

Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt
operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Erworbene Muskelschwäche auf der Intensivstation –
Elektronenmikroskopisches Korrelat in der Frühphase der
kritischen Erkrankung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Theresa Rathke
aus Berlin

Datum der Promotion: 09.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Abstract	VII
1. Einleitung	1
1.1 „Intensive Care Unit-acquired weakness“ (ICUAW) – Einführung	1
1.2 Pathogenese der ICUAW.....	2
1.3 Diagnostik der ICUAW und CIM	3
1.4 Histologischer und ultrastruktureller Aufbau der Skelettmuskulatur.....	4
1.6 Fragestellung der Arbeit	8
2. Methoden.....	9
2.1 Studiensetting	9
2.2 Entnahme der Muskelbiopsien	10
2.3 Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie	11
2.4 Mikroskopierstrategie	13
2.4.1 Mikroskopieren der Längsschnitte.....	13
2.4.2 Mikroskopieren der Querschnitte	14
2.5 Digitalisierung und Bearbeitung der Negative	14
2.6 Auswertung der EM-Bilder	15
2.6.1 Auswertung der Längsschnitte.....	15
2.6.2 Auswertung der Querschnitte	18
2.6.3 Statistische Auswertung	19
3. Ergebnisse	21
3.1 Frühe Phase.....	22
3.1.1 qualitative Auswertung der Längsschnitte.....	23
3.1.2 quantitative Auswertung der Längs- und Querschnitte.....	27
3.2 Verlauf.....	31
3.2.1 qualitative Auswertung der Längsschnitte.....	31
3.2.2 quantitative Auswertung der Längs- und Querschnitte	36
3.3 Gruppenvergleich	40
3.3.1 qualitative Auswertung der Längsschnitte.....	40
3.3.2 quantitative Auswertung der Längs- und Querschnitte	44
3.4 Verknüpfung mit den klinischen Parametern	46

4. Diskussion	51
4.1 Einführung	51
4.2 Einordnung in die bisher vorhandene Literatur	52
4.3 CIM, non-CIM und ICUAW– Zusammenhang zwischen klinischem, elektrophysiologischem und elektronenmikroskopischem Befund	53
4.4 Elektronenmikroskopisches Korrelat für CIM – Problematik der Begrifflichkeiten.....	54
4.5 Stärken und Schwächen der eigenen Methodik.....	56
4.7 Fazit und Ausblick.....	58
5. Literaturverzeichnis.....	61
6. Abkürzungsverzeichnis	67
Eidesstattliche Versicherung	IX
Curriculum vitae.....	XI
Komplette Publikationsliste	XIII
Danksagung	XV

Zusammenfassung

Eine auf der Intensivstation erworbene Muskelschwäche, „Intensive Care Unit-acquired Weakness“ (ICUAW), ist ein wichtiger Komorbiditätsfaktor bei kritisch kranken Patienten mit entscheidender prognostischer Bedeutung für deren Überleben sowie die langfristige Lebensqualität. Klinisch präsentiert sich die ICUAW durch eine generalisierte Muskelschwäche mit konsekutiv verlängerten Beatmungszeiten und Liegedauer. Die pathophysiologischen Prozesse finden bereits frühzeitig statt. Zu morphologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur in der frühen Phase der kritischen Erkrankung gibt es jedoch wenig Kenntnis. Diese Arbeit untersucht die Ultrastruktur der Skelettmuskelmorphologie während der frühen intensivmedizinischen Behandlungsphase. Zudem soll überprüft werden, ob der als charakteristisch beschriebene selektive Myosinfilamentverlust bei elektrophysiologisch nachgewiesener „Critical Illness Myopathie“ (CIM) als eine führende Entität der ICUAW zu finden ist.

In einer prospektiven, monozentrischen Observationsstudie wurden 30 schwer kranke, beatmete Patienten (SOFA-Score ≥ 8 an 3 von 5 Tagen mit Beatmung < 72 Stunden) eingeschlossen. Zu zwei Zeitpunkten fanden offene Muskelbiopsien statt (Median Tag 5 + 16). Mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurden Muskellängs- sowie Muskelquerschnitte untersucht. Ein aus 7 Kriterien resultierender Score diente zur semiquantitativen Auswertung und Charakterisierung der Ultrastruktur. Weiterhin wurde die Myofilamentdichte manuell ermittelt. Anhand direkter Muskelstimulation (Median Tag 5 + 15) wurde das Patientenkollektiv zusätzlich in „CIM“ (dmCMAP < 3.0 mV) und „non-CIM“ (dmCMAP ≥ 3.0 mV) unterteilt. Bei adäquater Wachheit erfolgte die Bestimmung des Kraftgrades gemäß MRC-Skala (Median Tag 13).

