

Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie
der Universität Tübingen
Abteilung Neuropathologie
Direktorin: Professor Dr. M. Neumann

Myogenese in humanen Muskelbiopsien mit neurogener
Atrophie – eine immunhistochemische Studie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Carola Elisabeth Neher

aus

Göttingen

2012

Dekan:

Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter:

Frau Professor Dr. A. Bornemann

2. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Ruck

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Skelettmuskel	1
1.2	Denervation	3
1.2.1	Histologie der chronischen neurogenen Atrophie	4
1.3	Regeneration von geschädigtem nicht denerviertem Muskelgewebe	4
1.4	Regenerationsversuche des Muskelgewebes bei anhaltender Denervation	8
1.5	Die Expression der Myosinisoformen	11
1.6	Warum Anti-MHCn als Marker? (MyosinHeavyChainneonatal) . . .	13
1.7	Ziele der vorliegenden Arbeit	13
2	Material und Methodik	15
2.1	Die Muskelbiopsien	15
2.1.1	Auswahlkriterien und Entnahme	15
2.1.2	Die Muskelbiopsien	16
2.1.3	Anfertigung der Stufenschnitte	17
2.2	Die Färbungen	17
2.2.1	Grundprinzipien der Immunhistochemischen Färbung nach der ABC-Methode	17
2.2.2	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	18
2.2.3	Der Primärantikörper	19
2.2.4	Der Sekundärantikörper	19
2.2.5	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität	20
2.2.6	Färbung mit dem AB-Komplex	20
2.2.7	DAB Entwicklung	20

Inhaltsverzeichnis

2.2.8	Entwässern	20
2.2.9	Eindeckeln	20
2.3	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen	21
2.3.1	TBS-Stammlösung	21
2.3.2	TBS/BSA-Lösung	21
2.3.3	Substratpuffer	21
2.3.4	DAB-Lösung	21
2.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	21
2.5	Mikroskopie	22
2.6	Auswertung der Daten	23
2.6.1	Statistikprogramm	23
2.6.2	Vorbereitung der Daten	23
2.6.3	Statistische Größen und Tests	23
3	Ergebnisse	26
3.1	Morphologische Beobachtungen	26
3.1.1	Stufenschnitte	28
3.2	Die Häufigkeit des Auftretens von MHCn-positiven kleinen Fasern bei neurogener Muskelatrophie	32
3.3	Anzahl der kleinen Fasern pro Biopsie	32
3.4	Länge der kleinen Fasern	33
3.5	Die Ausrichtung der kleinen Fasern	35
3.6	Der Durchmesser der kleinen Fasern	35
3.6.1	Der Minimaldurchmesser	35
3.6.2	Der Maximaldurchmesser	36
3.7	Die Kerne der kleinen Fasern	38
3.7.1	Aufsuchen und Zuordnen der Kerne zu den kleinen Fasern	38
3.7.2	Anzahl der Kerne in den kleinen Fasern	40
3.8	Weiterführende Analyse der Fasermorphologie	41
3.8.1	Profile	43
3.8.2	Die Rauigkeit der Fasern	44

3.8.3	Kernverteilung im Verhältnis zum maximalen Faserdurchmesser	45
3.8.4	Der Kerngehalt in rauen und glatten Fasern	46
3.8.5	Autokorrelation der Kerne	47
3.8.6	Rauigkeit der einzelnen Fasern und der Kernhaufen	48
3.8.7	Einfluss des maximalen Faserdurchmessers auf die Faserlänge	49
3.8.8	Verhältnis zwischen Kerndichte und Faserlänge	50
4	Diskussion	52
4.1	Morphologie der kleinen Fasern	52
4.1.1	Der Verlauf und die Lage der kleinen Fasern	56
4.1.2	Die Länge der kleinen Fasern	57
4.1.3	Der Minimaldurchmesser	58
4.1.4	Der Maximaldurchmesser	58
4.1.5	Die Kernverteilung	59
4.2	Weiterführende Analyse der Fasermorphologie	60
4.2.1	Die Rauigkeit der Faserprofile	60
4.2.2	Kernverteilung in Abhängigkeit von anderen Faserparametern und Verteilung der Kernhaufen	61
4.2.3	Die Länge der kleinen Fasern in Abhängigkeit von Faserprofil und Kernhaufen	62
5	Zusammenfassung	63
	Abkürzungsverzeichnis	66
	Abbildungsverzeichnis	67
	Tabellenverzeichnis	69
	Literaturverzeichnis	70
	Danksagung	76

Inhaltsverzeichnis

Lebenslauf

77

1 Einleitung

Muskel und Nerv bilden eine funktionelle Einheit. Kommt es durch Krankheit oder Verletzung zur Schädigung des motorischen Nervs, beginnen sehr schnell Um- und Abbaureaktionen des Muskelgewebes.

Beim Studium denervierter Muskeln wurde in der Vergangenheit von mehreren Arbeitsgruppen das Auftreten neu gebildeter kleiner Muskelfasern beschrieben. Dabei handelte es sich meist um Muskeln von Versuchstieren. Diese vermutlich neu aufgetretenen Fasern führen jedoch letztlich nicht zu einer effektiven Bildung von funktionsfähigen adulten Muskelfasern bzw. zur Regeneration des atrophierten Muskels.

In einer neueren Arbeit, in der humane Muskelbiopsien von Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen wie ALS und Polyneuropathie mit Antikörpern gegen MHCn (Myosin Heavy Chain neonatal) und NCAM (Neural Cell adhesions molecule) gefärbt wurden, wurden ebenfalls kleine, MHCn-positive Fasern beschrieben. Diese sind aufgrund ihres Expressionsmusters nicht mit Degeneration zu erklären. Es wurde angenommen, dass es sich auch hier, in humanem Muskelgewebe, um neu gebildete Muskelfasern handelt, die zuvor nur bei Muskeln von Nagetieren beschrieben worden waren [29]. Die vorliegende Arbeit nimmt auf diese Arbeit Bezug und beschäftigt sich mit der genaueren Beschreibung dieser kleinen Fasern in humanen Muskelbiopsien.

1.1 Der Skelettmuskel

Die Skelettmuskulatur ist aus vielen Einzelfasern aufgebaut. Jede Faser ist ein mehrkerniges Synzytium. Das zwischen den Fasern liegende Bindegewebe wird Endomysium genannt. Die einzelnen Fasern sind zu Bündeln (Faszikel) zusammengefasst, die von Bindegewebe (Perimysium) umgeben sind. Viele dieser Bün-

Einleitung

del zusammengefasst bilden den Muskel, der ebenfalls von einer Bindegewebschicht umgeben ist, dem Epimysium.

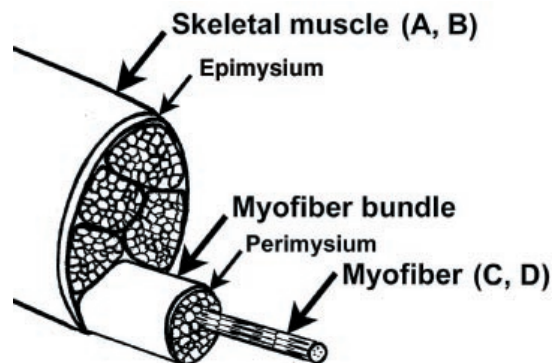


Abbildung 1.1: Muskelaufbau. Nach Chargé und Rudnicki [10]

Die Anzahl der Muskelfasern eines Individuums ist schon vor der Geburt festgelegt und ändert sich in der Regel im Laufe des Lebens nur wenig. Ist der Muskel erst einmal angelegt, findet Muskelwachstum lediglich in die Länge durch Anfügen von Sarkomeren am Sehnenansatz oder durch Umfangszunahme der einzelnen Muskelfasern in die Breite statt [6]. Der Muskel wird in der Embryonal- und Fetalperiode durch Fusion von myogen determinierten einkernigen Vorläuferzellen (Myoblasten) gebildet, die sich zu mehrkernigen nicht mehr teilungsfähigen Synzytien zusammenschließen (Myotuben). Diese differenzieren dann weiter zu adulten Muskelzellen aus [10].

Obwohl die menschliche Skelettmuskulatur im Laufe des Lebens in der Regel nicht neu angelegt wird, befinden sich an den Muskelfasern innerhalb der Basalmembran kleine, spindelförmige einkernige Zellen, die als Muskelstammzellen fungieren. Sie werden Satellitenzellen genannt. Diese werden bei Verletzung zur Teilung angeregt und fusionieren wieder zu vielkernigen Muskelfasern. (Siehe auch Kapitel 1.4)

Innerhalb der Muskelfasern befinden sich längs zur Muskelfaser die 1-2µm dicken Myofibrillen, die aus den aneinander gereihten 2,5-3 µm langen Funktionseinheiten, den Sarkomeren, aufgebaut sind. Die Sarkomere sind vorwiegend aus einem dicken Filament, dem Myosin (15-18 nm) und einem dünnen Filament, dem Aktin (6-7 nm), aufgebaut. Sie greifen ineinander und bilden den kontraktilem Apparat.

Neben diesen an der Kontraktilität beteiligten Proteinen befindet sich im Sarkomer noch ein weiteres häufiges Protein, das Titin, welches vor allem stabilisierende Funktion hat [8].

Die Muskelfasern können funktionell in mehrere Fasertypen eingeteilt werden. Sie unterscheiden sich durch die Schnelligkeit ihrer Zuckung und durch unterschiedliche Ermüdbarkeit. Es handelt sich bei den langsamen, Typ-I-Fasern eher um Haltemuskulatur, z. B. des Rückens und bei den schnellen Typ-II-Fasern um Muskulatur der Gliedmaßen, die zur schnellen Reaktion fähig sein sollen. Die Schnelligkeit der Muskelzuckung hängt vor allem von der jeweils exprimierten Myosinform ab, wobei sich die Subtypen in ihrer Myosin-ATPase-Aktivität unterscheiden. Die Myosine schneller Muskeln (Typ-IIa-Fasern und Typ-IIb-Fasern) spalten mehr ATP pro Zeiteinheit als die Myosine langsamer Muskeln (Typ-I-Fasern). Welche der Myosinisoformen in einem Muskel exprimiert werden, hängt von dem jeweiligen Motoneuron ab, das diesen Muskel innerviert. Es gibt verschiedene Klassen von Motoneuronen, die durch das Muster ihrer Reizübertragung diese Differenzierung bewirken [6].

1.2 Denervation

Als Denervation wird der komplette oder partielle Funktionsverlust eines Organs nach Durchtrennung oder Schädigung seiner motorischen Nerven bezeichnet.

Wird ein Muskel von seinem motorischen Nerv getrennt, beginnen sehr schnell Umbau und Abbau des Muskelgewebes, was als neurogene Atrophie bezeichnet wird.

Bereits in den ersten sieben Tagen nach Denervation ist ein Rückgang an kontraktilen Filamenten und eine Desorganisation der Querstreifung zu beobachten. Innerhalb eines Monats verringert sich das Faserkaliber bereits um ein Drittel, nach 2 bis 3 Monaten um ungefähr 60% und nach 8 Monaten um 70%, wenn man diese Werte mit dem Faserdurchmesser normaler Muskeln vergleicht. Der Gewichtsverlust im denervierten Muskel beträgt bei der Ratte schon nach 3 Monaten 70-80% [26]. Im Verhältnis zu dieser starken Substanzabnahme der Mus-

Einleitung

kelfasern nach Denervation ändert sich die Anzahl der Muskelfasern im Verhältnis nur wenig. Bei kompletter Durchtrennung des motorischen Nervs zeigt sich das soeben beschriebene Bild der Atrophie. Anders verhält es sich bei chronischen neurogenen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Polyneuropathie oder ALS. Hier kommt es durch ständige Nervenfaserverdegeneration und -regeneration im Laufe von Monaten und Jahren zu einem Nebeneinander von kurz- und langzeitdenervierten Muskelfasern in verschiedenen Stadien der De- und Regeneration [8].

1.2.1 Histologie der chronischen neurogenen Atrophie

In der Muskelbiopsie findet sich bei chronischer neurogener Atrophie ein Nebeneinander von typischen Denervations- und Reinnervationszeichen.

Charakteristisch sind atrophe Fasern, die in Gruppen oder netzförmig zwischen normal großen Fasern liegen. Die atrophischen Fasern sind im Querschnitt abgeflacht und eckig, sog. angulär-atrophe Fasern. Diese angulär-atrophischen Fasern stellen nach Denervation geschrumpfte Fasern dar und sind typisch nach kurzer Zeit stattgefundener Denervation [25]. Liegen zwischen 15 und 50 Fasern gleichen Fasertyps zusammen, spricht man von Fasertypengruppierung. Sie ist ein typisches Zeichen für chronische neurogene Atrophie. Man geht in diesem Fall von einer kollateralen Reinnervation der denervierten Muskelfaser aus, wodurch alle Fasern, die von einem Nerventyp innerviert werden auch den gleichen Muskelfasertyp annehmen, d.h. die gleiche Myosinisoform exprimieren [17]. Die normale schachbrettartige Verteilung der Muskelfasern wird dadurch aufgehoben [8].

Für chronisch denervationsgeschädigten Muskel sind desweiteren Kernhaufen, sog. „nuclear-clumps“ typisch. Die einzelnen Kerne sind stark gefärbt und pyknotisch. Die Kernhaufen treten entlang bereits atrophierter Fasern auf [50].

1.3 Regeneration von geschädigtem nicht denerviertem Muskelgewebe

Obwohl Skelettmuskelfaserkerne nicht mehr teilungsfähig sind hat Skelettmuskelgewebe das Potential zur Regeneration. Im Normalzustand ist der Skelettmuskel

ein sehr wenig regeneratives Gewebe mit einem sehr niedrigen Prozentsatz an Zellerneuerung [22]. Die Muskelzellkerne werden als postmitotisch bezeichnet.

Kommt es jedoch zur Verletzung durch ein direktes Trauma, genetischen Defekt oder Nervenschaden beginnen sehr schnell und umfangreich Regenerationsprozesse.

Der Anfang des Regenerationsprozesses ist geprägt von Nekrose der geschädigten Fasern. Im Muskel der Ratte wurde beobachtet, dass Nekrose und Phagozytose im geschädigten Gewebe sehr rasch einsetzen und bereits nach 2 Tagen abgeschlossen sind [20]. Generell kommt es durch Verletzung zu Permeabilitätsveränderung der Zellmembran und zum Austritt von muskelspezifischen Proteinen, wie z.B. der Kreatinkinase. Außerdem wurde vermutet, dass es zu einem Calciumeinstrom in die Muskelzelle kommt und die dadurch gestörte Calciumhomöostase der Zelle zu proteolytischen und apoptotischen Prozessen in der Zelle führt [41]. Der ganze Ablauf der Muskelregeneration ist einer hochkomplexen Regulation der Proliferation und Differenzierung unterworfen, die von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Neben Substanzen aus defektem Muskelgewebe werden freigesetzte Stoffe aus Makrophagen diskutiert, aber auch Faktoren aus umgebenden Geweben scheinen eine Rolle zu spielen. Im Experiment wurden bisher Stoffe aus verschiedensten Familien der interzellulär regulatorischen Substanzen identifiziert, u.a. einige Unterformen von Wachstumsfaktoren aus verschiedenen Geweben, Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-6 aus der Familie der Cytokine, aus dem Nervengewebe stammende Faktoren und ATP, um nur einige zu nennen. Diese Stoffe wurden in vitro einzeln oder in Kombination auf ihren Einfluss auf Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen hin getestet. Auch wenn für viele dieser Stoffe ein Einfluss auf die Regeneration von Muskeln festgestellt wurde, so ist die Regulation dieses Prozesses auf molekularer Ebene noch nicht abschließend geklärt [10].

Der erste Schritt der Regenerationsphase ist von Nekrose und Phagozytose geprägt (s.o.). Anschließend kommt es zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe und dann zur Einwanderung von Makrophagen, die in dieser Phase zur dominierenden Entzündungszellpopulation werden. Sie sind vor allem

Einleitung

mit dem Abtransport von Zellfragmenten beschäftigt. Es werden aber auch andere Aufgaben der Makrophagen in der Aktivierung von weiteren Faktoren im Regenerationsprozess vermutet [10] [16]

In der nächsten Phase kommt es zur Aktivierung und Anlockung von Satellitenzellen. Satellitenzellen sind ruhende spindelförmige mononukleare Zellen, mit reduzierten Zellorganellen und wenig Zytoplasma. Sie sind eindeutig durch ihre Lage zwischen der Basalmembran und der Basementmembran von Muskelfasern zu identifizieren [13] [14] [1] [5][15].

Betrachtet man alle Zellkerne die sich innerhalb der Basalmembran einer Muskelfaser befinden, handelt es sich in humanem Gewebe bei ca. 4-8 % der Kerne um Satellitenzellen [23]. Bischoff spricht von 2-3 Satellitenzellen pro 100 Muskelzellkernen [37].

Der Kontakt der Satellitenzellen zur adulten Muskelfaser scheint die mitotische Teilung der Satellitenzellen zu verhindern und lässt die Zellen in der G0 Phase verweilen [39][38].

Bei der Betrachtung einzelner adulter Muskelfasern in Ruhe fällt auf, dass es eine Häufung von Satellitenzellen im Bereich der neuromuskulären Endplatte und entlang von Kapillaren gibt [24] [28]. Außerdem sind die Satellitenzellen nicht gleichmäßig auf die verschiedenen Fasertypen verteilt. Am häufigsten wurden sie auf Typ IIA Fasern und zu etwa gleichen Teilen auf Typ IIB und Typ I Fasern beobachtet [32].

Erreicht die ruhenden Satellitenzellen bei Muskelschädigung ein Proliferationsreiz, so ist der erste Schritt der zellulären Regeneration die Aktivierung der Satellitenzellen. Dies äußert sich strukturell in der Vermehrung des Zytoplasmas und der Zellorganellen, des rauen endoplasmatischen Retikulums und an der kleinen Anzahl abgerundeter Mitochondrien. Dabei werden nicht nur Satellitenzellen direkt an der geschädigten Stelle aktiviert, sondern es werden weitere Satellitenzellen angelockt, die dann entlang der Muskelfaser in den geschädigten Bereich einwandern [13].

Es folgt die Proliferation der Satellitenzellen. Nach mehreren Teilungszyklen fusioniert ein Großteil der Satellitenzellen entweder direkt mit der geschädigten

Muskelfaser oder mit anderen Myoblasten, und bildet so eine komplett neue Faser. Diese Myotuben, die sich nach 2-4 Monaten nach Denervation unter der Basalmembran gebildet haben, enthalten noch keine Myofibrillen. Dies könnte daraufhin deuten, dass der Kontakt zur adulten Faser die Ausdifferenzierung unterbindet. In späteren Stadien der Atrophie (12-18 Monate nach Denervation) zeigen einige neue Fasern durchaus ausdifferenzierte kontraktile Strukturen [3]. In einer Arbeit von Schmalbruch, in der es um die Regeneration von Muskelgewebe nach Verletzung geht, stellt er 4 Wege vor, auf denen er Muskelregeneration beobachtet hat (siehe Abbildung 4.1, S. 66). Erstens die Neubildung einer Muskelfaser innerhalb der Basalmembran der geschädigten Muskelfaser. Dies ist der von ihm am häufigsten beobachtete Fall. Zweitens die Fusion von Myoblasten mit überlebenden Fragmenten der geschädigten Muskelfaser. Drittens das gehäufte Auftreten von Myoblasten zwischen der Basalmembran und der Basallamina der geschädigten Faser und Neubildung einer Faser in diesem Zwischenraum. Viertens die Fusion von Myoblasten zu Muskelfasern außerhalb der Basalmembran. Letztere Fasern waren zwei Wochen nach der Läsion noch wenig entwickelt und trugen nur wenig zur Muskelmasse bei. Es blieb unklar, ob sie sich aus Satellitenzellen oder aus anderen Stammzellen gebildet hatten [20].

Auch Borisov hat in elektronenmikroskopischen Aufnahmen die direkte Fusion von Satellitenzellen mit geschädigten differenzierten Muskelfasern beobachtet. Von Borisov wird darauf hingewiesen, dass trotz intensiver Suche keine mitotischen Satellitenzellen in ihrer normalen Lage unter der Basalmembran beobachtet werden konnten, außerhalb im Interzellularraum jedoch schon. Letztlich bleibt die Frage offen, woher die steigende Anzahl von Satellitenzellen bei denervierten Muskelzellen stammt [3].

Die Dichte der Satellitenzellen ist stark abhängig vom Alter des Individuums. Bei Mäusen konnte eine Abnahme an Satellitenzellen von zunächst 30% der unter der Basalmembran befindlichen Kerne bei Geburt, auf weniger als 5% der Kerne im Alter von 2 Monaten beobachtet werden [40]. Als Grund für diesen Rückgang der Anzahl der Satellitenzellen wird ein im Alter zunehmendes Ungleichgewicht zwischen Satellitenzellerneuerung und Verbrauch vermutet.

