

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik

der

Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. K.V. Toyka

Borrelienneuropathie – eine histologische und immunhistochemische Charakterisierung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Neukirchen

aus Würzburg

Würzburg, Januar 2005

Referentin: Prof. Dr. med. C. Sommer

Koreferent: Prof. Dr. med. G. Stoll

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2005

Der Promovend ist Arzt

## **Meinen Eltern**



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1-13</b>
1.1 Geschichte der Entdeckung	1
1.2. Der Erreger	2
1.3. Borreliose	3
1.4 Borrelien neuropathie	10
1.5 Fragestellung Ziel der Arbeit	12
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>14-21</b>
2.1. Patienten	14
2.2. Gewinnung der Biopsien	16
2.3. Immunhistochemische Färbungen von Gefrier- und Paraffinschnitten	17
2.4. Histologische Aufarbeitung der Semidünnschnitte	18
2.5. Fehlliste	19
2.6. Semiquantitative Beurteilung	19
2.7. Quantitative Auswertung	20
2.8. Statistik	21
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>22-47</b>
3.1. Illustrative Fallbeschreibungen	22
3.2. Patientendaten	25
3.3. Auswertung der Biopsien	29
3.3.1. Allgemein-histologischer Befund der BN-Patienten	29
3.3.1.1. Faserverlust	29
3.3.1.2. Vaskulitis/ Perivaskulitis	29
3.3.1.3. Perineurale Dicke	30
3.3.1.4. Vaskularisation im Endoneurium	31

3.3.1.5. Vaskularisation im Perineurium	31
3.3.2. Spezielle immunhistochemische Marker	32
a) T-Zellen	32
b) Makrophagen	34
c) Zytokine	36
d) Adhäsionsmolekül	39
e) Komplementfaktor	41
f) Humanes Leukozyten Antigen (HLA)	41
g) Metalloproteinase (MMP)	42
3.4. Neuropathie-Symptomatik anderer Genese	43
<b>4. Diskussion</b>	<b>47-55</b>
4.1. Zusammenfassung	47
4.2. Vergleich der klinischen Daten mit anderen Studien	47
4.3. Vergleich morphologisch- histologischer Daten mit anderen Studien	48
4.4. Vergleich immunhistochemischer Daten mit anderen Studien	50
<b>5. Aus der vorliegenden Arbeit abgeleitete Überlegungen zur möglichen Pathogenese der Neuropathie bei der Borreliose</b>	<b>53</b>
<b>6. Ausblick</b>	<b>54</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>54-56</b>
<b>8. Literatur</b>	<b>56-60</b>
<b>Danksagung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	

## Verzeichnis der Abkürzungen

ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
AN	Axonale Neuropathie
Bb	Borrelia burgdorferi
BN	Borrelien-assoziierte Neuropathie
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CD	( <i>engl.</i> ) Cluster of Differentiation
CDC	( <i>engl.</i> ) Centers for Disease Control and Prevention
CK	Creatinkinase
CMV	Cytomegalie-Virus
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECM	Erythema chronicum migrans
ELISA	( <i>engl.</i> ) enzyme-linked immuno sorbent assay
FSME	Frühsommerliche Meningoenzephalitis
HE	Hämalaun-Eosin
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IBM	( <i>engl.</i> ) Einschlusskörperchenmyositis
ICAM	( <i>engl.</i> ) intercellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kD	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Metalloprotease
NB	Neuroborreliose
Osp	( <i>engl.</i> ) Outer surface protein
PCR	( <i>engl.</i> ) polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VN	Vaskulitische Neuropathie
VZV	Varizella-Zoster-Virus





## **1. Einleitung**

Die Borreliose gilt als die häufigste durch Arthropoden übertragene Infektionskrankheit in Europa und Nordamerika. Neueste Studien gehen von einer Inzidenz des Erythema migrans, der frühen Borreliose-assoziierten Hautmanifestation, von 100 pro 100.000 Einwohner in Deutschland aus. Neben einer Vielzahl von anderen Krankheitserregern können Zecken die Spirochäte *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia burgdorferi*) übertragen, die als Erreger der Lyme-Borreliose beim Menschen gilt. Vor allem die Schildzecke, *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock), ist hierzulande weit verbreitet [1]. Diese komplexe Erkrankung manifestiert sich in verschiedenen Regionen des Organismus. So kann die Borreliose Verursacher dermatologischer, neurologischer, kardiologischer und ophthalmologischer Symptome sein.

### **1.1. Geschichte der Entdeckung**

#### **1.1.1. Entdeckung der Neuroborreliose**

Erstmals im Jahre 1909 beobachtete der schwedische Dermatologe Arvid Afzelius eine nach einem Zeckenbiss aufgetretene Hautrötung, Erythema migrans. Auf die Chronizität der Hauteffloreszenz wies ein Wiener Dermatologe 1913 hin und führte den Begriff Erythema chronicum migrans (ECM) ein. In Frankreich berichteten Garin und Bujadoux 1922 [2] über einen Patienten, bei dem nach einem Zeckenbiss ein Erythem, eine Parese des Musculus deltoideus und eine Meningoenzephalitis aufgetreten waren, und publizierten damit eine erste Kasuistik einer Neuroborreliose (NB). Hellerström zeigte den gleichen Zusammenhang bei einem Patienten mit lymphozytärer Meningitis im Jahre 1930. 11 Jahre später (1941) berichtete der Münchner Alfred Bannwarth über 19 Patienten, die infolge eines Zeckenbisses an radikulären Schmerzen und chronischer Meningitis litten [3]. Prof. Dr. Schaltenbrand, damals Leiter der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg, wies 1962 auf die strenge zeitliche Abfolge von Zeckenbiss, Erythem und Meningoradikulitis hin, außerdem auf das saisonale Auftreten der Krankheit in Frühsommer und Herbst. Seine daraus resultierende Vermutung, die Krankheit werde durch das gleiche Virus ausgelöst wie die zentraleuropäische Enzephalitis (FSME), wurde in den folgenden Jahren Stück für Stück von verschiedenen europäischen Wissenschaftlern korrigiert. Dabei wurde die Krankheit gegenüber der FSME abgegrenzt und in Bezug auf die Bandbreite ihrer Symptome

genauer definiert. Hörstrup und Ackermann prägten 1973 den Begriff „Meningopolyneuritis Garin-Bujadoux-Bannwarth“ [4].

### 1.1.2. Die Entdeckung der Lyme-Krankheit

Im Oktober 1975 waren einige Kinder aus dem Bezirk Lyme, Connecticut, USA an juveniler rheumatoider Arthritis erkrankt. In einer daraufhin veranlassten Untersuchung von allen 12.000 Einwohnern von 3 umliegenden Gemeinden fanden sich 39 Kinder und 12 Erwachsene, die ähnliche Symptome einer Arthritis zeigten. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde ein Zusammenhang zwischen einer Hauteffloreszenz, im Anschluss an einen Biss durch eine Zeckenart, *Ixodes ricinus*, und der Arthritis festgestellt, und das beobachtete Krankheitsbild Lyme-Krankheit genannt. 1982 gelang die Isolierung einer bis dahin unbekanntes Spirochäten aus *Ixodes dammini* [5]. Bald darauf konnte der Erreger auch in Blut, Haut und Liquor von Patienten identifiziert werden, die außerdem erhöhte IgM- und IgG-Antikörpertiter gegen den Erreger produzierten [5].

### 1.2. Der Erreger

Borrelien werden zur Familie der Spirochäten gerechnet. *B. burgdorferi* (Bb) sensu lato, Erreger der Lyme-Borreliose, kann in 3 Spezies unterteilt werden: *Bb sensu strictu*, *B. garinii*, *B. afzelii* [6, 7]. Eine Spezies jedoch wird nicht spezifisch von einem Vektor übertragen. In neuesten Studien bestehen Anhaltspunkte dafür, dass verschiedene Spezies verschiedene Manifestationen der Lyme-Borreliose hervorrufen können. Der Erreger charakterisiert sich durch eine hohe Beweglichkeit und besitzt eine helikale Struktur. Seine Länge beträgt 5 bis 25 µm, seine Breite 0,2 bis 0,5 µm. 7 bis 20 Flagellen ermöglichen ihm seine Beweglichkeit. Er gilt als mikroaerophil [8]. Verschiedene Proteine des Erregers sind bereits nach ihrer Molekularmasse identifiziert worden. Dazu zählen die „Outer-surface lipoproteins“ (Osp): Osp A (31/32 kD), Osp B (33-35 kD), Osp C (18-25 kD), Osp D (29 kD), Osp E (19 kD) und Osp F (26 kD), außerdem das p39-Lipoprotein und das p83 (p93/p100)-Antigen [9].

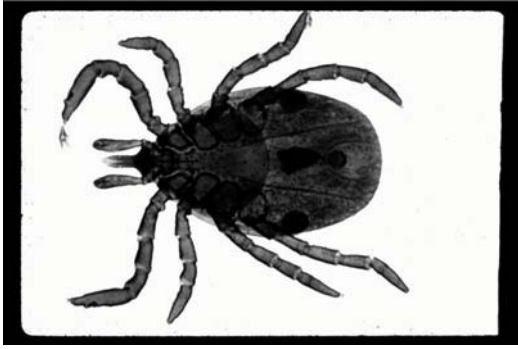


Abb. 1: *Ixodes* spp. – Zecke, 50-fache Vergrößerung,, K.Y. Mum,  
[medlib.med.utah.edu/parasitology/bmicrot.html](http://medlib.med.utah.edu/parasitology/bmicrot.html)

Häufigster Überträger der Borreliose ist der „gemeine Holzbock“, *Ixodes ricinus*. Sein Verbreitungsgebiet erstreckt sich von den britischen Inseln bis zum Kaspischen Meer und Nordiran, von Südkandinavien bis Spanien, Portugal, Italien, bis zu den Balkanländern und Nordafrika. Seine natürliche Umgebung ist der Laubwald. Insbesondere im Unterholz am Waldrand und auf Lichtungen mit hohem Gras (Weidegras) ist er zu finden. Der Holzbock gilt als Parasit sowohl vieler Kleinsäuger, Vögel und Reptilien als auch großer Wild- und Haustiere [3].

Unklar ist, wie die Zecke den sich nähernden Wirt wahrnimmt. Das Erkennen von Wärme oder Feuchtigkeit, von Schallwellen oder der CO<sub>2</sub>-Konzentration als auch der Geruchssinn sind mögliche sensorische Fähigkeiten der Zecke. Nimmt die Zecke einen potentiellen Wirt wahr, so lässt sie sich einfach fallen und versucht sich am Wirt festzuklammern. Anschließend sucht die Zecke einen für die Perforation geeigneten Hautbereich. Ein Paar Cheliceren, die mit Messerchen und Widerhaken besetzt sind, dienen dem Zweck der Perforation der Haut. Durch den Stichkanal führt die Zecke einen Saugrüssel, Hypostom, ein. Unter anderem um unbemerkt zu bleiben, werden anästhesierende, hämostatische, antiphlogistische und immunsupprimierende Substanzen injiziert. Zur Übertragung der Keime kommt es durch Regurgitation borrelienhaltigen Darminhalts, der beim Saugakt in den Wirt eingeschwenkt wird [4].

### 1.3. Borreliose

#### 1.3.1. Epidemiologie

Die Mehrzahl der Patienten wird im Zeitraum von Ende Mai bis Ende Juni infiziert. In Europa und Amerika ist die Borreliose die häufigste durch Arthropoden übertragene

Infektionskrankheit. Die Inzidenz des ECM wird in Deutschland auf 2 bis 32/100.000 Einwohner geschätzt, die Prävalenz auf 50/100.000 Einwohner, manche Autoren sprechen sogar von einer Inzidenz von 100/100.000 Einwohner [1].

Die Infektionsrate nach einem Zeckenstich beträgt 10% (Serokonversion). Die klinische Manifestationsrate einer Neuroborreliose beträgt nur 2-4%. In Mitteleuropa beträgt die Durchseuchungsrate der Zecke *Ixodes ricinus* mit *Borrelia burgdorferi* ungefähr 30%. Innerhalb ihres o.g. Verbreitungsgebietes tritt die Erkrankung besonders häufig in Österreich, Deutschland, Schweden und der Schweiz auf [3].

### 1.3.2. Pathogenese

Mehrere Pathomechanismen werden für die Entstehung der Symptome einer Lyme-Borreliose verantwortlich gemacht. Nach Einbringen der Erreger durch den Biss einer Zecke sind sie zunächst in hoher Konzentration in der Dermis der Haut nachzuweisen [10]. Das typischerweise auftretende ringförmige Erythem wird nach und nach größer, was das klinische Korrelat zentrifugal vom Ort der Entzündung „abschwimmender“ Spirochäten zu sein scheint [11]. Anschließend disseminieren sie hämatogen in den gesamten Organismus, können so entfernt liegende Organe erreichen und an Kollagenfasern an deren Oberfläche binden [7]. Auch Störungen der Herzerregungsleitung entstehen auf diesem Wege [11]. Um die Blut-Hirn- bzw. Blut-Nerven-Schranke zu durchdringen, können sie mit dem Gefäßendothel direkt interagieren und dann die Expression von *Adhäsionsmolekülen* (E-Selectin, ICAM und VCAM-1) auslösen. *Adhäsionsmoleküle* als auch *Zytokine* wie TNF- $\alpha$  und IL-1 erleichtern die Passage durch genannte Schranken. Die Expression konnte auch im Laborversuch mit menschlichem Umbilikalvenen-Endothel nachgewiesen werden [11]. Durch interzelluläre Öffnungen oder durch Transzytose gelangen Entzündungszellen ins zentrale und periphere Nervensystem [10]. Auch der Erreger selbst gelangt ins ZNS und kann dort über Galaktozerebroside an Astrozyten- und Oligodendrozytenoberflächen binden [12]. Die Entzündungsreaktion wird einerseits durch die *proinflammatorischen Zytokine* NO (Stickoxid) und IL-6, andererseits durch die *inflammatorischen Zytokine* IL-1 und TNF- $\alpha$  vermittelt [7, 10]. Am Rattenhirn wirkt NO als Neurotoxin und erhöht die Gefäßpermeabilität. IL-6 ist Reifungsfaktor für B-Zellen, welche so zur Immunglobulinsynthese veranlasst werden. Auf diesem Wege ist das Auftreten intrathekalen Antikörper erklärbar [10]. IL-1 und TNF- $\alpha$  werden von Astrozyten,

Mikroglia und Makrophagen produziert [13]. Yin et al. berichteten bereits 1997 [14] über signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Werte in synovialen Zellen aus Gelenken von Patienten mit Lyme-Arthritis. Weller et al. [15] dagegen konnten 1991 TNF- $\alpha$  weder in Serum noch in Liquor von BN-Patienten nachweisen. Bei rund der Hälfte der Patienten in der Kontrollgruppe mit bakterieller Meningitis (nicht von Spirochäten ausgelöst) konnte dagegen TNF- $\alpha$  im Liquor nachgewiesen werden. Lipopolysaccharide (LPS) der Spirochätenwand können einerseits eine fulminante TNF- $\alpha$ -Produktion auslösen, andererseits stehen LPS im Verdacht, *direkte toxische Wirkung* auf Nervenzellen zu haben. Glykolipide in der Spirochätenwand können die Produktion von Antikörpern auslösen, die mit wirtseigenem Gewebe kreuzreagieren [10]. Wie Makrophagen an Myelinscheiden der Nerven angreifen ist noch nicht vollständig geklärt. Die lokale Aktivierung des Komplementsystems könnte dafür verantwortlich sein [13]. Rosoklija et al. konnten [16] bei diabetischer Neuropathie Komplementproteine vornehmlich in der Wand kleiner endoneuraler Gefäße nachweisen. Sigal et al. als auch Dai et al. berichteten 1993 [17, 18], dass im Serum von Patienten mit Lyme-Borreliose Antikörper (H9724) nachzuweisen sind, die gegen das Flagellin-Protein der Spirochäten gebildet mit körpereigenen Antigenen des Axons kreuzreagieren. Der Erreger selbst ist selten oder nur in geringer Konzentration am Ort der pathologischen Veränderungen nachzuweisen [19]. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Spirochäte meist an humanes Gewebe gebunden ist und deswegen Nachweisverfahren nur schwer zugänglich ist [20]. Potentiell autoreaktive B- und T-Zellen reagieren normalerweise nicht gegen körpereigene Strukturen. Wird jedoch Gewebe durch einen der bereits beschriebenen Pathomechanismen geschädigt, besteht die Möglichkeit, dass primär unzugängliche, doch nun zugängliche Gewebsantigene vormals sequestrierte Immunzellen aktivieren und so eine autoreaktive Entzündung auslösen. Besteht eine Ähnlichkeit zwischen Antigenen des Erregers und Antigenen des Wirtes, können gegen den Erreger produzierte Antikörper wirtseigenes Gewebe angreifen („*molecular mimicry*“) [11]. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) gehören zu einer Gruppe von Endopeptidasen, die sich gegenseitig in ihren Affinitäten auf extrazelluläre Matrix-Komponenten überschneiden. MMP-9 kann die subendotheliale Basalmembran angreifen und somit eine Störung der Blut-Nerv- oder Blut-Hirn-Schranke auslösen. Über diesen

Mechanismus werden sie für das Eindringen von Entzündungszellen in Nervengewebe verantwortlich gemacht [21].

### 1.3.3. Klinisches Erscheinungsbild

Im klinischen Verlauf einer Borreliose können 3 Krankheitsstadien differenziert werden:

Im *ersten Stadium* sind vorwiegend lokalisierte Symptome typisch, die innerhalb von 6 Monaten nach Infektion auftreten. 75% der betroffenen Patienten zeigen ein Erythema chronicum migrans, welches als kranzförmiges, zentrifugal fortschreitendes livid-rotes, zentral ablassendes Erythem mit hellrotem, randbetontem Ring definiert ist. Typisch ist zusätzlich eine regionale Lymphadenopathie [22].

Im *zweiten Stadium* kommt es meist noch innerhalb von 6 Monaten nach Infektion zur Dissemination der Symptomatik. Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Unwohlsein und grippeähnliche Symptome mit Fieber können auftreten. In einigen Fällen ist eine kardiale Beteiligung und die Entwicklung einer Myositis oder Hepatitis beschrieben worden [22]. Eine Beteiligung des zentralen Nervensystems wird durch die Symptom-Trias aus lymphozytärer Meningitis, Hirnnervenparese und Polyradikuloneuritis (Bannwarth-Syndrom) verdeutlicht (=akute Neuroborreliose), die bei 30% der Patienten nach einem Monat nach Auftreten des ECM festzustellen sind [23]. Bei der lymphozytären Meningitis (10-15% der Fälle) sind klinisch vor allem Kopfschmerz, aber auch Fieber und Meningismus typisch, im Liquor findet sich eine lymphozytäre Pleozytose [24]. Bei den Hirnnervenparesen sind in 10-15% der Fälle der Nervus (N.) facialis (VII) betroffen, oft innerhalb der ersten 4 Wochen nach Infektion, die Parese kann ein- oder beidseitig auftreten. Weniger häufig ist der N. oculomotorius (III), N. trochlearis (IV), N. abducens (VI), wie auch der N. trigeminus (V) und der N. vestibulocochlearis (VIII) betroffen. In einigen Fällen sind Taubheitsgefühl und Schmerzen im Gesicht, sowie Doppelbilder und Minderung des Hörvermögens zu beobachten [7, 25]. Folgen der Polyradikuloneuritis sind initial Schmerzen, dann auch Paresen und sensible Ausfälle im jeweiligen Versorgungsgebiet des Nerven, oft asymmetrisch auftretend. Aus den anfänglichen Schmerzen können sich nach Wochen Taubheitsgefühle, aber auch Paresen entwickeln [9].

