

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR  
INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. REINHARD ANDREESEN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER KUTANEN, SYNOVIALEN UND  
INTRAOSSÄREN SYMPATHISCHEN UND SENSORISCHEN NERVENFASERN BEI  
CHARCOT-ARTHROPATHIE UND ARTHROSE DES FUSSSKELETTES**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Verena Monika Bobrik

2010



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR  
INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. REINHARD ANDREESEN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER KUTANEN, SYNOVIALEN UND  
INTRAOSSÄREN SYMPATHISCHEN UND SENSORISCHEN NERVENFASERN BEI  
CHARCOT-ARTHROPATHIE UND ARTHROSE DES FUSSSKELETTES**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Verena Monika Bobrik

2010

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rainer Straub

2. Berichterstatter:

PD Dr. Johannes Beckmann

Tag der mündlichen Prüfung:

30.03.2011



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Definition.....	1
1.2 Historisches.....	1
1.3 Epidemiologie und Klinik.....	2
1.4 Einteilung in Stadien.....	3
1.5 Pathophysiologie.....	6
1.6 Sensibles Nervensystem.....	8
1.7 Sympathisches Nervensystem.....	11
1.8 Ziel der Arbeit.....	13
<b>2 MATERIAL UND METHODE.....</b>	<b>15</b>
2.1 Patienten.....	15
2.2 Stadieneinteilung von Charcot-Fuß und OA.....	17
2.3 Klinische Tests zur Neuropathie.....	17
2.4 Präparation des Gewebes und Fluoreszenzimmunhistochemie der Nervenfasern.....	18
2.5 Nachweis von SEMA3C positiven Zellen.....	20
2.6 Präsentation der Daten und statistische Analysen.....	20
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>22</b>
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>27</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>30</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>32</b>
<b>7 PUBLIKATION.....</b>	<b>41</b>
<b>8 DANKSAGUNG.....</b>	<b>42</b>



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Definition

Der Charcot-Fuß ist die nicht infektiöse Zerstörung einzelner oder mehrerer Knochen- oder Gelenkstrukturen, überwiegend am Fußskelett lokalisiert (40). Als Synonyme für dieses Krankheitsbild werden außerdem diabetisch-neuropathische Osteoarthropathie (DNOAP), Neuroarthropathie, Neuroosteoarthropathie, Charcot-Arthropathie, Charcot-Gelenk, Charcot-Osteoarthropathie oder Arthropathia neuropathica verwendet (2)(5)(32)(40)(68)(84).

## 1.2 Historisches

Bereits 1703 beschrieb William Musgrave die Arthritis als Komplikation venerischer Erkrankungen (2)(4)(68). Mit einer neurologischen Erkrankung wurde das Krankheitsbild erstmals 1831 von J.K. Mitchell in Verbindung gebracht (39). 1868 beschrieb Charcot schwere, osteoarthritische Veränderungen an verschiedenen Gelenken im Zusammenhang mit Tabes dorsalis, einer tertiären Manifestation der Syphilis. Veröffentlicht wurden diese Erkenntnisse 1882 in London, wo die Betitelung sämtlicher neuropathischer Gelenk- und Knochenveränderungen als Charcot-Gelenke beschlossen wurde (60)(62). Derartige Deformitäten am Fuß bezeichnete Charcot zusammen mit Féré 1883 „pied tabétique“ und schließlich Charcot-Fuß (12)(62)(74). Auch andere Erkrankungen wurden als Ursache des Charcot-Fußes erwähnt, wie z.B. die Myelomeningocele, spinale Verletzungen und Kompressionen, kongenitale Analgesien, Poliomyelitis, Lepra, Syringomyelie, HIV-Infektion und chronischer Alkoholismus (38). W.R. Jordan brachte schließlich 1936 als Erster die neuropathische



Osteoarthropathie des Fußes/Sprunggelenks mit dem Diabetes mellitus in Zusammenhang (42)(58)(62). Im Jahr 1942 berichteten Bailey und Root vom Auftreten der schmerzlosen Destruktion des Tarsus in 14 Fällen bei chronischem, unkontrolliertem Diabetes mellitus, gefolgt von vielen anderen Fallstudien (7)(14)(57), welche zunehmend die Bedeutung der diabetischen Form der Arthropathie betonten. Heutzutage ist der Diabetes mellitus als chronische Erkrankung die Hauptursache der neuropathischen Charcot-Arthropathie (24)(36)(65).

### ***1.3 Epidemiologie und Klinik***

Die Prävalenz der DNOAP variiert in der Literatur zwischen 0.1 % bis 13 % (60)(65) (67). Bei Diabetikern mit bestehender Neuropathie erhöht sich die Prävalenz gar auf 29 %. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.15 % bis 2.5 % wird ein Diabetiker an einem akutem Charcot-Fuß erkranken (60). Dabei sind sowohl Patienten mit Typ I Diabetes als auch mit Typ II Diabetes betroffen. Die DNOAP manifestiert sich bei einem Großteil der Patienten mit Diabetes zwischen der fünften und sechsten Lebensdekade, wobei Typ I Diabetiker eher am Beginn dieses Zeitraums und Typ II Diabetiker eher am Ende liegen (55). Von weitaus wichtigerer Bedeutung als das Alter ist die Krankheitsdauer des Diabetes, welche im Schnitt bei über 10 Jahren liegt. Ein Unterschied in der Geschlechterverteilung zeigt sich nicht (37). Dass die Charcot-Arthropathie beiderseits auftritt, kommt bei 6-40 % der Fälle vor (18)(41) (77).

Die initialen Symptome einer DNOAP sind oft unschwellig und werden daher gern übersehen. Eine einseitige Schwellung des Fußes bei Diabetikern und Probleme bei der Schuhpassform sollten bereits an die Diagnose denken lassen. Die akute Form

der Charcot-Arthropathie manifestiert sich meist durch einen schmerzlosen, einseitig überwärmten, erythematösen und ödematösen Fuß mit oder ohne Trauma in der Anamnese. Armstrong et al. beobachteten jedoch bei 75% der Patienten eine gewisse Schmerzwahrnehmung bei einem sonst absolut empfindungslosen Fuß. Die Fußpulse sind meist gut palpabel. Auch Knocheninstabilitäten und eine zerstörte Fußarchitektur lassen sich nachweisen (68). Da bei 40% der Patienten gleichzeitig ein Ulkus besteht, verkompliziert sich die Diagnose durch die Möglichkeit einer begleitenden Osteomyelitis, welche als wichtigste Differentialdiagnose radiologisch ausgeschlossen werden muss (2)(36). In der postakuten Phase zeigt sich ein Rückgang der Entzündungszeichen und nach zunehmender Konsolidierung der knöchernen Destruktion ein reizloser, deformierter Fuß, auch als ruhender oder chronischer Charcot-Fuß bezeichnet (3)(41). Die beschriebenen Veränderungen können an jedem Gelenk des Fußes und Sprunggelenks auftreten. Die häufigste Lokalisation mit ca. 60 % aller Fälle ist jedoch das Chopart- und Lisfranc-Gelenk (63)(75).

### **1.4 Einteilung in Stadien**

Der Charcot-Fuß wurde von vielen Autoren in Stadien und Typen eingeteilt. Diese bezogen sich entweder auf radiologische, anatomische oder klinische Befunde oder aber eine Kombination zweier oder aller.

Eichenholtz teilte die Arthropathie in drei radiologisch verschiedene Stadien ein. Als Erstes steht das Entwicklungsstadium, charakterisiert durch signifikante Weichteilödeme, Auftreibung des Knochens und Gelenks, osteochondrale Fragmente, Frakturen, Subluxationen und Dislokationen unterschiedlichen Ausmaßes. Die typische Bezeichnung des Fußes als Tintenlöscher-Fuß in dieser Phase kommt durch die Defor-

mierung nach Zusammenbruch des Fußlängsgewölbes zustande. Im zweiten Stadium, dem Koaleszenzstadium, ist eine Verminderung der Weichteilschwellung, Entstehung von Knochenkallus und Konsolidierung der Frakturen typisch. Schließlich kann man im Rekonstruktionsstadium Knochenheilung, Gelenkankylose und eine ossäre Hypertrophie ohne weitere klinische Zeichen der Entzündung beobachten. Das erste Stadium wird meist als aktives Stadium bezeichnet und gibt den Zustand bei akutem Charcot-Fuß wieder. Das zweite und dritte Stadium spiegelt den chronischen Charcot-Fuß in seinem Ruhe- beziehungsweise Reparationsstadium wieder. Alle drei Stadien nehmen einen Zeitraum von zwei bis drei Jahren in Anspruch. Bis 1999 erfolgten einige Weiterentwicklungen der Einteilung nach Eichenholtz durch Levin und letztlich durch Kessler (40)(47)(48). Die primär auf rein radiologischen Aspekten basierende Einteilung bezieht nun auch klinische Veränderungen des Fußes mit ein (Tabelle 1). Zu der ursprünglichen Fassung zählen jetzt ein zusätzliches Initialstadium mit im MRT nachweisbarem Knochenmarködem sowie ein Ulkus-Stadium als letztes und viertes Stadium. In letzterem kommt es bei vorliegender Neuropathie unter pathologischen Druckspitzen, den Deformierungen und der Hypomobilität zu Ulzerationen und folglich Weichteil- und Knocheninfektionen (21)(25)(72).

Tabelle 1: Stadieneinteilung der DNOAP (modifiziert nach Eichenholtz und Levin) aus (41)

Zeichenerklärung: →: geht über in; ↑: nimmt zu; ↓: nimmt ab

Verlaufsstadium	Radiologische Zeichen	Klinische Zeichen
0: Initial-Stadium	MRT: Knochenmarködem Nativ-Röntgen: unauffällig	
I: Destruktions-Stadium	Nativ-Röntgen:	Schwellung ↑
a: Fragmentations-Phase	Demineralisierung → Osteolyse → ossäre Fragmentation → Gelenkdestruktion	Rötung ↑ Überwärmung ↑ Gelenkerguss ↑
b: Luxations-Phase	Gelenk-(Sub-)Luxation → Fußdeformität	Gelenkinstabilität ↑ Fußdeformität ↑
II: Reparations-Stadium	Nativ-Röntgen: Remineralisierung → Fragmentresorption → Knochenneubildung (Osteophyten, Sklerosierung, Kallus)	Schwellung ↓ Rötung ↓ Überwärmung ↓
III: Konsolidierungs-Stadium	Nativ-Röntgen: knöcherne Fusion → Ankylose	Fußdeformität → oder ↑ Gelenkeinstellung ↑
IV: Ulkus-Stadium	Nativ-Röntgen: Fußdeformität (→ Osteitis)	Ulkus → Infektion

Eine weitere, nach dem Befallsmuster ausgerichtete Einteilung von Sanders und Frykberg unterteilt anhand der anatomischen Lokalisation der Hauptdestruktion in 5 Typen (Abbildung 1) (85): Typ I Vorfußbefall, Typ II Lisfranc-Gelenkbefall, Typ III Chopart-Gelenkbefall und Befall der Bona-Jäger-Linie, Typ IV Befall des oberen Sprunggelenks (OSG) und des Subtalargelenks sowie Typ V Befall des Calcaneus (41).

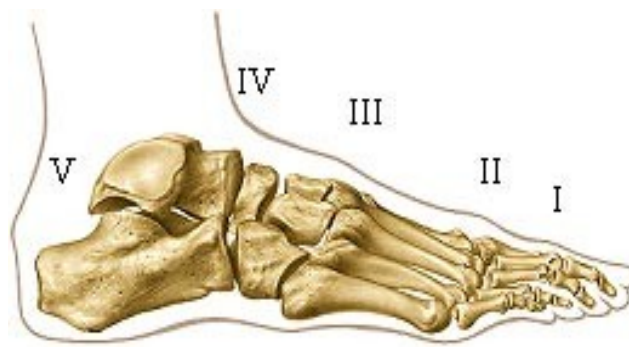


Abbildung 1(85): Einteilung des Befallsmusters der DNOAP nach Sanders und Frykberg

## 1.5 Pathophysiologie

Obwohl der genaue Pathomechanismus der Charcot-Arthropathie noch nicht komplett untersucht ist, kann man doch sagen, dass gewisse Faktoren zu dieser Erkrankung beisteuern. Die wohl bedeutendsten Komponenten sind die periphere Neuropathie mit Verlust der protektiven Schmerzwahrnehmung, mechanische Belastung, die autonome Neuropathie mit erhöhtem Blutfluss im Knochen und das Trauma (63). Auch andere Erscheinungen sind möglicherweise bei der Entstehung der DNOAP relevant. Hier sind metabolische Entgleisungen, Nierenerkrankungen, Z.n. Nierentransplantation, kortikoidinduzierte Osteoporose, Osteoklasten-Osteoblasten-Missverhältnis und die verminderte Knorpelwachstumsaktivität zu erwähnen (26)(37)(60).

Es existieren aktuell zwei Theorien, um die Vorgänge bei der neuropathischen Arthropathie zu erklären: die neurovaskuläre und die neurotraumatische Theorie. Sie basieren auf der französischen und deutschen Theorie, welche im späten 19. Jahrhundert aufgestellt wurden.

Die französische Theorie, auch neurotrophische Theorie genannt, aufgestellt von JM

Charcot besagt, dass spinale Rückenmarksläsionen jene Veränderungen an Knochen und Gelenken verursachen. Die zerstörten Nervenzentren seien für die Versorgung der Knochen und Gelenke verantwortlich und können diese damit nicht mehr gewährleisten (62). Weiterentwickelt als neurovaskuläre Theorie (20) basiert sie darauf, dass durch autonome Stimulation von vaskulären Reflexen eine Hyperperfusion im Knochen und damit ein vermehrter Abbau zustande kommt. Die so geschwächten, osteopenischen Knochen seien schon bei minimalem Stress anfälliger für pathologische Frakturen und Gelenkzerstörung (36)(62)(69).