Einleitung

Bei der Ratte konnte die Population der Satellitenzellen in zwei Gruppen differenziert werden. Ca. 80% der Satellitenzellen sind schnell teilend und für die Bereitstellung von Satellitenzellen für die Zellerneuerung zuständig, die übrigen teilen sich langsamer und es wird vermutet, dass diese Gruppe eine Art Reserve ruhender Satellitenzellen darstellt [14]. Für die Abnahme des Satellitenzellpools wird eine Erschöpfung des Teilungspotentials einerseits, Zellalterung mit Telomerverkürzung andererseits diskutiert [44]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Innervation die Teilungsfähigkeit der Satellitenzellen beeinflusst. Dies könnte entweder durch die elektrische Stimulation oder durch vom Nerv stammende Substanzen geschehen [21]. Der Einfluss des Innervationszustandes der Muskelfaser auf die Satellitenzellen ist noch nicht erschöpfend geklärt. So führte die Denervation von nicht ausgereiften Muskeln beim Huhn zur Beendigung der Proliferation von Myoblasten [36]. Es wurde jedoch gezeigt, dass regenerierende Fasern wieder innerviert werden können. Jeder Muskel hat eine Zone an seinem Muskelbauch, in der die Nerven enden, die sog. Endplattenzone. Bei regenerierenden Fasern, die diese Endplattenzone nicht erreichen, bleibt die Innervation aus [20].

1.4 Regenerationsversuche des Muskelgewebes bei anhaltender Denervation

In vielen tierexperimentellen Versuchen an Rattenmuskeln hat sich gezeigt, dass es bei lang anhaltender Denervation nicht nur zu Muskelfaseratrophie, sondern auch zum Auftreten von kleinen Muskelfasern kommt, von denen angenommen werden kann, dass es sich um neu gebildete Fasern handelt. Sie erreichen allerdings nicht den Durchmesser nicht denervierter regenerierter Fasern. Sie sind durch ihre Größe, zentrale Zellkerne, wenig Myofibrillen und zurückgebliebene Zellorganellen gekennzeichnet. Man geht von frustranen Regenerationsversuchen aus und es stellt sich die Frage, ob diese kleinen Fasern mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten MHCn-positiven kleinen Fasern in humanen Muskelbiopsien vergleichbar sind.

Der Regenerationsversuch bei anhaltender Denervation kann in seiner Dynamik in zwei Phasen geteilt werden. In der ersten Phase beginnt der Regenerationsprozess wie bei Muskelschädigung üblich. Auf der Oberfläche großer Muskelfasern erscheinen neu gebildete Myotuben, die sich innerhalb der Basalmembran der atrophen Fasern befinden. Es können an einer adulten Faser mehrere neu gebildete kleine Fasern gezählt werden. Im Verlauf bilden die kleinen Fasern eigene Basalmembranen und separieren sich von der atrophen adulten Faser. Die ersten neu gebildeten Fasern dieser Art sind 10 Tage nach Denervation zu beobachten, die maximale Anzahl etwa 2-4 Monate später. In den kleinen Fasern wurde von Schmalbruch meist ein zentraler Kern beobachtet. Bei solchen mit großem Faserdurchmesser wurden bis zu drei weitere peripher gelegene Kerne beobachtet. Nach dieser anfänglichen Regenerationsphase, in der der Innervationszustand keine Rolle zu spielen scheint, beginnt bei den langzeitdenervierten Muskeln eine zweite Phase, in der die neugebildeten Fasern gegenüber den nicht denervierten regenerierenden Fasern in ihrer Entwicklung zurück bleiben.

Es wurde in einem Experiment die Regeneration von denerviertem und nicht denerviertem Muskel der Ratte verglichen. Dabei zeigte sich, dass 3-4 Tage nach der Schädigung die Regenerationsvorgänge in der denervierten und der nicht denervierten Gruppe identisch waren. Im weiteren Verlauf wuchsen die nicht denervierten Fasern innerhalb von 28 Tagen zu normal ausgereiften Fasern heran. Die denervierten Fasern blieben im Wachstum zurück und bildeten nur unvollständige Myofibrillen und Zellorganellen aus [47]. In einem ähnlichen Versuchsaufbau zeigten sich 10 Tage nach Denervation die neu gebildeten Fasern in beiden Gruppen groß und rund und im Durchmesser größer als zu jedem späteren Zeitpunkt. 30 Tage nach Denervation zeigten die unter anhaltender Denervation wachsenden kleinen Fasern nur 20% des Durchmessers der normal wachsenden Fasern [27]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Denervation einen Regenerationsreiz darstellt, der Myogenesevorgänge anregt und zur Neubildung von Fasern führt. Für die abschließende Ausreifung und Funktionalität der Muskelfasern scheint die Reinnervation der neugebildeten Faser durch Ausbildung eines neuromuskulären Kontaktes eine wichtige Rolle zu spielen. Bleibt diese aus, kommt es zur Atrophie

Einleitung

der neugebildeten Fasern.

Es konnte bei den neu gebildeten Fasern im Elektronenmikroskop eine eigene neu gebildete Basalmembran beobachtet werden. Da sich die Fasern innerhalb der alten Basalmembran der atrophierten Fasern gebildet hatten, entstand eine charakteristische Doppelschicht der Membranen. Diese Doppelschicht blieb für mindestens einen Monat bestehen und wurde als Merkmal für regenerierende Fasern gewertet [2].

Andere Beobachtungen haben auch ergeben, dass es in Bezug auf die Basalmembran der Muskelfaser zwei Orte der Entstehung von kleinen Fasern gibt. Einerseits durch die Fusion ausgewanderter Satellitenzellen in den Interzellulärraum und andererseits die Bildung innerhalb der Basalmembran der atrophischen Faser und anschließender Abtrennung von der alten Faser [13]. Es wurden Öffnungen in der Basalmembran der "Mutterzelle" beobachtet, durch die die kleinen Fasern in den Extrazellulärraum gelangen können [3]. Auch von Schmalbruch wurden kleine Fasern außerhalb und innerhalb der Basalmembran beschrieben. Für ihn bleibt die Herkunft der interstitiellen Fasern unklar [20]. Bei über längerer Zeit denervierten Muskeln kann, im Vergleich zu innervierten Muskeln, eine deutliche Abnahme der Satellitenzellzahl festgestellt werden. Es könnte sich um die Erschöpfung des Satellitenzellpools handeln. Außerdem ist zu beobachten, dass auf den kleinen, vermutlich neu gebildeten Fasern keine Satellitenzellen zu finden sind. Dies unterstreicht die bisherige Annahme, dass sich diese neuen Fasern aus Satellitenzellen gebildet haben [12].

Von Schmalbruch wurde die Regeneration von Muskeln über 70 Tage nach Denervation beobachtet. Auch Schmalbruch beschreibt die Neubildung von kleinen Fasern, bezweifelt aber, dass die zu Beginn von ihm beobachteten Fasern identisch mit denen sind, die er nach 70 Tagen sah. Zu einem mittleren Zeitpunkt von 20 - 40 Tagen konnte ein eindeutiger Trend zur Abnahme des Faserdurchmessers beobachtet werden. Innerhalb dieses generellen Trends konnten jedoch zur selben Zeit unterschiedliche morphologische Entwicklungen beobachtet werden. Er teilt in drei unterschiedliche Fasertypen ein: Solche mit glattem runden Umriss und regelrechten Myofilamenten. Dann solche die geschrumpft aussahen, mit un-

regelmäßiger Kontur und unorganisierten Myofilamenten und eine dritte Gruppe mit unreif erscheinenden Fasern. Außerdem wurden häufig leere Basalmembranen mit Überresten untergehender Fasern beobachtet.

In dieser Studie zeigte sich auch das Phänomen, dass die Anzahl der kleinen Fasern zu Beginn der Regeneration größer war als zum Ende hin. Die absolute Faseranzahl konnte von ihm jedoch nicht ermittelt werden, da immer nur ein Querschnitt gezählt wurde. Er räumt ein, dass es sein könnte, dass es sich jeweils um viele kurze Fasern in Serie handelt oder um Arme einer verzweigten Muskelfaser [21].

Beim Versuch eines denervierten Muskels sich zu regenerieren zeigen sich die oben beschriebenen Phänomene, die letztlich nicht zu erfolgreicher Regeneration des Gewebes führen. Die Innervation der sich bildenden neuen Muskelfasern scheint eine große Rolle zu spielen, im Detail bleibt jedoch vieles noch ungeklärt.

1.5 Die Expression der Myosinisoformen

Der kontraktile Apparat der Muskelzellen ist hauptsächlich aus den Strukturproteinen Aktin und Myosin aufgebaut. Es sind bisher je nach Muskeltyp und Spezies verschiedene Myosinisoformen beschrieben, die durch eine stark konservierte Multigenfamilie codiert sind [31]. Welche Myosinisoform exprimiert wird, ist entwicklungsabhängig und unterliegt neuronalen, hormonellen und anderen gewebsspezifischen Signalen [49]. Unter neuronalem Einfluss steht z.B. die Entwicklung zu schnellen und langsamen Fasern durch die Expression unterschiedlicher Myosinisoformen.

Das Myosinmolekül ist aus zwei schweren und 4 leichten Ketten aufgebaut.

Bei der schnellen und langsamen Myosinform unterscheiden sich die leichten Ketten in ihrer Struktur.

Die Myogenese eines Lebewesens findet in seiner Embryonal- und Fetalphase statt. Die aus dem Mesoderm stammenden Muskelvorläuferzellen wandern in die Peripherie aus und werden erst sekundär durch die nachwachsenden Nerven innerviert. In vielen Untersuchungen zeigte sich, dass bestimmte Myosinisoformen

Einleitung

in der Entwicklung nacheinander exprimiert werden, die als embryonales -, neonatales - und adultes Myosin bezeichnet werden. Zu Beginn der Myogenese wird embryonales Myosin exprimiert, perinatal tritt neonatales Myosin auf und wird je nach Spezies und Muskeltyp in den ersten Lebensmonaten durch adultes Myosin ersetzt [34][43] [11] [45] [7] [33].

Es hat sich gezeigt, dass auch von regenerierendem Muskelgewebe neonatales Myosin reexprimiert wird [49] [46].

In einer Arbeit über humanes Muskelgewebe von Kindern mit infantiler spinaler Muskelatrophie (Werdnig-Hoffmann Erkrankung) konnte gezeigt werden, dass die Innervation der Muskelfasern für die Ausreifung des Myosins auch beim Menschen eine große Rolle spielt. Beim gesunden Kind wird unreifes Myosin nur in den ersten Lebensmonaten exprimiert. Kommt es zur Schädigung des Motorneurons sind auch zu späteren Zeitpunkten unreife Myosinformen nachzuweisen [42].

Um den Einfluss der Innervation auf die Expression der unterschiedlichen Myosinformen weiter zu untersuchen, wurden Untersuchungen an innervierten und denervierten Pectoralmuskeln am Huhn durchgeführt. Es zeigte sich, dass viele adulte schnelle Fasern nach Denervation neonatales Myosin (MHCn) reexprimieren und kleine regenerierende Fasern auftauchen, die MHCn exprimieren. Diese neugebildeten Fasern, exprimieren erst nach Innervation die adulte Form des Myosins. Von Cerny und Bandman wird dies so gedeutet, dass der Kontakt zum Nerven die Expression von MHCn unterdrückt und bei Ausbleiben des nervalen Reizes die Expression dieses Proteins wieder abläuft, so dass eine ausgereifte Muskelfaser nach Denervation wieder neonatales MHCn exprimiert [30]. Die Reexpression der neonatalen Myosinform nach Denervation in adultem Gewebe wurde auch von weiteren Arbeitsgruppen beschrieben [9] [48].

1.6 Warum Anti-MHCn als Marker? (MyosinHeavyChainneonatal)

In der vorliegenden Arbeit wurde Anti-MHCn als Marker gewählt, da er muskelspezifisch ist und damit sowohl denervierte als auch regenerierende Fasern gefärbt werden. Es ist das Ziel kleine Fasern zu untersuchen die in humanem Muskelgewebe mit neurogener Atrophie auftreten. Es ist nicht abschließend geklärt, ob es sich bei diesen kleinen Fasern um neu gebildete Fasern handelt oder um ein fortgeschrittenes Stadium von atrophierten Muskelfasern. Da Anti-MHCn sowohl für unreife Muskelfasern als auch für denervierte Muskelfasern positiv ist, bietet es sich als Marker für diese Fragestellung an.

1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Es gibt bereits zahlreiche Arbeiten, die Degenerations- und Regenerationsprozesse von tierischem Muskelgewebe untersuchen. In diesen Studien zeigte sich, dass Muskelgewebe nach Schädigung in der Regel nach einem bestimmten Muster degeneriert und dann bei Reinnervation ein starkes Potential hat, vollständig zu regenerieren. Bleibt die Reinnervation aus, wird der Regenerationsprozess unterbrochen und führt nicht zur Ausbildung von funktionsfähigem Muskelgewebe.

In humanem Muskelgewebe, das durch neuromuskuläre Erkrankungen geschädigt ist, ist ein buntes Bild von parallel laufenden Degenerations- und Regenerationsprozessen zu finden. Es zeigen sich kleine MHCn-positive Muskelfasern. Muskelfasern sind im adulten Stadium nach Denervation, als auch während der Neubildung vor der Innervation für MHCn positiv (siehe Abbildung 3.2, S. 32).

Es stellt sich nun die Frage, ob es sich bei diesen Fasern, um die im Nagermuskel beschriebenen neu gebildeten, sog. kleinen Fasern[13] handelt oder um fortgeschritten atrophierte adulte Fasern, die im humanen Muskel bisher als „nuclear clumps“ aufgefallen sind. Es soll erarbeitet werden, ob es Kriterien gibt diese beiden Formen der kleinen Fasern sicher voneinander zu unterscheiden.

Einleitung

Um dieser Frage nachzugehen werden Biopsien von Patienten mit neurogenen Muskelerkrankungen untersucht, die zu diagnostischen Zwecken entnommen wurden.

Zunächst wird untersucht, ob sich das Auftreten der kleinen Fasern in humanem Muskelgewebe bestätigen lässt und wie häufig diese in einem bestimmten Zeitraum aufzufinden waren.

Anhand von Stufenschnitten und anschließender Färbung wird die Morphologie im Längsverlauf beschrieben und untersucht. Hierzu wird die Länge der kleinen Fasern, der Minimal- und Maximaldurchmesser erhoben. Dabei wird die Verlaufsrichtung der kleinen Fasern in Bezug zu den normal großen Muskelfasern mit berücksichtigt. Bisher wurden die kleinen Fasern meist nur auf einer Schnittebene untersucht. Untersuchungen mit immunhistochemischer Färbung von Myosin unter Berücksichtigung des Expressionsmusters im Längsverlauf gab es bisher nicht. Außerdem werden die kleinen Fasern auf ihren Kerngehalt hin untersucht. Die Menge und das Verteilungsmuster der Kerne im Verhältnis zum Durchmesser der kleinen Fasern sollen weitere Erkenntnisse über die Entstehungsmechanismen der kleinen Fasern liefern.

2 Material und Methodik

2.1 Die Muskelbiopsien

2.1.1 Auswahlkriterien und Entnahme

Das in dieser Arbeit verwendete Material stammt aus 14 Muskelbiopsien, die im Zeitraum von 2003 bis 2008 zu diagnostischen Zwecken entnommen und in das Institut für Hirnforschung zur Untersuchung und Befundung eingesandt wurden.

Es wurden, in dem oben genannten Zeitraum, stichprobenartig Muskelbiopsien ausgewählt, bei denen anhand der Routinediagnostik mit den üblichen histologischen und enzymhistochemischen Färbungen (Hämatoxylin-Eosin, van Gieson, PAS, Trichrom, Ölrot O, NADH, COX, COX-SDH, saure Phosphatase, AMPDA, ATPase und Phosphorylase) die Diagnose neurogene Atrophie gestellt wurde.

Die Muskelbiopsien haben eine Größe von 1 cm³ und wurden unter Lokalanästhesie dem M. vastus medialis, M. gastrocnemius, M. biceps brachii oder M. deltoideus entnommen. Nach der Entnahme wurden die Biopsien schockgefroren und bei -195°C im Stickstofftank aufbewahrt.

Für die morphologische und statistische Auswertung wurden aus den 14 Biopsien fünf Biopsien ausgewählt, in denen ein langer Abschnitt lückenlos beurteilt werden konnte.

2.1.2 Die Muskelbiopsien

Präparatnr.	Bez. im Text	w/m	Alter	Diagnose
E 42-03	–	w	76	Neurogene Atrophie
E 809-03	(Biopsie 1)	m	61	Ausgeprägt chronische neurogene Atrophie bei V. a. M. Wegener
E 1176-03	–	m	70	Polyneuropathie
E 795-04	–	w	60	Neurogene Atrophie
E 1170-04	(Biopsie 2)	m	36	Neurogene Atrophie bei V. a. motoneuronen Erkrankung, DD Myopathie
E 282-06	–	m	19	Ausgeprägte neurogene Atrophie,
E 294-06	–	m	34	Ausgeprägte neurogene Atrophie
E 340-06	(Biopsie 3)	m	52	Mäßig ausgeprägte neurogene Atrophie bei Polyneuropathie, DD Myopathie
E 65-07	–	m	76	Muskelatrophie
E 1887-07	(Biopsie 4)	w	56	Ausgeprägte neurogene Atrophie bei V. a. Amylotrophe Lateralsklerose
E 364-08	(Biopsie 5)	m	62	Mittelgradige neurogene Atrophie bei Myalgie und Muskelschwäche
E 455-08	–	m	66	Chronische Neuropathie, neurogene Atrophie
E 1494-08	–	w	56	Neurogene Atrophie
E 1732-08	–	m	51	Neurogene Atrophie, Vaskulitis

Tabelle 2.1: Die 14 untersuchten Muskelbiopsien

2.1.3 Anfertigung der Stufenschnitte

Im Mikrotom (HM 500 OM) wurden die Gewebeproben bei -28 °C in 8 µm dicke, horizontale Scheiben geschnitten und auf Objektträger (SuperFrost Plus Objektträger) aufgebracht. Von fünf Gewebeproben wurden mindestens 75 Schnitte in Folge angefertigt, d.h. ein Muskelabschnitt von mindestens 600 µm aufgearbeitet.

2.2 Die Färbungen

2.2.1 Grundprinzipien der Immunhistochemischen Färbung nach der ABC-Methode

In der Immunhistochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung bestimmter Antigene auf der Zelloberfläche bestimmter Zellen in histologischen Schnitten sichtbar zu machen.

Wenn man einen histologischen Gewebeschnitt mit gelösten Antikörpern bedeckt, werden diese Antikörper dort binden, wo sich das passende Antigen befindet. Um diese Bindung nachzuweisen, muss man die Antikörper sichtbar machen. Hierzu verwendet man einen mit Biotin markierten Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers, in diesem Falle die Maus, gerichtet ist.

An das Biotin kann Avidin binden, das seinerseits drei weitere Biotinbindungsstellen besitzt. Diese können nun durch das Markermolekül Meerrettichperoxidase (HRP) besetzt werden, die ihrerseits mit Biotin gekoppelt sind. Auf diese Weise wird der Marker vervielfacht und der Nachweis empfindlicher.

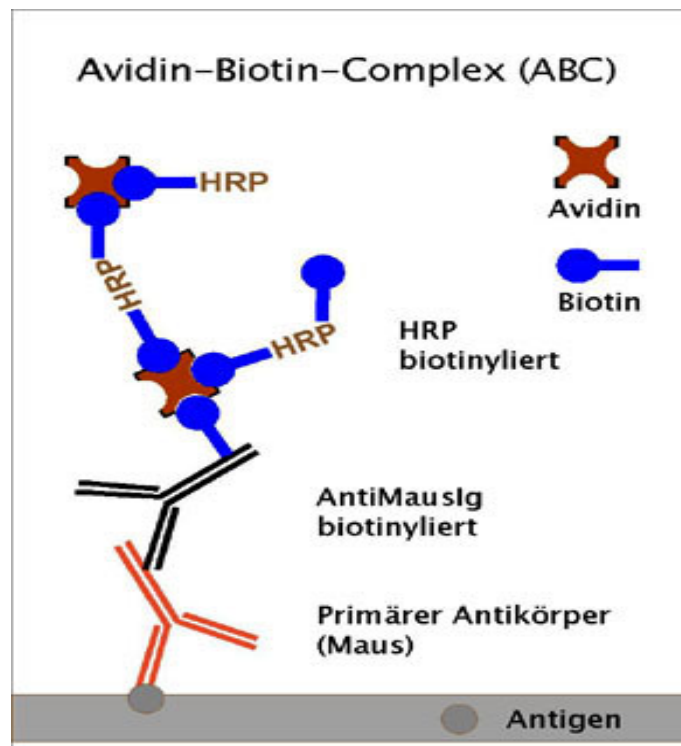


Abbildung 2.1: ABC-Methode. Abbildung der biologischen Fakultät der Universität Regensburg

Die eigentliche Farbreaktion findet durch das Peroxidaseenzym statt, das an die Biotinmoleküle gebunden ist. Unter Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zerfällt die Peroxidase zu Wasser und Sauerstoff; diese Reaktion wird durch die Ergänzung eines Chromogens, in diesem Fall 3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB), aufrechterhalten. Das DAB liefert die Elektronen zur Reduktion des Enzyms und fungiert gegenüber dem Enzym als Reduktionsmittel. Die Oxidation des DAB zeigt sich in der Ausfällung eines braunen, in Alkohol unlöslichen Reaktionsproduktes.

