**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Zentrum für Diagnostik
Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. med. Markus Glatzel

# Untersuchungen zur Nervenfaserdichte und Gefäßdichte an kutanen und plexiformen Neurofibromen

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Christian-Alexander Behrendt
aus Berlin

Hamburg 2014

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der**
**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.06.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. C. Hagel**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. R. Friedrich**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: -/-**

## Inhalt

**1. Fragestellung und Arbeitshypothese ..... 4**
**2. Einleitung ..... 6**
2.1 Neurofibromatosen ..... 6
2.2 Neurofibromatose Typ 1 ..... 6
2.3 Histopathologie der peripheren Nervenscheidentumore ..... 11
2.4 Strukturproteine von Nerven und Gefäßen ..... 13
2.5 Aufbau von Widerstandsgefäßen und perivaskulären Nerven ..... 16
2.6 Dichte von Nervenfasern und Gefäßen in der Haut ..... 17
**3. Material und Methoden ..... 23**
3.1 Reagenzien und Antikörper ..... 23
3.2 Laborgeräte ..... 26
3.3 Verbrauchsmaterialien ..... 27
3.4 Lösungen ..... 28
3.5 Patientenkollektiv ..... 29
3.6 Gewebeproben ..... 30
3.7 Immunhistochemie ..... 33
3.8 Evaluationen ..... 39
**3.9 Datenerfassung und statistische Auswertungen ..... 44**
3.9.1 Datenerfassung und statistische Auswertungen ..... 44
**4. Ergebnisse ..... 45**
4.1 Methodische Vorarbeiten ..... 45
4.2 Ergebnisse zur Nervenfaserdichte (NFD) ..... 54
4.3 Ergebnisse zur Gefäßdichte (GD) ..... 56
4.4 Ergebnisse zur relativen Gefäßinnervation (PVNFD) ..... 57
**5. Diskussion ..... 59**
5.1 Nervenfaserdichte ..... 59
5.2 Gefäßdichte ..... 61
5.3 Relative Gefäßinnervation ..... 64
**6. Zusammenfassung und Beantwortung der Fragestellung ..... 66**
**7. Abkürzungsverzeichnis ..... 67**
**8. Literaturverzeichnis ..... 68**
**8. Danksagung ..... 73**
**9. Lebenslauf / Curriculum Vitae ..... 74**
**10. Eidesstattliche Erklärung ..... 75**

# 1. Fragestellung und Arbeitshypothese

An Neurofibromatose Typ 1 (NF1) erkrankte Patienten entwickeln häufig zahlreiche primär benigne Nervenscheidentumoren, die sogenannten Neurofibrome. Diese entstehen aus transformierten Schwannzellen der peripheren Nerven. Die Therapie der Wahl für diese Tumore besteht in der chirurgischen Resektion. Dabei wird häufig eine verstärkte Blutung beobachtet. Diese Beobachtung ließe sich zum einen durch eine erhöhte Gefäßdichte oder zum anderen durch eine gesteigerte Gefäßdurchblutung bei gleicher Anzahl an Gefäßen in den Tumoren erklären. Untersuchungen im Institut für Neuropathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf konnten zeigen, dass kutane und plexiforme Neurofibrome keine erhöhte Gefäßdichte im Vergleich zu normaler Haut aufweisen (Naber, 2012). Eine möglicherweise gesteigerte Durchblutung der Neurofibrome bei normaler Gefäßdichte ließe sich auch auf einen erhöhten Gefäßdurchmesser, insbesondere im Bereich der sogenannten Widerstandsgefäße, zurückführen. Der Gefäßdurchmesser ergibt sich vor allem aus der Regulation der glatten Gefäßmuskulatur durch nervale und endokrine Faktoren. Das nachfolgende Schema zeigt vereinfachend die verschiedenen Einflüsse auf den Gefäßtonus der Widerstandsgefäße (siehe Abbildung 1).

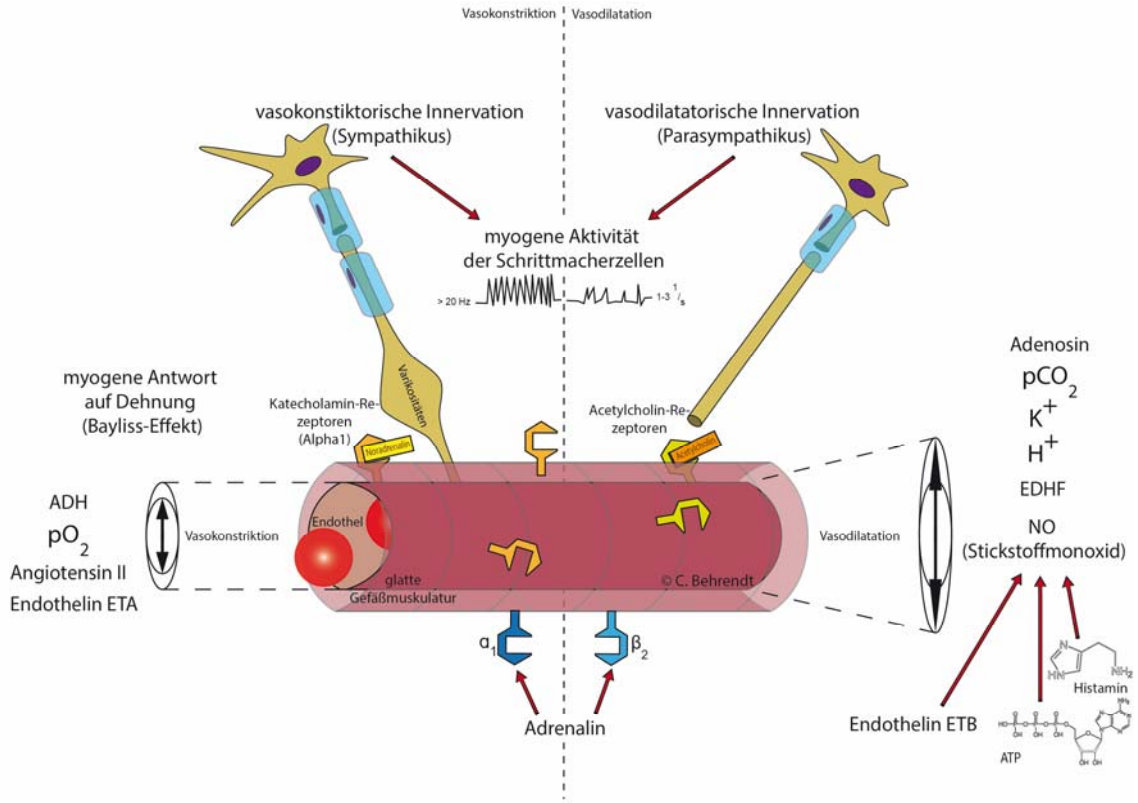


**Abbildung 1: Einflüsse auf den Gefäßdurchmesser geändert nach Silbernagel et al. 2005**

Eine Hauptrolle für den Gefäßtonus kommt der sympathischen Tonuserhöhung der Arteriolen zu, die über noradrenerge $\alpha_1$-Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur und postganglionäre Sympathikusnerven vermittelt wird. Bei Sympathikusaktivierung nimmt die Durchblutung der Haut unter allen Organsystemen am deutlichsten ab. Nennenswert sind in diesem Zusammenhang aber auch die Histamin-vermittelte Vasodilatation und die lokale Vasodilatation durch nozizeptive Reize der Haut (Axonreflex).
Bei Neurofibromen könnte das tumoröse Wachstum der Schwannzellen zu einer Degeneration der Nervenfasern führen, die normalerweise durch Schwannzellen geschützt werden. Ein Wegfall sympathischer Fasern im Bereich von Neurofibromen würde eine Denervierung entsprechender Blutgefäße bedeuten und damit die Weitstellung der Gefäße zur Folge haben.

Für die vorliegende Arbeit ergibt sich hieraus folgende
Nullhypothese:
Es gibt hinsichtlich der Gefäßinnervation und Nervenfaserdichte keinen signifikanten Unterschied zwischen Neurofibromen und normaler Haut.

# 2. Einleitung

## 2.1 Neurofibromatosen

Neurofibromatosen sind klinisch und pathophysiologisch äußerst vielseitige Erkrankungen mit genetischen Ursachen. Sie gehören neben weiteren Erkrankungen, wie dem Tuberösen Sklerose-Komplex oder dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom, zu der Gruppe der neurokutanen Syndrome (alte Bezeichnung: Phakomatosen). Gemeinsames Merkmal der neurokutanen Syndrome ist eine gestörte Differenzierung von Derivaten der Neuralleiste, die Veränderungen im Bereich der Haut und des Nervensystems zur Folge hat. Bis in das Jahr 2003 wurde die Gruppe der Neurofibromatosen in die Neurofibromatose Typ 1 (periphere Form) und Neurofibromatose Typ 2 (zentrale Form) unterteilt. Seit 2003 wird darüber hinaus die familiäre Schwannomatose als eigene Entität in der Gruppe der Neurofibromatosen angesehen (MacCollin et al., 2003). Zuvor galt die Schwannomatose noch als eine Unterform der Neurofibromatose Typ 2.

## 2.2 Neurofibromatose Typ 1

Die erste wissenschaftlich-klinische Beschreibung der Neurofibromatose Typ 1 (NF1) als Erkrankung der Nerven erfolgte bereits im Jahre 1768 durch den Arzt und Philosophen Mark Akenside am Royal College of Physicians in London (Akenside, 1768). Veröffentlichungen über die Geschichte dieser Erkrankung legen jedoch nahe, dass sich bereits im 13. Jahrhundert Bücher und Zeichnungen dieser Erkrankung widmeten (Brosius, 2010). Im Jahre 1882 veröffentlichte der Straßburger Professor Friedrich Daniel von Recklinghausen sein Werk Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen (von Recklinghausen, 1882) und prägte damit in der modernen Pathologie die Bezeichnung Neurofibromatose. Im englischsprachigen Raum ist die Bezeichnung VRNF (Von Recklinghausen Neurofibromatosis) für die Neurofibromatose Typ 1 bis heute üblich.

Die Neurofibromatose Typ 1 ist mit einer Inzidenz von ca. 1:3.000 (Lammert et al., 2005) bis 1:5.000 (Evans et al., 2010) Fällen eine der häufigsten genetischen Erkrankungen des Menschen. Sie wird autosomal-dominant (Viskochil, 2002) vererbt. Die Neumutationsrate zählt mit 50% zu den häufigsten Mutationsraten im gesamten

menschlichen Genom (Kehrer-Sawatzki und Mautner, 2009). NF1 zählt aufgrund ihrer zahlreichen genetischen Mechanismen zu den bedeutendsten Erkrankungen für das Verständnis der menschlichen Genetik (Viskochil, 2002). Die Penetranz dieser Erkrankung beträgt 100% bei sehr variabler Expressivität (Viskochil, 2002). Bereits im Jahr 1987 konnte nachgewiesen werden, dass das verantwortliche Gen für die NF1 in der Nähe des Zentromers von Chromosom 17 liegt (Barker et al., 1987, Seizinger et al., 1987). Drei Jahre später, im Jahr 1990, wurde der Genlocus der NF1 auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q11.2) vollständig sequenziert (Xu et al., 1990). Das NF1-Gen umfasst ca. 350 kb genomischer DNS (Viskochil, 2002) und 60 Exons (Kehrer-Sawatzki und Mautner, 2009), die für ein 2.485 Aminosäuren langes Protein kodieren (Xu et al., 1990). Das Genprodukt des NF1-Gens ist Neurofibromin, ein etwa 220-280 kDa schweres Protein (McClatchey, 2007), das unterschiedlich stark in verschiedenen Organen exprimiert wird. Neurofibromin ist ein Tumorsuppressor und dient als negativer Regulator der Ras-GTPase im Ras-Pathway (Kehrer-Sawatzki und Mautner, 2009, Ferner, 2007) (siehe Abbildung 2). Außerdem bewirkt es durch Stimulation der intrazellulären Adenylatcyclase eine Erniedrigung des intrazellulären cAMP (McClatchey, 2007, Xu et al., 1990, Gottfried et al., 2010) und wirkt dadurch antiproliferativ im Zellstoffwechsel. Eine t(1;17)-Translokationsmutation („Loss of function“) führt durch eine aberrante Aktivierung von Ras vereinfacht ausgedrückt zu einem Wegfall der Regulation der Zellproliferation (Xu et al., 1990).

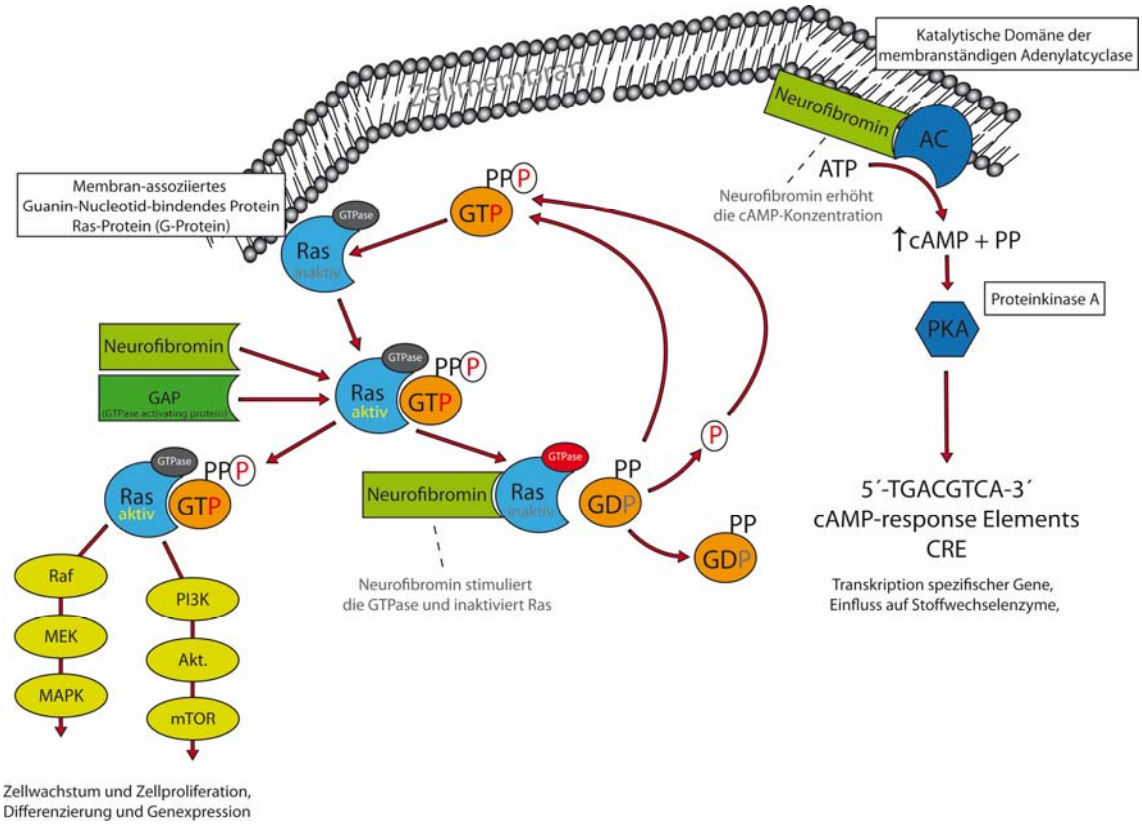


**Abbildung 2: Schema der intrazellulären Signalwege, an denen Neurofibromin als Tumorsuppressor beteiligt ist (geändert nach Hegedus et al., 1999 und Viskochil et al., 2002)**

Obwohl das Protein Neurofibromin im Menschen in einer großen Zahl von Zelltypen vorkommt, findet die Expression vor allem in Neuronen und Gliazellen (v.a. Schwannzellen) statt (Daston et al., 1992).

Für die klinische Diagnosestellung der Neurofibromatose Typ 1 gelten die 1987 vom National Institutes of Health (NIH) veröffentlichten Kriterien (1987, Gutmann et al., 1997) (siehe Tabelle 1). Trotz der sehr variablen Expression und der Tatsache, dass einige der klinischen Krankheitsmerkmale erst in der Adoleszenz auftreten, haben Untersuchungen gezeigt, dass eine Diagnosestellung anhand der gültigen NIH-Kriterien bereits bei 95% der erkrankten sechsjährigen Schulkinder möglich ist (Lammert et al., 2005).

**Tabelle 1: Diagnosekriterien des National Institutes of Health Consens Statement von 1987 (1987, Gutmann et al., 1997)**

| | **Mindestens 2 der aufgeführten Merkmale müssen vorhanden sein:** |
|---|---|
| 1. | 6 oder mehr **Café-au-Lait-Flecken**<br>- 1,5 cm oder größer im Erwachsenenalter (postpubertär)<br>- 0,5 cm oder größer in der Kindheit (präpubertär) |
| 2. | 2 oder mehr **Neurofibrome** jeden Typs oder 1 plexiformes Neurofibrom |
| 3. | **Freckling** im axillären oder inguinalen Bereich |
| 4. | **Optikusgliom** |
| 5. | 2 oder mehr **Lisch-Knötchen** |
| 6. | **Knochendysplasien** wie Skoliose, Kongenitale anterolaterale Verbiegung der Tibia, Pseudoarthrosen, Keilbeinflügeldysplasien |
| 7. | Betroffener **Verwandter 1. Grades** |

Neben den in Tabelle 1 aufgeführten diagnostischen Kriterien des NIH gibt es bei dieser Erkrankung noch eine große Zahl weiterer Manifestationen in unterschiedlicher Häufigkeit (Ferner et al., 2007, Kehrer-Sawatzki und Mautner, 2009). Die Häufigkeiten der bekannten klinischen Merkmale sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Diese bereits umfangreiche Liste an klinischen Manifestationen der NF1 kann aufgrund aktueller Studien noch um Sprachstörungen (Cosyns et al., 2010) und eine erhöhte Brustkrebsinzidenz bei jungen NF1-Patientinnen (Madanikia et al., 2012) ergänzt werden.

**Tabelle 2: Häufigkeiten und Manifestationsalter der klinischen Merkmale bei NF1 nach (nach Kehrer-Sawatzki et al. und Ferner et al. (Kehrer-Sawatzki und Mautner, 2009, Ferner et al., 2007))**

| Häufigkeiten und Manifestationsalter der klinischen Merkmale bei Neurofibromatose Typ 1 in absteigender Häufigkeit (nach Kehrer-Sawatzki et al. und Ferner et al. (Ferner et al., 2007, Kehrer-Sawatzki und Mautner, 2009)) | | | |
|---|---|---|---|
| **Frequenz [%]** | **Klinisches Merkmal** | **NIH-Kriterium?** | **Manifestationsalter** |
| >99 | Café-au-Lait-Flecken | ja | bis zum 12. Lebensjahr |
| 99 | Dermale Neurofibrome | ja | ab dem 7. Lebensjahr |
| 90-95 | Lisch-Knötchen | ja | ab dem 7. Lebensjahr |
| 85 | Freckling im axillären oder inguinalen Bereich | ja | 3. Lebensjahr bis Adoleszenz |
| 30-60 | Lernbehinderung | nein | Kindheit |
| 50 | (sichtbare) Plexiforme Neurofibrome | ja | bis zum 18. Lebensjahr |
| 50 | Makrozephalie | nein | bei Geburt |
| 30 | (nicht ohne Bildgebung sichtbare) Plexiforme Neurofibrome | ja | bis zum 18. Lebensjahr |
| 15 | Optikusgliom (nur bei 5-7% symptomatisch) | ja | bis zum 7. Lebensjahr |
| 8-13 | Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST) | nein | Lebenslang |
| 10 | schwere Skoliose | nein | bis zum 18. Lebensjahr |
| 4-8 | schwere kognitive Beeinträchtigung (Intelligenzquotient <70) | nein | Kindheit |
| 6-7 | Epilepsie | nein | Lebenslang |
| 2-3 | zerebrale Gliome | nein | Lebenslang |
| weitere seltene Krankheitsmanifestationen: Tibiapseudoarthrose (2%), Nierenarterienstenose (2%), Phäochromozytom (2%), Aquäduktstenose (1,5%), Keilbeinflügeldysplasie (<1%) | | | |

## 2.3 Histopathologie der peripheren Nervenscheidentumore

Die mit der Neurofibromatose Typ 1 (Grad I WHO) assoziierten primär benignen Neurofibrome lassen sich bereits makroskopisch in dermale und plexiforme Typen unterscheiden. Während die dermalen (kutanen) Neurofibrome als klingelknopfartige feste Knoten unterschiedlicher Größe direkt subepidermal imponieren, fallen die plexiformen Typen eher durch ein längliches perlschnurartiges Wachstum auf. Primäre Tumorzellen sind die schlanken nichtmyelinisierten Schwannzellen, welche sich in einem wellen- oder kommaartig konturierten Muster (spindelartig) anordnen. Weiterhin finden sich untermischt normale, nicht transformierte Fibroblasten sowie Mastzellen und Perineuralzellen in der Tumormasse (McClatchey, 2007). Der Extrazellulärraum zeichnet sich teilweise durch eine basophile myxoide Matrix mit hohem Anteil an Glykosaminoglykanen aus (Klöppel et al., 2012). Durch die Schwannzell-Differenzierung lässt sich eine kräftige immunhistochemische Anfärbung mit dem S100-Protein nachweisen (Klöppel et al., 2012). Der Ursprungsnerv der plexiformen Neurofibrome zeigt eine fusiforme oder zylindrische Auftreibung durch ein Auseinanderdrängen der Nervenfasern durch das an extrazellulärer Matrix reiche Tumorgewebe (Klöppel et al., 2012).

