

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Aktualisierte neuropathologische Klassifikation der Spina bifida
und deren Relevanz für Forschung und Klinik

Update on the neuropathological classification of spina bifida
and its relevance for science and clinic

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kim Hannah Schindelmann

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	5
Zusammenfassung	6
Abstract.....	7
1. Einleitung.....	8
1.1. Epidemiologie und aktuelle Entwicklungen	8
1.2. Klassifikation der SB und deren Unklarheiten	8
1.3. Prognostisch relevante Gehirnfehlbildungen in Zusammenhang mit SB	9
1.4. Bedeutung der Arbeit für das Fachgebiet.....	10
1.5. Fragestellungen und Zielsetzung der Studie	10
2. Material und Methodik	11
2.1. Studiendesign	11
2.2. Histologie und Färbungen	11
2.3. Fotodokumentation	12
2.4. Datenauswertung	13
3. Ergebnisse.....	13
3.1. Kohortenbeschreibung	13
3.2. Klassifikation der SB-Phänotypen	14
3.3. Verteilung der SB-Phänotypen	17
3.4. Isoliertes Auftreten von Myeloschisis der unteren Wirbelsäule	18
3.5. Gehirnfehlbildungen und häufigeres Auftreten bei Fällen mit Myelomeningozele	19
3.6. Fehler in der Nomenklatur und deren Ursachen	22
3.7. Definition des Begriffs Area medullovasculosa	22
3.8. Zusätzliche Fehlbildungen des Rückenmarks und potenzielle weitere Pathomechanismen..... in der Entstehung von SB.....	23

4.	Diskussion	25
4.1	SB-Klassifikation, Fehlerquellen und Auswirkungen der unklaren Definitionen.....	25
4.2	Klinische Erkenntnisse zum Phänotyp Myeloschisis.....	26
4.3	Frühes Auftreten von Gehirnefehlbildungen und Relevanz für intrauterine Operationen	30
4.4	Limitationen	31
4.5	Fazit und Ausblick	32
	Literaturverzeichnis	33
	Eidesstattliche Versicherung	36
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	37
	Auszug aus der Journal Summary List.....	39
1.	Originalpublikation: Systematic Classification of Spina bifida	41
	Auszug aus der Journal Summary List.....	56
2.	Originalpublikation: Cerebral Abnormalities in Spina bifida: A Neuropathological Study	60
	Lebenslauf	77
	Komplette Publikationsliste.....	79
	Danksagung	80

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Altersverteilung der Kohorte.....	14
Abbildung 2: Schematisch Darstellung der SB-Subtypen	15
Abbildung 3: Histologisches Bild der Myelomeningozele und Myeloschisis	16
Abbildung 4: Verteilung der SB-Subtypen.....	18
Abbildung 5: Gehirnehlbildungen bei Patient*innen mit SBA.....	20
Abbildung 6: Ependymverlust und Ependymrosetten bei SBA	21
Abbildung 7: Weitere histologische Befunde bei SBA.....	24
Tabelle 1: Histologische Charakteristika der einzelnen SB-Phänotypen	15
Tabelle 2: Verteilung der SBA-Subtypen in den Altersgruppen und gesamt	17
Tabelle 3: Häufigkeit von Gehirnehlbildungen.....	19

Abkürzungsverzeichnis

CM	Chiari-II-Malformation
ME	Meningozele
MMC	Myelomeningozele
MYS	Myeloschisis
OR	Odds Ratio
SB	Spina bifida
SBA	Spina bifida aperta
SBO	Spina bifida occulta
SSW	Schwangerschaftswoche
ZNS	zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Spina bifida (SB) ist ein Oberbegriff für verschiedene Phänotypen, denen eine Schlußstörung der Wirbelbögen gemein ist. Neuropathologische Befunde von Fällen mit SB werden oft mit unpräziser und überschneidender Terminologie befundet. Insbesondere der Begriff Myelomeningozele wird dabei synonym für SB aperta (SBA) sowie für verschiedene Subtypen – auch solche ohne vorwölbende Zele – verwendet. Der Phänotyp Myeloschisis mit offener Neuralplatte wird nur bei schwer betroffenen Ausnahmefällen mit Aneenzephalie beschrieben.

Ziel der Arbeit war es daher, basierend auf einer retrospektiven Studie mit 85 SB-Fällen (54 pränatal, 31 postnatal) eine eindeutigere SB-Klassifikation zu erarbeiten. Der häufigste SB-Subtyp in unserer Kohorte war Myeloschisis (n = 28; 32,9 %), gekennzeichnet durch eine offene Neuralplatte mit exponiertem Ependym. Von diesen Fällen zeigten mehr als drei Viertel einen alleinigen Defekt der unteren Wirbelsäule. Weitere 21 Fälle (24,7 %) hatten eine Myelomeningozele, 2 Fälle (2,4 %) eine Meningozele und 21 Fälle (24,7 %) einen nicht näher bestimmbaren SBA-Subtyp. Eine SB occulta (SBO) war nur bei 6 Fällen (7,1 %) vorhanden. Der im Neuropathologie-Bericht angegebene SB-Phänotyp wurde in etwa einem Drittel der Fälle korrigiert; nur in zwei Dritteln der Myeloschisis-Fälle wurde die offene Neuralplatte im ursprünglichen Befund beschrieben.

Die Prävalenz von Gehirnfehlbildungen wie Hydrozephalus und Chiari-II-Malformation (CM) ist unter SB-Patient*innen hoch und prognosebestimmend. Daher werteten wir diese Befunde im zweiten Teil der Arbeit aus. 83,5 % der SBA-Fälle zeigten Gehirnfehlbildungen, insbesondere Hydrozephalus (67,1 %), CM (34,2 %), Heterotopien (30,4 %) und Gyrierungsstörungen (29,1 %). Diese Auffälligkeiten traten bereits in der 16. – 19. Schwangerschaftswoche auf. Fälle mit SBO zeigten keinerlei Gehirnfehlbildungen. Die Wahrscheinlichkeit für einen Hydrozephalus in der Gruppe mit Myelomeningozele war im Vergleich mit den restlichen SBA-Fällen 4-mal höher, für CM fast 7-mal. Bei Myeloschisis-Fällen lag die Wahrscheinlichkeit für CM bzw. Gyrierungsstörungen jeweils nur bei einem Fünftel. Dies steht im Kontrast mit der Literatur, da beschrieben ist, dass Phänotypen mit radiologisch diagnostizierter Zele seltener von Gehirnfehlbildungen betroffen sind als Subtypen ohne Zele. Daher kann vermutet werden, dass der histologische Phänotyp etwas anderes beschreibt als das reine Fehlen einer Zele.

Zusammenfassend schlagen wir basierend auf unserer Auswertung eine Klassifikation der SB-Subtypen in SBO und die drei SBA-Subtypen Meningozele, Myelomeningozele und Myeloschisis vor. Es konnte gezeigt werden, dass Myelomeningozele und SBA nicht als synonyme Begriffe verwendet werden dürfen und dass Myeloschisis ein unterdiagnostizierter SB-Phänotyp ist. Wie häufig Gehirnfehlbildungen bei neuropathologisch diagnostizierter Myeloschisis sind, müssen weitere Studien mit durchgängiger Verwendung der neu etablierten SB-Subtypen analysieren.

Abstract

Spina bifida (SB) is an umbrella term for various phenotypes characterized by a misclosure of the vertebral arches. Neuropathologic findings in SB cases are often reported using imprecise and overlapping terminology. In particular, the term myelomeningocele is used as a synonym for SB aperta (SBA) and for various subtypes – including those without a protruding cele. The myeloschisis phenotype with presence of an open neural plate is only described in severely affected exceptional cases with additional anencephaly.

The aim of the work was to develop a clear SB classification based on a retrospective study with 85 SB cases (54 prenatal, 31 postnatal). The most common SB subtype in our cohort was myeloschisis (n = 28; 32.9 %) characterized by an open neural plate with exposed ependyma. Of these cases, more than three-quarters showed a singular defect of the lower spine. In addition, 21 cases (24.7 %) had myelomeningocele, 2 cases (2.4 %) meningocele and 21 cases (24.7 %) had an SBA subtype that could not be further determined from the available material. SB occulta (SBO) was only present in 6 cases (7.1 %). The SB phenotype was corrected in about a third of the cases in comparison to the primary neuropathological reports; only in two-thirds of the myeloschisis cases, the open neural plate was described in the original report.

The prevalence of brain malformations such as hydrocephalus and Chiari II malformation (CM) is high among SB patients and is of prognostic value. Therefore, we evaluated these findings in the second part of the study. 83.5 % of SBA cases presented brain malformations, specifically hydrocephalus (67.1 %), CM (34.2 %), heterotopias (30.4 %), and gyrification disorders (29.1 %). These malformations already occurred in gestational weeks 16 to 19. Cases with SBO did not show any brain malformations. The probability of hydrocephalus in the group with myelomeningocele was 4 times higher compared with the rest of the SBA cases, for CM almost 7 times. For myeloschisis, the likelihood of CM and gyration disorders was only one-fifth respectively. This is in contrast to the literature, as it is described that phenotypes with radiologically diagnosed cele are less frequently affected by brain malformations than subtypes without a cele. It can therefore be assumed that the histological phenotype describes something else than the mere absence of a cele.

In summary, based on our analysis, we proposed a classification of the SB subtypes into SBO and the three SBA subtypes meningocele, myelomeningocele, and myeloschisis. It could be shown that myelomeningocele and SBA should not be used as synonymous terms and that myeloschisis is an underdiagnosed SB phenotype. Further studies with consistent use of the newly established SB subtypes must analyze how common brain malformations are in neuropathologically diagnosed myeloschisis.

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und aktuelle Entwicklungen

Trotz allgemeiner Empfehlungen zur Supplementierung von Folsäure in der Schwangerschaft hat sich die Prävalenz von Spina bifida (SB) in den letzten Jahrzehnten kaum verringert. Auch heute zählt diese Erkrankung mit 0,5 Fällen pro 1000 Schwangerschaften in Europa zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen (1, 2). Verbesserte technische Voraussetzungen in der pränatalen Ultraschalldiagnostik haben zu frühzeitigeren Diagnosen geführt und damit insbesondere seit der Veröffentlichung der MOMS-Studie (Management of Myelomeningocele) 2011 die Möglichkeit der intrauterinen operativen Versorgung immer mehr in den Fokus gerückt. Adzick et al. zeigten darin, dass durch die pränatale operative Versorgung von SB-Patient*innen im Vergleich mit der postnatalen Operation die Notwendigkeit der Shunt-Implantation bei Hydrozephalus stark verringert sowie das motorische Outcome der Kinder verbessert werden konnte. Auf der anderen Seite ist eine intrauterine Operation jedoch mit dem Risiko einer Frühgeburt und Komplikationen für Mutter und Kind verbunden (3). Im Gegensatz dazu konnten andere Studien für postnatal operierte Kinder ein besseres Outcome im Sinne von häufigerem selbstständigen Laufen, geringerer Shunt-Versorgung und insbesondere das seltenere Auftreten von postoperativen Verwachsungen zeigen. Zusätzlich fehlen bei der postnatalen Operation die Risiken für Frühgeburtlichkeit und für Komplikationen bis hin zum Tod der Mutter (4, 5).

Daher bleibt die intrauterine operative Versorgung insgesamt ein hochkomplexer und risikoreicher Eingriff für Mutter und Kind und ist keinesfalls ‚state of the art‘, sondern der Behandlung in spezialisierten Zentren vorbehalten. Welche Patient*innen dabei besonders von dieser Therapiemethode profitieren können ist Gegenstand aktueller Forschung.

1.2 Klassifikation der SB und deren Unklarheiten

SB ist der am häufigsten auftretende Neuralrohrdefekt und entsteht zwischen dem 18. und 28.Tag in der Embryonalentwicklung. Die Ursachen dieser Fehlbildung sind sowohl genetisch als auch nicht-genetisch, in den meisten Fällen bleibt der genaue Pathomechanismus jedoch unklar (6). Als SB wird im Allgemeinen eine Verschlussstörung des Wirbelbogens bezeichnet, welche je nach zusätzlich betroffenen Strukturen in weitere Formen eingeteilt werden kann (siehe **Tabelle 1**, (6-8)). Hierbei lassen sich grundlegend die SB occulta (SBO) und SB aperta (SBA) unterscheiden. Die geschlossenen Form SBO ist vollständig von Haut bedeckt, Rückenmark und Meningen sind geschlossen und liegen im Spinalkanal. Bei Geburt sind die Patient*innen meist asymptomatisch, neurologische Folgeerscheinungen treten in Folge von Verwachsungen des Filum terminale im Spinalkanal (sogenanntes tethered cord) im Verlauf auf. Zusätzlich zeigen sich im Bereich der Verschlussstörung häufig Auffälligkeiten nicht-neuronaler Gewebe, wie Lipome, Angiome, Hypertrichose oder Dermalsinus (7, 8). Die SBA auf der anderen Seite definiert sich durch fehlenden Hautüberzug, wobei das Rückenmark entweder als vorwölbender Bruchsack (der sogenannten Zele) oder frei an der Oberfläche vorliegt (8). Betroffene Patient*innen zeigen je nach Läsionshöhe unterschiedlich schwere motorische und sensorische Ausfälle, sowie häufig Blasen- und Mastdarmentleerungsstörungen und orthopädische Auffälligkeiten wie Klumpfüße, Kontrakturen, Kyphose und Skoliose (9).

Je nachdem welche Malformationen Rückenmark und Meningen aufweisen, lässt sich die SBA anhand histologischer und radiologischer Aspekte in weitere Subformen unterteilen. Hierbei sind die Definitionen und Begriffe in der Literatur sehr uneinheitlich und überlappend (siehe **Tabelle 1**, (6, 7, 9-18)). Insbesondere der Begriff Myelomeningozele (MMC) wird für alle SBA-Phänotypen verwendet, auch dann, wenn gar kein Zelensack, sondern eine offene Neuralplatte vorliegt (6, 9-13). Der Befund der offenen Neuralplatte wird häufig als seltene Unterform der SBA im Rahmen von schwerwiegenden Neuralrohrdefekten in Kombination mit Anenzephalie als Craniorachischisis oder Myeloschisis bezeichnet (6, 10) und teilweise auch unter dem Überbegriff Myelomeningozele eingeordnet (9, 11-13, 18).

Dadurch kommt es zu zahlreichen Unklarheiten in der Klassifikation und es ist aus neuropathologischer Perspektive häufig nicht mehr zu evaluieren, ob das Rückenmark bei entsprechenden Fällen als offene Neuralplatte oder geschlossenes Neuralrohr vorlag. Vor allem diese Unterscheidung ist jedoch sowohl für die experimentelle Forschung mit Hinblick auf den Entstehungszeitpunkt und Pathomechanismen als auch im klinischen Alltag bezüglich der Symptomatik, radiologischer Diagnostik und neurochirurgischer Versorgung von hoher Relevanz.

Das Problem der inkongruenten Klassifikation wurde bereits von verschiedenen Autor*innen adressiert (15-17), jedoch finden sich auch hier weiterhin Überschneidungen und unklare Definitionen. Letztlich hat sich bis heute keine allgemein gültige Nomenklatur durchgesetzt, daher wurde im ersten Teil dieser Arbeit eine systematische Klassifikation herausgearbeitet und dabei auf Fehlerquellen in der Terminologie Bezug genommen.

1.3 Prognostisch relevante Gehirnehlbildungen in Zusammenhang mit SB

Neben der Fehlbildung des Rückenmarks und den daraus entstehenden neurologischen Symptomen zeigt sich eine hohe Prävalenz von Gehirnehlbildungen bei SBA. Die SBA ist dagegen selten von zusätzlichen Befunden des Gehirns betroffen (19). Besonders häufig ist die Ausbildung der Chiari-II-Malformation (CM) und eines Hydrozephalus (20, 21). Als Pathomechanismus wird basierend auf einer Publikation von McLone et al. davon ausgegangen, dass es durch den Verlust von Liquor über die SBA zu einer fehlenden Ausbildung des Ventrikelsystems und damit auch zu einem geringen Wachstum der knöchernen hinteren Schädelgrube kommt. Dies führt zu einer Kompression und damit zur Herniation von Strukturen des Kleinhirns und des Hirnstamms durch das Foramen ovale. Durch die Abflussbehinderung des Liquors kommt es daraufhin typischerweise zur Entstehung eines Hydrozephalus (21-23). Daneben treten auch Heterotopien, Gyrierungsstörungen und Fehlbildungen des Balkens im Zusammenhang mit SB und CM häufig auf (21, 24). Insgesamt ist SBA als komplexe Erkrankung des gesamten zentralen Nervensystems (ZNS), und nicht als isolierter Defekt des jeweiligen Levels des Rückenmarks zu betrachten.

Diese Ergebnisse sind von enormer klinischer Relevanz, da verschiedene Autor*innen zeigen konnten, dass Patient*innen mit SBA und radiologischen Zeichen der genannten Gehirnehlbildungen in kognitiven Tests schlechter abschneiden als solche ohne Gehirnehlbildungen (19, 20).

Bisher sind nur wenige Studien bekannt, die Gehirnehlbildungen bei SB-Patient*innen basierend auf einer histologischen Untersuchung und nicht basierend auf bildgebenden Methoden wie Ultraschall und MRT analysieren. Deshalb wurde im zweiten Teil dieser Promotion die Kohorte hinsichtlich dieser

Malformationen befundet. Insbesondere die Prävalenz in den einzelnen SB-Subtypen wurde dabei aus neuropathologischer Perspektive näher betrachtet.

1.4 Bedeutung der Arbeit für das Fachgebiet

Im Allgemeinen gibt es bereits sehr viel Forschung und Literatur zum Thema SB, insbesondere zu Vor- und Nachteilen intrauteriner Operationen, wie auch zu Pathomechanismen und genetischen Ursachen. Trotzdem sehen wir es als notwendig an, zurück zu den Grundlagen der histopathologischen Untersuchung betroffener Fälle zu gehen. Gerade weil die Diagnose heutzutage in frühen Schwangerschaftswochen (SSW) gestellt und damit die Entscheidung zum Abbruch der Schwangerschaft ebenfalls früh getroffen wird, bietet die Analyse von Archivmaterial aus den Jahren 1974-2000 und damit in fortgeschrittenen SSW ein enormes wissenschaftliches Potenzial.

Basierend auf einer retrospektiven Studie wurde in dieser Arbeit eine Klassifikation entwickelt, die Klarheit in die Begrifflichkeiten zur Beschreibung der Befunde bei SB bringt. Präzise Phänotypen und die Verwendung einer einheitlichen Klassifikation liefern für alle beteiligten Fachdisziplinen einen enormen Wissensgewinn. Besonders die exakte Beschreibung des Situs für (intrauterine) Operationen, sowie klinische Studien mit spezifischen Untergruppen innerhalb der insgesamt heterogenen Gruppe von Patient*innen mit SB führen zu differenzierten Erkenntnissen über jeden einzelnen SB-Subtyp. Vor allem die Prävalenz von Gehirnefehlbildungen bei den einzelnen SB-Phänotypen spielt dabei eine wichtige Rolle für die Prognose von Kindern mit SB. Die Kenntnisse aus der vorliegenden Promotionsarbeit können damit zu individuelleren Empfehlungen in Hinblick auf die Entscheidung bezüglich eines Schwangerschaftsabbruchs oder dem bestmöglichen Zeitpunkt einer operativen Versorgung wie auch dem zu erwartendem Grad der Einschränkungen der Patient*innen und damit gezielterer individueller Beratung betroffener Familien beitragen.

1.5 Fragestellungen und Zielsetzung der Studie

Aus dem dargestellten Forschungsstand leiten sich folgende Fragestellungen für diese Promotion ab:

- 1) Welche neuropathologischen Befunde des Rückenmarks fanden sich in einer Kohorte von 85 Spina Bifida-Patient*innen und wie ließen sich diese in allgemeine histologische Phänotypen und eine Klassifikation überführen?
- 2) Wie war die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Phänotypen in der Studienkohorte im Vergleich mit der Literatur?
- 3) Wo traten im Vergleich der neu erstellten Klassifikation mit den ursprünglichen Diagnosen der Patient*innen und mit der Literatur Fehldiagnosen und Unklarheiten auf? Wie können diese Fehlerquellen umgangen werden?
- 4) Wie häufig waren neuropathologische Auffälligkeiten des Gehirns? Ließen sich hierbei Unterschiede zwischen den SB-Subtypen finden?

2. Material und Methodik

2.1 Studiendesign

In einer retrospektiven Studie (25) wurden klinische Daten und Informationen aus den Autopsie-Berichten einschließlich biometrischer Daten, weiterer Auffälligkeiten oder Fehlbildungen und Todesursache sowie histologisches Material von SB-Patient*innen aus dem Archiv des Instituts für Neuropathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin analysiert. Das Einschlusskriterium war eine im histologischen Material oder neuropathologischen Bericht klar nachvollziehbare SB-Diagnose. Durch eine systematische Suche nach den ICD-10-Codes für SBA (Q05.) und SBO (Q76.0) in der elektronischen Datenbank der Zentralen Biobank der Charité (ZeBanC) konnten insgesamt 99 Fälle aus den Jahren 1974 bis 2000 identifiziert werden. 9 Fälle mit unklarer oder sich im Nachhinein als falsch herausgestellter SB-Diagnose wurden ausgeschlossen. Für die detaillierte Auswertung in der Folgestudie (26), die auch in dieser Arbeit verwendet wird, wurden außerdem 5 Fälle ausgeschlossen, bei denen der SB-Subtyp aufgrund von fehlendem histologischen Material oder widersprüchlichen Informationen nicht sicher evaluiert werden konnte. Im Falle von multiplem Auftreten von SB wurden die Fälle jeweils der schwerwiegendsten Form zugeordnet. Von allen 85 eingeschlossenen Fällen war ein neuropathologischer Befundbericht verfügbar, von 55 Fällen auch ein allgemeiner Befundbericht aus der Pathologie bzw. Paidopathologie.

Alle Patient*innen erhielten eine pseudonymisierte Identifikationsnummer (ID), diese wurde mittels einer ID-Liste nach entsprechend geltenden Datenschutzrichtlinien verschlüsselt. Die vor der Auswertung pseudonymisierten Befunde wurden in eine ausschließlich für die damit durchgeführten Auswertungen konzipierte Microsoft-Excel-Datenbank überführt. Für diese Studie liegt ein positives Ethikvotum der Charité Universitätsmedizin Berlin vor (EA 1/076/19).

2.2 Histologie und Färbungen

In der Zentralen Biobank der Charité waren Paraffin-Blöcke und histologische Schnitte des Rückenmarks auf Höhe der SB von 54 der 85 Patient*innen verfügbar, welche zur erneuten detaillierten Analyse genutzt werden konnten. Für die restlichen Fälle konnten lediglich die Informationen aus den neuropathologischen Befunden als Grundlage für die weitere Auswertung verwendet werden.

Im Falle von fehlenden oder verblichenen Schnitten erstellten wir neue Schnitte mit einer Dicke von 4-7 µm aus den Paraffinblöcken und zogen diese auf SuperFrost Plus™ Objektträgern (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) auf. Daraufhin wurden die Schnitte in ROTI®-Histol (6640, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 2-mal 10 min entparaffiniert und anschließend mit einer Mischung aus ROTI®-Histol und 100%igem Ethanol (1:1) für 5 min behandelt, sowie jeweils zweimal in einer absteigenden Ethanol-Reihe (100 %, 95 %, 70 %) und zweimalig in destilliertem Wasser für je 2 min rehydriert.

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) wurden die Schnitte wie folgt gefärbt: Harris Hämatoxylin (109253, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 7 min, 2-mal in destilliertem Wasser, sowie in 0,25 % HCl in 70%igem Ethanol gewaschen und in Leitungswasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit 0,2 % Eosin (2C-140, Waldeck GmbH + Co. KG, Münster, Deutschland) unter Zusatz von 2 Tropfen Essigsäure pro 100 ml für 2 min. Letztlich wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanol-Serie (96 %, 100 %) durchgezogen.

100 %) behandelt, dann mit ROTI®-Histol für 2 min und im letzten Schritt mit Entellan® (107960, Merck KGaA) eingedeckt.

Für alle verfügbaren neu erstellten Schnitte wurde eine Pikro-Sirusrot-Färbung zur Darstellung von Bindegewebe erstellt. Dies erfolgte durch Färbung mit 0,1%igem Sirius Rot in gesättigter Pikrinsäure (26357-02, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) für 1 h, daraufhin zweifaches Waschen mit 0,5%iger Essigsäure. Die Vor- und Nachbereitung sowie Einbettung erfolgten wie oben beschrieben.

Zur Darstellung von Astrozyten in neuronalem Gewebe wurden entsprechende Schnitte per Immunhistochemie mit GFAP, zur Darstellung von Ependym mit Tubulin gefärbt. Hierfür wurden die erforderlichen Schnitte zuerst wie oben beschrieben entparaffiniert, rehydriert und daraufhin zur Demaskierung der Antigene mit Retrieval-Lösung (H-3300, Vector Laboratories, Newark, CA, USA) in Kombination mit zweimaligem Erhitzen behandelt. Daraufhin wurden die Schnitte für je 10 min in PBS-Puffer und zur Blockierung der endogenen Peroxidase 30 min in 3 % H₂O₂ in PBS-Puffer, sowie in Aqua dest. gespült.

Die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen erfolgte mit 5 % Normalserum (Ziege) in 2 % BSA/PBS für 30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Die folgenden primären Antikörper wurden verwendet: Anti-acetylierter-Tubulin-Antikörper (hergestellt in Maus, t7451, Verdünnung 1:1000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) und Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein-Antikörper (GFAP, hergestellt in Kaninchen, Z0334, Verdünnung 1:500, Agilent DAKO, Carpinteria, CA, USA). Die Antikörper wurden zur Reduktion der Hintergrundfärbung in einem entsprechenden Verdünnungsmittel (antibody diluent with background reducing components, S3022, Agilent DAKO) für 24 h bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden daraufhin durch zweimaliges Waschen in PBS entfernt. Die entsprechenden sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen biotinylierter IgG-Antikörper hergestellt in Ziege (B8895, Sigma Aldrich) bzw. Anti-Maus biotinylierter IgG-Antikörper hergestellt in Ziege (ZB0324, Vector Laboratories)) wurden mit einer Verdünnung von 1:200 in 2 % BSA/PBS und 2 % Normalserum aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert und daraufhin wiederum 2-mal für 5 min in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Detektion mittels der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) mit Hilfe des Vectastatin® Elite® ABC-HRP Kit Peroxidase (PK-6100, Vector Laboratories) für 50 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer, hierauf wiederum 2-maliges Waschen mit PBS. Alle weiteren Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Die DAB-Reaktion erfolgte durch Verdünnung von einem Tropfen DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Substratlösung, Chromogen System, K3468, Agilent DAKO) pro Milliliter des beiliegenden Puffers. Die Reaktion wurde mittels PBS gestoppt, die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen und wie oben beschrieben rehydriert und eingedeckt.

2.3 Fotodokumentation

Das gesamte histologische Material wurde mit einem analogen Olympus-BH2 Mikroskops detailliert befundet, daraufhin mit Hilfe des digitalen M8 Mikroskops und Scanner gescannt (PreciPoint GmbH, Freising, Deutschland). Daraus wurden mit der Software ViewPoint (PreciPoint GmbH) sowie per Adobe Photoshop (Version CS6 (13.0) Adobe Inc., San José, California) Abbildungen und Detailaufnahmen erstellt.

2.4 Datenauswertung

Die Aufbereitung und Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). Zur statistischen Analyse der Daten wurde IBM SPSS Statistics 28 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) verwendet. Statistische Korrelationen wurde mittels Chi-Quadrat-Test geprüft, bei einer erwarteten Häufigkeit von < 5 wurde der exakte Test nach Fisher angewandt. Hierbei sahen wir p-Werte von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant an. Zur Beschreibung der Stärke von statistischen Zusammenhängen wurde außerdem die Odds Ratio (OR) berechnet. Alle Grafiken wurden mit Hilfe von GraphPad Prism (Version 8.4.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die wesentlichen neuen Ergebnisse der zur Promotion eingereichten Publikationen beschrieben und eingeordnet, für detaillierte Informationen siehe die dieser Arbeit zugrundeliegenden Originalpublikationen (25) und (26).

3.1 Kohortenbeschreibung

Diese Studie umfasst 85 SB-Patient*innen mit einer Häufung des weiblichen Geschlechts (weiblich 48,2 %, $n = 41$; männlich 40,0 %, $n = 34$; unbekannt 11,8 %, $n = 10$). Dies ist insbesondere für die Zeit vor Verbreitung der Folsäure-Substitution in der Schwangerschaft, in die auch diese Studie größtenteils fällt, in der Literatur beschrieben (27).

Fast zwei Drittel der Fälle (63,5 %, $n = 54$, siehe **Abbildung 1**) verstarben pränatal insbesondere durch Schwangerschaftsabbrüche ($n = 39$), was auch den hohen Anteil an Patient*innen zwischen der 16. und 25. SSW erklärt. Weitere Todesursachen in der pränatalen Gruppe waren Schwangerschaftskomplikationen ($n = 9$) sowie unbekannte Todesursachen ($n = 6$).

Von den 31 postnatalen Fällen (36,5 %) verstarben mehr als ein Drittel innerhalb der ersten 24 h nach Geburt (35,5 %, $n = 11$), sowie ca. ein weiteres Drittel der Patient*innen während des ersten Lebensmonats (32,3 %, $n = 10$). Die Todesursachen waren respiratorische bzw. kardiale Insuffizienz ($n = 9$ sowie $n = 3$), Herzversagen bei erhöhtem intrakraniell Druck oder Status epilepticus ($n = 3$), Meningoenzephalitis ($n = 3$), Überleben nach Schwangerschaftsabbruch ($n = 3$, Überleben für 30 min, 45 min, 10 h), postoperative Komplikationen und Nachblutungen ($n = 3$), Geburtskomplikationen ($n = 1$), Nierenversagen ($n = 1$) sowie unbekannte Todesursachen ($n = 5$).

Bei 38 Patient*innen (44,7 %) trat SB syndromal, d. h. assoziiert mit anderen Fehlbildungen, auf. In 6 Fällen (7,1 %) konnten für ein definiertes Syndrom typische Malformationen diagnostiziert werden: Potter-Syndrom ($n = 4$), Potter-Syndrom und kaudales Regressionssyndrom ($n = 1$), Joubert-Syndrom ($n = 1$). Die am häufigsten von Anomalien betroffenen Organsysteme waren: Kraniofaziale Dysmorphie (22,4 %, $n = 19$), urogenitale Fehlbildungen (21,2%, $n = 18$) sowie Fehlbildungen von GI-Trakt (15,3%, $n = 13$), Skelett (14,1%, $n = 12$), Lunge (11,8%, $n = 10$), Herz (9,4%, $n = 8$) und Zwerchfell (3,5%, $n = 3$). Die Verbreitung von systematischer genetischer Diagnostik war zur Zeit der Befundung der Studienkohorte in den 1970er- bis 1990er-Jahren gering, daher fanden sich in den Befunden lediglich die Ergebnisse von

sieben normalen Chromosomenanalysen. Wie oft eine genetische Diagnostik insgesamt durchgeführt wurde, war retrospektiv nicht zu klären.

Bei 72 der 85 Fälle (84,7 %) betraf die SB ausschließlich den Bereich der unteren Wirbelsäule (thorakolumbal bis sakral). Die obere Wirbelsäule (zervikal oder thorakal) war nur bei 2 Fällen (2,4 %) betroffen, außerdem zeigten 3 Fälle multiple Defekte (3,5 %), sowie ein Fall eine komplett offene Wirbelsäule (1,2 %, Myeloschisis, siehe auch Abschnitt 3.4). Die Läsionshöhe blieb bei 7 Fällen (8,2 %) unklar.

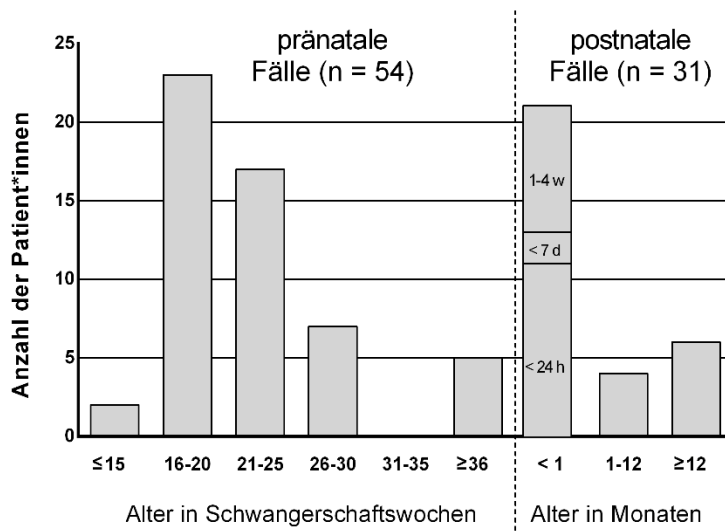


Abbildung 1: Altersverteilung der Kohorte. Für die pränatalen Fälle ist jeweils die Schwangerschaftswoche (15. – 40. SSW) angegeben, für die postnatalen Fälle der Zeitraum des postnatalen Überlebens (1 min – 36 Jahre). (eigenständig erstellte Abbildung, übersetzt und angepasst aus Abbildung 1 der Publikation in Erstautorenschaft (25))

3.2 Klassifikation der SB-Phänotypen

Die histologischen Befunde wurden dann anhand folgender Kriterien eingeteilt und in eine Klassifikation überführt (siehe **Tabelle 1**): Intakte Hautbedeckung über dem offenen Wirbelbogen definiert eine SBO, auf der anderen Seite zeigt sich bei allen SBA-Fällen ein zentraler epithelialer Defekt mit lateralen Übergangszonen (**Abbildungen 2 und 3**). Unter dem Hautdefekt lässt sich das Rückenmark identifizieren, seitlich schließt sich die Zona epithelioserosa an. Hier ist die Pia mater von einer dünnen Schicht an Plattenepithel bedeckt, dieser Bereich stellt daher ein Mischgewebe zwischen epidermalen und mesenchymalen Zellen dar. Noch weiter lateral findet sich die Zona dermatica mit einer dünnen Hornschicht und Hautanhangsgebilden wie Haaren sowie Schweiß- und Talgdrüsen (28). Dieses Gewebe geht dann in normale Haut über, gegebenenfalls finden sich rund um den Defekt Hypertrichose oder eine verdickte Hornschicht.

