

**Untersuchung der kleinen Nervenfasern in Haut-
biopsien bei Kindern und
Jugendlichen mit Schmerzen unklarer Ätiologie**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Görlach, Jonas Leonard
aus Uelzen

Gießen 2020

Aus dem Institut für Neuropathologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor des Instituts: Prof. Dr. med. Till Acker

Gutachterin: PD Dr. med. Anne Schänzer

Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Neubauer

Tag der Disputation: 10.11.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergrund.....	1
1.2	Stand der Forschung.....	2
2	Aufgabenstellung	5
3	Theoretische Grundlagen	6
3.1	Die menschliche Haut.....	6
3.1.1	Aufbau.....	6
3.1.2	Innervation und Funktion der kleinen epidermalen Nervenfasern.....	8
3.1.3	Ekrine Schweißdrüsen.....	10
3.2	Neuropathische Schmerzen.....	14
3.3	Pathologie der kleinen somatosensorischen und autonomen Nervenfasern im Kindes- und Jugendalter.....	15
3.3.1	Epidemiologie.....	15
3.3.2	Ätiologie.....	15
3.3.3	Pathophysiologie.....	19
3.3.4	Symptomatik.....	20
3.3.5	Diagnosekriterien und generelle Aspekte zur Diagnostik.....	23
3.3.6	Hautstanzbiopsie.....	26
3.3.7	Therapie.....	30
3.3.8	Prognose.....	30
4	Material und Methoden	31
4.1	Materialliste.....	32
4.2	Untersuchungskohorte und Probengewinnung.....	32
4.2.1	Untersuchungskohorte.....	32
4.2.2	Ethikvotum.....	32
4.2.3	Durchführung der Hautstanzbiopsie.....	33
4.2.4	Fixierung, Lagerung und Weiterverarbeitung der Proben.....	33
4.3	Probefärbungen und Etablierung des Färbeprotokolls.....	34

4.3.1	Grundlage der Immunfluoreszenzfärbung	34
4.3.2	Darstellung der epidermalen Nervenfaserdichte (END) und Schweißdrüseninnervationsdichte (SND) mit Antikörpern gegen PGP 9.5	34
4.3.3	Färbeprotokoll für die Analyse der END und SND	39
4.3.4	Darstellung myelinisierter Nervenfasern	39
4.4	Auswertung der Untersuchungsparameter	43
4.4.1	Fluoreszenz-Mikroskopie	43
4.4.2	Auswertung der END	43
4.4.3	Auswertung der SND	45
4.5	Statistische Analysen	48
5	Ergebnisse	49
5.1	Ergebnisse der statistischen Auswertungen	49
5.1.1	Berechnung auf Normalverteilung der Werte	49
5.1.2	Berechnungen zu den einzelnen Untersuchungsgruppen	50
5.2	Analyse der END und SND bei Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik (Kontrollgruppe)	51
5.2.1	Auflistung der morphometrischen Analyseergebnisse	52
5.2.2	Analyse der END	53
5.2.3	Analyse der SND	54
5.3	Klinische Daten der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik	55
5.4	Analyse der END und SND bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik	66
5.4.1	Analyse der END und Korrelation mit klinischen Befunden	66
5.4.2	Analyse der SND und Korrelation mit klinischen Befunden	70
5.5	Einzelfallvorstellung ausgewählter Patient*innen mit Schmerzsymptomatik ..	74
5.6	Einzelfallvorstellung Kind mit Morbus Pompe	76
5.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	78
6	Diskussion	79
6.1	Ergebnisdiskussion	79
6.1.1	Die kleinen Nervenfasern bei Kindern und Jugendlichen ohne Schmerzsymptomatik	79

6.1.2	Beteiligung kleinen Nervenfasern bei Kindern und Jugendlichen mit Schmerzsymptomatik.....	81
6.1.3	Ätiologie der Beteiligung der kleinen Nervenfasern bei Kindern und Jugendlichen mit Schmerzsymptomatik	91
6.1.4	Kleinfaserpathologie am Beispiel eines Kindes mit Morbus Pompe	96
6.2	Methodendiskussion und Limitationen	98
6.3	Fazit und Ausblick.....	100
7	Zusammenfassung	101
8	Summary	102
9	Abkürzungsverzeichnis	103
10	Abbildungsverzeichnis	105
11	Tabellenverzeichnis.....	106
12	Literaturverzeichnis.....	107
13	Anhang.....	130
13.1	Geräte	130
13.2	Software.....	130
13.3	Verbrauchsmaterialien.....	130
13.4	Zusammensetzung der Gebrauchslösungen	131
13.5	Skalierung des Fluoreszenzmikroskop Leica DM 2000.....	132
13.6	Protokoll Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für PGP 9.5 und Anti-MBP Antikörper.....	133
14	Publikationsverzeichnis.....	134
15	Ehrenwörtliche Erklärung	135
16	Danksagung.....	136
17	Tabellarischer Lebenslauf	137

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Eine pathologische Veränderung der kleinen somatosensorischen und autonomen Nervenfasern (engl.: „*small fiber*“, SF) kann bei verschiedenen Grunderkrankungen, aber auch idiopathisch auftreten und führt häufig zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität betroffener Personen vom Kindes- bis zum Erwachsenenalter (Bakkers et al., 2014; Voortman et al., 2017; MacDonald et al., 2019). Bei vielen Patient*innen ist die Diagnose oft schwierig und damit eine gute Therapie meist nicht möglich (Oaklander und Nolano, 2019). Terminologisch wird bei Verlust, Schädigung oder Hyperaktivität der SF mit entsprechender klinischer Symptomatik (neuropathische Schmerzen wie z.B. nächtliches Brennen in den Unterschenkeln, Hypoästhesien) von einer Kleinfaserneuropathie (engl.: „*small fiber neuropathy*“, SFN) gesprochen. Eine Beteiligung der großen Nervenfasern schließt eine SFN aus. (Döring et al., 2012).

Insgesamt stellt sich ein heterogenes Bild an Ursachen einer SF-Schädigung im Kindes- und Jugendalter, aber auch im Erwachsenenalter dar, welche primär hereditär (z.B. Mutationen in spannungsabhängigen Natriumkanälen/anderen Ionenkanälen), sekundärerworben (metabolisch, immunvermittelt, traumatisch oder toxisch nach Chemotherapie) oder idiopathisch bedingt sein können.

Bei der Diagnostik einer Beteiligung der SF im Krankheitsgeschehen spielen insbesondere Symptome wie neuropathische Schmerzen (z.B. nächtliche brennende Schmerzen), die Erhebung klinischer Befunde (z.B. vermindertes Empfinden auf Nadelstiche), autonome Störungen (z.B. anhaltender Durchfall) sowie apparative (Quantitativ-sensorische Testung, QST) und minimal-invasive (Hautstanzbiopsie) Methoden eine entscheidende Rolle (Döring et al., 2012). Die Hautstanzbiopsie bietet dabei eine quantitativ-morphometrische und kooperationsunabhängige Möglichkeit z.B. zur Bestimmung der Innervation der Epidermis (epidermale Nervenfaserdichte, END) und der Schweißdrüseninnervation (sudomotorische Nervenfaserdichte, SND). Dies kann histopathologische Korrelate zu den klinischen Symptomen bzw. Zeichen Betroffener mit SF-Schädigung liefern (Devigili et al., 2019).

In Abgrenzung zur SFN steht der Begriff Kleinfaserpathologie (engl.: „*small fiber pathology*“, SFP) der zur Beschreibung von Befunden bei schmerzhaften und nicht-schmerzhaften Erkrankungen genutzt wird. In diesen liegt eine Schädigung der SF vor, die aber aufgrund fehlender Diagnosekriterien nicht als SFN einzuordnen sind (Üçeyler, 2016).

In den letzten Jahren gab es vermehrt Publikationen, die eine SF-Beteiligung bei verschiedenen Erkrankungen zeigen und damit Hinweise darauf geben, dass auch das periphere Nervensystem betroffen sein kann (Nolano et al., 2008; Weis et al., 2011; Hobson-Webb et al., 2015).

1.2 Stand der Forschung

Auch wenn in der Literatur chronische Schmerzen und autonome Symptomkomplexe bei Kindern und Jugendlichen mit unterschiedlichen Erkrankungen beschrieben sind, liegen nur wenige Berichte bezüglich einer histopathologischen Analyse der epidermalen Innervation und insbesondere der Schweißdrüseninnervation in Zusammenschau mit der klinischen Symptomatik sowie einer möglichen Ätiologie im Gegensatz zu Erwachsenen vor. In Tabelle 1 sind die bisher veröffentlichten Studien an Kindern und Jugendlichen mit Schmerzsyndrom und Hautstanzbiopsie zur Untersuchung der SF zusammengefasst.

Tabelle 1: Fallstudien zur histopathologischen Untersuchung der kleinen Nervenfasern bei Kindern und Jugendlichen mit Schmerzsymptomatik

	n (Alter bei Biopsie)	Spezifische Klinik (wichtigste Ergebnisse)	Ergebnis der Hautstanzbiopsie	Ätiologie
Wakamoto et al., 1999	1 (12 Jahre)	- Distal brennende Schmerzen - Hypoästhesie auf Nadelstichreize - Postprandiales Erbrechen	END vermindert	Idiopathisch
Nolano et al., 2000	1 (10 Jahre)	- Stark verminderte Schmerz- und Temperaturwahrnehmung	Fehlende Innervation von Epidermis/Schweißdrüsen	HSAN Typ IV
Oaklander und Klein, 2013	41 (20,8 ± 9,1 Jahre)	- Seit Kindheit bestehende Symptomatik - Distal-symmetrische Schmerzen (76%) - Fatigue (83%) - Autonome Symptome (98%)	END vermindert, pathologisch verändertes autonomes	Sjögren-Syndrom (0,8%) Diabetes mellitus Typ I (0,4%)

		- Erythromelalgie (23%)	mes Nervensystem in Funktionstests	Autoimmun (33%)
Hoeijmakers et al., 2016	2 (14-16 Jahre)	- Schmerzen - Kribbeln und Jucken der UEX - Autonome Dysfunktionen - Fatigue, Erythromelalgie	END vermindert	Idiopathisch Zusammenhang mit Diabetes/rascher BZ-Senkung wird diskutiert
Kafaie et al., 2017	8 11-16 Jahre alt	- Distale, stechende/brennende und z.T. diffus verteilte Schmerzen	END vermindert	IgM-Antikörper titrierbar gegen das neuronale Antigen TS-HDS
Breton et al., 2018	1 (17 Jahre)	- Initial brennende/stechende Schmerzen im unteren Rücken, dann bis UEX - Taubheit Zehen	END vermindert	Nach anti-TNF- α Therapie bei Colitis Ulcerosa
Oaklander und Nolano, 2019	1 (13 Jahre)	- Nicht angegeben	Axondegeneration, -regeneration	Morbus Fabry
Shinkarevsky Fleitman et al., 2020	4 (9-17 Jahre)	- Erythromelalgie - Brennen/Parästhesien überwiegend in UEX, z.T. im Rücken	END vermindert	Mutation im MEFV-Gen (66%) Morbus Behcet (33%)

Erklärung: BZ = Blutzucker, END = epidermale Nervenfaserdichte, HSAN Typ IV = Hereditäre sensorische und autonome Neuropathie Typ IV, MEFV = Mutationsspektrum bei familiärem Mittelmeerfieber, n = Stichprobengröße, UEX = untere Extremität, TS-HDS = Trisulfatiertes Disaccharid Ido-A2S-GlcNS-6S

Zur diagnostischen Einschätzung, ob eine pathologische Verminderung der END vorliegt, sind anhand von Studien mit großen Gruppen gesunder Individuen Referenzwerte publiziert worden, welche eine physiologische Verminderung der END im Laufe des Lebens - allerdings nur für Erwachsene - beschreiben (Lauria et al., 2010a; Provitera et al., 2016; Collongues et al., 2018). Nur zwei Studien mit geringer Proband*innenzahl unter-

suchten die epidermale Innervation bei gesunden Kindern und Jugendlichen unterschiedlichen Alters, welche ebenfalls auf eine Abnahme der END mit zunehmendem Alter hindeuten (McArthur et al., 1998; Panoutsopoulou et al., 2015).

Für die Schweißdrüseninnervation liegen weder etablierten Referenzwerte für Erwachsene noch für Proband*innen jünger als 18 Jahre vor. Darüber hinaus sind bislang nur zwei histopathologische/funktionelle Untersuchungen der Schweißdrüseninnervation bzw. der -funktion bei Kindern- und Jugendlichen publiziert (Nolano et al., 2000; Cook-Norris et al., 2012) .

Die diagnostischen Möglichkeiten der Hautstanzbiopsie mit Analyse der epidermalen sowie der sudomotorischen Innervation in Zusammenschau mit der klinischen Symptomatik und Ätiologie ist bei Kindern- und Jugendlichen mit unklaren Schmerzen noch nicht ausreichend geklärt. Außerdem ist aufgrund fehlender Referenzwerte und einer Studienlage mit nur geringen Fallzahlen die Diagnose einer SFN für die Alterskohorte der Kinder und Jugendlichen nicht vollends etabliert.

2 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die somatosensorischen und autonomen kleinen Nervenfasern (SF) mittels Hautbiopsie bei Kindern- und Jugendlichen mit ungeklärter Schmerzsymptomatik pathologisch verändert sind. Die Befunde der Hautbiopsien wurden mit den klinischen Daten und Laborparametern der Probanden korreliert. Darüber hinaus wurden Hautbiopsien von Kindern ohne Schmerzsymptomatik verschiedenen Alters analysiert. Zusätzlich wurden bei einem Kind mit der Diagnose eines juvenilen Morbus Pompe (IOPD) die SF untersucht, mit der Fragestellung, ob das periphere Nervensystem bei dieser Erkrankung mitbetroffen ist.

Folgende Punkte sollten in der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

- Untersuchung von proximaler Hautstanzbiopsien einer Kontrollkohorte von Kindern und Jugendlichen ohne Schmerzsymptomatik zur Analyse altersabhängiger END und SND
- Analyse der END und der SND an Hautstanzbiopsien bei Kindern und Jugendlichen mit chronischem Schmerzsyndrom unklarer Ursache
- Retrospektive Datenerhebung der klinischen Symptome und Befunde der durchgeführten Untersuchungen
- Vergleich der morphometrischen Ergebnisse der Hautstanzbiopsien mit den klinischen Symptomen der Untersuchungskohorte
- Einzelfallvorstellung eines Kindes mit Morbus Pompe zur Untersuchung, ob bei Morbus Pompe das periphere Nervensystem und somit die SF betroffen sind
- Untersuchung, ob myelinisierte Nervenfasern in Hautbiopsien quantitativ bestimmt werden können

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Die menschliche Haut

Die Haut ist mit bis zu 2 m² Ausdehnung das größte Organ des menschlichen Körpers. Als natürliche Barriere schützt sie den Körper vor toxischen, mechanischen, thermischen und anderen Einflüssen der Umwelt sowie vor zu großen Flüssigkeitsverlusten und dient der Thermoregulation, sowie der sensorischen Wahrnehmung der Außenwelt. Darüber hinaus sendet die Haut über Schweiß oder die Veränderung ihrer Farbe Signale an die Umwelt und ist darüber hinaus maßgeblich an der Bildung von Vitamin D beteiligt (Ebenezer et al., 2007, S. 1059; Königshoff und Brandenburger, 2018, S. 171f.; Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 634ff.).

3.1.1 Aufbau

Da sich die menschliche Haut regional sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrer Funktion unterscheidet, wird sich im Folgenden aufgrund der Fragestellung primär auf die Haut bezogen, die am distalen Unterschenkel, am (proximalen) Oberschenkel und an der Fingerbeere zu finden ist.

Anatomisch gesehen wird die Haut (= lateinisch Kutis) in Epidermis und Dermis eingeteilt. Unter der Kutis gelegen befindet sich die Subkutis. Als äußerste Hautschicht ist die Epidermis aus einem mehrschichtig verhornten Plattenepithel aufgebaut, das überwiegend durch Keratinozyten, aber auch Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkelzellen gebildet wird. Die in die Epidermis ziehenden freien Nervenfasern (epidermale Nervenfasern, ENF, Abbildung 1) stellen terminale Nervenendigungen der C-Fasern und zum Teil der A δ -Fasern dar. Unter der am dermalen-epidermalen Übergang liegenden Basalmembran befindet sich das kapillarreiche Stratum papillare, das in der unbehaarten Haut (z.B. Fingerbeere) reich an Meissner-Tastkörperchen ist. Als tiefere Dermissschicht ist das Stratum reticulare überwiegend aus Bindegewebe zusammengesetzt.

Myelinisierte und unmyelinisierte Nervenfasern bzw. -bündel (C-, A δ - und A β -Fasern), diverse Mechanorezeptoren (Meissner-Tastkörperchen, Ruffini-Körperchen, Haarfollikel-Rezeptoren), die Haarfollikel sowie die Ausführungsgänge der ekkrinen Schweißdrüsen stellen für das Verständnis dieser Arbeit wichtige dermale Strukturen dar. Die ekkrinen Schweißdrüsen selbst sind ferner am dermalen-subkutanen Übergang lokalisiert und in das subkutane Fettgewebe eingebettet. Als Mechanorezeptoren sind die Vater-Pacini-

Körperchen in der Subkutis lokalisiert (Nolano et al., 2003; Provitera et al., 2007; Lüllmann-Rauch und Asan, 2019, S. 634ff.) Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau der menschlichen Haut mit Hautanhangsgebilden und Innervation.

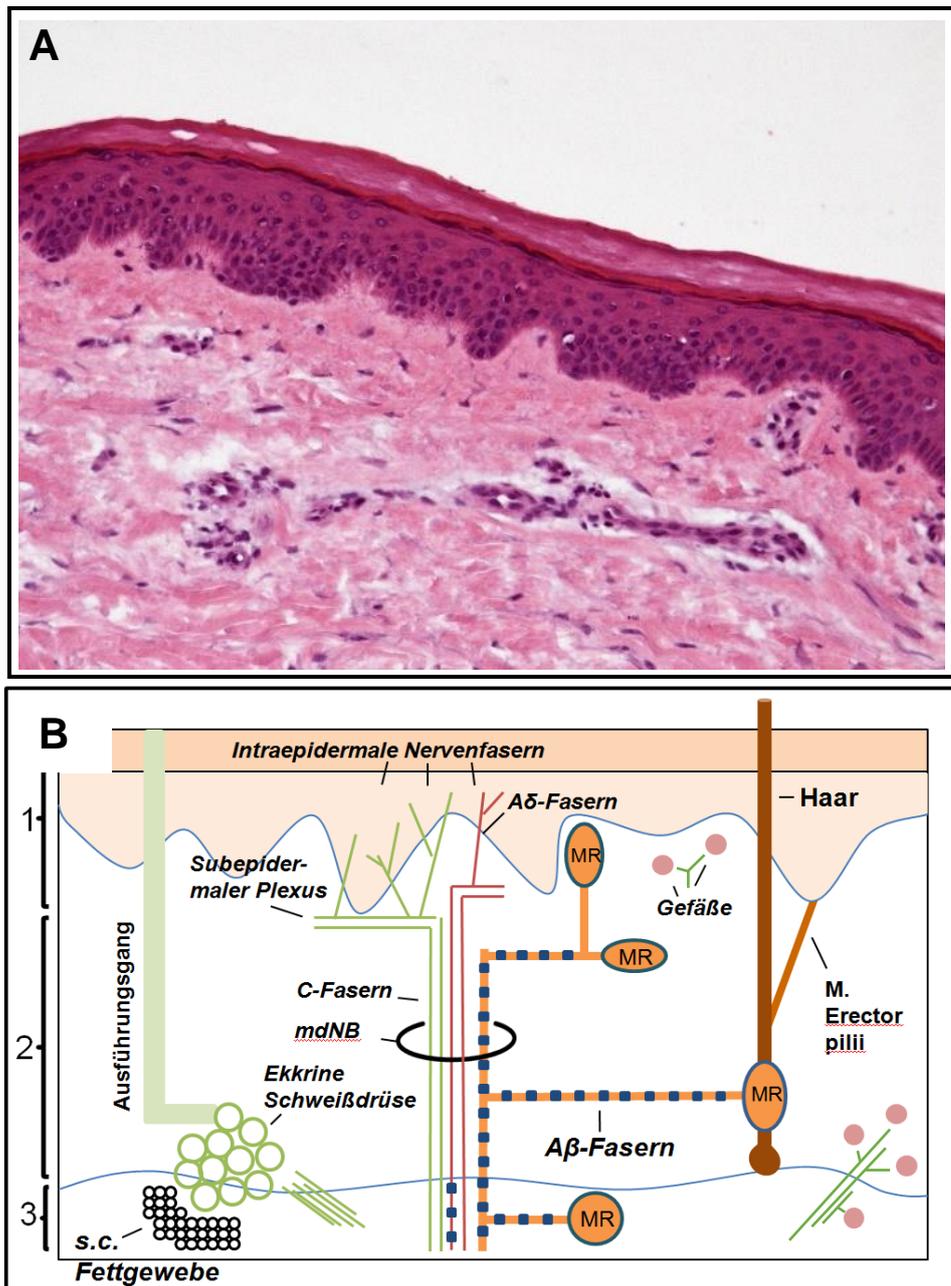


Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut im Hämatoxylin-Eosin-Schnitt (A, Vergrößerung x5) und schematisch (B) mit Innervation und Hautanhangsgebilden. (1) Epidermis. (2) Dermis. (3) Subkutis. mdNB = myelinisierte dermale Nervenbündel, MR = Mechanorezeptoren, s.c. Fettgewebe = subkutanes Fettgewebe

3.1.2 Innervation und Funktion der kleinen epidermalen Nervenfasern

Die senkrecht in die Dermis eintretenden Nervenbündel bilden im Stratum papillare einen subepidermalen Plexus (Abb. 1,2), von wo sich die C-Fasern und zum Teil die A δ -Fasern dreidimensional als freie Nervenendigungen in die Epidermis verteilen (Kennedy et al., 1994; Glatte et al., 2019, S. 5).

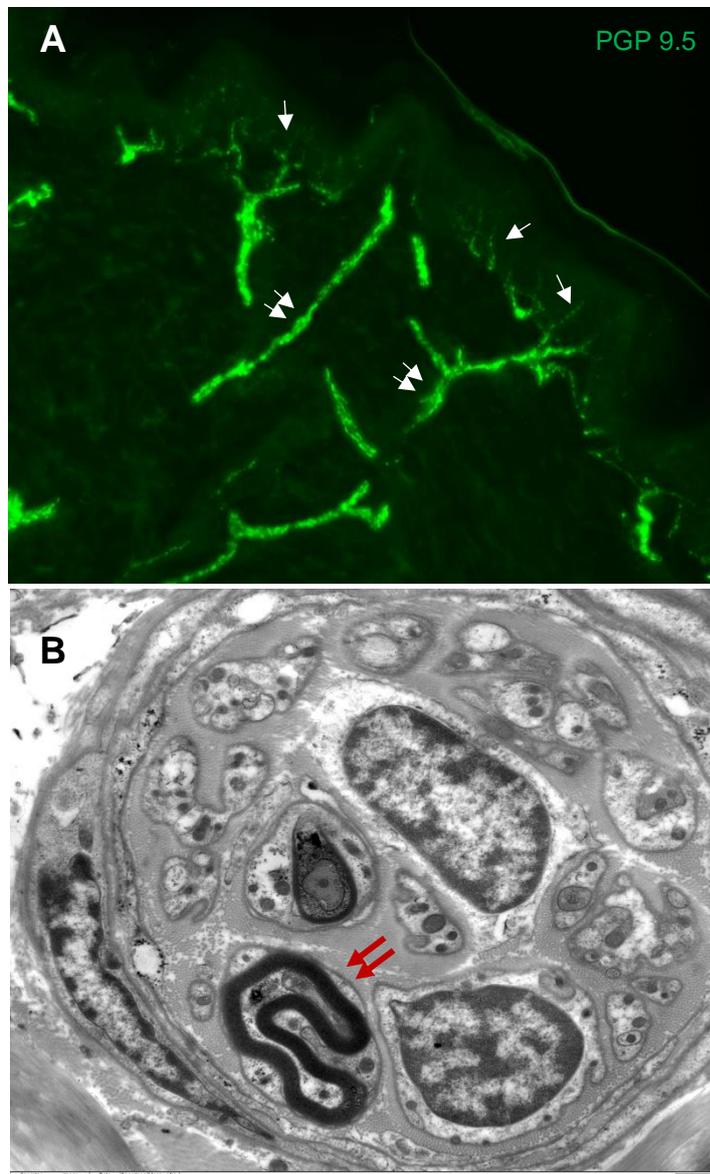


Abbildung 2: Die kleinen Nervenfasern in der Kutis im 50- μ m dicken Hautschnitt in Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen das Protein-Gen-Produkt 9.5 (**A**, Doppelpfeile = subepidermaler Plexus, Einzelpfeile = epidermale freie Nervenendigungen, Vergrößerung x20) und in einem Beispiel für einen dünn-myelinisierten Nerv (roter Doppelpfeil) in Elektronenmikroskopie (**B**). Vergrößerung x7000.

Die unmyelinisierten C-Fasern sowie die dünn-myelinisierten A δ -Fasern (Abb. 2B) werden auch als sogenannte kleine Nervenfasern (engl.: „*small fiber*“, SF) bezeichnet (Myers et al., 2013, S. 2; Themistocleous et al., 2014, S. 1). Die A δ -Fasern sind zunächst myelinisiert und verlieren ihre Myelinscheide mit Eintritt in die Dermis und sind somit im

subepidermalen Plexus sowie in der Epidermis ebenfalls unmyelinisiert (Provitera et al., 2007). Die C-Fasern lassen sich wiederum physiologisch in peptiderge (z.B. CGRP, engl.: „*Calcitonin-gene related peptide*“) und nicht-peptiderge Unterformen (z.B. Ionenkanäle wie der TRPA1, engl.: „*transient receptor potential ankyrin 1*“) sowie funktionell nach ihren Eigenschaften (Leitungsgeschwindigkeit) einteilen (Zylka et al., 2005; Lumpkin und Caterina, 2007, S. 859; Weyer-Menkhoff et al., 2019) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Darstellung der unterschiedlichen Nervenfasertypen in der menschlichen Haut (Klinke und Baumann, 2010, S. 635; McGlone und Reilly, 2010, S. 151; Glatte et al., 2019, S. 4)

Fasertyp	Funktion	Myelinisierung	Durchmesser (µm)	Geschwindigkeit (m/s)
C-Fasern - <i>C-pain</i> - <i>C-tactile</i> - <i>C-autonomic</i>	Nozizeption (dumpfer Schmerz) Kälte-&Wärmeleitung, Mechanorezeption, Berührungsempfinden, Jucken Vegetative Funktion (Vasomotor, Pilocomotor, Sudomotor)	-	0,5-1,5	0,5-2
B-Fasern	Präganglionäre vegetative Fasern	+	1-3	5-20
Aδ-Fasern	Nozizeption (scharfer Schmerz), Kälteleitung, Mechanorezeption	(+)	2-5	10-30
Aβ-Fasern	Niedrigschwellige Mechanorezeptoren (Vibration, Berührungen, Druck)	++	7-15	40-90

In Abhängigkeit vom Ort der untersuchten Hautstelle sind in der Literatur variierende Innervationsmuster beschrieben (Kawakami et al., 2001; Besné et al., 2002). So ist beispielsweise am Augenlid eine höhere Dichte an epidermalen Nervenfasern zu finden als am Abdomen (Besné et al., 2002).

Sensorische Informationen aus den Mechanorezeptoren, den Haarfolikeln, den Blutgefäßen sowie den SF werden über das sensible Neuron zum Spinalganglion (Rumpf, Gliedmaßen) oder den N. trigeminus (Gesicht), weiter zum Hinterhorn des Rückenmarks und von dort zum Gehirn geleitet (Lumpkin und Caterina, 2007, S. 859). Aber auch wichtige efferente Qualitäten des autonomen Nervensystems zu den Blutgefäßen (Vasomotor), den Schweißdrüsen (Sudomotor) und den Haarbalgmuskeln (Pilocomotor) sind in der Haut zu finden (Kennedy et al., 1994). Die dünn myelinisierten B-Fasern bilden hierbei den präganglionären und die unmyelinisierten C-Fasern den postganglionären Anteil (Glatte et al., 2019, S. 2).

3.1.3 Ekkrine Schweißdrüsen

3.1.3.1 Aufbau und Funktion

Die zu den Hautanhangsgebilden gehörenden Schweißdrüsen werden histologisch in apokrine (z.B. axilläre Schweißproduktion), ekkrine und apoekkrine (ebenfalls axilläre Schweißproduktion) Formen unterteilt (Wilke et al., 2007). Da für die Fragestellung dieser Arbeit nur die ekkrinen Schweißdrüsen von Relevanz sind, wird im Weiteren ausschließlich auf diese eingegangen.

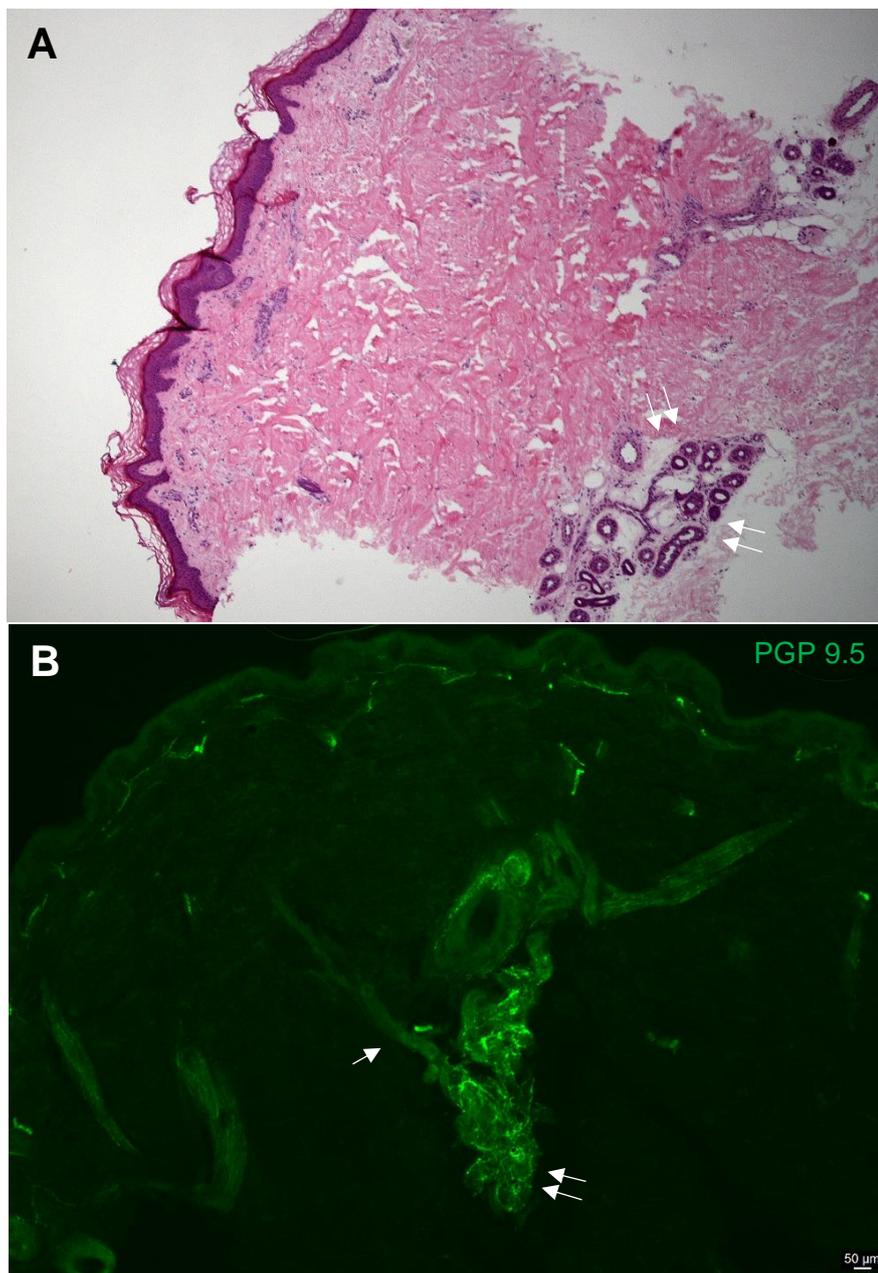


Abbildung 3: Darstellung einer in der Tiefe der Dermis liegenden Schweißdrüse (Doppelpfeil) in im Hämatoxylin-Eosin-Färbung (A) und in Immunfluoreszenzfärbung (B) mit nicht komplett dargestelltem Ausführungsgang (Einzelpfeil) sowie mit Antikörpern gegen PGP 9.5 in grün angefärbte Nervenfasern. Vergrößerung x5.

Im menschlichen Körper finden sich etwa 1,6-5 Millionen ekkrine Schweißdrüsen (Kuno, 1938; Greger, 1996, S. 2220; Achenbach, 2004, S. 2; Wilke et al., 2009, S. 168; Taylor und Machado-Moreira, 2013). Die Dichte der Schweißdrüsen und Menge der Schweißproduktion variiert individuell und steht in Abhängigkeit zur Körperregion (Sato und Dobson, 1970; Taylor und Machado-Moreira, 2013). Taylor und Machado-Moreira (2013) beschreiben an der volaren Seite der Finger die höchste (532 Drüsen/cm²) und an der Oberlippe die geringste (16 Drüsen/cm²) Dichte an Schweißdrüsen.

Ekkrine Schweißdrüsen bestehen aus tubulös-unverzweigten Endstücken, die in der Tiefe der Dermis am Übergang zur Subkutis in das Fettgewebe eingebettet liegen, sowie einem Ausführungsgang, der zur Hautoberfläche führt (Sato et al., 1989, S. 539; Kennedy et al., 1994) (Abb. 3).

Gibbons et al. (2009) geben die durchschnittliche Fläche der Endstücke mit 0,066 ($\pm 0,035$ mm²) an. Das Epithel des Endstücks besteht aus vielen hellen, glykogenhaltigen und dunklen, mucopolysaccharidhaltigen Drüsenzellen sowie kontraktile Myoepithelzellen (Abb. 4). Die Ausführungsgänge, welche an der Hautoberfläche enden, bestehen aus zwei- bis dreischichtigem Epithel, das der Modifizierung des Sekrets dient (insbesondere NaCl-Resorption) (Hibbs, 1958; Sato et al., 1989, S. 556; Cui und Schlessinger, 2015, S. 644f.). Ein Geflecht aus Blutgefäßen (eine Schweißdrüse wird von einer Arteriole versorgt) und von mehreren Nervenbündeln aus unmyelinisierten, sympathischen C-Fasern umgeben bzw. innervieren die tubulären Endstücke (Kennedy et al., 1994; Wang und Gibbons, 2013, S. 373; Glatte et al., 2019, S. 3).

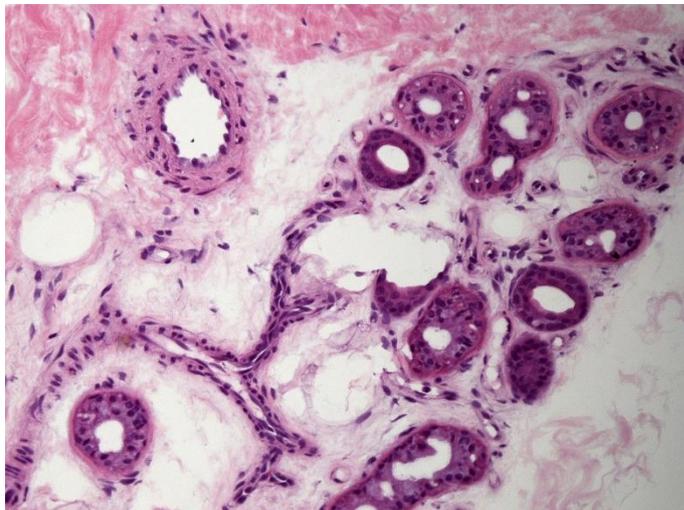


Abbildung 4: Endstück einer Schweißdrüse in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Vergrößerung x20

Bei Menschen und Primaten dient die Sekretion aus den ekkrinen Schweißdrüsen insbesondere der Thermoregulation, der Regulation des Wasser-Elektrolyt-Haushalts, der Immunabwehr (z.B. durch IgA und einer Reihe an Zytokinen), der Bildung eines Feuchtigkeitfilms auf der Haut und dem Aufbau eines schützenden Hautmilieus (z.B. durch antimikrobielle Substanzen wie Dermcidine) (Achenbach, 2004, S. 12; Cui und Schlessinger, 2015). Darüber hinaus führen emotionale und gustatorische Reize (Groscurth, 2002, S. 1) sowie der Flüssigkeitsstatus und körperliche Aktivität (Kondo et al., 1998; Taylor und Machado-Moreira, 2013; Gerrett et al., 2018) zu einer veränderten Schweißproduktion. Hauptbestandteil des Schweißsekrets bildet insbesondere Wasser, aber auch Natrium, Chlorid, andere Elektrolyte und anorganische Moleküle (z.B. Laktat, Urea oder diverse Zytokine) sind zu nennen (Baker, 2019).

3.1.3.2 Innervation und Regulierung der Schweißsekretion

Die Regulation der Schweißsekretion erfolgt durch das Zentralnervensystem (ZNS) in unterschiedlichen Zentren in Abhängigkeit des Auslösers. Das sogenannte kortikale Schwitzen gibt Antwort auf Emotionen und wird an den Hand- und Fußsohlen sowie in der Axilla beobachtet. Das gustatorische Schwitzen reagiert auf scharfe Gewürze und läuft im Gesicht ab und das hypothalamische Schwitzen ist für die Thermoregulation zuständig (Wilke et al., 2007, S. 170f.; Cui und Schlessinger, 2015, S. 646). Bei einer thermalen Reaktion (z.B. Erhöhung der Hauttemperatur, körperliche Belastung) werden die efferenten Informationen zur Schweißsekretion vom thermoregulatorischen Zentrum (präoptische Region des Hypothalamus) des Gehirns zunächst über den Pons und die Raphe-Region zur intermediolateralen Zellsäule des Rückenmarks weitergegeben (Bou-lant, 1981). Vom Vorderhorn des entsprechenden Rückenmarksabschnitts wenden sich dabei myelinisierte präganglionäre Fasern mit Acetylcholin (ACh) als Transmitter über den weißen Ramus communicans in das sympathische Grenzstrangganglion, von dem nicht-myelinisierte (postganglionäre) C-Fasern über den grauen Ramus communicans zu den ekkrinen Schweißdrüsen gelangen (Uno, 1977; Shibasaki und Crandall, 2010, S. 686). Laut Weihe et al. (2005) liegt eine Co-Expression von cholinergen (ACh) und adrenergen (Noradrenalin) Transmittern in den postganglionären schweißdrüseninner-vierenden Fasern vor, wobei der cholinerge Anteil womöglich überwiegt (Uno, 1977; Donadio et al., 2006; Wang und Gibbons, 2013). Die noradrenerge Innervation ist vermutlich für das Drüsenwachstum und die Drüsenplastizität von Bedeutung (Donadio et al., 2006) und trägt zur gesteigerten Schweißproduktion bei körperlicher Aktivität bei (Amano et al., 2017).

Nach erfolgter cholinergischer oder adrenerger Reizweiterleitung an die Drüse führt ein Calcium(Ca^{2+})-Einstrom in die Zellen (Sato und Sato, 1981) zur Verschiebung weiterer Elektrolyte (Natrium-Einstrom und Kalium-Ausstrom) zur Depolarisation der Schweißdrüsenzellen und dementsprechend zur Sezernierung von Schweiß in den Ausführungsgang.

Neben der zuvor primär zentral gesteuerten Freisetzung der Neurotransmitter, greifen vermutlich eine Reihe von Neuropeptiden intrinsisch regulierend in die Innervierung der Schweißdrüsen ein, um beispielsweise eine Feinregulierung der Schweißproduktion zu gewährleisten (Shibasaki und Crandall, 2010), oder die Widerstandsfähigkeit gegenüber Schädigungen z.B. bei Polyneuropathie zu verbessern (Kennedy und Sakuta, 1984; Kennedy et al., 1994). So werden insbesondere das Vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP), das Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), die Substanz P (SP) sowie die Dopamin- β -Hydroxylase ($\text{D}\beta\text{H}$) genannt. Zum Beispiel kann der cholinerge Marker VIP zwar die Schweißproduktion steigern, die Produktion aber nicht ohne den Einfluss von ACh induzieren (Yamashita et al., 1987) oder SP hat einen limitierenden Effekt auf die Dauer der Schweißproduktion aber nicht auf die Menge an Schweiß (Schlereth et al., 2006).

3.2 Neuropathische Schmerzen

Chronische Schmerzen, die länger als 8 Wochen dauern (Heuß, 2019), kommen mit steigender Inzidenz bei ca. 6 - 38% der Kinder und Jugendlichen vor (van Dijk et al., 2006; King et al., 2011).

Schmerz kann in eine nozizeptive, eine neuropathische und eine nozioplastische Form unterschieden werden (Dohrn et al., 2019, S. 90). Dabei bildet der nozizeptive Schmerz eine physiologische Antwort auf schmerzvolle Reize wie z.B. einer Gewebeschädigung nach Verletzung mit direkter Auslösung der peripheren Schmerzrezeptoren und Weiterleitung ins Gehirn ab. Bei einer neuropathischen Symptomatik kommt es durch zentrale oder periphere Ursachen zu einer Schädigung der somatosensorischen C- und A δ -Fasern, aber auch die autonomen Nervenfasern können betroffen sein (Cohen und Mao, 2014, 2). Die nozioplastische Form ähnelt in der Symptomatik dem neuropathischen Schmerz, es ist aber keine Beteiligung des somatosensorischen Systems nachweisbar (Kosek et al., 2016).