Massive ultrastrukturelle Veränderungen, insbesondere ein signifikanter Myosinfilamentverlust waren bereits zum frühen Zeitpunkt (Median Tag 5) der intensivmedizinischen Behandlung vorhanden. Die Sarkomerstruktur war größtenteils nicht mehr abgrenzbar und die fibrilläre Struktur des Muskels durch Atrophie oder komplette Zerstörung gekennzeichnet. Im zeitlichen Verlauf ist ein Fortschreiten des gesamten ultrastrukturellen Umbaus festzustellen, jedoch nahm die Myosinfilamentdichte nicht mehr signifikant ab. Der Myosinfilamentabbau ist gegenüber dem Aktinfilamentabbau stärker ausgeprägt, insbesondere in den Erstbiopsien. Der Myosinverlust war nicht isoliert bei den elektrophysiologisch als CIM charakterisierten Patienten zu sehen, jedoch ist er mit einem niedrigeren Kraftgrad, sowie mit einer längeren Beatmungszeit und Liegedauer assoziiert.

Die entscheidenden pathologischen Umbauvorgänge der Skelettmuskelultrastruktur finden in der Frühphase der kritischen Erkrankung statt und liegen nach wenigen Tagen intensivmedizinischer Behandlung bereits massiv ausgeprägt vor. Der frühzeitig einsetzende Myosinfilamentverlust war bei unserem Patientenkollektiv mit der Ausbildung einer ICUAW im späteren klinischen Verlauf vergesellschaftet. Im Gegensatz zu dem bislang geltenden Charakteristikum des „Thick-filament-loss“ im Zusammenhang mit einer CIM, lag dieser unabhängig von der Membranerregbarkeit vor. Vielmehr lässt er sich als generelles Zeichen bei ICUAW postulieren.

Diese Arbeit präsentiert erstmalig ultrastrukturelle Untersuchungen am Skelettmuskel von Hochrisikopatienten aus der Anfangsphase der kritischen Erkrankung, bevor die ICUAW klinisch in Erscheinung tritt.

Abstract

“Intensive Care Unit-acquired Weakness” (ICUAW) is a major comorbidity under critical illness with crucial prognostic significance for the patients survival. ICUAW is presented by a generalized muscle weakness which leads to prolonged ventilation and ICU-stay. There is little knowledge in particular on the early phase of critical illness. This work examines the ultrastructure of skeletal muscle morphology at two times during the early phase of intensive care. Furthermore we review whether a “thick-filament-loss” is characteristically found in patients who show a "Critical Illness Myopathy" (CIM) according to electrophysiological testing.

We included 30 critically ill, mechanically ventilated patients (SOFA score ≥ 8 at 3 within 5 days, ventilation < 72 hours) in a prospective, monocentric observational study. Two open muscle biopsies were obtained at median day 5 and 16. Electron microscope studies were performed and ultrastructural analyzation was done using Image J software. We developed a score with 7 criteria for semiquantitative evaluation of the longitudinal sections. Counting of myosin filaments was done in cross sections. Based on direct muscle stimulation (median day 5 and 15), we distinguished patients in 2 groups: "CIM" (dmCMAP $< 3.0\text{mV}$) and "non-CIM" (dmCMAP $\geq 3.0\text{mV}$). Muscle strength was assessed using Medical Research Council (MRC)-Scale when patients showed adequate awareness (median day 13).

There was a significant degradation of myosin filaments already in the early stage of ICU stay. The sarcomere structure was largely destroyed and fibrillar structure showed signs of atrophy or complete destruction. Later during ICU-course there is an ongoing destruction considering all ultrastructural features. However, regarding the myosin filament density over time, there is no significant decrease. Degradation of myosin filament was stronger than of aktin filament. The myosin loss was not uniquely found in patients with CIM, but it was associated with reduced muscle strength resulting in prolonged ventilation and hospital stay.