Zusätzlich unterteilen wir die SBA je nach Position des Rückenmarks und dem Vorliegen als geschlossenes Neuralrohr oder offene Neuralplatte in die drei Subtypen Meningozele, Myelomeningozele und Myeloschisis. Die Meningozele ist dabei eine Herniation (Zeile) von Dura, Arachnoidea und Pia mater durch den offenen Wirbelbogen. Das Rückenmark verbleibt an physiologischer Position im Spinalkanal (**Abbildung 2B**). Auf der anderen Seite liegt das Rückenmark bei der Myelomeningozele (**Abbildung 2C, Abbildung 3A, B**) ebenfalls im Zelensack. Im Gegensatz zu diesen Phänotypen mit abgeschlossener Neurulation und damit geschlossenem Rückenmark liegt das Rückenmark bei der Myeloschisis als in die

Hautoberfläche eingebettete Neuralplatte vor (**Abbildung 2D und Abbildung 3A, B**). Charakteristisch ist histologisch insbesondere der offene Zentralkanal, welcher sich dann als flache Ependymschicht zeigt. Insgesamt lässt sich der typische Myeloschisis-Befund als flaches oder teilweise v-förmig aufgeklapptes, offenliegendes Buch beschreiben. Wichtig ist hierbei, dass die Neuralplatte bei den analysierten Fällen im Gegensatz zu Beschreibungen in der Literatur aus normal konfigurierten Neuronen bestand und nicht als fehlgebildetes Mischgewebe vorlag (28, 29).

Myelomenigozele und Myeloschisis zeichnen sich darüber hinaus durch eine offenliegende Dura aus. Dadurch ist der Subarachnoidalraum nicht geschlossen und Liquor kann austreten, was wie eingangs beschrieben zur Ausbildung der CM und eines Hydrozephalus führen kann.

Tabelle 1: Histologische Charakteristika der einzelnen SB-Phänotypen

Im oberen Teil wird die Klassifikation aus dieser Studie dargestellt, im unteren Teil (hellgrau hinterlegt) im Vergleich dazu die Informationen aus der Literatur zu den einzelnen Phänotypen.

(eigenständig erstellte Tabelle, Ergebnisse aus Publikation in Erstautorenschaft (25))

	Spina bifida occulta	Spina bifida aperta		
Hautdefekt	nein	ja		
		Meningozele	Myelomenigozele	Myeloschisis
Dura	geschlossen	geschlossen	offen	offen
Rückenmark	geschlossen	geschlossen	geschlossen	offen → Neuralplatte
Herniation	nein	Meningen	Meningen + Rückenmark	nein
Literatur (6, 7, 9-18)	übereinstimmend	übereinstimmend	synonym mit SBA	seltener Spezialfall tlw. als Unterform der Myelomenigozele

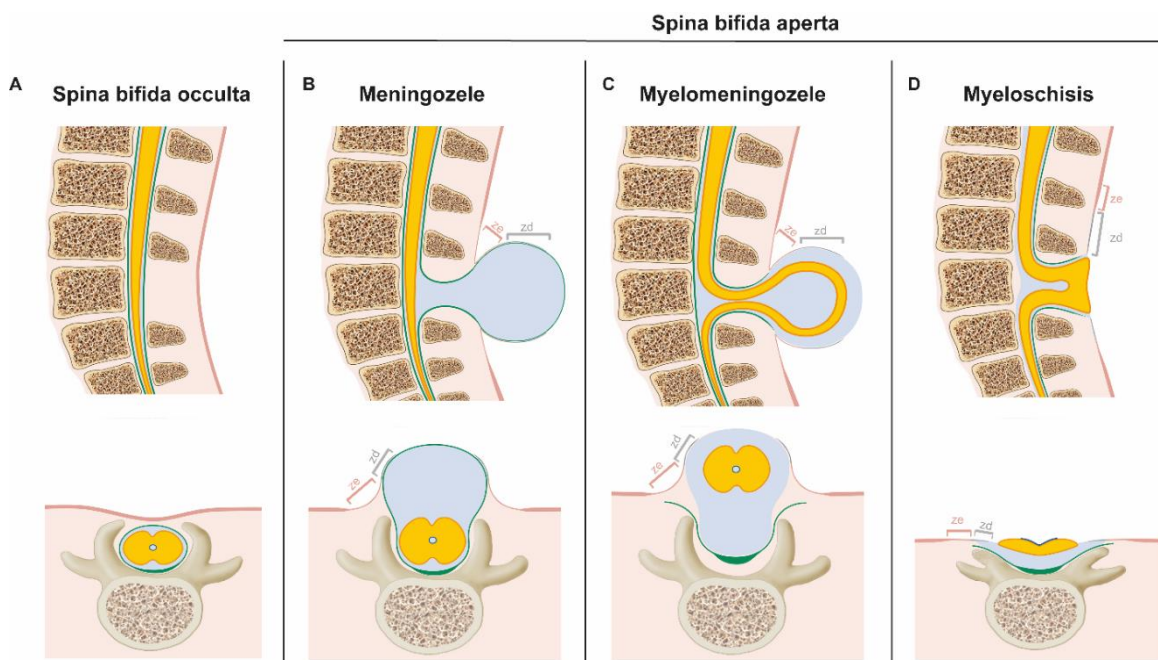


Abbildung 2: Schematisch Darstellung der SB-Subtypen. Jeweils oben Longitudinalschnitt und unten Transversalschnitt. **A.** SBO, **B.** Meningozele. **C.** Myelomenigozele. **D.** Myeloschisis. Die Gewebe werden mit folgenden Farben dargestellt: Rückenmark (gelb), Dura (grün), Liquorraum (hellblau), Ependym (dunkelblau), Hautübergangszonen bei SBA (**B-D**) werden zusätzlich mit Klammern markiert: Zona epithelioserosa (ze, grau), Zona dermatica (zd, rosa). Diese Farben werden, wenn möglich auch in **Abbildung 3** zur Markierung der Gewebe verwendet.

(in Zusammenarbeit mit der Grafikabteilung der Charité erstellte Abbildung, übersetzt aus Abbildung 2 der Publikation in Erstautorenschaft (25))

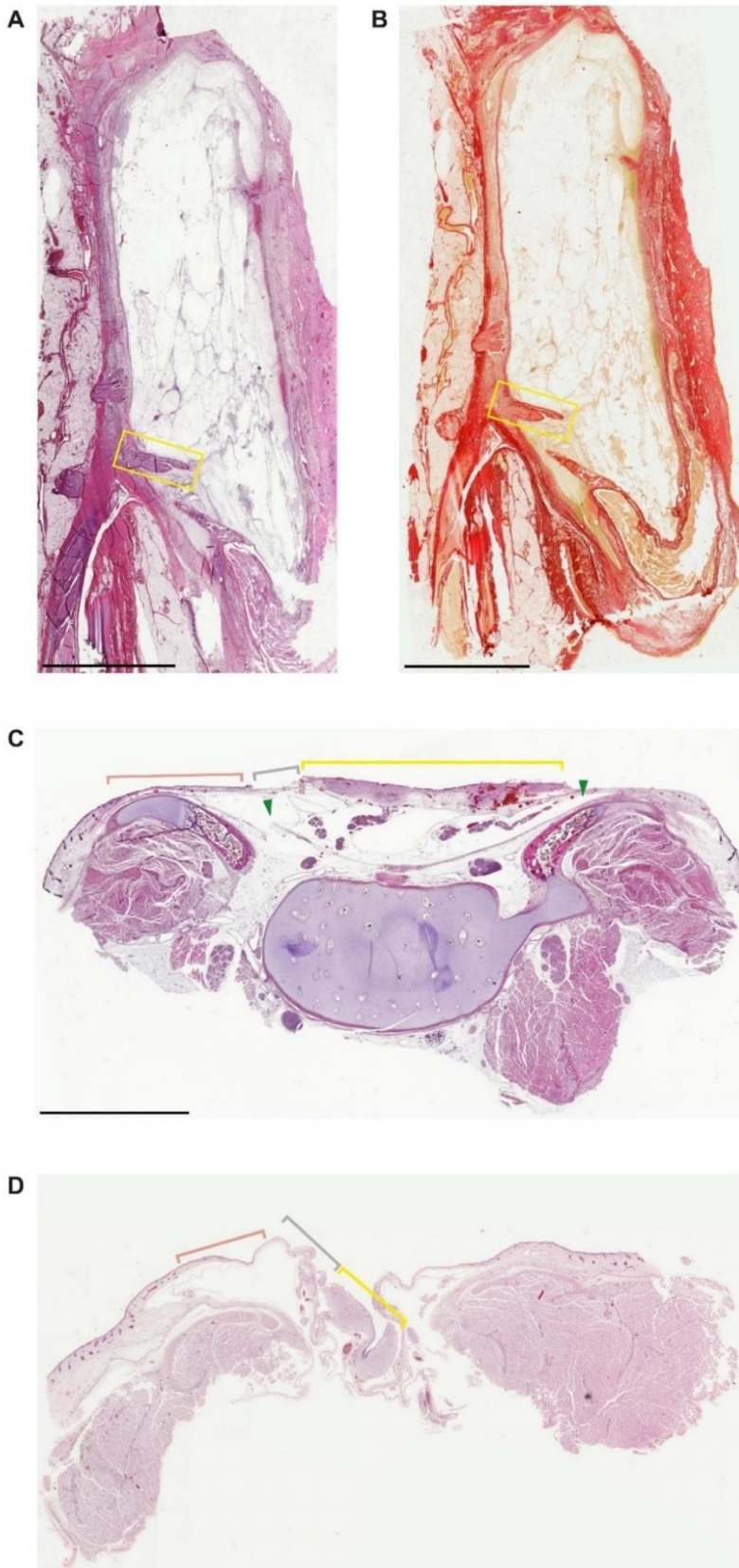


Abbildung 3: Histologisches Bild der Myelomeningozele und Myeloschisis. **A.** Transversalschnitt von einem 9 Wochen alten Patienten mit lumbosakraler Myelomeningozele (HE-Färbung, Maßstabsleiste 10 mm). **B.** Gleicher Schnitt wie in **A** mit Bindegewebsfärbung (Siriusrot-Färbung, Maßstabsleiste 10 mm). **C.** Transversalschnitt einer thorakolumbalen Myeloschisis aus der 24. SSW mit typischer Konfiguration in Form eines aufgeschlagenen Buches. Der Wirbelbogen verläuft sogar in die entgegengesetzte Richtung, die Nervenwurzeln sind langgezogen (HE-Färbung, Maßstabsleiste 5 mm). **D.** Transversalschnitt einer lumbalen Myeloschisis aus der 20. SSW mit v-förmig offenliegendem Rückenmark (HE-Färbung, Maßstabsleiste 2 mm). (eigenständig erstellte Abbildung, entspricht Abbildung 3 der Publikation in Erstautorenschaft (25))

Es ist zu beachten, dass in dieser retrospektiven Studie die Diagnose einer Myelomeningozele oder Meningozele rein aus dem histologischen Material sehr schwierig sein kann, da nicht immer sichergestellt ist, dass der komplette Zelensack eingebettet wurde. Es konnte daher häufig keine genaue Diagnose des SBA-Subtyps gestellt werden, vermutlich ist ein großer Anteil dieser Fälle der Myelomeningozele oder Meningozele zuzuordnen. Wichtig sind daher auch die makroskopische Beschreibung und Fotodokumentation, insbesondere für die Diagnose einer Myelomeningozele und auch die Differenzierung zur Meningozele durch die Position des Rückenmarks. Die Diagnose einer Myeloschisis darf jedoch unserer Ansicht nach nicht makroskopisch bei einer flachen Läsion gestellt werden, sondern ist das Metier der mikroskopischen Untersuchung. Zur Identifizierung einer Neuralplatte ist die neuropathologische Befundung daher die Voraussetzung und bietet einen hohen diagnostischen Mehrwert.

3.3 Verteilung der SB-Phänotypen

Der Großteil der Patient*innen in dieser Studie zeigte SBA (92,9 %, n = 79; **Abbildung 4**), SBO auf der anderen Seite war selten (7,1 %, n = 6). Fälle mit SBA ließen sich dabei wie folgt den einzelnen Subtypen zuordnen: Myeloschisis in 28 Fällen (32,9 %), Myelomeningozele in 21 Fällen (24,7 %) sowie Meningozele in 2 Fällen (2,4 %). 21 weitere SBA-Fälle konnten aufgrund von fehlendem histologischem Material (n = 17) oder widersprüchlichen Befunden (n = 4) nicht weiter einem Subtyp zugeordnet werden. 6 Fälle erhielten eine neurochirurgische Intervention und werden daher nicht mehr mit dem ursprünglichen Phänotyp, sondern separat beschrieben (siehe Zusatz zu (25)). Ein weiterer Fall mit ‚limited dorsal myeloschisis‘ stellte einen Spezialfall dar, der in Abschnitt 3.6 dieser Arbeit genauer beschrieben wird.

Betrachtet man nur die eindeutig diagnostizierten SBA-Fälle ohne postoperative Fälle und den Spezialfall ‚limited dorsal myeloschisis‘, war sowohl insgesamt als auch in der pränatalen Gruppe Myeloschisis am häufigsten, in der postnatalen Gruppe jedoch selten (siehe **Tabelle 2**). Dies ist dadurch zu erklären, dass das maximale Überleben dieser Patient*innen ohne operative Versorgung bei nur 8 Stunden lag. Myeloschisis ist daher im Gegensatz zur Myelomeningozele (maximales Überleben ohne operative Versorgung 36 Jahre) als tödliche Erkrankung einzuschätzen. Bei aktuellen radiologischen Studien kann meist nur differenziert werden, ob ein Zelensack vorhanden ist oder nicht. Dieses Fehlen einer Zele wird dann mit Myeloschisis gleichgesetzt, weshalb diese Unterteilung zur besseren Vergleichbarkeit mit derartigen Studien in **Tabelle 2** ergänzt wurde.

Tabelle 2: Verteilung der SBA-Subtypen in den Altersgruppen und gesamt
(eigenständig erstellte Tabelle, Daten aus Publikation in Erstautorenschaft (25))

	MYS	MMC	ME
Pränatal	24/33 (72,7 %)	7/33 (21,2 %)	2/33 (6,1 %)
	Zele allgemein: 9/33 (27,3 %)		
Postnatal	4/18 (22,2 %)	14/18 (77,8 %)	0/18
	Zele allgemein: 14/18 (77,8 %)		
Gesamt	28/51 (54,9 %)	21/51 (41,2 %)	2/51 (3,9 %)
	Zele allgemein: 23/51 (45,1 %)		

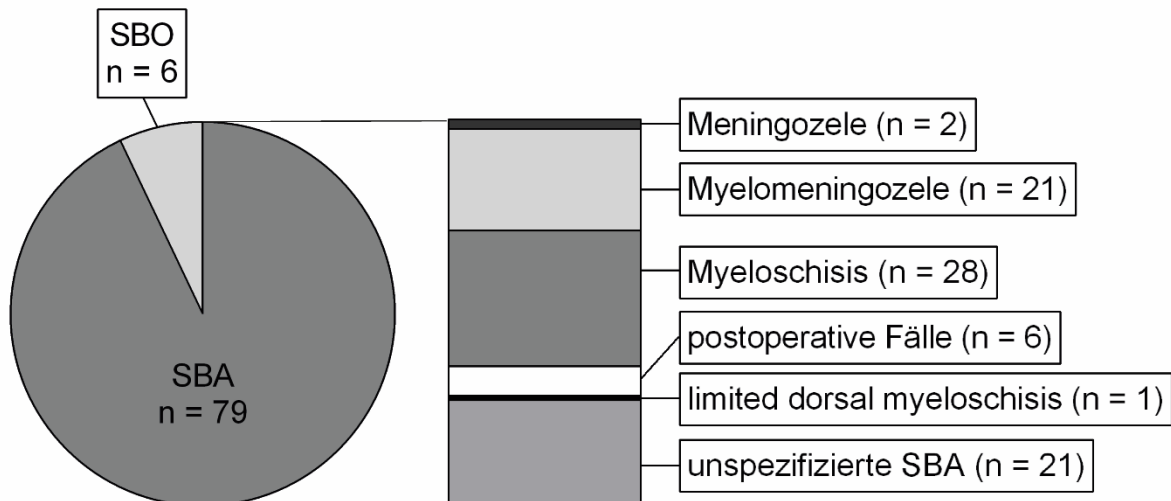


Abbildung 4: Verteilung der SB-Subtypen. SBA lag in 92,9 % der Fälle vor, SBO war mit 7,1 % selten. Auf der rechten Seite werden die SBA-Fälle weiter untergliedert: Meningozele (2,4 %), Myelomeningozele (24,7 %), Myeloschisis (32,9 %), postoperative Fälle (7,1 %), limited dorsal myeloschisis (1,2 %) sowie 24,7 % mit nicht weiter spezifizierbarem SBA-Subtyp. (eigenständig erstellte Abbildung, übersetzt und angepasst aus Abbildung 1 der Publikation in Erstautorenschaft (25))

3.4 Isoliertes Auftreten von Myeloschisis der unteren Wirbelsäule

Da der Myeloschisis-Phänotyp sehr selten und widersprüchlich beschrieben wird, soll hier weiter auf die Besonderheiten dieser Patient*innen eingegangen werden. In der Literatur wird über Myeloschisis-Fälle häufig als stark betroffene Spezialfälle mit einer Häufung von anderen schwerwiegenden Fehlbildungen insb. Anenzephalie oder Ausdehnung der SB über alle Wirbelkörpersegmente berichtet (6, 10, 29).

In unserer Studie zeigten 2 Fälle mit kaudaler bzw. thorakolumbalen Myeloschisis eine zusätzliche Enzephalozele, ein Fall mit zervikaler Myeloschisis eine Anenzephalie sowie ein Fall komplette Myeloschisis über alle Rückenmarksniveaus und zusätzliche Holoprosenzephalie. Damit ließen sich lediglich 4 der 28 Myeloschisis-Fälle (14,3 %) dieser Gruppe mit zusätzlichen gravierenden Fehlbildungen oder großflächiger SB zuordnen. Ein weiterer Myeloschisis Fall zeigte außerdem zusätzlich zu einer thorakolumbalen Myeloschisis eine kleine lumbosakrale SBO sowie ein weiterer Fall im Rahmen eines komplexen Fehlbildungssyndroms zusätzlich zur lumbalen Myeloschisis eine Mikrozephalie. Auf der anderen Seite wiesen jedoch die sonstigen 22 Myeloschisis Patient*innen (78,6 %) einen alleinigen Defekt der unteren Wirbelsäule (thorakolumbal bis sakral) auf. Daher war der Großteil der Myeloschisis-Fälle von der Ausdehnung und Lokalisation vergleichbar mit anderen Formen der SB und trat nicht als Spezialfall bei schwerstbetroffenen Patient*innen auf.

3 der 6 Fälle mit definiertem Syndrom (in Form des Potter-Syndroms) wiesen eine Myeloschisis auf, davon 2 mit thorakolumbalen bzw. thorakolumbosakraler Myeloschisis und ein Fall mit lumbalen Myeloschisis und zusätzlicher Mikrozephalie. Die mögliche Assoziation des Myeloschisis-Subtyps mit einem syndromalen Auftreten und insb. mit dem Potter-Syndrom konnte jedoch aufgrund der sehr geringen Fallzahlen mit diagnostiziertem Syndrom nicht weiter statistisch analysiert werden.

3.5 Gehirnfehlbildungen und häufigeres Auftreten bei Fällen mit Myelomeningozele

Während SBA-Patient*innen eine hohe Prävalenz von zusätzlichen Gehirnfehlbildungen und pathologischen histologischen Befunden zeigten (83,5 %, n = 66/79, mindestens einer der im folgenden Abschnitt und in **Tabelle 3** dargestellten Befunde), waren in der SBO-Gruppe keine dieser Auffälligkeiten festzustellen.

Tabelle 3: Häufigkeit von Gehirnfehlbildungen

^a Vergleich von Myelomeningozele und Myeloschisis; OR für die Häufung des Befunds bei Fällen mit Myelomeningozele im Vergleich mit Myeloschisis

^b Vergleich des jeweiligen SBA-Phänotyps mit den restlichen SBA-Fällen (eigenständig erstellte Tabelle, Daten aus Publikation als Koautorin (26))

	SBA insgesamt	MYS	MMC	p-Wert ^a	ME	frühestes Auftreten	pränatale SBA-Fälle
Hydrozephalus	53/79 (67,1 %)	15/28 (53,6 %) p ^b = 0,058	18/21 (85,7%) p ^b = 0,034	p = 0,018 OR = 5,208	0/2	17. SSW	28/49 (57,1 %)
CM	27/79 (34,2 %)	5/28 (17,9 %) p ^b = 0,023	14/21 (66,7%) p ^b < 0,001	p < 0,001 OR = 9,174	0/2	19. SSW	8/49 (16,3 %)
Heterotopien	24/79 (30,4 %)	8/28 (28,6 %) p ^b = 0,796	4/21 (19,0%) p ^b = 0,188	p = 0,443	0/2	16. SSW	16/49 (32,7 %)
Gyrierungsstörungen	23/79 (29,1 %)	4/28 (14,3 %) p ^b = 0,032	9/21 (42,9 %) p ^b = 0,106	p = 0,025 OR = 4,504	0/2	16. SSW	6/49 (12,2 %)
Ependymverlust	17/79 (21,5 %)	3/28 (10,7 %) p ^b = 0,083	3/21 (14,3 %) p ^b = 0,347	p = 0,706	0/2	19. SSW	8/49 (16,3 %)
Balkenfehlbildung	13/79 (16,5 %)	2/28 (7,1 %) p ^b = 0,122	3/21 (14,3 %) p ^b = 0,754	p = 0,414	1/2 (50,0 %)	16. SSW	7/49 (14,3 %)
Ependymrosetten	8/79 (10,1 %)	1/28 (3,6 %) p ^b = 0,248	1/21 (4,8 %) p ^b = 0,342	p = 0,835	0/2	16. SSW	4/49 (8,2 %)

Zusätzlich zur SBA konnten bei 6 Fällen kraniale Neuralrohrdefekte in Form von Enzephalozele (n = 4) und Anecephalie (n = 2) diagnostiziert werden. Außerdem zeigten sich 2 Fälle mit Holoprosenzephalie und 2 mit Mikrozephalie. Insbesondere ein Hydrozephalus war in mehr als zwei Drittel der Fälle mit SBA assoziiert (siehe **Tabelle 3**) und zeigte sich sowohl makroskopisch durch erweiterte Ventrikel sowie verstrichene Sulci (**Abbildung 5A**) als auch histologisch durch Verdünnung des Kortex und Dilatation des Ventrikels (**Abbildung 5C**). Bei mehr als der Hälfte der pränatalen SBA-Fälle trat ein Hydrozephalus auf, wir konnten diesen Befund bereits in der 17. SSW stellen. CM zeigte sich sowohl makroskopisch (**Abbildung 5A**) als auch mikroskopisch (**Abbildung 5B**) durch eine Verlagerung des Kleinhirns inkl. Vermis und des Hirnstamms. Es zeigte sich eine sehr hohe Rate von Patient*innen mit CM und Hydrozephalus (26 der 53 Hydrozephalus-Patient*innen mit CM (49,1 %), nur ein Fall mit CM zeigte keinen Hydrozephalus). Damit sind diese Befunde statistisch signifikant miteinander assoziiert (p < 0,001) und die Wahrscheinlichkeit bei vorhandener CM einen Hydrozephalus auszubilden war 24-fach erhöht (OR = 24,074). Jedoch trat die CM erst in der 19. SSW und damit später als der Hydrozephalus auf. Betrachtet man die pränatalen Fälle gesondert, war der Anteil an Fällen mit CM und Hydrozephalus niedriger als in der Gesamtkohorte (7/28 = 25,0%). Insbesondere pränatal war der Anteil an Fällen mit Hydrozephalus ohne CM hoch

(insgesamt: 27 der 53 Hydrozephalus Patient*innen; 50,9 %; pränatal \leq 20. SSW: 8/11 Fälle; 72,7 %; pränatal $>$ 20. SSW: 13/17 Fälle; 76,5 %; postnatal: 6/24 Fälle; 24,0 %). Die Chiari-III-Malformation bei zusätzlicher Enzephalozele lag in einem Fall mit thorakolumbalen Myelomeningocele vor, wurde jedoch als eigene Fehlbildung angesehen und ging in die obigen Auswertungen zur CM nicht mit ein.

Mikroskopisch zeigten sich bei 24 der 79 SBA-Patient*innen Heterotopien, welche insbesondere im Kleinhirn und im Marklager des Großhirns auftraten (**Abbildung 5B**). Auch das Risiko für Heterotopien war bei vorhandenem Hydrozephalus deutlich erhöht (21 der 24 Patient*innen mit Heterotopien haben gleichzeitigen Hydrozephalus (87,5 %); $p = 0,011$; OR = 5,031). Darüber hinaus zeigten sich bei 23 der 79 SBA-Fälle Gyrierungsstörungen in Form von erhöhter Anzahl oder abnormer Form der Gyri, sowie bei 13 der 79 SBA-Patient*innen Balkenfehlbildungen wie Hypoplasie bzw. Aplasie und histologische Auffälligkeiten des Corpus callosum. Diese Befunde waren nicht mit dem Auftreten eines Hydrozephalus assoziiert.

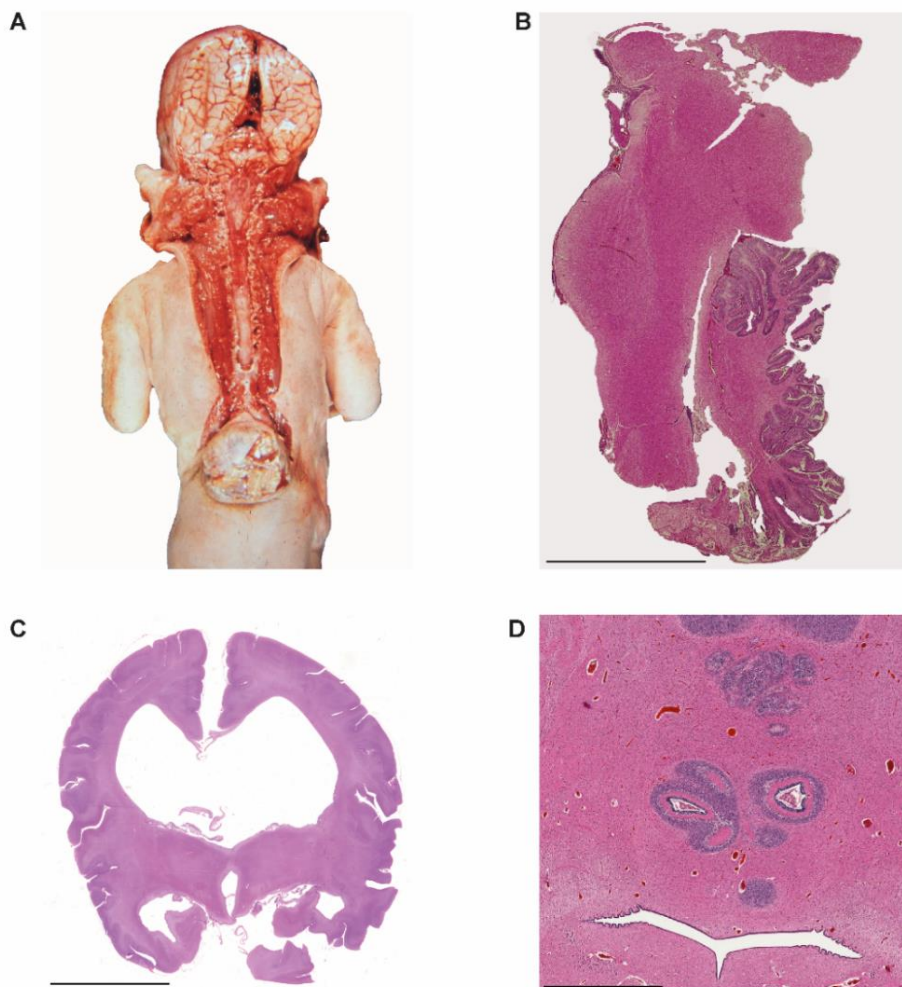


Abbildung 5: Gehirnfehlbildungen bei Patient*innen mit SBA. A. Makroskopisches Bild einer 2 Wochen alten Patientin mit lumbosakraler Myelomeningocele sowie Hydrozephalus und CM. Es zeigten sich verstrichene Sulci als Zeichen des Hydrozephalus sowie eine Verlagerung des Vermis und des Hirnstamms als Zeichen einer CM. B. Sagittalschnitt auf Höhe des Hirnstamms bei einer 10 Tage alten Patientin mit lumbaler unspezifizierter SBA und zusätzlichem Hydrozephalus und CM. Das Kleinhirn war nach kaudal verlagert und zusätzlich dysplastisch verändert. (HE-Färbung, Maßstabsleiste 1 cm). C. Hydrozephalus in Form der Ventrikulomegalie bei einem 5 Wochen alten Patienten mit lumbosakraler Myelomeningocele und zusätzlichem Hydrozephalus sowie CM (Koronschnitt, HE-Färbung, Maßstabsleiste 2 cm). D. Multiple, teils noduläre Heterotopien des Kleinhirns am Dach des 4. Ventrikels bei einem neugeborenen Patienten mit thorakolumbalen Myelomeningocele und zusätzlichem Hydrozephalus. (Transversalschnitt, HE-Färbung, Maßstabsleiste 2 mm).

(aus Abbildungen 2, 3 und 4 der Publikation als Koautorin (26))

Bei 17 SBA-Fällen zeigte sich ein Verlust des Ependyms, an den Stellen mit fehlendem Ependym fand eine reaktive Gliose statt (**Abbildung 6A, B**). Alle diese Fälle zeigten einen Hydrozephalus, 8 Fälle (15,1 % der Hydrozephalus-Patient*innen) davon ohne zusätzliche CM. Insgesamt zeigten 19 der 53 Fälle mit Hydrozephalus (35,8 %) weder eine CM noch Ependymverlust. In 8 Fällen konnten wir Ependymrosetten im neuronalen Gewebe (**Abbildung 6C**) identifizieren, 6 davon wiesen gleichzeitig Stellen mit Ependymverlust auf. Damit bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen Ependymverlust und Ependymrosetten, wobei das Risiko Ependymrosetten auszubilden beim Vorhandensein von Ependymverlust 16-fach erhöht ist ($p < 0,001$; OR = 16,364).

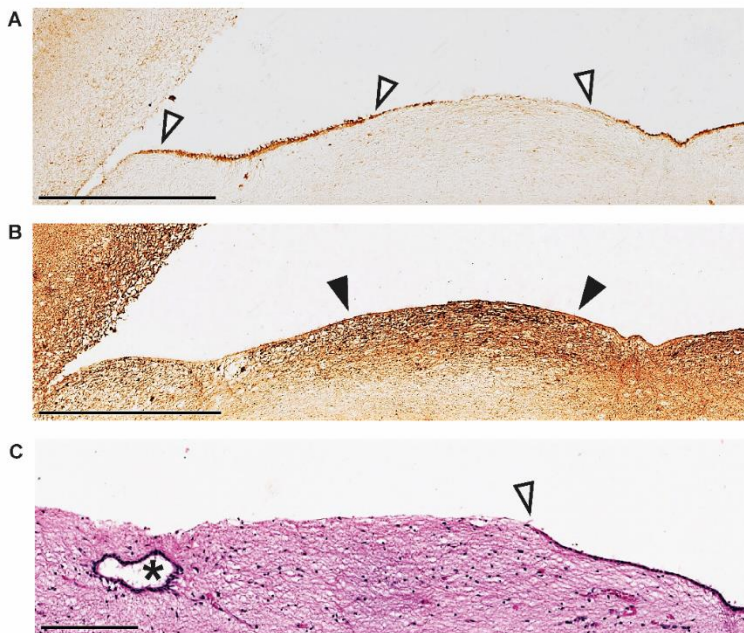


Abbildung 6: Ependymverlust und Ependymrosetten bei SBA. **A.** Intaktes Ependym (leere Pfeile) mit dazwischen liegenden Bereichen mit Ependymverlust im Seitenventrikel bei einer 4 Jahre alten Patientin mit Z.n. operativer Versorgung einer Myelomeningozele mit zusätzlichem Hydrozephalus und CM (Sagittalschnitt, acetyliertes-Tubulin-Färbung, Maßstabsleiste 500 µm). **B:** Gleicher Anschnitt mit reaktiver Gliose (ausgefüllte Pfeile) in Bereichen mit Ependymverlust, die sich in das Ventrikellumen vorwölbt (Sagittalschnitt, GFAP-Färbung, Maßstabsleiste 500 µm). **C.** Subventrikuläre Ependymrosette (Stern) unterhalb von Ependymverlust mit daneben liegendem intaktem Ependym (leere Pfeile) bei einer 14-jährigen Patientin mit Z.n. operativer Versorgung einer Myelomeningozele mit zusätzlichem Hydrozephalus und CM (HE-Färbung, Maßstabsleiste 200 µm). (aus Abbildung 6 der Publikation als Koautorin (26))

Beim Vergleich der Phänotypen Myeloschisis und Myelomeningozele als die beiden häufigsten SBA-Subtypen fiel auf, dass sowohl die Ausbildung eines Hydrozephalus als auch der CM signifikant häufiger mit Myelomeningozele assoziiert war (siehe **Tabelle 3**). Die Wahrscheinlichkeit, einen Hydrozephalus auszubilden, war dabei in der Gruppe mit Myelomeningozele 5-mal höher als in der Gruppe mit Myeloschisis, für CM sogar 9-mal höher. Im Vergleich mit den restlichen SBA-Fällen waren Fälle mit Myeloschisis signifikant seltener von einer CM betroffen (OR = 0,287), Fälle mit Myelomeningozele waren im Vergleich mit den restlichen SBA-Fällen fast 4-mal häufiger von einem Hydrozephalus (OR = 3,937) und fast 7-mal häufiger von CM betroffen (OR = 6,944). Hierbei ist zu beachten, dass die CM und die Ausbildung eines Hydrozephalus wie oben beschrieben sehr eng zusammenhängen.

Hinsichtlich der histologischen Auffälligkeiten des Gehirns zeigten Fälle mit Myelomeningozele 4-mal häufiger Gyrierungsstörungen als Fälle mit Myeloschisis. Fälle mit Myeloschisis waren im Vergleich mit den restlichen SBA-Fällen deutlich seltener von Gyrierungsstörungen betroffen (OR = 0,281).