Es wird vermutet, dass ca. ein Fünftel der chronisch vorkommenden Schmerzen bei Erwachsenen neuropathisch sind (Cohen und Mao, 2014), wobei insgesamt ältere Menschen häufiger betroffen sind als Jüngere (Bouhassira, 2019, S. 5). Ungefähr 6% der Kinder und Jugendlichen sind von neuropathischen Schmerzen betroffen, es liegen aber nur wenige Daten zur Häufigkeitsverteilung in dieser Altersgruppe vor (Howard et al., 2014, S. 84). Die Ursachen neuropathischer Schmerzen sind vielfältig und finden sich bei Erkrankungen wie einer Polyneuropathie (PNP), einer SFN, der Trigeminus-Neuralgie oder der Post-Zoster-Neuralgie (Bouhassira, 2019). Die Ursachen einer SFN bzw. der Schädigung der kleinen Nervenfasern werden in Abschnitt 3.3.2 weiter aufgeführt.

Klinisch lässt sich der neuropathische Schmerz in eine Kombination aus positiven und negativen Symptomen und Zeichen einteilen, wie in Abschnitt 3.3.5.1 beschrieben. Patient*innen schildern eine typische Symptomatik mit einschließenden Schmerzen von stechender oder brennender Natur sowie einer Allodynie beim Tragen enger Schuhe oder der Berührung durch eine Zudecke (Döring et al., 2012, S. 255).

3.3 Pathologie der kleinen somatosensorischen und autonomen Nervenfasern im Kindes- und Jugendalter

3.3.1 Epidemiologie

Es liegen bisher keine Studien zur Inzidenz und Prävalenz einer SFN bzw. SF-Beteiligung im Kindes- und Jugendalter vor. Eine Häufigkeitsverteilung in dieser Altersgruppe muss dadurch in Abhängigkeit der Inzidenz und Prävalenz der jeweiligen Ätiologie gesehen werden.

Im Hinblick auf Erwachsene wurde für die SFN im Jahr 2013 eine Inzidenz von mindestens 12 Fällen auf 100.000 Einwohner*innen pro Jahr sowie einer Prävalenz von mindestens 53 Fällen auf 100.000 Einwohner*innen für eine definierte Region im südlichen Teil der Niederlande erhoben (Peters et al.). Die Inzidenz war in der Altersgruppe >65 Jahre am Höchsten. Daraus lässt sich grob eine globale Prävalenz von 4,08 Millionen Menschen abschätzen (Oaklander und Nolano, 2019, S. 1241). Allerdings merken die Autor*innen an, dass nur 10% der tatsächlich Betroffenen diagnostiziert sind, wodurch sich eine weitaus höhere Prävalenz ergeben würde.

3.3.2 Ätiologie

Insgesamt stellt sich ein heterogenes Bild an Ursachen einer SF-Schädigung im Kindes- und Jugendalter dar, welche primär hereditär (z.B. Mutationen in spannungsabhängigen Natriumkanälen/anderen Ionenkanälen), sekundär-erworben (metabolisch, immunvermittelt, traumatisch oder toxisch nach Chemotherapie) oder idiopathisch bedingt sein können.

Hinsichtlich der Ätiologie einer SFN oder SFP zeigt sich für Patient*innen im Erwachsenenalter eine deutlich umfangreichere Studienlage als für Jüngere (Üçeyler, 2016; Cazzato und Lauria, 2017; Voortman et al., 2017; Devigili et al., 2019). In den bisher publizierten Studien zeigt sich, dass sich Ätiologie, Symptomatik und Krankheitsverlauf bei Kindern- und Jugendlichen von denen bei Erwachsenen unterscheiden. Beispielsweise ist Diabetes mellitus eine der häufigsten Ursachen einer SFN im Erwachsenenalter (ca. ein Drittel der Betroffenen), was allerdings eine verhältnismäßig geringere Zahl bei unter 20-Jährigen ausmacht (Oaklander und Klein, 2013; Oaklander und Nolano, 2019). Eine wichtige Ursache scheinen immunvermittelte Prozesse zu sein (Oaklander und Klein, 2013; Hoffman et al., 2015). Ferner kann Morbus Fabry als typische Krankheit einer SFN genannt werden, die primär im Kindes -und Jugendalter beginnt und aufgrund ihrer Behandlungsmöglichkeit mit Enzyersatztherapie (engl.: „*enzyme replacement therapy*“, ERT) von Relevanz ist (Schiffmann und Ries, 2016). Im Gegensatz dazu ist die Familiäre

Amyloid Polyneuropathie (FAP) bislang nur im Erwachsenenalter beschrieben (Plante-Bordeneuve und Said, 2011; Oaklander und Nolano, 2019). Darüber hinaus kann bei zunächst als idiopathisch angesehene Formen (initial-idiopathische SFN, iiSFN) durch umfassende apparative, laborchemische oder molekulargenetische Diagnostik in vielen Fällen eine Ätiologie erfasst werden (Oaklander und Nolano, 2019).

In Tabelle 3 sind die wichtigsten Ursachen für eine SFN zusammengefasst und es wurde vermerkt, ob die zugrundeliegende Erkrankung sowohl im Kindes- und Jugendalter als auch bei Erwachsenen auftreten kann.

Tabelle 3: Ursachen einer SFN im Kindes- und Jugendalter als auch im Erwachsenenalter

Ätiologie	Literaturangabe	Altersabhängigkeit	
		<18 Jahre	>18 Jahre
Hereditär			
Natriumkanalmutation/Erythromelalgie (SCN9A, SCN10A, SCN11A)	(Huang et al., 2019; Zhang et al., 2013; Dib-Hajj et al., 2005; Faber et al., 2012a; DiMario, 2016)	✓	✓
Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)	(Kremeyer et al., 2010; Ari Koivisto und Antti Pertovaara, 2013)	✓	✓
Familiäre Amyloid-PNP (FAP)	(Terkelsen et al., 2017)	-	✓
Morbus Fabry	(Hopkin et al., 2008; Burlina et al., 2011; Schiffmann und Ries, 2016)	✓	✓
Hereditäre sensorische und autonome Neuropathie (HSAN)	(Terkelsen et al., 2017; Nolano et al., 2000)	✓ (außer Typ I)	✓
Metabolisch			
Diabetes mellitus (auch Therapie-induziert)	(Abad et al., 2002; Nery Ferreira et al., 2005; Hoeijmakers et al., 2016)	✓	✓

Weitere (Hypothyreose, Folsäure-Mangel, Vitamin-B12-Mangel)	(Terkelsen et al., 2017; Wilmshurst et al., 2019)	✓	✓
Post-Infektiös und Immunvermittelt			
Unspezifisch, mögliche Assoziation (Rheumatisch, Morbus Crohn, Mykoplasma Pneumoniae-Infektion u.a.)	(Wakamoto et al., 1999; Oaklander und Klein, 2013; Kafaie et al., 2017)	✓	✓
Autoinflammation	(Shinkarevsky Fleitman et al., 2020)	✓	✓
Antikörper gegen Trisulfatiertes Disaccharid Ido-A2S-GlcNS-6S (TS-HDS)	(Kafaie et al., 2017)	✓	✓
Monoklonale Gammopathie	(Oaklander und Nolano, 2019)	-	✓
Guillain–Barré-Syndrom	(Wong et al., 1998; Rodrigues und Kang, 2016)	✓	✓
Sarkoidose	(Wilmshurst et al., 2019)	✓	✓
Lupus erythematodes	(Saigal et al., 2015; Wilmshurst et al., 2019)	✓	✓
Sjögren-Syndrom	(Kafaie et al., 2017)	✓	✓
Infektiöse Mononukleose	(Kafaie et al., 2017)	✓	✓
HIV/AIDS	(Floeter et al., 1997; Araújo et al., 2000)	-	✓
Post-Impfung	(Kafaie et al., 2016)	✓	✓
Syndromal			
Fibromyalgie	(Oaklander und Klein, 2013; Ghasemi und Rajabally, 2020)	✓	✓
Traumatisch			
Unfall	(Atherton et al., 2008)	✓	✓
Operation	(Lauder und White, 2005; Julien-Marsollier et al., 2017; Williams et al., 2017)	✓	✓

Komplexes regionales Schmerzsyndrom (CRPS)	(Sethna et al., 2007)	✓	✓
Toxisch			
Chemotherapie	(Lieber et al., 2018)	✓	✓
Immuntherapie (z.B. TNF- α -Blocker)	(Breton et al., 2018; Bertrand et al., 2020)	✓	✓
Alkohol	(Terkelsen et al., 2017)	-	✓
Idiopathisch			
- initial idiopathisch (iiSFN) - weiterhin idiopathisch (wiSFN)	Wenn mögliche hereditäre und erworbene Gründe ausgeschlossen wurden	✓	✓

In den letzten Jahren wurden vermehrt Studien publiziert, die eine SF-Beteiligung bei verschiedenen Erkrankungen zeigen und damit Hinweise geben, dass bei diesen auch das periphere Nervensystem betroffen ist. Die Schädigung der SF kann bei solchen Erkrankungen nicht als SFN bezeichnet werden, sondern wie zuvor bereits beschrieben als SFP (Tabelle 4).

Tabelle 4: Ursachen einer SFP im Kindes- und Jugendalter als auch im Erwachsenenalter

Ätiologie	Literaturangabe	Altersabhängigkeit	
		< 18 Jahre	>18 Jahre
ALS	(Weis et al., 2011; Ghasemi und Rajabally, 2020)	-	✓
Friedreich-Ataxie	(Nolano et al., 2001)	✓	✓
Morbus Pompe	(Hobson-Webb et al., 2015)	✓	✓
Schwannomatosis	(Farschtschi et al., 2019)	✓	✓
Charcot-Marie-Tooth Erkrankung	(Laurà et al., 2014)	✓	✓
Ehlers-Danlos-Syndrom	(Galan und Kousseff, 1995; Cazzato et al., 2016)	✓	✓
Morbus Parkinson	(Nolano et al., 2008; Ghasemi und Rajabally, 2020)	-	✓

3.3.3 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der SFN wird einerseits in Abhängigkeit zu der dahinterstehenden Grunderkrankung (Voortman et al., 2017) und andererseits im Hinblick auf den Schädigungsort der Nerven (Khoshnoodi et al., 2016) betrachtet.

Bezüglich der pathophysiologischen Kausalität sind in den letzten Jahren immer mehr Gene beschrieben worden, die zu einer hereditären SFN führen können, wobei dies insbesondere Mutationen in spannungsabhängigen Natrium-Kanälen (insbesondere NaV1.7, NaV1.8, NaV1.9) betrifft, die essentiell für die Entstehung von Aktionspotentialen an den Nozizeptoren der C- und A δ -Fasern sind (Dib-Hajj et al., 2013; Brouwer et al., 2014). Diese Variationen werden meist autosomal-dominant vererbt und führen vermutlich zu einer Übererregbarkeit von Neuronen im dorsalen Hinterwurzelganglion („dorsal root ganglion“, DRG) und/oder einer verminderten Erregbarkeit in sympathischen Ganglien, was langfristig in eine Degeneration der entsprechenden Axone münden kann (Faber et al., 2012a; Faber et al., 2012b; Han et al., 2012; Bennett und Woods, 2014).

In peripheren Nerven scheinen die kleinkalibrigen, unmyelinisierten C- und schwachmyelinisierten A δ -Fasern anfälliger für ischämische Prozesse als die großkalibrigeren Fasern (Parry und Brown, 1982; Ørstavik et al., 2006). Bereits bei Patient*innen mit gestörter Glukosetoleranz, aber ohne manifesten Diabetes mellitus kann eine beeinträchtigte Vasodilatation zur Ischämie der nervenversorgenden Gefäße führen, wodurch zunächst eine Schädigung an den C-Fasern entsteht (Green et al., 2010; Zeng et al., 2017, S. 221).

Lokale Entzündungsprozesse im Gewebe sind möglicherweise verantwortlich oder verstärkend für eine SFN. Bei längenabhängigen SFN konnten in den betroffenen Hautarealen erhöhte Werte proinflammatorischer Zytokine festgestellt werden (Üçeyler et al., 2010). Bei Patient*innen mit Diabetes mellitus war ein gesteigerter oxidativer Stress nachweisbar, der die Mitochondrien schädigt und Entzündungsprozesse fördert, was zu einer Schädigung der Neuronen führen kann (Edwards et al., 2008). Ferner vermag ein proinflammatorisches Milieu Nozizeptoren zu sensibilisieren und womöglich zu aktivieren, wodurch ein chronisches Schmerzgeschehen verstärkt wird (McMahon et al., 2015).

Die SF-Schädigung kann mit vielen verschiedenen autonomen Symptomen einhergehen (Abschnitt 3.3.4.3). Es wird beispielsweise beschrieben, dass es zu einer frühen Schädigung der parasympathischen und sympathischen C-Fasern bei Diabetes mellitus kommt, wobei der parasympathische Anteil bei Diabetes mellitus Typ 2 dominiert (Freccero et al., 2004; Jin et al., 2015, S. 463). Histopathologisch kann unter anderem

eine Schädigung der gastralen (Selim et al., 2010) oder schweißdrüsen-innervierenden (Gibbons et al., 2009) Nervenfasern nachgewiesen werden.

Eine Nervenschädigung kann axonal (längenabhängige SFN) oder im DRG (nicht-längenabhängige SFN) auftreten (Gemignani et al., 2010; Birnbaum und Bingham, 2014; Khoshnoodi et al., 2016). Durch eine Übererregbarkeit der kleinen Neuronen im DRG kommt es dabei zu einer sekundären Schädigung der in die Haut führenden Nervenfasern (Gemignani et al., 2010; Sheikh und Amato, 2010).

3.3.4 Symptomatik

3.3.4.1 Generelle Aspekte

Bei einer SFN führt die Schädigung der C- und A δ -Fasern zu somatosensorischen Krankheitszeichen, wie neuropathischen Schmerzen, autonomen Funktionsstörung und weiteren Symptomkomplexen (z.B. Fatigue oder Restless-Leg-Syndrom) (Hoeijmakers et al., 2012). Das klinische Erscheinungsbild kann dabei intra- und interindividuell variieren. Es können ausschließlich somatosensorische oder autonome Zeichen vorkommen. Bei den meisten Patient*innen liegen die Symptome allerdings gemischt vor (Oaklander und Nolano, 2019, S. 1249). Ferner kann das Krankheitsgeschehen auch ohne Schmerzsymptomatik in Erscheinung treten (Üçeyler, 2016; Gemignani, 2017). In Abhängigkeit vom Ort der Nervenschädigung kann die SFN/SFP in eine längenabhängige Form (bei primär axonaler Schädigung) mit distal-symmetrischen Symptomen und eine nicht-längenabhängige Form (bei Schädigung der kleinen DRG-Fasern) mit diffuser Symptomatik u.a. am Gesicht, im Mund, am Körperstamm oder von proximal ausgehend entlang der Extremitäten auftreten (Gorson et al., 2008; Chan und Wilder-Smith, 2016; Puhakka et al., 2016). Beide Formen sind aufgrund überlappender Symptomatik in der Praxis schwierig zu differenzieren und benötigen daher weitere Diagnoseschritte (Provitara et al., 2018).

Insbesondere bei kleinen Kindern ist die genaue Beschreibung der Symptome schwierig (Hoeijmakers et al., 2016, S. 2). Wie eingangs beschrieben, liegen ausschließlich Fallberichte zur Symptomkonstellation bei Kindern und Jugendlichen vor (Abschnitt 1.2). Darüber hinaus sind keine Studien darüber publiziert, ob es Differenzen im klinischen Erscheinungsbild einer SFN zwischen Kindern und Erwachsenen gibt. In den folgenden zwei Abschnitten sind mögliche Symptome einer SFN aufgelistet.

3.3.4.2 Neuropathische Symptome und klinische Zeichen

Die durch die Nervenschädigung entstandenen Schmerzen und somatosensorischen Symptome bzw. klinischen Zeichen können überwiegend als neuropathisch bezeichnet werden und sind in sogenannte Positiv- und Negativsymptome einteilbar (Tabelle 5), die in Abhängigkeit der Ätiologie und Pathophysiologie auch parallel bestehen können und bei Diagnose meist chronisch über Monate und Jahre andauernd vorliegen (Döring et al., 2012). Dabei muss eine Unterscheidung zwischen Symptomen und klinischen Zeichen gemacht werden. Symptome sind das, was Patient*innen spontan oder provoziert empfinden (z.B. Schmerzen beim Eintauchen der Füße in kaltes Wasser) und klinische Zeichen werden in der klinischen Untersuchung, insbesondere mithilfe der Quantitativ-sensorischen Testung (QST), gezielt evaluiert (z.B. Berührungsempfinden mit einem Wattebausch bei geschlossenen Augen) (Devigili et al., 2019, S. 3730).

Tabelle 5: Neuropathische Symptome und klinische Zeichen einer SFN

Neuropathisch-sensorische Symptome/Zeichen	Qualität der Symptomatik
Schmerzen (brennend, einschießend, prickelnd, kratzend)	+
Parästhesie	+
Allodynie (Berührung, thermal, mechanisch)	+
Hyperalgesie	+
Intoleranz gegenüber Socken oder Decken	+
Hypoästhesie, Hypoalgesie	-
Herabgesetztes Temperaturempfinden	-
Wahrnehmungsverlust von Nadelstichen	-

3.3.4.3 Autonome und weitere Symptome

Neben den genannten somatosensorischen Symptomen gibt es eine Reihe an klinischen Zeichen einer SF-Schädigung, die das autonome Nervensystem betreffen und sich in vielfältiger Weise bemerkbar machen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Autonome Symptome einer SFN

Kardial
Schwindel
Herzklopfen, (Prä-)Synkope
Gastrointestinal
Miktionsprobleme
Magen-Darmprobleme (z.B. Verstopfung, Diarrhö)
Augen
Probleme bei der Akkommodation, Verschwommene Sicht
Haut und Schleimhäute
Hyperhidrose oder Hypohidrose
Sicca-Syndrom (Trockene Augen & Mund)
Sonstige
Wärmeschauer
Sexuelle Dysfunktion (z.B. Impotenz)

Ferner gibt es weitere, unspezifische Erscheinungsformen, die mit einer SF-Schädigung assoziiert sind (Tabelle 7).

Tabelle 7: Weitere mögliche Symptome einer SFN

Mögliche unspezifische Symptome einer SFN
Restless-Leg-Syndrom
Fatigue
Erythromelalgie
Muskuloskeletale Schmerzen, Muskelkrämpfe
Kopfschmerzen
Kraniomandibuläre Dysfunktion
Kognitive Störungen

3.3.5 Diagnosekriterien und generelle Aspekte zur Diagnostik

3.3.5.1 Diagnosekriterien

In den letzten 20 Jahren wurden diverse Algorithmen bzw. Kriterien publiziert, um Sensitivität und Spezifität der Diagnose „SFN“ zu verbessern (Lacomis, 2002; Devigili et al., 2008; Tesfaye et al., 2010; Terkelsen et al., 2017; Devigili et al., 2019). Eine Kombination aus klinischen Zeichen sowie auffällige Ergebnisse in der QST und/oder eine verminderte epidermale Nervenfaserdichte (END) über die Entnahme einer Hautstanzbiopsie stellen dabei laut neuester Studie zuverlässige Diagnosekriterien einer SFN dar (Tabelle 8) (Devigili et al., 2019). Von den Autor*innen wurde darauf hingewiesen, dass morphologische Veränderungen der SF (z.B. verminderte END) immer im Kontext der Symptomatik sowie der klinischen Befunde interpretiert werden müssen und nicht alleinstehend zu einer Diagnose führen dürfen, die Quantifizierung der END aber die reliabelste Methode dabei sei.

Tabelle 8: "Besta-Kriterien" zur Diagnose einer Kleinfaserneuropathie (Devigili et al., 2008; Devigili et al., 2019)

Untersuchungskriterien	Einschätzung der SFN
Mindestens zwei somatosensorische Symptome oder klinische Zeichen (negative und positive möglich)	Mindestens 2/3 der Kriterien müssen zutreffen
Pathologische Warm- und/oder Kaltschwellen am Fuß in der QST	
Verminderte END am Unterschenkel	

Neben den bereits genannten Tests (QST und Bestimmung der END) gibt es eine Reihe an weiteren morphologischen Untersuchungen der SF, welche in Abschnitt 3.3.5.3 kurz vorgestellt werden.

Wichtig bei der Diagnose einer SFN ist zudem, dass wenn in der klinischen oder weiterführenden Untersuchung die großen dick-myelinisierten Nervenfasern betroffen sind (z.B. veränderte Tastwahrnehmung, verminderte Vibrationsempfinden, Lähmung, Areflexie) oder eine abnorme Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) festgestellt wurde, sollte eine reine SFN ausgeschlossen und die Diagnose einer Großfaserneuropathie (LFN) gestellt werden (Stewart et al., 1992; Devigili et al., 2008; Karlsson et al., 2015; Chan und Wilder-Smith, 2016; Terkelsen et al., 2017).

3.3.5.2 Schmerzsymptomatik und Fragebögen

Es gibt eine Reihe an standardisierten und nicht-standardisierten Fragebögen zur genauen Beschreibung und Einordnung neuropathischer Symptome. Beispielsweise sind in der Literatur der „*SFN-Symptom Inventory Questionnaire*“ (Bakkers et al., 2014), der „*Neuropathic Pain Symptoms Inventory questionnaire*“ (Bouhassira et al., 2004) oder der „*painDETECT-Questionnaire*“ (Freynhagen et al., 2006) beschrieben. Zur Erfassung der autonomen Symptomatik kann der Fragebogen „*Survey of Autonomic Symptoms*“ (SAS) (Doppler et al., 2017) herangezogen werden. Auf den deutschsprachigen Raum bezogen wurde der Deutsche Schmerzfragebogen (DSF) entwickelt, welcher die herkömmlichen Fragebögen zusammenfasst und auch für Kinder und Jugendliche erweitert und validiert wurde (Schroeder et al., 2010; Casser et al., 2012).

3.3.5.3 Apparative und invasive Untersuchungsmöglichkeiten

Die QST stellt eine etablierte, standardisierte und nicht-invasive Methode zur Untersuchung von funktionellen Schäden u.a. der Temperatur-, Schmerz- und mechanischen Wahrnehmung dar. Durch die Bestimmung der jeweiligen Reizschwellen können neuropathische Plus- und Minussymptome detektiert werden und die Beteiligung der einzelnen Fasertypen - also auch der SF - erfasst werden (Rolke et al., 2006; Döring et al., 2012, S. 255; Cazzato und Lauria, 2017). Die Untersuchung ist von Kooperation und Aufmerksamkeit der Versuchsperson abhängig (Karlsson et al., 2015). Zwar ist die QST in der Funktionsprüfung der SF im Kindes- und Jugendalter für unterschiedliche Altersgruppen etabliert (Hilz et al., 1996; Hilz et al., 1998; Blankenburg et al., 2010), besitzt aber insbesondere für Kinder unter fünf Jahren und Patient*innen mit eingeschränkter Kooperationsfähigkeit (z.B. kognitiven Störungen) eine limitierte Durchführbarkeit bzw. ist nicht anwendbar (Meier et al., 2001; Blankenburg et al., 2010). Außerdem ist die QST auch aufgrund des teuren Equipments nicht in allen Kliniken verfügbar. Zudem ist die Testung sehr zeitaufwendig (Cruz-Almeida und Fillingim, 2014; Siepmann et al., 2014). In einer Studie von Devigili et al. (2019) wurde die diagnostische Güte der Messung von END und QST verglichen und eine bessere Aussagekraft der END gefunden.

Als weitere mögliche nicht-invasive Methode zur Quantifizierung der SF weist die Bestimmung der kornealen Innervation mittels kornealer Konfokalmikroskopie eine gute Reliabilität sowie Reproduzierbarkeit auf und kann frühzeitig SF-Schäden aufdecken (Karlsson et al., 2015). Allerdings kann sich die Durchführung bei Kindern durch eine nötige Kooperationsbereitschaft ebenfalls erschweren (Oudejans et al., 2016) und altersbezogene Normwerte fehlen.

Die Nervenbiopsie z.B. des Nervus suralis bietet sich nicht zur Diagnostik einer SFN an, da sie invasiv und somit nebenwirkungsreicher ist, nicht Routinemäßig durchgeführt werden kann, sowie weniger sensitiv hinsichtlich einer Beteiligung der SF ist als die Hautstanzbiopsie (Herrmann et al., 1999; Tesfaye et al., 2010; Karlsson et al., 2015).

Zur Bestimmung der Beteiligung des autonomen Nervensystems können bspw. Tests zur Sudometrie herangezogen werden, da die Schweißdrüsenfunktion der sensitivste Marker für den Zustand des autonomen Nervensystems ist (Dabby et al., 2007; Minota et al., 2019). Hierbei gibt es eine Reihe an nicht-invasiven Tests zur Schweißdrüsenfunktion wie den Axon-Reflex-Test (Thaisetthawatkul et al., 2013; Vinik et al., 2013a), aber auch invasive Test wie die Hautstanzbiopsie zur Ermittlung der Schweißdrüseninnervation sind in der Literatur beschrieben.

3.3.5.4 Laboruntersuchungen

Die Untersuchung verschiedener Laborparameter und die Durchführung genetischer Tests im Rahmen einer SFN-Diagnostik dient vor allem der Ursachensuche (Terkelsen et al., 2017). Blutuntersuchungen sollten generell nach individuellen Risikofaktoren und demographischer Situation erfolgen, wobei z.B. die FAP in Europa häufiger vorkommt als in den USA (Lang et al., 2016). In einer Übersichtsarbeit unterscheiden Terkelsen et al. (2017) in eine initiale Blutuntersuchung bei Verdacht auf eine (Poly-)Neuropathie insbesondere mit Analyse des Glucosestoffwechsels, von Vitamin B12 und seines Metaboliten, sowie einer Immunelektrophorese u.a. und in eine eventuell nachfolgende biochemische Ursachensuche bei gesicherter SFN. Diese beinhaltet bspw. autoimmune Faktoren (Rf, ANA u.a.), Infektionen (HIV, Hepatitis B u.a.) und hereditäre Ursachen (α -Galaktoidase A-Enzymaktivität bei Morbus Fabry), SCN9A-Mutation oder Mutationen im Transthyretin-Gen bei FAP.

3.3.6 Hautstanzbiopsie

3.3.6.1 Bestimmung der epidermalen Nervenfaserdichte (END)

Die Bestimmung der END anhand einer Hautstanzbiopsie ist eine objektiv-morphologische Methode mit hoher Sensitivität. Die 3-mm große, am Unterschenkel entnommene Hautstanzbiopsie, welche in den meisten Studien Anwendung findet, ist minimal-invasiv und nebenwirkungsarm. So ist publiziert, dass von 35.000 in unterschiedlichen multinationalen Zentren durchgeführten 3-mm Hautstanzbiopsien 0,2% der Biopsien Nebenwirkungen zeigten. Diese beliefen sich meist auf leichte Wundentzündungen oder Blutungen (Lauria et al., 2010b). Prinzipiell kann jede Hautstelle untersucht werden und „*Follow-Up*“-Untersuchungen sind möglich (Lauria et al., 2005; Lauria und Lombardi, 2007). Dies ermöglicht beispielsweise einen Therapieerfolg morphologisch nachzuweisen, da sich SF regenerieren können (Sommer und Lauria, 2007).

In den Richtlinien der Internationalen Gesellschaft für Neurologie (EFNS/PNS) (Lauria et al., 2010b) werden Vorgehensweisen empfohlen, um die Hautstanzbiopsien reproduzierbarer und vergleichbarer zu machen, wobei der Bestimmung der END in der Hautstanzbiopsie eine gute Intra- und Interuntersucherreliabilität in der mikroskopischen Auswertung nachgewiesen wurde (Smith et al., 2005; Lauria et al., 2015; Lauria et al., 2010a).

Die Hautbiopsie zur Diagnose einer SFN wird eine Effizienz der Methode (= Patient*innen mit richtiger Diagnose) von 93,3%, eine Sensitivität von 94,3% und eine Spezifität von 91,9% angegeben (Devigili et al., 2019). Allerdings müssen diese Testverfahren in Abhängigkeit zu der Methodik gesehen werden, mit der sie erhoben wurden. Außerdem ist die Bezugnahme auf große Referenzgruppen in diesem Kontext relevant (Lauria et al., 2010b).

3.3.6.2 END im Erwachsenenalter

Um pathologische Grenzwerte für die END festlegen zu können, sind in weltweiten Referenzstudien, in denen Ergebnisse aus mehreren Zentren zusammengefasst wurden, alters- und geschlechtsspezifische Kontroll- bzw. Normwerte für die END an gesunden Proband*innen veröffentlicht worden. Wichtig ist dabei, dass die Werte mit zunehmender Lebensdekade absinken und weibliche Probandinnen in jeder Altersgruppe höhere Werte für die END haben als männliche (Lauria et al., 2010a). Allerdings beziehen sich die Referenzwerte auf Proband*innen älter als 18 Jahre (Tabelle 9).

Tabelle 9: Publierte Referenzwerte der END bei gesunden Erwachsenen der Altersgruppe 18-29 Jahre

Arbeitsgruppe	Alter (J)	Anzahl in der Alterskohorte (w/m)	Mediane END (5%-Cut-off-Wert oder Spanne)		Angewendete Technik
			m	w	
Bakkers et al., 2009	20-29	~30 (15/15)	11,2 (6,7)	9,0 (5,4)	- Distaler Unterschenkel*, IH
Collongues et al., 2018	20-29	49 (25/24)	(7,2)	(5,7)	- Distaler Unterschenkel*, IH
Lauria et al., 2010a	20-29	93 (57/36)	13,5 (8,4)	10,9 (6,1)	- Distaler Unterschenkel*, IH
Provitiera et al., 2016	18-29	k.A.	(11,9) [11,1–12,7]**	(10,9) [10,1–11,6]**	- Distaler Unterschenkel*, IF
Provitiera et al., 2018	18-29	k.A.	(17,1) [15,9-18,2]**		- Distaler Oberschenkel***, IF

*Erklärung: END = epidermale Nervenfaserdichte, IF = Immunfluoreszenzmikroskopie, IH = Immunhistochemie/Lichtmikroskopie, J = Jahre, k.A. = keine Angabe, KM = Immunfluoreszenz/Konfokalmikroskopie, m = männlich, SD = Standardabweichung, w = weiblich, * 10 cm über dem Malleolus lateralis, ** 95% Konfidenzintervall um den 5%-Cut-off-Wert, *** 10 cm über der Kniekehle*

3.3.6.3 END im Kindes- und Jugendalter

Bisher sind nur wenige Publikationen mit Referenzwerten von gesunden Kindern und Jugendlichen veröffentlicht worden, die allerdings eine zu geringe Proband*innenzahl aufweisen, um als gesunde Vergleichskohorte analog zu den Referenzwerten im Erwachsenenalter zu dienen. Somit liegen für die Altersgruppe <18 Jahre keine Normwerte für die END vor (Tabelle 10).

Tabelle 10: END-Werte von gesunden Kindern und Jugendlichen

Arbeitsgruppe	Alter (J)	Anzahl Proband*innen (w/m)	Mediane END (5%-Cut-off-Wert oder Spanne)	Mittlere END (\pm SD)	Angewendete Technik
McArthur et al., 1998	10-19	8 (1/7)	19,1 (12,7–36,5)	20,3 (\pm 7,4)	- Proximaler Oberschenkel, distaler Unterschenkel*, IH
Panoutsopoulou et al., 2015	7-17	20 (10/10)	-	34,4 (\pm 3)	- Äußerer Oberschenkel, distaler Unterschenkel, KM

*Erklärung: END = epidermale Nervenfaserdichte, IF = Immunfluoreszenzmikroskopie, IH = Immunhistochemie/Lichtmikroskopie, J = Jahre, KM = Immunfluoreszenz/Konfokalmikroskopie, m = männlich, SD = Standardabweichung, w = weiblich, * 10 cm über dem Malleolus lateralis, ** 95% Konfidenzintervall um den 5%-Cut-off-Wert, *** 10 cm über der Kniekehle*

3.3.6.4 Bestimmung der Schweißdrüseninnervationsdichte (SND)

Im Gegensatz zur nicht-invasiven Sudometrie ist die Bestimmung der Schweißdrüseninnervationsdichte (sudomotorische Nervenfaserdichte, engl.: „*sudomotor nerve fiber density*“, SND) mittels Hautstanzbiopsie eine quantitativ-morphometrische Methode zur Untersuchung der Innervation der Schweißdrüsen.

So könnte die Analyse der autonomen Nervenfasern beispielsweise dazu dienen, zusätzlich die Auszählung der END diagnostisch zu unterstützen (Gibbons et al., 2009; Lauria et al., 2010b), da Veränderungen am autonomen System als frühester und sensitivster Marker bei peripheren Neuropathien wie der SFN herangezogen werden können (Minota et al., 2019). Die Bestimmung der SND bietet ferner die Möglichkeit, morphologische Veränderung an den Schweißdrüsen noch vor dem Auftreten klinischer Symptome sichtbar zu machen (Dabby et al., 2006).

In der Literatur sind unterschiedliche morphometrische Analyseverfahren der Schweißdrüseninnervation beschrieben (Donadio et al., 2006; Dabby et al., 2007; Gibbons et al., 2009; Gibbons et al., 2010; Donadio und Liguori, 2011; Luo et al., 2011; Loavenbruck et al., 2014; Chao et al., 2015; Liu et al., 2015; Pan et al., 2016; Bischoffshausen et al., 2017; Minota et al., 2019). Die gewählte Methodik zur Quantifizierung der Schweißdrüseninnervation unterscheidet sich hierbei teilweise deutlich zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen. Die morphometrische Analyse ist bislang nicht in die Routinediagnostik aufgenommen worden, da es technisch und zeitlich aufwendig ist und keine Normwerte wie bei END für Erwachsene vorliegen (Minota et al., 2019).

Veränderungen in der Funktion der Schweißdrüsen und somit auch des autonomen Nervensystems sind bei Kindern- und Jugendlichen mit Schädigung der SF beschrieben. Beispielsweise wurden autonome Funktionstests (engl.: „*autonomic function testing*“, AFT) zur Bestimmung der kardiogenen, adrenergen und sudomotorischen SF-Funktion durchgeführt, bei denen 53% der Untersuchten eine definitive Funktionsstörung der autonomen Fasern zeigten (Oaklander und Klein, 2013). Es liegen bislang aber keine morphometrischen Analysen der Schweißdrüseninnervation bei Kindern und Jugendlichen vor.

3.3.7 Therapie

Die Therapie einer SFN oder der durch Schädigung der SF entstandenen Symptomatik kann einerseits symptomatisch und andererseits kausal je nach Ätiologie mit krankheits- und symptommodifizierender Wirkung erfolgen. Beispielsweise finden sich für die rein symptomatische Therapie der neuropathischen Schmerzen bei Kindern und Jugendlichen trizyklische Antidepressiva, Nortriptylin, Gabapentin oder Pregabalin (Howard et al., 2014). Darüber hinaus scheinen neue Erkenntnisse darauf hinzuweisen, dass eine Subgruppierung der Patient*innen mit neuropathischen Schmerzen hinsichtlich eines dominierenden Sensibilitätsprofils (sensorischer Verlust, thermische Hyperalgesie, mechanische Hyperalgesie) von Vorteil bei der Auswahl der Therapeutika sein kann (Sachau et al., 2020, S. 5). Die kausale Therapie ist heterogen und kann sich unter anderem auf genetische (z.B. Enzymersatztherapie bei M. Fabry (Germain et al., 2015)) oder immun-modulatorische (z.B. intravenöse Immunglobulintherapie (Liu et al., 2018)) Therapieansätze oder Kortisonbehandlung (Oaklander und Klein, 2013) bei immunvermittelter SFN beziehen (Oaklander und Nolano, 2019). Für Kinder und Jugendliche liegen bislang keine Studien zur spezifischen Therapie einer SFN vor.

3.3.8 Prognose

In einer aktuellen Studie (MacDonald et al., 2019) wurde die Prognose der SFN mit „Follow-up“-Hautbiopsien und Fragebögen zwei Jahre oder länger nach der ersten Hautbiopsie bei 101 Erwachsenen untersucht. Nach dieser Zeit beschrieben weiterhin 84% der Patient*innen anhaltende Schmerzen (86% am ersten Termin) und die durchschnittliche Zahl der eingenommenen Medikamente pro Patient*in stieg von 1,4 auf 2. Bei fünf Untersuchten war die Arbeitslosigkeit auf die SFN zurückzuführen. Zwölf Patient*innen benötigten Gehunterstützung bis hin zum Rollstuhl in zwei Fällen, wobei bei sechs von denen, die Gehproblematik direkt auf die SF-Schädigung zurückzuführen gewesen sei (Schmerzen in der unteren Extremität, orthostatische Hypotension). Zwei Patient*innen entwickelten im Verlauf eine Neuropathie, in der auch die großen Nervenfasern betroffen waren. Die Prognose hängt dabei entscheidend von der Ätiologie der SF-Schädigung und entsprechenden Therapiemöglichkeiten ab (Voortman et al., 2017).

4 Material und Methoden

In Abbildung 5 ist das methodische Vorgehen in der Arbeit von Materialgewinnung durch die Hautstanzbiopsie bis hin zur Darstellung der zu untersuchenden Strukturen in der Fluoreszenzmikroskopie schematisch abgebildet. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Punkte dann entsprechend abgehandelt.

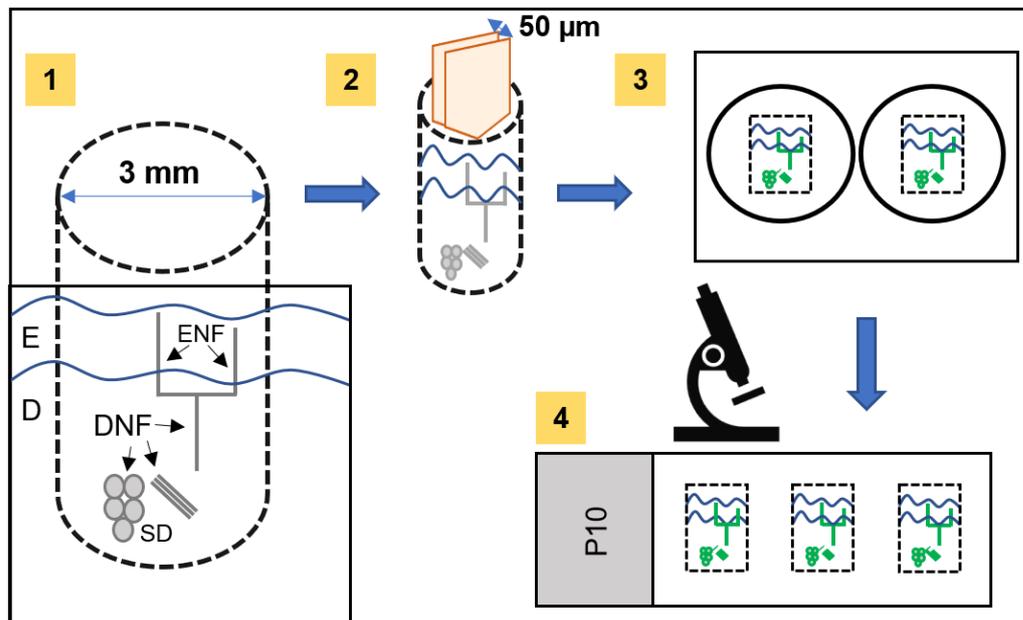


Abbildung 5: Schematischer Ablauf der Probengewinnung und Weiterverarbeitung. Schritt 1 bildet die Entnahme der 3-mm großen Hautstanzbiopsie ab, bei der Teile der Epidermis und der Dermis mitsamt den Hautanhangsgebilden (hier vereinfacht nur die Nervenfasern und Schweißdrüsen zu sehen) entnommen werden. In Schritt 2 wird das Gewebe am Kryostat in je sechs 50-µm dicke Proben geschnitten und anschließend zur Färbung in eine 24-Loch-Platte gegeben (Schritt 3). Am Ende erfolgt die Probenauswertung am Immunfluoreszenzmikroskop (Schritt 4). E = Epidermis, ENF = epidermale Nervenfasern, D = Dermis, DNF = dermale Nervenfasern, mm = Millimeter, SD = Schweißdrüsen, µm = Mikrometer.

4.1 Materialliste

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software sind im Anhang 13.1, 13.2 sowie 13.3 detailliert aufgelistet.

4.2 Untersuchungskohorte und Probengewinnung

4.2.1 Untersuchungskohorte

4.2.1.1 Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik (Kontrollgruppe)

Es wurden Hautstanzbiopsien von 15 Kindern und Jugendlichen unterschiedlichen Alters ohne Schmerzsymptomatik in der Krankheitsgeschichte untersucht.

4.2.1.2 Patient*innen mit Schmerzsymptomatik

Von 26 Kindern und Jugendlichen mit Schmerzsyndrom wurden Hautstanzbiopsien analysiert. Alle Proben, welche in dem Zeitraum Januar 2015 bis Mai 2019 in dem Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur diagnostischen Analyse untersucht wurden, sind in die Studie eingeschlossen worden. Die Proben wurden aus verschiedenen pädiatrischen Kliniken in Deutschland und Belgien zugeschickt. Retrospektiv wurden klinische und labordiagnostische Daten der Patient*innen erhoben.

4.2.1.3 Kind mit metabolischer Erkrankung (Morbus Pompe)

Darüber hinaus wurde die Hautbiopsie eines 7,5 Jahre alten Patienten mit infantilem Morbus Pompe (IOPD) untersucht.

4.2.2 Ethikvotum

Für die Studie liegt ein positives Ethikvotum der Justus-Liebig-Universität Gießen vor (07/09; 223/14; 85/16). Die Zustimmungserklärungen der Proband*innen bzw. derer Eltern zur Verwendung von überschüssigem Material zu Forschungszwecken liegen vor.