The main ultrastructural changings occur already after the beginning of critical illness and reaches its peak only after a few days. In our study population we found a significant association of early myosin degradation and the presentation of ICUAW later during ICU course. However, it was not associated with low membrane excitability (CIM). This disproves "Thick-filament-loss" to be characteristic in the presence of CIM. We postulate it therefore as typical of ICUAW.

This is the first work presenting ultrastructural studies on skeletal muscle of high-risk patients during early phase of critical illness, even before the clinical symptoms of ICUAW appear.

1. Einleitung

1.1 „Intensive Care Unit-acquired weakness“ (ICUAW) – Einführung

Die ICUAW präsentiert sich als eine klinisch ermittelte Muskelschwäche bei kritisch kranken Patienten, die sich ätiologisch allein durch das Vorhandensein der kritischen Erkrankung ergibt. Sie stellt eine der häufigsten erworbenen Komplikationen auf der Intensivstation (ITS) dar. Das charakteristische Merkmal ist eine beinbetonte Schwäche der Extremitätenmuskulatur, sowie eine erschwerte Entwöhnung vom Respirator. Folge sind eine verlängerte Beatmungspflicht und eine protrahierte Liegedauer der betroffenen Patienten. Die verlängerte Liegedauer bedingt wiederum weitere Komplikationen wie das Auftreten tiefer Beinvenenthrombosen, Lungenarterienembolien und nosokomiale Infektionen. Überleben und die Prognose der langfristigen Lebensqualität von ITS-pflichtigen Patienten ist hierdurch entscheidend negativ beeinflusst. Follow-up-Studien belegen, dass ITS-Überlebende noch nach Jahren erhebliche Schwierigkeiten haben ihre volle Muskelkraft wiederzuerlangen. Die langfristigen Konsequenzen für die betroffenen Patienten sowie die ökonomischen Folgen sind unübersehbar (1–7). Pathophysiologisch handelt es sich um eine Störung der (peripheren) neuromuskulären Organfunktion mit dem typischen Symptom der Muskelschwäche mit Areflexie, vor allem im Bereich der respiratorischen Muskulatur und der Extremitäten, selten auch der mimischen Muskulatur. Erstmals untersuchten Bolton et al. in den Achtziger Jahren den Verlauf von fünf Patienten mit Muskelschwäche, Areflexie und protrahierter Entwöhnung vom Respirator. Sie unternahmen elektrophysiologische Untersuchungen sowie Biopsien von Nerven und beschrieben eine durch die kritische Erkrankung erworbene Neuropathie, die „Critical Illness Polyneuropathie“ als Ursache für das klinische Störungsbild. Sie vermuteten Mangelernährung während der Phase der kritischen Erkrankung sowie endogene Infektionen im Rahmen des septischen Geschehens als Ursache (8). Es folgten Fallberichte und Studien mit kleinen Patientenzahlen, in denen die Skelettmuskulatur kritisch kranker Patienten elektrophysiologisch und histologisch durch Biopsieentnahme untersucht wurde. Infolgedessen konnte erstmals histologisch das Vorliegen einer Myopathie („Critical Illness Myopathie“) im Rahmen der kritischen Erkrankung gezeigt werden (9–14). In größer angelegten, systematischen Observationsstudien ist dieses Phänomen später vielfach bestätigt worden. Neben „Critical Illness Myopathie“ wurde auch der Begriff der „Thick Filament Myopathie“ geprägt, bezogen auf den elektronenmikroskopisch sichtbaren, selektiven Verlust von Myosinfasern (15–19). „Critical Illness Polyneuropathie“ (CIP) und „Critical Illness Myopathie“ (CIM) liegen häufig gleichzeitig vor. Das gemeinsame klinische Korrelat einer der beiden Diagnosen oder der Kombination ist die ICUAW (20).

