

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. Jens Volkmann

Biopsiediagnostik von entzündlichen Polyneuropathien

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Esther Wagemann

aus Eichenzell

Würzburg, März 2017

Referentin: Frau Prof. Dr. Claudia Sommer

Korreferentin: Frau Prof. Dr. Heike Rittner

Dekan: Herr Prof. Dr. Mathias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2017

Die Promovendin ist Ärztin.

Abkürzungsverzeichnis

ANA	antinukleäre Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
CIAP	chronisch idiopathisch axonale Polyneuropathie
CIDP	chronisch-inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CIP	Critical Illness Polyneuropathy
DAB	Diaminobenzidin
FAP	familiäre Amyloidneuropathie
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSAN	hereditäre sensorische und autonome Neuropathie
IVIG	intravenöse Immunglobuline
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
MMN	multifokale motorische Neuropathie
NSVN	nicht-systemische vaskulitische Neuropathie
PNP	Polyneuropathie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Polyneuropathien	1
1.1.1	Definition, Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologische Einordnung und Inzidenz	1
1.1.3	Diagnostik bei PNP	2
1.1.4	Spezialfall chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)	7
1.1.5	Spezialfall nicht-systemische vaskulitische Polyneuropathie	8
1.2	Fragestellung der Arbeit	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Patientenkollektiv und Datenextraktion	10
2.1.1	Klinische Daten	10
2.1.2	Elektrophysiologische Daten	10
2.1.3	Gruppeneinteilung	11
2.2	Nervenbiopsie	11
2.2.1	Herstellung von Gefrier- und Paraffinschnitten.....	11
2.2.2	HE-Färbung und immunhistochemische Färbung	12
2.3	Mikroskopische Beurteilung der histologischen Präparate	15
2.3.1	Grading-Schema	15
2.3.2	Auswertung der Klassifikation	17
2.3.3	Statistische Auswertung der Daten	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Zeigen sich bei gesicherter Entzündung im vollständig untersuchten und klinisch wie neuropathologisch validierten bioptischen Material bereits im HE-Gefrierschnitt eindeutig entzündliche Veränderungen, und wenn ja, wie oft?.....	19
3.1.1	HE-Gefrierfärbung	19
3.1.2	HE-Paraffinfärbung.....	20
3.1.3	Makrophagenfärbung	21
3.1.4	Lymphozyten-Färbung	22
3.2	Klinische Einflussfaktoren auf die histologische Trefferquote nach endgültiger diagnostischer Einteilung des Patientenkollektivs	23
4	Diskussion	25
4.1	Diagnostische Vorhersagekraft der histologischen Färbungen	25
4.2	Abhängigkeitsfaktoren für die Vorhersagekraft der durchgeführten Färbungen.....	27

4.3	Übereinstimmung diagnostischer Trefferquote: erfahrener versus und unerfahrener Untersucher	28
4.4	Weitere Arbeiten zum Thema.....	28
4.5	Schlussfolgerung.....	30
4.6	Einschränkungen der Arbeit.....	30
4.6.1	Patientenzahl	30
4.6.2	Geringe Möglichkeit zur Nachverfolgung des Therapieerfolges	30
4.6.3	Medikamentöse Vorbehandlung.....	31
5	Zusammenfassung.....	32
	Literaturverzeichnis	33

1 Einleitung

1.1 Polyneuropathien

1.1.1 Definition, Epidemiologie

Definition

Polyneuropathien (PNP) sind generalisierte Erkrankungen des peripheren Nervensystems (PNS). Zum PNS gehören alle außerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) liegenden Teile der motorischen, sensiblen und autonomen Nerven mit ihren Schwann-Zellen und ganglionären Satellitenzellen. Auch die bindegewebigen Hüllstrukturen (Peri- und Epineurium), sowie die versorgenden Blut- und Lymphgefäße gehören dazu.

Epidemiologie und ätiologische Einordnung

Da PNP oft als Begleit- oder Zweiterkrankungen bei anderen Primärerkrankungen vorkommen ist es schwierig, epidemiologische Angaben zu machen. Eine konservative Schätzung bezüglich neuromuskulärer Erkrankungen insgesamt (wovon wahrscheinlich etwa die Hälfte PNP sind) aus England kommt auf eine Prävalenz therapiebedürftiger neuromuskulärer Erkrankungen allgemein von 1:1000. In Deutschland wären demnach also ca. 100.000 Menschen betroffen. Um genauere Prävalenzdaten zu erheben, werden z.B. europäische Register geführt.

1.1.2 Ätiologische Einordnung und Inzidenz

PNP lassen sich ätiologisch in fünf große Gruppen einteilen:

- hereditäre PNP,
- entzündliche PNP (Polyneuritiden),
- vaskulär bedingte PNP,
- exotoxische PNP und
- endotoxisch-metabolische PNP

Die Differenzialdiagnose der PNP richtet sich nach dem zeitlichen Verlauf der Krankheit (akut, subakut, chronisch), dem betroffenen System (sensibel, motorisch, autonom, Kombinationen davon), der Lokalisation der Symptome (symmetrisch oder asymmetrisch, distal oder proximal) und danach, ob primär die Axone (axonal) oder die Markscheiden (demyelinisierend) betroffen sind. Anhand des zeitlichen Verlaufs - akut \leq vier Wochen, subakut vier bis acht Wochen und chronisch $>$ acht Wochen - kann eine erste Aussage über die Art der PNP getroffen werden. So ist der Verlauf beim Guillain-Barré-Syndrom (GBS) akut, bei der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) subakut bis chronisch. Ein symmetrisch-sensibles Störungsbild zeigt sich bei der alkoholischen PNP, nephrogenen PNP, bei einem Großteil der diabetischen PNP oder bei der chronischen axonalen PNP unklarer Ätiologie. Den symmetrisch-sensomotorischen Manifestationstyp findet man am häufigsten. Charakteristisch hierbei ist die socken-, strumpf- und handschuhförmige Verteilung. Eine asymmetrische Manifestation, auch Mononeuropathia multiplex oder Schwerpunkt-PNP genannt, kann z.B. bei den vaskulitischen Neuropathien, den proximalen diabetischen Neuropathien, der multifokalen motorischen Neuropathie (MMN) und dem Lewis-Sumner-Syndrom auftreten.

Für die Therapie ist es wichtig, die entzündlichen und somit behandelbaren PNP zu erkennen. Die Inzidenz der CIDP wird auf 1 - 1,9 pro 100.000, mit einem Häufigkeitsmaximum von 6,7 pro 100.000 in der Altersgruppe von 70 bis 79 Jahren geschätzt (Hadden et al., 1999). Aufgrund empirischer Schätzungen wird davon ausgegangen, dass bei 21% aller PNP mit initial unklarer Ätiologie eine CIDP vorliegen könnte, was 5% aller PNP entspräche (Latov, 2002). Für die vaskulitischen Neuropathien liegen keine validen epidemiologischen Zahlen vor (Gwathmey et al., 2014).

1.1.3 Diagnostik bei PNP

Die Diagnostik bei PNP baut auf Anamnese und klinischem Befund, elektrophysiologischen Untersuchungen, Laboruntersuchungen, genetischen Untersuchungen und morphologischen Gesichtspunkten auf.

Klinische Präsentation

In der Anamnese und Beschwerdeschilderung der Patienten wird nach sensiblen Ausfallerscheinungen, z.B. Taubheitsgefühl, und Reizerscheinungen wie Parästhesien und Schmerzen gefragt. Analog werden motorische Reiz- und Ausfallerscheinungen, wie Muskelkrämpfe, Muskelschwäche oder Muskelatrophie, erfragt. Bei der neurologischen Untersuchung findet man oft eine Abschwächung oder einen Ausfall von Muskeleigenreflexen, wobei der Achillessehnenreflex häufig an erster Stelle steht.

Die Muskulatur kann schlaffe und atrophe Paresen aufweisen. Ebenso können sich Sensibilitätsstörungen wie Pall- oder Thermhypästhesie oder jeweils –anästhesie zeigen. Falls autonome Fasern betroffen sind, kann dies zu vegetativen Störungen wie Hypo- oder Hyperhidrosis, Veränderungen an der Haut wie Pigmentationsstörungen, Rötungen, Ödem, Zyanose und Ulzeration führen. Sind die vegetativen Nerven viszeraler Organe betroffen, kann dies zu Rhythmusstörung, Störungen der Kreislaufregulation, gastrointestinalen Beschwerden, Blasen-Mastdarm- oder Potenzstörungen führen.

Elektrophysiologische Messungen

Um die Diagnose einer PNP zu sichern und um weitere Hinweise auf die Ätiologie der PNP zu erhalten, wird ergänzend zur klinischen Untersuchung die neurophysiologische Untersuchung eingesetzt. Hierbei kann eine Unterscheidung zwischen axonaler oder demyelinisierender Neuropathie getroffen, sowie der Verteilungstyp als asymmetrische oder symmetrische PNP bestimmt werden. So sind beispielsweise eine der erworbenen Hauptursachen für PNP mit Axonverlust der Diabetes mellitus, Alkoholkonsum, Urämie oder Vitamin B12-Mangel. Im Falle einer axonalen Schädigung findet sich in der Neurographie eine Reduktion der Amplituden der Muskelantwortpotenziale mit relativ normaler Nervenleitgeschwindigkeit, distal motorischer Latenz sowie F-Wellen-Latenz. Bei einer demyelinisierenden Schädigung zeigen sich in der Neurographie eine reduzierte Leitungsgeschwindigkeit, eine verlängerte distal motorische Latenz, eine verlängerte F-Wellen-Latenz sowie partielle oder komplette Leitungsblocks. Hauptursachen für demyelinisierende PNP sind GBS, die CIDP und die hereditären Neuropathien vom Typ CMT 1.

