

Hudbiopsi for kvantifisering av intraepidermale nervefibrer

Stansebiopsier fra hud med kvantifisering av intraepidermale nervefibrer er en relativt ny diagnostisk metode ved perifer nevropati. Immunfarging av proteingenprodukt 9.5 har vist seg å være særlig verdifullt for påvisning av intraepidermale nervefibrer.

Metodikken for målinger av epidermal nervefibertetthet i frysensnitt immunfarget for påvisning av proteingenprodukt 9.5 beskrives. Data fra undersøkelse av 56 friske personer og tre pasienter med tynnfibernevropati som ledd i deres perifere nevropati presenteres.

Hos de friske personene var gjennomsnittstettheten av epidermale nervefibrer 12,4 (SD 4,6), median 11,3 og spedning 6,0–26,1. Tre pasienter med tynnfibernevropati hadde lav tetthet av intraepidermale nervefibrer.

Hudbiopsi for kvantifisering av intraepidermale nervefibrer er enkel, medfører praktisk talt ingen smerter og såret gror raskt. Undersøkelsen kan gjentas og har potensial for å kunne brukes i monitorering av medikamentell behandlingseffekt ved perifer nevropati.

Pasienter med smerter i føttene, ofte av brennende karakter, er en relativt vanlig type pasienter i klinisk praksis og spesielt ved nevrologiske poliklinikker. Klinisk undersøkelse kan eventuelt avsløre svekket følelse for smerte og temperatur distalt i underekstremitetene, men nevrologisk status kan også være helt normal. Likeledes kan elektrofysiologisk undersøkelse med elektromyografi (EMG) og bestemmelse av nerveledningshastighet være normal. Tynnfibernevropati som ofte ligger til grunn for denne symptomatologien kan ha en rekke forskjellige årsaker (tab 1).

En noe mer «objektiv» test enn vanlig klinisk undersøkelse av smerte- og temperatursans er kvantitativ sensorisk testing med termotest. Denne metoden er det tidligere redegjort for i Tidsskriftet (1). Termotesting er en psykofysisk test som forutsetter at pasienten samarbeider godt og trykker på en knapp med én gang han/hun kjenner varme eller kulde fra det hudområdet som undersøkes med en såkalt termode. Nerveled-

Svein Ivar Mellgren

nevrsim@rito.no

Roald Omdal

Einar Fosse

Astrid Skjesol

Nevrologisk avdeling
Institutt for klinisk medisin
Universitetet i Tromsø
9037 Tromsø

Lasse Göransson

Medisinsk avdeling
Sentralsjukehuset i Rogaland
4068 Stavanger

Sigurd Lindal

Patologisk anatomisk avdeling
Regionsykehuset i Tromsø
9038 Tromsø

Mellgren SI, Omdal R, Fosse E, Skjesol A, Göransson L, Lindal S.

Skin biopsi for analysis of intraepidermal nerve fibres.

Tidsskr Nor Lægeforen 2001; 121: 2159–61.

Background. Skin biopsy for quantification of intraepidermal nerve fibre density has recently been introduced as a method for diagnosis of peripheral neuropathies. Immunostaining by antibody to protein gene product 9.5 has proved particularly useful because it selectively visualizes the epidermal nerve fibres.

Material and methods. We describe the procedure on the basis of relevant literature and our own experience. Results from investigations of 56 healthy individuals and three patients with small fibre involvement as part of their neuropathy are presented.

Results. In the healthy individuals, the mean density of epidermal fibres was 12,4 (SD 4,6), median 11,3 and range 6,0–26,1. Three patients with small fibre neuropathy had low intraepidermal nerve fibre density.