2.2.2 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

Im Folgenden werden die Schritte für die immunhistochemische Färbung beschrieben. Die Schnitte, die immunhistochemisch mit Anti-MHCn angefärbt werden sollen, werden 10 min in Aceton fixiert, anschließend 3-5 min luftgetrocknet und dann in TBS-Lösung rehydriert. Die Objektträger mit den Schnitten werden

mit jeweils 100 µl Schweineserum (10%) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen.

2.2.3 Der Primärantikörper

Der Myosin-Heavy-Chain-Antikörper (MHCn) aus der Maus ist gegen menschliches Gewebe gerichtet und wird in einer 1:20 Verdünnung auf die vorbereiteten Schnitte aufgebracht. Die Inkubationszeit sollte eine Stunde bei Raumtemperatur betragen.

Es wurde folgender Antikörper benutzt: Myosin-Heavy-Chain-Antikörper (MHCn)

Clone: WB-MHCn

IgClass: IgG1

Hybridoma partner: Mouse Myeloma (p3-NS1-Ag4-1)

Verdünnung: 1:5 - 1:20

Aufbewahrung: - 20 °C:

Hersteller: Novocastra

NCL-Merosin (Merosin Laminin Alpha 2 Chain)

Clone: Mer3/22B2

IgClass: IgG1, kappa

Hybridoma partner: Mouse Myeloma (X63.Ag8.653)

Verdünnung: 1:50 - 1:100

Aufbewahrung: - 20 °C:

Hersteller: Novocastra

Anschließend werden die Schnitte wieder 5 min in TBS-Lösung gewaschen.

2.2.4 Der Sekundärantikörper

Als Zweitantikörper wird der biotinylierte Polyclonale Rabbit Anti-Mouse-Antikörper (DakoCytomaton) in einer 1:400 Verdünnung mit TBS/BSA-Lösung auf die Schnitte aufgebracht (jeweils 100 µl). Es folgt die 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend 5 min Waschen in TBS-Lösung.

2.2.5 Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität

Die Schnitte werden in einer Lösung aus 60 ml H₂O₂ und 190 ml Methanol für 15 min blockiert, kurz in destilliertem Wasser gespült und anschließend 5 min in TBS-Lösung gewaschen.

2.2.6 Färbung mit dem AB-Komplex

Die AB-Komplexlösung (StreptABCComplex/HRP, Code-Nr: K 0377, Dako Cytomation) wird aus Streptavidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase und TBS/BSA-Lösung im Verhältnis 5:5:1000 µl angesetzt. Die Lösung wird 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend jeder Objektträger mit 100 µl der Lösung bedeckt und 30 min inkubiert. Anschließend werden die Schnitte wieder 5 min in TBS-Lösung gewaschen.

2.2.7 DAB Entwicklung

Die Schnitte werden für ca. 5 min in DAB-Lösung entwickelt und anschließend wieder 5 min in TBS-Lösung gewaschen.

2.2.8 Entwässern

Die Schnitte werden in einer Verdünnungsreihe aufsteigenden Alkoholgehalts (70%, 96% und 2x100%) für jeweils 2 min entwässert und anschließend 2 x für 8 min in Xylol fixiert.

2.2.9 Eindeckeln

Zum Eindeckeln wurde HICO-MIC Mikroskopiereinschlussmittel (Hirtz & Co., Köln) verwendet.

2.3 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

2.3.1 TBS-Stammlösung

Zur Herstellung eines Liters dieser gepufferten Salzlösung werden 30,3 g Tris Base und 81,8 g NaCl in 800 ml Aqua dest. gelöst. Mit HCl-Lösung (25%ig) wird die Lösung auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Anschließend wird die Lösung mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt. Zur Herstellung der TBS-Gebrauchslösung wird die Stammlösung 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnt.

2.3.2 TBS/BSA-Lösung

Für die TBS/BSA-Lösung wird je 1mg Albuminpulver in 1ml TBS-Gebrauchslösung gelöst.

2.3.3 Substratpuffer

Zur Herstellung der Stammlösung werden 21 g Zitronensäure Monohydrat, 34 g Imidazol und 29,2 g NaCl in ca. 400 ml Aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 7.0 eingestellt. Anschließend wird die Lösung mit Aqua dest auf 500 ml verdünnt.

2.3.4 DAB-Lösung

Zur Herstellung der DAB-Lösung werden 95 - 100 mg DAB Pulver (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid), in 150 ml Aqua dest. gelöst und mit 20 ml Substratpuffer, sowie 700 µl H₂O₂ versetzt. Anschließend wird die Lösung mit Aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt. Vor Gebrauch wird die Lösung filtriert und im weiteren Verlauf vor Licht abgeschirmt.

2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um den Kerngehalt der Fasern zu verfolgen wurde jeder zweite Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Dazu wurden die Objektträger kurz in Hämatoxylin getaucht und anschließend in lauwarmem Leitungswasser gebläut. Dann wird

der Objektträger mit Aqua dest. gespült und kurz in Eosinlösung getaucht. Anschließend wird wieder mit Aqua dest. gespült und in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und eingedeckelt.

Hämatoxylin ist ein zunächst farbloser Stoff, der aus Blauholz gewonnen wird. Durch Oxidation entsteht der Farbstoff Hämatein. In Verbindung mit Alaun, welches sauer und positiv geladen ist, wird eine Kernfärbung durch Bindung an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren möglich.

Eosin ist eine häufig verwendete Übersichtsfärbung, die an die positiven Gruppen, z.B. von Eiweißen, in den Zellstrukturen bindet.

2.5 Mikroskopie

Für die Auswertung wird ein Bereich auf den Schnitten ausgewählt, auf dem mehrere gut abgrenzbare kleine Fasern zu sehen sind. Als kleine Fasern gelten MHCn positive Fasern, die einen Minimaldurchmesser kleiner als 10 μm haben. Dieser Bereich wird dann entlang der Stufenschnitte aufgesucht und der Verlauf der kleinen Fasern verfolgt.

Es wurde ein Mikroskop der Firma Olympus (Vanox AHB3) verwendet und mit 10, 20 und 40facher Vergrößerung gearbeitet.

Von jedem MHCn-Schnitt wird mit einer installierten Kamera bei 20-facher Vergrößerung ein Foto gemacht und mit einer Bildverarbeitungssoftware (Image Access Enterprise 6, Imagic Bildverarbeitung Glattbrugg) digital archiviert. Die kleinen Fasern wurden mit der Messfunktion dieser Software vermessen. Das untersuchte Areal belief sich auf ca. 770/570 μm .

Von allen kleinen Fasern wurde in jedem MHCn-gefärbten Schnitt der Minimal- und der Maximaldurchmesser ausgemessen und in eine Tabelle übertragen. Im Wechsel wurde der dazugehörige HE-Schnitt mikroskopiert (30fache Vergrößerung) und die zu den kleinen Fasern gehörigen Zellkerne gezählt und ebenfalls in die Tabelle übertragen.

2.6 Auswertung der Daten

2.6.1 Statistikprogramm

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Skriptsprache Python und SciPy, eine Bibliothek die numerische und statistische Routinen bereitstellt [35].

2.6.2 Vorbereitung der Daten

Zur statistischen Analyse der Fasereigenschaften wurden aus den Daten jeder Biopsie alle Einzelfasern identifiziert und der Minimal- und Maximaldurchmesser, sowie die Anzahl der Kerne pro Schnitt entlang der Faser tabelliert.

Es wurden mechanisch beschädigte oder fehlgefärbte Schnitte als Schnitt ohne Daten behandelt. Eine neue Faser wurde angenommen, wenn ein benachbarter MHCn-Schnitt an dieser Stelle keine MHCn-positive Faser aufwies. Bei der Kernfärbung gehen wir davon aus, dass nicht zwingend in jedem Schnitt innerhalb einer Faser ein Kern vorliegt.

Da die Messungen von Durchmessern und Kernzahl in alternierenden Schnitten mit je 8 μm Dicke erfolgten, wurde von zwei aufeinander folgende Messungen der Durchmesser interpoliert um den ungefähren Durchmesser auf Schnitthöhe der Kerne zu erhalten. Wenn immer dies nicht möglich war, z.B. am Ende einer Faser, wurde stattdessen die nächste Messung gewertet.

Diese Datenvorbereitung liefert für jede Faser eine Liste von Kernzahl, Minimal- und Maximaldurchmesser entlang der Fasern in Abständen von 16 μm . Die Länge der Fasern spiegelt sich in der Anzahl der Messungen pro Faser wieder.

2.6.3 Statistische Größen und Tests

Um die Fasern morphologisch zu charakterisieren, wurden Histogramme der verschiedenen Messgrößen erstellt und ihre Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Um zu untersuchen welche morphologischen Eigenschaften sich als Prediktor von Pathologien eignen, wurden die Fasern zwei Gruppen zugeordnet, z.B. solche Fasern deren Standardabweichung des Maximaldurchmessers einen

Material und Methodik

Schwellwert von 15 μm übersteigt oder nicht. Die Eigenschaften der so erhaltenen Fasergruppen wurden dann verglichen und die statistische Signifikanz eventueller Unterschiede untersucht. Dabei muss zwischen Fasereigenschaften, z.B. Länge einer Faser, mittlerer Durchmesser, maximale Kerndichte, und Einzelmessungen an einem Schnitt unterschieden werden, da das Ensemble aller Fasern und das Ensemble aller Schnitte unterschiedliche statistische Eigenschaften haben.

In erster Näherung können verschiedene Fasern als unabhängige Beobachtungen angesehen werden und Signifikanz von Unterschieden zwischen Gruppen von Fasern kann z.B. mit einem Kolmogorov-Smirnov-Test untersucht werden (siehe unten). Schnitte einer Faser hingegen sind vermutlich keine unabhängigen Beobachtungen. Um dennoch statistische Aussagen über Unterschiede machen zu können, wurde bootstrap-Verteilungen der Messwerte ermittelt (siehe unten).

Kolmogorov-Smirnov-Test

Die Biolothek SciPy stellt einen "two-sample Kolmogorov-Smirnov-Test", `ks2samp()`, bereit, der für die Analyse benutzt wurde. Die Funktion `ks2samp()` gibt die Test-Statistik D und einen p -Wert für die Hypothese, dass beide Samples gleichverteilt sind, zurück. Diese Rückgabewerte sind in den entsprechenden Abbildungen angegeben.

Bootstrap-Verteilungen

Um Mittelwerte von Messgrößen eines Schnittes zwischen unterschiedlichen Fasergruppen zu vergleichen und die Signifikanz von Unterschieden zu bewerten, wurden Bootstrap-Verteilungen der Mittelwerte der verschiedenen Gruppen erstellt. Bootstrapping ist hier notwendig, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Schnitte einer Faser miteinander korreliert sind und systematisch variieren. Da diese Variation nicht bekannt ist kann dafür nicht korrigiert werden. Durch Bootstrapping über Fasern, d.h. das vielfache Erstellen von Pseudo-Datensätzen durch wiederholtes Ziehen mit Zurücklegen aus dem Ursprungsdatensatz, kann

diese Variabilität abgeschätzt werden. In jedem Fall wurden 10000 Bootstrap-Replikate erzeugt und Verteilungen der Mittelwerte dieser Replikate erzeugt. Die statistische Signifikanz eines Unterschieds von Mittelwerten zwischen zwei Gruppen wurde nun mit einem t -Test bestimmt. Hierzu wurde die Funktion `ttest_ind()` von SciPy benutzt.

Autokorrelationsfunktion

Zur Untersuchung der Korrelation der Kernanzahl entlang der Fasern wurde die Autokorrelation der Kernanzahl in Schnitten mit gegebenem Abstand empirisch bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Beobachtungen

In den mit Anti-MHCn-Antikörpern gefärbten Muskelschnitten stellen sich die normalen MHCn-negativen Muskelfasern groß und hell dar. Zwischen den großen Muskelfasern befinden sich die untersuchten kleinen Fasern. Sind die kleinen Fasern Anti-MHCn positiv, stellen sie sich dunkelbraun dar. Die kleinen Fasern können in der Form sehr variieren; von rund bis lang gezogen, spitz zulaufend oder hantelförmig (siehe Abb. 3.1).

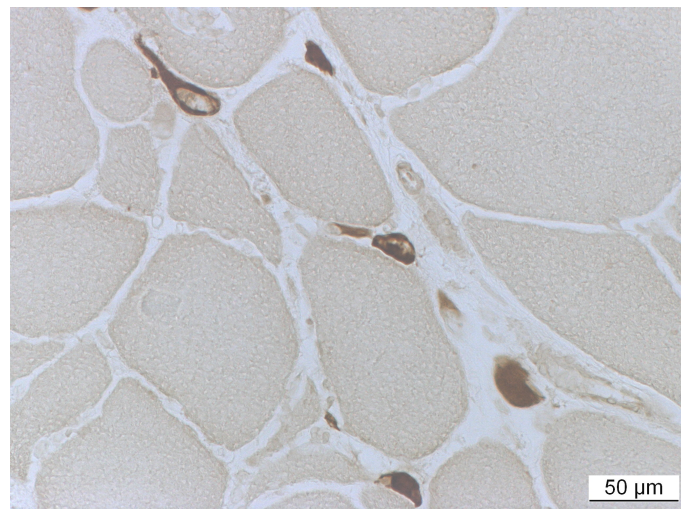


Abbildung 3.1: Kleine MHCn-positive Fasern (dunkelbraun) zwischen normal großen und atrophen Muskelfasern (hell).

In allen Biopsien sind vereinzelt oder gehäuft auch angulär-atrophe Fasern zu sehen. Diese sind für Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie typisch. Angulär-atrophe Fasern gelten als sicher denerviert und sind z. T. auch MHCn-positiv und dunkelbraun gefärbt. Sie haben konkave Außenflächen und sind deutlich größer als die kleinen Fasern (Siehe Abbildung 3.2 und 3.3).

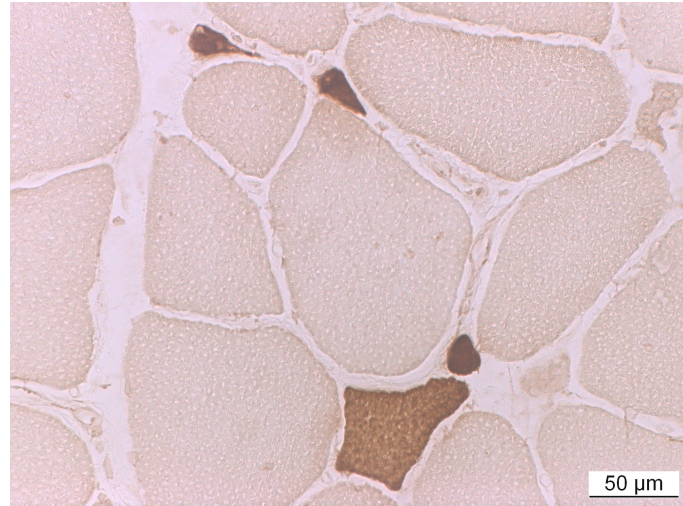


Abbildung 3.2: MHCn-positive angulär-atrophe Faser und MHCn-positive kleine Fasern.

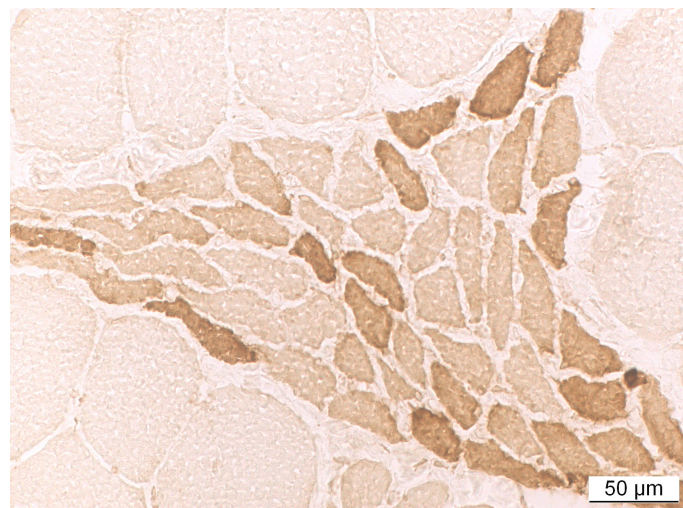


Abbildung 3.3: Gruppe von MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern

3.1.1 Stufenschnitte

Um die Morphologie der kleinen MHCn-positiven Fasern darzustellen, zeigen wir beispielhaft einige Schnitte aus einem Stufenschnitt. Es soll verdeutlicht werden, wie sich die kleinen Fasern im Längsverlauf in der Form verändern.

Die dargestellte Schnittfolge (Abb. 3.4 - 3.9) umfasst einen Muskelabschnitt von 120 μm . In diesem Areal ist eine Faser zu sehen, die den gesamten Bereich durchzieht (Faser 3). Faser 5 und 7 beginnen und enden im Verlauf, sind also vollständig erfasst. Faser 1, 2, 4 und 6 enden innerhalb der ersten drei dargestellten Schnitte. Es ist auffällig, dass oft an Stellen, an denen zuvor eine Faser endete auch erneut Fasern auftauchen (Faser 9, 7, 10 und kleine unbezifferte Fasern).

Abbildungen 3.10 bis 3.12 zeigen die Formänderung einer sehr abgeflachten MHCn-positiven kleinen Faser, innerhalb von 40 μm im Längsverlauf. Der Maximaldurchmesser der Faser 2 ändert sich innerhalb von zwei Schnitten von 98 μm auf 70 μm .

