

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. K. Faßbender**

**Untersuchungen zur Möglichkeit der histologischen Polyneuropathie -
Diagnostik durch morphometrische Quantifizierung der perivaskulären
Innervation der menschlichen Haut**

**Investigations of the option for histological polyneuropathy diagnostics
through morphometric quantification of the perivascular innervation of
human skin**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2006**

**Vorgelegt von
Marcus E. Möllenberg
geb. am 08.06.1973 in Porto/Portugal**

Tag der Promotion:

Dekan:

Berichterstatter:

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Summary	3
2 EINLEITUNG	5
2.1 Epidemiologie	5
2.2 Historischer Abriß zur Erforschung der kutanen Innervation und Konsequenz für die Polyneuropathie-Diagnostik	5
2.3 Fragestellung	7
3 MATERIAL UND METHODIK.....	9
3.1 Material	9
3.2 Methodik	9
3.2.1 Konservierung und Verarbeitung der Hautbiopsien	9
3.2.2 Färbetechnik	10
3.2.3 Inkubationstechnik.....	12
3.2.4 Vollständiger Färbeablauf/ Rezeptur	12
3.2.5 Digitaler Bildverarbeitungsprozeß.....	20
3.3 Morphometrische Basisparameter und Terminologie	26
3.4 Histomorphologisches Polyneuropathiekriterium	28
3.4.1 Einteilung des Patientenkollektivs in neuropathische und nicht neuropathische Fälle....	28
3.5 Statistische Bearbeitung	29
3.5.1 Diskriminanzanalyse.....	29
4 ERGEBNIS	31
4.1 Einleitung	31
4.2 Patientenkollektiv	31
4.3 Differenzierung der Gefäße in Arterien und Venen nach morphologischen und methodischen Gesichtspunkten	32
4.4 Deskriptive Statistik morphologischer Basisparameter der perivaskulären Innervation.....	35
4.4.1 Vergleich der perivaskulären Innervationsparameter zwischen Arterien und Venen der Zehen- und Caput metatarsale Haut.....	35
4.4.2 Vergleich der perivaskulären Innervationsdichte zwischen Arterien und Venen der Zehen- und Caput metatarsale Haut.....	36
4.5 Intrakutane Häufigkeit der Gefäße im Gesamtkollektiv	37

4.6	Anschnittkategorien und Durchmesser- verteilung der Gefäße der Zehen- und Caput metatarsale Haut.....	38
4.6.1	Verteilung der Gefäßdurchmesser der Arterien	39
4.6.2	Verteilung der Gefäßdurchmesser der Venen.....	40
4.7	Zusammenhang zwischen der intraindividuellen perivasculären Nerven- faserflächendichte und dem Gefäßdurchmesser	40
4.8	Intraindividuelle Korrelation der perivasculären Innervation zwischen Arterien und Venen innerhalb eines Hautareals.....	41
4.8.1	Korrelation der perivasculären Nerven- faserflächendichte und Nerven- faserpartikeldichte zwischen Arterien und Venen eines Hautareals.....	41
4.8.2	Vergleich der quantitativen Nerven- faserflächendichte und Nerven- faserpartikeldichte zwischen Arterien und Venen eines Hautareals.....	43
4.9	Intraindividuelle Korrelation der perivasculären Gefäßinnervation zwischen der Zehen- und Caput metatarsale Haut	44
4.9.1	Korrelation der periarteriellen Nerven- faserflächendichte zwischen der Z- und CM- Haut	44
4.9.2	Korrelation der periarteriellen Nerven- faserpartikeldichte zwischen der Z- und CM- Haut	45
4.9.3	Korrelation der perivenösen Nerven- faserflächendichte zwischen der Z- und CM-Haut	46
4.9.4	Korrelation der perivenösen Nerven- faserpartikeldichte zwischen der Z- und CM- Haut	46
4.10	Korrelation zwischen der perivasculären Innervationsdichte der Z- und CM-Haut und Dichtewerten des Nervus tibialis.....	47
4.10.1	Korrelation zwischen der perivasculären Innervation der Arterien der Metatarsalhaut und dem N. tibialis.....	48
4.10.2	Korrelation zwischen der perivasculären Innervationsdichte der Venen der Metatarsalhaut und dem N. tibialis	48
4.10.3	Korrelation zwischen der perivasculären Innervationsdichte der Arterien der Zehenhaut und dem N. tibialis.....	49
4.10.4	Korrelation zwischen der perivasculären Innervationsdichte der Venen der Zehenhaut und dem N. tibialis.....	49
4.11	Korrelation der perivasculären Innervationsdichte der CM- und Z-Haut mit Nervenfasersubpopulationen des Nervus tibialis.....	50
5	DISKUSSION	52

5.1 Die Quantifizierung der perivaskulären Innervation der Fußsohlenhaut im Kontext der bisher beschriebenen Methoden histologischer Polyneuropathiediagnostik an der Haut.....	52
5.2 Allgemeine Beurteilung des Verfahrens.....	53
5.3 Patientenkollektiv.....	53
5.4 Methodik.....	54
5.4.1 Fixierung und Schnitttechnik.....	54
5.4.2 Anwendung von Protein Gene Produkt 9.5.....	54
5.4.3 Detektionsmethode.....	55
5.4.4 Artefaktmöglichkeiten, ihre Minimierung und Färbekontrolle.....	56
5.5 Interaktives bildanalytisches Verfahren.....	56
5.6 Untersuchung der Hautschichten.....	57
5.6.1 Wahl des Biopsieortes.....	58
5.7 Stereologische Aspekte der Bearbeitungsmethode.....	58
5.8 Die perivaskuläre Innervation der Arterien und Venen im Gesamtkollektiv.....	59
5.9 Kriterien der Gefäßdifferenzierung.....	60
5.10 Hautstanzbiopsie und intrakutanes Gefäßvorkommen.....	60
5.11 Differentialindikation der Suralis- und der Hautbiopsie.....	61
5.12 Die Hautbiopsie und ihre Wertigkeit im Vergleich zu etablierten Diagnoseverfahren.....	61
5.12.1 Elektrophysiologische Untersuchungsverfahren.....	61
5.12.2 Die Stanzbiopsie der Haut.....	62
5.13 Aspekte der small-fiber und large-fiber Neuropathie.....	63
5.14 Die Rolle des N. tibialis in der Polyneuropathiediagnostik.....	63
5.14.1 Klassifizierungskriterien für das Vorliegen einer neuropathischen Schädigung des N. tibialis.....	64
5.14.2 Beziehung der Hautinnervation der Fußsohle zu den Fasersubpopulationen des N. tibialis.....	64
5.15 Kritik und Empfehlung.....	65
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	66
7 PUBLIKATIONEN / DANK.....	73
8 LEBENSLAUF.....	76

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Standardverfahren zur histologischen Beurteilung einer Polyneuropathie ist die Biopsie des sensiblen N. suralis. Nicht alle Läsionsvarianten einer Neuropathie (z. B. Beteiligung autonomer Fasern) lassen sich mit diesem etablierten Verfahren zufriedenstellend nachweisen. Wünschenswert wäre es, die histologische Diagnostik der Polyneuropathien durch minimal-invasive Hautbiopsien zu ergänzen.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit ist die Überprüfung der Frage, ob eine morphometrisch-quantifizierende Analyse der kutanen, perivaskulären autonom-vegetativen Innervation möglich ist. Hierdurch wäre eine Neuropathie am Ort der viszero-efferenten Effektorstruktur frühzeitig diagnostizierbar.

Die Biopsie des N. suralis geht einher mit dem irreversiblen Verlust des Nerven und seiner sensorischen Qualitäten im Versorgungsgebiet, zusätzlich bestehen die bekannten Operationsrisiken. Die minimal-invasive Hautstanzbiopsie vermeidet diese Probleme. Die beliebige Wiederholbarkeit, z. B. im Rahmen einer Verlaufskontrolle, sowie die potentiell an jeder Stelle des Körpers mögliche Entnahme der Probe wären weitere Vorteile dieses Verfahrens.

Das für diese Untersuchung verwandte Untersuchungsmaterial wurde von insgesamt 35 Verstorbenen im Rahmen regulärer Obduktionen am Pathologischen Institut der Universität des Saarlandes gewonnen. Eine Selektion nach Erkrankungen oder Alter fand nicht statt. Die Hautproben wurden in Längsrichtung aus zwei Stellen der Leistenhaut des Fußes entnommen: Zum einen aus der plantaren Seite der Phalanx distalis digiti I, zum anderen aus der Leistenhaut in Höhe des Caput ossis metatarsalis I. Zu Vergleichsmessungen wurden die peripheren Nerven mit entnommen: Der N. suralis wurde am Übergang des mittleren zum distalen Wadendrittel, der N. tibialis hinter dem Malleolus medialis der ipsilateralen Extremität reseziert.

Nach Fixierung der Hautproben wurden Serienschnitte im Kryostaten angefertigt. Anschließend wurden die Nervenfasern mit einem polyklonalen Antikörper gegen den panneuralen Marker (PGP 9.5) dargestellt. Mit dem Bildanalysesystem IBAS 2.5 wurde das histologische Präparat digitalisiert und morphometrisch analysiert. Zur Quantifizierung der perivaskulären Innervationsdichte von Arterien und Venen des Koriums und der Subcutis wurde ein spezielles Softwareprogramm in IBAS 2.5 von uns entwickelt, mit dem in einem halbautomatischen Bildanalyseverfahren neben der Quantifizierung der perivaskulären Innervation selbst auch eine morphologische Bearbeitung der kutanen Gefäße möglich war. Somit konnten Gefäß- und Innervationsmorphometrie zueinander in Bezug gesetzt werden. Da zusätzlich morphometrische

Daten zur Neuropathie in den peripheren Nerven (N. tibialis und N. suralis) zur Verfügung standen, konnten bislang nicht untersuchte Zusammenhänge einer peripheren Polyneuropathie zur autonom-vegetativen perivaskulären Innervation analysiert werden.

In dem untersuchten Kollektiv wiesen die peripheren Nerven (N. suralis und N. tibialis) einen hohen Anteil polyneuropathischer Veränderungen von ca. 60 % bis 80 % auf (Parameter: mittlere Myelinscheidendichte pro Endoneuralfläche). Anhand der Krankengeschichte konnten für 46 % der Patienten Indizien für eine polyneuropathische Vorschädigung identifiziert werden (Diabetes mellitus, Alkoholismus, Medikation, Neoplasien). Bei 37 % lagen keine Informationen für neurotoxische Faktoren vor.

Belegt werden konnte, dass das hier angewandte, bildanalytische Verfahren zum einen eine ausreichend hohe Diskriminierung der Gefäßarten, zum anderen die quantitative Auswertung der perivaskulären Innervation von Arterien und Venen erlaubt.

Es konnte gezeigt werden, dass zwischen den Biopsieorten der Großzehenhaut und der metatarsalen Mittelfußhaut ein signifikanter Zusammenhang der periarteriellen Innervationsdichte besteht und neuropathische Prozesse an unterschiedlichen Entnahmestellen des gleichen Individuums regelhaft und gleichsinnig ablaufen.

Der Nachweis eines statistischen Zusammenhangs zwischen der mittleren Myelinscheidendichte pro Endoneuralfläche des N. tibialis und der mittleren perivaskulären Innervationsdichte der kutanen Gefäße der plantaren Großzehen- und metatarsalen Mittelfußhaut konnte nicht erbracht werden. Hieraus ist zu schließen, dass die Hautgefäßnerven und die großen Nerven (hier N. tibialis) durch neuropathische Einflussfaktoren in ihrem histologischen Bild unterschiedlich beeinflusst werden. Es ist anzunehmen, dass sich neuropathische Prozesse in voneinander unabhängiger Art und Weise am jeweiligen Abschnitt (großer Nerv bzw. Endstrecke der Innervation in der Haut) ausprägen. Die Nerven- und Hautbiopsie sind deshalb nicht redundant, sondern ergänzen sich in ihrem diagnostischen Stellenwert.

Durch die hier angewandte biopsische und histomorphometrische Technik konnte gezeigt werden, dass Hautbiopsien zur quantitativen Polyneuropathieanalyse verwendbar sind. Die diagnostische Aussagekraft der morphometrischen Quantifizierung der Hautinnervation kann als zusätzliches Instrument zu den etablierten Verfahren der Polyneuropathiediagnostik genutzt werden. Damit erhält man ein flexibles Instrument für besondere Fragestellungen im Management von Polyneuropathien, die eine wiederholte Diagnostik im Krankheits- und Behandlungsverlauf wünschenswert erscheinen lassen.

1.1 Summary

Investigations of the option for histological polyneuropathy diagnostics through morphometric quantification of the perivascular innervation of human skin

The standard procedure for histological examination of polyneuropathies is a biopsy of the sensory sural nerve. But this procedure does not define the different forms of neuropathy (e.g. the involvement of autonomous fibres) with the same sensitivity. It would be helpful to complete the histological diagnosis of polyneuropathies by minimally invasive skin biopsies and morphometric analysis of the most distal nerve segments.

The purpose of the present work is to explore the question of whether a morphometric quantification of the cutaneous, perivascular autonomic vegetative innervation is feasible. If so, it would make possible an early diagnosis of neuropathies at the site of the visceromotor effector structure possible.

A biopsy of the sural nerve is associated with an irreversible loss of the nerve and sensation in its area. In addition, the known operation risks must be considered. A minimally invasive punch biopsy of the skin avoids these problems. Further advantages of this procedure would be that it can be repeated as often as necessary, for example during follow-up examinations. Finally, it may be possible to take a sample from any part of the body.

The test material used for the present investigation was taken during regular autopsies of a total of 35 deceased in the Institute of Pathology of the University of the Saarland. No selection was made according to diseases or age. The skin samples were taken longitudinally from two places on the sole of the foot: first from the plantar side of the distal phalanx of digit I and secondly from the skin of the sole at the level of the head of metatarsal bone I. For comparative analyses peripheral nerves were also removed: the sural nerve was resected at the transition from the medial to the distal third of the calf, and the tibial nerve behind the medial malleolus of the ipsilateral leg.

After the skin samples had been fixed, cryostat serial sections were made. The nerve fibres were then detected with a polyclonal antibody against the panneural marker (PGP 9.5). Using the IBAS 2.5 image analysis system the histological preparation was digitalised and analysed morphometrically. We developed a special software programme in IBAS 2.5 to quantify the perivascular innervation density of the arteries and veins in the corium and the subcutis. By this programme it was possible, in a semi-automatic image analysis procedure, both to quantify the perivascular innervation and to define the cutaneous vessels morphologically. In this way it was

possible to correlate vascular and neural morphometry. Since additional morphometric data were gained about neuropathic changes in the peripheral nerves (tibial and sural nerves), a possibility was created to analyse putative correlations between a polyneuropathy of nerve stems and the autonomic vegetative perivascular innervation.

In the samples investigated, sural and tibial nerves showed a high proportion of neuropathic changes, namely about 60% to 80% (parameter: median myelin sheath density per endoneural surface). Using the patient history, it was possible to identify reasons for neuropathic damage in 46% of the patients (Diabetes mellitus, alcoholism, medication, neoplasia). In 37% of the cases neurotoxic factors were absent.

It was shown that the image analysis procedure used here, allows a sufficiently high discrimination of vessel types and is able to quantify the perivascular innervation of arteries and veins.

It could be also shown that there is a significant intraindividual correlation of the periarterial neural innervation density of skin biopsy of the great toe and of the metatarsal foot. This allows to conclude that neuropathic processes occur evenly at different bioptic points.

According to Spearman's rank correlation it was not possible to provide evidence of a relationship between the median myelin sheath density per endoneural surface of the tibial nerve and the median perivascular innervation density of the cutaneous vessels of the plantar great toe or metatarsal foot skin. One can conclude that the skin vessel nerves and the large nerves (in this case the tibial nerve) are damaged by neuropathic factors in different ways or to different morphologic extent. Therefore nerve and skin biopsies are not redundant diagnostic tools, but supplement each other in their diagnostic information.

By means of the bioptic and histomorphological techniques used here, it could be shown that skin biopsies may be helpful in quantitative analysis of polyneuropathies. The morphometric quantification of the skin innervation may be used as a supplementary instrument along with established procedures for diagnosis of neuropathies. In this way we acquire a flexible instrument for particular questions in the management of polyneuropathies, which make repeated stagings desirable during their course or ongoing treatment.

2 EINLEITUNG

2.1 Epidemiologie

Exakte epidemiologische Zahlen, die die weltweite Verbreitung der Polyneuropathien widerspiegeln, liegen aufgrund stark schwankender regionaler Unterschiede nicht vor. Man schätzt die Prävalenz weltweit auf ca. 40/100000 Einwohner (Masuhr et al., 1996), wobei die Tendenz steigend ist. In Europa stellen der Diabetes mellitus mit einer Prävalenz von ca. 7 % und die Alkoholkrankheit mit einer Prävalenz von schätzungsweise 5 % in der Bevölkerung mit Abstand die häufigsten Polyneuropathie-Ursachen dar (KoDiM-Studie, IFT-Institut für Therapieforschung/München (2002)). In unterentwickelten Ländern sind es eher Infektionskrankheiten wie Lepra oder auch Malnutrition. Die daraus resultierenden Komplikationen (z. B. das diabetische Fußsyndrom mit seinen einhergehenden Risiken für den Patienten und entstehenden Folgekosten) spielen auch gesundheitsökonomisch eine wichtige Rolle. Hieraus werden sich verstärkte Präventionsanstrengungen ergeben müssen, z. B. durch eine verbesserte Diagnostik.

2.2 Historischer Abriss zur Erforschung der kutanen Innervation und Konsequenz für die Polyneuropathie-Diagnostik

Die Anwesenheit von freien Nervenendigungen in der menschlichen Epidermis wurde vor 135 Jahren erstmals von Paul Langerhans beschrieben (LANGERHANS, 1868). Seine durch die Gold-Chlorid-Färbemethode gewonnenen Ergebnisse wurden viele Jahrzehnte lang von einem Teil der Wissenschaftler bestätigt (WEDDELL et al., 1955; MILLER et al., 1958; ARTHUR and SHELLEY, 1959; RIDLEY, 1969), von anderen aufgrund der unsensitiven Färbemethode jedoch verneint (BOZETAT, 1908; WOOLLARD, 1936). KADANOFF (1928) fand im Rahmen seiner zellbiologischen Forschung zwar intraepidermale Nervenendigungen in der menschlichen Haut, fügte jedoch auch hinzu, dass die interindividuelle Variationbreite beträchtlich sei. Im Jahr 1959 konnten Arthur und Shelley erstmals ein dreidimensionales Verteilungsbild von unmyelinisierten intraepidermalen Nervenfasern mit einer Methylenblau-Färbung erstellen und somit nicht nur das Vorhandensein bestätigen, sondern auch die Morphologie näher beschreiben. Nachdem CHOUCHKOV (1974) elektronenmikroskopisch keine intraepidermalen Nervenfasern nachweisen konnte, beriefen sich während der folgenden 15 Jahre sämtliche Publikationen auf diesem Gebiet auf die Ergebnisse von CHOUCHKOV. Kontroversen bezüglich der Zuverlässigkeit der Methylen-Blau-Färbung (WINKELMANN, 1988), die bis dahin neben der

Versilberungstechnik (NOVOTNY and GOMMERT-NOVOTNY, 1988) gängige Methode war, konnten erst durch das Einsetzen von immunhistochemischen Methoden, insbesondere durch die Verwendung von Färbungen des Protein-Gen-Produkts 9.5 Anfang der 80er Jahre definitiv ausgeräumt werden (THOMPSEN et al., 1981, 1988). Im Verlauf der 80er Jahre wurden weitere Neuropeptide (Substanz-P, Neurokinin A, Neuropeptid Y, CGRP, VIP) und ihr Bezug zu Hautnerven immunhistochemisch untersucht (DALSGAARD et al., 1982, 1983, 1985, 1986, 1988; BJÖRKLUND et al., 1986). Die immunhistochemische Färbung mit dem panneuralen Marker PGP 9.5 stellte sich zum Ende der 80er Jahre als konstanteste Färbemethode heraus, um axonales Zytoplasma und damit kutane Nerven zu detektieren (DALSGAARD et al., 1989; WANG et al., 1990). Darauf basierend folgten wissenschaftliche Studien, die sich mit der nun verbesserten Möglichkeit der Nervenquantifizierung intraepidermaler Nervenfasern beschäftigten, die bis zu diesem Zeitpunkt nur mit Methylenblau bzw. Silberfärbung unbefriedigend erforscht werden konnten (NOVOTNY et al., 1988). Anfängliche Versuche zur Quantifizierung der Innervationsdichte erfolgten mit rein subjektiv-vergleichenden mikroskopischen Verfahren. Die Nervenfasermenge wurde durch den Untersucher semiquantitativ nach willkürlichen Gesichtspunkten in Abstufungen von fehlend bis stark vorhanden bewertet (LEVY et al., 1989). Durch den Innovationsprozeß wurden im gleichen Zuge neue computerunterstützte mikroskopische Verfahren entwickelt, die durch spezielle Software präzisere Fragestellungen beantworten konnten und somit insbesondere der Quantifizierungsmöglichkeit nervaler Strukturen der Haut einen wesentlichen Impuls verliehen. Die Elektronenmikroskopie bestätigte zwar all diese Befunde, rückte dabei aber selbst in den Hintergrund (KENNEDY et al., 1993). EDV-unterstützt ließen sich nun beispielsweise dreidimensionale Darstellungsmodelle der intraepidermalen unmyelinisierten Nervenendigungen errechnen und damit die Untersuchungen von ARTHUR und SHELLEY (1959) im Nachhinein bestätigen (KENNEDY et al., 1996). Nachdem erste wissenschaftliche Untersuchungen ergeben hatten, dass enge Korrelationen zwischen einer Reduktion intraepidermaler Nervenfasern und der Progredienz polyneuropathischer Symptome im Rahmen eines Diabetes mellitus bestanden, folgte eine Ausweitung des Untersuchungsfeldes auf Hautschichten unterhalb der Epidermis, wobei die Nervenquantifizierung insbesondere am subepidermalen Nervenplexus und an den Schweißdrüsen im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses stand (TERENGIHI et al., 1991; LEVY et al., 1992; PROPERZI et al., 1993; MCCARTHY et al., 1995). In der Tat konnten auch hier Korrelationen zwischen einer Abnahme der Nervenfaserdichte und der Schwere einer diabetischen Polyneuropathie nachgewiesen werden (KENNEDY et al., 1994, 1996).

Hintergrund dieser wissenschaftlichen Bemühungen war es festzustellen, ob anhand einer einfach durchführbaren Hautbiopsie aus dem Bereich der Innervationsstörung relevante Rückschlüsse auf eine diabetische Polyneuropathie gezogen werden könnten. Damit sollte auf eine Gewebeprobe des sensiblen N. suralis verzichtet werden, die bislang als einzige Methode einer histomorphologisch nachweisbaren peripheren Polyneuropathie galt. Ein weiterer Vorteil dieser minimal invasiven Methode gegenüber der Nervenbiopsie wäre z. B. die beliebige Wiederholbarkeit im Verlauf eines Krankheits- und Behandlungsprozesses (z. B. im Rahmen einer Pankreastransplantation oder Chemotherapie) oder auch die geringere Belastung der diagnostischen Maßnahme für den Patienten mit reduzierten Operationsrisiken (KENNEDY et al., 1996). Die Hautbiopsie liefert histologische Informationen zum neuropathischen Störungsmuster im Terminalgebiet der Innervation und der nervalen Interaktion mit den Effektor- bzw. Rezeptorstrukturen.

2.3 Fragestellung

Die Auswirkung einer peripheren Polyneuropathie auf die Innervationsdichte der perivaskulären Innervation ist bisher nicht quantitativ untersucht worden. Es sollte daher geklärt werden, ob die perivaskuläre Innervation ein geeigneter Parameter zur Bewertung einer Hautbiopsie als Parameter einer Polyneuropathie ist. Nachgewiesen ist bis jetzt eine korrelierende Reduktion der epidermalen unmyelinisierten Nervenfasern sowie der periglandulären Innervation der Glandulae sudoriferae mit der Schwere einer peripheren Polyneuropathie bei Diabetes mellitus (Kennedy et al., 1996).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist es, die perivaskuläre Innervation der distalen Fußsohlenhaut unter quantitativen Aspekten zu beurteilen und durch Anwendung spezieller gefäßmorphologischer Parameter Hinweise auf ein eventuell pathologisches Reaktionsmuster der autonomen Nervenfasern zu gewinnen. Um das Ausmaß einer peripheren Polyneuropathie am Ort der viszerofferenten Effektororgane (kutane Gefäße) durch eine Hautbiopsie objektivieren zu können, wurde mit einem selbst entwickelten Softwareprogramm auf der Basis eines halbautomatischen, bildanalytischen Verfahrens die perivaskuläre Innervationsdichte von Gefäßen der medialen Fußsohlenhaut (plantare Seite der Phalanx distalis digiti I und Höhe Caput ossis metatarsalis I) nach vorheriger immunhistochemischer Färbung mit Anti-PGP 9.5 quantifiziert. Die gewonnenen Parameter der Leistenhaut wurden nicht nur untereinander, sondern auch mit morphometrischen Parametern des zugehörigen N. tibialis in Bezug gesetzt, der dieses Hautareal sensibel innerviert. Ebenfalls untersucht wurde der N. suralis als histologischer Standard bei Fragen zu distalen Polyneuropathien. Da für diese spezielle Fragestellung keine vergleichbaren wissenschaftlichen

Publikationen und Daten existieren, mussten von der Färbemethode abgesehen, sämtliche histomorphologische Verfahren sowie Quantifizierungstechniken selber entwickelt, optimiert und schließlich interpretiert werden. Vor diesem Hintergrund war zu untersuchen, ob Anzahl und Art der Gefäße bzw. die Dichte der Gefäßinnervation und ihre Korrelation zu den peripheren Nerven (N. tibialis und N. suralis) unter neuropathischen Bedingungen diagnostisch verwertbar sind.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Material

Die Materialgewinnung erfolgte am Pathologischen Institut der Universität des Saarlandes. Bei insgesamt 35 Patienten wurden jeweils im Rahmen der regulären Obduktion zwei Gewebeproben aus der Leistenhaut des Fußes entnommen. Die Hautbiopsien wurden jeweils aus der plantaren Seite der Phalanx distalis digiti I (Großzehenendglied / Zehen-Haut / Z-Haut) und in Höhe des Caput ossis metatarsalis I (Fußballen / Caput metatarsale Haut / CM-Haut) eines jeden Patienten entnommen. Die streng in Längsrichtung resezierten Gewebeproben hatten eine mittlere Länge von 11 mm, eine Breite von 6 mm und eine Tiefe von 6 mm. Der Nervus suralis wurde am Übergang des mittleren zum distalen Wadendrittel und der Nervus tibialis hinter dem Malleolus medialis entnommen.

Das Zeitfenster zwischen dem Exitus letalis und der Gewebeentnahme bzw. der Konservierung belief sich im Mittel auf 22 Stunden, maximal jedoch auf 48 Stunden.

Das Patientenkollektiv wurde unabhängig von der zum Exitus führenden Grunderkrankung und ohne Selektion spezieller Krankheitsbilder ausgesucht und zusammengestellt. Die Altersverteilung lag mit einem Mittelwert von 62,5 Jahren in einem Bereich zwischen 35 bis 90 Jahren. 22 Patienten (63 %) waren männlich, 13 (37 %) weiblich. Retrospektiv konnten anhand der Patientenakten bei 16 (46 %) Patienten Indizien für polyneuropathische Belastungsfaktoren (Alkoholismus, Diabetes mellitus, Chemotherapien im Rahmen von Neoplasien und paraneoplastische Syndrome) aufgefunden gemacht werden. In 13 (37 %) Fällen lagen dokumentatorisch keine Anhalte für eine polyneuropathische Vorschädigung zugrunde, während bei 6 (17 %) Patienten aufgrund der fehlenden Dokumentation keine weiteren Aussagen über den peripher-neurogenen Status möglich waren.