Labor

Hier werden zunächst Untersuchungen durchgeführt, die gängige und therapierbare Krankheitsursachen nachweisen oder ausschließen können. Sie umfassen eine Basisdiagnostik wie die Untersuchung auf Entzündungszeichen und die Überprüfung von Leber-, Nieren- und Schilddrüsenwerten. Da Diabetes mellitus und übermäßiger Alkoholkonsum an erster Stelle bei den Ursachen von PNP stehen, sollte die Untersuchung von Nüchternblutzucker und HbA1c erfolgen und ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt werden. Bei Verdacht auf alkoholische Neuropathie sollte eine Transaminasenbestimmung erfolgen und das MCV gemessen werden. Erweiterte Untersuchungen, wie die Liquoruntersuchung, bei Verdacht auf Neuroborreliose, GBS oder CIDP, die Rheumafaktor- und ANA-Bestimmung, bei Verdacht auf vaskulitische Erkrankungen sowie ein zusätzlicher Antikörpersuchtest, bei Verdacht auf multifokal motorische Neuropathie, Paraproteinämie oder GBS, sind zu ergänzen.

Genetische Untersuchungen

Genetische Untersuchungen können bei positiver Familienanamnese oder bei typischen Zeichen einer hereditären PNP, wie Hohlfüße oder Krallenzehen, weiterführend sein.

Histologische Diagnostik

Die Nervenbiopsie ist wegen ihrer invasiven Natur erst dann indiziert, wenn die Differenzialdiagnose mit nicht-invasiven Maßnahmen nicht geklärt werden kann. Die Nervenbiopsie ist vor allem dann indiziert, wenn sich anhand der Diagnosestellung eine Behandlungskonsequenz erwarten lässt, wie etwa bei den Autoimmunneuropathien. Weitere Indikationen entstehen bei Verdacht auf Vaskulitis, Amyloidose, exogen entzündliche Neuropathien und bei speziellen Formen der erblichen Neuropathien. In manchen Fällen kann eine kombinierte Ätiologie wie die mikroangiopathisch/diabetische und entzündliche oder die hereditäre und entzündliche Ätiologie durch eine Biopsie aufgedeckt werden (Weis et al., 2012). Es bleibt zu beantworten, welchen diagnostischen Wert die morphologische Diagnostik hat, welche histologischen Färbungen für eine spezielle Diag-

Diagnosestellung nötig sind, und ob diese spezifische Diagnosestellung hilfreich für den klinischen Verlauf ist (Sommer et al., 2008).

Für die Entnahme der Nervenbiopsie wird unter Lokalanästhesie meist der N. suralis am Unterschenkel oder alternativ der N. peroneus superficialis gewählt (Rappaport et al., 1993). Entnommen wird ein ca. 2 cm langes Segment, das dann histologisch aufgearbeitet wird (siehe Material und Methoden, Seite 10). Über Komplikationen, wie Parästhesien, die nach einigen Wochen meist wieder sistieren, und Sensibilitätsstörungen im Versorgungsareal des betroffenen Nervens sowie selten Blutungen, Infektionen und Beinvenenthrombose, sind die Patienten aufzuklären.

Es existieren unterschiedliche Expertenmeinungen über den Nutzen bzw. die diagnostische Aussagekraft einer Nervenbiopsie. So zeigten Gabriel und Howard 2000 in einer Studie mit 50 Patienten, dass durch eine Suralisbiopsie 14% der Patienten ihre ursprüngliche Diagnose behielten, bei 60% der Patienten die Behandlung beeinflusst wurde und bei 33% der Patienten permanente Schmerzen zurückblieben (Gabriel et al., 2000). Die nach der Biopsie durchgeführte Patientenbefragung über mögliche Patientenunzufriedenheit z.B. aufgrund von Nebenwirkungen der Nervenbiopsie bzw. bezüglich des Ergebnisses der Biopsie ergab, dass 79% der Patienten mit der Nervenbiopsie sehr zufrieden waren. Diejenigen Patienten, die Unzufriedenheit nach der Biopsie angaben, waren Patienten, die an einer idiopathischen axonalen Neuropathie litten und deren Diagnose durch eine Biopsie nicht geklärt werden konnte.

Bosboom und van den Berg untersuchten in ihrer Studie die diagnostische Wertigkeit der Suralisbiopsie für Demyelinisierungs- und Entzündungszeichen bei der CIDP. Analysiert wurde, ob sich ein Unterschied zwischen den Patientengruppen der CIDP und denjenigen der CIAP (chronisch idiopathisch axonale Polyneuropathie) in Bezug auf Entzündungszeichen, Demyelinisierungsprozesse und De- und Regeneration nachweisen ließ. Da in der Studie kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu finden war, kamen die Autoren zu dem Schluss, dass eine Suralisbiopsie für die Diagnose einer CIDP von begrenzter Wertigkeit sei (Bosboom et al., 2001).

Der Nachweis von T-Lymphozyten als Zeichen einer Entzündung mittels Suralisbiopsie wurde in der Studie von Eurelings untersucht (Eurelings et al., 2002). Die Studie ergab, dass bei der monoklonalen Gammopathie des IgG Isotyps in der Suralisbiopsie gehäuft T-Zellen zu finden seien.

McLeod bekräftigt den Stellenwert der Suralisbiopsie in der Diagnosefindung von peripheren Nervenerkrankungen. Gerade bei der Vaskulitis sei die Suralisbiopsie die einzige Möglichkeit, die Diagnose zu sichern (McLeod, 2000).

Wann also ist eine Suralisbiopsie sinnvoll und indiziert?

Weis et al. beschrieben (Weis et al., 2012), dass eine Nervenbiopsie besonders dann sinnvoll ist, wenn entzündliche Prozesse wie bei einer Vaskulitis oder einer CIDP vermutet werden. Gerade atypische Fälle der Neuritiden können durch eine Nervenbiopsie öfter diagnostiziert werden. Auch die nicht-systemische Vaskulitis, als behandelbare Neuropathie, kann nur durch eine Nervenbiopsie diagnostiziert werden.

Routinemäßig sollten bei einer Nervenbiopsie untersucht werden:

- das Epineurium einschließlich der Gefäße,
- das Perineurium (Dicke, Fibrosierung, Kalzifikationen),
- das Ausmaß an endoneuralem Ödem,
- die Dichte der myelinisierten Nervenfasern,
- das Ausmaß axonaler Degeneration und Atrophie,
- die Anzahl der Makrophagen-Cluster,
- die De- und Regenerationsfasern,
- die Zwiebelschalenformationen,
- die Entzündungsinfiltrate sowie
- das Vorkommen von Amyloid.

Die Erkenntnisse aus der Nervenbiopsie müssen in Zusammenhang und in Kombination mit den klinischen, elektrophysiologischen und laborchemischen Ergebnissen diskutiert und eingeordnet werden.

1.1.4 Spezialfall chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)

Die CIDP ist eine erworbene, immunvermittelte Erkrankung des peripheren Nervensystems mit einer Prävalenz von 1-2/100000. Die klassische Form der CIDP präsentiert sich als symmetrische, motorisch betonte Polyradikuloneuropathie mit distaler wie proximaler Muskelschwäche, Areflexie, Parästhesien und sensiblen Defiziten. Der Verlauf ist entweder monophasisch und später stabil (40%), chronisch progredient (45%) oder, besonders bei jungen Erwachsenen, schubförmig remittierend (15%). Spontanheilungen sind möglich, ebenso die Ausheilung unter Therapie (Koller et al., 2005). Definitionsgemäß ist eine progrediente klinische Symptomatik über mehr als zwei Monate erforderlich. Bei rund 13% der Patienten beginnt die CIDP akut und wird in der Regel initial als GBS beurteilt (Ruts et al., 2005).

Um eine CIDP für die Zwecke klinischer Studien mit hoher Sicherheit von anderen Neuropathien unterscheiden zu können, wurden verschiedene Kriterienkataloge, unter anderem die sogenannten INCAT-Kriterien (inflammatory neuropathy cause and treatment group) formuliert (Hughes et al., 2001). Diese stützen sich im Wesentlichen auf klinische und elektrophysiologische Parameter. Klinisch wird nach den INCAT-Kriterien eine sensible und motorische Dysfunktion an mindestens einer Extremität verlangt. Die PNP sollte progredient oder schubförmig für mehr als zwei Monate verlaufen, die Muskeleigenreflexe abgeschwächt oder erloschen sein. Bei der optionalen Liquoruntersuchung sollten weniger als 10 Leukozyten/ μ l zu finden sein.