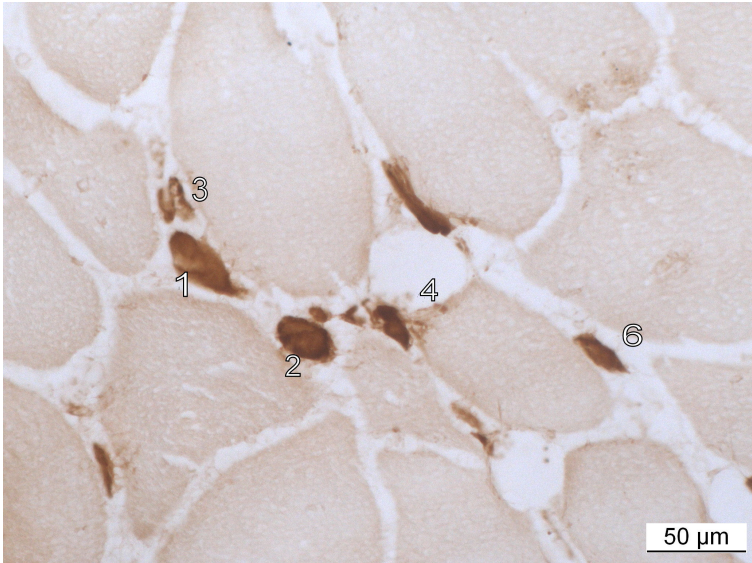


Abbildung 3.4: Schnitt 1

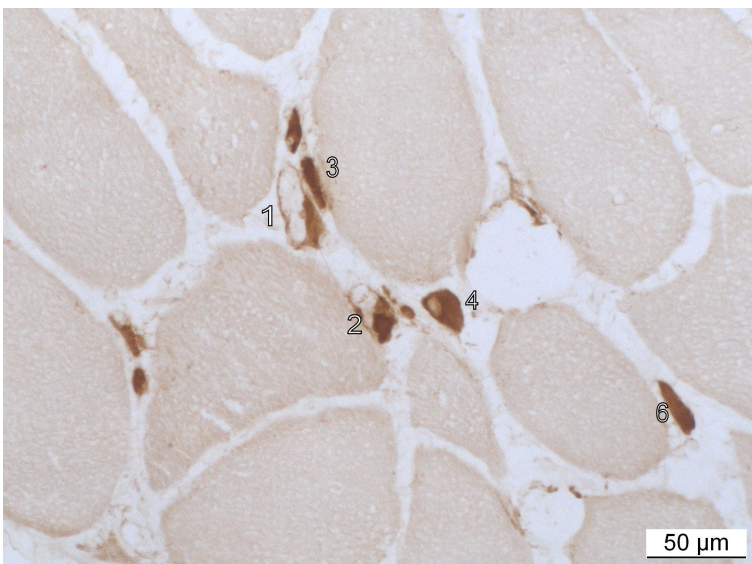


Abbildung 3.5: Schnitt 3

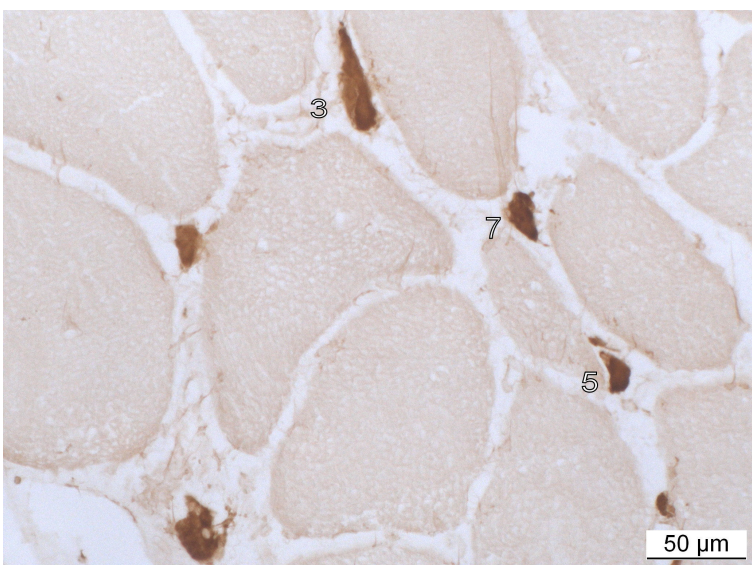


Abbildung 3.6: Schnitt 11

Ergebnisse

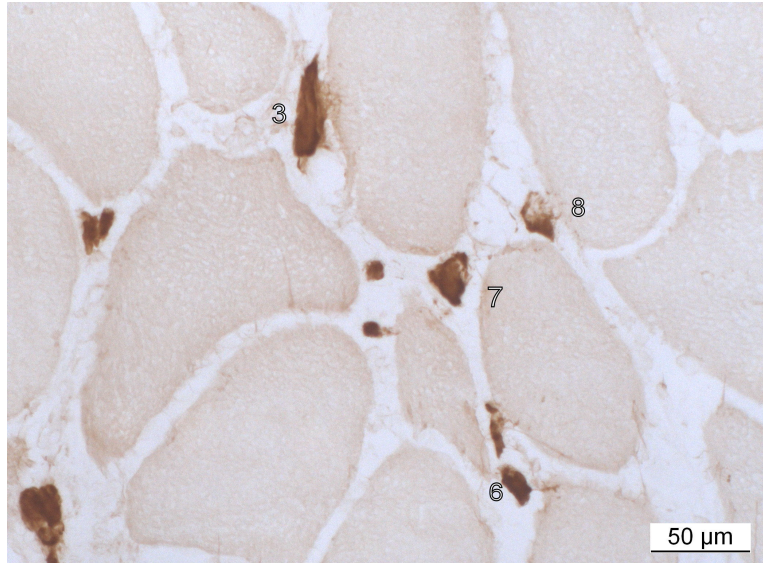


Abbildung 3.7: Schnitt 12

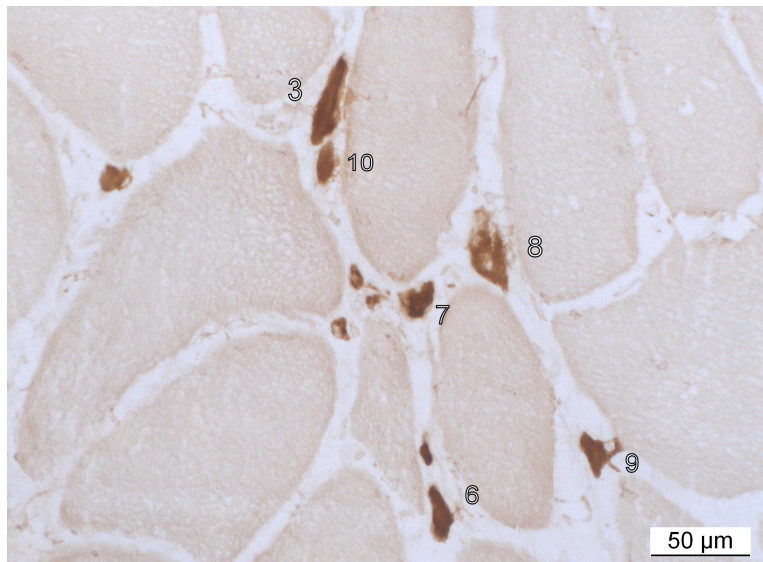


Abbildung 3.8: Schnitt 13

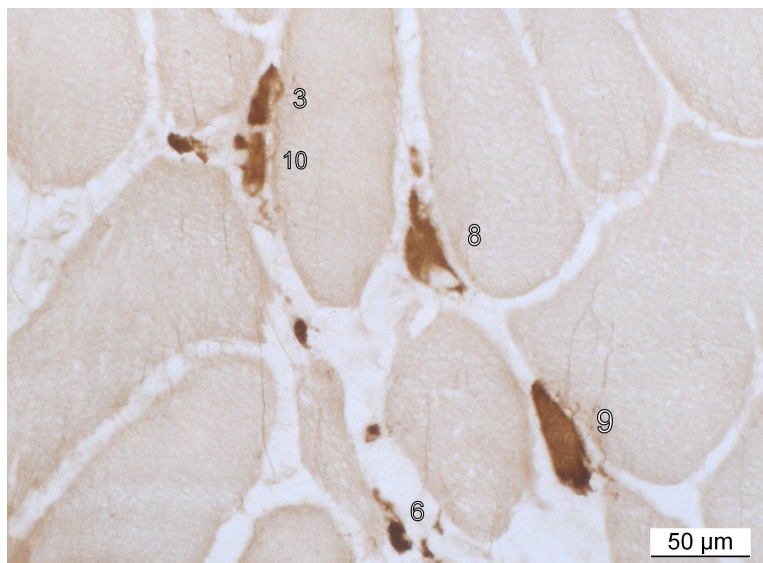


Abbildung 3.9: Schnitt 15

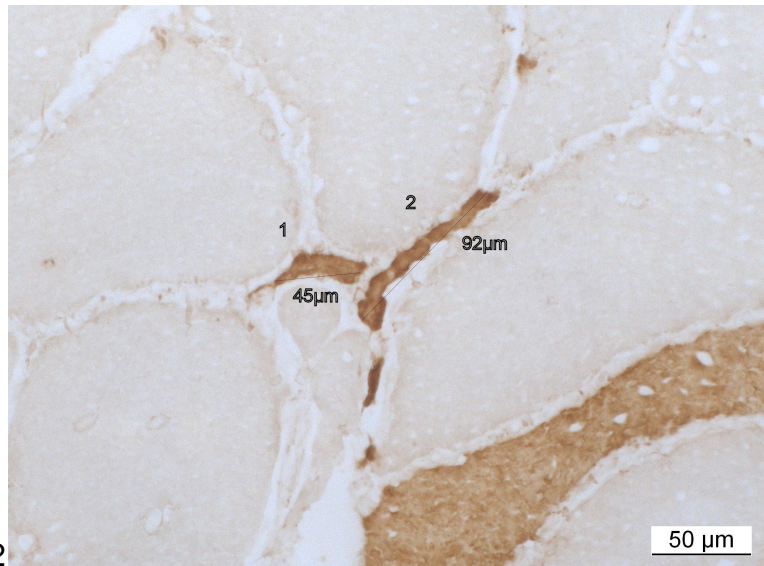


Abbildung 3.10: Schnitt 12

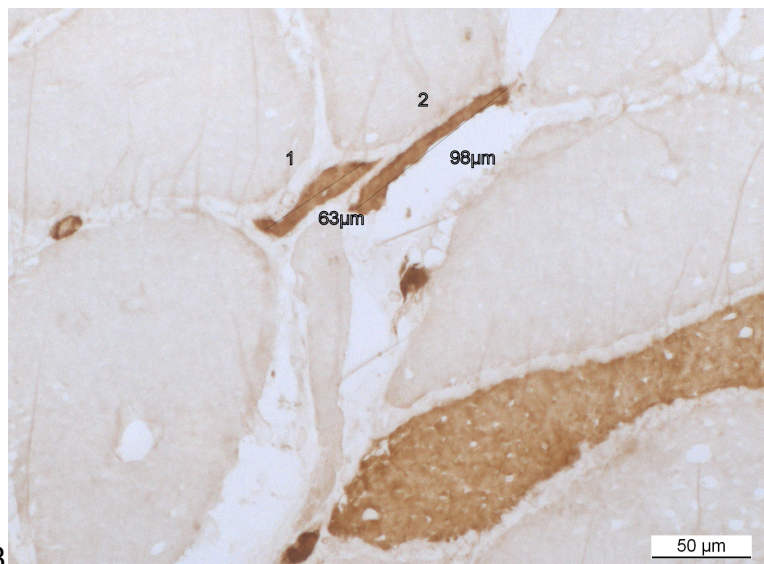


Abbildung 3.11: Schnitt 13

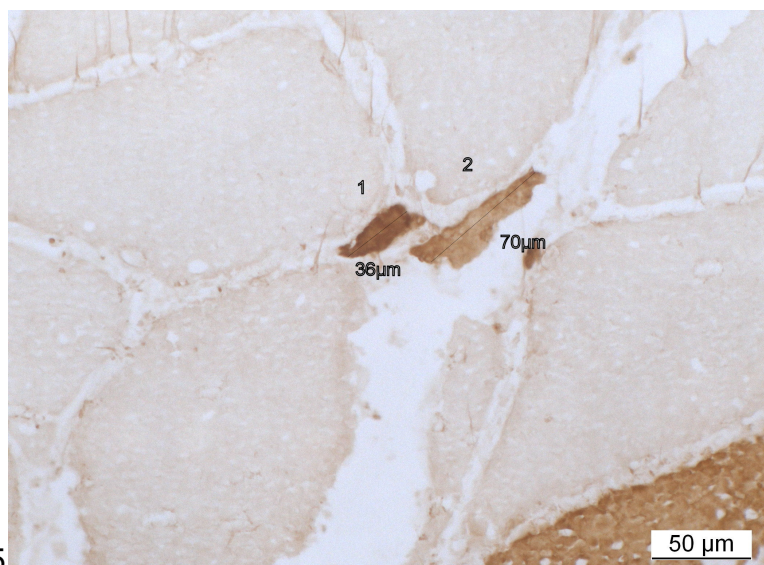


Abbildung 3.12: Schnitt 15

3.2 Die Häufigkeit des Auftretens von MHCn-positiven kleinen Fasern bei neurogener Muskelatrophie

Die untersuchten Muskelbiopsien stammen aus dem Zeitraum zwischen 2003 und 2008. Da neurogene Atrophie eine relativ häufig gestellte Diagnose ist, handelt es sich bei den 14 Biopsien, die von uns mit Anti-MHCn gefärbt wurden, nur um Stichproben innerhalb des oben genannten Zeitraums. Wir konnten in allen 14 Biopsien kleine MHCn-positive Fasern nachweisen.

3.3 Anzahl der kleinen Fasern pro Biopsie

Innerhalb einer Biopsie ist das Verteilungsmuster und die Anzahl der kleinen Fasern sehr verschieden. Sie können sowohl vereinzelt als auch in Gruppen liegen.

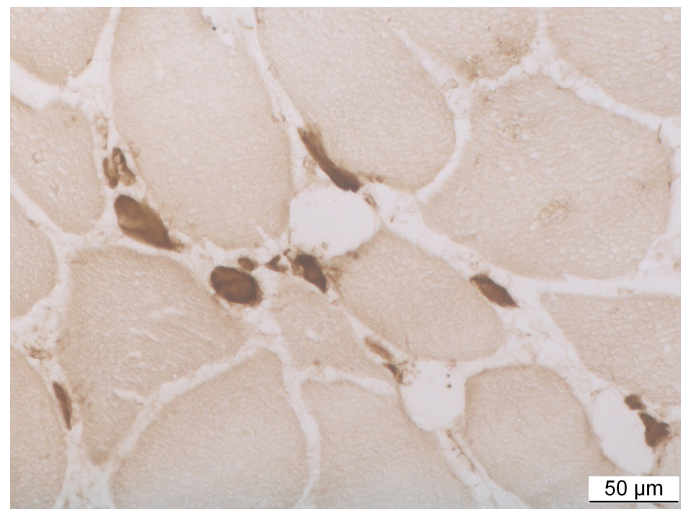


Abbildung 3.13: Beispiel für ein Areal mit gut voneinander abgrenzbaren kleinen MHCn-positiven Fasern

Für unsere Fragestellung wurde aus fünf Biopsien jeweils ein Areal ausgewählt, in dem auf dem ersten Schnitt mehrere, gut abgrenzbare kleine Fasern zu sehen sind und in dem die Fasern über mindestens 600μm gut zu verfolgen sind.

Das untersuchte Areal ist jeweils ca. 770/570 μm² groß und wurde Schnitt für Schnitt über mindestens 600 μm verfolgt. Da die Häufigkeit der kleinen Fasern in

den Biopsien unterschiedlich ist, haben wir in dem untersuchten Arealen unterschiedlich viele kleine Fasern gefunden.

Biopsie	Faseranzahl
Biopsie 1	52
Biopsie 2	13
Biopsie 3	89
Biopsie 4	43
Biopsie 5	44
Gesamt	241

Tabelle 3.1: Anzahl der kleinen Fasern pro untersuchtem Areal

3.4 Länge der kleinen Fasern

Die Fasern wurden Schnitt für Schnitt verfolgt, um ihre Länge zu ermitteln. Die Schnittdicke beträgt 8 μm . Die Länge der kleinen Fasern variiert stark und überschreitet zum Teil den beobachteten Raum von mindestens 600 μm . In den fünf Biopsien ist die Verteilung der Faserlängen sehr unterschiedlich. Die unterschiedlichen Faserlängen der einzelnen Biopsien wurden in folgende Gruppen zusammengefasst: kleiner 50 μm , 50-200 μm , 200-600 μm und größer 600 μm .(Siehe Abbildung 3.14)

Ergebnisse

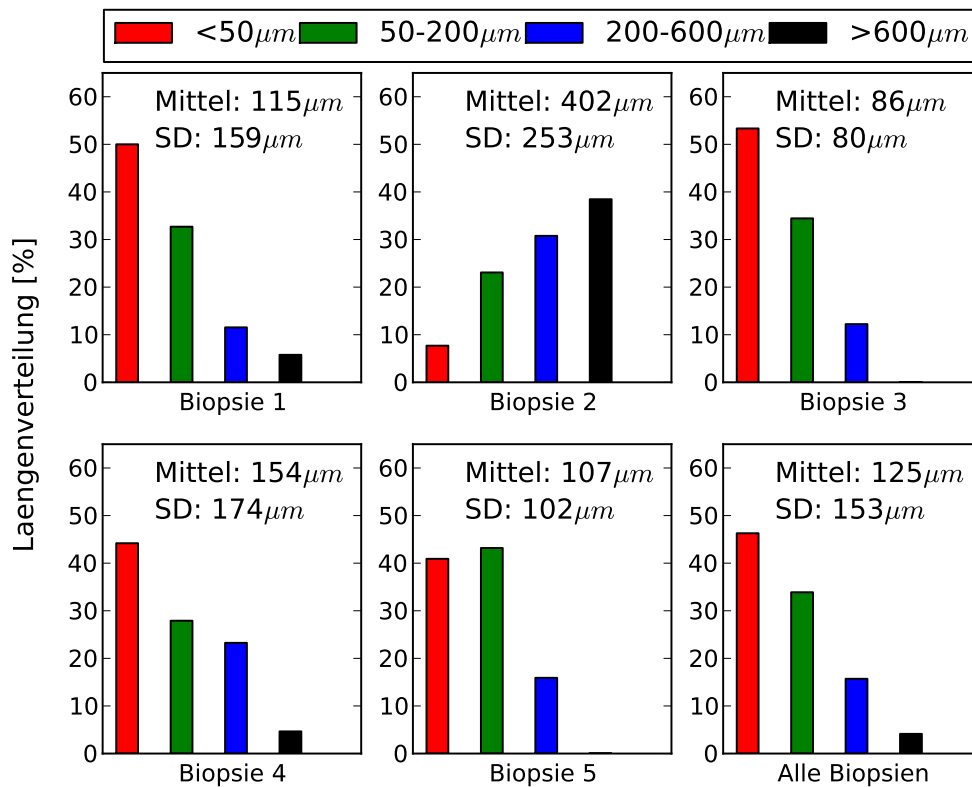


Abbildung 3.14: Längenverteilung der Fasern. In 4 von 5 Biopsien sinkt die Anzahl der Fasern mit zunehmender Länge. Fasern über 600 µm treten nicht in allen Biopsien auf. In Biopsie 2 sind die über 600 µm langen Fasern am häufigsten.

Da es sich bei dem beobachteten Areal um einen Ausschnitt handelt, sind einige Fasern, vor allem die längeren Fasern, an einem oder an beiden Enden abgeschnitten. In diesen Fällen sind die gemessenen Längen kürzer als die tatsächlichen Längen der Fasern. Dieser Fehler trifft natürlich für kurze Fasern, die das ausgewertete Areal unterschreiten nicht so stark zu, da sie höchstens angeschnitten sind oder ganz erfasst werden konnten.

In vier von fünf Biopsien treten die unter 50 µm langen Fasern am häufigsten auf und stellen insgesamt ca. 50% der gezählten Fasern dar. In den vier Biopsien mit überwiegend kurzen Fasern (<50 µm) nimmt die Anzahl der Fasern mit zunehmender Länge ab. In zwei der vier Biopsien (Biopsie 1 und 4) kommen zu ca. 5% über 600 µm lange Fasern vor.

Biopsie 2 fällt aus dem soeben beschriebenen Muster heraus. Hier ist die Verteilung der Längen umgekehrt. Die unter 50 μm langen Fasern sind am wenigsten vertreten und die Faseranzahl nimmt mit zunehmender Länge zu.

Die durchschnittliche Faserlänge aller Biopsien beträgt 125 μm (SD = 157 μm). Über die absoluten Minima und Maxima der Faserlänge können wir keine Aussage treffen, da unsere kürzeste Sequenz 8 μm ist und die langen Fasern zum Teil länger als der von uns ausgewertete Bereich sind.

3.5 Die Ausrichtung der kleinen Fasern

In aller Regel verlaufen die kleinen Fasern parallel zu den großen Muskelfasern. Beim Verfolgen der Fasern entsteht der Eindruck, dass die kleinen Fasern in konstantem Bezug zu den benachbarten großen Fasern stehen. Dadurch sind sie im nächsten Schnitt wieder gut zu identifizieren.

Wenn an einem Ort zwischen den großen Muskelfasern eine kleine Faser zu finden ist und endet, dann taucht an diesem Ort im weiteren Verlauf oft wieder eine kleine Faser auf. Wir nennen eine solche Anordnung im Folgenden in Serie liegend. (siehe Abbildung 3.4 - 3.9)

3.6 Der Durchmesser der kleinen Fasern

In den untersuchten Muskelarealen wurden in jedem Schnitt der minimale und der maximale Durchmesser aller kleinen Fasern ausgemessen.

3.6.1 Der Minimaldurchmesser

Im Längsverlauf zeigt sich, dass der Minimaldurchmesser der kleinen Fasern kaum, der Maximaldurchmesser jedoch stark schwankt. Die folgende Abbildung zeigt, wie oft in der jeweiligen Biopsie ein Minimaldurchmesser zwischen 0 - 30 μm gemessen wurde.

Ergebnisse

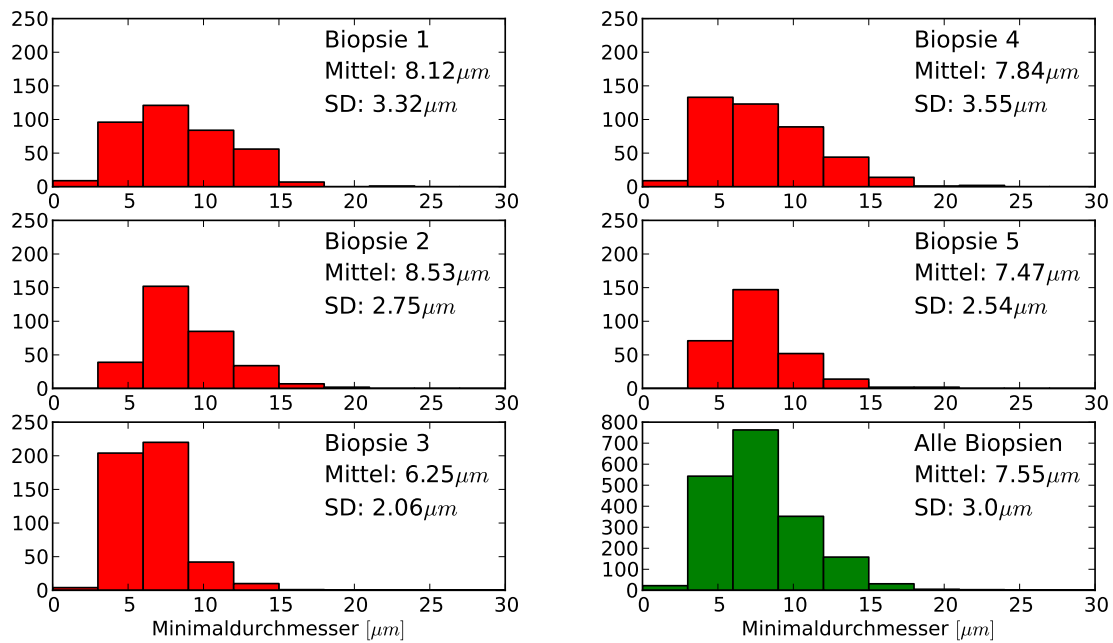


Abbildung 3.15: Häufigkeitsverteilung der Minimaldurchmesser

Der über alle Biopsien gemittelte Minimaldurchmesser der kleinen Fasern liegt bei $7,55 \mu\text{m}$ mit einer Standardabweichung von $3 \mu\text{m}$. Die Mittelwerte der einzelnen Biopsien variieren zwischen $6,25 \mu\text{m}$ und $8,53 \mu\text{m}$, die Standardabweichungen nehmen Werte zwischen $2,06 \mu\text{m}$ und $3,55 \mu\text{m}$ an. Es fällt auf, dass Biopsien mit größerem mittlerem Minimaldurchmesser auch eine größere Standardabweichung aufweisen.

