

Aus der Neurologischen Klinik
der
Friedrich- Alexander- Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. S. Schwab

**Korrelation der Axon- Reflex- Antworten mit der C- Faserdichte in
Hautbiopsien bei Patienten mit Small- Fiber- Neuropathie**

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät
der Friedrich- Alexander- Universität
Erlangen- Nürnberg

vorgelegt von
Christine Johanna Senger
aus
Pegnitz



**Gedruckt mit Erlaubnis der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. J. Schüttler
Referent:	Priv.- Doz. Dr. med. A. Bickel
Korreferent:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. S. Schwab
Tag der mündlichen Prüfung:	12.03.2012

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1.1	HINTERGRUND UND ZIELE.....	1
1.2	METHODEN.....	1
1.3	ERGEBNISSE UND BEOBACHTUNGEN.....	1
1.3.1	<i>Sudometrie- und Axonreflexmessung.....</i>	<i>1</i>
1.3.2	<i>Zusammenhang zwischen Axonreflexmessung und intraepidermaler Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie.....</i>	<i>2</i>
1.4	PRAKTISCHE SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	2
2	EINLEITUNG.....	3
2.1	POLYNEUROPATHIE - KLINIK UND EINTEILUNG.....	3
2.2	SMALL- FIBER- NEUROPATHIEN.....	4
2.2.1	<i>Ätiologie.....</i>	<i>4</i>
2.2.2	<i>Klinik.....</i>	<i>5</i>
2.2.3	<i>Diagnostik.....</i>	<i>5</i>
2.2.4	<i>Therapie.....</i>	<i>6</i>
2.3	DER AXONREFLEX.....	7
2.4	DER AXONREFLEX IN DER KLINISCHEN ANWENDUNG.....	9
2.4.1	<i>Untersuchung der neurogenen Flarereaktion.....</i>	<i>9</i>
2.4.2	<i>Axonreflex- Schwitzen.....</i>	<i>11</i>
2.4.3	<i>Stimuli zur Induktion von Axonreflexen.....</i>	<i>12</i>
2.5	ZIEL DER ARBEIT.....	12
3	MATERIAL UND METHODEN.....	13
3.1	KLASSIFIZIERUNG DER STUDIENTEILNEHMER- EINTEILUNG NACH ÄTIOLOGIE.....	13
3.2	QUANTITATIVE SENSORISCHE TESTUNG.....	13
3.2.1	<i>Instrumentarium, Methoden und Hintergrund.....</i>	<i>13</i>
3.2.1.1	<i>Erfassung der taktilen Detektions- und der mechanischen Schmerzschwelle.....</i>	<i>13</i>
3.2.1.2	<i>Bestimmung von S/R- Funktionen.....</i>	<i>14</i>
3.2.1.3	<i>Wind- up.....</i>	<i>14</i>
3.2.1.4	<i>Vibrationsschwelle und Druckschmerzschwelle..</i>	<i>14</i>
3.2.2	<i>Praktische Durchführung der Untersuchung.....</i>	<i>14</i>

3.3	THERMOTEST.....	15
3.4	ELEKTRISCHE STIMULATION	16
3.5	LASER DOPPLER IMAGING.....	18
	3.5.1 Durchführung der Messung.....	18
	3.5.2 Auswertung der Bilder.....	19
3.6	SUDOMETRIE.....	20
	3.6.1 Versuchsaufbau und Messapparatur.....	20
	3.6.2 Abgrenzung zum QSART.....	21
	3.6.3 Messung.....	22
3.7	ERFASSUNG DER NERVENFASERDICHTE IN EINER HAUTBIOPSIE.....	23
	3.7.1 Durchführung der Hautbiopsie.....	23
	3.7.2 Verarbeitung der gewonnenen Stanzbiopsie und immunhistochemische Anfärbung der Hautschnitte.....	24
	3.7.3 Erfassung der Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie mittels Lichtmikroskopie.....	25
3.8	STATISTISCHE VERFAHREN.....	27
4	ERGEBNISSE.....	28
4.1	ALLGEMEINE PATIENTENDATEN.....	28
	4.1.1 Alter und Krankheitsdauer.....	28
	4.1.2 Schmerzhaftigkeit der Neuropathie.....	28
	4.1.3 Elektroneurographische Untersuchungen.....	29
	4.1.4 Thermotest.....	29
4.2	REIZANTWORTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER STROMSTÄRKE.....	30
	4.2.1 Flare- Messungen.....	30
	4.2.2 Sudometrie.....	31
4.3	ERFASSTE NERVENFASERDICHTE IN DER HAUTBIOPSIE...	31
4.4	ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEN MESSGRÖSSEN.....	33
	4.4.1 Korrelation zwischen klinischen Daten und der Ausprägung der Axonreflexantwort.....	33
	4.4.2 Korrelation zwischen Flare und Sudometrie.....	33
	4.4.3 Korrelation zwischen Thermotest und Axonreflexantwort...33	
	4.4.4 Korrelation zwischen Nervenfaserdichte in der Haut- biopsie und Sudometrie.....	33

4.4.5	<i>Korrelation zwischen Nervenfaserdichte in der Haut- biopsie und neurophysiologischen Untersuchungen.....</i>	34
4.4.6	<i>Korrelation zwischen Nervenfaserdichte in der Haut- biopsie und Flaremessung.....</i>	34
5	DISKUSSION.....	36
5.1	DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG VON AXONREFLEXEN BEI SMALL- FIBER- NEUROPATHIEN.....	36
5.2	BETEILIGUNG UNTERSCHIEDLICHER C- FASERN BEI SMALL- FIBER- NEUROPATHIEN.....	39
5.3	AXONREFLEXFLAREGRÖSSE IN ZUSAMMENHANG MIT DER INTRAEPIDERMALEN NERVENFASERDICHTHE	40
5.4	LASER DOPPLER IMAGER ZUR ERFASSUNG DER AXONREFLEXFLAREFLÄCHE.....	40
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	42
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	46
8	ANHANG.....	47
8.1	KLASSIFIKATION DER NERVENFASERN NACH ERLANGER/ GASSER.....	47
8.2	GERÄTE.....	47
8.3	IMMUNHISTOCHEMIE HAUTBIOPSIEN.....	48
8.4	AUFKLÄRUNGSBÖGEN.....	48
8.4.1	<i>Aufklärung zur Untersuchung unmyelinisierter (=dünner) Nervenfasern (Sudometriemessung).....</i>	48
8.4.2	<i>Einwilligungserklärung zur wissenschaftlichen Verwen- dung von Blut- bzw. Gewebeproben und personenbe- zogenen Daten.....</i>	50
8.5	QST- ERHEBUNGSBOGEN.....	52
9	DANKSAGUNG.....	53

1 Zusammenfassung

1.1 Hintergrund und Ziele

Aktuell existiert kein etabliertes Verfahren zur nicht-invasiven Untersuchung der Integrität unmyelinisierter Nervenfasern. Aus vorhergehenden Arbeiten ist bekannt, dass Axonreflex- Schwitzen und Axonreflex- Flare durch transkutane Stromreizung induziert werden können und die entsprechenden Reflexantworten mit der Anzahl der vorhandenen Nervenfasern korrelieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, Ergebnisse der genannten Axonreflexmessungen mit dem derzeitigen „Goldstandard“ der C- Faserdiagnostik, der mikroskopischen Zählung von Nervenfasern in Hautbiopsien, zu vergleichen.

1.2 Methoden

Insgesamt wurden an 9 Patienten Axonreflexe elektrisch induziert. Die Erfassung der Axonreflexantworten erfolgte mittels Laser-Doppler-Imaging und Sudometrie am Fußrücken.

Am gleichen Patientenkollektiv wurden Hautbiopsien an der Messstelle des Axonreflexes, entweder als Stanzbiopsie oder im Rahmen einer Suralisbiopsie, entnommen und nach immunhistochemischer Aufbereitung lichtmikroskopisch untersucht und schließlich die Ergebnisse der beiden unterschiedlichen Methoden korreliert.

1.3 Ergebnisse und Beobachtungen

1.3.1 Sudometrie- und Axonreflexmessungen

Bei allen Patienten war mit zunehmender Stimulationsstromstärke ein Anstieg der Schwitzrate und der Hautperfusion nachweisbar.

Zunächst setzte die Schweißproduktion ein und in kurzer zeitlicher Latenz war ein Axonreflex- Flare detektierbar. Die maximale Axonreflexflarefläche während der Stromapplikation wies starke interindividuelle Unterschiede auf, wohingegen die Flareintensität bei nahezu allen Patienten vergleichbar war.

1.3.2 Zusammenhang zwischen Axonreflexmessung und intraepidermaler Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie

Die intraepidermale Nervenfaserdichte nach European Federation of Neurological Societies (EFNS)- Standard wurde von zwei unabhängigen Untersuchern ohne Kenntnis der Resultate der C- Faser- Testung bestimmt. Die Ergebnisse der Faserzählung beider Untersucher korrelierten in hohem Maße ($r=0,84$; $p<0,05$). Hierbei zeigte sich, dass Axonreflexflares insbesondere mit der Dichte der dermalen Fasern korrelieren.

Die Größe der Axonreflexfläche zeigte eine hohe und signifikante Korrelation zur Dichte der unmyelinisierten intraepidermalen Nervenfasern (IENF).

Die IENF- Dichte zeigte sich indirekt proportional zur elektrischen Reizschwelle, der zur Induktion eines Axonreflexflares nötigen Stromstärke.

Die Intensität des Axonreflexflares wies hingegen keine signifikante Korrelation zur IENF- Dichte auf.

1.4 Praktische Schlussfolgerungen

Diese Arbeit zeigt, dass die Größe der Axonreflexflareafläche (ARFS) nach elektrischer Stimulation von C- Fasern signifikant mit der intraepidermalen Nervenfaserdichte zusammenhängt, die derzeit den „Goldstandard“ in der Diagnostik von C- Faser- Neuropathien darstellt.

Die Validität der Messung der ARFS nach elektrischer Stimulation von C- Fasern konnte bestätigt werden.

Die Etablierung dieser Methode könnte in Zukunft in der klinischen Routine dazu dienen, die Diagnostik von Small- Fiber- Neuropathien mithilfe eines nicht-invasiven Messverfahrens zu erleichtern.

2 Einleitung

2.1 Polyneuropathie - Klinik und Einteilung

Eine Vielzahl von Erkrankungen des peripheren Nervensystems werden unter dem Sammelbegriff Neuropathie zusammengefasst. Unterschieden werden die Neuropathien gemäß ihrer Ätiologie in primäre Neuropathien, die hereditär auftreten, und sekundäre Neuropathien, welche– exogen vermittelt– die Folge einer neuronalen, axonalen, entzündlichen oder autoimmunen Schädigung darstellen [8].

Die Klassifikation der Neuropathien wird u.a. auf der Grundlage des vorliegenden Schädigungsmusters vorgenommen. Differenziert wird zwischen Mononeuropathien, Polyneuropathien, autonomen Neuropathien und der Mononeuritis multiplex.

Andere Einteilungen erfolgen nach Art der Schädigung (axonal versus demyelinisierend), der Art der betroffenen Fasertypen oder der Ursache.

Die motorischen, sensiblen und autonomen Neurone, deren Somata in den Vorder-, Hinter- und Seitenhörnern des Rückenmarks und im Grenzstrang lokalisiert sind, sind über Axone mit ihren jeweiligen Erfolgsorganen verbunden und vermitteln ihre Informationen über Afferenzen bzw. Efferenzen. Je nach Funktion werden die Nervenfasern in verschiedene Fasertypen eingeteilt. Erlanger und Gasser unterscheiden im peripheren Nerven die Faserklassen A-C (vgl. Anhang Kapitel 8.1).

A δ - Fasern vermitteln als Hautafferenzen vor allem Temperaturempfinden und Schmerz, C- Fasern fungieren als Hautafferenzen für den Schmerz und als sympathische postganglionäre Efferenzen.

Die Ursachen für eine Nervenfaserschädigung sind sehr vielfältig, das jeweilige Ausfallsmuster zeigt eine gewisse Variabilität zwischen den einzelnen Patienten. Häufigste Ursache für eine Neuropathie ist mit ca. 35% ein Diabetes mellitus. Bei Patienten mit Typ 1- oder Typ 2- Diabetes liegt die Prävalenz, an einer sensomotorischen diabetischen Neuropathie zu erkranken, im Mittel bei etwa 30%. Etwa 10 - 15% der manifesten Diabetiker leiden an mehr oder minder ausgeprägten Schmerzen. Etwa 80% aller Diabetiker zeigen wenigstens leichte polyneuropathische Symptome in Form subjektiver Sensibilitätsstörungen [8].

Für Neuropathien gibt es noch eine Vielzahl weiterer Ursachen (vgl. Tab. 1).

2.2 Small- Fiber- Neuropathien

Neuropathien, bei denen die für die Vermittlung der Schmerzempfindung verantwortlichen Nervenfasern betroffen sind, führen häufig zur Entwicklung eines neuropathischen Schmerzsyndroms mit Parästhesien und Dysästhesien, welche als „Brennen“ oder „Ameisenlaufen“ empfunden werden und daher von den Patienten als besonders quälend beschrieben werden.

Die Small- Fiber- Neuropathie (SFN) stellt einen Subtyp der sensorischen Neuropathien dar, bei der ausschließlich bzw. überwiegend kleinkalibrige Nervenfasern (unmyelinisierte C- Fasern oder dünn myelinisierte A δ - Fasern) betroffen sind. Sie kommt mit einer Häufigkeit von ca. 3% vor. Die SFN kann in allen Altersgruppen auftreten.

Davon abzugrenzen ist die sehr viel häufigere Large- Fiber- Neuropathie (LFN), bei der eine Störung überwiegend im Bereich der großkalibrigen myelinisierten A β - Fasern vorliegt. Bei vielen Patienten liegt jedoch eine Mischform vor.

2.2.1 Ätiologie

Die wichtigsten Ursachen für eine SFN zeigt folgende Aufstellung:

Ätiologie	Beispiele
Primär/ Idiopathisch	
- Hereditär	Hereditäre motorisch-sensible Neuropathie (HMSN), Hereditäre sensible autonome Neuropathie (HSAN), fam. Amyloidneuropathie, M. Fabry
Sekundär/ Erworben	
- Metabolisch	Diabetes mellitus (ca. 35%), Hyperlipidämie
- Immunologisch/Infektiös/Postinfektiös	Vaskulitis, Sjögren Syndrom, Hepatitis C, HIV, Lepra, Borreliose, postviral
- Toxisch	- <u>Medikamentös</u> : z.B. Metronidazol - Alkohol
- Paraneoplastisch	

Tab. 1: Ursachen von Polyneuropathien [modifiziert nach [14]]

2.2.2 Klinik

Die Klinik einer SFN manifestiert sich in Störungen des Schmerz- und Temperaturempfindens bei erhaltener Propriozeption und in der Regel intakter Motorik. Schmerzen treten häufig nachts auf und führen konsekutiv zu schmerzbedingten Schlafstörungen.

Ferner können sensorische Störungen wie Schmerzen, Dysästhesien und Allodynien auftreten. Im Gegensatz dazu kann ebenso eine Minussymptomatik mit Hypästhesie und Hypalgesie in Form von abgeschwächter Empfindung imponieren. Das Vibrationsempfinden hingegen ist jedoch meist intakt, da dies eine Funktion dick bemerkter Nervenfasern darstellt.

Je nach Manifestationsform der SFN können zusätzlich autonome Störungen in Form von Schweißsekretionsstörungen (Hyperhidrosis/ Hypohidrosis/ Anhidrosis), vasomotorischen Störungen (z.B. Hypotonie) oder gastrointestinalen Symptomen auftreten. Bei bis zu 40% der männlichen Patienten mit SFN tritt im Verlauf eine erektile Dysfunktion auf [42].

2.2.3 Diagnostik

Zur Diagnosestellung einer Small-Fiber- Neuropathie müssen folgende Kriterien erfüllt sein [23]:

- a) Auffälliges klinisches Erscheinungsbild: schmerzhafte Parästhesien
- Positiv- Symptome: Kribbeln, Brennen, Prickeln, stechende oder einschießende Schmerzen (v.a. nachts), evtl. Vorliegen von Allodynie und Auftreten von Muskelkrämpfen
- Negativ- Symptome: Taubheit, Enge- und Kältegefühl
- Autonome Symptome: Gesteigerte oder verminderte Schweißsekretion, Augen- oder Mundtrockenheit, Änderungen der Hauttemperatur (< 50% der Patienten); Erektile Dysfunktion (≤ 40% der männlichen Patienten)

- b) Reduktion des Temperatur- und Schmerzempfindens bei normaler Kraftentfaltung; Lagesinn, Reflexstatus und i.d.R. Vibrationsempfinden ungestört.
- c) Pathologische Resultate spezieller Untersuchungen zur Diagnostik von SFN:
- Messung des galvanischen Hautwiderstandes (Sympathetic Skin Response SSR): Testung der sympathischen Sudomotorenfunktion: Ausfall
 - Quantitative sensorische Testung (QST): Thermhypästhesie
 - Quantitativer Sudomotor Axonreflex- Test (QSART): reduzierte Schweißantwort
 - Autonome Tests: z.B. Aufzeichnung der Herzratenvariabilität: Einschränkung der Herzratenvariabilität
- d) Hautbiopsie: Histologie: reduzierte Faserdichte

In den elektrophysiologischen Messungen, der Nervenleitgeschwindigkeitsmessung (NLG) und Elektromyographie (EMG), sind bei isolierter SFN regelhaft keine Pathologien nachweisbar, da diese Untersuchungen nur Aussagen zur Funktion großkalibriger Nervenfasern liefern können. Diagnostische Möglichkeiten stellen bisher die Bestimmung der sympathischen Hautantwort (Sympathetic Skin Response SSR), die Quantitative Sensorische Testung (QST), die Quantitative Sudomotor Axonreflex- Testung (QSART) und die Hautbiopsie dar.