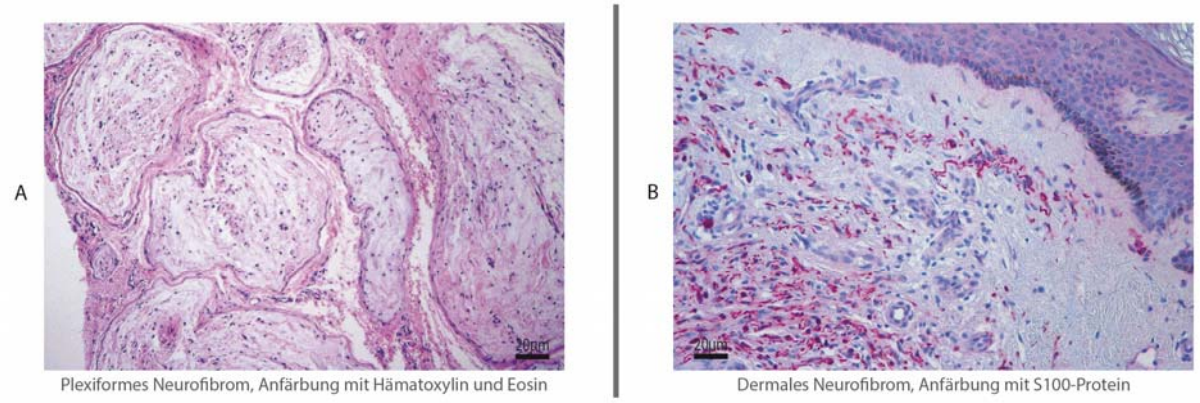


**Abbildung 3: Histologische Erscheinungsform der dermalen und plexiformen Neurofibrome**

Mit einem Lebenszeitrisiko von 8-13% (Evans et al., 2002) entwickeln sich aus plexiformen Neurofibromen sogenannte maligne periphere Nervenscheidentumore. His-

topathologisches Kriterium dieses hochmalignen Tumors sind Mitosen, erhöhte Zelldichte, infiltratives Wachstum und eine erhöhte Polymorphie der Zellen und Kerne. Häufig sind zusätzlich Nekrosen zu beobachten (Klöppel et al., 2012).

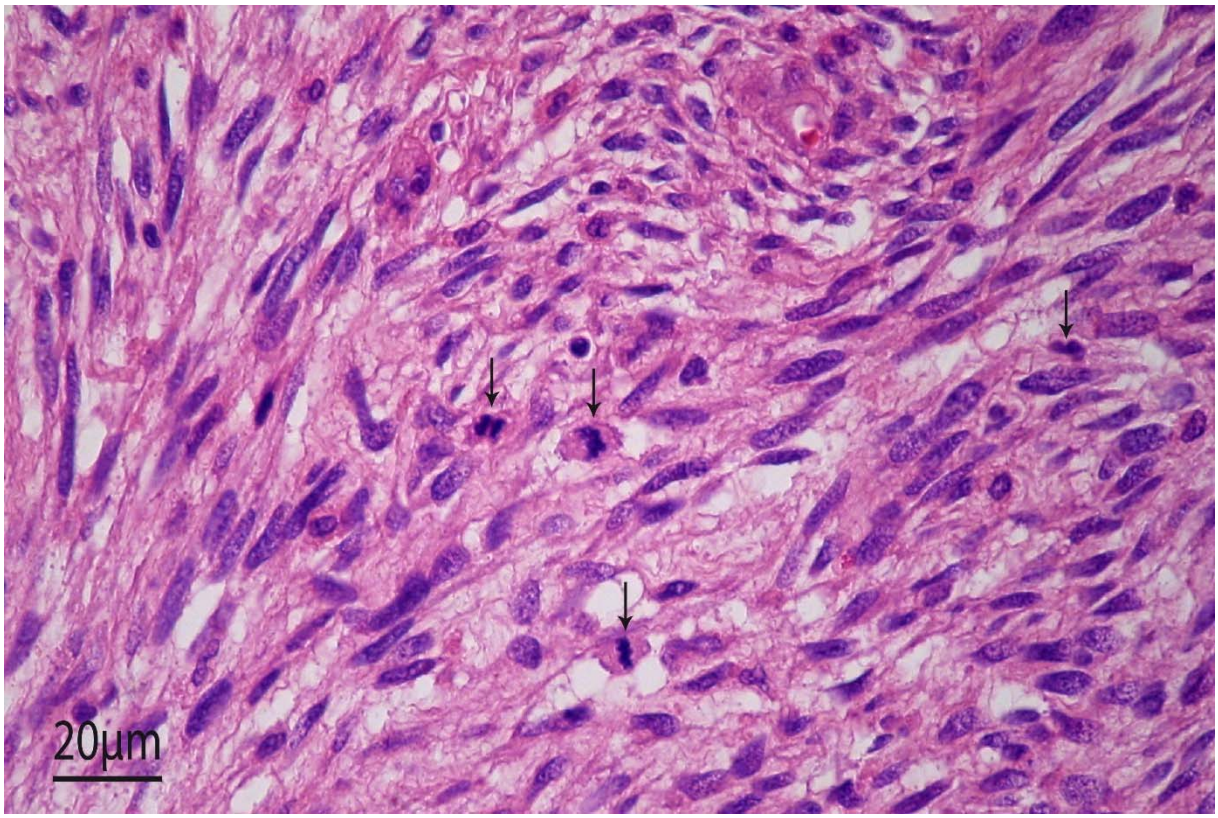


**Abbildung 4: Maligner peripherer Nervenscheidentumor (MPNST). Pfeile: Mitosen. Anfärbung mit HE**

## 2.4 Strukturproteine von Nerven und Gefäßen

Zum immunhistochemischen Nachweis von Nervenstrukturen und Gefäßen bieten sich mehrere Marker bzw. Antikörper gegen spezifische Strukturproteine an.

### 2.4.1 Neurofilamente (NF)

Neurofilamente (NF) sind etwa 10nm (Löffler, 2007) durchmessende Strukturproteine aus der Gruppe der Typ IV Intermediärfilamente und stellen wichtige exklusive Elemente des Zytoskeletts von Neuronen dar (Shaw, 1986). Neurofilamente können in vier verschiedenen Untergruppen eingeteilt werden: NF-L (*low weight*, ca. 68kDa), NF-M (*medium weight*, ca. 150kDa), NF-H (*high weight*, ca. 190-210kDa) und das Alpha-Internexin (ca. 66kDa) (Binder et al., 2009). Das letztgenannte Alpha-Internexin wurde erst kürzlich als vierte Untergruppe der Neurofilamente identifiziert (Yuan et al., 2006). Jede der vier Neurofilamente hat einen eigenen Genlocus und damit assoziierte Erkrankungen. So ist das leichte NF-L z.B. bei der Charcot-Marie Tooth Erkrankung betroffen (Binder et al., 2009).

### 2.4.2 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)

Das etwa 24kDa (Jackson und Thompson, 1981) bzw. 27kDa (Campbell et al., 2003, Rode et al., 1985) schwere Protein Gen Produkt 9.5 (PGP 9.5), auch bekannt als Ubiquitin C-Terminale Hydrolase-1 (UCH-L1), wird vor allem in Neuronen, zentralen und peripheren Axonen und allen neuroendokrinen Zellen von Wirbeltieren exprimiert (Rode et al., 1985, Thompson et al., 1983). Im menschlichen Gehirn macht das Protein etwa 1-2% der Gesamtmasse aller löslichen Proteine aus (Thompson et al., 1983). Neben PGP 9.5 wurden noch 7 weitere hirnspezifische PGP-Gruppen identifiziert (Jackson und Thompson, 1981). Bei der immunhistochemischen Anfärbung von Hautbiopsien mit Antikörpern gegen PGP 9.5 werden neben den größeren Nerven auch die perivaskulären Nervengeflechte und die kleinen intraepidermalen Nervenverzweigungen sowie terminalen Nervenendigungen in den Meissner Tastkörperchen angefärbt (Wang et al., 1990). PGP 9.5 wird weiterhin auch in zahlreichen Neoplasien mit neuroektodermaler Differenzierung exprimiert. So lässt sich eine teils deutliche Anfärbung verschiedener benigner und maligner Nervenscheidentumore und anderer Tumorentitäten nachweisen (Campbell et al., 2003).

### 2.4.3 *Alpha-smooth muscle actin* (SMA)

Das *Alpha-smooth muscle actin* (SMA) ist ein zweisträngiges helikales Polymer aus der Gruppe der Aktinfilamente. Mit einem Durchmesser von etwa 7-9nm (Löffler, 2007) sind die Aktinfilamente etwas kleiner als die Intermediärfilamente, zu denen beispielsweise Neurofilament (siehe Kapitel 1.7.1 Neurofilamente) gehört. Aktinfilamente kommen im gesamten Zytoplasma vor, konzentrieren sich aber vor allem direkt unter der Zellmembran von Muskelzellen, wo sie zusammen mit den Regulatorproteinen Tropomyosin und dem Troponinkomplex (nur bei quergestreifter Muskulatur) am kontraktilen Apparat beteiligt sind. Während die verschiedenen Unterformen der dünnen Filamente (ß-Aktin, γ-Aktin) ihre Aufgaben in ganz verschiedenen Zellen des menschlichen Organismus wahrnehmen, kommt das α-Aktin vor allem als typische Isoform der glatten Muskelzelle vor und ermöglicht durch Interaktion mit Myosin-II die Kontraktion der perivaskulären Myozyten (Skalli et al., 1989).

### 2.4.4 Dopamin-Beta-Hydroxylase (DBH)

Dopamin-β-Hydroxylase (DBH) ist das dritte Enzym in der menschlichen Biosynthese von Katecholaminen. Es hydroxyliert Dopamin zu Noradrenalin, einem wichtigen vasokonstriktorisch wirkenden Neurotransmitter im menschlichen Zellstoffwechsel. DBH kann vor allem in den synaptischen Vesikeln noradrenerger Neurone und in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks gefunden werden (Nagatsu et al., 1990). Es wurde eine lösliche als auch eine membrangebundene Form nachgewiesen (Stewart und Klinman, 1988). Die noradrenergen Neurone befinden sich vor allem im Locus coeruleus am Boden der Rautengrube sowie im lateralen Teil des Tegmentums der Medulla oblongata. Die aktive Domäne des Homotetramers DBH (Nagatsu et al., 1990) hat ein Molekulargewicht von ca. 29kDa im Menschen (Kapoor et al., 2011) und besteht aus einem N-terminalen (hDBH-N), einem C-terminalen (hDBH-C) sowie einem intermittierenden Teil (hDBH-I) (Nagatsu et al., 1990). Insbesondere der C-terminale Teil scheint spezifisch für den Menschen zu sein (Nagatsu et al., 1990), während der N-terminale Teil auch in Ratten und Mäusen nachgewiesen werden konnte (Nagatsu et al., 1990).

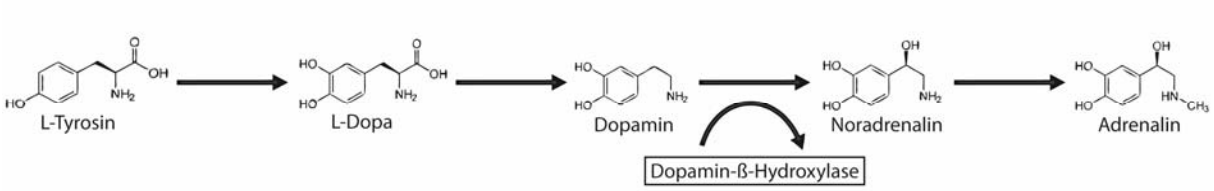


**Abbildung 5: Biosynthese der Katecholamine im Menschen**

## 2.5 Aufbau von Widerstandsgefäßen und perivaskulären Nerven

Der feinstrukturelle Aufbau und die Wandschichtung der für diese Arbeit bedeutenden Widerstandsgefäße in der mikrozirkulären Endstrombahn, also der Arterien vom muskulären Typ, setzen sich aus den histologischen Komponenten Endothel (Tunica intima), glatte Muskulatur (Tunica media) und extrazelluläres Bindegewebe (Tunica adventitia) zusammen (Lüllmann-Rauch, 2006). Zwischen den Wandschichten liegt je eine elastische Lamelle (Membrana elastica interna bzw. Membrana elastica externa) (Lüllmann-Rauch, 2006). Für die Steuerung der Durchblutung kommt der Media in den Widerstandsgefäßen die größte Bedeutung zu. Neben zahlreichen elastischen und kollagenen Fasern sowie Proteoglykanen lassen sich hier vor allem glatte Muskelzellen in zirkulärer oder spiralförmiger Anordnung darstellen, die für die Kontraktilität der Arterien zuständig sind. Die Morphologie glatter Muskulatur entspricht spindelförmigen Zellen mit einer Länge von ca. 20µm (Junqueira et al., 2005) ohne Querstreifung. Sie enthalten sowohl Aktin-, Myosin- als auch Intermediärfilamente (Junqueira et al., 2005) und sind über sogenannte Gap Junctions miteinander verbunden. Die Innervation der glatten Gefäßmuskulatur beinhaltet sowohl sympathische als auch parasympathische Fasern des autonomen Nervensystems (Junqueira et al., 2005). Untersuchungen an Affen- und Rattengewebe legen darüber hinaus auch eine Innervation der Gefäße durch sensorische Afferenzen nahe (Ruocco et al., 2002). Eine Besonderheit der autonomen Gefäßinnervation ist die Ausbildung sogenannter Varikositäten, einer Reihe von perlschnurartigen Kalibervergrößerungen im Endomysium (Junqueira et al., 2005), anstelle von synaptischen Verbindungen zur glatten Muskulatur. Diese Art der besonderen Innervation glatter Gefäßmuskulatur wird auch als Synapse en distance bezeichnet (Junqueira et al., 2005).

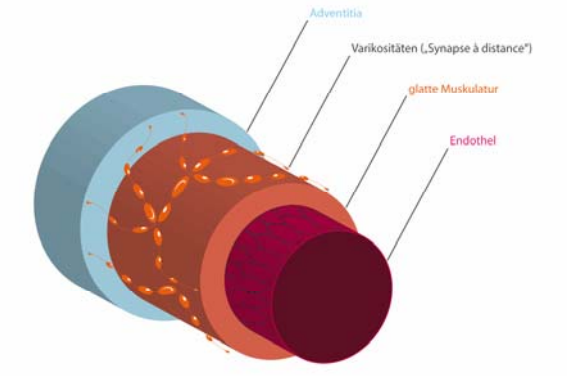


**Abbildung 6: Wandschichtung der Widerstandsgefäße**

## 2.6 Dichte von Nervenfasern und Gefäßen in der Haut

### 2.6.1 Gefäße der Haut

Besondere Relevanz hat die Messung der Gefäßdichte (*microvessel density*, MVD in $^{vv}/_{mm^2}$) vor allem als Malignitätskriterium in verschiedenen Tumoren. Allgemein anerkannt ist die Feststellung, dass Tumoren mit einem Gesamtvolumen von über 1-2 mm³ dazu in der Lage sein müssen, verschiedene Mechanismen der Angiogenese anzuwenden, um ihre eigene Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten (Weidner, 2008). Eine insuffiziente Fähigkeit zur Angiogenese-Stimulation führt aufgrund der wachsenden Diffusionsstrecke innerhalb des Tumors häufig zu zentralen Nekrosen.

Verschiedene Arbeiten legen darüber hinaus nahe, dass eine erhöhte Gefäßdichte in Tumoren mit einer schlechteren Gesamtprognose einhergeht (Weidner, 1995, Murray et al., 1997). Besonders gut wurde dieser Zusammenhang in Mammakarzinomen und Prostatakarzinomen untersucht. Für die Messung der Gefäßdichte verwenden die meisten Autoren Antikörper gegen die endothelialen Antigene Faktor VIII (Weidner et al., 1991), CD31 (Plotkin et al., 2009), von Willebrand-Faktor (Rossi et al., 2010) oder CD34 (Weidner, 1995) und konzentrieren sich bei den Auszählungen auf Regionen mit besonders hoher Gefäßdichte, die sogenannten „Hotspots“. Obwohl sich unter der Verwendung von CD31 und CD34 auch die Markierung von Fibroblasten und einigen Tumoren beobachten ließ (Weidner, 1995, Vermeulen et al., 1995), scheinen diese Marker gegenüber Faktor-VIII bessere Ergebnisse zu liefern (Weidner, 2008). Während es zahlreiche Arbeiten mit Daten zur Gefäßdichte in verschiedenen Tumorentitäten gibt, ist die Datenlage für Normwerte in Hautbiopsien weniger ergiebig. Eine Übersicht über die in der Literatur genannten Gefäßdichtewerte gibt Tabelle 3, wobei bereits erhebliche Schwankungen deutlich werden.

Frühere Untersuchungen im Institut für Neuropathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Naber, 2012) ergaben unter Verwendung von Antikörpern gegen CD34 eine mittlere Gefäßdichte von 11,39/mm² bei n=5 gesunden Hautkontrollen und 14,00/mm² bei n=4 gesunden Nervenproben. Die mittlere Gefäßdichte bei n=21 dermalen Neurofibromen lag bei 10,92/mm², bei n=24 plexiformen Neurofibromen im Durchschnitt bei 13,81/mm². (Plotkin et al. 2009), geben für gesunde Nervenbiopsien

eine durchschnittliche Gefäßdichte von 18/mm² an. Relevant ist die Gefäß- bzw. Kapillardichte der Haut in kürzerer Vergangenheit auch für die Perinatalmedizin gewesen. So ermittelte eine Arbeitsgruppe unter Verwendung einer intravitalen Videomikroskopie eine Kapillardichte von 96,6/mm² an 16 gesunden Neugeborenen (Bonamy et al., 2007). In einer anderen Arbeit wurde mit der gleichen Methode eine Kapillardichte von 90,9/mm² bei 272 gesunden Schwangeren ermittelt (Nama et al., 2012). Zu bedenken ist hierbei allerdings, dass sich die Werte der intravitalen Videomikroskopie nicht ohne weiteres mit immunhistochemischen Untersuchungen vergleichen lassen, da alle Gefäße der kapillaren Endstrombahn, ohne Einschränkung auf eine festgelegte Schnittdicke, mitgezählt werden.

**Tabelle 3: Übersicht über in der Literatur genannte Normalwerte und pathologischer Werte (*) der Gefäßdichte (vv/mm²)**

| Autor | Anzahl Patienten | Region | IHC | Sonst. | $^{vv}/_{mm^2}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| (Liu et al., 2012) | | Tissue engineered skin | HE | | 36,26* |
| Naber et al., 2012 | | Nerv | CD31 | | 14 |
| | | NF2-Schwannom | CD31 | *NF2* | 16,26* |
| | | MPNST | CD31 | *MPNST* | 30,8* |
| (Plotkin et al., 2009) | | gesunder Nerv | CD31 | *gesund* | 18 |
| | | Schwannom | CD31 | *pathol.* | 22* |
| (Perrigouard et al., 2013) | 25 | | CD31 | *Rosazea* | 15* |
| (Rossi et al., 2010) | 7 | Unterarm papilläre Dermis | vWF | *gesund* | 139,5 |
| | 9 | Unterarm papillär | vWF | *Sklerodermie* | 113,6* |
| | 7 | Unterarm retikuläre Dermis | vWF | *gesund* | 36,4 |
| | 9 | Unterarm retikulär | vWF | *Sklerodermie* | 35,7* |
| (Schwab et al., 2011) | 10 | | CD31 | *unklare Einheit* | ca. 45 |
| (Storr et al., 2012) | 202 | | CD34 | *Melanom* | 38,0* |
| (Smoller und Rosen, 1986) | 17 | Haut | HE | | 18,3 |
| | 7 | Hämangiome | HE | *pathol.* | 34,4* |
| (Tellechea et al., 2013) | 12 | Unterarm | CD31 | *gesund* | 21 |
| | 60 | Unterarm | CD31 | *Diabetes* | 27* |
| | 7 | Fuß | HE | *gesund* | 45 |
| | 5 | Fuß | HE | *Diabetes* | 27* |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| (Valencak et al., 2004) | 120 | | CD31 | *Melanom* | 44,6* |
| (Weidner et al., 1991) | 19 | Mamma-karzinom | F VIII | *pathol.* | 60,9* |

### 2.6.2 Innervation der Haut

Die meisten der verfügbaren Arbeiten, die sich mit der Dichte von Nervenfasern in Hautpräparaten beschäftigen, behandeln Erkrankungen, die typischerweise mit einem axonalen Untergang im peripheren Nervensystem einhergehen. Insbesondere die diabetischen Polyneuropathie, *Small-Fiber-Disease* und HIV-assoziierte Neuropathien sind hier zu nennen. Aufgrund der bereits physiologisch in jeder Körperregion unterschiedlichen Nervenfaserdichte ist ein Vergleich dieser Werte nicht ganz unproblematisch. In der menschlichen Haut befinden sich neben freien Nervenendigungen in der Dermis (Schiebler und Arnold, 2003) auch Nerven, an deren Ende sich nicht-nervale Zellstrukturen befinden. Diese Strukturen dienen der Organisation von Rezeptororganen, wie den Merkel-Zellen in der Epidermis, den Meissner-Körperchen im Stratum papillare oder den Pacini-Körperchen in der Hypodermis (Junqueira et al., 2005). Neben diesen genannten afferenten Nervenfasern findet man in der Haut aber auch efferente Nervenfasern des autonomen Nervensystems, insbesondere im Bereich der Gefäße, Drüsen und Mm. arrectores pilorum.