Im *dritten Stadium* (chronische Borreliose) tritt eine Enzephalomyelitis auf, die sich klinisch durch Einschränkung der Merkfähigkeit, Schwierigkeiten bei der Ausführung intellektuell komplexer Handlungen, spastische Para- oder Tetraparesen und Ataxie zeigen kann. Ebenfalls zu den Spätmanifestationen zählt die Lyme-Arthritis, die typischerweise die großen Gelenke betrifft, die bei 70% der Patienten nach 6 Monaten nach dem ECM auftritt und als asymmetrische Oligoarthritis bezeichnet wird [23, 26].

Eine Polyneuropathie kann bei der Borreliose im Stadium II und III auftreten. Im Stadium III werden in Verbindung mit einer Polyneuropathie häufig livide Hautveränderungen, die Akrodermatitis chronica atrophicans (ACA), und Parästhesien gesehen. Im Gegensatz zur Oligoarthritis tritt sie meistens distal und symmetrisch auf. In seltenen Fällen ist eine fokale Myositis zu beobachten [9, 24].

Weiterhin ungeklärt ist die Frage, wie häufig eine Infektion mit Borrelien zu einer Neuropathie führt. So beschrieben Logigian 1997 und Halperin 2002 [23] bei ungefähr 15% aller mit Borrelien infizierten Patienten neurologische Syndrome. Im einzelnen waren dies vor allem Hirnnerven neuropathien, Radikulopathien und lymphozytäre Meningitiden. Halperin et al. beschrieben in einer Arbeit von 1990 [27], dass 54% der Neuroborreliosepatienten Neuropathien mit diffuser Verteilung aufwiesen, die bei 39% dieser Fälle auch in der elektrophysiologischen Untersuchung bestätigt werden konnten. Diese Neuropathien korrelierten dabei in hohem Maße mit dem Auftreten von Dysästhesien beim Patienten. In seiner Arbeit von 1991 erwähnte Kristoferitsch [26], dass 36% der Patienten seiner Studie elektrophysiologisch nachgewiesene Neuropathien aufzeigten. Auch beschrieb er, dass die meisten dieser Patienten an Dysästhesien litten. 1988 bereits hatten Kristoferitsch et al. [28] Patienten untersucht, die an einer ACA litten. 48% aller Patienten dieser Studie wiesen Symptome einer Neuropathie auf. Betrachtet man nur die medikamentös unbehandelten Fälle, waren es sogar 62%. Shadick et al. berichteten 1994 [29], dass 16% ihrer Borreliose-Patienten an Taubheitsgefühl, Kribbelparästhesien oder brennenden Schmerzen als Zeichen einer Neuropathie litten. Logigian schrieb 1997 [23], dass 50% bis 75% der Patienten in einem frühen Krankheitsstadium an einer Fazialisparese litten. Außerdem traten Radikulopathien oder Lyme-Meningitiden vermehrt auf. Im späten Krankheitsstadium dagegen war bei den Patienten vor allem das Berührungsempfinden betroffen, im Sinne von Parästhesien und radikulären Schmerzen an den Extremitäten. In einer Arbeit von

1998 berichtete Kaiser [9], dass ungefähr 60% der Patienten in einem frühen Krankheitsstadium Hirnnervenparesen erlitten, am häufigsten Paresen des N. facialis, in 50% d. F. beidseitig. Außerdem traten Meningitis und Radikuloneuritis auf. In einem späteren Krankheitsstadium traten Polyneuritis, Myelitis, Enzephalitis und Hirnnervenparesen auf. Aus einer Arbeit in 1997 von Kindstrand [30], bei der Patienten mit weiter fortgeschrittener Erkrankung und Entwicklung einer ACA untersucht wurden, ergab sich, dass 65% der Patienten an klinischen Symptomen einer Polyneuropathie litten. Logigian schrieb 1992 [25], dass als Zeichen einer peripheren Neuropathie 48% seiner Patienten schmerzlose, distale Parästhesien und 48% seiner Patienten eine schmerzhaft Radikulopathie zeigten. In einer Arbeit von England et al. von 1997 [31] ließ sich im Tierversuch ähnliches feststellen. Bei 3 von 8 mit *Borrelia burgdorferi* infizierten Chinesischen Rhesusaffen konnte eine Erkrankung peripherer Nerven gezeigt werden.

#### 1.3.4. Diagnostik

##### Direkter Erregernachweis

Bei drei Viertel aller Patienten mit Erythema migrans können Spirochäten aus einer Hautbiopsie isoliert werden. Im Regelfall ist das aufgrund des charakteristischen Erscheinungsbildes des Erythems jedoch nicht notwendig. Bei Patienten mit ausschließlichem Befall der Hirnhäute (Lyme-Meningitis) kann der Erreger in 10% der Fälle im Liquor nachgewiesen werden. Im allgemeinen ist der Erreger in seiner Menge relativ gering und zudem häufig an Gewebeoberflächen gebunden, was zu Verfälschung des Untersuchungsergebnisses führt [20]. Der Erreger konnte auch bereits aus synovialer Flüssigkeit und synovialer Haut, Auge, Myokard, Blut und Retinaculum flexorum isoliert werden [9].

##### Serologische Diagnostik

Häufiger als der direkte Erregernachweis wird der indirekte Nachweis durch Diagnostik spezifischer Antikörper durchgeführt [3]. In Liquor und Serum sind ELISA oder PCR Methode der Wahl zum Nachweis Borrelien-spezifischer Antikörper. Die Kombination von ELISA und PCR verbessert die Aussagekraft der Untersuchung [19]. Bei einigen der im Western blot nachweisbaren Banden geht man von einer hohen Spezifität für die



Borreliose aus. In der Zusammenschau der Ergebnisse mehrerer Studien legten Dressler et al. [32] Kriterien fest, nach welchen ein Immunoblot als „positiv“ zu werten sei. Sind 5 von 10 der unten genannten IgG- oder 2 von 3 unten genannten IgM-Banden im Blot sichtbar, so ist er als „positiv“ zu werten [22].

<b>IgG-Banden (5 von 10)</b>	<b>IgM-Banden (2 von 3)</b>
18, 23, 28, 30,39, 41, 45, 60, 66, 93	23, 39, 41

Tab. 1: Western Blot Kriterien nach Dressler, 1993: Molekulargewicht in kD [32]

Des weiteren finden sich unspezifische Zeichen einer Entzündungsaktivität (u.a. BSG, C-reaktives Protein, Leukozytosen mit Linksverschiebung, erhöhte IgM-, IgG- und IgA-Werte, Immunkomplexe, Kryoglobuline (IgG und IgM), erhöhte C1q-Bindungskapazitäten und erniedrigte Komplementfaktoren C3 und C4 sowie erhöhte Transaminasenwerte.

Im Liquor sind eine lymphoplasmazelluläre Pleozytose, eine Vermehrung des Gesamt-Proteins, eine Störung der Blut-Liquor-Schranke und der Nachweis liquorspezifischer oligoklonaler IgG-Banden, Zeichen einer zunächst unspezifischen Infektion. Die serologischen Tests sind nicht uneingeschränkt aussagekräftig. Zum einen ist die zeitliche Verzögerung zwischen Exposition mit dem Antigen und einer messbaren Antikörperproduktion zu beachten. So kann in sehr frühen Infektionsphasen der Antikörpernachweis trotz einer bestehenden Infektion ausbleiben. In rund 50% d. F. können im ELISA IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Eine einmal stattgehabte Antikörperproduktion kann hingegen über lange Zeit nachgewiesen werden. Ein Antikörpernachweis ist allenfalls für eine vorausgegangene Antigen-Exposition beweisend, nicht jedoch für eine akute Infektion. Etwa 3-10% der gesunden Bevölkerung zeigen erhöhte Antikörper-Titer [9]. Kreuzreaktive Antikörper können die Diagnostik erschweren, z.B. bei Infektionen mit Varizella-Zoster-Virus (VZV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Cytomegalievirus (CMV), Parvovirus oder bei einer subakuten bakteriellen Endokarditis. Weder ist eine positive Serologie beweisend für eine Infektion, noch lässt sich eine Infektion anhand einer negativen Serologie ausschließen [20].

### 1.3.5. Therapie

Über die optimale Therapie einer Neuroborreliose wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Bei Patienten im akuten Stadium einer Borreliose ist die Gabe von Amoxicillin (1,5 g/d) oder Doxycyclin (200 mg/d) angezeigt, die Angaben über die optimale Behandlungsdauer schwanken dabei zwischen 2 bis 3 und 3 bis 4 Wochen [7, 20]. Bei Patienten mit ZNS-Beteiligung ist die Gabe von Ceftriaxon (2 g/d), intravenös verabreicht (i.v.), über 2 bis 4 Wochen indiziert, Cefotaxim (6 g/d) oder Penicillin G (20 Mega units/d) gelten als alternative Therapie [7, 22]. Der Erfolg einer medikamentösen Therapie lässt sich u.a. an einer Besserung der klinischen Symptome, am Rückgang einer Pleozytose im Liquor oder der Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke messen [9]. Der Einsatz von Kortikosteroiden ist umstritten [6]. Ein positiver Effekt zusätzlich zu Antibiotika verabreichter Kortikosteroide ist bisher nicht sicher nachgewiesen worden. Erfolge konnten bei der Behandlung von Arthritis und Karditis im Rahmen einer Lymeerkrankung verzeichnet werden [6]. Glukokortikoide, hochdosiert appliziert, können die *Apoptose* infiltrierender Lymphozyten fördern [33].

## 1.4. Borrelien-assoziierte Neuropathie (BN)

### 1.4.1. Epidemiologie

Eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* kann mit einer Polyneuropathie vergesellschaftet sein. Sie tritt in Stadium II und III der Erkrankung auf. Stadium II ist typischerweise durch das Auftreten eines Garin-Bujadoux-Bannwarth-Syndroms gekennzeichnet, welches mit Meningitis, Radikuloneuritis und Hirnnervenpareesen einhergeht. Damit steht das Syndrom bezüglich der Häufigkeit des Auftretens gleich nach dem ECM an zweiter Stelle. Es tritt bei 40% bis 60% der Patienten mit einer Borreliose auf. Die Häufigkeit der Polyneuropathie in Stadium III ist umstritten. Einige Autoren sind der Meinung, dass sie nur bei gleichzeitiger ACA auftritt [28, 34]. Andere, v.a. europäische Autoren, fanden Polyneuropathien auch ohne ACA im Stadium III, wobei entzündliche und zum Teil auch vaskulitische Formen beschrieben sind [35].

### 1.4.2. Pathogenese

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer Neuropathie. Es kann einerseits die Gefäßpermeabilität erhöhen, andererseits direkt als

Neurotoxin wirken. Unterstützend verursacht auch das *proinflammatorische Zytokin IL-6* Schäden am Nerven. Zusätzlich spielt die lokale Produktion der Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$ , die von infiltrierenden Astrozyten und Mikroglia-Zellen gebildet werden, eine wichtige Rolle bei der Entstehung eines neuronalen Schadens [13]. IL-1 wird u.a. von Makrophagen im Rahmen einer Entzündung produziert. Bei einer BN-Neuropathie können Lipoproteine der Spirochätenwand die Produktion von TNF- $\alpha$  induzieren [10]. IL-6 bewirkt eine B-Zell-Reifung und somit die Freisetzung von Immunglobulinen. Das könnte möglicher Mechanismus für die Produktion intrathekalen Antikörper sein [10, 13]. *Adhäsionsmoleküle* und *Metalloproteasen* erhöhen die Permeabilität natürlicher Barrieren, so zum Beispiel der Blut-Hirn- oder der Blut-Liquor-Schranke. Spirochäten können die Expression von Adhäsionsmolekülen hervorrufen und so das Übertreten der Entzündung ins Nervengewebe bewirken [10]. Auch der Erreger selbst ist in Gewebe und Liquor nachzuweisen [10]. Über alle diese Mechanismen können Schäden am Nervengewebe verursacht werden.

#### 1.4.3. Weitere Diagnostik

Bei Patienten mit schmerzhafter Radikulitis, Radikuloplexitis, Mononeuritis multiplex oder simplex, Polyneuritis, Hirnnervenpareesen mit unklarer Krankheitsgenese und begleitet von lymphozytärer Meningitis oder mäßiger Meningoenzephalitis sollte man an eine Borrelien-assoziierte Neuropathie denken [36]. Erhärtet wird der Verdacht, wenn sie mit Hautmanifestationen, wie ECM oder ACA, einhergehen. Ist ein Zeckenbiss in der Vorgeschichte erinnerlich oder hat sich der Patient im Frühsommer in einem Endemiegebiet aufgehalten, macht das die Verdachtsdiagnose immer wahrscheinlicher. Neben ausführlicher Anamnese, klinischer, körperlicher Untersuchung, bereits o.g. serologische Diagnostik von Blut und Liquor besteht die Möglichkeit des direkten Erregernachweises als weiteres Mittel der Diagnostik [25]. Zudem sind pathologische Zeichen einer demyelinisierenden oder axonalen Degeneration in der elektrophysiologischen Untersuchung des Nerven typisch [36].

#### 1.4.4. Therapie

Wird gleich zu Beginn der Erkrankung eine orale Antibiose mit Penicillin oder Tetrazyklinen durchgeführt, können möglicherweise ein Erythem oder systemische

Symptome gemildert bzw. beseitigt und der Spätmanifestation vorgebeugt werden. Allerdings gibt es dabei auch Therapieversager trotz Doxycyclin- oder Amoxicillingabe zu Beginn der Erkrankung [36]. Eine antibiotische Therapie ist aber auch bei bereits manifesten neurologischen Symptomen sinnvoll. Hier kommen intravenöse Antibiotika, wie z. B. Penicillin, Doxycyclin, Ceftriaxon und Cefotaxim zum Einsatz. Ein positiver Effekt der kombinierten Gabe von Kortikoiden und Antibiotika ist bisher nicht sicher bewiesen worden [22].

### 1.5. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die sichere Diagnosestellung einer BN ist noch immer schwierig, da nur wenige Studien vorliegen, die an einem größeren Patientenkollektiv das klinische und histologische Erscheinungsbild, den Krankheitsverlauf sowie das Ansprechen auf verschiedene Therapieformen systematisch beschreiben [25, 37-39], und die serologische Diagnostik oft nicht eindeutig ist.

Da die Universität Würzburg inmitten eines Endemiegebietes der Borreliose liegt, ergab sich die Möglichkeit, eine Analyse eines größeren Patientenkollektives mit der Verdachtsdiagnose einer BN durchzuführen und gegenüber anderen Neuropathieformen abzugrenzen. Hierzu wurden retrospektiv das klinische Erscheinungsbild, Erkrankungsverlauf, Laborparameter und histopathologische Charakteristika von Suralisbiopsien von Patienten mit Neuropathie und positiver Borrelien-Serologie bei Borreliose untersucht und gegenüber Neuropathien anderer Genese differenziert.

Ziel der Arbeit war es daher, nach morphologischen Kriterien zu suchen, die weitere Hinweise auf mögliche Pathomechanismen bei der BN geben könnten und ggf. sogar bei der Beurteilung von Nervenbiopsien die Abgrenzung einer BN gegenüber anderen Neuropathien ermöglichen. Ähnlich wie bei anderen entzündlichen Neuropathien wird auch bei der Borrelien-induzierten Neuropathie eine entzündungsvermittelte Genese diskutiert, so dass die vorliegende Arbeit auf die Untersuchung verschiedener immunmodulatorischer Faktoren fokussierte. Dies ist insbesondere für die Borrelien-Neuropathie interessant, da nach Eintritt der Spirochäte in den Organismus diese hämatogen disseminiert und durch Überschreiten von natürlichen Barrieren (Blut-Hirn- bzw. Blut-Nerven-Schranke) in humanes Nervengewebe gelangt. Adhäsionsmoleküle (u.a. ICAM) können die Passage ermöglichen [11]. *Proinflammatorische* und

*inflammatorische Zytokine* (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) erleichtern einerseits die Passage durch die natürlichen Schranken hindurch, andererseits vermitteln sie die Entzündungsreaktion [7]. Zusätzlich fördert IL-6 die B-Zell-Reifung und somit die Antikörperproduktion. Das Angreifen der Makrophagen an Myelinscheiden wird möglicherweise durch das Komplementsystem vermittelt [13]. Besonderes Augenmerk lag daher auf diesen Pathogenitätsfaktoren, um möglicherweise neue Pathomechanismen der Entzündungsreaktion im Rahmen einer Borrelien-assoziierten Neuropathie aufzudecken.

## **2. Material und Methoden**

### 2.1. Patienten

Wir untersuchten 45 Patienten im Alter von 35 bis 86 Jahren, bei denen in den Jahren 1992 bis 2000 an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg aus diagnostischen Gründen Biopsien des N. suralis entnommen wurden. 10 Patienten (22%) waren Frauen, 35 Patienten (78%) waren Männer. Die Patienten wurden 3 Gruppen zugeordnet:

BN (Neuropathie in Verbindung mit einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi* , N=22)

AN (axonale Neuropathie nicht entzündlicher Genese, N=14)

VN (vaskulitische Neuropathie mit negativer Borrelien-Serologie, N=9)

Die Informationen zu Anamnese und Untersuchungsbefund wurden den Krankenakten der Patienten entnommen.

#### 2.1.1. Einschlusskriterien für Patienten der Gruppe BN

Die BN-Patienten erfüllten folgende Kriterien des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [29, 40]:

- ein im Krankheitsverlauf aufgetretenes Erythema migrans und/oder
- späte Manifestationen einer Neuroborreliose mit positivem serologischem Laborbefund (Borrelien-spezifische Antikörper der Klasse IgG in Liquor und/oder Blut nachweisbar)

#### 2.1.2. Einschlußkriterien für Patienten der Gruppe AN

Die Patienten zeigten das klinische und elektrophysiologische Bild einer chronischen axonalen Neuropathie [41]. Im Verlauf war eine für dieses Krankheitsbild typische, langsame Progredienz zu beobachten, die keinen Schwankungen in Schwere und Ausmaß unterlag. Morphologisch konnte zudem jegliche andere Ursache einer Neuropathie ausgeschlossen werden. Im gesamten Nervenquerschnitt fanden sich nicht mehr als 5 T-Zellen. Außerdem gab es nach Anamnese und Laboruntersuchungen keinen Hinweis auf das Vorliegen eines Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangels, eines Diabetes mellitus, einer Urämie, einer Alkoholkrankheit, einer Kollagenose oder einer Toxinexposition.

### 2.1.3. Einschlusskriterien für Patienten der Gruppe VN

Die Diagnose "Vaskulitis" wurde gestellt, wenn wenigstens 3 der 5 folgenden Kriterien erfüllt waren [42]:

1. Klinische Zeichen einer Vaskulitis
  - Asymmetrische oder multifokale, schmerzhafte, sensomotorische Neuropathie
  - Akut/subakut rezidivierender, progressiver oder rezidivierend-progressiver Verlauf
  - keine Spontanremission
2. Nachweis einer systemischen Entzündung anhand einer erhöhten Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) oder eines anderen labortechnischen Nachweisverfahrens.
3. Negative Borrelienserologie
4. Nachweis einer aktiven, symmetrischen, axonalen, sensomotorischen Neuropathie durch elektrophysiologische Untersuchungen
5. Verdacht auf neuromuskuläre Beteiligung
6. Besserung der Symptome auf Immunsuppressiva

### 2.1.4. Diagnosekriterien für Vaskulitis in der Nervenbiopsie

Anhand von Semidünnschnitten, Paraffinschnitten mit HE- (Hämalaun-Eosin) und EvG-Färbung- und Gefrierschnitten mit T-Zell-Färbung (Leu-4) wurde nach folgenden Kriterien die Diagnose einer Vaskulitis gestellt [42].