1.2 Pathogenese der ICUAW

Die Pathogenese der ICUAW ist komplex und bisher nur in Ansätzen verstanden. Mehrfach gesichert wurde ein direkter Zusammenhang mit der Schwere der kritischen Erkrankung – ermittelt durch etablierte Scoring Systeme wie z.B. „Sequential Organ Failure Assessment“ (SOFA) Score – sowie dem Auftreten von Sepsis und Multiorganversagen, bei denen die Prävalenz bis zu 80% beträgt. Im Rahmen der kritischen Erkrankung und Sepsis kommt es zur generellen Mikrozirkulationsstörungen im Körper, die Skelettmuskulatur ist hiervon gleichermaßen betroffen. Die Sepsis-induzierte Ausschüttung von Zytokinen (insbesondere IL-1, IL-6, TNF- α) führt einerseits zur Induktion von Muskelproteinabbau und andererseits zu einer reduzierten Muskelproteinsynthese. Eine mögliche Beeinflussung der Muskelmembranerregbarkeit durch Veränderung des Ruhemembranpotentials wird ebenfalls diskutiert (21). Entscheidend für die Ausbildung einer Muskelschwäche ist allerdings nicht allein der Verlust an Muskelmasse, sondern im Besonderen der Verlust an Muskelkraft (Kraft pro Muskelquerschnittsfläche) (22). In dem Zusammenhang ist mehrfach eine frühzeitige Atrophie der schnellen Typ II-Fasern sowie der selektive Verlust von Myosinfilamenten beschrieben (14,15,23,24). Frühzeitige physiotherapeutische Behandlung in Kombination mit Siederungspausen konnten positive Effekte im Sinne einer schnelleren Beatmungsentwöhnung und einer verbesserten funktionellen Unabhängigkeit nach Beenden der ITS-Behandlung zeigen (25). Kontrovers präsentieren sich Ergebnisse von Interventionsstudien, in denen regelmäßig elektrische Muskelstimulation bei ITS-Patienten angewandt wurde, die teilweise zu Muskelmassenerhalt oder Muskelkraftherhalt führten (26–28). Lange Immobilisation und hohes Alter haben Einfluss auf die Ausbildung der erworbenen Muskelschwäche (5,29–32). Ferner konnte eine gestörte Insulinsensitivität bedingt durch eine insuffiziente Translokation von GLUT4 an die Zellmembran als ein unabhängiger Faktor in der Entstehung von ICUAW herausgestellt werden (33). Eine hochdosierte Kortikosteroidtherapie und die Anwendung nicht-depolarisierender Muskelrelaxanzien sind als Risikofaktoren ebenfalls mehrfach in der Literatur beschrieben. Diese werden zunehmend kontrovers diskutiert (4,6,14,29).

Viele Zusammenhänge in der Entstehung der ICUAW sind jedoch noch unklar. Die Minimierung von Risikofaktoren und eine leitliniengerechte Therapie der Sepsis sowie eine frühzeitige Physiotherapie sind aktuell die Hauptbehandlungsstrategien der ICUAW.

1.3 Diagnostik der ICUAW und CIM

Es existieren drei wesentliche Pfeiler in der Diagnostik der ICUAW bzw. CIM:

1. die klinische Ermittlung von Muskelschwäche mittels Kraftgradmessung nach „Medical Research Council“(MRC)-Skala,
2. der elektrophysiologische Nachweis von geringer Muskelaktivität bzw. eingeschränkter Muskelmembranerregbarkeit durch elektromyographische Untersuchung,
3. der histologische Nachweis einer Myopathie durch Muskelbiopsie.

Zusätzlich kann die Bestimmung der Kreatinkinase im Blut – am besten innerhalb der ersten Krankheitswoche – hilfreich sein. Allerdings ist bei Normalwerten die Diagnose CIM nicht auszuschließen, somit gilt die Kreatinkinase als eher unspezifischer Parameter (4,34,35).