Die elektrophysiologischen Kriterien verlangen den Nachweis eines partiellen Leitungsblocks oder einer zeitlichen Dispersion an zwei Nerven *und* den Nachweis einer verlangsamten Nervenleitgeschwindigkeit, einer verlängerten distal motorischen Latenz oder F-Latenz eines weiteren Nerven *oder* bei Fehlen eines Leitungsblocks oder zeitlicher Dispersion den Nachweis einer verlangsamten Nervenleitgeschwindigkeit, einer verlängerten distal motorischen Latenz oder F-Latenz in drei Nerven *oder* bei elektrophysiologischen Auffälligkeiten nur an zwei Nerven den Nachweis der De- und Remyelinisierung in der Nervenbiopsie. Diese Kriterien haben eine hohe Spezifität, aber eine für den klinischen Alltag nicht ausreichende Sensitivität. Das heißt, hiermit können Patienten ausge-

geschlossen werden, die durchaus das klinische Bild einer CIDP haben und von einer Therapie profitieren könnten.

1.1.5 Spezialfall nicht-systemische vaskulitische Polyneuropathie

Collins schlug für die nicht-systemische vaskulitische Polyneuropathie (NSVN) diagnostische Kriterien vor. Es sollte der elektrophysiologische Nachweis einer aktiven, asymmetrischen, axonalen und sensomotorischen Neuropathie bestehen. Pathologisch sollten Auffälligkeiten, wie verdickte oder sklerosierte Gefäße, ein verengtes oder obliteriertes Gefäßlumen, Gefäßwandinfiltration durch Entzündungszellen, Thrombosen, periadventitielle Kapillarproliferation, Hämosiderin, asymmetrischer Nervenfaserverlust oder Waller'sche Degeneration im Nervenbiopsat zu finden sein (Collins et al., 2010).

1.2 Fragestellung der Arbeit

Die Diagnostik von PNP basiert auf klinischen und elektrophysiologischen Kriterien. Ätiologische und pathogenetische Fragen können durch Labordiagnostik beantwortet werden, z. B. bei metabolischen und hereditären Neuropathien, oder bei systemischen Immunvaskulitiden. Die exakte Diagnose setzt bei einigen Neuropathien eine neuropathologische Diagnostik voraus. Aufgrund der begrenzten Zahl biopsierbarer Nerven muss eine Biopsie optimal aufbereitet und ausgewertet werden. Es gab im Rahmen eigener wissenschaftlicher Untersuchungen in der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg Beobachtungen, dass manchmal schon im „Schnellschnitt“ (d.h. Gefrier-Querschnitt des biopsierten Nerven mit Hämatoxylin-Eosin [HE] gefärbt) Hinweise auf entzündliche Infiltrate als Zeichen einer Neuritis gefunden werden, was sich in den weiteren histologischen und immunzytochemischen Färbungen (HE-Paraffinschnitt, Leu4-Gefrierschnitt, CD68-Paraffinschnitt, Semidünnschnitt) oft bestätigte. Das würde implizieren, dass in vielen Fällen bereits eine einfache Färbung wie HE am Gefrierschnitt wegweisend für die Diagnosestellung sein kann und somit eine erste, rasche Therapieentscheidung ermöglicht, bevor die aufwendigere, breite Immunhistologie abgeschlossen ist. Gefrierschnitte gehören aber meist nicht zur Standarddiagnostik bei Nervenbiopsien. Wir wollten daher die Aussa-

gekraft von HE-gefärbten Gefrierschnitten und Paraffinschnitten von Suralisbiopsien genauer untersuchen.

Sommer et al. beschreiben (Sommer et al., 2005), dass die Ansammlung von Makrophagen-Clustern für die Diagnosefindung der CIDP nützlich sein können. Es sollte daher untersucht werden, ob bereits eine HE-Färbung für die Diagnosefindung einer CIDP ausreicht und ob es auch einem Laienuntersucher möglich ist, diese zu erkennen. Neben der histologischen Auswertung durch einen Laienuntersucher stellte sich die Frage, wie dieselbe Auswertung durch einen histologisch geschulten Untersucher ausfällt. Es wurde analysiert, wieweit sich die Laienauswertung von der geschulten Auswertung unterscheidet.

Daraus ergaben sich folgende, klinisch-wissenschaftliche Fragen für diese Dissertation:

1. Zeigen sich in Fällen bei gesicherter Entzündung im vollständig untersuchten bioptischen Material (inkl. Berücksichtigung der klinischen und elektrophysiologischen Daten) bereits im HE-Gefrierschnitt eindeutig entzündliche Veränderungen, und wenn ja, wie oft?
2. Sind die entzündlichen Veränderungen im HE-Gefrierschnitt so deutlich, dass auch ein Laienauswerter diese erkennen oder vermuten kann?
3. Sind die Ergebnisse für HE-Paraffinschnitte und für immunhistochemische Färbungen für Makrophagen und Lymphozyten einzeln genommen besser als für HE-Gefrierschnitte?
4. Können bei histologisch gesicherter Entzündung klinische Einflussfaktoren ermittelt werden, die sich auf die neuropathologischen Ergebnisse auswirken?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Datenextraktion

Von den Patienten, die sich im Zeitraum von 2000 bis 2009 in der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg zur diagnostischen Abklärung einer PNP einer N. suralis Biopsie unterzogen hatten, wurden nach vorgegebenen Auswahlkriterien insgesamt 69 Fälle ausgewählt. Die Kohorte bestand aus 45 Männern und 24 Frauen mit einem medianen Alter von 65 Jahren (37-78 Jahre) und einer medianen Krankheitsdauer bis zur Suralisbiopsie von 3 Jahren (0,08-25 Jahre). Die auszuwählenden Fälle mussten eine histologische Diagnose einer vaskulitischen Neuropathie, CIDP, einer anderen Neuritis oder einer nicht-entzündlichen Neuropathie erhalten haben. Eine nicht weiter an dieser Studie beteiligte Labormitarbeiterin wählte die Fälle nach vorgegebenen Schlüsselwörtern aus dem histologischen Archiv der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg aus. Ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen die Qualität der Nervenpräparate für eine histologische Einteilung nicht ausreichte.

2.1.1 Klinische Daten

Nach Zuordnung der 69 Fälle in die jeweiligen histologischen Subgruppen wurden aus den Krankenakten die für das Krankheitsbild relevanten klinischen und elektrophysiologische Daten extrahiert. Die klinischen Daten umfassten Angaben zu Krankheitsdauer, Symptomen (Motorik, Sensibilität, Schmerzen), Komorbiditäten und zu Art und Wirkung der durchgeführten Therapie.

2.1.2 Elektrophysiologische Daten

Die elektrophysiologischen Daten umfassten Neurographien des N. suralis als sensiblen Nerven sowie von drei motorischen Nerven. Hierbei wurden als Messparameter die Reizantwortamplitude des motorischen oder sensiblen Summenaktionspotentials, die distale motorische Latenz, die Nervenleitgeschwindigkeit und ggf. Leitungsblöcke aus den Krankenakten extrahiert.

2.1.3 Gruppeneinteilung

Das Patientenkollektiv wurde unter Einbeziehung der klinischen, elektrophysiologischen und histologischen Daten in fünf Gruppen eingeteilt:

- vaskulitische PNP (10 Patienten),
- CIDP nach INCAT Kriterien (10 Patienten),
- CIDP nach INCAT Kriterien und vaskulitischer Komponente in der Nervenbiopsie (10 Patienten)
- andere Neuritiden (9 Patienten) und
- nicht-entzündliche PNP (30 Patienten).

Für die Diagnoseeinteilung der vaskulitischen Neuropathie wurden die diagnostischen Kriterien nach Collins (Collins et al., 2000) herangezogen. Die CIDP-Diagnose erfolgte nach den INCAT-Kriterien (Hughes et al., 2001) („CIDP nach INCAT Kriterien“). Histologisch fielen zudem Fälle auf, die bei sonst CIDP typischem Befund deutliche, vaskulitisartige Zellinfiltrate aufwiesen („CIDP nach INCAT Kriterien und vaskulitischer Komponente in der Nervenbiopsie“). Die Patientenkollektive der Gruppe der anderen Neuritiden sowie der nicht-entzündlichen Neuropathien wurden anhand der Nervenhistologie sowie anhand der klinischen und elektrophysiologischen Begutachtung eingeteilt.

2.2 Nervenbiopsie

Die aus diagnostischen Gründen durchgeführte N. suralis Biopsie erfolgte in der Neurochirurgischen Klinik der Universität Würzburg nach einem standardisierten Verfahren (Dyck and Dyck, 2005). Nach Entnahme wurde das Nervenbiopsat sofort aufgespannt, geteilt und in durch flüssigen Stickstoff gekühltes Methylbutan tiefgefroren oder in 4% Paraformaldehyd fixiert.

2.2.1 Herstellung von Gefrier- und Paraffinschnitten

Um einen Gefrierschnitt herzustellen, wurde der entnommene Nerv in definierter Größe zugeschnitten und in, durch flüssigen Stickstoff gekühltes Methylbutan eingetaucht. Es wurden mittels eines Kryostaten (Kryostat 1720, Leica) 10 µm dünne Schnitte hergestellt. Daraufhin wurden die Schnitte auf einen Ob-

jektträger gelegt und 30 Minuten getrocknet. Bei -20 °C wurden die Gefrierschnitte in einer mit Aceton gefüllten Küvette fixiert.