Zur Quantifizierung der epidermalen Nervendichte haben sich die in Tabelle 4 genannten Autoren auf ein standardisiertes, validiertes Verfahren zur Ermittlung der Nervenfaserdichte in Hautbiopsien (z.B. 3mm Stanzbiopsien) geeinigt. Hierbei werden in der Regel Proben im Bereich des proximalen Oberschenkels oder des distalen Unterschenkels entnommen und ausgewertet. Zur immunhistochemischen Färbung gelangen meist 50µm-Dickschnitte, die im sogenannten *Free-Floating-Verfahren* behandelt werden. Gezählt werden im ersten Schritt alle die Basalmembran in Richtung Epidermis durchdringenden angefärbten Nervenfasern an ihrer Durchtrittsstelle in die epidermale Schicht. Nervenfasern, die tiefer liegen oder parallel zum Hautniveau verlaufen, ohne die Basalmembran zu penetrieren, werden nicht mitgezählt. Im nächsten Schritt wird die Länge der ausgewerteten Strecke in Millimetern (mm) anhand der oberen Grenze des Stratum corneum ausgemessen. Die Nervenfaserdichte (IENF/mm, intraepidermal nerve fibers per mm) ergibt sich aus den gezählten Nervenfasern pro Millimeter (mm) Hautstrecke.

Die nachfolgende Tabelle 4 gibt einen Überblick über die in der Literatur genannten Normwerte an gesunden Kontrollen sowie einige pathologische Werte (grau).

**Tabelle 4: Übersicht über in der Literatur genannte Normalwerte und pathologischer Werte (*) der intraepidermalen Nervendichte (IENF) der Haut, ermittelt durch immunhistochemische Darstellung von PGP9.5 (UA=Unterarm, US=Unterschenkel, OS=Oberschenkel)**

| Autor | Anzahl Patienten | Region | IHC | Sonstiges | IENF (n/mm) |
|---|---|---|---|---|---|
| (Gøransson et al., 2004) | 106 | dist. US | *PGP9.5* | *50µm, 16-92y* | 12,4 |
| | 66 (106) | dist. US | *PGP9.5* | *nur weiblich* | 13,6 |
| | 40 (106) | dist. US | *PGP9.5* | *nur männlich* | 10,5 |
| (Herrmann et al., 2004) | 19 | prox. OS | *PGP9.5* | *50µm* | 21,6 |
| | 19 | dist. US | *PGP9.5* | *50µm* | 16,6 |
| | 19 | dist. US | *PGP9.5* | *50µm, weiblich* | 15,0 |
| | 57 | dist. US | *PGP9.5* | *50µm, HIV ohne PNP* | 11,7* |
| | 57 | dist. US | *PGP9.5* | *50µm, HIV asympt. PNP* | 9,7* |
| | 57 | dist. US | *PGP9.5* | *50µm, HIV sympt. PNP* | 8,7* |
| (Herrmann et al., 1999) | | dist. US | *PGP9.5* | | 14,7 |
| (Lauria et al., 2001) | 15 | prox. OS | *PGP9.5* | *50µm, PGP9.5* | 24,37 |
| | 15 | dist. US | *PGP9.5* | | 14,46 |
| | 15 | prox. OS | *PGP9.5* | *Neuropathie* | 17,07*** |
| | 15 | dist. US | *PGP9.5* | *Neuropathie* | 3,64*** |
| (Lauria et al., 2003) | 15 | prox. OS | *PGP9.5* | *50µm* | 22,6 |
| | 15 | dist. US | *PGP9.5* | *50µm* | 14,4 |
| | 15 | dist. US | *PGP9.5* | *31-68y, Neuropathie* | 8,4 |
| (McArthur et al., 1998) | 98 | prox. OS | *PGP9.5* | *50µm, 13-82y* | 21,1 |
| | 98 | dist. US | *PGP9.5* | | 13,8 |
| (Omdal et al., 2002) | 15 | dist. US | *PGP9.5* | *50µm, 25-65y* | 12,2 |
| | 15 | dist. US | *PGP9.5* | *SLE (Lupus)* | 8,0* |
| (Pan et al., 2001) | 55 | dist. US | *PGP9.5* | | 12,97 |
| | 55 | dist. UA | *PGP9.5* | | 17,36 |
| | 55 | dist. UA | *PGP9.5* | *Neuropathie* | 5,631* |
| | 55 | dist. US | *PGP9.5* | *Neuropathie* | 2,160* |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| (Shun et al., 2004) | 38 | dist. US | *PGP9.5* | *50µm, 31-73y* | 9,359 |
| | 38 | dist. US | *PGP9.5* | *50µm, 36-72y, Diabetes II* | 1,794* |
| (Umapathi et al., 2006) | 84 | prox. OS | *PGP9.5* | *50µm, 20-71y* | 20,4 |
| | 45 (84) | dist. US | *PGP9.5* | *50µm, nur männlich* | 11,7 |
| | 39 (84) | dist. US | *PGP9.5* | *nur weiblich* | 15,0 |

Zu den am häufigsten in der Literatur zitierten Normalwerten bei gesunden Kontrollproben gehören vor allem die Daten von McArthur et al. (McArthur et al., 1998) und Lauria et al. (Lauria et al., 2001, Lauria et al., 2003). Insgesamt lässt sich anhand der in Tabelle 4 aufgeführten Daten im proximalen Oberschenkel eine normale intraepidermale Nervenfaserdichte von 21,1 bis 24,37 Nerven pro Millimeter erwarten. Die zu erwartenden Werte liegen im Bereich des distalen Unterschenkels mit 13,8 bis 14,46 Nerven pro Millimeter etwas darunter. Erwartungsgemäß gibt es eine deutliche signifikante Korrelation zwischen der intraepidermalen Nervenfaserdichte und dem Alter (Gøransson et al., 2004) sowie verschiedenen, die Nerven betreffenden, Erkrankungen des Patienten. So war die intraepidermale Nervenfaserdichte bei Patienten mit langjährigem Diabetes mellitus Typ 2 und bereits vorhandenen symmetrischen Parästhesien im distalen Unterschenkel gegenüber der Kontrollgruppe von 9,359/mm auf 1,794/mm erniedrigt (Shun et al., 2004).

Nur wenige Autoren wichen von dem oben beschriebenen Verfahren ab und gaben die Nervenfaserdichte in Nervenanzahl pro mm² an. Hierbei ergaben Messungen einer Arbeitsgruppe zum Thema der sogenannten Feuermale (engl. *Port-Wine Stains*) eine Nervenfaserdichte von 21,1 Nerven pro mm² in den gesunden Hautkontrollen und nur 8,5 Nerven pro mm² in den untersuchten Feuermalen (Smoller und Rosen, 1986). Eine ältere Arbeit zur morphologischen Untersuchung kindlicher Suralis-Nervenbiopsien ergab bei dem einzigen gesunden von insgesamt neun Kindern eine Nervenanzahl von 27,65 pro mm². Hierbei war die Anzahl unmyelinisierter Nervenfasern mit 45,0 pro mm² gegenüber der Anzahl myelinisierter Nervenfasern mit 10,3 pro mm² deutlich höher (Ferriere et al., 1985).

# 3. Material und Methoden

## 3.1 Reagenzien und Antikörper

Die nachfolgende Tabelle 5 enthält alle im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Reagenzien.

Tabelle 6 enthält die Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen (IHC).

**Tabelle 5: Verwendete Reagenzien**

| Produkt | Stoff | Hersteller | Best.-Nr. |
|---|---|---|---|
| **1 M HCl** | HCl | Merck KGaA Darmstadt | 1.09057 |
| **1 M NaOH** | NaOH | Merck KGaA Darmstadt | 1.09137 |
| **3´3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid** | DAB | Sigma Chemical Co. | K3765 |
| **Antibody Diluent** | Antibody Diluent 500ml, Contains: PBS (pH 7.4) and Sodium Azide 0.1% | Invitrogen / Zymed San Francisco | 00-3218 |
| **Aqua destillata** | | Baxter Deutschland GmbH | 001428 |
| **Aquatex Microscopy Eindeckmedium** | wässriges Eindeckmittel für die Mikroskopie | Merck KGaA Darmstadt | 1.08562.0050 |
| **Citratsäure-Monohydrat** | | Merck KGaA Darmstadt | 31.05.08 |
| **Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert** | Lösung A (Best.-Nr. X906) Lösung B (Best.-Nr. X907) | Carl Roth | X906 und X907 |
| **Ethanol 100%** | | Walter CMP GmbH & Co. KG | (Apotheke UKE) |
| **Ethanol 96%** | Ethanol 96% vergällt mit 1% Methylethylketon | Walter CMP GmbH & Co. KG | 603-002-00-5 |
| **Ethanol 96%, 80%, 70%, 50%** | selbst hergestellte Verdünnungen | | (Apotheke UKE) |
| **Ethanol 99%** | Ethanol 99% vergällt mit 1% Methylethylketon | Walter CMP GmbH & Co. KG | 603-002-00-5 |
| **Ethylendiamintetraessigsäure** | EDTA-Puffer | Serva | #11280 |
| **Fast-Red-Tabletten** | Zusammensetzung: 0,5mg Naphthol-Substrat, 2mg Fast Red Chromogen, | Roche | 11496549001 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 0,4mg Levamisol; Tabletten | | |
| **Formaldehydlösung 3,5%** | | BÜFA Chemikalien GmbH & Co. KG | 21108 |
| **Histofine Simple Stain AP (MULTI)** | Universal Immuno-alkaline-phosphatase Polymer (Anti-Mouse/Anti-Rabbit) | Nichirei Biosciences Inc. Japan | 414261F |
| **Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI)** | Universal Immuno-peroxidase Polymer (Anti-Mouse/Anti-Rabbit) | Nichirei Biosciences Inc. Japan | 414151F |
| **Mayers Hämalaunlösung** | | Merck KGaA Darmstadt | 1.09249.0500 |
| **Perhydrol** | Wasserstoffperoxid 30%, stabilisiert | Merck KGaA Darmstadt | 1.08597.100 |
| **Poly-L-Lysine** | Poly-L-Lysine, 0.1% w/v, in water. Thimerosal, 0.01% added as preservative | Sigma Diagnostics Inc. | 25988-63-0 |
| **Protease** | Type XXIV: Bacterial | Sigma Chemical Co. | 9014-01-1 |
| **Tissue-Tek Glas Mounting Medium** | Xylene-haltig | Sakura Finetek Europe | H905140821 |
| **Tri-Natriumcitrat-Dihydrat** | | Merck KGaA Darmstadt | 1.00244.1000 |
| **Tris-Buffered Saline (TBS) Fertigpulver** | Zusammensetzung: 30-60% 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol-hydrochloride; Fertigpulver | Dako North America Inc. | S1968 |
| **Triton® X-100** | Otylphenolpoly(ethylenglycolether) | Serva | 37240 |
| **Xylol** | | Th. Geyer GmbH & Co. KG | 18.0220411.2400 |
| **Ziegenserum** | Goat Serum (Normal), 94 g/L | Dako North America Inc. | X0907 |

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie**

| Antikörper | Beschreibung | Hersteller | Bestell-nummer |
|---|---|---|---|
| Actin alpha | Actin alpha, α-Smooth Muscle, Concentrated 0,5ml, IgG2a-kappa | Zytomed Systems | Mob001-05 |
| CD31 | monoklonal Maus α-Human PECAM-1 | Dako Cytomation | M0823 |
| CD34 | monoklonal Maus α-Human CD34 Class II | Dako Cytomation | M7165 |
| Dopamine-Beta-Hydro-xylase | Rabbit X Hydroxylase-N-Terminal | Millipore | AB1538 |
| Histofine Simple-Stain MAX-PO (Multi) | Universal Immuno-peroxidase Polymer (Anti-Mouse/Anti-Rabbit) Sekundärantikörper Ready-to-use | Nichirei Bioscience Japan Inc. | 41415F H0712-1 |
| Histofine Simple-Stain AP (Multi | Universal Immuno-alkaline-phosphatase Polymer (Anti-Mouse/Anti-Rabbit) Sekundärantikörper Ready-to-use | Nichirei Bioscience Japan Inc. | 414261F H0803 |
| Neurofilament Protein (NF) | monoklonal Maus α-Hu, Isotyp: IgG1-kappa | Dako Cytomation | M0762 |
| Protein gene product PGP 9.5 | polyklonal Rabbit α | Dako Cytomation | Z5116 |
| S100 | polyklonal Rabbit α S100 | Dako Cytomation | Z0311 |

## 3.2 Laborgeräte

Tabelle enthält alle im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Laborgeräte.

**Tabelle 7: Verwendete Laborgeräte**

| Produkt | Beschreibung | Hersteller |
|---|---|---|
| Eindeckautomat | Leica CV-5030 | Leica Biosystems |
| Fluoreszenzmikroskop | Immunfluoreszenzmikroskop | NIKON |
| Gewebeinfiltrationsautomat | Leica ASP300S | Leica Biosystems |
| Heizbad | | GFL |
| Inkubationskammer | Feuchte Kammer | |
| Kurzzeitmesser | Digital Model KT188 | Oregon Scientific |
| Küvetten | | Roth |
| Magnetrührer mit Heizung | MR Hei-End | Heidolph Instruments |
| Microtom | Leica SM2000R | Leica Biosystems |
| Mikrowellengerät | | LG Intellowave |
| Mikroskop #1 | Olympus BH2 | Olympus Microscopy |
| Mikroskop #2 | Axiovert S-100 Lichtmikroskop | Carl Zeiss Microscopy GmbH |
| Mikroskop #3 | Labormikroskop Zeiss | Carl Zeiss Microscopy GmbH |
| Reiskocher 700W | Gastroback; UKE-Gerät 72299 | Gastroback GmbH |
| Pipetten 20/100/1000µL | | Eppendorf |
| Präzisions-Laborwaage | PB1502S | Mettler Toledo Int. |
| Shandon Coverplate Immunostaining Chambers | | Thermo Scientific |
| Stereo Investigator System | Stereo Investigator 10.30 64bit Auswertesystem für Stereologie | MBF Bioscience |
| Vollautomatischer Färbeautomat | | Ventana Systems |
| Wärmeschrank/Inkubator | 60° C | Heraeus Instuments |
| Wärmeschrank/Inkubator | 37° C; UKE-Gerät 29888 | memmert |

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8 enthält alle im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Verbrauchsmaterialien.

**Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

| Produkt | Beschreibung | Hersteller |
|---|---|---|
| Adhäsionsobjektträger | Roti®Bond Adhäsionsobjektträger<br>mit elektrostatischer und chemischer Vorbehandlung | Menzel GmbH & Co. KG |
| Dako Pen | Wasserabweisender Stift zum Umranden von Gewebe auf Objektträgern | Dako |
| Deckgläser | | Marienfeld |
| Eppendorf Tubes | 1ml, 2ml, 5ml | Eppendorf |
| Klingen | Mikrotom (siehe Tab. 7) | Feather R35 |
| Objektträger SuperFrost | SuperFrost Plus für die Immunhistochemie<br>mit elektrostatischer Vorbehandlung | Glaswarenfabrik Karl Hecht KG |
| Objektträger SuperFrost Ultra Plus® | Superfrost Ultra Plus® für die Immunhistochemie<br>mit elektrostatischer Vorbehandlung | Menzel GmbH & Co. KG |
| Pipettenspitzen | 20/100/1000µL | Eppendorf |

### 3.4 Lösungen

3.4.1 Lösung zur Antikörperblockierung

1 ml Ziegen-Normalserum + 9 ml TBS+Triton

+ 10 ml Antibody Diluent Reagent Solution

3.4.2 Citratpuffer 10 mM pH 6 für die Antigendemaskierung

9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B ad 500 ml Aqua dest.

- Stammlösung A: 21,01 g Citronensäure ad 1.000 ml Aqua
- Stammlösung B: 29,41 g Natriumcitrat ad 1.000 ml Aqua

3.4.3 3´3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) Stammlösung

200 mg DAB in 40 ml TBS+Triton, doppelte Filtration, 1 ml je Eppendorf Tube, Aufbewahrung in Aliquots zu 1 ml bei -20°C

3.4.4 3´3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) Reaktionslösung

1 ml TBS + 100 µL $H_2O_2$ (30%) mischen,

aus dieser Lösung 300 µL in 9 ml TBS+Triton geben und

1 ml DAB-Stammlösung hinzugeben

3.4.5 EDTA-Puffer 1 mM pH 8,0 für die Antigendemaskierung

1,861 g EDTA in 5.000 ml Wasser auflösen

und mit 1 N HCL auf pH 8,0 einstellen

3.4.6 Eisenhämatoxylin nach Weigert (Lösung A und B zu gleichen Teilen mischen)

Lsg. A (475ml Aqua dest mit 5ml HCl 25% und 20ml Eisen-3-Chl.)

Lsg. B (10g Hämatoxylin in 1.000ml 96% Ethanol lösen)

3.4.7 Lösung zur Vorbehandlung der Objektträger gegen Abschwimmen

10 ml Sigma Aldrich Poly-L-Lysine + 90 ml Aqua dest.

3.4.8 Lösung zur Blockierung der endogenen Peroxidase

20 ml Perhydrol© ($H_2O_2$ 30%) + 180 ml Ethanol 100%

3.4.9 Tris buffered saline (TBS) 50 mM pH 7,6

Fertiglösung siehe Tabelle 5

3.4.10 Tris buffered saline + Triton X-100 (TBS+T)

TBS (s.o.) + 5 ml Triton X-100

### 3.5 Patientenkollektiv

Alle Patienten, die in dieser Studie eingeschlossen waren, werden von Herrn Prof. Dr. med. V. F. Mautner in der Neurofibromatose-Ambulanz des UKE betreut und erfüllen die NIH Kriterien für NF1. Vor Beginn der Untersuchung wurden alle Daten anonymisiert. Das Alter der Patienten betrug im Mittel 35,05 Jahre (STDDEV 18,092 MIN 2 MAX 80) zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme.

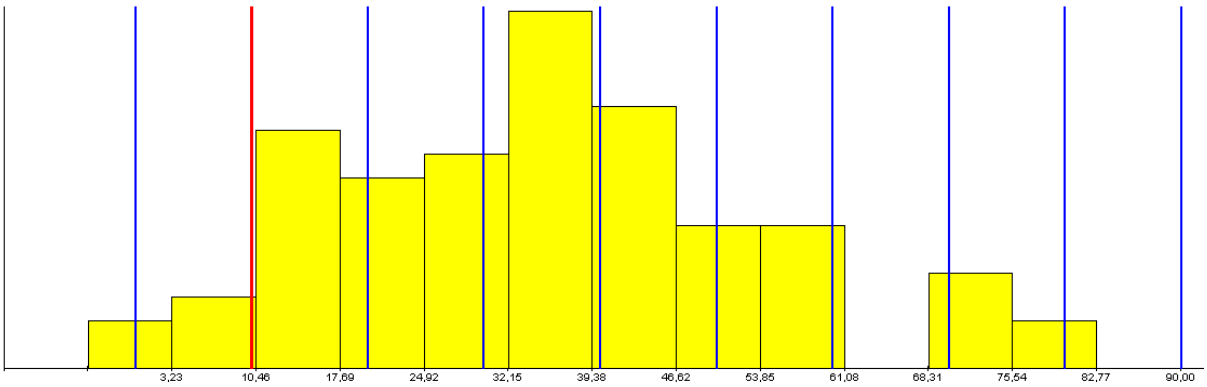


**Abbildung 7: Altersverteilung der n=77 in die Studie eingeschlossenen Fälle**

### 3.6 Gewebeproben

Für die Untersuchung wurden 77 formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben aus dem Archiv des Institutes für Neuropathologie, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf, herangezogen. Die Gewebeproben der NF-Patienten wurden in der Klinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gewonnen, die der sporadischen Tumore wurden in der Neurochirurgischen Klinik des UKE exzidiert.

In der nachfolgenden Tabelle 9 sind alle untersuchten Fälle aufgeführt.