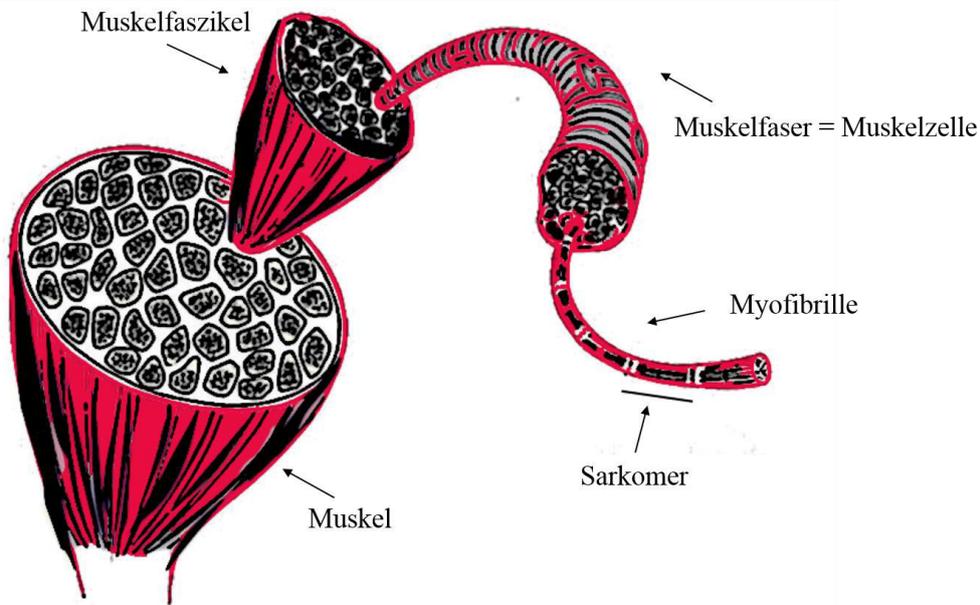
Ein großes Problem stellt die Früherkennung der ICUAW bzw. CIM dar. Hochrisikopatienten werden aus klinischen Gründen zu Beginn der intensivmedizinischen Behandlung häufig analgosediert. Deren Muskelschwäche kann erst nach Beendigung der Sedierung respektive bei adäquater Wachheit und Kooperativität des Patienten zuverlässig getestet werden. Zur Überprüfung der Muskelkraft hat sich weltweit der MRC-Score aufgrund der einfachen Durchführbarkeit etabliert (36,37). Jedoch sind dann die neuromuskulären Schäden bereits ausgeprägt. Eine diagnostische Methode für sedierte und gegebenenfalls beatmete Patienten ist essentiell zur Früherkennung der ICUAW bzw. CIM. Daher hat sich das Messen des Summenaktionspotentials im Muskel nach direkter Muskelstimulation („direct muscle Compound Muscle Action Potential“, dmCMAP) als elektrophysiologische Untersuchung hilfreich erwiesen. Es konnte nachgewiesen werden, dass niedrige Summenaktionspotentiale, die innerhalb der ersten ITS-Woche durch Ableitung von dmCMAP nachgewiesen wurden, mit einer Muskelschwäche im Verlauf assoziiert sind (38–40).

Muskelbiopsien werden aufgrund ihrer Invasivität nicht routinemäßig, sondern bislang nur im Rahmen von Studien oder zum Ausschluss anderer Muskelerkrankungen wie z.B. Myositiden durchgeführt. Histopathologisch werden in der Literatur drei wesentliche Merkmale beschrieben, welche teilweise auch als verschiedene Typen der CIM betrachtet werden: 1. die atrophische Form mit Faseratrophie v.a. der schnellen TypII-Fasern (23), 2. die nekrotisierend-apoptotische Form und 3. der selektive Verlust von Myosinfilament – Diagnose nur durch Elektronenmikroskopie (EM). Allerdings ist noch unklar, ob es sich hierbei tatsächlich um verschiedene Entitäten oder um unterschiedliche Stadien der CIM handelt. Zudem muss die CIM von der Muskelinaktivitätsatrophie abgegrenzt werden. Es wird auch diskutiert, ob verschiedene Risikofaktoren eher die eine oder andere Erscheinungsform begünstigen (4,15,35,41).