2.2.4 Therapie

Kann eine Ursache der SFN gefunden werden, resultiert daraus evtl. eine kausale Therapie, die meist durch eine symptomatische Therapie ergänzt wird. Bei unzureichender Ätiologiekklärung beschränkt sich die Therapie auf eine symptomatische Behandlung, deren Zielsetzung eine Schmerzreduktion um mindestens 50% und eine konsekutive Verbesserung der Schlafqualität beinhaltet. Medikamentöse Therapieoptionen ergeben sich hier durch Behandlungen mit Antidepressiva (unter Ausnutzung schmerzdistanzierender Wirkungsweise), Antikonvulsiva und Opioiden [8].

2.3 Der Axonreflex

Bereits 1901 konnte Bayliss [1] zeigen, dass durch Reizung vom Rückenmark abgetrennter Hinterwurzeln eine gesteigerte Haut- und Organdurchblutung über periphere afferente Axone hervorgerufen wird. Die Impulsweiterleitung muss somit in antidromer Richtung, d.h. entgegengesetzt der normalen Richtung der Impulsübermittlung, erfolgt sein. Bayliss prägte daher den Begriff der „antidromen Vasodilatation“.

In engem Zusammenhang damit steht der Begriff des Axonreflexes. Im Jahre 1927 untersuchte Lewis [26] die Hautantwort auf einen punktförmigen noxischen Hautreiz.

Nach Applikation des noxischen Hautreizes entsteht eine lokale Rötung, in Folge kommt es zur Ausbildung einer lokalen Schwellung („weal“) und Bildung einer sogenannten „Quaddel“. Schließlich resultiert daraus die Ausbildung eines Erythems in der unmittelbaren Umgebung („flare“) [26]. Im Rahmen dieser neurogenen Entzündung wurde von Lewis diese Reaktion der Haut auf einen noxischen Reiz als „triple response“ beschrieben. Die periphere Erregung primär afferenter nozizeptiver Neurone bedingt diese „triple response“.

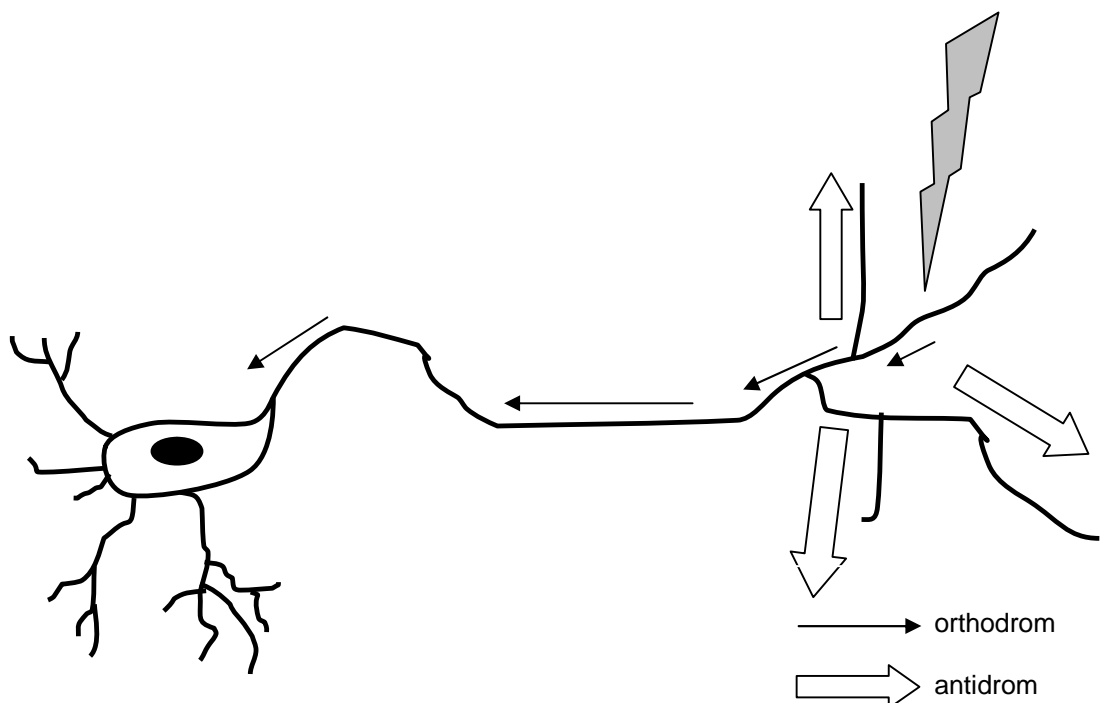


Abb. 1: Prinzip des Axonreflexes. Erläuterung siehe Text.

Die darauffolgende Depolarisation des Axons verläuft zunächst in orthodromer Richtung zum Soma des zugehörigen nozizeptiven Neurons (schwarze Pfeile Abb. Nr. 1). Gleichzeitig kommt es zur Erregung von Axonkollateralen beim Erreichen von axonalen Verzweigungen. Somit erfolgt parallel dazu eine Fortleitung des Impulses in antidromer Richtung mit darauffolgender Erregungsausbreitung in die Peripherie (weiße Pfeile Abb. Nr. 1) [32].

Die an den Nervenendigungen unmyelinisierter oder dünn myelinisierter Fasern erzeugten Aktionspotentiale werden daher nicht ausschließlich nach zentral fortgeleitet, sondern teilen sich an Axonverzweigungsstellen auf, werden zusätzlich in die Peripherie weitergeleitet und führen zur Depolarisation der übrigen Endigungen dieser Nervenfasern, indem sie in die terminalen axonalen Aufzweigungen der Haut eindringen.

Bei diesem Prozess kommt es zur Freisetzung zahlreicher vasoaktiver Neuropeptide. Zur Auslösung der präkapillären Vasodilatation spielt Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) eine bedeutende Rolle. Dies zeigt sich in Form eines entstehenden Flares an der Stimulationsstelle [7].

Neben CGRP erfolgte ebenfalls der Nachweis von Tachykininen wie Substanz P, Neurokinin A und Neurokinin B, welche ihre Wirkung nach Bindung an spezifischen Rezeptoren (NK1, NK2, NK3), zu denen sie eine unterschiedlich stark ausgeprägte Affinität aufweisen, entfalten [7].

Substanz P wird nach antidromer Erregung aus den nozizeptiven Afferenzen freigesetzt und führt zu einer neurogenen Vasodilatation und Plasmaextravasation. Die Wirkung von Substanz P ist stark abhängig von einem intakten Endothel und wird durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt [7].

Es lassen sich weitaus nicht alle Phänomene nach antidromer Nervenstimulation auf die alleinige Wirkung von Substanz P zurückführen. Die Induktion der Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung scheint zusätzlich durch sekundär aus Mastzellen freigesetztes Histamin bedingt zu sein [7]. Hierbei scheinen die Mastzellen, welche in unmittelbarer Nachbarschaft zu afferenten Nervenendigungen und Blutgefäßen lokalisiert sind, eine bedeutende Rolle zu spielen [17].

CGRP bedingt nach Freisetzung aus afferenten Nervenendigungen und Bindung an spezifische Rezeptoren eine intensive Vasodilatation. Das durch CGRP hervorgerufene Erythem ist, im Gegensatz zur Substanz P-induzierten Flareantwort, unabhängig von Histamin und bedingt eine erhöhte Gefäßpermeabilität durch eine direkte vasodilatatorische Wirkung des Peptids.

Durch transkutane elektrische Stimulation konnten Neuropeptidfreisetzung und Vasodilatation nachgewiesen werden. Die neurogene Proteinextravasation konnte bisher jedoch nur in Versuchsansätzen in der Haut von Ratten nachgewiesen werden [43].

Die Kombination aus Vasodilatation und Proteinextravasation wird als neurogene Entzündung bezeichnet.

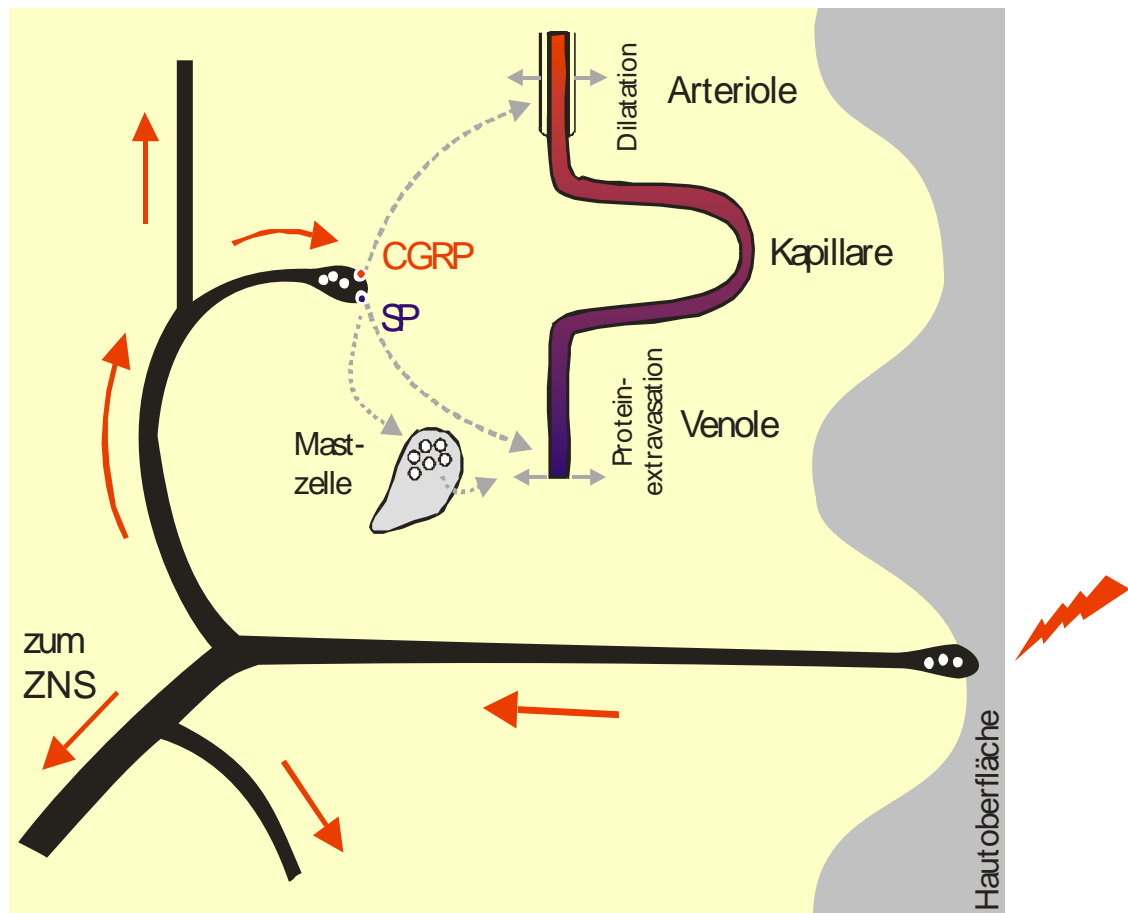


Abb. 2: Neurogene Entzündung: Zusammenhang von Axonreflex und vasoaktiven Peptiden [15]. Gedruckt mit freundlicher Genehmigung durch Prof. Dr. Dr. h.c. H. O. Handwerker

2.4 Der Axonreflex in der klinischen Anwendung

2.4.1 Untersuchung der neurogenen Flarereaktion

Die neurogene Vasodilatation wird durch die Erregung primär afferenter mechanoinsensitiver C- Fasern bedingt. Das makroskopische Korrelat der bezeichneten Gefäßerweiterung als flächenhafte Rötung in Umgebung zum Stimulationszentrum wird auch als neurogene Flarereaktion bezeichnet. Die Flare-

Antwort in Form eines Axonreflexflares in menschlicher Haut wird hauptsächlich von mechanoinsensitiven C- Fasern hervorgerufen [44].

Zur Messung des Blutflusses in der Haut wurde ein Laser- Doppler- Imager eingesetzt, mit dessen Hilfe der Blutfluss, der an der Mikrozirkulation der Haut beteiligten Gefäße, erfasst wurde. Die beurteilten Kapillaren befinden sich ca. 1 mm unter der Hautoberfläche und haben einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa 10 μm . Die Strömungsgeschwindigkeiten in diesen Kapillaren liegen zwischen 0,01 und 10 mm/s [49, 29].

Das Messverfahren basiert auf dem Dopplereffekt. Demnach wird ein niederfrequenter monochromatischer Laserstrahl nach Einfall auf die Haut durch die Bewegung der Partikel, an der Hautoberfläche v.a. Erythrozyten in den Blutgefäßen, reflektiert. Daraus resultiert eine Änderung des Frequenzspektrums. Das Licht, welches durch den Dopplereffekt in seiner Frequenz verändert wurde, lässt sich zusammen mit dem Licht, das an den statischen Elementen der Haut reflektiert wurde, mit Hilfe eines Photodetektors erfassen. Die Verarbeitung der Daten führt zu einer Messgröße, die als Flux bezeichnet wird und die charakteristische Intensität des Blutflusses in den oberflächlichen Hautabschnitten abbildet.

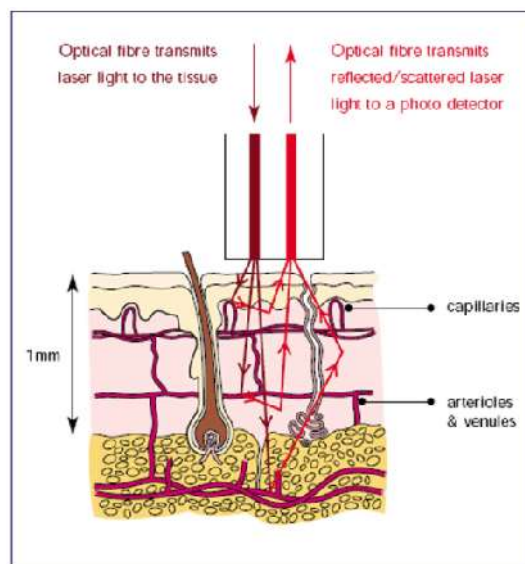


Abb. 3: Schematische Darstellung der Messung des Blutflusses durch Laser Doppler Imaging [31]

Der Flux ist dabei proportional zu dem Produkt aus der durchschnittlichen Geschwindigkeit der Blutzellen und der Konzentration der Blutzellen in dem unter-

suchten Hautabschnitt und wird in der Einheit „Perfusion units“ angegeben. Diese Größe ermöglicht eine Aussage über das Ausmaß einer Veränderung der Durchblutung in einem untersuchten Hautareal, z.B. im Bereich eines Erythems. Eine hohe zeitliche Auflösung ist dann gegeben, wenn der Flux nur an einem Punkt gemessen wird. Dies ermöglicht eine Aufzeichnung schneller Veränderungen des Blutflusses (Laser Doppler Flowmetry LDF) [49, 29].

Mithilfe der Laser Doppler Flowmetrie lässt sich die Intensität einer Hautrötung detektieren.

Die Bestimmung des Fluxes bei Neuropathiepatienten war bereits Gegenstand mehrerer Studien.

In Zusammenschau der bisherigen Untersuchungsergebnisse hat sich diese Messgröße jedoch nicht als hinreichend verlässlicher Parameter erwiesen. [38, 2].

In neueren Untersuchungen [6] konnte gezeigt werden, dass die Flaregröße ein geeigneter Parameter zur Einschätzung der C- Faser- Funktion ist. Die Fläche des Erythems ist ein Maß für die Integrität und Überlappung der C- Fasern. Die Intensität der Axon-Reflexreaktion hingegen hängt stark von der Gefäßfunktion und der Durchblutungsänderung in den jeweils untersuchten Hautarealen ab [30].

Die flächenhafte Ausdehnung eines Axonreflexflares lässt sich mithilfe des Laser Doppler Imagers (LDI) erfassen.

Hierbei wird durch einen Spiegel computergesteuert ein niederfrequenter Laserstrahl über ein definiertes Hautareal gelenkt. Dadurch wird die Ausprägung einer Durchblutungsänderung in einem bestimmten Hautareal aufgezeichnet [12].

Die Größe eines Axonreflexflares kann damit genau aufgezeichnet und erfasst werden.

2.4.2 Axonreflex- Schwitzen

Die Integrität afferenter C-Fasern lässt sich mithilfe des Axonreflex- Flares abbilden. Zur Darstellung der Funktion efferenter C- Fasern kann ein ähnlicher Test angewendet werden. Bei der Depolarisation peripherer Hautendigungen sympathischer C- Fasern wird ebenfalls durch eine antidrome Erregungsausbreitung ein Axonreflex ausgelöst.

Dort werden die Schweißdrüsen durch Acetylcholin, welches aus den efferenten sympathischen C- Faserendigungen freigesetzt wird, stimuliert. Daraus resultiert das Axon- Reflexschwitzen.

Der Quantitative Sudomotor Axonreflex- Test (QSART) ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung peripherer Nervenfasern, welches sich diesen Effekt zu Nutze macht [27, 28].

2.4.3 Stimuli zur Induktion von Axonreflexen

Die Induktion neurogener Flare- Reaktionen kann unter anderem durch Acetylcholin- [38] und Histaminiontophorese [6] erfolgen.

Die Anzahl der durch chemische Reize hervorgerufenen Aktionspotentiale in C- Fasern weist eine große Variabilität auf. Krämer [22] konnte 2004 zeigen, dass die Induktion neurogener Flarereaktionen durch elektrische Stimulation der chemischen Induktion überlegen ist, da die Steuerung der Reize einfacher und unabhängig vom Subtyp der Faserklasse erfolgen kann.