3.2 Methodik

3.2.1 Konservierung und Verarbeitung der Hautbiopsien

Unmittelbar nach Entnahme der Gewebeproben aus der Großzehe und der Fußsohle wurden die Biopsien 24 Stunden lang bei Raumtemperatur in Zamboni-Lösung (4 % Paraformaldehyd + 14 % gesättigte Pikrinsäure) fixiert. Danach wurden die Präparate für 3 Tage bei 4 ° C in einer

phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS 0,01 M pH 7,2) ausgewaschen. Zur Lagerung und Vorbereitung der Schnittgewinnung am Kryostaten wurden die Präparate für die Schockgefrierung in N₂ - gekühltem Isopentan bei ca. -180 ° C in ein Einbettmedium (Jung tissue freezing medium[®], Firma Reichert-Jung, Nussloch, BRD) eingeschlossen. Diese Kunststoffverbindung verbessert die Schnittqualität durch eine stabilere Schnittführung des Kryostaten am Präparat. Zudem schützt sie das Gewebe vor Gefrierartefakten bei Lagerung und Präparation zur Schnittgewinnung. Eine optimale Schneidekonsistenz des Gewebes ergab sich bei einer Schnitttemperatur von -20 ° C. Die Gewebeproben wurden senkrecht zur Haut und parallel zur Längsachse der Entnahmerichtung in 7 µm dünne Scheiben geschnitten und in einer lückenlosen 4er Schnittserie pro Patient und Hautareal auf einen Objektträger gebracht.

3.2.2 Färbetechnik

Die immunhistochemische Darstellung der perivascular lokalisierten Nervenfasern erfolgte mit der Immunperoxidase-Methode (Dako[®] Manual, DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Denmark).

Der verwendete Primärantikörper Anti-PGP 9.5 (polyklonaler IgG-Antikörper aus Kaninchen-Serum) (Ultrasclone Ltd., Isle of Wight, UK), ist gegen einen zytoplasmatischen panneuralen Marker (Protein-Gen-Produkt 9.5) gerichtet.

Ein aus Ziegenserum hergestellter und biotylinierter Sekundärantikörper (IgG-Antikörper) reagierte im folgenden zum einen mit dem Primärantikörper, zum anderen über sein biotyliniertes Fc-Fragment mit einem Avidin-Molekül. Dessen drei weitere Bindungsstellen wurden zur Ankoppelung von biotylinierter Peroxidase genutzt. Somit fungiert der Sekundärantikörper als Brückenantikörper zwischen dem Primärantikörper und dem Avidin-Biotin-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, UK) (s. Abb. 3.1).

Durch die Peroxidase wurde eine Substrat-Chromogenreaktion ausgelöst. Das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) oxidiert und fällt (s. Abb. 3.2) durch diesen Oxidationsvorgang als unlösliches, gold-braunes Präzipitat am Ort der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung aus.

Um eine unspezifische Hintergrundfärbung des Präparates zu verhindern, die dadurch auftritt, dass sich die Primärantikörper unspezifisch an geladene Bindegewebelemente koppeln, wurden vor Zugabe des Primärantikörpers (Anti-PGP 9.5) diese Bindungsstellen durch eine neutrale

Proteinlösung (Non-Immuserum) abgesättigt. Folgende Schemata veranschaulichen die oben beschriebenen Zusammenhänge.

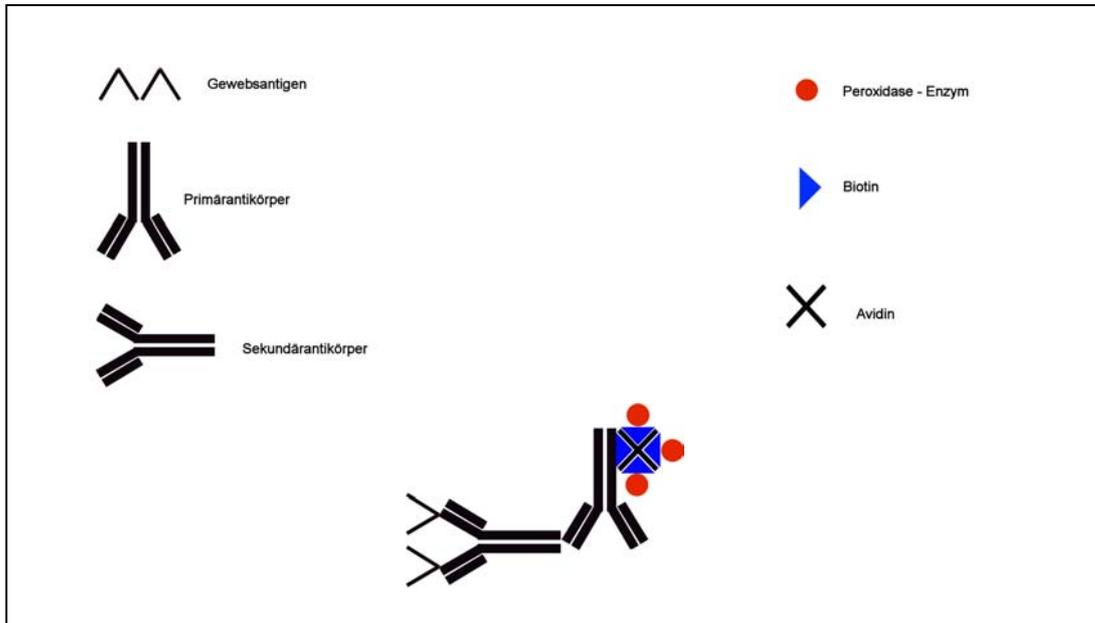


Abbildung 3.1
Komponenten der Immunperoxidase-Methode

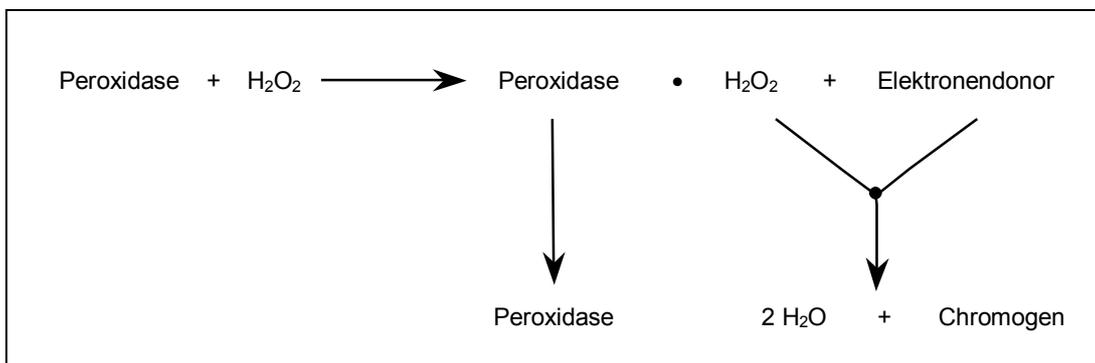


Abbildung 3.2
Reaktionsablauf der Substrat-Chromogenreaktion

Voraussetzung für eine exakte Lokalisation der nachzuweisenden Antigene ist, daß die Färbereaktion ausschließlich am Ort der Antikörperbindung abläuft. Deshalb muß eine mögliche endogene Peroxidaseaktivität (z. B. aus Blutzellen) durch die vorherige Zugabe von 3 % igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) irreversibel gehemmt werden.

Nachdem alle 4 Serienschnitte auf einem Objektträger gegen das Antigen gefärbt waren, wurde der jeweils erste Analyseschnitt mit Hämatoxylinblau gegengefärbt, um die Gefäße deutlich erkennen und kategorisieren zu können.

3.2.3 Inkubationstechnik

Für die Färbeprozedur kamen die ursprünglich für die Automatenfärbung entwickelten Coverplates™ (Thermo Shandon, Pittsburgh, USA) zum Einsatz. Dies sind auf die Präparateseite des Objektträgers installierte Kammern, die über dem Präparat einen kleinen Inkubationsraum entstehen lassen (ca. 80 µl pro Präparateträger), in dem sich durch Kapillarkräfte die Reagenz- bzw. Spüllösung gleichmäßig verteilt. Jeweils 10 Coverplate-Montagen wurden von einer Träger-Box aufgenommen. Hierdurch ergab sich ein effektiver sowie gleichzeitig gewebsschonender und sparsamer Umgang mit den teuren Reagenzien. Die unten berechneten Dosierungen sind immer für zehn Coverplates™ pro Box ausgelegt. Alle Hautareale eines Patienten (Zehen- bzw. CM-Haut) wurden gleichzeitig gefärbt, um homogene Bedingungen zu gewährleisten. Während eines jeden Färbvorganges wurde ein Kontrollschnitt eines immer gleichen Referenzpatienten mitgefärbt, um Färbeunregelmäßigkeiten auszuschließen (Positivkontrolle).

3.2.4 Vollständiger Färbeablauf / Rezeptur

1. Coverplate und Objektträger montieren
2. Einmaliges Spülen jedes Coverplate mit je 2 ml PBS

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) ⇒ pH 7,2

1,48 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)

0,43 g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)

7,2 g Natriumchlorid (NaCl)

500 µl Triton (Tris-hydroxymethylethylendiamin) zur Reduktion der Oberflächenspannung

Lösen der Salze in 1 Liter aqua dest.

3. Applikation von 100 µl 0,5 % igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in Methanol pro Coverplate. 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.

Wasserstoffperoxid – Lösung (Ansatz für 1 Box à 10 Coverplates)

167 µl 3 % iges Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

833 μ l Methanol

4. Zweimaliges Spülen jedes Coverplate mit je 2 ml PBS
5. Applikation von 100 μ l Ziegenserum 1 : 50 in PBS in jedes Coverplate. 15 min bei 37°C inkubieren.

Ziegenserum in PBS (Ansatz für 1 Kassette à 10 Coverplates)

20 μ l Ziegenserum

980 μ l PBS

6. Applikation von 100 μ l PGP 9.5 in Ziegenserum/PBS 1 : 4000 in jedes Coverplate. 12 h bei 37°C inkubieren.

Grundrezept für PGP 9.5 – Ansatz (Primärantikörper)

32000 μ l PBS

10 μ l PGP 9.5

9,75 μ g Natriumazid (Konservierungsstoff)

PGP 9.5 - Ansatz versetzt mit Ziegenserum

800 μ l PGP – Ansatz

200 μ l Ziegenserum

Endverdünnung: PGP 1 : 4000 in Ziegenserum/PGP- Ansatz 1 : 5

(Ansatz für 1 Kassette à 10 Coverplates)

7. Zweimaliges Spülen jedes Coverplate mit je 2 ml PBS
8. Applikation von 100 μ l biotinylierter Zweitantikörper in Ziegenserum/PBS 1:400 in jedes Coverplate. 1 h bei 37°C inkubieren.

Biotinylierter Zweitantikörper (Ansatz für 1 Kassette à 10 Coverplates)

2,5 μ l Zweitantikörper

20 μ l Ziegenserum

977,5 µl PBS

9. Zweimaliges Spülen jedes Coverplate mit je 2 ml PBS
10. Avidin-Biotin-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, UK) herstellen und vor Gebrauch 30 min bei 37°C ruhen lassen
11. Applikation von 100 µl Avidin-Biotin-Komplex 1:200 in jedes Coverplate. 1 h bei 37°C inkubieren.

Avidin-Biotin-Komplex

5 µl Avidin (Komplex A)

5 µl biotinylierte Peroxidase (Komplex B)

990 µl PBS

1000 µl → Ansatz für 1 Kassette à 10 Coverplates

12. Zweimaliges Spülen jedes Coverplate mit je 2 ml PBS
13. Applikation von 100 µl Diaminobenzidin-Substratlösung (DAB) in jedes Coverplate. 15 min bei Raumtemperatur inkubieren.

Diaminobenzidin-Substratlösung (DAB)

200 µl Dimethylformamid (DMS) (Lösungsvermittler)

6 mg Diaminobenzidin (DAB) (krebserregend !)

10000 µl PBS

100 µl 3 % iges Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Zu beachten ist die Mischungsreihenfolge

14. Zweimaliges Spülen jedes Coverplate mit je 2 ml PBS
15. Coverplate und Objektträger unter Spülung mit PBS auseinander bauen
16. Hämatoxylin-Gegenfärbung des ersten Serienschnittes

a) Eintauchen des ersten Serienschnitts für 30 sec in Hämatoxylin

b) Zweimaliges kurzes Spülen mit aqua dest.

c) Ca. 15 min in Leitungswasser bläuen

17. Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe

Alkoholreihe: 2 x 70 % → 2 min

2 x 96 % → 2 min

2 x 99,9 % → 2 min

1 x Xylol → 3 min

1 x Xylol → 5 min

18. Eindecken mit Deckglas

Die folgenden histologischen Bilder verdeutlichen die Ergebnisse nach durchlaufenem Färbeprogang. Dabei entspricht das erste Bild eines jeden Bilderpaares der Gegenfärbung mit Hämatoxylin, während das zweite Bild den ersten Analyseschnitt einer Serie darstellt und ausschließlich mit PGP 9.5 gefärbt ist.

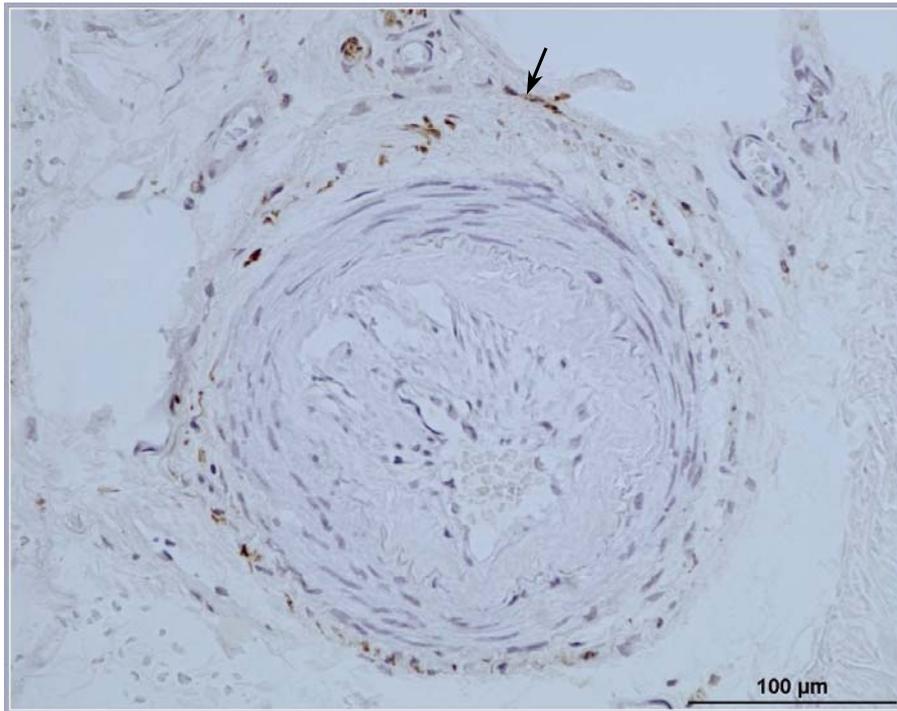


Abbildung 3.3
 Arteriole des Coriums (plantare Zehenhaut). Bräunlich angefärbt die adventitielle Gefäßinnervation durch PGP 9.5 (schwarzer Pfeil). Hämatoxylin gegengefärbt.

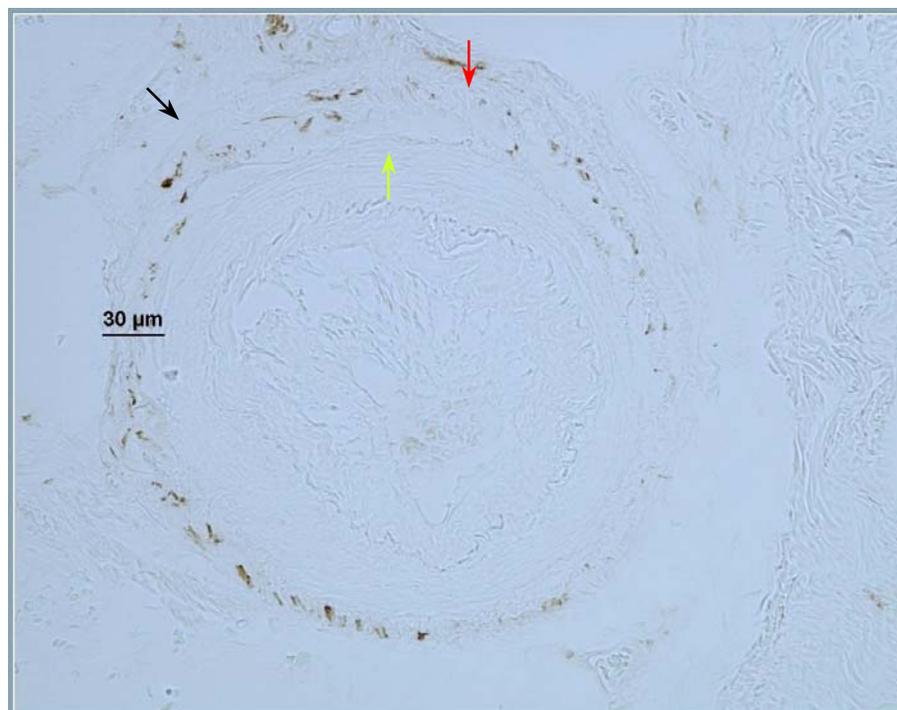


Abbildung 3.4
 Arteriole des Coriums, Serienschritt zu Abb. 3.3 ohne Hämatoxylin-Gegenfärbung. Isolierte Darstellung der axonalen, neuralen Strukturen (schwarzer Pfeil) für die Morphometrie. Die Membrana elastica interna (gelber Pfeil) und externa (roter Pfeil) bleiben erkennbar. PGP 9.5-Färbung

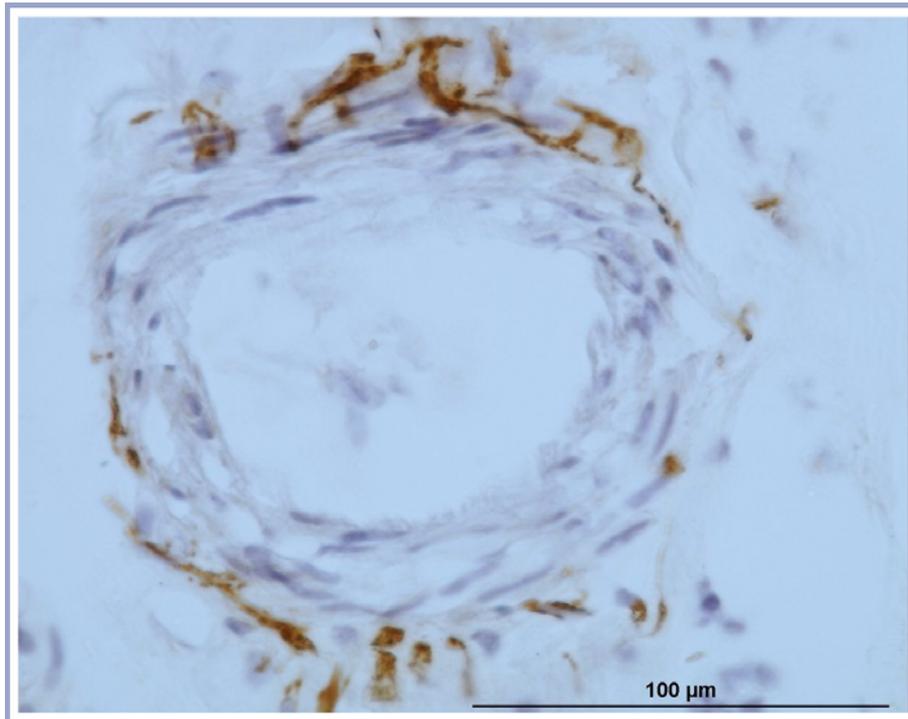


Abbildung 3.5
Arteriole des Coriums (plantar in Höhe des Caput ossis metatarsale I). Starker periarterieller Innervationsnachweis. Hämatoxylin- und PGP 9.5-Färbung

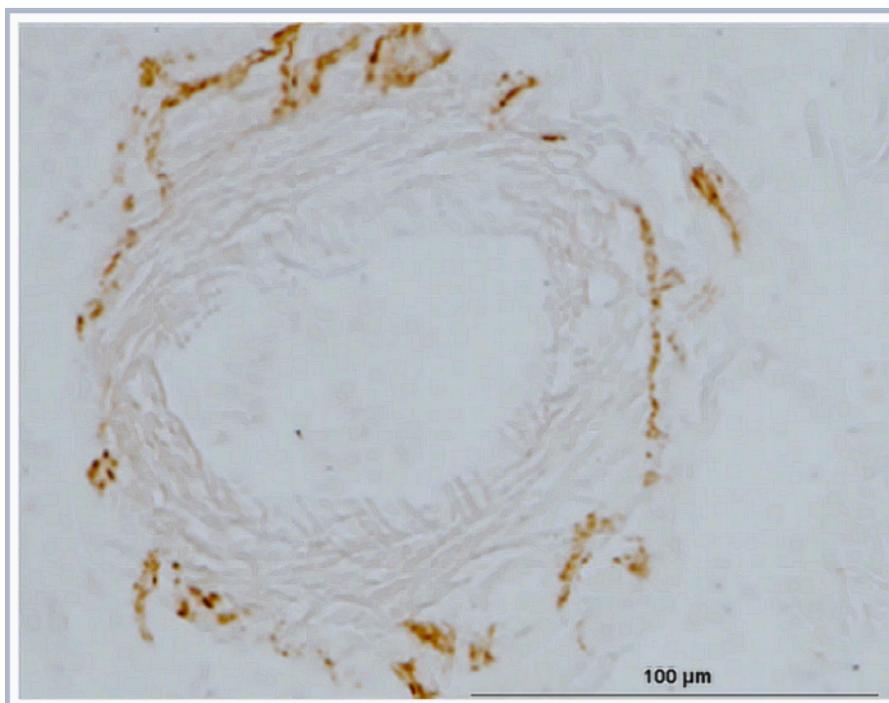


Abbildung 3.6
Erster Serienschritt der zuvor gezeigten Arteriole. Ausschließlich Färbung des neuronalen Zytoplasmas. PGP 9.5-Färbung

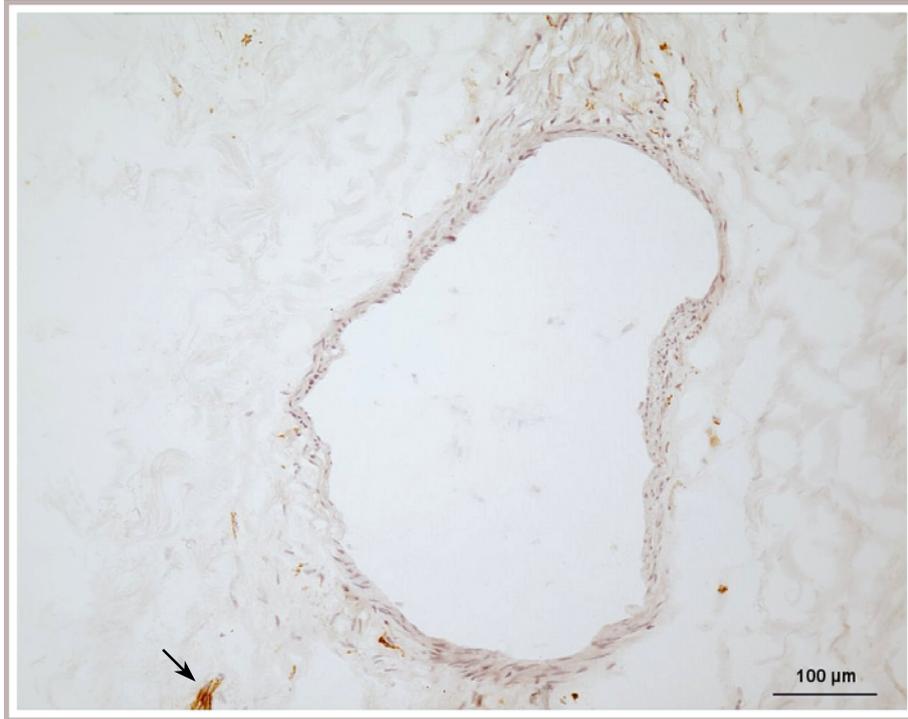


Abbildung 3.7
 Vene des Coriums (plantare Großzehenhaut). Links unten im Bild ein Nervenfaszikel (schwarzer Pfeil).
 Hämatoxylin - und PGP 9.5-Färbung



Abbildung 3.8
 Vene des Coriums (plantare Großzehenhaut) mit spärlicher perivaskulärer Innervation. 1. Serien-
 schnitt, PGP 9.5-Färbung

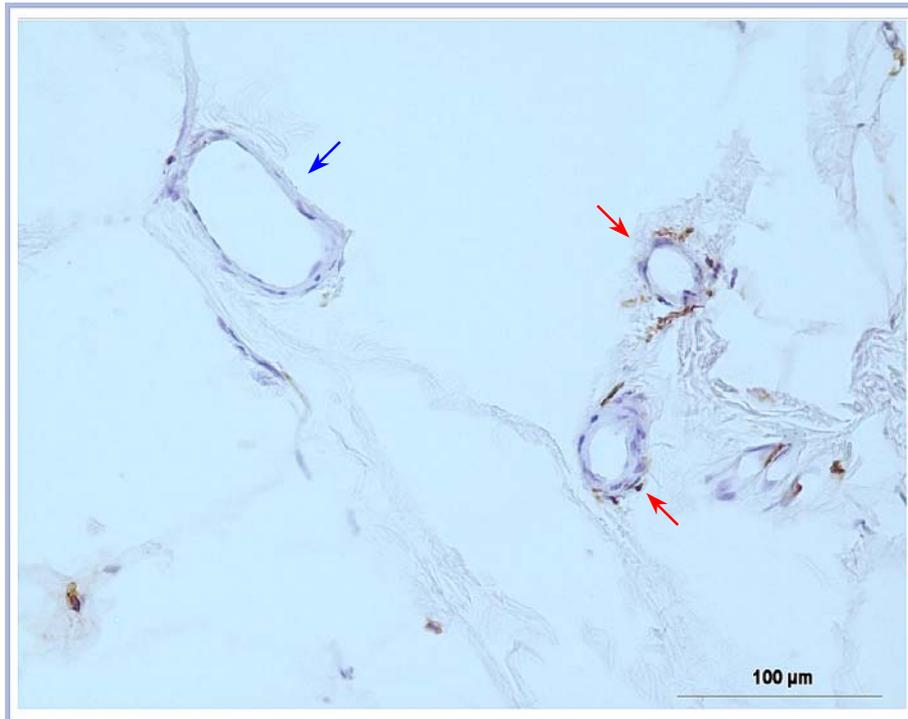


Abbildung 3.9
 Venole (blauer Pfeil) mit zwei benachbarten Arteriolen (rote Pfeile) der plantaren Großzehenhaut.
 Hämatoxylin- und PGP 9.5 -Färbung

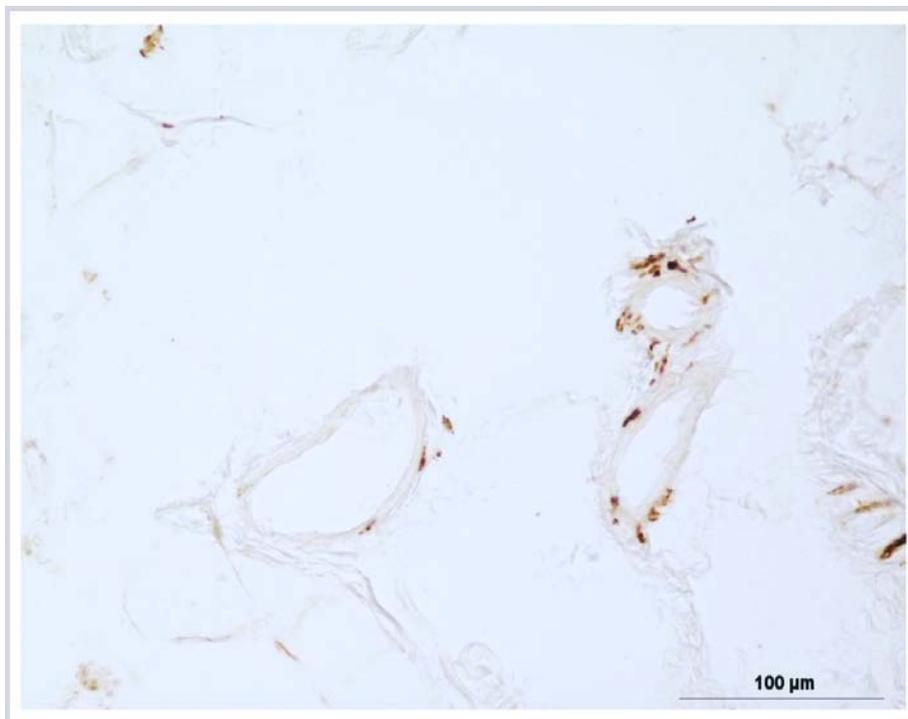


Abbildung 3.10
 Venole und Arteriolen der plantaren Großzehenhaut. 1. Serienschritt, PGP 9.5-Färbung

3.2.5 Digitaler Bildverarbeitungsprozeß

3.2.5.1 Meßgrundlage

Nach erfolgtem Färbevorgang wurden die histologischen Präparate in einem halbautomatischen Bildverarbeitungsprozeß analysiert. Für diesen Vorgang wurde von uns ein angepasstes Softwareprogramm in der Programmierumgebung IBAS 2.5 (Interaktives Bild Analyse System, Fa. Zeiss-Vision) geschrieben, welches in einem halbautomatischen Verfahren die gefärbten Strukturen (DAB-Präzipitate am Ort der immunhistochemischen Reaktion) in ein Binärbild umwandelte und quantifizierte (Flächenmessung der Signalpixel).