Definitive Vaskulitis (1): Im Präparat war mehr als ein Gefäß transmural mit T-Zellen infiltriert. Außerdem zeigte sich eine Gefäßläsion im Sinne

- einer fibrinoiden Wandnekrose,
  - einer Disruption des Endothels,
  - einer Fragmentation der Elastica interna
- oder
- einer Einblutung in die Gefäßwand.

Verdacht auf Vaskulitis (2): Hier wies mehr als ein Gefäß eine transmurale Infiltration auf ohne Zeichen einer Gefäßläsion

oder

nur ein Gefäß hatte eine perivaskuläre Infiltration und zeigte mindestens eine der folgenden pathologischen Veränderung:

- Gefäßwandverdickung und Sklerose,
- Verengung oder Verschluss des Lumens,
- Thrombose mit oder ohne Rekanalisation,
- epineurale Kapillarinfiltration,
- Periadventielles Hämosiderin,
- Asymmetrischer Faserverlust

oder

- Waller`sche Degeneration

Perivaskulitis (3): Morphologisch waren nur perivaskulär gelegene Infiltrate zu finden. Außerdem wurde keines der unter (2) genannten Kriterien erfüllt.

## 2.2. Gewinnung der Biopsien und histologische Aufarbeitung

Die Biopsien wurden in der Neurochirurgischen Klinik der Universität Würzburg entnommen. Unter Lokalanästhesie wurde der Unterschenkel im Verlauf der Vena (V.) saphena parva inzidiert. Der N. suralis, der unterhalb der Scarpa-Faszie und meist medial der V. saphena parva lokalisiert ist, wurde in Knöchelhöhe unter sterilen Bedingungen exzidiert.

### 2.2.1. Herstellung von Paraffinschnitten

2 g Paraformaldehyd wurden in 50 ml in 0,1 M Phosphatpuffer bei 60°C gelöst und anschließend filtriert. Nach Abkühlung des Ansatzes wurde ein pH von 7,4 eingestellt. Über Nacht wurde das Gewebe fixiert und am nächsten Tag mit 0,1 M Phosphatpuffer 3 mal 10 Minuten lang gespült.

Der Nerv wurde in Linsenpapier eingewickelt und in eine Biopsiekassette gelegt. Nachdem das Gewebe 10 Minuten gewässert worden war, wurden die Biopsiekassetten in einem Metallbehälter sechseinhalb Stunden in den sogenannten „Einbetter“ gehängt, der das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50% Ethanol bis 100% Ethanol) entwässerte, anschließend mit Chloroform (zwei Mal Chloroform mit 100% Ethanol, zwei Mal Chloroform abs.) fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Biopsiekassette



wurde entnommen und in einen mit Flüssigparaffin (Histowax, Paraffin mit polymeren Zusätzen) gefüllten Behälter gelegt. Das Biopsiematerial wurde in vorher mit Glycerin beschichteten und vorgewärmten Metallformen horizontal positioniert und diese mit flüssigem Paraffin gefüllt. Nach Abkühlen wurde das Paraffin mit dem Nerv aus der Form gelöst und bis zum Schneidevorgang kühl gelagert. Das Paraffinmaterial wurde in ein Schlittenmikrotom (Ultracut, Reichert & Jung) eingespannt und 5 µm dicke Schnitte wurden angefertigt, in Aqua dest. gesammelt, gestreckt und auf Poly-L-beschichtete Objektträger aufgezogen. Anschließend trockneten die Schnitte bei 37°C über Nacht.

### 2.2.2. Herstellung von Gefrierschnitten

Das gewonnene Humanmaterial (2.2.) wurde in durch flüssigen Stickstoff gekühltes Methylbutan eingetaucht und anschließend bei -70°C eingefroren. Mit Hilfe eines Kryostaten (Kryostat 1720, Leica) wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgebracht, 30 Minuten an der Luft getrocknet und 10 Minuten in einer mit Aceton gefüllten Küvette bei -20°C fixiert.

### 2.2.3. Herstellung von Kunststoff-eingebettetem Material

Nach Lagerung in einer 2,5%igen Glutaraldehydlösung mit pH 7,4 wurde das Gewebe mit 0,15 M Phosphatpuffer ausgewaschen und in einer mit Dalton-Puffer verdünnten 4%igen  $\text{OSO}_4$ -Lösung 90 Minuten lang nachfixiert. Das Osmium wurde drei Mal 15 Minuten mit 0,15 M Phosphatpuffer ausgewaschen. In einer aufsteigenden Acetonreihe 30%ig-100%ig erfolgte die Dehydratation. Das Einbettgemisch wurde aus 10 ml ERL 4206 (Vinylchloridhexendioxid), 5 ml DER (Weichmacher), 25 ml NASA (Nonylbernsteinsäureanhydrid), 1 ml DMAE (Dimethylaminoethanol) angesetzt. Anschließend ließen wir die Biopsie jeweils zwei Mal 30 Minuten in 50% Aceton und 50% Einbettgemisch, dann in 25% Aceton und 75% Einbettgemisch, zuletzt in reinem Einbettgemisch aushärten.

### 2.3. Immunhistochemische Färbungen von Gefrier- und Paraffinschnitten

Um unspezifische AK Bindungen zu minimieren, wurde das Gewebe mit 10% BSA für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den folgenden Primärantikörpern bei 4°C über Nacht:

Primärantikörper	Typ/Spezies	Verdünnung	Schnitte	Vertrieb
Leu-4 ( T-Zellen)	Monoklonal Maus	1:800	Paraffin	Coulter
CD 68 (Makrophagen)	monoklonal Maus	1:100	Paraffin	Dako
27E10	monoklonal Maus	1:100	Gefrier	Dianova
25F9	monoklonal Maus	1:50	Gefrier	Dianova
C5	polyklonal Kaninchen	1:5000	Gefrier	Dako
C5b9	monoklonal Maus	1:100	Gefrier	Dako
HLA-DR3	monoklonal Maus	1:4000	Gefrier	Dako
ICAM	monoklonal Maus	1:20000	Gefrier	DPC
IL-1 $\beta$	polyklonal Kaninchen	1:2000	Gefrier	R+D Systems
IL-6	polyklonal Ziege	1:50	Gefrier	R+D Systems
TNF- $\alpha$	polyklonal Ziege	1:50	Gefrier	R+D Systems
MMP-9	monoklonal Maus	1:5	Gefrier	R+D Systems
von Willebrandt Faktor	monoklonal Maus	1:50	Gefrier	Dako

Tab. 2: Bei immunhistochemischen Färbungen verwendete Antikörper

Nach Waschen mit Tris-Puffer wurde die endogene Peroxidase mit Methanol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 ml Methanol + 3,5 ml 30%ig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) geblockt. Nach nochmaligem Waschen mit Tris-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundär-AK, der zuvor 1 Stunde bei 37°C mit Humanserum inkubiert worden war. Ein Streptavidin-Biotin-Komplex, 15 Minuten mit dem ABC-Kit (Dako, Wiesbaden) vorinkubiert, verblieb für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Objektträger. Nach Spülen mit TRIS wurden, um die Antikörper optisch sichtbar zu machen, die Schnitte mit DAB (Diaminobenzidin) gefärbt. Die unmittelbar vorher mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivierte Lösung wurde auf das Präparat pipettiert und nach 10 Minuten mit Aqua dest, gespült. Bei Gegenfärbung wurde der Objektträger 45 s lang mit Hämalaun nach Mayer inkubiert und anschließend 20 Minuten mit Leitungswasser gewässert. Die Biopsie wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Xylol behandelt. Zur Konservierung wurde das Präparat mit Vitroclut eingedeckt.

#### 2.4. Histologische Aufarbeitung der Semidünnschnitte

Semidünnschnitte mit einer Dicke von 0,5  $\mu$ m wurden an einer Schneidemaschine (Ultracut, Reichert & Jung) angefertigt. Es folgte die Anfärbung mit Methylenblau-Azur II: 1% Methylenblau und 1% Azur wurden mit 40% Saccharose gemischt. Unter

Zugabe von 1-9 Tropfen 4%igem Formol wurde ein pH von 9,0 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Die Schnitte wurden bei 60°C 1 bis 2 Minuten gefärbt, in Aqua dest. gespült und dann getrocknet und eingeschlossen.

## 2.5. Fehlliste

Aus technischen Gründen standen uns folgende Färbungen nicht zur Verfügung:

Pat. 1: C5b9

Pat. 2: C5b9

Pat. 4: C5b9

Pat. 5: C5b9, MMP-9

Pat. 7: CD-3, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , ICAM, C5b9, HLA-DR 3

Pat. 9: CD68, 27E10, 25F9, MMP-9, C5b9

Pat. 10: C5b9

Pat. 13: C5b9

Pat. 16: C5b9

## 2.6. Semiquantitative Beurteilung

### 2.6.1. Faserverlust

Der Faserverlust eines Nerven wurde als „leicht“ bezeichnet, wenn nach mikroskopischer Einschätzung weniger als 40% der Axone betroffen waren; als „mäßiggradig“, wenn ungefähr 40% bis 70% der Axone betroffen waren; als „schwer“, wenn über 70% der Axone betroffen waren.

### 2.6.2. Vaskulitis/ Perivaskulitis

Das Vorhandensein einer Vaskulitis oder Perivaskulitis wurde anhand von Semidünnschnitten, Paraffinschnitten mittels HE- und EvG-Färbung- und Gefrierschnitten mittels T-Zell-Färbung (Leu-4) gemäß den o.g. Kriterien untersucht.

### 2.6.3. Gefäßzahl

Alle Färbungen wurden zunächst semiquantitativ von einem verblindeten Untersucher ausgewertet. Hierzu wurden die Schnitte unter einem Lichtmikroskop (Zeiss, Axioplan 2) betrachtet und der Grad der Vaskularisation in Endo- und Perineurium beurteilt.

- 0 - keine Gefäße
- 1 - geringe Vaskularisation
- 2 - mäßige Vaskularisation
- 3 - mittlere Vaskularisation
- 4 - starke Vaskularisation
- 5 - sehr starke Vaskularisation
- 6 - äußerst starke Vaskularisation

### 2.6.4. Immunhistochemie

Alle Färbungen wurden zunächst semiquantitativ von einem verblindeten Untersucher ausgewertet. Hierzu wurden die Schnitte unter einem Lichtmikroskop (Zeiss, Axioplan 2) betrachtet und die IR in Endo-, Peri- und Epineurium beurteilt.

Die Bewertung der Anzahl immunreaktiver Fläche erfolgte anhand einer Skala von 0 bis 6.

- 0 - keine immunreaktive Fläche
- 1 - geringe immunreaktive Fläche
- 2 - mäßig große immunreaktive Fläche
- 3 - mittel-große immunreaktive Fläche
- 4 - große immunreaktive Fläche
- 5 - sehr große immunreaktive Fläche
- 6 - äußerst große immunreaktive Fläche

## 2.7. Quantitative Auswertung

### 2.7.1. Perineurale Dicke

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss Axiophot 2), einer Digitalkamera (Sony CCD), angeschlossener Hardware (PC Intel Pentium II) und Software (Image Pro Plus 4.0 - Media Cybernetics, Director of Global Sales, Jos de Lange, Frambozenweg 139, 2321 KA Leiden, Niederlande) wurden digitale Aufnahmen der mit Azur-Blau gefärbten

Biopsien erzeugt. An jeder Biopsie wurde an 4 zufällig gewählten Stellen die Dicke des Perineuriums quantitativ bestimmt und der Mittelwert errechnet.

#### 2.7.2. Immunhistochemische Färbungen außer Leu-4 und MMP-9

Mit in 2.7.1. genannten Versuchsaufbau wurden digitale Aufnahmen in 340-facher Vergrößerung (20x Objektiv) angefertigt. Mit der Software wurde die IR mittels Analyse der optischen Dichte ermittelt.

#### 2.7.3. Quantitative Auswertung bei Leu-4

Immunhistochemisch markierte T-Zellen wurden unter dem Mikroskop mit 40-er Objektiv manuell ausgezählt. Die Anzahl der T-Zellen wurde in Relation zur Gesamtzahl der Faszikel des Nerven gesetzt.

#### 2.7.4. Quantitative Auswertung bei MMP-9

Um die Relation zwischen den MMP-9-markierten Gefäßen und der Gesamtzahl der Gefäße im Endoneurium berechnen zu können, wurden in einer ersten Färbereihe Gefäße mit dem von-Willebrand-Faktor markiert und so die Gesamtzahl der Gefäße bestimmt. In einer zweiten Färbereihe wurde mit einem AK gegen MMP-9 gefärbt. Die Relation zwischen MMP-9-markierten Gefäße und der Gefäße im Endoneurium insgesamt wurde erfasst und die Durchschnittswerte ermittelt.

### 2.8. Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Zur Berechnung von Gruppenunterschieden wurde ein Zweistichprobentest unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen verwendet. Ein p-Wert < 0,05 (\*) wurde als signifikant, ein p-Wert < 0,01 (\*\*) als hochsignifikant definiert. Werte, die signifikant bzw. hochsignifikant unterschiedlich im Vergleich zur AN-Patientengruppe sind, wurden mit <sup>+</sup> bzw. <sup>++</sup> gekennzeichnet.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Illustrative Fallbeschreibungen**

An dieser Stelle seien 3 Patienten beispielhaft gezeigt: 2 Fälle mit typischer Borrelien-Neuropathie, der erste von beiden in einem akuten Krankheitsstadium (Stadium II), der zweite ein Fall in einem chronischen Krankheitsstadium (Stadium III). Die dritte Fallbeschreibung stellt einen Patienten mit eher untypischer Symptomatik vor.

##### **1. Fallbeschreibung (Patient Nr. 2)**

Bei dem damals 59 Jahre alten Patienten war 3 Wochen vor Aufnahme in unserer Neurologischen Klinik ein allgemeiner Infekt aufgetreten, der unter anderem mit nächtlichen Rückenschmerzen und gastrointestinaler Beteiligung einherging. Zum Zeitpunkt der Aufnahme klagte der Patient über Schwäche der rechten Gesichtshälfte und Gefühlsstörungen am Bein. In der Untersuchung konnten eine Fazialisparese rechts und eine Hypästhesie der Unterschenkelinnenseite festgestellt werden. Im Verlauf (innerhalb von 2 Wochen) traten ein Taubheitsgefühl der Fußsohlen und Fingerspitzen und Kribbelparästhesien in Ober- und Unterschenkel zur Symptomatik hinzu. Bei der serologischen Untersuchung konnten im Blut Borrelien-spezifische Antikörper sowohl der Klasse IgG als auch IgM gefunden werden. In der Gelelektrophorese stellten sich 2 IgG-Banden dar (65 kD und 41 kD) dar. Im Liquor konnten ebenfalls Borrelien-spezifische Antikörper der Klassen IgG und IgM gefunden werden. In der Gelelektrophorese stellten sich 3 IgG-Banden (65 kD, 31 kD, 19 kD) und eine IgM-Bande (19 kD) dar. Zellzahl (11 Zellen) und Proteinmenge (286 mg/dl, Norm: <50 mg/dl) im Liquor waren erhöht. In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigte sich eine überwiegend axonale, sensibel betonte Neuropathie. In der Biopsie des N. suralis fanden sich eine mittelgradige, axonale Neuropathie und endoneural als auch epineural z. T. perivaskulär gelegen zahlreiche Entzündungszellen. Der Patient wurde initial mit Rocephin® i.v. (2 g/d über 14 Tage) behandelt. Bereits während des Krankenhausaufenthaltes ließ sich eine Besserung der Symptomatik beobachten. Beim Kontrolltermin 2 Monate später berichtete der Patient über eine weitere Besserung der Symptome. Die Therapie wurde mit Rocephin® i.v. (4 g/d über 14 Tage) und Urbason® (250 mg/d über 4 Tage) weitergeführt. Nach erneuter Besserung der Symptome wurde

die Therapie 4 Monate später auf Imurek® (150 mg/d) umgestellt. Darunter stabilisierte sich die Symptomatik bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (insgesamt 3 Jahre). Typisches klinisches Bild, Laborparameter, elektrophysiologische Ergebnisse, typische, mit einer Entzündung vereinbare morphologische und immunhistochemische Auffälligkeiten in der Biopsie (s.u.) und das gute Ansprechen des Patienten auf die antibiotische Therapie sichern die Diagnose einer akuten Borrelien-induzierten Neuropathie bei Neuroborreliose im Stadium II.

## 2. Fallbeschreibung (Patient-Nr. 7)

Der zum Aufnahmezeitpunkt 60-jährige Patient klagte über eine seit 1 Jahr bestehende livide Verfärbung der linken Hand. Außerdem gab er an, an Schwellungen und Schmerzen der Knie und Füße zu leiden. In Händen und Füßen verspüre er ein ständiges Kribbelgefühl. Die neurologische Untersuchung ergab eine sich an allen Regionen des Körpers abzeichnende Muskelatrophie, Pallhypästhesie der Finger und Zehen, ein unsicheres Stand und Gangbild, Schwellung der Fußgelenke und ein Pelzigkeitsgefühl der Fingerspitzen links. Zusätzlich wurde vom Dermatologen konsiliarisch die Diagnose eines ACA der linken Hand gestellt. Bei der serologischen Untersuchung fanden sich im Blut Borrelien-spezifische Antikörper der Klasse IgG. Im Liquor waren neben gering erhöhter Zellzahl und normalen Proteinwerten Borrelien-spezifische Antikörper der Klasse IgG (Bande 65 kD) nachzuweisen. Die elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten das Bild einer axonalen Neuropathie. Die Biopsie des N. suralis zeigte eine mäßiggradige Neuropathie mit massiver T-Zell-Infiltration des Epineuriums. Der Patient wurde initial mit Rocephin® i.v. (2 g/d über 14 Tage) behandelt, worunter sich keine Besserung der Symptomatik erreichen ließ. 2 Monate später wurde eine Therapie mit Claforan® drei Mal 4 g/d über 10 Tage durchgeführt, worauf sich die Symptomatik merklich besserte. Danach blieb die Symptomatik unter hausärztlicher Betreuung weitgehend stabil. Gelegentlich auftretende Gelenkschmerzen wurden symptomatisch mit Amuno® (Indometacin) behandelt. 5 Jahre später verstarb der Patient an den Folgen eines Rektumkarzinoms. Typischer Verlauf und klinisches Bild, elektrophysiologische Untersuchungsergebnisse, entzündliche Auffälligkeiten in der Nervenbiopsie und insbesondere das Auftreten einer

chronischen Hautmanifestation (ACA) sichern die Diagnose einer chronischen Borrelien-induzierten Neuropathie (Stadium III)

### 3. Fallbeschreibung (Patient-Nr. 21)

Der zum Aufnahmezeitpunkt 61-jährige Patient klagte über seit 6 Jahren bestehende Schluckbeschwerden. Vor 5 Jahren waren eine Schwäche und Atrophie des linken Beines hinzugetreten. Zudem berichtete der Patient über eine seit 2 Jahren bestehende Schwäche der linken Schulter, vermehrte Müdigkeit und Schmerzen in den Ellenbogen- und Fingergrundgelenken.

Befund der körperlichen neurologischen Untersuchung fanden sich Faszikulationen der Zunge, eine faziale Schwäche beidseits (bds.), Paresen der Kopfbeuger, der Fingerstrecker links, leichtgradige Paresen der linken Hand und der Hüftbeuger bds.. Es bestand eine Atrophie des linken Oberschenkels, die Muskeleigenreflexe waren allseits schwach auslösbar. Bei der serologischen Untersuchung fanden sich im Blut Borrelien-spezifische Antikörper der Klasse IgG. In der Gelelektrophorese fanden sich 6 Banden (94 kD, 65 kD, 41 kD, 39 kD, 31/34 kD, 19 kD). Ebenso fand sich ein um ein Mehrfaches gesteigerte Wert der Kreatinkinase (CK) (668 U/l, Normwert: < 80 U/l). Im Liquor konnten keine Zellen nachgewiesen werden. Das Liquoreiweiß war grenzwertig erhöht (66,6 mg/dl, Normwert: < 50 mg/dl). Borrelien-spezifische Antikörper der Klasse IgG fanden sich auch im Liquor (Banden 65 kD, 31/34 kD). In der elektrophysiologischen Untersuchung stellte sich eine motorisch betonte Neuropathie dar. In der Biopsie des N. suralis fand man eine mittelgradige, axonale Neuropathie mit sehr wenigen T-Zell-Infiltraten epi- und endoneural. Wegen des zusätzlichen Verdachts auf eine myopathische Erkrankung wurde eine Muskelbiopsie entnommen. Die Biopsie zeigte das Bild einer Einschlusskörperchenmyositis (IBM).