2.5 ZIEL DER ARBEIT

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes der Klinik für Neurologie und dem Institut für Physiologie der Friedrich- Alexander- Universität Erlangen/ Nürnberg wurde innerhalb der letzten Jahre ein Verfahren zur simultanen Analyse des Axonreflexes der C-Faser- Nozizeptoren und des Axonreflexes der Sudomotoren entwickelt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Zusammenarbeit mit der Dermatologischen Klinik der Friedrich- Alexander- Universität Erlangen/ Nürnberg, diese Testverfahren zur Evaluation der Small- Fiber- Schädigung mit der intraepidermalen Nervenfaserdichte in Hautstanzbiopsien, dem bisherigen „Goldstandard“ in der Small- Fiber- Diagnostik, zu vergleichen. Anhand dessen sollte eine nicht- invasive Methode zur Diagnostik von Small- Fiber- Neuropathien zur möglichen Integration in die klinische Diagnostik validiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Klassifizierung der Studienteilnehmer- Einteilung nach Ätiologie

Bei den Studienteilnehmern handelte es sich um Patienten der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Erlangen, die sich zur Abklärung einer Neuropathie in stationärer Behandlung befanden. Alle Studienteilnehmer waren von einer schweren Neuropathie betroffen. Die Ätiologie der Neuropathie war bei allen, mit Ausnahme eines Patienten, der an einer diabetischen Neuropathie erkrankt war, zum Zeitpunkt der Messungen nicht geklärt. Bei allen Teilnehmern zeigte sich klinisch das Bild einer Small- Fiber- Neuropathie. Manche der Patienten wiesen zusätzlich aufgrund der Beschwerdesymptomatik noch Zeichen einer Large fiber- Beteiligung auf, die sich in einer fehlenden Auslösbarkeit des Achillessehnenreflexes sowie pathologischen Resultaten in elektrophysiologischen Messungen (Nervenleitgeschwindigkeitsmessungen) zeigten (vgl. Tab.4).

3.2 Quantitative Sensorische Testung

3.2.1 Instrumentarium, Methoden und Hintergrund

Die Quantitative Sensorische Testung (QST) wurde am gesamten Patientenkollektiv zur Quantifizierung der Funktionen des somatosensorischen Nervensystems und zur Testung der Eigenschaften verschiedener Submodalitäten, die von verschiedenen Gruppen afferenter Nervenfasern vermittelt werden, durchgeführt. Die QST wurde am Fußrücken in jenem Areal vorgenommen, welches auch für die Sudometrie und die Flaremessung ihre Anwendung fand.

3.2.1.1 Erfassung der taktilen Detektionsschwelle und der mechanischen Schmerzschwelle

Zur Erfassung der taktilen Detektionsschwelle kam ein Set standardisierter von-Frey- Haare in den Stärken 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 und 256 mN zum Einsatz [13].

Mittels einer modifizierten „Grenzwert- Methode (method of limits)“ wurde der geometrische Mittelwert der taktilen Detektionsschwelle in fünf Serien auf- und absteigender Stimulusintensitäten ermittelt. Zur Bestimmung der mechanischen Schmerzschwelle wurde ein Set von Nadelreizstimulatoren (von-Frey-Haare)

mit standardisierten Stimulusintensitäten von 8, 16, 32, 64, 128, 256 und 512 mN sowie einer flachen Kontaktfläche von 0,2 mm Durchmesser verwendet.

3.2.1.2 Bestimmung von Stimulus/Response- Funktionen

Die Stimulus/Response (S/R)- Funktionen beinhalteten die Bestimmung der mechanischen Schmerzsensitivität der Haut sowie der mechanischen Allodynie bei bewegten Reizen.

3.2.1.3 Wind- up

Zur Ermittlung einer Schmerzzunahme bei wiederholten Nadelreizen wurde ein Wind- up- Test durchgeführt. Hierbei kam ein Nadelreizstimulator mit standardisierter Stimulusintensität (256 mN) sowie einer flachen Kontaktfläche (Durchmesser 2mm) zum Einsatz.

Die zunehmende Empfindungsstärke bei wiederholter Applikation eines konstanten Reizes (Reizserie) wird als „wind up“ bezeichnet.

3.2.1.4 Vibrationsschwelle und Druckschmerzschwelle

Die Vibrationsschwelle wurde anhand eines Stimmgabeltests am Großzehengrundgelenk (64 Hz, 8/8 Skala) erfasst. Zur Einschätzung des Druckschmerzes über der Fußinnenmuskulatur (im Bereich des M. abductor hallucis) wurde ein stumpfer mechanischer Stimulator (Kontaktfläche 1 cm², applizierte Kraft bis 20 kg/ 2000 kPa / 200 N) mit eingebauter Ablesemöglichkeit zur Druckmessung verwendet. Diese Messung diente zur Evaluation von Tiefenschmerz, indem die Druckschmerzschwelle über dem genannten Muskel bestimmt wurde.

3.2.2 Praktische Durchführung der Untersuchung

Die Praktische Durchführung der Quantitativen Sensorischen Testung (QST) erfolgte nach der standardisierten Testbatterie für die sensorische Testung der Universität Mainz (vom 19.04.2002) [R. Rolke, K. Andrews, W. Magerl, R.-D. Treede (Institut für Physiologie und Pathophysiologie Universität Mainz)].

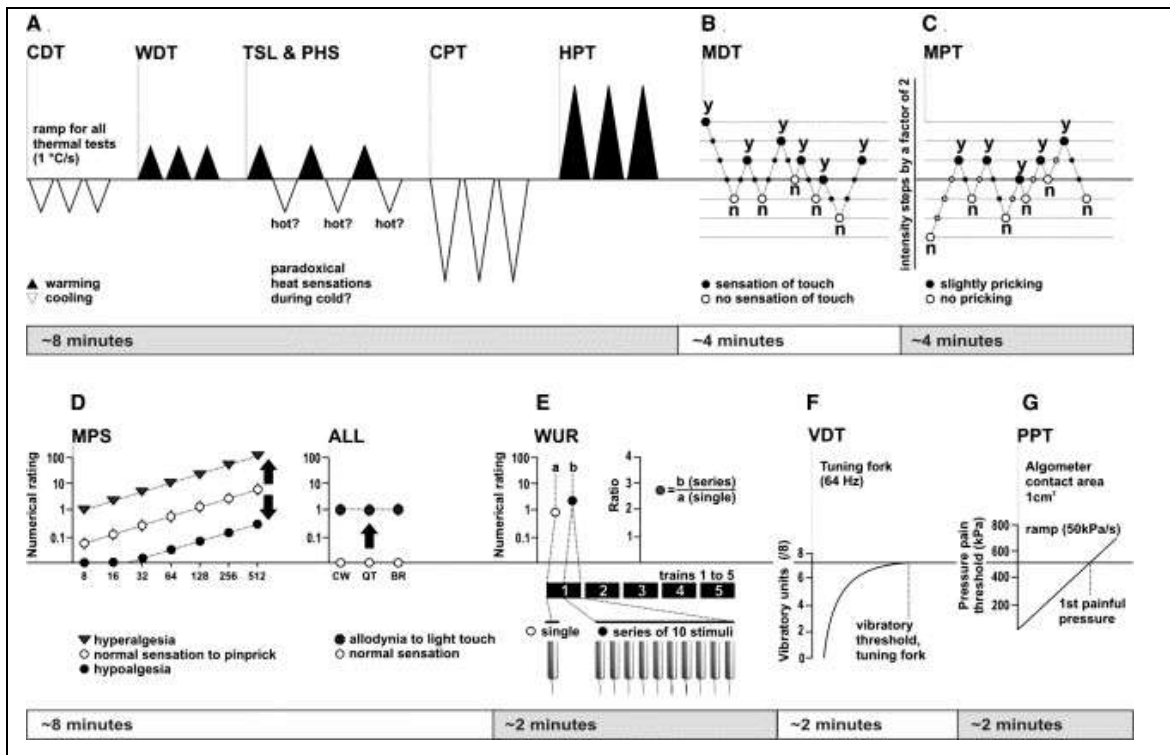


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ablaufes einer Quantitativen Sensorischen Testung nach standardisiertem Protokoll [41]

3.3 Thermostest

Zur Durchführung des Thermostests wurde ein Thermostestgerät (Somedic, Stockholm, Schweden) benutzt. Eine Thermode mit einer Auflagefläche von 2 x 5 cm wurde auf dem Fußrücken des Patienten befestigt. Beginnend bei einer Ausgangstemperatur von 32 °C wurden im Folgenden zunächst die Wahrnehmungsschwellen für kalte und warme Reize ermittelt. Der Schwellenwert von fünf aufeinanderfolgenden Reizen wurde gemittelt. Die thermische Unterschiedsschwelle (TSL= thermal sensory limen) zwischen alternierenden kalten und warmen Stimuli wurde bestimmt. Der Patient wurde aufgefordert anzugeben, wann eine Temperaturänderung spürbar war und diese als „warm“ oder „kalt“ einzustufen. Somit war eine Detektion von paradoxen Wärmeempfindungen möglich. Analog zur Ermittlung der Empfindungsschwelle für „warm“ und „kalt“ wurden in diesem Test die Kälte- und Hitze- Schmerzschwelle für warme und kalte Reize ermittelt.

3.4 Elektrische Stimulation

Zur gleichzeitigen Induktion von Axonreflex- Flare und Axonreflexschwitzen wurden über einen Constant current stimulator elektrische Reize auf das zu untersuchende Hautareal am dorsalen Fuß (Fußrücken) aufgebracht. Die elektrischen Reize wurden durch einen Pulsgenerator mit einer vorgegebenen Frequenz von 1 Hz ($1/s = s^{-1}$) erzeugt und über die beiden Oberflächenelektroden innerhalb der Sudometriekammer auf die Haut appliziert.

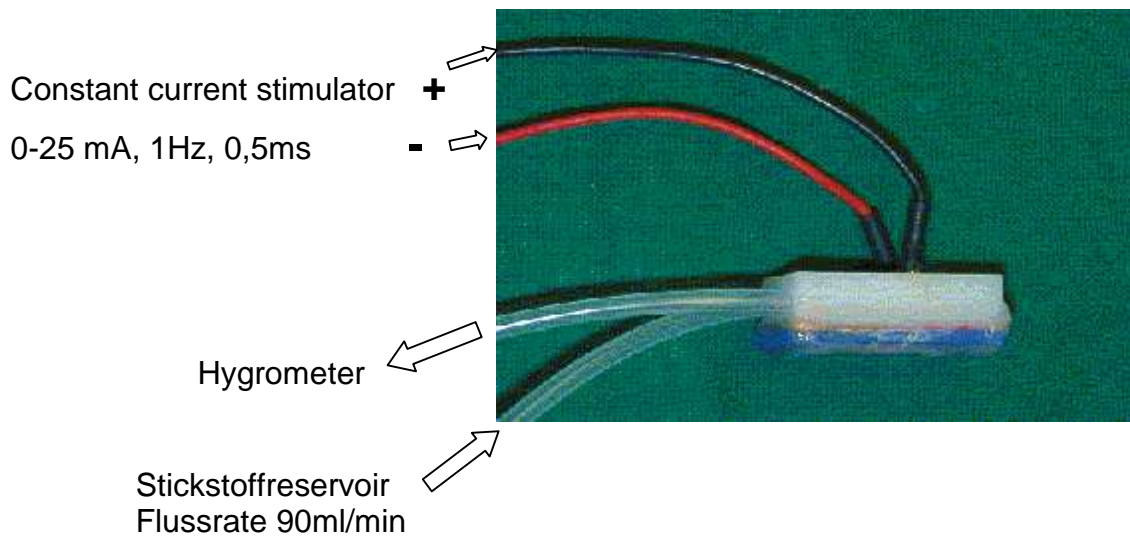


Abb.5: Sudometriekammer

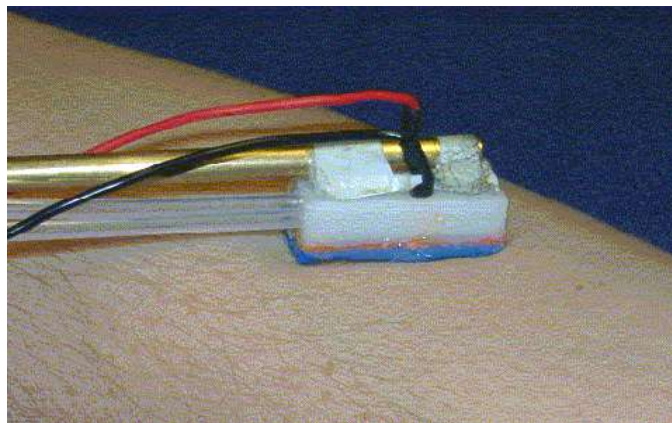


Abb.6: Sudometriekammer unter Messbedingungen auf der Haut eines Patienten

Die initiale Stromstärke betrug 0 mA und wurde langsam kontinuierlich innerhalb einer Minute auf 8 mA gesteigert. Eine weitere Erhöhung der Stromstärke

erfolgte nach festgelegtem Studienprotokoll (vgl. Tab. 2) von 10 mA auf 20 mA in Schritten von 2,5 mA innerhalb von 15 Sekunden.

Zeit	mA	Bild
0 - 5.15 min	0	1 / 2
5.15 – 8.00 min	bis auf 8 mA in 1 min	3
8.00 – 10.45 min	10 mA in 15 sec	4
10.45 – 13.30 min	12,5 mA in 15 sec	5
13.30 – 16.15 min	15 mA in 15 sec	6
16.15 – 19.00 min	17,5 mA in 15 sec	7
19.00 – 21.45 min	20 mA in 15 sec	8
21.45 – 24.30 min	25 mA in 15 sec	9
24.30 – 27.15 min	0 mA	10
27.15 – 30.00 min	0 mA	11
evtl. 30.00 – 32.45 min	0 mA	12
evtl. 32.45 – 35.30 min	0 mA	13
evtl. 35.30 – 38.15 min	0 mA	14

Tab. 2: Versuchsprotokoll der elektrischen Stimulation

Nach jeweiliger Steigerung um 2,5 mA blieb die erreichte Stromstärke für zwei Minuten und 45 Sekunden konstant. Nach Erlangung einer Stromstärke von 20 mA wurde je nach Toleranz des Patienten eine letzte Steigerung um 5 mA zum Erreichen einer Endstimulationsstromstärke von 25 mA angestrebt. Nach Ende der Stimulation schloss sich eine Abklingphase an, in der die Sudometriekammer am Fußrücken belassen wurde, jedoch keine weitere Stromapplikation erfolgte. Über einen Zeitraum von zwei Minuten und 45 Sekunden wurden das Abklingen des Axonreflex- Flares und die Rückbildung des Axonreflex- Schwitzens beobachtet.

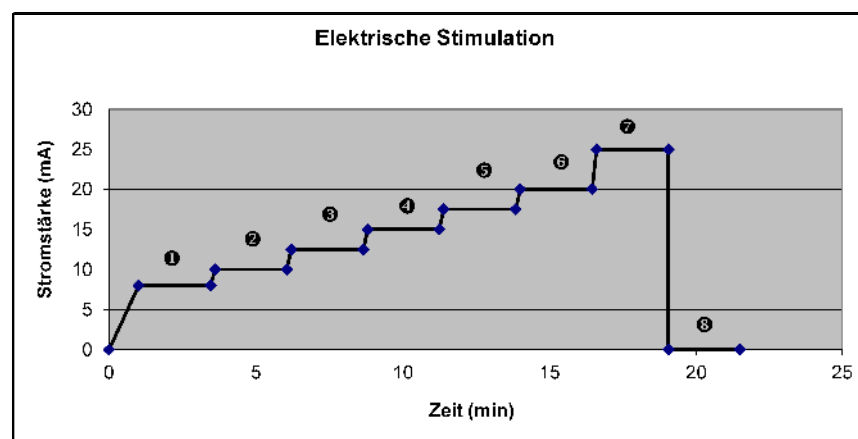


Abb. 7: Schematische Darstellung der elektrischen Stimulation

Die angegebenen Zahlen (1-8) zeigen das Zeitintervall der Aufzeichnung der Bilder mittels LDI an.

Die Darstellung der in die Messung eingehenden Parameter liegt in Tab. 3 vor.

Stromstärke	Spannung	Impulsbreite	Impulsfrequenz
0 – 25 mA	Max. 400 V	0,5 ms	1 Hz

Tab. 3: Parameter für die Stromstimulation

Aufgrund der elektrischen Stimulation wurden C- Fasern erregt, die beim Patienten eine Schmerzempfindung auslösten. Zur Erfassung der Schmerzintensität wurden die Patienten deshalb gebeten, jeweils nach Steigerung der Stromstärke ein Rating zur Bestimmung ihrer individuellen Schmerzempfindung unter Zuhilfenahme einer numerischen Ratingskala (0= „kein Schmerz“ bis 10= „maximaler Schmerz“) durchzuführen.

3.5 Laser Doppler Imaging

3.5.1 Durchführung der Messung

Zur quantitativen Erfassung der Größe des Axonreflex- Flares (ARFS) fand ein Laser Doppler Imager (LDI) (Moore, London, UK) Anwendung.

Eine Darstellung des zur Aufzeichnung des Axonreflexflares verwendeten Laser Doppler Imagers findet sich in Abb. 8.