3.6 Fehler in der Nomenklatur und deren Ursachen

Die eingangs beschriebene unklare SB-Nomenklatur war auch bei der Auswertung der Befunde der Studienkohorte weit verbreitet. Um die Auswirkungen dieser unpräzisen Begrifflichkeiten zu evaluieren, verglichen wir die ursprünglichen Diagnosen aus den neuropathologischen Berichten mit der neuen Diagnose, die auf den oben etablierten Definitionen beruht. Daraufhin musste die initiale Diagnose in mehr als zwei Drittel der Fälle korrigiert werden ($n = 31$; 36,5 %). Am häufigsten spezifizierten wir den Begriff Rachischisis zu Myeloschisis ($n = 18$; 21,2 %) oder passten lediglich die Begriffe Myelomeningoschisis ($n = 1$) und Myelozele ($n = 1$) an, jedoch mussten bei 11 Fällen (12,9 %) auch die Diagnosen komplett geändert werden. Der Begriff Rachischisis ist dabei unspezifisch und wird sowohl häufig für den Autopsie-Befund eines makroskopisch offenen Rückens oder für die Beschreibung einer großen SB (29), als teilweise auch synonym mit unserer Definition von Myeloschisis verwendet (28). Jedoch konnte nur in zwei Drittel der Fälle mit initialer Diagnose Rachischisis ($n = 18/27$; 66,7 %) bei der Reevaluation eine Neuralplatte identifiziert werden. Daher darf der Begriff Rachischisis nicht einfach ersetzt werden. Interessanterweise wurde nur bei 64,3% ($n = 18/28$) der nach neuer Definition als Myeloschisis diagnostizierten Fälle die Neuralplatte initial beschrieben.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Myeloschisis in unserer Kohorte unterdiagnostiziert war, was vor allem dadurch zustande kam, dass die Neuralplatte zwar beschrieben wurde, dann jedoch unter andere Diagnosen subsumiert wurde. Zusätzlich fehlte zum Zeitpunkt der Befundung und fehlt heutzutage weiterhin durch die seltene und nur bei stark betroffenen Fällen vorliegende Beschreibung der Myeloschisis in der neuropathologischen Befundung die Aufmerksamkeit für die hohe Verbreitung des Befunds einer Neuralplatte in typischen SB-Fällen.

Weitere Fehlerquellen in der Nomenklatur waren das gleichzeitige Auftreten zweier Phänotypen, Übergangszonen zwischen den Subtypen oder selten auftretende Sonderfälle. So fand sich ein Wirbelkörpersegment neben dem Myeloschisis-Befund aus **Abbildung 3C** ein geschlossenes Rückenmark sowie in zwei Myeloschisis-Fällen auf anderen Höhen eine Verdopplung des Rückenmarks mit einem geschlossenem und einem offenen Rückenmark. Außerdem zeigten zwei typische Myeloschisis-Fälle in anderen Schnitthöhen einen geschlossenen Zentralkanal mit flach in die Haut eingebettetem oder über dem Hautniveau liegendem Rückenmark, was als Übergangszone zu normalem Rückenmark zu verstehen ist. Dies verdeutlicht insbesondere, wie wichtig es ist, Proben aus der korrekten Höhe zu entnehmen und die Diagnose immer nach dem schwerwiegendsten SB-Phänotyp zu stellen.

„Limited dorsal myeloschisis“ stellte ebenfalls einen Sonderfall unter den SBA-Fällen dar, auf den in Abschnitt 3.8 genauer eingegangen wird

3.7 Definition des Begriffs Area medullovasculosa

Ein weiterer histologischer Terminus in Zusammenhang mit SB, der nur unklar definiert ist und für verschiedene Befunde verwendet wird, ist Area medullovasculosa. Dieser Begriff beschreibt in Analogie zur Area cerebrovasculosa bei Anenzephalie eine Vorwölbung von malformiertem neuroepithelialeem Gewebe (29). In beiden Fällen ist das fehlgebildete rudimentäre neuronale Gewebe mit zahlreichen

pathologischen Gefäßen durchsetzt. Diese Kapillargefäße sind sehr dünnwandig und großlumig, zeigen jedoch keine Blutungszeichen (siehe Detail in **Abbildung 7A**).

In der Literatur wird der Begriff Area medullovasculosa teilweise zur Beschreibung der Oberfläche einer Myelomeningozele verwendet (29), teilweise aber auch mit der Neuralplatte bei Myeloschisis gleichgesetzt (28). Bei den in dieser Arbeit analysierten Myeloschisis-Fällen konnte jedoch die Neuralplatte histologisch klar vom oben beschriebenen Befund einer Area medullovasculosa abgegrenzt werden, da sich dort in allen Fällen alleinig neuronales Gewebe ohne schwerwiegende Fehlbildung und charakteristischerweise eine flache oder v-förmige Ependymschicht zeigte. In dieser Kohorte lag die Area medullovasculosa außerdem in anderen Wirbelkörpersegmenten als die eigentliche SB. Daher beschreibt unserer Ansicht nach die Area medullovasculosa einen zusätzlich zur SB auftretenden Befund, der im Zusammenhang mit fehlgebildetem Rückenmark auftreten kann, aber nicht charakteristisch für eine SB-Subform ist und auch nicht mit der Neuralplatte gleichgesetzt werden darf.

3.8 Zusätzliche Fehlbildungen des Rückenmarks und potenzielle weitere Pathomechanismen in der Entstehung von SB

Bei 55 Fällen war ausreichend histologisches Material des Rückenmarks vorhanden, um auch Bereiche außerhalb der SB-Region zu analysieren. Es zeigten sich bei den 51 befundeten SBA-Fällen folgende Auffälligkeiten: multiple Zentralkanäle (33,3 %, n = 17), Hydromyelia (33,3 %, n = 17), Verdopplung von Teilen des Rückenmarks (15,7 %, n = 8) sowie Syringomyelia (11,8 %, n = 6), welche bei zwei Fällen bereits in der 19. SSW auftrat. Hierbei konnte keine Assoziation zu einem bestimmten SBA-Phänotyp festgestellt werden. Einer der 4 bezüglich dieser Fehlbildungen befundeten SBO-Fälle zeigte ebenfalls eine Hydromyelia sowie multiple Zentralkanäle. Alles in allem ist die Prävalenz dieser Fehlbildungen in der Literatur sehr variabel, jedoch in dieser Kohorte niedriger bis vergleichbar mit Angaben aus histologischen Studien (Hydromyelia: 29-77 %, multiple Zentralkanäle: 42 %, Verdopplung von Teilen des Rückenmarks 25-52 %, Syringomyelia 4-36 %) (13, 30, 31). Es muss dabei berücksichtigt werden, dass aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie Proben nicht systematisch entnommen wurden und sich in den meisten Fällen auf die Läsionshöhe konzentrierten. Diese Arbeit ist die erste, in der Syringomyelia histologisch bereits sehr früh intrauterin gezeigt werden konnte, auch sonographisch ist diese Fehlbildung in frühen Schwangerschaftswochen nur in Einzelfällen beschrieben (32).

Darüber hinaus fand sich in 5 Fällen mit SBA (9,8 %) und bei dem oben beschriebenen SBO-Fall zusätzlich zum Zentralkanal auftretendes Ependymgewebe im äußeren Liquorraum. Außerdem zeigte sich der Zentralkanal in manchen Fällen mit Hydromyelia nicht wie typischerweise kreisrund erweitert, sondern verzweigt und langgezogen. Zusätzlich konnten wir in einigen Fällen versprengtes Ependym oder auch mehrlagiges Ependym in Clustern, welches sich vermutlich regenerativ gebildet hat, identifizieren. Auch zeigte sich bei einigen Myeloschisis-Fällen histologisch mehr Ependymgewebe als zur Bildung eines Zentralkanals notwendig gewesen wäre. Alle diese Befunde legen nahe, dass in der Entstehung von SB die überschießende Bildung von Ependym eine Rolle spielen könnte.

Des Weiteren zeigte auch nicht-neuronales Gewebe Auffälligkeiten wie beispielsweise eine Hypertrichose. Dieser Befund trat bei 12 der 79 SBA-Patient*innen auf (15,2 %) und damit nicht wie in der Literatur

berichtet bei SBO im Bereich der Fehlbildung (7, 8), sondern seitlich und außerhalb der Läsionsregion von SBA-Befunden.

Neben den ektodermalen Fehlbildungen von ZNS und Haut war auch mesodermales Gewebe betroffen. Ein histologischer Schnitt zeigte beispielsweise Bindegewebe direkt über dem Wirbelkörper ohne dazwischen liegende Dura. ‚Limited dorsal myeloschisis‘ (**Abbildung 7B**) stellte eine weitere Form der fehlenden Trennung verschiedener Gewebe dar. Bei diesem Spezialfall der SBA verbindet charakteristischerweise ein Sporn aus dysplastischem Glia-Gewebe den Subarachnoidalraum mit der Hautläsion (33). Insgesamt kann bezüglich des Pathomechanismus von SBA also weniger von einer alleinigen Beeinträchtigung der Neurulation, sondern mehr von einer allgemein gestörten embryonalen Differenzierung ausgegangen werden.

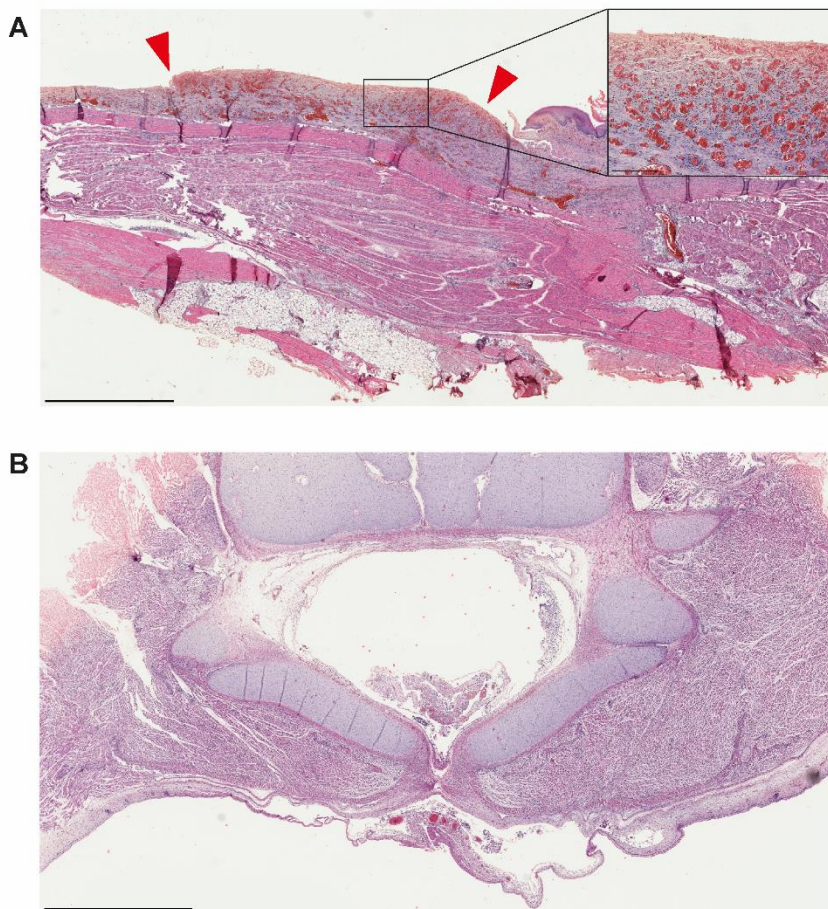


Abbildung 7: Weitere histologische Befunde bei SBA. A. Area medullovasculosa. Mit roten Pfeilen markierte Area medullovasculosa in einer 10 Tage alten Patientin mit unspezifizierter SBA. Es zeigten sich zahlreiche sinusoidale Gefäße ohne Blutungszeichen (HE-Färbung, Maßstabsleiste 2mm, Detail 200 µm). **B.** Limited dorsal myeloschisis. Dieser Spezialfall der SBA bei einem Patienten aus der 17. SSW zeichnete sich durch einen Sporn aus dysplastischem Gewebe aus, der sich durch den offenen Wirbelbogen vorwölbt. (HE-Färbung, Maßstabsleiste 2 mm). (eigenständig erstellte Abbildung aus Zusatzabbildung 4 und 5 der Publikation in Erstautorenschaft (25))

4. Diskussion

In dieser Promotionsarbeit wird der Fokus auf die wichtigsten Ergebnisse der beiden zugrundeliegenden Publikationen, wie die neu etablierte SB-Klassifikation sowie die Erkenntnisse bezüglich des Myeloschisis-Phänotyps und Gehirnehlbildungen in Assoziation zu SB gelegt. Weitere Aspekte werden ausführlich in den Originalpublikationen (25, 26) diskutiert.

4.1 SB-Klassifikation, Fehlerquellen und Auswirkungen der unklaren Definitionen

Basierend auf der dargestellten retrospektiven Studie mit 85 SB-Patient*innen wurden die histologischen Phänotypen detailliert beschrieben und daraus eine Klassifikation mit Unterscheidung von SBO und den drei SBA-Unterformen Meningozele, Myelomeningozele und Myeloschisis entwickelt.

Heterogene bzw. unpräzise Definitionen und Begriffe sind nicht nur in unserer Kohorte ein Problem, da in fast einem Drittel der Fälle die primäre Diagnose korrigiert bzw. spezifiziert werden musste, sondern auch heutzutage weiterhin in der Literatur. Durchgesetzt hat sich bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch keine stringente Nomenklatur. Es ist wichtig zu verdeutlichen, dass SBA als Ganzes nicht mit einer ihrer Unterformen der Myelomeningozele gleichgesetzt werden darf. Diese fehlende Trennschärfe ist in der aktuellen Literatur weit verbreitet und die häufigste Fehlerquelle bei der Anwendung der oben beschriebenen Phänotypen auf andere Veröffentlichungen (6, 7, 9-16). Es kommt hierbei zu zahlreichen Unklarheiten, Fehldiagnosen und Vermischungen von Subtypen, sodass mit den dargestellten Informationen dann oft nicht mehr rekonstruiert werden kann um welchen Phänotyp es sich nach unserer Definition handelt, also zum Beispiel ob wirklich nur Fälle mit Myelomeningozele ausgewertet wurden, oder im Allgemeinen Fälle mit SBA.

Eine weitere Unklarheit in aktuellen Publikationen ist darüber hinaus die Darstellung von Myeloschisis als Unterform der Myelomeningozele (9, 11-13, 18). Myeloschisis als Phänotyp mit offener Neuralplatte und Myelomeningozele mit geschlossenem Rückenmark unterscheiden sich im Zeitpunkt der embryologischen Entstehung und sind daher pathomechanistisch strikt zu differenzieren. Die Neuralplatte ist dabei der ausschlaggebende Punkt für die Einordnung als Myeloschisis. Obwohl dieser Befund so augenscheinlich ist und bei der neuropathologischen Befundung eines Falls mit SB von höchster Relevanz sein sollte, wurde die Neuralplatte nur bei knapp zwei Drittel der Fälle mit Myeloschisis in unserer Kohorte initial beschrieben. Diese fehlende Identifizierung der Neuralplatte kann dadurch begründet sein, dass die Aufmerksamkeit für die Häufigkeit dieser Fehlbildung auch unter erfahrenen Neuropathologen fehlte oder durch makroskopische Beschreibungen einer Vorwölbung die Untersuchung schon vorab beeinflusst war.

Wichtiger als die fehlende Beschreibung der Neuralplatte ist jedoch, dass sie zwar korrekt identifiziert wurde, dann jedoch unter den Diagnosen Rachischisis, SBA oder Myelomeningozele zusammengefasst wurde und damit im Befund unterging. Der Begriff Rachischisis ist heutzutage weniger gebräuchlich, wird aber sowohl als unspezifische makroskopische Beschreibung für einen komplett offenen Rücken in Abgrenzung zu SB für lokalisierte Defekte (29), als auch für den histologischen Befund einer Neuralplatte verwendet (28). Wir bevorzugen den Begriff Myeloschisis für den histologischen Befund, da deutlich wird, dass wirklich das Rückenmark (,myelon') von der Spaltbildung (,schisis') betroffen ist. Auch die

Unterscheidung anhand der Ausdehnung des Defekts ist angesichts dessen, dass die Myeloschisis in fast 80% der hier untersuchten Myeloschisis-Fälle lediglich den thorakolumbalen bis sakralen Bereich betraf, unserer Ansicht nach nicht zielführend. Darüber hinaus konnte in nur zwei Drittel der Fälle mit Rachischisis eine Neuralplatte identifiziert werden, daher ist der Begriff Rachischisis nicht synonym mit Myeloschisis und darf nicht simpel ersetzt werden.

In radiologischen Studien und pränataler Diagnostik wird außerdem häufig der Begriff Myelozele für Myeloschisis verwendet (34). Dies ist extrem irreführend, da sich charakteristischerweise keine Zele findet. Daher sollte der Begriff Myelozele nicht für eine ausgebliebene Neurulation verwendet werden. Darüber hinaus ist es unserer Ansicht nach nicht treffend, Myeloschisis als extra Phänotyp von den Formen mit Zele als SB cystica abzugrenzen (35), sondern alle drei Subtypen als SBA der SBO gegenüberzustellen.

Insgesamt gibt es zahlreiche Faktoren, die zu Überschneidungen und Unklarheiten in der Terminologie und damit zu Fehldiagnosen sowie Informationsverlust führen. Es ist daher wichtig, sich auf einheitliche Definitionen zu verständigen und diese Klassifikation sowohl in der präklinischen Forschung als auch in klinischen Studien aller beteiligten Fachdisziplinen durchgängig zu verwenden. Insbesondere Myeloschisis als Phänotyp mit Neuralplatte ist dabei klar zu benennen, um sowohl die Erkenntnisse bezüglich Pathomechanismen und beteiligter Gene voranzubringen als auch den OP-Situs für neurochirurgische Interventionen exakt zu beschreiben.

4.2 Klinische Erkenntnisse zum Phänotyp Myeloschisis

Ein wichtiges Ergebnis dieser Promotionsarbeit ist, dass Myeloschisis ein weit verbreiteter SB-Phänotyp ist, der in dieser Studie sogar noch häufiger war als Myelomeningozele (31,1 % vs. 23,3 %). In der Literatur wird Myeloschisis meist als Spezialfall beschrieben, der häufig in den Informationen über Myelomeningozelen untergeht (8, 11, 12, 16). Somit ist das Ziel dieser Arbeit, vor allem Aufmerksamkeit auf den SB-Phänotyp Myeloschisis und dessen Verbreitung zu lenken sowie klinische Besonderheiten dieser Patient*innen aufzuzeigen.

Lediglich Karakoyun et al. konnte ebenfalls einen höheren Anteil von Fällen mit Myeloschisis im Vergleich mit Myelomeningozele identifizieren (36). Dort wird als mögliche Ursache der hohe Anteil von syrischen Flüchtlingsfamilien angeführt. Faktoren, die mit einer höheren Prävalenz von SB im Allgemeinen assoziiert sind, sind ein niedriger sozio-ökonomischer Status, seltenere Vorsorgeuntersuchungen, schlechtere Ernährungslage sowie fehlende Supplementierung mit Folsäure (11, 37). Daher können diese Aspekte in der Studie von Karakoyun et al. sowie in der in dieser Arbeit dargestellten teilweise fast 50 Jahre alten Studienkohorte neben den technischen Möglichkeiten der Ultraschalldiagnostik entscheidende Auslöser für schwerer betroffene Phänotypen darstellen. Auffällig ist auch, dass es eine der wenigen Studien ist, die sich nicht mit der intrauterinen operativen Versorgung beschäftigt und daher die Diagnose auch postnatal gestellt wird. In der Studie von Hagemann et al. wird die Diagnose jedoch ebenfalls postnatal gestellt und trotzdem zeigt sich eine sehr niedrige Myeloschisis-Rate von 19 % (5).

Da in der hier beschriebenen Studie fast zwei Drittel der Fälle pränatal verstorben und damit histologisch untersucht worden sind, lässt sich die Verteilung der Untergruppen am ehesten mit Studien zur pränatalen Diagnose vergleichen. In diesen Auswertungen wird meistens nur zwischen flacher Läsion im Ultraschall oder MRT (Myeloschisis nach unserer Definition) und Fällen mit Zele (Myelomeningozele und Meningozele)

unterschieden. Es konnte keine Studie gefunden werden, die neuropathologische Befunde zur Diagnostik heranzieht und daher sind alle im Folgenden dargestellten Daten nur sehr eingeschränkt mit unserer Studie zu vergleichen. Mit einem Durchschnitt von 31 % für flache Läsionen in pränatalen Studien aus allen gefundenen Studien (34, 38-45) lag die Rate für Myeloschisis-Fälle innerhalb der eindeutig diagnostizierbaren pränatalen Fälle in dieser Arbeit deutlich höher (73 %). Es gilt zu beachten, dass Daten aktueller Veröffentlichungen häufig im Rahmen von Studien zur intrauterinen operativen Versorgung erhoben werden. Daher kann vermutet werden, dass in diesem Patientenkollektiv schwerwiegendere Fehlbildungen vorliegen und die Rate an Fällen mit Myeloschisis in der Gesamtheit aller SBA-Patient*innen sogar noch niedriger wäre.

Die höhere Rate an Myeloschisis-Fällen in der hier dargestellten Kohorte lässt sich neben den oben beschriebenen Unklarheiten in der Klassifikation und dargestellten möglichen Auslösern für echte Prävalenzunterschiede in dieser Kohorte insbesondere darauf zurückführen, dass mit der neuropathologischen Untersuchung des Rückenmarks die exakteste Diagnosemöglichkeit verwendet wurde. Wie häufig es zu Vorwölbungen von Gewebe bei Fällen mit Myeloschisis sowie zu flachgedrückten Zellen und damit zu radiologischen Fehldiagnosen kommen kann, wird aus den analysierten Studien aufgrund fehlender histologischer Untersuchung nicht deutlich. Lediglich in der Studie von Rethmann (43) wurden die radiologischen Diagnosen intraoperativ überprüft. Daraufhin zeigte sich, dass in mehr als 10 % der Fälle die Membran einer Zelle flachgedrückt und deshalb im MRT nicht zu sehen war, was dann zur Fehldiagnose einer Myeloschisis geführt hat. Derartige Fehler können jedoch mit histologischer Befundung nicht vorkommen, da die Diagnose einer Myeloschisis nur gestellt werden darf, wenn das Rückenmark als Neuralplatte vorliegt. Dies verdeutlicht die Ungenauigkeit der radiologischen Methoden und unterstreicht erneut die Notwendigkeit einer neuropathologischen Untersuchung mit dadurch entstehendem Wissensgewinn. Es ist zu vermuten, dass der Myeloschisis-Phänotyp daher nicht nur in dieser histologischen Studie im Vergleich zu den Vorbefunden unterdiagnostiziert ist, sondern zusätzlich in Arbeiten mit radiologischer Diagnostik zu selten über diesen Phänotyp berichtet wird, da radiologische Methoden das Vorliegen einer Neuralplatte nicht abbilden können.

Häufig wird in der Literatur von schwer betroffenen Myeloschisis-Fällen mit zusätzlichen kranialen Neuralrohrdefekten oder langstreckigem Defekt berichtet (6, 10, 29), jedoch zeigte in unserer Studie mehr als drei Viertel der Myeloschisis Patient*innen einen singulären Neuralrohrdefekt der unteren Wirbelsäule. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit Karakoyun et al., denn dort lagen fast 90 % der Läsionshöhen der Myeloschisis-Fälle im Bereich der unteren Wirbelsäule (36). Es ist daher besonders zu betonen, dass Myeloschisis in den allermeisten Fällen bei begrenzten Läsionen in typischer Höhe auftritt und keineswegs als seltene Diagnose für schwerstbetroffene Spezialfälle vorbehalten ist.

Die klinischen Besonderheiten der Myeloschisis lassen sich durch wenige und konträre Studien nur schwer einschätzen. Auf der einen Seite zeigen einige Studien ein besseres klinisches Outcome hinsichtlich der motorischen Funktion der unteren Extremität und selbstständigem Laufen bei Patient*innen mit Myeloschisis im Vergleich mit Myelomeningozele (38-41). Dies lässt sich mit der Hypothese des sogenannten ‚third-hit‘ erklären. Im Pathomechanismus von SB spielt nach der gestörten Neurulation als erster ‚hit‘, auch der Kontakt von neuronalem Gewebe mit neurotoxischer Amnionflüssigkeit als zweiter Verletzungsmechanismus eine Rolle (46). Diese Theorie wird auch als Begründung für eine frühe fetale

Operation herangezogen, um durch die Operation den zweiten Schritt abzumildern und weitere Schäden am neuronalen Gewebe zu verhindern. Neuere Studien gehen bei Fällen mit Myelomenigozele von einem zusätzlichen dritten Verletzungsmechanismus aus, der durch Zugkräfte innerhalb des Zelensacks entsteht (38, 45). Passend dazu konnten verschiedene Arbeiten zeigen, dass große Myelomenigozelen mit längerem Krankenhausaufenthalt, höherer Rate an tetraplegischen Patient*innen und häufigeren Klumpfüßen assoziiert sind als kleine Formen (45, 47). Im Sinne dieser Theorie würden Patient*innen mit Myelomenigozele stärker von einer frühen intrauterinen operativen Versorgung profitieren, da auch die Auswirkungen des dritten ‚hit‘ eingedämmt werden könnten. Dazu konnte jedoch aktuell keine Publikation gefunden werden.

Auf der anderen Seite gibt es viele Studien, in denen Myeloschisis-Fälle vermehrt klinische und radiologische Auffälligkeiten zeigten und insgesamt stärker betroffen waren. So konnten neben häufigerer Skoliose, Kyphose und Blasenfunktionsstörung, auch eine längere Dauer des Krankenhausaufenthalts bei Myeloschisis Fällen gezeigt werden (36, 42). Dies lässt sich embryologisch über die gestörte oder fehlende Erregungsweiterleitung in der Neuralplatte erklären. Im Gegensatz dazu ist bei Fällen mit geschlossenem Rückenmark teilweise eine Signalübertragung und damit Motorik und Sensorik möglich. Zusätzlich konnten für Myeloschisis-Fälle vermehrt zerebrale Auffälligkeiten, wie die Notwendigkeit der Versorgung mit einem Shunt und eine höhergradige Herniation von Strukturen der hinteren Schädelgrube im Rahmen der CM gezeigt werden (5, 34, 43-45). Dies wird meist durch das Austreten von Liquor im Bereich der Läsion und darauffolgende Ausbildung einer hypoplastischen hinteren Schädelgrube im Sinne der Theorie von McLone erklärt (23, 34, 43). Jedoch liegt definitionsgemäß bei allen Fällen mit SBA ein Defekt von Dura und Haut vor, somit kann es beispielsweise auch bei Fällen mit Myelomenigozele zum Austritt von Liquor kommen. Lediglich die Größe des Defekts und damit die Menge des austretenden Liquors könnte bei Fällen mit offenem Zentralkanal im Rahmen einer Myeloschisis höher sein (34). Weitere Erklärungsansätze für schwerwiegendere Gehirnfehlbildungen bei Fällen mit Myeloschisis ließen sich innerhalb der wenigen Studien mit beschriebenen Myeloschisis-Fällen nicht finden.

In dieser Arbeit zeigten Fälle mit Myeloschisis entgegen den dargestellten Studien signifikant seltener eine CM oder einen Hydrozephalus als Fälle mit Myelomenigozele sowie seltener CM als bei SBA im Allgemeinen. Myelomenigozele war hingegen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für die CM bzw. einen Hydrozephalus assoziiert. Dies kann auf der einen Seite dadurch zustande kommen, dass die histologischen Kriterien für Hydrozephalus und CM sich von den radiologischen Charakteristika unterscheiden, legt aber auch die Schlussfolgerung nahe, dass Myeloschisis nach histologischer Diagnose eventuell einen anderen Befund beschreibt als das reine Fehlen einer Zele in der Bildgebung.

Zusätzlich zur häufigeren Ausbildung von Hydrozephalus und CM konnten wir in der vorliegenden Studie zeigen, dass Gyrierungsstörungen häufiger bei Fällen mit Myelomenigozele vorkommen als bei Myeloschisis und bei Fällen mit Myeloschisis seltener sind als unter allen SBA-Fällen. Dazu liegen keine vergleichbaren Studien vor, es verdeutlicht jedoch zusätzlich, dass Myeloschisis-Patient*innen nicht pauschal als schwer betroffen gelten dürfen.

Insgesamt deuten die dargestellten Ergebnisse darauf hin, dass der histologische Myeloschisis-Phänotyp ohne neuropathologische Untersuchung schlichtweg nicht diagnostiziert werden kann und damit nicht mit dem radiologischen Aspekt einer fehlenden Zele gleichgesetzt werden darf. Zusammen mit dem oben

dargestellten mehrheitlichen Vorkommen als begrenzte Läsion im Bereich der unteren Wirbelsäule ohne schwerwiegende Gehirnfehlbildungen, lässt sich vermuten, dass der histologische Myeloschisis-Phänotyp auch in radiologisch und makroskopisch typischen SB-Fällen häufig vorkommt. Daher ist für die Einschätzung der Prävalenz und Schwere von Gehirnfehlbildungen wie Hydrozephalus und CM bei den unterschiedlichen SB-Phänotypen eine systematische neuropathologische Untersuchung betroffener Patient*innen notwendig.

Die Prävalenz von Gehirnfehlbildungen und insbesondere der CM bei den einzelnen SB-Subtypen hat dabei enorme Bedeutung für die weitere Therapie. In der MOMS-Studie wurde die CM als Einschlusskriterium verwendet und gilt daher heute bei vielen Autoren als wichtige Voraussetzung für die Entscheidung zur intrauterinen Operation (3). Das Ziel hierbei ist insbesondere, den Schweregrad der CM zu reduzieren (48). Wenn Fälle ohne radiologische Zele im Allgemeinen stärker von dieser Fehlbildung betroffen sein sollten, ist zu schlussfolgern, dass diese Fälle auch stärker von einer intrauterinen Operation profitieren würden. Passend dazu zeigen erste Daten von Rethmann et al. in einer kleinen Kohorte, dass sich der Subarachnoidalraum nach intrauteriner Operation in der Gruppe der Patient*innen ohne Zele stärker vergrößert hat als in der Gruppe mit Myelomeningozele (43). Darüber hinaus hat das Auftreten von Fehlbildungen der hinteren Schädelgrube im Rahmen von CM auch eine Relevanz für die pränatale Diagnostik. Die sonographische Untersuchung im ersten Trimester ist weniger auf den eigentlichen SB-Befund der Wirbelsäule als viel eher auf Auffälligkeiten der hinteren Schädelgrube fokussiert (49-52). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Gehirnfehlbildungen entscheidend für das kognitive Outcome betroffener SB-Patient*innen sind (19, 20, 53). Daher haben Unterschiede in der Prävalenz von Gehirnmalformationen wie CM in den einzelnen SB-Phänotypen auch Auswirkungen auf die pränatale Diagnostik und Beratung betroffener Familien.

Versucht man sich nur auf die klinischen Auswirkungen der SB allein zu beschränken und vergleicht Patient*innen mit Myeloschisis und CM mit Fällen mit Myelomeningozele und CM, konnten Oliver et al. zeigen, dass in der Myeloschisis-Gruppe die Rate von Klumpfüßen geringer und das motorische Outcome besser war (45). Es ist daher unklar, was Auswirkung des Neuralrohrdefekts und was Folge der assoziierten Gehirnfehlbildungen ist und insbesondere, ob sich dies überhaupt voneinander zu trennen ist.

Insgesamt lässt sich aktuell über zu erwartende motorische Einschränkungen, mögliche prognoseentscheidende Gehirnfehlbildungen und die Vor- und Nachteile des jeweiligen Operationszeitpunkts für einzelne SB-Subformen kaum eine Aussage treffen. Damit ist derzeit keine phänotypspezifische individuelle Beratung möglich. Um dies zu erreichen, müssen größere Studien mit durchgängiger Verwendung der oben etablierten SB-Klassifikation in allen Fachbereichen zeigen, in welcher Form sich die Subtypen hinsichtlich Prävalenz und Schweregrad von Gehirnfehlbildungen sowie bezüglich der Prognose und dem klinischen Erscheinungsbild unterscheiden. Außerdem muss durch systematische histologische Untersuchung gezeigt werden, wie sich Fälle mit Myeloschisis bildmorphologisch darstellen.

4.3 Frühes Auftreten von Gehirnehlbildungen und Relevanz für intrauterine Operationen

In dieser Arbeit konnten wir übereinstimmend mit der Literatur die hohe Prävalenz von Gehirnehlbildungen bei SBA-Patient*innen bestätigen (84 %). Dies ist eine der wenigen bekannten Studien, in der hierfür neuropathologische Diagnostik und keine bildgebenden Methoden verwendet wurden. In anderen histologischen Arbeiten wurden für Hydrozephalus (41-52 % vs. 67 % in dieser Studie), CM (57 % vs. 34 %), Heterotopien (34-44 % vs. 30 %) und Gyrierungsstörungen (40 % vs. 29 %) (31, 54) ähnliche bis höhere Prävalenzen festgestellt. Dies ist vermutlich durch fehlende Daten bzw. Material in der hier durchgeführten Studie bedingt. Radiologisch zeigten sich sehr variable Daten für die beschriebenen Ehlbildungen (Hydrozephalus: 56-96 %, CM: 21-100 %, Heterotopien: 4-44 %, Gyrierungsstörungen: 40 %) (19, 43-45, 55-58).

Balkenehlbildungen konnten in verschiedenen Studien radiologisch mit sehr hoher Prävalenz (40-96 % vs. 16 %) nachgewiesen werden, histologische Daten dazu fehlen (19, 44, 56-60). Den in der Literatur beschriebenen Zusammenhang von Hydrozephalus mit neuronalen Entwicklungsstörungen konnten wir nur für Heterotopien und nicht für Gyrierungsstörungen bzw. Balkenehlbildungen darstellen (59).

Darüber hinaus zeigten wir übereinstimmend mit Schneider et al., dass SBO-Fälle deutlich seltener von Gehirnehlbildungen betroffen waren. Dabei ist zu beachten, dass die Fallzahl bezüglich SBO mit 6 Fällen in dieser Studie nur sehr klein war, wodurch keinerlei Gehirnehlbildungen gezeigt werden konnten, dies ist mit einer größeren Kohorte von SBO-Patient*innen erneut zu evaluieren. SBO und SBA sind deutlich voneinander zu trennen, insbesondere, da von den Gehirnehlbildungen wie oben beschrieben ein prognostischer Wert hinsichtlich der Möglichkeiten der pränatalen Diagnostik und dem Outcome bezüglich kognitiver Leistung ausgeht (19, 20, 49-53). Diese Studie ist die erste ihrer Art, die ausgehend von histologischer Untersuchung SB-Phänotypen unterscheidet und daraus die bereits dargestellten Unterschiede innerhalb der SBA-Subtypen feststellen konnte. Darüber hinaus konnte eine hohe Prävalenz der Gehirnehlbildungen in allen Subtypen auch pränatal und insbesondere ein sehr frühes Auftreten im Zeitraum der 16. – 19. SSW dargestellt werden. Andere Studien konnten zeigen, dass bereits in der 11. SSW im Gehirn von SBA-Fällen die Anzahl der Neuronen und basalen Progenitorzellen vermindert ist, was eine gestörte Neurogenese impliziert (61). Aktuell werden fetale SB-Operationen hingegen meist in der 19. – 25. SSW durchgeführt (3, 10, 62). Das Auftreten von mikroskopischen sowie makroskopischen Gehirnehlbildungen vor diesem Zeitraum in der vorliegenden Studie deutet jedoch darauf hin, dass selbst durch die frühe intrauterine Operation die strukturellen Veränderungen des gesamten ZNS nicht mehr verhindert werden können. Es ist fraglich, inwieweit diese Ehlbildungen und insbesondere CM reversibel sind, da es sich neben der Herniation von Kleinhirnstrukturen und Hirnstamm vor allem um eine knöcherne Ehlbildung in Form der Hypoplasie der hinteren Schädelgrube handelt (21, 22).