Der Patient wurde initial mit Rocephin® i.v. (2 g/d über 14 Tage) und Urbason® (500 mg/d über 5 Tage) behandelt. Die Symptomatik verschlechterte sich nicht, eine Besserung war jedoch auch nicht zu beobachten. Unter einer intravenösen Therapie mit Immunglobulinen (IVIg 30 g/d über 5 Tage) besserten sich die Paresen in einem Zeitraum von 3 Monate merklich. Eine weitere 2 Monate später durchgeführte intravenöse Therapie mit Immunglobulinen erbrachte eine weitere Besserung der Paresen.



Der Patient zeigt für eine Borrelien-Neuropathie folgende untypische Merkmale: Schluckbeschwerden, Faszikulation der Zunge, fehlende Entzündungszeichen im Liquor, CK-Erhöhung, morphologisch und immunhistochemisch kaum Nachweis von Entzündung in der Suralisbiopsie, fehlendes Ansprechen der Symptomatik auf intravenöse Antibiose und Glukokortikoide. Genannte Gründe machen die Diagnose einer Borrelien-Neuropathie eher unwahrscheinlich. Der Patient hat vermutlich eine IBM begleitet von einer motorisch betonten Polyneuropathie. Die Borreliose kann bei diesem Patienten für einen Teil der Symptome, wie die Gelenkschmerzen, möglicherweise auch für die motorische Neuropathie verantwortlich sein, ist jedoch wahrscheinlich nicht Hauptursache für die ausgeprägte Symptomatik des Patienten.

### 3.2. Patientendaten

#### 3.2.1. BN Patienten

Nach den in Kapitel 2.1.1. genannten Kriterien wurden 22 Patienten mit einer Neuroborreliose identifiziert, davon 16 Männer (73%) und 6 Frauen (27%). Der Altersdurchschnitt lag bei  $63,4 \pm 9,1$  (39 bis 77) Jahren. Im Durchschnitt lag das erste Auftreten der Krankheitssymptome zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme  $29,8 \pm 44,6$  (0,5 bis 180) Monate zurück. Kein Patient befand sich zur Zeit der Biopsieentnahme in Stadium I, 3 Patienten (14%) befanden sich in Stadium II und 19 Patienten (86%) in Stadium III.

Patient-Nr.	Alter	Geschlecht	Stadium	Dauer (Mo)
1	74	m	III	180
2	59	m	II	1
3	64	m	III	6
4	70	m	III	12
5	39	m	II	5
6	72	m	III	48
7	60	m	III	1
8	58	w	III	9
9	51	m	II	0,5
10	57	w	III	36
11	62	m	III	1
12	73	w	III	120
13	59	w	III	5
14	72	m	III	1
15	58	m	III	45
16	73	m	III	12
17	77	m	III	180
18	58	m	III	48
19	77	m	III	20
20	62	m	III	18
21	61	w	III	72
22	68	w	III	4

Tab. 3: Allgemeine Daten der Patienten mit BN: m=männlich, w=weiblich, Dauer = Erkrankungsdauer bis zum Zeitpunkt der Biopsie, Mo= Monate

### Allgemeine Symptome einer Infektion

Unspezifische Symptome einer Infektion wurden von 4 Patienten (18%) angegeben. So gaben die Patienten Nr. 9, 10, 11 und 12 an, in der Vorgeschichte an einer grippeähnlichen Infektion gelitten zu haben. 7 Patienten (32%) war erinnerlich, in den letzten 3 Jahren von einer Zecke gebissen worden zu sein. Nur Patient Nr. 15 war eine rote, kreisrunde Hautveränderung, ECM, aufgefallen. Bei Patient Nr. 10 war etwa 3 Jahre vor Aufnahme ein Erythem nach einem Insektenstich aufgefallen, das jedoch weder eine ringförmige Struktur noch die typische zirkuläre Ausbreitung eines ECM aufwies.

### Symptome bei Patienten im Stadium II:

Alle 3 Patienten (100%) litten an Taubheitsgefühl in umschriebenen Bereichen der Extremitäten. 2 Patienten (67%) litten an Kribbelparästhesien. 2 Patienten (67%)

zeigten in der neurologischen Untersuchung ein vermindertes Vibrationsempfinden. 2 Patienten (67%) zeigten das Bild einer Fazialisparese. Keiner der Patienten litt an Muskelschmerzen, -krämpfen, -atrophien, oder Arthralgien. 1 Patient (33%) litt an einer beidseitigen Fußheberparese.

### Symptome bei Patienten in Stadium III

Gefühlsstörung im Sinne von Taubheit beschrieben 16 Patienten (84%), 11 Patienten (58%) im Sinne eines brennenden oder kribbelnden Gefühls. In 8 Fällen (42%) wurde in der neurologischen Untersuchung eine Pallhypästhesie festgestellt. Eine ACA konnte nur bei Patient Nr. 7 festgestellt werden. 13 Patienten (68%) litten an Paresen der Extremitätenmuskulatur und 9 Patienten (47%) an einer Muskelatrophie, davon in 2 Fällen ohne merkliche Parese des jeweiligen Muskels. Muskelschmerzen wurden von 5 Patienten (26%) beschrieben, über Muskelkrämpfe berichteten 2 Patienten (11%). Arthralgien beschrieben 7 Patienten (37%). Eine Gewichtsabnahme wurde nur von 2 Patienten (11%) in Stadium III beschrieben. 3 Patienten (16%) gaben Rückenschmerzen an. Weitere Schmerzen wurden in 3 Fällen (16%) beklagt. 1 Patient (5%) zeigte das Bild einer Fazialisparese. Keiner der Patienten zeigte radikuläre Symptome. Keiner der Patienten litt an Kopfschmerzen.

### Untersuchung des Serums

Bei 21 Patienten (96%) der BN-Gruppe war der Borrelien-spezifische IgG-Titer erhöht. Der Borrelien-spezifische IgM-Titer war bei 5 Patienten (23%) erhöht. Bei Patient Nr. 5 (Stadium II) konnten im Serum keine Borrelien-spezifischen Antikörper im ELISA nachgewiesen werden. Im Borrelien-spezifischen Immunoblot jedoch war eine Bande (31kD) für Antikörper der Klasse IgG deutlich sichtbar. Dieses Laborergebnis, die typischen Klinik des Patienten und das gute Ansprechen auf eine Therapie mit Rocephin® i.v. machte das Vorliegen einer Neuroborreliose sehr wahrscheinlich und veranlasste uns dazu, den Patienten als Fall einer Neuroborreliose in die Untersuchung mit einzubeziehen.

### Untersuchung des Liquors

Der Borrelien-spezifische IgG-Titer war bei 17 unserer Patienten (77%) erhöht, der IgM-Titer bei 2 Patienten (9%). Der Eiweißgehalt des Liquors war bei 15 Patienten (68%) über Norm erhöht (>50 mg/dl). Eine Pleozytose konnte bei 5 Patienten (23%) festgestellt werden. Bei 4 Patienten (18%) konnten in der Immunelektrophorese oligoklonale Banden entdeckt werden.

Vergleicht man die Laborparameter der Patienten verschiedener Krankheitsstadien miteinander, wird ersichtlich, dass alle Patienten (100%) im Stadium II eine Pleozytose im Liquor aufwiesen, im Stadium III waren das nur 2 Patienten (11%). Patienten in Stadium II wiesen alle (100%) ein erhöhtes Liquoreiweiß (>50 mg/dl) auf. Bei Patienten in Stadium III waren das immerhin noch 12 von 19 Patienten (63%). Die Höhe der Proteinwerte unterschied sich in beträchtlichem Maße. So lag der Wert bei Patienten im Stadium II im Mittel bei  $166,7 \pm 103,4$  mg/dl, bei Patienten in Stadium III nur bei  $61,6 \pm 17,3$  mg/dl.

### Vor- und Grunderkrankungen

Patient Nr. 2 war im Alter von 18 Jahren an rheumatischem Fieber erkrankt. Patient Nr. 8 war 1946 an einer nicht näher bezeichneten Meningitis erkrankt. Die Patienten Nr. 12, 18 und 22 waren langjährige Diabetiker. Patient Nr. 12 war zudem Asthmatiker und nahm deswegen seit Jahren regelmäßig Glukokortikoide ein. Bei Patient Nr. 17 standen fragliche zervikale und lumbale Bandscheibenvorfälle im Raum, die die beim Patienten aufgetretene Symptomatik jedoch nur zu einem kleinen Teil erklären konnten. Patient Nr. 4 war vor wenigen Jahren an einem Ulcus ventriculi, Patient Nr. 6 an einem Ulcus duodeni erkrankt.

### Risikofaktoren für eine Neuropathie

Die Patienten Nr. 4, 5, 6, 9, 13, 14, 15, 16 und 18 konsumierten bei Aufnahme schon über mehrere Jahre hinweg täglich alkoholhaltige Getränke (25 g bis 100 g Ethanol / Tag). Die Patienten Nr. 5, 6, 12 und 13 konsumierten über mehrere Jahre hinweg täglich zwischen 5 und 40 Zigaretten.

### 3.2.2. AN-Patienten

Wir untersuchten 14 Patienten, 12 Männer (86%) und 2 Frauen (14%). Der Altersdurchschnitt lag bei  $60,5 \pm 10,4$  (64 bis 85) Jahren.

### 3.2.3. VN-Patienten

Wir untersuchten 9 Patienten, 7 Männer (78%) und 2 Frauen (22%) .Der Altersdurchschnitt lag bei  $61,7 \pm 14,1$  (35 bis 86) Jahren.

## 3.3. Auswertung der Biopsien

### 3.3.1. Allgemein-histologischer Befund der BN-Patienten

#### 3.3.1.1. Faserverlust

Das Ausmaß der Neuropathie wurde anhand von Semidünnschnitten angefärbt mit Azur-Blau klassifiziert. Bei 21 Patienten (95%) lag eine vorwiegend axonale Neuropathie vor, bei einem Patienten (5%) eine demyelinisierende Neuropathie. Im Mittel betrug der Faserverlust  $59 \pm 14\%$ . Die Mehrheit der Patienten wies einen mäßiggradigen Faserverlust auf (15 Patienten, 68%), nur 2 Patienten (9%) zeigten einen leichten und 5 Patienten (23%) einen schweren Faserverlust. Bei 14 Patienten (64%) war der Faserverlust in seinem Verteilungsmuster symmetrisch, bei 8 Patienten (36%) asymmetrisch.

#### 3.3.1.2. Vaskulitis/ Perivaskulitis

8 Patienten (36%) wurden der Gruppe (1) (definitive Vaskulitis), 8 Patienten (36%) der Gruppe (2) (Verdacht auf Vaskulitis) und 6 Patienten (27%) der Gruppe (3) (Perivaskulitis) zugeordnet.

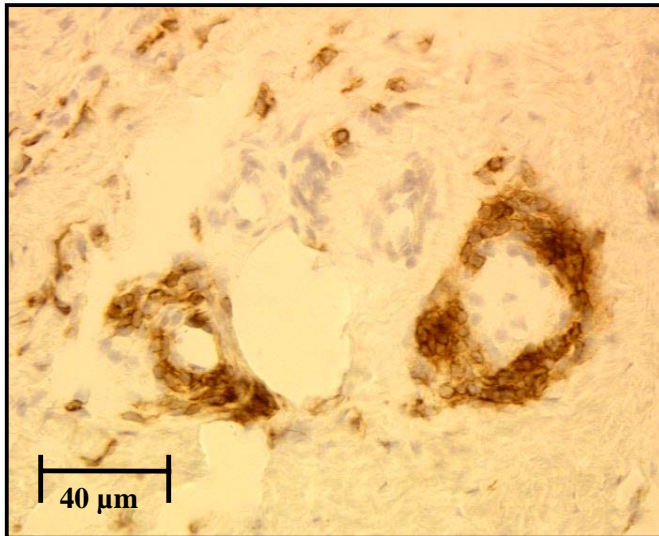


Abb. 2: Vaskulitis, Patient Nr. 5, transmurale T-Zell-Infiltration (Leu-4)

### 3.3.1.3. Perineurale Dicke

Im Mittel betrug die perineurale Dicke  $21,0 \pm 4,3 \mu\text{m}$ . Sie erreichte im Einzelfall Mittelwerte bis  $30,7 \mu\text{m}$  (Patient Nr. 1). Das Perineurium der BN-Patienten war gegenüber den Vergleichsgruppen verdickt. Die Unterschiede waren hochsignifikant. Das Perineurium bei VN-Patienten ( $15,2 \pm 2,0 \mu\text{m}$ ) war nicht unterschiedlich zu dem der AN-Patienten ( $14,4 \pm 3,2 \mu\text{m}$ ).

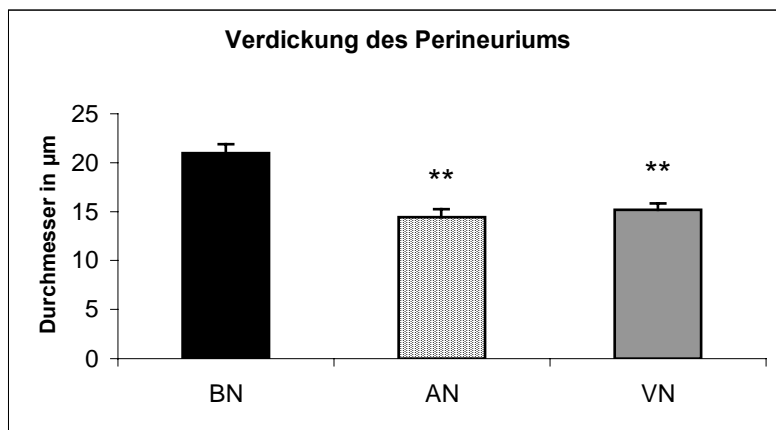


Abb. 3: Verdickung des Perineuriums, quantitative Auswertung, (x-Achse: ausgewertete Patientengruppe; y-Achse: Dicke des Perineuriums in  $\mu\text{m}$ ; Fehlerindikator: SEM),  $**p < 0,01$  BN vs. AN;  $**p < 0,01$  BN vs. VN

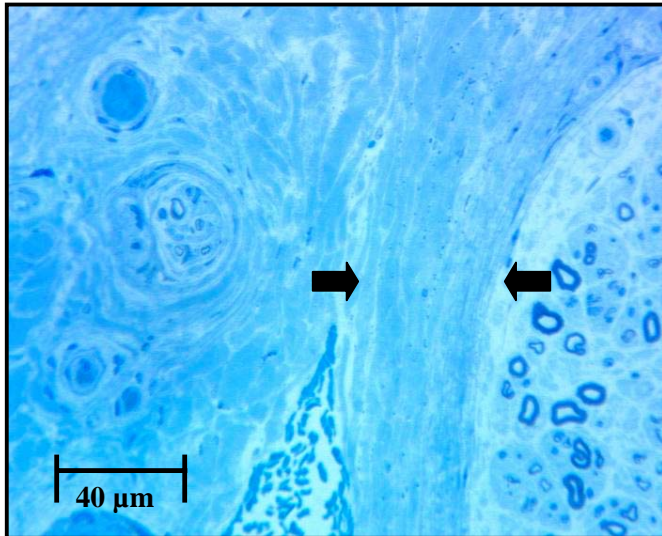


Abb. 4: Perineurale Verdickung, Patient Nr.12, Methylenblau-Azur II

### 3.3.1.4. Vaskularisation im Endoneurium

Die Anzahl der Gefäße im Endoneurium war bei BN-Patienten (semiquantitativer Wert:  $2,0 \pm 1,0$ ) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (AN:  $1,2 \pm 0,5$ ; VN:  $1,4 \pm 0,7$ ) erhöht. Die Unterschiede waren jedoch nur im Vergleich zu den AN-Patienten signifikant.

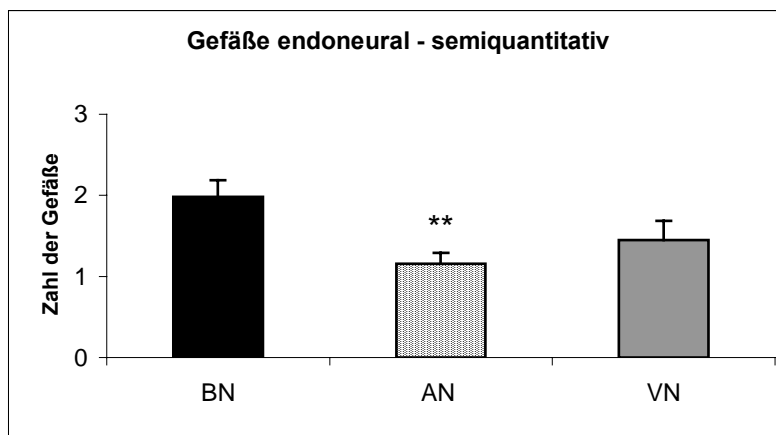


Abb. 5: Semiquantitative Beurteilung der Gefäßzahl in Endoneurium, (x-Achse: ausgewertete Patientengruppe; y-Achse: Zahl der Gefäße; Fehlerindikator: SEM),  $**p < 0,01$  BN vs. AN

### 3.3.1.5. Vaskularisation im Perineurium

Die Anzahl der Gefäße im Perineurium war bei BN-Patienten ( $2,0 \pm 1,1$ ) im Vergleich zu den Kontrollgruppen (AN:  $1,4 \pm 0,6$ , VN:  $1,3 \pm 0,6$ ) signifikant erhöht. Der Unterschied zwischen AN- und VN-Patienten war gering und nicht signifikant.

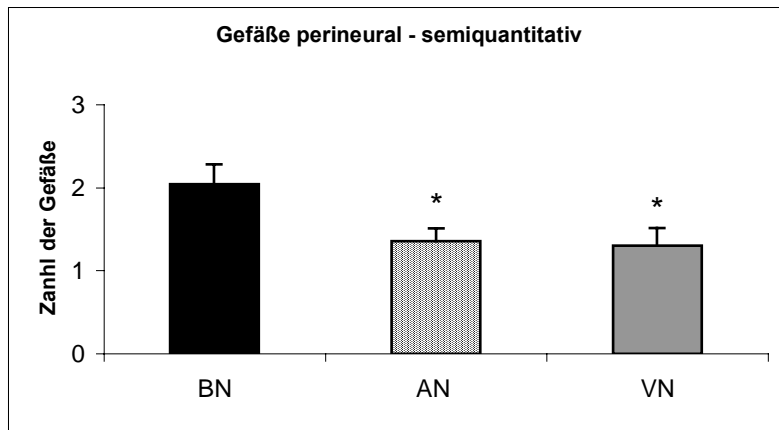


Abb. 6: Semiquantitative Beurteilung der Gefäßzahl im Perineurium, (x-Achse: ausgewertete Patientengruppe; y-Achse: Zahl der Gefäße; Fehlerindikator: SEM), \* $p < 0,05$  BN vs. AN; \* $p < 0,05$  BN vs. VN

### 3.3.2 Spezielle immunhistochemische Marker

#### a) T-Zellen

##### Leu-4

In der semiquantitativen Auswertung war der Anteil immunreaktiver Fläche bei Patienten mit einer entzündlichen Neuropathie in allen 3 Kompartimenten höher als bei nicht-entzündlichen Neuropathien. Die IR bei BN-Patienten war im Endo- und Perineurium geringer, im Epineurium dagegen größer als bei VN-Patienten. Nur die Unterschiede zwischen AN- und BN-Patienten im Peri- und Epineurium waren hochsignifikant.