Um einen Paraffinschnitt herzustellen, wurden 2 g Paraformaldehyd in 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer bei 60°C gelöst und filtriert. Nachdem der Ansatz bei einem pH von 7,4 eingestellt war, wurde das Gewebe über Nacht fixiert. Am folgenden Tag wurde es mit 0,1 M Phosphat-Puffer (=Phosphatpuffer bestehend aus a) di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und b) Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat der Fa. Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland) dreimal zehn Minuten gespült. Danach wurde das Biopsat in Linsenpapier eingewickelt und in eine Biopsiekassette gelegt. Nach zehnmütiger Wässerung wurde das Gewebe in der Biopsiekassette in einem Metallbehälter platziert, der dann sechseinhalb Stunden in einem Einbetter hing. Darin wurde das Gewebe mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (50% Ethanol bis 100% Ethanol) entwässert. Das Gewebe wurde darin ebenso mit Chloroform (zweimal Chloroform mit 100% Ethanol, zweimal Chloroform abs.) fixiert und in Paraffin eingebettet. Danach wurde die Biopsiekassette in einen mit Flüssigparaffin (Histowax, Paraffin mit polymeren Zusätzen) gefüllten Behälter gelegt. Das mit Glycerin beschichtete Biopsat wurde in, mit flüssigem Paraffin gefüllte Metallformen gelegt und bis zum Schneidevorgang kühl gelagert. Zum Anfertigen von 5 µm dicken Schnitten wurde das Material in einem Schlittenmikrotom (Ultracut, Reichert & Jung) geschnitten, in destilliertem Aqua gesammelt, gestreckt und auf Poly-L-beschichteten Objektträgern aufgezogen. Die Schnitte wurden bei 37°C über Nacht getrocknet.

2.2.2 HE-Färbung und immunhistochemische Färbung

Die Schnitte wurden für zehn Minuten in Hämatoxylin (nach Meyer) getaucht. Anschließend wurde für weitere zehn Minuten gewässert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte für 25 Sekunden in 1% Eosin, versetzt mit drei Tropfen 100% Essigsäure, gelegt. Daraufhin wurden sie für jeweils zwei Minuten in aufsteigende Alkoholreihen und anschließend für zwei Minuten in Xylol gelegt. Abschließend wurden die Gefrierschnitte mit Vitro-Clud (Vitro-Clud, Fa. R. Langenbrinck, 79331 Teningen, Deutschland) eingedeckt.

Um Paraffinschnitte nach HE anfärben zu können, mussten diese entparaffiniert werden. Dazu wurden sie zweimal fünfzehn Minuten in Xylol und folglich acht Minuten in eine absteigende Ethanolreihe gelegt, danach in destilliertem Wasser gespült und anschließend für zehn Minuten in Hämatoxylin getaucht. Anschließend für weitere zehn Minuten fließend gewässert und für weitere fünf Minuten in 1% Eosin, versetzt mit drei Tropfen 100% Essigsäure, gelegt. Daraufhin wurden die Schnitte für jeweils zwei Minuten in aufsteigende Alkoholreihen und anschließend für zwei Minuten in Xylol gelegt. Abschließend wurden die Schnitte mit Vitro-Clud eingedeckt.

Für die immunhistochemische Färbung zur Darstellung von CD3-positiven T-Zellen (sog. „Leu4 Antikörper“) wurde zu Beginn der immunhistochemischen Färbung an Gefrierschnitten 10% bovines Serumalbumin (BSA - Fa. Sigma-Aldrich GmbH, 89555 Steinheim, Deutschland) auf die Schnitte gegeben, um unspezifische Bindungen an den Primärantikörper zu verhindern. Während der Inkubationszeit von 30 Minuten wurde der Primärantikörper angesetzt. Das BSA wurde vom Schnitt abgekippt und der Primärantikörper aufgetragen (50 µl pro Schnitt). Der Antikörper wurde bei +4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Sekundärantikörper angesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit TRIS (= TRIS(hydroxymethyl)aminomethane - Fa. SERVA Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg, Deutschland) wurde die endogene Peroxidase mit 200 ml Methanol und 30% H₂O₂ geblockt. Nach wiederholtem Waschen mit TRIS-Puffer wurde der vorinkubierte Sekundärantikörper aufgetragen. Danach wurde der Sekundärantikörper für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Ein Streptavidin-Biotin-Komplex wurde mit dem Dako ABC-Kit (StreptABCComplex/HRP Duet mouse/rabbit2600 Glostrup – Fa. DAKO Denmark A/S, 2600 Glostrup, Dänemark) vorinkubiert und auf den Objektträger gegeben. Um die Antikörper optisch sichtbar zu machen, wurden die Schnitte nach dreimaligem Spülen mit TRIS mit Diaminobenzidin (DAB) angefärbt. Nach zehn Minuten wurde mit destilliertem Aqua gespült.

Für eine Kerngegenfärbung wurden die Gefrierschnitte für 45 Sekunden mit Hämalaun (nach Meyer) inkubiert. Nach 20-minütiger Entwässerung wurden die Schnitte in aufsteigenden Alkoholreihen dehydriert und mit Xylol versetzt und, konservierend, die Schnitte in Vitro-Clud eingedeckt.

Um eine immunhistologische Färbung an Paraffinschnitten durchzuführen zu können, mussten diese zuvor entparaffiniert werden. IgG- und IgM-Färbungen mussten mit Hydroxylamin vorbehandelt werden. CD68- und Albuminfärbungen mussten mit Protease vorbehandelt werden.

Nach der Vorbehandlung wurde 10% BSA (Fa. Sigma-Aldrich GmbH, 89555 Steinheim, Deutschland) auf die Schnitte gegeben, um unspezifische Bindungen an den Primärantikörper zu verhindern. Während der Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Primärantikörper (CD68, IgG, IgM und Albumin) angesetzt. IgG wurde 1 : 800.000, IgM 1 : 80.000 und Albumin 1 : 1000.000 verdünnt. Das BSA wurde vom Schnitt dekantiert und der jeweilige Primärantikörper aufgetragen (bei Nerven 50 μ l pro Schnitt). Der Antikörper wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Sekundärantikörper angesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit TRIS (Tris(hydroxymethyl)amino-methane, Fa. Serva Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg, Deutschland) wurde die endogene Peroxidase mit 200 ml Methanol und 30% H₂O₂ geblockt. Nach wiederholtem Waschen mit TRIS-Puffer wurde der vorinkubierte Sekundärantikörper aufgetragen. Danach wurde der Sekundärantikörper für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Ein Streptavidin-Biotin-Komplex wurde mit dem ABC-Kit von DAKO (StreptABCComplex/HRP Duet mouse/rabbit, Fa. DAKO Denmark A/S, 2600 Glostrup, Dänemark) vorinkubiert und auf den Objektträger gegeben. Um die Antikörper optisch sichtbar zu machen, wurden die Schnitte, nach dreimaligem Spülen mit TRIS, mit DAB (Diaminobenzidin) angefärbt. Nach zehn Minuten wurde mit destilliertem Aqua gespült.

Um eine Kerngegenfärbung darzustellen, wurden die Paraffinschnitte für 45 Sekunden mit Hämalaun (nach Meyer) inkubiert. Nach 20-minütiger fließender Entwässerung wurden die Schnitte in aufsteigenden Alkoholreihen dehydriert und mit Xylol versetzt. Konservierend wurden die Schnitte in Vitro-Clud eingedeckt.

2.3 Mikroskopische Beurteilung der histologischen Präparate

Zur Beurteilung der histologischen Präparate wurden von allen 69 Patienten die folgenden Färbungen von einer unerfahrenen (EW) und einer erfahrenen Untersucherin (NÜ) in verblindeter Weise untersucht: hierzu wurden von allen oben genannten Färbungen die Präparate zu jedem Fall einzeln mikroskopiert und ein Grading vom Ausmaß der gefundenen zellulären Infiltration vorgenommen (s. unten). Die Ergebnisse wurden jeweils einander und der klinischen, elektrophysiologischen und histologischen Abschlussdiagnose gegenübergestellt. Um eine Verblindung für die Untersucher zu gewährleisten, wurden die Präparatenummern der zu untersuchenden N. suralis Präparate von den Mitarbeiterinnen des histologischen Labors der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg codiert.

2.3.1 Grading-Schema

Für die histologische Einteilung der N. suralis Präparate wurde ein semiquantitatives immunhistologisches Grading-Schema definiert (s. unten). Ein wesentlicher Bestandteil dieses Schemas ist der Begriff des „Clusters“, der von der Arbeitsgruppe entwickelt (Sommer et al., 2005) und wie folgt definiert wurde: gruppierte Ansammlung von mindestens 3 endoneuralen Makrophagen um endoneurale Gefäße. Zellen wurden nur dann positiv gewertet, wenn sie erkennbare Zellgrenzen und einen Zellkern oder zumindest Kernanteile aufwiesen, um die falsch zu hohe Berechnung der Zellzahl durch immunreaktive Zellfortsätze auszuschließen.