In der deutschen Theorie behaupten Volkmann und Virchow (86), dass multiple repetitive Traumata der Auslöser für die typischen Osteopathien und Arthropathien bei fehlender protektiver Schmerzwahrnehmung in den Gelenken seien (25). Die andauernde Fehlbelastung des Gelenks bei Neuropathie führt damit zu den typischen Destruktionen von Knochen- und Weichteilgewebe und damit zum Vollbild der Charcot-Arthropathie (35). In der als neurotraumatischen weitergeführten Theorie wird sowohl von auslösenden Makrotraumata, wie Distorsionen, Frakturen oder Operationen, als auch von Mikrotraumata, wie Mikrofrakturen oder Mikrodislokationen bei chronischer Überbelastung gesprochen (60)(68). Intrinsische Muskelmissverhältnisse von Fuß- und Unterschenkelmuskulatur bei begleitender motorischer Neuropathie und plantare Druckspitzen verstärken noch die exzentrische Fehlbelastung mit Mikrofrakturen, Hypermobilität der Ligamente und Fortschreiten des Knochenabbaus (39) (69).

Die Wahrscheinlichkeit ist hoch, dass die wahre Pathogenese ein multifaktorielles Ereignis, bestehend aus den o.g. Theorien sowie neuen Erkenntnissen, welche inflammatorische Cytokine und andere Botenstoffe miteinbeziehen sei (34)(76)(77). Hierbei

wird von einer überschießenden entzündlichen Reaktion auf ein traumatisches Ereignis gesprochen, welche zur Entwicklung des akuten Charcot-Fußes führen soll. Die Cytokine, Interleukin-1(IL-1) und Tumornekrosefaktor (TNF), wurden von Baumhauer et al. (8) in erhöhter Konzentration bei Patienten mit Charcot Arthropathie nachgewiesen, genauso wie die Anwesenheit und Aktivität von Osteoklasten (23). Jeffcoate et al. (34) erklären den Prozess der Osteolyse mit Stimulation der Osteoklastensynthese durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear kappaB (NF-κB). Dieser Faktor wiederum ist von der Expression des speziellen Rezeptoraktivators (receptor activator of NF-κB ligand = RANKL) abhängig, welche durch die o.g. proinflammatorischen Cytokine getriggert wird. Der genaue Mechanismus der Beendigung dieses Prozesses ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch könnte Schmerzwahrnehmung eine Erklärung geben. Die reflektorische, schmerzbedingte Ruhigstellung des betroffenen Knochens resultierte dann in verminderter Belastung und reduziertem, lokalem Blutfluss. Hierbei können schmerzwahrnehmende Neuropeptide, wie Substanz P, eine wichtige Rolle in der Regulation des inflammatorischen Prozesses spielen (34).

### **1.6 Sensibles Nervensystem**

Das Neuropeptid Substanz P (SP) wurde von von Euler und Gaddum 1931 als hypotensiv wirkende und die glatte Muskulatur stimulierende Substanz entdeckt (29). Im Jahr 1971 gelang es Leeman's Mitarbeitern die genaue Struktur der Substanz P zu identifizieren (45)(54). Substanz P ist ein Undecapeptid und stammt aus der Familie der Tachykinine. Genauso wie die Tachykinine Neurokinin A und Neurokinin B leitet es sich bei Säugern vom Preprotachykinin I- bzw. II-Gen, welche auch für andere Tachykinine kodieren ab. Ihre neurologische Wirkung entfalten sie über spezifische

Zelloberflächenrezeptoren, als Neurokinin 1 (NK1)-, Neurokinin 2 (NK2)- und Neurokinin 3 (NK3)-Rezeptoren bezeichnet. Alle Tachykinine wirken in bestimmter Konzentration an allen drei Rezeptoren, jedoch hat SP die höchste Affinität zum NK1-Rezeptor, Neurokinin A zum NK2-Rezeptor und Neurokinin B zum NK3-Rezeptor (29)(59). Die biologische Wirkungsentfaltung erfolgt dann über eine G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C, woraufhin es in der Zelle mittels *second messenger* zu einer Freisetzung der intrazellulären Kalziumvorräte kommt. Kalzium aktiviert dann die Proteinkinase C (54). Substanz P ist im zentralen und peripheren Nervensystem von Wirbeltieren weit verbreitet. Es wirkt dort sowohl als Neurotransmitter als auch als Neuromodulator (87). Es wird in den Spinalganglien synthetisiert und von dort aus durch axonalen Transport an die zentralen und peripheren Nevenendigungen gebracht. Peripher sind das unmyelinisierte, afferente Nervenfasern (C-Fasern), welche nozizeptive Eigenschaften aufweisen. Im zentralen Nervensystem akkumuliert SP mit der höchsten Konzentration in den Hinterwurzeln und dem Hinterwurzelganglion des Rückenmarks (27). Nach afferenter sensorischer Stimulation erfolgt ein antidromer Transport über dieselben C-Fasern nach peripher, wo die Wirkung in Form von Vasodilatation, Plasmaextravasation und Zunahme der Gefäßpermeabilität stattfindet (46). Alles typische Effekte wie man sie bei einer akuten Entzündungsreaktion zu sehen bekommt. Daher bezeichnet man die Reaktion auf sensorische Stimuli mit SP als Mediator auch als neurogene Inflammation (22). Die Vasodilatation wird über den NK1-Rezeptor und einen *second messenger* Pfad erzeugt. Jedoch wurde auch nachgewiesen, dass diese Reaktionen nicht allein durch SP, sondern auch durch sekundär aus Mastzellen freigesetztes Histamin hervorgerufen werden (28). Der Hauptmediator für die erhöhte Gefäßpermeabilität ist SP über den direkt auf den Endothel-



zellen sitzenden NK1-Rezeptor (30)(46). Die Synthese von Substanz P wurde nicht nur in neuronalen Geweben nachgewiesen, sie konnte auch in Entzündungszellen wie Makrophagen, Eosinophilen, Lymphozyten und dendritischen Zellen gezeigt werden (28). Weiterhin stimuliert SP die Proliferation und die Immunglobulinsynthese von Lymphozyten (22), die Leukozytenadhäsion an Gefäßwände sowie deren Diapedese in das entzündete Gewebe. SP induziert die Freisetzung von Cytokinen wie Interleukin-1 (IL-1) (51), Interleukin-2 (IL-2) (10), Interleukin-8 (IL-8) (64) und Tumornekrosefaktor (TNF) (9)(11). Weiterhin stimuliert es Prostaglandin E<sub>2</sub> (50) und NF- $\kappa$ B (49), fördert die Basophilendegranulation und aktiviert die Synthese von zytotoxischen Sauerstoffradikalen in Neutrophilen (30)(54). SP spielt noch dazu in der Bildung extrazellulärer Matrix durch proliferative Eigenschaften eine bedeutende Rolle. Sie wirkt mitogen an glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Synoviozyten (54). Die Inaktivierung von SP erfolgt entweder durch enzymalen Abbau oder Internalisierung des Peptid-Rezeptor-Komplexes. Ein weiteres inhibitorisches Kontrollsystem ist das sympathische Nervensystem. Noradrenalin verhindert die weitere Freilassung von Transmittern aus den peripheren Nervenendigungen durch Stimulierung von präsynaptischen  $\alpha$ 2-Adrenozeptoren (30).

Die Beteiligung von Substanz P am nozizeptiven System, an entzündlichen Prozessen und die Induktion von inflammatorischen Substanzen durch Substanz P ist bekannt. Weiterhin wurde bereits der vermehrte Nachweis von SP bei Patienten mit rheumatoider Arthritis in synovialer Flüssigkeit sowie die höhere Anzahl von NK1-Rezeptoren in rheumatisch verändertem Gewebe beschrieben (22)(80). Diese Erfahrungen lassen damit die Vermutung zu, dass SP auch beim Charcot-Fuß eine gewisse Rolle spielt.

## **1.7 Sympathisches Nervensystem**

Das sympathische Nervensystem ist Teil des vegetativen Nervensystems und dient der Anpassung an Anforderungs- und Stresssituationen. Es hat auf den Organismus eine ergotrope Wirkung. Das Ergebnis eines erhöhten Sympatikonus durch aktivierte sympathische Nervenfasern zeigt sich in einem Anstieg an Adrenalin, Noradrenalin (NA) und Adenosin sowohl systemisch als auch in der direkten Umgebung der Nervenendigungen. Dies führt zu einer intrazellulären cAMP-Erhöhung in den Zielzellen und damit zur Auslösung einer Kaskade von antiinflammatorischen Effekten (73). Adrenalin und Noradrenalin werden auch als Katecholamine bezeichnet. In der Biosynthese leiten sich beide Substanzen aus dem Tyrosin ab. Dieses wird durch das Schrittmacherenzym Tyrosinhydroxylase oxidiert, welches in dieser Studie auch als Markersubstanz für das sympathische Nervensystem herangezogen wurde. Durch weitere Decarboxylierungs- und Oxidationsschritte in den sympathischen Nervenendigungen wird Noradrenalin gebildet. Im Nebennierenmark erfolgt außerdem durch Methylierung von Noradrenalin die Umwandlung in Adrenalin (19)(79). Adenosin, ein Neuromodulator, entsteht durch intra- und extrazellulären Abbau von Adenosintriphosphat (ATP). ATP und Noradrenalin sind, in Sekretgranula verpackt, in den sympathischen Nervenendigungen kolokalisiert und binden an verschiedene Rezeptorsubtypen mit unterschiedlicher Signalweiterleitung. Der präferierte Rezeptorsubtyp wiederum ist abhängig von der lokalen Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt. Eine antiinflammatorische Wirkung wird nur bei hohen Transmitterkonzentrationen zwischen  $10^{-6}$  bis  $10^{-5}$  M angenommen, da dann an jene Rezeptoren gebunden wird, welche die intrazelluläre cAMP Konzentration steigen lassen. Diese entsprechen bei NA den  $\beta$ -Adrenozeptoren und bei Adenosin den A2-Adenosinrezeptoren.

ren. Dabei haben der  $\beta$ -Adrenozeptor und der A2-Adenosinrezeptor die höchste antiinflammatorische Wirkung von allen sympathischen Rezeptoren. Bei niedrigen Konzentrationen  $\leq 10^{-7}$  M ist die Affinität von NA zu  $\alpha$ -Adrenozeptoren und von Adenosin zu A1-Adenosinrezeptoren am höchsten, welche die intrazelluläre cAMP Konzentration vermindern (52). Die Stimulation von  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren fördert die TNF Sekretion und bringt damit proinflammatorische Eigenschaften mit sich (70). Ebenfalls proinflammatorische Effekte entstehen durch die Sensibilisierung von primär afferenten sensiblen Nervenfasern mit konsekutiver SP-Freisetzung durch  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren, A1-Adenosinrezeptoren und anderer (33). Die antiinflammatorischen Effekte durch intrazelluläre cAMP Erhöhung bestehen aus einer Hemmung von Sauerstoffradikalen, der Antigenpräsentation, IL-2, IL-12, Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) und TNF sowie einer Zunahme von IL-10 (70). Darüber hinaus enthalten sympathische Nervenendigungen Vesikel mit endogenen Opioiden. Sie entwickeln ihre antiinflammatorische Wirkung, indem sie als Ligand an den präsynaptischen sensiblen Nervenendigungen die Freilassung von SP hemmen (71). Hierdurch wird die Kaskade von proinflammatorischen Effekten durch SP blockiert. Die antiinflammatorische Auswirkung durch NA oder Adenosin erfolgt bei genügend hohen Konzentrationen im Gewebe. Hierfür ist dementsprechend eine hohe Nervenfaserdichte notwendig (73). Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde jedoch bereits eine Verminderung der sympathischen Nervenfasern nachgewiesen (52). Eine komplette Sympathektomie würde daher gegebenenfalls eine Verminderung der entzündlichen Reaktionen zur Folge haben, da damit auch die  $\alpha 2$ -adrenergen Pfade erloschen sind (44). Das sympathische Nervensystem zeigt also sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen durch ihren Transmitter Noradrenalin und den Neuromodula-

tor Adenosin sowie durch endogene Opiode. Jedoch ist für den antiinflammatorischen Effekt eine hohe Nervenfaserdichte nötig um die ausreichende Konzentration der Transmitter zu erreichen.

### **1.8 Ziel der Arbeit**

Das Verhalten von sensiblen und sympathischen Nervenfasern in Charcot-Gelenken wurde bisher nicht beschrieben. Es ist jedoch von Bedeutung, da der Verlust der sensiblen und sympathischen Innervation wohl eine zentrale Funktion in der Entstehung dieses Krankheitsbildes einnimmt (17)(81). Normalerweise wird die sensible und sympathische Innervation durch klinisch-physiologische Tests, wie z.B. neurophysiologische Tests und Blutflussuntersuchungen (Laser-Doppler-Flussmessung oder Nagelfalz-Kapillaroskopie) untersucht.

Die Untersuchung kann von großer Bedeutung sein, da bei Patienten mit Arthritiden mit hoher inflammatorischer Aktivität, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis, der Verlust von sympathischen Nervenfasern und die Zunahme von sensiblen Nervenfasern in entzündetem Gewebe bereits beschrieben wurde (52). Es scheint wohl, dass der inflammatorische Prozess direkt mit einem Verlust von sympathischen Nervenfasern einhergeht, wobei sensible Substanz P-positive (SP+) Nervenfasern intakt bleiben oder sogar in entzündetes Gewebe einwachsen (52). Dieses entgegengesetzte Verhalten von sympathischen und sensiblen Nervenfasern, so wird vermutet, soll von verschiedenen Einflüssen von Nervenrepulsionsfaktoren abhängen (53).

Diese Studie hatte als Ziel, die Nervenfaserdichte von sympathischen und sensiblen Nervenfasern des Charcot-Fußes und für den Vergleich bei Sprunggelenksosteoarthrose zu bestimmen. Um ein vollständiges Bild der Nervenfaserdichte zu bekom-

men, wurden Knochen, angrenzendes Synovialgewebe der betroffenen Gelenke und die angrenzende Haut desselben Patienten untersucht.