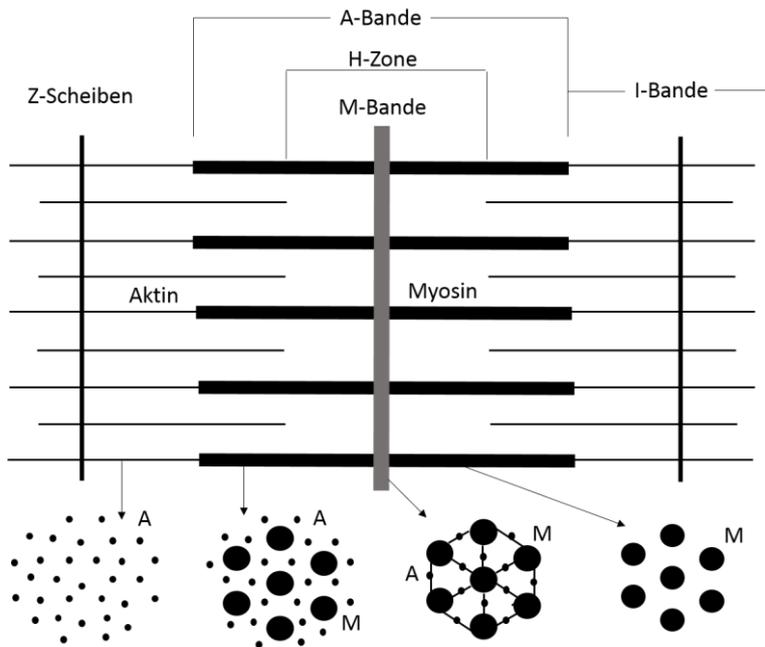
1.4 Histologischer und ultrastruktureller Aufbau der Skelettmuskulatur

Im Folgenden wird auf den Aufbau der Skelettmuskulatur, insbesondere auf die Darstellung im Elektronenmikroskop eingegangen. Dabei ist es wichtig, die unterschiedlichen Dimensionen eines Muskels zu kennen. Die Grundeinheit ist wie in jedem anderen Organ die Muskelzelle, auch Muskelfaser genannt. Eine Muskelzelle kann einige Zentimeter lang sein und mehrere Zellkerne haben. Sie ist so groß, dass man sie schon mit einer Lupe erkennen kann. Innerhalb der Fasern befinden sich zahlreiche Myofibrillen, welche mithilfe eines Lichtmikroskops sichtbar sind. Diese wiederum enthalten die nur mit einem Elektronenmikroskop erkennbaren Myofilamente, die kontraktile Elemente der Muskelzelle (siehe Grafik 1.1). Letztere bestehen aus dicken (ca. 15nm) und dünnen Filamenten (ca. 7nm), welche alternierend angeordnet sind und in Längsausrichtung somit eine Querstreifung erzeugen (siehe Grafik 1.2). Die dicken Filamente enthalten als Proteine das Myosin, während die dünnen Filamente das Aktin, das Tropomyosin und den Troponin-Komplex enthalten. Zusammen bilden sie mit zwei angrenzenden Z-Scheiben ein Sarkomer, die kleinste kontraktile Einheit des Skelettmuskels. Viele kettenartig aneinander gereihte Sarkomere bilden im Längsschnitt eine Myofibrille. Die Streifung der Fibrillen ergibt sich durch das unterschiedliche Verhalten der Myofilamente im polarisierten Licht. Die sogenannte I-Bande ist nicht-aufleuchtend (isotrop) und besteht aus den dünnen Filamenten, die A-Bande ist aufleuchtend (anisotrop) und besteht sowohl aus dicken als auch aus dünnen Filamenten. Im Elektronenmikroskop leuchten die Banden nicht auf, sondern sie sind aufgrund der Elektronendichte (E-Dichte) der Moleküle dunkel – A-Bande=hohe E-Dichte – bzw. hell – I-Bande=niedrige E-Dichte. Die Bezeichnung der Banden gemäß dem Lichtverhalten (A- bzw. I-Bande) wird dennoch zur Beschreibung des ultrastrukturellen Aufbaus auch in der Elektronenmikroskopie angewandt. In letzterer lassen sich weitere Abschnitte innerhalb eines Sarkomers abgrenzen. Die A-Bande ist noch einmal unterteilt in einen Überlappungsbereich beider Myofilamentarten und in die sogenannte H-Zone, in der ausschließlich die dicken Filamente zu finden sind. In der Mitte jedes Sarkomers befindet sich die M-Bande, ein elektronendichter Streifen, an dem die Myosinfilamente verankert sind. Die Befestigung für die dünnen Aktinfilamente sind die Z-Scheiben. Ein Sarkomer ist ca. 2,2µm lang und umfasst 1/2 I-Bande – A-Bande – 1/2 I-Bande. Die Länge der A-Bande bleibt stets konstant bei 1,5µm. Die I-Bande verkürzt sich während des Kontraktionsvorgangs durch Gleiten der Aktin- in die Myosinfilamente. Ein Sarkomer kann sich somit auf ca. 70% der Ruhelänge verkürzen (42). Der Querschnitt eines Sarkomers hat im Bereich der Überlappungszone der Myofilamente eine hexagonale Anordnung, ein dickes Filament (Myosin) mittig und 6 dünne

Filamente (Aktin) angrenzend. Ein veranschaulichendes Schema bietet Grafik 1.2. Das Verhältnis von Aktin zu Myosin im normalen Skelettmuskel beträgt 2:1 (43). Die Zellorganellen einer Muskelfaser liegen zwischen den Sarkomerreihen, den Myofibrillen.