Interpretation. Skin biopsy for determination of intraepidermal nerve fibre density is a simple and non-painful procedure. Skin biopsies can be done repeatedly and may be used for the purpose of monitoring potential therapeutic agents.

ningshastighetsbestemmelse med måling av amplituder av svarpotensialer eller ledningshastighet gir derimot helt objektive mål for eventuell funksjonssvikt. Det er kun ledningshastighet i myeliniserte fibrer som undersøkes, og man får med denne metoden ingen objektiv vurdering av de umyeliniserte C-fibrene, som fører smerte- og temperaturimpulser.

Pasienter med mistenkt tynnfibernevropati kan også undersøkes med full nervebiopsi (suralisbiopsi), men dette er et såpass invasivt inngrep at det ikke bør anvendes for å avklare om pasienten har nevropati eller annen årsak til smerte. Vurdering av små myeliniserte og umyeliniserte C-fibrer i suralisbiopsi forutsetter elektronmikroskopisk undersøkelse og tidkrevende kvantifisering. Det er i en annen artikkel i Tidsskriftet redegjort for teknikken med suralisbiopsi og indikasjoner for denne (2).

I 1993 beskrev Kennedy & Wendelschafer-Crabb (3) nettverket av nerveeender som løper ut til overflaten av huden, ved hjelp av immunhistokjemisk teknikk for påvisning av panaksonalt proteingenprodukt 9.5 (PGP 9.5). Denne metoden tillater kvantifisering av nervefibertetthet i hudbiopsier og gir spesielt mulighet for objektivt å påvise en tilstand som tynnfibernevropati. Epidermale nervefibrer antas i hovedsak å representere C-fibrer og til dels A δ -fibrer (3, 4).

Materiale og metode

I denne artikkelen beskriver vi teknikken for kvantifisering av intraepidermale nervefibrer basert på relevant litteratur (4) og egne erfaringer og presenterer resultater fra undersøkelser av 56 friske personer (17 menn og 39 kvinner) og tre pasienter.

Ved taking av stansebiopsi ligger pasienten på rygg og det aktuelle område desinfiseres. Hårløs hud distalt i leggen like ovenfor laterale malleol og eventuelt lateralt midt på låret brukes oftest. Det settes først lokalbedøvelse (2% lidokain og adrenalin) nær hudoverflaten. Med 3 mm stansenål penetreres huden til omtrent halve metallhodet på biopsistansen er dekket. Teknikken er tidligere beskrevet i Tidsskriftet (5).

Biopsien overføres direkte i klargjorte Eppendorf-rør med nylaget fiksjonsvæske av paraformaldehyd, lysin og Na-periodat (PLP fikseringsvæske). Rørene merkes og settes i kjøleskap (ikke i dypfryser) og står i 12–24 timer dersom materialet skal bearbeides videre lokalt. Hvis ikke, sendes prøvene på vanlig is, ikke tørris, med ekspresspost til aktuelt laboratorium (f.eks. Nevrologisk Forskningslaboratorium, MH-bygget, Universitetet i Tromsø, 9017 Tromsø). Det er viktig å avtale med laboratoriet og angi tidspunkt for når forsendelsen vil ankomme.

Det skjæres 50 μ frysensnitt i en kryostat. Snittene blir deretter immunfarget for påvisning av proteingenprodukt 9.5. Hovedtrek-

kene er at snittene inkuberes ved 4°C over natten i brønner som inneholder 0,1% primærantistoff mot proteingenprodukt 9.5 (Chemicon Internationals, USA). Etter vasking inkuberes i en time med 1% sekundært antistoff (biotinylert antistoff fra geit mot kanin-IgG (DAKO, Danmark). Endogen peroksidase blir blokkert med 1% H₂O₂ i 30% metanol/fosfatbufret saltvann. Snittene blir videre behandlet i avidinbiotinkompleksløsning (1% streptavidin (DAKO) og 1% biotinylert peroksidase) i en time ved romtemperatur. Til slutt overføres snittene til Vector SG substrat-analysesett for peroksidase (Vector laboratories, USA) 2–10 min for fremkalling av kromogen reaksjon og rensing i fosfatbufret saltvann før montering på objektglass. Etter tørking farges med eosin.