## **2 MATERIAL UND METHODE**

### **2.1 Patienten**

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg geprüft und genehmigt. Alle Patienten wurden über die Absicht und das Ziel dieser Studie ausführlich informiert und gaben daraufhin ihr Einverständnis.

Insgesamt wurden 15 Patienten mit bekanntem diabetischen Charcot-Fuß und 15 Patienten mit Sprunggelenksosteoarthrose (OA), jedoch ohne klinische Zeichen einer Neuropathie und ohne Diabetes mellitus, in die Studie mit eingeschlossen. Die Operationen, bei welchen die Gewebeproben (Knochen, Kapsel, Haut) gewonnen wurden, wurden zwischen März 2004 und August 2007 an zwei verschiedenen Kliniken für spezielle Fußchirurgie mit speziellen Fachabteilungen für Patienten mit Diabetes mellitus durchgeführt. Bei den Charcot-Patienten wurde eine Arthrodese oder eine Exostosektomie durchgeführt. Die OA-Patienten erhielten eine totale Sprunggelenksarthroplastik oder eine Sprunggelenksarthrodese. In allen Fällen wurde ein intraoperativer tiefer Wundabstrich genommen um bakterielle Kontamination oder Infektion auszuschließen. Das Durchschnittsalter und die Geschlechterverteilung waren in beiden Gruppen ausgewogen, wie aus Tabelle 2 nachvollziehbar ist. Des weiteren sind in dieser Tabelle klinische Angaben, Einteilungen in die Arthropathie- und Neuropathiestadien, Untersuchungsergebnisse und Medikamenteneinnahme von allen Patienten zusammengestellt.

Tabelle 2: Charakteristik der Studienpatienten

Angabe der Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Prozentwerte in runden Klammern und Skalabereiche in eckigen Klammern. Abkürzungen: NSAIDs = non-steroidal antiinflammatory drugs, n.a. = nicht angewendet, nicht anwendbar.

	Osteoarthrose	Charcot-Fuß
Anzahl	15	15
Alter in Jahren	61.5 $\pm$ 3.0	61.2 $\pm$ 2.3
Geschlecht w/m, n (%)	7/8 (47/53)	6/9 (30/60)
Dauer des Diabetes in Jahren	n.a.	15 $\pm$ 8.9
Lokalisation der Arthropathie, n (%)	Sprunggelenk	Sanders II: n=6 (40) Sanders III: n=6 (40) Sanders IV: n=3 (20)
Stadium der Arthropathie	Kellgren-Lawrence III: n=4 Kellgren-Lawrence IV: n=11	Levin III: n=13 Levin IV: n=2
Ätiologie der Neuropathie	n.a.	15/15 mit Langzeit Typ II Diabetes mellitus
Dauer der Neuropathie in Jahren	n.a.	5.7 $\pm$ 4.4
Neuropathie Defizit Score [1-10]	n.a.	5.9 $\pm$ 1.1
Temperaturempfindung	n.a.	Fehlendes Wärmeempfinden bei 87% Fehlendes Kälteempfinden bei 80%
Vibrationsempfinden	n.a.	12 $\pm$ 1
Neuropathie Symptom Score [1-10]	n.a.	6.0 $\pm$ 1.4
Plantares Sensibilitätsempfinden an drei bestimmten Punkten	n.a.	0 von 3: n=11  1 von 3: n=2 2 von 3: n=2
Medikation, n (%)		
NSAIDs	13 (87)	11 (73)
Opioidanalgetika	4 (27)	3 (20)
Bisphosphonate	0 (0)	5 (33)
Orale Antidiabetika	0 (0)	7 (47)
Insulin s.c.	0 (0)	7 (47)
Protonenpumpeninhibitoren	12 (80)	9 (60)
Diuretika	2 (13)	9 (60)
Beta-Blocker	2 (13)	7 (47)

## **2.2 Stadieneinteilung von Charcot-Fuß und OA**

Die Klassifikation der Gelenkszerstörung bei Charcot-Füßen bezieht sich auf das anatomische Verteilungsmuster (61). Es wurde die üblichste Einteilung basierend auf radiologischen Bildern und physiologischen Stadien des Prozesses benutzt. Diese Klassifikation von Eichenholtz aus dem Jahre 1966 unterteilt die Osteoarthropathie in Entwicklungsstadium (I), Koaleszenzstadium (II) und Rekonstruktionsstadium (III). Levin fügte ein weiteres Stadium der chronischen Ulzeration (IV) hinzu (47)(48).

Zur Beschreibung des Fortschreitens der OA wurde der Kellgren-Lawrence-Score verwendet, welcher von Stadium I (keine radiologischen Auffälligkeiten für OA) bis Stadium IV (Zeichen der schweren OA) reicht.

## **2.3 Klinische Tests zur Neuropathie**

Einen Tag vor der Operation wurde die Anamnese erhoben und eine ausführliche klinische Untersuchung durchgeführt. Um das Vorhandensein bzw. das Ausmaß der Neuropathie einzuteilen wurde der modifizierte Neuropathie-Symptom-Score (NSS) (1)(15) und der modifizierte Neuropathie-Defizit-Score (NDS) angewandt, welcher durch vier zu untersuchende Parameter (16)(78), im Folgenden beschrieben, zu ermitteln ist. Das Vibrationsempfinden wurde mit Hilfe der 128-Hz Rydel-Seiffer-Stimmgabel geprüft (56). Es wurde die Zahl notiert, bei welcher der Untersuchte ein absolutes Verschwinden des Vibrationsempfindens angab. Zu ermitteln war diese durch das Ansteigen der Spitze eines virtuellen Dreiecks entlang einer Skala von 0-8 nach Anschlagen der Stimmgabel und Aufsetzen auf den plantaren Hallux. Demnach waren Werte zwischen 0/8-8/8 möglich. Das Temperaturempfinden wurde mittels eines handelsüblichen kalt-warm-Stifts (TipTherm™) (83) an der Dorsalseite des Fußes unter-



sucht. Mit dem PinPrick-Test wurde das Schmerzempfinden eruiert; außerdem wurde der Achillessehnenreflex getestet. Zusätzlich zu den NDS-Parametern wurde noch die superfizielle Sensibilität mit dem 10-g Semmes-Weinstein-Monofilament (SWMF) beurteilt (6). Das Nylonfilament wurde an drei festgelegten Stellen senkrecht zur Hautoberfläche aufgesetzt und solange darauf Druck ausgeübt, bis sich das Filament bog. Der gesamte Vorgang betrug ca. zwei Sekunden. Beurteilt wurde, ob dieser Druck wahrgenommen wurde oder nicht.

### ***2.4 Präparation des Gewebes und Fluoreszenzimmunhistochemie der Nervenfasern***

Die Präparation des Gewebes für die nachfolgenden histologischen Untersuchungen geschah entsprechend bereits publizierten Protokollen (47)(82). Die Proben wurden für 18 Stunden in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mit 3.7% Formaldehyd fixiert, mit PBS gewaschen und in RDO Schnellentkalker (RDO, Aurora, IL) dekalzifiziert. Anschließend wurden die Proben nochmals mit PBS gewaschen und für weitere 18 Stunden in 20% Saccharose in PBS inkubiert. In kleine Aluminiumkontainer mit Einfriermedium (Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet, wurde das Gewebe auf flüssigem Stickstoff schwimmend schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden alle Gewebeproben bei -80°C gelagert. Für die Darstellung der Nervenfasern wurden je Färbung mit Hilfe eines Kryostaten (Microtom) sechs bis acht Gewebeschnitte (5-9 µm dick) pro Patient und Gewebeart angefertigt. Diese wurden auf beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus®) übernommen und eine Stunde bei Raumtemperatur Luft getrocknet. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur, wenn nicht anders erwähnt. Es schloss sich die Rehydratation in

0,05 M Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) für zehn Minuten an und danach die Inkubation mit Blocklösung (10% bovines Serumalbumin, 10% fötales Kälberserum, 10% Ziegenserum in 0,05 M TBS) für 45 Minuten in der Feuchthaltebox, um unspezifische Bindungsstellen des Sekundärantikörpers zu blockieren. Im Anschluss wurden die Schnitte für drei Mal fünf Minuten in TBS gewaschen. Daraufhin inkubierte man die Proben mit dem Primärantikörper gegen Tyrosin-Hydroxylase (TH, cat. no. AB152, Chemicon, Temecula, CA) zur Detektion sympathischer Nervenfasern und gegen Substanz P (SP, cat. no. AB1566, Chemicon) für sensible Nervenfasern. Am nächsten Tag erfolgte das Abwaschen der überschüssigen Primärantikörper in drei Waschschritten für jeweils fünf Minuten in TBS. Die Fluoreszenzmarkierung der sympathischen und SP+ Nervenfasern wurde mittels einem mit Alexa 546 konjugiertem Sekundärantikörper, einem Anti-Kaninchen IgG (cat. no. A-11010, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) erbracht. Der Sekundärantikörper inkubierte für 90 Minuten unter Lichtschutz, welcher auch für die weiteren Schritte bestand. Es folgten drei weitere Waschgänge der Schnitte für je fünf Minuten. Anschließend wurden die Objektträger mit Hilfe des Fluoreszenzeindeckmediums (Vectashield Mounting Medium) und Deckgläschen eingedeckt und lagerten erschütterungsfrei bei 4°C über Nacht. Mikroskopisch wurde die Anzahl der sympathischen und sensiblen Nervenfasern pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung pro Quadratmillimeter ermittelt. Hierzu wurden 17 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgezählt und der Mittelwert der dabei gefundenen Nervenfasern berechnet. Als positiv zu zählende Nervenfasern galten mindestens drei bis vier perlschnurartig aufgereichte, voneinander getrennte Kügelchen entlang eines Axons mit einer Gesamtmindestlänge von 50 µm. Diese war durch ein entsprechendes Längenmaß in der Optik des Mikroskops festgelegt. Eine

Kontrolle der positiv gezählten Nervenfasern geschah durch Gewebeschnitte, welche mit polyklonalen Kontrollantikörpern inkubiert waren. In der Kontrollmikroskopie zeigten sie stets negative Ergebnisse.

## **2.5 Nachweis von SEMA3C positiven Zellen**

Für den Nachweis von SEMA3C wurde ein erst kürzlich entwickeltes Antiserum angewendet (47). Gefrierschnitte von 5 µm Dicke mindestens zwei verschiedener mit Formaldehyd fixierten Gewebeproben wurden für eine Stunde luftgetrocknet und dann in 0,05 M TBS rehydriert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 0,05 M TBS mit 10% fötalem Kälberserum, 10% bovinem Serumalbumin und 10% normalem Hühnchenserum für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Nach drei Mal fünf Minuten Waschen mit TBS wurden die Schnitte mit reinem anti-SEMA3C Kaninchenantiserum für 12-18 Stunden bei 4°C inkubiert. Wiederum erfolgten drei Waschgänge für jeweils fünf Minuten und anschließend die Inkubation mit einem mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Sekundärantikörper gegen Kaninchen IgG (cat. no. D0487, Dako, Hamburg, Deutschland). Die Visualisierung positiv markierter Zellen erfolgte nach einem weiteren Waschvorgang mit BCIP/NBT Substrat (cat. no. K0598, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland). Kontrollschnitte mit PREIMMUNIZATION Serum und mit Peptid-neutralisiertem SEMA3C Antikörper wurden gleichzeitig angefertigt (47). Sie gaben immer negative Ergebnisse.

## **2.6 Präsentation der Daten und statistische Analysen**

Die Gruppenmediane wurden mit Hilfe des Mann-Whitney Tests nicht-parametrisch verglichen, gepaarte Daten mittels des nicht-parametrischen Wilcoxon Tests und Kor-

relationen wurden mit der nicht-parametrischen Rangkorrelationsanalyse nach Spearman (SPSS/PC, V.12.0, SPSS Inc., Chicago, IL) berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3 ERGEBNISSE

Die SP+ Nervenfaserdichte an Haut, Synovia und Knochen war bei OA-Patienten im Vergleich zu Charcot-Patienten ähnlich (Abbildung 2). Weiterhin unterschied sich die Dichte von SP+ Nervenfasern nicht zwischen Haut und Synovia (in OA  $p=0.730$ ; in Charcot  $p=0.798$ ), Haut und Knochen (in OA  $p=0.532$ ; in Charcot  $p=0.396$ ) und auch nicht zwischen Synovia und Knochen (in OA  $p=0.146$ ; in Charcot  $p=0.088$ ). Somit ist die Dichte von SP+ Nervenfasern bei OA-Patienten verglichen mit Charcot-Patienten, unabhängig von der Lokalisation, nicht verschieden.