**Tabelle 9: Auflistung aller in dieser Dissertation verwendeten Patientenfälle**

| ID | Jahr | Alter in Jahren | Typ |
|---|---|---|---|
| 1 | 2010 | 49 | Kutanes NF |
| 2 | 1997 | 33 | Kutanes NF |
| 3 | 1997 | 30 | Kutanes NF |
| 4 | 2011 | 19 | Kutanes NF |
| 5 | 1999 | 39 | Kutanes NF |
| 6 | 2010 | 33 | Kutanes NF |
| 7 | 1999 | 41 | Kutanes NF |
| 8 | 1999 | 47 | Kutanes NF |
| 9 | 1999 | 30 | Kutanes NF |
| 10 | 2000 | 26 | Kutanes NF |
| 11 | 2000 | 34 | Kutanes NF |
| 14 | 2001 | 24 | Kutanes NF |
| 15 | 2001 | 50 | Kutanes NF |
| 16 | 2001 | 50 | Kutanes NF |
| 17 | 2010 | 57 | Kutanes NF |
| 18 | 2002 | 16 | Kutanes NF |
| 19 | 2002 | 36 | Kutanes NF |
| 21 | 2003 | 17 | Kutanes NF |
| 22 | 1996 | 11 | Plexiform-diffuses NF |
| 23 | 1997 | 29 | Plexiform-diffuses NF |
| 24 | 1997 | 41 | Plexiform-diffuses NF |
| 25 | 1998 | 23 | Plexiform-diffuses NF |
| 26 | 1998 | 20 | Plexiform-diffuses NF |
| 27 | 1999 | 70 | Plexiform-diffuses NF |
| 29 | 1999 | 35 | Plexiform-diffuses NF |
| 30 | 2010 | 36 | Plexiform-diffuses NF |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 31 | 2000 | 14 | Plexiform-diffuses NF |
| 32 | 2000 | 36 | Plexiform-diffuses NF |
| 33 | 2000 | 56 | Plexiform-diffuses NF |
| 35 | 2011 | 40 | Plexiform-diffuses NF |
| 36 | 2009 | 48 | Plexiform-diffuses NF |
| 37 | 2002 | 27 | Plexiform-diffuses NF |
| 38 | 2006 | 37 | Plexiform-diffuses NF |
| 39 | 1994 | 2 | Plexiform-noduläres NF |
| 40 | 1994 | 55 | Plexiform-noduläres NF |
| 42 | 1995 | 14 | Plexiform-noduläres NF |
| 44 | 2009 | 5 | Plexiform-noduläres NF |
| 45 | 2011 | 13 | Plexiform-noduläres NF |
| 46 | 1997 | 33 | Plexiform-noduläres NF |
| 50 | 1997 | 4 | Plexiform-noduläres NF |
| 52 | 2011 | 14 | Plexiform-noduläres NF |
| 54 | 1998 | 11 | Plexiform-noduläres NF |
| 55 | 1998 | 38 | Plexiform-noduläres NF |
| 56 | 1999 | 13 | Plexiform-noduläres NF |
| 57 | 1999 | 70 | Plexiform-noduläres NF |
| 59 | 2009 | 45 | Plexiform-noduläres NF |
| 61 | 2001 | 6 | Plexiform-noduläres NF |
| 63 | 1995 | 31 | Atypisches NF |
| 64 | 1998 | 33 | Atypisches NF |
| 65 | 2003 | 25 | Atypisches NF |
| 66 | 2003 | 41 | Atypisches NF |
| 67 | 2003 | 41 | Atypisches NF |
| 68 | 2003 | 41 | Atypisches NF |
| 69 | 2004 | 31 | Atypisches NF |
| 71 | 2005 | 30 | Atypisches NF |
| 73 | 2005 | 24 | Atypisches NF |
| 74 | 2006 | 3 | Atypisches NF |
| 75 | 2007 | 23 | Atypisches NF |
| 76 | 2007 | 43 | Atypisches NF |
| 77 | 2007 | 23 | Atypisches NF |
| 78 | 2007 | 36 | Atypisches NF |
| 79 | 2007 | 23 | Atypisches NF |
| 80 | 2007 | 42 | Atypisches NF |
| 89 | 2006 | 49 | Haut (Kontrolle) |
| 90 | 2006 | 69 | Haut (Kontrolle) |
| 91 | 2007 | 16 | Haut (Kontrolle) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 92 | 2008 | 80 | Haut (Kontrolle) |
| 94 | 1991 | 32 | Haut (Kontrolle) |
| 100 | 2004 | 61 | Haut (Kontrolle) |
| 101 | 2008 | 76 | Haut (Kontrolle) |
| 102 | 2007 | 36 | Haut (Kontrolle) |
| 103 | 2004 | 56 | Haut (Kontrolle) |
| 104 | 1999 | 44 | Haut (Kontrolle) |
| 105 | 1999 | 37 | Haut (Kontrolle) |
| 106 | 2002 | 40 | Haut (Kontrolle) |
| 108 | 2001 | 60 | Haut (Kontrolle) |
| 109 | 2001 | 73 | Haut (Kontrolle) |

Die Gewebeproben wurden routinemäßig in Paraffin eingebettet. Die aus den Gewebeblöcken hergestellten Schnitte wurden nach HE, PAS und Elastica von Gieson gefärbt. Zusätzlich wurde bei allen Tumorproben eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis von S-100-Protein durchgeführt. Das Material wurde dann gemäß den WHO Kriterien von zwei Neuropathologen begutachtet. Aus den verbleibenden Paraffinpräparaten wurden vom Autor vier weitere 10µm-Gewebeschnitte hergestellt und eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis von Neurofilament, PGP 9.5, Dopamin-β-Hydroxylase und *Smooth-Muscle-Actin* durchgeführt.

## 3.7 Immunhistochemie

### 3.7.1 Vorbehandlung der Objektträger

Die Glasobjektträger SuperFrost Plus wurden vor der Verwendung für 5 Minuten in die vorbereitete Poly-L-Lysine-Lösung gestellt, für weitere 60 Minuten im Wärmeschrank bei 60°C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung staubfrei gelagert. Bei der Behandlung der Objektträger waren stets Handschuhe zu tragen, um eine unbeabsichtigte Fettauflagerung zu verhindern.

### 3.7.2 Herstellung der Gewebeschnitte

Von den Gewebeblöcken wurden, ohne die sonst übliche vorherige Kühlung auf Eis, jeweils vier 10µm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden in einem Warmwasserbad mit Aqua dest. bei 60°C gestreckt und auf die mit Poly-L-Lysin vorbehandelten Objektträger aufgezogen. Mit einer Gummiwalze erfolgte ein leichtes Andrücken. Nach dem Andrücken wurden die Gewebeschnitte für 120 Minuten im Wärmeschrank bei 60°C gelagert.

### 3.7.3 Immunhistochemische Doppelmarkierung für Neurofilament (NF) und *Smooth-Muscle-Actin* (SMA), Immunhistochemische Doppelmarkierung für Dopamine-ß-Hydroxylase (DBH) und *Smooth-Muscle-Actin* (SMA)

Das nachfolgende Färbeprotokoll für den Nachweis von Neurofilament, Dopamine-ß-Hydroxylase und SMA wurde von Hand über drei Tage an den vorbereiteten 10µm dicken Gewebeschnitten durchgeführt. Alle Lösungen und Reagenzien wurden jeweils frisch angesetzt und zeitnah verbraucht. Die insgesamt 77 Schnitte wurden in 5 Färbedurchläufe aufgeteilt (1. Durchlauf: 18 Fälle, 2. Durchlauf: 19 Fälle, 3. Durchlauf: 19 Fälle, 4. Durchlauf: 19 Fälle, 5. Durchlauf: 2 Fälle). Bei jedem Färbedurchlauf wurden zwei Positivkontrollen (Nervenbiopsie) durchgeführt.

**Tabelle 10: Protokoll für die immunhistochemische Doppel-Markierung mit NF und SMA an 10µm Gewebeschnitten**

| | |
|---|---|
| Entparaffinierung: | 120 Minuten bei 65° C im Wärmeschrank und weitere 8 Stunden in Xylol |
| Rehydratation und Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität | 100% Ethanol für 5 Minuten,<br>3% $H_2O_2$ für 90 Minuten,<br>absteigende Ethanolreihe 100%, 100%, 96%, 96%, 80%, 70%, 50% für jeweils 2 Minuten, Aqua dest. für 2 Minuten |
| Antigendemaskierung (Antigen-Retrieval) | Inkubation der Gewebeschnitte für 90 Minuten<br>in Citratpuffer (pH 6,0) bei 85°C bei geschlossener Küvette im Wasserbad,<br>Gewebeschnitte in Citratpuffer etwa 45 Minuten lang auf Raumtemperatur abkühlen lassen |
| Spülen | Spülen der Gewebeschnitte in TBS+Triton Pufferlösung<br>3 x 5 Minuten |
| Umrandung | Abtrocknen der Glasfläche um das Gewebe herum,<br>Auftragen einer flüssigkeitsabweisenden Barriere um die Gewebeschnitte mit einem Dako Pen, Trocknen für 1 Minute |
| Proteinblockierung | 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 10% Ziegenserum in TBS-Puffer blockieren |

| | |
|---|---|
| Primärantikörper-Inkubation (1. Primär-Antikörper) | Ziegenserum abtropfen lassen,<br>Inkubation mit 200 µL verdünnter Antikörperlösung<br>(NF, 1:400 in Antibody Diluent und Ziegenserum 10%)<br>(DBH, 1:100 in Antibody Diluent und Ziegenserum 10%)<br>für 18 Stunden bei Raumtemperatur in feuchter Kammer |
| Spülen | Spülen der Gewebeschnitte in frischem TBS+Triton-Puffer<br>für 3 x 10 Minuten unter kontinuierlicher Flüssigkeitsumströmung |
| Sekundärantikörper-Inkubation | Inkubation der Gewebeschnitte mit Histofine-Sekundärantikörper (Simple Stain MAX PO-Multi)<br>für 3 Stunden bei Raumtemperatur |
| Spülen | Spülen der Gewebeschnitte in frischem TBS+Triton-Puffer<br>für 3 x 10 Minuten unter kontinuierlicher Flüssigkeitsumströmung |
| Chromogen-Entwicklung | Inkubation der Gewebeschnitte mit frischer<br>3´3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) für 15 Minuten |
| Spülen | Spülen der Gewebeschnitte in frischem TBS+Triton-Puffer<br>für 3 x 10 Minuten unter kontinuierlicher Flüssigkeitsumströmung |
| Primärantikörper-Inkubation (2. Primär-Antikörper) | Inkubation mit 200 µL verdünnter Antikörperlösung<br>(SMA, 1:2.000 in Antibody Diluent und Ziegenserum 10%)<br>für 18 Stunden bei Raumtemperatur in feuchter Kammer |
| Spülen | Spülen der Gewebeschnitte in frischem TBS+Triton-Puffer<br>für 3 x 10 Minuten unter kontinuierlicher Flüssigkeitsumströmung |
| Sekundärantikörper-Inkubation | Inkubation der Gewebeschnitte mit Histofine-Sekundärantikörper (Simple Stain AP-Multi)<br>für 3 Stunden bei Raumtemperatur |
| Spülen | Spülen der Gewebeschnitte in frischem TBS+Triton-Puffer<br>für 3 x 10 Minuten unter kontinuierlicher Flüssigkeitsumströmung |

| | |
|---|---|
| Chromogen-Entwicklung | Inkubation der Gewebeschnitte mit frischer Fast-Red Chromogen Lösung für 15 Minuten |
| Spülen | Spülen der Gewebeschnitte in frischem TBS+Triton-Puffer für 3 x 10 Minuten unter kontinuierlicher Flüssigkeitsumströmung |
| Eindecken | Eindecken der doppelgefärbten Gewebeschnitte mit wässrigem Eindeckmedium und Trocknen bei Raumtemperatur |

### 3.7.4 Immunhistochemische Doppelmarkierung für Protein gene product 9.5 (PGP) und *Smooth-Muscle-Actin* (SMA)

Die Doppelfärbung der 10µm-Gewebeschnitte mit PGP 9.5 und SMA wurde mit einem vollautomatischen Färbeautomaten (BenchMark XT, Ventana Medical Systems) durchgeführt. Dieser führte alle notwendigen Schritte an bis zu 30 Objektträgern in einem Lauf durch. Insgesamt wurden drei Färbedurchläufe durchgeführt. Um trotz der etwas größeren Schnittdicke (10µm) ein ausreichendes Färbeergebnis zu erhalten, wurden die Gewebeschnitte vor der Behandlung mit dem Färbeautomaten über 8 Stunden in Xylol entparaffiniert und für weitere 2 Stunden in 3%-Wasserstoffperoxid inkubiert. Nach Rehydratation in der Alkoholreihe übernahm der Färbeautomat alle weiteren erforderlichen Schritte. Die von der Software festgelegten Behandlungsschritte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Nach Abschluss der aufgeführten Färbeschritte wurden die gefärbten Gewebeschnitte mit Aquatex® eingedeckt.

**Tabelle 11: Protokoll für die immunhistochemische Doppel-Markierung mit PGP und SMA an 10µm Gewebeschnitten im Färbeautomat BenchMark XT der Firma Ventana Medical Systems**

| | |
|---|---|
| Entparaffinierung: | Aufheizen des Objektträgers bis 75° C für 4 Minuten<br>Mehrere Waschschritte |
| Conditioning und Vorbehandlung: | Inkubation mit Conditioner für 8 Minuten<br>Aufheizen des Objektträgers bis 95° C<br>Inkubation mit Conditioner für 30 Minuten<br>Aufheizen des Objektträgers bis 100° C<br>Inkubation mit Conditioner für 60 Minuten |
| Spülen: | Spülen mit Reaktionspuffer |
| Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität: | Aufheizen des Objektträgers bis 37° C<br>Spülen mit Reaktionspuffer<br>Inkubation mit UV-Inhibitor für 4 Minuten<br>Spülen mit Reaktionspuffer |
| Primärantikörper-Inkubation:<br>(1. Primär-Antikörper) | Inkubation mit Primärantikörper für 48 Minuten bei 37° C<br>(PGP 9.5, 1:200 in Antibody Diluent und Ziegenserum 10%) |
| Spülen: | Spülen mit Reaktionspuffer |

| | |
|---|---|
| Sekundärantikörper-Inkubation: | Inkubation mit UV HRP UNIV MULT für 8 Minuten bei 37° C |
| Spülen: | Spülen mit Reaktionspuffer |
| Chromogen-Entwicklung | Inkubation mit UV DAB und UV DAB $H_2O_2$ für 8 Minuten |
| Spülen: | Spülen mit Reaktionspuffer |
| Verstärken: | Inkubation mit UV COPPER für 4 Minuten |
| Spülen: | Spülen mit Reaktionspuffer |
| Denaturierung: | Aufheizen des Objektträgers auf bis 95° C für 12 Minuten |
| Spülen: | Doppeltes Spülen mit Reaktionspuffer<br>(Option mit TBS-Puffer) |
| Primärantikörper-Inkubation<br>(2. Primär-Antikörper) | Inkubation mit Primärantikörper für 32 Minuten bei 37° C<br>(SMA, 1:2.000 in Antibody Diluent und Ziegenserum 10%) |
| Spülen: | Spülen mit Reaktionspuffer |
| Sekundärantikörper-Inkubation: | Inkubation mit UV Red UNIV MULT für 12 Minuten |
| Spülen: | Spülen mit Reaktionspuffer |
| Chromogen-Entwicklung: | Inkubation mit UV Red Enhancer für 4 Minuten<br>Inkubation mit UV Fast Red A und UV Red Naphtol für 4 Minuten<br>Inkubation mit UV Fast Red B für 8 Minuten |
| Spülen: | Spülen mit Reaktionspuffer |

## 3.8 Evaluationen

### 3.8.1 Semiquantitative Evaluation der Antikörperfärbung

Die doppelmarkierten Gewebeschnitte wurden direkt nach dem Färbedurchlauf semiquantitativ ausgewertet. Die Färbung mit Neurofilament (NF), Protein gene product-9.5 (PGP) und *Smooth-Muscle-Actin* (SMA) wurde folgendermaßen beurteilt:

0 – Keine sichtbare Anfärbung

1 – nur leichte oder schwache Anfärbung

2 – starke und kräftige Anfärbung der Zellen

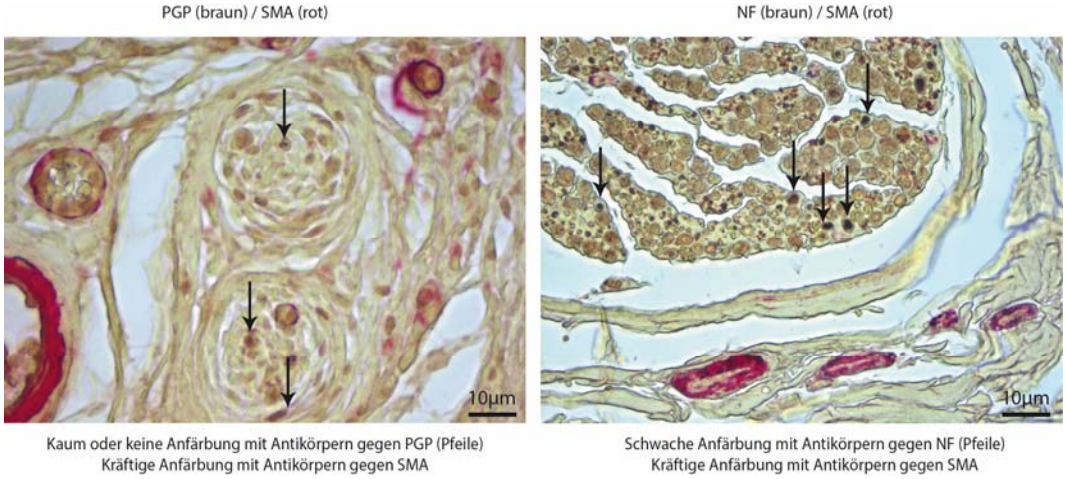


**Abbildung 8: Beispiele für schwache Anfärbungen in der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen NF, SMA und PGP 9.5 (Pfeile)**

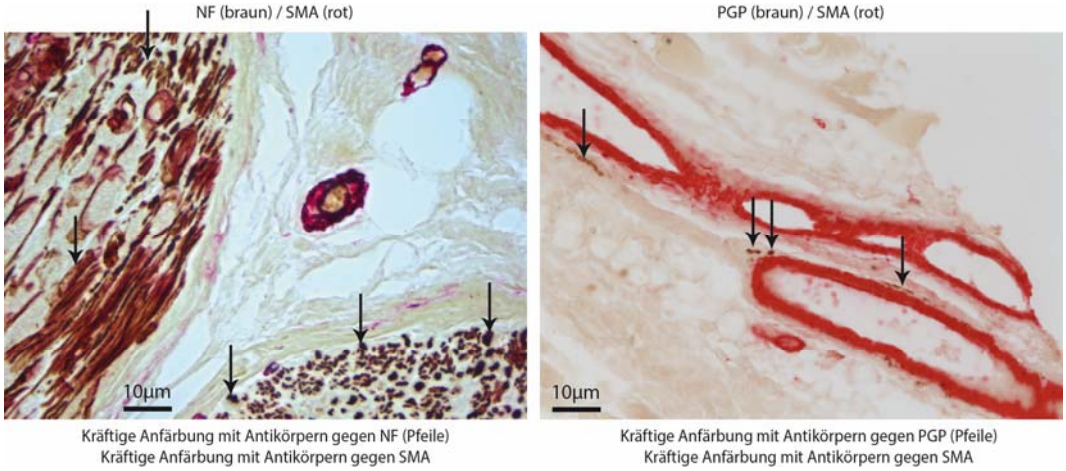


**Abbildung 9: Beispiele für kräftige Anfärbungen in der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen NF, SMA und PGP 9.5 (Pfeile)**

### 3.8.2 Nervenfaserdichte (NFD) und Gefäßdichte (GD)

Für die Ermittlung der Nervenfaserdichte wurden die mit *Smooth-Muscle-Actin* und Neurofilament doppelmarkierten Gewebeschnitte in jeweils gleicher Weise mit der Beschriftung nach links auf dem elektromechanischen Objekttisch des StereoInvestigator Lichtmikroskops eingespannt. Die Grundeinstellungen (Lichtintensität, Farbfilter) wurden für alle Messungen einheitlich gewählt. Mit dem 5x-Objektiv (EC Plan NeoFluar) wurde gemäß dem Messalgorithmus der Software StereoInvestigator Version 10.30 das gesamte Tumorareal umfahren und ein Auswerterahmen von 500x250 Pixel eingestellt. Nachfolgend wurde das gesamte digital markierte Tumorareal vollautomatisch abgefahren und in jedem von der Software festgelegten Auswerterahmen wurden am Monitor Digitalmarkierungen für Gefäße (rot) und Nervenfasern (gelb) gesetzt. Markiert wurden nur quer getroffene Gefäße und Nerven. Große Nervenfaszikel, die sich aus mehreren Axonen zusammensetzen, wurden 1-fach markiert.