Wir konnten mit unserer Auswertung die enge Assoziation von CM und Hydrozephalus bestätigen (21, 23, 54). Bezüglich der zeitlichen Abfolge ist jedoch unklar, ob der Hydrozephalus tatsächlich in Konsequenz einer CM auftritt, da der Hydrozephalus schon in der 17. SSW und die CM erst in der 19. SSW auftrat. Zusätzlich zeigten nur circa die Hälfte der Hydrozephalus Patient*innen eine CM. Es ist daher zu vermuten, dass im Rahmen von SBA neben der CM ein weiterer Pathomechanismus für die Entstehung des Hydrozephalus verantwortlich sein kann. De Wit et al. stellten in einer neuropathologischen Studie bei

einem Fall mit Myelomeningozele aus der 16. SSW einen Verlust des Ependyms noch vor der Entstehung von CM und Hydrozephalus fest (63). Auch in der vorliegenden Studie könnte bei einem geringen Anteil (15 %) der Hydrozephalus-Fälle ein Verlust des Ependyms verantwortlich gewesen sein. Darüber hinaus zeigten wir wie auch de Wit et al. im Zusammenhang mit Ependymverlust vermutlich regenerativ entstehende Ependymrosetten (63). Mehr als ein Drittel der Fälle mit Hydrozephalus wiesen jedoch in unserer Studie weder CM noch Ependymverlust auf, was neben fehlenden Daten durch die retrospektive Auswertung, insbesondere darauf schließen lässt, dass es möglicherweise neben der CM als häufigster Ursache und dem Verlust von Ependym als eher seltenem Auslöser, weitere Pathomechanismen für die Entstehung von Hydrozephalus bei SBA gibt.

4.4 Limitationen

Der retrospektive Studiencharakter dieser Arbeit geht mit fehlenden Daten und fehlendem histologischen Material einzelner Patient*innen einher, daher ist die Aussagekraft insgesamt eingeschränkt. Die unsystematische Probenentnahme stellt ebenfalls eine wichtige Limitation dar. Besonders zu erwähnen ist der hohe Anteil an nicht weiter klassifizierbaren SBA-Fällen. Da hier histologisch keine Neuralplatte gefunden werden konnte, lässt sich vermuten, dass diese Fälle den Phänotypen Meningozele oder Myelomeningozele zuzuordnen sind. Des Weiteren fehlt die Anamnese der Mutter und damit Informationen zu Vorerkrankungen, Folsäureeinnahme, Schwangerschaftsverlauf und Vorsorgeuntersuchungen, die insbesondere aufgrund des hohen Anteils an pränatalen oder kurz nach der Geburt verstorbenen Patient*innen von Bedeutung sein können. Diese Daten waren aufgrund der verstrichenen Aufbewahrungszeiträume der Akten oder auch durch fehlende Zuordnung der Mütter zu den Fällen nicht zu erheben. Bezüglich der neurologischen Symptome der älteren Patient*innen fehlen ebenfalls Informationen, da die Befunde aus der Pathologie nicht mit klinischen Befunden verknüpft waren.

Bei einer neuropathologischen Studie verstorbener Fälle ist im Allgemeinen zu beachten, dass diese eventuell schwerwiegender betroffen sein können als Überlebende. Zusätzlich war in dieser Studie durch den hohen Anteil an Schwangerschaftsabbrüchen in einigen Fällen das Material aufgrund von Autolyse nur eingeschränkt beurteilbar.

Insgesamt war die Kohorte zwar relativ groß, jedoch mindestens über 20 Jahre und teilweise fast 50 Jahre alt. Aktuelle SB-Patient*innen und die Verteilung der Phänotypen sind daher durch heutige Empfehlungen zur Folsäureeinnahme vor und in der Schwangerschaft beeinflusst und gegebenenfalls verändert. Postnatale Fälle sind darüber hinaus auch durch verbesserte und frühe Ultraschalldiagnostik geprägt. Trotzdem stellt die Kohorte gerade durch die fortgeschrittenen Schwangerschaftswochen eine heutzutage unwiederbringliche Informationsquelle dar.

4.5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit, basierend auf einer neuropathologischen Studie, eine Klassifikation der SB in SBO und die drei SBA-Phänotypen Meningozele, Myelomeningozele und Myeloschisis erarbeitet. Die kongruente und exakte Verwendung dieser Phänotypen in allen beteiligten Fachdisziplinen und insbesondere die Differenzierung des SB-Subtyps mit offener Neuralplatte unter dem Begriff Myeloschisis ist dabei äußerst wichtig. Dies ermöglicht eine Vergleichbarkeit verschiedener Studien sowie detailliertere Erkenntnisse bezüglich der einzelnen SB-Subtypen und sorgt somit für einen enormen Wissensgewinn.

Es ist zu vermuten, dass der Myeloschisis-Phänotyp nicht nur in dieser Kohorte, sondern auch in anderen Studien unterdiagnostiziert ist. Dies ist neben der unklaren Nomenklatur auch dadurch zu erklären, dass sich histologische Myeloschisis-Fälle in dieser Studie mit singulärer SB der unteren Wirbelsäule zeigten und somit Myeloschisis als Diagnose nicht für schwerstbetroffene Einzelfälle vorbehalten ist.

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass im Gegensatz zu SBO der Großteil von SBA-Patient*innen Gehirnefehlbildungen aufwiesen, welche bereits in frühen Schwangerschaftswochen entstanden. Die Verteilung von Hydrozephalus und CM auf die Subtypen war dabei gegensätzlich zu radiologischen Studien, was dafürspricht, dass der histologische Nachweis einer Neuralplatte nicht mit dem Fehlen einer Zele in der Bildgebung gleichzusetzen ist.

Abschließend ist basierend auf der vorliegenden Studie insbesondere die präzise und standardisierte Nomenklatur und deren Verbreitung besonders wichtig. Dies wurde bereits durch die Publikation und Präsentation der Ergebnisse dieser Promotionsarbeit auf verschiedenen Kongressen begonnen. Weitere Forschungsarbeiten können dann unter Verwendung der oben etablierten Klassifikation die folgenden wissenschaftlichen Fragestellungen adressieren:

- 1) Wie stellen sich histologisch diagnostizierte Myeloschisis-Patient*innen radiologisch und klinisch dar? Wie häufig sind Gehirnefehlbildungen bei diesen Fällen?
- 2) Wie ist das Outcome der verschiedenen SB-Subtypen je nach Operationszeitpunkt? Inwieweit können Gehirnefehlbildungen nach intrauteriner Operation verhindert oder abgemildert werden?
- 3) Wie hängen Hydrozephalus, CM und der Verlust des Ependyms bei SB-Patient*innen zusammen?
- 4) Können in der experimentellen Forschung Unterschiede bezüglich betroffener Gene, beteiligter Pathomechanismen und dem Entstehungszeitraum der einzelnen SB-Phänotypen festgestellt werden?

Literaturverzeichnis

1. EUROCAT. European surveillance of congenital anomalies 2022 [Available from: <https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence>].
2. Khoshnood B, Loane M, de Walle H, Arriola L, Addor MC, Barisic I, Beres J, Bianchi F, Dias C, Draper E, Garne E, Gatt M, Haeusler M, Klungsoyr K, Latos-Bielenska A, Lynch C, McDonnell B, Nelen V, Neville AJ, O'Mahony MT, Queisser-Luft A, Rankin J, Rissmann A, Ritvanen A, Rounding C, Sipek A, Tucker D, Verellen-Dumoulin C, Wellesley D, Dolk H. Long term trends in prevalence of neural tube defects in Europe: population based study. *BMJ*. 2015;351:h5949.
3. Adzick NS, Thom EA, Spong CY, Brock JW, 3rd, Burrows PK, Johnson MP, Howell LJ, Farrell JA, Dabrowiak ME, Sutton LN, Gupta N, Tulipan NB, D'Alton ME, Farmer DL, Investigators M. A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *N Engl J Med*. 2011;364(11):993-1004.
4. Weaver KJ, McDowell MM, White MD, Tempel ZJ, Zwagerman NT, Deibert CP, Bonfield CM, Johnson S, Greene S. Comparison of Follow-Up Length-Matched Single-Center Myelomeningocele Postnatal Closure Cohort to the Management of Myelomeningocele Study (MOMS) Trial Results. *Pediatr Neurosurg*. 2021;56(3):229-38.
5. Hagemann C, Krajewski K, Henne T, Stucker R, Kunkel P. Postnatal Repair of Open Neural Tube Defects: A Single Center with 90-Month Interdisciplinary Follow-Up. *J Clin Med*. 2021;10(19).
6. Copp AJ, Stanier P, Greene ND. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions, and controversies. *Lancet Neurol*. 2013;12(8):799-810.
7. Pike M. Disorders of the spinal cord in children. London: Mac Keith Press; 2013. xiv, 250 pages p.
8. Mohd-Zin SW, Marwan AI, Abou Chaar MK, Ahmad-Annuar A, Abdul-Aziz NM. Spina Bifida: Pathogenesis, Mechanisms, and Genes in Mice and Humans. *Scientifica (Cairo)*. 2017;2017:5364827.
9. Golden JA, Harding BN. Developmental neuropathology. Basel, Switzerland: ISN Neuropath Press; 2004. 386 p. p.
10. Copp AJ, Adzick NS, Chitty LS, Fletcher JM, Holmbeck GN, Shaw GM. Spina bifida. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15007.
11. Avagliano L, Massa V, George TM, Qureshy S, Bulfamante GP, Finnell RH. Overview on neural tube defects: From development to physical characteristics. *Birth Defects Res*. 2019;111(19):1455-67.
12. Avagliano L, Parazzini C, Righini A, Bulfamante GP, Massa V. Histopathology of Neural Tube Defects. *Histopathology: SMGroup*; 2016.
13. Emery JL, Lendon RG. The local cord lesion in neurospinal dysraphism (meningomyelocele). *J Pathol*. 1973;110(1):83-96.
14. Nielsen LA, Maroun LL, Broholm H, Laursen H, Graem N. Neural tube defects and associated anomalies in a fetal and perinatal autopsy series. *APMIS*. 2006;114(4):239-46.
15. Talwalker VC, Dastur DK. 'Meningoceles' and 'meningomyeloceles' (ectopic spinal cord). Clinicopathological basis of a new classification. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1970;33(2):251-62.
16. McComb JG. A practical clinical classification of spinal neural tube defects. *Childs Nerv Syst*. 2015;31(10):1641-57.
17. Jeelani Y, McComb JG. Congenital hydrocephalus associated with myeloschisis. *Childs Nerv Syst*. 2011;27(10):1585-8.
18. Schoner K, Axt-Flidner R, Bald R, Fritz B, Kohlhase J, Kohl T, Rehder H. Fetal Pathology of Neural Tube Defects - An Overview of 68 Cases. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2017;77(5):495-507.
19. Schneider J, Mohr N, Aliatakis N, Seidel U, John R, Promnitz G, Spors B, Kaindl AM. Brain malformations and cognitive performance in spina bifida. *Dev Med Child Neurol*. 2020.
20. Hampton LE, Fletcher JM, Cirino PT, Blaser S, Kramer LA, Drake J, Dennis M. Hydrocephalus status in spina bifida: an evaluation of variations in neuropsychological outcomes. *J Neurosurg Pediatr*. 2011;8(3):289-98.
21. McLone DG, Dias MS. The Chiari II malformation: cause and impact. *Childs Nerv Syst*. 2003;19(7-8):540-50.
22. Juranek J, Salman MS. Anomalous development of brain structure and function in spina bifida myelomeningocele. *Dev Disabil Res Rev*. 2010;16(1):23-30.
23. McLone DG, Knepper PA. The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatr Neurosci*. 1989;15(1):1-12.
24. Miller E, Widjaja E, Blaser S, Dennis M, Raybaud C. The old and the new: supratentorial MR findings in Chiari II malformation. *Childs Nerv Syst*. 2008;24(5):563-75.
25. Schindelmann KH, Paschereit F, Steege A, Stoltenburg-Didinger G, Kaindl AM. Systematic Classification of Spina Bifida. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2021;80(4):294-305.

26. Paschereit F, Schindelmann KH, Hummel M, Schneider J, Stoltenburg-Didinger G, Kaindl AM. Cerebral Abnormalities in Spina Bifida: A Neuropathological Study. *Pediatr Dev Pathol.* 2022;25(2):107-23.
27. Poletta FA, Rittler M, Saleme C, Campana H, Gili JA, Pawluk MS, Gimenez LG, Cosentino VR, Castilla EE, Lopez-Camelo JS. Neural tube defects: Sex ratio changes after fortification with folic acid. *PLoS One.* 2018;13(3):e0193127.
28. Essbach H. *Paidopathologie. Kyematopathien, Neogonopathien, Thelamonopathien.* Lehrbuch u. Atlas. Leipzig 1961.
29. Friede RL. *Developmental neuropathology.* 2nd rev. and expanded ed. Berlin ; New York: Springer-Verlag; 1989. xvi, 577 p. p.
30. Cameron AH. The Arnold-Chiari and Other Neuro-Anatomical Malformations Associated with Spina Bifida. *J Pathol Bacteriol.* 1957;73(1):195-&.
31. Gilbert JN, Jones KL, Rorke LB, Chernoff GF, James HE. Central nervous system anomalies associated with meningocele, hydrocephalus, and the Arnold-Chiari malformation: reappraisal of theories regarding the pathogenesis of posterior neural tube closure defects. *Neurosurgery.* 1986;18(5):559-64.
32. Iruetagoiena JI, Trampe B, Shah D. Prenatal diagnosis of Chiari malformation with syringomyelia in the second trimester. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23(2):184-6.
33. Pang D, Zovickian J, Wong ST, Hou YJ, Moes GS. Limited dorsal myeloschisis: a not-so-rare form of primary neurulation defect. *Childs Nerv Syst.* 2013;29(9):1459-84.
34. Nagaraj UD, Bierbrauer KS, Stevenson CB, Peiro JL, Lim FY, Zhang B, Kline-Fath BM. Myelomeningocele Versus Myelocele on Fetal MR Images: Are There Differences in Brain Findings? *AJR Am J Roentgenol.* 2018;211(6):1376-80.
35. Bhandari J, Thada PK. *Neural Tube Disorders.* StatPearls. Treasure Island (FL)2022.
36. Karakoyun DO, Duzenli Y. Factors Affecting the Intensive Care Stay of Patients with Spinal Neural Tube Defects. *Turk Neurosurg.* 2021;31(4):634-40.
37. Wald NJ. Folic acid and neural tube defects: Discovery, debate and the need for policy change. *J Med Screen.* 2022;29(3):138-46.
38. Corroenne R, Sanz Cortes M, Johnson RM, Whitehead WE, Donepudi R, Mehollin-Ray AR, Huisman T, Espinoza J, Nassr AA, Belfort MA, Shamshirsaz AA. Impact of the cystic neural tube defects on fetal motor function in prenatal myelomeningocele repairs: A retrospective cohort study. *Prenat Diagn.* 2021;41(8):965-71.
39. Corroenne R, Yopez M, Pyarali M, Johnson RM, Whitehead WE, Castillo HA, Castillo J, Mehollin-Ray AR, Espinoza J, Shamshirsaz AA, Nassr AA, Belfort MA, Cortes MS. Prenatal predictors of motor function in children with open spina bifida: a retrospective cohort study. *BJOG.* 2021;128(2):384-91.
40. Wilson RD, Johnson MP, Bebbington M, Flake AW, Hedrick HL, Sutton LN, Adzick NS. Does a myelomeningocele sac compared to no sac result in decreased postnatal leg function following maternal fetal surgery for spina bifida aperta? *Fetal Diagn Ther.* 2007;22(5):348-51.
41. Farmer DL, Thom EA, Brock JW, 3rd, Burrows PK, Johnson MP, Howell LJ, Farrell JA, Gupta N, Adzick NS, Management of Myelomeningocele Study I. The Management of Myelomeningocele Study: full cohort 30-month pediatric outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2):256 e1- e13.
42. Chao TT, Dashe JS, Adams RC, Keefover-Hicks A, McIntire DD, Twickler DM. Fetal spine findings on MRI and associated outcomes in children with open neural tube defects. *AJR Am J Roentgenol.* 2011;197(5):W956-61.
43. Rethmann C, Scheer I, Meuli M, Mazzone L, Moehrlen U, Kellenberger CJ. Evolution of posterior fossa and brain morphology after in utero repair of open neural tube defects assessed by MRI. *Eur Radiol.* 2017;27(11):4571-80.
44. Trigo L, Eixarch E, Bottura I, Dalaqua M, Barbosa AA, De Catte L, Demaerel P, Dymarkowski S, Deprest J, Lapa DA, Aertsen M, Gratacos E. Prevalence of supratentorial anomalies assessed by magnetic resonance imaging in fetuses with open spina bifida. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2022;59(6):804-12.
45. Oliver ER, Heuer GG, Thom EA, Burrows PK, Didier RA, DeBari SE, Martin-Saavedra JS, Moldenhauer JS, Jatres J, Howell LJ, Adzick NS, Coleman BG. Myelomeningocele sac associated with worse lower-extremity neurological sequelae: evidence for prenatal neural stretch injury? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2020;55(6):740-6.
46. Heffez DS, Aryanpur J, Hutchins GM, Freeman JM. The paralysis associated with myelomeningocele: clinical and experimental data implicating a preventable spinal cord injury. *Neurosurgery.* 1990;26(6):987-92.
47. Esegolu M, Eroglu A, Kemer S, Arslan M. Determination of the Effect of Diameter of the Sac on Prognosis in 64 Cases Operated for Meningomyelocele. *Korean J Spine.* 2017;14(1):7-10.
48. Nagaraj UD, Bierbrauer KS, Zhang B, Peiro JL, Kline-Fath BM. Hindbrain Herniation in Chiari II Malformation on Fetal and Postnatal MRI. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2017;38(5):1031-6.

49. Chen FC, Gerhardt J, Entezami M, Chaoui R, Henrich W. Detection of Spina Bifida by First Trimester Screening - Results of the Prospective Multicenter Berlin IT-Study. *Ultraschall Med.* 2017;38(2):151-7.
50. Zhu X, Zhao S, Yang X, Feng Q, Zhang X, Yang F, Chen X. First-Trimester Cranial Ultrasound Markers of Open Spina Bifida. *J Ultrasound Med.* 2020.
51. Sirico A, Raffone A, Lanzone A, Saccone G, Travaglino A, Sarno L, Rizzo G, Zullo F, Maruotti GM. First trimester detection of fetal open spina bifida using BS/BSOB ratio. *Arch Gynecol Obstet.* 2020;301(2):333-40.
52. Orlandi E, Rossi C, Perino A, Cucinella G, Orlandi F. Prospective sonographic detection of spina bifida at 11-14 weeks and systematic literature review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(14):2363-7.
53. Jenkinson MD, Campbell S, Hayhurst C, Clark S, Kandasamy J, Lee MK, Flynn A, Murphy P, Mallucci CL. Cognitive and functional outcome in spina bifida-Chiari II malformation. *Childs Nerv Syst.* 2011;27(6):967-74.
54. Bell JE, Gordon A, Maloney AF. The association of hydrocephalus and Arnold--Chiari malformation with spina bifida in the fetus. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1980;6(1):29-39.
55. Amari F, Junkers W, Hartge D, Beyer DA, Axt-Fliehdner R, Weichert J. Prenatal course and outcome in 103 cases of fetal spina bifida: a single center experience. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(10):1276-83.
56. Alexiou GA, Zarifi MK, Georgoulis G, Mpouza E, Prodromou C, Moutafi A, Anagnostakou M, Sfakianos G, Prodromou N. Cerebral abnormalities in infants with myelomeningocele. *Neurol Neurochir Pol.* 2011;45(1):18-23.
57. Wille DA, Padden B, Moehrlen U, Latal B, Schauer S, Kottke R, Grehten P, Meuli M. Impact of Brain Malformations on Neurodevelopmental Outcome in Children with a History of Prenatal Surgery for Open Spina Bifida. *Fetal Diagn Ther.* 2021;48(8):588-95.
58. Crawley JT, Hasan K, Hannay HJ, Dennis M, Jockell C, Fletcher JM. Structure, integrity, and function of the hypoplastic corpus callosum in spina bifida myelomeningocele. *Brain Connect.* 2014;4(8):608-18.
59. Elgamal EA, Elwatidy SM, Alhabib AF, Jamjoom ZB, Murshid WR, Hassan HH, Salih MA. Agenesis of the corpus callosum associated with spinal open neural tube defect. *Saudi Med J.* 2014;35 Suppl 1:S57-63.
60. Hannay HJ, Dennis M, Kramer L, Blaser S, Fletcher JM. Partial agenesis of the corpus callosum in spina bifida meningocele and potential compensatory mechanisms. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2009;31(2):180-94.
61. Fietz SA, Namba T, Kirsten H, Huttner WB, Lachmann R. Signs of Reduced Basal Progenitor Levels and Cortical Neurogenesis in Human Fetuses with Open Spina Bifida at 11-15 Weeks of Gestation. *J Neurosci.* 2020;40(8):1766-77.
62. Adzick NS. Fetal surgery for spina bifida: past, present, future. *Semin Pediatr Surg.* 2013;22(1):10-7.
63. de Wit OA, den Dunnen WF, Sollie KM, Munoz RI, Meiners LC, Brouwer OF, Rodriguez EM, Sival DA. Pathogenesis of cerebral malformations in human fetuses with meningocele. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2008;5:4.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kim Hannah Schindelmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Aktualisierte neuropathologische Klassifikation der Spina bifida und deren Relevanz für Forschung und Klinik - Update on the neuropathological classification of spina bifida and its relevance for science and clinic“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, §161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Kim Hannah Schindelmann hat folgenden Anteil an den jeweiligen Publikationen:

Publikation (25):

Schindelmann KH, Paschereit F, Steege A, Stoltenburg-Didinger G*, Kaindl AM*. Systematic Classification of Spina Bifida. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 2021.

(* gleichberechtigte Senior-Autorenschaft)

(Impact Factor bei Einreichung: 2,923)

In Zusammenarbeit mit Fabienne Paschereit:

- Datenbankabfrage, Identifizierung der einzuschließenden Patient*innen
- Beschaffung der Patientenakten aus dem Archiv der Charité Universitätsmedizin Berlin
- Datenerhebung und -analyse aus Aktenmaterial, Aufbereitung der Daten und Überführung in eine Excel-Tabelle
- Zusammenstellung des histologischen Materials aus dem Archiv der Biobank der Charité Universitätsmedizin Berlin
- Etablierung einer immunhistochemischen Färbung für GFAP und Tubulin
- Sichten und erstes Mikroskopieren des kompletten histologischen Materials (betreut von Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger)
- Digitalisierung des Bildmaterials

Eigener Beitrag:

- Umfassende Literaturrecherche zur geplanten Publikation
- Erstellung der notwendigen histologischen Schnitte des Rückenmarks wie in Kapitel 2.2 beschrieben (H&E, Sirius-Rot und immunhistologische Färbungen)
- Fokussierte mikroskopische Untersuchung der Rückenmarksbefunde der gesamten Kohorte, Befundung und Interpretation der Ergebnisse (betreut von Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger)
- Erarbeitung einer Klassifikation auf Grundlage der histologischen Befunde
- Vergleich der Befunde mit den ehemaligen Befundberichten aus dem Archiv
- Graphische Darstellung der Klassifikation, Gestaltung in Zusammenarbeit mit dem Bereich für Zentrale Mediendienstleistungen der Charité (Abbildung 2)
- Statistische Auswertung
- Eigenständige Erstellung aller in der Publikation vorhandenen Abbildungen und Tabellen mit Ausnahme der Abbildung 2
- Alleinige Erstellung der ersten Manuskriptversion, sowie Korrekturprozess des Manuskripts nach Feedback durch die Koautor*innen
- Eigenständige Einreichung der Publikation inkl. Registrierung, Letter to the Editor sowie Bearbeitung der Publikation im Anschluss an den Peer-Review Prozess

Publikation (26):

Paschereit F, Schindelmann KH, Hummel M, Schneider J, Stoltenburg-Didinger G*, Kaindl AM*. Cerebral Abnormalities in Spina Bifida: A Neuropathological Study. Pediatric and Developmental Pathology. 2022.

(* gleichberechtigte Senior-Autorenschaft)

Impact Factor bei Einreichung: 0,885

Die in der zweiten Publikation ausgewertete Kohorte ist eine Subgruppe der obigen Studie, die im Hinblick auf Gehirnefehlbildungen gezielt ausgewertet wurde. Daher bilden die erste Publikation und die dafür erfolgte Arbeit die Grundlage für diese Veröffentlichung. Die Zusammenstellung des gesamten Datenmaterials, die Etablierung der Färbungen, die Befundung des histologischen Materials sowie die Scans des Bildmaterials sind wie oben beschrieben in Zusammenarbeit mit Fabienne Paschereit entstanden.

Eigener Beitrag:

- Korrekturlesen des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2019 Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: "PATHOLOGY" Selected Category Scheme: WoS
 Gesamtanzahl: 78 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease	5,083	16.750	0.009070
2	ACTA NEUROPATHOLOGICA	21,908	14.251	0.040740
3	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,992	7.500	0.005960
4	Seminars in Immunopathology	3,734	7.480	0.006690
5	MODERN PATHOLOGY	13,799	5.988	0.019760
6	JOURNAL OF PATHOLOGY	16,307	5.979	0.017910
7	BRAIN PATHOLOGY	5,308	5.568	0.007020
8	JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS	4,299	5.553	0.009700
9	CELLULAR ONCOLOGY	1,719	5.304	0.002220
10	AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY	19,940	4.958	0.020820
11	Disease Models & Mechanisms	5,926	4.651	0.013370
12	LABORATORY INVESTIGATION	10,491	4.197	0.008970
13	EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS	3,020	4.096	0.006000
14	ARCHIVES OF PATHOLOGY & LABORATORY MEDICINE	10,104	4.094	0.012880
15	ADVANCES IN ANATOMIC PATHOLOGY	1,502	3.746	0.002260
16	PATHOLOGY	3,086	3.744	0.004860
17	CANCER CYTOPATHOLOGY	2,768	3.703	0.004670
18	HISTOPATHOLOGY	9,864	3.626	0.011930
19	AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY	37,564	3.491	0.021170
20	Journal of Pathology Clinical Research	416	3.489	0.001700

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	ENDOCRINE PATHOLOGY	1,251	3.168	0.001820
22	HLA	834	2.955	0.001180
23	JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY	9,263	2.923	0.007160
24	VIRCHOWS ARCHIV	5,969	2.906	0.007930
25	PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH	2,684	2.826	0.003790
26	DISEASE MARKERS	4,094	2.738	0.006650
27	HUMAN PATHOLOGY	12,999	2.735	0.014080
28	SEMINARS IN DIAGNOSTIC PATHOLOGY	1,300	2.511	0.001670
29	JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY & MEDICINE	4,741	2.495	0.003850
30	JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY	10,624	2.460	0.007370
31	Medical Molecular Morphology	579	2.429	0.000750
32	APMIS	4,031	2.406	0.004370
33	Brain Tumor Pathology	647	2.348	0.001060
34	Diagnostic Pathology	3,042	2.335	0.005070
35	EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY	3,818	2.280	0.004440
36	INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPATHOLOGY AND PHARMACOLOGY	2,211	2.209	0.001900
37	PATHOLOGY INTERNATIONAL	2,895	2.110	0.002520
38	ALZHEIMER DISEASE & ASSOCIATED DISORDERS	3,402	2.098	0.003480
39	AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY	10,839	2.094	0.007080
40	SCIENCE & JUSTICE	1,348	2.075	0.002240
41	CYTOMETRY PART B-CLINICAL CYTOMETRY	1,570	2.070	0.002110

1. Originalpublikation

J Neuropathol Exp Neurol
Vol. 00, No. 00, 2021, pp. 1–12
doi: 10.1093/jnen/nlab007

OXFORD

ORIGINAL ARTICLE

Systematic Classification of Spina Bifida

Kim Hannah Schindelmann, Fabienne Paschereit, Alexandra Steege, MD,
Gisela Stoltenburg-Didinger, MD, PhD, and Angela M. Kaindl, MD, PhD

Abstract

Spina bifida (SB) is an umbrella term for multiple conditions characterized by misclosure of vertebral arches. Neuropathologic findings in SB cases are often reported with imprecise and overlapping terminology. In view of the increasing identification of SB-associated genes and pathomechanisms, the precise description of SB subtypes is highly important. In particular, the term “myelomeningocele” is applied to various and divergent SB subtypes. We reevaluated 90 cases with SB (58 prenatal; 32 postnatal). The most frequent SB phenotype in our cohort was myeloschisis, which is characterized by an open neural plate with exposed ependyma (n = 28; 31.1%). An open neural plate was initially described in only in two-thirds of the myeloschisis cases. An additional 21 cases (23.3%) had myelomeningocele; 2 cases (2.2%) had a meningocele; and 21 cases (23.3%) had an unspecified SB aperta (SBA) subtype. Overall, the SB phenotype was corrected in about one-third of the cases. Our findings highlight that “myelomeningocele” and “SB aperta” cannot be used as synonymous terms and that myeloschisis is an underreported SB phenotype. Based on our findings and a review of literature we propose a classification of SB subtypes in SB occulta and the 3 SBA subtypes, meningocele, myelomeningocele, and myeloschisis.

Key Words: Myelomeningocele, Myeloschisis, Neural tube defects, Spina bifida.

From the Charité – Universitätsmedizin Berlin, Institute of Cellbiology and Neurobiology, Berlin, Germany (KHS, FP, GS-D, AMK); Charité – Universitätsmedizin Berlin, Institute of Pathology, Berlin, Germany (AS); Charité – Universitätsmedizin Berlin, Department of Pediatric Neurology, Berlin, Germany (AMK); and Charité – Universitätsmedizin Berlin, Center for Chronically Sick Children (Sozialpädiatrisches Zentrum, SPZ), Berlin, Germany (AMK).

Send correspondence to: Angela M. Kaindl, MD, PhD, Pediatric Neurology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany; E-mail: angela.kaindl@charite.de

Gisela Stoltenburg-Didinger and Angela M. Kaindl contributed equally to this work.

This research was supported by the German Research Foundation (DFG, SFB1315, FG3004), the Sonnenfeld-Stiftung and Charité – Universitätsmedizin Berlin.

The authors have no duality or conflicts of interest to declare.

[Supplementary Data](#) can be found at academic.oup.com/jnen.

INTRODUCTION

Spina bifida (SB) is the most prevalent form of neural tube defect (NTD) and occurs in 0.5 per 1000 pregnancies in Europe, including live births, pregnancy losses, and terminations (1). The number of affected individuals has not decreased relevantly since the 1990s, despite the general recommendation of periconceptional folate acid supplementation (1, 2). This is likely due to the multifactorial, genetic and nongenetic genesis of SB. In most patients the underlying pathomechanism remains unresolved (3).

SB is characterized by the lack of closure of the vertebral arches. It is possible to differentiate among various forms of SB depending on whether only the spine is affected or whether the meninges and the spinal cord are also affected (3–6). SB occulta (SBO) is defined as a defect covered entirely by skin; the spinal cord and the meninges remain in the spinal canal. Often, this form of SB is discovered due to abnormalities of other tissues, such as lipomas, angiomas, hypertrichosis, or a dermal sinus. These patients are usually asymptomatic at birth, and neurologic symptoms as sequelae of a tethered cord (attachment of the filum terminale in the spinal canal) can occur later (5, 6). In contrast to the closed malformation, the spinal cord is exposed on the surface or lies in a herniating sac visible at birth in individuals with SB aperta (SBA) (6). SBA is associated with neurologic symptoms that vary depending on lesion height and associated malformations. Motor and sensory deficits occur in areas innervated by spinal cord segments at lesion level and distally thereof. Bladder and bowel dysfunction, as well as orthopedic abnormalities, such as clubfeet, contractures, scoliosis, and kyphosis, are common (7).

The nomenclature used in the context of SB phenotypes is inconsistent with relevant terminological ambiguities concerning the explicit spinal cord phenotype. This problem is also reflected in literature on histologic findings in SB where overlapping and/or various terms are used (3, 5, 7–15). This applies particularly to the term myelomeningocele, which is used for all SBA subtypes, even in cases without a cystic component and in those with an open neural plate (3, 7–11). Unclear nomenclature seems to be a problem also identified by other authors (12, 13, 15), but still no consistent classification is generally accepted. Terminological precision is highly important, for both clinicians and basic scientists, particularly in view of emerging intrauterine surgery and next-generation sequencing approaches. Exact phenotypes help to pinpoint the

impacted timespan and putatively involved genes and developmental pathogenetic mechanisms. SB with an open neural plate and a lack of neurulation will presumably occur earlier than SB with a closed neural tube. Here, we introduce a systematic classification and clarify the SB phenotype terminology based on a detailed description of the spinal neuropathological findings of affected cases and a critical review of literature.

MATERIALS AND METHODS

Cohort

We identified 99 cases autopsied in the period 1974–2000 at the Institute of Neuropathology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, through a systematic search for SB ICD-10 codes in the electronic database of the Central Biobank Charité (ZebanC). Of those, 9 cases had to be excluded due to the wrong or uncertain allocation of the ICD-10 code ([Supplementary Data Fig. S1](#)). For the remaining 90 cases, we obtained medical information and autopsy findings from the database (general pathology report was available for 57 cases; neuropathology report was available for all cases) including biometric data, malformations, and the cause of death. The samples were anonymized at the beginning of the study. The study was approved by the local ethics committee (approval no. EA1/076/19).

Histology

Histological specimen of the spinal cord at the lesion level were available for re-evaluation and (if necessary) correction of the diagnosis in 54 of 90 cases. For the other cases, we had no histological material (paraffin tissue blocks or sections) and therefore relied on the neuropathology report. We used paraffin sections from the archive whenever possible. In cases in which these were not readily available, or if the staining had faded, we generated 4–7- μ m-thick sections from paraffin tissue blocks and mounted them on Super Frost Plus slides (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA). Sections were deparaffinized in ROTI-Histol (6640, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) for 15 minutes X3 and in ROTI-Histol/ethanol 100% (1:1) for 5 minutes, then hydrated in an ethanol series (100%, 95%, 70% ethanol, distilled water for twice for 2 minutes each).