Antall intraepidermale nervefibrer telles i mikroskop. Lengden på snittet måles i morfometriprogrammet «Image 1,61» (National Institute of Health, USA, tilgjengelig på <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) og resultatet oppgis i antall fibrer per millimeter. Man teller alle primærfibrer, ikke sekundære forgreninger som går gjennom basalmembranen mellom epidermis og dermis.

Figur 1 viser immunfarget snitt med visualisering av epidermale nervefibrer.

Innsamling av normalmateriale er del i et forskningsprosjekt som er godkjent av Regional etisk komité, Helseregion Nord.

Resultater

Tabell 2 viser resultat av målinger på de friske forsøkspersonene. Det var store individuelle forskjeller på nervefibertetthet i epidermis. 5-percentilen i vårt materiale var 6 fibrer/mm. Det var en svak, men signifikant tendens til redusert tetthet av nervefibrer med stigende alder ($r = 0,32$, $p = 0,015$).

Tabell 1 Etiologi ved tynnfiberneuropati

Diabetes mellitus
Primær systemisk amyloidose
Ernæringsmessige årsaker og mangeltilstander
Alkohol
Andre
Toksiner og medikamenter
AIDS
Kollagenoser
Primær biliær cirrhose
Hypotyreose
Urolige bein (restless legs) med sen debut
Hereditær
Hereditær sensorisk autonom neuropati type I, IV og V
Neuropati med brennende fornemmelse i føttene (dominant arvelig)
Tangierts sykdom (hereditær HDL-mangel)
Fabrys sykdom (alfagalaktosidase A-mangel)
Idiopatisk

Pasient 1. 69 år gammel mann som de siste 3–4 år hadde hatt plager med putefornemmelse under føttene og etter hvert hevelse i hender og føtter. Han ble undersøkt klinisk av nevrolog. Nevrofysiologisk undersøkelse viste en subakutt motorisk og sensorisk polyneuropati i underekstremitetene, først og fremst aksonalt. Pasientens hovedproblem ble etter hvert uttalte smerter, svie og brenning distalt i underekstremitetene. Ny EMG og nevrografi viste uttalte patologiske forhold i underekstremitetene, lette forandringer i muskulaturen i overekstremitetene, forenlig med generell perifer nevrogen affeksjon. Pasienten hadde også klare symptomer som tydet på affeksjon av

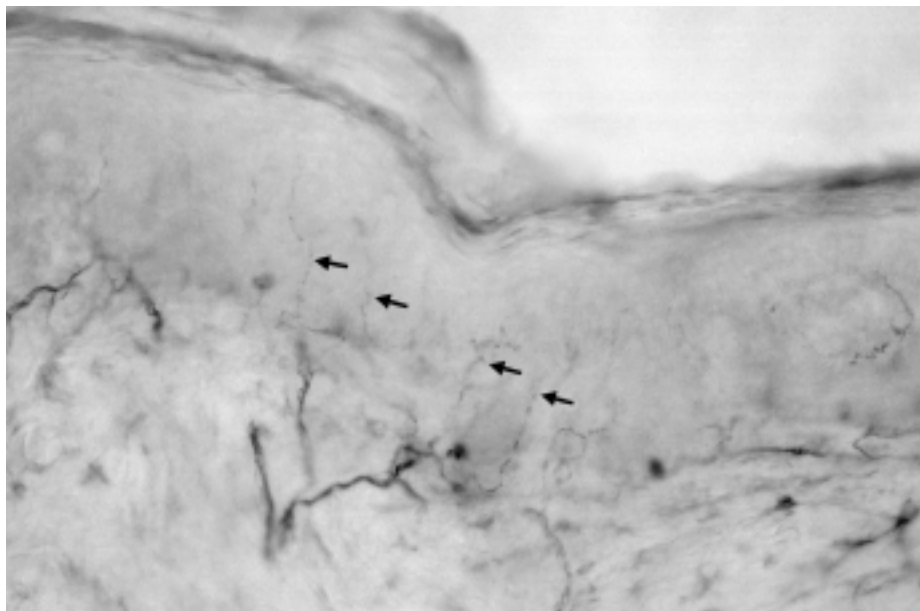
tynne fibrer (A δ - og C-fibrer). Ved termotesting var det betydelig forskjell mellom høyre og venstre fotrygg, spesielt med affeksjon av kulde- og varmepersepsjon på venstre fotrygg. Det ble gjort vanlig biopsi av venstre n. suralis, samt hudbiopsi. Suralisbiopsien viste forandringer forenlig med nevropatisk blandingsbilde (aksonopati/myelinopati) med holdepunkter for gjennomgått aksonal degenerasjon, men også trekk av remyelinisering. Videre var det fokal perivaskulær betennelse. Hudbiopsi viste en gjennomsnittlig tetthet på 5,6 fibrer/mm, en verdi i nedre område for aldersgruppen.