4.2.3 Durchführung der Hautstanzbiopsie

Die EFNS/PNS Guidelines (Lauria et al., 2010b) werten die Entnahme einer 3-mm großen Hautstanzbiopsie vom distalen Unterschenkel als Level-A-Empfehlung für die Diagnostik einer längenabhängigen SFN. Zunächst erfolgte die Abmessung des zu biopsierenden Hautareals, das 10 cm oberhalb des Malleolus lateralis am rechten Bein liegt (Abb. 6A). Bei Bedarf wurde eine Beinrasur an der Stelle durchgeführt; anschließend erfolgte die sterile Abdeckung und die Desinfizierung. Nach Betäubung des entsprechenden Hautareals durch Xylocain 2% Injektionslösung und ausbleibenden Schmerzempfindens wurde das Biopsat mittels 3-mm Hautstanze gewonnen (Abb. 6B/C). Die aufgetretene Wunde wurde durch sterile Wundhaftstreifen (Abb. 6D) sowie ein steriles Hautpflaster abgedeckt.

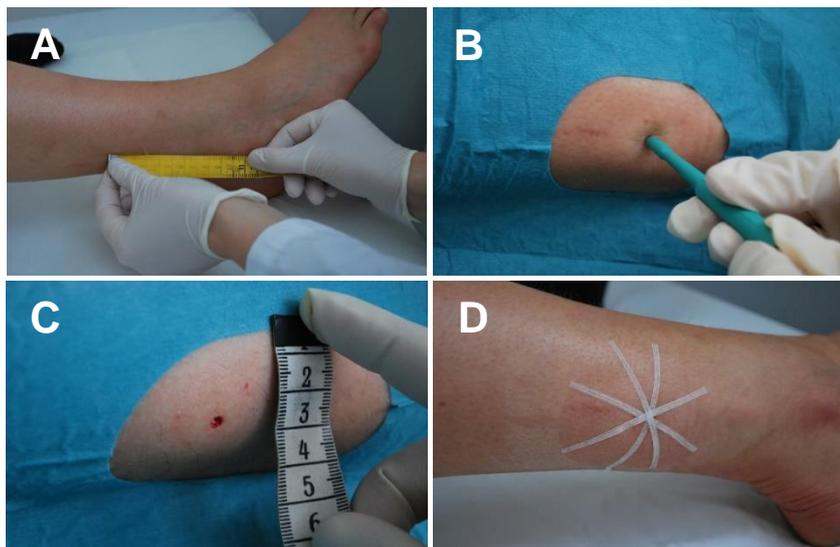


Abbildung 6: Hautstanzbiopsie am distalen Unterschenkel. Abmessung der Stelle der Biopsie 10 cm oberhalb des Malleolus lateralis (A). Durchführung der Stanzbiopsie mittels Hautstanze (B). 3-mm große Wunde nach der Biopsie (C). Abdeckung der Wunde mit Wundhaftstreifen zur Wundrandadaptation (D).

4.2.4 Fixierung, Lagerung und Weiterverarbeitung der Proben

Die Hautprobe wurde mindestens 48 Stunden in gekühlter Zamboni-Lösung fixiert (Zusammensetzung siehe Anhang 13.4). Danach wurde die Probe mit 0,1M Phosphatpuffer drei Mal für jeweils 10 Minuten gewaschen (PBS; Zusammensetzung siehe Anhang 13.4). Die Probe wurde zur Wässerung in 10% Sucrose-Puffer (Saccharose) überführt (mindestens 24 Stunden) und anschließend mit einem Tropfen „*Tissue-Tek-Compound*“ auf Korkplättchen aufgeblockt, in Methylbutan bei -80°C schockgefroren und bis zum Schneiden bei -80°C asserviert. Pro Probe wurden sechs $50\text{-}\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt (Leica CM 1950 Kryostat, Leica Biosystems, Wetzlar) und in einer 24-Well-Platte aufgefangen.

4.3 Probefärbungen und Etablierung des Färbeprotokolls

4.3.1 Grundlage der Immunfluoreszenzfärbung

Die hier angewendete Färbung kann als indirekte Immunfluoreszenz beschrieben werden, bei der ein Primärantikörper, welcher Epitop-spezifische Eigenschaften hat, an das Protein bindet, das untersucht werden soll. Um den Primärantikörper sichtbar zu machen, wird dieser durch einen mit Fluoreszenzfarbstoff versehenen Sekundärantikörper gebunden und mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht (Wang et al., 1990).

4.3.2 Darstellung der epidermalen Nervenfaserdichte (END) und Schweißdrüseninnervationsdichte (SND) mit Antikörpern gegen PGP 9.5

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zamboni-Lösung zur Fixierung der Hautschnitte verwendet, da sie zur Anwendung bei indirekter Immunfluoreszenz empfohlen wird (Wang et al., 1990; Pieri et al., 2002; Lauria et al., 2010b) und bereits in der Routinediagnostik der SFN-Diagnostik des Instituts für Neuropathologie der JLU Gießen Anwendung findet. Die Zamboni-Fixationslösung wurde erstmals von Stefanini et al. (1967) beschrieben. Eine Fixierung z.B. mit Formalin wird aufgrund möglicher Artefakte und der eher fragmentierten Darstellung der freien Nervenendigungen nicht empfohlen (McCarthy et al., 1995; McArthur et al., 1998; Lauria et al., 2010b).

Zur Darstellung der epidermalen Nervenfasern und der schweißdrüseninnervierenden Nervenfasern wurde ein polyklonaler Rabbit IgG Primärantikörper gegen das Protein-Gen-Produkt 9.5 (PGP 9.5) der Firma ZytomedSystems verwendet. Zur Darstellung der Zellkerne in den Schweißdrüsen und der Epidermis wurden die Proben zusätzlich mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Als Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzmarkierung der PGP 9.5-gefärbten Nervenfasern diente Alexa Fluor 488 (Goat anti-Rabbit IgG, Invitrogen).

Das PGP 9.5, auch bekannt als Ubiquitin C-Terminal Hydrolase 1, wird in Neuronen, Axonen und neuroendokrinen Zellen des menschlichen Körpers zentral und peripher wie z.B. im kardiovaskulären System (Gulbenkian et al., 1987) oder dem Darm (Krammer et al., 1993) exprimiert. In Studien wurde gezeigt, dass PGP 9.5 u.a. zur Darstellung der dermalen und epidermalen Nervenfasern, der Schweißdrüseninnervation und der Innervation der dermalen Mechanorezeptoren genutzt werden kann (Rydh et al., 1989; Wang et al., 1990). In den EFNS/PNS Guidelines (Lauria et al., 2010b) wird der anti-PGP 9.5 Antikörper zur Bestimmung der END empfohlen.

Mit Hilfe eines monoklonalen Mouse anti-Collagen-IV-Antikörpers in der Doppelfärbung mit PGP 9.5 sollte zusätzlich eine bessere Darstellbarkeit am dermalen-epidermalen

Übergang erzielt werden. Dies hätte von Vorteil für die Auszählung der epidermalen Nervendichte sein können, da der Durchtritt der Nervenfasern in die Epidermis womöglich distinkter darstellbar gewesen wäre. Die Basalmembran am dermalen-epidermalen Übergang wurde spezifisch angefärbt und die Epidermis war gut abgrenzbar. Die epidermalen Nervenfasern werden normalerweise mit einem Einfachfilter (L5) am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Durch einen Doppelfilter sind sowohl die PGP 9.5-positiven epidermalen Nervenfasern sichtbar als auch die Collagen-IV-positive Basalmembran. Allerdings erschwerte dies die Quantifizierung der Nervenfasern, da gerade die PGP 9.5-positiven Fasern am dermalen-epidermalen Übergang durch den zusätzlichen rötlichen Filter, welcher durch den Sekundärantikörper bedingt ist, schwerer erkennbar waren.

Eine separate Aufnahme mit beiden Filtern, die mit der Software zum Mikroskop (Leica Application Suite) als „*Overlay*“ zusammengefügt wurden, konnte eine distinkte Darstellung des Übergangs an der Basalmembran erreichen (Abb. 7). Dies wäre jedoch nicht für die direkte, diagnostische Auswertung am Mikroskop von Nutzen, da der zeitliche Aufwand zu groß wäre, für jeden Schnitt ein „*Overlay*“-Bild zu erstellen und dieses am Computer auszuwerten. Aus diesem Grund wurde der Collagen-IV-Antikörper nicht weiterverwendet.

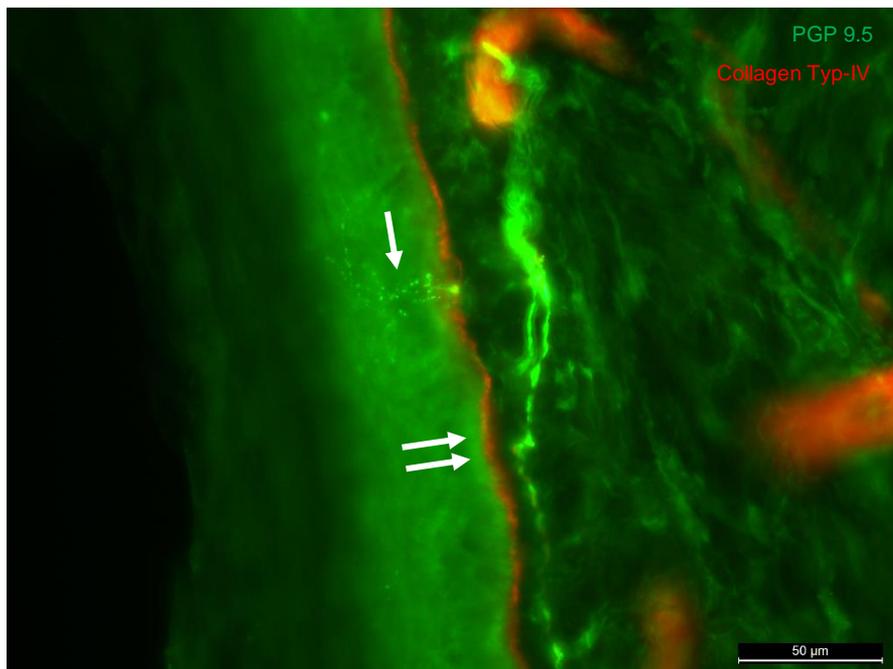


Abbildung 7: Epidermale Nervenfasern (Einzelpfeil) mit Darstellung der Basalmembran (Doppelpfeil). Die Basalmembran ist mit Antikörpern gegen das Typ-IV-Kollagen angefärbt und markiert den Übergang zwischen Dermis und Epidermis. Vergrößerung x40

Weiterhin sind in Tabelle 11 die Primärantikörper und in Tabelle 12 die Sekundärantikörper aufgelistet, welche auch bei Probefärbungen Anwendung fanden.

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Firma	Verdünnung	Zielstruktur	Art der Anwendung	
				Probefärbung	Arbeitsprotokoll
Polyklonaler Rabbit IgG anti-PGP 9.5	Zyto-med	1:1000	Axone	✓	✓
Monoklonaler Mouse IgG anti-MBP	Gene-Tex	1:250	Myelinisierte Nervenfasern	✓	
Polyklonaler Rabbit anti-MBP	Millipore	1:500	Myelinisierte Nervenfasern	✓	
Polyklonaler Rabbit anti-Caspr	Abcam	1:250	Darstellung der Paranodien	✓	
Monoklonaler Mouse anti-Collagen IV	Abcam	1:100	Darstellung der kutanen Basalmembran	✓	

Erklärung: Caspr = Contactin associated protein 1, IgG = Immunglobulin G, MBP = Myelin-Basisches Protein, PGP 9.5 = Protein Gene Product 9.5

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Firma	Verdünnung	Zielstrukturen	Art der Anwendung	
				Probefärbung	Arbeitsprotokoll
Alexa Fluor 488 (Goat anti-Rabbit IgG)	Invitrogen	1:500 1:1000	- Polyklonaler Rabbit IgG anti-PGP 9.5 - Polyklonaler Rabbit anti-MBP	✓	✓
Alexa Fluor 568 (Goat anti-Mouse IgG)	Invitrogen	1:500	- Monoklonaler Mouse IgG anti-MBP - Monoklonaler Mouse anti-Collagen IV - Polyklonaler Rabbit anti-Caspr	✓	
DyLight 650 (Goat anti-Mouse IgG)	Abcam	1:500	- Polyklonaler Rabbit IgG anti-PGP 9.5	✓	

Erklärung: Caspr = Contactin-associated protein, IgG = Immunglobulin G, MBP = Myelin-Basisches Protein, PGP 9.5 = Protein Gene Product 9.5

4.3.2.1 Darstellung und Analyse der SND

Die in dieser Arbeit verwendete Methodik zur Quantifizierung der Schweißdrüseninnervation baut auf der von Gibbons et al. (2009) publizierten quantitativ-morphometrischen Vorgehensweise der Schweißdrüseninnervation auf und sollte für die im Diagnostiklabor des Instituts für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung stehende Technik (Mikroskop, LeicaApplication Suite, Image J) und mit derselben Methodik wie der Färbung zur Analyse der END etabliert werden.

Um ein standardisiertes Raster (Abb. 8) zur Auswertung der Schweißdrüseninnervation nach Gibbons et al. (2009) erstellen zu können, mussten zunächst die mit dem Mikroskop messbaren metrischen Zahlenwerte auf die Pixelverhältnisse zur Erstellung des Rasters mittels ImageJ umgerechnet werden (Anhang 13.5). Dafür wurde zunächst das Verhältnis aus Pixel und Millimeter für das entsprechende Mikroskop (hier Leica DM 2000) sowie die jeweiligen Objektive bestimmt (Anhang 13.5).

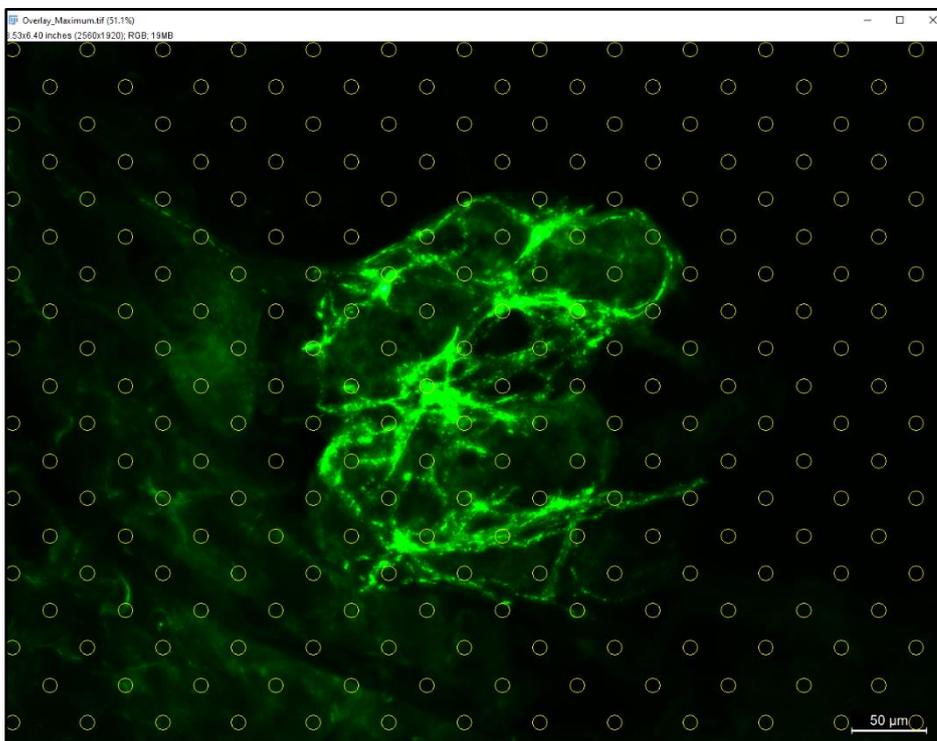


Abbildung 8: Standardisiertes Raster in ImageJ zur Auswertung der Schweißdrüseninnervationsdichte. Vergrößerung x20

4.3.3 Färbeprotokoll für die Analyse der END und SND

Nachdem die Hautbiopsien am Kryostat geschnitten und in eine 24-Loch-Platte übertragen wurden (sechs Schnitte pro Loch), wurden sie mit 0,1% Triton X-100 in 1-fach phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für drei Mal fünf Minuten gewaschen. Dann erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-PGP 9.5 (1:1000), welcher zuvor mit Antikörperverdünnungslösung (Zusammensetzung siehe Anhang 13.4) verdünnt wurde, bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler über Nacht.

Am zweiten Tag erfolgte ein Waschgang der Hautschnitte mit 0,1% Triton X-100 in PBS (3x 15 Minuten) und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, Alexa Fluor 488 (1:1000). Nach dreistündiger Inkubation auf dem Schüttler bei RT erfolgte eine weitere Waschung der Schnitte (3x 15 Minuten) mit 0,1M PBS. Hierbei soll möglichst dunkel gearbeitet werden, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden. Nun werden die Schnitte mit einer Pasteurpipette auf die jeweiligen Objektträger aufgetragen und mit „*Fluoroshield Mounting Medium with DAPI*“ zur Immunfluoreszenz-Darstellung der Zellkerne eingedeckt. Die Lagerung erfolgt im Dunkeln bei 4°C.

4.3.4 Darstellung myelinisierter Nervenfasern

Bei unterschiedlichen Formen von Neuropathien kann es zu einer Verminderung und einer morphologischen Veränderung der myelinisierten Nervenfasern der Dermis kommen (Doppler et al., 2012). Mittels Vorversuche sollte geprüft werden, ob eine Darstellung sowie quantitative Analyse der myelinisierten Fasern in Anlehnung an die von Doppler et al. (2012) gewählte Methodik in dieser Arbeit durchführbar ist und möglicherweise einen Zugewinn bei der Routinediagnostik zur Untersuchung der SF bietet. In den publizierten Studien wurde meist Paraformaldehyd (PFA) für die Fixierung der Hautbiopsien zur Darstellung myelinisierter Fasern benutzt (Doppler et al., 2012). Dadurch, dass eine Analyse der END und SND an Zamboni-fixiertem Gewebe bereits durchgeführt wurde, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Darstellung der Myelinisierung an Gewebe mit Zamboni-Fixierung möglich ist.

Folgende Parameter sollten demnach an Zamboni-Fixation untersucht und wenn möglich für die systematische Anwendung in dieser Arbeit etabliert werden:

- Darstellbarkeit der Myelinisierung von dermalen Nervenfasern mittels Doppelfärbung (Axone und Myelin)
- Darstellbarkeit der Paranodien am Ranvier-Schnürring des Myelins

4.3.4.1 Darstellbarkeit der Myelinisierung von dermalen Nervenfasern mittels Doppelfärbung (Axone und Myelin)

Zunächst erfolgte die Färbung einer Hautbiopsie mit einem polyklonalen Rabbit anti-MBP Antikörper zur Darstellung des Myelins ohne zusätzliche Färbung der Axone. Nach erfolgreicher Anfärbung des Myelins in dieser Einfachfärbung sollte die Doppelfärbung mit einem polyklonalen Rabbit anti-PGP 9.5 Antikörper und einem monoklonalen Mouse anti-MBP Antikörper an der gleichen Haut wie bei der Einfachfärbung etabliert werden (Protokoll siehe Anhang 13.6). Hierbei kam es zu einer distinkten Färbung der PGP 9.5-positiven Fasern (dermale und epidermale Nervenfasern), MBP-positive Fasern waren nicht vorhanden und nur unspezifische Anfärbungen bzw. Alexa Fluor 568-positive Artefakte sichtbar. Daraufhin wurde das gleiche Protokoll an einem Gefrierschnitt eines Nerven angewandt. Hierbei ergab die Doppelfärbung eine distinkte Anfärbung von PGP 9.5- und MBP-positiven Fasern. Allerdings waren weiterhin viele Alexa Fluor 568-positiv Verunreinigungen unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop zu erkennen. Die Färbung wurde anschließend erneut durchgeführt, allerdings fand beim Ansetzen des Sekundärantikörpers eine kurze Zentrifugierung vor der Verdünnung mit der Antikörperverdünnungslösung und einmal nach der Verdünnung statt. Durch diesen Schritt konnte ein Großteil der Verunreinigungen auch in nachfolgenden Doppelfärbungen von Hautschnitten vermieden werden.

Bestimmt wurde die Anzahl der dermalen Nervenbündel (myelinisiert und unmyelinisiert), der myelinisierten dermalen Nervenbündel sowie die absolute Anzahl myelinisierter Fasern pro mm² Haut. Die quantitative Auszählung der dermalen Nervenbündel wurde in einer 20-fachen Vergrößerung durchgeführt, die Analyse der myelinisierten Nervenfaserbündel erfolgte mit einem 40-fachen Objektiv.

In Tabelle 13 ist die Analyse der oben genannten Parameter an zehn Patient*innen der Kohorte mit Schmerzsymptomatik exemplarisch abgebildet.

Tabelle 13: Myelinisierung bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik

	Dermale Nervenbündel (pro mm ² Haut)	Myelinisierte Fasern (pro mm ² Haut)	Myelinisierte dermale Nervenbündel (pro mm ² Haut)
P1	2,4	4,6	1,8
P2	2,2	3,1	1,2
P3	2,1	1,7	0,9
P4	1,5	1,9	0,6
P5	0,9	1,3	0,4

P6	1,9	2	1
P7	2,2	1,6	0,7
P8	1,8	3,3	1,2
P9	1,2	2	0,7
P10	3,3	4,1	1,9
Mittelwert (\pm Standardabweichung)	1,95 (\pm 0,7)	2,56 (\pm 1,1)	1,04 (\pm 0,5)
Referenzwerte von Doppler et al. (2012) ¹	2,2 (0,5–7,7)	6,8 (0–30,0)	1,6 (0–4,3)

Erklärung: ¹ Die Werte beziehen sich auf gesunde Erwachsene Proband*innen (47 Jahre, Spanne 18–73 Jahre), mm = Millimeter

Die Auswertung der dermalen Nervenbündel war sehr zeitaufwendig (ca. 45 Minuten pro Biopsie). Obwohl die von uns bestimmten Werte mit denen von Doppler et al. (2012) vergleichbar sind (Tabelle 13), gab es einige Limitationen. Eine große Einschränkung in der Analyse stellte die unterschiedliche Tiefe der Biopsie und die dadurch auswertbare Fläche der Biopsie dar. Dadurch, dass die proximalen Hautproben auch im Zuge von Muskelbiopsien entnommen wurden, lag keine einheitliche Größe der Hautschnitte vor. Außerdem kann es durch den Waschvorgang bei der „Free-Floating“-Methode zum Verlust von Hautmaterial kommen, wodurch sich die dermale Fläche verkleinert. Aus diesen Gründen können die Parameter zwar in Bezug zur vorhandenen Hautfläche gesetzt werden, die tatsächliche Anzahl beispielsweise von dermalen Nervenbündeln kann aber verfälscht sein. Das Auszählen der absoluten Anzahl von myelinisierten Fasern erwies sich als potentiell fehlerhaft, da die einzelnen MBP-positiven Fasern nicht immer zweifelsfrei bei den in dieser Arbeit verwendeten 50- μ m großen Dickschnitten abzugrenzen waren (Abb. 9). Auch wenn in der Referenzpublikation ebenfalls 50- μ m Dickschnitte Anwendung fanden, wird auf diese Problematik nicht verwiesen (Doppler et al., 2012).

Durch die oben genannten Gründe wurde eine weitere Auswertung der myelinisierten Nervenfasern im Rahmen der Dissertation nicht verfolgt. Für die Routinediagnostik der SF wäre diese Auswertung zu aufwändig und fehlerhaft.

In dieser Arbeit konnte erstmals die Darstellung der myelinisierten Fasern mit Zamboni-Fixation gezeigt werden. Dadurch können an den Hautbiopsien, welche für die Routinediagnostik in Zamboni-Lösung fixiert wurden, myelinisierte Fasern dargestellt werden.

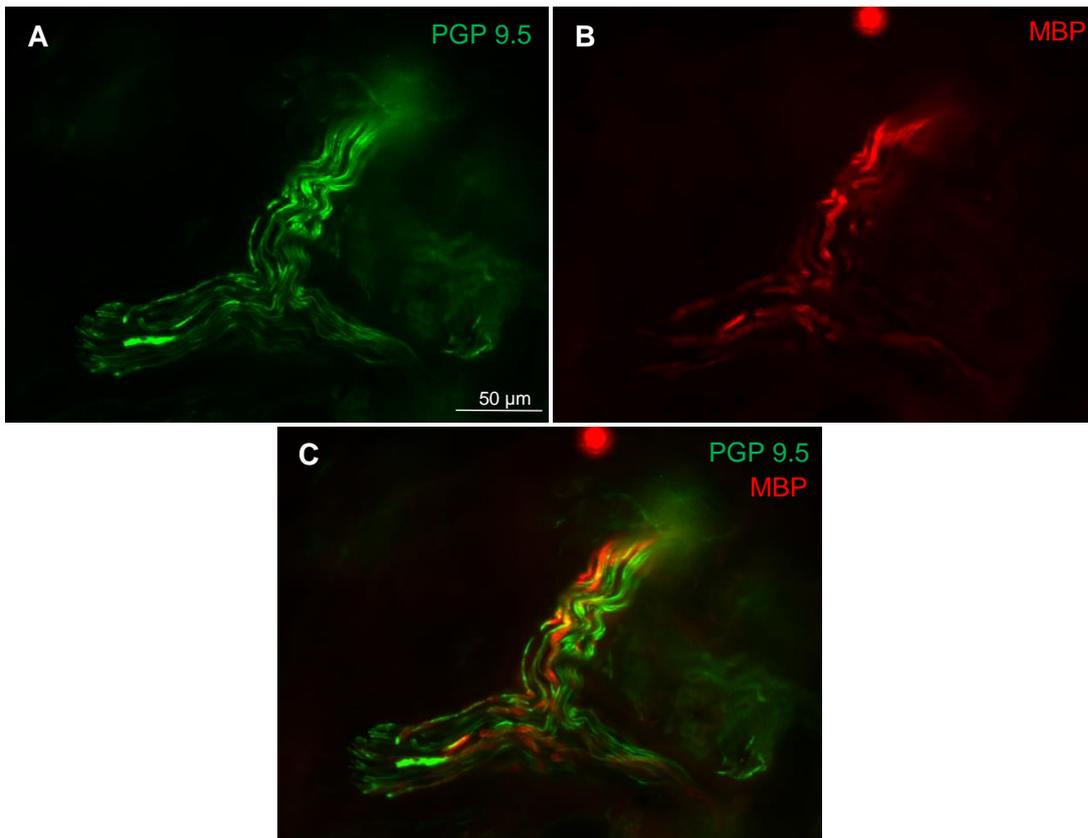


Abbildung 9: Darstellung der dermalen myelinisierten und unmyelinisierten Nervenfasern mittels Färbung gegen PGP 9.5-Antikörper (A) und gegen MBP-Antikörper (B) sowie eine Doppelfärbung gegen PGP 9.5- und MBP Antikörper (C). Vergrößerung x40. MBP = Myelin-basisches Protein, PGP 9.5 = Protein-Gen-Produkt 9.5

4.3.4.2 Darstellbarkeit der Paranodien am Ranvier-Schnürring des Myelins

Neben der quantitativen Darstellung von myelinisierten Hautnerven kann die Darstellung von myelinisierten Strukturen, wie z.B. der Paranodien, also des Bereichs des Myelins, der den Ranvier-Schnürring abgrenzt, relevant sein (Li et al., 2005; Saporta et al., 2009; Doppler et al., 06.2013; Doppler et al., 07.2015; Doppler et al., 2017). Zur Darstellung der Paranodien wurde ein polyklonaler Rabbit anti-Caspr Antikörper in einer Doppelfärbung mit PGP 9.5 zur Darstellung der Axone, eingesetzt. Es konnte keine distinkte Darstellung der Paranodien an den Zamboni fixierten Gewebeproben gezeigt werden.

4.4 Auswertung der Untersuchungsparameter

4.4.1 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Aufnahmen sowie die Auswertung der Biopsien wurde mithilfe eines Leica DM 2000 Fluoreszenz-Mikroskops (Leica Microsystems, Wetzlar), der Kamera Leica DFC450 C sowie der Leica Application-Suite Version 4.7.1 (Messung bestimmter Parameter) durchgeführt.

4.4.2 Auswertung der END

Die Auszählung der END wurde wie in den EFNS/PNS Guidelines (Lauria et al., 2010b) beschrieben bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt. An sechs Schnitten pro Biopsie wurden zunächst diejenigen epidermalen Nervenfasern (PGP 9.5-positive Fasern) aus gezählt, welche die Basalmembran des dermalen-epidermalen Übergangs überschreiten (zur Übersicht über die Regeln der Auszählung siehe Abb. 10).

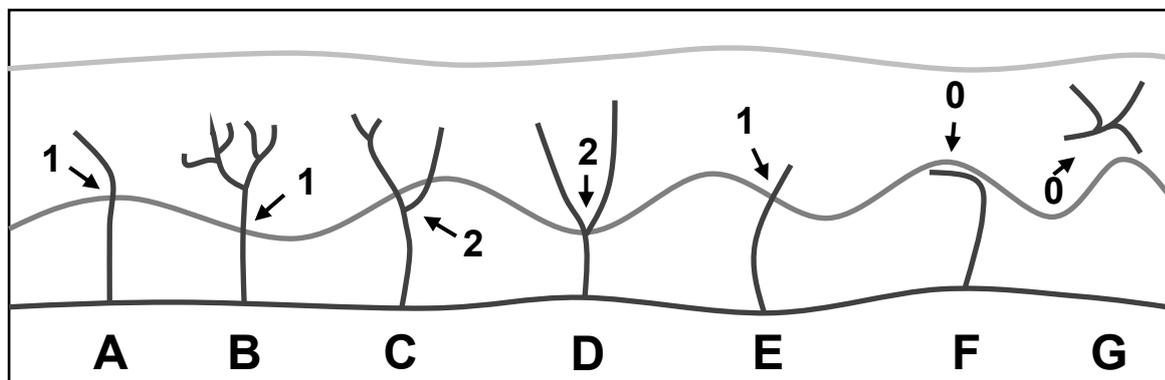


Abbildung 10: Regeln zur Bestimmung der epidermalen Nervenfaserdichte (nach Lauria et al., 2005). Die dunkelgraue Linie repräsentiert die Basalmembran am Übergang zwischen Dermis und Epidermis. Die hellgraue Linie bildet die äußerste Hornschicht ab. Nervenfasern, welche die Basalmembran überschreiten, werden einfach gewertet (**A**). Nervenfasern, die sich innerhalb der Epidermis/oberhalb der Basalmembran aufteilen, werden als eine Faser gewertet (**B**). Nervenfasern, die sich unterhalb der Basalmembran aufspalten und jeweils eigenständig die Basalmembran übertreten, werden als zwei Fasern gewertet (**C**). Nervenfasern, die sich auf der Basalmembran aufteilen, werden als eine Faser gewertet (**D**). Nervenfragmente, die nur knapp die Basalmembran in die Epidermis hinein passieren, werden als eine Faser gezählt (**E**). Nervenfasern, die an die Basalmembran heranreichen, diese aber nicht überschreiten, werden nicht gezählt (**F**). Nervenfragmente, die in der Epidermis liegen aber nicht sichtbar die Basalmembran überqueren, werden nicht gezählt (**G**).

Anschließend wurde die Länge der Epidermis in allen untersuchten Schnitten mit der Leica Application-Suite gemessen (Abb. 11).

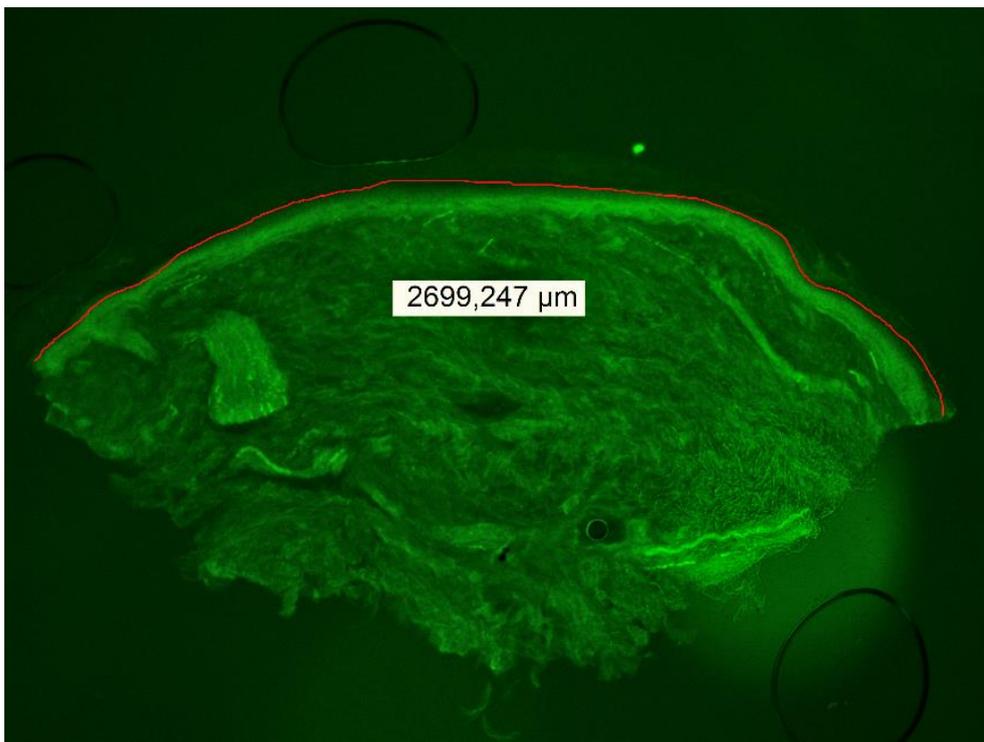


Abbildung 11: Messung der Länge der Epidermis exemplarisch an einem Hautschnitt. Die rote Linie stellt das Lineal der Leica Application-Suite dar. Vergrößerung x5.

Die END wurde dann als Nervenfasern/mm für die gesamte Biopsie angegeben (Abb. 12).

END = Gesamtzahl der gezählten ENF / Gesamtlänge der Epidermis (mm)

Abbildung 12: Berechnung der epidermalen Nervenfaserdichte. END = epidermale Nervenfaserdichte. ENF = epidermale Nervenfasern, mm = Millimeter

4.4.2.1 Referenzwerte für die END

Die END wurde in dieser Arbeit als reduziert bewertet, wenn sie unter dem 5%-Perzentil (6,1 Fasern/mm für männliche und 8,4 Fasern/mm für weibliche Patient*innen) einer Referenzkohorte von 20-29 Jährigen lag und als grenzwertig-reduziert zwischen dem 5%-Perzentil und dem Median (10,9 Fasern/mm für männliche und 13,5 für weibliche Patient*innen) dieser Gruppe (Lauria et al., 2010a). In Tabelle 9 in Abschnitt 3.3.6.2 sind die bislang publizierten Referenzwerte für die END abgebildet.

4.4.3 Auswertung der SND

Um die Schweißdrüseninnervation der untersuchten Proben quantitativ auszuwerten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine von Gibbons et al. (2009) vorgestellten Methodik der semiquantitativ-morphometrischen Bestimmung der Schweißdrüseninnervationsdichte (sudomotorische Nervenfaserdichte, engl.: „*sudomotor nerve fiber density*“, SND) gewählt. Laut Autor*innen liefert die von ihnen gewählte Herangehensweise die Möglichkeit, das für die klinische Standardauswertung der END aufbereitete Gewebe ebenfalls für die Analyse der SND zu nutzen. Außerdem wird in den EFNS/PNS Guidelines (Lauria et al., 2010b) die Bestimmung der Schweißdrüseninnervation nach Gibbons et al. (2009) als Level-B-Empfehlung für die Diagnostik der SFN aufgeführt.

Mit Fiji – ImageJ wurde ein Raster aus leeren Kreisen erstellt, das sich auf die in Abschnitt 4.3.2 beschriebene Normierung des Mikroskops bezieht. Für das Objektiv mit 20-facher Vergrößerung ergaben sich somit für den Durchmesser der Kreise 41 Pixel (10 µm), für den horizontalen Abstand 205 Pixel (50 µm) und den vertikalen Abstand 102,5 Pixel (25 µm) (Abb. 13A). Das Raster wurde abgespeichert und bei jeder Auswertung in das Programm geladen.

Sechs Kryostat-Schnitte jeder Biopsie wurden unter dem Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung auf Schweißdrüsen hin untersucht. Bestmöglich sollten vier Schweißdrüsen zur Auswertung verfügbar sein. Wenn keine vier Schweißdrüsen vorhanden waren, wurden zwei zusätzliche Schnitte herangezogen. Weiterhin wurde gezählt, wie viele Schweißdrüsen pro ausgewertete Schnitte insgesamt vorhanden waren, und die Fläche jeder Schweißdrüse bestimmt. Schweißdrüsen, welche direkt mit Haarfollikeln assoziiert waren, sowie Schweißdrüsen mit einer Fläche $<300 \mu\text{m}^2$ wurden ausgeschlossen.

Die Schweißdrüsen wurden mit 20-facher Vergrößerung mit „*Overlay*“-Technik in der Leica Application-Suite aufgenommen und abgespeichert. Zunächst erfolgte eine Aufnahme der unscharf eingestellten Drüse, um a) das Interessensgebiet (AOI) bzw. die komplette Schweißdrüse abbilden zu können und um b) die Fläche der Drüse zu messen (Abb. 13B). Bei Unsicherheiten bezüglich der Ausdehnung des Schweißdrüsenendstücks konnte die DAPI-Färbung hinzugezogen werden, wodurch die AOI nochmals deutlicher wurde. Die Aufnahme der scharfgestellten Schweißdrüse erfolgte mittels „*Overlay*“-Funktion, indem die Drüse in drei Ebenen fotografiert und als Überlagerung der drei Abbildungen dargestellt wurde.

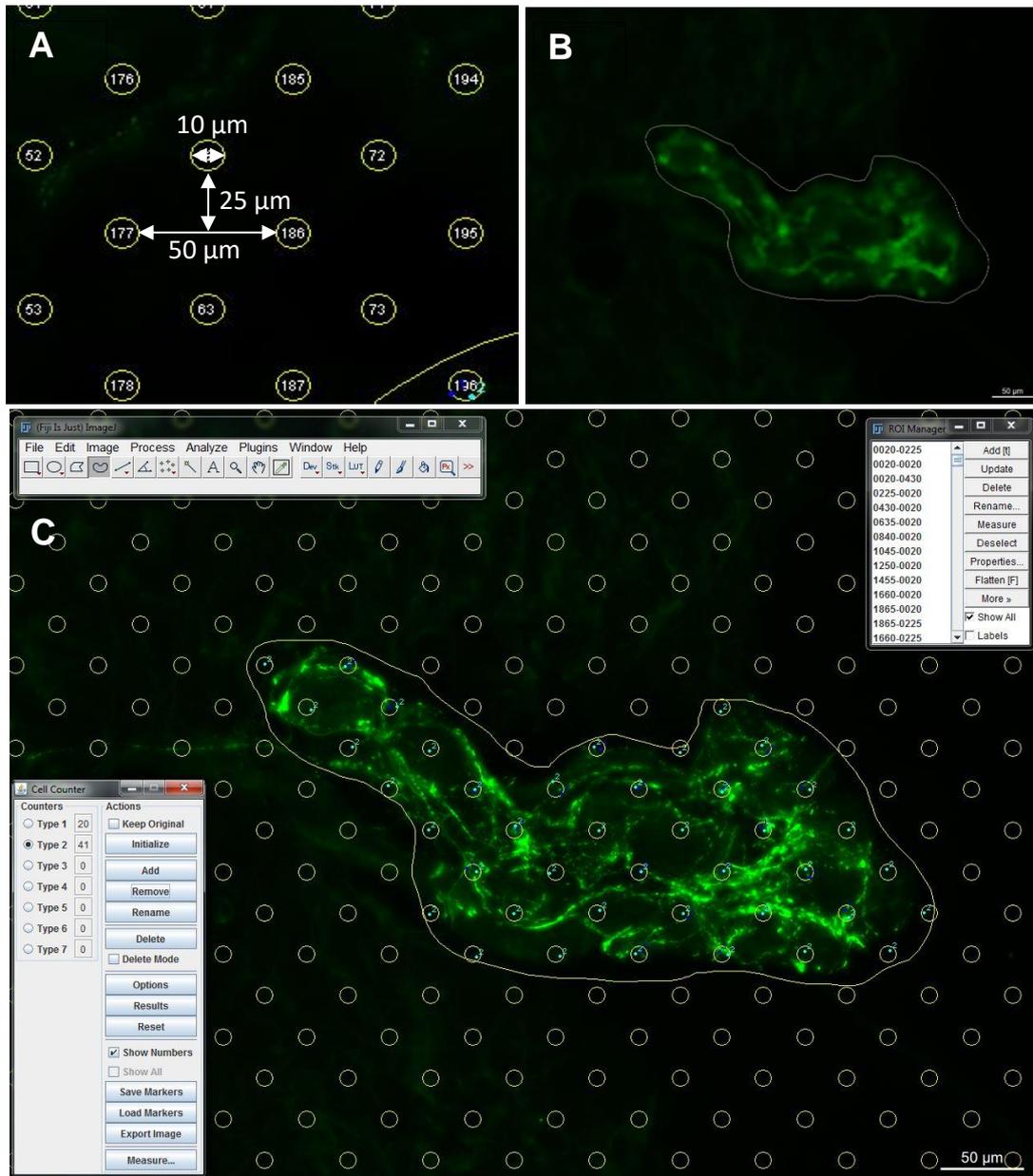


Abbildung 13: Schema zur Auswertung der Schweißdrüseninnervation mittels Raster modifiziert nach Gibbons et al. (2009). Jeder Kreis besitzt einen Durchmesser von 10µm, sie liegen in einem horizontalen Abstand von 50µm und einem vertikalen von 25-µm zueinander (A). Das Bild einer verschwommenen Schweißdrüse dient der Markierung des Interessensgebietes (AOI) und der Messung der Fläche der Schweißdrüsen (B). Das Raster wird über das scharfe Bild der Schweißdrüse gelegt. Es werden alle Kreise im Interessensgebiet sowie alle von Nervenfasern geschnittenen Kreise mit Hilfe der Zellzählfunktion („Cell counter“) markiert (C).