3.2.5.2 Identifikation der Gefäßinnervation

Zur Detektion der im reinen DAB-Bild (ab 2. Serienschnitt) nur schwer zu identifizierenden perivaskulären Innervation mussten im ersten Schritt folgende Voraussetzungen geschaffen werden: Die Ausrichtung des mit Hämatoxylin gegengefärbten Ausgangspräparates (1. Serienschnitt) wurde in Relation zu den Kreuztischkoordinaten durch interaktive Markierung und Speicherung seiner Umrissstruktur festgehalten. In 8facher Übersichtsvergrößerung wurden im Hämatoxylin gefärbten Präparat sämtliche erkennbaren Gefäße erfasst, wobei gleichzeitig eine Klassifizierung der Gefäße zum einen nach der Anschnittebene, zum anderen in Arterien und Venen erfolgte. Nach Archivierung aller Gefäßkoordinaten im Ausgangspräparat (Hämatoxylin schnitt entspricht 1. Serienschnitt) suchte das Programm im zweiten Schritt die äquivalenten Gefäßpositionen in den folgenden PGP-gefärbten Analyseschnitten (2. Serienschnitt und aufwärts) automatisch auf, nachdem eine Deckungsgleichheit der Umrissstruktur des Hämatoxylin-Ausgangspräparates mit der Umrissstruktur des zu bearbeitenden PGP-Analyseschnittes in Bezug auf die Kreuztischposition erfolgt war. Ab dem zweiten Serienschnitt und aufwärts stellten sich nur noch die isolierten Diaminobenzidin (DAB) - Farbsignale (goldbraunes Präzipitat) am Ort der abgelaufenen Immunperoxidase-Reaktion dar. Somit konnte die gesuchte perivaskuläre Gefäßinnervation nicht nur an ihrer ursprünglichen Koordinatenschnittstelle, sondern auch im Verlauf automatisch detektiert und beurteilt werden.

3.2.5.3 Binärbilderzeugung

Der dritte Schritt im Rahmen des Bearbeitungsprozesses war die Erzeugung eines Binärbildes in 20-facher Übersichtsvergrößerung. Die ursprünglich lichtmikroskopisch gold-braunen DAB-Farbstoffpräzipitate wurden auf dem Monitor als Graustufenbild mit 256 Stufen dargestellt, wobei die Farbstoffpräzipitate die dunkelsten Graustufen besetzten (Abb. 3.11). Sämtliche weitere Gefäßstrukturen, sowie der Gefäßwandaufbau ließen sich durch unterschiedliche, aber insgesamt schwächere Graustufen einwandfrei erkennen, ohne mit den im Interesse stehenden perivaskulären Strukturen zu konkurrieren.

Bei stark eingeeengter Kondensorblende konnte die Media-Adventitia-Grenze gut erkannt und interaktiv eingezeichnet werden. Ausgehend von dieser Grenze legte das Programm automatisch eine zirkuläre Messzone mit einer Breite von 40 μm (Referenzfläche) um das Gefäß. Nur in dieser Zone wurden die Binärsignale detektiert, weiter entfernt gelegene Signale (z. B. von Schweißdrüsenerven oder Faszikeln) wurden unterdrückt. Die binären Signale (Nervenfaseranteile) wurden nach Partikelanzahl und Fläche ausgewertet. Setzte man diese Parameter mit der errechneten Referenzfläche in Relation (z. B. Nervenfaserfläche / Referenzfläche bzw. Nervenfaserpartikel / Referenzfläche) konnten Dichtewerte ermitteln werden. Die Vergleichbarkeit von Gefäßen mit unterschiedlich großen Durchmessern wurde dadurch möglich.

Interaktiv wurde der Graustufenschwellenwert festgelegt, der zum Binärbild führte. Ursprünglich zarte Farbsignale wurden in einem automatisierten Prozessablauf nochmals durch eine programmierte Kontrastverstärkung betont (Abb. 3.12). Dieser Graustufenschwellenwert entschied über die Zugehörigkeit eines Signals zu neuronalem Gewebe oder nicht. Ein Grauwert, der über diesem Schwellenwert lag, war im Softwareprogramm der Variablen „weiß“ zugeordnet und charakterisierte nervales Gewebe. Alle nervalen Strukturen wurden somit im nächsten Bearbeitungsschritt als weiße Areale ausgegeben (Abb. 3.13). Alle unter dem Niveau, d. h. unter dem Schwellenwert liegende Parameter wurden als nicht-nervale Strukturen gewertet und stellten sich im Binärbild als schwarze Fläche und somit als Hintergrund dar (Abb. 3.13). Um den Bearbeitungsvorgang zu beschleunigen, wurden die zu Beginn einer Bearbeitungsserie primär eingestellten Diskriminationswerte für die Folgebilder automatisch vorgeschlagen.

Bearbeitungsschritte der morphometrischen Bildbearbeitung

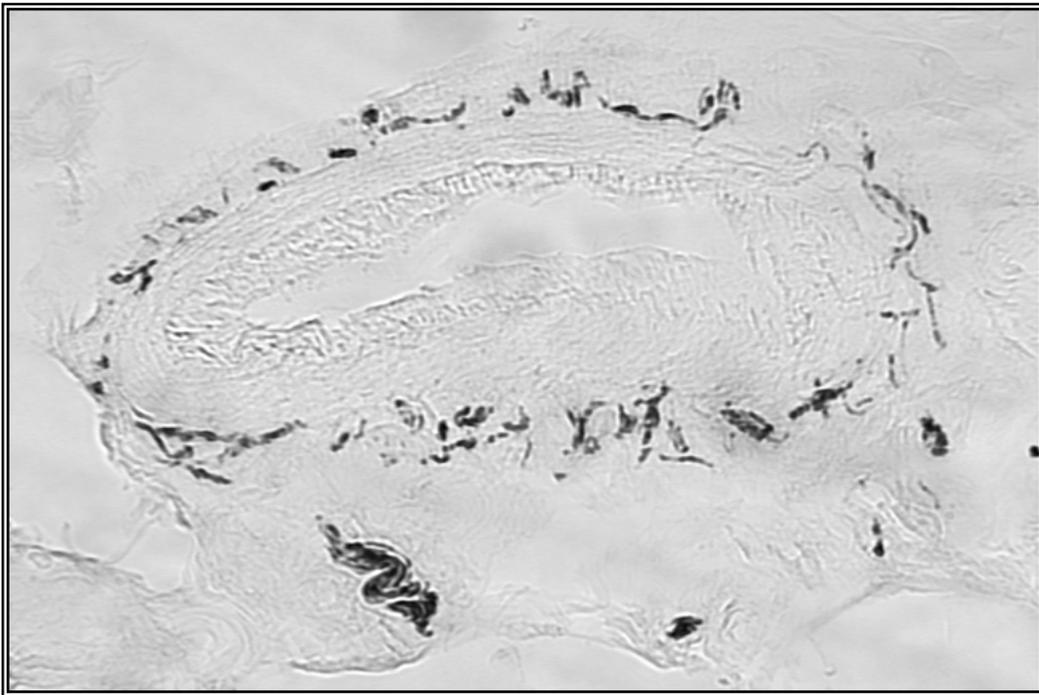


Abbildung 3.11
Coriarmarterie mit Darstellung der perivasalen Axone durch PGP 9.5 im Graustufenbild

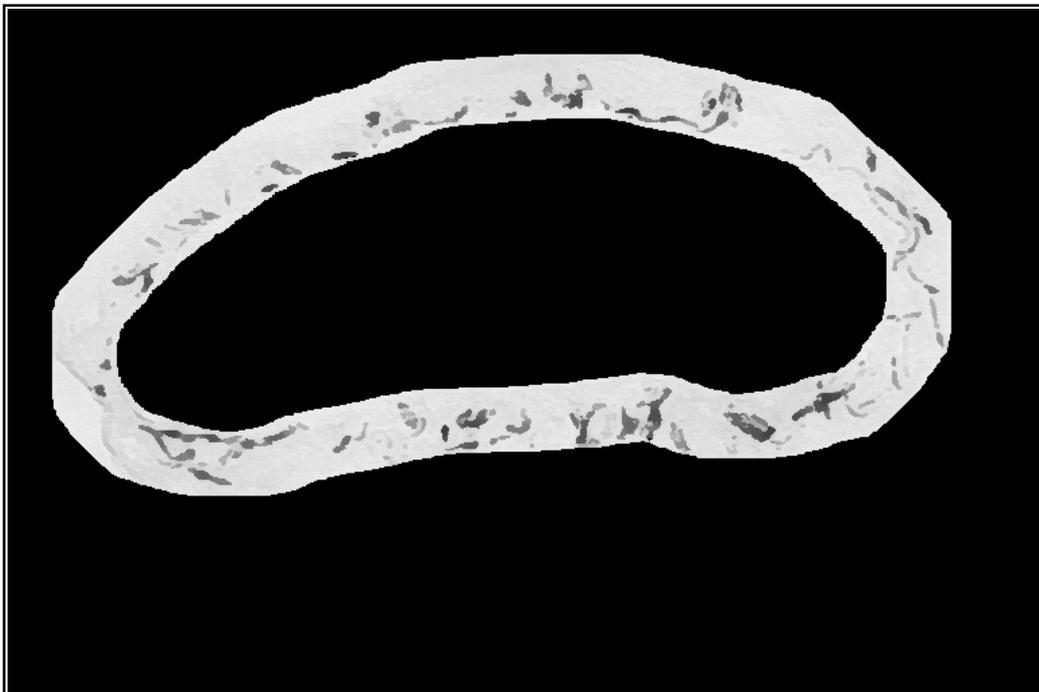


Abbildung 3.12
Bildeinzug im Rechner nach Kantenschärfung zur Verbesserung des Kontrastes gegenüber dem Hintergrund. Berücksichtigt sind nur Signale in der ringförmigen Meßzone.

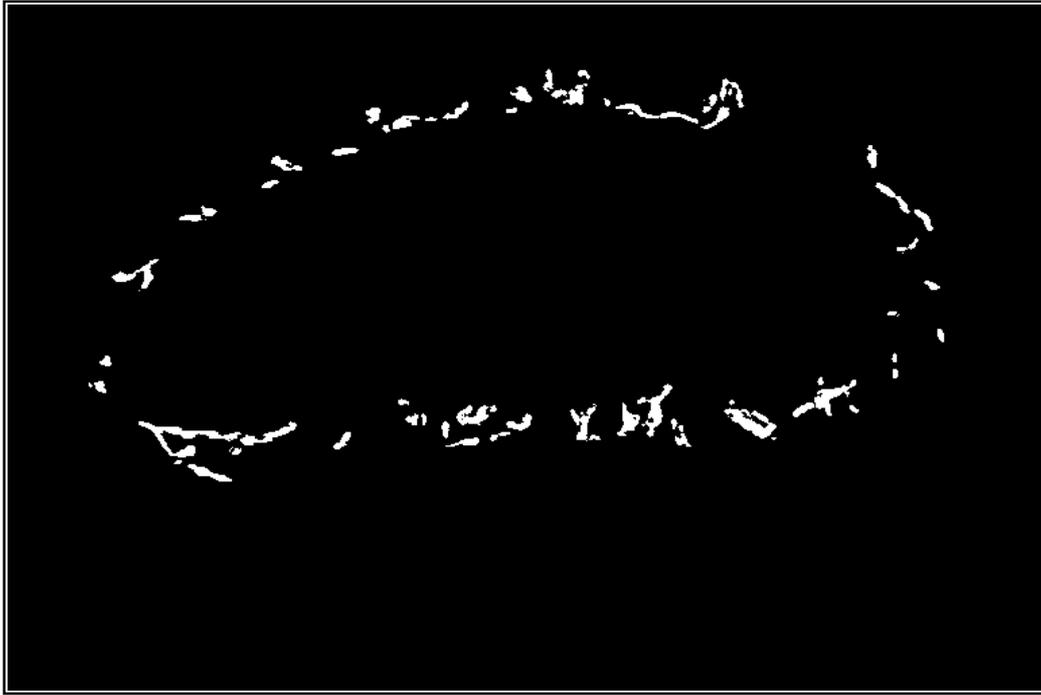


Abbildung 3.13
Binärbild zur Flächenmessung der Innervation nach Graustufendiskriminierung.

Alle gespeicherten morphometrischen Daten wurden für jedes Gefäß, in jedem Hautareal (Zehen- sowie Caput metatarsale Haut) und für jeden Patienten erhoben. Die morphometrische Bearbeitung einer Hautstelle eines Patienten nahm durchschnittlich acht bis zehn Stunden in Anspruch.

3.2.5.4 Anschnittkategorien

Die Anschnittebene des Gefäßes wurde in Klassen kategorisiert. Da Nervenfasern nicht zufällig, sondern gerichtet am Verlauf der Gefäße orientiert sind, war die Klassifizierung der Gefäße hinsichtlich ihrer Durchmesser und Anschnittebenen notwendig, um homogene Vergleichsgruppen für die Quantifizierung der Nerven zu erhalten. Als rund war die Anschnittfläche eines Gefäßes kategorisiert, deren längerer Gefäßdurchmesser nicht mehr als das 1,5 fache des kürzeren Durchmessers ($D_{Gmax}/D_{Gmin} \leq 1,5$) betrug. So ergaben sich folgende weitere Anschnittkategorien für oval ($D_{Gmax}/D_{Gmin} \leq 3$), längs ($D_{Gmax}/D_{Gmin} > 3$) und polymorph (unklassifizierbare Gefäßanschnitte) angeschnittene Gefäße. Statistisch ausgewertet wurde ausschließlich die Klasse der rund angeschnittene Gefäße ($D_{Gmax}/D_{Gmin} \leq 1,5$) mit Durchmessern (D_G) von 25-125 μm . Bei Verwendung anderer Anschnittklassen wird darauf hingewiesen.

3.2.5.5 Histomorphologische Kriterien zur Klassifizierung der Hautgefäße in Arterien und Venen

Durch die Färbung des ersten Serienschnittes mit Hämatoxylin stellten sich die Hautgefäße lichtmikroskopisch in 8facher Vergrößerung gut beurteilbar dar. Die Zuordnung der Gefäße zu Arterien und Venen erfolgte nach histomorphologischen Diskriminationskriterien.

Gefäßlumen : Arterielle Gefäße (Arteriolen) weisen im Querschnitt eher ein rundes oder leicht ovales Lumen auf, dass in der Regel nicht kollabiert ist. Venolen dagegen besitzen ein oval bis unregelmäßig gefaltetes Lumen, dass oftmals kollabiert ist.

1. **Membrana elastica interna:** Bei Arteriolen ist diese oft vorhanden, fehlt jedoch bei Venen bzw. Venolen oder ist nur spärlich ausgebildet.
2. **Glatte Muskelzellen:** Arterien imponieren mit einer dickeren, kompakten Schicht glatter Muskelzellen (Ringmuskulatur), die sich scharf von der Tunica intima und Tunica externa abgrenzen. Die Zellkerne sind zentral und zigarrenförmig ausgebildet, wobei ein relativ dichter Zellkernbesatz vorherrscht. Die Media der Venen ist dünner und zwischen den einzelnen glatten Muskelzellen kann kollagenfaseriges Bindegewebe vorkommen, dass gegenüber den Muskelzellen sogar vorherrschen kann. Der Zellkernbesatz ist deutlich weitgestreuter. Die Grenze zur Tunica intima bzw. Tunica externa ist nicht klar abgrenzbar.
3. **Membrana elastica externa:** In Arteriolen kaum vorhanden. Bei Venen fehlend.
4. **Abgrenzbarkeit der Gefäßwandschichtung:** Bei Arterien/Arteriolen liegt eine scharfe Abgrenzung zwischen den drei Wandschichten vor. Die Venen zeigen wesentlich unschärfere Übergänge der einzelnen Tunicae.
5. **Relation der Gefäßlumenfläche zur Dicke der Tunica media:** Eine kleine Gefäßlumenfläche in Relation zu einer relativ dicken Tunica media spricht eher für eine Arterie, wohingegen eine große Lumenfläche zu einer dünnen Mediaschichtdicke eher einer Vene entspricht.

Auf die diagnostische Präzision dieser Kriterien wird im Kapitel 4 näher eingegangen. In den nachfolgenden Abbildungen sind die histomorphologischen Unterscheidungskriterien nochmals bildlich dargestellt.

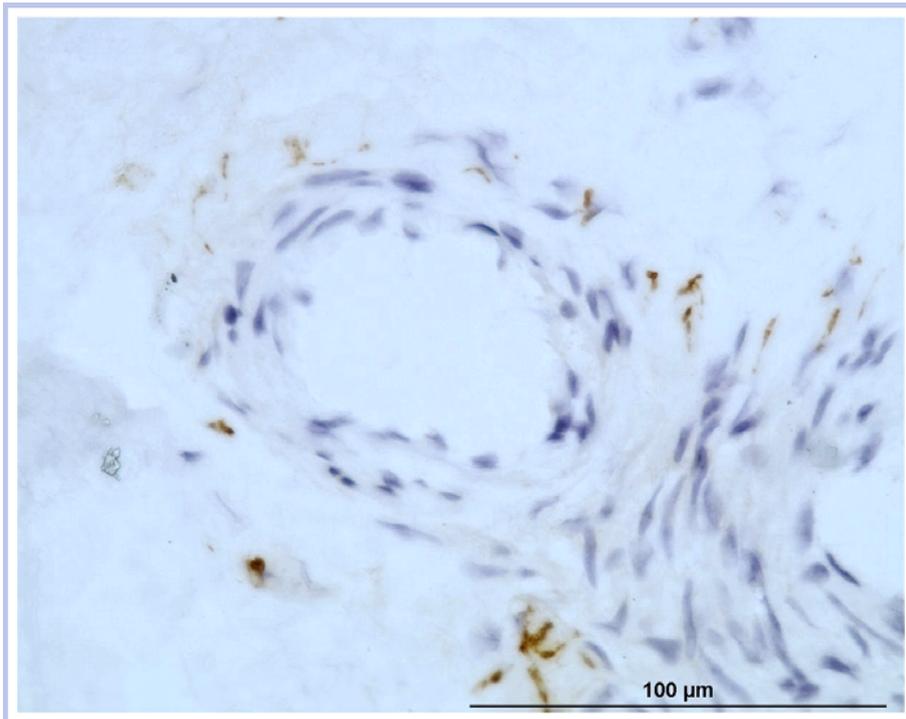


Abbildung 3.14
 Charakteristischer Gefäßwandaufbau einer Arteriole des Coriums mit benachbarter angeschnittener Arterie. Neuronales Zytoplasma stellt sich durch die Färbung mit PGP 9.5 bräunlich dar. Vergrößerung s. Maßstab

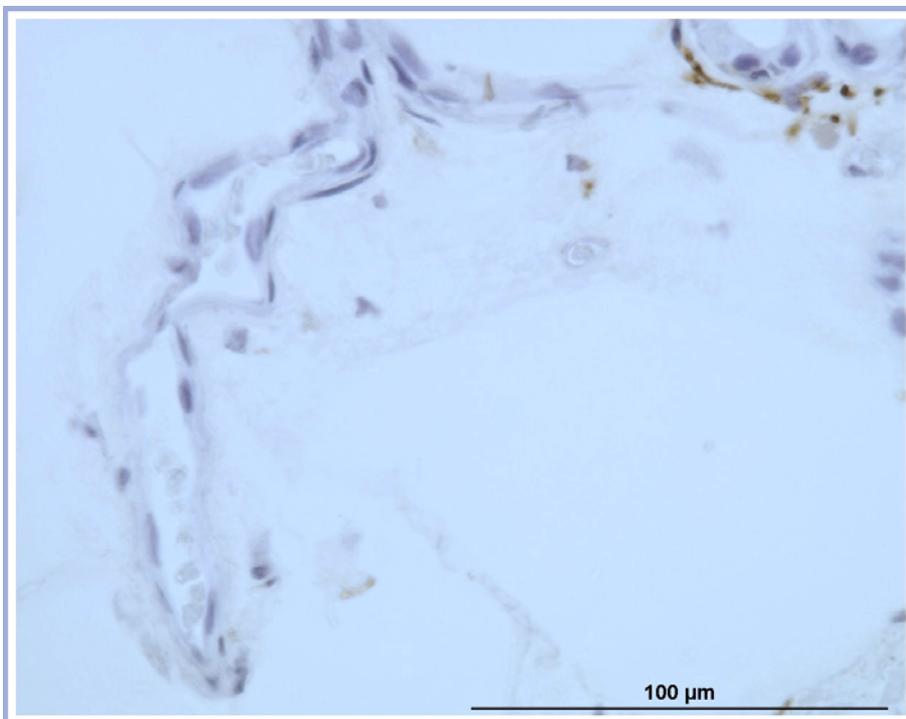


Abbildung 3.15
 Histomorphologischer Aspekt einer hämatoxylin-gefärbten Venole des Coriums mit vereinzeltem Nachweis axonaler Strukturen, die hauptsächlich um Schweißdrüsen (rechts oben) lokalisiert sind. Färbung mit PGP 9.5, 8 fache Vergrößerung im Lichtmikroskop

3.3 Morphometrische Basisparameter und Terminologie

Mit dem Bildverarbeitungsprozeß wurden für die statistische Analyse folgende Datengruppen gebildet:

Kodierung der Hautareale

- *Z-Haut (Zehenhaut)*: Entspricht dem Hautareal an der plantaren Seite der Großzehe
- *CM-Haut (Caput metatarsale Haut)*: Entspricht dem plantaren Hautareal in Höhe des Caput ossis metatarsale I

Morphometrische Daten zum Gefäß

- *VSA (Gefäßwandfläche)*: Beinhaltet die Fläche der Tunica media und Tunica intima
- *D_{Gmin} (Gefäßdurchmesser)*: Kleinster Gefäßdurchmesser
- *D_{Gmax} (Gefäßdurchmesser)*: Größter Gefäßdurchmesser
- *WTH (Gefäßwanddicke)*: Beinhaltet Tunica media und Tunica intima
- *BML (Gefäßumfang)*: Länge der Grenzstrecke zwischen der Tunica media und Tunica adventitia
- *PV-RefA (Perivaskuläre Referenzfläche)*: Entspricht der perivaskuläre Meßzone und somit dem Gürtel, der sich mit einer Breite von 40 µm zirkulär um die Tunica media legt und die Tunica adventitia beinhaltet
- *Total-RefA (Totale-Referenzfläche bzw. Gesamtmeßzone)*: Entspricht der perivaskulären Referenzfläche plus der Mediafläche

Gefäßklassifikationen

- *VMP (Anschnitttyp)*: Rund ($D_{Gmax}/D_{Gmin} \leq 1,5$), oval ($D_{Gmax}/D_{Gmin} \leq 3$), längs ($D_{Gmax}/D_{Gmin} > 3$) und polymorph (unklassifizierbare Gefäßanschnitte)
- *VTY (Gefäßart)*: Klassifizierung in Arterie bzw. Vene
- *DK (Durchmesserklasse)*: Einteilung der Gefäßdurchmesser (nach D_{Gmin}) in Klassen von 25 µm

Morphometrische Parameter der perivasculären Innervation

- *NFA-PV* : Nervenfaserfläche in der perivasculären Referenzfläche
- *NFA-Total* : Nervenfaserfläche in der totalen Referenzfläche
- *NFC-PV* : Nervenfaserpartikel in der perivasculären Referenzfläche
- *NFC-Total* : Nervenfaserpartikel in der totalen Referenzfläche

Morphometrische Parameter der peripheren Nerven (N. suralis, N. tibialis)

- *Myelinflächendichte (ArMyDicht)*: Summe der gemessenen Myelinfläche pro Analyseausschnitt des Endoneuriums
- *Nervenfasernanzahlendichte (NFDicht)*: Nervenfasernanzahl pro Analyseausschnitt des Endoneuriums

Im Folgenden sind die morphologischen Basisparameter mit den zugehörigen Termini aufgeführt.