Abb.8: Laser Doppler Imager [31]

In einer Entfernung von 45 cm wurde mittels des Lasers eine rechteckige Hautfläche in Umgebung zum Stimulationsareal erfasst. Die zweidimensionale Auflösung lag bei 0,5 mm. Gemäß dem Protokoll der Stromstimulation erfolgte die Aufnahme eines Laser- Doppler- Bildes jeweils im Abstand von zwei Minuten und 45 Sekunden. Zusätzlich wurden vor Beginn der elektrischen Stimulation zwei Bilder zur Festlegung des Ausgangszustandes (Baseline- Bilder) aufgenommen. Die Aufnahme des Laser- Doppler- Bildes begann mit Erreichen der Stromstärke (nach einer Steigerung innerhalb von 15 Sekunden auf die nächsthöhere Stromstärke). Der Laserstrahl startete in einer Ecke des zu erfassenden rechteckigen Messareals, hatte nach einer Minute und 22,5 Sekunden die Hälfte des Bereichs abgebildet und zum Ende (also nach zwei Minuten und 45 Sekunden) das gesamte Areal erfasst.

Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe der Steuerungssoftware des LDI (moorLDI Measurement V3.08) ausgewertet. Die aufgezeichneten Bilder standen für eine spätere computergestützte Auswertung zur Verfügung.

Die Durchführung der Messung lief automatisiert ab. Signale zur Steuerung erhielt der Laser- Doppler- Imager von einem handelsüblichen Personalcomputer, welcher mit o.g. Software ausgestattet war.

3.5.2 Auswertung der Bilder

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software moorLDI Image Processing Measurement V3.08. Die Größe und Intensität (Flux) der neurogenen Flarereaktion wurden im Anschluss an die Messungen mittels einer speziellen Software (MLDI 3.0, Moore, UK) ermittelt. Die Flare- Fläche wurde als Anzahl von Pixeln definiert, deren Fluxwerte den mittleren Flux des Baseline- Bildes (vor der Stimulation) um zwei Standardabweichungen übertrafen [33]. Anschließend wurde in jedem Bild der Flare mit Hilfe der Region-Of-Interest- Technik (ROI) markiert. Die Software errechnete die Fläche sowie den Prozentsatz der Pixel, deren Fluxwerte zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert des Fluxes im Baseline- Bild lagen. Um eine definitive Vergleichsmöglichkeit herzustellen, wurden beide Größen multipliziert. Zusätzlich fand zur Bestimmung der Intensität des Axonreflexes eine Registrierung des durchschnittlichen Fluxwertes der Pixel statt.

3.6 Sudometrie

3.6.1 Versuchsaufbau und Messapparatur

Zur Beurteilung der Integrität efferenter sympathischer C- Fasern wurden sudometrische Messungen in Form eines modifizierten QSART durchgeführt [24].

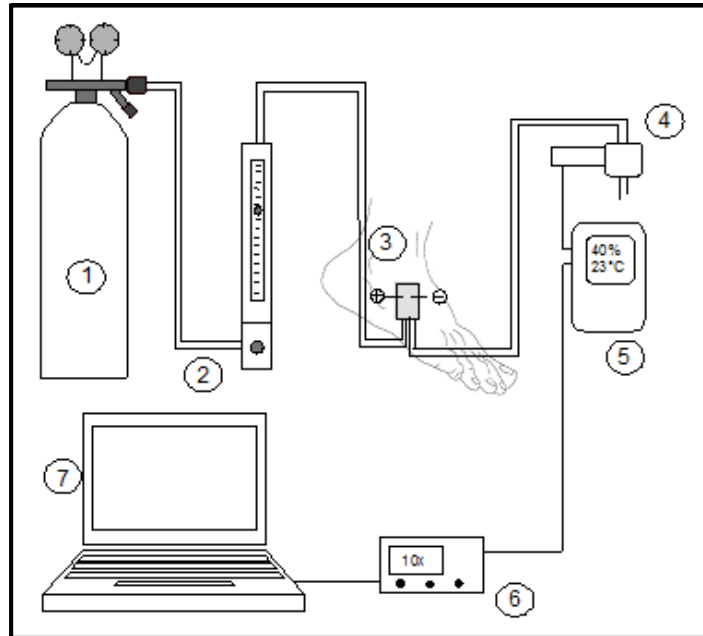


Abb. 9: Schematische Darstellung der Sudometrieinheit: Die Zahlen beziehen sich auf die Angaben im Text [modifiziert nach [24]].

Zur Erfassung der Schwitzrate wurde die Messkammer (3) luftdicht auf den Fußrücken des Patienten aufgebracht. Durch eine Siliconbeschichtung am Unterrand passt sich die Kammer Unebenheiten des Fußes an und gleicht diese aus.

Aus einer Gasflasche (1) wurde trockener Stickstoff (relative Feuchtigkeit < 5%) über einen Silikon Schlauch (Durchmesser 4 mm) der Kammer auf dem Fußrücken des Patienten zugeführt. Zur Regulation der Stickstoffflussrate befand sich zwischen der Gasflasche und der Messkammer ein Durchflussmengenbegrenzer (2). Die Durchflussmenge lag konstant bei 90ml/s.

Mit Beginn der Stromstimulation über die beiden Stimulationselektroden, die sich an der langen Seite innerhalb der Messkammer befanden, setzte bei den Patienten die Schweißproduktion in den Innervationsgebieten der stimulierten Nervenfasern ein. Der über den zuführenden Schlauch in die Kammer eingeleitete trockene Stickstoff nahm die aufgrund der steigenden Schweißproduktion verdunstete Feuchtigkeit auf. Diese wurde über einen abführenden Silikon-

schlauch einem Hygroskop (5) zugeführt. Zwischen der Messkammer und dem Hygroskop war ein Feuchtigkeitssensor (4) zwischengeschaltet, der sowohl die relative Luftfeuchtigkeit des zugeführten Stickstoffs, als auch dessen Temperatur messen konnte. Diese beiden Werte waren auf dem Hygroskop abzulesen. Die gemessenen Werte wurden über einen Analog- Digital- Wandler in einen Computer eingespeist. Somit konnte eine fortlaufende Registrierung und Aufzeichnung der relativen Luftfeuchte in der Kammer erfolgen.

Da sich die Schweißproduktion abhängig von der Hauttemperatur verändert, fanden die Messungen bei einer konstanten Raumtemperatur von ca. 23 °C nach ca. 15 Minuten Akklimatisierung des Patienten unter standardisierten Bedingungen statt.

3.6.2 Modifikationen des QSART

Im Vergleich zum konventionellen QSART wurde die hier verwendete Messapparatur unter folgenden Gesichtspunkten modifiziert:

Die Größe der Messkammer wurde reduziert (12,5 mm x 25,5 mm, Fläche ca. 3 cm²).

Dies trug dazu bei, dass die Fläche des mit zu erfassenden Axonreflex- Flares besser nachvollzogen werden konnte. Durch die Optimierung der Kammergröße war eine gleichzeitige Erfassung der Intensität und Größe der, durch die Stimulation hervorgerufenen, neurogenen Rötung (Axonreflex- Flare) und des Schwitzens über die Sudometriekammer möglich.

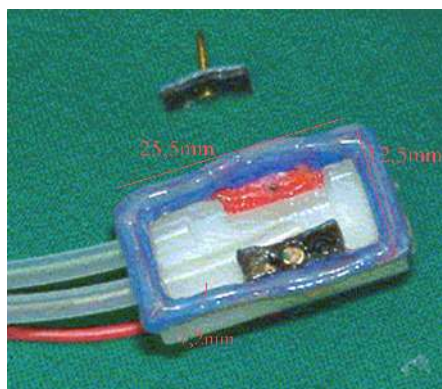


Abb. 10: Unterseite der Messkammer mit Stimulationselektroden und zu- bzw. abführendem Schlauch

Aufgrund der reduzierten Kammergröße musste die Flussrate des eingeleiteten trockenen Stickstoffs auf einen Wert von 90 ml/min angepasst werden.

Die elektrische Stimulation erfolgte, anstatt über die Iontophorese- Einheit beim konventionellen QSART, hier über zwei rechteckige Oberflächenelektroden (3 mm x 10 mm), die sich an der Längsseite im Inneren der Messkammer befanden.

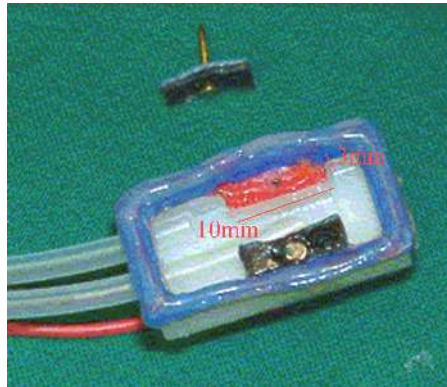


Abb. 11: Unterseite der Messkammer mit Stimulationselektroden und zu- bzw. abführendem Schlauch

Die Kammer war über eine Feder an einem Dreifuß befestigt. Dadurch wurde ein kontinuierlicher Druck auf das zu messende Hautareal unter der Kammer ausgeübt. Dies gewährleistete einen permanenten luftdichten Abschluss der Messkammer auf der Haut.

3.6.3 Messung

Bei jedem Patienten erfolgte die Messung der neurogenen Flare- Reaktion und des Axonreflexschwitzens am dorsalen Fuß (Fußrücken).

Zur Minimierung des Hautwiderstandes wurde das Messareal in einigen Fällen mit einer geringen Menge an Elektrodengel vorbehandelt. Ein luftdichter Abschluss des Messareals wurde durch die Silikonbeschichtung am Unterrand der Messkammer gewährleistet.

Die Messung der Schweißproduktion wurde zwei Minuten und 25 Sekunden vor Beginn der elektrischen Stimulation begonnen und noch über einen Zeitraum von acht Minuten und 15 Sekunden nach Abschluss der Stimulation fortgeführt.

Die Schweißproduktion wurde bei einer festgelegten Reizstärke als mittlere Schweißfreisetzung während eines Stimulationsabschnittes mit konstanter Reizstärke bestimmt.

Zusätzlich wurde für jeden Abschnitt die Schweißabgabe kumuliert und als Fläche unter der Kurve (Area under the curve / AUC) berechnet.

Jedem Abschnitt der Sudometriemessung konnte genau ein LDI- Bild zugeordnet werden.

Die Errechnung der Schwitzrate (SR) erfolgte gemäß den physikalischen Zusammenhängen [24]:

$$AH = (AH_{\max} * RH) / 100$$

Die absolute Feuchtigkeit (AH) als Wassermenge/ Luftvolumen wird hierbei in gH₂O/ m³ angegeben. AH_{max} beschreibt die maximale absolute Feuchtigkeit bei einer definierten Temperatur. RH stellt die relative Feuchtigkeit dar.

Die Schwitzrate (SR) kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$SR = AH * F / A \text{ (mg/cm}^2\text{*min)}$$

F = Flussrate des Stickstoffs, welcher die Kammer durchströmt

A = Hautareal, welches durch die Kammer eingeschlossen wird

Zur quantitativen Erfassung muss der Gasfluss durch die Schwitzkammer angepasst werden, damit die Feuchtigkeit am Sensor unterhalb der Schwitzrate gehalten werden kann. Bei maximaler Feuchtigkeit würde das Wasser an den Innenwänden der Gasschläuche kondensieren und somit vom Hygrometer nicht erfasst werden.

3.7 Erfassung der Nervenfaserdichte in einer Hautbiopsie

3.7.1 Durchführung der Hautbiopsie

Die Durchführung der Hautbiopsie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. G. Heyer (Dermatologische Universitätsklinik der FAU Erlangen/ Nürnberg). Die Studienteilnehmer erhielten alle einen ausführlichen Aufklärungsbogen über die Durchführung der Hautbiopsien und eine Einwilligungserklärung zur wissen-

schaftlichen Verwendung der gewonnenen Gewebeproben und personenbezogenen Daten [Ein Muster der Einwilligungserklärung befindet sich im Anhang in Kapitel 8.4]. Die Hautbiopsien wurden gemäß dem Antrag an den ELAN- Fonds (Fonds für Forschung und Lehre des Klinikums der Friedrich- Alexander- Universität Erlangen Nürnberg) nach erfolgtem Ethikvotum durchgeführt.

Die Hautbiopsie wurde als Stanzbiopsie am distalen, lateralen Unterschenkel 5 cm oberhalb des Malleolus lateralis, nach Lokalanästhesie mit Lidocain, unter sterilen Bedingungen aus den oberen Hautschichten entnommen. Die gewonnene Hautprobe hatte einen Durchmesser von ca. 3mm. Nach der Entnahme wurde die gewonnene Probe sofort in kalter 2% Zamboni- Lösung über einen Zeitraum von einer Stunde fixiert.

Der durch die Biopsie entstandene Hautdefekt wurde mit einer Einzelknopfnahrt verschlossen und mit einem sterilen Pflaster abgedeckt.

Bei denjenigen Patienten, welche sich bereits im Rahmen der Ätiologieabklärung ihrer Polyneuropathie während des stationären Aufenthaltes in der Neurologischen Universitätsklinik einer Suralisbiopsie unterzogen hatten, wurde keine erneute Stanzbiopsie durchgeführt, sondern konservierte Haut der bereits im Vorfeld erfolgten Biopsie untersucht.

3.7.2 Verarbeitung der gewonnenen Hautbiopsie und immunhistochemische Verarbeitung der Hautschnitte

Nach initialer Fixierung in 2%iger Zamboni-Lösung erfolgte eine Aufbewahrung der Probe in 1% Na- Azid- Puffer für 2h. Der Na- Azid- Puffer wurde nach einer Stunde ausgewechselt.

Im Anschluss daran wurde die Probe über Nacht in kaltem 15% Saccharose-Puffer gewässert. Die weitere Aufbewahrung der Probe bis zur endgültigen Verarbeitung erfolgte in einer Tiefkühltruhe bei -80 °C.

Zur Herstellung eines Gefrierschnittes wurde Methylbutan in ein Becherglas gegeben und in einem Bad von flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von -80 °C gebracht. Die Probe wurde zunächst mit Tissue- Tec- Kleber fixiert und für ein bis zwei Minuten in das Methylbutan- Bad (bei -80 °C) eingetaucht. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung im Gefrierschrank bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung.

In einem weiteren Arbeitsschritt wurde die Probe geschnitten (Gefrierschnitte: Schichtdicke ca. 12 µm). Jeweils zwei bis drei Kryostatschnitte wurden auf einem mit Poly- Lysin beschichteten Objektträger fixiert.

Zur Vorbereitung der Schnitte für die Färbung wurden die Objektträger aus dem Gefrierschrank entnommen und eine Stunde an der Luft getrocknet, anschließend wurden sie für 5min in eine Küvette mit TBS (Triton-Puffer, pH 7,3) gestellt.

Danach wurden die Proben über den Zeitraum von einer Stunde in einer Lösung aus TBS + 1% BSA + 0,5% Triton X 100 + 5% Esel- Normalserum vorinkubiert und anschließend 5 Minuten in TBS gewaschen.

Im Folgenden wurde ein primärer Antikörper [AK guinea pig α PGP 9.5 (Chemicon, Temacula, CA, USA)] in der Verdünnung 1: 500 auf den Objektträger aufgebracht und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Eine unspezifische Antikörperbindung wurde durch die Inkubation mit 5% normalem Eselserum unterbunden. Spezifische Kontrollen liefen parallel mit unbehandeltem Serum. Die PGP- Bindung wurde über einen sekundären Esel- Anti- Meer-schweinchen- Antikörper (Donkey- Anti- Guinea Pig- AK) gekoppelt an Cy 3 (Dianova, Boston, MA, USA, Verdünnung 1:500) nachgewiesen. Die darauf folgende Inkubationszeit der behandelten Proben im Dunkeln betrug eine Stunde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger drei Mal für 5 Minuten in TBS gespült.

Die fertigen Proben wurden mit TBS- Glycerin (pH 8,6) eingedeckt und anschließend lichtgeschützt in einer Mappe im Kühlschrank bis zum Zeitpunkt des Mikroskopierens aufbewahrt.

[Eine Aufstellung der verwendeten Antikörper und Puffer- Lösungen befindet sich im Anhang in Kapitel 8.3].

3.7.3 Erfassung der Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie mittels Lichtmikroskopie

Die Ermittlung der Nervenfaserdichte in der gewonnenen Hautbiopsie erfolgte anhand zweier verschiedener Zählverfahren. Zum einen wurde die Dichte der Nervenfasern unter Anwendung des geltenden EFNS- Standards, zum anderen nach einer eigenen Zählweise festgelegt.

Die Zählung nach den Richtlinien der European Federation of Neurological Societies (EFNS) [25] beinhaltete folgende Vereinbarungen:

- Nervenfasern, welche die Grenze zwischen Dermis und Epidermis durchbrachen, wurden als eine Faser erfasst (A).
- Eine Aufspaltung der Nervenfasern nach Durchsetzen der Basalmembran ging als eine Einheit in die Zählung ein (B).
- Eine Aufspaltung einer Nervenfasern innerhalb der Dermis unterhalb der Basalmembran wurde als zwei Fasern erfasst (C). Gleiche Vorgehensweise betraf eine Aufspaltung direkt in der Ebene der Basalmembran (D). Ein Nervenfragment, welches die Basalmembran durchsetzt und die Epidermis erreicht, wurde ebenfalls als eine Faser gewertet (E).
- Fragmente von Nerven, welche lediglich die Grenze zur Epidermis erreichten (F), sowie isoliert in der Epidermis liegende Nervenfragmente ohne Kontakt zur Basalmembran (G) wurden in der Zählung nicht berücksichtigt.