Das Bild mit der unscharfen Schweißdrüse wurde in ImageJ geladen und die AOI umfahren (Abb. 13B). Im AOI-Manager wurde die Fläche abgespeichert, das scharfe „Overlay“-Bild der jeweiligen Drüse geöffnet und alle gespeicherten Objekte des AOI-Managers angezeigt, wodurch das zuvor beschriebene Raster in das Bild und auch die AOI geladen wurde (Abb. 13C). Daraufhin wurden mithilfe der Zählfunktion einerseits alle

Kreise innerhalb der zuvor erstellten AOI gezählt und andererseits diejenigen, die von PGP 9.5-positiven Fasern geschnitten werden.

In Abbildung 14 ist dargestellt, welche von PGP 9.5-positiven Fasern geschnittenen Kreise gezählt wurden.

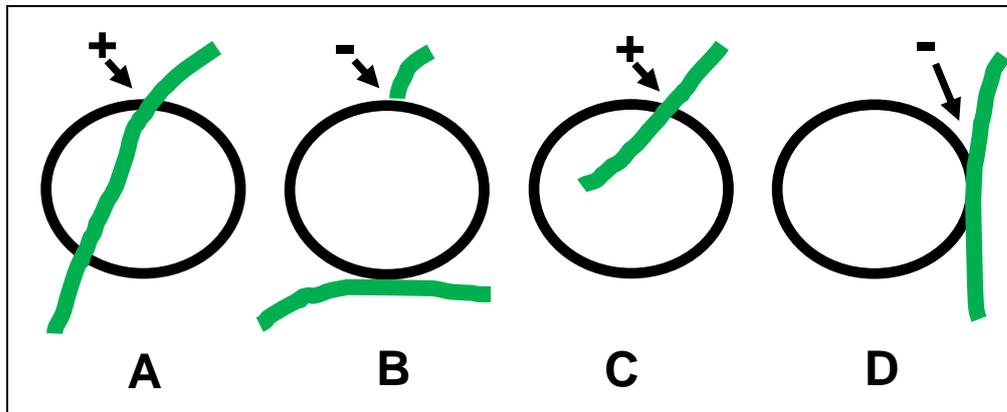


Abbildung 14: Regeln zur Bestimmung der Schweißdrüseninnervation nach Gibbons et al. (2009). Die schwarz umrandeten Kreise stellen die Kreise des Rasters dar. Die grünen Linien repräsentieren die Nervenfasern. Kreise, die von einer Nervenfaser komplett durchlaufen werden, werden als geschnitten gezählt (+) (A). Kreise, die nur am Rand von Nervenfasern berührt werden, werden als nicht-geschnitten gewertet (-) (B). Kreise, in die Nervenfragmente hineinlaufen, werden als geschnitten gezählt (+) (C). Kreise, die von Nervenfasern gestreift werden diese aber nicht in den Kreis eintreten, werden als nicht-geschnitten gewertet (-) (D).

Die SND bildet somit die Dichte von Nervenfasern innerhalb einer Schweißdrüse ab und wird in Prozent („percentage grid intercepts“) angegeben (Abb. 15).

$$\text{SND (\%)} = \frac{\text{Geschnittene Kreise im AOI}}{\text{nicht-geschnittene Kreise im AOI}}$$

Abbildung 15: Berechnung der sudomotorischen Nervenfaserdichte (SND)

4.4.3.1 Referenzwerte für die SND

Bislang sind keiner Normwerte der SND hinsichtlich eines gesunden Proband*innenkollektivs sowohl für Erwachsene als auch für Kinder- und Jugendliche publiziert. In der Referenzarbeit zur SND (Gibbons et al., 2009) wurden reduzierte Werte für Erwachsene mit Diabetes mellitus Typ 2 (SND $20,8 \pm 12,2\%$) und Werte für gesunde Erwachsene (SND $40,8\% \pm 12,8\%$) präsentiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die SND als reduziert bei $\leq 28\%$ und als grenzwertig-reduziert zwischen 29 - 40% erachtet.

4.5 Statistische Analysen

Die statistische Analyse wurde mithilfe von GraphPad Prism 7 (San Diego, California, USA) und R 3.6.0 (*R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>) durchgeführt. Zu Beginn fand ein Shapiro-Wilk-Test hinsichtlich der Variablen (Alter, END und SND für die Kohorten mit/ohne Schmerzen sowie die zurückliegende Schmerzdauer der Patient*innen) Anwendung, um eine mögliche Normalverteilung der Daten zu berechnen. Anschließend erfolgte eine Berechnung des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten zur Darstellung der Beziehung der einzelnen Variablen zueinander sowie zur Regressionsanalyse. Da die END der Kohorte mit Schmerzen drei Mal in der Analyse des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten benutzt wurde, wurde das α -Niveau mithilfe der Bonferroni-Korrektur von $\alpha = 0,05$ auf $\alpha = 0,017$ nach unten korrigiert. Ein zweiseitiger T-Test wurde verwendet, um den Unterschied in der END der Gruppen mit diffuser oder distaler Schmerzlokalisierung zu berechnen. Im Verlauf der Arbeit werden die Ergebnisse mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der statistischen Auswertungen

5.1.1 Berechnung auf Normalverteilung der Werte

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse des Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung der Untersuchungsparameter dargestellt. Dabei zeigte sich bis auf die SND und die Schmerzdauer der Kohorte mit Schmerzsymptomatik eine Normalverteilung der Parameter.

Tabelle 14: Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung der Untersuchungsparameter

	Alter	END	SND	Alter	END	SND	Schmerzdauer	END (proximal / distal)
	Kohorte ohne Schmerzsymptomatik			Kohorte mit Schmerzsymptomatik				
n	15	15	12	26	26	20	26	23
W	0,939	0,928	0,970	0,926	0,952	0,851	0,826	0,952
p-Wert	0,371	0,253	0,912	0,063	0,261	0,006	0,00063	0,261
$W_{\alpha=0,01}$	0,835	0,835	0,805	0,891	0,891	0,868	0,891	0,881

Erklärung: Die Annahme, H_0 = der Untersuchungsparameter ist normalverteilt, kann bei $W_{\alpha \geq 0,01}$ angenommen werden. Somit muss H_0 für die SND ($p = 0,006$) und die Schmerzdauer ($p = 0,0006$) der Kohorte mit Schmerzen verworfen werden und es liegt für die beiden Parameter keine Normalverteilung vor. END = epidermale Nervenfaserdichte, SND = sudomotorische Nervenfaserdichte

5.1.2 Berechnungen zu den einzelnen Untersuchungsgruppen

Tabelle 15 zeigt die Berechnungen der einzelnen Parameter in Abhängigkeit der Untersuchungsgruppe. Nach Bonferroni-Korrektur wurde das α -Niveau von $\alpha = 0,05$ auf $\alpha = 0,017$ nach unten korrigiert.

Tabelle 15: Zusammenfassung des Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizienten und p-Werte der einzelnen Berechnungen.

Parameter 1	Parameter 2	Gruppe	Spearman'sches rho	p-Wert
Alter	END	NP	-0,655898	0,007928
Alter	SND	NP	-0,5666155	0,05475
SND	END	NP	0,4780383	0,116
Alter	END	P	-0,1937118	0,343
Alter	SND	P	0,3660509	0,1124
SND	END	P	0,3427501	0,139
Schmerzverlauf (Jahre)	END	P	-0,3437203	0,09251
Schmerzverlauf (Jahre)	SND	P	-0,4033766	0,08679

Erklärung: END = epidermale Nervenfaserdichte, NP = „Non-Pain“-Gruppe, P = „Pain“-Gruppe, SND = sudomotorische Nervenfaserdichte

5.2 Analyse der END und SND bei Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik (Kontrollgruppe)

Bei 15 Kindern und Jugendlichen (8 Mädchen/ 7 Jungen) ohne Schmerzsymptomatik sowie mit fehlenden klinischen Zeichen einer SF-Beteiligung wurde ein Stück Haut am Oberschenkel entnommen. Die Probenentnahme erfolgte in Zusammenhang mit Muskelbiopsien aufgrund anderer Erkrankungen (Tabelle 16). Die Proband*innen waren bei Biopsieentnahme sieben Monate bis 19 Jahre alt (mittleres Alter $7,2 \pm 5,3$ Jahre).

Tabelle 16: Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik mit proximaler Hautbiopsie

Kennung	Ge- schlecht	Alter bei Biopsie (Jahre)	Grunderkrankung
NP1	m	19	Mitochondriale Erkrankung
NP14	w	16	Juvenile idiopathische Arthritis
NP2	w	12	Kardiomyopathie
NP9	m	10	Kongenitale Myopathie
NP13	m	10	Muskeldystrophie Typ Becker
NP7	m	8	Kongenitale Myopathie
NP4	w	7	Segawa-Syndrom
NP12	m	7	Muskeldystrophie Typ Duchenne
NP6	w	7	Kongenitale Myopathie
NP10	w	5	Dermatomyositis
NP3	m	5	Bewegungsentwicklungsstörung
NP8	w	4	Kardiomyopathie
NP11	m	4	Kardiomyopathie
NP15	w	1	Geistige Behinderung und Muskelhypotonie
NP5	w	0,6	Kardiomyopathie

Erklärung: m = männlich, NP = „Non-Pain“-Gruppe, w = weiblich

5.2.1 Auflistung der morphometrischen Analyseergebnisse

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse für die Bestimmung der END und SND dargestellt.

Tabelle 17: END und SND in proximalen Hautbiopsien bei Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik (NP)

Ken-nung	Ge-schlecht	Alter bei Bi-opsie (Jahre)	END (Fasern/mm)	SND (%)
NP1	m	19	11,9	44
NP14	w	16	20,1	ND
NP2	w	12	13	36
NP9	m	10	12,4	ND
NP13	m	10	20,6	45
NP7	m	8	17,5	52
NP4	w	7	29,5	46
NP12	m	7	15,8	45
NP6	w	7	12,8	43
NP10	w	5	17,4	46
NP3	m	5	26,2	41
NP8	w	4	34,1	49
NP11	m	4	21,9	49
NP15	w	1	29	ND
NP5	w	0,6	21,1	57

Erklärung: END = epidermale Nervenfaserdichte, m = männlich, ND = Analyse nicht durchgeführt, NP= „Non-Pain“-Gruppe, SND = sudomotorische Nervenfaserdichte, w = weiblich

5.2.2 Analyse der END

Bei den Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik (Non-Pain-Gruppe, NP) zeigte sich eine END mit dem Mittelwert von $20,22 \pm 6,9$ Fasern/mm. Der höchste Wert wurde bei einem vier Jahre alten Mädchen mit 34,1 Fasern/mm und der niedrigste Wert bei einem 19-jährigen Jungen gefunden (11,9 Fasern/mm) (Tabelle 17).

In der statistischen Analyse konnte eine negative Korrelation der END mit zunehmendem Alter bei der NP festgestellt werden (Spearman'sches $\rho = -0,66$; $P = 0,008$; Abb. 16). Diese Ergebnisse sind vereinbar mit einer Abnahme der epidermalen Nervenfaserdichte mit steigendem Alter sowie mit Befunden aus bereits publizierten Studien (McArthur et al., 1998; Panoutsopoulou et al., 2015). Auch die Mittelwerte der END unserer Untersuchungsgruppe sind mit denen von McArthur et al. (1998) vergleichbar ($20,3 \pm 7,4$).

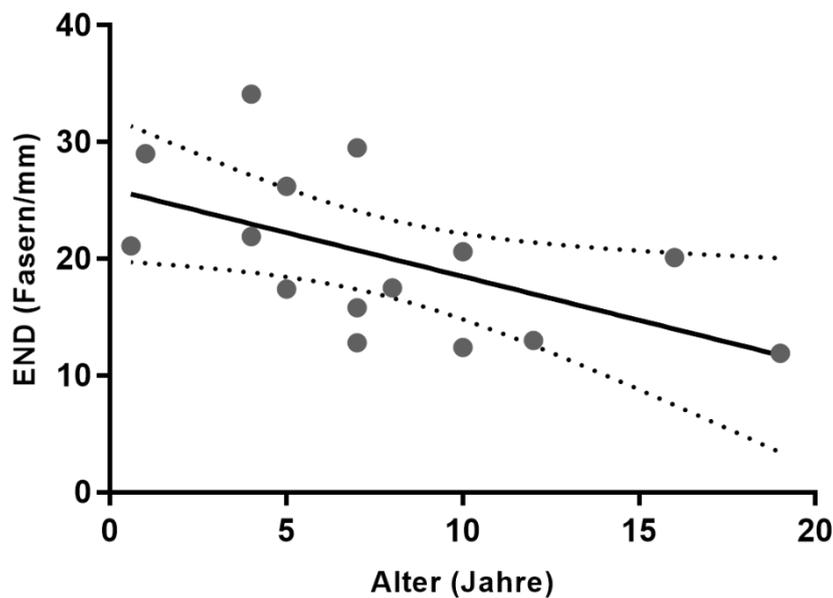


Abbildung 16: Zusammenhang von END und Alter bei Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik. Die END zeigt eine signifikante Korrelation mit zunehmendem Alter (Spearman'sches $\rho = -0,66$; $P = 0,008$). END = epidermale Nervenfaserdichte

5.2.3 Analyse der SND

Die SND konnte bei 12 Proband*innen untersucht werden. In drei Proben waren nicht genügend Schweißdrüsen zur Analyse vorhanden (P9,14, 15). Im Mittel wurden $4,3 \pm 0,5$ Schweißdrüsen pro Biopsie analysiert, welche eine Fläche von $0,075 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ aufwiesen. Die Analyse der Schweißdrüseninnervation zeigte ein Mittelwert von $46 \pm 5,4\%$. Dabei wurde die höchste SND (57%) bei einem sechs Monate alten Mädchen und die niedrigste (36%) bei einem 12 Jahre alten Mädchen gemessen (Tabelle 17). In der Regressionsanalyse konnte keine Korrelation zwischen SND und Alter (Spearman'sches $\rho = -0,57$; $p = 0,055$; Abb. 17A) oder SND und END (Spearman'sches $\rho = 0,48$; $p = 0,12$; Abb. 17B) bestimmt werden.

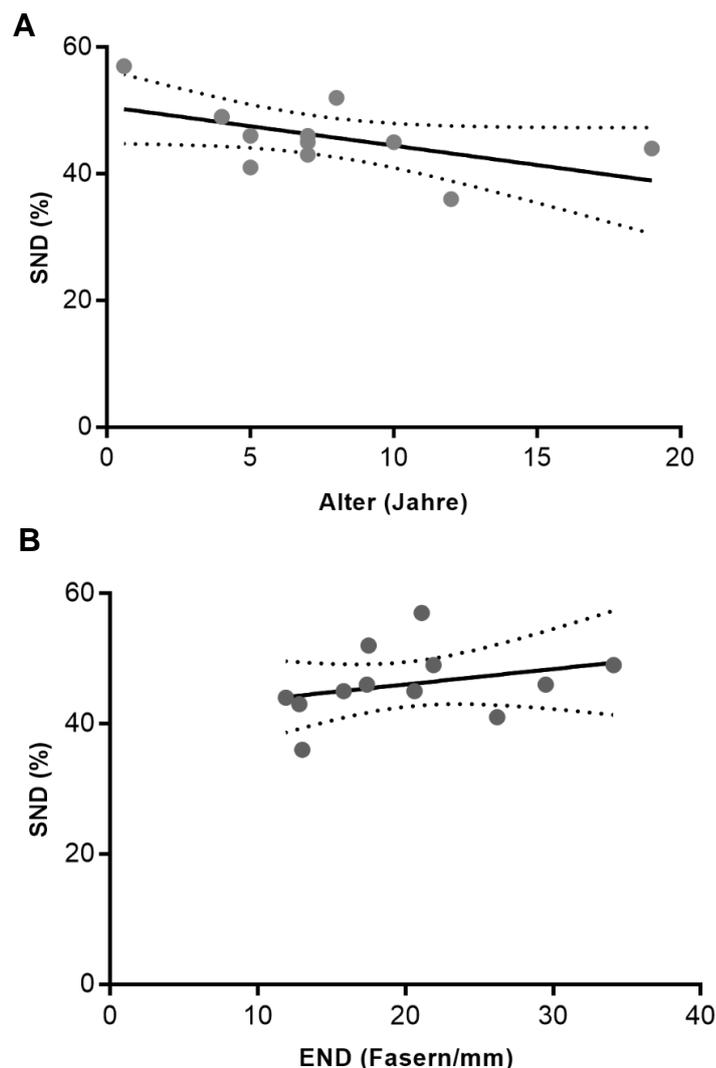


Abbildung 17: Analyse der SND. Korrelation von SND und Alter bei Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik. Die SND zeigte keine signifikante Veränderung mit zunehmendem Alter (Spearman'sches $\rho = -0,57$; $p = 0,055$) (A). Zusammenhang von SND und END bei Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik (B). SND und END zeigten keinen signifikanten Zusammenhang (Spearman'sches $\rho = 0,48$; $p = 0,12$). END = epidermale Nervenfaserdichte, SND = sudomotorische Nervenfaserdichte

5.3 Klinische Daten der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik

In die Arbeit eingeschlossen wurden 26 Patient*innen (15 Mädchen/ 11 Jungen) mit Schmerzsymptomatik unklarer Ätiologie (Tabelle 18). Eine detaillierte Übersicht ist in Tabelle 19 zu finden.

Die Patient*innen waren zum Zeitpunkt der Entnahme der Biopsie am distalen Unterschenkel 7 bis 20 Jahre alt ($14,2 \pm 3,9$ Jahre). Bei 72% der Patient*innen zeigte sich bei Biopsie ein chronisches Krankheitsgeschehen von länger als einem Jahr. Der Zeitpunkt der Diagnosestellung war im Mittel vier Jahre nach Beginn der Symptomatik ($4,3 \pm 2,9$ Jahre). Die Untersuchungskohorte beschrieb die Schmerzen als konstant (43%) oder intermittierend (35%) über den Tagesverlauf mit größtenteils distaler Ausprägung überwiegend im Bereich der distalen Extremitäten (73%). Die Schmerzqualität wurde als brennend (30%) oder kribbelnd (55%) bezeichnet und als Auslöser z.B. Kälte (22%) oder körperliche Belastung (39%) genannt. Eine Schmerzmitteleinnahme wurde von 77% der Befragten angegeben. Zusätzliche mit einer SFN assoziierte Symptome waren bspw. bei 72% der Kohorte Verdauungsprobleme (Übelkeit, Verstopfung oder Erbrechen u.a.), ein Restless-Leg-Syndrom (31%), eine Erythromelalgie (24%), oder Muskelschwäche/subjektiv verminderte Krafftähigkeit (54%). Zur Abklärung der Ursache der SF-Schädigung und der damit einhergehenden Symptomatik wurden neben der Hautstanzbiopsie weitere apparative (z.B. Elektromyographie, Nervenleitgeschwindigkeit) und nicht-apparative Untersuchungen (z.B. immunologische Titer, Mutationen in bestimmten Genen wie TRPA1 oder SCN9A) durchgeführt. Demzufolge konnte bei 13/26 (50%) Patient*innen eine zu Grunde liegende Ätiologie identifiziert werden, wobei 5/13 eine autoimmune Genese aufwiesen. Bei 50% waren die Beschwerden idiopathisch.

Tabelle 18: Zusammenfassung der klinischen Daten der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik

Anzahl der Patient*innen (n) = 26 Alter zum Zeitpunkt der Biopsie: $14,2 \pm 3,9$ Jahre (7-20 Jahre) Geschlecht: weiblich 15/26 (58%)	Anzahl an Patient*innen
Schmerzsymptomatik	26/26 (100%)
Chronizität (Krankheitsdauer >1 Jahr)	18/25 (72%)
Schmerz auf Visueller Analog Skala (VAS, >6 von 10)	6/7 (86%)
Diffuse Symptome (Beine, Augen, Abdomen, Rücken, Kopf, Gelenke)	7/26 (27%)
Distale Symptome (dominierend in distalen Extremitäten)	19/26 (73%)
Schmerzqualität	20/26 (77%)
Brennend	6/20 (30%)
Kribbelnd oder Prickelnd	11/20 (55%)

Hyperästhesie	3/20 (15%)
Drückend	3/20 (15%)
Verlauf	17/26 (65%)
Konstant	8/17 (47%)
Attacken	3/17 (18%)
Intermittierend	6/17 (35%)
Auslöser	18/26 (69%)
Kalte Temperaturen	4/18 (22%)
Warme Temperaturen	2/18 (11%)
Körperliche Aktivität	7/18 (39%)
Berührung oder Druck auf Triggerpunkte	3/18 (17%)
Weitere (Stress, Ruhe, Fatigue)	3/18 (17%)
Schlafprobleme	11/21 (52%)
Schmerzmitteleinnahme	17/22 (77%)
Autonome Dysfunktion	18/26 (69%)
Verdauungsprobleme (Übelkeit, Verstopfung, Dysphagie, abdominelle Schmerzen, Probleme bei der Ernährung)	13/18 (72%)
Inkontinenz (Stuhl- und Harn-)	5/18 (28%)
Hitzewallungen, Benommenheit, orthostatische Probleme	6/18 (33%)
Hyperhidrose, nächtliches Schwitzen	3/18 (17%)
Restless-Leg-Syndrom	8/26 (31%)
Erythromelalgie	4/17 (24%)
Muskelschwäche, verminderte körperliche Leistungsfähigkeit oder Kraft	14/26 (54%)
Abgeschlagenheit (Fatigue)	5/26 (19%)
Zugrundeliegende Erkrankung	
Idiopathisch	13/26 (50%)
Diabetes mellitus Typ 1	1/26 (4%)
Autoimmun (unspezifische Titererhöhung, post-infektiös)	5/26 (19%)
TRPA1 c.145A>G; p.Asn49Asp-Genmutation	1/26 (4%)
1q21.1 Mikrodeletion	1/26 (4%)
Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom mit Xp11.22-p11.23 Duplikation	1/26 (4%)
Strümpell-Lorrain-Syndrome	1/26 (4%)
Charcot-Marie-Tooth-Syndrom (CMT)	3/26 (12%)
CMT1 (PMP22 Mutation)	1/26 (4%)
CMT2	2/26 (8%)

*Erklärung: Obwohl 26 Patient*innen mittels Hautstanzbiopsie untersucht wurden, liegen die klinischen Daten nicht für alle komplett vor (z.B. wurde nur bei 21 Patient*innen angegeben, ob sie an Schlafproblemen leiden, oder nicht). CMT = Charcot-Marie-Tooth Erkrankung*

Tabelle 19: Klinische Daten der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik

	Ge- schlec- ht	Alter bei Symp- tombe- ginn (Jahre)	Alter bei Biopsie (Jahre)	Schmer- zquali- tät	Schmer- zlokali- sation	VAS	Spezifischer Schmerzaus- löser	Schme- rzver- lauf	Schlaf- prob- leme	Schmerz mittel- ein- nahme	Autonome & andere Symp- tome	R L S	Spezifische Untersu- chungsergebnisse
P1	w	12	17	NA	Distale US, Füße, teilweise in Hän- den und Gelen- ken, Ab- domen	k.A.	Kalte Umge- bungstempera- turen	Kon- stant	+	+	Abdominelle Schmerzen, be- kommt leicht blaue Flecke, verminderte KL, Fatigue, Erythro- melalgie in den Händen	+	Mikrodeletion 1q21.1q21.1; Mikrodupli- kation. Xq24; Mitochond- riale DNA-Punktmutatio- nen: negativ
P2	m	5	9	NA	Diffus in Beinen, Armen, linkes Auge, Nacken, Rücken, Abdo- men	k.A.	Kein	Kon- stant	+	+	Abdominelle Schmerzen, Probleme bei Nahrungsauf- nahme, Blasen- dysfunktion, Durchfall, ver- minderte Mus- kelkraft/Mus- kelatrophie,	+	PMP22-Duplikation (CMT1)

											insb. in den Armen		
P3	w	10	15	Pri- ckelnd	Diffus in den Bei- nen, teil- weise in OA, Na- cken, Kopf, Ober- bauch	7/10	Körperliche Ak- tivität	Atta- ckenar- tig	+	+	OB-Schmerzen, Appetitlosigkeit, Fatigue, vermin- derte Krafftähig- keit	-	NLG & MRT normal, hohe ANA-Titer, nega- tive auf M. Fabry
P4	m	15	16	Allody- nie, bren- nend	Distale US, Füße (plantar)	k.A.	Leichte Berüh- rungen	k.A.	-	-	Symmetrische Muskelatrophie in OEX/UEX, Tremor	-	CMT2, path. Depolarisa- tionen im EMG des rech- ten US, keine Mutatio- nen in Exomsequenzie- rung
P5	w	14	17	NA	wenig in distalen US, Hände	k.A.	Kein	k.A.	k.A.	k.A.	Verminderte Krafftähigkeit in distalen Hän- den, Erythro- melalgie in Hän- den	+	Keine Mutation in SCN9A und SCN10A Sequenzierung

P6	w	15	19	NA	Muskeln, Gelenken, Nacken, Schultern, Kopf	k.A.	Mentaler Stress	Attackenartig	+	+	Wiederkehrende Muskelschmerzen, interstitielle Zystidien	-	EMG & NLG normal, keine Auffälligkeiten im Skelettröntgen
P7	w	3,5	7	NA	Distale US, Füße, OS, Schultern, Kopf	k.A.	Hitze, Erschöpfung	k.A.	+	+	Fäkale Inkontinenz, Appetitlosigkeit, Epilepsie, Fatigue, verminderte KL/Muskelkraft, Erythromelalgie in Füßen, Ptosis unter körperlicher Belastung,	+	CGH-Microarray, SLC2A1, WES, MRT & Muskelbiopsie unauffällig, horizontale Augenbewegungsstörung

P8	m	6	14	Muskelspannung	Generalisiert, Muskelschmerzen	k.A.	Druck auf Triggerpunkte	Attackenartig	+	+	Chronische Myalgien, Krämpfe in US, Normale Kraftfähigkeit, Depression	+	Keine mitochondrialen Punktmutationen (m.3243A>G, m.8344A>G; m.8993 T>C/G)
P9	w	3	8	Dysästhesie	Distale US	6/10	Ruhe	Intermittierend	-	+	Probleme beim Wasserlassen, Enuresis nocturnus	-	Keine Mutation in Genen für SCN9A und GLA SEP/NLG vom N.tibialis normal, MRT Kopf, Wirbelsäule und Füße unauffällig
P10	w	10	12	Leicht kribbelnd, Hyperästhesie, Allodynie	Distale US, Knie	k.A.	Kein	Konstant	-	+	Verdauungsprobleme, kalte Füße. Hitzewallungen, erhöhte Blutungstendenzen	+	Erhöhte ANA-Titer, negativ auf M. Fabry
P11	w	3,5	8	Kribbelnd	Distale US, Füße, Hände, manchmal Brust, Arme,	k.A.	Kalte Umgebungstemperaturen	Intermittierend	-	-	Nächtliches Schwitzen, Dysurie, Verstopfung, kalte Hände, Hitzewallungen, Schwindel	-	Mutation im TRPA1-Gen (Heterozygot für c.145A>G; p.Asn49Asp), negative auf M. Fabry

P12	m	17 (2 Monate Krankheitsdauer)	17	Pri- ckelnd, ste- chend	Distale US, zeit- weise linke Körper- hälfte, Kopf, OB	k.A.	Kein	k.A.	-	-	Schluckauf, OB- Schmerzen, Sodbrennen, Mundgeruch, Fatigue, Druck über den Augen	-	NLG normal, grenzwertig verlängerte Latenzen der SEPs am N. media- nus/tibialis
P13	m	17	19	Hyper- ästhe- sie, pri- ckelnd, drü- ckend	Distale US, Hände, große Gelenke	8/10	Körperliche Ak- tivität	Kon- stant	+	+	Schwindel, Schwellung der Gelenke	-	EMG & NLG normal, ne- gative auf M. Fabry
P14	m	16 (3 Monate Krankheitsdauer)	16	Hyper- ästhesie	Distale US	k.A.	Nach Infektion	k.A.	k.A.	k.A.	Verschwommen- es Sehen, Schwindel, Übelkeit, Motili- tätsprobleme des Ösophagus, Durchfall, Mus- kelkrämpfe, Hör- minderung	-	NLG & MRT Kopf und Rücken normal

P15	w	17	18	Brennend, kratzend, ziehend, krampfähnlich in den Beinen	Diffus in den Beinen, Handgelenk, UA, Ellenbogen	8/10	Körperliche Aktivität	Konstant	+	+	Schwindel, Fatigue, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen	+	EMG & NLG normal, negativ auf M. Fabry
P16	w	13	15	Dumpf	Distale US	k.A.	Körperliche Aktivität	Konstant	-	-	-	-	Genanalysen negativ
P17	w	11 (4 Monate Krankheitsdauer)	11	Brennend	Füße	k.A.	Körperliche Aktivität	Intermittierend	k.A.	+	Morgensteifigkeit, Stimmungsschwankungen, Hypermobilität	-	Erhöhte Werte für LDH, AP, ANA-Titer, Rf, & CK; NLG & MRT der Beine normal, negative auf Morbus Fabry
P18	w	2	15	Prickelnd, brennend, Hyperästhesie	Füße, Hände, Haut	k.A.	Kalte Umgebungstemperaturen	k.A.	k.A.	k.A.	Orthostatisch bedingter Schwindel	-	CMT2, NLG des linken N. suralis grenzwertig reduziert, verlängerte Latenzen und reduzierte Amplituden in SEPs des N. tibialis, Rf erhöht, MRT, EEG und kardiale Diagnostik unauffällig

P19	m	10 (2 Monate Krankheitsdauer)	10	Kribbelnd	Distale US, sporadisch Abdomen	k.A.	Kein	Intermittierend	+	+	Abdominelle Schmerzen, entwicklungsbedingte Koordinationsstörung, Pyramidenbahnzeichen, Muskelschwäche	-	Strümpell-Lorrain-Krankheit, leichte Veränderungen der weißen Substanz im MRT-Kopf, Mikroduplikation 15q15.3q15.3
P20	w	15	20	Drückend, kribbelnd	Distale US, Füße, Nase, Lippen, Fingerspitzen, Abdomen	k.A.	Kalte Umgebungstemperaturen, Druck	k.A.	-	+	Verstopfung, trockener Mund, Dysphagie, abdominelle Schmerzen, Erythromelalgie in den Füßen, Sklerodermie, prox. Muskelschwäche, Ptosis, Hyperreflexie	-	Lambert-Eaton-Myasthenie Syndrome mit Duplikation bei Xp11.22-p11.23
P21	m	k.A.	14	Brennend	Diffus in den Beinen, Hände, Arme, unterer Rücken,	k.A.	Kein	k.A.	k.A.	k.A.	Abdominelle Schmerzen, gehäuft Café-au-Lait-Flecken	-	-

P22	w	17 (6 Monate Krankheitsdauer)	17	Pri-ckelnd, brennend	Distale US, Rücken	9/10	Kein	Konstant	+	+	-	-	Diabetes mellitus Typ 1, Mauriac Syndrome, NLG & f-Welle normal
P23	m	14	16	Pri-ckelnd, elektrisierend	Distale US, Hände, Brust	7/10	Körperliche Aktivität, Hitze	k.A.	-	-	-	-	-
P24	m	17	19	Drückend	Füße, Hände, Ellenbogen, Knie, Abdomen	k.A.	Körperliche Aktivität	Intermittierend	-	+	Fäkale Inkontinenz, Abdominelle Schmerzen	-	-

P25	w	9,5	12	NA	Gelenke, an der Kontrak- tur	k.A.	Kein	Kon- stant	-	+	Hyperhidrose, mentale und motorische Ent- wicklungsstö- rung, Flexions- kontraktur an den Fingern II-IV der rechten Hand, Genu va- lgum, vermin- derte Kraftfähig- keit, kalt-livide Finger	-	Normale SEPs des N. tibialis und medianus, NLG am N. medianus grenzwertig reduziert, CGH-Array unauffällig
P26	m	5	9	Pri- ckelnd	Distale US, Hände	8/10	Nach Infektion	Inter- mittie- rend	+	+	Hyperhidrose, Asthma	+	NLG & f-Welle normal, negative auf M. Fabry

Erklärung: ANA = Antinukleäre Antikörper, AP = Alkalische Phosphatase; CGH-array = Array-based Comparative Genomic Hybridization; CK = Creatine Kinase; CMT = Charcot-Marie-Tooth Erkrankung, EEG = Elektroenzephalogramm, EMG = Elektromyographie, k.A. = keine Angabe, KL = körperliche Leistungsfähigkeit, LDH = Laktatdehydrogenase, M. = Muskel, N. = Nervus, MRT = Magnetresonanztomographen, NA = nicht angegeben, NLG = Nervenleitgeschwindigkeit, OA = Oberarm, OB = Oberbauch, OEX = obere Extremität, OS = Oberschenkel, Rf = Rheumafaktor, RLS = Restlessleg-Syndrom, SEP = somatosensorisch evozierte Potentiale, UA = Unterarm, UEX = untere Extremität, US = Unterschenkel, VAS = Visuelle Analog Skala, WES = Sequenzierung des ganzen Genoms

5.4 Analyse der END und SND bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik

5.4.1 Analyse der END und Korrelation mit klinischen Befunden

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse für die Analyse der END und SND dargestellt.

Tabelle 20: Zusammenfassung der END und SND der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik (P)

	Geschlecht	Schmerzdauer (Jahre)	Alter bei Biopsie (Jahre)	END		SND	
				Fasern/mm	Grad der Verminderung	%	Grad der Verminderung
P20	w	5	20	4,8	reduziert	27	reduziert
P24	m	2	19	12,9	keine	ND	ND
P13	m	2	19	7,9	grenzwertig	36	grenzwertig
P6	w	4	19	5,4	reduziert	21	reduziert
P15	w	1	18	2,8	reduziert	ND	ND
P22	w	0,5	17	2,4	reduziert	ND	ND
P1	w	5	17	6,6	reduziert	26	reduziert
P5	w	3	17	6,8	reduziert	24	reduziert
P12	m	0,25	17	8,1	grenzwertig	33	grenzwertig
P4	m	1	16	6,3	grenzwertig	28	reduziert
P23	m	2	16	5,9	reduziert	51	keine
P14	m	0,25	16	7,1	grenzwertig	26	reduziert
P3	w	5	15	2,1	reduziert	ND	ND
P16	w	2	15	4,7	reduziert	33	grenzwertig
P18	w	13	15	0,7	reduziert	36	grenzwertig
P21	m	k.A.	15	17,6	keine	46	keine
P8	m	8	14	5,3	reduziert	24	reduziert
P10	w	2	12	6,1	grenzwertig	ND	ND
P25	w	2	12	13,8	keine	58	keine
P17	w	0,5	11	9,4	grenzwertig	31	grenzwertig
P19	m	0,25	10	12	keine	32	grenzwertig
P2	m	4	9	8,9	grenzwertig	27	reduziert
P26	m	4	9	7,3	grenzwertig	23	reduziert
P9	w	5	8	9,4	grenzwertig	ND	ND
P11	w	4,5	8	3,9	reduziert	20	reduziert
P7	w	3,5	7	8	reduziert	25	reduziert

Erklärung: END = epidermale Nervenfaserdichte, k.A. = keine Angabe, m = männlich, ND = Analyse nicht durchgeführt, P = „Pain“-Gruppe, SND = sudomotorische Nervenfaserdichte, w = weiblich

Die Patient*innen mit Schmerzsymptomatik wiesen einen END-Mittelwert von $7,2 \pm 3,9$ Fasern/mm auf (Tabelle 20) mit einem maximalen Wert von 17,6 Fasern/mm (P21) und einem Minimalen von 0,7 Fasern/mm (P18). Die epidermale Nervenfaserdichte war bei 50% (13/26) des Patient*innenkollektivs mit Schmerzen („Pain-Gruppe“, P) reduziert und bei 35% (9/26) grenzwertig-reduziert (Abb. 18, zur Einteilung siehe Abschnitt 4.4.2). In den Proben mit reduzierter bzw. grenzwertig-reduzierter Werten betrug die END im Mittel $6,17 \pm 2,7$ Fasern/mm.

Bei vier Patient*innen mit Schmerzsymptomatik zeigte sich die END als nicht vermindert. Dazu zählt ein Patient (P19) mit einer hereditären spastischen Paraplegie (Strümpell-orrain Syndrom) sowie drei Patient*innen (P21, 24, 25) mit Schmerzen unklarer Ätiologie.

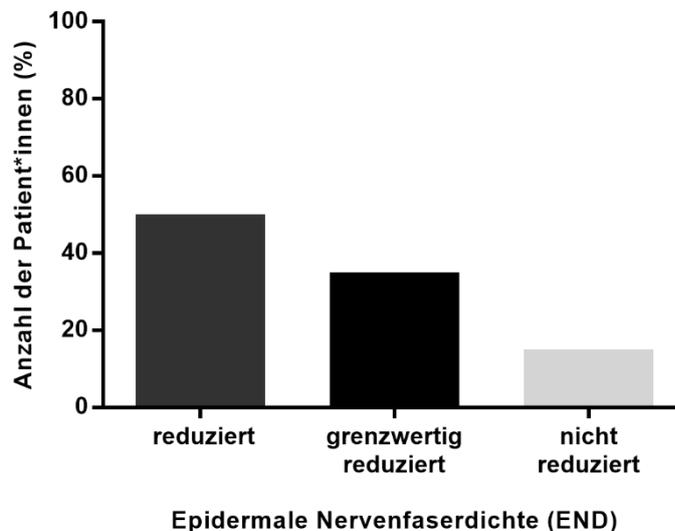


Abbildung 18: Grad der Verminderung der END bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik. Die END ist bei 50% der Patient*innen vermindert und bei 35% grenzwertig-vermindert, 15% der Untersuchten weisen keine reduzierten END-Werte auf. END = epidermale Nervenfaserdichte

Um abzuschätzen, ob trotz möglicher Verminderung der END ein Zusammenhang zwischen Wert der END und Alter besteht, wurde diesbezüglich der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt (Abb. 19A). Darüber hinaus wurde mit dem gleichen

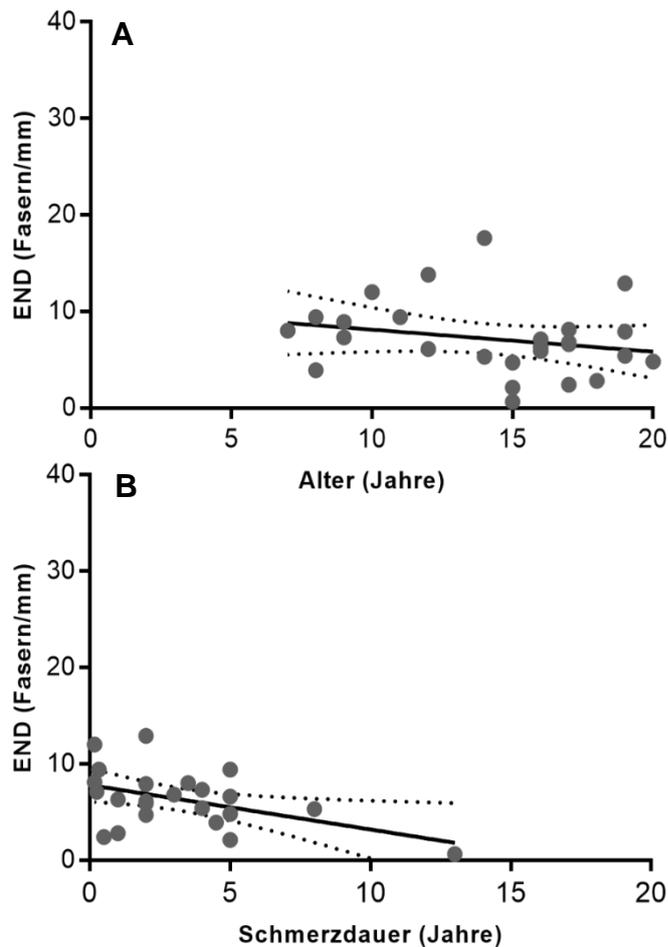


Abbildung 19: Zusammenhang zwischen END und Alter sowie Schmerzdauer bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik. In der Analyse mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman zeigte sich kein statistischer Zusammenhang sowohl zwischen END und Alter (Spearman'sches $\rho = -0,19$; $p = 0,34$) (A) als auch zwischen END und Schmerzdauer (Spearman'sches $\rho = -0,34$; $p = 0,09$) (B). END = epidermale Nervenfaserdichte

statistischen Verfahren untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Verminderung der END und der Dauer der Schmerzsymptomatik vorliegt (Abb. 19B). Für beide Untersuchungen zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit zwischen den Parametern ($p = 0,34$ bzw. $p = 0,09$). Individuell kann aufgezeigt werden, dass z.B. P18 zum Zeitpunkt der Hautbiopsie bereits seit 13 Jahren Schmerzen hatte und eine deutlich verminderte END mit 0,7 Fasern/mm aufwies. Bei fünf Patient*innen mit einer Krankheitsdauer von weniger als einem Jahr hatte nur eine Patientin (P22) eine reduzierte END (2,4 Fasern/mm). Demgegenüber war die END bei drei Patient*innen (P12,14,17) grenzwertig-reduziert (P12,14,17) und bei Patient 19 nicht reduziert (12 Fasern/mm). In Abbildung 20 sind

exemplarisch zwei Hautstanzbiopsien, einmal mit reduzierter (A) und einmal mit nicht-reduzierter (B) END in Immunfluoreszenzfärbung abgebildet.