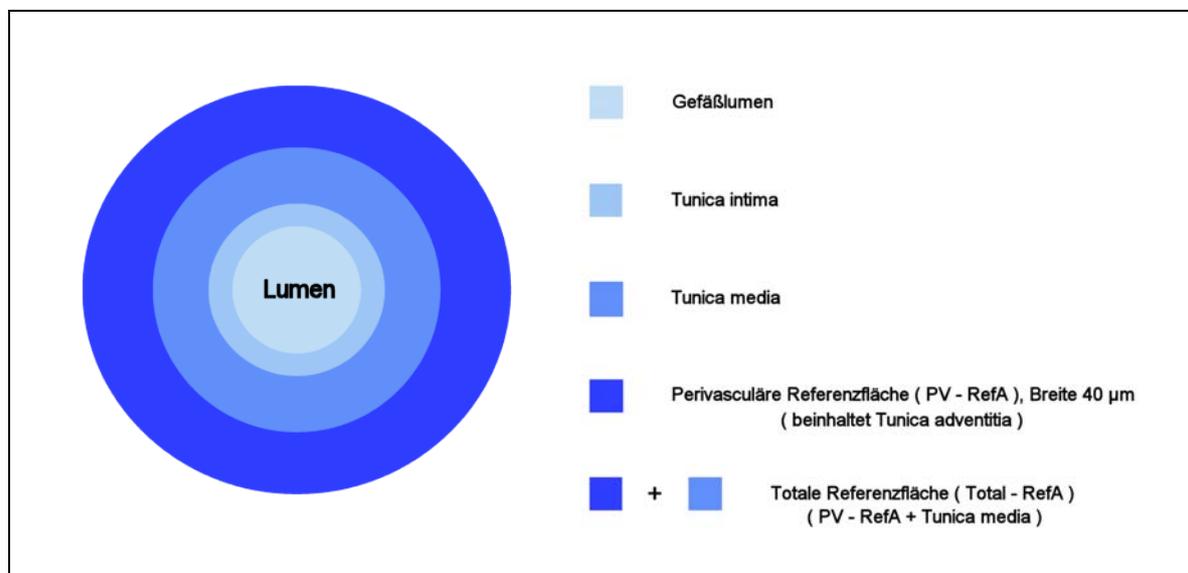


Abbildung 3.16
Schematischer Gefäßquerschnitt mit Messzonen und Terminologie

3.4 Histomorphologisches Polyneuropathiekriterium

Als histomorphologisches Maß der Ausprägung einer Polyneuropathie wurde die Myelinflächendichte des N. suralis und des N. tibialis herangezogen. Die morphometrischen Daten zum N. suralis und N. tibialis standen zur Verfügung. Sie waren im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit erhoben worden (LINDEMUTH et al., 2002). Die in dieser Arbeit untersuchten Nerven waren zusammen mit den beiden Hautbiopsien der Zehen – und Caput metatarsale Haut post mortem entnommen worden. Am Semidünnschnitt des quer geschnittenen Nerven wurden mit einem bildanalytischen Bearbeitungsprogramm folgende morphometrische Parameter erfasst: Myelinflächendichte (Summe der gemessenen Myelinfläche pro Analyseausschnitt des Endoneuriums), Nervenfasersflächendichte (Summe der gemessenen Nervenfasersflächen [Axon plus Myelinscheidenfläche] pro endoneuraler Flächeneinheit) und Nervenfasersanzahldichte (Nervenfasersanzahl pro endoneuraler Flächeneinheit). Entsprechend der charakteristischen bimodalen Verteilungskurve der Faserdurchmesser in den peripheren Nerven (BEHSE, 1990) erfolgte innerhalb des peripheren Nervens eine Aufteilung in die Faserdurchmesserklassen kleiner und größer 7µm.

In der vorliegenden Arbeit wurden die o.g. Polyneuropathieparameter für den N. tibialis mit den Morphometrieparametern der mediale Fußsohlenhaut in Korrelation gesetzt, da er der versorgende Hauptnerv ist. Dieses konnte um so leichter geschehen, da Lindemuth und Mitarbeiter (2002) nachgewiesen hatten, dass der N. tibialis in seinem histomorphologischen Verhalten auf neuropathogene Einflüsse in genau gleicher Weise wie der Referenznerv N. suralis reagiert.

Die Myelinflächendichte gilt nach WANG und SCHRÖDER (2000) als histopathologisch empfindlichster Parameter zur Beurteilung einer demyelinisierenden Polyneuropathie des peripheren Nervens. Als Grenzwert für eine polyneuropathische Strukturveränderung waren dabei Myelinflächendichtewerte von $\leq 20\%$ pro Endoneurium verwendet worden (WANG et al., 2000; LINDEMUTH et al., 2002). Die Spannweite der Myelinflächendichte pro Endoneurium des N. tibialis in unserem Kollektiv reichte dabei von 2,3 % bis 22,3 %.

3.4.1 Einteilung des Patientenkollektivs in neuropathische und nicht neuropathische Fälle

Gemäß dem oben genannten morphometrischen Polyneuropathiekriterium waren zu wenig Patienten ohne Polyneuropathiehinweis im N. tibialis (Myelinflächendichte $> 20\%$) im Untersuchungskollektiv vorhanden, die für weiterführende statistische Aussagen zum

Verhalten des gesunden Nervens nötig gewesen wären (N. tibialis: Z-Haut (n = 0), CM-Haut (n = 2), N. suralis: Z-Haut (n = 3), CM-Haut (n = 5)), so dass sich der weitere Verlauf bezüglich der Korrelation zwischen den Hautstellen der Fußsohle und des N. tibialis ausschließlich auf Patienten mit Polyneuropathie-Hinweis im N. tibialis (Myelinflächendichte $\leq 20\%$) bezieht.

Aus diesem Grund konnte u.a. der Frage nach Altersveränderungen der perivasculären Nervenfaserverflächendichte nicht nachgegangen werden, da die Altersabhängigkeit durch die Dichteveränderungen der Polyneuropathie überlagert bzw. verdeckt worden wäre. Diese Korrelation wäre nur bei ausschließlich gesunden Patienten möglich gewesen.

3.5 Statistische Bearbeitung

In der statistischen Bearbeitung wurde ausschließlich mit einem nicht-parametrischen Testverfahren gearbeitet. Zur Untersuchung einer Korrelation wurde der Spearman Rang-Korrelationskoeffizient bestimmt. Dieses Verfahren testet Hypothesen über Daten, ohne dass diese einer speziellen Verteilungsform, z. B. einer Normalverteilung oder einer linearen Abhängigkeit zugehörig sein müssen und berechnet die Korrelationskoeffizienten mit den Rängen der Werte zweier Variablen. Ein beginnender statistischer Zusammenhang wurde unsererseits bei einem Korrelationskoeffizienten $r_s \geq 0,6$ angesetzt. Eine Korrelation wurde als statistisch hoch signifikant bezeichnet, wenn der p-Wert $\leq 0,001$ lag. Als sehr signifikante Ereignisse waren p-Werte $\leq 0,01$, als signifikante Korrelationen p-Werte $\leq 0,05$ und als nicht signifikante statistische Zusammenhänge p-Werte $> 0,05$ zu deuten. P-Werte $> 0,1$ werden nicht explizit, sondern durch den Grenzwert $p > 0,05$ aufgeführt. Zur Veranschaulichung der histomorphologischen Parameter wurden graphische Darstellungen wie z. B. Scattergramme, Histogramme oder auch Box Plot-Darstellungen genutzt. Deskriptive Datensammlungen sind in Tabellen komprimiert zusammengestellt.

3.5.1 Diskriminanzanalyse

Zur Überprüfung der hier angewandten histomorphologischen Gefäßdifferenzierung in Arterien und Venen wurde das statistische Verfahren der Diskriminanzanalyse eingesetzt. Damit ist es möglich, eine objektive Vorhersagewahrscheinlichkeit über die korrekte Gefäßklassifizierung zu treffen, um die Genauigkeit unserer Methode zu bewerten.

Geht man von der Vorhersagewahrscheinlichkeit P aus, gilt für jedes Gefäß, dass die Summe aus der Vorhersagewahrscheinlichkeit, eine Arterie (P_A) bzw. eine Vene (P_V) zu sein, immer 100 % beträgt. Bei einem definierten Schwellenwert von 50 % ist eine Zuordnung eines Gefäßes in eine der beiden Gruppen immer möglich, da entweder P_A oder $P_V > 50 \%$ ist. Der größere der beiden Vorhersagewahrscheinlichkeiten bestimmt somit die Klassenzuordnung. Je höher der Schwellenwert (SW) gesetzt wird, umso größer wird ein „Grau-Bereich“ innerhalb dessen eine eindeutige Zuordnung in Arterien bzw. Venen nicht möglich ist. Würde beispielsweise der SW 80 % betragen, aber $P_A = 40 \%$ und $P_V = 60 \%$ sein, könnte dieses Gefäß weder einer Arterie noch einer Vene zugeordnet werden und läge somit im „Grau-Bereich“.

4 ERGEBNIS

4.1 Einleitung

Die Bearbeitung der erhobenen morphologischen Daten verläuft in drei Schritten. Zunächst erfolgt die Überprüfung unserer Methode hinsichtlich der Vorhersagewahrscheinlichkeit einer Gefäßklassifizierung in Arterien und Venen sowie die Frage nach möglichen Korrelationen der perivaskulären Innervation zwischen Arterien und Venen innerhalb eines einzelnen Hautareals.

Im zweiten Schritt steht die Beantwortung der Frage nach einer möglichen Korrelation der perivaskulären Innervation zwischen Arterien und Venen der beiden Hautareale der Zehen- und Caput metatarsale Haut im Mittelpunkt.

Der dritte Schritt ist die Klärung eines möglichen Zusammenhanges zwischen polyneuropathischen Veränderungen im Nervus tibialis und in den von ihm sensibel innervierten Bereichen der peripheren Fußsohlenhaut (plantare Zehenhaut und Haut über dem Caput metatarsale I).

4.2 Patientenkollektiv

Es wurde die Haut der plantarseitigen Großzehe (Z-Haut) sowie die Haut des Fußballens in Höhe des Caput ossis metatarsale I (CM-Haut) des ipsilateralen Fusses eines Patienten bei 35 verstorbenen Personen gewonnen. Anhand der Patientenakten konnten bei 16 (46 %) Patienten Grunderkrankungen mit dem Risiko einer polyneuropathischen Schädigung identifiziert werden. Die Verteilung polyneuropathischer Risikofaktoren innerhalb des betroffenen Patientenkollektivs zeigt Abbildung 4.1. Bei 13 (37 %) Patienten lagen keine Hinweise auf eine solche Erkrankung vor. Aufgrund fehlender Dokumentation konnten bei 6 (17 %) Patienten keine Aussagen über eine Belastung mit neuropathogenen Risikofaktoren getroffen werden.

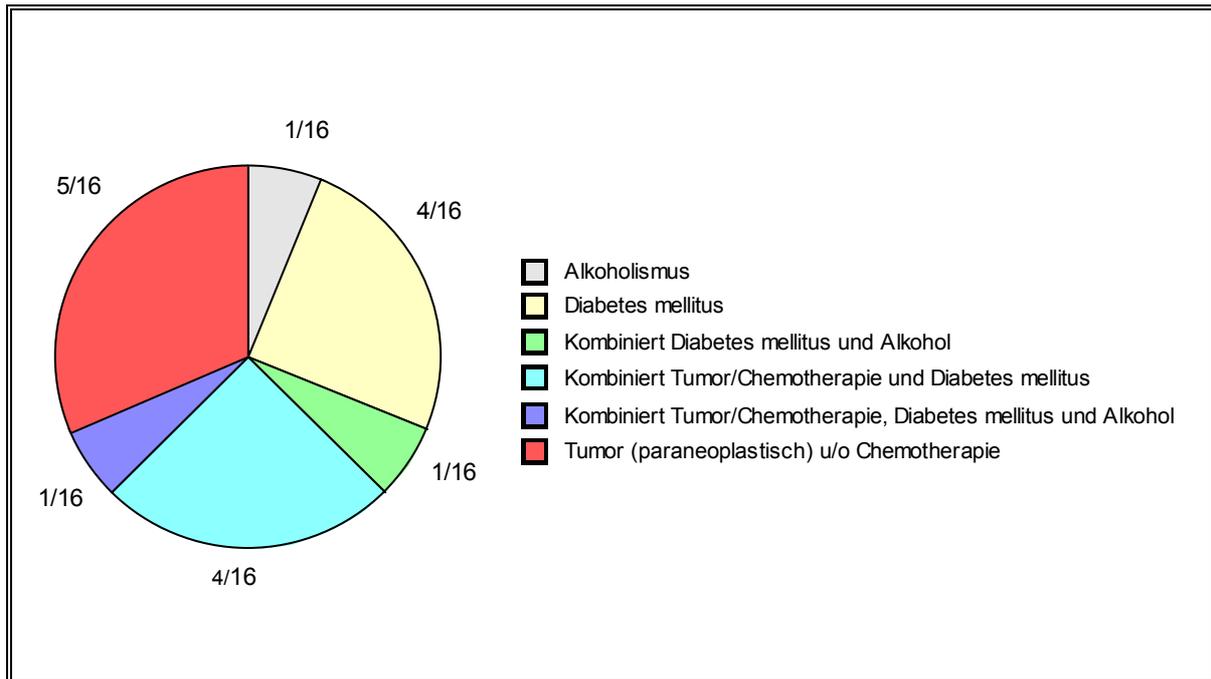


Abbildung 4.1
Verteilung der Erkrankungen mit Polyneuropathie-Risiko innerhalb der betroffenen Subpopulation (n = 16)

4.3 Differenzierung der Gefäße in Arterien und Venen nach morphologischen und methodischen Gesichtspunkten

Insgesamt konnten in beiden Hautarealen der Z- und CM-Haut 1233 Gefäße (855 Arterien und 378 Venen) ausgewertet werden. Diese hauptsächlich im Corium, seltener in der Subcutis liegenden Gefäße waren nach standardisierten Gesichtspunkten (s. Kap. 3.2.5.5) ausgewählt und nach ihrer Anschnittgeometrie in drei Formklassen (rund, oval, längs) unterteilt worden (s. Kap. 3.2.5.4).

Die Trennschärfe der für die Einteilung benutzten Kriterien wird in den folgenden Punktwolken-Diagrammen dargestellt.

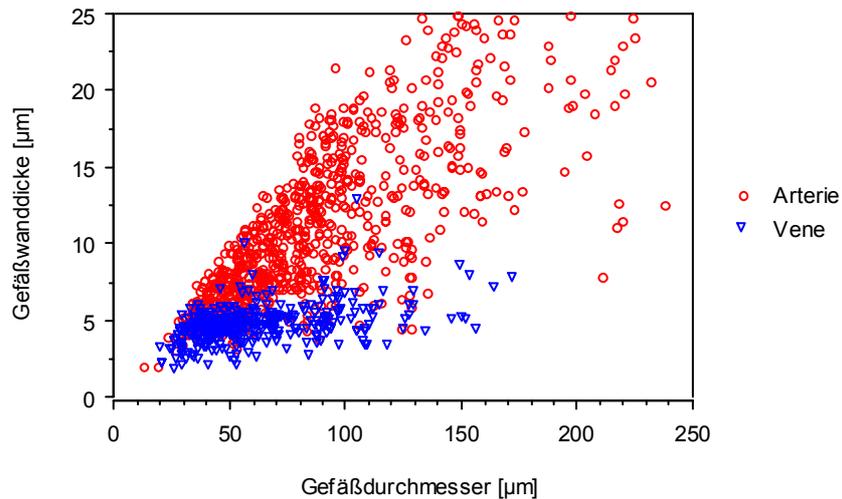


Abbildung 4.2
 Korrelation zwischen der Gefäßwanddicke WTH (μm) und dem Gefäßdurchmesser D_G (μm). Die Arterien sind rot und rund, die Venen blau und dreieckig dargestellt.

In Abbildung 4.2 wurde die Gefäßwanddicke WTH (Tunica media und Tunica intima) mit dem Gefäßdurchmesser D_G korreliert. Dabei wird deutlich, dass bei steigendem Gefäßdurchmesser die Gefäßwanddicke der Arterien steiler ansteigt als die der Venen. Es ergab sich in der Spearman Rangkorrelation ein $r_s = 0,865$ ($p\text{-Wert} < 0,0001$), was den hohen statistischen Zusammenhang belegt. Die zweite Korrelation wird in Abbildung 4.3 dargestellt.

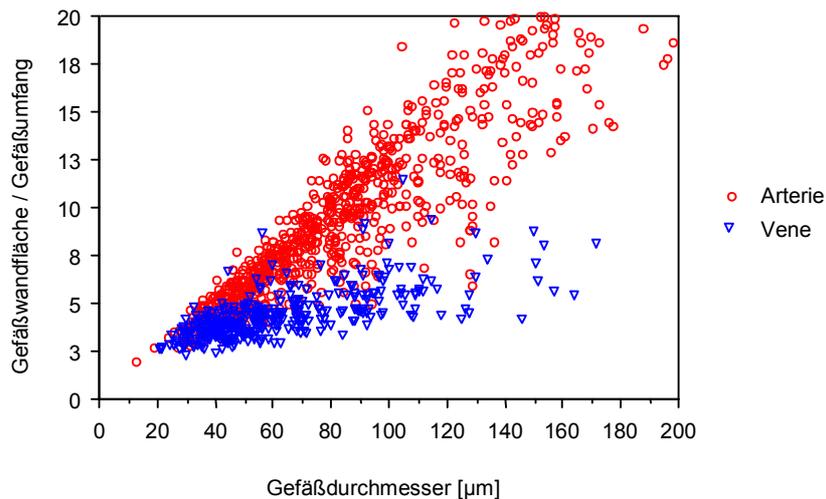


Abbildung 4.3
 Korrelation zwischen dem Verhältnis der Gefäßwandfläche und Gefäßumfang (VSA/BML) zum Gefäßdurchmesser D_G (μm). Die Arterien sind rot und rund, die Venen blau und dreieckig dargestellt.

Hier wurde der Quotient aus Gefäßwandfläche VSA (Media- und Intimafläche) zum Gefäßumfang BML (Gefäßumfang an der Grenze zwischen Tunica media und Tunica adventitia) mit dem Gefäßdurchmesser in Korrelation gesetzt. Es zeigte sich auch in diesem Fall eine deutliche Trennung der Gefäßtypen, wobei die Arterien mit wachsendem Gefäßdurchmesser eine größere Gefäßwandfläche im Verhältnis zum Umfang zeigen als die Venen. Der Korrelationskoeffizient lag in diesem Fall bei $r_s = 0,879$ (p -Wert $< 0,0001$).

Um die Genauigkeit unserer histomorphologischen Gefäßdifferenzierung überprüfen zu können, führten wir eine Diskriminanzanalyse der oben aufgeführten Streudiagramme durch (s. Kap. 3.5.1). Der Schwellenwert (SW) wurde bei 50 % festgesetzt. Dabei ergaben sich Scattergramme mit einer Gesamtgefäßpopulation, in denen nur die Arterien und Venen aufgeführt sind, die mit einer Wahrscheinlichkeit von größer 50 % der jeweiligen Gefäßklasse zugehörig sind.

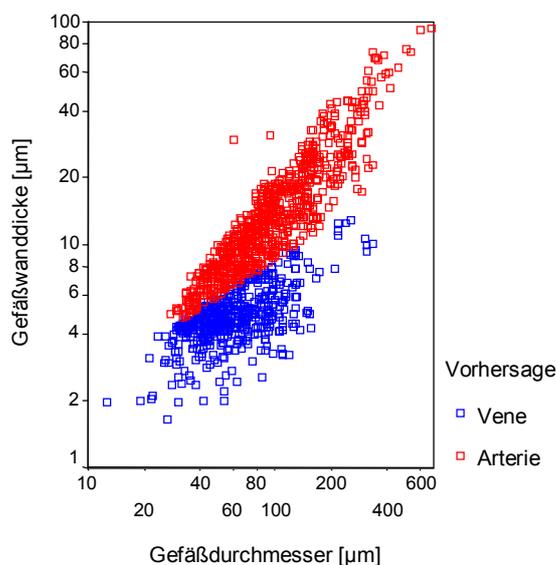


Abbildung 4.4
Korrelation zwischen der Gefäßwanddicke WTH (μm) und dem Gefäßdurchmesser D_G (μm) bei einer Diskriminanzanalyse mit einem Schwellenwert von 50%

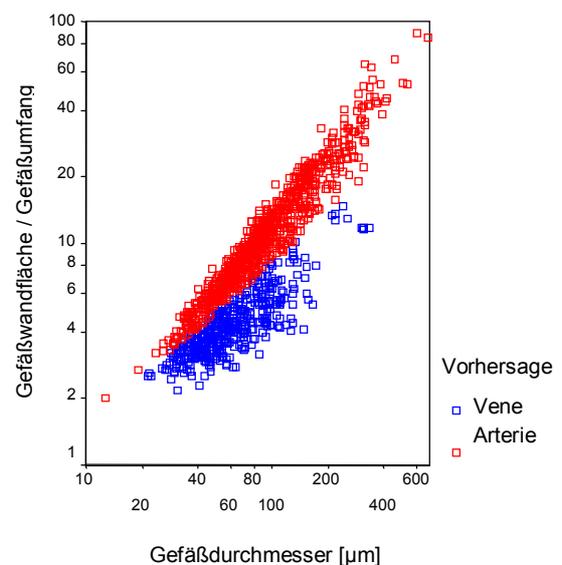


Abbildung 4.5
Korrelation zwischen dem Verhältnis der Gefäßwandfläche und Gefäßumfang (VSA/BML) zum Gefäßdurchmesser D_G (μm). Vorhersagewahrscheinlichkeit der Diskriminanzanalyse $\geq 50\%$

Die statistischen Vorhersagewahrscheinlichkeiten der Gefäße in den oben durchgeführten Diskriminanzanalysen (SW = 50 %) der Abb. 4.4 und Abb. 4.5 spiegelt Tabelle 4.1 und 4.2 wider.

WTH / D _G		Gefäßtyp		Gesamt
		Arterien	Venen	
Vorhergesagte Arterien	Anzahl	717	21	738
	% der Gesamtzahl	58,2 %	1,7 %	59,9 %
Vorhergesagte Venen	Anzahl	138	357	495
	% der Gesamtzahl	11,2 %	29,0 %	40,1 %
Gesamt	Anzahl	855	378	1233
	% der Gesamtzahl	69,3 %	30,7 %	100 %

Tabelle 4.1

Vorhersagewahrscheinlichkeiten einer korrekten Gefäßklassifizierung bei einer Diskriminanzanalyse von Gefäßwanddicke (WTH) zu Gefäßdurchmesser (D_G). Die Wahrscheinlichkeit, unter diesen Voraussetzungen ein Gefäß korrekt eingeschätzt zu haben, liegt bei 87,2 % (Prozentsatz der vorhergesagten Arterien plus Prozentsatz der vorhergesagten Venen).
Sensitivität für Arterien: 84 % , Spezifität für Venen: 94 %

In der Diskriminanzanalyse der Korrelation WTH/D_G liegt die Wahrscheinlichkeit, ein Gefäß korrekt eingeteilt zu haben, bei 87,2 % (Tabelle 4.1). Eine noch höhere Treffsicherheit zeigte sich in der Diskriminanzanalyse der Korrelation VSA/BML / D_G mit einer Wahrscheinlichkeit von 89,5 %, eine Arterie bzw. Vene als solche korrekt beurteilt zu haben (Tabelle 4.2). Durch unser angewandtes histologisch-morphologisches Verfahren konnte eine hohe Sensitivität für Arterien sowie eine hohe Spezifität für Venen gewährleistet werden, die Gefäße nach histologisch-anatomischen Gefäßcharakteristika korrekt kategorisiert zu haben (s. Tab. 4.1 und 4.2).

VSA/BML / D _G		Gefäßtyp		Gesamt
		Arterien	Venen	
Vorhergesagte Arterien	Anzahl	761	36	797
	% der Gesamtzahl	61,8 %	2,9 %	64,7 %
Vorhergesagte Venen	Anzahl	94	341	435
	% der Gesamtzahl	7,6 %	27,7 %	35,3 %
Gesamt	Anzahl	855	377	1232
	% der Gesamtzahl	69,4 %	30,6 %	100 %

Tabelle 4.2

Vorhersagewahrscheinlichkeiten einer korrekten Gefäßklassifizierung bei einer Diskriminanzanalyse von Mediafläche/Mediaumfang (VSA/BML) zu Gefäßdurchmesser (D_G). Die Wahrscheinlichkeit, unter diesen Voraussetzungen ein Gefäß korrekt einzuschätzen, liegt bei 89,5 % (Prozentsatz der vorhergesagten Arterien plus Prozentsatz der vorhergesagten Venen).
Sensitivität für Arterien: 89 % , Spezifität für Venen: 90 %

4.4 Deskriptive Statistik morphologischer Basisparameter der perivaskulären Innervation

4.4.1 Vergleich der perivaskulären Innervationsparameter zwischen Arterien und Venen der Zehen- und Caput metatarsale Haut

Eine Veranschaulichung über die absolute perivaskuläre Nervenfaserverfläche und Nervenfaserteilchen in der Zehen- und Caput metatarsale Haut ermöglicht Tabelle 4.3 und 4.4. Die unterschiedlichen Fallzahlen pro Gefäßtyp und Hautareal entstanden dadurch, daß aus dem

Gesamtkollektiv von insgesamt 35 Patienten ausschließlich die Mittelwerte eines jeden Patienten zur statistischen Weiterverarbeitung verwendet wurden. Dabei kam es vor, daß während der morphologisch-histologischen Analyse keine entsprechenden Gefäße in einem Hautareal identifiziert werden konnten und somit der Patient aus der Statistik herausfiel. Die unten aufgeführten Parameter sind gemittelt aus den Mittelwerten der einzelnen Patienten. Es erfolgte eine Selektion ausschließlich runder Gefäßanschnitte ($D_{Gmax}/D_{Gmin} \leq 1,5$) mit den im Kap. 4.6 aufgeführten Gefäßdurchmessern.

	NFA-PV [μm^2]				NFA-T [μm^2]			
	Z – Haut		CM – Haut		Z – Haut		CM - Haut	
	Arterien	Venen	Arterien	Venen	Arterien	Venen	Arterien	Venen
Patientenfallzahl	32	22	35	27	32	22	35	27
Minimum	19,7	4,5	31,8	0,0	20,6	4,5	32,5	0,0
Maximum	1236,4	201,6	539,2	266,4	1570,3	242,8	552,5	277,1
Mittelwert	236,5	57,3	170,5	57,8	272,1	63,1	183,3	59,4
Median	118,9	35,9	121,6	43,5	152,5	38,8	130,6	43,5
Standardabweichung	278,1	53,3	120,1	69,8	343,4	60,6	126,9	72,8

Tabelle 4.3

Gegenüberstellung der perivaskulären Nervenfaserverfläche (NFA-PV) zwischen Arterien und Venen der Z-Haut und CM-Haut in μm^2
Gegenüberstellung der Gesamtnervenfaserverfläche (NFA-T) zwischen Arterien und Venen der Z-Haut und CM-Haut in μm^2

	NFC-PV [Partikelzahl/Gefäß]				NFC-T [Partikelzahl/Gefäß]			
	Z – Haut		CM – Haut		Z – Haut		CM - Haut	
	Arterien	Venen	Arterien	Venen	Arterien	Venen	Arterien	Venen
Patientenfallzahl	32	22	35	27	32	22	35	27
Minimum	2,9	1,0	4,8	0,0	3,1	1,0	5,0	0,0
Maximum	45,2	13,0	39,7	23,2	48,8	14,0	45,3	23,9
Mittelwert	17,1	5,1	15,4	5,6	18,9	5,6	16,5	5,7
Median	13,6	4,3	12,9	5,2	15,2	5,0	15,1	5,2
Standardabweichung	11,3	3,7	8,3	5,6	12,3	4,0	9,1	5,9

Tabelle 4.4

Gegenüberstellung der Nervenfaserteilchen (NFC-PV) in der perivaskulären Meßzone (PV-RefA) zwischen Arterien und Venen der Z-Haut und CM-Haut in Partikelzahl/Gefäß
Gegenüberstellung der Nervenfaserteilchen (NFC-T) in der Gesamtmeßzone (Total-RefA) zwischen Arterien und Venen der Z-Haut und CM-Haut in Partikelzahl/Gefäß

4.4.2 Vergleich der perivaskulären Innervationsdichte zwischen Arterien und Venen der Zehen- und Caput metatarsale Haut

Um ein Maß der Innervation unabhängig von der Gefäßgröße zu erhalten, sind in Tabelle 4.5 und 4.6 die Relativparameter aufgeführt. Die Kriterien der Parametergewinnung und das verwendete Patientenkollektiv entsprechen dem in Abschnitt 4.4.1.