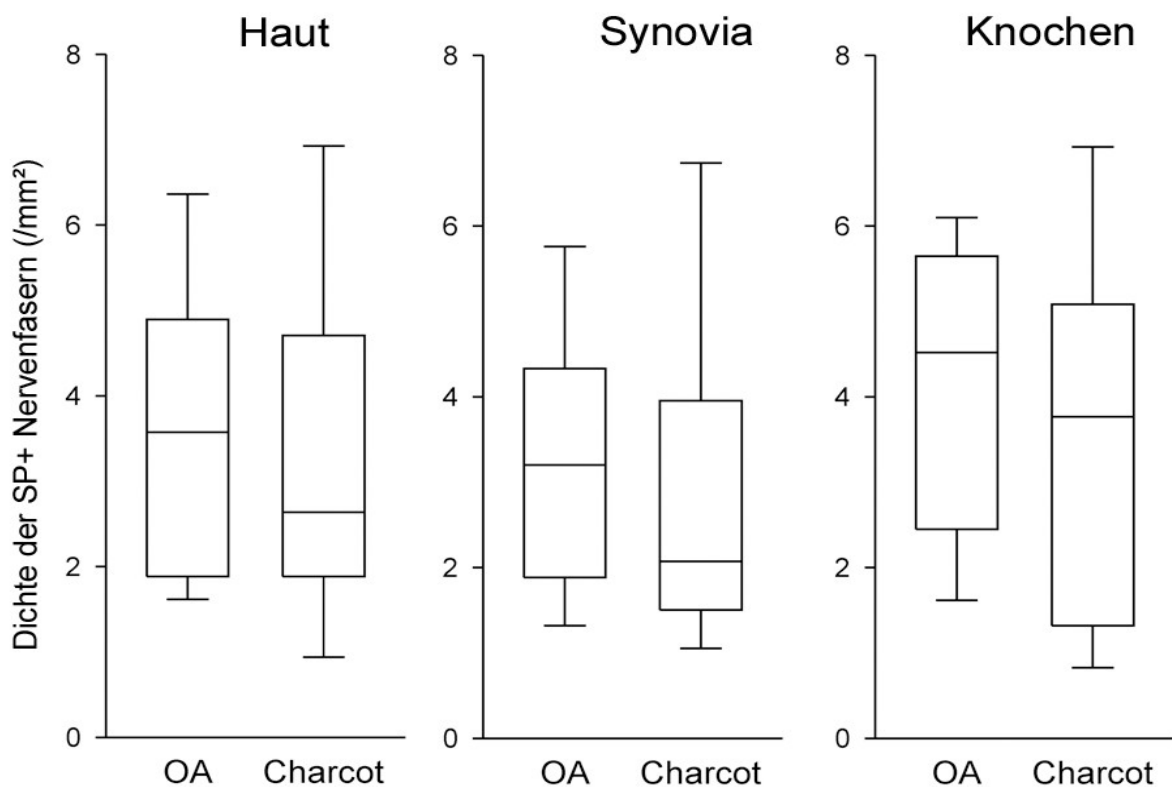


Abbildung 2: Dichte von Substanz P positiven Nervenfasern in der Haut, Synovia und im Knochen bei Patienten mit OA und Charcot-Fuß. Die Box-Plots zeigen die 10. und 90. Perzentile (Whiskers), die 25. und die 75. Perzentile und den Median.

Es wurde vermutet, dass der sympathische Einfluss beim Charcot-Fuß eine schädigende Rolle spielt (53). Erstaunlicherweise wurde aber bisher die quantitative Erfassung der Dichte der sympathischen Nervenfasern noch nicht gezielt durchgeführt. In allen drei untersuchten Gewebearten war die Dichte von sympathischen Nervenfasern bei Charcot-Patienten geringer als bei OA-Patienten (Abbildung 3). Außerdem war die Dichte sympathischer Nervenfasern in der Haut verglichen mit Synovia bei OA höher ( $p=0.011$ ). Bei der Charcot-Arthropathie schien dies ebenso der Fall zu sein ( $p=0.073$ ).

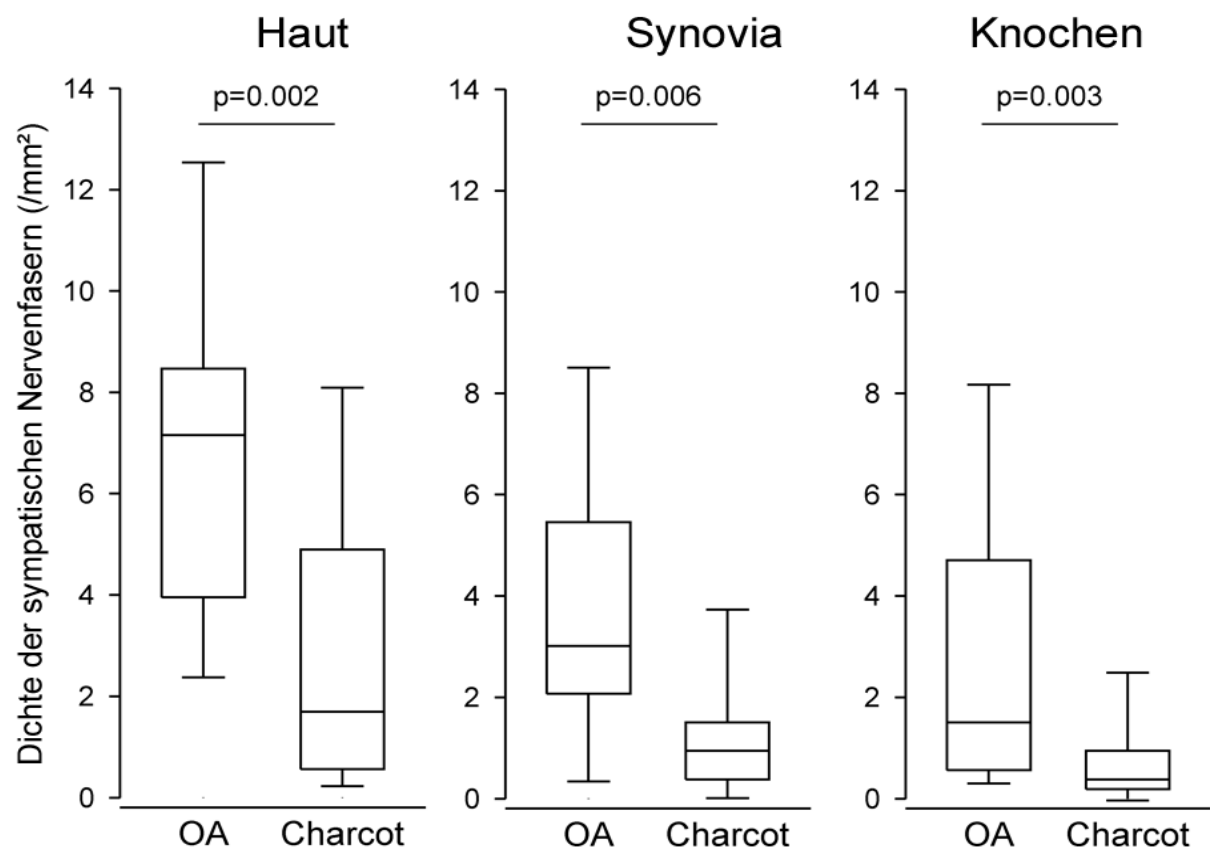
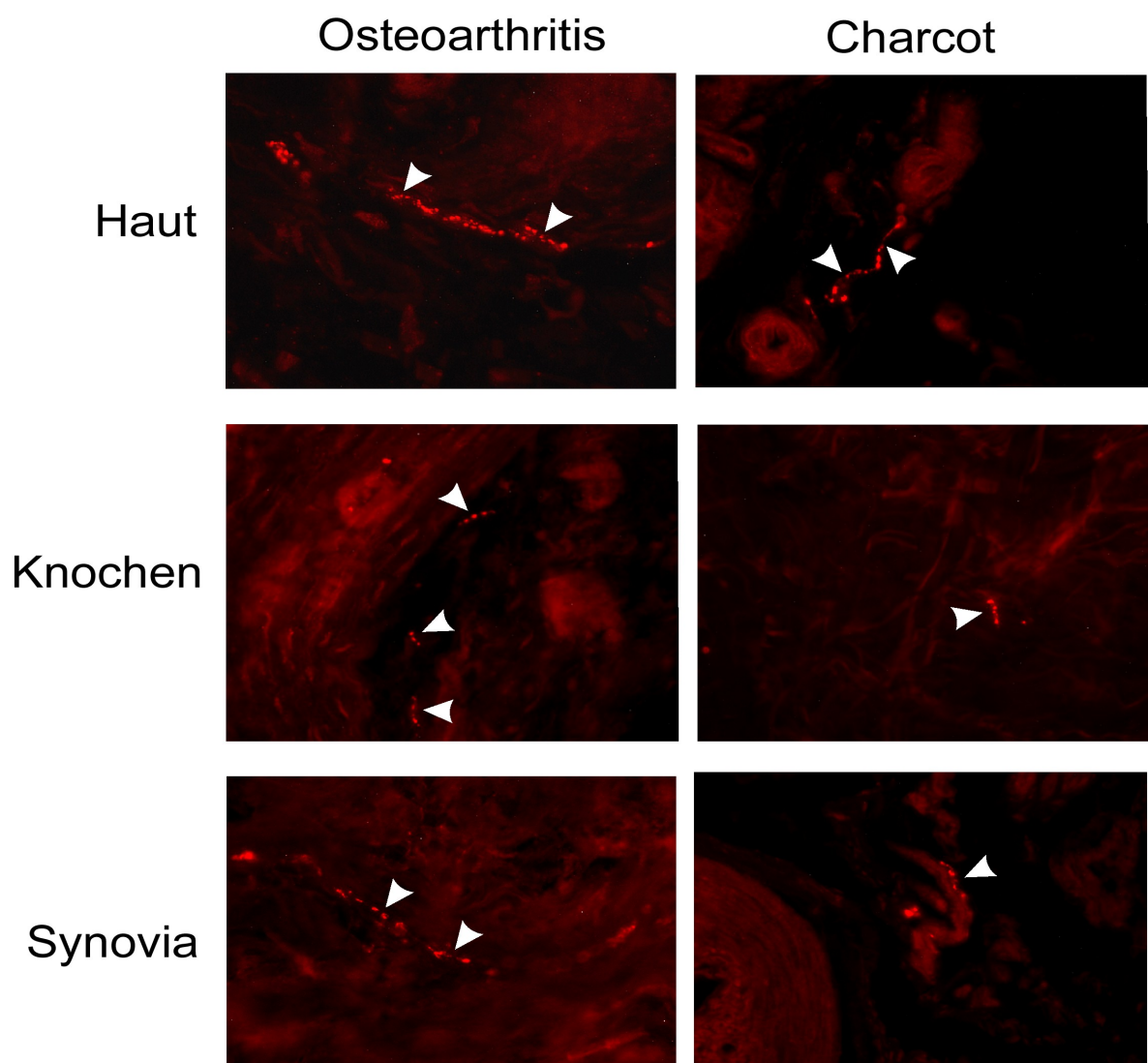


Abbildung 3: Dichte von sympathischen Nervenfasern in der Haut, Synovia und im Knochen bei Patienten mit OA und Charcot-Fuß. Die Box-Plots zeigen die 10. und 90. Perzentile (Whiskers), die 25. und die 75. Perzentile und den Median. Der p-Wert macht einen signifikanten Unterschied zwischen OA und Charcot-Fuß deutlich.

Bei beiden Gruppen war die Nervenfaserdichte von sympathischen Nervenfasern in der Haut verglichen zu Knochen bedeutend höher (in OA  $p=0.001$ ; in Charcot  $p=0.008$ ), die Dichte in Synovia verglichen mit der in Knochen hingegen zeigte keinen Unterschied (Abbildung 3). Hieraus ergibt sich, dass die sympathische Nervenfaserdichte in der Haut mit Abstand am höchsten war, gefolgt von Synovia und Knochen.



„Abbildung 4: Färbung Tyrosinhydroxylase positiver Nervenfasern in Haut, Knochen und Synovia bei Osteoarthrose- und Charcot-Patienten zeigen die typische perlenkettenartige Anordnung bei 400-facher Vergrößerung.“

Die Anwendung einer ähnlichen Methode zur quantitativen Bestimmung von SP+ und sympathischen Nervenfasern erlaubte es eine Ratio zu berechnen, welche das Übergewicht von sympathischen zu SP+ Nervenfasern zeigt (Ratio = Dichte sympathischer Nervenfasern/Dichte SP+ Nervenfasern). Dieser Quotient war bei OA-Patienten eindeutig höher im Vergleich zu Charcot-Patienten sowohl in der Haut, als auch in Synovia und im Knochen (Abbildung 5). Dies bedeutet, dass sympathische Nervenfasern gegenüber SP+ Nervenfasern in allen untersuchten Geweben bei OA-Patienten im Vergleich zu Charcot-Patienten überwogen.

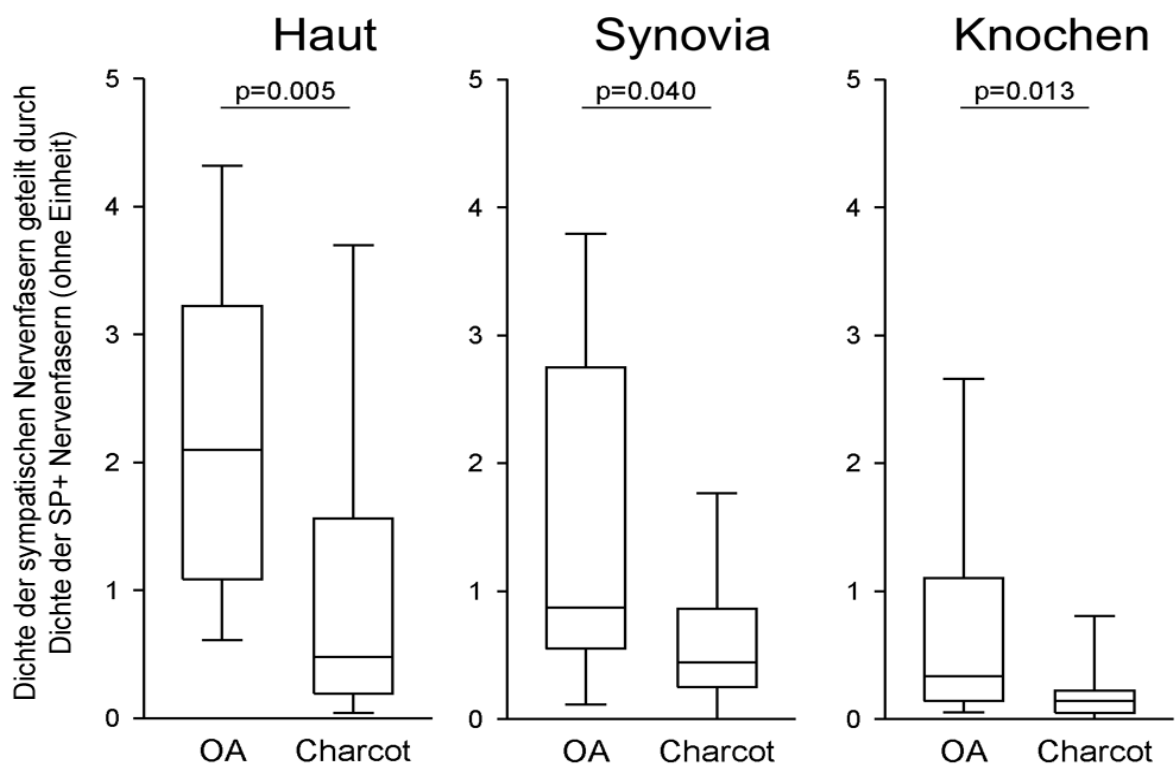


Abbildung 5: Die Dichte der sympathischen Nervenfasern in Relation zu Substanz P positiven Nervenfasern bei Patienten mit OA und Charcot-Fuß: Der Graph stellt den Quotienten aus der Dichte der sympathischen Nervenfasern dividiert durch die Dichte von Substanz P positiven Nervenfasern dar.