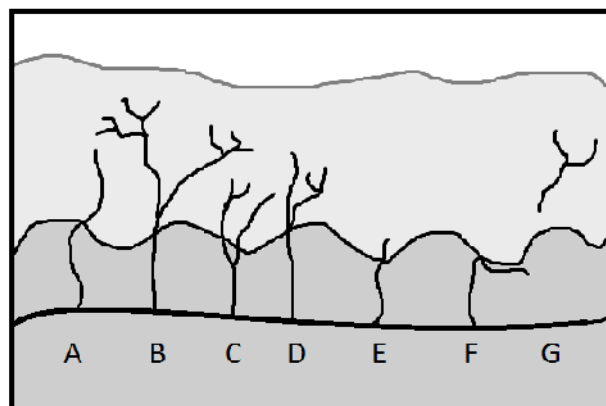


Abb. 12: Schematische Darstellung der Faserzählung nach EFNS- Richtlinien, die Buchstaben A-G beziehen sich auf die ausführliche Erläuterung in oben genanntem Text.

Die Nervenfaserdichte wurde zusätzlich zum geltenden EFNS- Standard nach einer eigenen Methode bestimmt. Hierbei wurden alle epidermalen, dermalen und Crossing Fibers (Fasern, welche die Basalmembran durchbrachen) berücksichtigt. Daraus resultiert die quantitativ höhere Anzahl an ermittelten Fasern im Gegensatz zur Zählung nach EFNS- Standard.

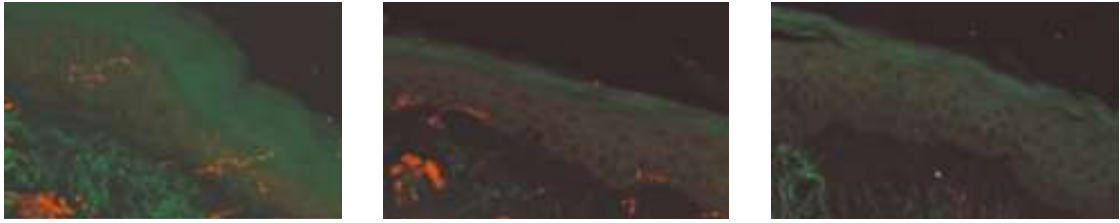


Abb. 13: Hautbiopsie mit hoher (links), mittlerer (Mitte) und geringer Nervenfaserdichte in der Lichtmikroskopie.

3.8 Statistische Verfahren

Zur statistischen Auswertung wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) Korrelationen zwischen den Parametern der Axonreflexmessungen und der Nervenfaserdichte in der Hautbiopsien berechnet. Hierzu wurde eine Spearman rank order Analyse angewandt und bei wiederholten Testungen eine entsprechende Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Als statistisch signifikant gewertet wurden p-Werte < 0.05 .

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Patientendaten

4.1.1 Alter, Geschlecht der Patienten und Ätiologie der Neuropathie

Es wurden insgesamt 9 (4 weibliche, 5 männliche) Patienten in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten wiesen eine vorbestehende klinisch oder elektro-physiologisch gesicherte periphere Neuropathie auf.

Das durchschnittliche Alter betrug 67,5 +/- 12,5 Jahre (vgl. Tab.4)

Die Ätiologie der vorliegenden Neuropathie war bei allen, mit Ausnahme eines Patienten, der an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt war, unbekannt.

4.1.2 Schmerzhaftigkeit der Neuropathie

Von den Patienten, die an der Studie teilnahmen, litten 44,4% an klar definierten neuropathischen Schmerzen, 33,3% gaben unklare Missempfindungen oder Parästhesien im Bereich der distalen Extremitäten an. (vgl. Tab.4)

Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Geschlecht	w	m	m	m	m	m	w	w	w	5m/4w
Alter	67	71	69	58	80	78	67	55	69	67,5 +/- 12,5
Schmerz ¹	j	n	j	j	n	n	n	j	n	44,4%
Mechanisches Schmerzempfinden ²	hyper	hypo	hypo	hyper	no	hypo	hypo	hypo	hypo	
Klinische Large-fiber-Neuropathie ¹	n	j	n	j	j	n	j	j	j	66,7%
Achillessehnenreflex (ASR) ³	p	norm	norm	p	p	norm	p	p	p	
Amplitude SNAP (sensibles Nervenaktionspotenzial) N. suralis (µV) ⁴	6	0	1	0	0	2	0	0	0	
N. suralis NLG (m/s) ⁴	56	0	44	0	0	46	0	0	0	
N. peroneus NLG (m/s) ⁴	44	0	41	0	0	41	0	0	0	
Empfindungsschwelle „warm“ (°C)	44,6	50	48,7	38,6	46,1	46,6	49	42	38,6	
Empfindungsschwelle „kalt“ (°C)	28,1	23,8	0	26,3	12	19,7	0	26,7	23,9	
Hitzeschmerzschwelle (°C)	48,2	50	50	43,2	48,4	49,4	45,9	44,3	47,9	

Tab. 4: Allgemeine Patientendaten

¹ j: ja; n: nein

² hyper: Hyperalgesie; hypo: Hypalgesie; no: normal

³ p: pathologisch; norm: normal

⁴ fehlende Antwort: 0

4.1.3 Elektroneurographische Untersuchungen

Die sensiblen Nervenaktionspotenziale des N. suralis waren bei 6 Patienten nicht erhältlich, bei zwei Patienten mit einer reduzierten Amplitude messbar und nur bei einem Patienten normwertig. Die errechnete sensible NLG war bei 7 Patienten nicht ermittelbar bzw. reduziert, bei zwei Patienten lag sie im Normbereich.

In der Messung der motorischen Nervenaktionspotenziale des N. peroneus waren bei 5 Patienten ebenfalls keine Potenziale erhältlich, bei 2 Patienten fanden sich reduzierte und nur bei einem Patienten normwertige Amplituden. Die Nervenleitgeschwindigkeit am N. peroneus war bei einem Patienten reduziert und bei zwei Patienten ergaben sich normwertige Messergebnisse, bei den Übrigen war sie aufgrund fehlender Reizantworten nicht bestimmbar (vgl. Tab.4).

4.1.4 Thermostest

Aus den Thermostestmessungen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Empfindungsschwelle „warm“ (°C)	44,6	50	48,7	38,6	46,1	46,6	49	42	38,6
Empfindungsschwelle „kalt“ (°C)	28,1	23,8	0	26,3	12	19,7	0	26,7	23,9
Hitzeschmerzschwelle (°C)	48,2	50	50	43,2	48,4	49,4	45,9	44,3	47,9
Kälteschmerzschwelle (°C)	0	3,9	0	4,5	0	0	0	3,2	0

Tab. 5: Thermostestmessungen zur Beurteilung der Temperaturwahrnehmung und -empfindung.

Die Empfindungsschwelle für „kalt“ lag bei den getesteten Patienten im Mittel bei 17,83 °C, die Empfindungsschwelle für „warm“ bei 40,52 °C. Die Schmerzschwellen für Kälte lagen bei 1,29 °C und für Hitze bei 36,37 °C. Bei der Durchführung des Thermostests fiel auf, dass die Empfindlichkeit gegenüber Wärme/Hitze deutlich stärker ausgeprägt war als gegenüber Kälte. Die Mehrheit des getesteten Patientenkollektivs gab gegenüber Wärme eine gesteigerte Wahrnehmung im Sinne einer Hyperalgesie bzw. Allodynie an.

4.2 Reizantworten in Abhängigkeit von der Stromstärke

Bei elektrischer Stimulation der Haut, wie im Studienprotokoll angegeben, kam es bei 8 Patienten ab einem Schwellenwert von 10 mA (8- 12,5 mA) zu einer messbaren Schweißsekretion und ab 12,5 mA (8-20 mA) zu einer messbaren Axonreflex- Flare- Reaktion. Die Größe der Axonreflexflarefläche nahm mit steigender Stromstärke zu, ebenso das Schwitzen.

Dieser Effekt konnte bei allen Studienteilnehmern beobachtet werden und war abhängig von der Stromstärke und der Reizintensität. Bei Erhöhung der verwendeten Stromstärke kam es zu einer Vergrößerung des von der neurogenen Flarereaktion betroffenen Hautareals und zu einem Anstieg der Schwitzrate.

4.2.1 Flare- Messungen

Alle Patienten wurden nach dem verwendeten Versuchsprotokoll mit einer ansteigenden Stromstärke von 0mA auf bis zu 25 mA gemessen. Unter dieser Stimulationsstromstärke war bei allen Studienteilnehmern ein Axonreflex- Flare und eine QSART- Antwort erhältlich. Ein Axonreflex- Flare war ab einer durchschnittlichen Stimulationsstromstärke von 12,5 mA (8-20 mA) detektierbar. Die maximale Fläche des Axonreflex- Flares während der Stromapplikation zeigte interindividuelle Unterschiede ($0,47 - 5,09 \text{ mm}^2$), wohingegen die Flareintensität bei allen, mit Ausnahme eines Patienten, durchaus vergleichbar war (230- 366 RU, Patient 3: 660 RU).

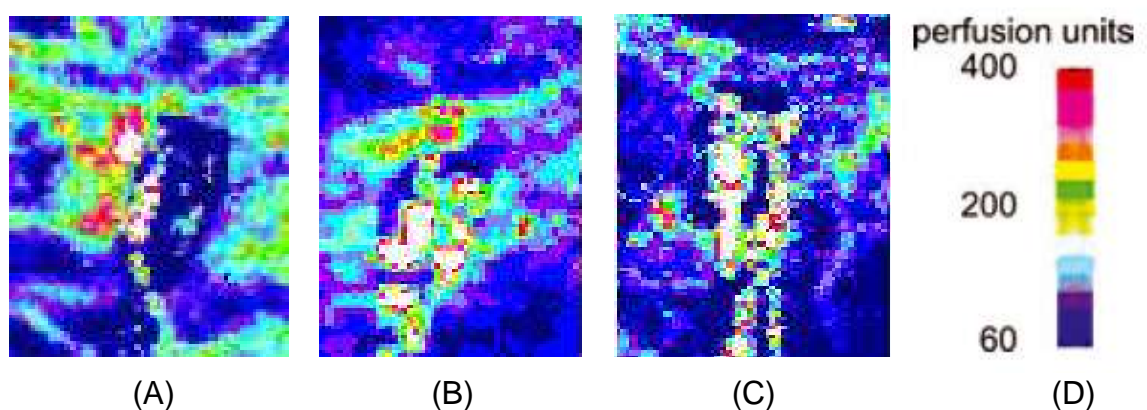


Abb. 14: Laser- Doppler- Bilder des Axonreflexflares bei Patienten mit hoher (A), mittlerer (B) und niedriger (C) Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie. Die Vasodilatation der Hautgefäße wird farbcodiert abgebildet (D), wobei farbintensive Areale (gelb, rot und weiß) die Vasodilatation anzeigen.

4.2.2 Sudometrie

Bei der Schwitzrate war ebenfalls eine positive Korrelation der Schweißproduktion zur verwendeten Stromstärke detektierbar (Abb.). Die Schweißproduktion, messbar mithilfe des QSART, setzte ab einer durchschnittlichen Stromstärke von 10mA (8- 12,5 mA) ein. Die maximale QSART- Antwort wies eine große Varianz an interindividuellen Unterschieden der Studienteilnehmer auf. Die gemessene Schweißproduktion lag in einem Bereich von 2,7 – 5,7 mm³/mm²* min.

4.3 Erfasste Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie

Die intraepidermale Nervenfaserdichte (IENF) wurde von zwei unabhängigen Untersuchern, ohne Kenntnis der Ergebnisse weiterer C- Faser- Untersuchungen, in einer doppelblinden Zählung erhoben. Die Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte erfolgte anhand der Richtlinien der European Federation of Neurological Sciences (EFNS) [25].

Erfasst wurden nur diejenigen Nervenfasern, welche die Grenze zwischen Dermis und Epidermis durchbrachen.

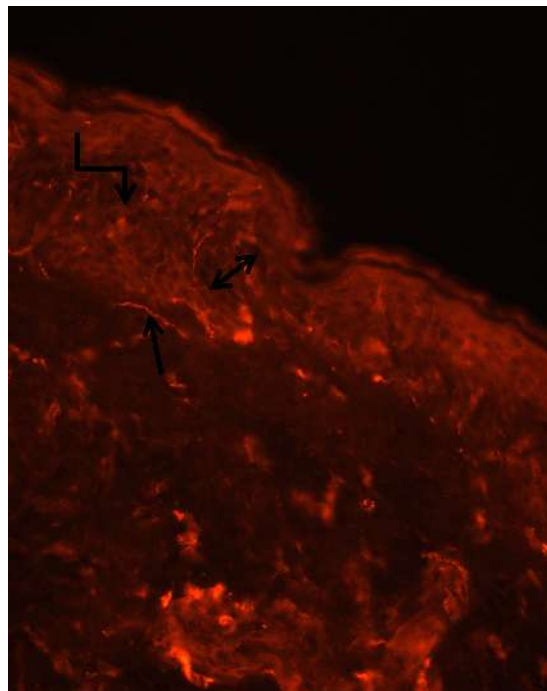
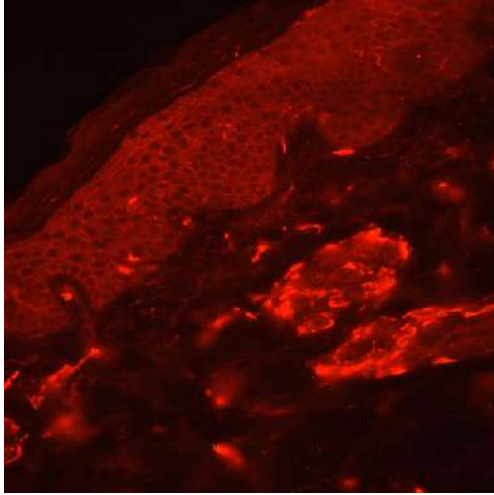
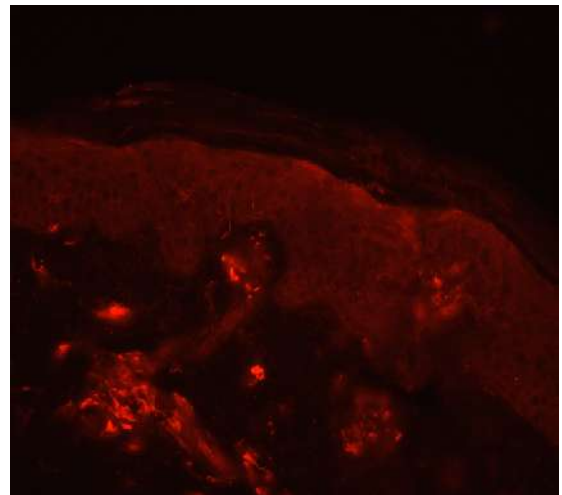


Abb. Nr. 15: Erfassung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENF) mittels Lichtmikroskopie von Hautschnitten. Der einfache Pfeil markiert eine dermale Nervenfasern, der gewinkelte Pfeil eine epidermale Nervenfasern und der Doppelpfeil eine Crossing fiber.

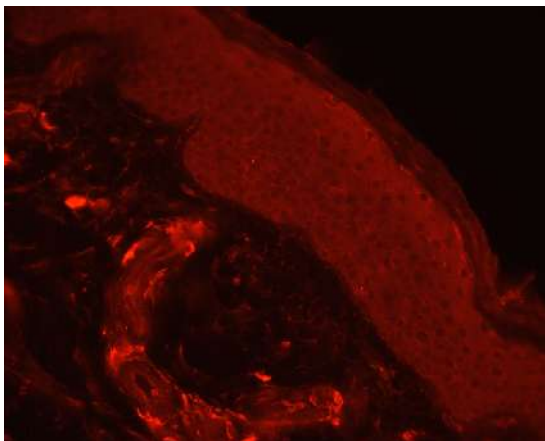
Die Ergebnisse der Faserzählung wiesen eine ausreichend hohe Korrelation ($r=0,84$; $p<0,05$) zwischen den Untersuchern auf. Deshalb wurde auf eine weitere Analyse verzichtet und die Hauptzählung der beiden Untersucher als Grundlage für die Studie verwendet.