	NFA-PV/PV-RefA [%]				NFA-T/Total-RefA [%]			
	Z – Haut		CM – Haut		Z – Haut		CM - Haut	
	Arterien	Venen	Arterien	Venen	Arterien	Venen	Arterien	Venen
Patientenfallzahl	32	22	35	27	32	22	35	27
Minimum	0,2	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0
Maximum	8,2	1,6	3,6	2,1	7,1	1,8	3,1	2,0
Mittelwert	1,3	0,5	1,2	0,5	1,0	0,5	0,9	0,5
Median	0,8	0,3	0,7	0,3	0,7	0,3	0,7	0,3
Standardabweichung	1,5	0,4	0,9	0,6	1,3	0,4	0,8	0,5

Tabelle 4.5

Dichte (NFA-PV/PV-RefA) der Nervenfaserverfläche (NFA-PV) in der perivasculären Messzone (PV-RefA) für Arterien und Venen der Z-Haut und CM-Haut in Prozent
Dichte (NFA-T/Total-RefA) der Nervenfaserverfläche (NFA-T) in der Gesamtmeßzone (Total-RefA) für Arterien und Venen der Z-Haut und CM-Haut in Prozent

	NFC-PV/PV-RefA [Partikelzahl/mm ²]				NFC-T/Total-RefA [Partikelzahl/mm ²]			
	Z – Haut		CM – Haut		Z – Haut		CM - Haut	
	Arterien	Venen	Arterien	Venen	Arterien	Venen	Arterien	Venen
Patientenfallzahl	32	22	35	27	32	22	35	27
Minimum	255,3	70,7	396,0	0,0	95,8	65,4	339,1	0,0
Maximum	2626,9	1049,7	2414,5	1860,9	2253,4	1032,8	2250,6	1769,0
Mittelwert	962,2	399,1	1030,4	479,2	760,7	397,6	858,8	458,6
Median	823,9	310,7	939,0	415,9	682,3	315,4	730,7	375,7
Standardabweichung	573,6	297,9	530,0	434,2	440,4	291,6	461,3	418,9

Tabelle 4.6

Dichte (NFC-PV/PV-RefA) der Nervenfaserteilchen (NFC-PV) in der perivasculären Meßzone (PV-RefA) für Arterien und Venen der Z-Haut und CM-Haut in Partikelzahl/mm²
Dichte (NFC-T/Total-RefA) der Nervenfaserteilchen (NFC-T) in der Gesamtmeßzone (Total-RefA) für Arterien und Venen der Z-Haut und CM-Haut in Partikelzahl/mm²

4.5 Intrakutane Häufigkeit der Gefäße im Gesamtkollektiv

Die intrakutane Häufigkeit der Gefäße wurde sowohl für die Arterien als auch für die Venen der Großzehen- und Caput metatarsale Haut unabhängig von der Schnittrichtung aufgesplittet. Das Häufigkeitsspektrum der Arterien lag mit einem Minimum von 0 und einem Maximum von 11 im Mittel bei 3 Arterien pro mm Epitheloberflächenlänge. Für die Venen ergab sich eine Spannweite von 0 bis 16 mit einem Mittelwert von 1,8 Venen pro mm Epitheloberflächenlänge. Im Durchschnitt wurden kutane Gewebeproben von 10,9 mm Länge bearbeitet. Die kürzeste Hautbiopsie lag bei 5,5 mm, die längste bei 21,9 mm. Näheres siehe Abbildung 4.6 und 4.7.

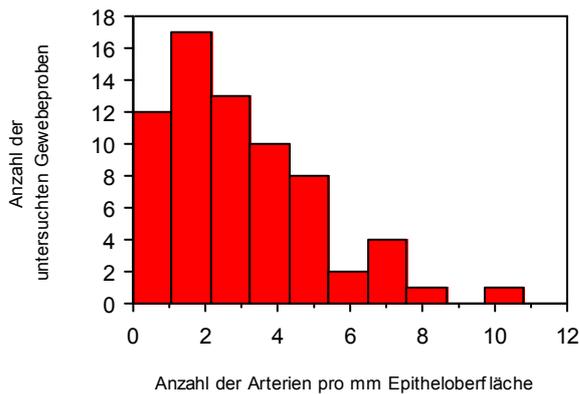


Abbildung 4.6
Verteilung der Arterienanzahl pro mm Epitheloberflächenlänge für die einzelnen untersuchten Gewebeproben

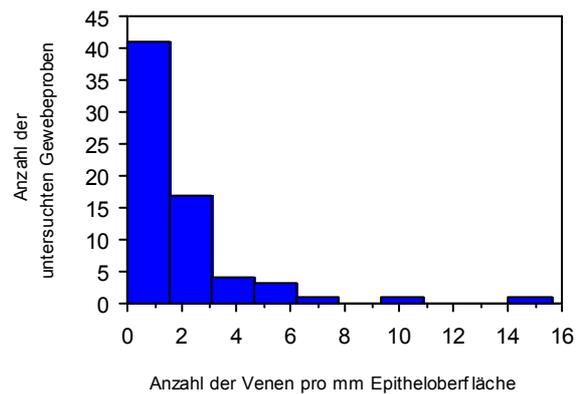


Abbildung 4.7
Verteilung der Venenanzahl pro mm Epitheloberflächenlänge für die einzelnen untersuchten Gewebeproben

Zwischen der Großzehen- und Caput metatarsale Haut ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bzgl. der intrakutanen Gefäßhäufigkeit pro mm Epitheloberfläche (graphisch nicht aufgeführt).

4.6 Anschnittkategorien und Durchmesserverteilung der Gefäße der Zehen- und Caput metatarsale Haut

Die in Tabelle 4.7 aufgeführten Daten sind Grundlage für die Berechnungen der in diesem Kapitel dargestellten Diagramme. Die dargestellten Gefäßdurchmesser (kleinster Durchmesser im Anschnitt) sind mit ihren Mittelwerten und Spannweiten in Zusammenhang mit den unten aufgeführten Histogrammen zu deuten. Mit der Anschnittkategorie sind die möglichen Anschnittebenen eines Gefäßes gemeint (s. Kap. 3.2.5.4.). In diesem Abschnitt werden alle drei Anschnittkategorien in die Berechnungen mit einbezogen.

		CM-Haut Arterien	CM-Haut Venen	Z-Haut Arterien	Z-Haut Venen
Gefäßanzahl		896	454	963	527
Anschnittkategorie	Rund	432	178	423	200
	Oval	329	174	340	167
	Längs	135	102	200	160
Durchmesser (D _{Gmin})	Mittelwert	109,6	63,3	119,9	61,2
	Standardabweichung	72,0	40,1	90,4	43,9
	Median	86,2	51,3	93,5	50,9
	Minimum	18,6	18,4	12,8	8,1
	Maximum	586,7	415,5	857,6	334,2

Tabelle 4.7
Gefäßmorphologie und Gefäßdurchmesser der Arterien und Venen der Caput metatarsal Haut und Zehenhaut im gesamten Gefäßkollektiv (n = 2840)

4.6.1 Verteilung der Gefäßdurchmesser der Arterien

Die Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9 basiert auf den Parametern der Tabelle 4.7 und stellt die Verteilung der Gefäßdurchmesser des gesamten Arterienkollektivs ($n = 1859$) der CM-Hautarterien und Z-Hautarterien separiert dar. Eine Trennung nach Anschnittkategorien war nicht notwendig, da für die Erfassung des Durchmessers in allen drei Kategorien (rund, oval, längs) der kleinste Gefäßdurchmesser (D_{Gmin}) verwandt werden konnte. Gleiches gilt für die Venen (s. Kap. 4.6.2).

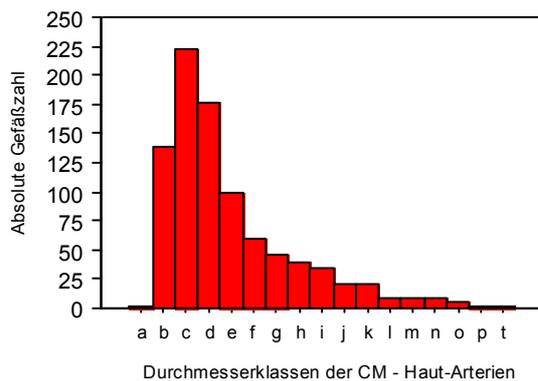


Abbildung 4.8
Verteilung der Durchmesserklassen im Gesamtkollektiv der CM-Hautarterien in Prozent ($n = 896$)

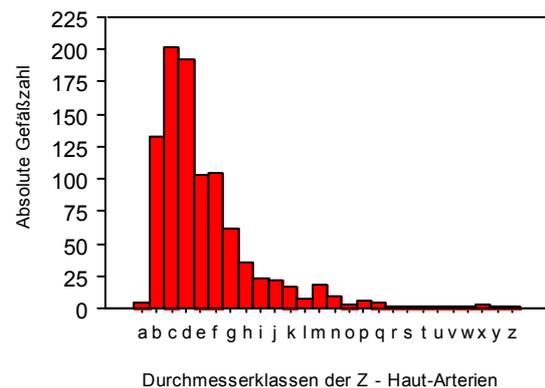


Abbildung 4.9
Verteilung der Durchmesserklassen im Gesamtkollektiv der Z-Hautarterien in Prozent ($n = 963$)

a	b	c	d	e	f	g	h	I	J	k
0-25	25-50	50-75	75-100	100-125	125-150	150-175	175-200	200-225	225-250	etc.

Legende 1 : Durchmesserklassen des gesamten Gefäßkollektivs der Arterien und Venen in der CM- und Z-Haut in μm . Die Durchmesserklassen setzen sich ab der Klasse k in 25 μm Abständen fort und sind daher nicht weiter detailliert aufgeführt

Beide Histogramme (Abb. 4.8 und Abb. 4.9) zeigen die absolute Häufigkeitsverteilung der arteriellen Durchmesserklassen in beiden Hautstellen. Die Gefäßdurchmesser wurden hierzu in Klassen mit je 25 μm Intervallen eingeteilt (s. Legende 1). Die meisten Arterien liegen danach im Durchmesserbereich zwischen 50 und 75 μm (Durchmesserklasse c) unabhängig davon, ob Z- oder CM-Haut. Von insgesamt 896 Arterien der CM-Haut liegen 24,9 % in der Durchmesserklasse c. Die Arterien der Z-Haut sind mit insgesamt 20,9 % in dieser Durchmesserklasse vertreten.

4.6.2 Verteilung der Gefäßdurchmesser der Venen

Die Verteilung der absoluten Gefäßdurchmesser im Gesamtkollektiv für die Venen der CM- und Z-Haut zeigt Abbildung 4.10 und 4.11.

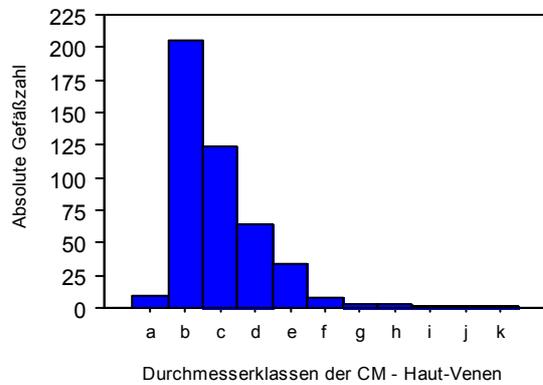


Abbildung 4.10
Verteilung der Durchmesserklassen im Gesamtkollektiv der CM-Hautvenen in Prozent (n = 454)

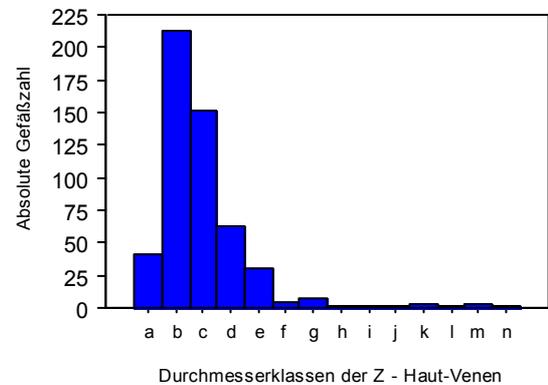


Abbildung 4.11
Verteilung der Durchmesserklassen im Gesamtkollektiv der Z-Hautvenen in Prozent (n = 527)

Im Gegensatz zu den Arterien findet sich der größte Anteil der Venen in einem Durchmesserbereich von 25 bis 50 μm (Durchmesserklasse b, s. Legende 1). Für die CM-Haut liegt 45,2 % (n = 454) und für die Z-Haut 40,4 % (n = 527) des gesamten Venenkollektivs innerhalb dieser Durchmesserklasse (s. Abbildung 4.10, 4.11).

4.7 Zusammenhang zwischen der intraindividuellen perivaskulären

Nervenfaserflächendichte und dem Gefäßdurchmesser

Wie man in Abbildung 4.12 und 4.13 erkennen kann, liegen keine statistischen Zusammenhänge zwischen dem Gefäßdurchmesser und der perivaskulären Nervenfaserflächendichte der Arterien oder Venen weder in der CM- noch in der Z-Haut vor. Dieses Ergebnis wird durch den Spearman Rangkorrelationskoeffizienten von $r_s = 0,04$ für die Arterien und von $r_s = -0,02$ für die Venen der Z- und CM-Haut bestätigt. Die Signifikanzwerte liegen in beiden Fällen über $p > 0,05$.

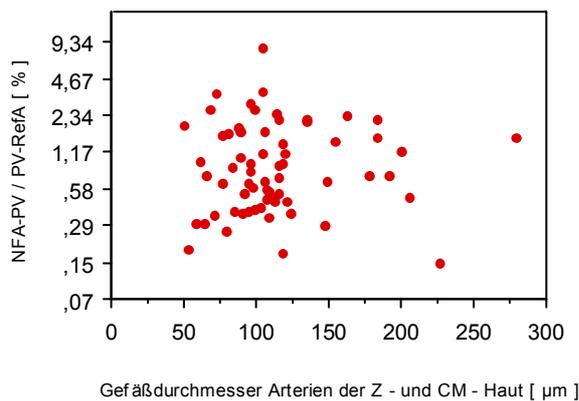


Abbildung 4.12
Scattergramm der perivaskulären Nervenfaserdichtendichte (NFA-PV/PV-RefA [%]) der Arterien und der Gefäßdurchmesser D_G (μm) der Z- und CM-Haut für $n = 67$ Fälle

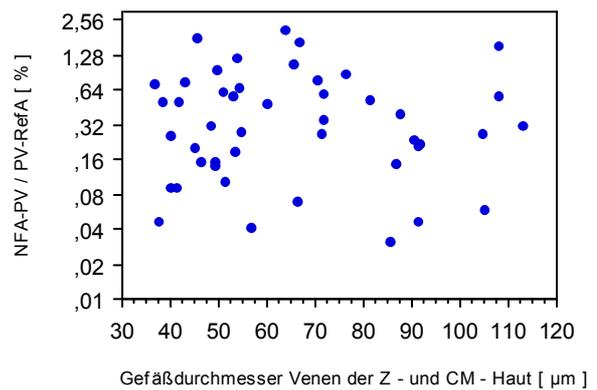


Abbildung 4.13
Scattergramm der perivaskulären Nervenfaserdichtendichte (NFA-PV/PV-RefA [%]) der Venen und der Gefäßdurchmesser D_G (μm) der Z- und CM-Haut für $n = 49$ Fälle

4.8 Intraindividuelle Korrelation der perivaskulären Innervation zwischen Arterien und Venen innerhalb eines Hautareals

Die im folgenden Kapitel zugrunde liegenden Korrelationen morphometrischer Parameter sind mit Gefäßdurchmessern zwischen 25 und 125 μm durchgeführt worden, da in diesem Durchmesserintervall sowohl für die Arterien, wie auch für die Venen das größte Gefäßvorkommen liegt (s. Kapitel 4.6). Es wurden nur Gefäße mit runder Anschnittebene ($D_{G_{\text{max}}}/D_{G_{\text{min}}} \leq 1,5$) verwendet. Die Anzahl der beteiligten Patientenpaare ist bei jeder graphischen Darstellung angezeigt.

4.8.1 Korrelation der perivaskulären Nervenfaserdichtendichte und Nervenfaserpartikeldichte zwischen Arterien und Venen eines Hautareals

4.8.1.1 Großzehenhaut (Z-Haut)

Zwischen der perivaskulären Arterien- und Veneninnervation der Großzehenhaut ergibt sich für den Parameter der Nervenfaserdichtendichte bezogen auf die totale Referenzfläche (NFA-T/Total-RefA) ein Spearman Rangkorrelationskoeffizient von $r_s = 0,52$ mit einem Signifikanzwert von $p = 0,028$ (Abbildung 4.14). In Abbildung 4.15 erfolgt die gleiche Berechnung für die relative Nervenfaserpartikeldichte (NFC-T/Total-RefA) beider Gefäßtypen. Hierbei stellt sich ein sehr signifikantes Ergebnis mit $p = 0,008$ und einem Spearman Korrelationskoeffizienten von $r_s = 0,61$ heraus.

Damit zeichnet sich für die letztgenannte Korrelation ein beginnender statistischer Zusammenhang ab.

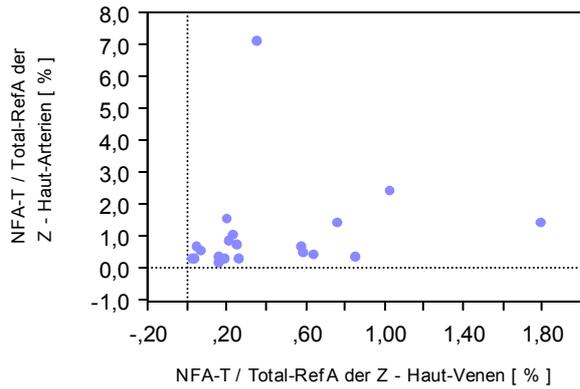


Abbildung 4.14
Korrelation der Nervenfaserschichtdichte in der Gesamtmesszone (NFA-T/Total-RefA [%]) zwischen Arterien und Venen der Z-Haut für 20 Patientenpaare

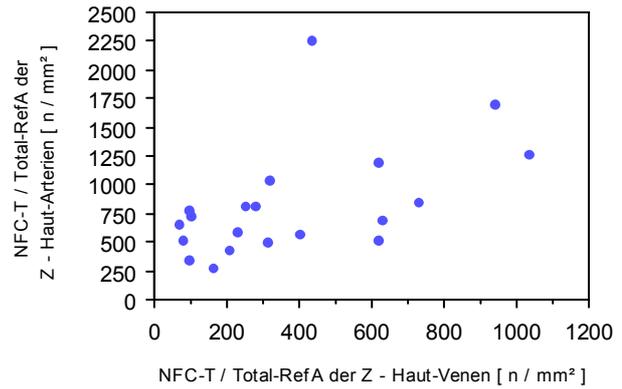


Abbildung 4.15
Korrelation der Nervenfaserschichtdichte in der Gesamtmesszone (NFC-T/Total-RefA [n/mm²]) zwischen Arterien und Venen der Z-Haut für 20 Patientenpaare

4.8.1.2 Caput metatarsale Haut (CM-Haut)

Für die perivaskuläre Innervation der arteriellen und venösen Caput metatarsale Haut läßt sich kein statistischer Zusammenhang erheben, was die Nervenfaserschichtdichte bezogen auf die Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA) betrifft. Hierbei zeigt sich für den Parameter der Nervenfaserschichtdichte (Abbildung 4.16) ein Spearman Rangkorrelationskoeffizient von $r_s = 0,54$ bei einem Signifikanzwert $p = 0,005$. Die Abbildung 4.17 gibt die Korrelation der Nervenfaserschichtdichte pro Gesamtmeßzone (NFC-T/Total-RefA) wider. Dabei ergibt sich ebenso keine Korrelation ($r_s = 0,51$ bei $p = 0,01$).

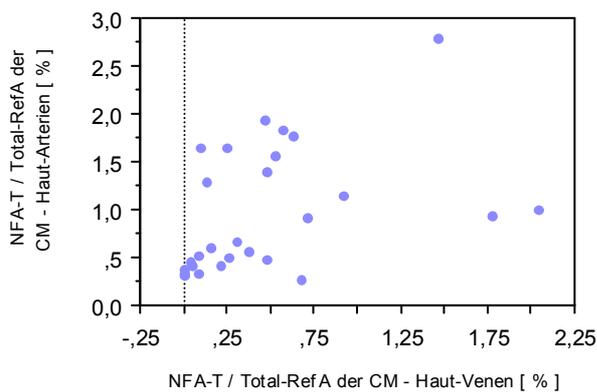


Abbildung 4.16
Korrelation der Nervenfaserschichtdichte in der Gesamtmesszone (NFA-T/Total-RefA [%]) zwischen Arterien und Venen der CM-Haut für 27 Patientenpaare

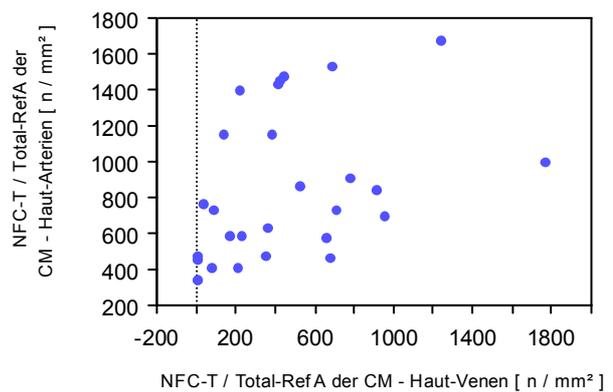


Abbildung 4.17
Korrelation der Nervenfaserschichtdichte in der Gesamtmesszone (NFC-T/Total-RefA [n/mm²]) zwischen Arterien und Venen der CM-Haut für 27 Patientenpaare

Hinsichtlich der perivasculären Nervenfaserschichtdichte bzw. der Nervenfaserschichtdichte in der Gesamtmeßzone liegt keine ausreichende statistische Korrelation zwischen Arterien und Venen beider Hautareale vor.

4.8.2 Vergleich der quantitativen Nervenfaserschichtdichte und Nervenfaserschichtdichte zwischen Arterien und Venen eines Hautareals

Die vier folgenden Abbildungen spiegeln das Verhältnis der Nervenfaserschichtdichte (NFA-T/Total-RefA) bzw. der Nervenfaserschichtdichte (NFC-T/Total-RefA) in der Gesamtmeßzone zwischen Arterien und Venen pro Patient wider. Dabei ist allen Gegenüberstellungen gleich, daß sowohl die Nervenfaserschichtdichte wie auch die Nervenfaserschichtdichte in der Gesamtmeßzone bei Arterien deutlich höher liegt, als bei Venen. Dies gilt für beide Hautstellen.

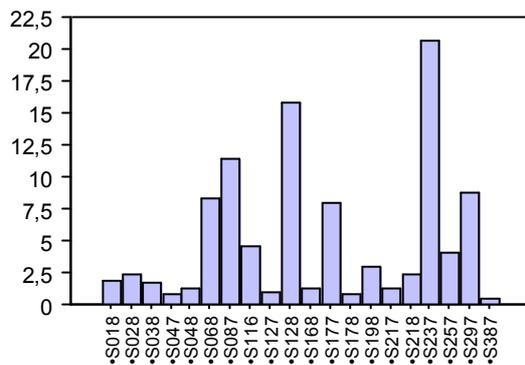


Abbildung 4.18
Verhältnis der Nervenfaserschichtdichte in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA [%]) zwischen Arterien und Venen der Z-Haut für 20 Patientenpaare, DK 25-125µ

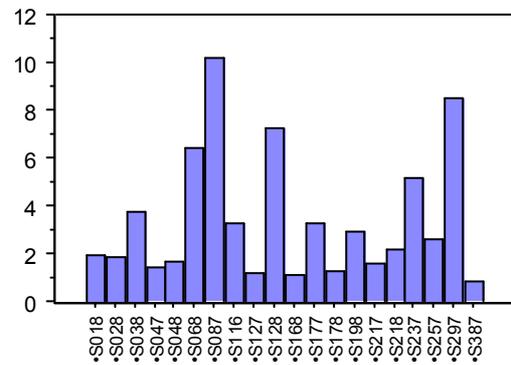


Abbildung 4.19
Verhältnis der Nervenfaserschichtdichte in der Gesamtmeßzone (NFC-T/Total-RefA [n/mm²]) zwischen Arterien und Venen der Z-Haut für 20 Patientenpaare, DK 25-125µ

In diesem Fall bedeutet dies im Mittel eine 2,6fach höhere Nervenfaserschichtdichte pro Gesamtmeßzone der Z-Hautarterien im Vergleich zu den Z-Hautvenen (s. Abbildung 4.18) und eine 2,0fach höhere Nervenfaserschichtdichte der CM-Hautarterien im Vergleich zu den CM-Hautvenen (s. Abbildung 4.20). Für die Nervenfaserschicht pro Gesamtmeßzone ergibt sich das 2,2fache für die Z-Hautarterien im Vergleich zu den Z-Hautvenen (s. Abbildung 4.19) und das 1,9fache für das Verhältnis der CM-Hautarterien zu den CM-Hautvenen zugunsten der Arterien (s. Abbildung 4.21).

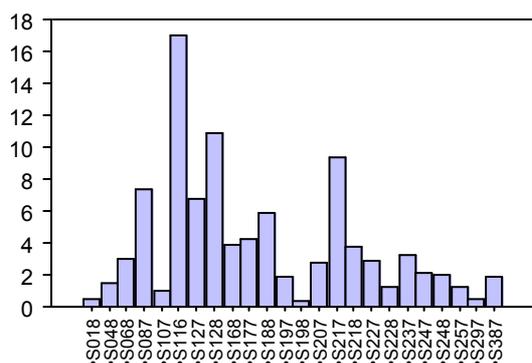


Abbildung 4.20
Verhältnis der Nervenfaserflächendichte in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA [%]) zwischen Arterien und Venen der CM-Haut für 24 Patientenpaare, DK 25-125µ

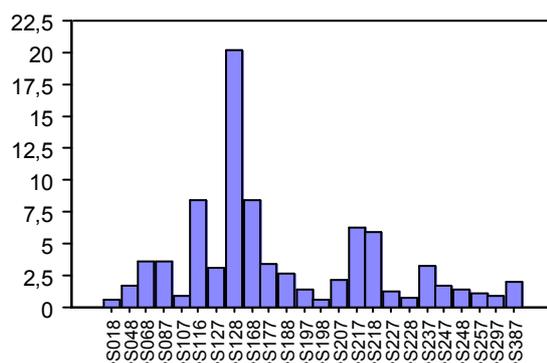


Abbildung 4.21
Verhältnis der Nervenfaserpartikeldichte in der Gesamtmeßzone (NFC-T/Total-RefA [n/mm²]) zwischen Arterien und Venen der CM-Haut für 24 Patientenpaare, DK 25-125µ

4.9 Intraindividuelle Korrelation der perivaskulären Gefäßinnervation zwischen der Zehen- und Caput metatarsale Haut

4.9.1 Korrelation der periarteriellen Nervenfaserflächendichte zwischen der Z- und CM-Haut

Vergleicht man die Nervenfaserflächendichte in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA) zwischen Arterien der Zehen- und Caput metatarsale Haut mit einem Gefäßdurchmesser von 25 bis 125 µm, so liegt die Innervationsflächendichte im Durchschnitt für die CM-Haut bei 0,99 % und für die Z-Haut bei 1,11 % der Gesamtmeßzone (Mediafläche plus adventitielle Meßzone mit einer Breite von 40 µm). Lediglich zwischen 0,003 % und 0,004 % der gesamten Nervenfaserflächendichte befinden sich in der Media. Im Mittel ergibt sich eine annähernd ausgeglichene Verteilung der periarteriellen Nervenfaserflächendichte mit einer 1,1 fach höheren Nervenfaserfläche in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA [%]) zugunsten der Z-Hautarterien (s. Abb. 4.22). Der Hauptteil der arteriellen Gefäßinnervation ist in der perivaskulären Meßzone (40 µm breiter Gürtel, der um die Tunica media liegt und die Tunica Adventitia beinhaltet) nachzuweisen, unabhängig von der entnommenen Hautstelle. Die arterielle Nervenfaserflächendichte nimmt prozentual Werte zwischen 0,18 % und 7,13 % der Gesamtmeßfläche in Anspruch. In der Spearman Rangkorrelation ergibt sich ein mittelstarker Korrelationskoeffizient von $r_s = 0,7$ bei einem signifikanten Zusammenhang ($p = 0,02$) (s. Abbildung 4.23).