3.6.2 Der Maximaldurchmesser

Wie beim Minimaldurchmesser, wurde auch der Maximaldurchmesser der MHCn-positiven Fasern in allen untersuchten Biopsien auf jeder Schnittebene gemessen.

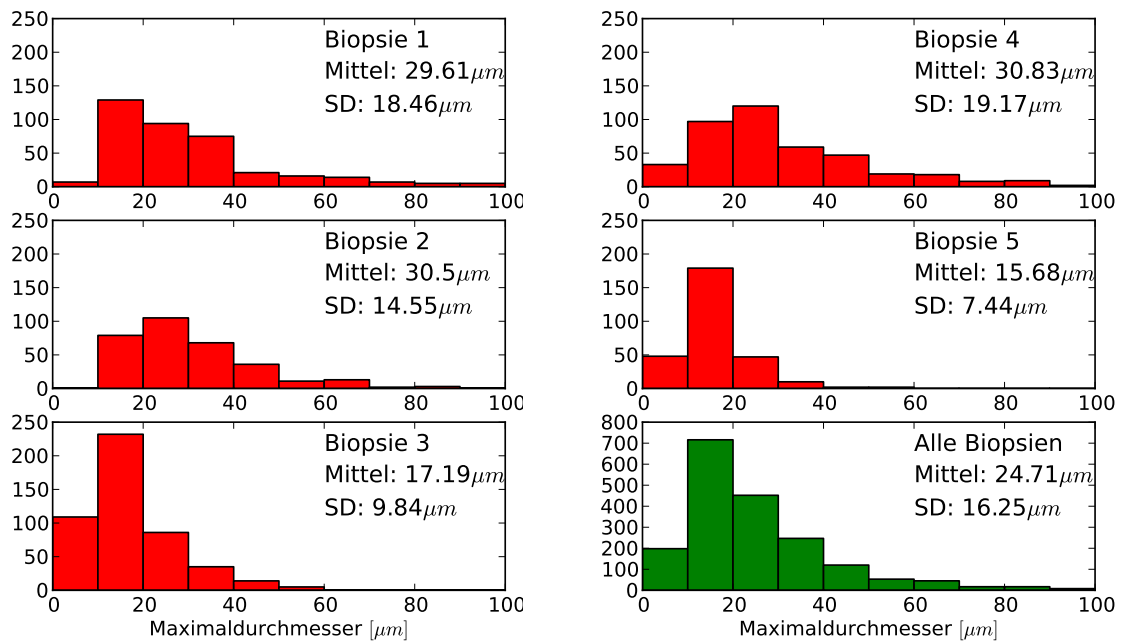


Abbildung 3.16: Häufigkeitsverteilung der Maximaldurchmesser. Die Variation ist sehr viel stärker als bei den Minimaldurchmessern

Der mittlere Maximaldurchmesser der kleinen Fasern in allen Biopsien liegt bei 24,71 μm mit einer Standardabweichung von 16,25 μm. Die mittleren Maximaldurchmesser variieren zwischen 15,68 μm und 30,83 μm. Die Standardabweichungen der einzelnen Biopsien liegen zwischen 7,44 μm und 19,17 μm. Es verhält sich hier, wie bei den Minimaldurchmessern so, dass bei Biopsien mit großem mittlerem Maximaldurchmesser auch eine größere Standardabweichung auftritt. Insgesamt ist die Standardabweichung bei den Maximaldurchmessern erheblich größer als bei den Minimaldurchmessern. Da gezeigt wurde, dass die Minimaldurchmesser selten größer als 10 μm sind, nehmen die Fasern mit großem Maximaldurchmesser eine stark abgeplattete Form an (siehe Abbildung 3.4 - 3.12).

3.7 Die Kerne der kleinen Fasern

3.7.1 Aufsuchen und Zuordnen der Kerne zu den kleinen Fasern

Die Stufenschnitte wurden abwechselnd mit MHCn und HE gefärbt. Auf den HE-gefärbten Schnitten sind die Kerne blau sichtbar und können den kleinen Fasern zugeordnet werden.

In den HE gefärbten Schnitten wurde in alle kleinen Fasern die Kernanzahl pro Schnitt gezählt.

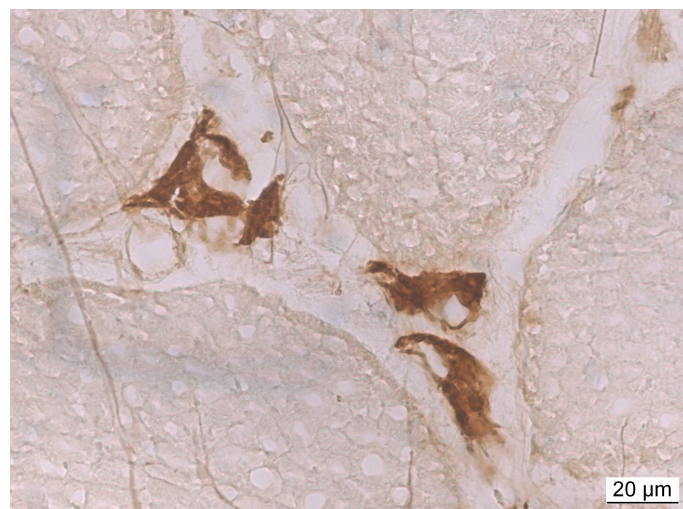


Abbildung 3.17: MHCn-positive kleine Fasern. In den kleinen Fasern sind Ausparungen zu sehen, die wahrscheinlich den in dieser Färbung nicht sichtbaren Kerne zuzuordnen sind.

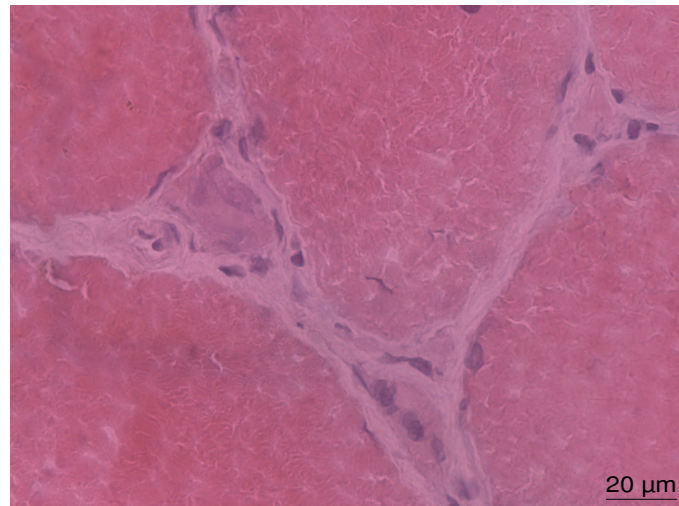


Abbildung 3.18: Kernfärbung. In der HE-Färbung sind die Kerne blau zu sehen. Es gibt Kerne, die eindeutig in den Fasern liegen und im Interstitium liegende Kerne.

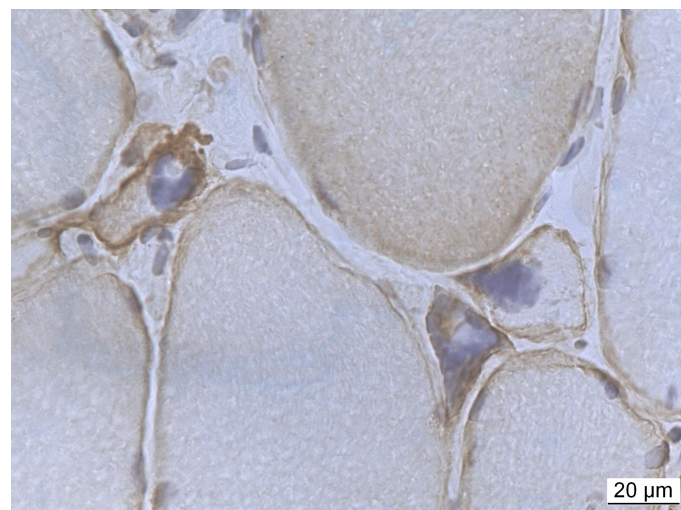


Abbildung 3.19: Merosin-Hämatoxylin-Kerngegenfärbung. Anti-Merosin ist spezifisch für Basalmembranen von Muskelzellen und wird auch als Laminin alpha2 bezeichnet. Diese Abbildung soll nochmals die Lage der Kerne innerhalb der kleinen Fasern verdeutlichen.

Es ist zu beachten, dass die gezählten Kerne nur etwa die Hälfte aller in der Faser enthaltenen Kerne darstellen. Der Grund ist die abwechselnde Färbung der Kernfärbung (Hämatoxylin) und Anti-MHCn. Es ist davon auszugehen, dass

Ergebnisse

sich die nicht berücksichtigten Kerne ähnlich verhalten, wie die gezählten. Es ist im Einzelfall allerdings denkbar, dass große Kerne zweimal angeschnitten wurden und dadurch doppelt gezählt wurden.

3.7.2 Anzahl der Kerne in den kleinen Fasern

Es hat sich gezeigt, dass die kleinen Fasern eine hohe Kerndichte aufweisen. In den folgenden Tabellen ist für jede Biopsie dargestellt, wie oft eine Kernanzahl in einem Faserquerschnitt einer kleinen Fasern gezählt wurde.

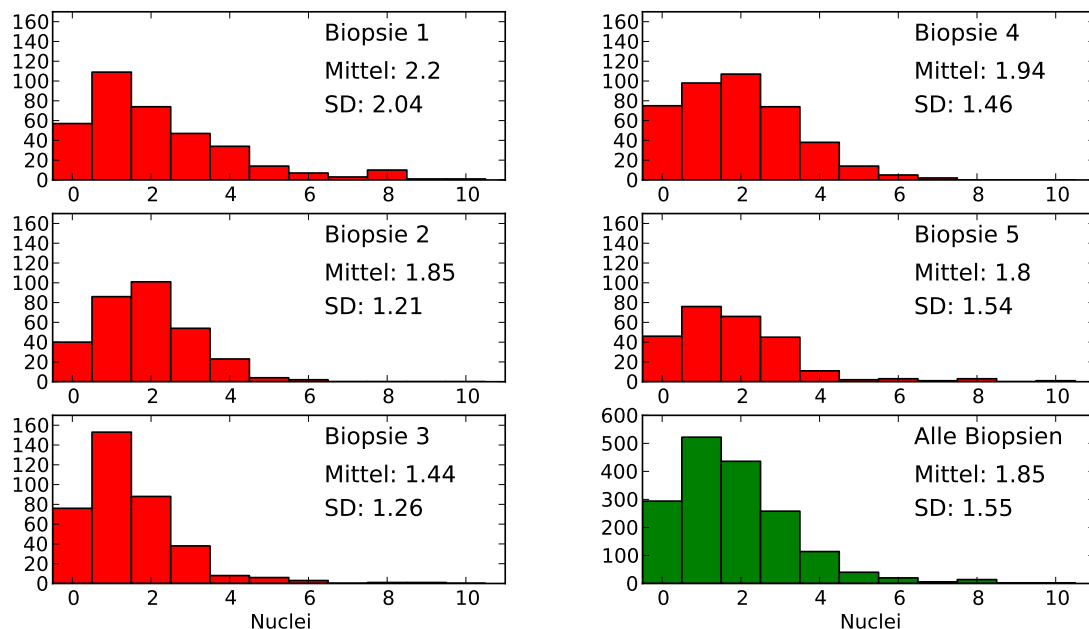


Abbildung 3.20: Kernverteilung in den kleinen Fasern

Das Ergebnis lag zwischen null und zehn Kernen pro Querschnitt. Die häufigste Kernanzahl pro Faserquerschnitt liegt zwischen 1-2 Kernen. Der Mittelwert aller gezählten Kerne pro Faserquerschnitt liegt bei 1,85 Kernen mit einer Standardabweichung von 1,55. Mehr als 6 Kerne pro Faserquerschnitt wurden nur vereinzelt gezählt. Die Kernhaufen aus pygnotischen Kernen, werden auch als „nuclear clumps“ bezeichnet und gelten als histologisches Zeichen für neurogene Atrophie.

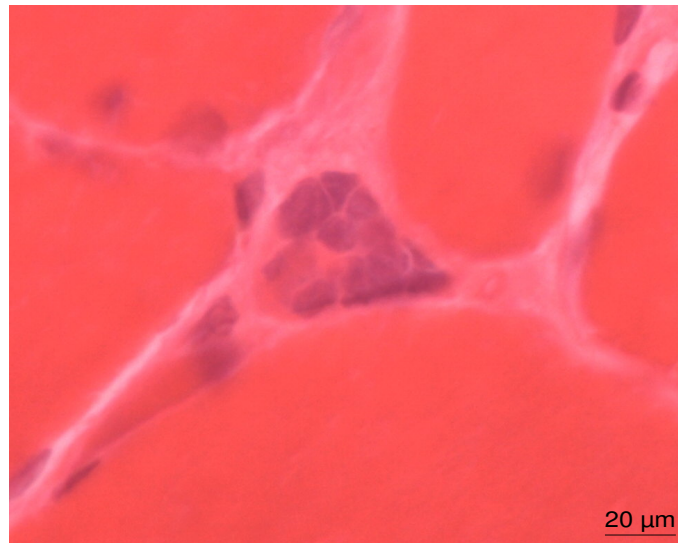


Abbildung 3.21: „Nuclear clump“ in einer kleiner Faser, HE-Färbung

3.8 Weiterführende Analyse der Fasermorphologie

Wir gewannen den Eindruck, dass die sehr breiten Faserabschnitte der kleinen Fasern nicht in allen Fasern gleich häufig vorkommen. Es scheint so zu sein, dass es einige Fasern gibt, die im Durchmesser zwischen dünn und sehr breit schwanken, dass heißt im Profil eher rau sind und andere, die durchgehend dünn sind. Außerdem erschien es bemerkenswert, dass die MHCn-positiven Fasern relativ oft Kernhaufen enthalten, was für neu entstandene Fasern untypisch wäre. Diese großen Unterschiede in der Morphologie warfen bei uns die Frage auf, ob es sich bei den MHCn-positiven kleinen Fasern nicht um eine in der Entstehung homogene Gruppe handelt, sondern um Fasern unterschiedlicher Genese. Denkbar wäre z.B., dass es sich zum einen, um durch Myogenese neu entstandene und zum anderen um stark atrophe denervierte Fasern handelt. Dieser Gedanke liegt nahe, da in einigen Fasern Kernhaufen zu finden sind und in anderen nicht. Es ergaben sich folgende Fragen:

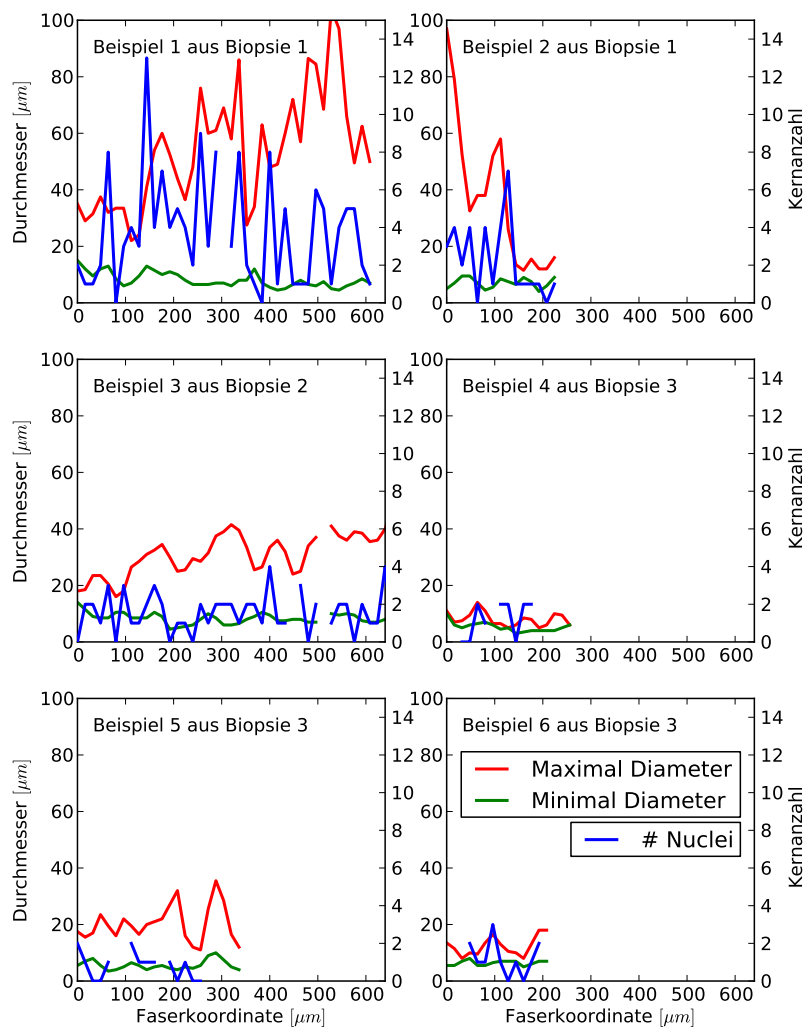
1. Wie kommt es zu der großen Vielfalt innerhalb der Fasermorphologien? Lassen sich die Fasern Gruppen zuordnen, die durch morphologische Kriterien voneinander zu unterscheiden sind?

Ergebnisse

2. Sind die kleinen Fasern anhand ihres Durchmesserprofils zu charakterisieren?
3. Wie sind die Kerne verteilt? Lassen sich die Kernhaufen, die wir nur in einigen Fasern gefunden haben einer bestimmten Fasermorphologie zuordnen?
4. Hat die Morphologie des Faserprofils und die Kernverteilung Auswirkungen auf die Länge der Fasern?

3.8.1 Profile

Um die Unterschiedlichkeit der kleinen Fasern besser darzustellen, zeigen wir beispielhaft einzelne Faserprofile aus den fünf Biopsien. Es gibt eher runde Fasern, bei denen Minimal- und Maximaldurchmesser durchgehend dicht zusammen liegen. Bei anderen liegt der Maximaldurchmesser weit über dem Minimaldurchmesser. Oft sind diese breiten, flachen Fasern sehr lang, sie können aber auch sehr kurz sein (Beispiel 1 und 2). Betrachtet man die Kerne, fällt auf, dass in den breiten, flachen Fasern zwar häufiger Kernhaufen vorkommen, diese aber nicht unbedingt an den breitesten Stellen dieser Faser liegen (Beispiel 8 und 12).



Ergebnisse

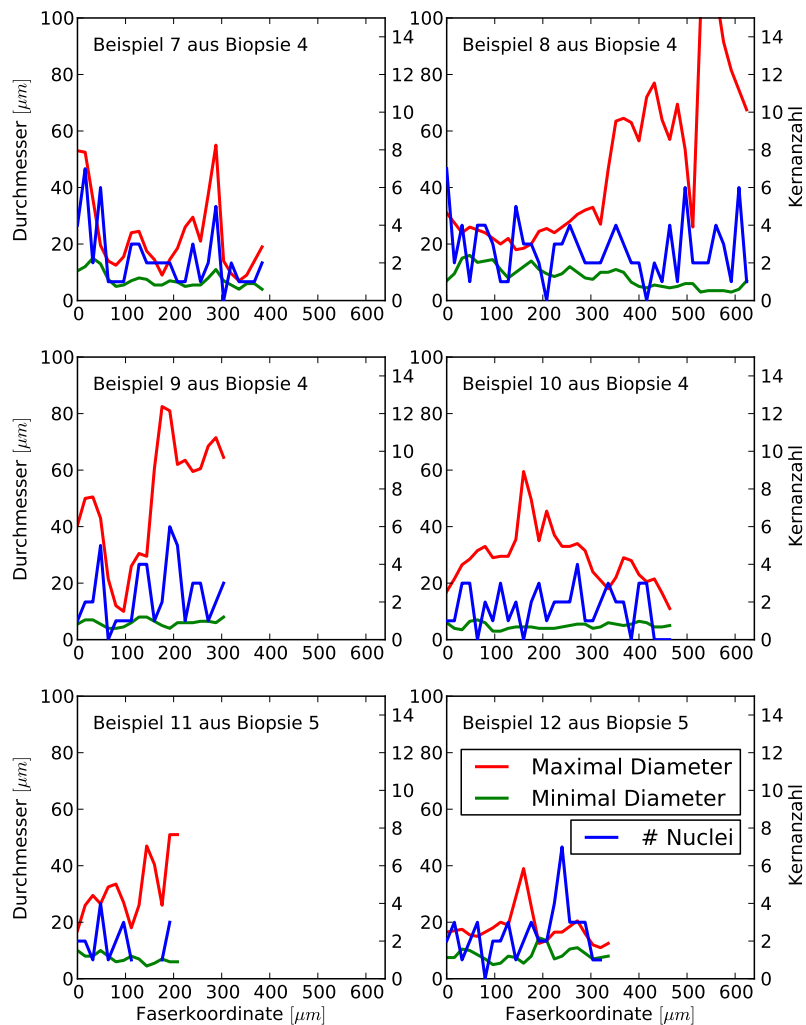


Abbildung 3.22: Die Abbildungen zeigen zwölf Faserprofile, wie sie in unseren Biopsien vorkommen. Die Faser wird entlang der Abzisse in μm aufgetragen. Grün ist der Minimaldurchmesser, rot ist der Maximaldurchmesser (linke Ordinate) und blau die Anzahl der Kerne (rechte Ordinate)

3.8.2 Die Rauigkeit der Fasern

Wir suchten nach einem Maß, um die Unterschiede der Fasermorphologien gut zu charakterisieren und zu quantifizieren. Wir wählten die Standardabweichung

des Maximaldurchmessers, um die Rauigkeit des Faserprofils zu beschreiben. In der folgenden Abbildung sind die Standardabweichungen der Maximaldurchmesser aller Fasern der Häufigkeit nach aufgetragen.