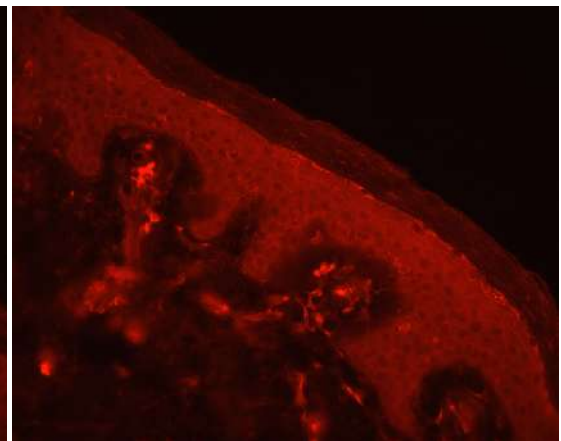
(a)



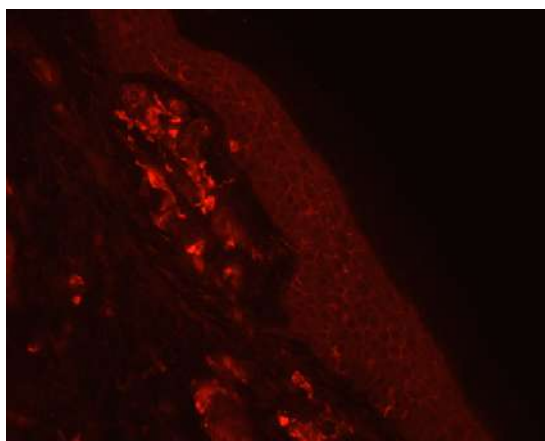
(b)



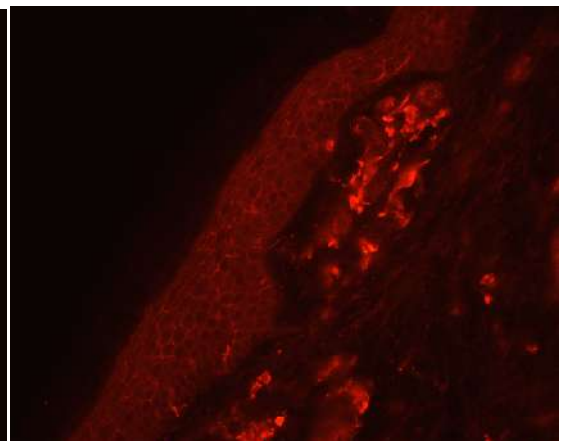
(c)



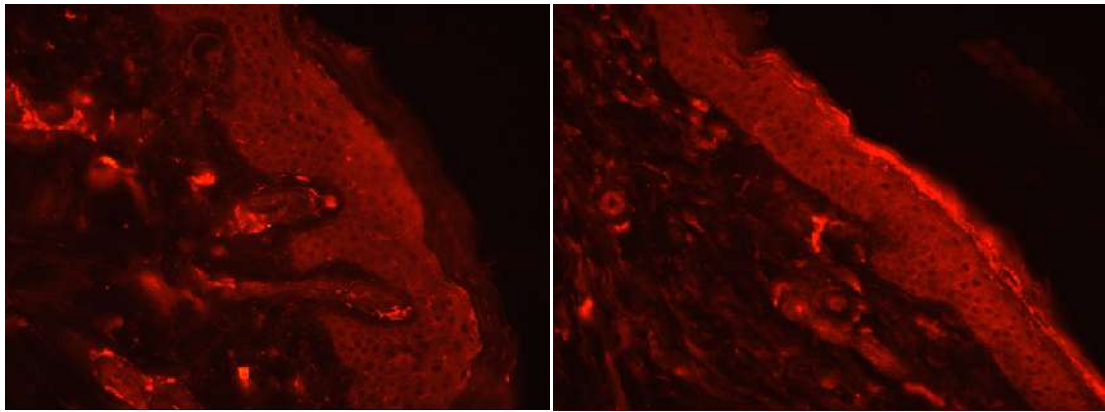
(d)



(e)



(f)



(g)

(h)

Abb. 16: Weitere Beispiele (a) – (h) für Hautschnitte in der Lichtmikroskopie nach Färbung mit PGP 9.5

4.4 Zusammenhänge zwischen den Messgrößen

4.4.1 Korrelation zwischen klinischen Daten und der Ausprägung der Axonreflexantwort

Die Ausprägung der Axonreflexantwort stand in keinem Zusammenhang mit den Angaben klinischer Daten hinsichtlich des Vorliegens einer schmerzhaften Neuropathie. Weiterhin ergab sich keine hinreichende Korrelation zwischen den Ergebnissen aus der Quantitativen Sensorischen Testung (QST) und der fassbaren Axonreflexantwort.

4.4.2 Korrelation zwischen Flare und Sudometrie

Die Ergebnisse der Axonreflexflaremessung korrelierten nicht hinreichend mit den Resultaten der Sudometriemessung. Insofern handelt es sich um unterschiedliche Funktionen unterschiedlicher Nervenfasern.

4.4.3 Korrelation zwischen Thermotest und Axonreflexantwort

Es fand sich keine Korrelation zwischen den Ergebnissen aus der Thermotestung im Sinne einer Erfassung von Kalt- und Warm- Wahrnehmungsschwellen und Hitze- und Kälte- Schmerzschwellen.

4.4.4 Korrelation zwischen Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie und Sudometrie

Die Ergebnisse der QSART- Messungen und die IENF- Dichte korrelierten nicht signifikant.

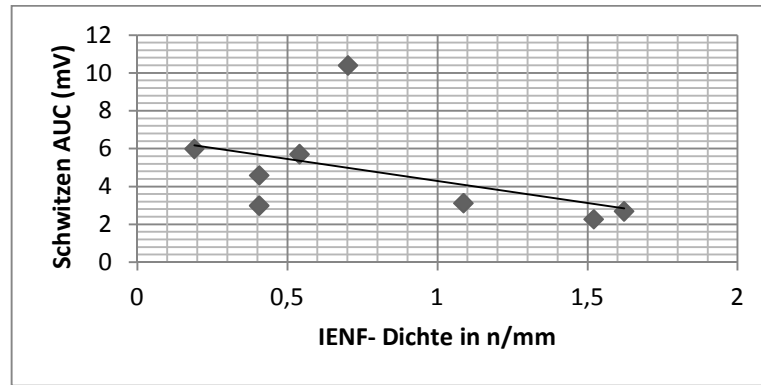


Abb. 17: Zusammenhang zwischen der Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie und den Sudometriemessungen

4.4.5 Korrelation zwischen Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie und neurophysiologischen Untersuchungen

Die konventionelle Elektrophysiologie (Neurographie, somatosensorisch evozierte Potentiale) untersucht vorwiegend die Funktion dicker markhaltiger Nervenfasern, die Funktion dünner Nervenfasern wird in diesen Untersuchungsverfahren nicht repräsentiert [6].

Es bestand daher kein signifikanter Zusammenhang zwischen der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENF), klinischen Parametern und Ergebnissen der klinisch- neurophysiologischen Untersuchungen.

4.4.6 Korrelation zwischen Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie und Flaremessung

Die Flaregröße der Axonreflexantwort korrelierte signifikant mit der Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie nach Zählung gemäß den EFNS- Richtlinien ($r=0,77$; $p<0,01$) (vgl. Abb. 21).

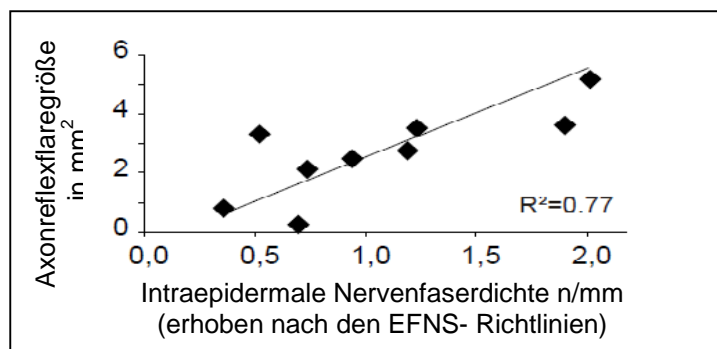


Abb. 18: Korrelation zwischen intraepidermaler Nervenfaserdichte und Axonreflexflaregröße

Die Flareintensität hingegen stand in keinem signifikanten Zusammenhang mit der erhobenen Nervenfaserdichte ($r=0,32$, n.s.)

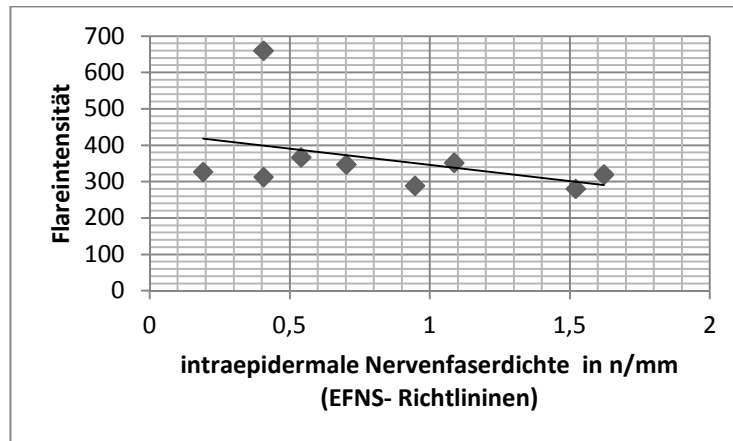


Abb. 19: Intraepidermale Nervenfaserdichte in Zusammenhang zur detektierten Flareintensität

Weiterhin fand sich eine negative Korrelation zwischen der intraepidermalen Nervenfaserdichte und der jeweiligen Stromstärke, die zur Auslösung einer Axonreflexantwort benötigt wird ($r=0,55$; $p<0,01$).

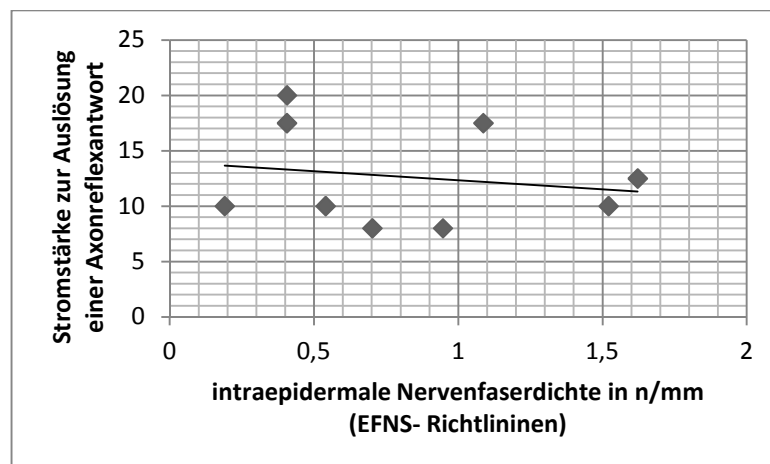


Abb. 20: Negative Korrelation der intraepidermalen Nervenfaserdichte mit der Stromstärke zur Auslösung einer Axonreflexantwort

5 Diskussion

5.1 Diagnostische Bedeutung von Axonreflexen bei Small- Fiber- Neuropathie

In der Vergangenheit wurden viele Versuche unternommen, ein geeignetes Verfahren zur Diagnostik von Small- Fiber- Neuropathien zu entwickeln [36, 23, 6]. Der Nachteil vieler Untersuchungsverfahren besteht darin, dass ein Großteil dieser Verfahren unter experimentellen Gesichtspunkten entwickelt wurde und deshalb ein Einsatz in der klinischen Routine bisher nur bedingt möglich war [23]. Unter dem Begriff des QSART (Quantitativer Sudomotor Axonreflex- Test) wurde eine Methode entwickelt, welche die Auslösbarkeit eines Axonreflexes der (sympathischen) Sudomotorfasern nutzt [28]. Low [28] zeigte, dass bei Stimulation eines definierten Hautareals durch Acetylcholin nach einer kurzen Latenzphase eine Schweißproduktion in einem Areal von 3-5cm Durchmesser einsetzt. Dieses Phänomen wird als Axonreflex- Schwitzantwort bezeichnet. Diese Reflexantwort wird von sympathischen postganglionären Fasern hervorgerufen und verschwindet daher innerhalb von Tagen bis Wochen nach postganglionärer Sympathektomie. Die Axonreflexflareantwort stellt somit ein zuverlässiges Messverfahren zur Untersuchung der Funktion postganglionärer sympathischer Nervenfasern dar.

Dieses Messverfahren hat sich in der klinischen und experimentellen Erfassung von Small- Fiber- Neuropathien bewährt. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht jedoch darin, dass nur efferente postganglionäre C- Fasern getestet werden und somit keine Diagnostik beeinträchtigter afferenter Fasern erfolgen kann.

Parallel zu einer, ca. 1-2 Minuten nach Beginn der Stimulation einsetzenden, Schweißproduktion kommt es zu einer Axonreflexantwort in Form einer reflektorischen Vasodilatation. Die neurogene Flarereaktion, welche durch afferente C- Faser- Nozizeptoren hervorgerufen wird, kann durch die Messung eines Axonreflexflares erfasst werden. Die Erregung peripherer C- Faser- Nozizeptoren bedingt eine Stimulation von Nervenfasern, deren Impulse nach zentral weitergeleitet werden. An manchen Verzweigungsstellen des neuronalen Netzwerkes bedingen diese Aktionspotentiale eine Ausbreitung in die Peripherie mit nachfolgender Ausschüttung vasodilatatorischer Neuropeptide (CGRP, Substanz P).

Die Axonreflex- Flare- Antwort der C- Faser- Nozizeptoren, durch Hautstimulation hervorgerufen, wurde von Lewis [26] 1927 und in den späten 80er Jahren unter dem Begriff der „triple response“ zusammengefasst. Parkhouse et al. [38] verglichen die Axonreflexflare- Antworten daraufhin an einem größeren Kollektiv von Neuropathie- Patienten. In diesen früheren Untersuchungen wurde die Flareantwort als ein Parameter verwendet. Mittlerweile hat sich jedoch in mehrfachen Untersuchungen gezeigt, dass die Flareintensität kaum von der Degeneration der C- Fasern [6, 22] sondern vielmehr von vaskulären Reaktionen abhängt und von der Endothelfunktion beeinflusst wird [4].

Im Gegensatz dazu war bei Patienten mit vermuteter Small- Fiber- Neuropathie die Größe des Axonreflexflares erwartungsgemäß verringert [6].

In zahlreichen Studien wurde belegt, dass bei Patienten mit Small- Fiber- Schädigung und eingeschränkter Funktion der C- Fasern eine reduzierte Axonreflexfläche zu erwarten ist.

Bisher gab es noch kein standardisiertes objektives Testverfahren, welches sich in einem Schritt zur Diagnostik von Small- Fiber- Neuropathien eignete. Devigili [9] definierte 2008 einen neuen diagnostischen „Goldstandard“ zur Detektion reiner Small- Fiber- Neuropathien, indem jeweils zwei pathologische Ergebnisse in der klinischen Untersuchung, in der Quantitativen Sensorischen Testung (QST) und Hautbiopsie postuliert wurden. Hierbei zeigten pathologische Resultate in der Hautbiopsie eine klinische Sensitivität von 88,4%.

Eine Beeinträchtigung der Small- Fiber- Funktion führt zu einer Abnahme der Axonreflexflarefläche [6].

Krämer [22] untersuchte die Abhängigkeit elektrisch induzierter Axonreflexantworten im Zusammenhang mit diabetischen Small- Fiber- Neuropathien und zeigte, dass die Axonreflexflareantwort in menschlicher Haut von verschiedenen Faktoren abhängt. Neben der Stimulationsart (mechanisch, chemisch [z.B. Histamin], elektrisch) scheint die Axonreflexflareantwort ebenso von der neurosekretorischen Funktion in den Nervenendigungen aktivierter primär afferenter Neurone beeinflusst zu werden.

Zur Quantifizierung des Ausmaßes der Nervenfaserschädigung bei peripheren Small- Fiber- Neuropathien steht im klinischen Alltag bislang nur eine geringe Anzahl an Testverfahren zur Verfügung, wie beispielsweise die quantitative sensorische Testung (QST), die Analyse der Herzratenvariabilität, die Messung von Sudomotor- Axonreflexen oder die Durchführung von Hautbiopsien.

Sommer [47] verglich 2008 die Hautbiopsie mit anderen bisher etablierten Verfahren in der Diagnostik von Small- Fiber- Neuropathien. Hierbei bestätigte sich eine nur geringe Korrelation der IENFD verglichen mit funktionellen Testverfahren wie der Quantitativen Sensorischen Testung (QST). Nachteil dieser Verfahren ist jedoch, dass die Hautbiopsie, welche bisher als „Goldstandard“ in der Small- Fiber- Diagnostik gilt, ein invasives Verfahren darstellt. Die QST hingegen unterliegt einigen Schwankungen in Sensitivität und Spezifität, da dieses Untersuchungsverfahren sehr stark untersucherabhängig ist und deren Auswertbarkeit ebenfalls durch die unterschiedliche Compliance des Patienten beeinflusst wird. Aufgrund dessen haben Rolke et al. 2006 eine Testbatterie nach standardisiertem Testprotokoll festgelegt [39, 40].

In der klinischen Routine scheinen diese Messverfahren daher aufgrund oben genannter Limitationen nur begrenzt zur Anwendung zu kommen.

Die Analyse des Axonreflexflares stellt ein einfaches nicht- invasives Verfahren zur Untersuchung peripherer C- Faser- Funktion dar. Die Aktivierung von nozizeptiven C- Fasern in der Haut durch mechanische, chemische oder elektrische Stimulation führt zu einer zunehmenden reflektorischen Vasodilatation um die Stimulationsstelle, welche als Axonreflexflareantwort bezeichnet wird. Die Axonreflexflareantwort ist abhängig von Dichte und Funktion der nozizeptiven C- Fasern in der Haut.

In den bisher angewandten Testverfahren wurde der Erfassung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENF) die beste und am meisten objektive Aussagekraft zugeschrieben [25]. Nicht zuletzt scheint daher die Hautbiopsie – als invasives Verfahren – mit nachfolgender Erfassung der intraepidermalen Nervenfaserdichte somit derzeit der „Goldstandard“ in der Diagnostik und Untersuchung von Small- Fiber- Neuropathien zu sein.

In der vorliegenden Dissertation wurde deshalb die intraepidermale Nervenfaserdichte (IENF) mit der Axonreflexflarefläche verglichen, unter Berücksichtigung der Tatsache, dass bei der Zählung der IENF nur Aussagen über die Morphologie und nicht über die Funktion erfasster Nervenfasern getroffen werden können [25].

Als Ergebnis dieser Dissertation zeigte sich, dass die Größe der Axonreflexflarefläche (ARFS) von Patienten mit peripheren Neuropathien–induziert durch elektrische Stimulation der C- Fasern– in einem engen Zusammenhang mit der Nervenfaserdichte in Hautbiopsien steht.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, folgern wir daraus, dass die Testung eines Axonreflexes, ausgelöst durch afferente C- Fasern, als ein objektives Untersuchungsverfahren in der Diagnostik der Small- Fiber- Neuropathien eingesetzt werden könnte.

5.2 Beteiligung unterschiedlicher C- Fasern bei SFN

Die Axonreflexantworten korrelierten nicht hinreichend mit Ergebnissen aus klinischen Untersuchungen, da hierbei vorwiegend nur eine Untergruppe der C- Fasern erfasst wird, welche keine ausreichende Aussage über die Mitbeteiligung von Nervenfasern der Small- Fiber- Klasse beinhaltet.