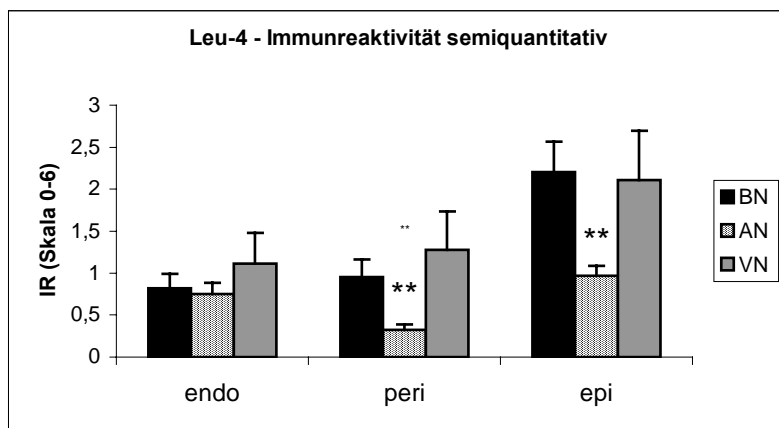


Abb. 7: Semiquantitative Beurteilung des Anteils immunreaktiver Fläche für Leu-4-pos. Zellen, (x-Achse: Patientengruppe und beurteiltes Kompartiment; y-Achse: durchschnittliche IR; Fehlerindikator: SEM); \*\* $p < 0.01$  BN vs. AN perineural; \*\* $p < 0.01$  BN vs. AN epineural

In der quantitativen Auswertung wurden wie in 2.8 beschrieben vorgegangen.



Bei BN-Patienten zeigte sich die größte Zahl an T-Zellen im Epineurium ( $12,6 \pm 15,1$  Zellen epineural,  $2,4 \pm 3,8$  Zellen endoneural und  $2,3 \pm 9,3$  Zellen perineural).

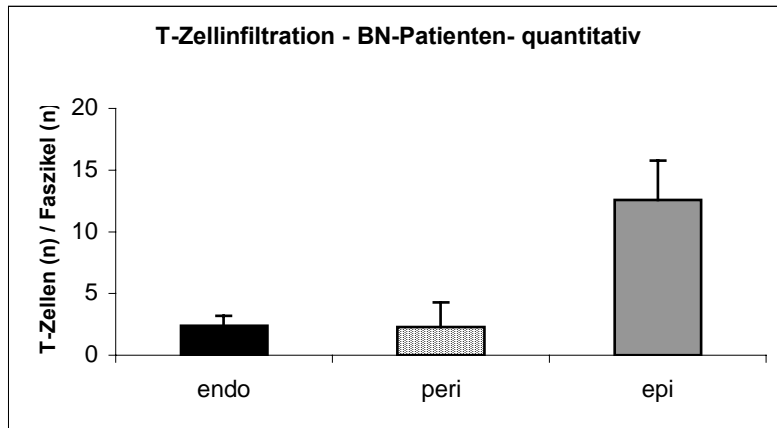


Abb. 8: Quantitative Bestimmung der T-Zell-(Leu-4)-Infiltration bei BN-Patienten (x-Achse: bewertetes Kompartiment; y-Achse: Anzahl der Leu-4-pos.-Zellen in Relation zur Gesamtzahl der Faszikel eines Nerven; Fehlerindikator: SEM)

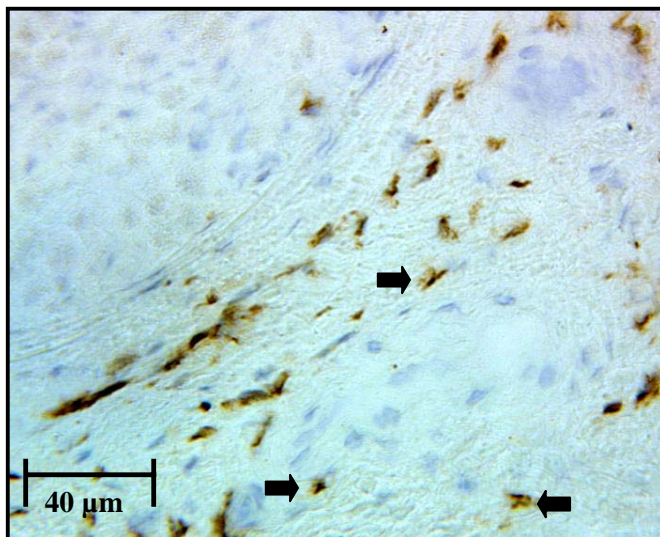


Abb. 9: T-Zell-Infiltration im Epineurium, Patient Nr.7, Leu-4-Färbung

## b) Makrophagen

### CD68

Die IR für CD68 war in allen 3 Kompartimenten bei Patienten der Gruppe VN (endo:  $3,1 \pm 1,4$ ; peri:  $2,0 \pm 1,5$ ; epi:  $2,3 \pm 0,9$ ) am größten. Der Unterschied zu den AN-Patienten (endo:  $1,6 \pm 1,3$ ; peri:  $1,14 \pm 1,4$ ; epi:  $1,6 \pm 1,3$ ) war im Endoneurium signifikant. Endoneural war die größte IR zu verzeichnen. Die IR der BN-Patienten (BN endo:  $2,4 \pm 1,5$ ; peri:  $1,3 \pm 1,0$ ; epi:  $1,6 \pm 1,3$ ) war endo- und perineural höher als bei AN-Patienten. Epineural zeigten BN- und AN-Patienten etwa gleich große IR.

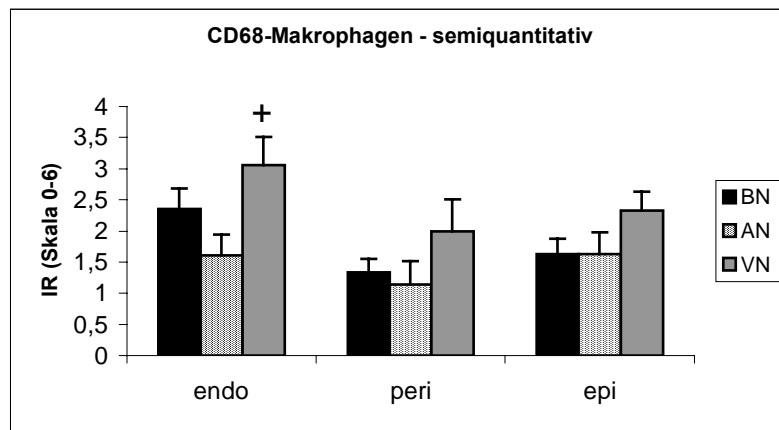


Abb. 10: Semiquantitative Beurteilung des Anteils immunreaktiver Fläche für CD68-Makrophagen (x-Achse: Patientengruppe und beurteiltes Kompartiment; y-Achse: durchschnittliche IR; Fehlerindikator: SEM); <sup>+</sup>p<0,05 VN vs. AN endoneural

### 27E10 - Frühe Makrophagen

Der Antikörper gehört zu den IgG1-Antikörpern. Er bindet an ein Antigen auf ungefähr 2 bis 3 Tagen alten Monozyten, ist somit nur bei akuten Entzündungen nachweisbar und fehlt dagegen bei chronischen Entzündungen und nicht-entzündlichen Läsionen [43, 44]. Die IR für 27E10 war bei allen Patientengruppen in allen ausgewerteten Kompartimenten niedrig, im Epineurium vergleichsweise am höchsten. Es zeigten sich zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen, tendenziell war jedoch bei den entzündlichen Neuropathien eine endo- und perineural erhöhte IR (BN endo:  $0,3 \pm 0,9$ , peri:  $0,2 \pm 0,5$ ; VN endo:  $0,1 \pm 0,4$ , peri:  $0,1 \pm 0,2$ ) gegenüber den nicht-entzündlichen Neuropathien (AN endo:  $0,04 \pm 0,1$ , peri:  $0,04 \pm 0,1$ ) zu beobachten. Die fehlende Signifikanz könnte durch die große Variabilität der IR innerhalb der Gruppen bedingt sein. Epineural war die IR bei AN-Patienten (AN epi:  $0,8 \pm 0,7$ ) gegenüber den entzündlichen Neuropathien (BN epi:  $0,6 \pm 0,8$ ; VN epi:  $0,7 \pm 0,5$ ) tendenziell höher. Eine bemerkenswert hohe IR endoneural zeigte Patient Nr.8. Dieser Patient wies ebenfalls eine hohe endoneurale IR für IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und ICAM auf.

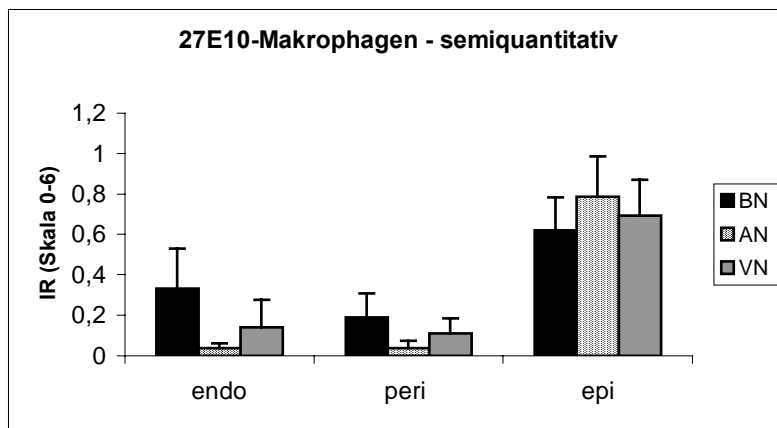


Abb. 11: Semiquantitative Beurteilung des Anteils immunreaktiver Fläche für 27E10 (frühe Makrophagen) (x-Achse: Patientengruppe und beurteiltes Kompartiment; y-Achse: Durchschnittliche IR; Fehlerindikator: SEM)

### 25F9 - Späte Makrophagen

Der Antikörper 25F9 gehört zur Klasse IgG1, bindet nicht an junge Monozyten, sondern an ein Antigen auf Monozyten, die älter als 3 Tage sind. 25F9-Makrophagen kommen in normalem und geschädigtem Gewebe vor unabhängig von einer aktiven Entzündung [44, 45]. Die IR zu den zuvor bestimmten 27E10-Makrophagen war vergleichsweise höher, was durch den zumeist chronifizierten Krankheitsverlauf bei Biopsiezeitpunkt bedingt sein kann. Die IR für 25F9 war endoneural bei den entzündlichen Neuropathien im Vergleich zu den AN-Patienten tendenziell erhöht, bei BN-Patienten vergleichsweise am höchsten. Die Unterschiede waren jedoch aufgrund der geringen Patientenzahlen und interindividuellen Schwankungen auch innerhalb der Patientengruppen nicht signifikant. Peri- und epineural zeigten sich nur sehr geringe IR.

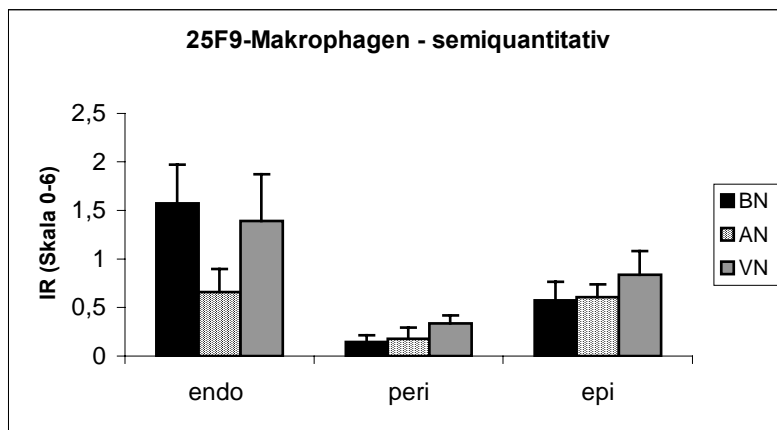


Abb. 12: Semiquantitative Beurteilung des Anteils immunreaktiver Fläche für 25F9 (späte Makrophagen) (x-Achse: Patientengruppe und beurteiltes Kompartiment; y-Achse: Durchschnittliche IR; Fehlerindikator: SEM)

### c) Zytokine

#### TNF- $\alpha$

Der Anteil immunreaktiver Fläche für TNF- $\alpha$  war semiquantitativ bei BN-Patienten im Perineurium (BN peri:  $2,0 \pm 1,2$ ) deutlich höher als in den Kontrollgruppen (AN peri:  $0,6 \pm 0,8$ ; VN peri:  $1,1 \pm 1,2$ ). Der Unterschied war gegenüber den AN-Patienten hochsignifikant. Epineural und endoneural war die IR bei VN-Patienten (VN: epi:  $1,9 \pm 1,6$ , endo:  $2,0 \pm 1,7$ ) tendenziell höher als bei BN- und AN-Patienten (BN epi:  $1,1 \pm 1,0$ , endo:  $1,5 \pm 1,2$ ; AN epi:  $1,4 \pm 1,0$ , endo:  $1,8 \pm 1,3$ ).

Für das Perineurium bestätigte sich in der quantitativen Auswertung das Ergebnis der semiquantitativen Auswertung. Der Unterschied zwischen BN-Patienten sowohl zu AN-

als auch zu VN-Patienten war hochsignifikant (BN:  $0,7 \pm 0,4$ , AN:  $0,2 \pm 0,3$ , VN:  $0,1 \pm 0,2$ ).

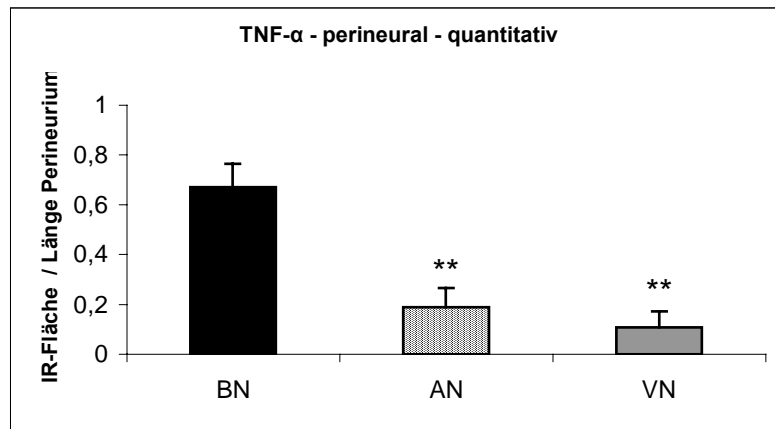


Abb.. 13: Quantitative Bestimmung der IR für TNF- $\alpha$  im Perineurium (x-Achse: Patientengruppe; y-Achse: , IR-Fläche in Relation zur Länge des Perineuriums; Fehlerindikator: SEM); \*\* p<0,01 BN vs. AN; \*\*p<0.01 BN vs. VN

## IL-6

Die IR war in der semiquantitativen Auswertung bei VN-Patienten (VN endo:  $1,8 \pm 1,6$ , peri:  $2,2 \pm 1,9$ , epi:  $1,1 \pm 0,9$ ) in allen 3 Kompartimenten höher als bei AN- (AN endo:  $0,6 \pm 0,7$ , peri:  $0,8 \pm 0,8$ , epi:  $0,1 \pm 0,2$ ) und BN-Patienten (BN endo:  $0,4 \pm 1,3$ , peri:  $1,0 \pm 1,2$ , epi:  $0,2 \pm 0,9$ ). Die IR war peri- und epineural bei BN-Patienten größer als bei AN-Patienten, endoneural jedoch niedriger als bei AN-Patienten. Signifikant waren die Unterschiede zwischen BN- und VN-Patienten endoneural, sowie zwischen BN- und VN-, als auch zwischen AN- und VN-Patienten epineural.

In der quantitativen Auswertung konnte die im Vergleich höchste IR bei VN-Patienten endo- und perineural bestätigt werden. BN-Patienten hatten eine höhere IR als AN-Patienten. Die Unterschiede waren nicht signifikant (BN endo:  $1,0 \pm 4,1\%$ , peri:  $0,6 \pm 1,7$ , AN endo:  $0,6 \pm 1,3\%$ , peri:  $0,2 \pm 0,2$ , VN endo:  $1,4 \pm 2,4\%$ , peri:  $0,9 \pm 1,1$ ).

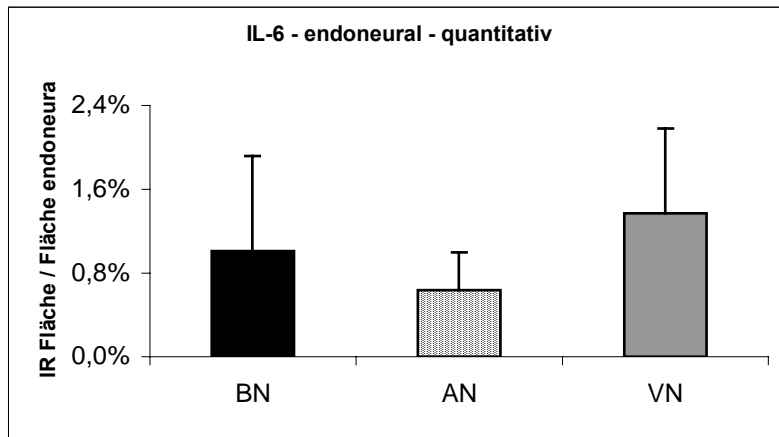


Abb. 14: Quantitative Bestimmung der IR für IL-6 im Endoneurium (x-Achse: Patientengruppe, y-Achse: IR-Fläche in Relation zur endoneuralen Fläche; Fehlerindikator: SEM)

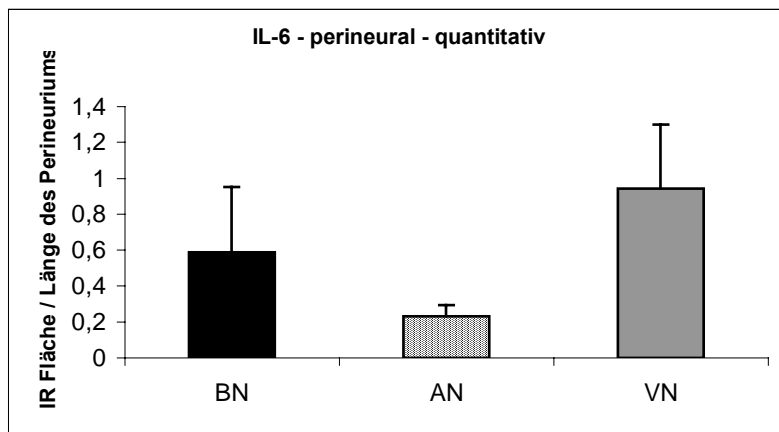


Abb. 15: Quantitative Bestimmung der IR für IL-6 im Perineurium (x-Achse: Patientengruppe, y-Achse: IR-Fläche in Relation zur Länge des Perineuriums, Fehlerindikator: SEM)

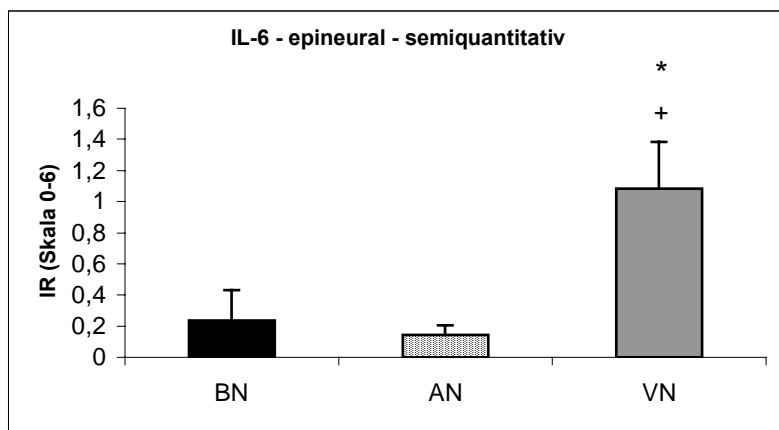


Abb. 16: Semiquantitative Beurteilung der IR für IL-6 im Epineurium (x-Achse: Patientengruppe; y-Achse: Durchschnittliche IR; Fehlerindikator: SEM); \*p<0,05 BN vs. VN, +p<0,05 AN vs. VN

## IL-1 $\beta$

Die IR bei entzündlichen Neuropathien war gegenüber den nicht-entzündlichen Neuropathien in allen 3 Kompartimenten tendenziell erhöht. (BN endo:  $1,4 \pm 1,3$ , peri:  $2,7 \pm 1,1$ , epi:  $0,9 \pm 0,8$ , AN endo:  $1,1 \pm 1,0$ , peri:  $1,6 \pm 1,2$ , epi:  $0,6 \pm 0,5$ , VN endo:  $2,1 \pm 2,0$ , peri:  $2,3 \pm 2,4$ , epi:  $1,2 \pm 1,3$ ). Perineural war die IR bei BN-Patienten am höchsten. Der Unterschied zwischen BN und AN perineural war hochsignifikant. Endo- und epineural war die IR bei VN-Patienten tendenziell am größten.