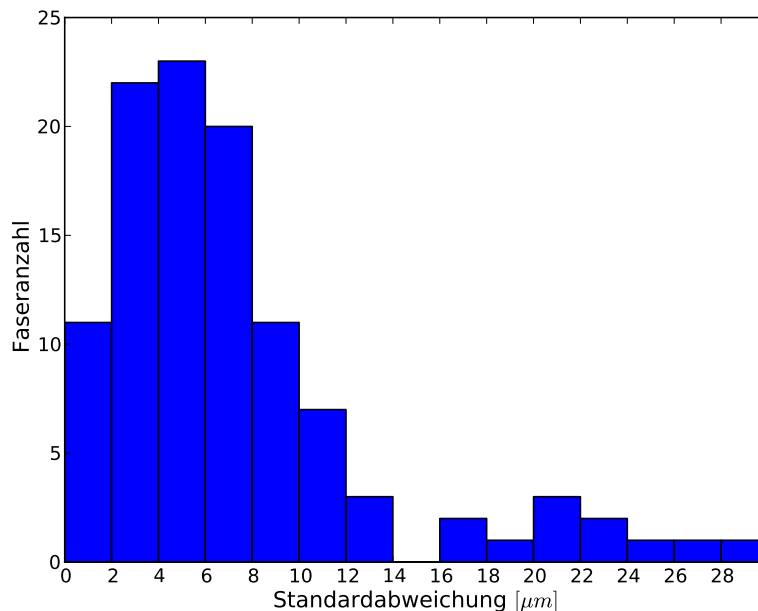


Abbildung 3.23: Standardabweichung des Maximaldurchmessers der einzelnen Fasern. Es zeigt sich eine Häufung zwischen 2 - 8 µm SD und nur wenige Fasern mit über 14 µm SD.

Der Großteil der Fasern hat im Maximaldurchmesser eine Standardabweichung von 2 - 8 µm. Dh., dass diese Fasern im Maximaldurchmesser nicht stark schwanken und ein eher glattes Profil haben. Ab einer Standardabweichung von etwa 14 µm flacht die Kurve sehr stark ab, es befinden sich also nur wenige Fasern in diesem Bereich mit großen Schwankungen im Profil.

3.8.3 Kernverteilung im Verhältnis zum maximalen Faserdurchmesser

In den folgenden Grafiken werden von allen untersuchten Fasern alle gemessenen Maximaldurchmesser und die jeweilige Kernanzahl auf dieser Schnittebene gegeneinander aufgetragen. Es soll untersucht werden, ob die Anzahl der Kerne direkt mit der jeweiligen Breite der Faser zusammen hängt.

Ergebnisse

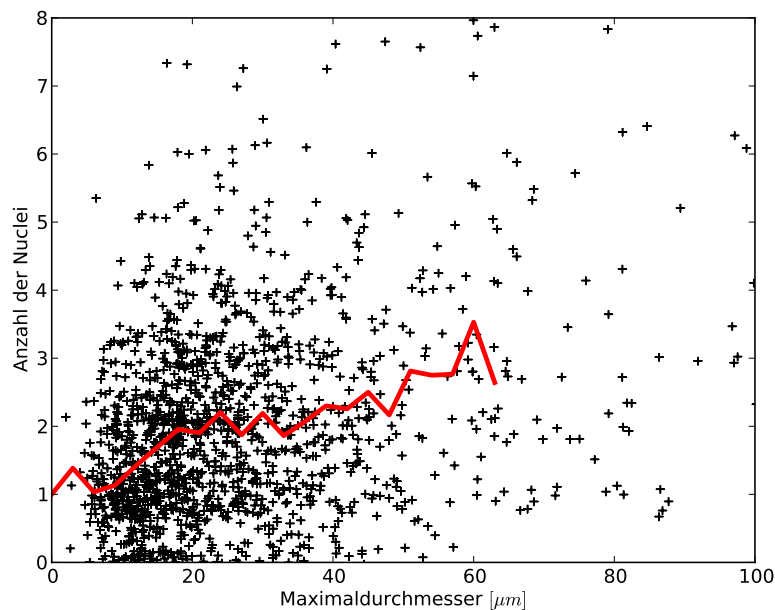


Abbildung 3.24: Kernanzahl aufgetragen gegen den Maximaldurchmesser der jeweiligen Schnittebene. Die rote Kurve zeigt die Mittelwerte der Kernanzahl bei steigendem Maximaldurchmesser.

Es zeigt sich eine leichte Tendenz zu größerer Kernanzahl bei großen Faserdurchmessern. Es scheint aber nicht so zu sein, dass die Kernhaufen immer in den breiten Faserabschnitten liegen, was sich in den Profilen bereits angedeutet hat.

3.8.4 Der Kerngehalt in rauen und glatten Fasern

In der folgenden Grafik wird gezeigt, dass in Fasern mit stark schwankenden Maximaldurchmessern signifikant mehr Kerne enthalten sind, als in dünnen, gleichmäßigen Fasern. Dazu teilten wir alle von uns untersuchten Fasern in solche mit einer Standardabweichung der Maximaldurchmessers unter und über $15 \mu\text{m}$ und ermittelten die jeweilige mittlere Kerndichte pro Schnittebene in einer Faser .

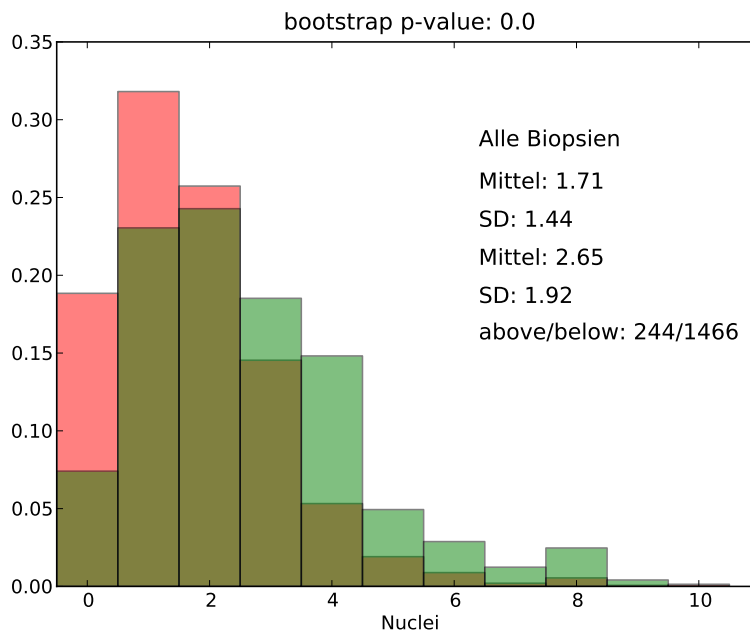


Abbildung 3.25: Kernverteilung in Fasern mit Standardabweichung des Maximaldurchmessers größer (grün) und kleiner (rot) 15 μm

Es zeigt sich, dass die mittlere Kernanzahl bei Fasern mit einer Standardabweichung des Maximaldurchmessers größer 15 μm 2,65 Kerne beträgt und bei Fasern mit Standardabweichung kleiner 15 μm nur 1,71 Kerne. Statistische Tests bestätigen dieses Ergebnis mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% als signifikant.

3.8.5 Autokorrelation der Kerne

Um zu untersuchen, ob die Kerne unabhängig von der Fasermorphologie einem Verteilungsmuster folgen, analysierten wir die Kernverteilung mit einer Autokorrelationsfunktion, die eine Korrelation der Nachbarschaftsverhältnisse untersucht. Um zu quantifizieren wie schnell sich die Kerndichte und der Durchmesser entlang der Faser ändert, haben wir die Autokorrelation der Kerndichte und des Durchmessers zwischen zwei Schnitten der Faser als Funktion des Abstandes der Schnitte bestimmt. Wir erwarten, dass die Maße in weit von einander entfernten Schnitten unabhängig sind. Zwei Messungen in benachbarten Schnitten

Ergebnisse

können sehr wohl korreliert sein. Messen wir zum Beispiel einen großen Wert in einem Schnitt, erwarten wir einen ähnlich großen Wert in der näheren Umgebung. Die Autokorrelationsfunktion misst diese Tendenz als Funktion des Abstandes. Sie ist definiert als das Mittel des Produktes der Messwerte in gegebenem Abstand, abzüglich des Produktes der Mittelwerte. Die Autokorrelationsfunktion am Abstand null ist die Varianz der Messgröße.

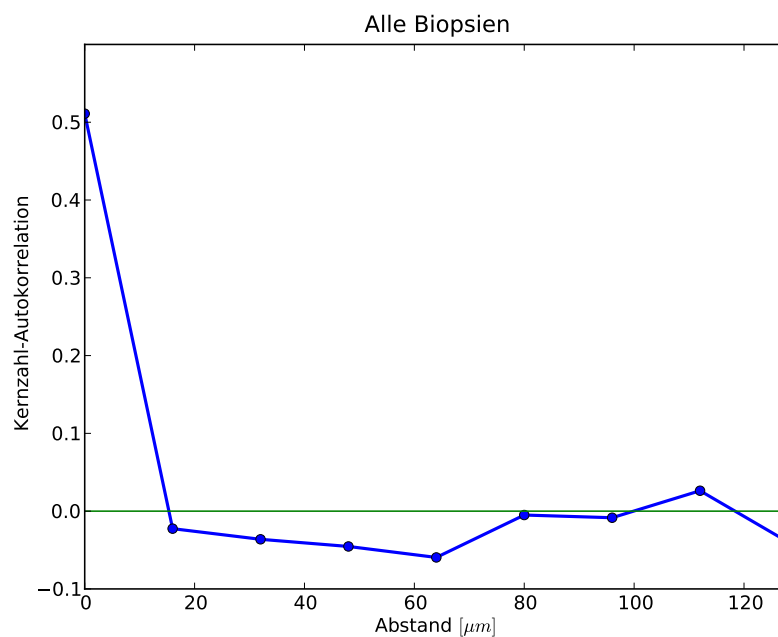


Abbildung 3.26: Autokorrelation der Kerne in den kleinen Fasern

Die Funktion fällt, ausgehend von der Varianz der Messwerte (bei $Y : 0$), sofort ab und schwankt um null, da der Mittelwert der Kernanzahl abgezogen wurde. D.h., dass die Anzahl der Kerne an einem bestimmten Ort in einer Faser keinen Einfluss auf die Kernanzahl in der Nachbarschaft hat.

3.8.6 Rauigkeit der einzelnen Fasern und der Kernhaufen

Da die Kernhaufen („nuclear clumps“) ein wichtiger Hinweis auf atrophe Fasern sind, haben wir eine Analyse durchgeführt, die das Verhältnis zwischen Rauigkeit und größtem Kernhaufen einer Faser charakterisiert. In der folgenden Abbildung

sind die größten Kernhaufen von Fasern mit einer Standardabweichung des Maximaldurchmessers größer und kleiner 15 μm dargestellt.

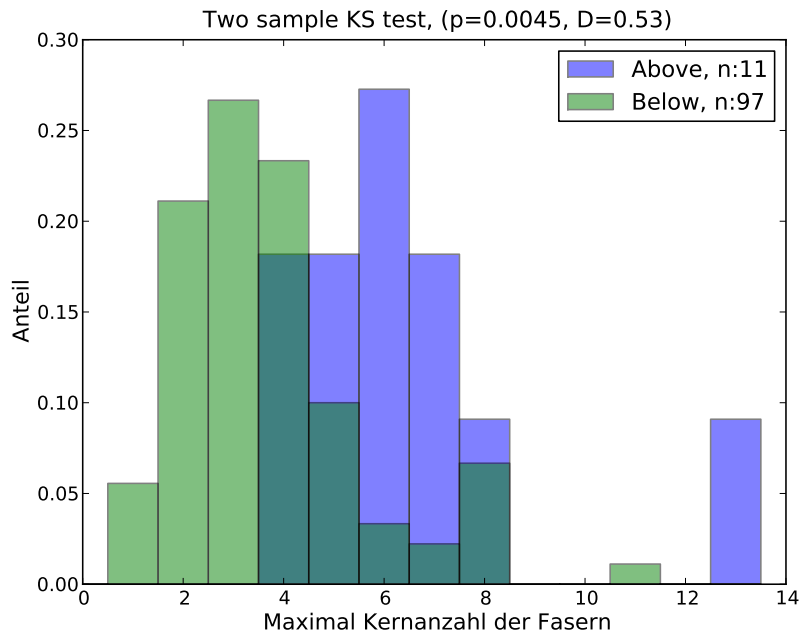


Abbildung 3.27: Standardabweichung des Maximaldurchmessers der einzelnen Fasern größer/kleiner 15 μm im Verhältnis zu dem größten in der Faser enthaltenen Kernhaufen.

Es zeigen sich überraschend deutlich zwei Fasergruppen, die sich signifikant voneinander unterscheiden ($p = 0,0045$). Zu sehen ist, dass die Gruppe an Fasern mit geringer Schwankung in der Breite, am häufigsten maximal 3 Kerne und nur selten mehr als 5 Kerne enthält. Allerdings gibt es vereinzelt Fasern dieser Gruppe mit sehr großen Kernhaufen. In der Gruppe, mit einer Standardabweichung des Maximaldurchmessers von über 15 μm liegt die häufigste Kernanzahl bei 6 Kernen und es gibt nie weniger als vier Kerne, als größte Kernanzahl in einer Faser.

3.8.7 Einfluss des maximalen Faserdurchmessers auf die Faserlänge

Die MHCn-positiven kleinen Fasern weisen eine starke Varianz bezüglich ihrer Länge (<8 bis >600 μm) und ihres Maximaldurchmessers (<7 bis >100 μm) auf.

Ergebnisse

Es stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen gibt. Deshalb wurde die Länge aller Fasern gegen die Standardabweichung ihres Maximaldurchmessers aufgetragen.

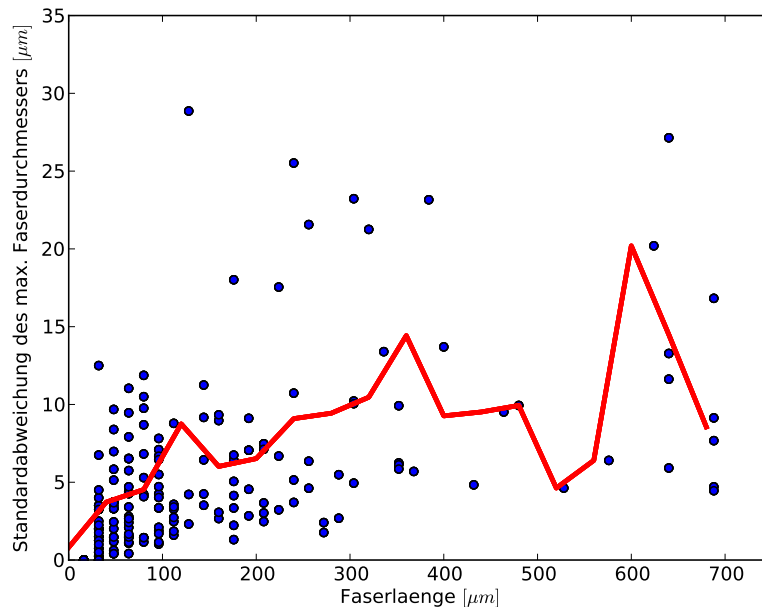


Abbildung 3.28: Standardabweichung des Maximaldurchmessers im Verhältnis zur Faserlänge. Die rote Kurve beschreibt den Mittelwert der SD des Maximaldurchmessers bei der jeweiligen Faserlänge.

Es zeigt sich eine Tendenz zu längeren Fasern bei stärker schwankendem Maximaldurchmesser (größere SD). Da die Anzahl der langen Fasern viel geringer ist, als die der kurzen Fasern, sind die Mittelwerte je länger die Fasern werden immer weniger aussagekräftig. Die zahlreichen kurzen Fasern ($< 300 \mu\text{m}$) haben eine deutlich geringere Standardabweichung im Maximaldurchmesser und tendieren deutlich zu zunehmender Länge bei größeren Standardabweichungen.

3.8.8 Verhältnis zwischen Kerndichte und Faserlänge

Nachdem wir die Beziehung zwischen der Standardabweichung des Maximaldurchmessers auf die Länge untersucht haben, interessierte uns die Abhängigkeit der Faserlänge von der maximalen Kernanzahl. Dafür wurden die Fasern in

eine Gruppe mit Kernhaufen bis maximal drei Kerne und eine Gruppe mit allen größeren Kernhaufen geteilt.

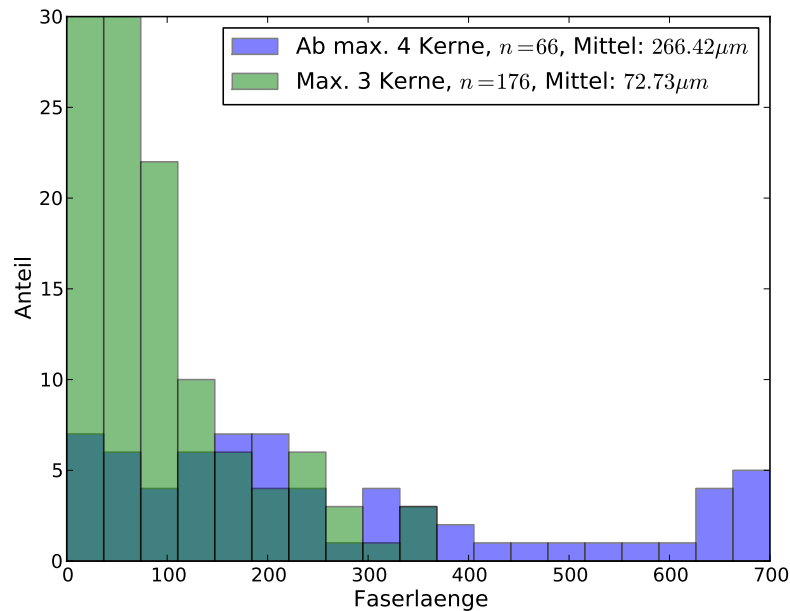


Abbildung 3.29: Häufigkeitsverteilung der Faserlängen (μm) in zwei Gruppen: hellgrün sind die Faserlängen von Fasern mit maximal 3 Kernen pro Schnittebene und blau sind die Faserlängen von Fasern mit 4 Kernen oder mehr pro Schnittebene.

Der Großteil der Fasern ($n = 176$) hat nie über 3 Kerne pro Schnittebene und enthält demnach keine pygnotischen Kernhaufen. Diese Fasern sind nie länger als $400 \mu\text{m}$, ihr Großteil sogar kürzer als $100 \mu\text{m}$. Im Mittel ist diese Gruppe von Fasern $72,73 \mu\text{m}$ lang.

Die Fasern mit Kernhaufen ab 4 Kernen ($n = 66$) sind mit $266,42 \mu\text{m}$ um ein Vielfaches länger. In der Fasergruppe mit Kernhaufen gibt es neben den sehr lange Fasern auch viele mittellangen und kurze Fasern. Bezüglich ihrer Länge handelt es sich bei diesen Fasern um eine sehr heterogene Gruppe.

4 Diskussion

4.1 Morphologie der kleinen Fasern

Unsere Ergebnisse bestätigen ein häufiges Auftreten von MHCn-positiven kleinen Muskelfasern in humanen Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie. In einer Arbeit [29], in der mit sehr ähnlichen Auswahlkriterien 66 Muskelbiopsien auf kleine MHCn-positive Fasern untersucht wurden, wurden in 75,8% der Fälle kleine Fasern gefunden. Dieses Ergebnis unterstreicht unsere Vermutung, dass MHCn-positive kleine Fasern eine häufige Erscheinung bei neurogener Atrophie sind.