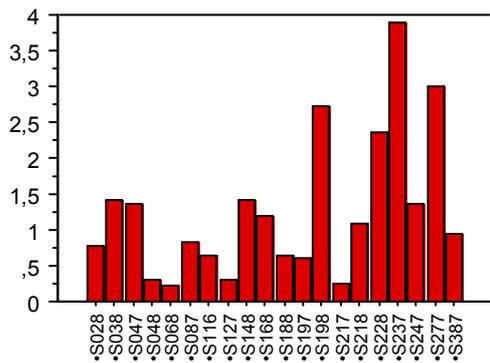


Abbildung 4.22
Verhältnis der Nervenfaserdichte in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA [%]) zwischen Arterien der Z-Haut und CM-Haut für 20 Paare, DK 25-125 μ

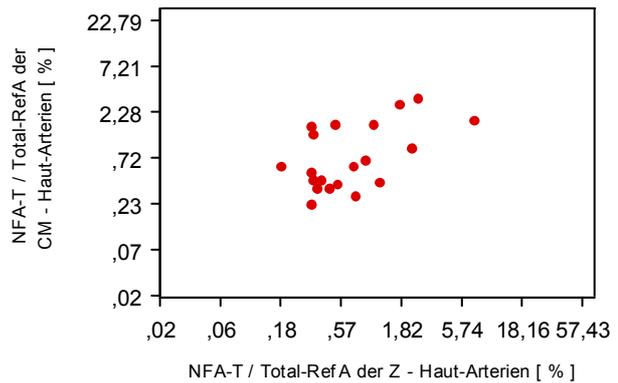


Abbildung 4.23
Vergleich der Nervenfaserdichte in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA [%]) zwischen Arterien der CM-Haut und Z-Haut für 20 Paare, DK 25-125 μ

4.9.2 Korrelation der periarteriellen Nervenfaserpunkteldichte zwischen der Z- und CM-Haut

Bezugnehmend auf die arterielle Nervenfaserpunkteldichte in der Gesamtmeßzone (NFC-T/Total-RefA) zwischen der Z- und CM-Haut können mittlere Nervenpartikelzahlen pro mm^2 (Gesamtmeßzone) von 826 für die CM-Haut und von 806 für die Z-Haut beschrieben werden. Die Spannweite der Nervenpartikelanzahl ist in der Z-Haut mit Werten zwischen 276 und 2253 pro Gesamtmeßzone größer als in der Vergleichshautstelle. Auch in diesem Falle liegt die arterielle Nervenfaserpunkteldichte in der Media in beiden Hautarealen unter 1 ‰ und ist somit vernachlässigbar. Wie in Abb. 4.25 anhand der relativ dichten Punktwolke erkennbar, liegt ein statistisch mittelstarker und signifikanter Zusammenhang zwischen der arteriellen Nervenpartikelanzahl beider Hautstellen vor ($r_s = 0,68$, p-Wert = 0,03). Abbildung 4.24 zeigt das Verhältnis der Nervenfaserpunkteldichte zwischen den Arterien der Z- und CM-Hautarterien pro Patient.

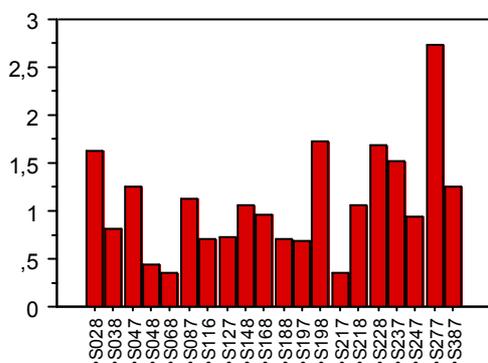


Abbildung 4.24
Verhältnis der Nervenfaserpunkteldichte in der Gesamtmeßzone (NFC-T/Total-RefA [n/mm^2]) zwischen Arterien der Z-Haut und CM-Haut für 20 Paare, Dk 25-125 μ

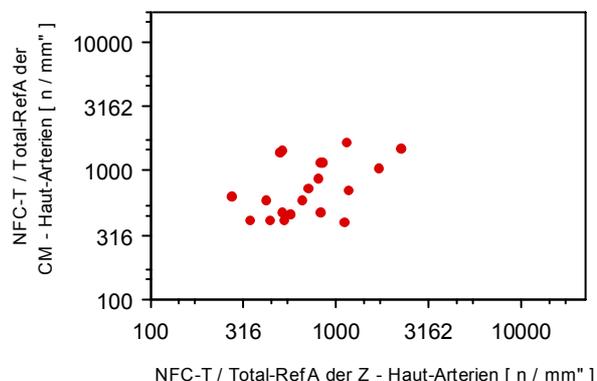


Abbildung 4.25
Vergleich der Nervenfaserpunkteldichte in der Gesamtmeßzone (NFC-T/Total-RefA [n/mm^2]) zwischen Arterien der CM-Haut und Z-Haut für 20 Paare, DK 25-125 μ

4.9.3 Korrelation der perivenösen Nervenfaserflächendichte zwischen der Z- und CM-Haut

Mit einer deutlich geringeren mittleren prozentualen Nervenfaserflächendichte zwischen 0,32 % in der Z-Haut und 0,49 % in der CM-Haut pro Gesamtmeßzone unterscheiden sich die venösen Gefäße mit einem Durchmesser von 25 bis 125 µm von den Arterien mit gleichen Durchmesserklassen. Die Spannweite reicht von fehlendem Innervationsnachweis bis maximal 2 % Nervenfaserflächendichte pro Gesamtmeßzone in der venösen CM-Haut. Das Verhältnis der Nervenfaserflächendichte zwischen den Z- und CM-Hautvenen weist eine 1,6 fach höhere Nervenfaserflächendichte in der CM-Haut auf (s. Abb. 4.26). Ein statistisch verwertbarer Zusammenhang zwischen der Nervenfaserflächendichte der Z- bzw. CM-Hautvenen läßt sich in der Spearman Rangkorrelation (s. Abbildung 4.27) nicht ersehen ($r_s = 0,093$, $p > 0,05$).

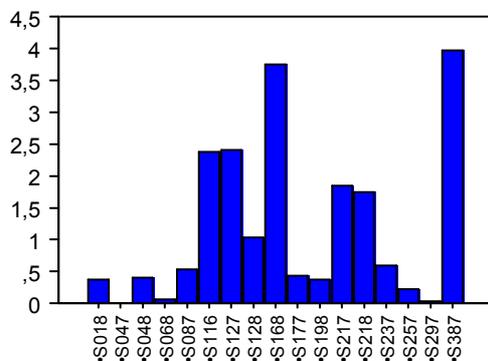


Abbildung 4.26
Verhältnis der Nervenfaserflächendichte in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA [%]) zwischen Venen der Z-Haut und CM-Haut für 17 Paare, Dk 25-125µ

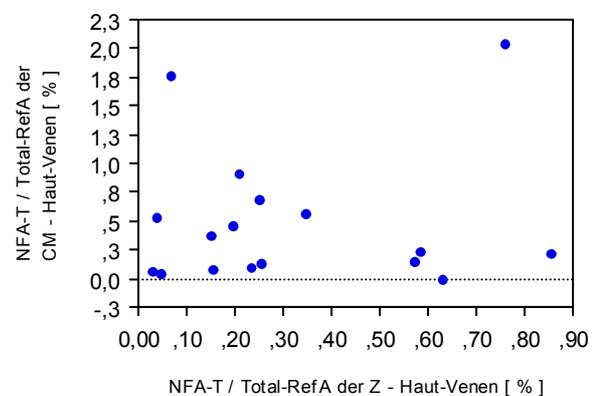


Abbildung 4.27
Vergleich der Nervenfaserflächendichte in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA [%]) zwischen Venen der Z-Haut und CM-Haut für 17 Paare, Dk 25-125µ

4.9.4 Korrelation der perivenösen Nervenfaserpartikeldichte zwischen der Z- und CM-Haut

Äquivalent zur niedrigeren Nervenfaserflächendichte verhält sich die venöse Nervenfaserpartikeldichte in der Gesamtmeßzone. Mittelwerte von 411 Nervenpartikel pro Gesamtmeßzone für die Venen der CM-Haut und 325 Partikel pro Gesamtmeßzone für die Z-Haut sind weniger als die Hälfte im Vergleich zu den Arterien. Grundsätzlich ist die Innervation schwächer als bei den Arterien ausgeprägt und unterliegt größeren Schwankungsbreiten. Das Verhältnis der Nervenfaserpartikeldichte zwischen den Venen der Z- und CM-Haut liegt mit dem 1,3 fachen bei den CM-Hautvenen (s. Abb. 4.28). Eine Korrelation zwischen der venösen Nervenfaserpartikel der CM-Haut und Z-Haut (s. Abbildung 4.29) läßt sich mit einem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten von $r_s = 0,05$ und einem $p > 0,05$ nicht ableiten. Innerhalb einer Hautstelle dagegen

korreliert erwartungsgemäß die Nervenflächendichte zur Nervenfaserpartikeldichte in der Gesamtmeßzone.

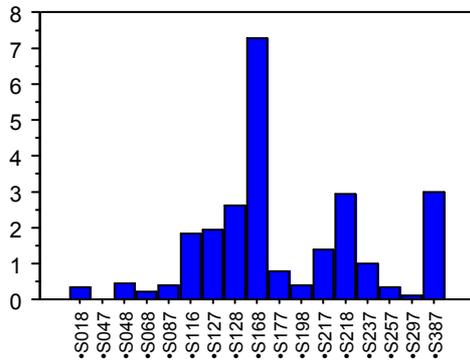


Abbildung 4.28
Verhältnis der Nervenfaserpartikeldichte in der Gesamtmeßzone (NFC-T/Total-RefA [n/mm²]) zwischen Venen der Z-Haut und CM-Haut für 17 Paare, Dk 25-125µ

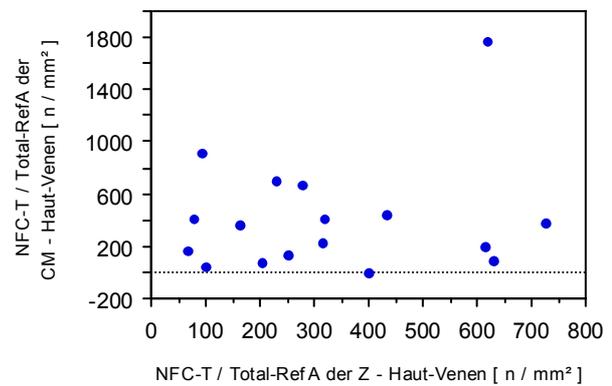


Abbildung 4.29
Vergleich der Nervenfaserpartikeldichte in der Gesamtmeßzone (NFC-T/Total-RefA [n/mm²]) zwischen Venen der CM-Haut und Z-Haut für 17 Paare, Dk 25-125µ

4.10 Korrelation zwischen der perivasculären Innervationsdichte der Z- und CM-Haut und Dichtewerten des Nervus tibialis

Es handelt sich dabei ausschließlich um ein Patientenkollektiv, das auf der Basis morphologischer Untersuchungen des N. tibialis als neuropathisch (Myelinflächendichte pro Endoneurium $\leq 20\%$) einzustufen ist. Dabei wurde die Myelinflächendichte bzw. die Nervenfaserpartikel des N. tibialis mit den von ihm innervierten Hautarealen in Bezug gesetzt. Alle Arterien sowie Venen sind nach der morphologischen Gefäßtypisierung rund angeschnitten ($D_{Gmax}/D_{Gmin} \leq 1,5$) und besitzen einen Durchmesser von 25-125 µm. Die Berücksichtigung eines speziellen Nervenfaserdurchmessers des peripheren Nervens findet in diesem Kapitel nicht statt. In Tab. 4.8 sind die zugrunde liegenden Parameter des N. tibialis deskriptiv aufgeführt.

	Nervus tibialis	
	Myelinflächendichte [%]	Nervenfaseranahl [n/mm ²]
Mittelwert	0,13	6422
Minimum	0,02	1523
Maximum	0,19	10326
Median	0,11	6717
Standardabweichung	0,06	2087
Patientenfallzahl	21	21

Tabelle 4.8
Deskriptive Parameter der Myelinflächendichte und Nervenfaseranahl pro mm² des neuropathischen Nervus tibialis ohne Berücksichtigung eines speziellen Nervenfaserdurchmessers. Die Summe der gemessenen Myelinfläche pro Analyseausschnitt eines Nervenfaserbündels entspricht der Myelinflächendichte. Die Nervenfaseranahl pro mm² bezieht sich ebenso auf den Analyseausschnitt eines Nervenfaserbündels.

4.10.1 Korrelation zwischen der perivaskulären Innervation der Arterien der Metatarsalhaut und dem N. tibialis

Es wurde die CM-Hautarterieninnervation dem mittleren Myelinflächendichteanteil des zugehörigen N. tibialis des gleichen Patienten gegenübergestellt. Die miteinander korrelierten Ränge führten bei insgesamt 21 Patientenpaaren mit morphologisch nachgewiesener Neuropathie zu den unten aufgeführten Spearman Rangkorrelationskoeffizienten (r_s). Sowohl bei der Korrelation der Abbildung 4.30 ($r_s = 0,098$, $p > 0,05$), wie auch der Abbildung 4.31 ($r_s = 0,187$, $p > 0,05$) besteht kein statistischer Zusammenhang.

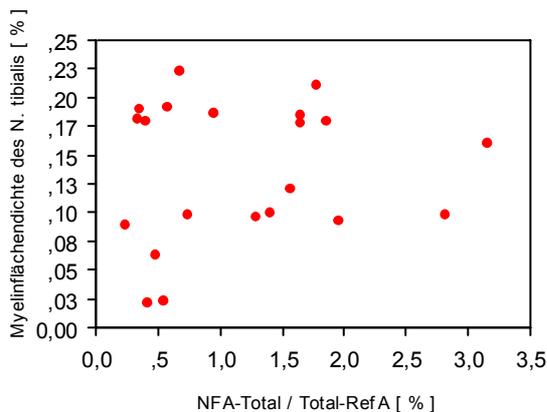


Abbildung 4.30
Verhältnis der perivaskulären Nervenfaserdichte in der Gesamtmeßzone (NFA-Total/Total-RefA [%]) der CM-Haut-Arterien zur Myelinflächendichte des N. tibialis (n = 21)

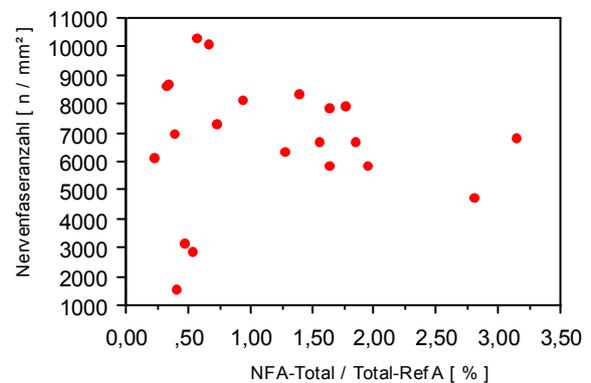


Abbildung 4.31
Verhältnis der perivaskulären Nervenfaserdichte in der Gesamtmeßzone (NFA-Total/Total-RefA [%]) der CM-Haut-Arterien zur Nervenfaserpartikel pro mm² des N. tibialis (n = 21)

4.10.2 Korrelation zwischen der perivaskulären Innervationsdichte der Venen der Metatarsalhaut und dem N. tibialis

Zur Verfügung standen 17 Patientenpaare der CM-Hautvenen und des zugehörigen neuropathischen N. tibialis. Es konnte zwischen der perivaskulären Nervenfaserdichte in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA) und der Myelinflächendichte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Für das verglichene Parameterpaar der Abbildung 4.32 lag ein $r_s = 0,051$ und ein Signifikanzwert von $p > 0,05$ vor.

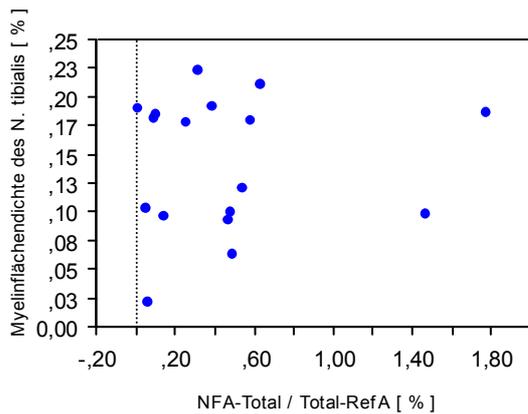


Abbildung 4.32
Verhältnis der perivaskulären Nervenfaserflächendichte in der Gesamtmeßzone (NFA-Total/Total-RefA [%]) der CM-Hautvenen zur Myelinflächendichte des N. tibialis (n= 17)

4.10.3 Korrelation zwischen der perivaskulären Innervationsdichte der Arterien der Zehenhaut und dem N. tibialis

In Abbildung 4.33 und Abbildung 4.34 zeigen sich innerhalb der 14 Patientenpaare bei morphologisch nachgewiesener neuropathischer Schädigung des N. tibialis bzgl. der perivaskulären Nervenfaserflächendichte in der Gesamtmeßzone der Z-Hautarterien keine statistisch relevanten Korrelationen. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient r_s lag in Abbildung 4.33 bei 0,055. und in Abbildung 4.34 bei $r_s = -0,147$. In beiden Fällen wurden keine signifikanten Ergebnisse erreicht.

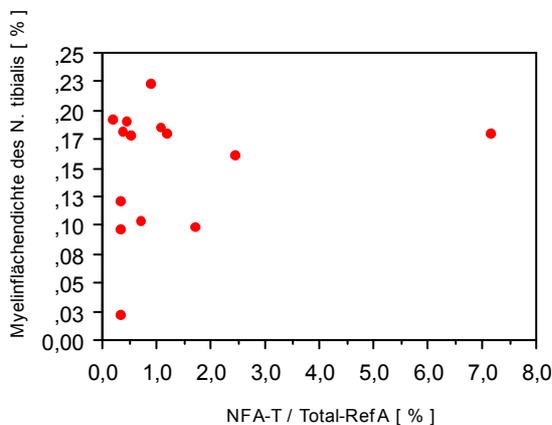


Abbildung 4.33
Verhältnis der perivaskulären Nervenfaserflächendichte in der Gesamtmeßzone (NFA-Total/Total-RefA [%]) der Z-Hautarterien zur Myelinflächendichte des N. tibialis (n= 14)

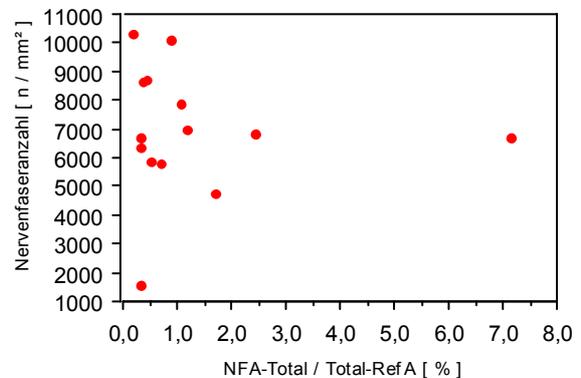


Abbildung 4.34
Verhältnis der perivaskulären Nervenfaserflächendichte in der Gesamtmeßzone (NFA-Total/Total-RefA [%]) der Z-Hautarterien zur Nervenfasernzahl pro mm² des N. tibialis (n= 14)

4.10.4 Korrelation zwischen der perivaskulären Innervationsdichte der Venen der Zehenhaut und dem N. tibialis

Zwischen der perivaskulären Veneninnervation der Z-Haut und der Myelinflächendichte des N. tibialis konnten keine signifikanten Zusammenhänge erkannt werden. Im Einzelnen bedeutet dies

für die Abbildung 4.35 einen Rangkorrelationskoeffizienten von $r_s = 0,093$ bei einem Signifikanzwert von $p > 0,05$.

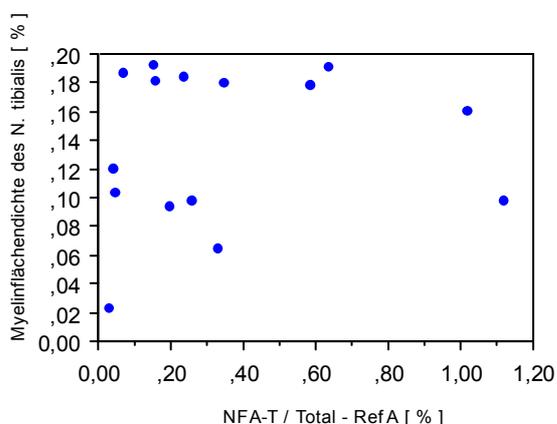


Abbildung 4.35
Verhältnis der perivaskulären Nervenfaserschichtendichte in der Gesamtmeßzone (NFA-Total / Total-RefA [%]) der Z-Hautvenen zur Myelinflächendichte des N. tibialis (n= 15)

4.11 Korrelation der perivaskulären Innervationsdichte der CM- und Z-Haut mit Nervenfasersubpopulationen des Nervus tibialis

Analog zu den Berechnungen der Abschnitte 4.10.1 bis 4.10.4 wurden gleichartige Analysen für die Subpopulationen der großkalibrigen (Faserdurchmesser $> 7 \mu\text{m}$) (s. Tab. 4.9) und kleinkalibrigen (Faserdurchmesser $< 7 \mu\text{m}$) (s. Tab. 4.10) Faseranteile entsprechend der bimodalen Durchmesser-Verteilung durchgeführt. Die zugehörigen Spearman Korrelationskoeffizienten r_s sind in Tabelle 4.9 und 4.10 komprimiert aufgeführt. Die schwach ausgeprägten statistischen Zusammenhänge können keine relevanten Korrelationen zwischen der medialen Fußsohlenhaut und den Nervenfasersubpopulationen des N. tibialis aufzeigen, die für einen gleichsinnigen Innervationsrückgang sprechen.

N. tibialis – Subpopulation mit Faserdurchmesser $> 7 \mu\text{m}$			
Spearman Rangkorrelationskoeffizient (r_s) für :		Korrelation Myelinflächendichte [%] und Nervenfaserschichtendichte [%]	Korrelation Nervenfaserschichtendichte [%] und Nervenfaserschichtendichte [%]
CM - Haut	Arterien (n=21)	$r_s = 0,211$	$r_s = 0,156$
	Venen (n=17)	$r_s = 0,127$	$r_s = 0,088$
Z - Haut	Arterien (n=14)	$r_s = 0,451$	$r_s = 0,235$
	Venen (n=15)	$r_s = 0,261$	$r_s = 0,196$

Tabelle 4.9
Spearman Korrelationskoeffizienten (r_s) für die Korrelation zwischen der Myelinflächendichte bzw. der Nervenfaserschichtendichte großkalibriger N. tibialis-Fasern ($> 7 \mu\text{m}$) und der perivaskulären Nervenfaserschichtendichte in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA [%]) der beiden Leistenhautareale. Für alle 8 Korrelationen liegen Signifikanzwerte von $p > 0,05$ vor. N gibt die Anzahl der Patientenpaare der perivaskulären Hautregion mit dem zugehörigen N. tibialis wider. Für die Gefäßmorphologie gilt: ($D_{Gmax}/D_{Gmin} \leq 1,5$), Durchmesserklasse 25-125 μm

N. tibialis – Subpopulation mit Faserdurchmesser < 7 µm			
Spearman Rangkorrelationskoeffizient (r_s) für :		Korrelation Myelinflächendichte [%] und Nervenfaserflächendichte [%]	Korrelation Nervenfaseranzahldichte [%] und Nervenfaserflächendichte [%]
CM - Haut	Arterien (n=21)	$r_s = - 0,174$	$r_s = - 0,200$
	Venen (n=17)	$r_s = - 0,069$	$r_s = - 0,097$
Z - Haut	Arterien (n=14)	$r_s = - 0,424$	$r_s = - 0,365$
	Venen (n=15)	$r_s = 0,064$	$r_s = 0,100$

Tabelle 4.10

Spearman Korrelationskoeffizienten (r_s) für die Korrelation zwischen der Myelinflächendichte bzw. der Nervenfaseranzahldichte kleinkalibriger N. tibialis-Fasern (< 7 µm) und der perivaskulären Nervenfaserflächendichte in der Gesamtmeßzone (NFA-T/Total-RefA [%]) der beiden Leistenhautareale. Für alle 8 Korrelationen liegen Signifikanzwerte von $p > 0,05$ vor. N gibt die Anzahl der Patientenpaare der perivaskulären Hautregion mit dem zugehörigen N. tibialis wider. Für die Gefäßmorphologie gilt: $(D_{Gmax}/D_{Gmin} \leq 1,5)$, Durchmesserklasse 25-125 µm

5 DISKUSSION

5.1 Die Quantifizierung der perivaskulären Innervation der Fußsohlenhaut im Kontext der bisher beschriebenen Methoden histologischer Polyneuropathiediagnostik an der Haut

Die hier vorgestellten Untersuchungen beschäftigen sich mit der Frage, ob und inwieweit der Einsatz von Hautbiopsien zur Diagnosesicherung einer peripheren Polyneuropathie in der klinischen Praxis durchführbar und aussagekräftig ist. Im Falle der praktischen Umsetzung sollte man in der Lage sein, durch eine nur wenige Millimeter betragende Stanzbiopsie der Haut (s. Kap. 4.5 und 5.10) auf eine periphere Polyneuropathie schließen zu können. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei auf der Quantifizierung der perivaskulären Innervation der distalen Fußsohlenhaut, die in Bezug zum ipsilateralen Nervus tibialis gesetzt wurde.