SEMA3C ist ein Nervenrepulsionsfaktor, welcher für den Verlust von sympathischen Nervenfasern verantwortlich sein kann. Wesentlich bei diesen Untersuchungen war die sehr hohe Expression von SEMA3C bei Charcot-Patienten im Synovialgewebe, gefolgt von Knochen, und mit spärlicher Expression in der Haut (Abbildung 6). Diese Ergebnisse korrespondieren sehr gut mit der oben genannten Verteilung sympathischer Nervenfasern in Haut, Synovia und Knochen bei Charcot-Patienten.

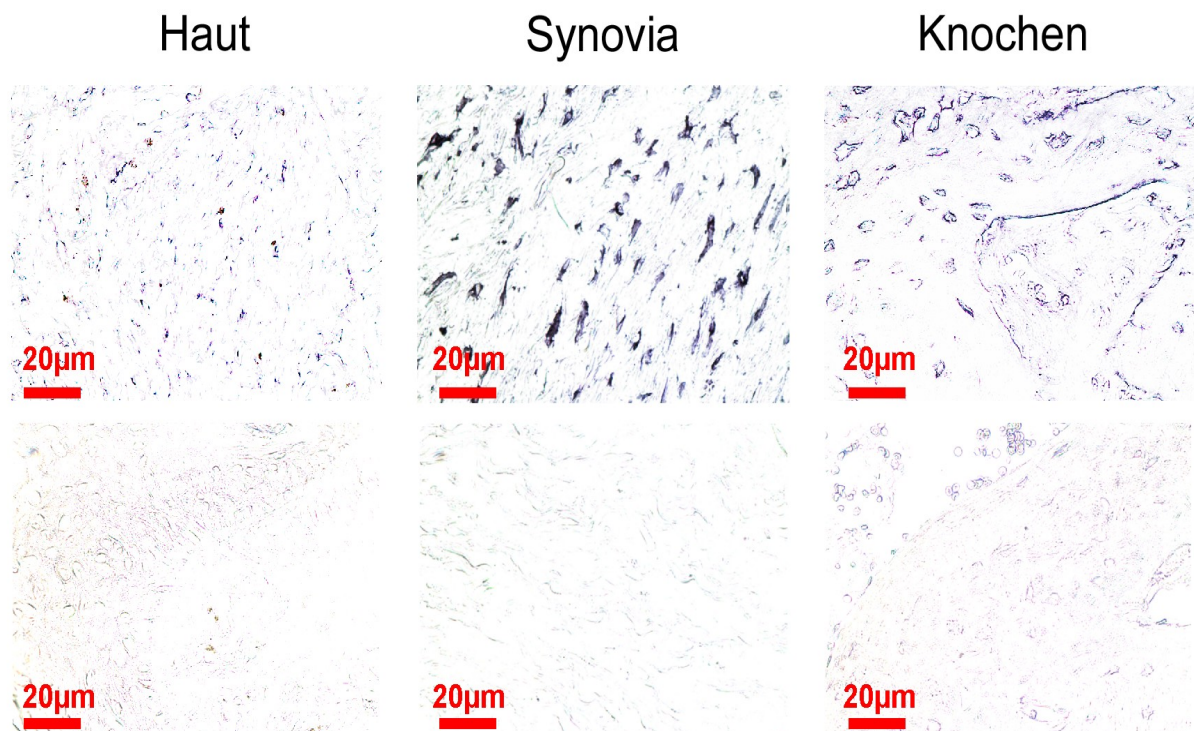


Abbildung 6: Die obere Reihe zeigt die immunhistochemische Expression von SEMA3C. In der unteren Reihe sind die Kontrollanfärbungen zu sehen. Vergrößerung 400-fach.

## 4 DISKUSSION

Es ist offensichtlich so, dass alle Ätiologien des Charcot-Fußes mit Veränderungen der sympathischen und/oder der sensiblen Nervenfasern einhergehen. Trotzdem sind bisher keine Studien verfügbar, welche beide Nervenfasertypen in vergleichender Weise und Quantität untersucht hätten. Ursache dafür scheint höchstwahrscheinlich die schwierige Beschaffung von Kontrollgewebe von Patienten zu sein, welche nicht an einer Charcot-Arthropathie oder Diabetes mellitus leiden. Im Rahmen dieser Studie war es möglich Patienten mit Osteoarthrose des Sprunggelenkes als Kontrollgruppe mit einzubringen. Es ist die einzig verfügbare Patientengruppe mit einer großen Operation an derselben Stelle, bei welcher ebenfalls große Gewebeteile für die immunhistochemische Untersuchung entnommen werden können.

Es zeigte sich ein deutlicher Verlust von sympathischen Nervenfasern im chronisch entzündeten Tarsus sowie in der angrenzenden Haut im Vergleich zu OA. In der Tat entsprach dies der Vermutung, einen Abfall der sympathischen Nervenfaserdichte zu beobachten. Bereits in mehreren Studien an menschlichem Gewebe wurde gezeigt, dass eine Entzündung allein zu einem Verlust an sympathischen Nervenfasern führen kann (82). Es sind wohl drei Faktoren, die eine Neurodegeneration bei Entzündungen ausmachen: (1) oxidativer Stress und proinflammatorische Cytokine, wie der Tumornekrosefaktor, (2) Nervenfaseraoptose und (3) die Abstoßung von Nervenfasern, welche zur Depletion der Fasern führen. Alle drei Mechanismen scheinen sich im chronischen Charcot-Fuß abzuspielen. Dennoch ist die Nervenfaserabstoßungstheorie zu favorisieren, um die beobachtete sympathische Neurodegeneration zu erklären, da keinerlei sensible SP+ Nervenfasern betroffen waren. Außerdem können

sich Nervenfasern während der Entzündung zurückziehen und wieder einwachsen, was bedeutet, dass sie nicht nekrotisch oder apoptotisch sind (31). Die Erklärung des spezifischen Verlusts von sympathischen, aber eben nicht sensiblen Nervenfasern, stellt sich nicht einfach dar, wenn man sich allein auf allgemeine neurodegenerative Faktoren wie oxidativen Stress, schädliche Cytokine und Nervenfaseraoptose stützt. Es scheint, dass der Verlust von sympathischen Nervenfasern spezifisch und absichtlich ist.

Neben Nervenwachstumsfaktoren (welche chemotaktisch und wachstumsfördernd sind), sind Nervenrepulsionsfaktoren (welche chemorepellent sind) für die Führung von neuronalen Axonen notwendig. Sensible und sympathische Nervenfasern verlaufen in verschiedenen anatomischen Kompartimenten. Während der embryonalen Entwicklung wird die Führung dieser Nervenfasern durch verschiedene Repulsionsfaktoren und deren Rezeptoren erreicht. Wachstumsfaktoren haben dabei keinen spezifischen Einfluss auf die Ausbildung der Nervenfasern (43). Die massive Produktion von SEMA3C bewirkt eine erhöhte Repulsion von sympathischen Nervenfasern, wobei sensible Nerven davon unberührt bleiben (13). In vorherigen Studien wurde bereits gezeigt, dass SEMA3C bei Patienten mit rheumathoider Arthritis im Vergleich zu Patienten mit Osteoarthrose oder anderen Traumakontrollpatienten erhöht ist (47). In der aktuellen Studie wurde nun die Anwesenheit von SEMA3C im Charcot-Fuß, speziell im angrenzenden Synovial- und Knochengewebe gezeigt.

Zusammenfassend ist zu vermerken, dass beim Charcot-Fuß ein deutlicher Verlust von sympathischen Nervenfasern v.a. im Knochen und im angrenzenden synovialen Gewebe charakteristisch ist. Bei der Sprunggelenksosteoarthrose, verglichen mit dem Charcot-Fuß, war die SP+ Nervenfaserdichte in beiden Gruppen ähnlich. Da die

Osteoarthrose selbst auch mit einer Verminderung der SP+ Nervenfasern einhergehen kann (66)(82), wurde möglicherweise der Verlust von sensiblen Nervenfasern beim Charcot-Fuß durch die Auswahl der o.g. Kontrollgruppe verschleiert. Damit konnte durch diese Studie eine Degeneration von sensiblen Nervenfasern beim Charcot-Fuß nicht sicher ausgeschlossen werden. Außerdem könnte auch das unkontrollierte Wachstum von SP+ sensiblen Nervenfasern in der chronischen Phase der Charcot-Arthropathie den neurodegenerativen Prozess verbergen. Trotzdem war der Verlust von sympathischen Nervenfasern beim Charcot-Fuß in größerem Ausmaß vermutet als der wahrscheinliche Verlust von SP+ Nervenfasern, wie die Ratio der beiden Nervenfasertypen zeigte.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die periphere, sensible und autonome Neuropathie sind allgemein bekannte Bedingungsfaktoren für den Charcot-Fuß. Es ist ein seltenes, jedoch kompliziertes Krankheitsbild des Vorfußes bzw. Sprunggelenks mit schweren Folgen von Deformationen und pathologischer Druckverteilung auf der Fußsohle. In unserer Gesellschaft vorwiegend Diabetiker betreffend, gibt es jedoch auch Endemiegebiete der Lepra, wo diese als Hauptursache des Charcot-Fußes gilt. Ziel dieser Studie war es, das Verhalten der sensiblen und sympathischen Nervenfasern zu untersuchen. Hierfür wurden bei Patienten mit Charcot-Fuß die genannten Nervenfasern an Knochen, Synovia und Haut im Bereich des Tarsus untersucht. Sensible Nervenfasern übermitteln die Schmerzempfindung über die Transmittersubstanz SP, welche eine proinflammatorische Wirkung zeigt. Der Neurotransmitter Noradrenalin und der Neuromodulator Adenosin des sympathischen Nervensystems besitzen antiinflammatorische Eigenschaften, indem sie unter anderem mit dem sensiblen Nervensystem interagieren. Verstärkt wird diese Wirkung noch durch Abgabe von endogenen Opioiden, welche die sensible Wirkung vermindern.

Es wurden 15 Patienten mit Charcot-Fuß und als Kontrollgruppe 15 Patienten mit Osteoarthritis in die Studie mit eingeschlossen. Die quantitative Ermittlung der Nervenfasern erfolgte durch Immunhistochemie. Die Antikörper der sensiblen Nervenfasern richteten sich gegen SP, die der sympathischen Nervenfasern gegen das Enzym Tyrosin-Hydroxylase. Desweiteren wurde die Expression von SEMA3C positiven Zellen, einem Nervenrepulsionsfaktor untersucht.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte unabhängig von der Lokalisation keinen

Unterschied in der Nervenfaserdichte von SP+ Nervenfasern beim Charcot-Fuß im Vergleich zur OA. Bei den sympathischen Nervenfasern konnte insgesamt ein deutlicher Verlust bei Charcot-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten gezeigt werden. Im Knochen und im angrenzenden Synovialgewebe war dieser Verlust noch stärker ausgeprägt als in der Haut. Eine Ratio aus sympathischer Nervenfaserdichte und SP+ Nervenfaserdichte zeigte überall ein Übergewicht von sympathischen Nervenfasern bei OA-Patienten. Die Expression von SEMA3C positiven Zellen bei Charcot-Patienten konnte in Knochen- und Synovialgewebe erhöht und deutlich geringer in der Haut nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis korreliert mit der Nervenfaserdichte sympathischer Nervenfasern in den jeweiligen Geweben. Der deutliche Verlust von sympathischen Nervenfasern im späten Verlauf der Erkrankung könnte ein wichtiger Faktor sein.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Abbott CA, Carrington AL, Ashe H, et al. The North - West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. *Diabet Med.* 2002;19:377–384.
- (2) Armstrong DG, Lavery LA. Acute Charcot's arthropathy of the foot and ankle. *Phys Ther.* 1998;78:74-80.
- (3) Armstrong DG, Lavery LA. Monitoring healing of acute Charcot's arthropathy with infrared dermal thermometry. *Journal of Rehabilitation Research and Development.* 1997;34:317-321.
- (4) Armstrong DG, Peters EJG. Charcot's arthropathy of the foot. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2002;92:390-394.
- (5) Armstrong DG, Todd WF, Lavery LA, et al. The natural history of acute Charcot's arthropathy in a diabetic foot speciality clinic. *J Am Podiatr Med Assoc.* 1997;87:272-276.
- (6) Armstrong DG. The 10-g monofilament: the diagnostic divining rod for the diabetic foot? *Diabetes Care.* 2000;23:887.
- (7) Bailey CC, Root HE. Neuropathic joint lesions in diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1942;21:649.
- (8) Baumhauer JF, O'Keefe RJ, Schon LC et al. MS. Cytokine-induced osteoclastic bone resorption in Charcot arthropathy: A immunohistochemical study. *Foot Ankle Int.* 2006;27:797-800.
- (9) Branchet-Gumila MC, Boisnic S, Le Charpentier Y et al. Neurogenic modifications induced by substance P in an organ culture of human skin. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology.* 1999;12:211-220.