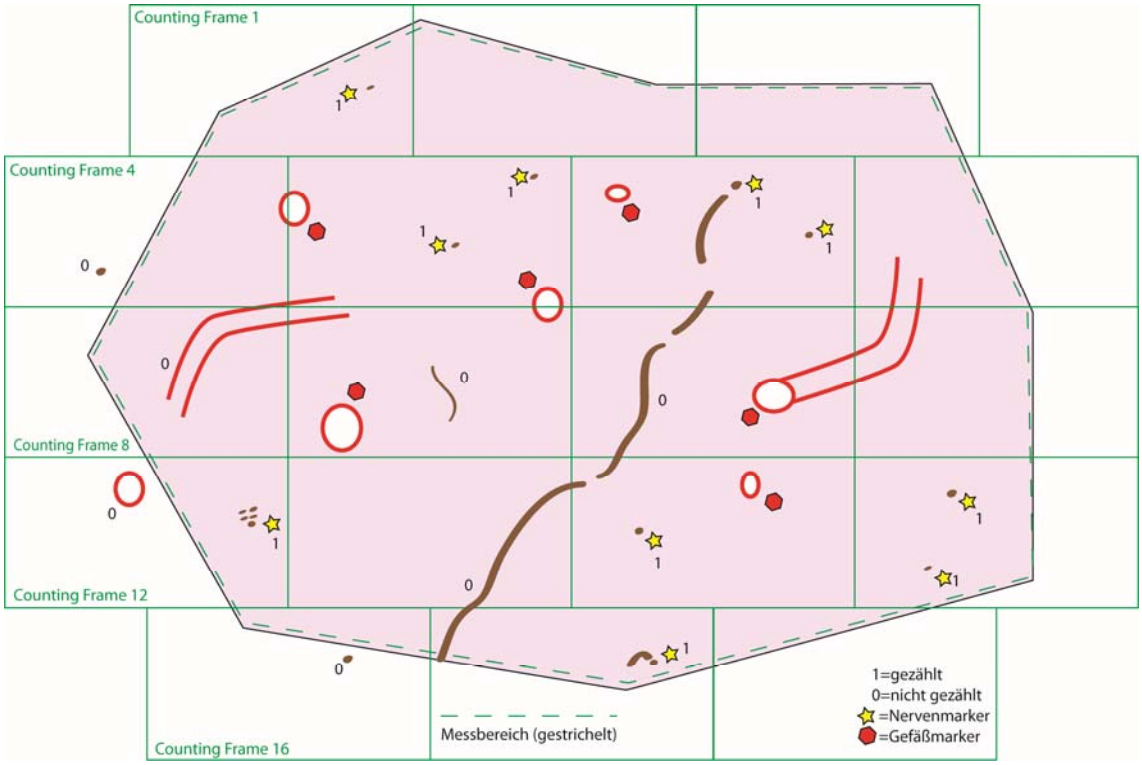


**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Auswertung mit der Software StereoInvestigator**

Das Protokoll der Messung ergab neben der Messfläche in µm² auch die Anzahl der gesetzten Marker für Nervenfasern und Gefäße. Die Anzahl der Nervenfasern bzw.

der Gefäße geteilt durch die Messfläche in mm² ergab die Nervenfaser- bzw. Gefäß-dichte.

Die nachfolgende Abbildung 11 zeigt die Verteilung der quer getroffenen Gefäße (rot markiert, n=814) und Nervenfasern (gelb markiert, n=102) in einem Neurofibrom mit 6,57mm² Messfläche.

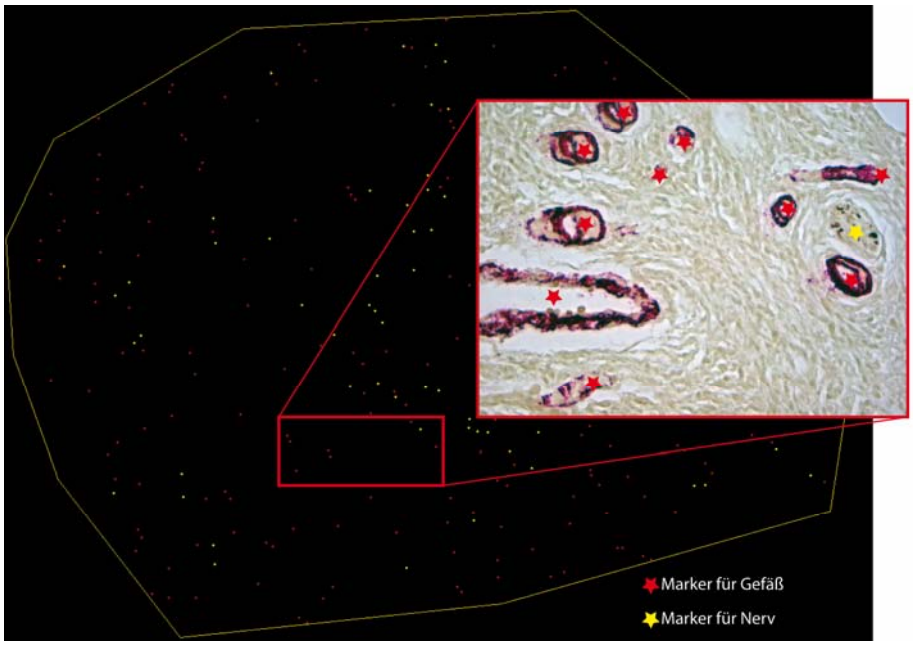


**Abbildung 11: Übersichtsdarstellung (MakroView) der Software StereoInvestigator 10.30 nach Auswertung eines zuvor festgelegten Areals. 102 Nervenfasern (gelb) und 814 Gefäße (rot). Gesamtfläche innerhalb der gelben Linie (Total Area): 6,57mm². E0040-2006; Anfärbung mit Antikörpern gegen glattmuskuläres Aktin (SMA) für Gefäße und mit Antikörpern gegen Neurofilament (NF) für Nervenfasern**

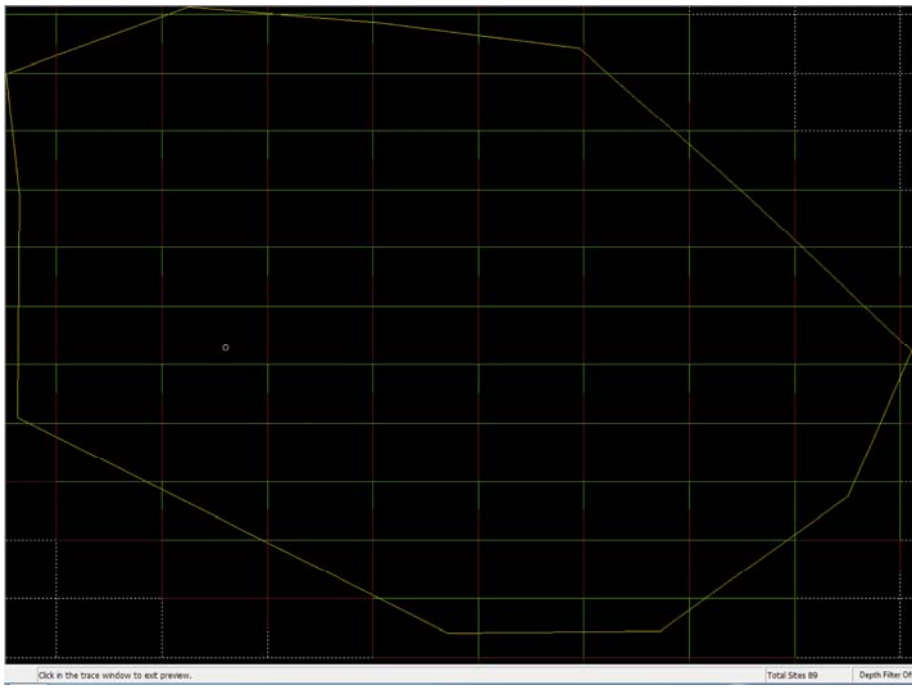


**Abbildung 12: Darstellung der von der Software erstellten Messareale (Counting Frames je 500x250) zur schrittweisen Auswertung des gesamten Tumorareals (gelbe Linie). Gezählt wurden nur Gefäße und Nervenfasern innerhalb der gelben Linie. Total Area: 7,51mm² in 89 Counting Frames. E1115-2007.**

### 3.8.4 Relative Innervation der Gefäße mit glatter Gefäßmuskulatur

Zur Ermittlung der relativen Gefäßinnervation wurden die Gewebeschnitte bei 400-facher Vergrößerung an einem Lichtmikroskop (Carl Zeiss Axiovert S-100) begutachtet. Beginnend mit dem linken oberen Rand wurde der ganze Gewebeschnitt von Gesichtsfeld zu Gesichtsfeld mäandert. In jedem Gesichtsfeld wurden die Anzahl der mit *Smooth-Muscle-Actin* (SMA) angefärbten Gefäße ohne perivaskulären Nerv sowie die Anzahl der Gefäße, in deren direkter Nähe sich ein mit PGP-9.5 angefärbter Nerv befand, ausgezählt. Hierbei wurden nur quer getroffene Gefäße mitgezählt. Ein Gefäß wurde nur dann als innerviert gezählt, wenn sich der Nerv in einer Distanz von maximal 5µm zur glatten Muskelzelle des Gefäßes befand. Die Anzahl der innervierten Gefäße geteilt durch die Anzahl der Gefäße insgesamt ergab die relative Gefäßinnervation in % (PVNFD = n innerviert / n absolut). In die Auswertung sollten möglichst alle Gefäße im Tumorareal eingehen, wobei maximal 246 Gefäße in einem Fall (ID 36) ausgewertet wurden.

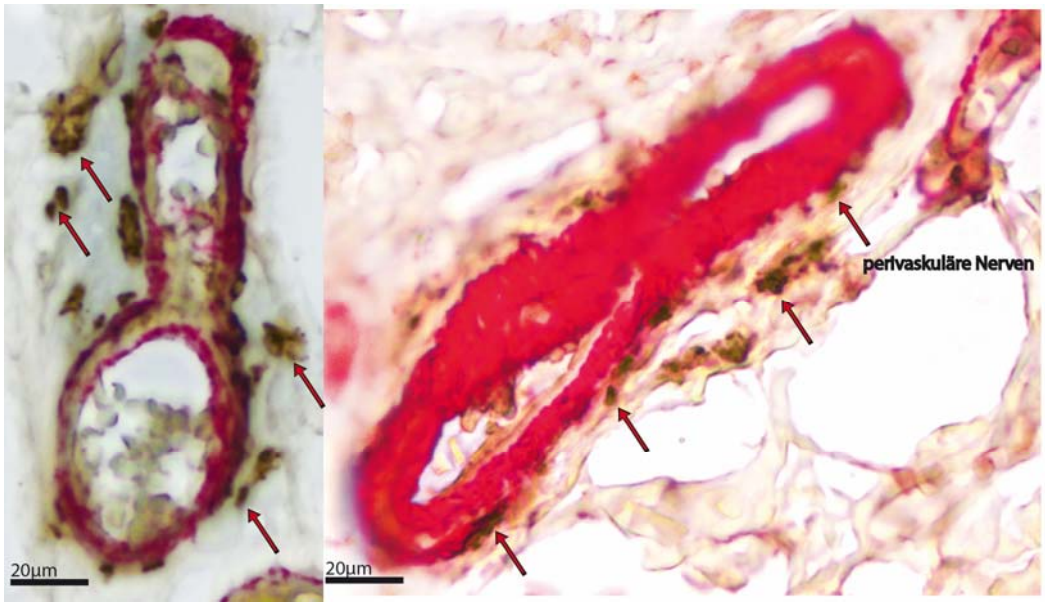


**Abbildung 13: Doppelmarkierung mit PGP-9.5 (braun) und *Smooth-Muscle-Actin* (rot), 400-fache Vergrößerung. Gezählt wurden alle quer getroffenen Gefäße und Nervenfasern in maximal 5 Mikrometern Distanz zum Gefäß. Beide dargestellten Gefäße sind innerviert.**

## 3.9 Datenerfassung und statistische Auswertungen

### 3.9.1 Datenerfassung und statistische Auswertungen

Die durch die vorbeschriebenen Methoden erfassten Rohdaten für Messfläche, Nervenanzahl pro Messfläche, Gefäßanzahl pro Messfläche, Anzahl ausgewerteter Einzelgefäße und Anzahl innervierter Einzelgefäße wurden zusammen mit der anonymisierten Fallnummer, dem Patientenalter und dem Gewebetyp (*1: Kutanes Neurofibrom, 2: Plexiform-diffuses Neurofibrom, 3: Plexiform-noduläres Neurofibrom, 6: Atypisches Neurofibrom, 21: Haut*) in einer gemeinsamen MS-Excel 2010-Datentabelle erfasst.
Die Daten wurden anschließend mit der Software IBM® SPSS® Statistics 21 ausgewertet.
Die Nervenfaserdichte, die Gefäßdichte sowie die perivaskuläre Innervation wurden von der Statistiksoftware anhand der Rohdaten errechnet.
Anhand des T-Tests für unabhängige Stichproben und einer einfaktoriellen ANOVA wurden die gruppenspezifischen Mittelwerte untereinander verglichen.

# 4. Ergebnisse

## 4.1 Methodische Vorarbeiten

Bei der Auswahl der geeigneten Antikörper bzw. histologischen Färbung zur Darstellung der zu untersuchenden Zellstrukturen standen zahlreiche, teilweise bereits in der Routine verwendete, immunhistochemische Marker zur Verfügung. Untersucht werden sollten vor allem die kleineren Widerstandsgefäße mit glatter Muskulatur, also Arteriolen mit einem luminalen Durchmesser von ca. 5-15µm (Junqueira et al., 2005) und die kleinsten perivaskulär verlaufenden sympathischen Nervenfasern.

### 4.1.1 Auswahl der histologischen und immunhistochemischen Verfahren

#### 4.1.1.1 Gefäßdarstellung

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die ausgetesteten Färbungen zur Darstellung von Gefäßen.

**Tabelle 3: Ausgetestete Färbungen und Antikörper zur Darstellung von Gefäßen. Zytosol/Membran: Ort der Zielstrukturen des Antikörpers. +++: starke Anfärbung. (-): keine Anfärbung.**

| | IHC oder Histo | Arterien | Zytosol / Membran | Anfärbung anderer Strukturen Sonstiges |
|---|---|---|---|---|
| **SMA (1A4)** | IHC | **+++** | (+++) / (+) | Drüsengänge, quergestreifte Muskulatur |
| CD34 (QBEnd10) | IHC | + | (-) / (++) | **Kapillaren**, **Venen**, verschiedene Tumore, **Lymphgefäße**, Lymphome |
| CD31 (JC70A) | IHC | ++ | (+) / (+++) | Endothel, Megakaryozyten, Plasmazellen, teilweise **Nervenscheidentumore** |
| Faktor VIII | IHC | ++ | kleine/große Gefäße, **Lymphgefäße**, Kapillaren, **Fibroblasten**, **teilw. Tumorgewebe** | |
| van Gieson | Histo | +++ | Zellkerne (schwarzbraun), Zytoplasma (gelbbraun), kollagenfaseriges Bindegewebe (rot), bemarkte Nervenfasern | |

Beim Vergleich der fünf Färbungen stellte sich der Antikörper gegen das glattmuskuläre α-Actin (SMA) aufgrund seiner hohen Spezifität bei der Anfärbung der Gefäßmuskulatur als beste Wahl heraus. Mit SMA wurden im Gegensatz zu CD34 und Elastica van Gieson weder die Lymphgefäße noch das kapilläre Gefäßbett angefärbt, was die Identifikation und Auswertung der Widerstandsgefäße deutlich erleichtert hat.

Die von Faktor VIII-Antikörpern und CD34-Antikörpern teilweise angefärbten Lymphgefäße wurden bei der Färbung mit Antikörpern gegen das glattmuskuläre α-Actin (SMA) nicht angefärbt. Im Gewebe vorhandenes Drüsengewebe, vor allem Myoepithelzellen in unverzweigten tubulären Schweißdrüsen, wurde durch den Antikörper gegen das glattmuskuläre Actin ebenso angefärbt, wie die angeschnittene glatte Muskulatur der Musculi arrector pili. Diese angefärbten Strukturen waren jedoch am Mikroskop gut von den zu untersuchenden Gefäßen abzugrenzen. Die untenstehende Abbildung zeigt beispielhaft die Anfärbung einer Hautdrüse sowie einen Muskel im Querschnitt.

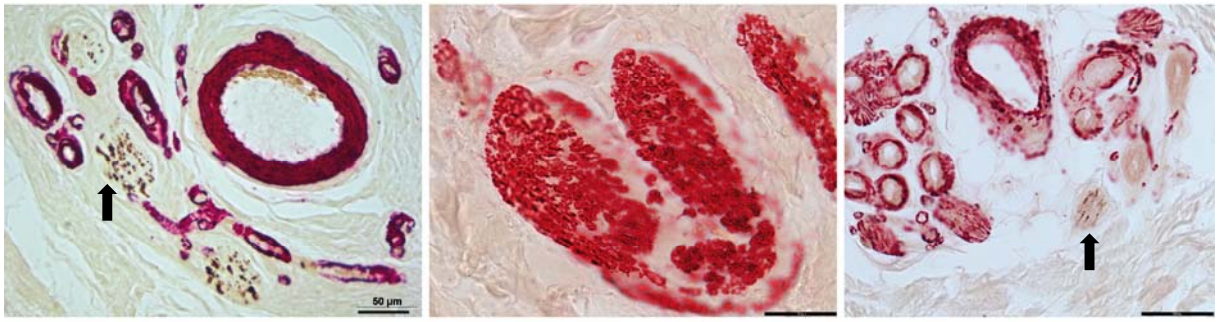


**Abbildung 14: Anfärbung von mehreren quer getroffenen Gefäßen (links) einer sogenannten „Knäueldrüse“ mit den zahlreichen quer getroffenen Drüsenausführungsgängen (rechts) und eines quer getroffenen Haarmuskels (mittig) mit Antikörpern gegen glattmuskuläres Actin. Auf dem linken und rechten Bild auch ein angeschnittener Neurofilament-positiver Nerv (braun, Pfeil).**

Aufgrund der CD31-Expression verschiedener Nervenscheidentumoren war eine korrekte Auswertung der Gefäße mit dem Antikörper gegen CD31 nicht möglich. Der teilweise deutliche Hintergrund erschwerte die Abgrenzung der Gefäße von der Tumormasse und machte die Identifikation von perivaskulären Nervenfasern unmöglich.

#### 4.1.1.2 Nervenfaserdarstellung

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die ausgetesteten Antikörper zum Nachweis von Nervenstrukturen.

**Tabelle 4: Immunhistochemische Antikörper zur Darstellung von Nervenstrukturen und deren Darstellung von verschiedenen Nervenkalibern und kleinen perivaskulären Fasern.**

| | **große Nerven** | **kleine Nerven** | **perivaskuläre Nerven** | **Anfärbung anderer Strukturen** |
|---|---|---|---|---|
| **NF** (2F11) | +++ (70kDa) | + | **-** | Zytosol; zentrale und periphere Neurone/Axone, Merkel-Zell-Karzinome, |
| **PGP 9.5** (Fraktion) | +++ | ++ | ++ | Zytosol; Hirngewebe, Pankreasinselzellen, Nervengewebe, neuroendokrine Zellen, Karzinoide, **Schwannome und verschiedene Nervenscheidentumore** |
| DBH (Fraktion) | - | + | ++ | chromaffine Noradrenalin-produzierende Zellen im Nebennierenmark, Phäochromozytom |

Eine Anfärbung von größeren sowie kleineren, isoliert oder in der Nähe von Gefäßen verlaufenden, Nervenfasern erfolgte mit Neurofilament-Antikörpern, die jedoch keine perivaskulären Fasern darstellten.

Bei der Darstellung der perivaskulären Nervenfasern zeigte sowohl der Antikörper gegen das Protein gene product 9.5 als auch der Antikörper gegen Dopamin-β-Hydroxylase eine Reaktion. Wie vermutet, färbte der Antikörper gegen DBH nur die noradrenergen sympathischen Axone in direkter Nähe zur glatten Gefäßmuskulatur an. Der Antikörper gegen das PGP 9.5 färbte darüber hinaus auch die weiteren Nervenmodalitäten direkt perivaskulär und innerhalb der größeren Nerven kräftig an.