For hematoxylin and eosin (H&E) staining, sections were incubated in Harris' hematoxylin (109253, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 7 minutes, rinsed sequentially in distilled water 3 times, once in acid ethanol (0.25% HCl in 70% ethanol) and in tap water for 15 minutes. The counterstaining was performed with 0.2% eosin (2C-140, Waldeck GmbH + Co. KG, Münster, Germany) supplemented with 2 drops of acetic acid per 100 mL for 2 minutes. Sections were dehydrated in an ethanol series (96%, 100%) following one step of ROTI-Histol and then mounted with Entellan new (107960, Merck KGaA).

Sirius Red staining for connective tissue was done for all available cases and obtained through incubation of sections in 0.1% Sirius Red in saturated picric acid (26357-02, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) for 1 hour followed by 2

rinses in 0.5% acetic acid. Sections were dehydrated and mounted as described above.

Images and Statistical Analysis

All histological specimens were documented and scanned using an M8 microscope scanner (PreciPoint GmbH, Freising, Germany). Images of the histological specimen were created with the software ViewPoint (PreciPoint GmbH) and excerpts were generated using Adobe Photoshop (version CS6 [13.0] Adobe, Inc., San Jose, CA). IBM SPSS Statistics 26 (IBM Corp., Armonk, NY) was used for statistical calculations. To evaluate correlations, we used the Chi-square test and considered test results with $p < 0.05$ as statistically significant. GraphPad Prism (version 8.4.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) was used to design the figures.

RESULTS

The study cohort comprised 90 cases with SB with equal sex distribution ([Fig. 1A, B](#)). Of these, 58 cases deceased prenatally due to induced abortion ($n = 43$), maternal complications ($n = 9$), or unknown reasons ($n = 6$). The high number of cases that deceased between gestational week 16 and 25 can be explained through the concomitant timing of induced abortions. More than a third of the liveborn cases (12/32 cases) died within the first postnatal 24 hours. The causes of postnatal death were respiratory ($n = 10$) or cardiac insufficiency ($n = 3$), cardiovascular failure due to increased intracranial pressure or status epilepticus ($n = 3$), meningoencephalitis ($n = 3$), survived induced abortions ($n = 3$; survival 30 minutes, 45 minutes, and 10 hours), postsurgical complications or bleeding ($n = 3$), perinatal bleeding ($n = 1$), renal failure ($n = 1$), and unknown reasons ($n = 5$). Myeloschisis cases survived postnatally for a maximum of 8 hours without surgical intervention, myelomeningocele cases up to 36 years. Detailed information on the cases is given in the [Table](#) and [Supplementary Data Table S1](#).

High Rate of Syndromic SB Cases

There was a high occurrence of syndromic SB cases in the cohort (40 cases; 44.4%). Six of these cases (6.7%) had characteristic malformations that led to the diagnosis of a defined syndrome, including Potter syndrome ($n = 4$), Potter syndrome and caudal regression syndrome ($n = 1$), and Joubert syndrome ($n = 1$). There were no diagnosed chromosomal anomalies in the cohort; however, it is unclear for how many cases a chromosomal analysis was undertaken. Here, the limited accessibility of modern genetic diagnostic techniques at the time of analysis (1974–2000) needs to be considered. Various organ systems were affected in the 40 cases with syndromic SB: Craniofacial dysmorphism (22.2%, $n = 20$), urogenital malformation (15.6%, $n = 14$), gastrointestinal malformation (13.3%, $n = 12$), pulmonary malformation (13.3%, $n = 12$), skeletal anomalies (13.3%, $n = 12$), cardiac malformations (10.0%, $n = 9$), and malformations of the diaphragm (4.4%, $n = 4$). The exact malformations of each case are listed in [Supplementary Data Table S1](#). Additional cranial NTDs were present in 6 SB cases (6.6%) and included encephalo-

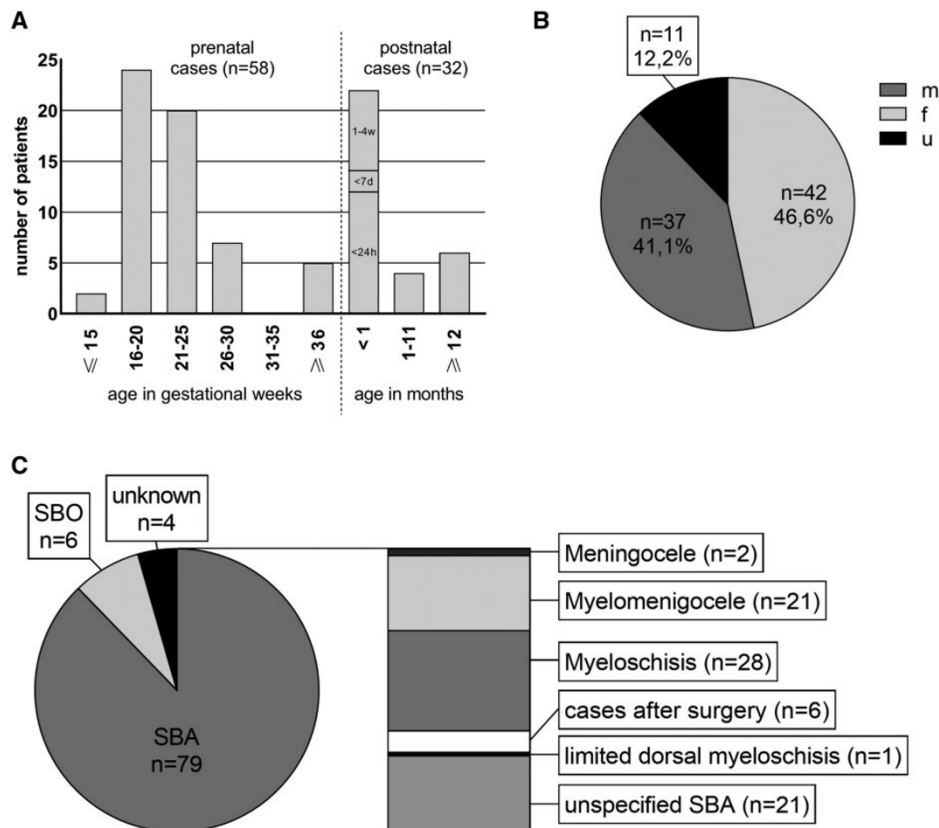


FIGURE 1. Demographic data and type of SB in our cohort. **(A)** Age distribution. For prenatally deceased cases, data on gestational week (gw) 15–40 are shown; for cases with postnatal survival, times of postnatal survival (1 minute–36 years) are shown. **(B)** Sex distribution (m = male, f = female, u = unknown). **(C)** Type of Spina bifida. Spina bifida aperta (SBA) was present in 87.8% of the cases, Spina bifida occulta (SBO) in 7.8% of cases, and the Spina bifida subtype remained unknown in 4.4%. In the bar chart on the right, the subtypes of SBA are further specified: meningocele (2.2%), myelomeningocele (23.3%), myeloschisis (31.1%), cases after surgery (6.7%), limited dorsal myeloschisis (1.1%), and unspecified SBA (23.3%).

celes (n = 4) and anencephalies (n = 2). Most cases in this study are of European descent, some cases have an Arabic ethnic background.

Classification of SB Phenotypes

To delineate the prevalence of SB subtypes within the cohort, we differentiated between SBO and SBA based on the presence or lack of skin coverage (Fig. 2). We identified a central epithelial defect with lateral skin transition zones in all SBA cases (Figs. 2 and 3). We further distinguished between the 3 SBA phenotypes meningocele, myelomeningocele, and myeloschisis based on the position of the spinal cord and its presentation as a closed neural tube or an open embryonic neural plate. A meningocele was defined as when the spinal cord is within the spinal canal and only the dura mater, arachnoid mater, and pia mater herniate through the open vertebrae. For myelomeningocele cases, the cele also contained the spinal cord in addition to the meninges (Fig. 3A, B). It is important to note that the actual cele is often ruptured or not preserved

after histological fixation; therefore, detailed autopsy and macroscopic photo documentation are highly important for the correct diagnosis (Supplementary Data Fig. S2A, B). This is particularly relevant for differentiation between the entities meningocele and myelomeningocele regarding the localization of the spinal cord as in the spinal canal or inside the cele. In contrast to these phenotypes with completed neurulation, the spinal cord was present as an open medullar plate in myeloschisis (Fig. 3C, D). Here, neurulation had not occurred and, hence, the neural tissue was embedded in the skin surface.

Distribution and Localization of SB Phenotypes

SBA was present in most cases (n = 79, 87.8%), followed by SBO (n = 7, 7.8%) and unclear cases due to missing histologic material (n = 4, 4.4%; Fig. 1C). SBA subtypes occurred as follows: Myeloschisis in 28 cases (31.1%), myelomeningocele in 21 cases (23.3%), and meningocele in 2 cases (2.2%). Twenty-one SBA cases (23.3%) could not be classified further and were categorized as unspecified SBA for reasons

TABLE. Characteristics of the Cohort
Spina Bifida and Additional
CNS Malformations

Case	Lesion Level	Born in gw	Postnatal Age	Sex	Cause of Death	Hydrocephalus	Chiari Malformation	Syndromic
1	LS	22	0	w	Induced abortion	+	II	-
2	S	37	6w	m	Postsurgical bleeding	-	-	+
3	LS	17	0	m	Induced abortion	-	-	+
4	LS	16	0	m	u	-	-	+
5	LS	23	0	w	Induced abortion	-	-	-
6	LS	26	0	m	Induced abortion	-	-	-
7	u	u	7h	w	u	+	II	-
8	S	u	20y	m	Cardiac insufficiency	+	-	-
9	TL	37	0	w	Maternal complications	+	-	+
10	LS	21	0	w	Induced abortion	+	-	+
11	LS	20	0	w	Induced abortion	+	II	-
12	LS	20	0	u	Induced abortion	+	-	-
13	L	38	2w	w	Increased intracranial pressure leading to cardiovascular failure	+	II	+
14	LS	40	9w	m	Increased intracranial pressure leading to cardiovascular failure	+	II	+
15	L	22	0	m	Induced abortion	-	-	-
16	L	40	2w	w	Respiratory insufficiency	+	II	+
17	TL + LS	34	8h	m	Respiratory insufficiency	+	-	-
18	LS	u	3w	m	Postsurgical bleeding	-	-	-
19	L	39	0	w	Maternal complications	-	-	+
20	LS	19	0	w	Induced abortion	+	II	-
21	LS	26	0	u	Induced abortion	+	-	-
22	u	u	9y	w	Status epilepticus leading to cardiovascular failure	+	II	-
23	LS	18	0	u	u	-	-	-
24	L	38	4y	w	Postsurgical complications	+	II	+
25	LS	23	0	m	Induced abortion	+	II	+
26	TL	24	45min	m	Induced abortion (survived for 45 minutes)	+	II	-
27	total	17	0	u	u	-	-	-
28	LS	20	0	m	Maternal complications	-	-	+
29	TL	37	5d	w	Cardiac insufficiency	+	II	+
30	LS	23	0	w	Induced abortion	+	-	-

(continued)

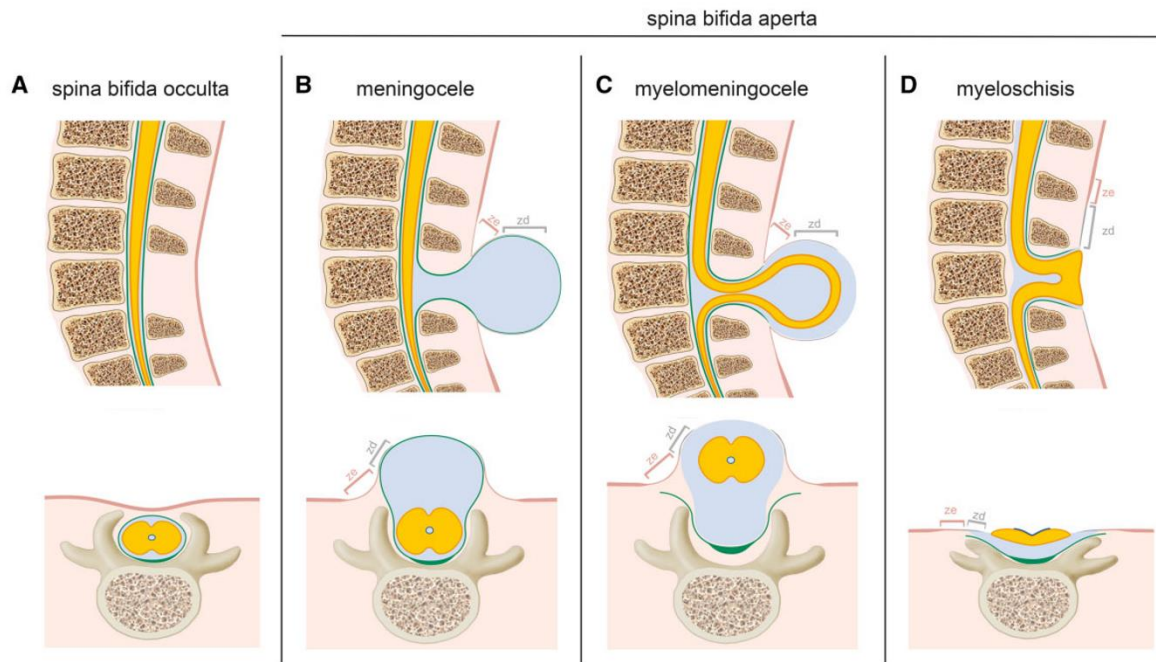


FIGURE 2. Schematic drawing of SB subtypes. **(A)** Spina bifida occulta: longitudinal section on top, transversal section below. **(B)** Myelocele longitudinal section on top, transversal section below. **(C)** Myelomeningocele longitudinal section on top, transversal section below. In the SBA phenotypes **(B–D)**, skin transition zones can be described as follows: below the skin defect, the spinal cord (yellow) can be identified. As the meninges and consequently the subarachnoid space is not closed, cerebrospinal fluid is leaking. Lateral to the lesion, the zona epithelioserosa (ze, gray) follows. This zone contains leptomeninges covered by a thin layer of squamous epithelium and hence forms a mixed tissue of epidermal and mesenchymal cells. In the zona dermatica (zd, pink), there is only a thin horn layer and dermal appendages like hair, sweat, and sebaceous glands (Essbach, 1961); this tissue then passes over to normal skin coverage that can have a thicker keratin layer or hypertrichosis lateral to the lesion. Other tissues are marked with the following colors: dura (green), subarachnoid space (light blue), and ependyma (dark blue). To mark the tissues whenever possible, the same colors are used in the histological images in [Figure 3](#) and macroscopic pictures in [Supplementary Data Figure S2](#).

of missing histological material ($n = 17$) or misleading information ($n = 4$). Six cases (6.7%, see [Supplemental Information](#)) received a neurosurgical intervention, and the limited dorsal myeloschisis present in one case (1.1%) depicts a SBA subtype that will be described later.

We further analyzed the localization of SB within the spine. In 74 of 90 cases (82.2%), the SB affected the lower spine (thoracolumbar to sacral lesion level), while the upper spine (cervical or thoracic lesion level) was affected in only 3 cases (3.3%). Three cases (3.3%) had multiple defects (myeloschisis and SBO, unspecified SBA and SBO, and SBO in 2 different levels), and in one case (1.1%), the whole spine was affected by a myeloschisis. In 9 cases (10.0%), the lesion level remained unknown.

High Incidence of Isolated Myeloschisis in the Lower Spine

To address the association between the presence of particularly severe malformations and myeloschisis, often reported in the literature (3, 4, 8), we studied the extent of myeloschisis cases as well as associated cranial NTDs in these

cases. In our cohort, 22 of the 28 myeloschisis cases (78.6%) showed a SBA of the lower spine only without additional cranial NTD. Anencephaly as a severe form of cranial NTD was only present in one case with cervical myeloschisis.

Errors in SB Phenotype Nomenclature

To investigate the extent of an imprecise nomenclature of SB phenotypes, we compared the initial diagnosis of each case according to the neuropathological report with our diagnosis based on the definitions stated above. Indeed, the initial diagnosis had to be changed or specified in about a third of all cases ($n = 31$, 34.3%, [Supplementary Data Fig. S3A](#)). Most frequently, we clarified the use of the terms “rachischisis” and “myeloschisis.” The term, “rachischisis” is used by general pathologists to describe the autopsy finding of an open back in general but it is also used in neuropathological reports with a vague definition for a large SB (4), or synonymously with our definition of myeloschisis (16). Of all 27 cases with the initial unspecific diagnosis of rachischisis, we only found an open neural plate in 18 cases (66.7%), indicating that the terms rachischisis and myeloschisis are not interchangeable. Of 28

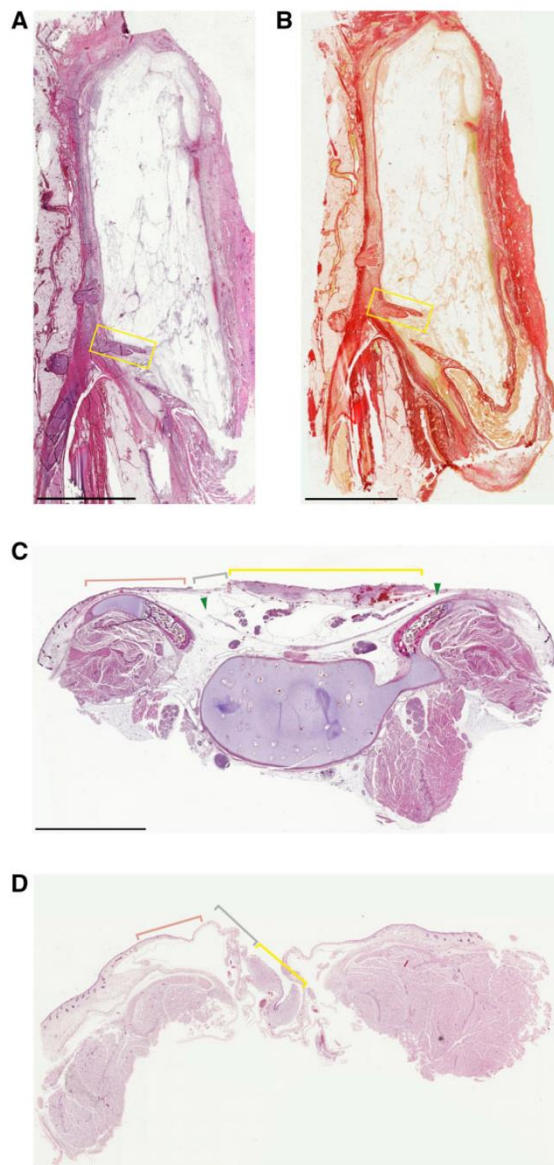


FIGURE 3. Histology of myelomeningocele and myeloschisis. **(A)** Longitudinal section of a 9-week old case with lumbosacral myelomeningocele (H&E, 10 mm). **(B)** Same section as in Figure 3A with staining for connective tissue (Sirius red, 10 mm). **(C)** Transversal section of a thoracolumbar myeloschisis case (gw 24) in the typical open-book configuration. The vertebral arch is bending in the opposite direction and nerve roots are elongated (H&E, 5 mm). **(D)** Transversal section of a lumbar myeloschisis case (gw 20) with the spinal cord opened in V-shape (H&E, 2 mm). Colors are the same as in Figure 2: spinal cord (yellow), Zona epithelioserosa (gray), Zona dermatica (pink), and dura (green).

myeloschisis cases, the neural plate was initially only described in 18 cases (64.3%, [Supplementary Data Fig. S3B](#)). Even though this should be a main issue when analyzing the spinal cord of SB cases histologically, in the remaining 10 cases (35.7%) the striking finding of a neural plate was not identified in the original histological report. Thus, myeloschisis is an underreported diagnosis in our cohort, given that this phenotype is often subsumed under other terms and due to a lack of attention for this finding in the neuropathological examination.

Rachischisis and other terms mentioned above are less frequently used in current literature but failure to distinguish between myelomeningocele and myeloschisis is common; this was the most frequent source of error in up-to-date histological SB descriptions (3, 5, 7–10). Nevertheless, these 2 phenotypes can be clearly distinguished under the microscope. In myelomeningocele cases, the longitudinal section shows an eponymous herniating sac that consists of a cerebrospinal fluid-filled space and contains parts of the spinal cord (Figs. 2 and 3A, B). The characteristic feature of myeloschisis is the open neural plate with ependyma forming the outer layer as a result of missing neurulation (Figs. 2 and 3C, D). The neural plate contains normal configured neurons, but sometimes it is malformed and hemorrhagic (Fig. 3C). In cases where the bony spine is also histologically preserved the nerve roots are elongated and the vertebral arch is wide open or even bends in the wrong direction (Fig. 3C). Also, the dura is broadly opened and laterally passes over into the skin. In some cases, the neural plate was not flattened entirely but rather open in a “v” shape (Fig. 3D). It is important to note that the neural plate can also be protruded due to the pressure of the cerebrospinal fluid, and then macroscopically may be misinterpreted as a cele.

Additional Errors in Naming an SBA Phenotype Due to Transition Forms and the Parallel Occurrence of Various SBA Types

Besides the classification errors in naming the SBA phenotype delineated above, errors in naming the correct SBA phenotype can also occur due to the presence of SBA phenotype transition forms or the occurrence of different SBA subtypes in an individual. The latter can occur at various spinal levels or directly next to each other. For example, [Supplementary Data Figure S4A](#) shows the myeloschisis phenotype (also pictured in Fig. 3C), whereas the next spinal level ([Supplementary Data Fig. S4B](#)) shows a closed spinal cord. If only the latter specimen had been sectioned and analyzed, this case would be incorrectly diagnosed. Therefore, it is important to sample histological material from the correct level and always classify the SB according to the most severe phenotype.

In our cohort, we also identified cases that could not be classified easily. In one myelomeningocele case, the actual cele was formed by thickened skin and connective tissue ([Supplementary Data Fig. S4C](#)). Here the dura was open in a v shape, nevertheless, the spinal cord was closed. This probably represents a mixed form of myelomeningocele and myeloschi-

sis. It also shows that potentially the neural tube and the meninges can perform neurulation independently. The entire tissue showed pronounced signs of inflammation, and this patient died of meningoencephalitis. Consequently, it is also possible that this region was secondarily malformed due to an inflammatory process.

Also, some special types of myeloschisis occurred in the study cohort. Two cases showed a spinal cord embedded into the skin or lining on top; however, in these cases, the central canal was closed (Supplementary Data Fig. S4D). Other levels of these cases showed the typical myeloschisis phenotype; therefore, myeloschisis with a closed central canal may form a transitional phenotype converting into the normal spinal cord cranial or caudal to the lesion. Two other myeloschisis cases had a duplicated spinal cord, whereby one spinal cord had completed neurulation and the other one was missing the neural tube closure but rather showed the typical myeloschisis phenotype with an ependymal lining on the surface (Supplementary Data Fig. S4E). We classified these cases as myeloschisis, as we considered the most severe phenotype. One case was constituted as limited dorsal myeloschisis (Supplementary Data Fig. S4F). This SBA subtype has a characteristic stalk with dysplastic glial tissue connecting the cerebrospinal fluid space to the skin lesion (17).

Misuse of the Term Area Medullovasculosa for Neural Plate or Spinal Cord in Myelomeningocele

We further addressed the histological findings of area medullovasculosa and compared them with findings in the literature. The term area “medullovasculosa” is analogous to the term “area cerebrovasculosa” to depict the cranial protrusion of disorganized neuroepithelial tissue in anencephaly (4). In both, the histological findings of malformed neural tissue with ganglion and glial cells are interspersed with abundant pathological vessels. Because they are capillaries, they are thin-walled and their sinusoid structure rarely shows signs of bleeding (Detail in Supplementary Data Fig. S5A) (4). Sometimes the area medullovasculosa is described as the “cele surface of myelomeningocele” cases (4); in contrast, other authors use this term equivalent to the medullary plate of myeloschisis cases (16). In our cohort, the neural plate could be clearly delineated from the area medullovasculosa in the histological specimen since the neural plate showed a solely neural tissue and no severe malformation. The ependymal lining as the characteristic feature of the neural plate was present in all myeloschisis cases. The area medullovasculosa (Supplementary Data Fig. S5A, B) was found next to the particular SB level and therefore is a histological finding that is not characteristic for a particular SBA subtype and should not be mistaken for a neural plate.

Reporting of Further Spinal Malformations Cranial and Caudal to the Lesion Level

The occurrence of additional malformations of the spinal cord in other segments, which is not relevant for the SB

classification, was evaluated in 56 cases. This may be relevant for surgical management and therefore for the outcome in those patients. In 19 cases (33.9%), multiple central canals were present (Supplementary Data Fig. S6A), and hydromyelia occurred in 21 cases (37.5%, Supplementary Data Fig. S6B, C). Apart from these enlargements of the inner cerebrospinal fluid space, the outer space could also be extended, leading to a detachment of the meninges from the spinal cord (Supplementary Data Fig. S6B). Syringomyelia (Supplementary Data Fig. S6C, D) was present in 6 cases (10.7%), and in 2 of them, the cyst of the spinal cord was already present at gestational week 19. Duplication of parts of the spinal cord was present in 9 cases (16.1%).

Excess Formation of the Ependyma and Disturbed Embryonal Differentiation as Potentially Additional Mechanisms of SB

Apart from the multiplication of the central canal, 6 cases (6.7%) showed additional ependymal bands in the outer cerebrospinal fluid space. It was striking that the central canal was branched and elongated rather than circularly enlarged in some cases with hydromyelia (Supplementary Data Fig. S6E, F). In one case, the ependyma was stratified and appeared in clusters, possibly as a sign of regeneration (Supplementary Data Fig. S6E). The myeloschisis cases also had more ependyma covering the open neural plate than would be necessary to form the central canal.

Not only the neural tissue of SB cases was suspicious. Twelve SBA cases showed hypertrichosis laterally to the lesion (13.3%), a feature that is reported to characteristically cover SBO in the affected levels. Apart from this abnormality of the ectoderm, the mesoderm was also affected. The skin coverage sometimes lay directly above the vertebral body. In the latter cases, there was no dural sac (Supplementary Data Fig. S6G). Limited dorsal myeloschisis in one case presented another type of incomplete segregation of different tissues. Here, there was no separation of the neural crest and the surface ectoderm, and a fibroneural stalk connected the neural tube with the skin (Pang et al., 2013).

DISCUSSION

Here, we report on the histological phenotype of a cohort of 90 SB cases and highlight the precise distinctions among SB subtypes. We propose a classification of SB phenotypes into SBO and the 3 SBA subtypes meningocele, myelomeningocele, and myeloschisis.

This study is the first to identify myeloschisis as a widespread rather than a rare finding in SB patients (6, 9, 10, 13). Myeloschisis (31.1%) occurred more frequently than myelomeningocele (23.3%) in our cohort. This underlines that SBA cannot be used as a synonymous term with myelomeningocele as usually done in the literature (3, 5, 7–11). Because a high percentage of cases in our study deceased prenatally, we compared the rates for myeloschisis and myelomeningocele to prenatal radiological and intrauterine surgery studies of affected fetuses. In the literature, the rate for myelomeningocele is 67%–96% (18–22) versus 43% in our cohort and that of myelo-

schisis (often called myelocele) is 4%–33% (18–22) versus 57% in our study. Thus, the distribution varies widely among different studies, which could result from classification discrepancies, true differences in SBA subtype incidence and/or differences in diagnostic depth. The proportion of myeloschisis cases in our study is higher than that usually reported, possibly due to a more detailed neuropathologic examination, which is the essential for identifying the presence of a neural plate in myeloschisis cases. In contrast, radiological techniques mainly focus on the presence or absence of a cele, the latter indicating myeloschisis.

The imprecise nomenclature of SB phenotypes appears to be a universal problem, not only in our cohort where the diagnosis had to be corrected in a third of all cases, but also when applying our classification to further cases presented in the literature (3, 5, 7–15). Particularly, the term myeloschisis is often considered as a subform of the myelomeningocele phenotype (7, 9–11, 23). This is problematic, as in these 2 SB subtypes—one with a closed spinal cord and one with a neural plate—the timepoint of affected mechanisms in embryology differs. In about one-third of the myeloschisis cases in our cohort, the neural plate was not diagnosed before, and in the other two-thirds an identified neural plate was misnamed or summarized into other phenotypes. These 2 factors—more importantly the terminological imprecision—lead to the fact that myeloschisis is rarely described and probably underreported in other patients' collectives. Also, we recommend using the term myeloschisis rather than rachischisis. The term myeloschisis clearly indicates that the spinal cord (“myelon”) is affected by the cleft (“schisis”). It also avoids misunderstanding seen with the term rachischisis, which is used frequently as an umbrella term for open back malformations. Furthermore, Friede and coworkers (4) suggested that “SB,” in contrast to “rachischisis,” should be used for more localized defects. However, as the lesion level of more than three-fourths of myeloschisis cases in our cohort was limited to a few segments in the SB, typically the lower spine, this distinction regarding the size of the defect seems obsolete. Furthermore, the term myelocele for myeloschisis, (which is widely used in prenatal diagnostics), should be avoided because there characteristically is no “cele.” Particularly in times of intrauterine SB surgery and next-generation sequencing techniques, a precise naming for a SB phenotype with a neural plate is important to explicitly describe the surgery region and/or the phenotype associated with a particular genotype.

The distinction between myeloschisis and myelomeningocele can have a clinical impact but most studies do not differentiate between these 2 subtypes (18). However, some studies bring up important aspects that highlight the differences between myeloschisis and myelomeningocele regarding neurosurgical aspects, radiological findings, and clinical implications.

Myeloschisis without surgical repair was a lethal condition in our cohort and therefore we underline the importance of this phenotype in prenatal diagnostics and consequently intrauterine surgery. In cases of myeloschisis, closing the tissue above the defect is reported to be difficult, a situation that in most cases requires a graft (24). Only one study focusing on in utero repair of open NTDs differentiated between myelome-

ningocele and myeloschisis revealed a difference in the occurrence of Chiari II malformation, that is, a malformation of the posterior fossa leading to hindbrain herniation (22). Myeloschisis cases preoperatively had a more severe hindbrain herniation and smaller supratentorial cerebrospinal fluid space (22). Hindbrain herniation resolved in 96% of all patients (SBA subtype not stated) in neonatal follow-up MRIs (22). Other fetal MRI studies also showed higher incidence and higher severity of Chiari II malformation for myeloschisis cases (18, 19). They further highlighted that myelomeningocele sac size inversely correlated with hindbrain herniation, suggesting a protective function of large myelomeningoceles against hindbrain herniation (18, 19). Because one main goal of prenatal surgery is to decrease the size of hindbrain herniation, (as well as cases with high-grade Chiari II malformation) (25), it seems that prenatal repair in myeloschisis cases may have a greater benefit.

In addition to these considerations regarding surgical management of SBA cases, the described differences in the posterior fossa for myeloschisis and myelomeningocele may also have an impact on diagnostics. The early prenatal ultrasound-based diagnosis of SBA in the first trimester is focused on the examination of the posterior fossa possibly leading to hindbrain herniation in SBA patients and not on the actual spinal defect which in most cases cannot be examined in very early weeks of pregnancy (26–29). Therefore, a possibly stronger hindbrain herniation in myeloschisis cases—as indicated by studies described before—may also be important for prenatal counseling.

Clinical data show that SBA cases without a covering membrane or a sac (indicating myeloschisis regarding our classification) have a higher incidence of high-risk bladder dysfunction and scoliosis, as well as a positive correlation with independent ambulation after prenatal surgery (30, 31). Another important aspect concerning the clinical outcome of SB patients is the presence and severity of cerebral malformations. There is only one known study on brain malformations distinguishing between myelomeningocele and myeloschisis. In the small cohort of this study, no significant difference between both entities was investigated (32). As studies demonstrated that the occurrence of brain malformations has a high impact on the cognitive performance of SB patients (33–36), further studies distinguishing between SBA subtypes need to assess this important issue. All in all, precise classification and further distinction between myelomeningocele and myeloschisis, for example, in intrauterine surgery, radiological, and clinical studies of affected patients are needed.

The histological examination of SB cases additionally showed that the identification of an area medullovasculosa should not lead to the diagnosis of myeloschisis. This phenotype can only be diagnosed if the spinal cord is present in an open book formation and covered with ependymal lining. In our cases, the neural plate was—in contrast to other histological descriptions (4, 16)—not seriously malformed or rudimentary and consisted of normally configured neurons. Therefore, from our perspective, area medullovasculosa and neural plate depict different histological findings.

SB patients often showed additional spinal cord abnormalities. The prevalence of hydromyelia was lower than in

other studies (38% vs 68%–77%) (37, 38) but comparable to the findings of Emery and Lendon (29%) (11). The prevalence of multiple central canals reported in this study (34%) is in line with previous reports (27% duplication, 15% >2 central canals) (11). The distribution of SB cases with syringomyelia varies widely between studies (4%–36%) (11, 37, 38), but our study is the first to describe syringomyelia in early fetal development in gestational week 19. We found a lower rate of duplications of the spinal cord (16%) than that previously reported (25%–52%) (11, 37, 38), which could result from differences in sampling levels in the autopsy and the sampling of only the level of the lesion. Thus, we also could not specify the malformations as either diplomyelia (additional accessory spinal cord) or diastematomyelia (forking of the spinal cord usually with a bony spur) (39).

Excess formation of ependyma, whether as a large ependymal layer in myeloschisis cases, a more elongated and branched than a circularly extended central canal in cases with hydromyelia or additional ependymal bands was striking in our cohort. Therefore, we suppose that ependyma possibly plays a role in the pathomechanism of SB. Also, disturbed differentiation of mesodermal tissue may interact in the embryogenesis of SB. This hypothesis is underlined by common neuromesodermal progenitor cells (40), the association of lipomas with SB (8), and abnormalities of the dura or the SB phenotype limited dorsal myeloschisis in this study. Apparently, neurulation is not an isolated process of the neural tube.

Syndromic SB was present in 44% of the evaluated cases, that is, more frequently than in comparable studies (9%–35%) (14, 23, 41–47). In most cases, we could not identify a definite syndrome as other authors did for a high percentage of syndromic cases (23, 41–43); however, the most frequently affected organ systems are consistent with other cohorts (14, 42–46). This probably results from a lack of genetic diagnostics at the time that our cases were autopsied.

A general limitation of this study is the incomplete histology and the unsystematic selection of histological specimens. In addition, monocentric study design that does not include harmonic ethnic group distribution. Moreover, current recommendations for folic acid supplementation may influence the incidence of SB phenotypes. The characteristics of liveborn cases are also highly affected by improved and earlier intrauterine diagnostics.