Zu dieser Fragestellung liegt bislang keine Publikation vor. Dies gilt zum einen für die visceroefferente perivaskuläre Innervation der Fußsohlenhaut im Bereich des Fußballens und der Großzehe, zum anderen für die Korrelation mit dem dazugehörigen N. tibialis, der dieses Hautareal sensibel innerviert. Es ist nicht bekannt, in welchem Ausmaß eine polyneuropathische Schädigung eines peripheren Nervens (hier N. tibialis) sich in einer Reduktion der autonomen Gefäßinnervation der Fußsohlenhaut und vice versa widerspiegelt und inwieweit man daraus Rückschlüsse auf das Stadium einer Neuropathie ziehen darf. Dass es im Rahmen einer Polyneuropathie zu einer Schädigung viszero-efferenter Nervenfasern kommt, ist unbestritten (PROPERZI et al., 1993) und zeigt sich klinisch z. B. in einer gestörten Vasomotorik mit den bekannten Konsequenzen trophischer Störungen (Tooke JE, Brash PD, 1996). Ein weiterer, bislang nicht untersuchter biologischer Zusammenhang, war die Einbeziehung bemerkter Nervenfasern (hier N. tibialis) in die Thematik des Polyneuropathienachweises und die Hypothese einer Korrelation zur plantaren Fußsohlenhaut hinsichtlich der quantitativen Gefäßinnervation. Bekannt ist bislang nur die enge Korrelation zwischen polyneuropathischen Veränderungen im N. suralis und N. tibialis (LINDEMUTH et al., 2002). Die Fachliteratur bezieht sich hinsichtlich der Polyneuropathiediagnostik nur auf den rein sensiblen N. suralis, der zur Stadienbestimmung einer peripheren Neuropathie bislang als ultima ratio biopsiert werden musste (DYCK et al., 1984). Alle bislang veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten legten für die quantitative Nervenfaserbestimmung im Rahmen der Polyneuropathiediagnostik an der Haut nur die freien Nervenendigungen, also rein sensible Fasern in epidermalen Hautschichten oder autonome Nervenfasern in periglandulären Arealen der Schweißdrüsen als Untersuchungsobjekte zugrunde

(LEVY, 1989 und 1992; PROPERZI et al., 1993; HOLLAND et al., 1997; HERRMANN et al., 1999; KENNEDY et al., 1994, 1996 und 1999; PERIQUET et al., 1999).

5.2 Allgemeine Beurteilung des Verfahrens

Die N. suralis Biopsie ist der Standard zur histologischen Diagnose einer peripheren Polyneuropathie (DYCK et al., 1984). Neben dem Myelinisierungsgrad und -zustand kann auch die Nervenfasernzahl und -dichte beurteilt werden. Zusätzlich lassen sich Aussagen über das Gefäßbett (Vaskulitis, Angiopathie) treffen. Nachteile der Suralis-Biopsie sind die bekannten Operationsrisiken sowie Sensibilitätsverluste im Versorgungsgebiet des Nerven und damit das erhöhte Risiko für chronische Geschwüre bei einer oftmals ohnehin schon trophisch beeinträchtigten Haut. Eine Wiederholbarkeit bzw. eine Beurteilung im Verlauf sind zudem nicht möglich. Die Hautbiopsie als minimal invasives Verfahren hat dem gegenüber einige Vorteile, die den oben genannten Zielen gerecht werden könnten. Die Überlegung beruht darauf, dass die Haut als Sinnesorgan mit den in ihr vorkommenden viszeromotorischen Effektororganen und Rezeptorstrukturen als Untersuchungsorgan genutzt werden könnte, um periphere Innervationsstörungen frühzeitig detektieren zu können, da morphologische Veränderungen in der Regel distal der unteren Extremitäten beginnen und sich durch „dying back“ zentripetal fortsetzen (HOLLAND et al., 1998). Aber nicht nur die gute Zugänglichkeit zu bestimmten in der Haut vorkommenden Strukturen wäre von Vorteil, sondern auch die Tatsache, dass unterschiedliche Hautareale des menschlichen Körpers auf das Ausmaß einer neuropathischen Schädigung hin untersucht und miteinander verglichen werden könnten. Von entscheidender Bedeutung wäre in diesem Zusammenhang zudem die Wiederholbarkeit von Hautstanzen, um im zeitlichen Verlauf einer Erkrankung oder auch einer Therapie eine Mitbeteiligung peripherer Hautnerven hinsichtlich einer Besserung oder Verschlechterung beurteilen zu können. Mit einer deutlich geringeren Belastung für den Patienten wäre zudem ein relativ kostengünstiges Verfahren gefunden, das in der klinischen Praxis oder auch im ambulanten Bereich Anwendung finden könnte.

5.3 Patientenkollektiv

Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf Leichenmaterial. Im Entnahmezeitraum bis maximal 48 h post mortem konnte kein statistisch erkennbarer Einfluß der Autolysezeit auf die Innervationsdichte erkannt werden. Anzumerken ist, dass im Vergleich zu anderen veröffentlichten Arbeiten (DALSGAARD et al., 1984; PROPERZI et al., 1993; HOLLAND et al., 1997;

HERRMANN et al., 1999; KENNEDY et al., 1994, 1996 und 1999; PERIQUET et al., 1999) der größte Teil der Patienten keine neurologische Voruntersuchung oder weitere spezielle elektrophysiologische Analysen erfahren hatte, die zusätzliche Informationen über den neurologischen Status hätten liefern können. Da die Patientenauswahl keiner speziellen Selektion unterlegen war, gestaltete sich das Gesamtkollektiv sehr heterogen (s. Kap. 4.2). Somit konnte eine weite Variation der neuropathischen Veränderungen und damit der Messwerte zum Vorteil der statistischen Bearbeitung erfasst werden. Eine Abgrenzung von neuropathisch veränderten Nerven gegenüber einem noch normalem histologischen Bild erfolgte nach WANG und SCHRÖDER (2000), deren Kriterien ebenfalls in einer Arbeit von LINDEMUTH et al. (2002) über die histomorphologische Untersuchung des N. suralis und N. tibialis zur Anwendung gekommen waren. In dieser Untersuchung beziehen sich die Korrelationen zwischen den Hautstellen der Fußsohle und des N. tibialis ausschließlich auf neuropathische Patienten (s. Kap. 3.4.1). Obwohl ein direkter Vergleich zwischen neuropathischen bzw. nicht neuropathischen Patienten nicht möglich war, konnte die Fragestellung dieser Studie trotzdem erfüllt werden, da es schließlich um die Überprüfung der Aussage ging, ob eine Korrelation zwischen der perivaskulären Leistenhautinnervation und dem dazugehörigen N. tibialis innerhalb eines polyneuropathischen Patientenkollektivs vorlag.

5.4 Methodik

5.4.1 Fixierung und Schnitttechnik

Die Gewebefixierung mit Zamboni und anschließender Kryokonservierung ist ein relativ schonendes Verfahren zur Fixierung empfindlicher Oberflächenantigene (ROSE et al., 1980). Intrazelluläre Antigene werden durch die Gefriertechnik ebenfalls schnell erfaßt, so dass einer intrazellulären Enzymaktivierung vorgebeugt wird. Dieses Risiko dezimiert sich mit abnehmender Dicke bzw. Tiefe einer Gewebeprobe, was in der hiesigen Präparationstechnik (Schnittdicke 7 µm) beachtet wurde.

5.4.2 Anwendung von Protein Gene Produkt 9.5

Die in wissenschaftlichen Untersuchungen der epidermalen Innervation bis Anfang der achtziger Jahre angewandte Silberfärbung (RIDLEY, 1969) wurde aufgrund einer vollständigeren und verlässlicheren Darstellung nervaler Strukturen mittels immunhistologischen Methoden verlassen. PGP 9.5 (WANG et al., 1990), welches als neuron-spezifisches Protein sowohl im zentralen, wie

auch im peripheren Nervengewebe und in neuroendokrinen Zellen detektiert werden konnte, wurde statt dessen eingesetzt (THOMPSON et al., 1983). PGP 9.5 ist dabei ausschließlich im Zytoplasma des Neurons vorhanden, da es eine Hauptkomponente der Zytoplasma-zusammensetzung darstellt (THOMPSON, 1981; GULBENKIAN et al., 1987; WANG, 1990; KARANTH et al., 1991). Gegenüber Neuropeptiden, wie z. B. Neuron-Spezifische Enolase (NSE), Neurofilamenten, Acetylcholinesterase und Cholinacetyltransferase, zeigt PGP 9.5 aufgrund der neuronalen zytoplasmatischen Gewebskonzentration die intensivste Anfärbbarkeit und damit die sicherste Darstellung neuronalen Gewebes (JOHANSSON et al., 1999). Dies gilt sowohl für die Epidermis und Dermis, wie auch für die Hautanhangsgebilde wie Schweißdrüsen, Haarfollikel, aber auch für die perivaskuläre Innervation (KARANTH et al., 1991).

5.4.3 Detektionsmethode

Das Immunperoxidase-Verfahren bietet durch den Avidin-Biotin-Komplex eine stabile Verbindung und sichere Reaktion, um die gewünschten Zellkomponenten am Ort der Peroxidasereaktion sichtbar zu machen (BULLOCK et al., 1982). Das Enzym Peroxidase ist sehr stabil und bleibt während der Aufbewahrung und Anwendung unverändert. Als kleines Molekül behindert es nicht die Bindung von Antikörpern. Die geringen Kosten sind ein zusätzlicher Vorteil. Da vor allem rote und weiße Blutkörperchen eine endogene Peroxidaseaktivität besitzen, mußten diese zuerst blockiert werden, um Artefakte zu verhindern. Dazu wurde 3 % Wasserstoffperoxid verwendet. Die Avidin-Biotin-Methode bietet die Möglichkeit, eine Vielzahl von Antigenen darzustellen. Durch die ausgeprägte Affinität des Avidins zum Biotin wird die Färbequalität deutlich verbessert. Die Menge des präzipitierten Chromogens und damit die Intensität der Reaktion ist dabei proportional zur Menge des vorhandenen Antigens. Dadurch hatten die hier produzierten Präparate eine gute Signalwiedergabe der gesuchten Antigene. Ein Vorteil des Chromogens DAB ist u. a. die Beständigkeit gegen Alkohol, insbesondere bei dem Durchlaufen der Alkoholreihe.

Ein schonender Färbevorgang mit Vermeidung von Gewebeschäden durch direkten Kontakt oder Austrocknung konnte durch die zur Anwendung gebrachten Coverplates gewährleistet werden (BULLOCK et al., 1982; POLAK et al., 1983).

5.4.4 Artefaktmöglichkeiten, ihre Minimierung und Färbekontrolle

Insgesamt fünf Artefaktmöglichkeiten, die fälschlicherweise zu einer Anfärbung führen und die korrekte Interpretation stören könnten, waren zu beachten. An erster Stelle sind präzipitatähnliche Strukturen zu nennen, die dadurch auffallen, dass sie nicht an den zu erwartenden Stellen vorkommen, sondern recht willkürlich über das gesamte Präparat verteilt sind (z. B. Verunreinigungen). An zweiter Stelle muß an Gewebsartefakte gedacht werden, die dadurch entstehen, dass beim Schneidevorgang und insbesondere beim Ausbreiten der dünnen Präparate auf dem Objektträger Gewebefalten aufgeworfen werden. Charakteristisch sind geradlinige Aufwurfkanten, die intensiv gefärbt sind. Aufgrund der Schneidetechnik, 7 µm dünne Schnitte zu erzeugen, waren Gewebefalten nicht zu vermeiden. An dritter Stelle sind Zellartefakte zu erwähnen, die z. B. durch nekrotische oder zerquetschte Zellen entstehen können. Im vorliegenden Fall ist die erste Schnittebene einer gefrorenen Gewebeprobe immer verworfen worden, so dass durch die Vorbehandlung entstandene oberflächliche mechanische Schäden (z. B. Quetschartefakte) reduziert werden konnten. An vierter Stelle sind Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindung der Antikörper zu nennen, die durch die Vorbehandlung des Präparates mit einer neutralen Proteinlösung (Ziegen Serum) zum Absättigen dieser Bindungsstellen vermieden werden konnten. Davon abzugrenzen ist als fünfte Artefaktmöglichkeit die endogene Peroxidaseaktivität zu bedenken, die bei fehlender oder unzureichender Blockade durch Wasserstoffperoxid zu irreführenden chromogenen Ablagerungen hauptsächlich in Konglomeraten von Erythrozyten oder Leukozyten führt. Das hätte in unserem Fall hauptsächlich innerhalb von Gefäßen auftreten können. Unter Berücksichtigung bzw. Ausschluß dieser Punkte konnten die zu untersuchenden signalgebenden Farbpräzipitate recht genau lokalisiert und identifiziert werden.

Als Positivkontrolle wurde während eines jeden Färbedurchganges ein Kontrollschnitt eines immer gleichen Referenzpatienten mitgefärbt. Hierdurch konnte der konstante Ausfall der Färbung an den intrakutanen Nerven gesichert werden.

5.5 Interaktives bildanalytisches Verfahren

Die meisten wissenschaftlichen Arbeiten zur kutanen Innervationsquantifizierung der vergangenen Jahre verwendeten fluoreszenzmikroskopische Verfahren zur Signaldarstellung der Antigen-Antikörper-Komplexe (DALSGAARD et al., 1984; LEVY et al., 1989, 1992; WANG et al., 1990; KARANTH et al., 1991; KENNEDY et al., 1993, 1994, 1996; PROPERZI et al., 1993; SCHULZE et al., 1997; JOHANSSON et al., 1999). Für die Auswertung wurden in der Literatur

drei Quantifizierungsmethoden angewandt: 1. Der semiquantitative Ansatz, bei der der Untersucher die Dichte des Nervenfasernetzes abschätzend in vier bis fünf Kategorien gruppiert, die von fehlender bis stark ausgeprägter Innervationsdichte festgelegt waren (LEVY et al., 1989; KARANTH et al., 1991). 2. Ein Untersucher zählt die Fluoreszenzsignale pro mm Epithellänge aus (HOLLAND et al., 1997). 3. Der Einsatz konfokaler Lasermikroskope, deren Bilder digital verarbeitet und drei-dimensional ausgearbeitet werden konnten (WANG et al., 1990; LEVY et al., 1992; KENNEDY et al., 1993, 1994, 1996; PROPERZI et al., 1993; SCHULZE et al., 1997; JOHANSSON et al., 1999). In diesem Verfahren konnten somit die immunfluoreszierenden nervalen Strukturen ausfindig gemacht und in ihrer Länge, ihrem Verlauf und auch in ihrem Volumen berechnet werden. Diese 3-dimensionale Einstellung ermöglicht die Wiedergabe der Fluoreszenzen im Raum der Epidermis und Dermis, aber nicht deren Beziehung zu Hautanhangsgebilden oder gar Gefäßen, da diese nicht mitgefärbt werden konnten. Der Einsatz der Elektronenmikroskopie mit der Domäne der qualitativen Beurteilung anatomischer Strukturen und Strukturveränderungen, wäre für die quantitative Beurteilung unseres Sachverhaltes nur eingeschränkt bzw. mit überdurchschnittlich großem Aufwand anwendbar gewesen. Zur Bearbeitung der perivaskulären Innervationsquantifizierung liegen bislang keine adäquaten Methoden vor. Um eine Klassifizierung der Gefäße in Arterien und Venen sowie eine quantitative Bestimmung der perivaskulären Innervation eines einzelnen Gefäßes vornehmen zu können, entwickelten wir ein spezielles Software-Programm, das zur Beurteilung dieser Fragestellungen konzipiert war. Durch Koppelung an ein computergesteuertes Bild-Analyse-System konnten somit histomorphometrische Gefäß- und Nervenparameter (Nervenfaserteilchen und -fläche) berechnet und zueinander in Bezug gesetzt werden. Da nicht nur die nervale Gesamtmenge pro Präparat hinsichtlich einer reduzierten oder unauffälligen Quantität beurteilt wurde, konnten somit differenziertere Aussagen z. B. über das Innervationsverhalten bei bestimmten Gefäßdurchmessern mitberücksichtigt und korreliert werden. Somit stellt dieses Verfahren einen neuen Ansatz im Gebiet der kutanen Innervationsquantifizierung dar.

5.6 Untersuchung der Hautschichten

Der überwiegende Teil der Untersuchungen zur quantitativen Hautinnervation bezieht sich auf die Epidermis unterschiedlicher Körperregionen (WANG et al., 1990; KENNEDY et al., 1993, 1996, 1999; HOLLAND et al., 1997; JOHANSSON et al., 1999). In diesen Publikationen wurden durch die oben genannten Quantifizierungsmethoden (s. Kap. 5.5) freie Nervenendigungen nachgewiesen und z. B. auf Zusammenhänge mit einer peripheren Polyneuropathie bei Diabetes mellitus hin

untersucht. Nur bei einem geringeren Teil der Publikationen wurde das Corium untersucht (DALSGAARD et al., 1984; LEVY et al., 1989; KARANTH et al., 1991; PROPERZI et al., 1993; SCHULZE et al., 1997). Die perivasculäre Innervation der Leistenhaut des Fußes und die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zu einer morphologisch nachgewiesenen peripheren Polyneuropathie des N. tibialis wurde bisher noch nicht untersucht. Grund für die relativ wenig erforschte Hautinnervation, insbesondere des Coriums und der Subcutis, ist zum einen die bislang komplizierte und arbeitsaufwendige Präparierung der Hautbiopsien, zum anderen der Mangel an präzisen und umsetzbaren Quantifizierungsmethoden .

5.6.1 Wahl des Biopsieortes

Als Biopsieorte wurden in dieser Arbeit Leistenhautareale aus der plantaren Seite der Phalanx distalis digiti I und aus der plantaren Fußhaut in Höhe des Caput ossis metatarsalis I gewählt. An diesen Stellen kann der stärkste Läsionsgrad bzw. die deutlichste Manifestation einer distal-symmetrischen Polyneuropathie erwartet werden. Entsprechende Untersuchungen über die kutane Innervation von Felderhautarealen aus dem Bereich der Wade waren u. a. von KENNEDY (1996) beschrieben worden. Der gleichzeitig entnommene N. tibialis und N. suralis erlaubte die histologische Beurteilung des Polyneuropathiegrades des jeweiligen Falles nach bekannten Kriterien (WANG et al., 2000; LINDEMUTH et al., 2002). Nach der Forderung von KENNEDY (1999), sollte die Biopsie an einer Hautstelle entnommen werden, in der eine Sensibilitätsstörung am wahrscheinlichsten oder nachweislich vorliegt, bzw. ein erhöhtes Risiko für Komplikationen, wie z. B. das Auftreten eines Malum perforans an druckbelasteten Fußarealen besteht.

5.7 Stereologische Aspekte der Bearbeitungsmethode

Mit der hier angewandten Bearbeitungsmethode wurden in vivo vorkommende dreidimensionale Hautstrukturen durch die Präparationstechnik im zweidimensionalen Flächenbild (entspricht der Schnittebene) dargestellt und ausgewertet. Dieses Bearbeitungsprinzip ist nur dann ohne Berücksichtigung der Anschnittebene erlaubt, wenn die in einem dreidimensionalen Raum vorkommenden Strukturen isotrop, d. h. gleichmäßig regellos in alle Richtungen verteilt sind. Da der Nervenfaserverlauf jedoch parallel zum Gefäß ausgerichtet ist und somit einer bestimmten Vorzugsrichtung im Raum unterliegt, können nur gleichartige Anschnittebenen zusammengefasst werden. Daher wurden nur Gefäße ausgewählt, die in einem runden Anschnitt getroffen worden

waren. Diese Anschnittkategorie war so definiert, dass die längste Achse des Gefäßdurchmessers höchstens das 1,5 fache der kürzesten Achse betragen durfte ($D_G \text{ max}/D_G \text{ min} < 1,5$). Da die kutanen Nervenbahnen parallel zu den Gefäßen verlaufen (Weddel, 1961), kann bei einem runden Gefäßanschnitt auch von einem Querschnitt für den größten Teil der angeschnittenen Fasern ausgegangen werden. Das breite Spektrum der Gefäßdurchmesser wurde auf 25 μm bis 125 μm beschränkt, da Durchmesser kleiner 25 μm bzw. größer 125 μm zu selten vorhanden waren. Durch diese Maßnahmen kam es zu einer Reduktion des Stichprobenumfangs.

5.8 Die perivasculäre Innervation der Arterien und Venen im Gesamtkollektiv

Innerhalb unseres Gesamtkollektivs betrug der Nervenfaserverflächenanteil pro Gesamtmesszone sowohl für die Z-Hautarterie (Schwankungsbereich: 0,1% bis 7,1%) wie auch für die CM-Hautarterien (Schwankungsbereich: 0,2% bis 3,1%) etwa 1 % der Gesamtmesszone. Perivenös sind es in beiden Hautarealen 0,5 % der Gesamtmesszone (Schwankungsbereich (Z-Haut): 0% bis 1,8%; Schwankungsbereich (CM-Haut): 0% bis 2,0%). Diese Nervenfaserverflächenanteile setzen sich im Mittel für die Arterien der Z-Haut aus 761 (Schwankungsbereich: 96 bis 2253 Partikelanzahl/Gesamtmeßzone) und für die Arterien der CM-Haut (Schwankungsbereich: 339 bis 2251 Partikelanzahl/Gesamtmeßzone) aus 859 autonom-vegetativen Nervenfasern pro Gesamtmesszone zusammen. Für die Venen der Z-Haut sind es 398 (Schwankungsbereich: 65 bis 1033 Partikelanzahl/Gesamtmeßzone) bzw. 459 Nervenfasern pro Gesamtmesszone für die CM-Hautvenen (Schwankungsbereich: 0 bis 1769 Partikelanzahl/Gesamtmeßzone). Die eben erwähnten sowie die im Kap. 4.4 und Kap 4.10 tabellarisch aufgeführten morphometrischen Parameter sollen die Dimension der hier quantitativ untersuchten perivasculären Innervation verdeutlichen. Aufgrund des heterogenen Patientenkollektivs können diese Quantifizierungsparameter nicht als Grundlage für Standardisierungen der perivasculären Innervation herangezogen werden.

Hinsichtlich der Innervationsdichte erweisen sich die Arterien und Venen innerhalb eines Hautareals als nur schwach korrelierend (Kap. 4.8), so dass kein valider statistischer Zusammenhang abgeleitet werden kann. Es zeigt sich eine doppelt so starke arterielle Innervation im Vergleich zur venösen Nervenversorgung. Die starke periarterielle Innervation war nach der Literatur zu erwarten.

Es ist bislang nicht bekannt, ob sich das Denervierungsverhalten autonom-vegetativer Nervenfasern bei Polyneuropathien mit dem Gefäßdurchmesser verändert oder ob alle hier

erfassten Gefäßdurchmesser gleichsinnig reagieren. In dem hiesigen Kollektiv konnte kein spezielles Denervationsverhalten bezüglich eines bestimmten Gefäßdurchmessers detektiert werden (s. Kap. 4.6).

Im statistischen Vergleich der mittleren arteriellen Innervationsdichten beider Entnahmestellen an der Leistenhaut zeigte sich eine signifikante Korrelation. Dies kann Ausdruck einer gleichsinnigen Reduktion bzw. Innervationsstörung sein und würde somit auf einen regelhaften und morphometrisch quantifizierbaren Einfluß der neuropathisch wirkenden Faktoren auf unterschiedliche Hautareale hinweisen. Hieraus ist abzuleiten, dass zumindest intraindividuell anhand zweier an verschiedenen Stellen oder im zeitlichen Verlauf an der gleichen Stelle entnommener Proben vergleichende quantitative Aussagen möglich wären (s. Kap. 4.9).

5.9 Kriterien der Gefäßdifferenzierung

Die Gefäßdifferenzierung erfolgte nach bekannten histologischen Morphologiekriterien (s. Kap. 3.2.5.5) (JUNQUEIRA et al., 2002). Die Genauigkeit unserer Differenzierungsmethoden zeigt sich anhand der hohen Korrelationskoeffizienten (s. Kap. 4.3). In den Durchmesser kategorien bis 140 µm war die Klassifizierung der Gefäße vereinzelt nicht eindeutig. Dies wird in den Überlappungsbereichen der Abbildungen 4.2 und 4.3 deutlich. Aus diesem Grund wurde eine Diskriminanzanalyse durchgeführt, die diejenigen Gefäße eliminierte, die mit einer Wahrscheinlichkeit von kleiner 50 % nicht der ausgewählten Gefäßkategorie zugeordnet worden waren.

5.10 Hautstanzbiopsie und intrakutanes Gefäßvorkommen

Bei einer mittleren Anschnitthäufigkeit von drei Arterien und knapp zwei Venen mit rundem Anschnitttyp pro Millimeter Epitheloberflächenlänge (s. Kap. 4.5) sind Stanzbiopsien von entsprechender Größe unumgänglich, um eine Aussage zur perivaskulären Innervation treffen zu können. Der angestrebte Hautstanzdurchmesser sollte dabei so groß wie nötig, aber so klein wie möglich sein. Stanzbiopsien an Lebenden sind zur Beurteilung der epidermalen Innervation in der Literatur durchgehend mit 3 mm Durchmesser durchgeführt worden (KENNEDY et al., 1996; HOLLAND et al., 1997). Übertragend auf unseren Fall könnten somit 9 Arterien und 6 Venen pro Biopsie nachgewiesen werden, was für die Beurteilung der perivaskulären Innervation ausreichend wäre. Die Wundverschließung der Biopsiestelle kann

dabei bis zu einem Durchmesser von 6 mm einfach mit einem Klammerpflaster (Steri Strip[®]) erfolgen. Erst darüber hinaus sollte eine Nahtversorgung durchgeführt werden.

5.11 Differentialindikation der Suralis- und der Hautbiopsie

Die intraepidermale Nervenfaserdichte korreliert sowohl mit unmyelinisierten und myelinisierten kleinkalibrigen Fasern ($< 7 \mu\text{m}$), wie auch mit großkalibrigen Nervenfasern ($> 7 \mu\text{m}$) des N. suralis (HERRMANN et al., 1999).

Die Frage nach der Art der Biopsie zur Ablärung einer Neuropathie kann mit HERRMAN (1999) folgendermaßen beantwortet werden: Im Falle einer Neuropathie der großen, bemerkten Fasern wären die Suralis-Biopsie und die Neurographie sensitive Methoden. Wird eine Neuropathie der schwach bemerkten und autonomen Fasern vermutet (sog. small fibers), wäre die kutane Biopsie am Ort der „brennenden Symptome“ eine konkrete Alternative, da in diesen Fällen die Nervenleitgeschwindigkeit des N. suralis normal und nicht repräsentativ ist. In diesem Punkt wäre die invasive N. suralis Biopsie nicht Methode der ersten Wahl, zumal die distalen morphologischen Veränderungen an peripheren kutanen Nerven früher auftreten als am proximalen N. suralis (HERRMANN et al., 1999). Die epidermale Innervationsbeurteilung per Hautbiopsie ist hinsichtlich der sensorischen small fiber Neuropathie eine sensitivere Methode als die Biopsie des N. suralis (HERRMANN et al., 1999). Zu bedenken ist, dass für eine Hautbiopsie keine Normwerte existieren. Daher wird die N. suralis-Biopsie zunächst die Standardmethode zur morphologischen Diagnosesicherung einer Polyneuropathie bleiben. Aussagen zu einer small fiber-Neuropathie können mit der N. suralis Biopsie nur dann getroffen werden, wenn elektronenmikroskopische Verfahren eingesetzt werden würden.

5.12 Die Hautbiopsie und ihre Wertigkeit im Vergleich zu etablierten Diagnoseverfahren

5.12.1 Elektrophysiologische Untersuchungsverfahren

Ein auch weiterhin wesentlicher Bestandteil der peripheren Polyneuropathiediagnostik und ihrer Verlaufskontrolle ist die elektrophysiologische Stimulation peripherer Nerven (CELIKER et al., 1996). Sowohl die Nervenleitgeschwindigkeit zwischen zwei Punkten, wie auch die Amplitude des elektrischen Impulses beim sensible Nerven oder der Muskelantwort beim motorischen Nerven und die entsprechenden Potentialkonfigurationen geben Aufschluß über den Myelinisierungs-

zustand sowie axonalen Zustand des Nerven (BOSTOCK et al., 1998). Das Verfahren ist relativ unsensibel hinsichtlich distaler Axonschädigungen sensibler Nerven (AREZZO 1997). Es steht außer Frage, dass elektrophysiologische Messungen in hohem Maße mit fortgeschrittenen diabetischen Polyneuropathien korrelieren (AREZZO 1997). Es ist dabei jedoch zu berücksichtigen, dass die elektroneurographische Messung in erster Linie die stark bemerkten Nervenfasern des Typus A α und A β , nicht aber die in einer Polyneuropathie ebenso betroffenen kleinkalibrig-bemerkten (A δ) und kleinkalibrig-unbemerkten (C) Nervenfasertypen repräsentiert, was diese Methode in ihrer Aussagekraft bezüglich der Affektion kleinerer Faserdurchmesser einschränkt.