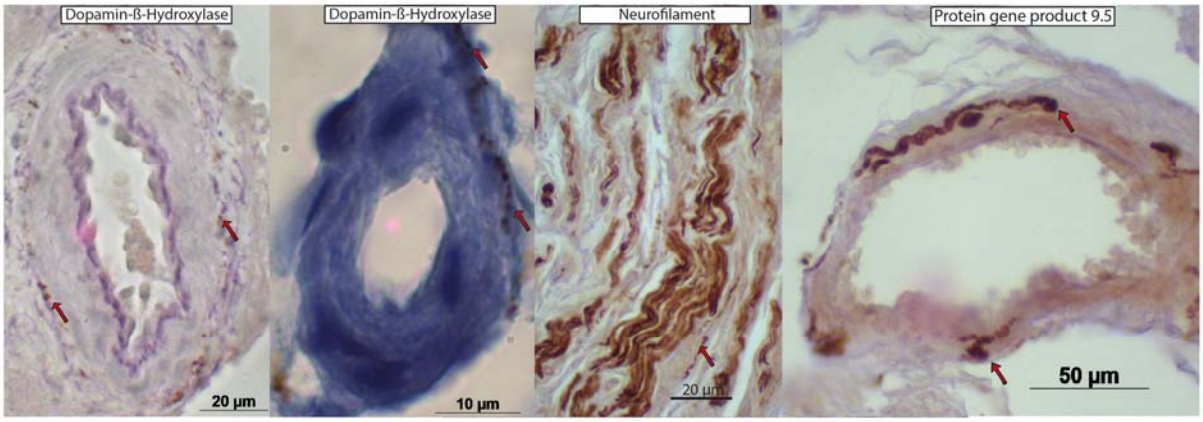


**Abbildung 15: Markierung von Nervenfasern mit verschiedenen Antikörpern. Bei der Anfärbung mit Antikörpern gegen Neurofilament sind nur größere Nervenfaserbündel markiert worden. Besonders kräftige Anfärbungen der perivaskulären Fasern mit PGP 9.5 (Bild rechts). Rote Pfeile: Nervenfasern.**

Aufgrund der hohen Spezifität des Antikörpers gegen DBH fiel die Wahl zunächst auf diesen Antikörper.

Die Hitzevorbehandlung zur Antigendemaskierung, die für den Antikörper gegen Dopamin-β-Hydroxylase notwendig war, ließ jedoch einen großen Prozentsatz der Gewebeschnitte von den Objektträgern abschwimmen und machte letztlich die Suche nach einem anderen Antikörper erforderlich. Hierbei fiel die Wahl auf den Antikörper gegen PGP 9.5, der stets eine kräftige Anfärbung der großen Nerven und der direkt perivaskulär verlaufenden Nervenfasern zeigte.

### 4.1.2 Auswahl der geeigneten Gewebeschnittdicke der Paraffinpräparate

Bei der Suche nach einer geeigneten Gewebeschnittdicke wurden mehrere Schnittdicken (4µm, 10µm, 20µm, 50µm) an gesunder Haut sowie an kutanen Neurofibromen ausgetestet. Bis auf den Antikörper gegen DBH, gab es für alle verwendeten Antikörper im Institut für Neuropathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bereits etablierte Verfahren für die Markierung an 4µm-Dünnschnitten. Diese wurden zunächst ohne Anpassung an die Schnittdicke getestet.

**Tabelle 5: Versuche mit unterschiedlichen Schnittdicken bei der Anfärbung mit Antikörpern gegen NF, SMA, PGP 9.5 und DBH**

| Schnitt-dicke | Abschwimmen | Hinter-grund | Dicke | Eindringtiefe | |
|---|---|---|---|---|---|
| 4µm | - | - | 2µm | 100% | Standard, gutes Resultat, perivaskuläre Fasern nur selten zu finden |
| 10µm | + | ++ | 6µm | 80% | mittleres Resultat, Eindringtiefe nicht optimal, Fasern gut zu erkennen |
| 20µm | +++ | +++ | 14µm | 40% | nur oberste Schicht gefärbt, deutlicher Hintergrund, Artefakte |
| 50µm | +++ | +++ | 34µm | 20% | nur oberste Schicht gefärbt, deutlicher Hintergrund, Artefakte |

10µm-Gewebeschnitte stellten den besten Kompromiss aus kräftiger Anfärbung über alle Eindringtiefen bei noch tolerierbarer Hintergrundfärbung und seltenem Abschwimmen der Gewebeschnitte dar.

Insbesondere bei Schnittdicken ab 20µm schwammen die Gewebeschnitte bereits bei der Vorbehandlung von den Objektträgern ab. Deshalb wurde die Objektträgervorbehandlung und die Hitzevorbehandlung der Präparate modifiziert (siehe Kapitel 3.3.1 Austestung und Etablierung einer geeigneten Methode zur Vorbehandlung). Bei den 4µm-Schnitten zeigte sich insbesondere bei den Färbungen mit Antikörpern gegen DBH, dass nur selten die perivaskulären Varikositäten angeschnitten und angefärbt wurden. Bei Schnittdicken von 10µm waren diese mit Antikörpern gegen DBH und

PGP 9.5 regelrecht angefärbt. Bei Schnittdicken von 10µm, 20µm und 50µm war eine nicht mehr ausreichende Anfärbung der Gewebestrukturen in tieferen Schichten zu erkennen. Zur Messung der postprozeduralen Gewebeschnittdicke wurde die Distanz zwischen der oberflächlichsten und der tiefsten erkennbaren Zelle ermittelt. Der elektromechanische Objekttisch ermöglicht hierfür die Messung in 1µm-Schritten. Anhand eines quergetroffenen Nerven konnte die Eindringtiefe bis zum Abbrechen der Anfärbung nachverfolgt werden. Bei den 50µm-Dickschnitten wurde eine Gewebedicke nach der vollständigen Färbung von ca. 34µm gemessen, wobei nur etwa 20% (ca. 7µm) der gesamten Schnitttiefe angefärbt waren. Die 20µm und 50µm messenden Schnitte schwammen in bis zu 80% der Fälle bereits bei der Vorbehandlung von den Objektträgern ab. Aufgrund der genannten Beobachtungen fiel die Wahl auf 10µm-Gewebeschnitte. Diese hatten nach der Färbung noch eine Dicke von etwa 6µm und ließen sich am Mikroskop trotz der leichten Hintergrundanfärbung gut auswerten.

### 4.1.3 Etablierung des immunhistochemischen Protokolls

Bei der Auswahl der geeigneten Gewebeschnittdicke zeigte sich, dass bereits bei der Vorbehandlung bis 6 von 10 der Gewebeschnitte bei 10µm-Gewebeschnitten vom Objektträger abschwammen. Für die Verbesserung der Gewebeanhaftung auf dem Objektträger wurden verschiedene Objektträger mit und ohne werksseitige Adhäsionsbeschichtung in Kombination mit verfügbaren Adhäsionsbeschichtungen zum nachträglichen Aufbringen ausgetestet. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Resultate dieser Austestung.

**Tabelle 6: Auflistung der ausgetesteten Kombinationen an 10µm-Gewebeschnitten. Anzahl abgeschwommener / Gesamtzahl der Gewebeschnitte**

| | SuperFrost Ultra Plus® | Roti®Bond Adhäsionsobjektträger | **SuperFrost Plus** | Standard-Objektträger |
|---|---|---|---|---|
| | elektrostatisch | elektrostatisch und chemisch | elektrostatisch | keine |
| ohne nachträgliche Beschichtung | 6/8 | 4/10% | 6/10 | 8/10 |
| mit Poly-L-Lysine pur | 5/10 | 5/10 | 5/10 | 5/10 |
| mit Poly-L-Lysine 1:10 | 3/10 | 3/10 | **3/10** | 4/10 |
| mit Silan | 3/10 | 3/10 | 4/10 | 5/10 |

Die besten Resultate wurden durch Aufbringen von 1:10 mit Aqua dest. verdünnter Poly-L-Lysine-Adhäsionsbeschichtung auf die SuperFrost Plus Objektträger. Hierbei schwammen nur noch ca. 30% der 10µm-Gewebeschnitte in der Mikrowellen-Vorbehandlung ab.

Mit den so ausgewählten Objektträgern in Kombination mit einer manuellen Poly-L-Lysine-Beschichtung vor der weiteren Verwendung wurden verschiedene verfügbare Methoden der Hitzevorbehandlung ausgetestet. Die bereits genannte Mikrowellenmethode wurde um die Hitzevorbehandlung mittels eines handelsüblichen Reiskochers,

der die von Citratpuffer umgebenen Gewebeschnitte für 45 Minuten auf 100° C erwärmte, erweitert. Darüber hinaus wurden vier weitere Arten Hitzevorbehandlung mit einem Wasserbad ausgetestet. Hierbei wurden die Gewebeschnitte, wie bei den anderen Verfahren, in einer mit Citratpuffer gefüllten Küvette, in ein vorgeheiztes Wasserbad gestellt und damit schonend auf die gewünschte Temperatur erwärmt. Nach Ablauf der vorgewählten Dauer wurden die Gewebeschnitte langsam wieder auf Raumtemperatur gekühlt und das Ergebnis begutachtet.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Resultate der Austestung an 10µm-Gewebeschnitten mit Antikörpern gegen NF, SMA, PGP 9.5 und DBH.

**Tabelle 7: Austestung verschiedener Hitzevorbehandlungen an 10µm-Gewebeschnitten**

| | **Mikro-welle 640W 20 Min.** | **Reisko-cher 100° C 45 Min.** | **Wasser-bad 70° C 45 Min.** | **Wasser-bad 80° C 45 Min.** | **Wasser-bad 99° C 45 Min.** | **Wasser-bad 99° C 60 Min.** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NF | +++ / 3/10 | +++ / 3/10 | ++ / 0/10 | **+++ /** 0/10 | +++ / 2/10 | +++ / |
| SMA | +++ / 3/10 | +++ / 3/10 | +++ / 0/10 | **+++ /** 0/10 | +++ / 2/10 | +++ / |
| PGP 9.5 | +++ / 3/10 | +++ / 3/10 | ++ / 0/10 | **+++ /** 0/10 | +++ / 2/10 | +++ / |
| DBH | +++ / 3/10 | +++ / 3/10 | - / 0/10 | - / 0/10 | + / 2/10 | **+++ /** 2/10 |

Kein Färbeergebnis: (-),
schwaches Färbeergebnis: (+), gutes Färbeergebnis: (+++),
Anzahl abgeschwommener / getestete Gewebeschnitte

Am wenigsten Gewebeschnitte schwammen bei der Erwärmung im Wasserbad auf 80° C für 45 Minuten von den Objektträgern ab, wobei gleichzeitig eine gute Markierung mit 3 der 4 getesteten Antikörper nachweisbar war.

## 4.2 Ergebnisse zur Nervenfaserdichte (NFD)

In die statistische Auswertung der ermittelten Daten zur Nervenfaserdichte (NFD) mit der Statistiksoftware IBM® SPSS® Statistics Version 21.0.0.0 64-Bit gingen 76 Fälle ein. Alle 76 Werte waren gültig. Die durchschnittlich ausgewertete Fläche betrug 5,176mm² (MEDIAN 4,561mm² STDDEV 3,391 SEMEAN 3,890 MIN 0,923mm² MAX 27,205mm²) in durchschnittlich 61 Counting Frames.

**Bericht IBM SPSS Statistics Version 21**

NFD in n/mm²

| Typ | Mittelwert | N | Standard-ab-weichung | Standardfehler des Mittelwertes | Median | Varianz |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Kutan | 15,7855 | 18 | 13,26711 | 3,12709 | 10,7384 | 176,016 |
| Plexiform-diffus | 11,9512 | 15 | 12,80216 | 3,30550 | 8,0059 | 163,895 |
| Plexiform-nodulär | 19,9925 | 14 | 26,29901 | 7,02871 | 8,8042 | 691,638 |
| Atypisch | 13,9183 | 16 | 11,19269 | 2,79817 | 10,5903 | 125,276 |
| Haut | 5,1370 | 13 | 3,76484 | 1,04418 | 5,0654 | 14,174 |
| Insgesamt | 13,5892 | 76 | 15,47423 | 1,77502 | 8,8042 | 239,452 |

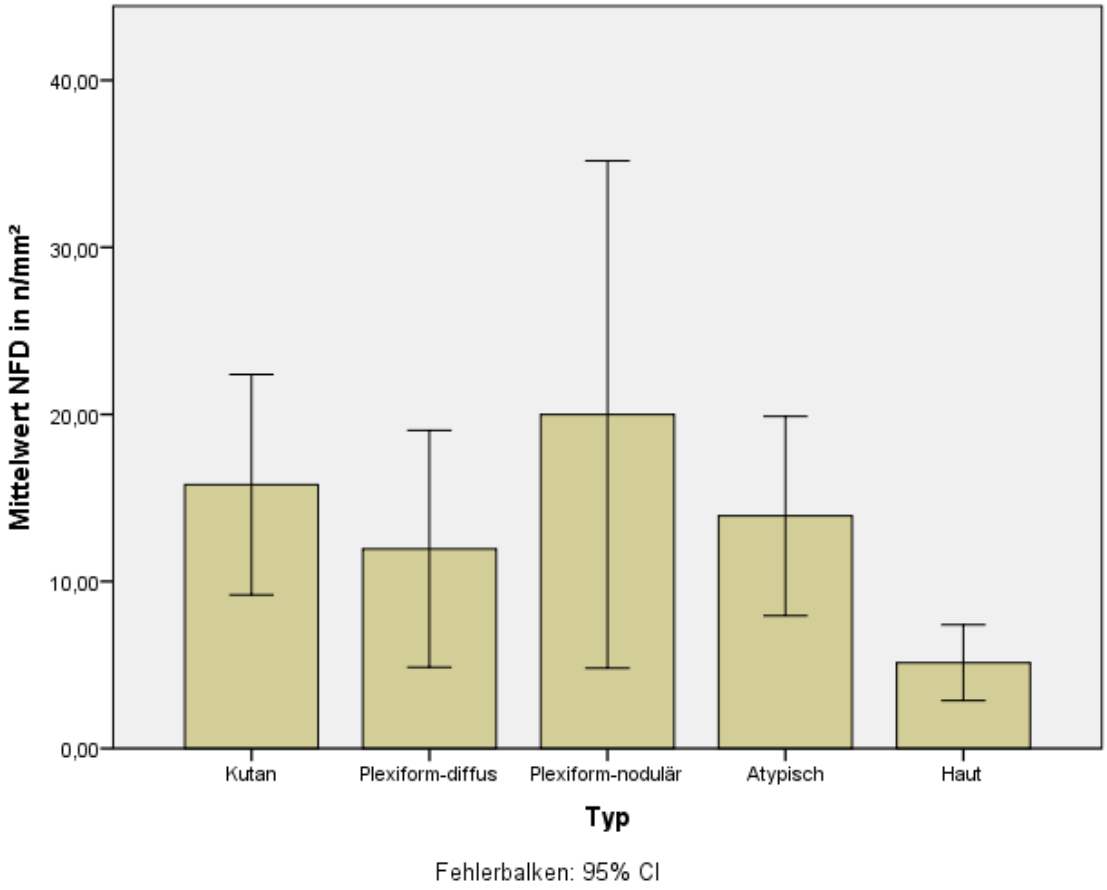


**Abbildung 16: Übersicht über die Mittelwerte der Nervenfaserdichte (NFD) in n/mm² nach Gruppen mit 95%-Konfidenzintervall; Färbungen mit Antikörpern gegen Neurofilament (NF)**

Mit durchschnittlich 19,99 Nervenfasern/mm² war die Nervenfaserdichte in den plexiform-nodulären Neurofibromen am höchsten. Die plexiform-diffusen Neurofibrome hatten eine mittlere Nervenfaserdichte von 11,95 Nervenfasern/mm². Die mittlere Nervenfaserdichte aller 29 plexiformen Neurofibrome betrug 15,83 Nervenfasern/mm². Am niedrigsten war die mittlere Nervenfaserdichte bei den 13 Hautkontrollen mit 5,14 Nervenfasern/mm². Insgesamt betrug die mittlere Nervenfaserdichte bei allen 76 Fällen 13,59 Nervenfasern/mm².

Die Durchführung eines T-Tests bei unabhängigen Stichproben für die Mittelwerte der Nervenfaserdichte ergab eine signifikante (p=0,001) und relevante (95%-CI [-18,42208; -2,87489] Mittelwertabweichung der Hautkontrollen um -10,65 Nervenfasern/mm² gegenüber den kutanen Neurofibromen. Die übrigen Mittelwertvergleiche (T-Tests bei unabhängigen Stichproben, Einfaktorielle Anova) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

## 4.3 Ergebnisse zur Gefäßdichte (GD)

In die statistische Auswertung zur Gefäßdichte (GD) gingen dieselben 76 Fälle ein, wie zur Ermittlung der Nervenfaserdichte.

**Bericht IBM SPSS Statistics Version 21**

GD in n/mm²

| typ | Mittelwert | N | Standard-ab-weichung | Standardfehler des Mittelwertes | Median | Varianz |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Kutan | 59,3059 | 18 | 41,37840 | 9,75298 | 45,7853 | 1712,172 |
| Plexiform-diffus | 75,0508 | 15 | 35,22707 | 9,09559 | 76,0081 | 1240,946 |
| Plexiform-nodulär | 50,0262 | 14 | 26,61652 | 7,11356 | 46,1713 | 708,439 |
| Atypisch | 36,8798 | 16 | 16,86970 | 4,21743 | 36,2686 | 284,587 |
| Haut | 36,8682 | 13 | 16,25511 | 4,50836 | 33,7669 | 264,229 |
| Insgesamt | 52,1447 | 76 | 32,40325 | 3,71691 | 45,3725 | 1049,971 |

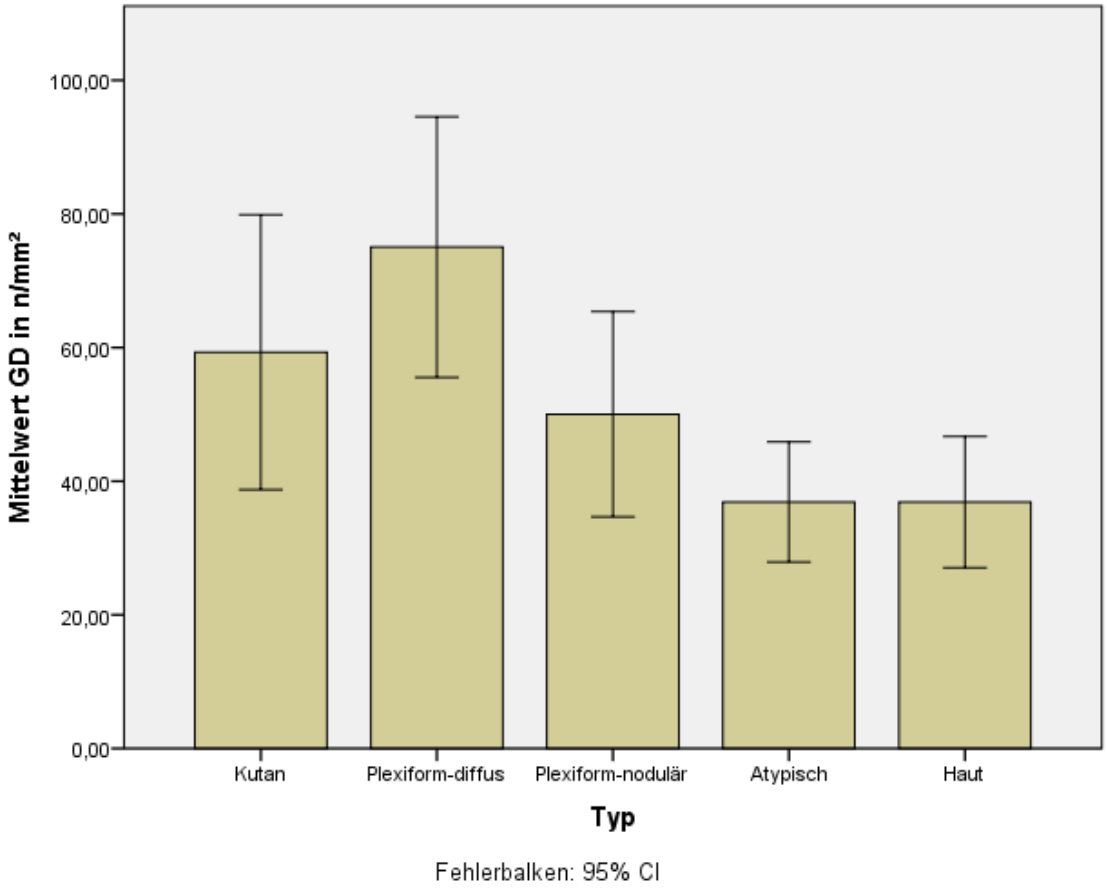


**Abbildung 17: Übersicht über die Mittelwerte der Gefäßdichte (GD) in n/mm² nach Gruppen mit 95%-Konfidenzintervall; Färbungen mit Antikörpern gegen glattmuskuläres Aktin (SMA)**

Mit durchschnittlich 75,05 Gefäßen/mm² war die Gefäßdichte bei den plexiform-diffusen Neurofibromen, gefolgt von den kutanen Neurofibromen (59,31 Gefäße/mm²) und den plexiform-nodulären Neurofibromen (50,03 Gefäße/mm²), am höchsten.

Die Durchführung einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) an den Daten zur Gefäßdichte ergab einen signifikanten (p=0,003) Unterschied zwischen den Gruppen. Die Durchführung einer Post-Hoc-Analyse mit dem Tukey HSD Test ergab für die mittlere Gefäßdichte eine signifikante und relevante Mittelwertdifferenz zwischen plexiform-diffusen Neurofibromen und atypischen Neurofibromen (p=0,006; 95%-CI [8,1737;68,1684]) sowie zwischen plexiform-diffusen Neurofibromen und den Hautkontrollen (p=0,010; 95%-CI [6,5547;69,8104]).