In conclusion, we suggest a SB classification that includes SBO and the 3 SBA subtypes, that is, meningocele, myelomeningocele, and myeloschisis, based on histological findings. This classification can also be applied to radiological imaging assessments and its consistent use will improve the interdisciplinary work of all specialties dealing with affected individuals. In addition, the dramatic changes in next-generation sequencing techniques will continue to identify genetic NTD entities and will likely open a new classification system. We are convinced that the combination of precise, standardized, and detailed neuropathological description of SB subtypes with systematic genetic work-up will improve the identification of specific phenotypes. This is an important step in improving subtype-specific therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGMENTS

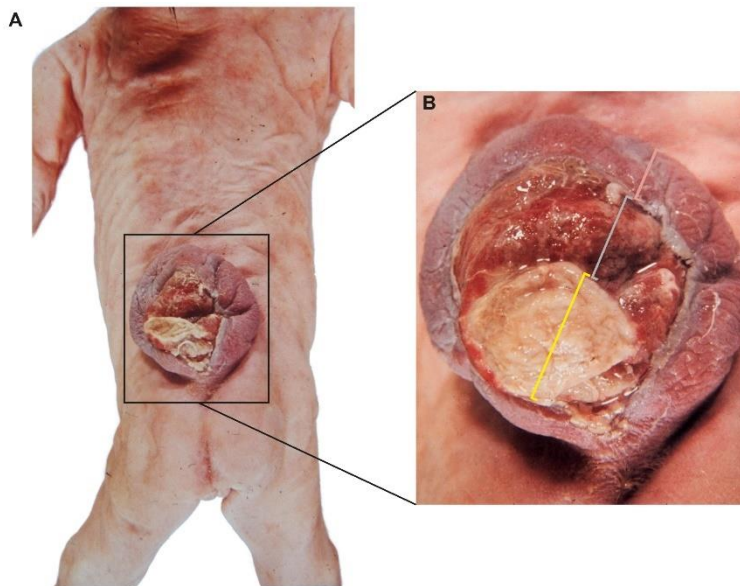
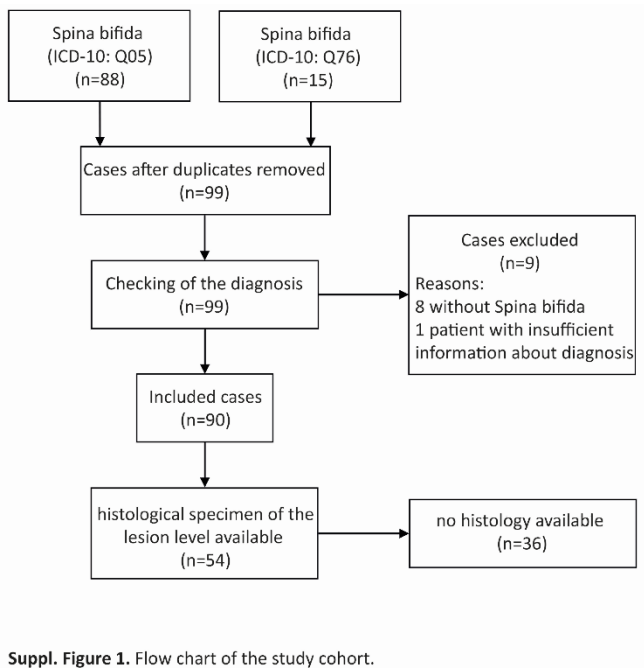
We thank Prof. Hummel for his support in the project execution. We also thank Dr. Volker Meske for technical assistance regarding the scanning and Ms. Corinna Naujok for her help with Figure 2.

REFERENCES

1. European surveillance of congenital anomalies. <https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence>. Accessed October 20, 2019.
2. Khoshnood B, Loane M, de Walle H, et al. Long term trends in prevalence of neural tube defects in Europe: Population based study. *BMJ* 2015;351:h5949
3. Copp AJ, Stanier P, Greene ND. Neural tube defects: Recent advances, unsolved questions, and controversies. *Lancet Neurol* 2013;12:799–810
4. Friede RL. *Developmental neuropathology*. 2nd rev. and expanded ed. Berlin, New York: Springer-Verlag 1989.
5. Pike M. *Disorders of the Spinal Cord in Children*. London: Mac Keith Press 2013.
6. Mohd-Zin SW, Marwan AI, Abou Chaar MK, et al. Spina bifida: Pathogenesis, mechanisms, and genes in mice and humans. *Scientifica (Cairo)* 2017;2017:1–29
7. Golden JA, Harding BN. *Developmental neuropathology*. Basel, Switzerland: ISN Neuropath Press 2004.
8. Copp AJ, Adzick NS, Chitty LS, et al. Spina bifida. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15007
9. Avagliano L, Parazzini C, Righini A, et al. Histopathology of Neural Tube Defects. In: *Histopathology*. Italy: SMGroup 2016.
10. Avagliano L, Massa V, George TM, et al. Overview on neural tube defects: From development to physical characteristics. *Birth Defects Res* 2019;111:1455–67
11. Emery JL, Lendon RG. The local cord lesion in neurospinal dysraphism (meningomyelocele). *J Pathol* 1973;110:83–96
12. Talwalker VC, Dastur DK. ‘Meningocele’ and ‘meningomyelocele’ (ectopic spinal cord). Clinicopathological basis of a new classification. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1970;33:251–62
13. McComb JG. A practical clinical classification of spinal neural tube defects. *Childs Nerv Syst* 2015;31:1641–57
14. Nielsen LA, Maroun LL, Broholm H, et al. Neural tube defects and associated anomalies in a fetal and perinatal autopsy series. *APMIS* 2006; 114:239–46
15. Jeelani Y, McComb JG. Congenital hydrocephalus associated with myeloschisis. *Childs Nerv Syst* 2011;27:1585–8
16. Essbach H. *Paidopathologie. Kyematopathien, Neogonopathien, Thelamonopathien*. Lehrbuch u. Atlas. Leipzig, 1961.
17. Pang D, Zovickian J, Wong ST, et al. Limited dorsal myeloschisis: A not-so-rare form of primary neurulation defect. *Childs Nerv Syst* 2013; 29:1459–84
18. Nagaraj UD, Bierbrauer KS, Stevenson CB, et al. Myelomeningocele versus myelocele on fetal MR images: Are there differences in brain findings? *Am J Roentgenol* 2018;211:1376–80
19. Oliver ER, Heuer GG, Thom EA, et al. Myelomeningocele sac associated with worse lower-extremity neurological sequelae: Evidence for prenatal neural stretch injury? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2020;55: 740–6
20. Ghi T, Pilu G, Falco P, et al. Prenatal diagnosis of open and closed spina bifida. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006;28:899–903
21. D’Addario V, Rossi AC, Pinto V, et al. Comparison of six sonographic signs in the prenatal diagnosis of spina bifida. *J Perinat Med* 2008;36: 330–4.
22. Reithmann C, Scheer I, Meuli M, et al. Evolution of posterior fossa and brain morphology after in utero repair of open neural tube defects assessed by MRI. *Eur Radiol* 2017;27:4571–80
23. Schoner K, Axt-Flidner R, Bald R, et al. Fetal pathology of neural tube defects—An overview of 68 cases. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2017;77: 495–507
24. Heuer GG, Adzick NS, Sutton LN. Fetal myelomeningocele closure: Technical considerations. *Fetal Diagn Ther* 2015;37:166–71

25. Nagaraj UD, Bierbrauer KS, Zhang B, et al. Hindbrain herniation in Chiari II malformation on fetal and postnatal MRI. *Am J Neuroradiol* 2017;38:1031–6
26. Chen FC, Gerhardt J, Entezami M, et al. Detection of spina bifida by first trimester screening—Results of the prospective multicenter Berlin IT-study. *Ultraschall Med* 2017;38:151–7
27. Zhu X, Zhao S, Yang X, et al. First-trimester cranial ultrasound markers of open spina bifida. *J Ultrasound Med* 2020; [Epub ahead of print]
28. Sirico A, Raffone A, Lanzone A, et al. First trimester detection of fetal open spina bifida using BS/BSOB ratio. *Arch Gynecol Obstet* 2020;301:333–40
29. Orlandi E, Rossi C, Perino A, et al. Prospective sonographic detection of spina bifida at 11–14 weeks and systematic literature review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29:2363–7
30. Farmer DL, Thom EA, Brock JW 3rd, et al. The management of myelomeningocele study: Full cohort 30-month pediatric outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2018;218:256.e251–256.e213.
31. Chao TT, Dashe JS, Adams RC, et al. Fetal spine findings on MRI and associated outcomes in children with open neural tube defects. *Am J Roentgenol* 2011;197:W956–61
32. Kawamura T, Morioka T, Nishio S, et al. Cerebral abnormalities in lumbosacral neural tube closure defect: MR imaging evaluation. *Childs Nerv Syst* 2001;17:405–10
33. Schneider J, Mohr N, Aliatakis N, et al. Brain malformations and cognitive performance in spina bifida. *Dev Med Child Neurol* 2020; [Epub ahead of print]
34. Hampton LE, Fletcher JM, Cirino PT, et al. Hydrocephalus status in spina bifida: An evaluation of variations in neuropsychological outcomes. *J Neurosurg Pediatr* 2011;8:289–98
35. Vinck A, Nijhuis-van der Sanden MW, Roeleveld NJ, et al. Motor profile and cognitive functioning in children with spina bifida. *Eur J Paediatr Neurol* 2010;14:86–92
36. Jenkinson MD, Campbell S, Hayhurst C, et al. Cognitive and functional outcome in spina bifida-Chiari II malformation. *Childs Nerv Syst* 2011;27:967–74
37. Cameron AH. The Arnold-Chiari and other neuro-anatomical malformations associated with spina bifida. *J Pathol Bacteriol* 1957;73:195–211
38. Gilbert JN, Jones KL, Rorke LB, et al. Central nervous system anomalies associated with meningomyelocele, hydrocephalus, and the Arnold-Chiari malformation: Reappraisal of theories regarding the pathogenesis of posterior neural tube closure defects. *Neurosurgery* 1986;18:559–64
39. Hori A. Dimyelia, disastematomyelia, and diplomyelia. *Clin Neuropathol* 1988;7:314
40. Henrique D, Abranches E, Verrier L, et al. Neuromesodermal progenitors and the making of the spinal cord. *Development* 2015;142:2864–75
41. Ceylaner S, Ceylaner G, Guneyli I, et al. Postmortem evaluation of 220 prenatally diagnosed fetuses with neural tube defects: Detection of associated anomalies in a Turkish population. *Prenat Diagn* 2006;26:147–53
42. Stevenson RE, Seaver LH, Collins JS, et al. Neural tube defects and associated anomalies in South Carolina. *Birth Defect Res A* 2004;70:554–8
43. Bupp CP, Sarasua SM, Dean JH, et al. When folic acid fails: Insights from 20 years of neural tube defect surveillance in South Carolina. *Am J Med Genet A* 2015;167:2244–50
44. Kallen B, Robert E, Harris J. Associated malformations in infants and fetuses with upper or lower neural tube defects. *Teratology* 1998;57:56–63
45. Amari F, Junkers W, Hartge D, et al. Prenatal course and outcome in 103 cases of fetal spina bifida: A single center experience. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010;89:1276–83
46. Toru HS, Sanhal CY, Uzun OC, et al. Associated anomalies with neural tube defects in fetal autopsies. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29:798–802
47. Ekin A, Gezer C, Taner CE, et al. Chromosomal and structural anomalies in fetuses with open neural tube defects. *J Obstet Gynaecol* 2014;34:156–9

Abbildungen aus dem Anhang:

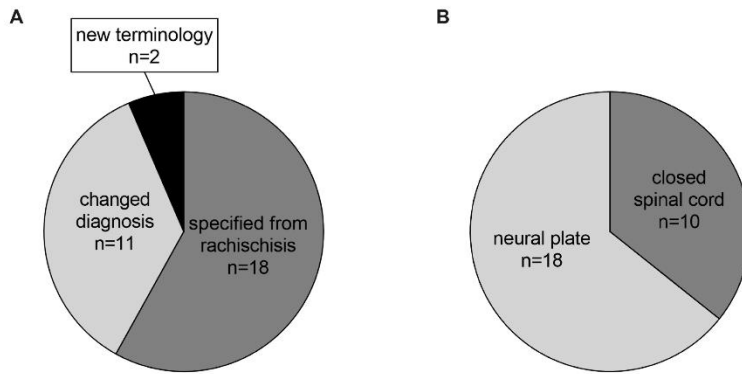


Suppl. Figure 2. Macroscopic images of myelomeningocele.

A: overview of a lumbosacral myelomeningocele in a 4-week-old-patient with central skin defect.

B: detail image of the same case with brackets to mark the different types of tissues.

Colors as in Figure 2 (spinal cord (yellow), Zona epithelioserosa (grey), Zona dermatica (pink).



Suppl. Figure 3. Errors in SB phenotype nomenclature and initial findings in myeloschisis cases.

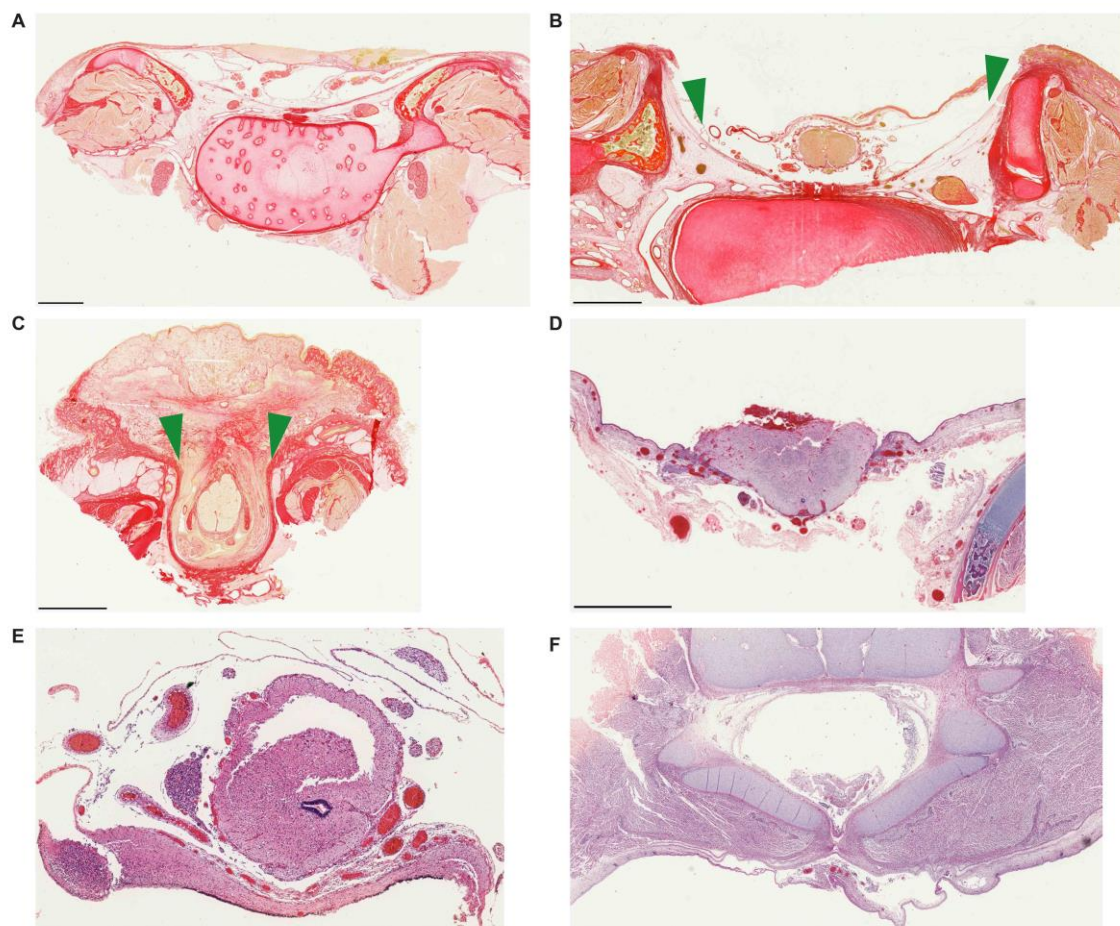
A: Adapted diagnosis in 31/90 cases (34.4%). Specification of the term rachischisis to myeloschisis in 18 cases (20.0%), thereof 14 with a described neural plate and 4 with normal spinal cord. Completely changed diagnosis in 11 cases (12.2%), thereof from myelomeningocele to myeloschisis in 5 cases, from spina bifida to myeloschisis in 2 cases (1 with described normal spinal cord, one with neural plate), from meningocele to myeloschisis (n=1) or to myelomeningocele (n=1), from myelomeningocele (n=1) or from SBO (n=1) to unspecified SBA.

New terminology for myelomeningoschisis (n=1) and myelocele (n=1), both changed to myeloschisis.

B: Initial description of the spinal cord of myeloschisis cases.

Description of a neural plate in 18 of 28 myeloschisis cases (64.3%, rachischisis n=14, spina bifida n=1, myelocele n=1, myelomeningocele n=1, myelomeningoschisis n=1).

In the 10 other myeloschisis cases the spinal cord is described to be normal (37.5%, diagnosis myelomeningocele (n=4), rachischisis (n=4), spina bifida (n=1), meningocele (n=1)).



Suppl. Figure 4. Transition of phenotypes and special types of myelomeningocele and myeloschisis.

A: Myeloschisis as shown in Figure 3C with staining for connective tissue (Sirius red, 2 mm).

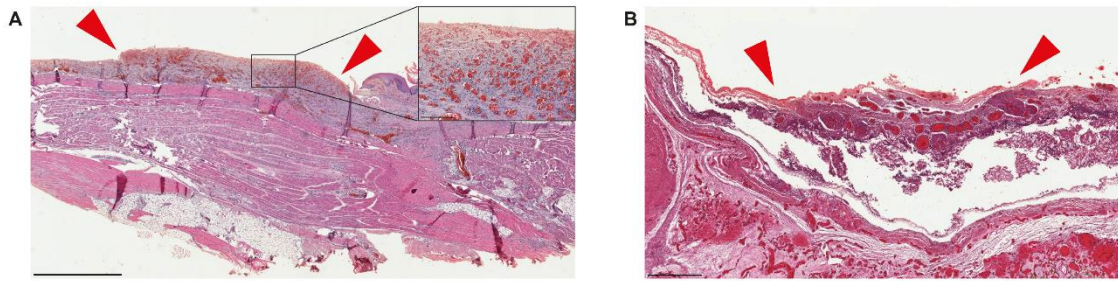
B: The next level of the case shown in Figure 3C and Suppl. Figure 4D shows a closed spinal cord with open dura (green arrows, Sirius red, 2 mm). This underlines the transition of phenotypes within a short distance and the importance of taking histological specimen out of the lesion level.

C: myelomeningocele with closed spinal cord and open dura (green arrows) as a mixed form of myelomeningocele and myeloschisis. The cele consists of thickened skin and connective tissue, probably due to inflammatory processes. (5w, Sirius Red, 5 mm)

D: myeloschisis with closed central canal as a transitional phenotype. The neural tissue is lying on top of the skin (gw 19, H&E, 2 mm).

E: myeloschisis in combination with duplication of the spinal cord resulting in one closed and one open spinal cord (gw 15, H&E, 500 μ m).

F: limited dorsal myeloschisis as a special form of SBA with a stalk consisting of dysplastic glial tissue protruding through the open vertebral arch (gw 17, H&E, 2 mm).

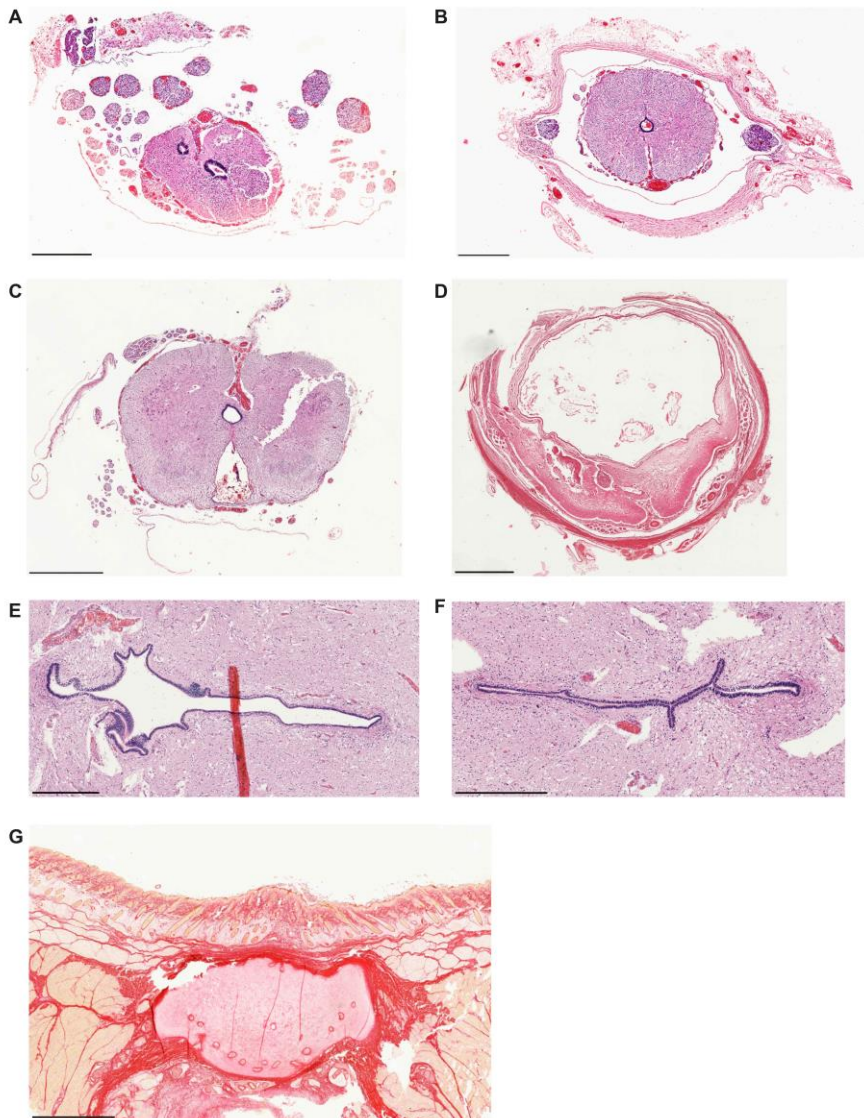


Suppl. Figure 5. Area medullovasculosa.

A: area medullovasculosa (red arrows) in a 10-day old unspecified SBA case.

The tissue is interspersed with many small vessels without bleeding shown in the detail image (H&E, 2 mm, detail 200 μ m).

B: area medullovasculosa (red arrows) in a myeloschisis case (gw 36, H&E, 1 mm).



Suppl. Figure 6. Additional findings of the spinal cord cranial or caudal to the lesion.

A: duplication of the central canal (gw 15, H&E, 500 μ m).

B: enlarged subarachnoid space and hydromyelia (gw 23, H&E, 500 μ m).

C: hydromyelia and syringomyelia (gw 19, H&E, 500 μ m)

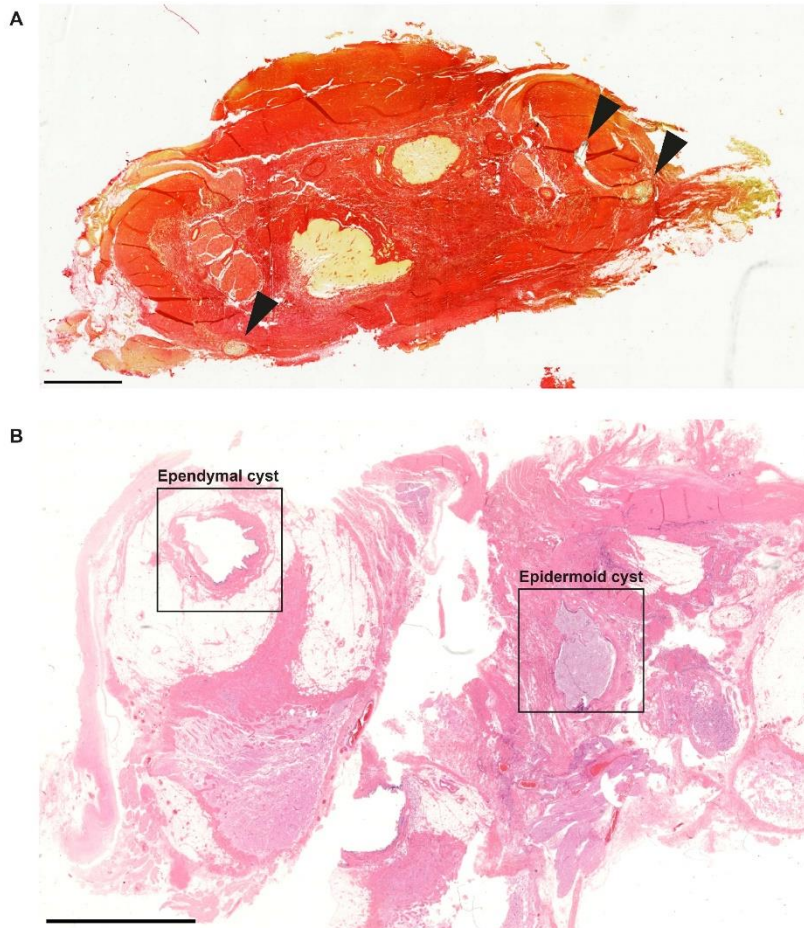
D: large syringomyelia (2w, H&E, 2 mm).

E: elongated and branched central canal with stratified ependyma as an overflow formation (gw 37, H&E, 500 μ m).

F: narrow central canal without expansion but with elongation (gw 37, H&E, 500 μ m).

G: Missing formation of a dural sack; instead the skin coverage directly lies above the vertebral body.

Interestingly the next level shows myeloschisis (gw 26, Sirius red, 2 mm).



Suppl. Figure Cases with surgical intervention.

A: 4-year-old case with described operated myelomeningocele.

Fibrosis of the outer cerebrospinal fluid space and aggressive proliferation of the connective tissue lead to a separation of parts of the spinal cord and a missing separation of germ layers. (black arrows mark suture material, Sirius Red, 2mm).

B: 20-year-old case with described operated SBA. Ependymal and epidermoid cysts are marked in the specimen (Sirius Red, 4mm).

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2019 Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: "PATHOLOGY" Selected Category Scheme: WoS
 Gesamtanzahl: 78 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease	5,083	16.750	0.009070
2	ACTA NEUROPATHOLOGICA	21,908	14.251	0.040740
3	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,992	7.500	0.005960
4	Seminars in Immunopathology	3,734	7.480	0.006690
5	MODERN PATHOLOGY	13,799	5.988	0.019760
6	JOURNAL OF PATHOLOGY	16,307	5.979	0.017910
7	BRAIN PATHOLOGY	5,308	5.568	0.007020
8	JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS	4,299	5.553	0.009700
9	CELLULAR ONCOLOGY	1,719	5.304	0.002220
10	AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY	19,940	4.958	0.020820
11	Disease Models & Mechanisms	5,926	4.651	0.013370
12	LABORATORY INVESTIGATION	10,491	4.197	0.008970
13	EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS	3,020	4.096	0.006000
14	ARCHIVES OF PATHOLOGY & LABORATORY MEDICINE	10,104	4.094	0.012880
15	ADVANCES IN ANATOMIC PATHOLOGY	1,502	3.746	0.002260
16	PATHOLOGY	3,086	3.744	0.004860
17	CANCER CYTOPATHOLOGY	2,768	3.703	0.004670
18	HISTOPATHOLOGY	9,864	3.626	0.011930
19	AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY	37,564	3.491	0.021170
20	Journal of Pathology Clinical Research	416	3.489	0.001700

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
21	ENDOCRINE PATHOLOGY	1,251	3.168	0.001820
22	HLA	834	2.955	0.001180
23	JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY	9,263	2.923	0.007160
24	VIRCHOWS ARCHIV	5,969	2.906	0.007930
25	PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH	2,684	2.826	0.003790
26	DISEASE MARKERS	4,094	2.738	0.006850
27	HUMAN PATHOLOGY	12,999	2.735	0.014080
28	SEMINARS IN DIAGNOSTIC PATHOLOGY	1,300	2.511	0.001670
29	JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY & MEDICINE	4,741	2.495	0.003850
30	JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY	10,624	2.460	0.007370
31	Medical Molecular Morphology	579	2.429	0.000750
32	APMIS	4,031	2.406	0.004370
33	Brain Tumor Pathology	647	2.348	0.001060
34	Diagnostic Pathology	3,042	2.335	0.005070
35	EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY	3,818	2.280	0.004440
36	INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPATHOLOGY AND PHARMACOLOGY	2,211	2.209	0.001900
37	PATHOLOGY INTERNATIONAL	2,895	2.110	0.002520
38	ALZHEIMER DISEASE & ASSOCIATED DISORDERS	3,402	2.098	0.003480
39	AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY	10,839	2.094	0.007080
40	SCIENCE & JUSTICE	1,348	2.075	0.002240
41	CYTOMETRY PART B-CLINICAL CYTOMETRY	1,570	2.070	0.002110

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
42	Analytical Cellular Pathology	509	2.052	0.000610
43	PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE	4,186	2.050	0.005260
44	HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY	4,113	2.021	0.003320
45	VETERINARY PATHOLOGY	5,651	2.010	0.005130
46	PATHOBIOLOGY	1,074	1.985	0.001160
47	Annals of Diagnostic Pathology	1,642	1.877	0.002170
48	INTERNATIONAL JOURNAL OF GYNECOLOGICAL PATHOLOGY	2,328	1.797	0.002350
49	APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY & MOLECULAR MORPHOLOGY	2,068	1.773	0.003430
50	NEUROPATHOLOGY	1,769	1.758	0.002110
51	CARDIOVASCULAR PATHOLOGY	1,998	1.756	0.002360
52	INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY	1,867	1.672	0.001110
53	International Journal of Paleopathology	523	1.614	0.000950
54	Forensic Science Medicine and Pathology	1,115	1.611	0.001910
55	CYTOPATHOLOGY	1,082	1.493	0.001450
56	TOXICOLOGIC PATHOLOGY	5,421	1.485	0.002750
57	Journal of Toxicologic Pathology	478	1.476	0.000780
58	JOURNAL OF CUTANEOUS PATHOLOGY	3,634	1.373	0.003490
59	FOLIA NEUROPATHOLOGICA	719	1.278	0.000730
60	DIAGNOSTIC CYTOPATHOLOGY	2,923	1.229	0.002850
61	ACTA CYTOLOGICA	2,016	1.226	0.001400
62	CLINICAL NEUROPATHOLOGY	858	1.103	0.000690

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
63	JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY	2,891	0.994	0.001950
64	ULTRASTRUCTURAL PATHOLOGY	837	0.989	0.000700
65	CytoJournal	305	0.952	0.000420
66	POLISH JOURNAL OF PATHOLOGY	460	0.903	0.000620
67	PEDIATRIC AND DEVELOPMENTAL PATHOLOGY	1,300	0.885	0.001490
68	INTERNATIONAL JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY	1,329	0.872	0.001860
69	AMERICAN JOURNAL OF FORENSIC MEDICINE AND PATHOLOGY	1,657	0.785	0.000920
70	Indian Journal of Pathology and Microbiology	1,313	0.663	0.001100
70	LEPROSY REVIEW	830	0.663	0.000670
72	Journal of Hematopathology	112	0.657	0.000110
73	Fetal and Pediatric Pathology	400	0.596	0.000610
74	PATHOLOGIE	685	0.586	0.000570
75	Malaysian Journal of Pathology	347	0.477	0.000350
76	ANNALES DE PATHOLOGIE	312	0.394	0.000240
77	International Journal of Clinical and Experimental Pathology	9,472	0.252	0.020570
78	Medecine Nucleaire-Imagerie Fonctionnelle et Metabolique	80	0.235	0.000100


Copyright © 2020 Clarivate Analytics

2. Originalpublikation



Original Investigation

Cerebral Abnormalities in Spina Bifida: A Neuropathological Study

Fabienne Paschereit^{1,2} , Kim Hannah Schindelmann^{1,2},
Michael Hummel³, Joanna Schneider^{2,4},
Gisela Stoltenburg-Didinger¹, and Angela M Kaindl^{1,2,4}

Pediatric and Developmental Pathology
0(0) 1–17
© 2021, Society for Pediatric Pathology
All rights reserved



Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/10935266211040500
journals.sagepub.com/home/pep



Abstract

Introduction: Spina bifida (SB) is the most common neural tube defect in humans. Here, we analyzed systematically the neuropathological findings of the brain in SB cases.

Methods: 79 cases with SB aperta (SBA) and 6 cases with SB occulta (SBO) autopsied at the Charité Neuropathology from 1974 to 2000 were re-evaluated retrospectively. For this, case files and spinal cord as well as brain sections were studied.

Results: While no brain malformations were detected in SBO cases, 95% of SBA cases had brain malformations. Main brain anomalies identified were hydrocephalus (71%), Chiari II malformation (36%), heterotopia (34%), other cerebellar anomalies (36%), gyrification defects (33%), and ependymal denudation (29%). Hydrocephalus was observed as early as gestational week 17 and was highly associated to Chiari II and ependymal denudation. In 55% SBA was accompanied by further anomalies not primarily affecting the CNS.

Conclusion: We confirm using neuropathologic methods brain malformations in most SBA but none in SBO cases. In addition to our previous radiologic study, we now demonstrate the high prevalence of cerebellar malformations and cerebral heterotopias in SBA. The early detection of hydrocephalus and Chiari II malformation in fetuses raises the question whether these arise parallel rather than in strict temporal sequence.

Keywords

spina bifida, hydrocephalus, Chiari II malformation, myelomeningocele, myeloschisis, heterotopia, neural tube defect, neuropathology

Introduction

Spina bifida (SB) is the most common non-fatal neural tube closure defect (NTD) in humans with an incidence of around 0.5 per 1000 pregnancies worldwide.^{1–4} SB results from an incomplete neurulation between day 18 and 28 of embryogenesis and is classified roughly into an open (SB aperta, SBA) or closed (SB occulta, SBO) subtype,² depending on whether there is skin coverage or not. We recently proposed a systematic classification of SB phenotypes that includes the following SBA subtypes⁵: (i) myeloschisis (MYS) characterized by a neural placode lining within the skin surface and being directly exposed without meningeal or dermal coverage; (ii) myelomeningocele (MMC) defined as sac of spinal cord and meninges protruding through the vertebral defect; (iii) meningocele (ME) with protrusion only of the meninges without spinal

¹Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

²Department of Pediatric Neurology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

³Institute of Pathology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

⁴Center for Chronically Sick Children (Sozialpädiatrisches Zentrum, SPZ), Charité—Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

The last 2 authors contributed equally to this study.