Pasient 2. 58 år gammel mann som i mange år hadde hatt nummenhet på lateralsiden av venstre fot. Fra juni 1998 merket han problemer med å strekke ut fingrene på høyre hånd. Kort etter fikk han brennende progredierende smerter, hovedsakelig i 1. og 2. finger. Ved klinisk nevrologisk undersøkelse ble det funnet utfall i radialisinnervert muskulatur og hud i høyre arm. Fra sommeren 1999 fikk han også symptomer med brennende smerter i ulnarisområdet i venstre hånd. Litt senere på høsten 1999 merket han også nummenhet og brennende smerte i høyre underekstremitet, lateralt på foten og opp til ca. halvveis på leggen. EMG og nevrografi var forenlig med totalt denervert radialisinnervert underarmsmuskulatur på høyre side. I mer proksimal radialisinnervert muskulatur var det uttalt med denervasjonsaktivitet og uttalt tap av motoriske enheter. I tillegg var det nye funn som ved en ulnarislesjon på venstre side med denervasjonsaktivitet i ulnarisinnervert håndmuskulatur, men nivået av lesjonen lot seg ikke bedømme. EMG viste også uttalte nevrogene forandringer i peroneusinnervert leggmuskulatur på høyre side. Det kliniske bildet og de elektrofysiologiske funn var i overensstemmelse med diagnosen multipl mononeuropati. Det ble utført hudbiopsi for kvantifisering av intraepidermale nervefibrer, og denne viste en fibertetthet på 2,8 fibrer/mm.

Pasient 3. 51 år gammel kvinne. Hun hadde hatt kliniske symptomer forenlig med Sjögrens syndrom ca. 15 år. Hun hadde vært spesielt mye plaget med conjunctivitis sicca og artralgi, og det ble påvist antinukleære antistoffer (SSA og SSB). Gjennom mange år hadde hun tiltakende plager med svekket temperatursans og tendens til å brenne seg ofte, f.eks. ved matlaging. Etter hvert fikk hun også dårlig gangfunksjon på grunn av svekket sensibilitet og sensorisk ataksi. Pasienten hadde også pupilleforandringer (Adies syndrom), nedsatt følelse for stikk og berøring i høyre ansiktshalvdel og generell arefleksi. Nevrografi viste tilnærmet normale forhold i motoriske nerver, mens sensorisk nerveledningshastighet var redusert (EMG og nevrografi var gjort ved annet sykehus og pasienten nektet ny undersøkelse). Det ble gjort termotesting som viste abnorme terskelverdier for både kulde- og varmepersepsjon, spesielt i beina, og som indikerte påvirkning av både C- og A δ -fibrer. Hudbiopsi viste redusert tetthet av intraepidermale nervefibrer (2,5 fibrer/mm).