Alle von uns untersuchten Biopsien zeigen histologisch typische Merkmale für langzeit-denerviertes Muskelgewebe. Wobei die Häufigkeit, Form und Länge der kleinen Fasern zwischen den Biopsien variiert. Auch innerhalb einer Biopsie unterscheiden sich die kleinen Fasern in Länge, Form und Kernverteilung.

Es ist zu beachten, dass es sich bei neurogener Atrophie um die Folge eines chronischen Krankheitsverlaufes handelt, bei dem es neben Denervation auch immer wieder zu Reinnervation kommt. So kann es zu einem Nebeneinander unterschiedlichster Degenerations- und Regenerationsstadien kommen.

Im folgenden Abschnitt werden Angaben aus experimentellen Daten besprochen, die weitere Aspekte der heterogenen Morphologie der kleinen Fasern beleuchten. In einer Arbeit mit Rattenmuskel von Borisov et al. [2] wird darauf hingewiesen, dass Muskelfasern nach Denervation sehr unterschiedlich stark atrophieren. Zum einen atrophieren die schnellen Muskelfasern sehr viel stärker als die langsamen Muskelfasern. Auch innerhalb der beiden Gruppen gibt es große Unterschiede im Ausmaß der Atrophie nach Denervation. Individueller Krankheitsverlauf und unterschiedliches Ansprechen auf Denervation werden Anteil an dem gemischten Bild der von uns untersuchten Biopsien haben.

Da sowohl denervierte als auch neugebildete Fasern MHCn-positiv sind, ist da-

von auszugehen, dass die von uns untersuchten MHCn-positiven kleinen Fasern sowohl fortgeschritten atrophe, als auch neu gebildete Fasern sein können. In einem vergleichenden Versuch an denerviertem, geschädigtem Hühnermuskel und geschädigtem Muskel ohne Denervation konnten Cerny und Bandmann [30] zeigen, dass die ersten Fasern in der Gruppe mit denerviertem Muskelgewebe nach 16 Tagen begannen MHCn zu exprimieren und nach 6 Wochen nahezu alle denervierten Fasern MHCn-positiv waren. Muskeln, in denen Nekrose und Regeneration erzeugt wurde, die aber nicht denerviert wurden, zeigten nach 7 Tagen MHCn-positive kleine Fasern, die als Myotuben gewertet wurden. Diese Fasern haben sich innerhalb von 2 bis 5 Wochen zu normal großen Muskelfasern ausgebildet und nur noch adultes Myosin exprimiert. Die denervierten, regenerierenden Fasern zeigten sich dagegen auch nach mehr als 8 Wochen als MHCn-positiv. Das heißt, dass regenerierende und degenerierende Fasern für einige Wochen anhand ihres Myosinexpressionsmuster nicht zu unterscheiden sind.

Im Fall unserer Biopsien kommt hinzu, dass bei Krankheiten, die neurogene Atrophie verursachen, die Innervation neugebildeter Fasern nicht zu erwarten ist. Dadurch können die neugebildeten Myotuben nicht zu adulten Fasern ausreifen, sondern beginnen wieder zu atrophieren.

In einer elektronenmikroskopischen Gewebestudie an langzeit-denerviertem Froschmuskel wurde beobachtet, dass neugebildete Muskelfasern, bei Ausbleiben der Innervation nach 20 Tagen wieder begannen zu atrophieren [4]. In einer Arbeit, die bei kleinen Fasern und angulär-atrophen Fasern die Expression von MHCn und NCAM untersuchte, wurde festgestellt, dass sich das Expressionsmuster dieser beiden Marker, bei diesen morphologisch unterschiedlichen Fasern signifikant von einander unterscheidet. Dies unterstreicht unsere Annahme, dass es sich bei den kleinen Fasern nicht nur um stark atrophe anguläre Fasern handelt [29].

Wir nehmen an, dass die unterschiedlichen Erscheinungsformen, der von uns untersuchten kleinen MHCn-positiven Fasern durch dieses Nebeneinander regenerierender und degenerierender Fasern zu erklären ist.

In einer Arbeit von Kern et al. [18] wird das Neuauftreten von kleinen Muskelfa-

Diskussion

ern bei Langzeitdenervation untersucht. Das Muskelgewebe stammt von Patienten, bei denen die Denervation über 9 Monaten bis hin zu 19 Jahren besteht. Die Arbeit beschreibt die typischen Zeichen für Langzeitdenervation, wie z. B. stark atrophe Fasern, „clumps“ und kleine MHCe positive Fasern. Diese Fasern machen ca. 1% der gesamten Muskelfasern aus. Das heißt, dass Muskelgewebe auch nach jahrelang verlaufender, denervierender Erkrankung Versuche unternimmt, neue Fasern zu bilden.

Die von uns untersuchten Biopsien sind, in der Auswahl, den in dieser Studie untersuchten Biopsien sehr ähnlich, weshalb wir annehmen, dass wir bei den von uns gefundenen kleinen Fasern, neben atropen auch von neugebildeten Fasern ausgehen können.

Eine Arbeit von Borisov et al. [2] bietet einen weiteren Aspekt, der die unterschiedlichen Erscheinungsformen der kleinen Fasern erklären könnte. Die Untersuchungen sprechen dafür, dass es nach Denervation zwei Formen der Myogenese gibt. Die Autoren stellen fest, dass 10-21 Tage nach Denervation kleine Fasern auftreten. Zu diesem Zeitpunkt weisen die großen Fasern noch kaum Atrophie auf. Diese kleinen Fasern liegen vor allem im Interstitium. Der Großteil der kleinen Fasern trat erst zwei bis vier Monate nach Denervation auf, nun jedoch innerhalb der Basalmembranen atropher Fasern. Diese zweite Generation an Fasern zeigte oft unnormales und abgebrochenes Wachstum. Beide Fasertypen könnten in unseren Biopsien enthalten sein.

In einer Arbeit von Schmalbruch [20], die sich allerdings nur auf Regeneration nach Schädigung und nicht auf Denervation bezieht, wird die Regeneration von Muskelfasern sehr detailliert untersucht. Er beschreibt vier Arten der Faserregeneration und Neubildung (siehe Abbildung 2.1).

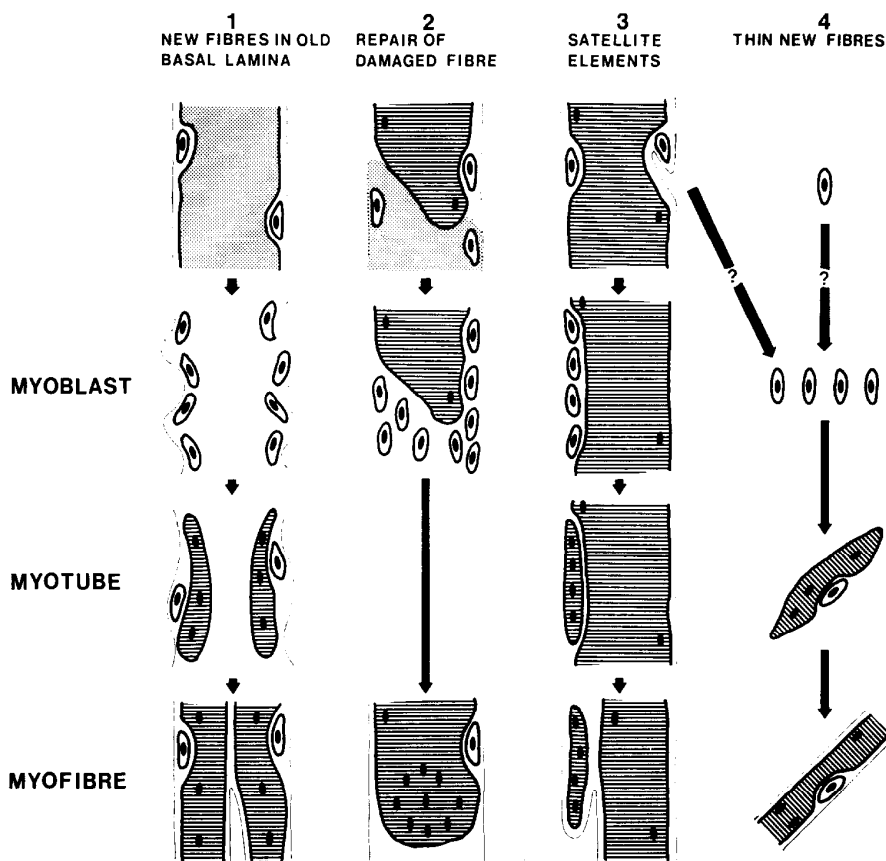


Abbildung 4.1: Vier Formen der Regeneration von Muskelfasern. Abbildung nach Schmalbruch [20]

Drei davon finden innerhalb der Basalmembran der geschädigten Faser statt und eine außerhalb im Interstitium. Bei letzterer bleibt für ihn unklar, ob die neuen Fasern aus Satellitenzellen gebildet werden oder aus Stammzellen anderer Gewebe. Er stellt fest, dass diese Fasern unreif und klein bleiben. In dieser Arbeit wird auch dargestellt, dass Fasern, die die Endplattenzone des Muskels nicht erreichen nicht innerviert werden und wegen fehlender Innervation nicht ausreifen. Alle vier Arten der Regeneration wären für unsere Biopsien vorstellbar. Eine Ausreifung zu adulten Muskelfasern ist durch fehlende Reinnervation jedoch eher unwahrscheinlich.

4.1.1 Der Verlauf und die Lage der kleinen Fasern

In den Stufenschnitten zeigte sich, dass der Verlauf der kleinen Fasern gut von einem Schnitt zum nächsten zu verfolgen ist. Die Ausrichtung der kleinen Fasern relativ zu den großen Fasern ist in der Literatur kaum beschrieben. Es zeigte sich, dass sie in aller Regel parallel zu den großen Fasern verlaufen. In einer Arbeit von Borisov mit langzeit denervierten Rattenmuskeln, in der ebenfalls das Vorkommen von Muskelfasern mit sehr kleinem Durchmesser beschrieben wird, werden diese auch als dicht mit großen Fasern assoziiert beschrieben. In dieser Arbeit, wird auch erwähnt, dass durch mechanische Hindernisse, wie Fibrose und unvollständig abgebaute Faserfragmente die Migration, Fusion und Ausreifung der Muskelfasern gestört werden kann. Weiterhin könne Myogenese sowohl innerhalb der Basalmembranen atropher Muskelfasern, als auch ausserhalb derselben stattfinden. Die leeren, oft vielfach gefalteten Basalmembranen, werden auch als potentielle mechanische Hindernisse angesehen. So kommt es, dass vielfach Gruppen unausgereifter, z.T. verzweigter kleiner Fasern zu finden sind [3]. Auch von Schmalbruch wird immer wieder das starke Verzweigen von regenerierenden Fasern beschrieben, wenn sie nicht reinnerviert werden [21]. Da wir die Fasern in Querschnitten untersucht haben, ist es für uns nicht möglich Verzweigungen und neu beginnende Fasern von einem Schnitt zum nächsten zu unterscheiden.

Die Abfolge der kleinen Fasern entlang der großen Fasern erweckte bei uns den Eindruck, dass die kleinen Fasern in Serie zwischen den großen Fasern liegen. D.h., dass wenn an einer Stelle eine Faser aufhört, in einem nachfolgenden Querschnitt gehäuft an der gleichen Stelle erneut eine kleine Faser auftreten und dies sich in Folge wiederholt. Da es sich bei diesen Serien oft um kurze Fasern mit kleinen Durchmessern handelt, liegt die Vermutung nahe, dass hier aus Satellitenzellen neue Myotuben entstanden sind, die bei fortschreitender Regeneration zu einer adulten Muskelfaser fusionieren könnten.

In diesem Zusammenhang ist interessant zu vermerken, dass elektronenmikroskopische Studien die kleinen Fasern häufig innerhalb der Basalmembran adulter Fasern zeigen. Dies äußert sich in Form einer charakteristischen Doppelschicht

der Basalmembranen, da die kleinen Fasern typischerweise auch eine eigene Basalmembran ausbilden. Die Basalmembran der adulten Faser wird in diesem Fall auch als Leitstruktur für das Wachstum der neuen Fasern angesehen [3].

In einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von Schmalbruch wird ebenfalls eine serielle Anordnung neuentstandener Fasern beschrieben. Er zeigt Fasern, die innerhalb leerer Basalmembranen untergegangener Muskelfasern liegen. Da diese Fasern kürzer als die ursprünglichen Fasern sind, liegen sie in Serie und sind durch myotendinous junctions verbunden [25] [20]. Ob die von uns beobachteten, in Serie liegenden Fasern auch verbunden sind und in einer Basalmembran liegen, konnten wir lichtmikroskopisch nicht beurteilen.

4.1.2 Die Länge der kleinen Fasern

Es zeigte sich, dass die MHCn-positiven kleinen Fasern stark in der Länge variieren. Wir fanden kurze Fasern, die nur über ein oder zwei der 8 μm dicken Schnitte zu verfolgen waren und so lange kleine Fasern, die das von uns untersuchte Areal (mind. 600 μm) überschritten. Die große Länge der kleinen Fasern entsprach nicht unseren Erwartungen, so dass wir keine Aussage darüber treffen können, wie lang die kleinen Fasern maximal sein können. Auch unsere mittleren Faserlängen der einzelnen Biopsien sind nur über das von uns untersuchte Areal von ca. 600 μm gemittelt und vermutlich kürzer als der tatsächliche Wert.

Die großen Längenunterschiede der kleinen Fasern, werten wir u. a. als Hinweis darauf, dass es sich, wie oben beschrieben, um unterschiedliche Faserentitäten handeln könnte. Nach den bisherigen Kenntnissen wären bei langzeitdenervierten Muskeln eher kurze Fasern zu erwarten, da keine Innervation der neugebildeten Fasern auftritt und die Ausreifung ausbleibt. Dabei ist insbesondere die Vermutung von Borisov zu beachten, dass es sich um einen späteren, schwächeren Myogeneseschub handelt und die Fasern durch ausbleibende Innervation und wegen mechanischer Widerstände im atrophen Gewebe kurz bleiben [3]. In der Regel haben wir in den Biopsien eine große Anzahl kurzer Fasern und nur wenige sehr lange Fasern gefunden. Nur in einer Biopsie (Biopsie 2) zeigte sich ein reziprokes Verhältnis. Wir haben in dieser Biopsie, in dem von uns un-

Diskussion

tersuchten Areal, insgesamt nur 13 Fasern gefunden, die jedoch zum Großteil eine beträchtliche Länge haben. Außerdem haben wir sehr große Maximaldurchmesser gemessen und es kommen im Vergleich zu den anderen Biopsien relativ wenig Kernhaufen vor. Wir vermuten, dass es sich bei den langen, breiten Fasern dieser Biopsie eher um atrophe, denervierte Fasern handelt, die im weiteren Verlauf zu „nuclear clumps“ degenerieren würden. In der Umgebung dieser langen, vermutlich atrophischen Fasern haben wir viele kurze kleine Fasern finden können, die als Reaktion auf die Denervation durch Myogenese entstanden sein könnten. Dies könnte das Nebeneinanderliegen von sehr kurzen und sehr langen Fasern erklären. Insgesamt bildet diese Biopsie innerhalb unseren Biopsien eine Ausnahme.

4.1.3 Der Minimaldurchmesser

Die Minimaldurchmesser aller untersuchten MHCn-positiven Fasern in den fünf Biopsien erwiesen sich als ein nahezu konstanter Wert. Insgesamt liegt der mittlere Minimaldurchmesser bei 7,55 μm mit einer Standardabweichung von 3 μm . Diese Größe läßt vermuten, dass neu entstehende Fasern, die im Minimaldurchmesser noch kleiner sind, noch kein Myosin exprimieren und deshalb in unseren Ergebnissen nicht auftauchen.

Wir sind bei unserer Untersuchung von einer Definition von Schultz ausgegangen, der den Durchmesser der kleinen Fasern im Experiment bei Ratten als kleiner 10 μm beschreibt [13]. Diesen Wert können wir für den Minimaldurchmesser auch in humanen Biopsien bestätigen.

4.1.4 Der Maximaldurchmesser

Es ist bekannt, dass in geschädigten, regenerierenden Muskeln die Varianz der Faserdurchmesser insgesamt zunimmt [20]. Dass jedoch der Maximaldurchmesser bei den MHCn-positiven kleinen Fasern, die in ihrem Minimaldurchmesser sehr homogen sind, so stark schwankt, war überraschend. Fasern, die auf einer Ebene 10 μm unterschreiten und sicher als kleine Fasern gewertet werden kön-

nen, können im Verlauf sehr viel breitere Durchmesser annehmen, z.T. bis zu 100 μm . Interessanterweise vollzieht sich diese große Durchmesserzunahme nur in eine Richtung, so dass die Fasern sehr abgeflacht erscheinen (siehe Abbildung 3.10 - 12). D.h. für den Maximaldurchmesser können wir diese Definition von $< 10 \mu\text{m}$ nicht bestätigen. Dabei ist zu beachten, dass die Ratten in dem Experiment von Schulz [13] nach Denervation für nur drei Wochen beobachtet wurden und nur die Entstehung kleiner Muskelfasern untersucht wurde. In unserem Fall haben wir es mit humanen Biopsien nach langem Krankheitsverlauf zu tun. Es handelt sich um ein Spektrum an Degenerations- und Regenerationsprozessen, in dem auch fortgeschritten atrophe Fasern zu erwarten sind. Bei den stark abgeflachten Fasern vermuten wir, dass es sich vor allem um fortgeschritten atrophe adulte Fasern handelt. Es könnte sich jedoch auch um kleine Fasern handeln, die durch Myogenese neu entstanden sind und dann nach ausbleibender Innervation zu atrophieren begonnen haben.

4.1.5 Die Kernverteilung

Die von uns untersuchten MHCn-positiven kleinen Fasern enthalten viele zentral gelegene Kerne. Wir fanden im Mittel 1,86 Kerne pro Schnitt, bei Schwankungen von null bis zehn Kernen. Bei Myogenesevorgängen in denerviertem Muskel wurde von einigen Arbeitsgruppen der Anstieg von Satellitenzellen im geschädigten Muskelareal beobachtet, die dann zu Myotuben fusionieren [13]. In einer Arbeit von Kern et al [19] wird gezeigt, dass die Kerne nach der Fusion der Myoblasten, zum Teil in Reihen sehr dicht hintereinander liegen und sich erst bei der Längenzunahme der Muskelfaser vereinzeln. Daher ist ein hoher Kerngehalt von 1-2 Kernen pro Schnitt in den kleinen Fasern wohl zu erwarten. Als charakteristisch für kleine Fasern gilt, dass keine Satellitenzellen auf ihrer Oberfläche zu finden sind [3] und die Kerne zentral liegen. Auch für degenerierende Fasern ist die zentrale Lage der Kerne beschrieben worden [25].

Unerwartet war für uns, dass wir häufig größere Kernmengen fanden, die ihrem Aussehen nach als „nuclear clumps“ zu werten sind. Dies sind pygnotische Kernhaufen, die charakteristisch für Denervation sind [8][50]. Fasern mit

Diskussion

„nuclear clumps“ können deshalb nicht als neu entstandene Fasern gewertet werden. Es gibt in der Literatur keine genauen Angaben, ab welcher Kernanzahl ein Kernhaufen ein „nuclear clump“ ist. Die Angaben schwanken zwischen über drei und über fünf Kernen [19]. Durch das Auftreten von pygnotischen Kernhaufen in den kleinen Fasern ist anzunehmen, dass es sich um eine Überlagerung von Regenerations- und Denervationsprozessen handelt.

4.2 Weiterführende Analyse der Fasermorphologie

In der vorangegangenen Diskussion wurde besprochen, dass ein Nebeneinander von Regerations- und Degenerationsprozessen eine Erklärungsmöglichkeit für die sehr unterschiedlichen Fasermorphologien der kleinen MHCn-positiven Fasern sein kann. Die rein beschreibenden Parameter, die wir erhoben haben (Minimal-, und Maximaldurchmesser, Kerne und Länge) reichen für sich genommen jedoch nicht aus, um eine Differenzierung der Fasern in unterschiedliche Gruppen vorzunehmen. Deshalb haben wir an die rein deskriptive Betrachtung noch weitere statistische Analysen mit den bereits bekannten Parametern angeschlossen.

4.2.1 Die Rauigkeit der Faserprofile

Uns waren bei einem Teil der MHCn-positiven Fasern große Schwankungen im Maximaldurchmesser aufgefallen. Diese Schwankungen sind in der Literatur bisher, da es nur wenige Untersuchungen von langzeit denerviertem Muskelgewebe im Längsverlauf gibt, nicht beschrieben. Bei Untersuchungen auf einer Schnittebene können diese Schwankungen nicht erfasst werden.