Grad 0 = keine entzündlichen Veränderungen (nicht-entzündliche Neuropathie)

- keine Rundzellen um endoneurale oder epineurale Gefäße, maximal einzelne Rundzellen im Endoneurium

Grad 1 = geringe Entzündungszeichen

- einzelne Zellen um endoneurale oder epineurale Gefäße, die evtl. Rundzellen sind, bis maximal 1 Cluster je Faszikel

oder

- keine endoneuralen aber maximal 2 epineurale Cluster

Grad 2 = mittelgradige Entzündungszeichen, aber nicht in Vaskulitis-Verteilung

- mehr als 1 Cluster pro Faszikel und Zellen um mindestens ein epineurales Gefäß

oder

- mindestens ein Faszikel mit mindestens 3 Clustern

oder

- mindestens 3 epineurale Gefäße mit entzündlichen perivaskulären Infiltraten

Grad 3 = starke entzündliche Veränderungen oder vaskulitische Neuropathie

- sehr viele Rundzellen dicht um epineurale Gefäße mit oder ohne Durchsetzung der Gefäßwand

Es wurden mehrere Trainingsrunden durchgeführt, um sicherzustellen, dass beide Untersucherinnen das Grading (siehe schematische Darstellung in der nachfolgenden Abb. 1) in gleicher Weise anwendeten.

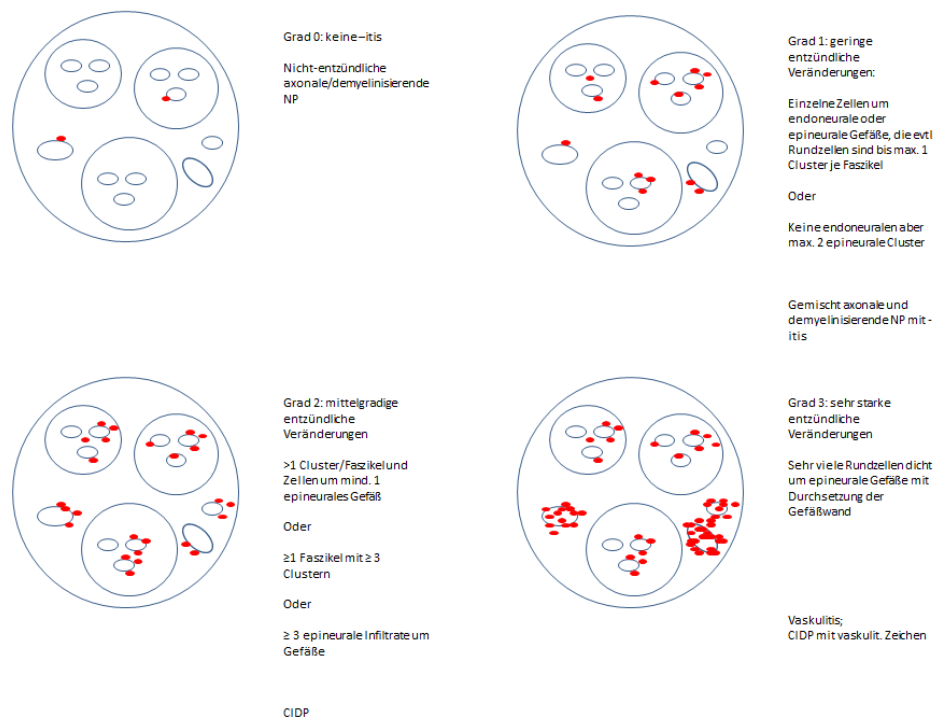


Abbildung 1: Das Grading Schema illustriert mit den vier Graden 0-3.

Der große Kreis repräsentiert den Nervenquerschnitt; die darin enthaltenen drei kleineren Kreise stehen für die Faszikel; die weiteren drei kleineren Ellipsen stellen epineurale Gefäße dar. Die roten Punkte entsprechen Entzündungszellen.

2.3.2 Auswertung der Klassifikation

Als zutreffend klassifiziert galten folgende Präparate, die für die Gruppe der:

1. vaskulitischen Neuropathie in der verblindeten Einteilung den Grad 3 erhielten.
2. CIDP in der verblindeten Einteilung den Grad 1 und 2 erhielten.
3. CIDP mit histologisch vaskulitischen Zeichen in der verblindeten Einteilung den Grad 2 oder 3 erhielt
4. anderen Neuritiden in der verblindeten Einteilung des o. a. Grades 1 und 2 erhielten.
5. nicht-entzündlichen Neuropathie eine Einteilung 0 erhielten.

Diese Zuordnung wurde folgendermaßen begründet: Bei einer Vaskulitis sind definitionsgemäß sehr zahlreiche Entzündungszellen vorhanden, also Grad 3. Bei CIDP und anderen Neuritiden sind Entzündungszellen vorhanden, die Zahl

kann aber stark variieren, also Grad 1-3. Bei nicht-entzündlichen PNP sollten keine Entzündungszellen zu sehen sein, also Grad 0. Es wurde der Prozentsatz der richtig klassifizierten Präparate berechnet und als Trefferquote bezeichnet.

2.3.3 Statistische Auswertung der Daten

Die Untersuchungsergebnisse wurden überwiegend in Excel-Datentabellen dokumentiert und die Häufigkeiten dort ausgezählt. Für Korrelationsanalysen mittels Spearman Koeffizienten wurde SPSS Version 23 (IBM, Ehningen) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Zeigen sich bei gesicherter Entzündung im vollständig untersuchten und klinisch wie neuropathologisch validierten bioptischen Material bereits im HE-Gefrierschnitt eindeutig entzündliche Veränderungen, und wenn ja, wie oft?

3.1.1 HE-Gefrierfärbung

Aus 65/69 auswertbaren Fällen konnte die Expertin (EXP) die Differenzierung „entzündliche“ PNP bzw. „nicht-entzündliche“ PNP gemäß den oben aufgestellten Regeln in 39/65 (60%) der Fälle bereits im HE-Gefrierschnitt korrekt vornehmen. Wenn man nur die verwertbaren nicht-entzündlichen PNP betrachtet lag die EXP in nur 5/29 (17%) der Fälle bereits im HE-Gefrierschnitt richtig. Wenn man nur die verwertbaren entzündlichen PNP betrachtet lag die Trefferquote der EXP bei 33/35 (94%).

Die Laienuntersucherin (LU) konnte aus den 65/69 auswertbaren Fällen die Differenzierung „entzündliche“ PNP bzw. „nicht-entzündliche“ PNP gemäß den oben aufgestellten Regeln in 36/65 (55%) der Fälle bereits im HE-Gefrierschnitt korrekt vornehmen. Wenn man nur die verwertbaren nicht-entzündlichen PNP betrachtet, lag die LU in nur 4/29 (14%) der Fälle bereits im HE-Gefrierschnitt richtig. Wenn man nur die verwertbaren entzündlichen PNP betrachtet, lag die Trefferquote der LU bei 32/35 (91%).

Auswertung nach Diagnosen

Im Folgenden werden die korrekten Ergebnisse entsprechend der Definition nach Abschnitt 2.3.2 (Seite 17) jeweils für EXP und LU gegenübergestellt. In der Gruppe der vaskulitischen Neuropathie ergab sich eine Trefferquote von 4/10 (40%) für EXP und 4/10 (40%) für LU. Bei CIDP betrug die Trefferquote für

EXP 5/10 (50%), für LU 6/10 (60%). Bei CIDP mit histologisch vaskulitischen Zeichen lag die Trefferquote für EXP bei 3/10 (30%), für LU 4/10 (40%). Die Gruppe der CIDP mit vaskulitischen Zeichen war von EXP in 3/9 (33%) und von LU in 4/9 (44%) richtig eingruppiert worden. Die anderen Neuritiden waren von EXP in 4/7 (57%) und von LU in 3/7 (43%) jeweils korrekt eingeordnet worden. Tabelle 1 fasst die Trefferquoten zusammen.

	Vaskulitis	CIDP	CIDP mit histologisch vaskulitischen Zeichen	andere Neuritiden	Nicht-entzündlich
EXP	40%	50%	33%	57%	17%
LU	40%	60%	44%	43%	14%

Tabelle 1: HE-Gefrierfärbung: Trefferquote im Experten- (EXP) und Laiengrading (LU).

3.1.2 HE-Paraffinfärbung

Aus 65/69 auswertbaren Fällen konnte die EXP die Differenzierung „entzündliche“ PNP bzw. „nicht-entzündliche“ PNP gemäß den oben aufgestellten Regeln in 35/65 (54%) der Fälle im HE-Paraffinschnitt korrekt vornehmen. Wenn man nur die verwertbaren nicht-entzündlichen PNP betrachtet, lag die EXP in 3/27 (11%) der Fälle im HE-Paraffinschnitt richtig. Wenn man nur die verwertbaren entzündlichen PNP betrachtet lag, die Trefferquote der EXP bei 32/37 (87%).

Die LU konnte aus den 65/69 auswertbaren Fällen die Differenzierung „entzündliche“ PNP bzw. „nicht-entzündliche“ PNP gemäß den oben aufgestellten Regeln in 35/65 (54%) der Fälle im HE-Paraffinschnitt korrekt vornehmen. Wenn man nur die verwertbaren nicht-entzündlichen PNP betrachtet, lag die LU in 2/28 (7%) der Fälle im HE-Paraffinschnitt richtig. Wenn man nur die verwertbaren entzündlichen PNP betrachtet, lag die Trefferquote der Laie bei 32/37 (87%).