5.12.2 Die Stanzbiopsie der Haut

Die Stanzbiopsie der Haut ist eine einfach durchführbare und wenig invasive Alternative zur herkömmlichen Biopsie des N. suralis zur Beurteilung peripherer Nervenläsionen bei Polyneuropathien (Herrmann et al., 1999). Die heute zur Verfügung stehenden computerunterstützten Bildverarbeitungsprogramme und die Verwendung des panneuralen Marker PGP 9.5 erlauben eine exakte Detektion von Nervenfasern (KARANTH et al., 1991) in allen Hautschichten und Hautstrukturen. Bereits Biopsien mit einem Durchmesser von 3 mm reichen zur quantitativen Beurteilung von epidermalen freien Nervenendigungen aus (KENNEDY et al., 1996; HOLLAND et al., 1997). Dass ein statistischer Zusammenhang zwischen der kutanen Innervation und einer peripheren small- bzw. large-fiber Polyneuropathie besteht, belegen die Studien von LINDBERGER (1989), LEVY (1992) und HOLLAND (1997). HERRMANN (1999) beschreibt dabei die gute Korrelation zwischen der N. suralis-Biopsie und dem Vorkommen intraepidermaler Nervenfasereindigungen. Die mehrfache Probengewinnung an fast jedem Ort des Körpers und v. a. die Wiederholbarkeit kutaner Biopsien machen dieses Verfahren attraktiv. Die beliebige Kombinationsmöglichkeit mit weiteren immunhistochemischen Markern (z. B. Substanz P, CGRP = calcitonin gene-related-peptide) für spezielle Fragenstellungen eröffnen weitere Verfahrensmöglichkeiten und Ergebnisse. Da diese Methode neu ist, fehlen bislang quantitative Normwerte der kutanen Innervation für die Hautstrukturen, die unterschiedlichen Hautschichten und die Gefäße sowie eventuelle Einflüsse von Alter, Geschlecht und Rasse.

5.13 Aspekte der small-fiber und large-fiber Neuropathie

In ca. 97 % aller peripheren Polyneuropathien unterschiedlichster Ätiologie sind sämtliche Nervenfasertypen in unterschiedlicher Gewichtung betroffen. Insgesamt 3 % sind reine small-fiber Neuropathien, welche ebenso durch die Hauptrisikofaktoren Diabetes mellitus und Alkoholabusus ausgelöst werden (BEGHI et al., 1998). Unter den diabetischen Polyneuropathien sind ca. 10 % reine small-fiber Neuropathien (BROWN et al., 1984), von den äthyltoxischen Polyneuropathien ca. 6 % small-fiber Neuropathien. Besonders zu erwähnen sind small-fiber Neuropathien aufgrund der Tatsache, dass sie durch die alleinige neurologische Untersuchung nur schwer und durch neurophysiologische Testverfahren überhaupt nicht detektierbar sind, da die großen myelinisierten Fasern (large-fiber $> 7 \mu\text{m}$) nicht betroffen sind. Sinnesqualitäten wie Druck, Berührung, Vibration und Propriozeption sind dabei ebensowenig wie motorische Fasern betroffen. Die Gruppe der myelinisierten und unmyelinisierten small-fibers ($< 7 \mu\text{m}$) besteht aus somatischen Afferenzen (A δ) sowie präganglionär und postganglionär autonomen Efferenzen (B- und C-Fasern). Daraus erklären sich neben den bekannten vegetativen Dysfunktionen am kardiovaskulären und gastrointestinalen System und die im Rahmen einer peripheren small-fiber Polyneuropathie auftretenden Symptome wie z. B. eine Störung der Thermosensibilität oder eine reduzierte Transpirationskapazität aufgrund affizierter Glandulae sudoriferae, die ebenso wie die Gefäße von autonomen unmyelinisierten Nervenfasern versorgt werden.

5.14 Die Rolle des N. tibialis in der Polyneuropathiediagnostik

Der N. tibialis wurde als versorgender Hauptnerv der Fußsohle nie in die morphologische Diagnostik peripherer Neuropathien mit einbezogen, da eine Biopsie einen irreversiblen Ausfall der sensomotorischen und autonomen Nervenbahnen in der Peripherie zur Folge hätte. Im Rahmen vorausgegangener Untersuchungen konnten jedoch gleichsinnige histologische Veränderungen zwischen dem N. suralis und N. tibialis nachgewiesen werden (LINDEMUTH et al., 2002). Ebenso konnte durch Anwendung der hier beschriebenen Methode eine signifikante Korrelation zwischen einer polyneuropathischen Veränderung des N. suralis und der periarteriellen Innervation der durch ihn sensibel versorgten Wadenhaut nachgewiesen werden (Manousakis, 2004). Somit ergab sich die Schlußfolgerung, dass im Falle morpho-logischer Polyneuropathiekriterien des N. suralis auch von einer Mitbeteiligung des N. tibialis ausgegangen und die von ihm innervierte mediale Fußsohlenhaut als korrelierendes Objekt untersucht werden kann.

5.14.1 Klassifizierungskriterien für das Vorliegen einer neuropathischen Schädigung des N. tibialis

Um ein homogenes und jederzeit nachvollziehbares Polyneuropathiekriterium zu erhalten, wurde auf eine Studie von WANG und SCHRÖDER (2000) Bezug genommen, die die Myelinflächendichte als histopathologisch empfindlichsten Parameter zur Beurteilung einer demyelinisierenden Polyneuropathie des peripheren Nervens beschrieb und als histomorphologisches Polyneuropathiekriterium eine Myelinscheidenflächenreduktion von kleiner 20 % pro Endoneuralfläche festlegte.

5.14.2 Beziehung der Hautinnervation der Fußsohle zu den Fasersubpopulationen des N. tibialis

In dem untersuchten Kollektiv von Obduzierten konnten zwischen der perivascularären Innervation der Arterien und Venen beider Leistenhautareale (Zehen – und Metatarsalhaut) und der Nervenfasern des N. tibialis keine relevanten Korrelationen nachgewiesen werden (s. Kap. 4.10, 4.11). Dies betrifft sowohl den Vergleich zwischen der vasculären Fußsohlenhautinnervation mit der Klasse der large-fibers (Nervenfaserdurchmesser $> 7 \mu\text{m}$) (s. Kap. 4.11), wie auch die Korrelation der vasculären Fußsohlenhautinnervation mit der Klasse der small-fibers (Nervenfaserdurchmesser $< 7 \mu\text{m}$) (s. Kap. 4.11) des Nervus tibialis für die Parameter der Myelinflächendichte pro Endoneuralfläche und Nervenfaseranzahl/ mm^2 (siehe Kapitel 4.11). Eine Bestätigung der Korrelation zwischen der epidermalen Reduktion freier Nervenendigungen und einer small-fiber Neuropathie, wie sie von HERRMANN (1999) beschrieben worden waren, konnten zwischen der autonom-vegetativen perivascularären Innervation der Fußsohlenhaut und den kleinkalibrigen Nervenfasern ($< 7 \mu\text{m}$) des N. tibialis nicht bestätigt werden.

Unter der Einschränkung, dass eine nicht nachweisbare Korrelation der untersuchten Parameter auf einer fehlenden Eignung des Probenkollektivs beruhen könnte, können anhand der perivascularären Innervation der Fußsohlenhaut gemäß der erhobenen Resultate keine Rückschlüsse auf den polyneuropathischen Status der peripheren Nerven gezogen werden. Im untersuchten Kollektiv scheint die Nervenfaserreduktion in der Haut und dem zugehörigen peripheren Nerven verschieden abzulaufen. Daher ersetzen sich die histologisch-quantitative Analyse des Nerven und des Hautbiopsates nicht, sondern stellen sich als einander ergänzende Elemente dar.

5.15 Kritik und Empfehlung

Durch diese Arbeit konnten erstmals methodische Grundlagen etabliert werden, um quantitative Parameter der intraindividuellen perivaskulären Innervation der Leistenhaut des Fußes detektieren und berechnen zu können. Der mögliche diagnostische Wert der Hautbiopsie als solcher konnte durch die ausreichende Anzahl in ihr vorkommender Gefäße und Nervenstrukturen verdeutlicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die perivaskuläre Innervationsstörung der Leistenhaut intraindividuell gleichsinnig abläuft und damit in der Verlaufskontrolle einer neuropathischen Erkrankung und ihrer Therapie Anwendung finden könnte. In der vorliegenden Untersuchung konnte auch gezeigt werden, dass Hautinnervationsstörungen und Denervation am peripheren Nerven (N. tibialis) nicht gleichsinnig verlaufen, sich daher in ihrer diagnostischen Aussage nicht ersetzen.

Zu bedenken sind Faktoren, die sich möglicherweise ungünstig auf unser Ergebnis ausgewirkt haben und im Rahmen nachfolgender Studien zu diesem Thema zu beachten wären. Eine wichtige Grundvoraussetzung wäre dabei die Gewährleistung eines homogeneren Patientenkollektivs. Darauf aufbauend müsste eine weitergehende Selektion des Untersuchungskollektivs z. B. nach Ätiologie der Polyneuropathie (Diabetes mellitus, Alkoholabusus, neurotoxische Medikation, Tumoren) oder auch Alter erfolgen. Von besonderem Interesse wäre sicherlich die Durchführung unserer Analysetechnik an Hautbiopsien lebender Probanden, die die Erhebung detaillierter Angaben zur neurologisch-polyneuropathischen Vorgeschichte eines jeden Patienten erlaubt. Auch wäre die Durchführung neurologischer Begleituntersuchungen insbesondere mit Schwerpunkt auf neurophysiologische sowie sensible und autonome Testverfahren für die klinische Validierung des bioptischen Verfahrens unbedingt erforderlich. So könnten in Folgestudien vergleichende und vertiefende Angaben zur Standardisierung der perivaskulären Innervationsparameter der Haut getroffen werden.

Die vielfältigen Möglichkeiten dieser hier erstmalig angewandten Methodik sollen Ansporn sein, weiter auf dem Gebiet der morphometrischen Polyneuropathiediagnostik zu forschen, um, je nach Fragestellung, die autonome Innervation auf bestimmte Einfluss- und Risikofaktoren hin analysieren zu können.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Al Shekhlee A, Chelimsky T, Preston D (2002) Review: small-fiber neuropathy. *Neurologist* 8:237-253
2. Arezzo JC (1997) The use of electrophysiology for the assessment of diabetic neuropathy. *Neurosci Res Communications* 21:13-23
3. Arezzo JC (1999) New developments in the diagnosis of diabetic neuropathy. *American Journal of Medicine* 107:9S-16S
4. Arthur RP, Shelley WB (1959) The innervation of human epidermis. *J Invest Dermatol* 32:397-413
5. Beghi E, Monticelli ML (1998) Chronic symmetric symptomatic polyneuropathy in the elderly: a field screening investigation of risk factors for polyneuropathy in two italian communities. Italian General Practitioner Study Group (IGPST). *J Clin Epidemiol.* 51 :697-702
6. Behse F, (1990) Morphometric studies on the human sural nerve. *Acta Neurol Scand* 132:1-38
7. Bostock H, Cikubel K, Burke D (1998) Threshold tracking techniques in the study of human peripheral nerve. *Muscle & Nerve* 21:137-158
8. Botezat E (1908) Die Nerven der Epidermis. *Anat. Anz.* 33:45-75
9. Brown MJ, Asbury AK (1984) Diabetic neuropathy. *Ann Neurol.* 15 :2-12
10. Bullock G.R., Petrusz P. (eds) (1982) *Techniques in immunocytochemistry.* Academic Press, New York
11. Burnstock G, Ralevic V (1994) New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. *British Journal of Plastic Surgery* 47:527-543
12. Celiker R, Basgoze O, Bayraktar M (1996) Early detection of neurological involvement in diabetes mellitus. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 36:29-35
13. Chouchkov CN (1974) An electron microscopic study of the intraepidermal innervation of human glabrous skin. *Acta Anat.* 88:84-92

14. Cowen T, Haven J, Wen-Qin C, Gallen DD, Franc F, Burnstock G (1982) Development and ageing of perivascular adrenergic nerves in the rabbit. A quantitative fluorescence histochemical study using image analysis. *Journal of the Autonomic Nervous System* 5:317-336
15. Dalsgaard CJ, Hökfelt T, Elfvin LG, Skirboll L, Emson P (1982a) Substanz P – containing primary sensory neurons projecting to the inferior mesenteric ganglion: evidence from combined retrograde tracing and immunohistochemistry. *Neuroscience* 7:647-654
16. Dalsgaard CJ, Jonsson CE, Hökfelt T, Cuello AC (1983b) Localization of substance P – immunoreactive nerve fibers in the human digital skin. *Experientia* 39:1018-1020
17. Dalsgaard CJ, Björklund H, Jonsson CE, Hermansson A, Dahl D (1984) Distribution of neurofilament-immunoreactive nerve fibers in human skin. *Histochemistry* 81:111-114
18. Dalsgaard CJ, Haegerstrand A, Brodin E, Theodorsson-Norheim E, Hökfelt T (1985) Neurokinin A-like immunoreactivity in rat primary sensory neurons: coexistence with substance P. *Histochemistry* 83:407-414
19. Dalsgaard CJ, Franco-Cereceda A, Saria A, Lundberg JM, Theodorsson-Norheim E, Hökfelt T (1986) Distribution and origin of substance P and neuropeptide Y immunoreactive nerves in the guinea pig heart. *Cell tissue Res.* 243:477-485
20. Dalsgaard CJ, Björklund A, Hökfelt T, Owman C (eds) (1988) *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol 6: The Peripheral Nervous System. Ch XIII: The Sensory System.* Elsevier Science Publishers B.V.
21. Dalsgaard CJ, Rydh M, Haegerstrand A (1989) Cutaneous innervation in man visualised with protein gene product (PGP 9.5) antibodies. *Histochemistry* 92:385-389
22. Dyck PJ, Karnes J, Lain A (eds) (1984) *Pathologic alterations of the peripheral nervous system of humans. Peripheral Neuropathy* 2nd ed. Saunders, Philadelphia
23. Feldman EL, Brown MB, Stevens MJ (1994) A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 17:1281-1289

24. Fundin BT, Pfaller K, Rice FL (1997) Different distributions of the sensory and autonomic innervation among the microvasculature of the rat mystacial pad. *The Journal of Comparative Neurology* 389:545-568
25. 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
26. Herrmann DN, Griffin JW, Hauser P, Cornblath DR, McArthur JC (1999) Epidermal nerve fiber density and sural nerve morphometry in peripheral neuropathies. *Neurology* 53:1634-1640
27. Holland NR, Stocks A, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC (1997) Intraepidermal nerve fiber density in patients with painful sensory neuropathy. *Neurology* 48:708-711
28. Holland NR, Crawford TO, Hauer P (1998) Small-fiber sensory neuropathies: clinical course and neuropathology of idiopathic cases. *Ann Neurol*. 44:47-59
29. Holland NR (001) Idiopathic painful sensory neuropathy. *J Clin Neuromusc Dis*. 2 :211-220
30. Johansson O, Wang L, Hilliges M, Liang Y (1999) Intraepidermal nerves in human skin: PGP 9.5 immunohistochemistry with special reference to the nerve density in skin from different body regions. *Journal of the Peripheral Nervous System* 4:43-52
31. Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O. (eds) (2002) *Histologie*. 5. Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio
32. Kadanoff D (1928) Über die intraepithelialen Nerven und ihre Endigungen beim Menschen und bei Säugetieren. *Zellforsch*. 7:553-576
33. Kaji A, Maeda T, Watanabe S (1991) Parasympathetic innervation of cutaneous blood vessels examined by retrograde tracing in the rat lower lip. *Journal of the Autonomic Nervous System* 32:153-158
34. Karanth SS, Springall DR, Kuhn DM, Levene MM, Polak JM (1991) An immunocytochemical study of cutaneous innervation and the distribution of neuropeptides

- and protein gene product 9.5 in man and commonly employed laboratory animals. *The American Journal of Anatomy* 191:369-383
35. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb (1993) The innervation of human epidermis. *Journal of the Neurological Science* 115:184-190
 36. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Brelje TC (1994) Innervation and vasculature on human sweat glands: An immunochemistry-laser scanning confocal fluorescence microscopy study. *Journal of Neuroscience* 14:6825-6833
 37. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G (1996) Utility of skin biopsy in diabetic neuropathy. *Seminars in neurology* 16:163-171
 38. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T (1996) Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy. *Neurology* 47:1042-1048
 39. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G (1997) Innervation of the skin. In: Low PA (ed) *Clinical Autonomic disorders*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 109-115
 40. Kennedy WR, Said G (1999) Sensory nerves in skin. *Answers about painful feet*. *Neurology* 53:1614-1615
 41. Langerhans P (1868) Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch* 44:325-337
 42. Lauria G, Holland N, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC (1999) Epidermal innervation: changes with aging, topographic location and in sensory neuropathy. *Journal of the Neurological Science* 164:172-178
 43. Levy DM, Karanth SS, Springdall DR, Pollak JM (1989) Depletion of cutaneous nerves and neuropeptides in diabetes mellitus: an immunohistochemical study. *Diabetologia* 32:427-433
 44. Levy DM, Terenghi G, Gu XH, Abraham RR, Springall DR, Polak JM (1992) Immunohistochemical measurements of nerves and neuropeptides in diabetic skin: relationship to tests of neurological function. *Diabetologia* 35:889-897
 45. Lindberger M, Schroder HD, Schultzberg M (1989) Nerve fibre studies in skin biopsies in peripheral neuropathies. Immunohistochemical analysis of neuropeptides in diabetes mellitus. *J Neurol Sci*. 93:289-296

46. Lindemuth R, Ernzerhof C, Schimrigk K (2002) Comparative morphometry of myelinated nerve fibers in the normal and pathologically altered human sural and tibial nerve. *Clin Neuropathol.* 21:29-34
47. Manousakis M (2004) Morphometrische Untersuchung der perivaskulären Innervation der menschlichen Felderhaut und ihr Stellenwert in der bioptischen Polyneuropathie-Diagnostik. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der Med. Fakultät der Universität des Saarlandes
48. Masuhr K.F., Neumann M., (eds) (1996) *Neurologie.* 3. Auflage. Hippokrates, Stuttgart
49. McCarthy BG, Hsieh ST, Stocks A, Hauer P, Marco C, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC (1995) Cutaneous innervation in sensory neuropathies: Evaluation by skin biopsy. *Neurology* 45:1848-1855
50. Miller MR, Ralston HJ, Kasahara M (1958) The pattern of cutaneous innervation of the human hand. *Am. J. Anat.* 102:183-198
51. 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
52. Novotny GEK, Gommert-Novotny E (1988) Silver impregnation of peripheral and central axons. *Stain Technol.* 63:1-14
53. Novotny GEK, Gommert-Novotny E (1988) Intraepidermal nerves in human digital skin. *Cell Tissue Res* 254:111-117
54. Ochoa J, Mair WGP (1969) The normal sural nerve in man. *Acta Neuropathologica* 13:197-216
55. Periquet MI, Novak V, Collins MP (1999) Painful sensory neuropathy: Prospective evaluation using skin biopsy. *Neurology* 53:1641-1647
56. Polak J.M., Van Noorden S. (eds) (1983) *Immunocytochemistry. Practical applications in Pathology and Biology.* Wright-PSG, Boston

57. Properzi G, Francavilla S, Poccia G, Aloisi P, Gu XH, Terenghi G, Polak JM (1993) Early increase precedes a depletion of VIP and PGP 9.5 in the skin of insulin-dependent diabetics. Correlation between quantitative Immunohisto-chemistry and clinical assessment of peripheral neuropathy. *Journal of Pathology* 169:269-277
58. Ridley A (1969) Silver staining of nerve endings in human digital glabrous skin. *J. Anat.* 104:41-48
59. Rose N.R., Bigazzi P.E. (eds) (1980) *Methods in immunodiagnosis: second edition.* John Wiley and Sons, New York
60. Schulze E, Witt M, Fink T, Hofer A, Funk RHW (1997) Immunohistochemical detection of human skin nerve fibers. *Acto histochem.* 99:301-309
61. Short JM (1974) Diseases of the blood vessels. In: Denis DJ, Dobson RL, McGuire J (eds) *Clinical Dermatology Vol. 2,* Harper and Row, Hagerstown, pp 1-9
62. Terenghi G, Bunker CB, Liu YF (1991) Image analysis quantification of peptide-immunoreactive nerves in the skin of patients with Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J. Pathol.* 164:245-252
63. Thompson RJ (1981) Human nervous system specific proteins. In: Alberti, Price (eds) *Recent Advances in Clinical Biochemistry.* Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 295-307
64. 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
65. Thompson RJ, Day INM (1988) Protein gene product 9.5-a new neuronal and neuroendocrine marker. In: Marangos PJ, Campbell, Cohen RM (eds) *Neuronal and glial proteins: structure, function and clinical application.* Neurobiological Research. California Academic Press, pp 209-328
66. Tooke JE, Brash PD (1996) Microvascular aspects of diabetic foot disease. *Diabetic Medicine* 13:26-29
67. Wang L, Hilliges M, Jernberg T, Wiegleb-Edström D, Johansson O (1990) Protein gene product 9.5 immunoreactive nerve fibres and cells in human skin. *Cell Tissue Research* 261:25-33

68. Wang JF, Schröder JM (2000) Comparative morphometric evaluation of peripheral nerves and muscle fibres in myotonic dystrophy. *Acta Neuropathol* 99:39-47
69. Weddell G, Pallie W, Palmer E (1954) The morphology of peripheral nerve terminations in the skin. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 95:483-501
70. Weddell G, Palmer E, Pallie W (1955) Nerve endings in mammalian skin. *Biol. Rev.* 30:159
71. Weddell G (1961) The innervation of cutaneous blood vessels. In: Montagna W, Ellis RA (eds) *Advances in biology of skin Vol II: Blood vessels and circulation*. Pergamon Press, New York, pp 71-78
72. Winkelmann RK (1988) Cutaneous sensory nerves. *Semin Dermatol.* 7:236-268
73. Woollard HH (1936) Intra-epidermal nerve endings. *J. Anat.* 71:54-60
74. Yasuda H, Kikkawa R, Hatanaka I, Kobayashi N, Taniguchi Y, Shigeta Y (1985) Skin biopsy as a beneficial procedure for morphological evaluation of diabetic neuropathy. *Acta Pathol* 35:1-8
75. Young MJ, Veves A, Breddy JL, Boulton AJM (1994) The prediction of diabetic neuropathic foot ulceration using vibration perception thresholds. *Diabetes Care* 17:557-560

7 PUBLIKATIONEN

Lindemuth R., Bodenstedt St., Funda J., Möllenberg M., Manousakis M. (1998) Morphometrische Quantifizierung der Innervation von Hautstrukturen am Beispiel von Schweißdrüsen und Gefäßen. Aktuelle Neurologie 25: S.231

Lindemuth R., Bodenstedt St., Funda J., Möllenberg M., Manousakis M., Schimrigk K. (1999) Korrelation der Dichte markhaltiger Nervenfasern im N. tibialis und der Schweißdrüseninnervation der Fußsohlenhaut. Nervenheilkunde 7a: S.39

Lindemuth R., Bodenstedt St., Möllenberg M., Manousakis M., Funda J., Schimrigk K. (1999) Korrelation von Neuropathieparametern des N. tibialis mit der periglandulären Innervation von Schweißdrüsen der Fußsohlenhaut. Aktuelle Neurologie 26: S.108

Lindemuth R., Möllenberg M., Ernzerhof C., Schimrigk K. (2000) Korrelation der kutanen Gefäßinnervation der Fußsohle und der Dichte markhaltiger Nervenfasern im N. tibialis. Aktuelle Neurologie 27: S. 199

DANK

Herrn Prof. Dr. med. K. Schimrigk und Herrn OA Dr. med. R. Lindemuth danke ich für die Möglichkeit der Promotion. Mein besonderer Dank gilt Herrn OA Dr. med. R. Lindemuth für die konsequente Förderung und kompetente Unterstützung im Verlauf der Dissertation, die mit der stetigen Möglichkeit zur kritischen Diskussion verbunden war und mir die Methodik des wissenschaftlichen Denkens und Arbeitens eröffnete.

In Dankbarkeit erinnere ich an die großzügigen Unterstützung von Herrn Prof. Dr. med. G. Becker, für die Möglichkeit der Fortführung der Dissertation unter seiner Obhut sowie für die weitere Nutzung des histologischen Labors der Neurologischen Universitätsklinik und Poliklinik. Sein unerwarteter Tod hat uns sehr getroffen.

Herrn Prof. Dr. med. K. Faßbender danke ich für die freundliche Übernahme der Dissertation.

Herrn PD Dr. med. S. Jung danke ich für die wissenschaftliche Begutachtung der Thematik. Seine klinische Einschätzung verbunden mit konstruktiver Kritik waren von großem Wert.

Frau Gisela Blank und Frau Ulrike Kaul gilt mein besonderer Dank für die fachkundige Einarbeitung in alle labortechnischen Prozesse der Biopsieaufbereitung und immunhistochemischen Färbung. Ihre labortechnische Betreuung war ausgezeichnet.

Frau Christine Ernzerhof danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und Bereitstellung des morphometrischen Datenmaterials über die peripheren Nerven (N. suralis und N. tibialis).

Herrn Dr. rer. med. T. Georg (Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik der Universitätsklinik des Saarlandes) danke ich für die kompetente Unterstützung im Rahmen der umfangreichen statistischen Auswertungen.

Herrn Prof. Dr. med. K. Remberger (Pathologisches Institut der Universitätsklinik des Saarlandes)
danke ich für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung des Biopsiematerials.

8 LEBENS LAUF

Name	Marcus Etienne Möllenberg
Geburtsdatum	08.06.1973
Geburtsort	Porto / Portugal
Staatsangehörigkeit	deutsch / portugiesisch
Eltern	Hr. Gerhard Möllenberg Fr. Felismina Möllenberg, geb. Sousa Pinto Da Fonseca
1980 - 1984	Besuch der Grundschule in Reinheim / Hessen
1984 - 1993	Besuch des Gymnasium in Groß-Bieberau / Hessen Abschluß der schulischen Laufbahn mit dem Abitur
1993 - 1994	Zivildienst im Rettungsdienst des DRK
1994 - 2001	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg / Saar
20.09.1996	Physikum
18.09.1997	1. Staatsexamen
17.09.1999	2. Staatsexamen
1999 - 2000	Forschungssemester
2000 - 2001	Praktisches Jahr
03.05.2001	3. Staatsexamen
2001 - 2003	Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik I Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie Diabetologie, Endokrinologie, Infektiologie CA PD. Dr. med. D. Grandt, Klinikum Saarbrücken
01.04.2003	Approbation als Arzt
2003 - 2004	Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik I Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie Diabetologie, Endokrinologie, Infektiologie CA PD. Dr. med. D. Grandt, Klinikum Saarbrücken
Seit 2004	Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin, Endokrinologie, Diabetologie und Intensivmedizin CA PD Dr. med. M. Frank Saarlandkliniken / Saarbrücken