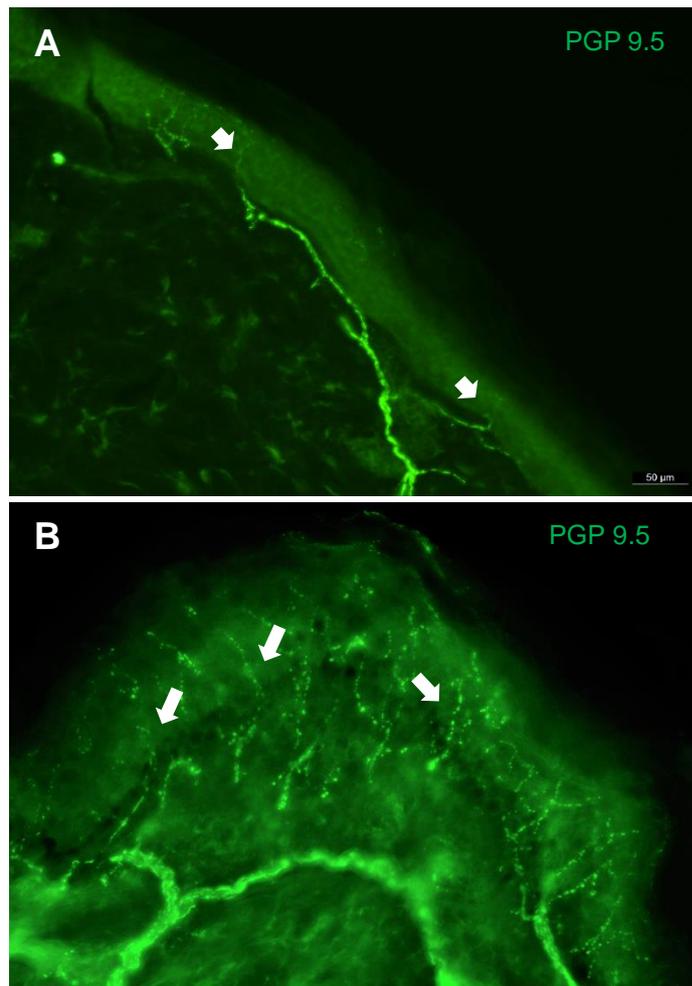


Abbildung 20: Darstellung der PGP 9.5-positiven epidermalen Nervenfasern bei einer Patientin mit reduzierter END (P20, 4,8 Fasern/mm) (A) und eines Probanden ohne Verminderung der END (NP10, 20,6 Fasern/mm) (B). Die weißen Pfeile markieren die epidermalen Nervenfasern. END = epidermale Nervenfaserdichte. Vergrößerung x20.

Ein Zweistichproben-*t*-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,64$) zwischen den END-Mittelwerten der Gruppe an Patient*innen mit distaler Ausprägung der Schmerzsymptomatik (END-Mittelwert $6,9 \pm 2,9$ Fasern/mm) und der mit Schmerzen diffus über den ganzen Körper verteilt (END-Mittelwert $8 \pm 5,4$ Fasern/mm). Bei den Patient*innen die zusätzlich von einem Restless-Leg-Syndrom berichteten war die END in 63% der Fälle reduziert und bei 37% grenzwertig-reduziert. In allen vier Patientinnen mit Erythromelalgie (P1,5,7,20) waren sowohl die END als auch die SND reduziert. Auffällig war, dass in diesen Patient*innen die Muskelkraft bzw. eine schnelle Ermüdbarkeit z.B. der Handmuskulatur vorherrschte. Zudem war die Symptomatik bis auf P20 mit einem Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom distaler Ausprägung und parallel bestand bei Datenerhebung ein Restless-Leg-Syndrom.

5.4.2 Analyse der SND und Korrelation mit klinischen Befunden

Die Schweißdrüsen konnten in 22 Proben analysiert werden. Bei Patient*in 3, 9, 10, 15, 20 und 24 waren keine Schweißdrüsen in den Biopsien. In den Biopsien von vier Patient*innen (P6, 11, 12, 18) fanden sich weniger als vier, wobei diese aufgrund der ausreichenden Größe ($>300 \mu\text{m}^2$) in die Auszählung einbezogen wurden. Im Mittel ergaben sich $4,0 \pm 1,1$ analysierte Schweißdrüsen pro Biopsie, welche eine Fläche von $0,071 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ aufwiesen. In Tabelle 20 sind ebenfalls die Werte der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik für die Schweißdrüseninnervation (SND) angegeben.

Bei den Patient*innen mit Schmerzsymptomatik ergab die SND-Analyse einen Mittelwert von $31 \pm 10\%$ (Tabelle 20) mit einem maximalen Wert von 58% (P25) und einem Minimalen 20% (P11). Die Schweißdrüseninnervationsdichte – auch sudomotorische Nervenfaserdichte genannt – war bei 11/20 (55%) der Patient*innen mit Schmerzen reduziert sowie bei 6/20 (30%) grenzwertig-reduziert (Abb. 21, zur Einteilung siehe Abschnitt 4.4.3).

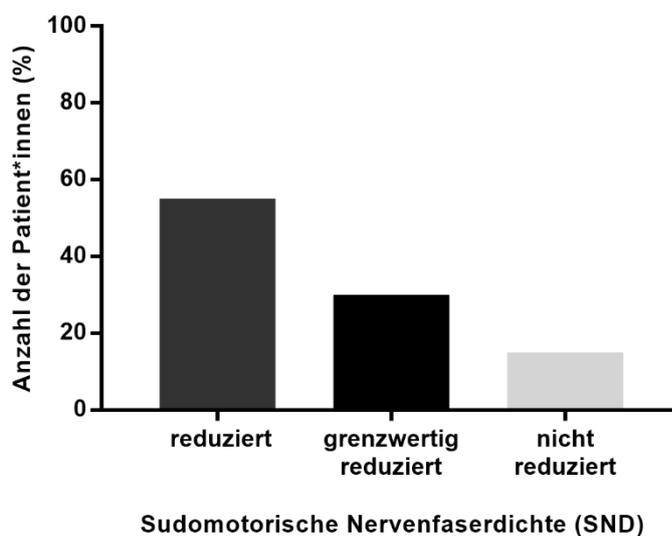


Abbildung 21: Grad der Verminderung der SND bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik. Die SND ist bei 55% der Patient*innen reduziert und bei 30% grenzwertig-reduziert, 15% der Untersuchten weisen keine reduzierten END-Werte auf. SND = sudomotorische Nervenfaserdichte

Es zeigte sich keine Korrelation von SND und Alter ($p = 0,11$) sowie SND und Schmerzdauer ($p = 0,09$) (Abb. 22A/B).

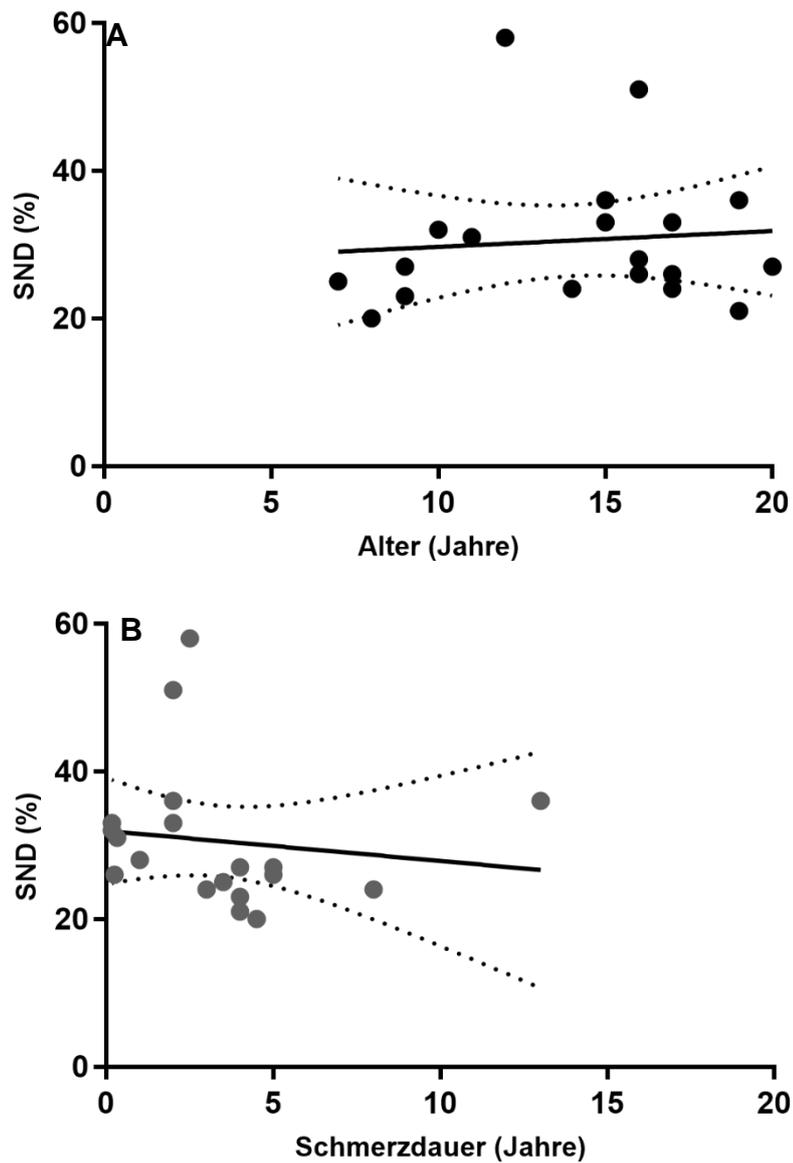


Abbildung 22: Zusammenhang zwischen SND und Alter sowie Schmerzdauer bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik. In der Analyse mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman zeigte sich kein statistischer Zusammenhang sowohl zwischen SND und Alter (Spearman'sches $\rho = 0,37$; $p = 0,11$) (A) als auch zwischen SND und Schmerzdauer (Spearman'sches $\rho = -0,40$; $p = 0,09$) (B). SND = sudomotorische Nervenfaserdichte

Darüber hinaus konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen sudomotorischer Innervationsdichte und epidermalem Innervationsmuster gefunden werden ($p = 0,14$) (Abb. 23).

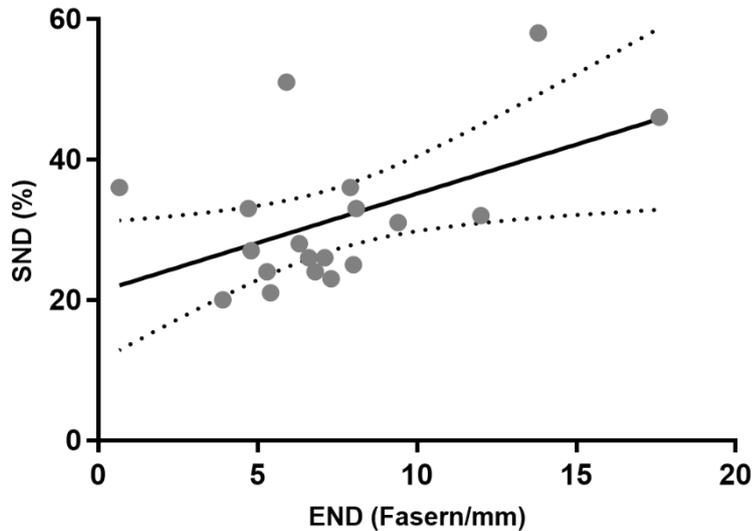


Abbildung 23: Zusammenhang von SND und END bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik. SND und END zeigen statistisch keinen signifikanten Zusammenhang (Spearman'sches $\rho = 0,34$; $p = 0,14$). END = epidermale Nervenfaserdichte, SND = sudomotorische Nervenfaserdichte

In Abbildung 24 sind exemplarisch zwei Hautstanzbiopsien, einmal mit reduzierter (A) und einmal mit nicht-reduzierter (B) SND in Immunfluoreszenz abgebildet.

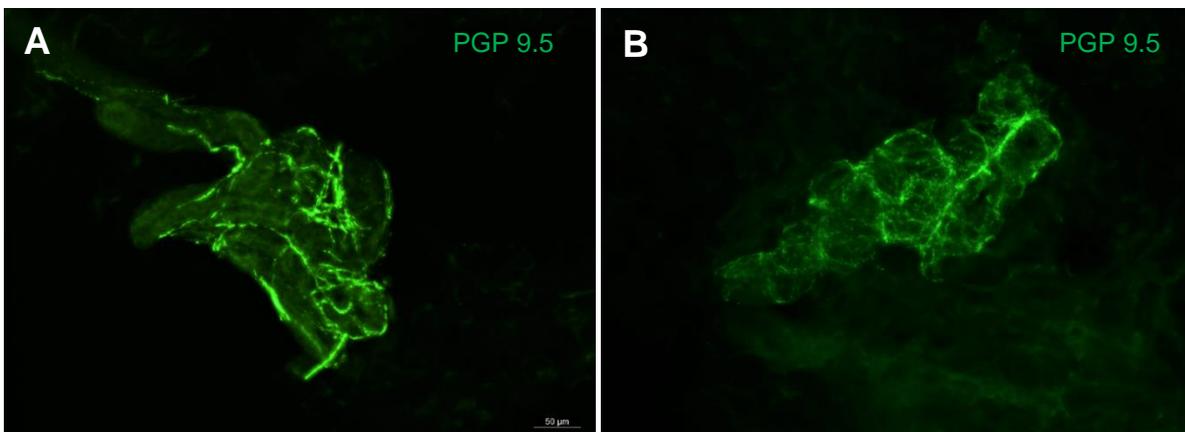


Abbildung 24: Darstellung der Schweißdrüseninnervation nach Immunfluoreszenzfärbung mit anti-PGP 9.5 Antikörpern. P8 wies eine Verminderte SND (24%) auf (A). Im Vergleich dazu eine gesunde Kontrolle mit normaler SND (B). Vergrößerung x20. SND = sudomotorische Nervenfaserdichte

Bei den Patient*innen, die autonome Symptomen äußerten wie z.B. Verdauungsproblemen oder Inkontinenz konnten nur in 50% die SND analysiert werden. Die sudomotorische Nervenfaserdichte war hierbei in 64% der Betroffenen reduziert und in 31% grenzwertig-reduziert. Patient 19 wies eine normale END bei grenzwertig-reduzierter SND auf. Im Vergleich von SND und klinischer Symptomatik war die SND bspw. bei P7 mit Stuhlinkontinenz, bei P11 mit vermehrtem nächtlichen Schwitzen, Dysurie und Verstopfungen oder bei P14 mit Akkomodationsproblemen, Übelkeit und rezidivierenden Diarrhöen reduziert.

Im Zuge der SD-Auswertung zeigte sich, dass die in das subkutane Fettgewebe eingebetteten und am dermal-epidermalen Übergang liegenden Schweißdrüsen durch die „Free-Floating“-Technik zum Teil deutlich aus dem umliegenden Gewebe herausgelöst wurden (Abb. 25).

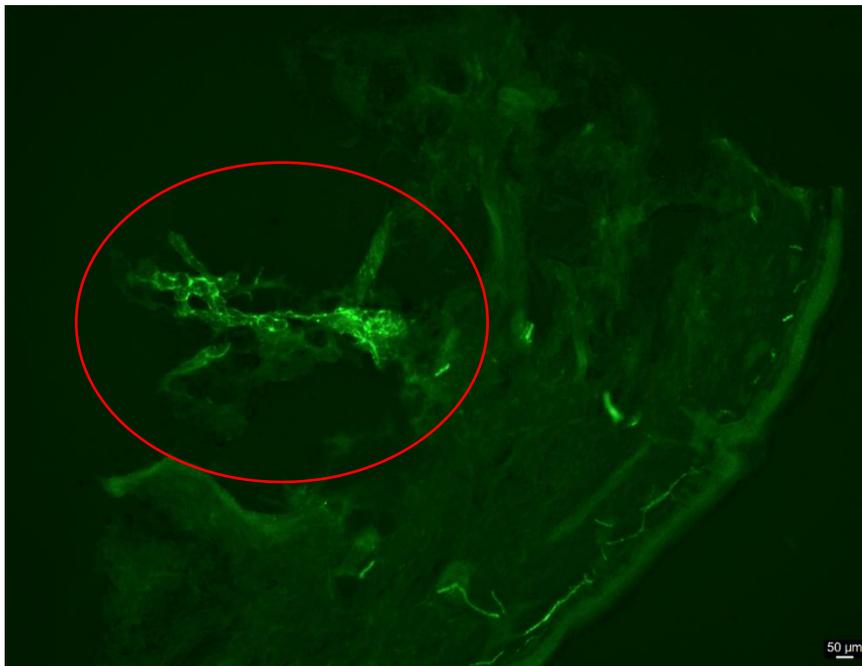


Abbildung 25: Defekte Schweißdrüse am Übergang zur Kutis. Der rot umrandete Bereich zeigt eine in subkutanes Fettgewebe eingebettete Schweißdrüse, die im Zuge der Immunfluoreszenzfärbung in „Free-Floating“-Methode in Mitleiden-schaft gezogen wurde und nicht mehr auszuwerten war. Vergrößerung x20.

5.5 Einzelfallvorstellung ausgewählter Patient*innen mit Schmerzsymptomatik

P10

Die 12-jährige Patientin hatte zum Zeitpunkt der Biopsie seit zwei Jahren konstant bestehende neuropathische Schmerzen an den Unterschenkeln und Füßen sowie teilweise an den Knien mit übersteigerter Schmerzwahrnehmung oder mit Allodynie. Zudem erfolgte eine Schmerzmedikation und es zeigten sich Verdauungsprobleme, häufig kalte Füße und Hitzewallungen. Erhöhte Antinukleäre-Antikörper Titer lassen auf eine autoimmune Genese der Beschwerden schließen. Genetische Ursachen konnten ausgeschlossen werden. Die END war grenzwertig-reduziert (6,1 Fasern/mm), Schweißdrüsen waren nicht auswertbar.

P11

Mit 3,5 Jahren traten bei der Patientin rezidivierende Schmerzen in den Füßen, Händen und gelegentlich in der Brust und den Armen mit neuropathischer Komponente auf, die als kribbelnd empfunden wurden und sich insbesondere bei Kälte äußerten. Zudem waren u.a. häufiges nächtliches Schwitzen, Dysurie, Obstipation und Schwindel als Symptome des autonomen Nervensystems auffällig. Die Mutter fiel mit ähnlichen Symptomen auf. In der Genanalyse zeigte sich eine pathologische Mutation im TRPA1-Gen (p.Asn49Asp). Der TRPA1-Rezeptor ist im peripheren und zentralen Nervensystem vorhanden und für die Schmerzwahrnehmung, -weiterleitung, und -modellierung von Bedeutung (Malek et al., 2015, S. 1). Mit acht Jahren erhielt die Patientin eine Hautbiopsie. Hierbei waren sowohl die END (3,9 Fasern/mm) als auch die SND (20%) reduziert.

P17

Mit einer Schmerzhistorie von vier Monaten präsentierte die 11 Jahre alte Patientin brennende Schmerzen in den Füßen, die intermittierend insbesondere bei körperlicher Aktivität auftraten. Weitere Symptome waren Stimmungsschwankungen, Morgensteifigkeit und eine Hypermobilität. Sowohl END (9,4 Fasern/mm) als auch SND (31%) waren grenzwertig-reduziert. Weitere Untersuchungen zeigten positive autoimmunologische Faktoren (RF, ANA u.a.) und erhöhte CK. Physiologische Tests der Muskulatur und Nerven sowie eine Muskelbiopsie waren unauffällig, wodurch die Ätiologie der SF-Beteiligung als autoimmun angesehen werden kann.

P20

Bei dieser Patientin wurde im Alter von 13 Jahren ein Lambert-Eaton-Myasthenie Syndrom diagnostiziert. Symptome waren z.B. häufige Verstopfungen, Schluckstörungen, abdominelle Schmerzen und proximale Muskelschwäche. Mit 15 Jahren begannen kribbelnde und drückende Schmerzen mit über den ganzen Körper verteilter Lokalisation (Unterschenkel, Füße, Nase u.a.). Als Trigger wurde kalte Umgebungstemperatur und Druck auf die entsprechenden Körperteile angegeben. Die Symptomatik führte zur Schmerzmitteleinnahme. Nach einer Therapie mit Kortikosteroiden waren die Beschwerden deutlich rückläufig. Sowohl END (4,8 Fasern/mm) als auch SND (27%) waren reduziert.

P22

Die Patientin war zum Zeitpunkt der Entnahme der Hautbiopsie 17 Jahre alt und klagte seit sechs Monaten über äußerst ausgeprägte Schmerzen (9/10 auf VAS) neuropathischer Ausprägung von brennender und prickelnder Qualität. Die Schmerzen präsentierten sich insbesondere an den distalen Unterschenkeln/Füßen und teilweise am Rücken und waren konstant vorhanden. Die Symptomatik führte zu Schlafstörungen und einer Einnahme von Schmerzmitteln. Die Symptomatik wurde zunächst als psychosomatisch bedingt gedeutet, letztlich konnte ein Diabetes mellitus Typ 1 diagnostiziert werden, der ursächlich für die neuropathischen Schmerzen war. Die END zeigte sich mit 2,4 Fasern/mm reduziert. Die SND konnte aufgrund fehlender Schweißdrüsen in der Hautbiopsie nicht analysiert werden.

5.6 Einzelfallvorstellung Kind mit Morbus Pompe

Der infantile Morbus Pompe (engl. „*infantile onset Pompe disease*“, IOPD) führt durch ein nahezu komplettes Fehlen der lysosomalen α -Glucosidase (engl. „*acid alpha glucosidase*“, GAA) zu einer pathologisch erhöhten Einlagerung von Glykogen in verschiedenen Geweben. Dies hat meistens eine Myopathie der rumpfnahen Skelettmuskulatur und in der Herzmuskulatur mit der Entwicklung einer hypertrophen Kardiopathie zur Folge. Ohne Behandlung versterben die Patient*innen innerhalb des ersten Lebensjahres an kardiorespiratorischem Versagen (Bay et al., 2019, S. 271f.). Durch eine Enzymersatztherapie (ERT) mit rekombinanter α -Glucosidase kann eine verlängerte Überlebensrate und das Erreichen von motorischen Entwicklungsschritten, wie das freie Gehen, bei der Mehrzahl der Erkrankten beobachtet werden (Hahn und Schänzer, 2019). Bei einigen Patienten zeigt sich unter ERT eine distale Parese, wobei bisher nicht geklärt ist, ob die Schädigung myopathisch oder neurogen bedingt ist (Prater et al., 2012; Parini et al., 2018).

Das in dieser Arbeit vorgestellte Kind mit einem IOPD war zum Zeitpunkt der Hautbiopsie 7,5-Jahre alt und wies u.a. eine schwere, distale Myopathie auf und wurde zuvor bereits für sechs Jahre mit ERT behandelt. Initial zeigten sich nach Therapiebeginn eine verbesserte Symptomatik wie z.B. eine Normalisierung der hypertrophen Kardiomyopathie und eine verbesserte freie Gehstrecke. Im Verlauf der ERT stellte sich eine zunehmende distale Muskelschwäche mit Verminderung der Gehfähigkeit im 6-Minuten-Gehetest von 370 m (im Alter von 6 Jahren) auf 250 m sechs Monate später. Es zeigte sich hierzu eine schwere Schwäche der Dorsalflexoren der Füße. Eine durchgeführte Muskelbiopsie des M. tibialis zeigte eine ausgeprägte vakuolisierte Myopathie. Eine Biopsie des N. suralis deutete auf einen leichten Verlust myelinisierter Axone sowie unmyelinisierter Fasern hin. Elektrophysiologisch konnten geringe Muskelaktionspotentiale in beiden Mm. extensor digiti brevis nach Stimulation des N. peroneus detektiert werden, was auf eine LF-Beteiligung im Sinne einer möglichen PNP schließen lässt. Eine vom rechten Unterschenkel entnommene Hautstanzbiopsie ergab eine mit 7,3 Fasern/mm grenzwertig-reduzierte END sowie eine grenzwertig-reduzierte SND (32%), was eine Beteiligung

der kleinen somatosensorischen und autonomen Nervenfasern im Krankheitsgeschehen hindeutet (Abb 26).

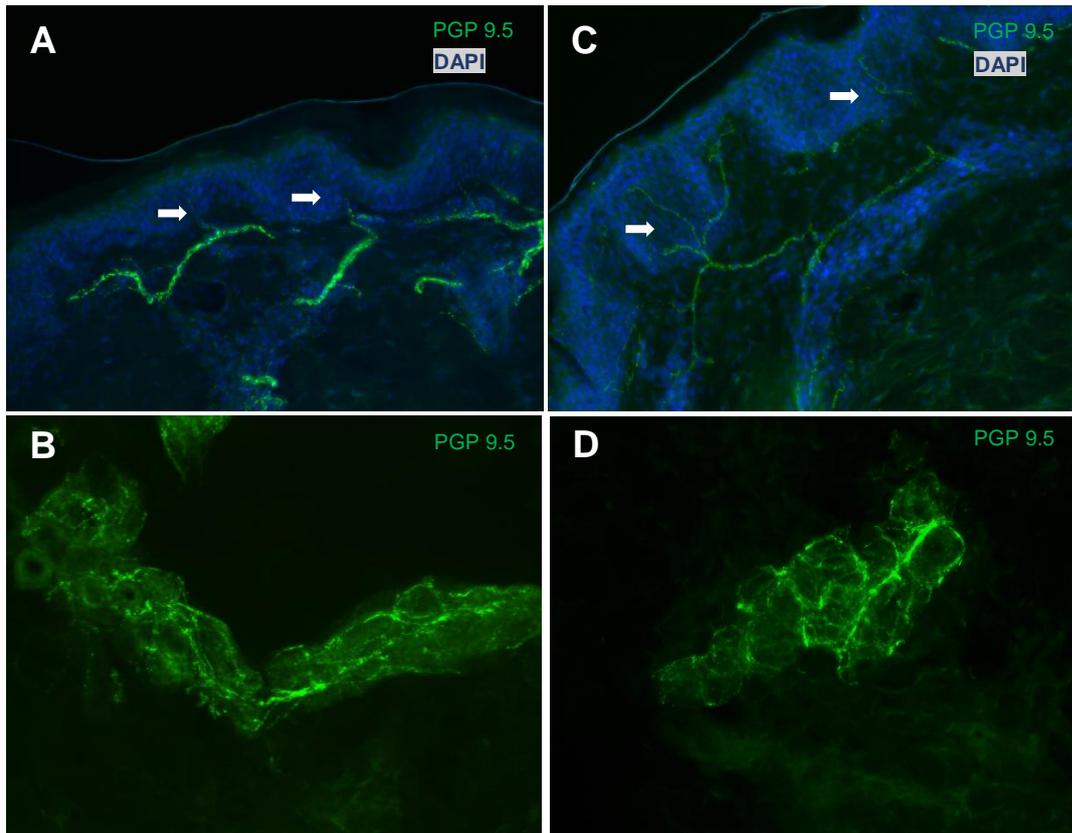


Abbildung 26: END und SND eines 7,5-jährigen Kindes mit Morbus Pompe nach 6,5 Jahren Enzyersatztherapie sowie einer gesunden Kontrolle. Die Immunfluoreszenzfärbung einer Hautstanzbiopsie mit Antikörpern gegen PGP 9.5 zeigt eine mit 7,3 Fasern/mm grenzwertig-reduzierte END (die epidermalen Nervenfasern sind mit Pfeilen markiert) **(A)** mit zusätzlicher DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkerne der Epidermis sowie eine grenzwertig-reduzierte SND (32%) **(B)**. Abbildungen **(C)** und **(D)** zeigen zum Vergleich die epidermalen sowie sudomotorischen Nervenfasern einer gesunden Kontrolle. Vergrößerung x20. END = epidermale Nervenfaserdichte, SND = sudomotorische Nervenfaserdichte

Die Analyse der END und SND bei unserem Patienten mit IOPD sollte zeigen, dass eine kleine Hautbiopsie einen Hinweis darauf geben kann, ob das periphere Nervensystem bei dieser Erkrankung betroffen ist.

5.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Analyse der epidermalen Nervenfaserdichte bei Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik ($8,2 \pm 4,9$ Jahre, $n = 15$) ergab eine signifikante Abnahme der Innervationsdichte mit zunehmenden Alter.

In einer Kohorte von Patient*innen mit Schmerzsymptomatik ($14,2 \pm 3,9$ Jahre, $n = 26$) wurde bei 50% eine Grunderkrankung, welche zur Schädigung der SF führen könnte (metabolischer, autoimmuner und genetischer Ursache), gefunden. Es zeigte sich eine reduzierte END bei 50% sowie eine reduzierte SND bei 55% der Patientin*innen, wobei keine Korrelation der morphometrischen Daten mit Schmerzlokalisierung (distal vs. diffus) oder der Krankheitsdauer vorlag.

Bei einem Kind mit der Stoffwechselerkrankung Morbus Pompe konnte mit grenzwertig-reduzierten Werten der epidermalen sowie sudomotorischen Nervenfaserdichte eine Beteiligung der SF im Krankheitsgeschehen nachgewiesen werden.

6 Diskussion

6.1 Ergebnisdiskussion

6.1.1 Die kleinen Nervenfasern bei Kindern und Jugendlichen ohne Schmerzsymptomatik

Die Hautstanzbiopsie stellt eine valide Möglichkeit zur Diagnose einer SFN dar (Devigili et al., 2019). Um eine Aussage über die Verminderung der durch eine Hautstanzbiopsie bestimmten Werte treffen zu können, wurden bei Erwachsenen anhand von zahlreichen Studien mit großen Gruppen gesunder Individuen Referenzwerte publiziert, welche eine physiologische altersabhängige Verminderung der END zeigen (Lauria et al., 2010a; Provitera et al., 2016; Collongues et al., 2018). Bisher sind für Kinder und Jugendliche nur zwei Studien zur Untersuchung gesunder Proband*innen mit geringen Fallzahlen publiziert (McArthur et al., 1998; Panoutsopoulou et al., 2015). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die END und SND von 15 Kindern und Jugendlichen ohne Schmerzsymptomatik untersucht.

6.1.1.1 END

In der Kohorte mit proximal entnommener Hautprobe konnte eine signifikante Reduktion der END mit zunehmendem Alter festgestellt werden. Zudem konnten wir erstmals die Hautbiopsien von ganz jungen Proband*innen auswerten, wobei die Jüngste ein halbes Jahr alt war. Unsere Daten sind in Übereinstimmung mit Studien von McArthur et al. (1998) und Panoutsopoulou et al. (2015), welche ebenfalls einen inversen Zusammenhang von Alter und END beschreiben, der sich in den multizentrischen Referenzstudien für über 18-Jährige fortsetzt. Zusätzlich zeigten McArthur et al. (1998) und Panoutsopoulou et al. (2015) Unterschiede der END in Abhängigkeit von der Lokalisation der Hautstanzbiopsie. So ergaben sich höhere END-Werte für proximale (am Oberschenkel) Biopsien verglichen mit distalen vom Unterschenkel entnommenen. Diese waren mit Mittelwerten von $31,6 \pm 13,2$ Fasern/mm ($n = 8$) bzw. $39,1 \pm 3,0$ Fasern/mm ($n = 20$) höher als die in dieser Arbeit präsentierten Werte ($20,2 \pm 6,9$ Fasern/mm, $n = 15$). Allerdings wurde die Auswertung bei McArthur et al. (1998) nicht wie in dieser Arbeit mit Immunfluoreszenzmikroskopie, sondern lichtmikroskopisch durchgeführt, was abweichende Werte hervorbringen kann (Lauria et al., 2010b). Hinzu kommt, dass in beiden Studien weniger Schnitte pro Biopsie ausgewertet wurden als in dieser Arbeit, was eine gewisse Abweichung der Ergebnisse erklären könnte.

6.1.1.2 SND

Ein Einfluss des Alters auf die sudomotorische Innervation wurde bisher in keiner Studie sowohl für das Kindes- als auch das Erwachsenenalter - konkordant zur END - systematisch und mit großen Fallzahlen analysiert. Verglichen mit der Arbeit von Gibbons et al. (2009), auf der die verwendete Auswertung der SND basiert, ergaben sich ähnliche Mittelwerte zwischen der hier untersuchten Kohorte (SND $46 \pm 5,4\%$, Fläche der Schweißdrüsen $0,075 \pm 0,03 \text{ mm}^2$) und der Kohorte mit gesunden Proband*innen von Gibbons et al. für proximale Hautbiopsien (SND $46,6 \pm 13,2\%$, Fläche der Schweißdrüsen $0,066 \pm 0,04 \text{ mm}^2$). Allerdings sind die Untersuchten bei Gibbons et al. mit im Mittel 34 ± 9 Jahren deutlich älter. Wenn die Vergleichbarkeit der Methoden angenommen wird, was durch ähnliche Innervationsmuster und Größen der Schweißdrüsen möglich ist, deuten unsere Daten darauf hin, dass die Schweißdrüseninnervation keine Altersabhängige Veränderung aufweist, was ebenfalls bei Gibbons et al. (2009) gezeigt wurde. Daten aus anderen Studien, allerdings mit unterschiedlicher Methodik zur Analyse der sudomotorischen Innervation, zeigen ähnliche Befunde (Dabby et al., 2007; Luo et al., 2011; Liu et al., 2015). Eine Korrelation zwischen END und SND konnte in den analysierten Daten der Kinder und Jugendlichen ohne Schmerzsymptomatik nicht gefunden werden, welche bei gesunden Erwachsenen beschrieben wird (Gibbons et al., 2009). Dies könnte auf die geringe Zahl an analysierten Schweißdrüsen zurückzuführen sein.

Dadurch, dass eine Hautstanzbiopsie trotz geringer Komplikationen eine invasive Methodik darstellt, wäre es ethisch fragwürdig, Kontrollbiopsien bei gesunden Kindern durchzuführen. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie Hautproben von nicht-gesunden Kindern und Jugendlichen einbezogen, die zusammen mit Muskelbiopsien am Oberschenkel entnommen wurden. Die Muskelbiopsien dienten zur Diagnostik von Erkrankungen, die keine Beteiligung der SF vermuten ließen. Hierbei wäre sowohl eine größere Stichprobe hilfreich gewesen, als auch Biopsien vom distalen Unterschenkel, um die Daten der Kohorte mit und ohne Schmerzsymptomatik besser vergleichen zu können.

Wir hatten im Rahmen der Studie versucht, distale Hautbiopsien von jüngeren Proband*innen zu bekommen, welche am Bein z.B. im Rahmen einer orthopädischen Operation hätten entnommen können. Dies ist leider nicht umsetzbar gewesen.

Die Ergebnisse unsere Studie zeigen, dass es auch im Kindes- und Jugendalter einen Zusammenhang zwischen epidermaler Innervation und Alter gibt und daher Referenzwerte für jüngere Patient*innen dringend erforderlich sind.

6.1.2 Beteiligung kleinen Nervenfasern bei Kindern und Jugendlichen mit Schmerzsymptomatik

Eine pathologische Veränderung der kleinen somatosensorischen und autonomen Nervenfasern kann bei verschiedenen Grunderkrankungen aber auch idiopathisch auftreten, und führt häufig zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität z.B. aufgrund der anhalten Schmerzsymptomatik betroffener Personen vom Kindes- bis ins Erwachsenenalter (Bakkers et al., 2014; Voortman et al., 2017; MacDonald et al., 2019). Eine rasche Diagnose und damit eine entsprechende Therapie bleibt vielen Patient*innen oft lange verwehrt (Oaklander und Nolano, 2019). Die bisher publizierten Studien zu einer Beteiligung der SF bei juvenilen Patient*innen mit Schmerzen beziehen sich auf Fallbeispiele mit geringen Stichproben (Wakamoto et al., 1999; Nolano et al., 2000; Hoeijmakers et al., 2016; Kafaie et al., 2017; Breton et al., 2018; Shinkarevsky Fleitman et al., 2020) oder die Hautbiopsien wurden entnommen als die Patient*innen größtenteils bereits erwachsen waren und die klinischen Daten retrospektiv erhoben (Oaklander und Klein, 2013). In allen angeführten Studien wurde die epidermale Innervation untersucht, wohingegen lediglich eine Fallstudie (n = 1) eine morphologische Veränderung der Schweißdrüseninnervation analysiert (Nolano et al., 2000). Insgesamt zeigen die Studien einen Zusammenhang zwischen der Schmerzsymptomatik und einer Verminderung der ENF und weiteren Symptomen wie Erythromelalgie, Fatigue oder autonomen Beschwerden (postprandiales Erbrechen, Hypohidrose u.a.). Eine zugrundeliegende Ätiologie der SF-Beteiligung konnte nur bei der Hälfte der Patient*innen identifiziert werden, wobei der größte Anteil autoimmune Genese war. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die epidermale sowie die sudomotorische Innervation anhand von Hautstanzbiopsien bei Kindern und Jugendlichen mit chronischen Schmerzen unklarer Ursache untersucht, diese mit den erhobenen klinischen Daten korreliert und im Rahmen dessen eine mögliche Ätiologie der SF-Beteiligung diskutiert werden. In unserer Studie wurde die bis dato größte Anzahl an Hautbiopsien von Kindern und Jugendlichen mit schmerzen unklarer Genese im Vergleich zu bereits publizierten Arbeiten analysiert (n = 26).

6.1.2.1 END

Die Untersuchungen zeigten eine reduzierte epidermale Nervenfaserdichte in etwa bei der Hälfte der Patient*innen (zusätzlich waren 35% grenzwertig-reduziert), von denen aber nur wenige eine stark reduzierte END (<3 Fasern/mm) aufwiesen. Dies steht in Übereinstimmung mit den Daten anderer Arbeitsgruppen (Wakamoto et al., 1999; Oaklander und Klein, 2013; Hoeijmakers et al., 2016; Kafaie et al., 2017). Allerdings bezie-

hen sich die in den Studien angelegten Grenzwerte auf den 5%-Cut-off-Wert von Referenzgruppen >18 Jahre (Lauria et al., 2010a; Provitera et al., 2016; Collongues et al., 2018), da END-Normwerte für unter 18-Jährige nicht vorliegen. Eine Korrelation zwischen Alter und END unserer Stichprobe konnte ausgeschlossen werden, wodurch eine Verminderung der END nicht auf das zunehmende Alter der Untersuchten zurückzuführen ist, wie es für die Kohorte ohne Schmerzen beschrieben wurde. Aufgrund der Korrelation aus Alter und END in unserer proximalen Gruppe sowie den bereits zuvor genannten Ergebnissen von McArthur et al. (1998) und Panoutsopoulou et al. (2015) wurden die oben genannten Referenzwerte in dieser Arbeit angenommen.

Neben der Hautstanzbiopsie können die Messung der kornealen Innervation und die Durchführung einer QST weitere Möglichkeiten zur Untersuchung der SF sein, welche aufgrund ihrer Non-Invasivität eine Alternative bei Kindern und Jugendlichen darstellen (Karlsson et al., 2015; Devigili et al., 2019). Allerdings standen beide Verfahren in den an dieser Studie teilnehmenden Zentren nicht zur Verfügung. Darüber hinaus sind bisher keine Normwerte für die korneale Innervation für jüngere Proband*innen etabliert (Terkelsen et al., 2017).

In unserer Untersuchungskohorte konnte kein Zusammenhang zwischen Dauer der Schmerzsymptomatik und Höhe der END-Reduktion gefunden werden. Diesbezüglich bietet die Patientin mit einer Krankheitsdauer von 13 Jahren zwar eine stark reduzierte END, eine andere Patientin aber ebenfalls eine reduzierte END bei nur einem halben Jahr Schmerzhistorie. In der Literatur ist beschrieben, dass die epidermale Nervenfaserdichte mit der Krankheitsdauer korrelieren kann, allerdings eher bei Erkrankungen, die seltener bei Kindern und Jugendlichen vorkommen wie der Amyloid-Neuropathie oder der diabetischen Neuropathie (Shun et al., 2004; Divisova et al., 2016; Masuda et al., 2017). Interessanterweise ist bei einer 17-jährigen Patientin ein Diabetes mellitus Typ 1 diagnostiziert. Obwohl die subjektive Schmerzsymptomatik erst sechs Monate vor Biopsie auftrat, kann eine frühere Schädigung der SF und somit möglicherweise eine beginnende Reduktion der END bei einigen Betroffenen schon vor Symptombeginn möglich sein (Shun et al., 2004; Bonhof et al., 2017; Määttä et al., 2019) oder sich zeitlich zunächst an unterschiedlicher Lokalität manifestieren (Ziegler et al., 2014).

Aufgrund der Tatsache, dass bei 50% der Patient*innen die END reduziert war (zusätzlich 35% grenzwertig-reduziert), kann vermutet werden, dass die SF-Schädigung in Zusammenhang mit der Schmerzsymptomatik steht. Ob eine Korrelation zwischen Höhe der END-Reduktion und der Schmerzsymptomatik vorliegt, wird in der Literatur diskutiert, aber eher als nicht gegeben angesehen (Sorensen et al., 2006; Gibbons et al.,

2009; Lauria et al., 2010b; Truini et al., 2014; Bonhof et al., 2017). Trotzdem muss hierbei vermutlich eine Differenzierung in der Art der (neuropathischen) Schmerzen und der Befunde der Hautbiopsie vorgenommen werden. Truini et al. (2014) verweisen auf eine höhere Nervenfaserdichte bei Patient*innen mit provozierbaren Beschwerden (z.B. mechanische Allodynie) als bei Betroffenen mit eher konstanten, nichtprovozierten Schmerzen, was mit einer geminderten mechanischen Reizschwelle der entsprechenden Schmerzrezeptoren zusammenhängen könnte. Die Autor*innen diskutieren zusätzlich, dass es bei konstanten, brennenden Schmerzen womöglich zu spontanen Überreaktionen der C-Fasern kommt. Somit würde eine Veränderung der ENF zwar in Zusammenhang mit den zum Teil gefundenen neuropathischen Schmerzen stehen, die präsentierte Klinik aber nicht linear erklären.