## 4.4 Ergebnisse zur relativen Gefäßinnervation (PVNFD)

Die statistische Auswertung zur relativen Gefäßinnervation (PVNFD) zeigte, dass durchschnittlich 129,12 Gefäße pro Fall ausgewertet wurden. Insgesamt gingen 9.813 Gefäße in die Berechnung ein, von denen insgesamt n=628 Gefäße innerviert waren.

**Bericht IBM SPSS Statistics Version 21**

PVNFD relativ (n innerviert / n absolut)

| typ | Mittelwert | N | Standard-abweichung | Standardfehler des Mittelwertes | Median | Varianz |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Kutan | ,0811 | 18 | ,10560 | ,02489 | ,0490 | ,011 |
| Plexiform-diffus | ,0471 | 15 | ,05487 | ,01417 | ,0288 | ,003 |
| Plexiform-nodulär | ,1081 | 14 | ,13797 | ,03687 | ,0597 | ,019 |
| Atypisch | ,0779 | 16 | ,06941 | ,01735 | ,0450 | ,005 |
| Haut | ,1324 | 13 | ,08091 | ,02244 | ,1200 | ,007 |
| Insgesamt | ,0875 | 76 | ,09584 | ,01099 | ,0591 | ,009 |

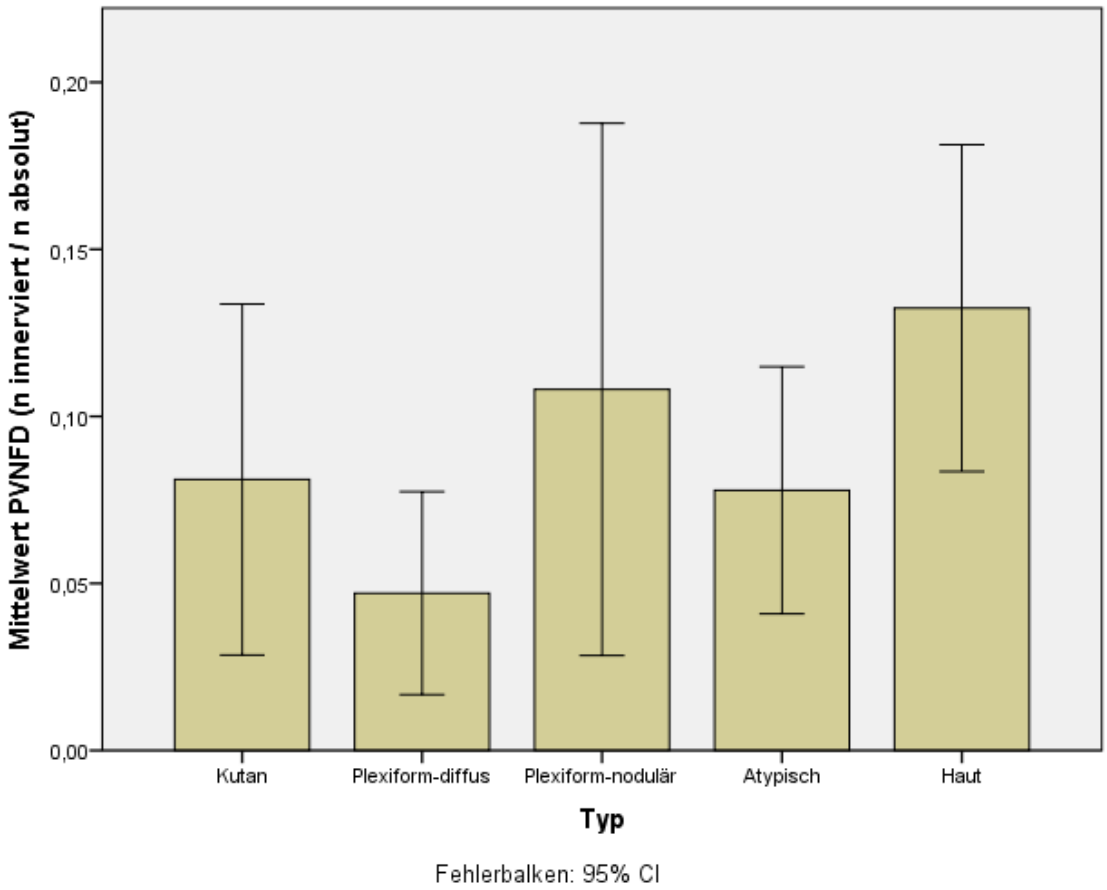


**Abbildung 18: Übersicht über die Mittelwerte der relativen Gefäßinnervation (PVNFD) nach Gruppen mit 95%-Konfidenzintervall; Färbungen mit Antikörpern gegen PGP9.5 und SMA**

Die durchschnittliche relative Gefäßinnervation bei allen 76 begutachteten Fällen betrug 0,0875. Das bedeutet, dass für jedes 12te der ausgewerteten Gefäße eine Nervenfaser im Bereich des Gefäßes in den 10µm dicken Schnitten gezeigt werden konnte. Die relative Gefäßinnervation der Hautkontrollen war mit 13,24% am höchsten und mit 4,71% bei den plexiform-diffusen Neurofibromen am niedrigsten.

Der Vergleich der Mittelwerte durch einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) und T-Tests für unabhängige Stichproben zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppen.

# 5. Diskussion

## 5.1 Nervenfaserdichte

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich unter anderem mit der Frage, ob das Tumorwachstum in Neurofibromen einen axonalen Untergang bedingt, welcher sich in einer erniedrigten Nervenfaserdichte (NFD) äußern würde. Die Art und Lokalisation der untersuchten formalinfixierten Gewebeproben machte ein Messverfahren notwendig, welches sich sowohl auf Hautbiopsien, als auch auf Tumor- und Nervenbiopsien ohne Epidermis anwenden ließ. Die in Kapitel 2.6.2 genannten Autoren ermittelten die sogenannte intraepidermale Nervenfaserdichte (IENF) anhand eines etablierten und standardisierten Verfahrens für Hautbiopsien. Bei diesem Messverfahren werden die ermittelten Werte in Nervenanzahl pro Millimeter ausgewerteter epidermaler Basalmembran angegeben und eignete sich daher für die hier bearbeitete Fragestellung nicht.

Nur wenige Autoren gaben die Nervenfaserdichte in Nervenfasern/mm² an. Eine Arbeit zum Thema der sogenannten Feuermale ergab zum Beispiel eine Nervenfaserdichte von 21,1 Nervenfasern/mm² an 17 gesunden Hautkontrollen (Smoller und Rosen, 1986).

Als mögliche Ursachen für die auffallend niedrigen Nervenfaserdichtewerte der gesunden Hautkontrollen in der vorliegenden Arbeit kommen verschiedene Erklärungen in Frage. Neben den bereits vorhandenen intra- und interindividuellen Schwankungen der Nervenfaserdichte, etwa durch gemessene Körperregion und Dermis-Schichttiefe, Patientenalter und Komorbiditäten, kommen auch Einflüsse der technischen Gewebeaufbereitung und Messmethodik in Frage. Die Lagerungszeit der formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcke unterschied sich teilweise deutlich voneinander, wobei eine mit der Zeit abnehmende immunhistochemische Anfärbbarkeit verschiedener Antigenstrukturen bekannt ist. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass die überwiegende Mehrheit der genannten Autoren zur Ermittlung der Nervenfaserdichte auf Antikörper gegen das panaxonale Protein gene product 9.5 (PGP9.5) zurückgriffen, welches unspezifisch auch Tumormaterial markiert. Der spezifischere Antikörper gegen das Neurofilament (NF-L, 70 kDa) findet zwar breite Anwendung in der

Routinediagnostik von Nerven, färbte aber beispielsweise nicht die kleinsten und perivaskulären Fasern an und konnte daher nicht verwendet werden. Es ist also zu vermuten, dass kleinste intraepidermale Fasern durch Antikörper gegen Neurofilament (NF-L, 70 kDa) nicht zur Darstellung kamen und daher nicht in die Messung eingingen. Aussagen über die prozentuale Verteilung der in die Messung eingehenden Sinnesmodalitäten (Parasympathikus, Sympathikus, Sensibilität) können mit den verwendeten Antikörpern nicht getroffen werden, da alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper die verschiedenen Modalitäten gleichermaßen anfärbten.

Auch wenn sich die ermittelten Werte nicht mit anderen Arbeiten vergleichen lassen, so ist der Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Gruppen untereinander und eine Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit jedoch möglich. Alle Gewebeproben wurden mit dem identischen Verfahren aufbereitet, angefärbt und ausgewertet und es ergab sich keine Reduktion der Nervenfaserdichte in Tumoren gegenüber tumorfreier Haut. Im Gegenteil, es zeigte sich eine niedrigere Nervenfaserdichte in den gesunden Hautkontrollen gegenüber den kutanen Neurofibromen. Dieses Ergebnis war zwar überraschend, jedoch vor dem Hintergrund der oben genannten Störfaktoren durchaus möglich.

Somit kann die Fragestellung der vorliegenden Arbeit dahingehend beantwortet werden, dass keine signifikante Abnahme der Nervenfaserdichte in den untersuchten Neurofibromen gegenüber den gesunden Hautkontrollen nachgewiesen werden konnte.

## 5.2 Gefäßdichte

Neben der Nervenfaserdichte, sollte die vorliegende Arbeit auch die Frage beantworten, ob in den untersuchten Neurofibromen, eine im Vergleich zu den gesunden Hautkontrollen erhöhte Gefäßdichte nachgewiesen werden kann. Zur Einordnung der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Gefäßdichtewerte wurden zunächst Vergleichswerte anderer Autoren recherchiert. Besondere Relevanz hat die Ermittlung der Gefäßdichte (*microvessel density*, MVD) vor allem bei der Bestimmung der Malignität von Tumoren, wie etwa dem Mammakarzinom. Die in der Literatur genannten Gefäßdichtewerte für gesundes und krankes Gewebe variieren teilweise erheblich. Hierbei scheinen sowohl interindividuelle Faktoren, wie etwa das Alter oder Komorbiditäten, eine ebenso große Rolle zu spielen, wie intraindividuelle Einflüsse. Rossi et al. erfassten die Gefäßdichte mit immunhistochemischen Antikörpern gegen den von-Willebrand-Faktor (vWF) an der gesunden Haut des Unterarms. Hierbei ergab die Auswertung der papillären Dermis mit 139,5 Gefäßen/mm² einen fast vierfach höheren Wert als in der retikulären Dermis mit 36,4 Gefäßen/mm² (Rossi et al., 2010). Bereits zwischen den unterschiedlichen dermalen Hautschichten des gleichen Individuum zeigen sich also große Unterschiede hinsichtlich der Gefäßdichte.
Andere Arbeiten mit Antikörpern gegen den endothelialen Marker CD31 oder mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung ergaben Gefäßdichtewerte von 21 Gefäßen/mm² (Tellechea et al., 2013) und 18,3 Gefäßen/mm² (Smoller und Rosen, 1986). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte liegen bei durchschnittlich 52,1 Gefäßen/mm² in allen 76 Gewebeproben, wobei die Gefäßdichte in den 13 gesunden Hautkontrollen mit 36,9 Gefäßen/mm² im Vergleich mit den untersuchten Neurofibromen am geringsten ist. Statistisch signifikant und relevant ist jedoch nur die Differenz der mittleren Gefäßdichte zwischen den plexiform-diffusen Neurofibromen (75,1 Gefäße/mm²) und den gesunden Hautkontrollen (36,9 Gefäße/mm²). Im Vergleich mit den ermittelten Gefäßdichtewerten einer anderen Arbeit aus dem Institut für Neuropathologie (Naber, 2012) fällt zunächst auf, dass die Gefäßdichtewerte der hier vorliegenden Arbeit deutlich höher ausgefallen sind. Der Autor der zuletzt genannten Arbeit gibt für normale Nervenbiopsien als Kontrollgruppe einen Gefäßdichtewert von 14 Gefäßen/mm² an. Die dort verwendeten Antikörper gegen CD34 wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht verwendet, sondern Antikörper gegen glattmuskuläres Aktin (SMA). Durch die hohe

Spezifität dieses Antikörpers war eine artifizielle Erfassung von Lymphgefäßen oder Kapillaren weitestgehend ausgeschlossen. Lediglich die Anfärbung von Drüsengängen oder anderen muskulären Strukturen bedingte die Gefahr einer falsch hohen Messung, wobei eine histomorphologische Abgrenzung dieser Strukturen zu den Gefäßen in der Regel gut möglich war. Eine randomisierte stichprobenartig wiederholte Messung der Gefäßdichte durch den Betreuer dieser Arbeit bestätigte die eingangs ermittelten Werte der vorliegenden Arbeit.

Trotz der auffallend unterschiedlichen Gefäßdichtewerte zeigte sich im Vergleich der untersuchten Gruppen untereinander jeweils die gleiche Tendenz, wie in der anderen Arbeit (Naber, 2012). So wiesen in der vorliegenden Arbeit, wie auch in der anderen Arbeit von Naber (Naber, 2012), die Hautkontrollen zusammen mit den atypischen Neurofibromen die geringste Gefäßdichte auf. Die plexiform-diffusen Neurofibrome hatten die höchsten Gefäßdichtewerte, gefolgt von den plexiform-nodulären Neurofibromen.

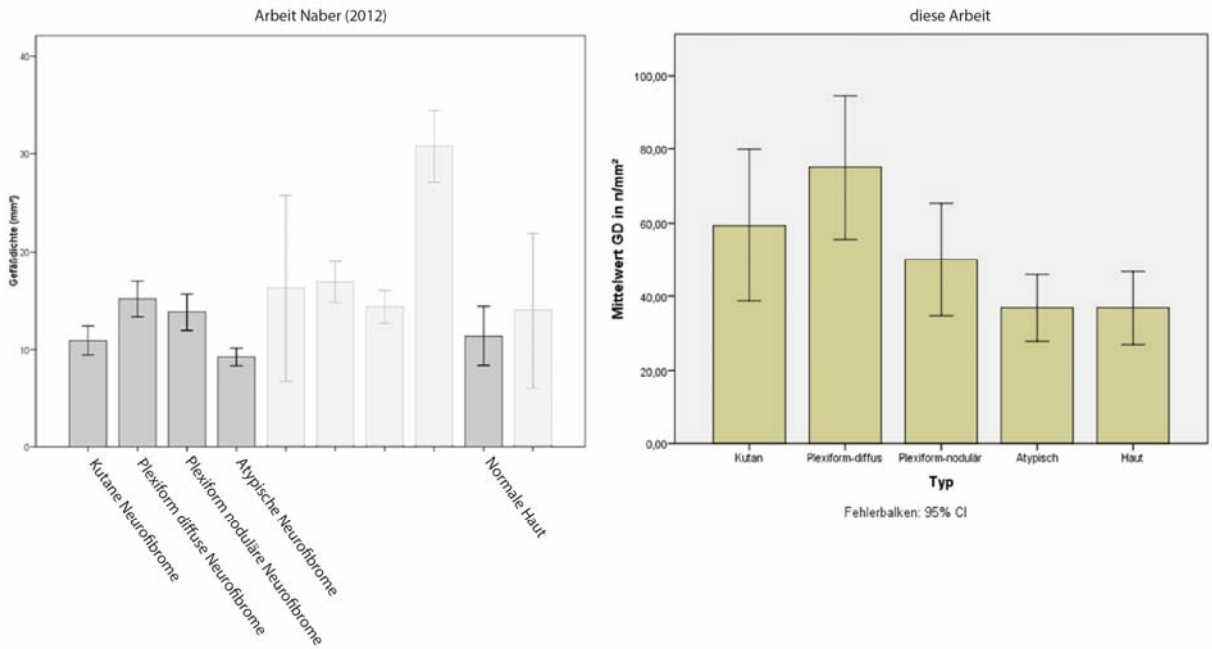


**Abbildung 19: Vergleich der Daten zur Gefäßdichte (n/mm²). Links: Ergebnisse der Arbeit Naber (2012), rechts: Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.**

Wie bereits bei der Nervenfaserdichte, so unterlag auch die Messung der Gefäßdichte einer erheblichen Schwankung. Die Färbe- und Messmethodik spielen dabei eine ebenso bedeutende Rolle wie Faktoren im Bereich der untersuchten Gewebe. Verglichen mit den in der Literatur genannten Werten der intravitalen Videomikroskopie bei gesunden Schwangeren und Neugeborenen erscheinen die in dieser Arbeit ermittelten

Daten jedoch durchaus noch plausibel. So wurde bei 272 gesunden Schwangeren eine Kapillardichte von durchschnittlich 90,9 Gefäßen/mm² an der Hand ermittelt (Nama et al., 2012). Eine andere Arbeit ermittelte mit derselben Messmethode eine Kapillardichte von 47 Gefäßen/mm² bei 71 gesunden Neugeborenen (D'Souza et al., 2011). Während die hier vorliegende Arbeit hochspezifisch nur die präkapillären Widerstandsgefäße mit glatter Gefäßmuskulatur erfasst, wird bei der intravitalen Videomikroskopie die gesamte kapilläre Endstrombahn erfasst, wodurch sich die höheren Werte erklären lassen.

Aufgrund einer teilweise erheblichen Streuung der Messwerte in der vorliegenden Arbeit ließ sich im statistischen Vergleich der einzelnen Gruppen lediglich eine signifikante Mittelwertabweichung zwischen den Hautkontrollen und den plexiform-diffusen Neurofibromen nachweisen. Eine generell erhöhte Gefäßdichte in den Neurofibromen gegenüber den Hautkontrollen konnte nicht festgestellt werden.

### 5.3 Relative Gefäßinnervation

Die in Kapitel 4.1 diskutierte Abnahme der Nervenfaserdichte durch das Tumorwachstum in Neurofibromen würde sich auch bei direkter Betrachtung der perivaskulären Innervation zeigen.
Ein weiteres Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher, einen geeigneten Antikörper zur Darstellung der Gefäßinnervation, insbesondere der sympathischen Nervenfasern, zu ermitteln und ein geeignetes Färbeprotokoll zu ermitteln.
Bei der Evaluation eines geeigneten Antikörpers zur Darstellung der Gefäßinnervation, hat sich der Autor der vorliegenden Arbeit, aufgrund der schlechten Färbeergebnisse und komplikationsreichen Vorbehandlung, gegen den hochspezifischen Antikörper gegen Dopamin-Beta-Hydroxylase (DBH) entschieden. Der Antikörper gegen das Neurofilament (NF), welcher für die Messung der Nervenfaserdichte verwendet wurde, zeigte keine Anfärbung perivaskulär verlaufender Nervenfasern und war damit nicht für diese Fragestellung geeignet. Offensichtlich findet sich die 70 kDa messende Untereinheit des Neurofilaments (NF-L), welche der verwendete Antikörper spezifisch anfärbt, nicht in ausreichendem Maße in den direkt perivaskulär verlaufenden Nervenfasern.
Die Wahl fiel letztlich auf Antikörper gegen das panaxonale Protein gene product 9.5 (PGP9.5), welches weniger spezifisch aber sehr regelmäßig alle neuronalen inklusive der perivaskulären Strukturen anfärbte. Hierbei konnte jedoch eine Anfärbung aller vorhandenen Modalitäten der Gefäßinnervation erwartet werden. Es kamen also nicht nur sympathische Fasern, sondern auch parasympathische und sensible Fasern zur Darstellung.
Die Begutachtung von insgesamt n=9.813 Gefäßen mit glatter Muskulatur hinsichtlich ihrer Innervation durch PGP9.5-positive Nervenfasern ergab in 8,76% einen Nachweis von Nervenfasern im Bereich von Gefäßen. Hierbei war die relative Gefäßinnervation bei den gesunden Hautkontrollen mit ca. 13,24% am höchsten und bei den plexiform-diffusen Neurofibromen mit 4,71% am niedrigsten. Durch die Messmethodik wurden nur direkt (bis 5µm) neben der glatten Gefäßmuskulatur verlaufende PGP9.5-positive Nervenfasern mitgezählt, was eine Fehlmessung, insbesondere bei intraneural verlaufenden Gefäßen, weitestgehend verhinderte. Trotz der teilweisen unspezifischen An-

färbung von Tumormasse waren die perivaskulär verlaufenden Nervenfasern bei starker Vergrößerung unter dem Mikroskop gut gegenüber der Hintergrundfärbung abgrenzbar. Bei der statistischen Auswertung der ermittelten Gefäßinnervation ergaben sich keine signifikanten Mittelwertabweichungen zwischen den untersuchten Gruppen. Die Fragestellung dieser Arbeit kann also dahingehend beantwortet werden, dass hinsichtlich der Innervation der untersuchten Widerstandsgefäße keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten.

Das Vorliegen einer klinisch manifesten Polyneuropathie wird bei NF1-Patienten mit 1,3 - 2,3% (Drouet et al., 2004, Ferner et al., 2004) angegeben und ist damit insgesamt selten. Allerdings konnten in elektrophysiologischen Untersuchungen in ca. 36% der Fälle abnormale evozierte Potentiale (SEP) bei Stimulation der peripheren Nerven abgeleitet werden, was auf eine subklinische axonale Neuropathie hindeutet (Yerdelen et al., 2011).