Diskusjon

Vi har redegjort for metodikken for kvantifisering av intraepidermale nervefibrer i hudbiopsier. Det er en betydelig variasjon av fibertetthet hos normalpersoner, slik at grensen for patologisk redusert nervefibertetthet har vært satt ved 5-percentilen (6). I vårt materiale tilsvarer 5-percentilen 6 fibrer/mm, men er i større materiale ned mot 3,8 fibrer/mm (6). I sistnevnte normalmateriale med 98 personer var der eksempel på betydelig variasjon (i aldersgruppen 60–69 år med spredning 0,6–20,2). Våre tall og tallene til MacArthur og medarbeidere (6) og



Figur 1 50 μ tykt snitt fra stansebiopsi som er immunfarget og som viser epidermale nervefibrer. Det er ikke mulig å gjengi et skarpt bilde av et så tykt snitt i vanlig lysmikroskop

Tabell 2 Verdier av C-fibrer i 50 µ tykke snitt i hud fra laterale legg like ovenfor laterale malleol hos 56 friske forsøkspersoner

	Alder (år)					Totalt
	15–29	30–39	40–49	50–59	60–75	
Antall (menn/kvinner)	15 (2/13)	9 (3/6)	17 (6/11)	11 (3/8)	4 (3/1)	56 (17/39)
Antall fibrer (mm), snitt (SD)	14,4 (4,1)	14,5 (6,6)	10,7 (3,3)	11,5 (4,7)	10,1 (2,2)	12,4 (4,6)
Antall fibrer (mm), median	13,4	10,1	10,1	8,9	10,2	11,2
Antall fibrer (mm), spredning	9,1–22,3	7,8–26,1	6,0–17,0	6,8–18,6	7,3–12,7	6,0–26,1

Herrmann og medarbeidere (7) bygger på analyse i 50 µ frysesnitt og vurdering i vanlig lysmikroskop, men fibre teller i successive plan nedover i snittet. Dersom det brukes tykkere snitt og visualiseringen foregår i laserskanning konfokalt mikroskop, kan andre verdier oppnås (8). Det kan ikke utelukkes at noe av variasjonen i fibertetthet hos friske individer skyldes varierende grad av vevsskrumpning, men eventuell effekt ansees å motvirkes av at alle biopsiene tas med samme stansestørrelse og blir tilnærmet like store.

McArthur og medarbeidere (6) inkluderte 20 pasienter med nevropati i sin undersøkelse. De fant at med 5-percentilen for fibertetthet som grenseverdi ble 88 % korrekt klassifisert som nevropati. Sensitiviteten var 45 %, spesifisiteten 97 %, positiv prediktiv verdi 92 % og negativ prediktiv verdi 90 %. Den lave sensitiviteten innebærer at normal intraepidermal nervefibertetthet ikke utelukker en sensorisk nevropati, jf. også vår pasient med 5,6 fibrer/mm. Holland og medarbeidere (9) sammenliknet 20 pasienter med smertefull nevropati og 20 aldersparede kontrollpersoner. Gjennomsnittlig fibertetthet på leggen var 4,9 hos pasientene og 16,3 fibrer/mm hos kontrollpersonene ($p < 0,0001$). Spredningen hos nevropatipasientene var 0–13,1 fibrer/mm, men er ikke angitt for kontrollpersonene. De fant også en klar sammenheng mellom reduksjon av intraepidermale nervefibrer og økende grad av symptomer. Hos pasienter med lettere symptomer kan man derfor ikke vente så store forandringer med denne metoden.

Hos våre tre pasienter var nevropatien mer omfattende enn bare ren tynnfibernevropati, slik at det også ble gjort funn ved EMG og nevrografi. Med denne enkle teknikken fant vi det imidlertid ikke betenkelig å supplere den diagnostiske utredningen med stansebiopsi for å måle tetthet av intraepidermale nervefibrer. Pasienten med Sjögrens syndrom hadde perifer nevropati, som er relativt vanlig ved denne sykdommen (10).