Auswertung nach Diagnosen

Im Folgenden werden die korrekten Ergebnisse am Paraffinschnitt entsprechend der Definition nach Abschnitt 2.3.2 (Seite 17) jeweils für EXP und LU gegenübergestellt. In der Gruppe der vaskulitischen Neuropathie ergab sich eine Trefferquote von 4/9 (44%) bei EXP und 2/9 (22%) bei LU. Bei CIDP betrug die Trefferquote für EXP 8/10 (80%) und für LU 9/10 (90%). Die Gruppe der CIDP mit vaskulitischen Zeichen war von EXP und LU in 6/8 (75%) der Fälle richtig eingruppiert worden. Die Gruppe der anderen Neuritiden war von beiden mit 7/7 (100%) korrekt zugeordnet worden. Tabelle 2 fasst die Trefferquoten zusammen.

	Vaskulitis	CIDP	CIDP mit histologisch vaskulitischen Zeichen	andere Neuritiden	Nicht-entzündlich
EXP	44%	80%	75%	100%	11%
LU	24%	90%	75%	100%	7%

Tabelle 2: HE-Paraffinfärbung: Trefferquote im Experten- (EXP) und Laiengrading (LU).

3.1.3 Makrophagenfärbung

Aus 65/69 auswertbaren Fällen konnte die EXP die Differenzierung „entzündliche“ PNP bzw. „nicht-entzündliche“ PNP gemäß den oben aufgestellten Regeln in 28/65 (43%) der Fälle aus der Makrophagenfärbung (CD68) korrekt vornehmen. Wenn man nur die verwertbaren nicht-entzündlichen PNP betrachtet, lag die EXP in 7/28 (25%) der Fälle in der CD68-Färbung richtig. Wenn man nur die verwertbaren entzündlichen PNP betrachtet, lag die Trefferquote der EXP bei 21/37 (57%).

Aus 65/69 auswertbaren Fällen konnte die LU die die Differenzierung „entzündliche“ PNP bzw. „nicht-entzündliche“ PNP gemäß den oben aufgestellten Regeln in 24/65 (37%) der Fälle in der CD68-Färbung korrekt vornehmen. Wenn man nur die verwertbaren nicht-entzündlichen PNP betrachtet, lag die LU in 2/28 (7%) der Fälle in der CD68-Färbung richtig. Wenn man nur die verwertbaren entzündlichen PNP betrachtet, lag die Trefferquote der LU bei 22/37 (59%).

Auswertung nach Diagnosen

Im Folgenden werden die korrekten Ergebnisse an der Makrophagenfärbung entsprechend der Definition nach Abschnitt 2.3.2 (Seite 17) jeweils für EXP und LU gegenübergestellt. In der Gruppe der vaskulitischen Neuropathie ergab sich eine Trefferquote von 1/8 (13%) für EXP und LU. Bei CIDP betrug die Trefferquote für EXP 8/10 (80%), für LU bei 9/10 (90%). Die Gruppe der anderen Neuritiden war von EXP und LU mit 8/9 (89%) korrekt eingeordnet worden.

	Vaskulitis	CIDP	CIDP mit histologisch vaskulitischen Zeichen	andere Neuritiden	Nicht-entzündlich
EXP	13%	80%	60%	89%	25%
LU	13%	90%	60%	89%	7%

Tabelle 3: Makrophagenfärbung: Trefferquote im Experten- (EXP) und Laiengrading (LU).

3.1.4 Lymphozyten-Färbung

Aus 63/69 auswertbaren Fällen konnte die EXP die Differenzierung „entzündliche“ PNP bzw. „nicht-entzündliche“ PNP gemäß den oben aufgestellten Regeln in 45/63 (71%) der Fälle aus der Lymphozytenfärbung (CD3) korrekt vornehmen. Wenn man nur die verwertbaren nicht-entzündlichen PNP betrachtet, lag die EXP in 18/28 (64%) der Fälle in der CD3-Färbung richtig. Wenn man nur die verwertbaren entzündlichen PNP betrachtet, lag die Trefferquote der EXP bei 26/36 (72%).

Aus 63/69 auswertbaren Fällen konnte die LU die die Differenzierung „entzündliche“ PNP bzw. „nicht-entzündliche“ PNP gemäß den oben aufgestellten Regeln in 36/63 (57%) der Fälle in der CD3-Färbung korrekt vornehmen. Wenn man nur die verwertbaren nicht-entzündlichen PNP betrachtet, lag die LU in 20/28 (71%) der Fälle in der Lymphozytenfärbung richtig. Wenn man nur die verwertbaren entzündlichen PNP betrachtet, lag die Trefferquote der LU bei 16/36 (44%).

Auswertung nach Diagnosen

Im Folgenden werden die korrekten Ergebnisse für die Lymphozytenfärbung entsprechend der Definition nach Abschnitt 2.3.2 (Seite 17) jeweils für EXP und LU gegenübergestellt. In der Gruppe der vaskulitischen Neuropathie ergab sich eine Trefferquote von 4/9 (44%) bei EXP und LU. Bei CIDP betrug die Trefferquote für EXP 3/8 (38%) und für LU. Die Gruppe der CIDP mit vaskulitischen Zeichen war von EXP 7/10 (70%) und von LU in 3/10 (30%) der Fälle richtig eingruppiert worden. Die Gruppe der anderen Neuritiden war von EXP in 7/9 (78%) der Fälle korrekt zugordnet worden und in 6/9 (66%) der Fälle von LU. Tabelle 4 fasst die Trefferquoten zusammen.

	Vaskulitis	CIDP	CIDP mit histologisch vaskulitischen Zeichen	andere Neuritiden	Nicht-entzündlich
EXP	44%	38%	70%	78%	64%
LU	44%	38%	30%	66%	71%

Tabelle 4: Lymphozytenfärbung: Trefferquote im Experten- (EXP) und Laiengrading (LU).

3.2 Klinische Einflussfaktoren auf die histologische Trefferquote nach endgültiger diagnostischer Einteilung des Patientenkollektivs

Die EXP gab zusätzlich zur Beurteilung der Einzelfärbungen auch ein Gesamtgrading nach Sichtung der HE-Gefrier-, HE-Paraffin CD3- und CD68-Färbung pro Fall ab. Es wurde mittels Spearman Korrelation analysiert, ob mögliche klinische Einflussfaktoren auf die Trefferquote einwirkten. Untersucht wurde in diesem Zusammenhang der potenzielle Einfluss der Krankheitsdauer, das Vorhandensein von Diabetes mellitus als Vorerkrankung (relevant v.a. für die Differenzialdiagnose CIDP) und ob eine immunsuppressive Behandlung der Patienten vor Entnahme der Nervenbiopsie durchgeführt worden war. Die Korrelationsanalysen ergaben für keine der fünf Diagnosegruppen einen Hinweis auf eine Korrelation der EXP Trefferquote nach Sichtung aller vier histologischer

Färbungen. Auch für die Annahme, ob eine Biopsie eine entzündliche oder nicht-entzündliche Neuropathie zeigt ergaben sich in der Korrelationsanalyse keine Hinweise auf Assoziation mit den genannten klinischen Parametern.

4 Diskussion

4.1 Diagnostische Vorhersagekraft der histologischen Färbungen

Primäres Ziel der Arbeit war zu untersuchen, ob bereits mit einer einfachen HE-Färbung eine differentialdiagnostische Aussage zu den unterschiedlichen Formen der Polyneuropathien gemacht werden kann und ob ein nicht-Experte („Laie“) nach Erlernen der festgelegten Regeln die Auswertung übernehmen kann (Vital et al., 2006). Es zeigte sich überraschenderweise, dass die HE-Färbung zum Teil besser abschnitt als immunhistochemische Spezialfärbung. Zudem zeigte sich, dass der „Laie“ in der diagnostischen Einschätzung nur in geringem Maße weniger erfolgreich war als die Experten.

Vergleicht man die in dieser Studie durchgeführten Färbungen untereinander, so scheinen diese, abhängig von der jeweiligen PNP Form unterschiedliche diagnostische Vorhersagekraft zu haben. Bei vaskulitischen Neuropathien hatten Vital et al. gezeigt, dass schon mit einer einfachen HE-Färbung neuropathologische Veränderungen, wie eine Infiltration von entzündlichen Zellen in die Gefäßwände gefunden, und so eine Diagnose gestellt werden kann (Vital et al., 2006). Zudem ist die vaskulitische Neuropathie eine streng histologische Diagnose. Daher hatten wir erwartet, dass sich für die Vaskulitiden eine hohe Trefferquote ergeben würde, unabhängig von der Färbung. In der Gruppe der vaskulitischen PNP hatte jedoch die HE-Gefrierfärbung im Laiengrading mit 40% und die HE-Paraffinfärbung mit 24% Trefferquote jeweils eine niedrige diagnostische Vorhersagekraft, was auch deutlich unter der Quote für die anderen diagnostischen Gruppen lag. Dies zeigte sich in analoger Weise auch im Expertengrading mittels HE-Gefrier- und -Paraffinfärbung mit jeweils nur 40% und 44% Trefferquote. Entgegen der Erwartung erhöhte die Immunhistochemie für Entzündungszellen die Trefferquote nicht wesentlich. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass Grad 3 der hier angewendeten Klassifikation „sehr viele Entzündungszellen“ mehr von der subjektiven Einschätzung abhing als beispielsweise Grad 0 („keine Entzündungszellen“).