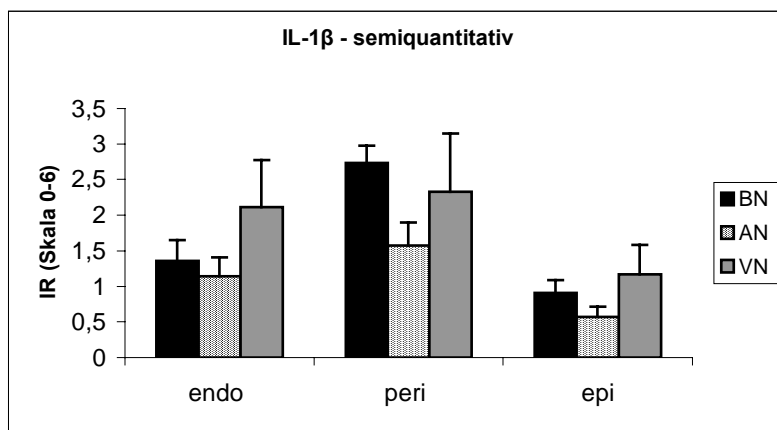


Abb. 17: Semiquantitative Beurteilung der IR für IL-1 $\beta$  (x-Achse: Patientengruppe und beurteiltes Kompartiment; y-Achse: Durchschnittliche IR; Fehlerindikator: SEM); \* $p < 0,01$  peri BN vs. AN

## d) Adhäsionsmolekül

### ICAM

Die IR war bei entzündlichen Neuropathien peri- und epineural höher als bei nicht-entzündlichen Neuropathien. Endoneural war die IR für VN-Patienten signifikant gegenüber AN- und BN-Patienten erhöht (quantitative Auswertung: BN endo:  $2 \pm 2\%$ , AN endo:  $3 \pm 2\%$ ; VN endo:  $6 \pm 3\%$ ). Peri- und Epineural zeigten BN-Patienten die höchste IR (BN peri:  $1,4 \pm 0,9$ , epi:  $1,7 \pm 0,7$ ; AN peri:  $0,6 \pm 0,5$ ; epi:  $1,4 \pm 0,7$ ; VN peri:  $1,2 \pm 1,2$ , epi:  $1,5 \pm 0,7$ ). Epineural waren die Unterschiede zwischen BN und AN signifikant, perineural sogar hochsignifikant.

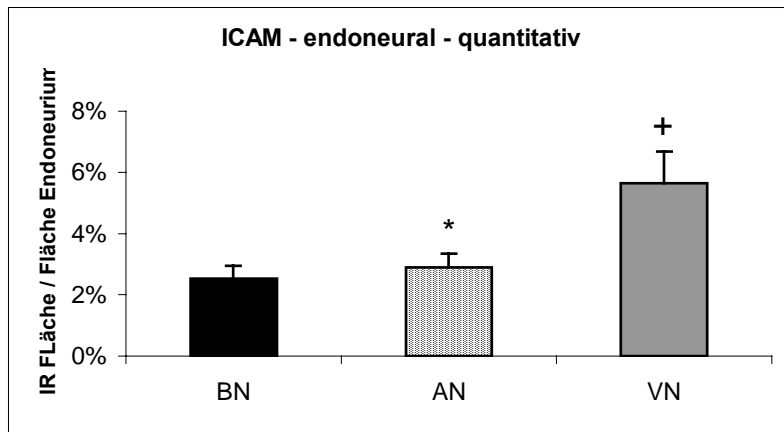


Abb. 18: Quantitative Bestimmung der IR für ICAM im Endoneurium (x-Achse: Patientengruppe ;y-Achse: IR-Fläche in Relation zur endoneuralen Fläche; Fehlerindikator: SEM); \* $p < 0,05$  BN vs. VN, <sup>+</sup> $p < 0,05$  AN vs. VN

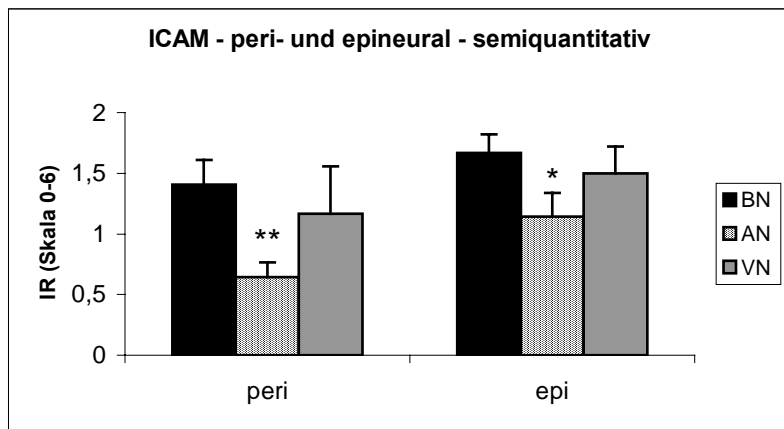


Abb. 19: Semiquantitative Beurteilung der IR für ICAM in Peri- und Epineurium (x-Achse: Patientengruppe und beurteiltes Kompartiment; y-Achse: durchschnittliche IR; Fehlerindikator: SEM); \*\* $p < 0,01$  BN vs. AN peri; \* $p < 0,05$  BN vs. AN epi



## e) Komplementfaktor

### C5b9

Wir konnten hohe IR vor allem im Perineurium feststellen. In der quantitativen Auswertung war die IR bei BN-Patienten ( $3,8 \pm 2,3$ ) gegenüber den AN-Patienten (AN:  $1,8 \pm 1,2$ ; VN:  $2,7 \pm 1,8$ ) signifikant erhöht.

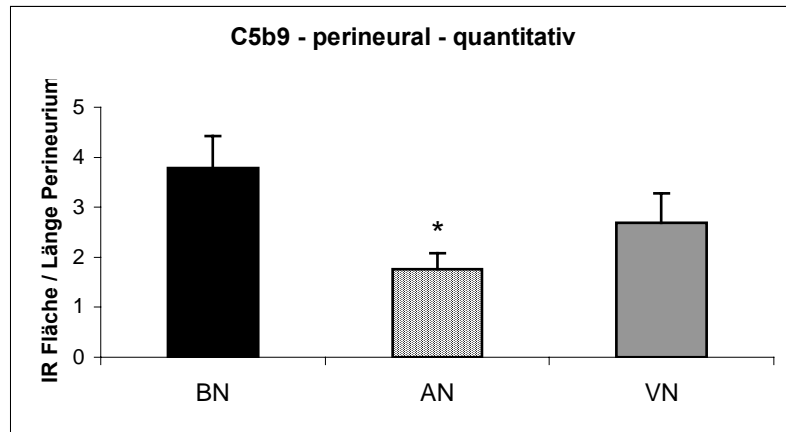


Abb. 20: Quantitative Bestimmung der IR für C5b9 im Perineurium (x-Achse: Patientengruppe; y-Achse: IR-Fläche in Relation zur Länge des Perineuriums; Fehlerindikator: SEM); \* $p < 0,05$  BN vs. AN

## f) Humanes Leukozyten Antigen (HLA)

### HLA-DR3

In allen 3 Kompartimenten war die IR bei Neuropathien entzündlicher Genese höher als bei Neuropathien nicht-entzündlicher Genese. Die IR war jedoch in jedem Kompartiment bei VN-Patienten tendenziell höher als bei BN-Patienten. Die Unterschiede zwischen BN- und AN-Patienten waren hochsignifikant. Die Unterschiede zwischen VN- und AN-Patienten waren endo- und perineural signifikant, epineural sogar hochsignifikant (BN endo:  $4,3 \pm 1,1$ , peri:  $3,6 \pm 1,2$ , epi:  $2,24 \pm 0,8$ , AN endo:  $3,4 \pm 0,7$ , peri:  $2,6 \pm 0,7$ , epi:  $1,8 \pm 0,4$ , VN endo:  $4,7 \pm 1,2$ , peri:  $4,1 \pm 1,7$ , epi:  $2,8 \pm 0,8$ ).

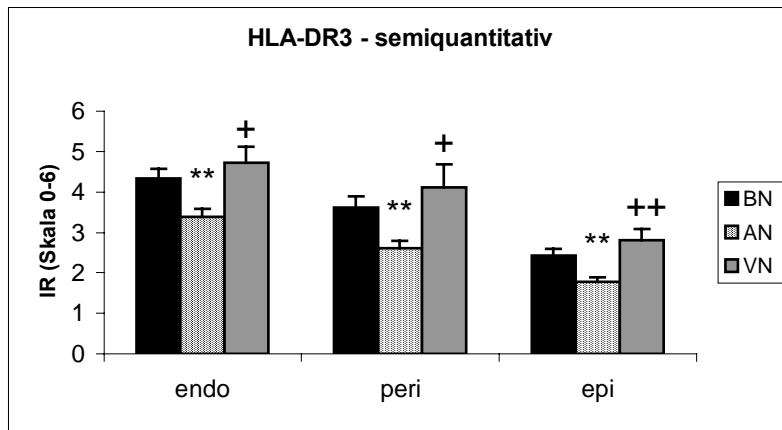


Abb. 21: Semiquantitative Beurteilung der IR für HLA-DR3 (x-Achse: Patientengruppe und beurteiltes Kompartiment; y-Achse: Durchschnittliche IR; Fehlerindikator: SEM); \*\*p<0,01endo BN vs. AN; +p<0,05 endo AN vs. VN; \*\*p<0,01 peri BN vs. AN; +p<0,05 peri AN vs. VN; \*\*p<0,01 epi BN vs. AN; ++p<0,01 epi AN vs. VN

### g) Matrix-Metalloprotease

#### MMP-9

Die Patientengruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zueinander. Eine tendenziell höhere Anzahl immunreaktiver Gefäße im Endoneurium war bei VN-Patienten im Vergleich zu AN- und BN-Patienten zu verzeichnen. BN-Patienten hatten die tendenziell niedrigste Anzahl MMP-9-positiver Gefäße. (MMP-9-pos.-Gefäße: BN: 19 ± 21%, AN: 30 ± 28%, VN: 43 ± 33%).

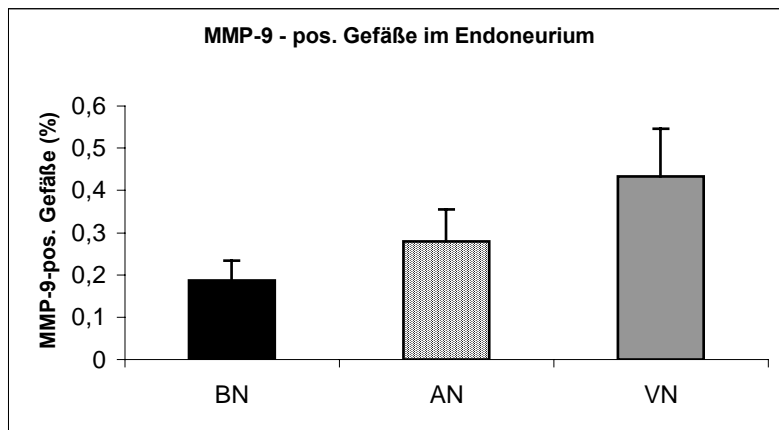


Abb. 22: Quantitative Bestimmung MMP-9-pos. Gefäße im Endoneurium (x-Achse: Patientengruppe, y-Achse: Anteil MMP-9-pos. Gefäße in Relation zur Gesamtzahl endoneural gelegener Gefäße, Fehlerindikator: SEM)

### 3.4. Neuropathie-Symptomatik anderer Genese

Bei genauer Betrachtung der klinischen Befundsymptomatik und der serologischen und bioptischen Befundergebnisse könnte bei 3 der BN-Patienten der Effekt anderer

Grundleiden für die Genese der bestehenden Krankheitssymptomatik mitverantwortlich gemacht werden. Diese Gruppe wird nachfolgend mit „BN<sub>2</sub>“ bezeichnet. 3 Patienten wurden den BN<sub>2</sub>-Patienten zugeordnet. Die dadurch um 3 Patienten reduzierte BN-Gruppe wird nachfolgend mit „BN<sub>1</sub>“ bezeichnet. So stellten bei Patient Nr. 16 der fehlende positive Therapieeffekt auf Gabe von Antibiotika (Rocephin®), Glukokortikoiden (Urbason®) und immunsuppressiven Chemotherapeutika (Endoxan®) als auch unauffällige Liquorwerte bezüglich Zellzahl und Proteingehalt die Neuroborreliose als primäre Ursache der Beschwerdesymptomatik ernsthaft in Frage. Die positiven Borrelien-Antikörper-Titer in Liquor und Blut müssen eher als Zeichen einer begleitenden Neuroborreliose gewertet werden. Vielmehr muss bei diesem Patienten der längjährige Alkoholkonsum (50g Alkohol/d) für die neuropathischen Beschwerden verantwortlich gemacht werden. Patient Nr. 18 stellte sich wegen seit 4 bis 5 Jahren bestehender Krämpfe und Schmerzen sowie Taubheitsgefühl in beiden Füßen bei uns vor. Die Borrelienserologie im Serum war deutlich positiv. Neben leicht erhöhten Proteinwerten (68,9 mg/dl), aber normaler Zellzahl, konnten keine Borrelien-spezifischen-Antikörper im Liquor nachgewiesen werden. Eine Therapie mit Rocephin® (2 g/d i.v. über 14 Tage) blieb ohne positiven Effekt. Eine Kortisonstoßtherapie (Urbason® 500 mg/d über 5 Tage) bewirkte eine anfängliche Besserung der Symptomatik, die sich unter der Erhaltungsdosis von 70 mg über mehrere Tage nicht konservieren ließ. Da der Patient langjähriger Diabetiker war, seit vielen Jahren Nikotin- und Alkoholabusus betrieb, ist diesen Pathogenitätsfaktoren die entscheidende Rolle für die Entstehung der neuropathischen Beschwerdesymptomatik zuzuschreiben.

Bei Patient Nr. 21 (siehe auch 3.1., 3. Fallbeschreibung) wurde wegen erhöhter CK-Werte bei Verdacht auf eine myopathische Erkrankung eine Muskelbiopsie entnommen, die das Bild einer Einschlusskörperchenmyositis bot. Das fehlende Ansprechen auf Rocephin® und Urbason® machen die Diagnose einer BN zusätzlich nicht sehr wahrscheinlich.

Nach dieser Zuordnung der Fälle wurden die Ergebnisse der Suralisbiopsie der BN<sub>1</sub>-Gruppe mit denen der BN<sub>2</sub>-Gruppe verglichen. Tatsächlich waren die Suralisbiopsien beider Subgruppen morphologisch und immunhistochemisch deutlich zu unterscheiden. Folgende Unterschiede fielen im Vergleich zwischen BN<sub>2</sub>- und BN<sub>1</sub>-Patienten auf:

-BN<sub>1</sub>-Patienten hatten ein im Durchschnitt dickeres Perineurium als BN<sub>2</sub>-Patienten. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 23).

-BN<sub>1</sub>-Patienten zeigten eine tendenziell stärkere T-Zell-Infiltration endo-, peri- und epineural als BN<sub>2</sub>-Patienten (Abb. 24).

-BN<sub>1</sub>-Patienten hatten in allen 3 Kompartimenten eine tendenziell höhere IR für CD-68-Makrophagen als BN<sub>2</sub>-Patienten (Abb.25).

-BN<sub>1</sub>-Patienten hatten im Endoneurium eine tendenziell niedrigere IR für ICAM .

-BN<sub>1</sub>-Patienten hatten im Endo- und Perineurium eine tendenziell niedrigere IR für IL-6 als BN<sub>2</sub>-Patienten.

-Die IR für TNF- $\alpha$  war bei BN<sub>1</sub>-Patienten in allen 3 Kompartimenten in etwa gleich hoch wie bei BN<sub>2</sub>-Patienten.

-Die Biopsien der Subgruppe BN<sub>2</sub> zeigten in 2 von 3 Fällen das Bild einer Perivaskulitis. In nur einem Fall (Patient mit Diabetes und anfänglicher Besserung auf Kortisonstoßtherapie) konnte der Verdacht auf eine Vaskulitis gestellt werden.

-Die IR für C5b9 war bei BN<sub>1</sub>-Patienten tendenziell niedriger als bei BN<sub>2</sub>-Patienten.