Corresponding Author:

Angela M Kaindl, Department of Pediatric Neurology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany.
Email: angela.kaindl@charite.de

cord through the defect. Furthermore there is the rare limited dorsal myeloschisis (LDM) defined as a focal closed midline skin defect with a fibroneural stalk that links the skin lesion to the underlying cord.⁶

Patients with SBA depict various degrees of motor and sensory function impairment as well as urinary and fecal incontinence,^{4,7} depending on their anatomical and functional lesion level. The outcome of patients with SBA, however, also depends on associated brain malformations that range from Chiari II malformation and hydrocephalus to heterotopia, gyrification defects and further neocortical anomalies as well as hypoplasia or aplasia of cranial nerve nuclei, agenesis of corpus callosum, fusion of the thalami and reduction in total white matter with increased neocortical thickness in the frontal regions.^{8–11} Patients with malformations of cortical development such as heterotopias or polymicrogyria may present with symptoms such as developmental delay, epilepsy and focal neurologic deficits.^{12–14} There is strong evidence that the pathogenesis of SB reflects a long-term disruption of the central nervous system development far beyond an isolated NTD of the spine. We recently reported in a radiological study that cerebral pathology is always present in patients with SBA but rarely in those with SBO. We further reported the relationship between brain malformations and lower cognitive function in SBA patients.¹⁵

The currently favored model for brain malformation and hydrocephalus in SB invokes venting of cerebrospinal fluid (CSF) through the open caudal end of the neural tube to cause Chiari II, subsequent additional abnormal CSF flow and hydrocephalus, resulting in abnormal neural development.^{16–19} Results of other studies suggest that a loss of ventricular lining may trigger cerebral pathology, and it is now acknowledged that fetal ependyma has a key role in brain development as a secretory structure.²⁰ In this regard, it has been shown that ependymal pathology, e.g. denudation, occurs prior to the occurrence of Chiari II and/or hydrocephalus^{21,22} and may therefore not be the result of hydrocephalus as previously suggested.²³ This is further underpinned through results in mouse models showing that hydrocephalus may result from a primary alteration of ependymal lining.²⁴

Understanding the SB pathomechanism and the sequence of occurrence of brain malformations is important for the general knowledge on the disease occurrence but also in view of therapeutic approaches. The aim of this study was to systematically analyze neuropathological findings of the brain at various developmental time points in SB.

Cases and Methods

Cases

Autopsies including neuropathological examination of all children and fetuses with SB who deceased at

Charité – Universitätsmedizin Berlin from 1974 to 2000 was performed at the Institute of Neuropathology. Clinical data were available from the electronic database provided by the Central Biobank Charité (ZebanC). A search within the database for the ICD10 diagnoses Q05 (SB) and Q76 (SBO) yielded 99 cases which were subsequently re-evaluated. Inclusion criteria were SB with or without associated brain malformations. 14 cases had to be excluded due to false allocation of the ICD-10 code (n=8), missing clinical data (n=1) or missing histological specimen for re-evaluation of the SB subtype (n=5). In total, 85 cases could be included (Supplemental Figure 1), and corresponding histological sections and/or clinical data were anonymized and investigated retrospectively. The study cohort included 79 cases with SBA of different subtypes and 6 cases with SBO. For those cases medical information and autopsy findings were obtained from the database. Pathological reports were sometimes incomplete, and some histological specimens were not usable for interpretation due to their autolytic condition as a consequence of induced abortion, which represent limitations in the retrospective analysis of neuropathological findings in brain sections. Brain malformations identified in SB cases are listed in Tables 1 to 4. The ethic committee of the Charité approved the study (EA1/076/19).

Brain Sections

The brains obtained from all cases were fixed by immersion in 4% buffered formaldehyde. Coronal cuts were obtained for evaluation of ventricular volume, and ventriculomegaly was assessed by neuropathologists. In selected cases, sagittal and horizontal cuts were performed. Whole brain slices and larger blocks were embedded in Celloidin (Figure 3(B), Supplemental Figure 3(C)). Blocks of brain tissue containing representative brain regions were processed for paraffin embedding. Serial sections from paraffin blocks were cut, mounted on SuperFrost PlusTM slides (Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Germany, J1800AMNZ) and then stained with hematoxylin-eosin. In case the available stained sections were not sufficient for evaluation, additional sections were cut for immunohistochemistry at 4 μ m.

Immunohistochemistry

The following primary antibodies were used: mouse anti-acetylated tubulin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA, t6793/t7451, 1:1000 dilution) and rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, DAKO, Glostrup, Denmark, Z0334, 1:500 dilution). Incubation of the primary antibody at 4°C was in a moist chamber for 24 hours in antibody diluent with background reducing components

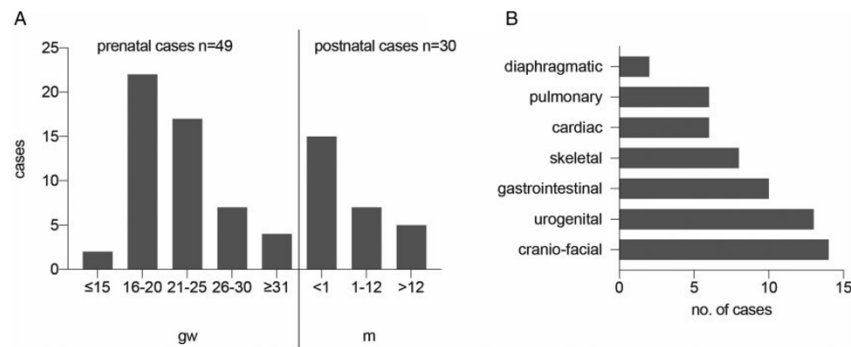


Figure 1. Study cohort. A, Age distribution of cohort with 79 SBA patients. Fetal ages ranged from GW15 to GW40. Surviving children were older than GW25 and are divided into categories depending on survival for ≤ 1 month, > 1 month and > 1 year. B, Cranio-facial, urogenital and gastrointestinal malformations dominate associated malformations in individuals with SB. Abbreviations: GW, gestational weeks; m, months; SBA, spina bifida aperta; SBO, spina bifida occulta; NTD, neural tube defect.

Table 1. Anomalies of the Brain in SBA.

Brain Anomalies in SBA	Percentage	Comment
Hydrocephalus	71% (53/75)	– Already at GW 17 – 27/53 already intrauterine before GW 26
Chiari II malformation	36% (27/74)	– Already at GW 19 – 26/27 with associated hydrocephalus – 10/27 with additional heterotopias
Heterotopias	41% (24/58)	– Located especially in the cerebellum and in cerebral grey or white matter
Gyrification disorder	33% (23/69)	– 13/23 associated with Chiari II malformation
Cerebellar anomalies	36% (25/70)	– Hypoplasia/dysplasia of the vermis, dysplastic dentate nucleus
Ependymal denudation	29% (17/58)	– 17/17 with associated hydrocephalus – 6/17 with associated ependymal rosettes
Ependymal rosettes	14% (8/58)	– 2/8 not associated to ependymal denudation (very dysplastic cases 4 and 50)
Plexus anomaly	13% (9/69)	
Anomaly of corpus callosum	19% (13/68)	
Other anomalies	39% (28/71)	– Listed in Table 2

(DAKO, Carpinteria, CA, USA, S3022) after blocking of the endogenous peroxidase with hydrogen peroxide at a dilution of 1:10 and with unconjugated normal goat serum (Jackson Immuno Research Europe Ltd, West Grove, PA, USA, 005-000-121). Anti-rabbit IgG biotinylated antibody raised in goat (Sigma Aldrich, St. Louis, USA, B8895) and anti-mouse IgG biotinylated antibody raised in goat (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA, ZB0324) were applied as secondary antibodies at a dilution of 1:200 for 30 minutes at room temperature. Detection was induced by Vectastain ABC-KIT (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA, PK-6100) in a moist chamber for 50 minutes. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB+ Substrate Chromogen System, DAKO, Carpinteria, CA, USA K3468) was used for development.

Photographic Documentation

For documentation of microscopic findings M8 PreciPoint digital microscope and scanner (PreciPoint GmbH, Freising, Germany) was used. Images of the scanned histological specimen were created with the software ViewPoint (PreciPoint GmbH, Freising, Germany) and detailed figures were generated using Adobe Illustrator (Illustrator 2020 (Version 24.1.2), Adobe Inc., San José, California) and Gimp (Gimp 2020 (Version 2.10.22), The Gimp-Team).

Statistical Analysis

To evaluate correlations, we used the Chi-square test and considered test results with a p-value $< 0,05$ as statistically significant. Data analysis was performed, and

Table 2. Other Anomalies of the Brain in SBA.

Group	Anomalies
Cephalic disorders (n = 10)	<ul style="list-style-type: none"> - Cephalocele (n = 4) - Anencephaly (n = 2) - Microcephaly (n = 2) - Holoprosencephaly (n = 2)
Genetic disorders (n = 1)	<ul style="list-style-type: none"> - Joubert syndrome (n = 1)
Neuronal anomalies (n = 12)	<ul style="list-style-type: none"> - Brain stem anomaly (n = 3) - Dysplastic cranial nerves (n = 2) - Diminution of matrix (n = 2) - Hypoplasia/aplasia of mesencephalon (n = 2) - Aplasia of olfactory bulb (n = 1) - Atresia of 4th ventricle (n = 1) - Aqueductal stenosis (n = 1)
Anomalies of the limbic system (n = 6)	<ul style="list-style-type: none"> - Hippocampal anomaly (n = 4) - Aplasia of fornix (n = 2)
Nuclear anomalies (n = 3)	<ul style="list-style-type: none"> - Dysplastic olives (n = 2) - Diminution of pontine nuclei (n = 1)
Malformations of the skull (n = 2)	<ul style="list-style-type: none"> - Dolichocephaly (n = 1) - Hamartia (n = 1)
Meningeal malformations (n = 2)	<ul style="list-style-type: none"> - Dysplasia of the subarachnoid space (n = 2)

graphs were generated using GraphPad Prism 8 (version 8.4.0, GraphPad Software Inc., San Diego, California).

Results

We analyzed the presence of brain malformations in 79 cases with SBA and 6 cases with SBO at a mean age of GW23, with 49 prenatal (range GW15-40) and 30 postnatal SBA (range GW24-40) cases as well as 5 prenatal cases and 1 postnatal SBO case (Figure 1(A)). Of the 49 SBA cases that deceased prenatally most died because of induced abortion (n=36), followed by pregnancy or birth complications (n=7) or unknown reasons (n=6). Of the 30 liveborn SBA cases more than a third died shortly within the first postnatal 24 hours (11/30). The causes of postnatal death included respiratory (n=8) or cardiac (n=3) insufficiency, survived induced abortion (n=3), status epilepticus, meningoencephalitis or surgical complications (n=9), renal failure (n=1), birth complications (n=1) and unknown reasons (n=5). In the SBO group cases deceased because of induced abortion (n=3), intrauterine death (n=2) and for the one liveborn case due to respiratory insufficiency as a result of pulmonary hypoplasia with bilateral renal agenesis (Potter sequence, n=1). Data concerning age at death, sex, type and level of SBA and associated brain malformations are presented in Table 3 and detailed information on brain malformations in SBA is listed in Table 1. While the SBA group showed a high prevalence of additional brain anomalies, none were present in the SBO group (Table 4).

Most cases with SBA had lumbar and/or sacral lesions (72%, n=57), followed by thoracolumbar (13%, n=10) and cranial and/or thoracic lesions (3%, n=2). One case had a lesion reaching from the cervical to the sacral spine, and two cases had a lesion reaching from the thoracic to the sacral spine. The lesion level could not be unambiguously determined in 6 cases. We diagnosed myeloschisis (MYS) in 32% (n=27), myelomeningocele (MMC) in 31% (n=26), meningocele (ME) in 2% (n=2), limited dorsal myeloschisis (LDM) in 1% (n=1) and SBO in 7% (n=6) of all cases. The SBA subtype could not be unambiguously identified in 23 autopsied cases (27%) due to missing or incomplete histological specimen or because of wrong cutting position for re-evaluation of SB type (AP). Occurrence of brain malformations was not associated with the lesion level and/or the sex in our cohort, in comparison to higher rates of malformations in thoracic/cranial NTDs and/or female cases described previously by others.²⁵

SB was frequently accompanied by further anomalies. In SBA cases this was the case in 55% (34/62) of the cases with associated anomalies not primarily affecting the CNS. Such anomalies ranged from cranio-facial (n=14), urogenital (n=13) and gastrointestinal (n=10) malformations via skeletal (n=8), cardiac or pulmonary deficiencies (n=6 each) or diaphragm abnormalities (n=2) (Figure 1(B)) to syndromes like Potter sequence (n=3). Other syndromes we detected affecting the CNS were Joubert syndrome (n=1) and a caudal regression syndrome which occurred together with Potter sequence (n=1). Of all SBA cases, 10 cases (13%) had the following additional cephalic

Table 3. Malformations in SBA.

Case	SBA Type	Location	Born in GW	Age at Death	Sex	Hydrocephalus	Chiari II	Heterotopia	Gyrification Disorders	Cerebellar Anomalies	Ependymal Denudation	Non CNS Anomalies	Further Features
1	MYS	LS	22	0	f	+	+	-	-	-	+	-	
2	MMC	S	37	6 w	m	-	-	-	+	+	-	+	Microcephaly
3	LDM	LS	17	0	m	-	-	-	+	-	-	+	Cephalocele
4	AP	LS	16	0	m	-	-	+	+	-	-	+	
5	MMC	LS	23	0	f	-	-	-	-	-	-	-	
6	ME	LS	26	0	m	-	-	-	+	-	-	-	
7	MMC			7 h	f	+	+	-	+	-	-	-	
8	AP	S		20 y	m	+	-	-	+	-	-	+	
9	AP	TL	37	0	f	+	-	+	+	-	+	+	
10	AP	LS	21	0	f	+	-	+	-	-	-	+	
11	MYS	LS	20	0	f	+	+	+	-	+	-	-	
12	MMC	LS	20	0	f	+	-	-	-	-	-	-	
13	MMC	L	38	2 w	f	+	+	+	+	-	+	+	
14	MMC	LS	40	9 w	m	+	+	-	-	-	+	+	
15	MYS	L	22	0	m	-	-	-	+	-	-	+	
16	AP	L	40	10 d	f	+	+	+	+	+	-	+	SBO
17	MYS	TL	34	8 h	m	+	-	+	-	+	-	-	
18	AP	LS		3 w	m	-	-	-	-	-	-	-	
19	ME	L	39	0	f	-	-	-	-	-	-	+	
20	MYS	LS	19	0	f	+	+	+	-	+	+	-	
21	MYS	LS	26	0	f	+	-	+	-	-	-	-	
22	AP			9 y	f	+	+	-	+	-	-	-	
23	MYS	LS	18	0	f	+	+	-	-	-	-	-	
24	MMC	L	38	4 y	f	+	+	-	-	+	+	+	Cephalocele Joubert syndrome
25	MMC	LS	23	0	m	+	+	-	-	-	-	-	
26	MMC	TL	24	0	m	+	+	-	-	+	-	-	
27	MYS	CTLS	17	0	m	-	-	-	-	-	-	-	Holoprosencephaly Anencephaly
28	AP	LS	20	0	m	-	-	-	-	-	-	+	
29	MMC	TL	37	5 d	f	+	+	+	+	+	+	+	
30	MYS	LS	23	0	f	+	-	+	-	-	-	-	
31	AP	LS	20	0	f	+	-	+	-	+	+	-	
32	MMC	LS	40	5 min	m	+	+	+	+	+	-	-	
33	MMC	LS	25	0	f	+	+	+	+	-	-	+	
34	MMC	LS		5 w	m	+	+	+	+	-	-	+	
35	MMC	LS		4 w	m	+	+	+	+	+	+	+	
36	AP	LS	36	1 h	f	+	+	+	-	-	-	-	
37	AP		19	0	m	+	-	-	-	+	-	-	
38	MMC	S	24	0	f	+	-	+	-	+	-	-	
39	MMC		15	0	f	+	-	+	-	+	-	-	
40	MMC	LS		4 w	f	+	+	+	+	-	-	+	

(continued)

Table 3. Continued.

Case	SBA Type	Location	Born in GW	Age at Death	Sex	Hydrocephalus	Chiari II	Chiari III	Heterotopia	Gyrification Disorders	Cerebellar Anomalies	Ependymal Denudation	Non CNS Anomalies	Further Features
41	MMC	LS	31	0	f	+	+		-	-	+	-	+	
42	MMC			36 y	f	+	-		-	+	-	+	-	
43	MYS	TLS	20	0	f								+	
44	MYS	LS	26	0	f	+			+	-	-	+	-	
45	AP	LS	36	0	m	+				-	+		+	
46	MYS	LS	17	0	f	-				-	-	-	+	Potter sequence SBO
47	MYS	TL	24	0	m	+			-	-	-	+	+	
48	AP	LS	19	0	f	+			+	-	-	+	-	
49	AP	LS	20	0	f	+	+	Chiari III	-	-	-	+	-	Cephalocele
50	MYS	TL	19	0	m	-			+	+	+	-	-	
51	MYS	TL	25	0	f	+			-	-	-	-	+	
52	MYS	L	40	2 h	m	+			-	+	+	-	+	
53	MYS	LS	20	0	f					-	-	+	-	
54	AP	LS	19	0	m	-				-	+	-	-	
55	MMC	L		1 y	m	+	+			+	+	-	-	
56	MMC	L	26	0	f	+			+	-	-	-	+	
57	MMC	LS		2 w	f	+	+		-	+	+	-	-	
58	AP	LS	25	8 min	m	-			-	-	+	-	-	
59	AP	LS		5 w	m	+			+	+	+	+	+	Potter sequence + caudal regression syndrome
60	AP	LS	23	0	m	-				-	-	+	+	
61	AP	TH		1 w	f	+	+		+	-	-	+	-	
62	MYS	LS	20	0	f	-	+		+	-	-	-	-	
63	MYS	TL	24	0	m	-				+	-	-	+	
64	MMC	LS		1 d	f	-				-	-	-	+	
65	MYS	TL	28	0	f	-			-	-	-	-	+	
66	MMC	LS	22	0	f	+			-	-	-	-	-	Cephalocele
67	MYS	L	26	0	f	+	+		+	-	+	-	-	
68	MYS	L	20	0	m	+			-	-	-	-	-	
69	MYS	LS	23	0	m	+			+	-	+	-	-	
70	AP		17	0		+				-	-	-	-	
71	MMC	TL		2 w	f	+	+		-	+	-	-	-	
72	MYS	L	23	0		-			-	-	-	-	-	
73	AP	LS	21	0	m	+			-	+	+	-	+	Holoprosencephaly Potter IIb
74	AP	LS	30	0	m	+			+	-	-	-	+	Microcephaly + Potter sequence
75	MYS	TLS	20	0	f	+			-	-	-	-	+	
76	MYS	L	31	1 min	m	-			-	-	-	-	+	

(continued)

Table 3. Continued.

Case	SBA Type	Location	Born in GW	Age at Death	Sex	Hydrocephalus	Chiari II	Heterotopia	Gyrification Disorders	Cerebellar Anomalies	Ependymal Denudation	Non CNS Anomalies	Further Features
77	AP	LS	20	0	m	+	-	+	-	-	-	+	
78	MYS	C	15	0	f	-	-	-	-	-	-	-	
79	MMC	L		14 y	f	+	+	-	+	+	+	-	Anencephaly

Abbreviations: AP, spina bifida aperta unspecified; C, cranial; CNS, central nervous system; CTLS, cervico-thoracic-lumbo-sacral; d, days; f, female; GW, gestational week; h, hours; L, lumbar; LDM, limited dorsal myeloschisis; LS, lumbo-sacral; m, male; ME, meningocele; min, minutes; MMC, myelomeningocele; MYS, myeloschisis; S, sacral; SBO, spina bifida occulta; T, thoracic; TL, thoracic-lumbar; TLS, thoracic-lumbo-sacral; w, weeks; y, years.

disorders: microcephaly (n = 2), holoprosencephaly (n = 2) and the additional NTDs: cephalocele (n = 4), anencephaly (n = 2) (Table 2), while none were present in SBO. Four of the cases with SBA had characteristic malformations leading to the diagnosis of following defined syndromes: Potter sequence (n = 2), Potter sequence and caudal regression syndrome (n = 1), Polycystic kidney disease (Potter IIb, n = 1) and Joubert syndrome (n = 1). Accessibility of genetic testing was limited at the time of analysis with only seven chromosome analysis results available that were all normal. Modern genetic approaches applied to patients with SB have, however, revealed several genetic causes,^{26–28} and it would be desirable to perform future neuropathological studies in genetically well characterized cases. Detailed information about the associated malformations is given in Supplemental Figure 2.

Brain malformations were found in 95% of SBA cases while no malformation was found in SBO cases. Additional malformations would be expected in SBO significantly less frequently than in SBA ($p = 7,5 \times 10^{-11}$). All neuropathological findings in the brain are summarized in Tables 1 and 2.

Chiari II malformation, defined as cerebellar vermis herniation through the foramen magnum and brain stem elongation (Figure 2(C) and (D)),^{17,19} was present in 36% of the cases (27/74) and was detected as early as GW19 (Figure 2(A)). 74 cases were included in analysis while 4 cases of the total 79 cases with SBA were excluded due to insufficient preservation of histological specimen and 1 was excluded because of Chiari III malformation. Chiari II malformation is highly associated to MMC (Figure 2(B)). In our cohort 26 of the cases had associated hydrocephalus, while only one case (#62) presented Chiari II malformation without hydrocephalus. The latter case was aborted in GW 20 and is one of the youngest cases developing Chiari II malformation in our cohort. SBA, especially MMC, is known to be nearly always associated to Chiari II hind-brain malformation and the onset of hydrocephalus.²⁹ Whereas the Chiari II rate of all evaluated cases was 36% (27/74 cases), cases with MMC showed higher Chiari II rates (18/26 cases; 69%, $p = 0,0389$) than cases with MYS (5/24 cases; 21%, $p = 0,1549$).

Hydrocephalus was identified in 71% of the cases (53/75). 75 cases were included in analysis while the same 4 cases mentioned above had to be excluded because brain examination was not possible due to insufficient preservation of histological tissue. Hydrocephalus was detected as early as GW17 and was present in over half of the prenatal cases (n = 27) (Figure 3(A)). Diagnosis can be made through macroscopic analysis of ventriculomegaly or via ultrasound while microscopic presentation shows thinning of the cortex and ventricular dilatation (Figure 3(B) and (C)). Today MRI and

Table 4. Brain Malformations in SBO.

Case	Location	Born in GW	Age at Death	Sex	Hydrocephalus	Chiari II	Heterotopia	Gyrification Disorders	Cerebellar Anomalies	Ependymal Denudation
SBO1	CT+ S	34	0	m	–	–	–	–	–	–
SBO2	S	40	0	f	–	–	–	–	–	–
SBO3	L	23	0	m	–	–	–	–	–	–
SBO4		26	0		–	–	–	–	–	–
SBO5	TL	19	0	m	–	–	–	–	–	–
SBO6	L	40	0	f	–	–	–	–	–	–

Abbreviations: CT, cervico-thoracic; f, female; GW, gestational week; L, lumbar; m, male; S, sacral; SBO, spina bifida occulta; TL, thoracic-lumbar.

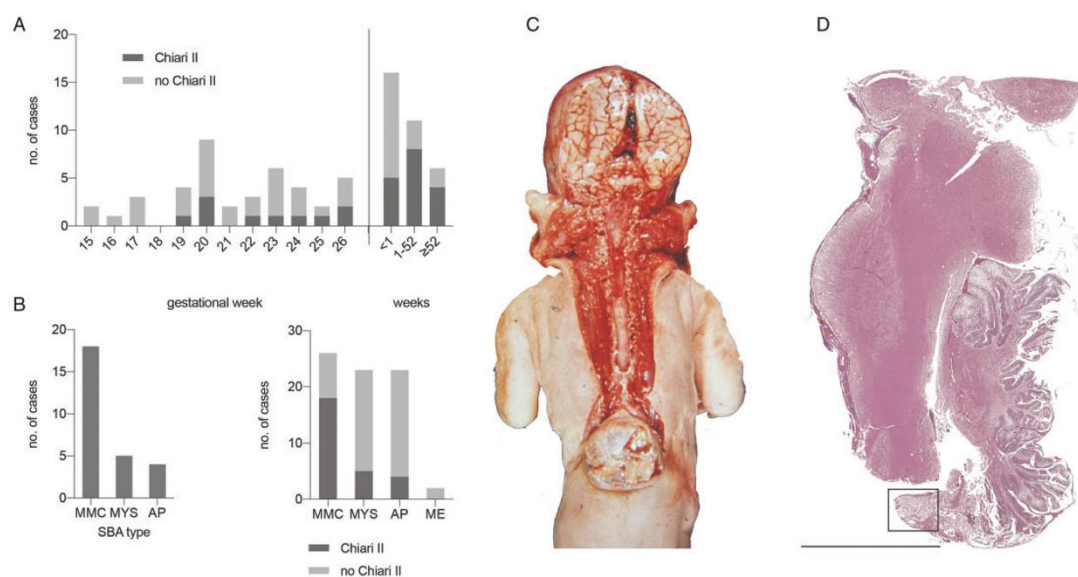


Figure 2. Chiari II malformation in SBA. A, Presence or absence of Chiari II in 74 SBA cases. Chiari II was identified as early as GW19 but presents increasingly postnatally in individuals born after GW25 ($n = 74$ SBA cases). B, Chiari II was present predominantly in myelomeningocele but was also present in the other SBA subtypes myeloschisis and in cases with SBA where subtype could not be closer specified (AP). In comparison distribution of SBA cases without Chiari II are displayed. C, Chiari II in a 2 weeks old female newborn with lumbosacral myelomeningocele and hydrocephalus (case #88). Note the displacement of the cerebellar vermis and low-lying brain stem characteristic for Chiari II. Effacement of sulci are evidence of hydrocephalus. D, Cerebellar herniation and its position in relation to the brain stem are part of a Chiari II malformation. Additionally, the dysplastic cerebellum is outlined and magnified for better analysis in Figure 4(D) of a 10-day-old newborn with SBA, Chiari II and hydrocephalus (case #16, H&E, sagittal section, bar 1 cm). Abbreviations: GW, gestational weeks; SBA, spina bifida aperta; H&E, hematoxylin-eosin; MMC, myelomeningocele; MYS, myeloschisis; AP, SBA not closer specified; ME, meningocele.

ultrasound enable more accurate analysis of ventricular enlargement^{15,30} and SB³¹ and will be the leading methods for future studies addressing the question whether the severity of hydrocephalus correlates with the degree or extend of associated malformations.

Heterotopia defined as nodules of grey matter in an abnormal location³² were found in 34% of the cases (20/58) and were only present in SBA (Figure 4(A)). 21 cases were excluded from this analysis due to missing histological specimen for evaluation. Heterotopic neurons

were located especially in the cerebellum ($n = 9$) (Figure 4(B) to (E)) and/or in the white matter ($n = 9$) of the cerebrum. Other locations included tectum of 4th ventricle ($n = 4$), meninges of the subarachnoid space ($n = 1$) and the hippocampal ($n = 1$) or subependymal zone ($n = 1$) (Figures 4(B)). Seven of the cases showed heterotopia in multiple locations. All of the cases with heterotopias showed additional brain malformations, whereas 17 were associated to hydrocephalus (17/20; 85%), 7 were associated to Chiari II malformation

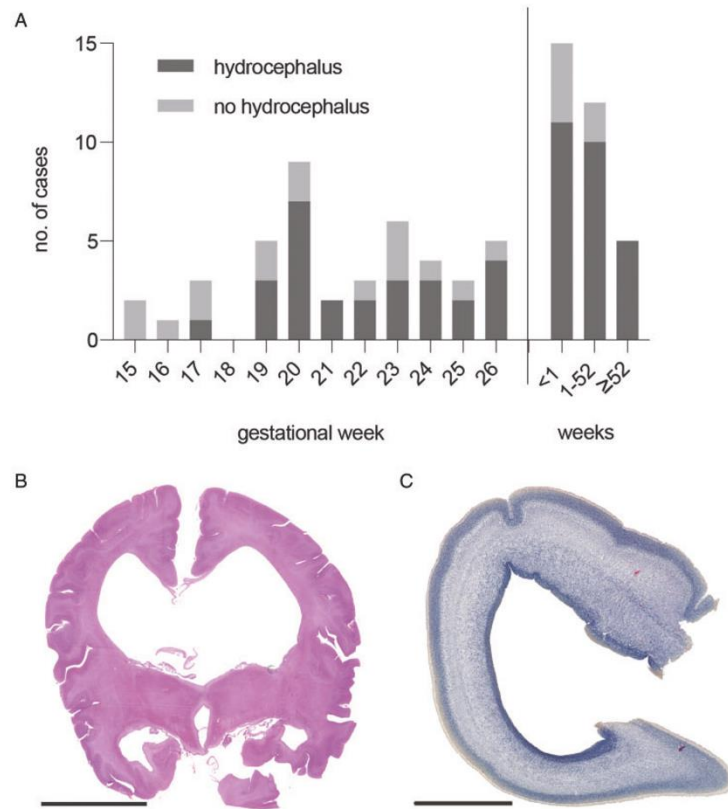


Figure 3. Hydrocephalus in SBA. **A**, Hydrocephalus is present in 71% of 75 SBA cases. It can be detected as early as GW17, with an increase of incidence after birth. **B**, Ventriculomegaly signals the hydrocephalus. H&E staining of a coronal celloidin embedded section of a 5 weeks old newborn with myelomeningocele, hydrocephalus and Chiari II malformation (case #34, bar 2 cm). **C**, Hydrocephalus was identified as early as GW17 and is indicated by thinning of the cortex. H&E staining with faded eosin staining of a coronal brain section of a fetus with SBA at GW17 (case #70, bar 2 mm). Abbreviations: GV, gestational weeks; SBA, spina bifida aperta; H&E, hematoxylin-eosin.

(7/20; 35%) and 5 of the cases showed additional gyration disorders. The same applies for the cases with cerebellar heterotopias that were also all associated to further brain malformations (90% with hydrocephalus, 33% with Chiari II, 33% with gyration disorders) and did not occur isolated. In addition to the heterotopic nodules, focal cortical dysplasia was seen in 8 cases.

Gyrification disorders were present in 33% of the evaluable cases (23/69), whereas 13 of those cases showed concomitant Chiari II malformation (Figure 5 (A) to (D)). Definition of gyrification anomalies is inconsistent and literature suggests the terms polymicrogyria, microgyria, polygyria, polysulceria, pachygyria and stenogyria being associated to NTDs and/or Chiari II^{10,15,29,33–35} whereas polymicrogyria (Figure 5 (C)) can only be diagnosed histologically and is seen as a real neuronal migration disorder¹⁹ being often associated with SB and/or Chiari II. In this cohort polymicrogyria was only present in 2 of the cases with anomalous gyration whereas abnormal number and form of gyri

and sulci was more common. Polymicrogyria, often used synonymously to microgyria, describes a cerebral or cerebellar cortical disorder in which the gyri are reduced in size, increased in number and accompanied by a characteristic four layered lamination^{19,34} (Figure 5 (C)). Stenogyria, which is not a true neuronal migration disorder, stands for the presence of multiple small compacted gyri separated by shallow sulci^{15,36} and is also mentioned as polygyria^{33,35} (Figure 5(B)). The gyrification pattern can also show an abnormal number and distribution of principal sulci with increased average length of the sulci and should be referred to as polysulceria.³⁵ Such pattern with deep branched sulci was also present in our cohort (Figure 5(D)).

Ependymal denudation occurred in 29% of the cases (17/58) and ependymal rosettes only in 14% (8/58). The latter were strongly associated to ependymal denudation and only 2 cases showed ependymal rosettes in absence of denudation. These 2 cases however were the most malformed brains of the cohort (case 4, case 50).

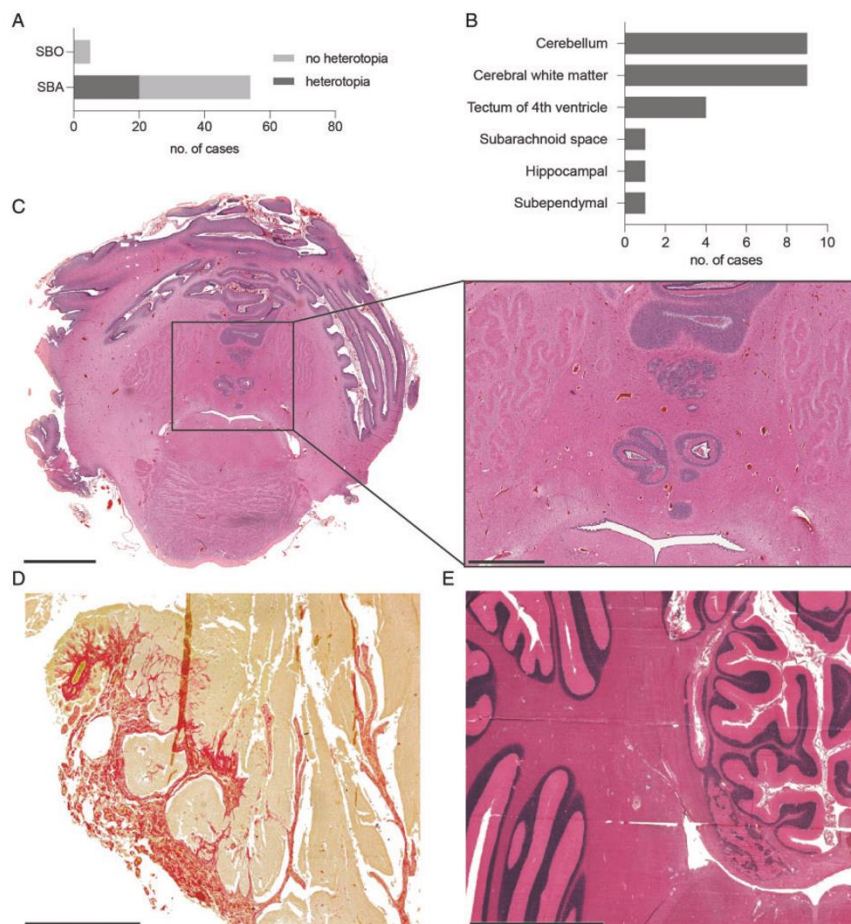


Figure 4. Heterotopia in SBA. A, Heterotopias are present only in SBA (20/58) and not in SBO (0/6). B, Heterotopias are predominantly located in the cerebellum ($n=9$) and/or white matter ($n=9$). C, Heterotopias in proximity of the 4th ventricle in the cerebellum of a hydrocephalic one-day-old newborn with myeloschisis and SBO (case #17, H&E, transverse section, bar 5 mm). Magnification shows multiple heterotopias forming a nodule (bar 2 mm). D, Cerebellar heterotopias in the subarachnoid space as part of a dysplastic cerebellum in a hydrocephalic 10-days-old newborn with SBA and Chiari II (case #16, H&E, Sirius-Red, sagittal section, bar 2 mm, displayed in Figure 2D at larger size). Red staining shows amplification of connective tissues forming a big cerebellar heterotopia. E, Cerebellar heterotopia in a hydrocephalic 4-year-old child with myelomeningocele and Chiari II (case #24, H&E, transverse section, bar 5 mm). Abbreviations: GW, gestational weeks; SBA, spina bifida aperta; SBO, spina bifida occulta; H&E, hematoxylin-eosin.