Nach einer Läsion kommt es zu sekundären Veränderung mit einer hohen Plastizität in den involvierten Strukturen des schmerzwahrnehmenden Systems, die von den Schmerzrezeptoren bis zum Gehirn reichen. So kommt es beispielsweise zu funktionellen und strukturellen Veränderung auf Rückenmarksebene, welche von Bedeutung für die Chronifizierung der Schmerzen sind, die primär durch eine Läsion in den Axonen oder den Nervenkörpern der SF im DRG induziert wurden (Rohini, 2017). Darüber hinaus unterliegen die SF einer kontinuierlichen Anpassung an die Krankheitsumstände (Martínez-Martínez et al., 2011; Bonhof et al., 2017) und adaptieren sich z.B. bei Diabetes mellitus an eine veränderte Einstellung der Blutglukose (Luo et al., 2012; Liu et al., 2015; Timar et al., 2016) oder nehmen unter Enzymersatztherapie bei Morbus Fabry wieder zu (Üçeyler et al., 2011). So könnte auch der Nutzen einer immunmodulatorischen Therapie auf den Verlauf der SF-Schädigung untersucht werden, da sowohl bei Kindern als auch Erwachsenen festgestellt wurde, dass die Patient*innen unter Therapie bei autoimmunbedingter SFN eine Remission zeigten (Oaklander und Klein, 2013; Devigili et al., 2019; Shinkarevsky Fleitman et al., 2020) und sich zumindest die Symptomatik bei einigen unserer Patient*innen durch die immunmodulatorische Therapie besserte.

Zusätzliche Marker wie das GAP-43 (engl. „*growth associated protein 43*“), das eine Regeneration der epidermalen Nervenfasern abbildet, könnten anhand einer Hautbiopsie bestimmt werden (Narayanaswamy et al., 2012; Üçeyler et al., 2013). Unter dem Gesichtspunkt, dass wie oben beschrieben der Verlust an ENF wahrscheinlich nicht linear die vorherrschende Klinik abbildet, wären weitere Parameter zur Beschreibung z.B. funktioneller Veränderungen interessant. Hierbei könnte z.B. die Bestimmung von funktionellen Reizschwellen an den Rezeptoren der SF relevant sein (Nielson Hoberg et al., 2019). Eine Regeneration der ENF zeigt sich außerdem mit einer Verminderung der Schmerzen

(Sommer und Lauria, 2007). Interessanterweise lässt sich ein (vollständiger) Verlust der epidermalen Nervenfasern einerseits beispielsweise bei Patient*innen mit einem genetisch-bedingtem Ausfall der Schmerzempfindung (z.B. HSAN-Typ IV) (Nolano et al., 2000) sowie andererseits bei Patient*innen mit chronischen neuropathischen Schmerzen feststellen (Devigili et al., 2008). Zusätzlich sind Erkrankungen beschrieben, wie z.B. Morbus Pompe (Hobson-Webb et al., 2015) oder ALS (Dalla Bella et al., 2016), bei denen Schmerzen nicht das initiale Symptom sind, aber eine Verminderung der ENF zeigen und eher als Kleinfaserpathologie denn als Kleinfaserneuropathie bezeichnet werden müssen (Üçeyler, 2016). Dies ist ebenfalls bei unserem untersuchten Kind mit IOPD der Fall.

Zwei Drittel unserer Patient*innen gaben eine Medikation mit Schmerzmitteln an. Bei nur sieben Patient*innen waren Angaben zur VAS verfügbar, wobei alle mindestens eine mittlere Schmerzstärke vorgaben. Beides könnte auf eine deutliche Beeinträchtigung der Lebensqualität aufgrund der Schmerzen schließen lassen. So wurden die Schmerzen bei einer Patientin mit deutlich reduzierter END als sehr ausgeprägt beschrieben (VAS 9/10), was zu Schlafproblemen und regelmäßiger Schmerzmitteleinnahme führte. Andererseits wurde von einigen Patient*innen berichtet, dass sie Schmerzmittel nehmen und eine VAS von 7-8/10 vorliegt, die END aber nicht-reduziert war. Anhand der vorliegenden Daten kann somit keine abschließende Aussage darüber getroffen werden, ob es einen Zusammenhang zwischen Schmerzintensität und Reduktion der END gibt. Außerdem sind weitere Mechanismen bei der Schmerzentstehung und der präsentierten Symptome relevant als ein reiner Verlust an SF (Oaklander und Nolano, 2019).

Die Schädigung der SF und somit die entsprechenden Symptome können sich mit distaler (längenabhängig) und diffus-generalisierter (nicht-längenabhängig) Ausprägung äußern. In dieser Arbeit konnte kein Unterschied zwischen der epidermalen Innervation der Gruppen mit distaler Schmerzsymptomatik und diffus über den Körper verteilter Symptomatik auch bezüglich der Ausprägung der Symptomatik festgestellt werden. Hinsichtlich der Klinik wurde in anderen Arbeiten eine stärkere Ausprägung der Schmerzen in der Gruppe mit längenabhängiger Schädigung gefunden (Üçeyler et al., 2010). Andererseits ist beschrieben, dass beide Ausprägungsformen einer SF-Schädigung rein anhand klinischer Symptome schwer zu differenzieren sind, wodurch eine Beurteilung über den Vergleich einer distalen und einer proximalen Hautbiopsie weiterhelfen könnte und in aktuellen Publikationen empfohlen wird (Khoshnoodi et al., 2016; Provitiera et al., 2018). Dies wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Chan & Wilder-Smith (2016) beschreiben in einer Übersichtsarbeit, dass in der nicht-längenabhängigen Variante eher Frauen als Männer betroffen sind, die Symptome bei den Betroffenen im Durchschnitt

mit einem geringeren Alter einsetzen und häufiger Juckreiz sowie Allodynie beschrieben werden als bei der längenabhängigen Form. Die Daten beziehen sich jedoch lediglich auf Erwachsene, Vergleichsarbeiten zwischen Kindern und Erwachsenen liegen nicht vor. In unserer Kohorte gaben fast ein Drittel der Patient*innen eine diffuse als nicht klassisch distal-symmetrisch zu wertende Symptomatik an. Die Ergebnisse decken sich mit einer Fallserie bei Erwachsenen (Gemignani et al., 2010). Dagegen zeigten tendenziell weniger Patient*innen mit diffuser Schmerzausbreitung eine brennende Schmerzsymptomatik oder hatten ein RLS als die Gruppe mit längenabhängigen Schmerzen. In unserer Arbeit konnte dies nicht gezeigt werden. Eine klinische und pathologische Unterscheidung beider Ausprägungsformen ist insofern von Relevanz, als dass sich Pathomechanismus und Ätiologie unterscheiden können. Bei der nicht-längenabhängigen SFN liegt die Schädigung nicht im Axon, sondern in den Zellkörpern der Spinalganglion (DRG). Hier sind die Kapillaren gefenestert und anfälliger für den Einfluss von Infektionen, Inflammation und Toxinen (Hsu et al., 2017). Außerdem führen z.B. paraneoplastische Einflüsse zu Autoantikörperbildung und schließlich zur Schädigung der Zellkörper. Dadurch ist eine Ursachenforschung und entsprechende Therapie unabdingbar (Gorson et al., 2008; Oaklander und Nolano, 2019, E4).

Interessanterweise ist in der Literatur beschrieben, dass Fatigue und eine verminderte körperliche Leistungsfähigkeit in Zusammenhang mit einer SFN stehen (Oaklander und Nolano, 2019, E3). In dieser Arbeit zeigten rund die Hälfte der Untersuchten mit Schmerzsymptomatik eine Muskelschwäche oder eine herabgesetzte Toleranz gegenüber körperlicher Belastung, von denen wiederum 50% eine reduzierte sowie 35% eine zumindest grenzwertig-reduzierte END aufwiesen. Vier von sechs Patient*innen mit der Angabe einer gesteigerten Erschöpfbarkeit (Fatigue) - auch unabhängig von einer vermehrten körperlichen Belastung - zeigten reduzierte END-Werte. Als Pathomechanismus könnte dahinterstehen, dass arteriovenöse Anastomosen im Skelettmuskel durch die SF-Schädigung denervieren und dilatieren. Dadurch kommt es unter Umgehung des Kapillarbettts zu einer Shunt-Bildung zwischen Arteriolen und Venolen, wodurch die Muskelfasern unterversorgt werden und eine lokale Hypoxie gefördert wird (Albrecht et al., 2013; Dori et al., 2015; Oaklander und Nolano, 2019, E3). Damit vereinbar ist, dass 39% unserer Patient*innen körperliche Anstrengung als Trigger für die Schmerzen beschreiben. Aufgrund des eben beschriebenen Mechanismus könnte sich so die Versorgung der peripheren Nerven zu Gunsten der Muskulatur unter Belastung reduzieren und Schmerzen aufgrund der lokalen Hypoxie an den Nervenendigungen oder den Zellkörpern hervorrufen (Oaklander und Nolano, 2019, E3). Zudem ist die Kontraktilität der Ka-

pazitätsgefäße des menschlichen Körpers (große Venen) durch die SF-Schädigung beeinträchtigt, was zu einer verminderten Auswurfleistung des Herzens führt und die periphere Perfusion schwächt (Oaklander und Nolano, 2019, E3).

6.1.2.2 SND

In den letzten Jahren hat das Interesse an einer Untersuchung des autonomen Nervensystems als wichtigen Manifestationsort einer SFN stark zugenommen. Eine Schädigung im sudomotorischen System bildet dabei laut Literatur den sensitivsten Marker ab (Minota et al., 2019, S. 453).

Die vorliegende Arbeit ist die erste, welche die Schweißdrüseninnervation von Kindern und Jugendlichen an einer größeren Stichprobe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 64% der Untersuchten mit autonomer Symptomatik eine Reduktion der sudomotorischen Nervenfaserdichte aufwiesen, zusätzlich zeigten 31% eine grenzwertige Reduktion.

Die hier verwendete Einteilung der Reduktion bezieht sich wie die Methodik der SND-Auswertung auf die Arbeit bzw. auf die Ergebnisse von Gibbons et al. (2009). Im Hinblick auf die Auswertung der SND sind zurzeit keine alters- und geschlechtsspezifischen Normwerte beschrieben. Anders als bei der END wurde bislang kein Einfluss des Alters auf die SND bei erwachsenen, gesunden Kontrollen gefunden (Dabby et al., 2007; Gibbons et al., 2009; Liu et al., 2015), was mit unseren Daten aus der Kohorte der Proband*innen ohne Schmerzen übereinstimmt. Dadurch haben wir die hier festgelegten Grenzwerte für eine Reduktion der SND angenommen. Die Untersuchung einer größeren Kohorte von gesunden Proband*innen <20 Jahre könnte weiteren Aufschluss darüber geben.

In der Literatur sind eine Reihe an Möglichkeiten publiziert, eine Quantifizierung der Schweißdrüseninnervation vorzunehmen, es gibt aber noch keine Standardmethodik analog zur Untersuchung der END (Minota et al., 2019). Die in dieser Arbeit verwendete Methodik von Gibbons et al. (2009) ist ohne großen technischen Aufwand, mithilfe von Immunfluoreszenzfärbung und eines entsprechenden Fluoreszenzmikroskops, sowie der Software ImageJ reproduzierbar auszuwerten gewesen. Auf der anderen Seite ist die manuell-quantitative Auszählung der SND mit einem erheblichen zeitlichen Aufwand von ca. 45-60 Minuten pro Hautbiopsie aufgrund des mehrstufigen Vorgehens verbunden und so schwer in der Routinediagnostik umzusetzen. Automatisierte Herangehensweisen mit konfokaler Mikroskopie und 3D-Rekonstruktion scheinen nach neuesten Arbeiten der manuellen Auszählung im zeitlichen Aufwand und womöglich auch in der Präzision der Erkennung von Nervenfasern überlegen zu sein (Gibbons et al., 2010; Minota

et al., 2019). Allerdings erfordert eine automatisierte Auszählung der SND einen größeren technischen und finanziellen Aufwand.

Neben der Methode der Quantifizierung spielen auch die gewählten Antikörper und die damit verfolgten Zielstrukturen eine Rolle. Als Antikörper zur Darstellung der Schweißdrüseninnervation wurde in dieser Arbeit der pan-axonale Antikörper PGP 9.5 gewählt, welcher bereits in der Auswertung der END eingesetzt wurde. Somit könnte ein möglicher Aufwand für den Einsatz in der Routinediagnostik einer SFN ohne weitere Färbungen geringer gehalten werden (Donadio und Liguori, 2011). Da PGP 9.5 ein genereller neuronaler Marker ist, kann keine Unterscheidung in spezifische Subtypen (cholinerg, adrenerg oder peptiderg) gemacht werden, wozu weitere Antikörper z.B. gegen VIP, D β H oder Substanz P nötig wären (Uno, 1977; Thompson et al., 1983; Rydh et al., 1989; Kennedy et al., 1994; Donadio et al., 2006; Donadio und Liguori, 2011). PGP 9.5 soll dabei eher von struktureller Bedeutung für die Schweißdrüsen sein und z.B. VIP, was in einem Großteil der PGP 9.5-positiven Fasern vertreten ist, vielmehr von funktioneller Relevanz und bei Erkrankungen, welche die Schweißdrüsen betreffen, früher involviert sein (Nolano et al., 2006; Chao et al., 2015). So waren VIP-positive Nervenfasern in Schweißdrüsen stärker vermindert bei Diabetes mellitus (Liu et al., 2015), FAP (Chao et al., 2015) oder dem Ross-Syndrom (Nolano et al., 2006) als PGP 9.5-positiven Fasern. Laut Liu et al. (2015) sollen VIP-positive Fasern eine Neuropathie mit autonomer Beteiligung sensitiver abbilden. Folglich wird in dieser Arbeit vielmehr eine strukturelle als eine funktionelle Aussage zur Situation der Schweißdrüsen und damit dem autonomen Nervensystem getroffen.

Unsere Ergebnisse verdeutlichen die Beteiligung autonomer SF bei jungen Patient*innen mit SFN und entsprechender Symptomatik. Cook-Norris et al. (2012) führten zwar keine Hautstanzbiopsie zur Analyse des autonomen Nervensystems durch, konnten aber in einem Test zur Funktion der Schweißdrüsen (Axon-Reflex-Test) eine Schädigung der autonomen SF bei kindlicher Erythromelalgie mit Schmerzsymptomatik insbesondere in den Füßen feststellen. Bezüglich der histopathologischen Untersuchung des autonomen Nervensystems bei Kindern und Jugendlichen liegt bislang nur eine Fallstudie zu einem 10-jährigen Mädchen mit einer HSAN-Typ-IV vor, welches kein Schmerz sowie Temperaturempfinden zum Zeitpunkt der Biopsie aufwies. Neben einer fehlenden Innervierung der Epidermis konnten in den Schweißdrüsen ebenfalls keine Nervenfasern nachgewiesen werden (Nolano et al., 2000). Bei Oaklander und Klein (2013) zeigten 98% der Patient*innen autonome Symptome und ein Großteil hatte auffällige Ergebnisse in Funktionstests des autonomen Nervensystems (z.B. verminderte Schweißproduktion bei 83% der Patient*innen). In unserer Studie gaben 69% der Untersuchten autonome

Symptome an, von denen 95% mindestens eine grenzwertig-reduzierte SND aufwiesen. Studien von Erwachsenen stützen die Korrelation von morphologischer bzw. funktionaler Analyse der Schweißdrüsen sowie ihrer Innervation und autonomer Symptome (Gibbons et al., 2009; Luo et al., 2011; Liu et al., 2015). Dies spricht für eine Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit bereits publizierten und hebt die klinische Relevanz einer Testung der Schweißdrüseninnervation hervor.

Ein Vorteil z.B. der nicht-invasiven Analyse der Schweißdrüsenfunktion ist, dass wie bei der Thermoregulatorischen Schweißtestung (TST) sowohl post- als auch präganglionäre Fasern untersucht werden können, die SND dies alleine nicht differenzieren kann. Allerdings unterliegen die funktionellen Tests einer Reihe an Einflussfaktoren wie der Umgebungstemperatur, dem Hydratationsstatus der Untersuchten und eingenommenen Medikamente und sind nicht in allen Kliniken vorhanden (Illigens und Gibbons, 2009, S. 6). Ferner bringt die funktionelle Untersuchung sowohl einen deutlich größeren zeitlichen als auch einen größeren apparativen Aufwand mit sich und die Geräte sind nur in spezialisierten Kliniken verfügbar (Siepmann et al., 2014). Wie oben bereits beschrieben, könnten aber auch andere Antikörper als PGP 9.5 (z.B. VIP) einen funktionellen Anhalt über die Schweißdrüsen anhand einer Hautstanzbiopsie geben.

In dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen Krankheitsdauer und SND-Reduktion gefunden werden. Für eine Korrelation zwischen Denervierung und Krankheitsdauer sind unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur - meist im Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 2 - beschrieben. Einerseits wurden Veränderungen in der Schweißdrüseninnervation im mittleren bis späten Stadium einer diabetischen Neuropathie beobachtet (Kennedy und Wendelschafer-Crabb, 1996; Shun et al., 2004), andererseits wurde in anderen Studien keine Korrelation gefunden (Luo et al., 2012; Liu et al., 2015). Ferner wurde beschrieben, dass es zu einer frühen Schädigung der parasympathischen und sympathischen C-Fasern bei Diabetes mellitus kommt, die allerdings auch andere Systeme als die Schweißdrüsen betreffen können (Freccero et al., 2004; Jin et al., 2015, S. 463). So können die SF bereits vor dem klinischen Auftreten des Metabolischen Syndroms betroffen sein (Terkelsen et al., 2017). Anhand unserer Patientin mit Diabetes mellitus Typ 1 konnte dies nicht verifiziert werden, da keine Schweißdrüsen in der Hautbiopsie zu finden waren und somit eine Analyse der SND entfiel. Bei einem Patienten mit einer Schmerzgeschichte von zwei Monaten wurde eine grenzwertig-reduzierte SND gemessen, die END lag aber im Normbereich. Somit kann geschlussfolgert werden, dass hier die Schädigung der autonomen SF früher aufgetreten ist, als die der somatosensorischen, was in der Literatur bei Erwachsenen mit Morbus Parkinson (Dabby et al., 2006) oder mit Diabetes mellitus Typ 2 (Liu et al., 2015) nachgewiesen wurde. Auf der anderen

Seite wird z.B. für Morbus Fabry die Hypothese aufgestellt, dass es wie oben bereits beschrieben, bei dieser Erkrankung vielmehr zu einer selektiven Schädigung der nicht-autonomen A δ -Fasern kommt, wodurch autonome Funktionen der C-Fasern länger aufrecht erhalten bleiben können (Biegstraaten et al., 2012).

Ein Drittel unserer Patient*innen gaben Bauchschmerzen in ihrer Krankheitsgeschichte an. Fünf von diesen wiesen eine reduzierte oder zumindest grenzwertig-reduzierte SND auf (bei zwei Patient*innen konnten keine Schweißdrüsen analysiert werden). Pathophysiologisch könnte dahinter eine neuropathische Fehlregulation der sympathischen und parasympathischen Nervenfasern des Magen-Darm-Trakts bzw. ein Verlust an enterischen SF stehen, was klinisch als gastrointestinale Angina bezeichnet wird (Selim et al., 2010; Oaklander und Nolano, 2019, A4). Möglicherweise kann die Untersuchung der SND dies abbilden, was allerdings aufgrund der geringen Fallzahl nicht abschließend geklärt werden konnte.

Die Analyse der Daten ergab keine signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern END und SND, welche im Gegensatz dazu bei Erwachsenen mit Diabetes mellitus Typ 2 gefunden wurde (Gibbons et al., 2009). Eine Erklärung für die divergierenden Ergebnisse könnte sein, dass bei sechs Patient*innen keine Schweißdrüsen analysierbar waren und somit die Stichprobe zu klein gewesen sein könnte. Darüber hinaus ist ein Einfluss der zugrundeliegenden Erkrankung und damit womöglich einer anderen Pathogenese der SF-Schädigung nicht auszuschließen. Zudem scheint die Regeneration autonomer Nervenfasern rascher fortzuschreiten als die somatosensorischer Fasern (Gibbons et al., 2010; Vinik et al., 2013a, S. 521). Auch die C- und A δ -Fasern besitzen eine unterschiedliche Plastizität, was eine jeweilige Untersuchung von autonomen und somatosensorischen Fasern vorteilhaft macht (Gibbons et al., 2009).

In der Literatur ist beschrieben, dass neben der Reduktion der Innervation auch morphologische Veränderung an den Schweißdrüsen beobachtet werden können. Dabei nehmen die Schweißdrüsen z.B. auch an Größe im Krankheitsverlauf ab (Loavenbruck et al., 2014; Liu et al., 2015), betten sich so vermehrt in umliegendes Fettgewebe ein oder die Innervierung verändert sich nicht nur quantitativ, sondern wird ungleichmäßiger und die Fasern nehmen an Umfang zu (Kennedy et al., 1994; Dabby et al., 2007; Gibbons et al., 2009; Loavenbruck et al., 2014). Diese Punkte wurden in dieser Arbeit nicht dezidiert untersucht. Eine Analyse im Vergleich zu einer Kontrollgruppe und/oder im zeitlichen Verlauf der Erkrankungen wären hierbei vorteilhaft gewesen. Allerdings konnte ein häufiges Ablösen von Schweißdrüsen aus der Dermis durch den Färbeprozess der Proben

beobachtet werden. Dies könnte durchaus auf eine morphologische Veränderung zurückzuführen sein, da z.B. ein vermehrtes Einbetten in das umliegende Fettgewebe ein fragileres Gewebe hervorbringen könnte (Loavenbruck et al., 2014).

Die Daten deuten insgesamt darauf hin, dass eine SF-Schädigung auch vor Beginn der Schmerzsymptomatik auftreten kann und der entsprechende Pathomechanismus, der Ort der primären Schädigung sowie die Grunderkrankungen dies beeinflussen. Eine Untersuchung der SND kann somit auch bei Kindern und Jugendlichen als hilfreiche Möglichkeit zur Bestimmung der Beteiligung des autonomen Nervensystems im Krankheitsgeschehen beurteilt werden.

6.1.3 Ätiologie der Beteiligung der kleinen Nervenfasern bei Kindern und Jugendlichen mit Schmerzsymptomatik

Die Ätiologie einer SFN bzw. einer Schädigung der SF ist sehr heterogen. Durch zunehmende Forschung in den letzten Jahren, welche die Genese und Ausprägung einer SF-Schädigung betraf, konnten fortlaufend weitere pathophysiologische Mechanismen insbesondere bei Erwachsenen identifiziert werden (Cazzato und Lauria, 2017). Eine richtige Diagnose ist dabei unabdingbar für die Therapieentscheidung (Terkelsen et al., 2017, S. 942). Unsere Daten und Ergebnisse anderer Studien deuten auf einen Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der zugrundeliegenden Ätiologie im Alter hin. So macht beispielsweise die Patient*innengruppe mit Diabetes mellitus Typ 2 (Hoffman et al., 2015) einen weitaus größeren Anteil bei Erwachsenen aus als bei Kindern und Jugendlichen, wo eher autoimmune Prozesse überwiegen (Oaklander und Klein, 2013; Kafaie et al., 2017; Breton et al., 2018; Shinkarevsky Fleitman et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit wurden bei den meisten Patient*innen ausführliche Untersuchungen zur Klärung der Beschwerden durchgeführt. Eine wahrscheinlich zugrundeliegende Genese der SF-Schädigung konnte bei 50% der hier Untersuchten gefunden werden. Bei einem Kind wurde ein Diabetes mellitus Typ 1 diagnostiziert und als größten Anteil in sechs Patient*innen eine autoimmune Genese (unspezifische Titer-Erhöhung, post-infektiös, LEMS) festgestellt. In Studien an überwiegend älteren Kindern machten autoimmune Gründe, wie in unseren Daten, den größten Anteil an Patient*innen aus (Oaklander et al., 2013; Kafaie et al., 2017). Ein wichtiger Bereich in der Ursachendiagnostik einer SF-Beteiligung ist die Detektion hereditärer Ursachen, wie z.B. der Natriumkanalmutationen oder des Morbus Fabry, da sich hierfür neue Therapieansätze in der Entwicklung befinden (Oaklander und Nolano, 2019) bzw. bei Morbus Fabry eine Enzymersatztherapie eingeleitet werden kann (Ranieri et al., 2016). Bei dem jüngsten Kind unserer Kohorte (3,5 Jahre) konnte hingegen eine hereditäre Erkrankung mit Mutation im TRPA1-Gen festgestellt werden. Bei 13 Patient*innen muss die SF-Beteiligung als idiopathisch klassifiziert werden.

Bei der Patientin mit Diabetes mellitus Typ 1 war die END reduziert und eine Beteiligung der großen Nervenfasern konnte über die Messung der Nervenleitgeschwindigkeiten zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen werden. Reduzierte END-Werte wurden auch in zwei anderen Studien mit jungen Diabetes-Patient*innen beschrieben (Oaklander und Klein, 2013; Hoeijmakers et al., 2016). Eine diabetische Neuropathie stellt die häufigste Komplikation eines Diabetes mellitus dar (Vinik et al., 2013b, S. 747). Neben den kleinen somatosensorischen Nervenfasern können auch solche des autonomen Nervensystems

und im Verlauf größere Nervenfasern des sensorischen und motorischen Systems betroffen sein (Jin et al., 2015, S. 461). Bei der Patientin konnten keine Schweißdrüsen in der Hautbiopsie gefunden werden, wodurch keine Aussage über die Beteiligung der autonomen SF bei dieser Patientin getroffen werden kann. Die Pathophysiologie einer diabetischen Neuropathie ist überaus heterogen und beläuft sich u.a. auf metabolische (Glykosylierung von Proteinen, oxidativer Stress), autoimmune (Antikörperbildung), sowie mikrovaskuläre (Endothelschäden) Faktoren (Vinik et al., 2013b, S. 749). Daneben kann aber auch eine zu rasche Senkung des HbA_{1c} zu neuropathischen Schmerzen führen (Gibbons und Freeman, 2015).

Zusätzliche Blutuntersuchungen mit erhöhten Werten für immunologische Marker wie Antinukleäre-Antikörper (ANA) oder dem Rheumafaktor (Rf) lassen eine unspezifische autoimmune Genese in fünf Patient*innen des Untersuchungskollektivs vermuten. Dies steht in Zusammenhang mit anderen Studien, die autoimmune Mechanismen als Grund für die SF-Schädigung bei einem wesentlichen Teil betroffener Kinder und Jugendlicher ansahen und eine Immuntherapie bei diesen als wirkungsvoll beschrieben (Oaklander und Klein, 2013; Kafaie et al., 2017; Liu et al., 2018; Shinkarevsky Fleitman et al., 2020). Außerdem legen Untersuchungen nahe, dass Infektionen (Oaklander und Klein, 2013; Kafaie et al., 2017) und z.B. auch Impfungen (Kafaie et al., 2016; Schofield und Hendrickson, 2018) autoimmune Neuropathien und somit eine SF-Schädigung erzeugen können. Zwei unserer Patient*innen beschrieben einen Beginn der Symptome z.B. nach Influenza-Infektion. In der Literatur sind zahlreiche Mechanismen beschrieben, wie das Immunsystem Einfluss auf das Schmerzempfinden (hemmend und fördernd) und strukturelle Elemente (Sensitivierung von Schmerzrezeptoren etc.) nimmt (Ren und Dubner, 2010; Malcangio, 2019).

Bei einer Patientin unserer Kohorte wurde ein Lambert-Eaton-Myasthenie Syndrom (LEMS) mit einer Xp11.22-p11.23 Duplikation diagnostiziert (Verbeek et al., 2014). Klinisch wurden distal-dominierende Schmerzen beobachtet mit einer häufigen Induktion durch Kälte. Zudem zeigten sich END und SND in der Analyse der Hautstanzbiopsie reduziert. Bei dem LEMS richten sich Autoantikörper gegen spannungsabhängige Calcium-Kanäle an der motorischen Endplatte, was zu einer Abnahme der Ausschüttung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt und somit zur schlechteren Reizweiterleitung an der motorischen Endplatte führt (Wirtz et al., 2003). Es wird vermutet, dass die Xp11.22-p11.23 Duplikation mit einem autoimmunem Geschehen einhergeht, was für die Autoantikörperbildung bei dieser Patientin verantwortlich zu sein scheint und nicht wie häufig mit einer paraneoplastische Genese einhergeht (Verbeek et al., 2014). In der duplizierten Genregion ist u.a. der Transkriptionsfaktor *FOXP3* vertreten, welcher von

regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und zur Reifung und Funktion dieser beiträgt (Invernizzi et al., 2009; Bending und Ono, 2019). Nach immunsuppressiver Therapie mit Prednison zeigte sich eine Besserung der Beschwerden. Somit kann bei dieser Patientin die Genese ebenfalls als autoimmun-vermittelt bezeichnet werden.

In dieser Arbeit wurde bei 24% der Patient*innen eine Erythromelalgie mit Schmerzen, und Rötungen an den Händen oder Füßen festgestellt. Familiär gehäufte Mutationen im SCN9A-Gen, welches für die spannungsabhängigen Natriumkanäle (NaV_{1.7}) im DRG und sympathischen Ganglionen kodiert, sind mit dieser Erkrankung und SF-Schädigung assoziiert (Faber et al., 2012a), können zusätzlich episodisch vorkommende neuropathische Schmerzen hervorrufen und je nach Unterform der Mutation mit erheblichen autonomen Symptomen einhergehen (Han et al., 2012). Eine ursächliche Mutation im SCN9A-Gen konnten wir nicht nachweisen. Bei allen Patient*innen wurde eine verminderte END sowie SND gemessen, was mit Ergebnissen von Cook-Norris et al. (2012) vergleichbar ist. Ferner wurden bei drei Viertel der Patient*innen autonome Beschwerden wie Verstopfung, Dysphagie oder abdominelle Schmerzen beschrieben. Erythromelalgie kann womöglich auch unabhängig der primären Form einer SCN9A-Mutation auftreten, was in einer Studie an vier Kindern mit Familiärem Mittelmeerfieber und Morbus Behcet gezeigt wurde (Shinkarevsky Fleitman et al., 2020). Morales et al. (2012) vermuteten bei einem neunjährigen Jungen mit starkem Brennen in Händen und Füßen sowie einer voranschreitenden Rötung und Überwärmung der betroffenen Stellen eine autoimmune Genese der Beschwerden, da sich die Symptomatik durch antientzündliche Therapie mit Kortikosteroiden deutlich besserte. Ergebnisse einer älteren Fallstudie stützen die Beobachtung (Paticoff et al., 2007). Die zuvor genannte Patientin mit einem LEMS zeigte klinisch ebenfalls eine Erythromelalgie. Eine Therapie mit Kortikosteroiden führte zur Remission der Beschwerden, was die These von autoimmunen Prozessen als mögliche Ursache einer Erythromelalgie stützen würde.

Eine seltene Gain-of-Function Mutation im Gen für die TRPA1-Unterform von Schmerzrezeptoren wurde bei einer achtjährigen Patientin nachgewiesen, bei der die Schmerzsymptomatik 3,5 Jahre zuvor begann. In der Literatur ist bislang nur ein Fall mit TRPA1-Mutation und neuropathischen Schmerzen beschrieben (Kremeyer et al., 2010). Dort wurden normale QST-Werte gemessen, aber keine Hautstanzbiopsie durchgeführt. Generell ist der TRPA1-Rezeptor im peripheren und zentralen Nervensystem vorhanden und für die Schmerzwahrnehmung, -weiterleitung, und -modellierung von Bedeutung (Malek et al., 2015, S. 1; Weyer-Menkhoff et al., 2019). Laut Kremeyer et al. (2010) führt die „Gain-of-function“-Mutation im TRPA1-Rezeptor zu einer verstärkten Empfindlichkeit gegenüber Reizen, z.B. durch verminderte Membranpotentiale. Die Empfindlichkeit ist

demnach z.B. bei Müdigkeit, Kälte, Wärme oder Fasten gesteigert (Obata et al., 2005). Bei der achtjährigen Patientin werden die Schmerzen ebenfalls bei kalten Umgebungstemperaturen vermehrt hervorgerufen.

Bei einer Patientin wurden eine Mikrodeletion auf der Chromosomenregion 1q21.1 und eine Mikroduplikation bei Xq24 festgestellt. Klinisch zeigten sich deutliche, diffus verteilte unspezifische Schmerzen mit Bauchschmerzen und einer raschen geistigen und körperlichen Erschöpfbarkeit. Die morphometrischen Analysen ergaben verminderte Werte für END und SND. Hinsichtlich des Phänotyps der Patientin liegen keine Angaben diesbezüglich vor. Bei beiden festgestellten Chromosomenveränderungen kann es zu phänotypischen Veränderungen (z.B. vergrößerter Kopfumfang und weitere Dysmorphiezeichen), mentaler/motorischer Entwicklungsverzögerung oder psychiatrischen Auffälligkeiten (Autismus, Angststörungen u.a.) kommen (Priest et al., 1995; Brunetti-Pierri et al., 2008; Bernier et al., 2016). Interessanterweise ist bei der Mutation am X-Chromosom (Xq24) eine motorisch-sensorische Neuropathie beschrieben (Priest et al., 1995), die als Unterform einer Charcot-Marie-Tooth Erkrankung Typ 2 (CMT2) gewertet werden kann (Gemignani und Marbini, 2001). Aufgrund fehlender weiterer Untersuchungen liegen keine Daten bezüglich einer möglichen Diagnose einer CMT2 vor.

Die Strümpell-Lorrain-Krankheit, auch Hereditäre Spastische Paraplegie genannt, welche bei einem Patienten diagnostiziert wurde, stellt eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen mit zahlreichen Formen und klinischen Erscheinungsbildern dar (Kara et al., 2016). Bei einigen Untergruppen ist eine periphere Neuropathie beschrieben (Erfanian Omidvar et al., 2019; Toft et al., 2019). In einer Studie von Toft et al. (2019) wurden pathologische Veränderungen der kleinen Nervenfasern (Schmerz- und Temperaturempfinden), aber auch teilweise bei den großen Fasern (Vibrationsempfinden) mittels QST festgestellt. Der Patient zeigte seit ca. zwei Monaten neuropathisch erscheinende Schmerzen (kribbelnd mit diffuser Lokalisation), es konnte aber keine Verminderung der END und nur eine grenzwertig-reduzierte SND festgestellt werden, was auf eine beginnende Schädigung autonomer SF schließen lassen könnte.

Zusätzlich wurden drei Patient*innen mit der Diagnose eines hereditären Charcot-Marie-Tooth Syndroms (CMT) in diese Arbeit aufgenommen. Grundsätzlich wird die CMT als neuromuskuläre Erkrankung bezeichnet und in eine demyelinisierende (CMT1) sowie in eine axonale Form (CMT2) eingeteilt (Reilly et al., 2011), wobei sich beide Formen nochmal in verschiedene Untergruppen mit entsprechenden Mutationsformen und entsprechender Klinik unterteilen lassen (Gemignani und Marbini, 2001; Murphy et al., 2012). Die CMT1A mit PMP22-Duplikation, wie sie bei einem Patienten zu finden ist, scheint

dabei die häufigste Unterform zu sein (Murphy et al., 2012). Die anderen beiden Patient*innen wurden mit CMT2 klassifiziert. Die Betroffenen berichteten von ungewöhnlich starken Schmerzen und z.T. deutlichen autonomen Beschwerden. Die END sowie SND zeigten sich grenzwertig-reduziert bis reduziert. Auch andere Studien zeigten, dass Schmerzen und eine Beteiligung der SF nicht selten bei CMT sind (Tavakoli et al., 2012; Laurà et al., 2014) und in Bezug zueinander stehen (Pazzaglia et al., 2010). Die Leitsymptomatik bezieht sich allerdings eher auf einer Schädigung der großen Nervenfasern (Atrophie von Skelettmuskulatur, Deformitäten z.B. ein Spitzfuß, vermindertes Vibrationsempfinden) (Murphy et al., 2012), was bei den hier präsentierten Patient*innen durch auffällige neurophysiologische Tests sichtbar wurde und es können auch nicht-schmerzhafte Formen vorliegen (Pazzaglia et al., 2010). Somit kann die CMT-Erkrankung aufgrund der Beteiligung von großen peripheren Nerven nicht als SFN im klassischen Sinne bezeichnet werden, sondern es besteht eine Beteiligung der SF.

In dieser Arbeit wurde bei 50% der untersuchten Patient*innen keine Ursache der Symptomatik gefunden, wodurch die SF-Schädigung als idiopathisch bezeichnet werden kann. Die Bezeichnung kann gewählt werden, wenn sich nach umfangreichen klinischen und labortechnischen Untersuchungen keine Ursache finden ließ (Cazzato und Lauria, 2017). Die Identifikation neuer Gene, die erst im Verlauf durchgeführte Analyse autoimmuner Faktoren oder eine zunächst nicht festgestellte, prädiabetische Stoffwechsellage können zu einer späteren Identifikation der Ätiologie führen. In der Literatur wird dann der Begriff einer initial-idiopathischen SFN (iiSFN) verwendet (Oaklander und Nolano, 2019). Leider wurden in unserer Studie keine „*Follow-Up*“-Untersuchungen durchgeführt. Mit einer Studiendauer von ca. drei Jahren und den retrospektiv erhobenen klinischen Daten wurde dennoch eine ausführliche Diagnostik vorgenommen.

6.1.4 Kleinfaserpathologie am Beispiel eines Kindes mit Morbus Pompe

In Abgrenzung zur SFN wurde in den letzten Jahren der Begriff Kleinfaserpathologie (SFP) geprägt, bei der eine Schädigung der SF zu finden ist, klinisch aber eine Reihe an schmerzhaften und nicht-schmerzhaften Erkrankungen dahinterstehen können, die nicht mit den klassischen Kriterien für die Diagnose einer SFN zu beschreiben sind (Üçeyler, 2016). Interessanterweise besitzen einige Erkrankungen, die primär als zentral-nervös eingestuft wurden, zusätzlich eine Beteiligung der SF und somit des PNS wie z.B. bei ALS oder Morbus Parkinson und darüber hinaus wurde dies auch für einzelne lysosomale Erkrankungen wie Morbus Pompe beschrieben (Nolano et al., 2008; Weis et al., 2011; Hobson-Webb et al., 2015). In dieser Arbeit sollte ein Kind mit der Diagnose eines juvenilen Morbus Pompe (IOPD) als Beispiel für die Ätiologie einer SFP vorgestellt werden.

Einzelne Beschreibungen weisen darauf hin, dass es bei Patient*innen mit Morbus Pompe möglicherweise zu einer Verminderung der epidermalen SF kommt. Eine reduzierte END wurde bislang in zwei Patient*innen mit einem im Erwachsenenalter begonnenen Morbus Pompe (engl. „*late onset Pompe disease*“, LOPD) beschrieben (Hobson-Webb et al., 2015). Darüber hinaus deutete die Auswertung von SFN-Screening-Fragebögen bei 50% der Untersuchten in dieser Studie auf eine SFN-Symptomatik hin. Insbesondere Patient*innen mit LOPD geben Schmerzen an, die sich häufig nicht weiter charakterisieren lassen, was in einer Kohortenstudie mit 124 LOPD-Patient*innen gezeigt werden konnte, von denen 45% eine regelmäßige, aber eher milde Schmerzsymptomatik äußerten (Güngör et al., 2013).

Wir hatten die Möglichkeit, die Hautbiopsie eines Kindes mit IOPD zu untersuchen und konnten zeigen, dass es bei dem 7,5-jährigen Kind unter ERT mit rekombinanter GAA zu einer Verminderung der somatosensorischen und autonomen peripheren Nervenfasern kam. Zudem wurde bei dem Patienten ein geringer Verlust an myelinisierten und unmyelinisierten Fasern in einer Nervenbiopsie und eine Myopathie in einer Muskelbiopsie festgestellt. Letztere ist eher für die zunehmende Muskelschwäche des Patienten verantwortlich zu machen als die Veränderungen am peripheren Nerv oder dem Zentralnervensystem. Es konnten nur geringe Glykogenanreicherungen in Schwann-Zellen des biopsierten N. suralis sowie keine Veränderung der Myelinscheiden nachgewiesen werden, was auf eine Axondegeneration durch Glykogenspeicherung im DRG hinsichtlich der Genese der Neuropathie schließen lassen würde. Dies konnte bereits in Mausmodellen zu der Erkrankung aufgezeigt werden (Sidman et al., 2008; Hordeaux et al., 2017).

Auf der anderen Seite waren bei unserem Patienten Glykogenablagerungen in den arteriellen Gefäßwänden am N. suralis zu sehen, woraus die Hypothese aufgestellt werden könnte, dass es durch die Ablagerungen zur lokalen Hypoxie und schließlich zu einer axonalen Schädigung mit längenabhängiger SFP kommt. Eine zusätzliche proximale Hautbiopsie wäre hilfreich gewesen, um eine morphologische Differenzierung in eine längenabhängige oder eine nicht-längenabhängige Ausprägung der SF-Schädigung vorzunehmen und auf den Ort der Schädigung rückschließen zu können. In Fallstudien mit einem zweijährigen Mädchen mit IOPD (Burrow et al., 2010) und fünf Erwachsenen mit LOPD (Lamartine S Monteiro und Remiche, 2019) war die nervale Schädigung ferner axonal bedingt und nicht demyelinisierend. Andere Studien zeigten hingegen eine demyelinisierende PNP mit Glykogenanreicherung in Schwannzellen peripherer Nerven (Pena et al., 2015) und demyelinisierende Prozesse in GAA-Knock-out Mäusen (Falk et al., 2015), sowie eine Einlagerung von Glykogen in Schwann-Zellen peripherer Nerven bei autopsierten Patient*innen mit LOPD (Hobson-Webb et al., 2012).

Ein Einfluss der Krankheitsdauer sowie der Dauer der ERT auf die Ausprägung der SF-Beteiligung bei Morbus Pompe wurde nicht untersucht, was z.B. durch zusätzliche Hautbiopsien im Zeitverlauf möglich gewesen wäre (MacDonald et al., 2019). Dadurch kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die gefundene SF-Beteiligung beispielsweise durch die ERT abgemildert oder verstärkt wurde. Die ERT kann die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren (Ebbink et al., 2018). Hingegen deuten Untersuchungen an Patient*innen mit Morbus Fabry unter ERT darauf hin, dass die peripheren Anteile der Nerven für eine ERT zugänglich sind, da es zu Verbesserungen der Temperaturwahrnehmung und Schweißproduktion unter Therapie kam (Schiffmann et al., 2003). Daten an LOPD-Patient*innen weisen jedoch darauf hin, dass die Dauer der ERT mit einer zunehmenden Symptomatik hinsichtlich einer SF-Schädigung korreliert (Hobson-Webb et al., 2015).