- (10) Calvo CF, Chavanel G, Senik A. Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells. *J Immunol.* 1992;148:3498-3504.
- (11) Chancellor-Freeland C, Zhu GF, Kage R et al. Substance P and stress-induced changes in macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;771:472-484.
- (12) Charcot JM. Sur quelques arthropathies qui paraissent de'pendre d'une le'sion du cerveau ou de la moelle e'pinie`re. *Arch Physiol Norm Pathol.* 1868;1:161–178.
- (13) Chen H, He Z, Bagri A, et al. Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron.* 1998;21:1283–1290.
- (14) Copland WA. Bone changes in diabetes. *Proc Roy Soc Med.* 1954;47:345.
- (15) Dyck PJ, Kratz KM, Lehman KA, et al. The Rochester Diabetic Neuropathy Study: design, criteria for types of neuropathy, selection bias, and reproducibility of neuropathic tests. *Neurology.* 1991;41:799–807.
- (16) Dyck PJ, Sherman WR, Hallcher LM, et al. Human diabetic endoneurial sorbitol, fructose, and myo-inositol related to sural nerve morphometry. *Ann Neurol.* 1980;8:590–596.
- (17) Dyck PJ, Stevens JC, O'Brien PC, et al. Neurogenic arthropathy and recurring fractures with subclinical inherited neuropathy. *Neurology.* 1983;33:357–367.
- (18) Eckardt A, Lobmann R. *Der diabetische Fuß.* Springer Verlag, Heidelberg, 2005.
- (19) Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP et al. The sympathetic nerve – a integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000;52:595-638.
- (20) Frykberg RG. Charcot changes in the diabetic foot. In: Veves A, LoGerfo FW.



- The diabetic foot: medical and surgical management. Humana Press, Totowa, 2002.
- (21) Frykberg RG, Rogers LC. The diabetic Charcot foot: A primer on conservative and surgical management. J Diabetic Foot Complications. 2009;1:19-25.
  - (22) Garret NE, Mapp PI, Cruwys SC et al. Role of substance P in inflammatory arthritis. Ann Rheum Dis. 1992;51:1014-1018.
  - (23) Gough A, Abraha H, Li F, et al. Measurement of markers of osteoclast and osteoblast activity in patients with acute and chronic diabetic Charcot neuroarthropathy. Diabetic Medicine. 1997;14:527-531.
  - (24) Gries A, Cameron NE, Low PA et al. Textbook of diabetic neuropathy. Thieme, New York, 2003.
  - (25) Gupta PPK, Mohan V. Charcot foot- an update. JAPI. 2003;51:367-372.
  - (26) Haddad J. Foot deformities commonly seen in diabetic patients. Podiatry Management. 2002;23:119-128.
  - (27) Harmar A, Schofield JG, Keen P. Cycloheximide-sensitive synthesis of substance P by isolated dorsal root ganglia. Nature. 1980;284:267-269.
  - (28) Herbert MK, Holzer P. Die neurogene Entzündung. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 2002;37:314-325.
  - (29) Hökfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. J Int Med. 2001;249:27-40.
  - (30) Holzer P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. Gen Pharmac. 1998;30:5-11.
  - (31) Imai S, Tokunaga Y, Konttinen YT et al. Ultrastructure of the synovial sensory peptidergic fibers is distinctively altered in different phases of adjuvant induced

- arthritis in rats: ultramorphological characterization combined with morphometric and immunohistochemical study for substance P, calcitonin gene related peptide, and protein gene product 9.5. *J Rheumatol.* 1997;24:2177–2187.
- (32) Imhoff AB, Baumgartner R, Linke RD. Checkliste Orthopädie. Thieme, Stuttgart, 2006.
- (33) Jänig W, Levine JD, Michaelis M. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Progress in Brain Research.* 1996;113:161-184.
- (34) Jeffcoate WJ, Game F, Cavanagh PR. The role of proinflammatory cytokines in the cause of neuropathic osteoarthropathy (acute Charcot foot) in diabetes. *The Lancet.* 2005;366:2058-2061.
- (35) Jeffcoate WJ. Abnormalities of vasomotor regulation in the pathogenesis of the acute Charcot foot of diabetes mellitus. *Lower Extremity Wounds.* 2005;4:133-137.
- (36) Johnsen B. Acute Charcot's arthropathy: a difficult diagnosis. *JAAPA.* 2007;20:22-26.
- (37) Johnson T. Charcot's osteoarthropathy. *CME.* 2010;28:171-175.
- (38) Jones EA, Manaster BJ, May DA, et al. Neuropathic osteoarthropathy: diagnostic dilemmas and differential Diagnosis. *RadioGraphics.* 2000;20:279-293.
- (39) Jude EB, Boulton AJM. Update on Charcot neuroarthropathy. *Curr Diab Rep.* 2001;1:228-232.
- (40) Kessler SB, Kalteis TA, Botzlar A. Prinzipien der chirurgischen Behandlung bei diabetisch-neuropathischer Osteoarthropathie. *Internist.* 1999;40:1029-1035.

- (41) Köck F, Bonnländer G. Diabetisches Fußsyndrom. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007.
- (42) Koller A, Fühner J, Wetz HH. Radiologische und klinische Aspekte der diabetisch-neuropathischen Osteoarthropathie. Orthopäde. 2004;33:972-982.
- (43) Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. Cell. 1993;75:1389–1399.
- (44) Lee A, Coderre TJ, Basbaum AI et al. Sympathetic neuron factors involved in bradykinin-induced plasma extravasation in the rat. Brain Res. 1991;557:146-148.
- (45) Leeman SE. Substance P and neurotensin: discovery, isolation, chemical characterization and physiological studies. J Exp Biol. 1980;89:193-200.
- (46) Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 1979;310:175-183.
- (47) Levin ME. Diabetes and bone. Compr Ther. 1978;4:63–72.
- (48) Levin ME. Preventing amputation in the patient with diabetes. Diabetes Care. 1995;18:1383–1394.
- (49) Lieb K, Fiebich BL, Berger M et al. The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells. J Immunol. 1997;159:4952-4958.
- (50) Lotz M, Carson DA, Vaughan JH. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. Science. 1987;235:893-895.

- (51) Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Scienes*. 1988;241:1218-1221.
- (52) Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, et al. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J*. 2000;14:2097–2107.
- (53) Miller LE, Weidler C, Falk W, et al. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1156–1163.
- (54) O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, et al. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*. 2004;201:167-180.
- (55) Petrova NL, Foster AVM, Edmonds ME. Difference in presentation of Charcot osteoarthropathy in type 1 compared with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27:1235-1236.
- (56) Rith-Najarian SJ, Stolusky T, Gohdes DM. Identifying diabetic patients at high risk for lower-extremity amputation in a primary health care setting. A prospective evaluation of simple screening criteria. *Diabetes Care*. 1992;15:1386–1389.
- (57) Robillard R, Gagnon PA, Alarie R. Diabetic neuroarthropathy: report of four cases. *Can Med Ass J*. 1964;91:795-804.
- (58) Rogers LC, Bevilacqua NJ, Dellacorte MP, et al. Charcot's arthropathy in a patient with HIV-associated neuropathy. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2008;98:153–155.
- (59) Rupniak NMJ, Kramer MS. Substance P and related Tachykinins. In: Davis KL,

- Charney D, Coyle JT, et al. Neuropsychopharmacology, the 5th Generation of Progress. Lippincott, Williams and Wilkins, New York, 2002.
- (60) Sanders LJ, Frykberg RG. Charcot neuroarthropathy of the foot. In: Bowker JH, Pfeifer MA, editors. Levin and O'Neal's the diabetic foot. Mosby, Philadelphia, 2001.
- (61) Sanders LJ. Anatomical patterns of bone and joint destruction in neuropathic diabetics. Diabetes. 1991;40:529.
- (62) Sanders LJ. The Charcot foot: historical perspective 1827–2003. Diabetes Metab Res Rev. 2004;20:4–8.
- (63) Schon LC, Easley ME, Weinfeld SB. Charcot neuroarthropathy of the foot and ankle. Clin Orthop Relat Res. 1998;349:116-131.
- (64) Serra MC, Calzetti F, Ceska M, et al. Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. Immunology. 1994;82:63-69.
- (65) Shah M, Panis W. Charcot arthropathy. emedicine. 2010;13.
- (66) Shakoor N, Agrawal A, Block JA. Reduced lower extremity vibratory perception in osteoarthritis of the knee. Arthritis Rheum. 2008;59:117–121.
- (67) Sinha S, Munichoodappa CS, Kozak GP. Neuroarthropathie (Charcot Joints) in Diabetes mellitus. Medicine. 1972;51:191-210.
- (68) Slater RA, Ramot Y, Buchs A, et al. The diabetic charcot foot. IMAJ. 2004;6:280-283.
- (69) Sommer TC, Lee TH. Charcot foot: the diagnostic dilemma. Am Family Physician. 2001;64:1591-1598.
- (70) Spengler RN, Allen RM, Remick DG, et al. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor.

- J Immunology. 1990;145:1430-1434.
- (71) Stein A, Yassouridis A, Szopko C, et al. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. *Pain*. 1999;83:525-532.
- (72) Storey G. Charcot Joints. *Brit. J. Vener. Dis.* 1964;40:109-117.
- (73) Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis in the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44:493-507.
- (74) Teive HAG, Munhoz RP, Barbosa ER. Little-known scientific contributions of J-M Charcot. *Clinics*. 2007;62:211-214.
- (75) Tomas MB, Patel M, Marwin SE, et al. The diabetic foot. *The British J Radiol.* 2000;73:443-450.
- (76) Van der Ven A, Chapman CB, Bowker JH. Charcot neuropathy of the foot and ankle. *J Am Acad Orthop Surg.* 2009;17:562-571.
- (77) Vella S, Cachia MJ. Charcot neuroarthropathy: pathogenesis, diagnosis and medical management. *Malta Medical Journal.* 2008;20:13-19.
- (78) Veves A, Manes C, Murray HJ, et al. Painful neuropathy and foot ulceration in diabetic patients. *Diabetes Care.* 1993;16:1187–1189.
- (79) Vogel G, Angermann H. *dtv-Atlas zur Biologie*. Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 1985.
- (80) Walsh DA, Mapp PI, Wharton J et al. Localisation and characterisation of substance P binding to human synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1992;51:313-317.
- (81) Watkins PJ, Edmonds ME. Sympathetic nerve failure in diabetes. *Diabetologia.* 1983;25:73–77.

- (82) Weidler C, Holzer C, Harbuz M, et al. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:13–20.
- (83) Windecker R, Kindermann S, Spraul M. Tip Therm: a simple screening method for temperature sensation. *Diabetologia*. 1997;40:483.
- (84) Wirth CJ. *Orthopädie und orthopädische Chirurgie*. Thieme, Stuttgart, 2002.
- (85) <http://www.klinikum-hannover.de/nsk/mdiab/dfuss1.htm>, Stand: 18. Dezember 2010.
- (86) Young MJ, Marshall A, Adams JE, et al. Osteopenia, neurological dysfunction and the development of Charcot neuroarthropathy. *Diabetes Care*. 1995;18:34–38.
- (87) Zubrzycka M, Janecka A. Substance P: Transmitter of Nociception (Minireview). *Endocrine Regulations*. 2000;34:195-201.

## **7 PUBLIKATION**

Als Anhang wird die bereits publizierte Originalarbeit angefügt. Die Arbeit wurde im Oktober 2008 online bei Wiley Interscience veröffentlicht und erschien im Juni 2009 in der 27. Ausgabe des Journals of Orthopaedic Research.



## 8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rainer Straub danken, der es mir ermöglichte die Arbeit in seinem Labor durchzuführen und stets mit hilfreichen Ratschlägen in kameradschaftlicher Art zur Seite stand.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Franz Koeck, der die Idee dieser Arbeit initiierte und mich in der klinischen Phase betreute und unterstützte.

Frau Dr. Birgit Lehner danke ich für die Einarbeitung in die immunhistologischen Techniken.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe des Labors für experimentelle Rheumatologie und Neuroendokrino-Immunologie für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft bedanken.

# Marked Loss of Sympathetic Nerve Fibers in Chronic Charcot Foot of Diabetic Origin Compared to Ankle Joint Osteoarthritis

Franz-Xaver Koeck,<sup>1</sup> Verena Bobrik,<sup>2</sup> Alexander Fassold,<sup>2</sup> Joachim Grifka,<sup>1</sup> Sigurd Kessler,<sup>3</sup> Rainer H. Straub<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedic Surgery, University Hospital Regensburg, 93042 Regensburg, Germany, <sup>2</sup>Department of Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, 93042 Regensburg, Germany, <sup>3</sup>Department of Surgery, Klinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians-University Munich, 80336 Munich, Germany

Received 21 July 2008; accepted 20 October 2008

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jor.20807

**ABSTRACT:** The pathogenesis of Charcot foot is based on three disputed factors: (1) loss of neurotrophic influence, (2) microtraumatic lesions, and (3) neurovascular disturbances. These etiological causes were uncovered by clinicophysiological tests. However, no results of quantitative nerve density studies of sympathetic and sensory substance P-positive (SP+) nerve fibers are available. We studied the density of sympathetic and SP+ nerve fibers in three distinct areas of the tarsus. Fifteen patients with ankle osteoarthritis (OA) and 15 patients with diabetic Charcot foot were included. Patients with OA did not differ from those with Charcot foot in SP+ sensory nerve fiber density. However, at all three areas, the density of sympathetic nerve fibers was significantly lower in patients with Charcot foot compared to OA ( $p = 0.006$ ). In addition, we found that the sympathetic nerve repellent factor semaphorin 3C was highly expressed in inflamed tissue in Charcot patients. In Charcot foot of diabetic origin a severe loss of sympathetic nerve fibers was observed. These findings in chronically inflamed Charcot foot lend support to the neurovascular theory in the late chronic phase, which probably depends on the inflammatory upregulation of nerve repellent factors. © 2008 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res*

**Keywords:** Charcot; sympathetic nerve fiber; sensory nerve fiber; substance P

In 1868, Charcot described severe osteoarthritic changes in the foot associated with tabes dorsalis, a syphilitic tertiary manifestation.<sup>1</sup> Other diseases with neuropathic arthropathies were mentioned, such as myelomeningocele, spinal injuries, multiple local micro-injuries, poliomyelitis, syringomyelia, alcoholism, HIV infection, and—second to none—chronic diabetes mellitus.<sup>2,3</sup>

In 1942, Bailey and Root reported the appearance of painless destruction of the tarsus in 14 cases with chronic uncontrolled diabetes mellitus.<sup>4</sup> The exact mechanisms contributing to its development are not understood. Changes associated with Charcot joint deformity include the loss of sensation (including the loss of the trophic influence of nerve fibers), and this absence of protective sensory inputs is thought to make the foot susceptible to trauma (according to Volkmann and Virchow).<sup>5</sup> In addition, a neurovascular theory suggests a disturbance of sympathetic vascular control leading to hyperemia and exaggerated bone resorption,<sup>2</sup> although this has been debated by others.<sup>6</sup> The exact sequence of events in the development of Charcot foot is unclear, but three etiological causes—neurotrophic, microtraumatic, and neurovascular—may accompany each other depending on the time point of investigation, that is, the duration of the disease and the stage of inflammation. In this context, recent investigations with magnetic resonance imaging (MRI) have demonstrated that an incipient stage of the disease exists, which might be quite different from more chronic stages with long-term inflammation.<sup>7</sup>

The role of proinflammatory cytokines and RANK ligand as a cause of acute Charcot foot, and osteoclastic bone resorption was also described.<sup>8,9</sup>

To our knowledge, the behavior of sensory and sympathetic nerve fibers in affected Charcot joints has not been described. This is important because a loss of sensory and sympathetic innervation might be central in this disorder.<sup>10,11</sup> Usually, tests to detect alterations in sympathetic and sensory innervation are of clinicophysiological nature, such as neurophysiological tests and blood flow tests (laser Doppler flowmetry or nailfold capillaroscopy).