Hinzu kommt, dass die chemische Induktion eines Axonreflexes ebenfalls nur Subtypen von C- Fasern erregt. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurde bei vorliegender Dissertation zur Induktion von Axonreflexflares eine elektrische Stimulation durchgeführt, welche eine Erregung von C- Fasern unabhängig ihres Subtyps zuließ. Die elektrische Stimulation stellt zudem die einzige Möglichkeit der Stimulation sogenannter „stummer“ Nozizeptoren dar, welche mechano- und chemosensitiv sind, jedoch einen Großteil der C- Faser- Funktion repräsentieren [45]. Die klinischen Symptome in Form von Parästhesien und neuropathischen Schmerzen werden diesen „stummen“ Nozizeptoren zugeschrieben.

Schmelz [44] zeigte, dass eine dauerhafte Flareantwort die Stimulation mechanoinsensitiver C- Fasern in menschlicher Haut impliziert. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die Fläche der Axonreflexflareantwort eine größere Ausdehnung als der Durchmesser des rezeptiven Felds mechanosensitiver C- Nozizeptoren aufweist. Die C-Faserklasse, welche die Auslösung einer Axonreflexflarereaktion bedingt, ist somit die mechanoinsensitive C- Faser- Population. Diese Nervenfasersubpopulation wurde in der Vergangenheit häufig als „stille Nozizeptoren“ bezeichnet. Sie nimmt eine bedeutende Rolle bei der Schmerzentstehung im Rahmen einer Hyperalgesie und beim Entzündungsschmerz ein. Diese C-Fasern sind maßgeblich an der Entstehung des neuropathischen Schmerzes beteiligt. Sie spielen zudem eine wichtige Rolle bei der Auslösung der neurogenen Vasodilatation. Für die Temperaturwahrnehmung spielen sie eine eher untergeordnete Rolle.

5.3 Axonreflexflaregröße in Zusammenhang mit der intraepidermalen Nervenfaserdichte

In der Vergangenheit wurde die QSART- Testung als Verfahren zur Evaluation der C- Faser- Funktion eingesetzt. Durch dieses Testverfahren wurde eine Subpopulation der C- Fasern, die sogenannten Sudomotor- Fasern, erfasst. Die Sudomotorfasern bewirken eine Schweißreaktion im betroffenen Gewebe und führen zu einer Schweißsekretion, welche mit Hilfe einer Schweißkammer detektiert wurde.

Die Tatsache, dass in der Hautbiopsie nicht ausschließlich Sudomotor- Fasern oder Schweißdrüsen erfasst wurden, bildet sich in der fehlenden Korrelation zwischen der absoluten Nervenfaserdichte und den Ergebnissen aus der QSART- Messung in der vorliegenden Dissertation ab. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass das verwendete Patientenkollektiv, welches Einzug in die Studie hielt, heterogen im Hinblick auf Ätiologie, Form und Ausprägungsgrad untersuchter Neuropathie war.

Bei der Erfassung der IENF scheint die Dichte kleiner Nervenfasern, unabhängig von jeglicher zusätzlicher Large- Fiber- Beteiligung, abgebildet zu werden. Daraus folgt, dass eine Reduktion der Axonreflexflaregröße (ARFS) und eine dadurch bedingte Korrelation zur IENF die Hypothese stützt, dass die Erfassung der ARFS ein hilfreicher und nützlicher Test in der Diagnostik einer Small-Fiber- Schädigung darstellt.

In vorliegender Dissertation konnte dieser Zusammenhang hergestellt werden. Zur Validierung dieses Testverfahrens könnte im weiteren Verlauf diese Hypothese an einem größeren Patientenkollektiv mit ausschließlicher Small- Fiber- Neuropathie untersucht werden.

5.4 LASER DOPPLER IMAGER zur Erfassung der AXONREFLEXFLAREGRÖÖE

Zur Erfassung der Axonreflexflarefläche (ARFS) fand ein Laser Doppler Imager (LDI) Anwendung.

In dieser und allen vorangehenden Studien zeigte sich die maximale Axonreflexflarefläche als zuverlässigster Parameter zur Erfassung der C- Faser- Funktion.

In früheren Veröffentlichungen wurde die ARFS mittels eines Transparentpapieres abgebildet und manuell erfasst. Da diese manuelle Detektion der ARFS starke interindividuelle Schwankungen durch die visuellen Erfassung des Untersuchers und der daraus resultierenden Ungenauigkeit und Unschärfe für nachfolgende statistische Berechnungen aufwies, rückte mit zunehmender Entwicklung technischer Möglichkeiten dieses Messverfahren zunehmend in den Hintergrund und wurde durch die Anwendung eines Laser Doppler Imagers abgelöst.

Die Erfassung der ARFS erfolgt mittels eines LDI nach standardisierten Vorgaben und ist deshalb besser detektierbar und reproduzierbar.

In vorliegender Dissertation konnte unter Einsatz oben genannter Verfahren auf die Validität der Axonreflexmessung in Untersuchung der C- Faser- Funktion geschlossen werden.

Dieses einfache, nicht-invasive Testverfahren könnte in Zukunft in der Routine als semiquantitatives Messverfahren oder in der morphologischen Testung der IENF in der Diagnostik von Small- Fiber- Neuropathien, insbesondere zur Diagnostik der C- Faserfunktion, Anwendung finden.

Alternativ zu diesem Messverfahren könnte ein Single- Spot- Laser- Doppler vom Rand des Stimulationsareals aus in die Peripherie geleitet werden um die Grenze des Axonreflexflares zu erfassen [6]. Bickel [6] zeigte 2002, dass, unter Einsatz des Laser Doppler Imagers (LDI) bei der Untersuchung des Axonreflexantwort bei Small- Fiber- Neuropathien, die Flarefläche einen sensitiveren Marker in der Ausprägung der Nervenfaserschädigung darstellt als die Intensität des ausgelösten Umgebungserythems.

Zur weiteren Spezifizierung und technischen Verbesserung dieses Messverfahrens müsste erweiternd eine höhere Anzahl an gesunden Probanden mit einem größeren Patientenkollektiv verglichen werden, um eine größere Datenbank an Vergleichsmesswerten zu generieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Bayliss, W.M. (1901): On the origin from the spinal cord of the vasodilator fibres of the hind-limb and on the nature of these fibres; *J Physiol* (26); 173-209
2. Bennaroch, E.E.; Low, P.A. (1991): The acetylcholine-induced flare response in evaluation of Small-fibre dysfunction; *Ann Neurol* (29); 590-595
3. Benett, G.J. (1991): The role of sympathetic nervous system in painful peripheral neuropathy; *Pain* (45); 221-223
4. Berghoff, M.; Kathpal, M.; Kilo, S.; Hilz, M.J.; Freeman, R. (2002): Vascular and neural mechanisms of Ach-mediated vasodilatation in the forearm cutaneous microcirculation; *J. Appl. Physiol* (92); 780-788
5. Bickel, A.; Butz, M.; Schmelz, M.; Handwerker, H.O.; Neundörfer, B. (2000): Density of sympathetic axons in sural nerve biopsies of neuropathy patients is related to painfulness; *Pain* (84); 413-419
6. Bickel, A.; Krämer, H.H.; Hilz, M.J.; Birklein, F.; Neundörfer, B.; Schmelz, M. (2002): Assessment of the neurogenic flare reaction in small-fiber neuropathies; *Neurology* (59); 917-919
7. Brown, M.J.; Martin, J.R.; Asbury, A.K. (1976): Painful diabetic neuropathy. A morphometric study; *Arch Neurol* (33); 164-171
8. Delank, H.-W.; Gehlen, W. (2006): *Neurologie*; 11. korrigierte Auflage, Thieme Verlag; Stuttgart, 102-124
9. Devigili, G.; Tugnoli, V.; Penza, P.; Camozzi, F.; Lombardi, R.; Melli, G.; Broglio, L.; Granieri, E.; Lauria, G. (2008): The diagnostic criteria for small fibre neuropathy : From symptoms to neuropathology; *Brain* (131); 1912-1925
10. Donnerer, J.; Schuligoi, R.; Stein, C. (1992): Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: Evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo; *Neuroscience* (49); 693-698
11. Dyck, P.J.; Turner, D.W.; Davies, J.L.; O'Brien, P.C., Dyck P.J.B.; Rask, C.A. and the rhNGF group (2002): Electronic case-report forms of symptoms and impairments of peripheral neuropathy; *Can J Neurol Sci* (29); 258-266
12. Essex, T.J.H.; Byrne, P.O. (1991): A laser Doppler scanner for imaging blood flow in skin; *J Biomed Eng* (13); 189-194
13. Frey von, M. (1896): Ueber den Gebrauch von Reizhaaren, Untersuchungen über die Sinnesfunktionen der menschlichen Haut. Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz; *Abhandlungen der mathema-*

tisch-physischen Klasse der Königlich Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften (23); 208-217

14. Hahn, K. (2007): Small- fiber- Neuropathien erkennen und behandeln; Der Neurologe und Psychiater DNP 5/07; 48-50
15. Handwerker, H.O. (1999): Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes; Springer- Verlag Berlin; S.45-49
16. Holland, N.R.; Stocks, A.; Hauer, P.; Cornblath, D.R.; Griffin, J.W.; McArthur, J.C. (1997): Intraepidermal nerve fiber density in patients with painful sensory neuropathy; Neurology (48); 708-711
17. Herbert, M.K.; Holzer, P. (2002): Die neurogene Entzündung: Pathophysiologie und klinische Implikationen; Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther (37) Thieme Verlag Stuttgart; 386-394
18. Holzer, P. (1998): Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin; Gen Pharmac (30); 5-11
19. Kennedy, W.R.; Wendelschafer- Crabb, G.; Johnson, T. (1996): Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy; Neurology (59); 1042- 1048
20. Kennedy, W.R.; Wendelschafer- Crabb, G.; Polydefkis, M.; McArthur, J.C. (2005): Pathology and quantitation of cutaneous nerves; In Dyck, P.J.; Thomas, P.K.; Editors. Peripheral Neuropathy. Philadelphia: Saunders; 890-6
21. Krämer, H.H.; Rolke, R.; Bickel, A.; Birklein, F. (2004): Thermal thresholds predict painfulness of diabetic neuropathies; Diabetes Care (27); 2386-2391
22. Krämer, H.H.; Schmelz, M.; Birklein, F.; Bickel, A. (2004): Electrically stimulates axon reflexes are diminished in diabetic Small- Fiber neuropathies; Diabetes (53); 769-774
23. Lacomis, D. (2002): Small fiber neuropathy; Muscle & Nerve (26); 173-188
24. Lang, E.; Foerster, A.; Pfannmüller, D.; Handwerker, H.O. (1993): Quantitative assessment of sudomotor activity by capacitance hygrometry; Clin Auton Res (3); 107-115
25. Lauria, G.; Cornblath, D.R.; Johansson, O.; McArthur, J.C.; Mellgren, S.I.; Nolano, M.; Rosenberg, N.; Sommer, C. (2005): EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy; European Journal of Neurology (12); 747-758

26. Lewis, T.; Marvin, H.M. (1927): Observations relating to vasodilatation arising from antidromic impulses to herpes zoster and trophic effects; *Heart* (14); 27-47
27. Low, P.A. : *Clinical autonomic disorders*; Lippincott-Raven Publishers Philadelphia; 1997; S. 179-208
28. Low, P.A.; Caskey, P.E.; Tuck, R.R.; Fealey, R.D.; Dyck, P.J. (1983): Quantitative sudomotor axon reflex test in normal and neuropathic subjects; *Ann Neurol* (14); 573-580
29. Magerl, W.; Szolcsanyi, J.; Westermann, R.A.; Handwerker, H.O. (1987): Laser doppler measurements of skin vasodilatation elicited by percutaneous electrical stimulation of nociceptors in humans; *Neurosci Lett* (82); 349-353
30. Magerl, W.; Westermann, R.A.; Möhner, B.; Handwerker, H.O. (1990): Properties of transdermal histamine iontophoresis: differential effects of season, gender and body region; *J Invest Dermatol* (94); 347-352
31. Moore Instruments laser Doppler blood flow assessment, Basic Theory and Operating Principles of Laser Doppler Blood Flow Monitoring and Imaging (LDF & LDI), Issue 1; 1-4
32. Morris, J.L., Gibbins, I.L.: *Autonomic innervations of the skin*; Harwood Academic Publishers Amsterdam; 1997; 213- 267
33. Namer, B.; Bickel, A.; Krämer, H.; Birklein, F.; Schmelz, M. (2004): Chemically and electrically induced sweating and flare reaction; *Auton Neurosci* (114); 72-82
34. Navarro, X.; Kennedy, W.R.; Fries, T.J. (1989): Small nerve fiber dysfunction in diabetic neuropathy; *Muscle Nerve* (12); 498-507
35. Neundörfer, B.; Said, G. (2001): *Autonomic Neuropathies*; Eleventh Meeting European Neurological Society 21.04.2001 Teaching Course 5, Paris, France; 39-51
36. Parkhouse, N.; Le Quesne, P.M. (1988): Impaired neurogenic vascular response in patients with diabetes and neuropathic foot lesions; *N Engl J Med* (318); 1306-1309
37. Orstavik, K.; Weidner, C.; Schmidt, R.; Schmelz, M.; Hilliges, M.; Jorum, E.; Handwerker H.O.; Torebjork E. (2003): Pathological C- fibres in patients with a chronic painful condition; *Brain* (126); 567-578
38. Parkhouse, N.; Le Quesne, P.M. (1988): Quantitative objective assessment of peripheral nociceptive C fibre function; *J Neurosurg Psychiatry* (51); 28-34
39. Rolke, R.; Baron, R.; Maier, C.; Tölle, T.R.; Treede, R.-D.; Beyer, A.; Binder, A.; Birbaumer, N.; Birklein, F.; Bötefür, I.C.; Braune, S.; Flor, H.;

- Huge, V.; Klug, R.; Landwehrmeyer, G.B.; Magerl, W.; Maihöfner, C.; Rolko, C.; Schaub, C.; Scherens, A.; Sprenger, T.; Valet, M.; Wasserrka, B. (2006): Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): Standardized protocol and reference values; *Pain* (123), 231-243
40. Rolke, R.; Magerl, W.; Andrews Campbell, K.; Schalber, C.; Casparia, S.; Birklein, F.; Treede, R.-D. (2006): Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials; *European Journal Of Pain* Volume 10, Issue 1, Pages 77-88
41. Rolke, R. (2009): Diagnostischer „Work-up“ neuropathischer Schmerzen in der klinischen Praxis: Quantitative sensorische Testung als komplementäres Verfahren zur konventionellen Elektrophysiologie; *Klin. Neurophysiol*, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart/ New York, 40 (3), 177-182
42. Said, G.; Neundörfer, B. (2001): Peripheral Neuropathies; ENS April 2001 Teaching Course 5 Autonomic Neuropathies; Paris, France; 40-51
43. Sauerstein, K.; Klede, M.; Hilliges, M.; Schmelz, M. (2000): Electrically evoked neuropeptide release and neurogenic inflammation differ between rat and human skin; *J Physiol* (529); 803-810
44. Schmelz, M.; Michael, K.; Weidner, C.; Schmidt, R.; Torebjörk, H.E.; Handwerker, H.O. (2000): Which nerve fibers mediate the axon reflex flare in human skin?; *Neuroreport* (119); 645-648
45. Schmidt, R.; Schmelz, M.; Bickel, A.; Weidner, C.; Handwerker, H.O. (1998): Innervation territories of mechanosensitive C nociceptor units in human skin. *Soc Neurosci Abstr* (24); 383
46. Singer, W.; Spies, J.M.; McArthur, J.; Low, J.; Griffin, J.W.; Nickander, K.K.; Gordon, V.; Low, P.A. (2004): Prospective evaluation of somatic and autonomic Small- fibers in selected autonomic neuropathies; *Neurology* (62); 612-618
47. Sommer, C. (2008): Skin biopsy as a diagnostic tool; *Current Opinion in Neurology* (21); 563-568
48. Sumner, C.J.; Shet, S.; Griffin, J.W.; Cornblath, D.R.; Polydefkis, M. (2003): The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance; *Neurology* (60); 108-111
49. Westermann, R.A.; Low, A.; Pratt, A.; Hutchinson, J.S.; Szolcsanyi, J.; Magerl, W.; Handwerker, H.O.; Kozak, W.M. (1987): Electrically evoked skin vasodilatation: A quantitative test of nociceptor function in man; *Clin Exp Neurol* (23); 81-89

7 Abkürzungsverzeichnis

ARFS	Axonreflexflarefläche
AUC	Area under the curve
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
EFNS	European Federation of Neurological Sciences
HMSN	Hereditär motorisch sensible Neuropathie
IENF	Intraepidermale Nervenfasern
IENFD	Intraepidermale Nervenfaserdichte
LDF	Laser Doppler Flowmetrie
LDI	Laser Doppler Imager
LFN	Large Fiber- Neuropathie
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
QSART	Quantitativer Sudomotor Axonreflex-Test
QST	Quantitative Sensorische Testung
ROI	Region of interest
SFN	Small- Fiber- Neuropathie
SNAP	Sensibles Nervenaktionspotential
SSR	Sympathetic skin response

8 Anhang

8.1 Klassifikation von Nervenfasern nach Erlanger/Gasser

Typ	Funktion	Leitungsgeschwindigkeit (m/s)	Mittlerer Durchmesser (μm)
A α	Primäre Muskelspindelafferenzen, motorisch zu den Skelettmuskeln	70-120	15
A β	Hautafferenzen für Berührung, Druck und Vibration	30-70	8
A γ	Motorisch zu den Muskelspindeln	15-30	5
A δ	Hautafferenzen für Temperatur (Kälteempfinden) und Nozizeption	12-30	<3
B	Sympathisch präganglionär	3-15	3
C	Hautafferenzen für Temperatur (Wärmeempfinden) und Nozizeption, sympathische postganglionäre Efferenzen	0,5-2	1

8.2 Geräte

Gerät	Hersteller	Typ
Laser Doppler Imager	Moor Instruments Ltd., Axminster, Großbritannien	moorLDI2-VR
Constant Current Stimulator	Digitimer Ltd., Welwyn, Garden City, Großbritannien	DS7A
Pulsgenerator	Rimkus Medizintechnik, Parsdorf, Deutschland	PG1
Hygrometer	Rotronic, Basserdorf, Schweiz	SA-100C
Hygroskop	Rotronic, Basserdorf, Schweiz	DV-2

8.3 Immunhistochemie Hautbiopsien

TBS Triton-Puffer, pH 7,3
2% Zamboni- Lösung
1% Na- Azid- Puffer
15% Saccharose- Puffer
Methylbutan
1% BSA
0,5% Triton X 100
5% Esel- Normalserum
Primärer Antikörper AK guinea pig PGP 9.5 (Chemikon, Temacula, CA, USA, Verdünnung 1:500)
Donkey- Anti- Guinea Pig- AK
Cy3 (Dianova, Boston, MA, USA, Verdünnung 1:500)
TBS- Glycerin pH 8,6

8.4 Aufklärungsbögen

8.4.1 Aufklärung zur Untersuchung unmyelinisierter (=dünner) Nervenfasern (Sudometriemessung)

Aufklärung zur Untersuchung unmyelinisierter (=dünner) Nervenfasern

Liebe Patientin, lieber Patient,

Sie leiden wahrscheinlich unter einer Krankheit, die man „Polyneuropathie“ nennt. Bei dieser Krankheit werden verschiedene Nervenfasern in der Peripherie des Körpers zerstört, was eine Verminderung der Empfindung von Berührung, Schmerz, eine Verminderung der Muskelkraft und eine schlechtere Versorgung des Gewebes (z.B. schlechte Heilung von Wunden) zur Folge haben kann. Mit den herkömmlichen elektrophysiologischen Tests, die in der Klinik durchgeführt werden, kann nur die Funktion von Nervenfasern, die für Berührungsempfinden oder Muskelkraft zuständig sind, beurteilt werden (sog. „myelinisierte Nervenfasern“ - dicke Nervenfasern). Unmyelinisierte (= dünne) Nervenfasern, die unwillkürliche Funktionen (z.B. Schwitzen, Gefäßweite, aber auch Schmerzempfindungen) steuern, sind mit Routinemethoden bislang nur sehr schwer und eingeschränkt zu beurteilen.