In der CIDP-Gruppe zeigten im Experten- und Laiengrading die HE-Paraffin und die Makrophagenfärbung die höchste Vorhersagekraft mit je 80% Trefferquote (80% bzw. 90%).

Kulkarni et al. zeigten in ihrer Studie, dass mithilfe der HE-Färbetechnik bei der Suralisbiopsie histopathologische Auffälligkeiten wie ein subperineurales Ödem, Zwiebschalenformationen sowie endo- und epineurale Zellinfiltrationen um kleine Gefäße herum gefunden werden und dabei unterstützend bei der Diagnostik der CIDP sind (Kulkarni et al., 2010). Bosboom et al. untersuchen den diagnostischen Wert von Suralisbiopsien bei Patienten mit CIDP und CIAP (chronisch idiopathische axonale Polyneuropathie). Es wurde mithilfe von Epon-schnitten und Toluidinblau-Färbungen nach Unterschieden in histopathologischen Auffälligkeiten wie Demyelinisierung, Zwiebschalenformationen und Entzündungszellen zwischen den beiden Gruppen sowie einer Kontrollgruppe gesucht. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass eine Suralisbiopsie von begrenzter diagnostischer Wertigkeit sei, da in Bezug auf Demyelinisierungs- und Entzündungszeichen kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen gefunden wurde. Vor der Studie wurden allerdings einige Patienten (6 von 21 der CIDP-Patienten) systemisch anti-inflammatorisch behandelt, was wiederum Einfluss auf das histopathologische Ergebnis haben könnte (Bosboom et al., 2001). Im Gegensatz dazu zeigte sich in unserer Arbeit für die Gruppe der CIDP die HE-Paraffinfärbung und die Makrophagenfärbung im Experten- und Laiengrading mit 90% bzw. 80% Trefferquote jeweils die höchste Trefferquote unter den Färbungen. Für die Gruppe der anderen Neuritiden besaß die HE-Paraffinfärbung im Experten- und Laiengrading mit je 100% Trefferquote sogar die höchste diagnostische Vorhersagekraft.

In der Gruppe der nicht-entzündlichen axonalen und demyelinisierenden Neuropathien zeigte die Lymphozytenfärbung beim Expertengrading mit 64% Trefferquote die höchste diagnostische Vorhersagekraft. Diese lag beim Laiengrading bei 71%.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich bereits mit einer HE-Färbung in der Gruppe der:

- vaskulitischen PNP
- CIDP im Laiengrading, sowie
- anderen Neuritiden

eine relativ hohe diagnostische Vorhersagekraft erzielen lässt.

Die zu Beginn der Studie aufgestellte Hypothese, dass im Falle einer definitiven entzündlichen Neuropathie der HE-Gefrierschnitt eindeutig entzündliche Veränderungen zeigt, kann durch die bei entzündlichen Neuropathien durchweg hohe Trefferquote in den HE Gefrierfärbungen unterstützt werden.

4.2 Abhängigkeitsfaktoren für die Vorhersagekraft der durchgeführten Färbungen

Es wurde untersucht, welche Faktoren Einfluss auf die Vorhersagekraft der verschiedenen Färbungen hatten. Die Patientendaten zu den jeweiligen Biopsaten wurden nach Krankheitsdauer, Begleiterkrankungen, Vorbehandlung mit immunsuppressiver Therapie sowie das Ansprechen auf diese Therapie vor der Biopsie hin untersucht. Es fand sich für keine der Diagnosegruppen ein Hinweis auf eine Beeinflussung der histologischen Trefferquote durch diese klinischen Faktoren. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer Studie von Deprez et al., in der gezeigt wurde, dass klinische Faktoren Einfluss auf die diagnostische Vorhersagekraft von Suralisbiopsien haben können. So wurden bei einer Krankheitsdauer von weniger als sechs Monaten häufiger entzündliche PNP entdeckt, insbesondere die vaskulitische Neuropathie häufiger diagnostiziert (Deprez et al., 2000). Möglicher Grund für diese diskrepanten Ergebnisse kann u. a. die relativ kleine Fallzahl pro Diagnosegruppe in unserer Studie sein.

4.3 Übereinstimmung diagnostischer Trefferquote: erfahrener versus und unerfahrener Untersucher

Alle Präparate wurden jeweils von einem erfahrenem sowie einen unerfahrenem Untersucher nach einem gemeinsamen Gradingssystem ausgewertet. Interessanterweise lagen beide Untersucherinnen in ihren Trefferquoten über praktisch alle Diagnosegruppen relativ eng zusammen. Einzig bei den nicht-entzündlichen PNP war bei insgesamt sehr niedriger Trefferquote auch im Expertengrading, das Gradingergebnis der Laienuntersucherin geringer. Eine mögliche Erklärung dafür mag eine sehr gute Einarbeitung des Laien in das gemeinsame Gradingssystem sein und der gegenseitige Abgleich von Experte und Laie. Ebenso könnte man rückschließen, dass die Auswertung auf einer einfachen Methodik beruht, deren Umsetzung vielleicht sogar künftig mithilfe einer maschinellen Bearbeitung möglich wäre.

4.4 Weitere Arbeiten zum Thema

Anders als bei unserer Fragestellung, welche Färbe- und Auswertemethode für die jeweiligen PNP die geeignetste ist, untersuchen Cornblath et al. das Vorkommen von unterschiedlichen Lymphozyten-Subtypen bei den verschiedenen PNP (Cornblath et al., 1990). Bei 76 % von 42 Patienten die an CIDP; GBS und anderen Neuropathien erkrankt waren ließen sich immunreaktive T-Entzündungszellen in der Suralisbiopsie nachweisen. Die höchste Dichte an T-Zellen zeigte sich in den Biopsien der an CIDP erkrankten Patienten. Unter den Subtypen zeigten CD3 positive T-Lymphozyten die höchste Dichte.

Matsumuro et al. untersuchten in ihrer Studie Suralisbiopsien von Patienten, die an CIDP erkrankt waren (Matsumuro et al., 1994). Histologisch zeigte sich eine Makrophagen-assoziierte Demyelinisierung. Ein endoneurales Vorkommen von T-Zellen korrelierte mit dem Demyelinisierungsgrad. Hier zeigte sich ein erhöhtes Auftreten von CD8+ Zellen. Es wurde angenommen, dass ein von T-Zellen gesteuerter Prozess Einfluss auf die Pathogenese der CIDP hat und somit die Suralisbiopsie wichtige histopathologische Erkenntnisse liefert.

Bosboom et al. untersuchten in ihrer Studie die diagnostische Wertigkeit von Suralisbiopsien bei Patienten mit CIDP (Bosboom et al., 2001). Es wurden Biopsien von 21 erkrankten Patienten histopathologisch untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Patienten, die an einer nicht-inflammatorischen, chronisch idiopathisch axonalen PNP (CIAP) erkrankt waren, sowie eine weitere Kontrollgruppe von verstorbenen Patienten ohne PNP. Die Biopsien wurden speziell auf Entzündungszeichen, Zeichen der Demyelinisierung sowie axonaler De- und Regeneration hin untersucht. Bosboom et al. kamen zu dem Ergebnis, dass keine histopathologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu finden war und daher die Suralisbiopsie bei der Untersuchung von CIDP von begrenzter diagnostischer Wertigkeit ist.

Im Gegensatz dazu beschreiben jedoch Vital et al., dass in der Nervenhistologie von an CIDP erkrankten Patienten Zeichen von Makrophagen-assoziiierter Demyelinisierung sowie eine axonale Beteiligung zu finden war, und diese Veränderungen bezeichnend für die Erkrankung seien (Vital et al., 2000).

Kararizou et al. untersuchten in ihrer Studie die Suralisbiopsien von Patienten mit nicht systemischer vaskulitischer Neuropathie (NSVN) (Kararizou et al., 2005). Histopathologisch zeigte sich darin eine axonale Degeneration sowie ein Faserverlust. Die vaskulitischen Veränderungen wurden vor allem in den kleinen epineuralen Blutgefäßen gefunden. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass bei dem Auftreten von PNP unklarer Genese eine NSVN angenommen werden sollte und die spezifische Diagnose nur durch eine Nervenbiopsie bestätigt werden kann.

Davies et al. untersuchten in ihrer Studie (Davies et al., 1996) die Histopathologie des N. suralis von Patienten mit NSVN. Die meisten Patienten zeigten das Bild einer nekrotisierenden Vaskulitis mit Entzündungszellen und einer deutlichen axonalen Degeneration sowie eine durch Immunhistochemie sichtbar gemachte Ablagerung von Immunkomplexen. Eine definitive NSVN definiert sich nach diesen Untersuchungen durch einen Infarkt der Gefäßwand. Davies et al. plädieren auch für eine Untersuchung von weiteren Nervenabschnitten, da bei ihren Untersuchungen einige der von ihnen diagnostizierten Vaskulitiden erst bei der Betrachtung zusätzlicher Präparate erkannt wurden.