6.2 Methodendiskussion und Limitationen

In dieser Arbeit wurde die Methode der Immunfluoreszenzfärbung (IF) zur Darstellung der kleinen Nervenfasern gewählt. In diversen Studien wurde gezeigt, dass aber auch eine immunhistochemische Anfärbung (IH) der Hautbiopsie eine valide Möglichkeit zur Visualisierung der dermalen und epidermalen Nervenfasern darstellt (Lauria et al., 2010b). Die Art der Darstellung hat keinen Effekt auf die Reliabilität sowie die diagnostische Effizienz der Methodik (Lauria und Devigili, 2007; Nolano et al., 2015), dennoch ist beschrieben, dass die Immunfluoreszenz eine höhere Auflösung der Nervenfasern bietet und somit eine etwas bessere Sensitivität ermöglicht (Nolano et al., 2015). So liegen die Referenzwerte für gesunde Proband*innen bei der IF höher als bei der IH (Provitera et al., 2016; Lauria et al., 2010a).

In der Literatur sind ferner eine Reihe an weiteren Parametern zur Bewertung des Zustandes der kleinen Nervenfasern - sowohl für die epidermalen Nervenfasern (z.B. axonale Auftreibungen, Länge der ENF) als auch für die Schweißdrüsen innervierenden Nervenfasern (z.B. ungleichmäßigere Innervation, Umfangszunahme der SF) - beschrieben (Lauria et al., 2010b; Loavenbruck et al., 2014; Cheung et al., 2015; Karlsson et al., 2015). In dieser Arbeit wurde durch die Analyse der END und SND nur eine rein quantitativ-morphometrische Beschreibung der Nervenfasern vorgenommen. Die Betrachtung weiterer morphologischer Veränderungen könnte in nachfolgenden Untersuchungen zusätzliche Informationen über den Zustand der SF bieten, ist aber aufgrund der zum Teil nur qualitativen Beschreibung und durch fehlende einheitliche Kriterien subjektiver Natur und zudem zusätzlich zeitintensiv.

Insbesondere aufgrund des hohen Zeitaufwandes der manuellen Analyse der END und SND wurde in den letzten Jahren nach Methoden gesucht, die Auswertungen zu beschleunigen und zu automatisieren, was zu einer effizienteren Anwendung in der klinische Diagnostik führen könnte (Bergwerf et al., 2019). Diesbezügliche, aktuelle Ansätze wurden mit Verfahren des „*Deep-Learnings*“ zur automatisierten Analyse der epidermalen Nervenfaserdichte (Bergwerf et al., 2019) und computergestützten Vorgehensweisen für die SND (Minota et al., 2019) beschrieben. Automatisierte Herangehensweisen mit konfokaler Mikroskopie und 3D-Rekonstruktion scheinen nach neuesten Arbeiten der manuellen Auszählung im zeitlichen Aufwand und womöglich auch in der Präzision der Erkennung von Nervenfasern überlegen zu sein (Gibbons et al., 2010; Minota et al., 2019; Bergwerf et al., 2019).

Die Färbung der Hautbiopsien erfolgte in sogenannter „*Free-Floating*“-Methode, bei der die Schnitte in Pufferflüssigkeit und mit den zugesetzten Antikörpern in kleinen Näpfchen

schwimmen. Die jeweiligen Antikörper und Pufferlösungen werden zu- und abpipettiert, wodurch die Hautschnitte in Mitleidenschaft gezogen werden können. Dies kann insbesondere die Schweißdrüsen betreffen, da diese eingebettet in das subkutane Fettgewebe am dermal-epidermalen Übergang liegen und sich leicht durch den Färbeprozess ablösen können. Dies ist sicherlich auch eine Erklärung dafür, dass bei sechs Proben keine Schweißdrüsen bzw. zu wenige für die Analyse zu finden waren. Hier wäre möglicherweise ein schonenderes pipettieren von Vorteil gewesen. Da die Auswertung der SND zusammen mit der END erfolgen sollte, stellte eine „*On-Slide*“-Technik keine Alternative dar, da die „*Free-Floating*“-Methode zur Analyse der END empfohlen wird und es nur unzureichende Daten zur „*On-Slide*“-Methode gibt (Nolano et al., 2015). Hinsichtlich der Untersuchung der Schweißdrüsen wurde, wie bereits erwähnt, mit Antikörpern gegen PGP 9.5 eher eine strukturelle Untersuchung der Schweißdrüseninnervation durchgeführt statt einer funktionellen. Dies hätte mit der Anwendung weiterer Antikörper (z.B. VIP) untersucht werden können (Liu et al., 2015).

Die klinischen Daten wurden in dieser Arbeit retrospektiv analysiert und standardisierte Fragebögen/Klassifikationen zur Erfassung der Schmerzsymptomatik und der Beschwerden, die das autonome Nervensystem betreffen, waren nicht verfügbar. Außerdem wurden keine standardisierten Untersuchungen, z.B. eine QST, durchgeführt, um klinische Zeichen einer SFN (z.B. Allodynie oder Stärke der Schmerzempfindung) zu verifizieren. Dies wäre hilfreich gewesen, um die morphometrischen Ergebnisse der END und SND in einen differenzierteren, statistischen Zusammenhang mit einzelnen Punkten der klinischen Symptomatik/klinischen Zeichen setzen zu können.

Bei den Patient*innen mit Schmerzsymptomatik wurden lediglich Biopsien von distaler Lokalisation entnommen. Interessant wäre ein Vergleich der distalen Werte mit proximalen, die vom Oberschenkel entnommen wurden (z.B. bei den Patient*innen mit diffuser Schmerzverteilung) oder dem Patienten mit Morbus Pompe gewesen. Dies würde eine Einteilung in längenabhängige und nicht-längenabhängige SFN ermöglichen und Hinweise auf den Ursprung der SF-Schädigung geben (distale Axone vs. DRG) (Gemignani et al., 2010). Aus ethischen Gesichtspunkten wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet. Wir konnten zwar keinen Zusammenhang zwischen Krankheitsdauer und END oder SND schon allein aufgrund der kleinen Stichprobe feststellen; trotzdem ist nicht auszuschließen, dass z.B. bei den 35% der Patient*innen mit grenzwertig-reduzierter END diese im weiteren Verlauf abnimmt, was eine Analyse von „*Follow-up*“-Biopsien ermöglichen könnte (MacDonald et al., 2019).

6.3 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die kleinen somatosensorischen und autonomen Nervenfasern in Hautstanzbiopsien von Kindern und Jugendlichen mit und ohne chronische Schmerzen sowie Symptomen des autonomen Nervensystems untersucht. In rund 50% der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik konnte eine verminderte Anzahl an somatosensorischen als auch autonomen Fasern gefunden werden, die in Zusammenhang mit der klinisch präsentierten Symptomatik stehen. Die Daten verdeutlichen einen diagnostischen Nutzen der Hautbiopsie bei Betroffenen mit unklaren Schmerzbeschwerden und Symptomen, die das autonome Nervensystem betreffen. Dadurch sollte eine SFN bei Kindern und Jugendlichen mit chronischen Schmerzen differenzialdiagnostisch erwogen werden. Weiterführende Diagnostik hinsichtlich der individuellen Genese und der anschließenden Einleitung einer entsprechenden Therapie ist dabei insbesondere für eine langfristige Prognose des Krankheitsverlaufs von großer Bedeutung. Darüber hinaus ist es wichtig, z.B. für die Altersgruppe ausgelegte Schmerzfragebögen einzusetzen, um die Diagnose im Kontext der Hautstanzbiopsie valider betrachten und die Schmerzsymptome und die entsprechende Klinik besser charakterisieren zu können. Eine SFN-Diagnose bedeutet ferner zusätzlich eine Polyneuropathie abzuklären, da dort neben den kleinen Nervenfasern auch die Großen betroffen sein können, was zu zusätzlichen Komorbiditäten führen kann. In weiteren Studien mit größerer Proband*innenzahl sollten altersabhängige Referenzwerte für gesunde Kinder und Jugendliche im Hinblick auf die hier untersuchten Parameter gefunden und die Schädigung der kleinen Nervenfasern in größeren Kohorten Betroffener untersucht werden. So kann eine bessere Einordnung von Studienergebnissen, aber auch von den Messwerten einzelner Patient*innen in der Routinediagnostik für Kinder und Jugendliche gelingen.

7 Zusammenfassung

Eine pathologische Veränderung der kleinen somatosensorischen und autonomen Nervenfasern (engl.: „*small fiber*“, SF) kann zu neuropathisch-sensorischen Krankheitszeichen (brennende Schmerzen, Parästhesien, u.a.), autonomen Symptomen (Hyperhidrose, Schwindel, Verstopfung u.a.) und weiteren unspezifischen Beschwerden (Fatigue u.a.) führen. Dies bringt häufig eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität betroffener Personen vom Kindes- bis zum Erwachsenenalter mit sich. Bei vielen Patient*innen ist die Diagnose oft schwierig und damit eine gute Therapie meist nicht möglich. Im Erwachsenenalter ist die Analyse der epidermalen Nervenfasern an einer Hautbiopsie eine etablierte Methode zur Diagnose einer Pathologie der SF und es gibt etablierte Normwerte für Proband*innen > 20 Jahre. Für Kinder und Jugendliche dagegen liegen nur wenige Studien bezüglich einer histopathologischen Analyse der SF in Zusammenschau mit der klinischen Symptomatik sowie einer möglichen Ätiologie vor. Normwerte sind bislang nicht publiziert.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob in Hautbiopsien von 26 Kindern und Jugendlichen mit ungeklärter Schmerzsymptomatik (7 - 20 Jahre) die epidermale Nervenfaserdichte (END) und die Schweißdrüseninnervationsdichte (SND) pathologisch verändert waren und eine Korrelation der Ergebnisse mit den klinischen Daten bestand. Nach unserem Wissen ist dies die bisher größte untersuchte Kohorte mit dieser Fragestellung. Darüber hinaus wurden bei 15 Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik (7 Monate - 19 Jahre) die END und SND hinsichtlich einer altersabhängigen Verminderung analysiert. Ferner wurde bei einem 7,5 Jahre alten Kind mit der Diagnose einer angeborenen Muskelerkrankung (Juveniler Morbus Pompe, IOPD) die Fragestellung untersucht, ob das periphere Nervensystem - also die SF - bei dieser Erkrankung mitbetroffen ist.

Bei 50% der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik zeigte sich eine reduzierte END, sowie bei 55% eine reduzierte SND, wobei keine Korrelation mit der Schmerzlokalisierung oder der Krankheitsdauer vorlag. Eine Ätiologie der SF-Schädigung wurde bei 50% gefunden. Dazu zählten hereditäre, metabolische und größtenteils autoimmune Erkrankungen. Die Analyse der END bei den Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik zeigte eine signifikante Abnahme der END mit zunehmendem Alter. Bei dem Kind mit IOPD konnte eine Beteiligung der SF und somit des peripheren Nervensystems nachgewiesen werden. Unsere Daten verdeutlichen zusammenfassend einen diagnostischen Nutzen der Hautstanzbiopsie bei Kindern und Jugendlichen mit unklaren Schmerzbeschwerden sowie Symptomen, die das autonome Nervensystem betreffen, und eine Notwendigkeit von Normwerten für die hier untersuchten Parameter in dieser Altersgruppe.

8 Summary

A damage of the small somatosensory and autonomic nerve fibers (SF) can lead to neuropathic (e.g. burning/prickling pain, paraesthesia, allodynia), autonomic (e.g. hyperhidrosis, dizziness, constipation, diarrhoea), and other unspecific symptoms (e.g. fatigue, restless-leg syndrome). This often results in an impaired daily life of infant and adult patients. Diagnosing an SF impairment and to treat the symptoms and the underlying disease is often difficult. In adults, the analysis of epidermal nerve fibers from a skin punch biopsy provides an established method to diagnose an SF pathology. Normative values are available in patients >20 years of age, but not for younger patients. However, there is only a small number of studies undergoing a histopathologic analysis in correlation with clinical presentation and possible aetiologies of the SF damage in children.

Aim of this study was to examine the epidermal nerve fiber density (END) and sudomotor nerve fiber density (SND) from skin biopsies of 26 children and adolescents (aging 7 to 20 years) with pain of unknown origin. The results were compared with clinical data. To the best of our knowledge, this is the largest cohort of young patients where skin biopsies were performed. Above, skin biopsies of 15 subjects without a history of pain aging 7 months to 19 years were analysed considering an age-dependency of END and SND. Additional, in a 7.5-year old child with an innate muscle disease (infantile-onset Pompe disease, IOPD), we examined, if the peripheral nervous system, hence the SF, was also affected.

In our patients, END was reduced in 50% and SND in 55%. No correlation was found between morphometric data and localisation or duration of pain. An underlying aetiology of the SF damage was found in 50% of the patients mostly with autoimmune diseases, but also hereditary or metabolic causes were found. There was a significant reduction of END with increasing age in young subjects without pain. Considering the child with IOPD, lowered values for END and SND were found, which highlights an involvement of the peripheral nervous system in the pathogenesis of the disease.

Our data emphasize a diagnostic benefit of skin biopsies in children and adolescents with pain of unknown origin and symptoms affecting the autonomic nervous system. Reference values for healthy controls younger than 20 years of age are needed.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AFT	Autonome Funktionstestung, engl. „autonomic function testing“
AK	Antikörper
AOI	Interessensgebiet, engl.: „ <i>area of interest</i> “
bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
BZ	Blutzucker
Ca ²⁺	Calcium
Caspr	<i>Contactin associated protein 1</i>
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
COL6A5	Kollagen Typ VI, alpha 5
DβH	Dopaminbetahydroxylase
DRG	Dorsalwurzelganglion, engl.: „ <i>dorsal root ganglion</i> “
EFNS/PNS Guidelines	<i>European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society</i>
END	epidermale Nervenfaserdichte
ENF	epidermale Nervenfasern
ERT	Enzyersatztherapie
HSAN IV	Hereditäre sensorische und autonome Neuropathie Typ IV
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IH	Immunhistochemie
IOPD	infantiler Morbus Pompe, engl.: „ <i>infantile onset Pompe disease</i> “
k.A.	keine Angabe
LF	großkalibrige Nervenfasern, engl. „ <i>large fiber</i> “
LFN	Großfaserneuropathie, engl.: „ <i>large fiber neuropathy</i> “
M.	Musculus
MBP	Myelin-basisches Protein
mdNB	myelinisierte dermale Nervenbündel
MEFV	Mutationsspektrum bei familiärem Mittelmeerfieber
MR	Mechanorezeptoren
N.	Nervus
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NO	Stickstoffmonoxid
OEX	Obere Extremität
PFA	Paraformaldehyd

PGP 9.5	<i>Protein-Gen-Produkt 9.5</i>
PNP	Polyneuropathie
QST	Quantitativ-sensorische Testung
RLS	Restless-Leg-Syndrom
s.c.	subkutan
SCNxA	Neuroendokriner Natriumkanal Nr. X
SF	kleine Nervenfasern, engl.: „ <i>small fiber</i> “
SFN	Kleinfaserneuropathie, engl.: „ <i>small fiber neuropathy</i> “
SFP	Kleinfaserpathologie, engl.: „ <i>small fiber pathology</i> “
SND	Schweißdrüseninnervationsdichte, sudomotorische Nervenfaserdichte, engl.: „ <i>sudomotor nerve fiber density</i> “
SP	Substanz P
TRPA1	<i>Transient receptor potential ankyrin 1</i>
TS-HDS	Trisulfatiertes Disaccharid Ido-A2S-GlcNS-6S
TST	Thermoregulatorische Schweißtestung
UEX	Untere Extremität
VAS	Visuelle Analog Skala
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut	7
Abbildung 2: Die kleinen Nervenfasern in der Kutis	8
Abbildung 3: Darstellung einer in der Tiefe der Dermis liegenden Schweißdrüse	10
Abbildung 4: Endstück einer Schweißdrüse	11
Abbildung 5: Schematischer Ablauf der Probengewinnung und Weiterverarbeitung	31
Abbildung 6: Hautstanzbiopsie am distalen Unterschenkel	33
Abbildung 7: Epidermale Nervenfasern mit Darstellung der Basalmembran	35
Abbildung 8: Standardisiertes Raster in ImageJ zur Auswertung der Schweißdrüseninnervationsdichte	38
Abbildung 9: Darstellung der dermalen myelinisierten und unmyelinisierten Nervenfasern	42
Abbildung 10: Regeln zur Bestimmung der epidermalen Nervenfaserdichte	43
Abbildung 11: Messung der Länge der Epidermis	44
Abbildung 12: Berechnung der epidermalen Nervenfaserdichte	44
Abbildung 13: Schema zur Auswertung der Schweißdrüseninnervation	46
Abbildung 14: Regeln zur Bestimmung der Schweißdrüseninnervation	47
Abbildung 15: Berechnung der sudomotorischen Nervenfaserdichte (SND)	47
Abbildung 16: Zusammenhang von END und Alter bei Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik	53
Abbildung 17: Analyse der SND	54
Abbildung 18: Grad der Verminderung der END bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik	67
Abbildung 19: Zusammenhang zwischen END und Alter sowie Schmerzdauer bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik	68
Abbildung 20: Darstellung der PGP 9.5-positiven epidermalen Nervenfasern bei einer Patientin mit reduzierter END	69
Abbildung 21: Grad der Verminderung der SND bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik	70
Abbildung 22: Zusammenhang zwischen SND und Alter sowie Schmerzdauer bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik	71
Abbildung 23: Zusammenhang von SND und END bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik	72
Abbildung 24: Darstellung der Schweißdrüseninnervation	72
Abbildung 25: Defekte Schweißdrüse am Übergang zur Kutis	73

Abbildung 26: END und SND eines 7,5-jährigen Kindes mit Morbus Pompe nach 6,5 Jahren Enzymersatztherapie	77
Abbildung 27: Vorgehen zur Skalierung von metrischen Verhältnissen in Pixel	132

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Fallstudien zur histopathologischen Untersuchung der kleinen Nervenfasern bei Kindern und Jugendlichen mit Schmerzsymptomatik.....	2
Tabelle 2: Darstellung der unterschiedlichen Nervenfasertypen in der menschlichen Haut	9
Tabelle 3: Ursachen einer SFN im Kindes- und Jugendalter als auch im Erwachsenenalter.....	16
Tabelle 4: Ursachen einer SFP im Kindes- und Jugendalter als auch im Erwachsenenalter.....	18
Tabelle 5: Neuropathische Symptome und klinische Zeichen einer SFN.....	21
Tabelle 6: Autonome Symptome einer SFN	22
Tabelle 7: Weitere mögliche Symptome einer SFN	22
Tabelle 8: "Besta-Kriterien" zur Diagnose einer Kleinfaserneuropathie	23
Tabelle 9: Publierte Referenzwerte der END bei gesunden Erwachsenen der Altersgruppe 18-29 Jahre.....	27
Tabelle 10: END-Werte von gesunden Kindern und Jugendlichen.....	28
Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Primärantikörper	36
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Sekundärantikörper	37
Tabelle 13: Myelinisierung bei Patient*innen mit Schmerzsymptomatik.....	40
Tabelle 14: Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung der Untersuchungsparameter	49
Tabelle 15: Zusammenfassung des Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizienten und p-Werte der einzelnen Berechnungen.....	50
Tabelle 16: Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik mit proximaler Hautbiopsie	51
Tabelle 17: END und SND in proximalen Hautbiopsien bei Proband*innen ohne Schmerzsymptomatik (NP)	52
Tabelle 18: Zusammenfassung der klinischen Daten der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik.....	55
Tabelle 19: Klinische Daten der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik	57
Tabelle 20: Zusammenfassung der END und SND der Patient*innen mit Schmerzsymptomatik (P)	66

12 Literaturverzeichnis

- Abad F, Díaz-Gómez NM, Rodríguez I, Pérez R, Delgado JA (2002) Subclinical pain and thermal sensory dysfunction in children and adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 19:827–831
- Achenbach RK (2004) Hyperhidrosis. Physiologisches und krankhaftes Schwitzen in Diagnose und Therapie ; mit 63 Tabellen. Steinkopff: Darmstadt
- Albrecht PJ, Hou Q, Argoff CE, Storey JR, Wymer JP, Rice FL (2013) Excessive peptidergic sensory innervation of cutaneous arteriole-venule shunts (AVS) in the palmar glabrous skin of fibromyalgia patients: implications for widespread deep tissue pain and fatigue. *Pain Med* 14:895–915
- Amano T, Shitara Y, Fujii N, Inoue Y, Kondo N (2017) Evidence for β -adrenergic modulation of sweating during incremental exercise in habitually trained males. *J Appl Physiol* 123:182–189
- Araújo AP, Nascimento OJ, Garcia OS (2000) Distal sensory polyneuropathy in a cohort of HIV-infected children over five years of age. *Pediatrics* 106:E35
- Ari Koivisto, Antti Pertovaara (2013) Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ion channel in the pathophysiology of peripheral diabetic neuropathy. *Scand J Pain* 4:129–136
- Atherton DD, Taherzadeh O, Elliot D, Anand P (2008) Age-dependent development of chronic neuropathic pain, allodynia and sensory recovery after upper limb nerve injury in children. *J Hand Surg Eur Vol* 33:186–191
- Baker LB (2019) Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature (Austin)* 6:211–259
- Bakkers M, Faber CG, Hoeijmakers JGJ, Lauria G, Merkies ISJ (2014) Small fibers, large impact. Quality of life in small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 49:329–336
- Bakkers M, Merkies ISJ, Lauria G, Devigili G, Penza P, Lombardi R, Hermans MCE, van Nes SI, Baets M de, Faber CG (2009) Intraepidermal nerve fiber density and its application in sarcoidosis. *Neurology* 73:1142–1148
- Bay LB, Denzler I, Durand C, Eiroa H, Frabasil J, Fainboim A, Maxit C, Schenone A, Specola N (2019) Infantile-onset Pompe disease: Diagnosis and management. *Arch Argent Pediatr* 117:271–278

- Bending D, Ono M (2019) From stability to dynamics: understanding molecular mechanisms of regulatory T cells through Foxp3 transcriptional dynamics. *Clin Exp Immunol* 197:14–23
- Bennett DLH, Woods CG (2014) Painful and painless channelopathies. *Lancet Neurol* 13:587–599
- Bergwerf H, Bechakra M, Smal I, Jongen JLM, Meijering E (2019) Nerve Fiber Segmentation in Bright-Field Microscopy Images of Skin Biopsies Using Deep Learning 2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019), 232–235
- Bernier R, Steinman KJ, Reilly B, Wallace AS, Sherr EH, Pojman N, Mefford HC, Gerdts J, Earl R, Hanson E, Goin-Kochel RP, Berry L et al (2016) Clinical phenotype of the recurrent 1q21.1 copy-number variant. *Genet Med* 18:341–349
- Bertrand V, Massy N, Pigneur B, Coopman S, Durrieu G, Gaboriau L, Langlois V, Gower-Rousseau C, Hugot J-P, Ruemmele FM (2020) Neurological Adverse Effects Associated with anti-TNF Alpha Antibodies in Pediatric Inflammatory Bowel Diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*
- Besné I, Descombes C, Breton L (2002) Effect of age and anatomical site on density of sensory innervation in human epidermis. *Arch Dermatol* 138:1445–1450
- Biegstraaten M, Hollak CEM, Bakkers M, Faber CG, Aerts JMFG, van Schaik IN (2012) Small fiber neuropathy in Fabry disease. *Mol Genet Metab* 106:135–141
- Birnbaum J, Bingham CO (2014) Non-length-dependent and length-dependent small-fiber neuropathies associated with tumor necrosis factor (TNF)-inhibitor therapy in patients with rheumatoid arthritis. Expanding the spectrum of neurological disease associated with TNF-inhibitors. *Semin Arthritis Rheum* 43:638–647
- Bischhoffshausen S von, Ivulic D, Alvarez P, Schuffeneger VC, Idiaquez J, Fuentes C, Morande P, Fuentes I, Palisson F, Bennett DLH, Calvo M (2017) Recessive dystrophic epidermolysis bullosa results in painful small fibre neuropathy. *Brain*
- Blankenburg M, Boekens H, Hechler T, Maier C, Krumova E, Scherens A, Magerl W, Aksu F, Zernikow B (2010) Reference values for quantitative sensory testing in children and adolescents: developmental and gender differences of somatosensory perception. *Pain* 149:76–88

- Bonhof GJ, Strom A, Puttgen S, Ringel B, Bruggemann J, Bodis K, Mussig K, Szendroedi J, Roden M, Ziegler D (2017) Patterns of cutaneous nerve fibre loss and regeneration in type 2 diabetes with painful and painless polyneuropathy. *Diabetologia* 60:2495–2503
- Bouhassira D (2019) Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. *Rev Neurol (Paris)* 175:16–25
- Bouhassira D, Attal N, Fermanian J, Alchaar H, Gautron M, Masquelier E, Rostaing S, Lanteri-Minet M, Collin E, Grisart J, Boureau F (2004) Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain* 108:248–257
- Boulant JA (1981) Hypothalamic mechanisms in thermoregulation. *Fed Proc* 40:2843–2850
- Breton J, Ellazam B, Haddad E, Deslandres C (2018) Small-Fiber Neuropathy in a Pediatric Patient Following Anti-Tumor Necrosis Factor- α Therapy for Ulcerative Colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 66:e159-e161
- Brouwer BA, Merkies ISJ, Gerrits MM, Waxman SG, Hoeijmakers JGJ, Faber CG (2014) Painful neuropathies. The emerging role of sodium channelopathies. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 19:53–65
- Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, Lalani SR, Graham B, Lee B, Shinawi M, Shen J, Kang S-HL et al (2008) Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet* 40:1466–1471
- Burlina AP, Sims KB, Politei JM, Bennett GJ, Baron R, Sommer C, Møller AT, Hilz MJ (2011) Early diagnosis of peripheral nervous system involvement in Fabry disease and treatment of neuropathic pain. The report of an expert panel. *BMC Neurol* 11:61
- Burrow TA, Bailey LA, Kinnett DG, Hopkin RJ (2010) Acute progression of neuromuscular findings in infantile Pompe disease. *Pediatr Neurol* 42:455–458
- Casser HR, Hüppe M, Kohlmann T, Korb J, Lindena G, Maier C, Nagel B, Pfingsten M, Thoma R (2012) Deutscher Schmerzfragebogen (DSF) und standardisierte Dokumentation mit KEDOQ-Schmerz. Auf dem Weg zur gemeinsamen Qualitätsentwicklung der Schmerztherapie. *1432-2129* 26:168–175

- Cazzato D, Castori M, Lombardi R, Caravello F, Bella ED, Petrucci A, Grammatico P, Dordoni C, Colombi M, Lauria G (2016) Small fiber neuropathy is a common feature of Ehlers-Danlos syndromes. *Neurology* 87:155–159
- Cazzato D, Lauria G (2017) Small fibre neuropathy. *Curr Opin Neurol*
- Chan ACY, Wilder-Smith EP (2016) Small fiber neuropathy: Getting bigger! *Muscle Nerve* 53:671–682
- Chao C-C, Huang C-M, Chiang H-H, Luo K-R, Kan H-W, Yang NC-C, Chiang H, Lin W-M, Lai S-M, Lee M-J, Shun C-T, Hsieh S-T (2015) Sudek's atrophy in transthyretin amyloid neuropathy: Pathology and functional correlates. *Ann Neurol* 78:272–283
- Cheung A, Podgorny P, Martinez JA, Chan C, Toth C (2015) Epidermal axonal swellings in painful and painless diabetic peripheral neuropathy. *Muscle Nerve* 51:505–513
- Cohen SP, Mao J (2014) Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ* 348:f7656
- Collongues N, Samama B, Schmidt-Mutter C, Chamard-Witkowski L, Debouverie M, Chanson J-B, Antal M-C, Benardais K, Seze J de, Velten M, Boehm N (2018) Quantitative and qualitative normative dataset for intraepidermal nerve fibers using skin biopsy. *PLoS ONE* 13:e0191614
- Cook-Norris RH, Tollefson MM, Cruz-Inigo AE, Sandroni P, Davis MDP, Davis DMR (2012) Pediatric erythromelalgia. A retrospective review of 32 cases evaluated at Mayo Clinic over a 37-year period. *J Am Acad Dermatol* 66:416–423
- Cruz-Almeida Y, Fillingim RB (2014) Can quantitative sensory testing move us closer to mechanism-based pain management? *Pain Med* 15:61–72
- Cui C-Y, Schlessinger D (2015) Eccrine sweat gland development and sweat secretion. *Exp Dermatol* 24:644–650
- Dabby R, Djaldetti R, Shahmurov M, Treves TA, Gabai B, Melamed E, Sadeh M, Avinoach I (2006) Skin biopsy for assessment of autonomic denervation in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 113:1169–1176
- Dabby R, Vaknine H, Gilad R, Djaldetti R, Sadeh M (2007) Evaluation of cutaneous autonomic innervation in idiopathic sensory small-fiber neuropathy. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 12:98–101

- Dalla Bella E, Lombardi R, Porretta-Serapiglia C, Ciano C, Gellera C, Pensato V, Cazzato D, Lauria G (2016) Amyotrophic lateral sclerosis causes small fiber pathology. *Eur J Neurol* 23:416–420
- Devigili G, Rinaldo S, Lombardi R, Cazzato D, Marchi M, Salvi E, Eleopra R, Lauria G (2019) Diagnostic criteria for small fibre neuropathy in clinical practice and research. *Brain* 142:3728–3736
- 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
- Dib-Hajj SD, Rush AM, Cummins TR, Hisama FM, Novella S, Tyrrell L, Marshall L, Waxman SG (2005) Gain-of-function mutation in Nav1.7 in familial erythromelalgia induces bursting of sensory neurons. *Brain* 128:1847–1854
- Dib-Hajj SD, Yang Y, Black JA, Waxman SG (2013) The Na(V)1.7 sodium channel. From molecule to man. *Nat Rev Neurosci* 14:49–62
- DiMario FJ (2016) Inherited Pain Syndromes and Ion Channels. *Semin Pediatr Neurol* 23:248–253
- Divisova S, Vlckova E, Srotova I, Kincova S, Skorna M, Dusek L, Dubovy P, Bednarik J (2016) Intraepidermal nerve-fibre density as a biomarker of the course of neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 33:650–654
- Dohrn MF, Lampert A, Üçeyler N, Kurth I (2019) Neuropathische Schmerzsyndrome bei Ionenkanalerkrankungen. *Internist (Berl)* 60:90–97
- Donadio V, Liguori R (2011) Methods of sudomotor innervation quantification. *Muscle Nerve* 43:920-1; author reply 921
- Donadio V, Nolano M, Provitera V, Stancanelli A, Lullo F, Liguori R, Santoro L (2006) Skin sympathetic adrenergic innervation: an immunofluorescence confocal study. *Ann Neurol* 59:376–381
- Doppler K, Appeltshauser L, Wilhelmi K, Villmann C, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Mäurer M, Weishaupt A, Sommer C (07.2015) Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 86:720–728

- Doppler K, Frank F, Koschker A-C, Reiners K, Sommer C (2017) Nodes of Ranvier in skin biopsies of patients with diabetes mellitus. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*
- Doppler K, Werner C, Henneges C, Sommer C (2012) Analysis of myelinated fibers in human skin biopsies of patients with neuropathies. *J Neurol* 259:1879–1887
- Doppler K, Werner C, Sommer C (06.2013) Disruption of nodal architecture in skin biopsies of patients with demyelinating neuropathies. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 18:168–176
- Dori A, Lopate G, Keeling R, Pestronk A (2015) Myovascular innervation: axon loss in small-fiber neuropathies. *Muscle Nerve* 51:514–521
- Döring K, Schänzer A, Krämer HH (2012) Small Fiber Neuropathie. *Klin Neurophysiol* 43:254–258
- Ebbink BJ, Poelman E, Aarsen FK, Plug I, Regal L, Muentjes C, van der Beek, Nadine A M E, Lequin MH, van der Ploeg, Ans T, van den Hout, Johanna M P (2018) Classic infantile Pompe patients approaching adulthood: a cohort study on consequences for the brain. *Dev Med Child Neurol* 60:579–586
- Ebenezer GJ, Hauer P, Gibbons C, McArthur JC, Polydefkis M (2007) Assessment of epidermal nerve fibers: a new diagnostic and predictive tool for peripheral neuropathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:1059–1073
- Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL (2008) Diabetic neuropathy. Mechanisms to management. *Pharmacol Ther* 120:1–34
- Erfanian Omidvar M, Torkamandi S, Rezaei S, Alipoor B, Omrani MD, Darvish H, Ghaedi H (2019) Genotype-phenotype associations in hereditary spastic paraplegia: a systematic review and meta-analysis on 13,570 patients. *J Neurol*
- Faber CG, Hoeijmakers JGJ, Ahn H-S, Cheng X, Han C, Choi J-S, Estacion M, Lauria G, Vanhoutte EK, Gerrits MM, Dib-Hajj S, Drenth JPH et al (2012a) Gain of function Nav1.7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy. *Ann Neurol* 71:26–39
- Faber CG, Lauria G, Merkies ISJ, Cheng X, Han C, Ahn H-S, Persson A-K, Hoeijmakers JGJ, Gerrits MM, Pierro T, Lombardi R, Kapetis D et al (2012b) Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:19444–19449

- Falk DJ, Todd AG, Lee S, Soustek MS, ElMallah MK, Fuller DD, Notterpek L, Byrne BJ (2015) Peripheral nerve and neuromuscular junction pathology in Pompe disease. *Hum Mol Genet* 24:625–636
- Farschtschi SC, Kluwe L, Schon G, Friedrich RE, Matschke J, Glatzel M, Weis J, Hagel C, Mautner V-F (2019) Distinctive low epidermal nerve fiber density in schwannomatosis patients provides a major parameter for diagnosis and differential diagnosis. *Brain Pathol*
- Floeter MK, Civitello LA, Everett CR, Dambrosia J, Luciano CA (1997) Peripheral neuropathy in children with HIV infection. *Neurology* 49:207–212
- Freccero C, Svensson H, Bornmyr S, Wollmer P, Sundkvist G (2004) Sympathetic and Parasympathetic Neuropathy Are Frequent in Both Type 1 and Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 27:2936
- Freyhagen R, Baron R, Gockel U, Tolle TR (2006) painDETECT: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain. *Curr Med Res Opin* 22:1911–1920
- Galan E, Kousseff BG (1995) Peripheral neuropathy in Ehlers-Danlos syndrome. *Pediatr Neurol* 12:242–245
- Gemignani F (2017) Small fiber neuropathy or small fiber pathology? *Pain* 158:988–989
- Gemignani F, Giovanelli M, Vitetta F, Santilli D, Bellanova MF, Brindani F, Marbini A (2010) Non-length dependent small fiber neuropathy. a prospective case series. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 15:57–62
- Gemignani F, Marbini A (2001) Charcot-Marie-Tooth disease (CMT): distinctive phenotypic and genotypic features in CMT type 2. *J Neurol Sci* 184:1–9
- Germain DP, Charrow J, Desnick RJ, Guffon N, Kempf J, Lachmann RH, Lemay R, Linthorst GE, Packman S, Scott CR, Waldek S, Warnock DG et al (2015) Ten-year outcome of enzyme replacement therapy with agalsidase beta in patients with Fabry disease. *J Med Genet* 52:353–358
- Gerrett N, Griggs K, Redortier B, Voelcker T, Kondo N, Havenith G (2018) Sweat from gland to skin surface: production, transport, and skin absorption. *J Appl Physiol* 125:459–469

- Ghasemi M, Rajabally YA (2020) Small fiber neuropathy in unexpected clinical settings: a review. *Muscle Nerve*
- Gibbons CH, Freeman R (2015) Treatment-induced neuropathy of diabetes: an acute, iatrogenic complication of diabetes. *Brain* 138:43–52
- Gibbons CH, Illigens BMW, Wang N, Freeman R (2009) Quantification of sweat gland innervation: a clinical-pathologic correlation. *Neurology* 72:1479–1486
- Gibbons CH, Illigens BMW, Wang N, Freeman R (2010) Quantification of sudomotor innervation: a comparison of three methods. *Muscle Nerve* 42:112–119
- Glatte P, Buchmann SJ, Hijazi MM, Illigens BM-W, Siepmann T (2019) Architecture of the Cutaneous Autonomic Nervous System. *Front Neurol* 10:970
- Gorson KC, Herrmann DN, Thiagarajan R, Brannagan TH, Chin RL, Kinsella LJ, Ropper AH (2008) Non-length dependent small fibre neuropathy/ganglionopathy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 79:163–169
- Green AQ, Krishnan S, Finucane FM, Rayman G (2010) Altered C-fiber function as an indicator of early peripheral neuropathy in individuals with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 33:174–176
- Greger R (1996) The Formation of Sweat. In: Greger R, Windhorst U (Hrsg) *Comprehensive Human Physiology: From Cellular Mechanisms to Integration*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2219–2228
- Groscurth P (2002) Anatomy of sweat glands. *Curr Probl Dermatol* 30:1–9
- Gulbenkian S, Wharton J, Polak JM (1987) The visualisation of cardiovascular innervation in the guinea pig using an antiserum to protein gene product 9.5 (PGP 9.5). *J Auton Nerv Syst* 18:235–247
- Güngör D, Schober AK, Kruijshaar ME, Plug I, Karabul N, Deschauer M, van Doorn PA, van der Ploeg AT, Schoser B, Hanisch F (2013) Pain in adult patients with Pompe disease: a cross-sectional survey. *Mol Genet Metab* 109:371–376
- Hahn A, Schänzer A (2019) Long-term outcome and unmet needs in infantile-onset Pompe disease. *Ann Transl Med* 7:283
- Han C, Hoeijmakers JGJ, Liu S, Gerrits MM, te Morsche RHM, Lauria G, Dib-Hajj SD, Drenth JPH, Faber CG, Merkies ISJ, Waxman SG (2012) Functional profiles of SCN9A variants in dorsal root ganglion neurons and superior cervical ganglion

- neurons correlate with autonomic symptoms in small fibre neuropathy. *Brain* 135:2613–2628
- Herrmann DN, Griffin JW, Hauer P, Cornblath DR, McArthur JC (1999) Epidermal nerve fiber density and sural nerve morphometry in peripheral neuropathies. *Neurology* 53:1634–1640
- Heuß D (2019) Diagnostik bei Polyneuropathien. S1-Leitlinie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie
- Hibbs RG (1958) The fine structure of human eccrine sweat glands. *Am J Anat* 103:201–217
- Hilz MJ, Glorius SE, Schweibold G, Neuner I, Stemper B, Axelrod FB (1996) Quantitative thermal perception testing in preschool children. *Muscle Nerve* 19:381–383
- Hilz MJ, Stemper B, Schweibold G, Neuner I, Grahmann F, Kolodny EH (1998) Quantitative thermal perception testing in 225 children and juveniles. *J Clin Neurophysiol* 15:529–534
- Hobson-Webb LD, Austin SL, Jain S, Case LE, Greene K, Kishnani PS (2015) Small-fiber neuropathy in pompe disease: first reported cases and prospective screening of a clinic cohort. *Am J Case Rep* 16:196–201
- Hobson-Webb LD, Proia AD, Thurberg BL, Banugaria S, Prater SN, Kishnani PS (2012) Autopsy findings in late-onset Pompe disease: a case report and systematic review of the literature. *Mol Genet Metab* 106:462–469
- Hoeijmakers JG, Faber CG, Lauria G, Merkies IS, Waxman SG (2012) Small-fibre neuropathies--advances in diagnosis, pathophysiology and management. *Nat Rev Neurol* 8:369–379
- Hoeijmakers JGJ, Faber CG, Miedema CJ, Merkies ISJ, Vles JSH (2016) Small Fiber Neuropathy in Children: Two Case Reports Illustrating the Importance of Recognition. *Pediatrics* 138
- Hoffman EM, Staff NP, Robb JM, St Sauver JL, Dyck PJ, Klein CJ (2015) Impairments and comorbidities of polyneuropathy revealed by population-based analyses. *Neurology* 84:1644–1651
- Hopkin RJ, Bissler J, Banikazemi M, Clarke L, Eng CM, Germain DP, Lemay R, Tytki-Szymanska A, Wilcox WR (2008) Characterization of Fabry disease in 352 pediatric patients in the Fabry Registry. *Pediatr Res* 64:550–555

- Hordeaux J, Dubreil L, Robveille C, Deniaud J, Pascal Q, Dequeant B, Pailloux J, Lagalice L, Ledevin M, Babarit C, Costiou P, Jamme F et al (2017) Long-term neurologic and cardiac correction by intrathecal gene therapy in Pompe disease. *Acta Neuropathol Commun* 5:66
- Howard RF, Wiener S, Walker SM (2014) Neuropathic pain in children. *Arch Dis Child* 99:84–89
- Hsu J-L, Liao M-F, Hsu H-C, Weng Y-C, Lo A-L, Chang K-H, Chang H-S, Kuo H-C, Huang C-C, Ro L-S (2017) A prospective, observational study of patients with uncommon distal symmetric painful small-fiber neuropathy. *PLoS ONE* 12:e0183948
- Huang J, Estacion M, Zhao P, Dib-Hajj FB, Schulman B, Abicht A, Kurth I, Brockmann K, Waxman SG, Dib-Hajj SD (2019) A Novel Gain-of-Function Nav1.9 Mutation in a Child With Episodic Pain. *Front Neurosci* 13:918
- Illigens BMW, Gibbons CH (2009) Sweat testing to evaluate autonomic function. *Clin Auton Res* 19:79–87
- Invernizzi P, Pasini S, Selmi C, Gershwin ME, Podda M (2009) Female predominance and X chromosome defects in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 33:12–16
- Jin HY, Baek HS, Park TS (2015) Morphologic Changes in Autonomic Nerves in Diabetic Autonomic Neuropathy. *Diabetes Metab J* 39:461–467
- Julien-Marsollier F, David R, Hilly J, Brasher C, Michelet D, Dahmani S (2017) Predictors of chronic neuropathic pain after scoliosis surgery in children. *Scand J Pain*
- Kafaie J, Al Balushi A, Kim M, Pestronk A (2017) Clinical and Laboratory Profiles of Idiopathic Small Fiber Neuropathy in Children. Case Series. *J Clin Neuromuscul Dis* 19:31–37
- Kafaie J, Kim M, Krause E (2016) Small Fiber Neuropathy Following Vaccination. *J Clin Neuromuscul Dis* 18:37–40
- Kara E, Tucci A, Manzoni C, Lynch DS, Elpidorou M, Bettencourt C, Chelban V, Manole A, Hamed SA, Haridy NA, Federoff M, Preza E et al (2016) Genetic and phenotypic characterization of complex hereditary spastic paraplegia. *Brain* 139:1904–1918
- Karlsson P, Nyengaard JR, Polydefkis M, Jensen TS (2015) Structural and functional assessment of skin nerve fibres in small-fibre pathology. *Eur J Pain* 19:1059–1070