Mit unserer neuen Untersuchungsmethode, die hier entwickelt wird und die wir an Ihnen durchführen möchten, kann man bestimmen, ob auch die Funktion dieser unmyelinisierten Nervenfasern, gestört ist. Diese neue Methode kann also die Funktion Ihrer dünnen (= unmyelinisierten) Nerven im Bein bestimmen. Weiterhin erhoffen wir uns dadurch auch in Zukunft die Ursache bestimmter Störungen (z.B. Schmerzentstehung bei Polyneuropathien) genauer verstehen zu können.

Ablauf der Untersuchung:

Während der Untersuchung sitzen Sie bequem in einem Stuhl. Es wird eine kleine Plexiglasskammer auf einem Ihrer Fußrücken bzw. Oberschenkel befestigt, durch die trockener Stickstoff geleitet wird. Diesen „Stickstoff-Luftstrom“ werden Sie nicht bemerken.

In dieser Kammer befinden sich zwei kleine Elektroden, mit denen die Nervenfasern in der Haut elektrisch gereizt werden können. Die Reizung erfolgt mit kurzen Impulsen (1/ Sekunde) und verschiedenen Stromstärken bis maximal 30 mA. Diese 30 mA sind in etwa vergleichbar mit Stromstärken bei Untersuchungen wie z.B. „Nervenleitgeschwindigkeit“, die Patienten in der Klinik routinemäßig mitmachen. Die Stromstärke wird über 30 Minuten von 0 auf 25 mA und evtl. (nach Ihrer eigenen Entscheidung) auf 30 mA in kleinen Sprüngen erhöht. Das führt etwa ab der Mitte des Versuchs zu einer schmerzhaften Empfindung, die aber gut erträglich ist.

Durch diese elektrische Stimulation ruft man eine Erregung unmyelinisierter (= dünner) Nervenfasern hervor. Einleits kommt es dadurch zu einem vermehrten Schwitzen des Hautbereichs um die Elektroden herum (ca. 5cm). Die vermehrte Feuchtigkeit in der Kammer durch das Schwitzen wird mit dem „Stickstoff-Luft-Strom“ abtransportiert und gemessen. Zweitens wird eine Hautrötung um die Elektroden herum verursacht. Um diese Hautrötung, d.h. vermehrte Durchblutung zu messen, wird die Haut mit einem Laser niedriger Energie abgetastet und das reflektierte Licht mit einem Laser-Doppler-Imager gemessen. Die Stromstimulation wird ca. 25 Minuten durchgeführt und die gesamte Untersuchung wird ca. 90 Minuten (einmal 25 min Fuß und einmal 25 min Oberschenkel + Vorbereitungen) dauern.

Mögliche Risiken:

Ein Risiko für einen ernsthaften oder bleibenden Schaden ist bei dieser Untersuchung nicht zu befrachten und bis jetzt auch noch nie eingetreten. Die Risiken entsprechen in etwa denen der konventionellen Neurographie. Prinzipiell könnte eine Kontaktallergie gegen den Schaumgummi, Silikon oder Elektrodengel auftreten. Dies wurde bisher nie beobachtet. Durch die elektrische Stimulation kann es zu einer vorübergehenden Reizung der Haut kommen. Bleibende Schäden (Verbrennungen, Brandblasen) wären bei höheren Stromstärken theoretisch möglich, sind bei den von uns gewählten niedrigen Stromstärken auf gesunder Haut noch nie aufgetreten. Um eine Schädigung des Augenhintergrundes zu vermeiden, sollten Sie nicht direkt in den Laserstrahl blicken, obwohl das Risiko hierfür bei dieser niedriger Energie sehr gering ist. Ein Herzschrittmacher oder ein implantierter Defibrillator können durch die geringen Stromstärken vermutlich nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, da hierzu aber keine Erfahrungen vorliegen, führen wir diese Messungen derzeit bei Schrittmacherpatienten nicht durch. Unter besonderen Umständen (z.B. wenig Schlaf und kein Pflöckchen und viel Stress und Aufregung ...) kann es zu einer übersteigerten Kreislaufreaktion (Abfall von Blutdruck und Puls) kommen, bei der es zu Übelkeit und Schwindel kommen kann. Dies ist nicht häufig und wird durch kurzes Liegen mit hochgelegten Beinen schnell wieder behoben.

Einverständniserklärung:

Meine Teilnahme ist freiwillig und ich weiß, dass ich dieses Einverständnis jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen kann. Mit der Teilnahme an der oben beschriebenen Untersuchung bin ich einverstanden. Ich bin über die Risiken und den Ablauf der Untersuchung ausreichend aufgeklärt und hatte genügend Gelegenheit eventuelle Fragen mit dem durchführenden Arzt/ Ärztin bzw. AIP zu besprechen.

Ich habe einen:

Herzschrittmacher

Ja / Nein

Hauterkrankungen (z.B. Ekzem, offene Stellen, Ausschlag ...)

Ja / Nein

Erlangen, den

Unterschrift Patient

(Unterschrift Arzt/ Ärztin/ AIP)

8.4.2 Einwilligungserklärung zur wissenschaftlichen Verwendung von Blut- bzw. Gewebeproben und personenbezogenen Daten

Einwilligungserklärung zur wissenschaftlichen Verwendung von Blut- bzw. Gewebeproben und personenbezogenen Daten	
<p>Sehr geehrte Frau _____ / Sehr geehrter Herr _____</p> <p>Hiermit bitten wir Sie um Ihre Einwilligung zur wissenschaftlichen Verwendung Ihrer Blut- bzw. Gewebeprobe und Ihrer personenbezogenen Daten, wie sie Ihnen in der Probandeninformation näher erläutert wurden ist.</p>	
<p>Messung der C-Reaser Funktion bei Polycythaemia mittels Laser-Doppler-Analyse von Axillareflexen</p>	
<p>Neurologische Klinik Arbeitsgemeinschaft für Diagnostik und Therapie bei Polycythaemia</p>	
A. Allgemeines	
<p>Ich bin durch den Protokoll über den Zweck, den Ablauf, die Bedeutung der klinischen Studie sowie die Vorteile und Risiken, die damit verbunden sein können, mündlich aufgeklärt worden.</p> <p>Die schriftliche Probandeninformation habe ich gelesen. Alle meine Fragen sind zu meiner Zufriedenheit beantwortet worden.</p> <p>Ich habe eine Kopie der Probandeninformation und Einwilligungserklärung angefordert bekommen. Ich hatte genügend Zeit, um meine Entscheidung zur Studienteilnahme zu überlegen und frei zu treffen.</p> <p>Meine folgenden Erklärungen reichen nur so weit, wie mir dies im Rahmen der schriftlichen Probandeninformation bzw. in der mündlichen Erläuterung näher dargelegt wurde.</p> <p>Meine eigenen Erklärungen berechtigen und verpflichten die oben benannten genannten Institutionen.</p>	

B. Einwilligung in die Entnahme und Nutzung der Blut- bzw. Gewebeprobe (Zutreffendes bitte ankreuzen)	
<p>B 1 Ich bin mit der Entnahme einer Gewebeprobe einverstanden und überlasse die zur zehnommene Blut- bzw. Gewebeprobe hiermit der oben genannten Institution.</p> <p>Ich stimme zu, dass die Gewebeprobe unter der Verantwortung der oben genannten Institution in wissenschaftlicher Form (d.h. so, dass eine Zuordnung zu meiner Person nur über weitere Mittel) – etwa eine Referenzliste – möglich ist)</p> <p><input type="checkbox"/> für Studien mit allen wissenschaftlich in Betracht kommenden Fragestellungen verwendet wird.</p> <p>oder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> für Studien mit der oben genannten Fragestellung verwendet wird.</p> <p><input type="checkbox"/> Ich bin damit einverstanden, dass ich ggf. (soweit möglich) von der erlenkenden genannten Institution kontaktiert werde, um meine Zustimmung zur Verwendung meiner Blut- bzw. Gewebeprobe in weiteren Studien zu erlauben.</p> <p>oder</p> <p><input type="checkbox"/> Ich verlange bereits heute, dass meine Blut- bzw. Gewebeprobe nach Abschluss der genannten Studien vernichtet wird.</p>	
<p>B 2 [KOMMERZIELLE VERWERTUNG]</p> <p>Ihre kommerzielle Verwendung der Gewebeprobe wird ausgeschlossen.</p>	
<p>B 3 [WEITERGABE AN DRITTE]</p> <p>Die Weitergabe der Blut- bzw. Gewebeprobe an andere Institutionen ist mir nicht bekannt.</p>	
<p>B 4 [INFORMATION ÜBER STUDIERERGEBNISSE]</p> <p><input type="checkbox"/> Sofern durch die oben bezeichnete Studie Ergebnisse erzielt werden, die für mich oder meine weiteren Angehörigen von unmittelbarer Bedeutung sind, möchte ich darüber informiert werden.</p> <p>oder</p>	

Ich bin damit einverstanden, dass ich keine individuellen Rückinformationen über die Ergebnisse der Studie erhalte.

B 5 UNENTGELTlichkeit:

Ich bin mir bewusst, dass ich für die Überlassung meiner Gewebeprobe kein Entgelt erhalte.

Ich bin mir bewusst, keinerlei Ansprüche auf Vergütung, Tantieme oder sonstige Beteiligung an finanziellen Vorteilen und Gewinnen zu haben, die möglicherweise auf der Basis der Forschung mit meiner Blut- bzw. Gewebeprobe erlangt werden.

B 6 Widerruf der Zustimmung zur Probenverwendung

Ich weiß, dass ich meine Zustimmung zur Verwendung meiner Blut- bzw. Gewebeprobe jederzeit und ohne Angabe von Gründen gegenüber der oben genannten Institution / Person widerrufen kann und dass dies keinen Einfluss auf meine etwaige weitere ärztliche Behandlung hat.

Im Falle des Widerrufs bin ich damit einverstanden, dass meine Blut- bzw. Gewebeprobe zu Kontrollzwecken weiter aufbewahrt wird. Ich habe jedoch das Recht, deren Vernichtung zu verlangen, sofern gesetzliche Bestimmungen der Vernichtung nicht entgegenstehen.

Ich bin mir bewusst, dass eine Vernichtung der Blut- bzw. Gewebeprobe auf meinen Wunsch nicht möglich ist, wenn sie so weit verschlüsselt („anonymisiert“) wurde, dass eine Verbindung zwischen dem Proben und meiner Person nicht oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft möglich ist.

C. Datenschutzrechtliche Einwilligungserklärung (Zutreffendes bitte ankreuzen)

Ich bin damit einverstanden, dass die untenstehend genannte Person bzw. ein Mitarbeiter der einleitend genannten Institution Hinblick in meine Original-Krankennote(n) nimmt.

Ich stimme zu, dass Daten, die meine Person betreffen (hierzu gehören insbesondere auch Krankheitsdaten aus meinen Krankennote(n)) unter der Verantwortung der oben genannten Institution in verschlüsselter Form

für Studien mit allen wissenschaftlich in Betracht kommenden Fragestellungen gespeichert und verarbeitet werden.

oder

für Studien mit der oben genannten Fragestellung gespeichert und verarbeitet werden.

3

(WEITERGABE DER DATEN / EINBLICK DURCH DRITTE)

Ich bin damit einverstanden, dass ferner folgende Personen Einblick in meine Original-Krankennote(n) nehmen. Die ärztliche Schweigepflicht gilt dabei für alle genannten Personen:

PD Dr.med. A.Bickel, PD. Dr.med. C.Maihöfner, Pr. Dr.med. B.Numer, Pr. cand.med. C. Säuger.....

Ich bin mir bewusst, dass die zuständigen Behörden im Rahmen ihrer gesetzlichen Befugnisse ggf. Hinblick in sämtliche Unterlagen nehmen können.

Widerruf der Zustimmung zur Datenverwendung

Ich weiß, dass ich meine Zustimmung zur Verwendung meiner Daten jederzeit und ohne Angabe von Gründen gegenüber der einleitend genannten Institution bzw. Person widerrufen kann und dass dies keinen Einfluss auf meine etwaige weitere ärztliche Behandlung hat.

Im Falle des Widerrufs bin ich damit einverstanden, dass meine Daten zu Kontrollzwecken weiterhin gespeichert bleiben. Ich habe jedoch das Recht, deren Löschung zu verlangen, sofern gesetzliche Bestimmungen der Löschung nicht entgegenstehen.

Ich bin mir bewusst, dass im Falle einer anonymisierten Speicherung meiner Daten deren Löschung auf meinen Wunsch nicht möglich ist.

Datum

Name der Probandin / des Probanden

Unterschrift

4

8.5 QST- Erhebungsbogen

Randomisation Sheet A1

Name: _____
Date of birth: _____

Screening- No.: _____
Date: _____

Subject- No.: _____
Duration of test: _____ Init.: _____

Test area

8		16		QT		512		64	
QT		BR		64		16		512	
256		512		8		64		QT	
64		32		215		BR		16	
CW		64		256		QT		8	
512		128		16		32		BR	
128		QT		CW		8		256	
16		CW		BR		128		32	
32		8		128		256		CW	
BR		256		32		CW		128	

Touch

	mN
mN	
	mN
mN	
	mN
mN	
	mN
mN	
	mN
mN	

Pain

	mN
mN	
	mN
mN	
	mN
mN	
	mN
mN	
	mN
mN	

Vibration

/8
/8
/8

Pressure pain

Wind up

1st stimulus	Repeated stimulus

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

PD Dr. A. Bickel für die hervorragende, umfassende, motivierende, stets sorgende und wissenschaftliche Betreuung als Doktorvater;

PD Dr. B. Namer für die kompetente Unterstützung in praktischen und theoretischen Fragen und ihre Hilfe bei der immunhistochemischen Aufarbeitung der Hautbiopsien;

PD Dr. G. Heyer für die Durchführung und die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Hautbiopsien in der Dermatologischen Klinik;

Prof. Dr. med. Dr. h.c. S. Schwab für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Neurologischen Klinik durchzuführen;

Prof. Dr. W. L. Neuhuber und den Mitarbeitenden des Institutes für Anatomie Lehrstuhl I für die gute Unterstützung und Hilfe bei der Herstellung und immunhistochemischen Aufarbeitung der Hautbiopsien;

Prof. Dr. Dr. h.c. H.- O. Handwerker für die Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologie I und die Möglichkeit die Untersuchungen dort durchzuführen;

Frau G. Göhring- Waldeck für den technischen Beistand im Labor und die engagierte Unterstützung in der Terminkoordination und der Histologischen Aufarbeitung der Hautbiopsien;

Meinen Eltern Rudolf und Waltraud Senger für die verlässliche Förderung und ihr stetes und gewissenhaftes Sorgen, die mir dieses Studium ermöglichten;

Meiner Schwester Daniela Senger für ihre unermüdliche Geduld, ihr anhaltendes Verständnis in Fachfragen und ihre umfassende Unterstützung in allen Bereichen;

Allen Patientinnen und Patienten für die bereitwillige Teilnahme an den Untersuchungen und die Überlassung der Hautbiopsien zur weiteren Aufarbeitung zur Erlangung wissenschaftlicher Erkenntnisse.