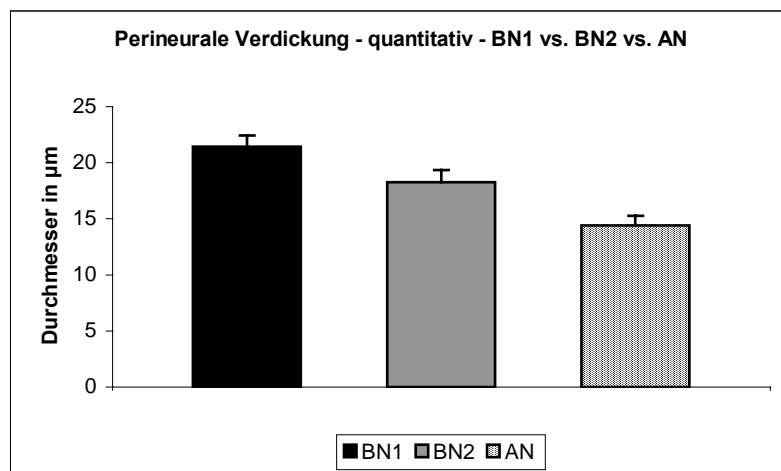


Abb. 23: Perineurale Dicke im Vergleich zw. BN<sub>1</sub>, BN<sub>2</sub> und AN (x-Achse: Patientengruppe; y-Achse: Durchmesser des Perineuriums in  $\mu\text{m}$ ; Fehlerindikator: SEM)

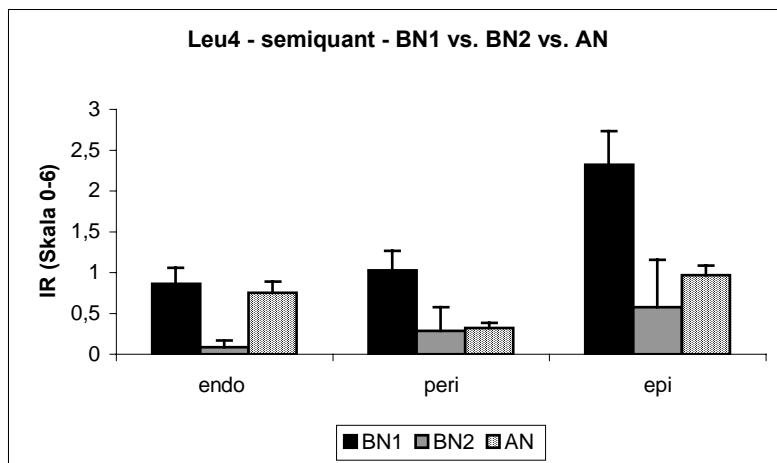


Abb. 24: IR für Leu-4 im Vergleich zw. BN<sub>1</sub>, BN<sub>2</sub> und AN (x-Achse: Patientengruppe und beurteiltes Kompartiment; y-Achse: Durchschnittliche IR; Fehlerindikator: SEM)

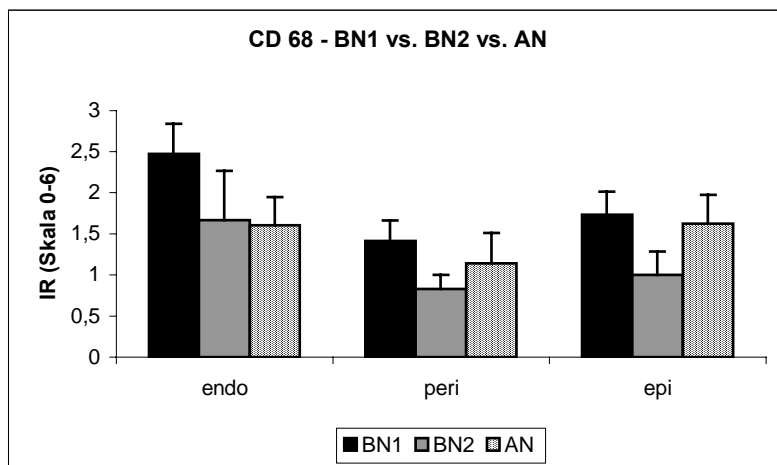


Abb. 25: IR für CD68 im Vergleich zw. BN<sub>1</sub>, BN<sub>2</sub> und AN (x-Achse: Patientengruppe und beurteiltes Kompartiment; y-Achse: Durchschnittliche IR; Fehlerindikator: SEM)

Das unterstützt die von uns schon zuvor getroffenen Aussagen über ein verdicktes Perineurium, die Vergesellschaftung einer Borrelien-assoziierten Neuropathie mit einer Vaskulitis und eine geringe Bedeutung von ICAM bei der Borrelien-assoziierten Neuropathie. Nur die von uns getroffene Aussage bezüglich der IR für C5b9 lässt sich unter diesem Aspekt nicht mehr uneingeschränkt aufrecht halten. In Anbetracht dessen, dass 2 unserer Patienten aus der BN<sub>2</sub>-Gruppe langjährige Diabetiker waren, werden die von Rosoklija im Jahre 2000 [16] getroffenen Aussagen unterstützt. Rosoklija hatte bei Patienten mit Diabetes in den Wänden endoneural gelegener Gefäße eine signifikant höhere IR gefunden. Ebenso kann die tendenziell vermehrte perineurale Dicke bei den

BN<sub>2</sub>-Patienten auf den bei 2 dieser Patienten bestehenden Diabetes zurückzuführen sein [46].

## **4. Diskussion**

### **4.1. Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden Studie war die Erfassung potentieller klinischer und histologischer Charakteristika der Borrelien-assoziierten Neuropathie anhand einer retrospektiven Gegenüberstellung von Krankendaten und Suralisbiopsien von Patienten mit Borrelien-assoziiierter Neuropathie gegenüber Patienten mit vaskulitischer und chronisch axonaler Neuropathie.

Zusammenfassend fanden sich an klinischen Symptomen bei Patienten im frühen Krankheitsstadium häufig eine Lumbago, faziale Parese oder Gefühlsstörungen, wohingegen Patienten im späteren Krankheitsstadium zusätzlich auch Paresen der Extremitätenmuskulatur mit Atrophie der betroffenen Muskeln und dauerhafte Schmerzsymptomatik an Gelenken der oberen oder unteren Extremität aufwiesen.

Histologisch lag zumeist eine axonale Neuropathie vor, die im Mittel bei unserem Patientengut ca. 60% der Fasern zerstörte. An histologischen Charakteristika fiel bei den Patienten mit einer Borrelien-assoziierten Neuropathie im Gegensatz zu anderen Neuropathien eine Verdickung des Perineuriums mit Vermehrung der peri- und endoneuralen Gefäße und gesteigerter TNF- und C5b9-Immunreaktivität auf. Epineural war eine gesteigerte T-Zell Infiltration und endoneural eine gesteigerter ICAM-1 IR und Makrophagenrekrutierung nachweisbar. Die endoneurale und perineurale IL-6 IR war bei Patienten mit einer Borrelien-assoziierten Neuropathie gegenüber Patienten mit einer chronisch axonalen Neuropathie erhöht, jedoch nicht höher als bei Patienten mit vaskulitischen Neuropathien. Da bei einigen Patienten mit nachgewiesener Borrelien-assoziiierter Neuropathie auch die Definitionskriterien einer Vaskulitis erfüllt waren, sollte auch bei histologisch gesicherter vaskulitischer Neuropathie eine Borrelien-assoziierte Neuropathie erwogen werden.

### **4.2. Vergleich der klinischen Daten mit anderen Studien**

Aufgrund der oftmals nur geringen Patientenzahlen vieler Studien differieren die klinischen Angaben zu Patienten mit Borrelien-assoziierten Neuropathien beträchtlich: Ähnlich wie in unserer Arbeit hatten etwa ein Drittel der Patienten (32% gegenüber 37% bei Oschmann et al. [38]) in der Vergangenheit einen Zeckenbiss bemerkt. Das Auftreten eines ECM dagegen war in unserer Studie nur von einem Patienten (5%)

berichtet worden, wohingegen andere Studien weitaus häufiger ein vorausgehendes ECM angeben (34% bei Oschmann [38] und 55 % bei Shadick [29]). Das Bild einer Fazialisparese trat bei Halperin et al. [27] genauso häufig auf (5%) wie in unserer Studie. Im Gegensatz zu anderen Studien waren in unserem Patientengut Sensibilitätsstörungen das führende Symptom (85%), was sicherlich durch unsere Patientenselektion mittels Suralisbiopsie bedingt ist. In anderen Studien variiert das Vorkommen von Sensibilitätsstörungen zwischen 5% [30], 44% [38] und 52% [25]. Im Gegensatz dazu war die in unserer Studie ermittelte Häufigkeit von Muskelkrämpfen vergleichbar mit anderen Studien (9% in der hiesigen Studie vs. 11% [30]). 32% unserer Patienten litten unter Gelenkschmerzen, andere Studien haben diesbezüglich höherer Inzidenzen (55% [29]), wobei in diesen Studien allerdings auch Patienten mit längerer Krankheitsdauer eingeschlossen wurden.

#### 4.3. Vergleich morphologisch-histologischer Daten mit anderen Studien

In der überwiegenden Zahl unserer Fälle war die Neuropathie in der bioptischen Auswertung vom **axonalen Typ** (95%). Unsere Ergebnisse sind vergleichbar mit Ergebnissen von Kindstrand et al. [47], in dessen Studie 65% der Patienten die neurophysiologischen Kriterien einer axonalen Neuropathie, 24% die eines Mischtyps aus axonaler und demyelinisierender Neuropathie erfüllten, jedoch keiner eine reine demyelinisierende Neuropathie aufwies. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Logigian [25], Meier et al. [35] und Kristoferitsch et al. [28], in deren Studien keiner der Patienten eine demyelinisierende Neuropathie aufwies. Auch im Tiermodell einer Borreliose an Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) konnte elektrophysiologisch bei 75% und histologisch bei 50% der untersuchten Nerven ein Verlust myelinisierter Axone beschrieben werden [31].

Die Frage, ob eine BN mit einer **Vaskulitis** der Gefäße oder einer Perivaskulitis zusammenhängt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In unserer Untersuchung erfüllten jeweils 8 Biopsien (36% der Patienten) die Kriterien einer „Definitiven Vaskulitis“ oder „Verdacht auf Vaskulitis“; 6 Patienten (28%) wurden als Perivaskulitis definiert. Unsere Ergebnisse sind kongruent mit verschiedenen Studien anderer Autoren.



Alle Patienten von Creange [48] und Kristoferitsch et al. [28] erfüllten die Kriterien eines ‚Verdacht auf Vaskulitis‘. In Einzelfallstudien von Meier et al. [35] und Camponovo [49] sind ebenfalls Borrelien-assoziierte Neuropathien mit vaskulitischen Veränderungen beschrieben. Für das Vorliegen einer Perivaskulitis bei Borreliose gemäß unseren in dieser Arbeit definierten Kriterien fanden sich mehrere Bestätigungen in der Literatur: Vallat et al. beschrieben 1987 [51] 10 Fälle, die in der Biopsie alle das Bild einer Perivaskulitis boten. Im Tiermodell zeigte Roberts 1995 [52], dass bei 3 seiner 5 Rhesusmakaken im Nerven eine perivaskuläre Infiltration mit Entzündungszellen vorhanden war. In der Zusammenschau mit der Literatur kann nicht eindeutig geklärt werden, ob bei einer Borreliose eher eine Vaskulitis oder Perivaskulitis vorliegt. Möglicherweise hängt dies von der Vielfältigkeit der Pathomechanismen ab, die bei einer Borreliose ablaufen. Wir schließen aus unseren Befunden, dass eine Neuroborreliose durchaus mit einer Vaskulitis des peripheren Nervens einhergehen kann. Da der untersuchte Bereich der Suralisbiopsie nur einen kleinen Ausschnitt aus dem peripheren Nervensystem beinhaltet, und Vaskulitiden sehr fokal sein können, kann sogar davon ausgegangen werden, dass bei einem noch höheren Prozentsatz als bei dem von uns festgestellten eine Vaskulitis vorlag.

In unserer Studie war das *Perineurium* im Rahmen einer BN gegenüber anderen Formen einer Neuropathie signifikant verdickt (21 µm bei BN vs. 14 µm bei AN und 15 µm bei VN). Eine solche perineurale Verdickung ist zunächst nur von Johnson et al. [46] bei Patienten mit diabetischer Neuropathie beschrieben worden. Die Verdickung wurde als Folge einer Vermehrung der Laminae interpretiert, ausgelöst durch den wiederholten Ablauf von Zelltod und Zellreplikation. In einer späteren Arbeit von Hill et al. [59] konnte eine Vermehrung v.a. von Kollagen IV, Laminin und Fibronectin in der Basalmembran des Perineuriums als mögliche Ursache der Verdickung festgestellt werden. Die Verdickung kann einerseits die Permeabilität des Perineuriums verändern, andererseits kann eine Änderung der Rigidität des Perineuriums zur Deformierung der darin enthaltenen Gefäße führen und somit Ursache für eine Mangelversorgung des Endoneuriums mit Sauerstoff und Nährstoffen bedeuten [59]. Die spezifisch auftretende perineurale Verdickung legt den Verdacht nahe, dass das Perineurium eine

entscheidende Schlüsselrolle bei der Pathogenese einer Borrelien-Neuropathie spielen könnte.

#### 4.4. Vergleich immunhistochemischer Daten mit anderen Studien

In unsere Studie war bei den BN vorwiegend das Epineurium von **der T-Zell-Infiltration** betroffen. Unsere Befunde sind kongruent mit den Ergebnissen von Kindstrand et al. [47] und Meier et al. [35], die eine T-Zellinfiltration im Epineurium, allerdings auch endoneural beschrieben. Die geringe endoneurale und ausgeprägte epineurale T-Zellinfiltration könnte nahe legen, dass Lymphozyten die Entzündung im epineuralen Nervengewebe unterhalten und ihnen die Diapedese ins Endoneurium verwehrt bleibt.

Die endoneurale Rekrutierung **CD68-positiver Makrophagen** war bei entzündlichen Neuropathien (BN, VN) tendenziell höher als bei den nicht-entzündlichen (AN), bei VN jedoch am höchsten. Ähnliches zeigten Leppert et al. [21], die eine signifikant höhere endoneurale Makrophagenzahl bei entzündlichen Neuropathien im Vergleich zu nicht-entzündlichen Neuropathien fanden. In einer Fallbeschreibung von Maimone et al. [53] konnten ebenfalls CD68-positive Makrophagen in und um epineurale Gefäße als auch verstreut liegende CD68-Makrophagen im Endoneurium gezeigt werden .

Zur weiteren **Differenzierung der rekrutierten Makrophagen** wurden immunhistochemische Färbungen zur Darstellung frisch (< 3 Tage, 27E10) rekrutierter vs. älterer (> 3 Tage, 25F9) rekrutierter Makrophagen durchgeführt. Während beim Nachweis frisch rekrutierter Makrophagen ähnlich wie in früheren Studien von Kiefer et al. [44] große Schwankungsbreiten innerhalb der Gruppe auftraten, zeigte sich eine vergleichsweise höhere IR für den 25F9-Marker, der Makrophagen, die älter als 3 Tage sind. Die Problematik der Darstellung frisch rekrutierter Makrophagen ist sicherlich z.T. durch die längere Krankheitsdauer der BN-Patienten bedingt, die, im Gegensatz zu Patienten mit einer Vaskulitis, oft nicht in der floriden Phase ihrer Erkrankung zur Suralisbiopsie kommen. Die hohe Schwankungsbreite innerhalb der Patientengruppe könnte durch die unterschiedliche Krankheitsdauer und Floridität der Entzündung innerhalb der Patientengruppen bedingt sein. Für ältere Makrophagen fand sich in

Übereinstimmung mit Kiefer et al. [44], die eine deutlich höhere endoneurale IR bei entzündlichen Neuropathien im Vergleich zu hereditären Neuropathien und gesunden Nerven fanden, auch in unserer Studie ein erhöhter endoneuraler Anteil 25F9-Zellen bei den entzündlichen Neuropathien im Vergleich zu den AN-Patienten. Das deutet einerseits darauf hin, dass es sich bei den CD-68 Makrophagen in unserer Auswertung unter Anbetracht der niedrigen IR gegen 27E10 und der höheren IR für 25F9 zum größten Teil um alte, d.h. älter als 3 Tage, Makrophagen handelte.

**Zytokine** werden in der Pathogenese der Borrelien-assoziierten Neuropathie vielfach diskutiert. In unserer Studie fiel eine gesteigerte perineurale TNF Immunreaktivität auf, welches eine pathogenetisch entscheidende Rolle für die Entstehung einer Neuropathie bei Borreliose darstellen könnte. Ähnliche Hypothesen wurden von Yin et al. [14] erhoben, die vermehrt TNF- $\alpha$  in der synovialen Membran von Patienten mit Lyme-Arthritis nachweisen konnten. Er schloss daraus, dass TNF als proinflammatorisches Zytokin Mediator der Zellrekrutierung ist und somit eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese einer Synovitis spielt. Desweiteren war in der vorliegenden Studie die perineurale IR für IL-6 und IL-1 bei BN-Patienten höher als bei nicht-entzündlichen Neuropathien. Ein möglicher Kausalzusammenhang wird für IL-6 und die Neuroborreliose diskutiert, da erhöhte IL-6 Spiegel im Hirngewebe von mit *Borrelia burgdorferi* inokulierten Rhesusmakaken [54] und im Liquor von Neuroborreliose Patienten [55] nachgewiesen werden konnten.

Auch **Adhäsionsmoleküle** könnten eine entscheidene pathogenetische Rolle für die Entstehung der Borrelien-assoziierten Neuropathie darstellen. In unserem Patientengut war die ICAM-IR bei VN und BN Patienten peri und epineural höher als bei nicht-entzündlichen Neuropathien (AN). Die tendenziell höhere IR perineural bei den BN-Patienten könnte erklären, warum das Perineurium bei einer Borrelien-assoziierten Neuropathie in höherem Ausmaß als bei anderen Neuropathien beteiligt ist, da bekannt ist, dass *Borrelia burgdorferi* in vivo [10] und in vitro [11] Adhäsionsmoleküle aktiviert, die die Migration von Entzündungszellen durch die Blut-Liquor- und Blut-Hirn-Schranke ermöglichen. Die Erhöhung der durch Adhäsionsmoleküle ausgelösten

Gefäßpermeabilität könnte im Zusammenhang mit der erhöhten Vaskularisation des Perineuriums stehen und für die perineurale Verdickung verantwortlich sein.

Vorangegangene Fallstudien berichteten über die potentiell wichtige Rolle von **Komplementkomponenten** wie den terminalen complement membrane attack complex (MAC; C5b9), der peri-, epi- und endoneural vermehrt nachgewiesen werden konnte [53]. Die vorliegende Studie stützt die Ergebnisse dieser Einzelfallberichte, da perineural eine vermehrte IR für die terminale Komplementkomponente C5b9 nachgewiesen werden konnte. Dies könnte die Hypothese stützen, dass das Perineurium schwerpunktmäßig im Rahmen einer Borrelien-assoziierten Neuropathie betroffen ist. Erhöhte C5b9 Werte sind auch für nichtentzündliche Neuropathien wie z.B. die diabetische Neuropathie beschrieben [16]. Diabetische Neuropathien können das Symptomenbild einer Borrelien-Neuropathie überlagern. Bei uns zeigte sich bei einem Patienten, der nebenbefundlich einen Diabetes mellitus aufwies, die höchste IR für C5b9. Bei diesem Patienten könnte man vermuten, dass sich das Zusammenwirken der pathogenen Einflüsse von Borrelieninfektion und des Diabetes mellitus in einer hohen IR für C5b9 wiederfindet.

Ähnlich wie einigen rheumatischen Erkrankungen scheint auch bei der chronischen Lyme-Arthritis eine Immunpathogenese zugrunde zu liegen. Den D-locus Allelen von Major-Histo-Compatibility-Complexes (**MHC-Komplexe**), die vor allem auf B-Zellen und Makrophagen lokalisiert sind, wird dabei die entscheidende Schlüsselstellung zugeschrieben. So kann eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* bei auf jene Weise prädisponierten Menschen eine Autoimmunreaktion verstärken. In einer Studie von Steere et al. [6] konnte gezeigt werden, dass Patienten mit chronischer Lyme-Arthritis signifikant mehr HLA-DR4 oft auch mehr HLA-DR3 oder HLA-DR2 aufwiesen. Im Fall einer Borrelien-Neuropathie, der 1997 von Maimone [53] beschrieben wurde, konnte ein vom Autor nicht näher bezeichnetes HLA-DR-Antigen in diffuser Verteilung im Nerven nachgewiesen werden. In den Biopsien unserer Arbeit stellte sich ein ähnlich unspezifisches Verteilungsmuster für HLA-Antigene dar. Die IR war, unabhängig welcher Gruppe der Patient zugehörte, in allen 3 Kompartimenten sehr groß. Der Anteil immunreaktiver Fläche war bei entzündlichen Neuropathien (BN, VN) im Vergleich zu

den nicht-entzündlichen Neuropathien erhöht, was dadurch erklärbar ist, dass die Expression von HLA-DR3 von einer unspezifischen Entzündungsreaktion getriggert wird und zwar auch in den Bereichen des Nerven, die, wie wir postulieren, nicht zu Orten höchster Entzündungsaktivität einer Borrelien-assoziierten Neuropathie innerhalb des Nerven zählen. HLA-DR3 ist daher eher kein spezifischer Marker für die Diagnose einer Borrelien-assoziierten Neuropathie.