All of the cases with loss of ependymal lining had concomitant hydrocephalus (Figure 6(A) and (B)) and rosettes were found in 35% (6/17) (Figure 6(D)). Consequently, from all the hydrocephalus cases 17 showed defects of ventricular lining (32%; 17/53). We discovered that the occurrence of ependymal abnormalities has a prenatal peak in GW19-22 which could embrace the cases where ependymal loss precedes the onset of hydrocephalus and a postnatal peak which could embrace the cases where the ependyma is injured due to higher pressure of cerebral spinal fluid and subsequent ventricular dilatation. Figure 6(B) shows the relationship of hydrocephalus and ependymal defects.

Loss of ependymal lining is followed by creation of subventricular gliotic nodules that form within the gaps between ependymal islands bulging into the ventricular lumen (Figure 6(C)). These are accompanied by reactive subventricular gliosis and formation of rosettes in zones of ependymal damage (Figure 6(D) to (F)). All samples from the cerebral aqueduct and lateral ventricles from nonhydrocephalic fetuses examined were lined by a continuous ependymal lining ($n=8$ in SBA, $n=6$ in SBO).

Our results show additional brain anomalies like heterotopias, gyrification anomalies, anomalies of corpus callosum or the cerebellum in 14 of the cases with ependymal denudation. Only 3 cases with hydrocephalus and

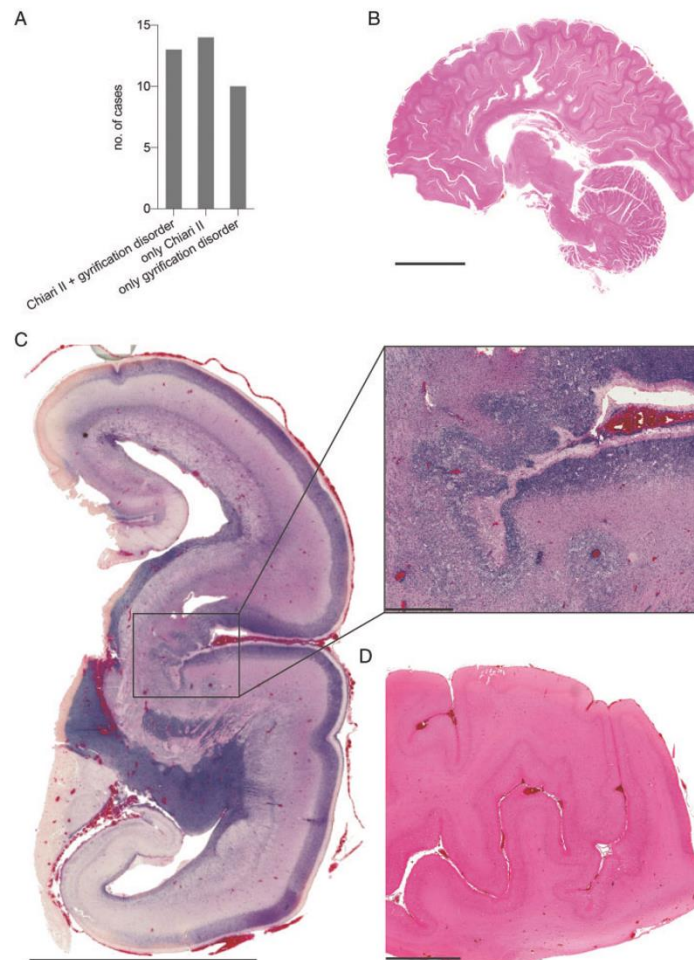


Figure 5. Disorders of gyration in SBA. A, Gyration disorders were present in 33% of 69 SBA cases where analysis of the gyri was possible. 13 of the 23 cases with gyration disorders showed concomitant Chiari II malformation. B, Stenogryria in a hydrocephalic brain from a one-year-old newborn with myelomeningocele and Chiari II (case #55, sagittal section, H&E, bar 3 cm). C, Polymicrogyria in the right hemisphere of a fetus from GW19 with myeloschisis and Chiari III with a cephalocele (case #50, H&E, coronal section, bar 10 mm). The magnified lateral sulcus shows polymicrogyria with disorganization of the cortical layering (bar 1 mm). D, Polysulceria of the cortex in a 5-week-old newborn with SBA and hydrocephalus (case #59, H&E, bar 5 mm). Abbreviations: GW, gestational weeks; SBA, spina bifida aperta; H&E, hematoxylin-eosin.

ependymal denudation showed no further alterations of brain morphology (case 1, 14 and 49) but had Chiari II malformation suggesting hydrocephalus being a result of hindbrain herniation in those cases. In total, hydrocephalus coincided with Chiari II malformation in 26 cases. In 8 cases hydrocephalus was present without Chiari II malformation but accompanied by discontinuities of ependymal lining. In this group hydrocephalus could be the result of an alternated neuroepithelial lining. For 3 cases with hydrocephalus a hypertrophic plexus epithelium was found but in only 2 of those cases it occurred isolated without Chiari II malformation and could be the cause due to abnormalities of secretion.

For 14 cases (14/75; 19%) the pathogenesis of hydrocephalus remains unclear as it is not associated with loss of ependymal lining and/or Chiari II malformation.

Malformations of the cerebellum other than Chiari II were present in 36% (25/70). They included hypoplasia of the cerebellum or isolated dysplasia or aplasia of the vermis, dysplasia of the dentate nucleus and/or gyration disorders.

More rare malformations were plexus anomalies (13%; 9/69) and anomalies of the corpus callosum in 19% (13/68). From the 9 cases with plexus anomalies, 7 had associated hydrocephalus suggesting that hydrocephalus can be caused also by abnormalities of

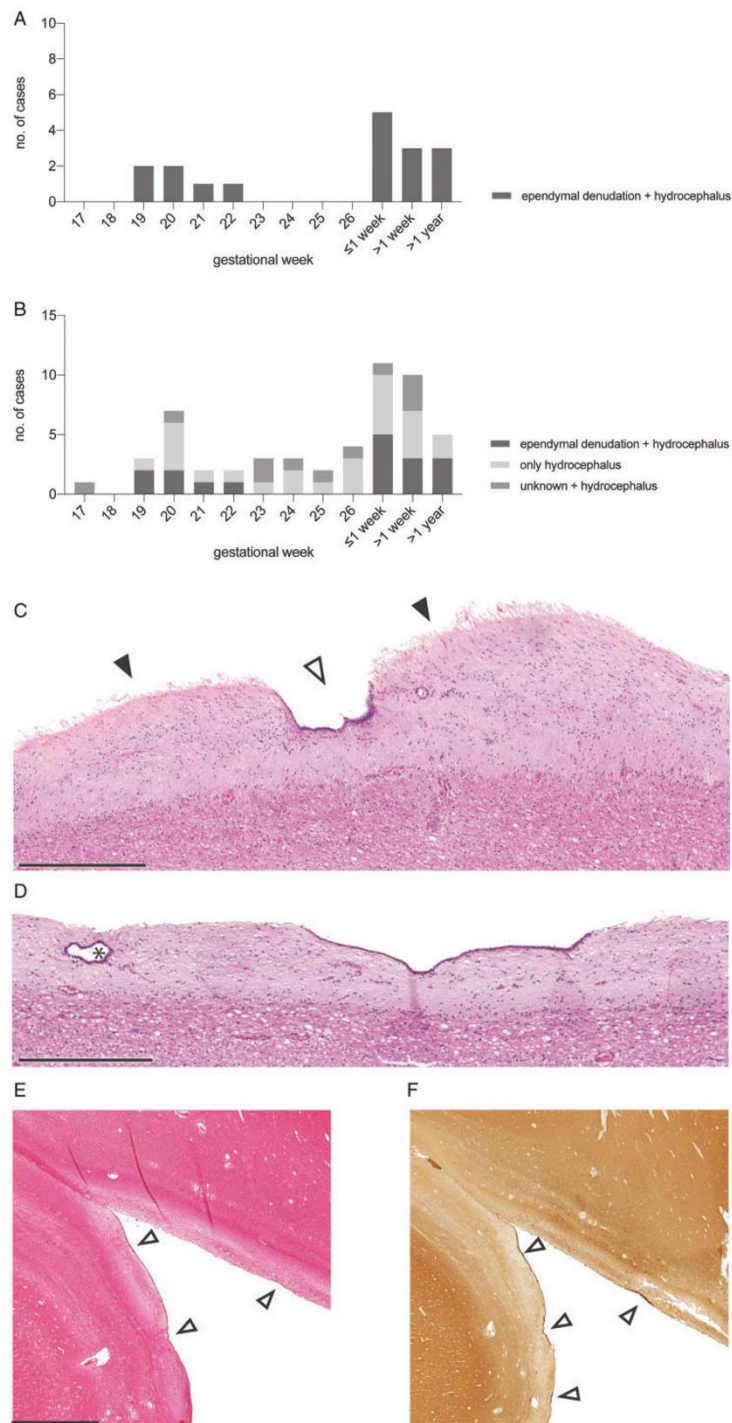


Figure 6. Ependymal denudation in SBA. A, Ependymal denudation in 29% of SBA cases and only in those with hydrocephalus. The two age peaks when ependymal denudation is present could explain the two theories of when ependymal denudation occurs. One peak from GW19-22 builds the group where a defect ependyma causes hydrocephalus while the second peak could be the group formed by ependymal injury as a result of hydrocephalus. B, Additional to A cases with only hydrocephalus and with unknown ependymal status are

(continued)

secretion through abnormal plexus epithelium. Of the two cases without hydrocephalus, one had ectopic plexus epithelium between the two occipital lobes and no choroid plexus in the ventricles and could as a consequence not develop a hydrocephalus even if born with atresia of the 4th ventricle (#50), and the other case was born with microcephaly (#79). Other malformations (Table 2) of the central nervous system (CNS) were detected in 39% of the cases (28/71) and include additional cephalic disorders (n = 10), neuronal anomalies (n = 12), anomalies of the limbic system (n = 6), nuclear anomalies (n = 3), malformations of the skull (n = 2) and the meninges (n = 2). Some of them are displayed in Supplemental Figure 3(A) to (D).

Two cases showed diffuse heterotopias in both hemispheres with prominent neuronal migration disorder (cases 4 and 50). Case 4 is a fetus from GW16 with unknown lumbo-sacral SBA and associated parieto-occipital cephalocele and amelia of the upper right extremity. The brain of this case showed a huge cephalocele in an extremely malformed brain, with hamartia and perivascular ossifications, diffuse heterotopias of the cerebellum and white matter, polymicrogyria of the gray matter and multiple ependymal rosettes (Supplemental Figure 3(A)). Case 50 is a fetus from GW19 with thoracic-lumbar myeloschisis and associated occipital-cervical cephalocele. Brain findings showed asymmetric hemispheres with a completely malformed left hemisphere, polymicrogyria, atresia of the 4th ventricle, ectopic choroid plexus, hippocampal anomaly, Chiari III malformation and multiple heterotopias and ependymal rosettes in the white matter. This is the case mentioned above where the ectopic plexus epithelium explains the missing hydrocephalic ventriculomegaly.

Discussion

In this study we systematically characterized neuropathological findings in the brains of 85 cases with SB (79 SBA, 6 SBO). Our main finding using neuropathologic methods is that brain malformations were present in most (95%) SBA cases, whereas none could be identified in SBO cases. Main brain anomalies identified were hydrocephalus (71%), Chiari II malformation (36%),

heterotopia (34%), cerebellar anomalies other than Chiari II (36%), gyrification defects (33%), and ependymal denudation (29%). In addition to our previous radiologic study,¹⁵ we now demonstrate the high prevalence of cerebellar and cerebral heterotopia in SBA. Also, we detected hydrocephalus without a Chiari II malformation in fetuses early in development, a finding that raises the question whether these develop parallel rather than in temporal sequence. The difficult detection of mild forms of hydrocephalus and Chiari II however challenge our statement and call for further, e.g., ultrasound-based studies. We also detected a high prevalence of associated anomalies not primarily affecting the CNS, but rather the lower limbs or the urogenital tract in 55% of the SBA cases. Limitations of this study coincide with the retrospective nature of the study and include incomplete histological specimen as well as limited genetic and imaging results at the time of collection of the cohort. Given the nature of the study on deceased subjects this could lead to a higher incidence of associated anomalies.

Our results support the strong association of Chiari II malformation and hydrocephalus.^{16–18} One of the youngest four cases presenting with a Chiari II malformation did not have a hydrocephalus at GW20, but may have developed it later on. This would sustain the idea that hydrocephalus develops as a result of Chiari II malformation.¹⁷ Following that theory of Chiari emergence, the presence of an open neural tube allows constant CSF loss resulting in failure of proper ventricular growth leading to inadequate and disorganized neural development and secondarily to mesenchymal defects like a small posterior fossa and a low-lying tentorium. Hydrocephalus is seen as a result of Chiari II due to maldevelopment of the CSF spaces and consequently abnormal CSF flow.^{16–18} However, half of the 53 cases with hydrocephalus (n = 27) in our cohort did not have an associated Chiari II malformation, and we detected hydrocephalus already as early as GW17 in one of these. This does not go along with the common belief of a Chiari-II-linked hydrocephalus-onset,^{17,37} i.e., they must have followed a different pathophysiology.

Newer, extended theories on the pathophysiology of hydrocephalus in SB argue that hydrocephalus results

Figure 6. Continued

listed. C, Gliotic nodules bulging into the ventricular lumen (solid arrows) adjacent to the intact ependyma (open arrow) show the denuded areas. Wall of a lateral ventricle of a hydrocephalic 14-year-old child with myelomeningocele, Chiari II and ependymal denudation (case #79, H&E, bar 500 μ m). D, Ependymal rosettes form in the subventricular zones devoid of ependymal lining (black star). Hematoxylin-eosin-stained section through the ventricular wall of a hydrocephalic 14-year-old child with myelomeningocele and Chiari II (case #79, H&E, bar 500 μ m). E and F, Immunostaining of ependymal lining and denudation in SBA: Sections through the wall of the lateral ventricle of a hydrocephalic 4-year-old child with myelomeningocele and Chiari II malformation (case #24) immunostained for acetylated tubulin. E, H&E stain showing nondenuded areas (open arrows) and denuded areas (bar 1 mm). F, The ependyma is reactive for acetylated tubulin showing nondenuded areas (open arrows, bar 1 mm). Abbreviations: GW, gestational weeks; H&E, hematoxylin-eosin.

from a primary alteration of the ependymal cell lineage^{21,22,38} rather than being only a consequence of it.^{23,39} A loss of ependymal lining preceding hydrocephalus has already been shown in a mouse model for long-lasting hydrocephalus (*Hyh* mutant mice).²⁴ In this line, Dominguez-Pinos et al. showed that ependymal detachment is associated with hydrocephalus and abnormal neurogenesis.²² Our finding of early ependymal denudation is supported by that of de Wit et al. who reported neuroepithelial denudation in fetuses with SBA already at GW16 even in absence of hydrocephalus and/or Chiari II malformation.²¹ Together, these results suggest that ependymal denudation may be associated with the onset of hydrocephalus. In addition, further pathomechanisms such as an obstruction to CSF flow or excess CSF production^{39,40} and defect ciliary function^{41–44} have been suggested and may also contribute to hydrocephalus. This may explain the 14 cases in our cohort associated neither with a loss of ependymal lining nor with a Chiari II malformation. Reversibility of hindbrain herniation following prenatal surgery suggest that part of the abnormalities associated to SB and Chiari II malformation is secondary to mechanical effects.⁴⁵ Prospective studies concentrating on the development of hydrocephalus at an early gestational age are a key to resolve the knowledge gap in causes leading to hydrocephalus.

Not only hydrocephalus and/or Chiari II were present in the cohort, but also further brain malformations arise in most (80%; 57/71) SBA cases. Totally and diffuse malformed brains were only present in 2 of our cases (cases 4 and 50) whereas the incidence of specific structural abnormalities was higher. We suggest there is an underlying malformative aspect in brain development explaining the associated anomalies in SBA.

Only four studies on postmortem neuropathological findings in SB focus on CNS malformations in SB.^{8,10,25,46} Concentrating only on hydrocephalus (71%) and Chiari II (36%) we now showed a higher incidence for these entities than Bell et al. who detected hydrocephalus in 52% and Chiari II in 57% of cases.²⁵ In comparison to these studies we showed a higher incidence of neuronal migration disorders such as heterotopias (34%) and gyrification disorders (33%) in our study in comparison to the 7% (4/56) frequency of dysplasia and polymicrogyria reported by others.¹⁰ Gilbert et al. also analyzed specific brain stem anomalies describing hypoplasia or aplasia of cranial nerve nuclei in 20% and other CNS malformations as disordered migration of cortical neurons (92%), cerebellar dysplasia (72%), fusion of the thalami (16%) and complete or partial agenesis of the olfactory tract and bulb (8%).⁸ Regarding the higher incidence of heterotopias and gyrification disorders for the latter study it has to be taken into account that criteria for included cases was MMC with Chiari II malformation and hydrocephalus. The

occurrence of holoprosencephaly in two fetuses with SBA in GW 17 and 30 is compelling since it implies cooccurring defects in neurulation and in diverticulation at different time points of embryogenesis. This was previously described by Osaka et al. in 18/92 (20%) myelochistic embryos,⁴⁶ but to our knowledge never in fetuses with SBA. Another novel finding was the association of Joubert syndrome with lumbar MMC. Ciliopathies such as Joubert syndrome and Meckel Gruber syndrome have been associated to NTDs, but particularly to cephaloceles⁴⁷ and not to lumbar NTDs. Many genes^{48–50} have been related to the development of Joubert syndrome and this new association underpins the question of a ciliopathic pathogenesis also for SB among the NTDs. Other neuropathological reports did not concentrate on SB explicitly but on NTDs in general bringing malformations other than those of the CNS, like urogenital, gastrointestinal or skeletal malformations, more into account.^{9,26,51} Associated anomalies not primarily affecting the CNS were previously described in 36% (n=15/42)²⁶ and 34% (n=10/29)⁵¹ while one study coincided with our data (55%, 21/38).⁹ Our results underline the importance of a separate analysis of SBA and SBO phenotypes, particularly given the differing prognosis of an affected child in light of associated malformations. The latter would be expected in SBO significantly less frequently than in SBA.^{15,25,52}

We here detected a high rate of cerebellar heterotopias (16%; 9/58). It has to be considered that of all heterotopias (n=20) most of them were located in the cerebellum (45%; 9/20). Histologic changes of the cerebellum being associated to SBA in our study consisted of hypoplasia of the cerebellum or isolated dysplasia or aplasia of the vermis, dysplasia of the dentate nucleus and/or gyrification disorders as well as heterotopias, heterotaxias and immature germinal cell collections already described by others⁸ while general Purkinje and granular cell depletion⁵³ was not further analyzed. Our findings are in line with those of Gilbert et al. describing frequent cerebellar heterotopias in patients with SBA.⁸ While the relevance of cerebellar heterotopias – that are usually not apparent in MRIs – is unclear,¹⁴ they could be an explanation for ataxia often visible in SBA patients.⁵⁴ It has to be considered that cerebellar heterotopias are observed in various developmental abnormalities of the CNS but are also not uncommon in normal developing brains.¹⁹

Understanding SB pathomechanism including the sequence of occurrence of brain malformations in affected individuals is important, also in view of the promising approach to repair neural tube defects in utero.^{45,55} Current data that are based on limited observation periods and only small cohorts suggest that prenatal SBA surgery reduces but not eliminates the need for shunting

and improves motor outcomes as well as it results in reversal of hindbrain herniation (the Chiari II malformation)^{45,55} which could be interesting regarding the intelligence quotients in SBA. To our knowledge there is no data on the brain pathology apart from Chiari II and hydrocephalus in such operated patients. Since hydrocephalus and shunting complications are associated with and potentially cause low IQ values^{56,57} further data on brain morphology and the cognitive profile of individuals with SBA following in utero closure are urgently needed. Moreover, it needs to be considered that a hydrocephalus can occur early, and that ependymal denudation can indicate hydrocephalus onset and generate cerebral pathology before an intrauterine repair in the GW19-26.

Conclusion

In conclusion we show that a wide range of cerebral malformations can be present in SBA patients in addition to the NTD. Not all of these are detected by MRI. We further show that hydrocephalus and Chiari II malformation can occur together or independent from each other. This finding challenges the usual hypothesis of sequential occurrence, but further analysis is limited due to difficult detection of mild forms of hydrocephalus and Chiari II. In prenatal NTD surgery it has to be considered that hydrocephalus can develop very early, even before GW19 when in utero surgery is usually performed. Prospective studies on the occurrence of brain malformations and hydrocephalus in individuals with SBA from early gestational age following prenatal surgery and in unoperated controls with NTDs are essential to resolve the knowledge gap in causes leading to hydrocephalus and the effect of abnormal CSF flow. The pathophysiology of SB is multifactorial. Correct phenotype nomenclature, further data on the sequence of prenatal malformation occurrence coupled with genotyping using modern genetic techniques will surely lead to a better knowledge on SB subtypes and pathophysiology. This will guide our future therapies.

Acknowledgments

We thank the staff of the Institute of Neuropathology and Pathology who in the years 1974-2000 closely analyzed and documented the findings of fetuses with SB. We also thank Dr. Meske for his help and introduction in using a very new high-resolution scanner for histological specimen and the team of the Institute of Cell and Neurobiology for continuous support.

Author Contributions

AMK and GSD were responsible for the project conception. FP and AMK wrote the manuscript. FP, KHS and GSD collected patient data and incorporated them into a database. FP and KHS

analyzed the data. GSD, JS and MH critically reviewed the data. All authors read, revised, and approved the final manuscript.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.


Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID iD

Fabienne Paschereit  <https://orcid.org/0000-0003-2159-5077>

Supplemental Material

Supplemental material for this article is available online.

References

1. Detrait ER, George TM, Etchevers HC, Gilbert JR, Vekemans M, Speer MC. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicol Teratol.* 2005;27:515–524.
2. Copp AJ, Stanier P, Greene ND. Neural tube defects: recent advances, unsolved questions, and controversies. *Lancet Neurol.* 2013;12:799–810.
3. Adzick NS. Fetal myelomeningocele: natural history, pathophysiology, and in-utero intervention. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15:9–14.
4. Copp AJ, Adzick NS, Chitty LS, Fletcher JM, Holmbeck GN, Shaw GM. Spina bifida. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15007.
5. Schindelmann KH, Paschereit F, Steege A, Stoltenburg-Didinger G, Kaindl AM. Systematic classification of spina bifida. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2021;80:294–305.
6. Pang D, Zovickian J, Wong ST, Hou YJ, Moes GS. Limited dorsal myeloschisis: a not-so-rare form of primary neurulation defect. *Childs Nerv Syst.* 2013;29:1459–1484.
7. Mitchell LE, Adzick NS, Melchionne J, Pasquariello PS, Sutton LN, Whitehead AS. Spina bifida. *Lancet.* 2004;364:1885–1895.
8. Gilbert JN, Jones KL, Rorke LB, Chernoff GF, James HE. Central nervous system anomalies associated with meningomyelocele, hydrocephalus, and the Arnold-Chiari malformation: reappraisal of theories regarding the pathogenesis of posterior neural tube closure defects. *Neurosurgery.* 1986;18:559–564.
9. Nielsen LA, Maroun LL, Broholm H, Laursen H, Graem N. Neural tube defects and associated anomalies in a fetal and perinatal autopsy series. *APMIS.* 2006;114:239–246.
10. Pinar H, Tatevosyants N, Singer DB. Central nervous system malformations in a perinatal/neonatal autopsy series. *Pediatr Dev Pathol.* 1998;1:42–48.

11. Juranek J, Fletcher JM, Hasan KM, et al. Neocortical reorganization in spina bifida. *Neuroimage*. 2008;40:1516–1522.
12. Dubeau F, Tampieri D, Lee N, et al. Periventricular and subcortical nodular heterotopia. A study of 33 patients. *Brain*. 1995;118(Pt 5):1273–1287.
13. Hino-Shishikura A, Niwa T, Aida N, Okabe T, Nagaoka T, Shibasaki J. Periventricular nodular heterotopia is related to severity of the hindbrain deformity in Chiari II malformation. *Pediatr Radiol*. 2012;42:1212–1217.
14. Hori A. Causes of neuronal heterotopia other than migration disturbances. *Neuropathology*. 2006;26:540–543.
15. Schneider J, Mohr N, Aliatakis N, et al. Brain malformations and cognitive performance in spina bifida. *Dev Med Child Neurol*. 2021;63:295–302.
16. McLone DG, Dias MS. The Chiari II malformation: cause and impact. *Childs Nerv Syst*. 2003;19:540–550.
17. McLone DG, Knepper PA. The cause of Chiari II malformation: a unified theory. *Pediatr Neurosci*. 1989;15:1–12.
18. Shuman RM. The Chiari malformations: a constellation of anomalies. *Semin Pediatr Neurol*. 1995;2:220–226.
19. Friede RL. *Developmental Neuropathology*. 2nd ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1978.
20. Sarnat HB. Role of human fetal ependyma. *Pediatr Neurol*. 1992;8:163–178.
21. de Wit OA, den Dunnen WF, Solle KM, et al. Pathogenesis of cerebral malformations in human fetuses with meningomyelocele. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2008;5:1–9.
22. Dominguez-Pinos MD, Paez P, Jimenez AJ, et al. Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64:595–604.
23. Sarnat HB. Ependymal reactions to injury. A review. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54:1–15.
24. Jimenez AJ, Tome M, Paez P, et al. A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyl mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60:1105–1119.
25. Bell JE, Gordon A, Maloney AFJ. The association of hydrocephalus and Arnold-Chiari malformation with spina bifida in the fetus. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1980;6:29–39.
26. Schoner K, Axt-Fliedner R, Bald R, et al. Fetal pathology of neural tube defects—an overview of 68 cases. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2017;77:495–507.
27. Copp AJ, Greene ND. Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol*. 2010;220:217–230.
28. Krupp DR, Soldano KL, Garrett ME, Cope H, Ashley-Koch AE, Gregory SG. Missing genetic risk in neural tube defects: can exome sequencing yield an insight? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2014;100:642–646.
29. Miller E, Widjaja E, Blaser S, Dennis M, Raybaud C. The old and the new: supratentorial MR findings in Chiari II malformation. *Childs Nerv Syst*. 2008;24:563–575.
30. Krishnan P, Raybaud C, Palasamudram S, Shroff M. Neuroimaging in pediatric hydrocephalus. *Indian J Pediatr*. 2019;86:952–960.
31. Chen FC, Gerhardt J, Entezami M, Chaoui R, Henrich W. Detection of spina bifida by first trimester screening—results of the prospective multicenter Berlin IT-study. *Ultraschall Med*. 2017;38:151–157.
32. Cameron AH. The Arnold-Chiari and other neuro-anatomical malformations associated with spina bifida. *J Pathol Bacteriol*. 1957;73:195–211.
33. Bekiesinska-Figatowska M, Duczkowska A, Bragoszewska H, Duczkowski M, Mierzewska H. Stenogyria—not only in Chiari II malformation. *J Neurol Sci*. 2014;347:337–340.
34. Crome L. Microgyria. *J Pathol Bacteriol*. 1952;64:479–495.
35. McLendon RE, Crain BJ, Oakes WJ, Burger PC. Cerebral polygyria in the Chiari Type II (Arnold-Chiari) malformation. *Clin Neuropathol*. 1985;4:200–205.
36. Barkovich AJ, Raybaud C. *Pediatric Neuroimaging*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
37. Jeelani Y, McComb JG. Congenital hydrocephalus associated with myeloschisis. *Childs Nerv Syst*. 2011;27:1585–1588.
38. Sival DA, Guerra M, den Dunnen WF, et al. Neuroependymal denudation is in progress in full-term human foetal spina bifida aperta. *Brain Pathol*. 2011;21:163–179.
39. Di Curzio D. Neuropathological changes in hydrocephalus—a comprehensive review. *Open J Modern Neurosurg*. 2018;8:1–29.
40. Del Bigio MR. Neuropathology and structural changes in hydrocephalus. *Dev Disabil Res Rev*. 2010;16:16–22.
41. Banizs B, Pike MM, Millican CL, et al. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development*. 2005;132:5329–5339.
42. Flicgauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:880–893.
43. Louvi A, Grove EA. Cilia in the CNS: the quiet organelle claims center stage. *Neuron*. 2011;69:1046–1060.
44. Youn YH, Han YG. Primary cilia in brain development and diseases. *Am J Pathol*. 2018;188:11–22.
45. Adzick NS, Thom EA, Spong CY, et al. A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *N Engl J Med*. 2011;364:993–1004.
46. Osaka K, Tanimura T, Hirayama A, Matsumoto S. Myelomeningocele before birth. *J Neurosurg*. 1978;49:711–724.
47. Seidahmed MZ, Abdelbasit OB, Shaheed MM, et al. Genetic, chromosomal, and syndromic causes of neural tube defects. *Saudi Med J*. 2014;35 Suppl 1:S49–S56.
48. Bader I, Decker E, Mayr JA, et al. MKS1 mutations cause Joubert syndrome with agenesis of the corpus callosum. *Eur J Med Genet*. 2016;59:386–391.
49. Abdelhamed ZA, Wheway G, Szymanska K, et al. Variable expressivity of ciliopathy neurological phenotypes that encompass Meckel-Gruber syndrome and Joubert syndrome is caused by complex de-regulated ciliogenesis, Shh and Wnt signalling defects. *Hum Mol Genet*. 2013;22:1358–1372.
50. Li Y, Tian X, Ma M, et al. Deletion of ADP ribosylation factor-like GTPase 13B leads to kidney cysts. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:3628–3638.

51. Toru HS, Sanhal CY, Uzun OC, Ocak GA, Mendilcioglu I, Karaveli FS. Associated anomalies with neural tube defects in fetal autopsies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29:798–802.
52. Russell DS, Donald C. The mechanism of internal hydrocephalus in spina bifida. *Brain.* 1935;58:203–215.
53. Sav A. *Spina bifida: Management and Outcome.* 1st ed. Milan, Italy: Springer-Verlag; 2008.
54. Dennis M, Salman MS, Juranek J, Fletcher JM. Cerebellar motor function in spina bifida meningocele. *Cerebellum.* 2010;9:484–498.
55. Mohrlen U, Ochsenbein-Kolble N, Mazzone L, et al. Benchmarking against the MOMS trial: Zurich results of open fetal surgery for spina bifida. *Fetal Diagn Ther.* 2020;47(2):91–97.
56. Mapstone TB, Rekate HL, Nulsen FE, Dixon MS Jr, Glaser N, Jaffe M. Relationship of CSF shunting and IQ in children with myelomeningocele: a retrospective analysis. *Childs Brain.* 1984;11:112–118.
57. Alimi Y, Iwanaga J, Oskouian RJ, Loukas M, Tubbs RS. Intelligence quotient in patients with myelomeningocele: a review. *Cureus.* 2018;10:e3137.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

1. Schindelmann KH, Paschereit F, Steege A, Stoltenburg-Didinger G*, Kaindl AM*. Systematic Classification of Spina Bifida. J Neuropathol Exp Neurol. 2021;80(4):294-305.

(* gleichberechtigte Senior-Autorenschaft)

(<https://doi.org/10.1093/jnen/nlab007>)

Impact Faktor bei Einreichung: 2,923

Impact Faktor 2021: 3,148

2. Paschereit F, Schindelmann KH, Hummel M, Schneider J, Stoltenburg-Didinger G*, Kaindl AM*. Cerebral Abnormalities in Spina Bifida: A Neuropathological Study. Pediatr Dev Pathol. 2022;25(2):107-23.

(* gleichberechtigte Senior-Autorenschaft)

(<https://doi.org/10.1177/10935266211040500>)

Impact Faktor bei Einreichung: 0,885

Impact Faktor 2021: 2,266

Außerdem Posterbeiträge auf folgenden Kongressen:

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ) und der Gesellschaft für Neuropädiatrie in München 2019:

Paschereit F*, Schindelmann KH*, Stoltenburg-Didinger G, Kaindl AM. Neuropathological findings in Spina bifida patients.

(* gleichberechtigte Erstautorenschaft)

Europäischer Kongress für Neuropathologie (online) 2021:

Schindelmann KH, Paschereit F, Stoltenburg-Didinger G, Kaindl AM. Systematic classification of Spina bifida phenotypes.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Promotion begleitet, stets unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuerinnen Prof. Dr. Angela M. Kaindl und Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger für die hervorragende Betreuung und außergewöhnliche Förderung. Durch ihre unermüdliche Unterstützung bei der Befundung jedes einzelnen Falls und ihre enorme Erfahrung hat Prof. Dr. Gisela Stoltenburg-Didinger maßgeblich zu dieser Doktorarbeit, aber auch zu meiner fachlichen und persönlichen Weiterentwicklung beigetragen. Für methodische Unterstützung, wertvolle Anregungen und Korrekturen der Publikation und dieser Dissertation sowie ein immer offenes Ohr bedanke ich mich herzlichst bei Prof. Dr. Angela M. Kaindl.

Außerdem möchte ich mich bei Fabienne Paschereit für die außerordentlich gute Zusammenarbeit während der intensiven Zeit der Promotion, die gegenseitige Motivation und die vielen Gespräche bedanken. Darüber hinaus danke ich allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe des Instituts für Zell- und Neurobiologie, besonders Ethiraj Ravindran, Lena-Luise Becker und unserer MTA Jessica Fassbender für die stetigen Hilfestellungen, Anregungen und den wissenschaftlichen sowie persönlichen Austausch. Zudem gilt mein Dank Gabriela Korus für die Unterstützung bei histologischen Färbungen, Dr. Volker Meske für die Einarbeitung und Hilfe beim Scannen der Schnitte, sowie Corinna Naujok für die Erstellung der schematischen Zeichnungen.

Die Förderung der Sonnenfeld-Stiftung in Form eines Stipendiums hat es mir ermöglicht mich ganz der Forschung und dieser Promotionsarbeit zu widmen. Für diese Möglichkeit möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Mein außerordentlicher Dank geht zudem an die Patient*innen und ihre Familien, die an dieser Studie beteiligt waren. Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeiter*innen des Instituts für Neuropathologie, die durch ihre Arbeit diese Promotion ermöglicht haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freundeskreis für ihre große Unterstützung, Zuspruch in schwierigen Phasen, Rückhalt und Geduld danken.

Ohne sie wäre ich nicht da, wo ich heute bin.