This can be all the more important because in chronic inflammation, such as in patients with rheumatoid arthritis, the loss of sympathetic nerve fibers and the increase of sensory nerve fibers has been described in inflamed tissue.<sup>12</sup> It seems that the inflammatory process is immediately accompanied by a loss of sympathetic nerve fibers, whereas sensory substance P-positive (SP+) nerve fibers remain intact or even sprout into inflamed tissue.<sup>12</sup> This diverging behavior of sympathetic versus sensory nerve fibers has been hypothesized to depend on the differential effects of nerve repellent factors.<sup>13</sup>

This study aimed to determine the density of sympathetic and sensory SP+ nerve fibers in Charcot joints and, for comparison, in osteoarthritic joints at the same anatomical area (the tarsus). To give a complete picture of the nerve fiber density, the bone, the adjacent synovial tissue of affected joints, and the adjacent skin were investigated in the same patient.

Franz-Xaver Koeck and Verena Bobrik contributed equally to this article.

Correspondence to: Rainer H. Straub (T: +49 941 944 7120; F: +49 941 944 7121; E-mail: rainer.straub@klinik.uni-regensburg.de)

© 2007 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. <sup>†</sup>

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

The study was approved by the Ethical Committee of the University of Regensburg. All patients were informed about

the purpose of the study and gave informed consent. The surgeries for obtaining tissue samples of specimens (bone, capsule, skin) were conducted from March 2004 to August 2007 at two different departments for foot and ankle surgery with specialized clinics for patients with diabetes mellitus. A total of 15 patients with known diabetic Charcot foot and 15 nondiabetic patients with osteoarthritis (OA) of the ankle joint without clinical signs of neuropathy were included. The mean age and gender distribution in the two groups were similar (Table 1).

Patients with chronic Charcot foot underwent arthrodesis or exostectomy of affected joints. All patients with severe OA of the ankle joint obtained a total ankle arthroplasty or an ankle arthrodesis. In every case, a smear of deep wound layers was taken to exclude bacterial contamination or infection.

#### Staging of Charcot Foot and OA

Classification of joint destruction in Charcot feet was based on an anatomical distribution pattern.<sup>14</sup> We used the most common classification system based on radiographic appearance and physiologic stages of the process. The Eichenholtz classification divides osteoarthropathy into developmental (stage I), coalescent (stage II), and reconstructive (stage III) stages. Levin added a further stage of chronic ulceration (stage IV).<sup>15,16</sup>

For description of OA progression, we used the Kellgren-Lawrence radiographic scale, which ranges from stage 0 (no radiographic findings of OA) to stage IV (signs of severe OA).

#### Clinical Neuropathy Testing

Clinical examinations and collection of medical history were conducted 1 day prior to surgery. First, we used a modified neuropathy symptom score (NSS)<sup>17,18</sup> and a modified neuropathy disability score (NDS) based on four parameters,<sup>19,20</sup> applying the following methods. Peripheral neuropathy was assessed with vibration perception threshold using a 128-Hz Rydel-Seiffer tuning fork.<sup>21</sup> Subjects indicated first loss of vibration at the plantar hallux as the intersection of two virtual triangles moved on a scale exponentially from 0 to 8 on the nine-point grading scale (0/8–8/8) of the tuning fork. Dorsal foot temperature perception was determined using a commercially available warm and cool rod (TipTherm<sup>TM</sup>).<sup>22</sup> Pain sensation was investigated using a pinprick test and the Achilles tendon reflex test. In addition to the test of NDS, superficial sensation was assessed using a 10-g Semmes-Weinstein monofilament (SWMF).<sup>23</sup> The nylon filament was placed perpendicular to the plantar foot skin at three predetermined points. Pressure was applied until the filament buckled. The filament was held in place for approximately 1 s and then released.

**Table 1.** Characteristics of Patients under Study

	Osteoarthritis	Charcot Foot
Number	15	15
Age, years	61.5 ± 3.0	61.2 ± 2.3
Women/men, <i>n</i> (%)	7/8 (47/53)	6/9 (30/60)
Diabetes duration, years	n.a.	15 ± 8.9
Localization of arthropathy, <i>n</i> (%)	ankle joint	Sanders II: <i>n</i> = 6 (40) Sanders III: <i>n</i> = 6 (40) Sanders IV: <i>n</i> = 3 (20)
Stage of arthropathy	Kellgren-Lawrence III: <i>n</i> = 4 Kellgren-Lawrence IV: <i>n</i> = 11	Levin III: <i>n</i> = 13 Levin IV: <i>n</i> = 2
Etiology of neuropathy	n.a.	15/15 with long-term type 2 diabetes mellitus
Neuropathy duration, years	n.a.	5.7 ± 4.4
Neuropathy deficit score [1–10]	n.a.	5.9 ± 1.1
Temperature perception	n.a.	missing warm perception in 87% missing cold perception in 80%
Vibration perception threshold	n.a.	12 ± 1
Neuropathy symptom score [1–10]	n.a.	6.0 ± 1.4
Presence of plantar sensation at three distinct points	n.a.	none of 3: <i>n</i> = 11  one of 3: <i>n</i> = 2 two of 3: <i>n</i> = 2
Medication, <i>n</i> (%)		
NSAIDs	13 (87)	11 (73)
Opioid analgesics	4 (27)	3 (20)
Bisphosphonates	0 (0)	5 (33)
Oral antidiabetics	0 (0)	7 (47)
Insulin s.c.	0 (0)	7 (47)
Proton pump inhibitors	12 (80)	9 (60)
Diuretics	2 (13)	9 (60)
Beta-blockers	2 (13)	7 (47)

Data are given as means ± SEM, percentages in parentheses, and ranges in parentheses.

d.m. = diabetes mellitus; n.a. = not applicable or not applied; NSAIDs = nonsteroidal antiinflammatory drugs.

### Tissue Preparation and Immunofluorescence of Nerve Fibers

The preparation of the tissue for histology followed published protocols.<sup>12,13</sup> Samples were fixed for 18 h in phosphate-buffered saline (PBS) containing 3.7% formaldehyde, washed in PBS, and decalcified in RDO Rapid Decalcifier (RDO, Aurora, IL). The samples were then washed again with PBS and incubated in 20% sucrose in PBS for 18 h. Thereafter, tissue was embedded in Tissue Tek (Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, The Netherlands) and quick frozen. All tissue samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Then, six to eight cryosections (5–9  $\mu\text{m}$  thick) of the formaldehyde/sucrose-fixed tissue samples were used for immunofluorescence with a primary antibody against tyrosine hydroxylase ( $\text{TH}^+$ , the key enzyme for noradrenaline production in sympathetic nerve endings, cat.no. AB152, Chemicon, Temecula, CA) and against substance P (SP, the key neurotransmitter of SP+ sensory nerve fibers, cat. no. AB1566, Chemicon). An Alexa 546 conjugated secondary antibody (cat. no. A-11010, goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) was used to achieve immunofluorescent staining of sympathetic and sensory SP+ nerve fibers. The numbers of  $\text{TH}^+$  sympathetic and SP+ sensory nerve fibers per  $\text{mm}^2$  were determined by averaging the number of stained nerve fibers (typical bead chain structure with at least three to four separated vesicles along the axon, minimum length 50  $\mu\text{m}$  as determined by a micrometer eyepiece) in 17 randomly selected high power fields (400 $\times$ ). Positive nerve fiber staining was controlled by incubating the tissue with polyclonal control antibodies that always yielded a negative result.

### Detection of SEMA3C-Positive Cells

For SEMA3C detection, a recently developed antiserum was used.<sup>13</sup> Cryosections (5  $\mu\text{m}$ ) of at least two different formaldehyde-fixed tissue samples were air dried for 1 h and then rehydrated in 0.05 M TBS. Unspecific binding sites were blocked with 0.05 M TBS containing 10% fetal calf serum, 10% bovine serum albumin, and 10% normal chicken serum for 1 h at room temperature. After  $3 \times 5$ -min washes with TBS, the sections were incubated with the purified anti-SEMA3C rabbit antiserum for 12 to 18 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . The sections were washed  $3 \times 5$  min and then incubated with an alkaline phosphatase conjugated secondary antibody directed against rabbit IgG (cat. no. D0487, Dako, Hamburg, Germany). After another wash, the positively marked cells were visualized using BCIP/NBT substrate (cat. no. K0598, DakoCytomation, Hamburg, Germany). Control stainings with preimmunization serum and with peptide-neutralized SEMA3C antibody solution were carried out in parallel.<sup>13</sup> These controls always yielded negative results.

### Presentation of Data and Statistical Analysis

Group medians were compared by the nonparametric Mann-Whitney test, paired data were compared by the nonparametric Wilcoxon test, and correlations were calculated by the nonparametric Spearman rank correlation analysis (SPSS/PC, V.12.0, SPSS Inc., Chicago, IL). A level of  $p < 0.05$  was of significance.

## RESULTS

In skin, synovial tissue, and bone, the density of SP+ nerve fibers did not differ in patients with OA of the ankle joint compared to Charcot foot patients (Fig. 1A). In addition, SP+ nerve fiber density was not different

between skin and synovial tissue (in OA  $p = 0.730$ ; in Charcot  $p = 0.798$ ), skin and bone (in OA  $p = 0.532$ ; in Charcot  $p = 0.396$ ), and synovial tissue and bone (in OA  $p = 0.146$ ; in Charcot  $p = 0.088$ ). Thus, patients with OA and Charcot foot did not differ in SP+ nerve fiber density independent of the localization.

Similarly, the loss of a sympathetic influence was thought to play a detrimental role in Charcot foot.<sup>11</sup> Interestingly, the systematic quantitative determination of sympathetic nerve fibers has never been performed. In all three tissues investigated the density of sympathetic nerve fibers was lower in Charcot patients compared to patients with OA (Fig. 1B). In addition, sympathetic nerve fiber density was higher in skin compared to synovial tissue in OA ( $p = 0.011$ , data not shown) and also tended to be higher in Charcot arthropathic patients ( $p = 0.073$ , data not shown). Sympathetic nerve fiber density was markedly higher in skin compared to bone in both groups (in OA:  $p = 0.001$ ; in Charcot:  $p = 0.008$ ; data not shown), whereas no difference was observed between synovial tissue and bone (data not shown). Thus, sympathetic nerve fiber density was highest in skin followed by synovial tissue and bone.

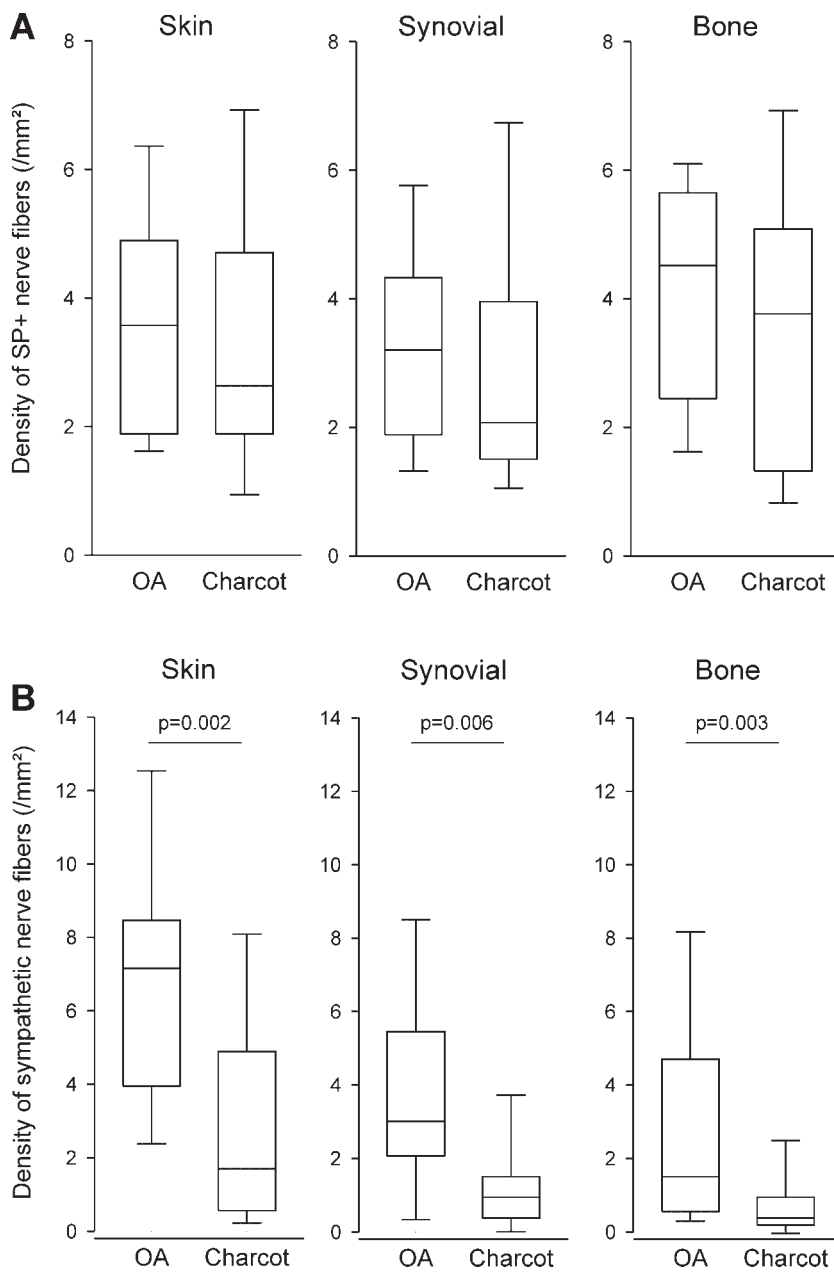
Because we used a similar quantitative technique for sympathetic and SP+ nerve fibers, a ratio was calculated, which expresses the preponderance of sympathetic over SP+ nerve fibers (ratio = density of sympathetic nerve fibers/density of SP+ nerve fibers). This ratio was markedly higher in OA patients compared to Charcot patients in skin, synovial tissue, and bone (Fig. 2A), indicating a preponderance of sympathetic nerve fibers in relation to SP+ nerve fibers in all tissues investigated in OA versus Charcot patients.