- Kawakami T, Ishihara M, Mihara M (2001) Distribution density of intraepidermal nerve fibers in normal human skin. *J Dermatol* 28:63–70
- Kennedy WR, Sakuta M (1984) Collateral reinnervation of sweat glands. *Ann Neurol* 15:73–78
- Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G (1996) Utility of skin biopsy in diabetic neuropathy. *Semin Neurol* 16:163–171
- Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Brelje TC (1994) Innervation and vasculature of human sweat glands: an immunohistochemistry-laser scanning confocal fluorescence microscopy study. *J Neurosci* 14:6825–6833
- Khoshnoodi MA, Truelove S, Burakgazi A, Hoke A, Mammen AL, Polydefkis M (2016) Longitudinal Assessment of Small Fiber Neuropathy. Evidence of a Non-Length-Dependent Distal Axonopathy. *JAMA Neurol* 73:684–690
- King S, Chambers CT, Huguet A, MacNevin RC, McGrath PJ, Parker L, MacDonald AJ (2011) The epidemiology of chronic pain in children and adolescents revisited: a systematic review. *Pain* 152:2729–2738
- Kondo N, Takano S, Aoki K, Shibasaki M, Tominaga H, Inoue Y (1998) Regional differences in the effect of exercise intensity on thermoregulatory sweating and cutaneous vasodilation. *Acta Physiol Scand* 164:71–78
- Königshoff M, Brandenburger T (2018) Das Vitamin D (Calcitriol). In: Königshoff M, Brandenburger T (Hrsg) *Kurzlehrbuch Biochemie*. Georg Thieme Verlag
- Kosek E, Cohen M, Baron R, Gebhart GF, Mico J-A, Rice ASC, Rief W, Sluka AK (2016) Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? *Pain* 157:1382–1386
- Krammer HJ, Karahan ST, Rumpel E, Klinger M, Kuhnel W (1993) Immunohistochemical visualization of the enteric nervous system using antibodies against protein gene product (PGP) 9.5. *Ann Anat* 175:321–325
- Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, Woods CG, Jones NG, Paterson KJ, Fricker FR, Villegas A, Acosta N et al (2010) A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* 66:671–680
- Kuno Y (1938) VARIATIONS IN SECRETORY ACTIVITY OF HUMAN SWEAT GLANDS. *The Lancet* 231:299–303
- Lacomis D (2002) Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 26:173–188

- Lamartine S, Monteiro M, Remiche G (2019) Late-onset Pompe disease associated with polyneuropathy. *Neuromuscul Disord* 29:968–972
- Lang M, Treister R, Oaklander AL (2016) Diagnostic value of blood tests for occult causes of initially idiopathic small-fiber polyneuropathy. *J Neurol* 263:2515–2527
- Lauder GR, White MC (2005) Neuropathic pain following multilevel surgery in children with cerebral palsy. A case series and review. *Paediatr Anaesth* 15:412–420
- Laurà M, Hutton EJ, Blake J, Lunn MP, Fox Z, Pareyson D, Solari A, Radice D, Koltzenburg M, Reilly MM (2014) Pain and small fiber function in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Muscle Nerve* 50:366–371
- Lauria G, Bakkers M, Schmitz C, Lombardi R, Penza P, Devigili G, Smith AG, Hsieh S-T, Mellgren SI, Umapathi T, Ziegler D, Faber CG et al (2010a) Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: a worldwide normative reference study. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 15:202–207
- Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, McArthur JC, Mellgren SI, Nolano M, Rosenberg N, Sommer C (2005) EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 12:747–758
- Lauria G, Dacci P, Lombardi R, Cazzato D, Porretta-Serapiglia C, Taiana M, Sassone J, Dalla Bella E, Rinaldo S, Lettieri C, Eleopra R, Devigili G (2015) Side and time variability of intraepidermal nerve fiber density. *Neurology* 84:2368–2371
- Lauria G, Devigili G (2007) Skin biopsy as a diagnostic tool in peripheral neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol* 3:546–557
- Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI, Nolano M, Merkies ISJ, Polydefkis M, Smith AG, Sommer C, Valls-Sole J (2010b) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 17:903-12, e44-9
- Lauria G, Lombardi R (2007) Skin biopsy: a new tool for diagnosing peripheral neuropathy. *BMJ* 334:1159–1162
- Li J, Bai Y, Ghandour K, Qin P, Grandis M, Trostinskaia A, Ianakova E, Wu X, Schenone A, Vallat J-M, Kupsky WJ, Hatfield J et al (2005) Skin biopsies in myelin-related neuropathies: bringing molecular pathology to the bedside. *Brain* 128:1168–1177

- Lieber S, Blankenburg M, Apel K, Hirschfeld G, Hernáiz Driever P, Reindl T (2018) Small-fiber neuropathy and pain sensitization in survivors of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Paediatr Neurol*
- Liu X, Treister R, Lang M, Oaklander AL (2018) IVIg for apparently autoimmune small-fiber polyneuropathy: first analysis of efficacy and safety. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 11:1756285617744484
- Liu Y, Billiet J, Ebenezer GJ, Pan B, Hauer P, Wei J, Polydefkis M (2015) Factors influencing sweat gland innervation in diabetes. *Neurology* 84:1652–1659
- Loavenbruck A, Wendelschaefler-Crabbe G, Sandroni P, Kennedy WR (2014) Quantification of sweat gland volume and innervation in neuropathy: Correlation with thermoregulatory sweat testing. *Muscle Nerve* 50:528–534
- Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart. https://eref.thieme.de/ebooks/2444813#/ebook_2444813_SL91304781
- Lumpkin EA, Caterina MJ (2007) Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* 445:858–865
- Luo K-R, Chao C-C, Chen Y-T, Huang C-M, Yang NC-C, Kan H-W, Wang S-H, Yang W-S, Hsieh S-T (2011) Quantitation of sudomotor innervation in skin biopsies of patients with diabetic neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:930–938
- Luo K-R, Chao C-C, Hsieh P-C, Lue J-H, Hsieh S-T (2012) Effect of glycemic control on sudomotor denervation in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 35:612–616
- Määttä LL, Charles M, Witte DR, Bjerg L, Jørgensen ME, Jensen TS, Andersen ST (2019) Prospective Study of Neuropathic Symptoms Preceding Clinically Diagnosed Diabetic Polyneuropathy: ADDITION-Denmark. *Diabetes Care* 42:2282–2289
- MacDonald S, Sharma TL, Li J, Polston D, Li Y (2019) Longitudinal follow-up of biopsy-proven small fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 60:376–381
- Malcangio M (2019) Role of the immune system in neuropathic pain. *Scand J Pain* 20:33–37
- Malek N, Agnieszka Pajak, Natalia Kolosowska, Mateusz Kucharczyk, Katarzyna Starowicz (2015) The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. *Molecular and Cellular Neuroscience* 65:1–10

- Martínez-Martínez E, Toscano-Márquez B, Gutiérrez-Ospina G (2011) Long-term effects of neonatal capsaicin treatment on intraepidermal nerve fibers and keratinocyte proliferation in rat glabrous skin. *Anat Rec (Hoboken)* 294:173–184
- Masuda T, Ueda M, Suenaga G, Misumi Y, Tasaki M, Izaki A, Yanagisawa Y, Inoue Y, Motokawa H, Matsumoto S, Mizukami M, Arimura A et al (2017) Early skin denervation in hereditary and iatrogenic transthyretin amyloid neuropathy. *Neurology* 88:2192–2197
- McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW (1998) Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 55:1513–1520
- McCarthy BG, Hsieh ST, Stocks A, Hauer P, Macko C, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC (1995) Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. *Neurology* 45:1848–1855
- McMahon SB, La Russa F, Bennett DLH (2015) Crosstalk between the nociceptive and immune systems in host defence and disease. *Nat Rev Neurosci* 16:389–402
- Meier PM, Berde CB, DiCanzio J, Zurakowski D, Sethna NF (2001) Quantitative assessment of cutaneous thermal and vibration sensation and thermal pain detection thresholds in healthy children and adolescents. *Muscle Nerve* 24:1339–1345
- Minota K, Schmeichel AM, Gehrking JA, Mandrekar JN, Low PA, Singer W (2019) Refined Quantitation of Sweat Gland Innervation. *J Neuropathol Exp Neurol* 78:453–459
- Morales PS, Escobar RG, Lizama M, Aglony M, Salomon J, Drenth JPH, Borzutzky A (2012) Paediatric hypertension-associated erythromelalgia responds to corticosteroids and is not associated with SCN9A mutations. *Rheumatology (Oxford)* 51:2295–2296
- Murphy SM, Laura M, Fawcett K, Pandraud A, Liu Y-T, Davidson GL, Rossor AM, Polke JM, Castleman V, Manji H, Lunn MPT, Bull K et al (2012) Charcot-Marie-Tooth disease: frequency of genetic subtypes and guidelines for genetic testing. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 83:706–710
- Myers MI, Peltier AC, Li J (2013) Evaluating dermal myelinated nerve fibers in skin biopsy. *Muscle Nerve* 47:1–11
- Narayanaswamy H, Facer P, Misra VP, Timmers M, Byttebier G, Meert T, Anand P (2012) A longitudinal study of sensory biomarkers of progression in patients with

- diabetic peripheral neuropathy using skin biopsies. *Journal of Clinical Neuroscience* 19:1490–1496
- Nery Ferreira BES, Silva IN, Oliveira JT de (2005) High prevalence of diabetic polyneuropathy in a group of Brazilian children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 18:1087–1094
- Nielson Hoberg T, Frahm S, Hennings K, Arendt-Nielsen L, Dahl Mørch C (2019) Assessing the modulation of cutaneous sensory fiber excitability using a fast perception threshold tracking technique. *Muscle Nerve* 60:367–375
- Nolano M, Biasiotta A, Lombardi R, Provitera V, Stancanelli A, Caporaso G, Santoro L, Merkies ISJ, Truini A, Porretta-Serapiglia C, Cazzato D, Dacci P et al (2015) Epidermal innervation morphometry by immunofluorescence and bright-field microscopy. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 20:387–391
- Nolano M, Crisci C, Santoro L, Barbieri F, Casale R, Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Provitera V, Di Lorenzo N, Caruso G (2000) Absent innervation of skin and sweat glands in congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Clin Neurophysiol* 111:1596–1601
- Nolano M, Provitera V, Crisci C, Saltalamacchia AM, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Filla A, Santoro L, Caruso G (2001) Small fibers involvement in Friedreich's ataxia. *Ann Neurol* 50:17–25
- Nolano M, Provitera V, Crisci C, Stancanelli A, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR, Santoro L (2003) Quantification of myelinated endings and mechanoreceptors in human digital skin. *Ann Neurol* 54:197–205
- Nolano M, Provitera V, Estraneo A, Selim MM, Caporaso G, Stancanelli A, Saltalamacchia AM, Lanzillo B, Santoro L (2008) Sensory deficit in Parkinson's disease: evidence of a cutaneous denervation. *Brain* 131:1903–1911
- Nolano M, Provitera V, Perretti A, Stancanelli A, Saltalamacchia AM, Donadio V, Manganeli F, Lanzillo B, Santoro L (2006) Ross syndrome. A rare or a misknown disorder of thermoregulation? A skin innervation study on 12 subjects. *Brain* 129:2119–2131
- Oaklander AL, Herzog ZD, Downs HM, Klein MM (2013) Objective evidence that small-fiber polyneuropathy underlies some illnesses currently labeled as fibromyalgia. *Pain* 154:2310–2316

- Oaklander AL, Klein MM (2013) Evidence of small-fiber polyneuropathy in unexplained, juvenile-onset, widespread pain syndromes. *Pediatrics* 131:e1091-100
- Oaklander AL, Nolano M (2019) Scientific Advances in and Clinical Approaches to Small-Fiber Polyneuropathy: A Review. *JAMA Neurol* 76:1240–1251
- Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K (2005) TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 115:2393–2401
- Ørstavik K, Namer B, Schmidt R, Schmelz M, Hilliges M, Weidner C, Carr RW, Handwerker H, Jørum E, Torebjörk HE (2006) Abnormal function of C-fibers in patients with diabetic neuropathy. *J Neurosci* 26:11287–11294
- Oudejans L, He X, Niesters M, Dahan A, Brines M, van Velzen M (2016) Cornea nerve fiber quantification and construction of phenotypes in patients with fibromyalgia. *Sci Rep* 6:23573
- Pan B, Byrnes K, Schwartz M, Hansen CD, Campbell CM, Krupiczkoj M, Caterina MJ, Polydefkis M (2016) Peripheral neuropathic changes in pachyonychia congenita. *Pain* 157:2843–2853
- Panoutsopoulou IG, Luciano CA, Wendelschafer-Crabb G, Hodges JS, Kennedy WR (2015) Epidermal innervation in healthy children and adolescents. *Muscle Nerve* 51:378–384
- Parini R, Lorenzo P de, Dardis A, Burlina A, Cassio A, Cavarzere P, Concolino D, Della Casa R, Deodato F, Donati MA, Fiumara A, Gasperini S et al (2018) Long term clinical history of an Italian cohort of infantile onset Pompe disease treated with enzyme replacement therapy. *Orphanet J Rare Dis* 13:32
- Parry GJ, Brown MJ (1982) Selective fiber vulnerability in acute ischemic neuropathy. *Ann Neurol* 11:147–154
- Paticoff J, Valovska A, Nedeljkovic SS, Oaklander AL (2007) Defining a treatable cause of erythromelalgia: acute adolescent autoimmune small-fiber axonopathy. *Anesth Analg* 104:438–441
- Pazzaglia C, Vollono C, Ferraro D, Virdis D, Lupi V, Le Pera D, Tonali P, Padua L, Valeriani M (2010) Mechanisms of neuropathic pain in patients with Charcot-Marie-Tooth 1 A: a laser-evoked potential study. *Pain* 149:379–385

- Pena LDM, Proia AD, Kishnani PS (2015) Postmortem Findings and Clinical Correlates in Individuals with Infantile-Onset Pompe Disease. *JIMD Rep* 23:45–54
- Peters MJH, Bakkers M, Merkies ISJ, Hoeijmakers JGJ, van Raak EPM, Faber CG (2013) Incidence and prevalence of small-fiber neuropathy. A survey in the Netherlands. *Neurology* 81:1356–1360
- Pieri L, Sassoli C, Romagnoli P, Domenici L (2002) Use of periodate-lysine-paraformaldehyde for the fixation of multiple antigens in human skin biopsies. *Eur J Histochem* 46:365–375
- Plante-Bordeneuve V, Said G (2011) Familial amyloid polyneuropathy. *Lancet Neurol* 10:1086–1097
- Prater SN, Banugaria SG, DeArmev SM, Botha EG, Stege EM, Case LE, Jones HN, Phornphutkul C, Wang RY, Young SP, Kishnani PS (2012) The emerging phenotype of long-term survivors with infantile Pompe disease. *Genet Med* 14:800–810
- Priest JM, Fischbeck KH, Nouri N, Keats BJ (1995) A locus for axonal motor-sensory neuropathy with deafness and mental retardation maps to Xq24-q26. *Genomics* 29:409–412
- Provitera V, Gibbons CH, Wendelschafer-Crabb G, Donadio V, Vitale DF, Loavenbruck A, Stancanelli A, Caporaso G, Liguori R, Wang N, Santoro L, Kennedy WR et al (2018) The role of skin biopsy in differentiating small fiber neuropathy from ganglionopathy. *Eur J Neurol*
- Provitera V, Gibbons CH, Wendelschafer-Crabb G, Donadio V, Vitale DF, Stancanelli A, Caporaso G, Liguori R, Wang N, Santoro L, Kennedy WR, Nolano M (2016) A multi-center, multinational age- and gender-adjusted normative dataset for immunofluorescent intraepidermal nerve fiber density at the distal leg. *Eur J Neurol* 23:333–338
- Provitera V, Nolano M, Pagano A, Caporaso G, Stancanelli A, Santoro L (2007) Myelinated nerve endings in human skin. *Muscle Nerve* 35:767–775
- Puhakka A, Forssell H, Soinila S, Virtanen A, Røyttä M, Laine M, Tenovuo O, Teerijoki-Oksa T, Jääskeläinen SK (2016) Peripheral nervous system involvement in primary burning mouth syndrome--results of a pilot study. *Oral Dis* 22:338–344
- Ranieri M, Bedini G, Parati EA, Bersano A (2016) Fabry Disease. Recognition, Diagnosis, and Treatment of Neurological Features. *Curr Treat Options Neurol* 18:33

- Reilly MM, Murphy SM, Laura M (2011) Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of the peripheral nervous system* : JPNS 16:1–14
- Ren K, Dubner R (2010) Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med* 16:1267–1276
- Rodrigues AC, Kang PB (2016) Neuropathic and Myopathic Pain. *Semin Pediatr Neurol* 23:242–247
- Rohini K (2017) Das plastische Rückenmark: funktionelle und strukturelle Plastizität bei der Chronifizierung von Schmerzen 23. <https://www.degruyter.com/view/j/nf.2017.23.issue-3/nf-2017-0016/nf-2017-0016.xml>
- Rolke R, Magerl W, Campbell KA, Schalber C, Caspari S, Birklein F, Treede R-D (2006) Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. *Eur J Pain* 10:77–88
- Rydh M, Dalsgaard C, Hægerstrand A (1989) Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibodies. *Histochemistry* 92:385
- Sachau J, Fabig S-C, Rehm S, Baron R (2020) Therapie der Polyneuropathie – autonome Symptome und Schmerzen. *Internist (Berl)*
- Saigal R, Bhargav R, Goyal L, Agrawal A, Mital P, Wadhvani D (2015) Peripheral Neuropathy in Systemic Lupus Erythematosus: Clinical and Electrophysiological Properties and their Association with Disease Activity Parameters. *J Assoc Physicians India* 63:15–19
- Saporta MA, Katona I, Lewis RA, Masse S, Shy ME, Li J (2009) Shortened internodal length of dermal myelinated nerve fibres in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain* 132:3263–3273
- Sato K, Dobson RL (1970) Regional and individual variations in the function of the human eccrine sweat gland. *J Invest Dermatol* 54:443–449
- Sato K, Kang WH, Saga K, Sato KT (1989) Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *J Am Acad Dermatol* 20:537–563
- Sato K, Sato F (1981) Role of calcium in cholinergic and adrenergic mechanisms of eccrine sweat secretion. *Am J Physiol* 241:C113-20
- Schiffmann R, Floeter MK, Dambrosia JM, Gupta S, Moore DF, Sharabi Y, Khurana RK, Brady RO (2003) Enzyme replacement therapy improves peripheral nerve and sweat function in Fabry disease. *Muscle Nerve* 28:703–710

- Schiffmann R, Ries M (2016) Fabry Disease. A Disorder of Childhood Onset. *Pediatr Neurol* 64:10–20
- Schlereth T, Dittmar JO, Seewald B, Birklein F (2006) Peripheral amplification of sweating--a role for calcitonin gene-related peptide. *J Physiol (Lond)* 576:823–832
- Schofield JR, Hendrickson JE (2018) Autoimmunity, Autonomic Neuropathy, and the HPV Vaccination: A Vulnerable Subpopulation. *Clin Pediatr (Phila)* 57:603–606
- Schroeder S, Hechler T, Denecke H, Müller-Busch M, Martin A, Menke A, Zernikow B (2010) Deutscher Schmerzfragebogen für Kinder, Jugendliche und deren Eltern (DSF-KJ). Entwicklung und Anwendung eines multimodalen Fragebogens zur Diagnostik und Therapie chronischer Schmerzen im Kindes- und Jugendalter. *1432-2129* 24:23–37
- Selim MM, Wendelschafer-Crabb G, Redmon JB, Khoruts A, Hodges JS, Koch K, Walk D, Kennedy WR (2010) Gastric mucosal nerve density: a biomarker for diabetic autonomic neuropathy? *Neurology* 75:973–981
- Sethna NF, Meier PM, Zurakowski D, Berde CB (2007) Cutaneous sensory abnormalities in children and adolescents with complex regional pain syndromes. *Pain* 131:153–161
- Sheikh SI, Amato AA (2010) The dorsal root ganglion under attack. The acquired sensory ganglionopathies. *Pract Neurol* 10:326–334
- Shibasaki M, Crandall CG (2010) Mechanisms and controllers of eccrine sweating in humans. *Front Biosci (Schol Ed)* 2:685–696
- Shinkarevsky Fleitman I, Nevo Y, Harel L, Amarilyo G, Dori A, Agmon-Levin N, Kachko L, Zaks Hoffer G, Dabby R, Rabie M, Aharoni S (2020) Small-fiber neuropathy associated with autoinflammatory syndromes in children and adolescents. *Muscle Nerve* n/a
- Shun C-T, Chang Y-C, Wu H-P, Hsieh S-C, Lin W-M, Lin Y-H, Tai T-Y, Hsieh S-T (2004) Skin denervation in type 2 diabetes. Correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain* 127:1593–1605
- Sidman RL, Taksir T, Fidler J, Zhao M, Dodge JC, Passini MA, Raben N, Thurberg BL, Cheng SH, Shihabuddin LS (2008) Temporal neuropathologic and behavioral phenotype of 6neo/6neo Pompe disease mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:803–818

- Siepmann T, Illigens BM-W, Reichmann H, Ziemssen T (2014) Axon-Reflex-basierte Nervenmessverfahren in der Diagnostik autonomer Neuropathie. *Nervenarzt* 85:1309–1314
- Smith AG, Howard JR, Kroll R, Ramachandran P, Hauer P, Singleton JR, McArthur J (2005) The reliability of skin biopsy with measurement of intraepidermal nerve fiber density. *J Neurol Sci* 228:65–69
- Sommer C, Lauria G (2007) Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy. *Lancet Neurol* 6:632–642
- Sorensen L, Molyneaux L, Yue DK (2006) The Relationship Among Pain, Sensory Loss, and Small Nerve Fibers in Diabetes. *Diabetes Care* 29:883
- Stefanini M, Martino C de, Zamboni L (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216:173–174
- Stewart JD, Low PA, Fealey RD (1992) Distal small fiber neuropathy: results of tests of sweating and autonomic cardiovascular reflexes. *Muscle Nerve* 15:661–665
- Tavakoli M, Marshall A, Banka S, Petropoulos IN, Fadavi H, Kingston H, Malik RA (2012) Corneal confocal microscopy detects small-fiber neuropathy in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A patients. *Muscle Nerve* 46:698–704
- Taylor NA, Machado-Moreira CA (2013) Regional variations in transepidermal water loss, eccrine sweat gland density, sweat secretion rates and electrolyte composition in resting and exercising humans. *Extrem Physiol Med* 2:4
- Terkelsen AJ, Karlsson P, Lauria G, Freeman R, Finnerup NB, Jensen TS (2017) The diagnostic challenge of small fibre neuropathy: clinical presentations, evaluations, and causes. *Lancet Neurol* 16:934–944
- Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, Lauria G, Malik RA, Spallone V, Vinik A, Bernardi L, Valensi P (2010) Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 33:2285–2293
- Thaisetthawatkul P, Fernandes Filho, J Americo M, Herrmann DN (2013) Contribution of QSART to the diagnosis of small fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 48:883–888
- Themistocleous AC, Ramirez JD, Serra J, Bennett DLH (2014) The clinical approach to small fibre neuropathy and painful channelopathy. *Pract Neurol* 14:368–379

- Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J (1983) PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res* 278:224–228
- Timar B, Popescu S, Timar R, Baderca F, Duica B, Vlad M, Levai C, Balinisteanu B, Simu M (2016) The usefulness of quantifying intraepidermal nerve fibers density in the diagnostic of diabetic peripheral neuropathy: a cross-sectional study. *Diabetol Metab Syndr* 8
- Toft A, Birk S, Ballegaard M, Duno M, Hjermind LE, Nielsen JE, Svenstrup K (2019) Peripheral neuropathy in hereditary spastic paraplegia caused by REEP1 variants. *J Neurol* 266:735–744
- Truini A, Biasiotta A, Di Stefano G, Leone C, La Cesa S, Galosi E, Piroso S, Pepe A, Giordano C, Cruccu G (2014) Does the epidermal nerve fibre density measured by skin biopsy in patients with peripheral neuropathies correlate with neuropathic pain? *Pain* 155:828–832
- Üçeyler N (2016) Small fiber pathology--a culprit for many painful disorders? *Pain* 157 Suppl 1:S60-6
- Üçeyler N, He L, Schonfeld D, Kahn A-K, Reiners K, Hilz MJ, Breunig F, Sommer C (2011) Small fibers in Fabry disease: baseline and follow-up data under enzyme replacement therapy. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 16:304–314
- Üçeyler N, Kafke W, Riediger N, He L, Necula G, Toyka KV, Sommer C (2010) Elevated proinflammatory cytokine expression in affected skin in small fiber neuropathy. *Neurology* 74:1806–1813
- Üçeyler N, Zeller D, Kahn A-K, Kewenig S, Kittel-Schneider S, Schmid A, Casanova-Molla J, Reiners K, Sommer C (2013) Small fibre pathology in patients with fibromyalgia syndrome. *Brain* 136:1857–1867
- Uno H (1977) Sympathetic innervation of the sweat glands and piloerector muscles of macaques and human beings. *J Invest Dermatol* 69:112–120
- van Dijk A, McGrath PA, Pickett W, VanDenKerkhof EG (2006) Pain prevalence in nine- to 13-year-old schoolchildren. *Pain Res Manag* 11:234–240
- Verbeek S, Vanakker O, Mercelis R, Lipka AF, Haerynck F, Dullaers M, Verloo P, van Coster R, Verhelst H (2014) Lambert-Eaton myasthenic syndrome in a 13-year-old girl with Xp11.22-p11.23 duplication. *Eur J Paediatr Neurol* 18:439–443

- Vinik AI, Nevoret M, Casellini C, Parson H (2013a) Neurovascular function and sudorimetry in health and disease. *Curr Diab Rep* 13:517–532
- Vinik AI, Nevoret M-L, Casellini C, Parson H (2013b) Diabetic neuropathy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 42:747–787
- Voortman M, Fritz D, Vogels OJM, Eftimov F, van de Beek D, Brouwer MC, Drent M (2017) Small fiber neuropathy: a disabling and underrecognized syndrome. *Curr Opin Pulm Med* 23:447–457
- Wakamoto H, Hirai A, Manabe K, Hayashi M (1999) Idiopathic small-fiber sensory neuropathy in childhood: A diagnosis based on objective findings on punch skin biopsy specimens. *J Pediatr* 135:257–260
- Wang L, Hilliges M, Jernberg T, Wiegleb-Edstrom D, Johansson O (1990) Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibres and cells in human skin. *Cell Tissue Res* 261:25–33
- Wang N, Gibbons CH (2013) Skin biopsies in the assessment of the autonomic nervous system. *Handb Clin Neurol* 117:371–378
- Weihe E, Schütz B, Hartschuh W, Anlauf M, Schäfer MK, Eiden LE (2005) Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. *J Comp Neurol* 492:370–379
- Weis J, Katona I, Müller-Newen G, Sommer C, Necula G, Hendrich C, Ludolph AC, Sperfeld A-D (2011) Small-fiber neuropathy in patients with ALS. *Neurology* 76:2024–2029
- Weyer-Menkhoff I, Pinter A, Schlierbach H, Schänzer A, Lötsch J (2019) Epidermal expression of human TRPM8, but not of TRPA1 ion channels, is associated with sensory responses to local skin cooling. *Pain* 160:2699–2709
- Wilke K, Martin A, Biel S (2009) Eccrine, apocrine and apoecrine sweat glands. *Neuroimmunology of the Skin Basic Science to Clinical Practice*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin Heidelberg
- Wilke K, Martin A, Terstegen L, Biel SS (2007) A short history of sweat gland biology. *Int J Cosmet Sci* 29:169–179
- Williams G, Howard RF, Lioffi C (2017) Persistent postsurgical pain in children and young people. Prediction, prevention, and management. *PAIN Reports* 2

- Wilmshurst JM, Ouvrier RA, Ryan MM (2019) Peripheral nerve disease secondary to systemic conditions in children. *Ther Adv Neurol Disord* 12:1756286419866367-1756286419866367
- Wirtz PW, Nijhuis MG, Sotodeh M, Willems LNA, Brahim JJ, Putter H, Wintzen AR, Verschuuren JJ (2003) The epidemiology of myasthenia gravis, Lambert-Eaton myasthenic syndrome and their associated tumours in the northern part of the province of South Holland. *J Neurol* 250:698–701
- Wong BL, deGrauw T, Fogelson MH (1998) Pain in pediatric Guillain-Barré syndrome. Case report. *J Child Neurol* 13:184–185
- Yamashita Y, Ogawa T, Ohnishi N, Imamura R, Sugenoja J (1987) Local effect of vasoactive intestinal polypeptide on human sweat-gland function. *Jpn J Physiol* 37:929–936
- Zeng L, Alongkronrusmee D, van Rijn RM (2017) An integrated perspective on diabetic, alcoholic, and drug-induced neuropathy, etiology, and treatment in the US. *J Pain Res* 10:219–228
- Zhang XY, Wen J, Yang W, Wang C, Gao L, Zheng LH, Wang T, Ran K, Li Y, Li X, Xu M, Luo J et al (2013) Gain-of-function mutations in SCN11A cause familial episodic pain. *Am J Hum Genet* 93:957–966
- Ziegler D, Papanas N, Zhivov A, Allgeier S, Winter K, Ziegler I, Bruggemann J, Strom A, Peschel S, Kohler B, Stachs O, Guthoff RF et al (2014) Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes* 63:2454–2463
- Zylka MJ, Rice FL, Anderson DJ (2005) Topographically Distinct Epidermal Nociceptive Circuits Revealed by Axonal Tracers Targeted to Mrgprd. *Neuron* 45:17–25

13 Anhang

13.1 Geräte

Fluoreszenz-Mikroskop DM 2000	Leica, Wetzlar
Kamera DFC450C	Leica, Wetzlar
Kryostat Leica CM1950	Leica, Wetzlar
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P2	Gilson Inc., Middletown, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P10	Gilson Inc., Middletown, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P20	Gilson Inc., Middletown, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P1000	Gilson Inc., Middletown, USA
Schüttler Titramax 101	Heidolph, Schwabach
Vortexer M21/1	Frane G
Vortexer Ikanag KMC-1	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau
Zentrifuge klein	unbekannt
Zentrifuge groß	unbekannt

13.2 Software

Citavi 6	Zitationsprogramm
Fiji-ImageJ (Version 1.51n)	Auswertung der Schweißdrüseninnervation
GraphPad Prism 7	Statistische Auswertung
Leica Application Suite (Version 4.7.1)	Aufnahme und Ausmessung der Schweißdrüsen bzw. Hautareale

13.3 Verbrauchsmaterialien

2-Methylbutan	Merck, Darmstadt
24-well Platten	Becton-Dickinson, New Jersey, USA
Objektträger Superfrost	Langenbrinck, Emmendingen
Deckglässchen (24x50 mm)	Roth, Karlsruhe
Nitrilhandschue	Ansell, Belgien
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10 µl)	Nerbe Plus, Winsen-Luhe
Parafilm M Verschlussfolie	Parafilm, Oshkosh, WI, USA
Tissue-Tek	Sakura, The Netherlands
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Fluoroshield Mounting Medium with Dapi 20ml	Abcam, Cambridge, UK

13.4 Zusammensetzung der Gebrauchslösungen

Antikörper-Verdünnungslösung: 1g BSA (Kühlschrank)
0,3 ml (besser 0,3g abwiegen) Triton X 100
0,1 ml (besser 0,1g abwiegen) Tween 20
auf 100 ml 0,1M PBS bei 4°C lagern

<u>10x PBS-Stammlösung:</u>	<u>für 500 ml</u>	<u>für 1 L</u>
NaH ₂ PO ₄ ~H ₂ O	2,6 g	5,2 g
Na ₂ HPO ₄ ~H ₂ O	6,22 g	12,44 g
NaCl	38,0 g	76,0 g

PH-Wert auf 7,4 mit 1 N NaOH einstellen

Für den Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

0,1% Triton-PBS:

- 0,1ml (besser 0,1g abwiegen) Triton X 100 auf 100ml 0,1M PBS

Zamboni-Lösung:

- 20g Paraformaldehyd zu 150ml Pikrinsäurelösung und für 2 Stunden bei 60°C in den Wärmeschrank stellen
- mit verdünnter 2,5% NaOH tropfenweise neutralisieren bis die Lösung klar ist
- Filtrieren und mit Phosphatpuffer (1xPBS) auf 1000ml auffüllen

10%-Succrose-Lösung:

- 10g Succrose in 100ml 1xPBS auflösen

13.5 Skalierung des Fluoreszenzmikroskop Leica DM 2000

Als Referenzwerte für das Raster zur Darstellung der Schweißdrüseninnervation von Gibbons et al. (2009), das aus leeren Kreisen besteht, wird pro Kreis ein Durchmesser von 10 μm angegeben. Die Kreise stehen in einem horizontalen Abstand von 50 μm und vertikal 25 μm zueinander (Abb. 13). Da die Skalenverhältnisse bei ImageJ in Pixel angegeben werden, müssen die obenstehenden metrischen Angaben entsprechend in Pixel umgerechnet werden. Zunächst muss dafür das Verhältnis aus Pixel und Millimeter für das entsprechende Mikroskop (hier Leica DM 2000) sowie die jeweiligen Objektive bestimmt werden. Dafür wurde in dieser Arbeit ein Lineal unter dem Mikroskop mit dem 5-fach Objektiv platziert und eine Strecke von 2 mm abgemessen (Abb. 27A). In ImageJ wurde anhand dieser Strecke die Anzahl der entsprechenden Pixel bestimmt und auf die

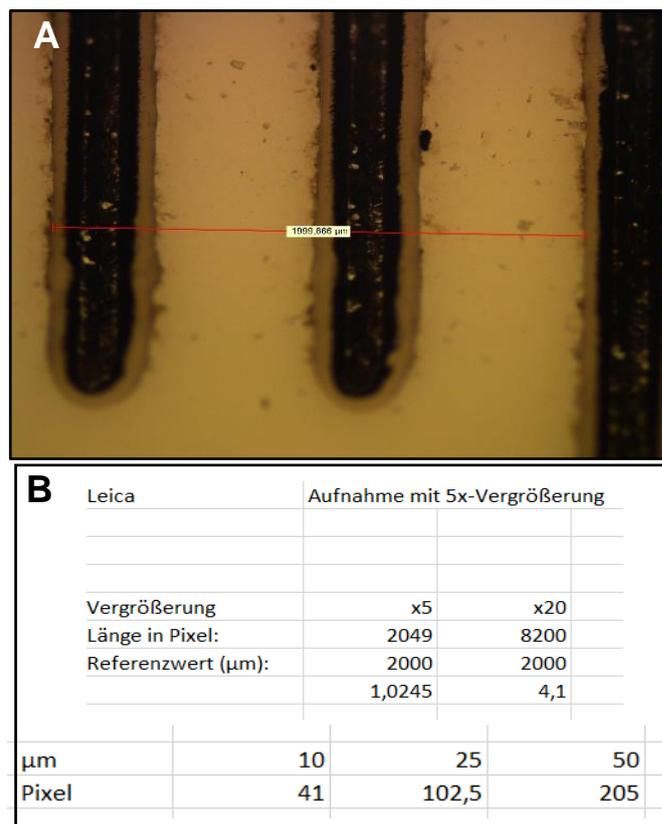


Abbildung 27: Vorgehen zur Skalierung von metrischen Verhältnissen in Pixel. Referenzstrecke für die Skalierung in ImageJ (A) und Umrechnung der metrischen Werte in Pixel entsprechend der Vergrößerung des Objektivs (B)

20-fach Vergrößerung für die Aufnahme der Schweißdrüsen umgerechnet (Abb. 27B). Für das Objektiv mit 20-facher Vergrößerung ergeben sich somit für den Durchmesser der Kreise 41 Pixel, für den horizontalen Abstand 205 Pixel und den vertikalen 102,5 Pixel.

13.6 Protokoll Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für PGP 9.5 und Anti-MBP Antikörper

Je sechs 50-µm große Schnitte pro Biopsie in einem Well

0,1% Triton X-100/PBS => 0,1g Triton auf 100g Gebrauchslösung PBS

1. Tag

3 x 10 min waschen mit 0,1% Triton X-100/PBS

Inkubation mit Primäantikörpern über Nacht bei RT auf Schüttler (500 µl pro Well)

PGP 9.5 1:1000

Anti-MBP 1:250

+ Antikörperverdünnungslösung (Zusammensetzung siehe Anhang 13.4)

2. Tag

3) 3 x 15 min waschen mit 0,1% Triton X-100/PBS

4) Inkubation mit Sekundäantikörpern bei RT auf Schüttler über 3 Stunden (470 µl pro Well)

- Ab diesem Punkt auf Arbeiten im Dunkeln achten -

Vor Benutzung der Sekundär-Antikörper (AK), diese in Original-Röhrchen kurz zentrifugieren (auf 2000 rpm und sofort wieder auf Stopp stellen). Nach Mischung der Sekundär-Ak mit Antikörperverdünnungslösung die Falconröhrchen auf 3000 rpm zentrifugieren und dann die Drehzahl auf 0 zurückstellen. Vor Inkubation mit Sekundär-Ak Wachlösung möglichst komplett absaugen. Cave: Beim Übertragen der Sekundär-Ak aus den Original-Röhrchen bzw. den Falconröhrchen nicht vom Boden pipettieren!

Alexa Fluor 488 1:1000

Alexa Fluor 568 1:500

+ Antikörperverdünnungslösung (Zusammensetzung siehe Anhang 13.4)

5) 3 x 15 min waschen mit 0,1M PBS

6) Schnitte auf Objektträger bringen

7) 1,5h im Dunkeln trocknen lassen

8) Mit Fluoreszenz-Mounting Medium mit DAPI (Abcam) eindecken

14 Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Original Artikel

Jonas Görlach, Daniel Amsel, Heike Kölbl, Michelle Grzybowski, Frank Rutsch, Hannah Schlierbach, Arnaud Vanlander, Esther Pogatzki-Zahn, Kathrin Habig, Stefanie Garkisch, Verena Müller, Thorsten Fritz, Andreas Ziegler, Andreas Hahn, Heidrun H. Krämer, Rudy Van Coster, Anne Schänzer: Diagnostic utility of small fiber analysis in skin biopsies from children with chronic pain. *Muscle and Nerve*, January 2020, 61:173–181

Case Report

Anne Schänzer, **Jonas Görlach**, Kerstin Claudi, Andreas Hahn: Severe distal muscle involvement and mild sensory neuropathy in a boy with infantile onset Pompe disease treated with enzyme replacement therapy for 6 years. *Neuromuscular Disorders*, June 2019, Volume 29, Issue 6, 477 – 482

Präsentation auf wissenschaftlichen Symposien:

Poster

J. Görlach, A. Hahn, Y. Heidenreich, A. Vanlander, R. Van Coster, A. Schänzer. Die Bedeutung morphometrischer Analysen von Hautstanzbiopsien für die Beteiligung kleiner Nervenfasern bei Kindern mit Schmerzsyndrom. *44. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie, Bad Nauheim 2017. Neuropediatrics 2017; 48(S 01): S1-S45*

J. Görlach, A. Hahn, Y. Heidenreich, A. Vanlander, R. Van Coster, A. Schänzer. Die Bedeutung morphometrischer Analysen von Hautstanzbiopsien für die Beteiligung kleiner Nervenfasern bei Kindern mit Schmerzsyndrom. *Science-Day 2017 des Fachbereichs 11 - Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen*

J. Görlach, A. Hahn, A. Vanlander, F. Rutsch, K. Habig, M. Grzybowski, T. Fritz, H. Kölbl, A. Ziegler, V. Müller, R. Van Coster, A. Schänzer. Small nerve fiber involvement in children and adolescents with pain syndrome
Neurowoche der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Berlin 2018. Prämiert mit dem Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie (DGNN)

Vortrag

A. Schänzer. Small Fiber Neuropathie und Small Fiber Pathologie im Kindesalter
Neurowoche der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Berlin 2018.

15 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehendspezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

16 Danksagung

Zunächst spreche ich Frau PD Dr. med. Anne Schänzer einen besonderen Dank für eine äußerst engagierte Betreuung, die große Hilfsbereitschaft und die steten, konstruktiven Diskussionen aus.

Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Till Acker für die Unterstützung und die Zurverfügungstellung des Labors am Institut für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität bedanken.

Auch danken möchte ich allen Mitarbeiter*innen des Instituts für Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, aber insbesondere Hannah Schlierbach und Angela Roth, für die tatkräftige Unterstützung bei der Planung, der Einarbeitung in die labortechnischen Gegebenheiten und bei der Durchführung dieser Arbeit, sowie Daniel Amsel für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freund*innen bedanken, die mich sowohl im Studium als auch bei der Anfertigung der Dissertation von Anfang an unterstützt und begleitet haben.

17 Tabellarischer Lebenslauf

In diesem Exemplar nicht enthalten.