4.5 Schlussfolgerung

Schon eine einfache Färbemethode, wie die HE-Färbung an Gefrier- und Paraffinschnitten, kann bei PNP unklarer Genese hilfreich bei der Diagnosefindung sein. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass bei Vaskulitis, CIDP und in der Gruppe der anderen Neuritiden die Trefferquote mit einer HE-Färbung im verblindeten Grading am höchsten ist und die Unterschiede in der Diagnosefindung zwischen erfahrenem und unerfahrenem Untersucher als gering einzustufen sind. Klinische Faktoren hatten in dieser Kohorte keinen Einfluss auf die Trefferquote.

4.6 Einschränkungen der Arbeit

Die Aussagekraft der Ergebnisse wird durch die in den einzelnen Gruppen geringe Patientenzahl, die retrospektiv eingeschränkte Möglichkeit zur Nachverfolgung des Therapieerfolges und durch die partiell medikamentöse Vorbehandlung der Patienten eingeschränkt.

4.6.1 Patientenzahl

Die gesamte Patientenzahl von 69 Patienten wurde durch die Unterteilung der Patienten in die fünf Untergruppen verringert. So beinhaltete die kleinste Gruppe eine Patientenzahl von 9 Patienten (die Gruppe der vaskulitischen Neuropathie). Die höchste Patientenzahl (in der Gruppe der nicht entzündlichen Neuropathie) beinhaltete eine Gruppenstärke von 30 Patienten.

4.6.2 Geringe Möglichkeit zur Nachverfolgung des Therapieerfolges

Um den Therapieerfolg nachverfolgen zu können, wurde die Krankengeschichte der Patienten vom Zeitpunkt der Aufnahme bis zum letzten Krankenhausaufenthalt extrahiert. Teilweise fehlten Einträge bezüglich der medikamentösen Behandlung und des nachfolgenden Krankheitsverlaufs. Andere Patienten wurden mit Therapieempfehlungen in eine außeruniversitäre ärztliche Betreuung entlassen, so dass hier Angaben zu einem weiteren Krankheitsverlauf fehlten. Während der Studie wurden einige Patienten telefonisch kontaktiert. Dies führte partiell zu weiteren Ergebnissen, denn einige Patienten waren bereits verstor-

ben oder hatten sich einer weiteren ärztlichen Betreuung bzw. einer medikamentösen Behandlung entzogen.

4.6.3 Medikamentöse Vorbehandlung

Bei einigen der Patienten konnte vor oder zu dem Zeitpunkt der Nervenbiopsie in den Patientenakten eine immunsuppressive medikamentöse Therapie festgestellt werden. Dieser Faktor mag einen Einfluss auf das histologische Bild sowie die darauffolgende histologische Einteilung und damit einen Einfluss auf das Ergebnis haben.

5 Zusammenfassung

Häufig stellt die Suralisbiopsie den letzten Schritt in der Diagnostik der PNP dar. Mithilfe von immunhistochemischen Färbungen kann die Ansammlung von Makrophagen-Clustern sichtbar und für die Diagnosefindung einer CIDP nutzbar gemacht werden. Doch reicht bereits eine HE-Färbung für die Diagnosefindung einer CIDP aus, und es ist einem Laien möglich, diese zu erkennen? In dieser Arbeit sollte anhand von Suralisbiopsien untersucht werden, ob bereits mit einer HE-Färbung eine Aussage getroffen werden kann, ob eine entzündliche Neuropathie vorliegt. Zudem wurde untersucht, ob klinische Einflussfaktoren die histologische Trefferquote verändern. Die HE-Färbungen erwiesen sich bei den Vaskulitiden, den CIDP und den anderen Neuritiden als diagnostisch wertvoll – dies mit ähnlich hohen Trefferquoten beim verblindeten Grading durch eine erfahrene und unerfahrene Untersucherin. Klinische Einflussfaktoren auf die Trefferquote fanden sich nicht. Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass schon eine einfache Färbemethode wie die HE-Färbung an Gefrier- und Paraffinschnitten bei PNP unklarer Genese hilfreich bei einer differenzierten Diagnosefindung sein kann und dies sogar in den Händen von unerfahrenen Untersuchern.

Literaturverzeichnis

- Bosboom, W.M., et al., 2001. Diagnostic value of sural nerve demyelination in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain*. 124, 2427-38.
- Collins, M.P., et al., 2000. Superficial peroneal nerve/peroneus brevis muscle biopsy in vasculitic neuropathy. *Neurology*. 55, 636-43.
- Collins, M.P., et al., 2010. Peripheral Nerve Society Guideline on the classification, diagnosis, investigation, and immunosuppressive therapy of non-systemic vasculitic neuropathy: executive summary. *J Peripher Nerv Syst*. 15, 176-84.
- Cornblath, D.R., et al., 1990. Quantitative analysis of endoneurial T-cells in human sural nerve biopsies. *J Neuroimmunol*. 26, 113-8.
- Davies, L., et al., 1996. Vasculitis confined to peripheral nerves. *Brain*. 119 (Pt 5), 1441-8.
- Deprez, M., et al., 2000. Clinical and neuropathological parameters affecting the diagnostic yield of nerve biopsy. *Neuromuscul Disord*. 10, 92-8.
- Dyck, P.J., Dyck, P.J.B., 2005. Pathological alterations of nerves. In: *Peripheral Neuropathy*. Vol. 1, P.J. Dyck, P.K. Thomas, ed. eds. Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 733-829.
- Eurelings, M., et al., 2002. Sural nerve T cells in demyelinating polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy. *Acta Neuropathol*. 103, 107-14.
- Gabriel, C.M., et al., 2000. Prospective study of the usefulness of sural nerve biopsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 69, 442-6.
- Gwathmey, K.G., et al., 2014. Vasculitic neuropathies. *Lancet Neurol*. 13, 67-82.
- Hadden, R.D., Lunn, M.P., Hughes, R.A., 1999. Autoimmune inflammatory neuropathy. *J R Coll Physicians Lond*. 33, 219-24.
- Hughes, R., et al., 2001. Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol*. 50, 195-201.
- Kararizou, E., et al., 2005. Nonsystemic vasculitic neuropathy: a clinicopathological study of 22 cases. *J Rheumatol*. 32, 853-8.
- Koller, H., et al., 2005. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *N Engl J Med*. 352, 1343-56.
- Kulkarni, G.B., et al., 2010. Sural nerve biopsy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: are supportive pathologic criteria useful in diagnosis? *Neurol India*. 58, 542-8.
- Latov, N., 2002. Diagnosis of CIDP. *Neurology*. 59, S2-6.

- Matsumuro, K., et al., 1994. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: histological and immunopathological studies on biopsied sural nerves. *J Neurol Sci.* 127, 170-8.
- McLeod, J.G., 2000. Sural nerve biopsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 69, 431.
- Rappaport, W.D., et al., 1993. Clinical utilization and complications of sural nerve biopsy. *Am J Surg.* 166, 252-6.
- Ruts, L., van Koningsveld, R., van Doorn, P.A., 2005. Distinguishing acute-onset CIDP from Guillain-Barre syndrome with treatment related fluctuations. *Neurology.* 65, 138-40.
- Sommer, C., et al., 2005. Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP. *Neurology.* 65, 1924-9.
- Sommer, C., et al., 2008. 147th ENMC international workshop: guideline on processing and evaluation of sural nerve biopsies, 15-17 December 2006, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 18, 90-6.
- Vital, C., et al., 2000. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: immunopathological and ultrastructural study of peripheral nerve biopsy in 42 cases. *Ultrastruct Pathol.* 24, 363-9.
- Vital, C., et al., 2006. Combined nerve and muscle biopsy in the diagnosis of vasculitic neuropathy. A 16-year retrospective study of 202 cases. *J Peripher Nerv Syst.* 11, 20-9.
- Weis, J., et al., 2012. Processing of nerve biopsies: a practical guide for neuropathologists. *Clin Neuropathol.* 31, 7-23.

Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei folgenden Begleitern und Unterstützern bedanken:

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Klaus V. Toyka für die Themenfindung und für das Ermöglichen dieser Dissertation.

Frau Prof. Dr. med. Claudia Sommer und Frau Prof. Dr. med. Nurcan Üçeyler gebührt besonderer Dank für die stets geduldige, sachkundige und differenzierte Betreuung bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit. Ihre Anregungen, Erfahrungen und Wissen haben mir beim Erstellen dieser Arbeit große Hilfe geleistet.

Ich bedanke mich auch recht herzlich bei den Mitarbeitern der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg, insbesondere bei Frau Klüpfel und den Mitarbeitern des histologischen Labors für Ihre allzeit freundliche Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meinem Ehemann Tim Wagemann für seine fortwährende emotionale Unterstützung und seinen Optimismus. Ihm widme ich diese Arbeit. Ich bedanke mich bei unseren wundervollen Kindern Maximilian und Maja.

Bei meinen Eltern, Schwiegereltern, sowie meiner Patentante und meinen Geschwistern möchte ich mich ganz besonders herzlich für die liebevolle und ermutigende Unterstützung während meines Studiums bedanken, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Veröffentlichungen

Üçeyler, N., Necula, G., **Wagemann, E.**, Toyka, KV., Sommer, C.

Endoneurial edema in sural nerve may indicate recent onset inflammatory neuropathy. *Muscle Nerve*. 2016; 53: 705-10.