SEMA3C is a nerve repellent factor that can be responsible for the loss of sympathetic nerve fibers. Importantly, in Charcot patients, the expression of SEMA3C was highest in synovial tissue followed by bone, but was sparse in skin samples (Fig. 2B). These data fit well to the distribution of sympathetic nerve fibers in skin, synovial tissue, and bone in Charcot foot as demonstrated above.

## DISCUSSION

It is obvious that all three etiological causes of Charcot foot are linked to alterations of sensory and/or sympathetic nerve fibers. However, no studies are available that have investigated both nerve fiber types in a comparative and quantitative manner. The reason is most probably the difficulty in obtaining adequate control tissue of patients not affected by Charcot foot and diabetes mellitus. We were able to include patients with OA of the ankle joint, which is the only control group available due to the fact that surgery happens at the same location and large amounts of tissue are removed for immunohistochemical studies.

We demonstrated a marked loss of sympathetic nerve fibers in the chronically inflamed tarsus and also in adjacent skin when compared to OA. Indeed, we expected



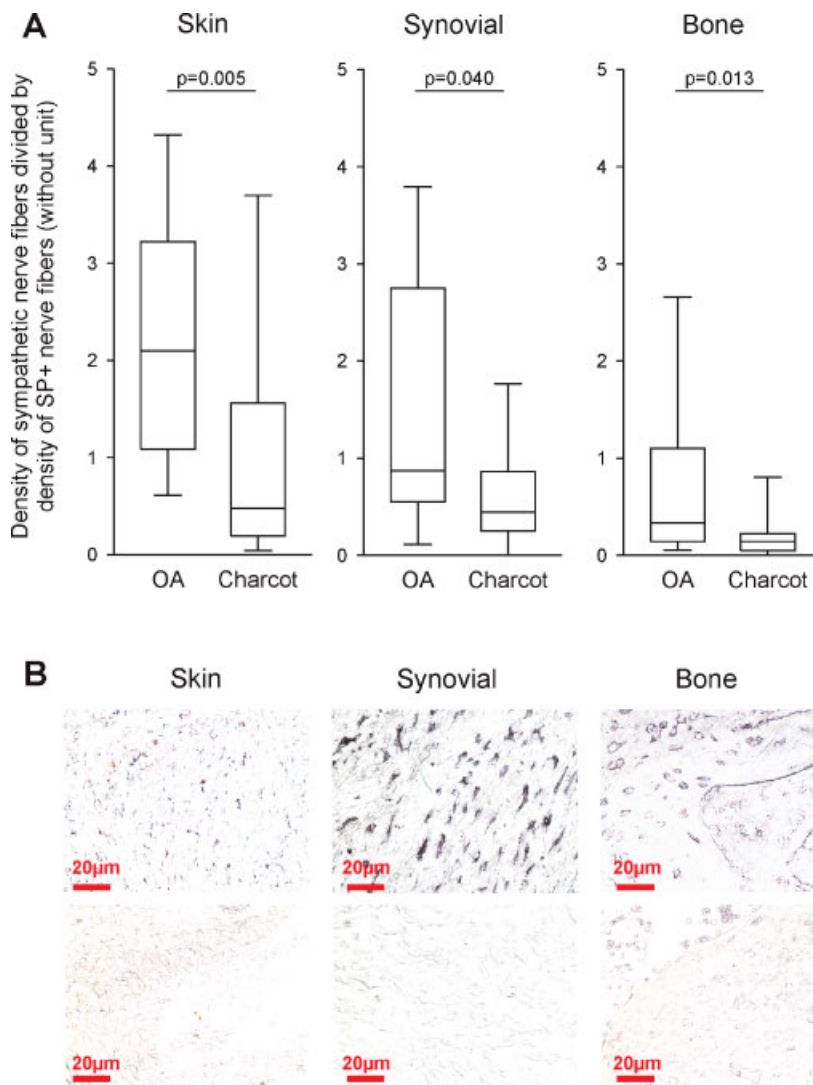
**Figure 1.** Density (nerve fiber per mm<sup>2</sup>) of substance P-positive (SP+) (A) and sympathetic nerve fibers (B) in the skin, synovial tissue, and bone in patients with OA and Charcot foot. The box plots demonstrate the 10th and 90th percentile (whiskers), the 25th and 75th percentile, and the median. The *p*-value indicates significant difference between OA and Charcot foot.

to observe a decrease in sympathetic nerve fiber density because several studies in humans showed that inflammation *per se* leads to a loss of sympathetic nerve fibers.<sup>12,24</sup> Three different factors might account for sympathetic neurodegeneration in inflammation: (1) oxidative stress and proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor, (2) nerve fiber apoptosis, and (3) nerve fiber repulsion leading to fiber depletion. All three mechanisms might take place in chronic Charcot foot. Nevertheless, we favor the nerve fiber repulsion theory to explain the observed sympathetic neurodegeneration because sensory SP+ nerve fibers were not affected. In addition, during inflammation nerve fibers can retract and regenerate, which indicates that nerve fibers are not necrotic or apoptotic.<sup>25</sup> It is not easy to explain the distinct loss of sympathetic but not sensory nerve fibers

relying on general neurodegenerative factors such as oxidative stress, harmful cytokines, and nerve fiber apoptosis. It seems that the loss of sympathetic nerve fibers is specific and intentional.

Besides nerve growth factors (which are chemotactic and growth promoting), nerve repellent factors (which are chemorepellent) are necessary for guidance of neuronal axons. Sensory and sympathetic nerve fibers are located in different anatomical compartments. Necessarily, during embryological development guidance of these nerve fibers is achieved by different repellent factors and their receptors, but nerve growth factors have no specific guiding influence.<sup>26</sup> Abundant production of SEMA3C induces an increased repulsion of sympathetic nerves while sensory nerves are protected from repulsion.<sup>27</sup> Previously, we demonstrated that





**Figure 2.** Density of sympathetic in relation to substance P-positive (SP+) nerve fibers (A) and expression of semaphorin 3C (B) in patients with OA and Charcot foot. (A) The graph depicts the ratio of density of sympathetic nerve fibers divided by the density of SP+ nerve fibers. The box plots demonstrate the 10th and 90th percentile (whiskers), the 25th and 75th percentile, and the median. The *p*-value demonstrates significant difference between OA and Charcot foot. (B) Immunohistochemical expression of semaphorin 3C as given in the upper panels. The lower panels demonstrated control staining. Original magnification 400×.

SEMA3C was indeed increased in patients with rheumatoid arthritis compared to OA or trauma controls.<sup>13</sup> In the present study, we also demonstrated SEMA3C in Charcot foot, which was particularly present in cells of adjacent synovial tissue and bone.

In conclusion, chronic Charcot foot was characterized by a marked loss of sympathetic nerve fibers, which was most pronounced in the bone and adjacent synovial tissue. In OA of the ankle joint compared to Charcot foot, density of SP+ nerve fibers was similar in both groups. Because OA *per se* can be accompanied by a reduction of SP+ sensory nerve fibers,<sup>24,28</sup> a possible loss of sensory nerve fibers in diabetic Charcot foot was probably masked by the use of this control group. Thus, our study did not rule out degeneration of sensory nerves in Charcot foot. In addition, in the chronic phase of Charcot foot uncontrolled sprouting of SP+ sensory nerve fibers may also mask the neurodegenerative process. Nevertheless, the loss of sympathetic nerve fibers in Charcot foot was more pronounced than the probable loss of SP+ nerve fibers as demonstrated by the ratio of the two nerve fiber types. On the basis of this study, we cannot

determine the role of these nerve fiber types in early Charcot foot, but in the late phase the deterioration of sympathetic nerve fibers is probably an important factor.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR696). The authors have nothing to disclose.

## REFERENCES

- Charcot JM. 1868. Sur quelques arthropathies qui paraissent dépendre d'une lésion du cerveau ou de la moelle épinière. *Arch Physiol Norm Pathol* 1:161–178.
- Sanders LJ. 2004. The Charcot foot: historical perspective 1827–2003. *Diabetes Metab Res Rev* 20 (Suppl 1):S4–S8.
- Rogers LC, Bevilacqua NJ, Dellacorte MP, et al. 2008. Charcot's arthropathy in a patient with HIV-associated neuropathy. *J Am Podiatr Med Assoc* 98:153–155.
- Bailey CC, Root HE. 1942. Neuropathic joint lesions in diabetes mellitus. *J Clin Invest* 21:649.

5. Young MJ, Marshall A, Adams JE, et al. 1995. Osteopenia, neurological dysfunction, and the development of Charcot neuroarthropathy. *Diabetes Care* 18:34–38.
6. Chantelau E, Onvlee GJ. 2006. Charcot foot in diabetes: farewell to the neurotrophic theory. *Horm Metab Res* 38:361–367.
7. Ahmadi ME, Morrison WB, Carrino JA, et al. 2006. Neuropathic arthropathy of the foot with and without superimposed osteomyelitis: MR imaging characteristics. *Radiology* 238:622–631.
8. Jeffcoate WJ, Game F, Cavanagh PR. 2005. The role of proinflammatory cytokines in the cause of neuropathic osteoarthropathy (acute Charcot foot) in diabetes. *Lancet* 366:2058–2061.
9. Baumhauer JF, O'Keefe RJ, Schon LC, et al. 2006. Cytokine-induced osteoclastic bone resorption in charcot arthropathy: an immunohistochemical study. *Foot Ankle Int* 27:797–800.
10. Dyck PJ, Stevens JC, O'Brien PC, et al. 1983. Neurogenic arthropathy and recurring fractures with subclinical inherited neuropathy. *Neurology* 33:357–367.
11. Watkins PJ, Edmonds ME. 1983. Sympathetic nerve failure in diabetes. *Diabetologia* 25:73–77.
12. Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, et al. 2000. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 14:2097–2107.
13. Miller LE, Weidler C, Falk W, et al. 2004. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:1156–1163.
14. Sanders LJ. 1991. Anatomical patterns of bone and joint destruction in neuropathic diabetics [Abstract]. *Diabetes* 40 (Suppl 1):529A.
15. Levin ME. 1978. Diabetes and bone. *Compr Ther* 4:63–72.
16. Levin ME. 1995. Preventing amputation in the patient with diabetes. *Diabetes Care* 18:1383–1394.
17. Dyck PJ, Kratz KM, Lehman KA, et al. 1991. The Rochester Diabetic Neuropathy Study: design, criteria for types of neuropathy, selection bias, and reproducibility of neuropathic tests. *Neurology* 41:799–807.
18. Abbott CA, Carrington AL, Ashe H, et al. 2002. The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. *Diabet Med* 19:377–384.
19. Dyck PJ, Sherman WR, Hallcher LM, et al. 1980. Human diabetic endoneurial sorbitol, fructose, and myo-inositol related to sural nerve morphometry. *Ann Neurol* 8:590–596.
20. Veves A, Manes C, Murray HJ, et al. 1993. Painful neuropathy and foot ulceration in diabetic patients. *Diabetes Care* 16:1187–1189.
21. Rith-Najarian SJ, Stulusky T, Gohdes DM. 1992. Identifying diabetic patients at high risk for lower-extremity amputation in a primary health care setting. A prospective evaluation of simple screening criteria. *Diabetes Care* 15:1386–1389.
22. Windecker R, Kindermann S, Spraul M. 1997. Tip Therm: a simple screening method for temperature sensation [Abstract]. *Diabetologia* 40 (Suppl 1):A483.
23. Armstrong DG. 2000. The 10-g monofilament: the diagnostic divining rod for the diabetic foot? *Diabetes Care* 23:887.
24. Weidler C, Holzer C, Harbuz M, et al. 2005. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 64:13–20.
25. Imai S, Tokunaga Y, Kontinen YT, et al. 1997. Ultrastructure of the synovial sensory peptidergic fibers is distinctively altered in different phases of adjuvant induced arthritis in rats: ultramorphological characterization combined with morphometric and immunohistochemical study for substance P, calcitonin gene related peptide, and protein gene product 9.5. *J Rheumatol* 24:2177–2187.
26. Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. 1993. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75:1389–1399.
27. Chen H, He Z, Bagri A, et al. 1998. Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* 21:1283–1290.
28. Shakoar N, Agrawal A, Block JA. 2008. Reduced lower extremity vibratory perception in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 59:117–121.