Som nevnt kan tynnfibernevropati opptre helt alene uten engasjement av tykkere nervefibrer, noe som gjenspeiler seg i elektrofysiologiske funn. Det er god korrelasjon mellom tetthet av tynne fibrer i nervebiopsier fra n. suralis og epidermal nervefibertetthet (7). Dersom imidlertid amplituden av det sam-

mensatte sensoriske nerveaksjonspotensial i suralisnerven sammenliknes med epidermal nervefibertetthet, er korrelasjonen relativt svak (7).

Det kan være andre diagnostiske kriterier enn fibertelling som kan øke nytten av hudbiopsi. Oppsvulming langs de epidermale nervefibre hos f.eks. pasienter med diabetesnevropati tyder på nervefiberdegenerasjon, men dette er vanskelig å kvantifisere. Likeledes kan økt fiberlengde og forgreninger være tidkrevende å måle, men kan indikere kompensatorisk kollateralisering av epidermale nervefibrer (11).

Vi anbefaler at man vurderer hudbiopsi for måling av epidermal nervefibertetthet hos pasienter med ingen eller lite forandringer ved elektrofysiologiske undersøkelser, og eventuelt også suralisbiopsi. Det er nylig også beskrevet pasienter med sen debut av urolige bein (restless legs) ledsaget av redusert tetthet av epidermale nervefibrer (12).

Hudstansebiopsier gir ingen sekvele av betydning, innebærer relativt lite kostnader og gir mulighet for gjentatte biopsier f.eks. i forbindelse med monitorering av et behandlingsopplegg. Dersom symptomer på tynnfibernevropati er dominerende (uten mistanke om vaskulitt som årsak) og det er ønskelig med undersøkelse av hel, perifer nerve (n. suralis), anbefales stansebiopsi fra hud før man går videre til nervebiopsi.

Litteratur

1. Johnsen SH, Løseth, Mellgren SI. Tynnfibernevropati. Tidsskr Nor Lægeforen 1997; 117: 1476–9.
2. Mellgren SI, Moxnes W, Lindal S, Johansen R, Solberg T. Nervebiopsi. Tidsskr Nor Lægeforen 1999; 119: 3146–9.
3. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G. The innervation of the human epidermis. J Neurol Sci 1993; 115: 184–90.
4. McCarthy BG, Hsieh S-T, Stocks A, Hauer BA, Macko C, Cornblath DR et al. Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsies. Neurology 1995; 45: 1848–55.
5. Hunskaar S, Kubon P. Stansebiopsi. Tidsskr Nor Lægeforen 1990; 110: 2665–6.
6. McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. Arch Neurol 1998; 55: 1513–20.
7. Herrmann DN, Griffin JW, Hauer P, Cornblath DR, McArthur JC. Epidermal nerve fiber density and sural nerve morphometry in peripheral neuropathies. Neurology 1999; 53: 1634–40.
8. Periquet MI, Novak V, Collins MP, Nagaraja

HN, Erdem S, Nash SM et al. Painful sensory neuropathy. Prospective evaluation using skin biopsy. Neurology 1999; 53: 1641–7.

9. Holland NR, Stocks A, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, MacArthur JC. Intraepidermal nerve fiber density in patients with painful sensory neuropathy. Neurology 1997; 48: 708–11.

10. Mellgren SI, Conn DL, Stevens JC, Dyck PJ. Peripheral neuropathy in primary Sjögren's syndrome. Neurology 1989; 39: 390–4.

11. Kennedy WR, Said G. Sensory nerves in skin. Answers about painful feet? Neurology 1999; 53: 1614–5.

12. Polydefkis M, Allen RP, Hauer P, Earley CJ, Griffin JW, McArthur JC. Subclinical sensory neuropathy in late-onset restless legs syndrome. Neurology 2000; 55: 1115–21.

○