Als beschreibenden Wert für diese Schwankung wählten wir die Standardabweichung (SD) des Maximaldurchmessers. Da sich herausgestellt hat, dass die Fasern im Minimaldurchmesser alle sehr konstant sind, ist dieser hier zu vernachlässigen. Die Verteilung der Standardabweichungen (Abbildung 3.27) zeigt deutlich, dass die meisten Fasern eine kleine Standardabweichung im Maximaldurchmesser haben. Die Anzahl der Fasern nimmt mit steigender SD kontinuierlich ab

und erfährt einen Knick bei einer SD von etwa 15 μm und fällt dann nicht, wie zu erwarten, schnell weiter ab. Unsere Vermutung ist, dass die Fasern mit einer großen SD einer anderen Fasergruppe angehören als die mit einer kleinen SD. Deshalb wird in den folgenden Analysen z.T. eine Unterscheidung zwischen $</>$ 15 μm gemacht.

4.2.2 Kernverteilung in Abhängigkeit von anderen Faserparametern und Verteilung der Kernhaufen

Ein weiterer Parameter von dem wir uns Aufschluss über die Entstehung der kleinen Fasern erhofften sind die Kerne, insbesondere die Kernhaufen. Wir haben dargestellt, wie die Kernanzahl mit dem jeweiligen Maximaldurchmesser der Faser leicht ansteigt (Abbildung 3.27), die großen Kernhaufen jedoch nur selten in den breiten Faserabschnitten liegen. Ausserdem konnten wir zeigen, dass Fasern mit großer Standardabweichung signifikant mehr Kerne enthalten, als Fasern mit kleiner Standardabweichung (Abbildung 3.28). Als Grenze zwischen kleiner und großer Standardabweichung setzten wir hierbei die 15 μm , die bei der einfachen Verteilung der Standardabweichung als Knick in der Kurve auffällt. Ein regelmäßiges Verteilungsmuster der Kerne unabhängig von anderen Parametern schlossen wir mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion aus (Abbildung 3.29). Da uns die Kernhaufen als besonders wegweisend erschienen, analysierten wir, ob die Schwankungen der Faserbreite mit der größten Kernansammlung innerhalb einer Faser zusammenhängt. Wir bildeten wieder anhand der Standardabweichung zwei Gruppen mit SD $>/<$ 15 μm (Abbildung 3.30). Dieser Einteilung liegt die Annahme zugrunde, dass ab einer gewissen Größe eines Kernhaufens es sehr unwahrscheinlich ist, dass es sich um eine neugebildete Faser handelt. Es zeigte sich eine erstaunlich deutliche Differenzierung in zwei Gruppen ($p=0.0045$) mit einer Häufung an Kernmaxima von 3 Kernen bei den dünnen Faser und einer Häufung von 6 Kernen bei den im Durchmesser stark schwankenden Fasern. Die starke Überlappung der beiden Gruppen und vereinzelt sehr große Kernhaufen bei den Fasern mit kleiner SD zeigt aber, dass unsere Einteilung eine starke Vereinfachung ist und nicht den wirklichen biologischen Sachverhalt widerspiegelt.

Diskussion

Auch bei den dünnen Fasern, die wir der Kategorie der neugebildeten zuordnen, sind mehr als 3 Kerne häufig. In solchen Fällen könnte man vermuten, dass es sich um neugebildete Fasern handelt, die durch fehlende Innervation zu atrophieren begonnen haben.

4.2.3 Die Länge der kleinen Fasern in Abhängigkeit von Faserprofil und Kernhaufen

Wir haben versucht das Faserprofil anhand der SD einerseits und das Vorhandensein von Kernhaufen andererseits mit der Länge zu korrelieren. Bei der Standardabweichung des Maximaldurchmessers zeigte sich die Tendenz, dass im Maximaldurchmesser breite, stark schwankende Fasern länger sind. Dies bestärkt uns in unsere Annahme, dass es sich bei diesem Fasertyp um atrophe adulte Muskelfasern handeln könnte. Es gibt jedoch, wie in Abbildung 3.32 sichtbar, einige Ausnahmen, vor allem Fasern mit großer Standardabweichung, die sehr kurz sind. Man könnte diese Fasern als Fragmente von atrophischen Fasern werten [3]. Fasern mit sehr kleiner Standardabweichung ($<5 \mu\text{m}$), die jedoch sehr lang sind, gibt es kaum. Diese Fasern könnten als durch Myogenese neu entstandene kleine Fasern gewertet werden. In der Literatur sind uns dazu keine Längenangaben bekannt.

Bei der Untersuchung, ob die Kernhaufen direkt mit der Faserlänge korreliert, haben wir verglichen, ob Fasern, die an irgendeiner Stelle mehr als 3 Kerne enthalten, sich in der Länge von solchen Fasern unterscheiden, die keine Kernhaufen über drei Kerne enthalten. Es zeigte sich, dass Fasern mit großen Kernhaufen im Mittel deutlich länger sind, die einzelnen Fasern jedoch stark um diesen Mittelwert schwanken. Diese Heterogenität könnte auf unterschiedlich weit fortgeschrittene Stadien der Atrophie deuten; von stark atrophischen, jedoch noch ganzen Muskelfasern (lang) bis hin zu kurzen Faserfragmenten.

5 Zusammenfassung

In langzeitdenerviertem humanem Muskelgewebe, können mittels immunhistochemischer Färbung mit Anti-MHCn-AK (MyosinHeavyChainneonatal) sehr kleine Muskelfasern nachgewiesen werden, deren Genese noch nicht abschließend geklärt ist. Anti-MHCn ist ein muskelspezifisches Protein, das sowohl in der Myogenese, als auch nach Denervation von Muskelgewebe exprimiert wird. Aus Tiermodellen ist bekannt, dass nach der Denervation von Muskelfasern Satellitenzellen aktiviert werden und Myogenese stattfindet.

In humanem Muskelgewebe sind Myogenesevorgänge und insbesondere die MHCn-positiven Fasern bei neurogener Atrophie bisher kaum beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, wie häufig diese kleinen MHCn-positiven Fasern bei neurogener Atrophie auftreten und ihre Morphologie charakterisiert werden.

Da auch denervierte stark atrophe Muskelfasern MHCn-positiv sind, ist ein Mischbild als Regenerations- und Degenerationsprozessen zu erwarten und es stellt sich die Frage, ob sich morphologische Eigenschaften finden lassen, anhand derer zwischen regenerierenden oder degenerierenden Entstehungsmechanismen der kleinen Fasern unterschieden werden kann.

Zu diesem Zweck wurden stichprobenartig ausgewählte Muskelbiopsien mit neurogener Atrophie in Stufenschnitten über einen Verlauf von mindestens 600µm aufgearbeitet und im Wechsel mit Anti-MHCn und HE gefärbt. Es wurden die Länge, sowie der Maximal-, der Minimaldurchmesser und die Kernanzahl der kleinen Fasern pro Schnitt erhoben.

Es konnten in allen 14 untersuchten Fällen, kleine MHCn-positive Fasern nachgewiesen werden.

Im Längsverlauf zeigte sich, dass die Länge der kleinen Fasern stark variiert, von

Zusammenfassung

kürzer 16 μm bis über 600 μm . Es konnte gezeigt werden, dass alle kleinen Fasern im Minimaldurchmesser einen sehr konstanten Wert aufweisen (Mittelwert 7,5 μm , SD 3 μm). Dieser Wert stimmt gut mit den Durchmesserangaben aus dem Tiermodell überein. Der Maximaldurchmesser der kleinen Fasern schwankt jedoch stark (24,9 μm , SD 16,4 μm), so dass der Querschnitt der kleinen Fasern z.T. bauchig oder sehr stark abgeflacht ist.

Es zeigte sich, dass die kleinen Fasern insgesamt viele Kerne enthalten und die Kerne oft Haufen („nuclear clumps“) bilden. In Mittel wurden 1,86 Kerne pro Schnitt (SD 1,55 Kerne) gefunden. Es gab jedoch auch Kernhaufen mit über 6 Kernen pro Schnitt.

Da in der Myogenese viele Satellitenzellen zu einer neuen Faser fusionieren, ist ein relativ großer Kerngehalt der kleinen Fasern zu erwarten. Kernhaufen sprechen allerdings eher gegen Myogenese. Pygnotische Kernhaufen („nuclear clumps“) sind histologisch bekannt als Zeichen für Langzeitdenervation und gelten als das Endstadium einer atrophen Muskelfaser. Daher können kleine MHCn-positive Fasern, die „nuclear clumps“ enthalten nicht als neugebildete Fasern wertet werden. Es enthält jedoch nur ein Teil der untersuchten Fasern „nuclear clumps“.

Da es keinen Marker gibt, der zwischen denerviert atrophen und neugebildeten unreifen Fasern unterscheiden kann, stellte sich die Frage, ob eine Unterscheidung nach morphologischen Kriterien möglich ist.

Wir konnten zeigen, dass die kleinen MHCn-positiven Fasern in der Standardabweichung ihrer Maximaldurchmessers stark variieren. Die Standardabweichung des Maximaldurchmessers misst die Variation des Maximaldurchmessers entlang der Faser, d.h. die Rauigkeit des Faserprofils. Wir konnten zeigen, dass der Großteil der Fasern nicht rau ist, sondern ein eher glattes Profil hat und einen bauchigen Querschnitt. Dem gegenüber stehen einige sehr raue Fasern, die sowohl sehr lang, als auch sehr kurz sein können. Es ließ sich zeigen, dass diese rauen Fasern signifikant mehr Kerne enthalten und insbesondere mehr Kernhaufen. Die glatten, kurzen Fasern enthalten in der Regel keine Kernhaufen.

Aus diesem Ergebnis stellen wir die Vermutung auf, dass es sich bei den runden

kurzen Fasern um neugebildete unreife Muskelfasern handelt und es sich bei den Fasern mit sehr breitem, unregelmäßigem Profil mit Kernhaufen um denervierte Muskelfasern handelt, die sich in unterschiedlichen Stadien der Atrophie befinden.

Wir konnten damit zeigen, dass Myogenesevorgänge auch in langzeitdenerviertem Muskel zu finden sind, jedoch von degenerativen Vorgängen überlagert werden. Bei den MHCn-positiven kleinen Muskelfasern, die durch ihr Expressionsmuster nicht eindeutig in degenerierende oder regenerierende Fasern einzuordnen sind, lassen sich durch morphologische Kriterien Rückschlüsse auf ihren Entstehungsmechanismus ziehen.

Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amylotrophe Lateralsklerose
HE	Hämatoxylin - Eosin
MHCn	Myosin Heavy Chain neonatal
MHCe	Myosin Heavy Chain embryonal
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
SD	Standard Deviation
TBS	Tris Buffered Saline

Abbildungsverzeichnis

1.1	Muskelaufbau. Nach Chargé und Rudnicki [10]	2
2.1	ABC-Methode. Abbildung der biologischen Fakultät der Universität Regensburg	18
3.1	Kleine MHCn-positive Fasern	26
3.2	MHCn-positive angulär-atrophe Faser und MHCn-positive kleine Fasern.	27
3.3	Gruppe von MHCn-positiven angulär-atrophen Fasern	27
3.4	Schnitt 1	29
3.5	Schnitt 3	29
3.6	Schnitt 11	29
3.7	Schnitt 12	30
3.8	Schnitt 13	30
3.9	Schnitt 15	30
3.10	Schnitt 12	31
3.11	Schnitt 13	31
3.12	Schnitt 15	31
3.13	Beispiel für ein Areal mit gut voneinander abgrenzbaren kleinen MHCn-positiven Fasern	32
3.14	Längenverteilung der Fasern	34
3.15	Häufigkeitsverteilung der Minimaldurchmesser	36
3.16	Häufigkeitsverteilung der Maximaldurchmesser	37
3.17	MHCn-positive kleine Fasern	38
3.18	Kernfärbung	39
3.19	Merosin-Hämatoxylin-Kerngegenfärbung	39

Abbildungsverzeichnis

3.20 Kernverteilung in den kleinen Fasern	40
3.21 „Nuclear clump“ in einer kleiner Faser, HE-Färbung	41
3.22 Faserprofile	44
3.23 Standardabweichung des Maximaldurchmessers der einzelnen Fasern	45
3.24 Kernanzahl aufgetragen gegen den Maximaldurchmesser der jeweiligen Schnittebene	46
3.25 Kernverteilung in Abhängigkeit von SD	47
3.26 Autokorrelation der Kerne in den kleinen Fasern	48
3.27 SD der Maximaldurchmessers $\geq / < 15 \mu\text{m}$	49
3.28 Standardabweichung des Maximaldurchmessers im Verhältnis zur Faserlänge	50
3.29 Häufigkeitsverteilung der Faserlängen	51
4.1 Vier Formen der Regeneration von Muskelfasern. Abbildung nach Schmalbruch [20]	55

Tabellenverzeichnis

2.1	Die 14 untersuchten Muskelbiopsien	16
3.1	Anzahl der kleinen Fasern pro untersuchtem Areal	33

Literaturverzeichnis

- [1] Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.*, 9:493–5, 1961.
- [2] Borisov AB, Dedkov E, and Carlson BM. Interrelation of myogenic response, progressive atrophy of muscle fibers, and cell death in denervated skeletal muscle. *Anat Rec.*, 264(2):203–18, 2001.
- [3] Borisov AB, Dedkov E, and Carlson BM. Abortive myogenesis in denervated skeletal muscle: differentiative properties of satellite cells, their migration, and block of terminal differentiation. *Anat Embryol*, 209:269–279, 2005.
- [4] Anzil AP and Wernig A. Muscle fibre loss and reinnervation after long-term denervation. *Journal of Neuropathology*, 18:833–845, 1989.
- [5] Muir AR, Kanji A, and Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J. Anat.*, 99:435–444, 1963.
- [6] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. Molecular biology of the cell. *Operations Research*, fifth edition:1463–1467, 2008.
- [7] Gambke B, Lyons GE, Haselgrove J, Kelly AM, and Rubinstein NA. Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett.*, 156(2):335–9, 1983.
- [8] Banker BQ, Engel AG, and Franzini-Armstrong CF. *Myology*. third edition, 2004.
- [9] Janmot C and Albis A. Electrophoretic separation of developmental and adult rabbit skeletal muscle myosin heavy chain isoform: example of application to muscle denervation study. *FEBS Letters*, 353:13–15, 1994.

- [10] Sophie B. P. Chargé and Michael Rudnicki. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84:209–238, 2004.
- [11] Bandman E, Matsuda R, and Strohman RC. Developmental appearance of myosin heavy and light chain isoforms in vivo and in vitro in chicken skeletal muscle. *Dev Biol.*, 93(2):508–18, 1982.
- [12] Dedkov E, Kostrominova TY, Borisov AB, and Carlson BM. Reparative myogenesis in long-term denervated skeletal muscles of adult rats results in a reduction of satellite cell population. *Anat Rec.*, 263(2):139–154, 2001.
- [13] Schultz E. Changes in the satellite cells of growing muscle following denervation. *Anat.Rec.*, 190:299–312, 1978.
- [14] Schultz E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol*, 175:84–94, 1996.
- [15] Schultz E, Jaryszak DL, , and Valliere CR. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve*, 8:217–222, 1985.
- [16] Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, and Gardahaut. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve*, 22:724–732, 1999.
- [17] Gauthier GF, Burke RE, Lowey S, and Hobbs AW. Myosin isozymes in normal and cross-reinnervated cat skeletal muscle fibers. *J Cell Biol.*, 97(3).
- [18] Kern H, Boncompagni S, Rossini K, Mayr W, Fano G, Zanin ME, Podhorska-Okolow M, Protasi F, and Carraro U. Long-term denervation in humans causes degeneration of both contractile and excitation-contraction coupling apparatus, which is reversible by functional stimulation (fes): a role for myofiber regeneration? *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(9):919–931, 2004.
- [19] Kern H, Carraro U, Biral D, Adami N, and Zampieri S. Severely atrophic muscle fibers with nuclear clumps survive many years in permanently denervated human muscle. *The Open Pathology Journal*, 3:106–110, 2009.

Literaturverzeichnis

- [20] Schmalbruch H. The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. *Tissue and Cell*, 8 (4):673–692, 1976.
- [21] Schmalbruch H and Lewis DM. A comparison of the morphology of denervated with aneurally regenerated soleus muscle of rat. *J Muscle Res Cell Motil.*, 15(3):256–266, 1994.
- [22] Schmalbruch H and Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve*, 23:617–626, 2000.
- [23] Schmalbruch H and Hellhammer U. The number of satellite cells in normal human muscle. *Anat Rec*, 185(3):279–87, 1976.
- [24] Schmalbruch H and Hellhammer U. The number of nuclei in adult rat muscle with special reference to satellite cells. *Anat Rec.*, 189(2):169–75, 1977.
- [25] Schmalbruch H, Al-Amood WS, and Lewis DM. Morphology of long-term denervated rat soleus muscle and the effect of chronic electrical stimulation. *Journal of Physiology*, 441:233–241, 1991.
- [26] Stonnington HH and Engel AG. Normal and denervated muscle. a morphometric study of fine structure. *Neurology*, 7:714–724, 1973.
- [27] Mussini I, Favaro G, and Carraro U. Maturation, dystrophic changes and the continuous production of fibers in skeletal muscle regeneration in the absence of nerve. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 46(3):315–31, 1987.
- [28] Wokke JH, Van Den Oord CJ, Leppink GJ, , and Jennekens FG. Perisynaptic satellite cells in human external intercostal muscle: a quantitative and qualitative study. *Anat Rec*, 223:174–180, 1989.
- [29] Doppler K, Mittelbronn M, and Bornemann A. Myogenesis in human denervated muscle biopsies. *Muscle Nerv*, 37(1):79–83, 2008.

- [30] Cerny LC and Bandman E. Expression of myosin heavy chain isoforms in re-generating myotubes of innervated and denervated chicken pectoral muscle. *Developmental Biology*, 119:350–362, 1987.
- [31] Buckingham M, Alonso S, Barton P, Cohen A, Daubas P, Garner I, Robert B, and Weydert A. Actin and myosin multigene families: their expression during the formation and maturation of striated muscle. *Am J Med Genet.*, 25(4):623–634, 1986.
- [32] Gibson MC and Schultz E. The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat Rec*, 202:329–337, 1982.
- [33] Crow MT and Stockdale FE. The developmental program of fast myosin heavy chain expression in avian skeletal muscle. *Dev Biol.*, 118(2):333–342, 1986.
- [34] Agbulut O, Noirez P, Beaumont F, and Butler-Browne G. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biology of the cell*, 95:399–406, 2003.
- [35] T Oliphant. Python for scientific computing. *Computing in Science & Engineering*, 9(3):10–20, Jan 2007.
- [36] Bonner PH. Interaction of chicken embryo myoblasts is transiently sensitive to functional denervation. *Dev Biol*, 76:79–86, 1980.
- [37] Bischoff R. Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. *Dev Biol*, 115:129–139, 1986.
- [38] Bischoff R. A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Dev Biol*, 115:140–147, 1986.
- [39] Bischoff R. Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells. *J Cell Biol.*, 111(1):201–7, 1990.

Literaturverzeichnis

- [40] Bischoff R. The satellite cell and muscle regeneration. *Myology*, pages 97–118, 1994.
- [41] Armstrong RB. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exercise*, 22:429–435, 1990.
- [42] Fritzsims RB and Hoh J. Embryonic and fetal myosins in human skeletal muscle. *Journal of the Neurological Sciences*, 520:367–384, 1981.
- [43] Whalen RG, Sell SM, and Butler-Browne GS. Three myosin heavy-chain isoenzymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature*, 292:805–809, 1981.
- [44] Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbet JP, and Butler-Browne GS. Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther*, 8:1429–1438, 1997.
- [45] Lowey S, Benfield PA, LeBlanc DD, and Waller GS. Myosin isozymes in avian skeletal muscle. sequential expression of myosin isozymes in developing chicken pectoralis muscle. *J Muscle Res Cell Motil.*, 4(6):695–716, 1983.
- [46] Satore S, Gorza L, and Schiaffino S. Fetal myosin heavy chains in regenerating muscle. *Nature.*, 298(5871):294–296, 1982.
- [47] Sesodia S and Cullen MJ. The effect of denervation on the morphology of regenerating rat soleus muscles. *Acta Neuropathol.*, 82(1):21–32, 1991.
- [48] Obinata T, Saitoh O, and Takano-Ohmuro H. Effect of denervation on the isoform transitions of tropomyosin, troponin t, and myosin isozyme in chicken breast muscle. *J. Biochem.*, 95:585–588, 1984.
- [49] Soukup T and Jirmanová I. Regulation of myosin expression in developing and regenerating extrafusal and intrafusal muscle fibers with special emphasis on the role of thyroid hormones. *Physiol Res.*, 49(6):617–33, 2000.

- [50] Dubowitz V and Sewry CA. Muscle biopsy, a practical approach. *Elsevier*, 3rd Edition:92–100, 2007.

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. Bornemann für die Überlassung des Themas und die weitere Betreuung der Arbeit bedanken.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Richard Neher für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten, bei Rafael Baur für die Unterstützung bei der Textverarbeitung und bei den KorrekturleserInnen herzlich bedanken. Mein Dank gilt auch meinem kleinen Sohn Wolfram, der auf seine Weise diese Arbeit vorangebracht hat.