Die Ergebnisse lassen sich unter Berücksichtigung der erhöhten Vulnerabilität bemarkter Fasern gegenüber unbemarkten Fasern bei pathologischen Prozessen dahingehend interpretieren, dass es bei NF1-Patienten mit plexiformen Neurofibromen zu subklinischen Störungen kommt, z.B. zu Druckschädigung der bemarkten Nervenfasern oder durch ein verändertes Mikromilieu im Bereich der plexiformen Tumore, wohingegen die unbemarkten Fasern, zu denen Schmerz und Temperatur wie auch die hier untersuchten Fasern des vegetativen Systems zählen weitestgehend erhalten bleiben. Die eigenen Ergebnisse, dass kein Unterschied in der Gefäßinnervation in normaler Haut und Neurofibromen gefunden wurde, stehen hiermit in Einklang.

# 6. Zusammenfassung und Beantwortung der Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dichte von Gefäßen und Nervenfasern durch Anfärbung mit immunhistochemischen Antikörpern gegen glattmuskuläres Aktin (SMA), Protein-Gene-Product 9.5 (PGP9.5) und Neurofilament (NF) ermittelt und die ermittelten Werte der verschiedenen Neurofibrome und gesunden Kontrollen untereinander verglichen.
Die vorliegende Arbeit sollte dabei drei Fragestellungen klären:
1.) Kann in den untersuchten Neurofibromen eine gegenüber den gesunden Hautkontrollen erniedrigte Nervenfaserdichte beobachtet werden?
2.) Kann in den untersuchten Neurofibromen eine gegenüber den gesunden Hautkontrollen erhöhte Gefäßdichte beobachtet werden?
3.) Kann in den untersuchten Neurofibromen eine gegenüber den gesunden Hautkontrollen erniedrigte Gefäßinnervation beobachtet werden?

Obwohl die ermittelten Werte aufgrund zahlreicher Einflüsse teilweise erheblichen Schwankungen unterworfen waren, konnten alle drei Fragen abschließend beantwortet werden:
Ad 1.: Eine in den untersuchten Neurofibromen signifikant erniedrigte Nervenfaserdichte ließ sich nicht nachweisen.
Ad 2.: Eine signifikant erhöhte Gefäßdichte ließ sich nur in den untersuchten plexiform-diffusen Neurofibromen gegenüber der gesunden Haut nachweisen. Eine generell erhöhte Gefäßdichte aller untersuchten Neurofibrome gegenüber der gesunden Haut lag nicht vor.
Ad 3.: Eine signifikante Abnahme der Gefäßinnervation ließ sich in den untersuchten Neurofibromen gegenüber den gesunden Hautkontrollen nicht nachweisen.

# 7. Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|---|---|
| cAMP | Zyklisches Adenosin Monophosphat |
| CI | Konfidenzintervall |
| Da, kDa | Dalton, Kilo-Dalton |
| DAB | Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid |
| DBH | Dopamin-Betahydroxylase |
| DNS | Desoxy Ribonuklein Säure (DNA) |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| GD | Gefäßdichte |
| HE | Hämatoxylin Eosin |
| IENFD | Intraepidermale Nervenfaserdichte |
| IHC | Immunhistochemie |
| MPNST | Maligner peripherer Nervenscheidentumor |
| MVD | *microvessel density* (Gefäßdichte) |
| MW | Mittelwert (Mean) |
| NF | Neurofilament |
| NF1, NF2 | Neurofibromatose Typ 1, Neurofibromatose Typ 2 |
| NFD | Nervenfaserdichte |
| PAS | Periodic acid-Schiff (reaction) |
| PBS | Phosphat gepufferte Salzlösung |
| PGP 9.5 | Protein gene product 9.5 |
| PNST | Peripherer Nervenscheidentumor |
| PVNFD | Perivaskuläre Nervenfaserdichte |
| SEMEAN | Standardfehler |
| SMA | Glattmuskuläres Aktin |
| SOP | Standard Operating Procedure (Standardvorgehensweise) |
| STDDEV | Standardabweichung |
| TBS | Tris-buffered Saline |
| UCH-L1 | Ubiquitin C-Terminal Hydrolase 1 (PGP 9.5) |
| vWF | Von-Willebrand-Faktor |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |

## 8. Literaturverzeichnis


1987. Neurofibromatosis. *Natl Inst Health Consens Dev Conf Consens Statement,* 6**,** 1-7.

AKENSIDE, M. 1768. Observations on cancers. *Med Trans R Col Phys (London),* 1**,** 64-92.

BARKER, D., WRIGHT, E., NGUYEN, K., CANNON, L., FAIN, P., GOLDGAR, D., BISHOP, D. T., CAREY, J., BATY, B. & KIVLIN, J. 1987. Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. *Science,* 236**,** 1100-2.

BINDER, M. D., HIROKAWA, N. & WINDHORST, U. 2009. *Encyclopedia of neuroscience,* Berlin, [London], Springer.

BONAMY, A. K., MARTIN, H., JÖRNESKOG, G. & NORMAN, M. 2007. Lower skin capillary density, normal endothelial function and higher blood pressure in children born preterm. *J Intern Med,* 262**,** 635-42.

BROSIUS, S. 2010. A history of von Recklinghausen's NF1. *J Hist Neurosci,* 19**,** 333-48.

CAMPBELL, L. K., THOMAS, J. R., LAMPS, L. W., SMOLLER, B. R. & FOLPE, A. L. 2003. Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is not a specific marker of neural and nerve sheath tumors: an immunohistochemical study of 95 mesenchymal neoplasms. *Mod Pathol,* 16**,** 963-9.

COSYNS, M., MORTIER, G., JANSSENS, S., SAHARAN, N., STEVENS, E. & VAN BORSEL, J. 2010. Speech fluency in neurofibromatosis type 1. *J Fluency Disord,* 35**,** 59-69.

D'SOUZA, R., RAGHURAMAN, R. P., NATHAN, P., MANYONDA, I. T. & ANTONIOS, T. F. 2011. Low birth weight infants do not have capillary rarefaction at birth: implications for early life influence on microcirculation. *Hypertension,* 58**,** 847-51.

DASTON, M. M., SCRABLE, H., NORDLUND, M., STURBAUM, A. K., NISSEN, L. M. & RATNER, N. 1992. The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron,* 8**,** 415-28.

DROUET, A., WOLKENSTEIN, P., LEFAUCHEUR, J. P., PINSON, S., COMBEMALE, P., GHERARDI, R. K., BRUGIERES, P., SALAMA, J., EHRE, P., DECQ, P. & CREANGE, A. 2004. Neurofibromatosis 1-associated neuropathies: a reappraisal. *Brain,* 127**,** 1993-2009.

EVANS, D. G., BASER, M. E., MCGAUGHRAN, J., SHARIF, S., HOWARD, E. & MORAN, A. 2002. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet,* 39**,** 311-4.

EVANS, D. G., HOWARD, E., GIBLIN, C., CLANCY, T., SPENCER, H., HUSON, S. M. & LALLOO, F. 2010. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *Am J Med Genet A,* 152A**,** 327-32.

FERNER, R. E. 2007. Neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2: a twenty first century perspective. *Lancet Neurol,* 6**,** 340-51.

FERNER, R. E., HUGHES, R. A., HALL, S. M., UPADHYAYA, M. & JOHNSON, M. R. 2004. Neurofibromatous neuropathy in neurofibromatosis 1 (NF1). *J Med Genet,* 41**,** 837-41.

FERNER, R. E., HUSON, S. M., THOMAS, N., MOSS, C., WILLSHAW, H., EVANS, D. G., UPADHYAYA, M., TOWERS, R., GLEESON, M., STEIGER, C. & KIRBY, A. 2007. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet,* 44**,** 81-8.

FERRIERE, G., DENEF, J. F., RODRIGUEZ, J. & GUZZETTA, F. 1985. Morphometric studies of normal sural nerves in children. *Muscle Nerve,* 8**,** 697-704.

GØRANSSON, L. G., MELLGREN, S. I., LINDAL, S. & OMDAL, R. 2004. The effect of age and gender on epidermal nerve fiber density. *Neurology,* 62**,** 774-7.

GOTTFRIED, O. N., VISKOCHIL, D. H. & COULDWELL, W. T. 2010. Neurofibromatosis Type 1 and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurosurg Focus,* 28**,** E8.

GUTMANN, D. H., AYLSWORTH, A., CAREY, J. C., KORF, B., MARKS, J., PYERITZ, R. E., RUBENSTEIN, A. & VISKOCHIL, D. 1997. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA,* 278**,** 51-7.

HERRMANN, D. N., GRIFFIN, J. W., HAUER, P., CORNBLATH, D. R. & MCARTHUR, J. C. 1999. Epidermal nerve fiber density and sural nerve morphometry in peripheral neuropathies. *Neurology,* 53**,** 1634-40.

HERRMANN, D. N., MCDERMOTT, M. P., HENDERSON, D., CHEN, L., AKOWUAH, K., SCHIFITTO, G. & CONSORTIUM, N. E. A. D. N. 2004. Epidermal nerve fiber density, axonal swellings and QST as predictors of HIV distal sensory neuropathy. *Muscle Nerve,* 29**,** 420-7.

JACKSON, P. & THOMPSON, R. J. 1981. The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Neurol Sci,* 49**,** 429-38.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. & GRATZL, M. 2005. *Histologie,* Berlin, Springer.

KAPOOR, A., SHANDILYA, M. & KUNDU, S. 2011. Structural insight of dopamine β-hydroxylase, a drug target for complex traits, and functional significance of exonic single nucleotide polymorphisms. *PLoS One,* 6**,** e26509.

KEHRER-SAWATZKI, H. & MAUTNER, V.-F. 2009. Klinik und Genetik der Neurofibromatose Typ 1. *medizinische genetik*

*Band 21, Ausgabe 4, pp 519-531,* 21**,** 519-531.

KLÖPPEL, G., KREIPE, H. H., REMMELE, W., PAULUS, W. & SCHRÖDER, J. M. 2012. *Pathologie,* Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.

LAMMERT, M., FRIEDMAN, J. M., KLUWE, L. & MAUTNER, V. F. 2005. Prevalence of neurofibromatosis 1 in German children at elementary school enrollment. *Arch Dermatol,* 141**,** 71-4.

LAURIA, G., MORBIN, M., LOMBARDI, R., BORGNA, M., MAZZOLENI, G., SGHIRLANZONI, A. & PAREYSON, D. 2003. Axonal swellings predict the degeneration of epidermal nerve fibers in painful neuropathies. *Neurology,* 61**,** 631-6.

LAURIA, G., SGHIRLANZONI, A., LOMBARDI, R. & PAREYSON, D. 2001. Epidermal nerve fiber density in sensory ganglionopathies: clinical and neurophysiologic correlations. *Muscle Nerve,* 24**,** 1034-9.

LIU, P., QI, S., SHU, B., XIE, J., XU, Y. & LIU, X. 2012. [Experimental study on dermal papillary cells improving vascularization of tissue engineered skin substitutes]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi,* 26**,** 135-40.

LÖFFLER, G. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie,* Heidelberg, Springer.

LÜLLMANN-RAUCH, R. 2006. *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen,* Stuttgart [u.a.], Thieme.
MACCOLLIN, M., WILLETT, C., HEINRICH, B., JACOBY, L. B., ACIERNO, J. S., PERRY, A. & LOUIS, D. N. 2003. Familial schwannomatosis: exclusion of the NF2 locus as the germline event. *Neurology,* 60**,** 1968-74.
MADANIKIA, S. A., BERGNER, A., YE, X. & BLAKELEY, J. O. 2012. Increased risk of breast cancer in women with NF1. *Am J Med Genet A,* 158A**,** 3056-60.
MCARTHUR, J. C., STOCKS, E. A., HAUER, P., CORNBLATH, D. R. & GRIFFIN, J. W. 1998. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol,* 55**,** 1513-20.
MCCLATCHEY, A. I. 2007. Neurofibromatosis. *Annu Rev Pathol,* 2**,** 191-216.
MURRAY, J. D., CARLSON, G. W., MCLAUGHLIN, K., PENNINGTON, M., LYNN, M., DEROSE, P. B., WILLIAMS, J. K. & COHEN, C. 1997. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Am J Surg,* 174**,** 523-6.
NABER, U. 2012. *Potentielle Merkmale für Dedifferenzierung und Tumorprogress in peripheren Nervenscheidentumoren.* Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg.
NAGATSU, I., KOBAYASHI, K., FUJII, T., KOMORI, K., SEKIGUCHI, K., TITANI, K., FUJITA, K. & NAGATSU, T. 1990. Antibodies raised against different oligopeptide segments of human dopamine-beta-hydroxylase. *Neurosci Lett,* 120**,** 141-5.
NAMA, V., MANYONDA, I. T., ONWUDE, J. & ANTONIOS, T. F. 2012. Structural capillary rarefaction and the onset of preeclampsia. *Obstet Gynecol,* 119**,** 967-74.
OMDAL, R., MELLGREN, S. I., GØRANSSON, L., SKJESOL, A., LINDAL, S., KOLDINGSNES, W. & HUSBY, G. 2002. Small nerve fiber involvement in systemic lupus erythematosus: a controlled study. *Arthritis Rheum,* 46**,** 1228-32.
PAN, C. L., LIN, Y. H., LIN, W. M., TAI, T. Y. & HSIEH, S. T. 2001. Degeneration of nociceptive nerve terminals in human peripheral neuropathy. *Neuroreport,* 12**,** 787-92.
PERRIGOUARD, C., PELTRE, B. & CRIBIER, B. 2013. [A histological and immunohistological study of vascular and inflammatory changes in rosacea]. *Ann Dermatol Venereol,* 140**,** 21-9.
PLOTKIN, S. R., STEMMER-RACHAMIMOV, A. O., BARKER, F. G., HALPIN, C., PADERA, T. P., TYRRELL, A., SORENSEN, A. G., JAIN, R. K. & DI TOMASO, E. 2009. Hearing improvement after bevacizumab in patients with neurofibromatosis type 2. *N Engl J Med,* 361**,** 358-67.
RODE, J., DHILLON, A. P., DORAN, J. F., JACKSON, P. & THOMPSON, R. J. 1985. PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. *Histopathology,* 9**,** 147-58.
ROSSI, A., SOZIO, F., SESTINI, P., RENZONI, E. A., KHAN, K., DENTON, C. P., ABRAHAM, D. J. & WEBER, E. 2010. Lymphatic and blood vessels in scleroderma skin, a morphometric analysis. *Hum Pathol,* 41**,** 366-74.
RUOCCO, I., CUELLO, A. C., PARENT, A. & RIBEIRO-DA-SILVA, A. 2002. Skin blood vessels are simultaneously innervated by sensory, sympathetic, and parasympathetic fibers. *J Comp Neurol,* 448**,** 323-36.
SCHIEBLER, T. H. & ARNOLD, G. 2003. *Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des*

*Menschen : unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; mit 119 Tabellen,* Berlin [u.a.], Springer.
SCHWAB, V. D., SULK, M., SEELIGER, S., NOWAK, P., AUBERT, J., MESS, C., RIVIER, M., CARLAVAN, I., ROSSIO, P., METZE, D., BUDDENKOTTE, J., CEVIKBAS, F., VOEGEL, J. J. & STEINHOFF, M. 2011. Neurovascular and neuroimmune aspects in the pathophysiology of rosacea. *J Investig Dermatol Symp Proc,* 15**,** 53-62.
SEIZINGER, B. R., ROULEAU, G. A., LANE, A. H., FARMER, G., OZELIUS, L. J., HAINES, J. L., PARRY, D. M., KORF, B. R., PERICAK-VANCE, M. A. & FARYNIARZ, A. G. 1987. Linkage analysis in von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) with DNA markers for chromosome 17. *Genomics,* 1**,** 346-8.
SHAW, G. 1986. Neurofilaments: abundant but mysterious neuronal structures. *Bioessays,* 4**,** 161-6.
SHUN, C. T., CHANG, Y. C., WU, H. P., HSIEH, S. C., LIN, W. M., LIN, Y. H., TAI, T. Y. & HSIEH, S. T. 2004. Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain,* 127**,** 1593-605.
SKALLI, O., PELTE, M. F., PECLET, M. C., GABBIANI, G., GUGLIOTTA, P., BUSSOLATI, G., RAVAZZOLA, M. & ORCI, L. 1989. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem,* 37**,** 315-21.
SMOLLER, B. R. & ROSEN, S. 1986. Port-wine stains. A disease of altered neural modulation of blood vessels? *Arch Dermatol,* 122**,** 177-9.
STEWART, L. C. & KLINMAN, J. P. 1988. Dopamine beta-hydroxylase of adrenal chromaffin granules: structure and function. *Annu Rev Biochem,* 57**,** 551-92.
STORR, S. J., SAFUAN, S., MITRA, A., ELLIOTT, F., WALKER, C., VASKO, M. J., HO, B., COOK, M., MOHAMMED, R. A., PATEL, P. M., ELLIS, I. O., NEWTON-BISHOP, J. A. & MARTIN, S. G. 2012. Objective assessment of blood and lymphatic vessel invasion and association with macrophage infiltration in cutaneous melanoma. *Mod Pathol,* 25**,** 493-504.
TELLECHEA, A., KAFANAS, A., LEAL, E. C., TECILAZICH, F., KUCHIBHOTLA, S., AUSTER, M. E., KONTOES, I., PAOLINO, J., CARVALHO, E., NABZDYK, L. P. & VEVES, A. 2013. Increased skin inflammation and blood vessel density in human and experimental diabetes. *Int J Low Extrem Wounds,* 12**,** 4-11.
THOMPSON, R. J., DORAN, J. F., JACKSON, P., DHILLON, A. P. & RODE, J. 1983. PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res,* 278**,** 224-8.
UMAPATHI, T., TAN, W. L., TAN, N. C. & CHAN, Y. H. 2006. Determinants of epidermal nerve fiber density in normal individuals. *Muscle Nerve,* 33**,** 742-6.
VALENCAK, J., HEERE-RESS, E., KOPP, T., SCHOPPMANN, S. F., KITTLER, H. & PEHAMBERGER, H. 2004. Selective immunohistochemical staining shows significant prognostic influence of lymphatic and blood vessels in patients with malignant melanoma. *Eur J Cancer,* 40**,** 358-64.
VERMEULEN, P. B., VERHOEVEN, D., FIERENS, H., HUBENS, G., GOOVAERTS, G., VAN MARCK, E., DE BRUIJN, E. A., VAN OOSTEROM, A. T. & DIRIX, L. Y. 1995. Microvessel quantification in primary colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Br J Cancer,* 71**,** 340-3.
VISKOCHIL, D. 2002. Genetics of neurofibromatosis 1 and the NF1 gene. *J Child Neurol,* 17**,** 562-70; discussion 571-2, 646-51.

VON RECKLINGHAUSEN, F. 1882. *Ueber die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen: Festschrift zur Feier des fünfundzwanzigjährigen Bestehens des pathologischen Instituts zu Berlin Herrn Rudolf Virchow*, Hirschwald.

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 Res,* 261**,** 25-33.

WEIDNER, N. 1995. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat,* 36**,** 169-80.

WEIDNER, N. 2008. Chapter 14. Measuring intratumoral microvessel density. *Methods Enzymol,* 444**,** 305-23.

WEIDNER, N., SEMPLE, J. P., WELCH, W. R. & FOLKMAN, J. 1991. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med,* 324**,** 1-8.

XU, G. F., O'CONNELL, P., VISKOCHIL, D., CAWTHON, R., ROBERTSON, M., CULVER, M., DUNN, D., STEVENS, J., GESTELAND, R. & WHITE, R. 1990. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell,* 62**,** 599-608.

YERDELEN, D., KOC, F., DURDU, M. & KARAKAS, M. 2011. Electrophysiological findings in neurofibromatosis type 1. *J Neurol Sci,* 306**,** 42-8.

YUAN, A., RAO, M. V., SASAKI, T., CHEN, Y., KUMAR, A., VEERANNA, LIEM, R. K., EYER, J., PETERSON, A. C., JULIEN, J. P. & NIXON, R. A. 2006. Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J Neurosci,* 26**,** 10006-19.

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Markus Glatzel danke ich sehr für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.
Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagel, meinem Betreuer und Doktorvater, danke ich für die stets kompetente, freundliche und engagierte Betreuung dieser Arbeit.
Mein herzlicher Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie, ohne deren Rat und Unterstützung, insbesondere bei der immunhistochemischen Laborarbeit, diese Arbeit nicht entstanden wäre.
Meinen Eltern und vor allem meiner Mutter Uta-Maria Behrendt danke ich dafür, dass Sie stets die richtigen Ratschläge für mich hatten.
Meinen Kommilitonen und Freunden, die mich während der Erstellung dieser Arbeit stets unterstützt und motiviert haben gilt ebenfalls großer Dank.
Meiner treuen Freundin, Kommilitonin und Arbeitskollegin Franziska Heidemann danke ich für ihr stets offenes Ohr und die aufopfernde Unterstützung.
Zuletzt danke ich der Liebe meines Lebens, Vera Haustein, für ihre liebevolle und verständnisvolle Art und die großartige Unterstützung!

## 9. Lebenslauf / Curriculum Vitae

[redacted]

## 10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....