Im Endoneurium zeigten BN und AN-Patienten tendenziell geringere IR für *MMP* als VN-Patienten. Unsere Ergebnisse stehen im Widerspruch zu anderen Studien, in denen im Liquor von BN-Patienten [57] oder in vitro in Bb-infizierten neuronalen Zellen [58] eine deutlich höhere Aktivität von MMP-9 nachgewiesen werden konnte. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass Kirchner Patienten mit akuter Neuroborreliose untersuchte, und Perides einen Versuchsaufbau wählte, der ebenfalls als Modell einer eher akuten Neuroborreliose gelten muss. In unserer Arbeit war die MMP-9-Aktivität von Patient 2, einem Patienten mit akuter Neuroborreliose, höher als die mittlere Aktivität bei VN-Patienten. Möglicherweise könnte also MMP-9 eher Marker einer akuten Borreliose sein.

## **5. Aus der vorliegenden Arbeit abgeleitete Überlegungen zur möglichen Pathogenese der Neuropathie bei der Borreliose**

In der Zusammenschau unserer Ergebnisse und der anderer Autoren ist naheliegend, dass das Perineurium schwerpunktmäßig im Rahmen einer Borrelien-assoziierten Neuropathie betroffen ist. Darauf deuten das im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant verdickte Perineurium, die vermehrte Vaskularisation des Perineuriums und die starke IR für das Zytokin TNF- $\alpha$ , in geringerem Ausmaß für IL-1 $\beta$ , und für die terminale Komplementkomponente C5b9 hin. Die starke Vaskularisation des Perineuriums könnte dabei einerseits begünstigend für das Entstehen einer fulminanten Entzündungsreaktion wirken, andererseits eine Kompensationsreaktion einer durch die Entzündungsreaktion entstehenden Ischämie darstellen. In erstem Fall würde der hohe Gefäßreichtum des Perineuriums ermöglichen, dass Entzündungsmediatoren, insbesondere o.g. TNF- $\alpha$  und C5b9, in hohem Maße auf hämatogenem Wege ins

Perineurium gelangen. Die dadurch entstehende Entzündung könnte eine Verdickung des Perineuriums im Sinne eines perineuralen Entzündungsödems auslösen. In zweitem Falle wäre die durch die Entzündung verursachte lokale Ischämie Auslösefaktor für eine vermehrte Vaskularisation des Perineuriums. Im Sinne eines Circulus vitiosus könnte sich dieser Pathomechanismus (Entzündung → Ischämie → Vaskularisation → hämatogene Einschwemmung von Entzündungsmediatoren → Entzündung) selbst aufrechterhalten und somit Grund für lang anhaltende Neuropathie-Symptomatik verantwortlich sein, die bei Patienten in einem späten, chronischen Stadium auftritt.

## **6. Ausblick**

Aus den getroffenen Aussagen ergeben sich mehrere Fragestellungen für zukünftige Arbeiten:

- Welche Pathomechanismen sind für die perineurale Verdickung ausschlaggebend ?
- Möglicherweise erkennen gegen Borrelien gerichtete AK antigene Epitope auf dem Perineurium (molecular mimicry), so dass dieses gezielt von der Entzündungsreaktion angegriffen wird.
- Während bei der VN IL-6 eine besondere Bedeutung zu haben scheint, ist dies bei der BN perineurales TNF- $\alpha$ . Erlaubt die differentielle Hochregulation von Zytokinen Rückschlüsse auf die Pathogenese der Borrelien-assoziierten Neuropathie ?
- Warum findet ein für verschiedenste entzündliche NP gezeigter Vorgang, wie die Hochregulation von MMP-9 auf Endothelzellen, bei der BN nicht statt?
- Im Perineurium von BN-Patienten findet eine Hochregulation für C5b9 statt, während bei VN-Patienten vor allem ICAM hochreguliert wird. Können daraus Rückschlüsse auf die Entstehung der pathologischen Verdickung des Perineuriums bei BN-Patienten geschlossen werden?

## **7. Zusammenfassung**

Die Diagnose einer Borrelien-induzierten Neuropathie zu stellen, ist häufig schwierig. Die serologische Diagnostik einer Borreliose kann Probleme bereiten. Grund dafür ist

unter anderem, dass in Endemiegebieten viele Menschen eine positive Borrelienserologie haben, ohne manifest erkrankt zu sein.

Ziel der Arbeit war es, morphologische Kriterien zu identifizieren, die bei der Beurteilung von Nervenbiopsien die Abgrenzung einer Borrelien-Neuropathie gegenüber Neuropathien anderer Genese ermöglichen.

Zu diesem Zweck untersuchten wir 45 Patienten, bei denen in den Jahren 1992 bis 2000 an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg aus diagnostischen Gründen Biopsien des N. suralis entnommen wurden. Anamnese, Untersuchungsbefund, Laborparameter und Therapie der Patienten wurden den archivierten Krankenblättern entnommen. Die Biopsien wurden mikroskopisch untersucht und die Dicke des Perineuriums, Art und Schweregrad der Neuropathie und des Faserverlustes bestimmt. Zudem wurden die Biopsien auf das Vorliegen einer Vaskulitis untersucht. In immunhistochemischen Färbereihen wurde anschließend die IR für T-Zellen, Makrophagen, einige Zytokine, Adhäsionsmoleküle, humane Leukozytenantigene, Komplementfaktoren und Metalloproteasen semiquantitativ bzw. quantitativ ermittelt.

Die Borrelien-assoziierte Neuropathie (BN) unterschied sich in folgenden Punkten von einer Neuropathie anderer entzündlicher Genese (VN) bzw. nicht-entzündlicher Genese (AN).

Das Perineurium ist im Vergleich zu Neuropathien anderer Genese bei BN-Patienten einerseits verdickt, andererseits ist eine erhöhte Vaskularisation nachzuweisen. Außerdem findet sich im Perineurium eine vergleichsweise höhere IR für das Zytokin TNF- $\alpha$  als auch für die terminale Komplementkomponente C5b9. Eine T-Zellinfiltration findet bei einer Borrelien-assoziierten Neuropathie in ähnlich hohem Ausmaß statt wie bei anderen entzündlichen Neuropathien. Das Epineurium ist dabei am stärksten betroffen. Die IR für IL-6 in Endo- und Perineurium und für ICAM im Endoneurium ist bei einer Borrelien-assoziierten Neuropathie in geringerem Ausmaß als bei anderen entzündlichen Neuropathien betroffen.

Insbesondere das Perineurium ist nach den Ergebnissen unserer Arbeit im Rahmen einer Borrelien-assoziierten Neuropathie betroffen. Morphologisches Korrelat der pathologischen Vorgänge ist einerseits die Verdickung andererseits die erhöhte Vaskularisation des Perineuriums. Die erhöhte Vaskularisation und die unter Umständen damit verbundene vermehrte Durchblutung des Perineuriums könnte das

vermehrte Einschwellen von Zytokinen und der terminalen Komplementkomponente C5b9 zur Folge haben, womit die erhöhte IR dieser Marker im Perineurium zu erklären wäre. Schäden im Endoneurium dagegen scheinen durch die Infiltration von Makrophagen zu entstehen. Diese Parameter können somit hilfreich sein, an Suralisbiopsien von Patienten mit Verdacht auf Borrelien-assoziierte Neuropathie die Verdachtsdiagnose zu erhärten.

## **8. Literatur**

1. Kamradt T. Die Lyme-Arthritis: Klinik, Diagnose und Therapie. Deutsches Ärzteblatt 1998;214-9.
2. Kristoferitsch W. In: Neuropathien bei Lyme-Borreliose: Springer-Verlag; 1989:1-2.
3. Reik L, Jr. Lyme disease and the nervous system. In: Thieme Medical Publishers, Inc.; 1991.
4. Satz N. Historische Aspekte. In: Klinik der Lyme-Borreliose. Toronto: Verlag Hansuner, Bern; 1992:36-7.
5. Steere AC, Snyderman D, Murray P, et al. Historical perspective of Lyme disease. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A] 1986;263(1-2):3-6.
6. Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med 1989;321(9):586-96.
7. Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med 2001;345(2):115-25.
8. Schwan TG, Burgdorfer W, Rosa PA. Borrelia. In: Manual of Clinical Microbiology. 6th ed; 1995.
9. Kaiser R. Neuroborreliosis. J Neurol 1998;245(5):247-55.
10. Garcia-Monco JC, Benach JL. Mechanisms of injury in Lyme neuroborreliosis. Semin Neurol 1997;17(1):57-62.
11. Sigal LH. Immunologic mechanisms in Lyme neuroborreliosis: the potential role of autoimmunity and molecular mimicry. Semin Neurol 1997;17(1):63-8.
12. Garcia Monco JC, Fernandez Villar B, Rogers RC, et al. Borrelia burgdorferi and other related spirochetes bind to galactocerebroside. Neurology 1992;42(7):1341-8.



13. Hartung HP, Stoll G, Toyka KV. Immune reactions in the peripheral nervous system. In: *Peripheral Neuropathy*. 3rd ed; 1993:418-44.
14. Yin Z, Braun J, Neure L, et al. T cell cytokine pattern in the joints of patients with Lyme arthritis and its regulation by cytokines and anticytokines. *Arthritis Rheum* 1997;40(1):69-79.
15. Weller M, Stevens A, Sommer N, et al. Cerebrospinal fluid interleukins, immunoglobulins, and fibronectin in neuroborreliosis. *Arch Neurol* 1991;48(8):837-41.
16. Rosoklija GB, Dwork AJ, Younger DS, et al. Local activation of the complement system in endoneurial microvessels of diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000;99(1):55-62.
17. Sigal LH. Cross-reactivity between *Borrelia burgdorferi* flagellin and a human axonal 64,000 molecular weight protein. *J Infect Dis* 1993;167(6):1372-8.
18. Dai Z, Lackland H, Stein S, et al. Molecular mimicry in Lyme disease: monoclonal antibody H9724 to *B. burgdorferi* flagellin specifically detects chaperonin-HSP60. *Biochim Biophys Acta* 1993;1181(1):97-100.
19. Garcia-Monco JC. [Pathomechanisms of neuroborreliosis]. *Wien Med Wochenschr* 1995;145(7-8):174-7.
20. Halperin JJ. Nervous system Lyme disease. *J Neurol Sci* 1998;153(2):182-91.
21. Leppert D, Hughes P, Huber S, et al. Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurology* 1999;53(1):62-70.
22. Halperin JJ. In: *Medlink Neurology San Diego*; 2002.
23. Logigian EL. Peripheral nervous system Lyme borreliosis. *Semin Neurol* 1997;17(1):25-30.
24. Garcia-Monco JC, Benach JL. Lyme neuroborreliosis. *Ann Neurol* 1995;37(6):691-702.
25. Logigian EL, Steere AC. Clinical and electrophysiologic findings in chronic neuropathy of Lyme disease. *Neurology* 1992;42(2):303-11.
26. Kristoferitsch W. Neurological manifestations of Lyme borreliosis. *Infection* 1991;19(4):268-72.

27. Halperin J, Luft BJ, Volkman DJ, Dattwyler RJ. Lyme neuroborreliosis. Peripheral nervous system manifestations. *Brain* 1990;113(Pt 4):1207-21.
28. Kristoferitsch W, Sluga E, Graf M, et al. Neuropathy associated with acrodermatitis chronica atrophicans. Clinical and morphological features. *Ann N Y Acad Sci* 1988;539:35-45.
29. Shadick NA, Phillips CB, Logigian EL, et al. The long-term clinical outcomes of Lyme disease. A population-based retrospective cohort study. *Ann Intern Med* 1994;121(8):560-7.
30. Kindstrand E, Nilsson BY, Hovmark A, Pirskanen R, Asbrink E. Peripheral neuropathy in acrodermatitis chronica atrophicans - a late *Borrelia* manifestation. *Acta Neurol Scand* 1997;95(6):338-45.
31. England JD, Bohm RP, Jr., Roberts ED, Philipp MT. Mononeuropathy multiplex in rhesus monkeys with chronic Lyme disease. *Ann Neurol* 1997;41(3):375-84.
32. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993;167(2):392-400.
33. Gold R, Buttgereit F, Toyka KV. Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol* 2001;117(1-2):1-8.
34. Hopf HC. Peripheral neuropathy in acrodermatitis chronica atrophicans (Herxheimer). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1975;38(5):452-8.
35. Meier C, Grahmann F, Engelhardt A, Dumas M. Peripheral nerve disorders in Lyme-Borreliosis. Nerve biopsy studies from eight cases. *Acta Neuropathol* 1989;79(3):271-8.
36. Reik L, Jr. Peripheral Neuropathy in Lyme Disease. In: *Peripheral Neuropathy*; 1993:1401-11.
37. Kaiser R. False-negative serology in patients with neuroborreliosis and the value of employing of different borrelial strains in serological assays. *J Med Microbiol* 2000;49(10):911-5.
38. Oschmann P, Dorndorf W, Hornig C, et al. Stages and syndromes of neuroborreliosis. *J Neurol* 1998;245(5):262-72.
39. Halperin JJ. Abnormalities of the nervous system in Lyme disease: response to antimicrobial therapy. *Rev Infect Dis* 1989;11 Suppl 6:1499-504.

40. Kalish RA, Kaplan RF, Taylor E, et al. Evaluation of study patients with Lyme disease, 10-20-year follow-up. *J Infect Dis* 2001;183(3):453-460.
41. Kelkar P, McDermott WR, Parry GJ. Sensory-predominant, painful, idiopathic neuropathy: inflammatory changes in sural nerves. *Muscle Nerve* 2002;26(3):413-6.
42. Collins MP, Mendell JR, Periquet MI, et al. Superficial peroneal nerve/peroneus brevis muscle biopsy in vasculitic neuropathy. *Neurology* 2000;55(5):636-43.
43. Zwadlo G, Schlegel R, Sorg C. A monoclonal antibody to a subset of human monocytes found only in the peripheral blood and inflammatory tissues. *J Immunol* 1986;137(2):512-8.
44. Kiefer R, Kieseier BC, Bruck W, Hartung HP, Toyka KV. Macrophage differentiation antigens in acute and chronic autoimmune polyneuropathies. *Brain* 1998;121(Pt 3):469-79.
45. Zwadlo G, Brocker EB, von Bassewitz DB, Feige U, Sorg C. A monoclonal antibody to a differentiation antigen present on mature human macrophages and absent from monocytes. *J Immunol* 1985;134(3):1487-92.
46. Johnson PC. Non-vascular basement membrane thickening in Diabetes mellitus. *Lancet* 1981, 8252 (2): 932-3.
47. Kindstrand E, Nilsson BY, Hovmark A, et al. Polyneuropathy in late Lyme borreliosis - a clinical, neurophysiological and morphological description. *Acta Neurol Scand* 2000;101(1):47-52.
48. Creange A, Saint-Val C, Guillevin L, Degos JD, Gherardi R. Peripheral neuropathies after arthropod stings not due to Lyme disease: a report of five cases and review of the literature. *Neurology* 1993;43(8):1483-8.
49. Camponovo F, Meier C. Neuropathy of vasculitic origin in a case of Garin-Boujadoux-Bannwarth syndrome with positive borrelia antibody response. *J Neurol* 1986;233(2):69-72.
50. Tezzon F, Corradini C, Huber R, et al. Vasculitic mononeuritis multiplex in patient with Lyme disease. *Ital J Neurol Sci* 1991;12(2):229-32.
51. Vallat JM, Hugon J, Lubeau M, et al. Tick-bite meningoradiculoneuritis: clinical, electrophysiologic, and histologic findings in 10 cases. *Neurology* 1987;37(5):749-53.

52. Roberts ED, Bohm RP, Jr., Cogswell FB, et al. Chronic lyme disease in the rhesus monkey. *Lab Invest* 1995;72(2):146-60.
53. Maimone D, Villanova M, Stanta G, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA and complement membrane attack complex deposits in the sural nerve of a patient with chronic polyneuropathy and tertiary Lyme disease. *Muscle Nerve* 1997;20(8):969-75.
54. Pachner AR, Amemiya K, Delaney E, et al. Interleukin-6 is expressed at high levels in the CNS in Lyme neuroborreliosis. *Neurology* 1997;49(1):147-52.
55. Cepok S, Zhou D, Vogel F, et al. The immune response at onset and during recovery from *Borrelia burgdorferi* meningoradiculitis. *Arch Neurol* 2003;60(6):849-55.
56. Lindenlaub T, Sommer C. Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2003;105(6):593-602.
57. Kirchner A, Koedel U, Fingerle V, et al. Upregulation of matrix metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of patients with acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68(3):368-71.
58. Perides G, Tanner-Brown LM, Eskildsen MA, Klempner MS. *Borrelia burgdorferi* induces matrix metalloproteinases by neural cultures. *J Neurosci Res* 1999;58(6):779-90.
- 59 Hill RE, Williams PE. A quantitative analysis of perineurial cell basement membrane collagen IV, laminin and fibronectin in diabetic and non-diabetic human sural nerve. *J Anat.* 2002;201(2):185-92.

## **Danksagung**

Ich danke Fr. Dr. M. Schäfers für ihre aufopferungsvolle Hilfestellung, Fr. Prof. C. Sommer für die Ermöglichung der Durchführung der Arbeit, den Mitarbeitern des Histologielabors der Klinik und Poliklinik für Neurologie für ihre Unterstützung und Hr. Prof. G. Stoll für die Erstellung des Koreferats.



## Sebastian Neukirchen

Afrawald 3

86150 Augsburg

Fon +49 (0)821 5088235

Mobil +49 (0)170 83 43 787

S.Neukirchen@t-online.de

Geboren am 22.09.1975 in Wertheim am Main

AUSBILDUNG	1982 - 1986	Grundschule Wertheim
	1986 - 1995	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, humanistisches Gymnasium, Wertheim; Abitur mit Note: 1,7
	04/1996	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	03/1999	Ärztliche Vorprüfung
	03/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	03/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	10/2002	Beginn des Praktischen Jahres (PJ)
	11/2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2004	Approbation als Arzt	
FAMULATUREN	03/2000 - 05/2000	Städt. Krankenhaus Wertheim am Main, Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Unfallchirurgie, Dr. Schüder
	02/2001 - 04/2001	Neurologische Universitätsklinik Würzburg, Station für Allgemeine Neurologie und Neuroonkologie, Prof. Dr. Toyka, PD Dr. Becker
	09/2001 - 11/2001	Niedergelassene Praxis für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, Neustadt am Rübenberge, Dr. Faust
	02/2002 - 03/2002	Orthopädische Universitätsklinik Würzburg, Prof. Dr. Eulert
	03/2002 – 04/2002	Neurologische Universitätsklinik Würzburg, Stroke Unit, Prof. Dr. Toyka, Prof. Dr. Gold

PRAKTISCHES  
JAHR

10/2002 - 02/2003 Neurologische Universitätsklinik Würzburg,  
Prof. Dr. Toyka  
- Allgemeinstation, PD Dr. Classen  
- Stroke unit., PD Dr. Naumann  
- Intensivstation, Dr. Müllges  
- Poliklinik, Prof. Dr. Riekmann

02/2003 - 06/2003 Chirurgische Universitätsklinik Würzburg,  
Prof. Dr. Thiede  
- Privatstation, Prof. Dr. Reith  
- Allgemeinstation (Bauchchirurgie)

06/2003 - 09/2003 Universitätsklinik für Innere Medizin

ARZT IM  
PRAKTIKUM

01/2004 - 07/2004 Beschäftigung in der Psychiatrischen Klinik des  
Innenstadtklinikums der Ludwig-Maximilian-  
Universität, München

08/2004 - 09/2004 Beschäftigung im Zentralklinikum Augsburg, Abteilung  
für klinische Radiologie und Neuroradiologie

ASSISTENZARZT

10/2004 Übernahme als Assistenzarzt im Zentralklinikum  
Augsburg, Abteilung für klinische Radiologie und  
Neuroradiologie

Augsburg 14.12.2005