Grafik 1.1: organisatorischer Aufbau eines Skelettmuskels, modifiziert nach Oatis (44)



Grafik 1.2: schematischer Aufbau eines Sarkomers auf elektronenmikroskopischer Ebene, oben: Längsschnitt, unten: Querschnitt, M: Myosin, A: Aktin, Z: Z-Scheiben;

1.5 Stand der Forschung

Zunächst wurden in der Literatur nur vereinzelt die Umbauvorgänge an der Skelettmuskulatur im Zusammenhang mit CIM beschrieben. Zunehmend rückte der strukturell veränderte Muskel in den Fokus. Die überwiegenden Erkenntnisse wurden durch Untersuchungen von Muskelbiopsien am Lichtmikroskop gewonnen. Neben der histologisch nachgewiesenen Abnahme des Muskelfaserquerschnitts im Sinne eines Verlusts an Muskelmasse (15,16,23), wurde in elektronenmikroskopischen Aufnahmen häufig ein selektiver Verlust der dicken Myosinfilamente beobachtet (14–16,19). So wird in der Literatur unter anderem auch der Begriff „Thick-Filament-Myopathy“ zur Beschreibung der CIM verwendet, wobei sich Lacomis et al. vereinfachend auf „Critical Illness Myopathie“ als zusammenfassenden Term festlegen (34). Danon et. al. brachten den ersten Nachweis über einen selektiven Abbau des dicken Filaments bei einer jungen Asthmatikerin, die nach 10tägiger Therapie mit hochdosierten Steroiden und Relaxierung mit nicht-depolarisierenden Muskelrelaxanzien diffuse Muskelschwäche und Areflexie bei erhaltener Sensorik zeigte (45). Einige Jahre vorher wurde bereits am Tiermodell nachgewiesen, dass die Denervierung des Muskels und simultane Hochdosis-Dexamethasonbehandlung zu einem „Thick-Filament-Loss“ im Skelettmuskel führen (46,47). Der selektive Abbau von dicken Filamenten im Muskel war nur sporadisch aus Fällen mit Dermatomyositis, Thrombozytopenischer Purpura, Human Immunodeficiency Virus und kongenitalen Myopathien bekannt (14,48,49). Mittlerweile gehört ein durch Muskelbiopsie nachgewiesener Myosinverlust zu den Diagnosekriterien einer CIM (34,50). Die standardmäßige Durchführbarkeit dessen ist zu diskutieren. In den bisherigen Veröffentlichungen über Veränderungen der ultrastrukturellen Skelettmuskelmorphologie im Zusammenhang mit CIM wird häufig beschrieben, dass trotz eines ausgedehnten Myosinverlusts Aktinfilamente und Z-Scheiben intakt bleiben. Dieses würde die CIM von einer nekrotisierenden Myopathie abgrenzen. Außerdem lassen sich vergrößerte Mitochondrien, lysosomale Vakuolen und Glykogenpartikel in zerstörten Arealen finden (12,16,19). Nur mithilfe der Elektronenmikroskopie können solche Befunde gestellt werden. Die Datenlage ist leider lückenhaft. Gründe hierfür sind die Invasivität der Muskelbiopsien und die notwendige Zustimmung von Patient(in) bzw. dessen Betreuer(in). Administrativ ist Letzteres besonders im intensivmedizinischen Setting ein komplizierender Faktor. Weiterhin ist die Probenpräparation für die Elektronenmikroskopie sehr aufwendig und nicht überall verfügbar. In den veröffentlichten Studien fand die Muskelbiopsie frühestens 14 Tage nach ITS-Aufnahme des Patienten statt, teilweise fehlen Angaben über den Entnahmezeitpunkt

komplett (15,16,19). Auch in den bereits erwähnten Fallberichten waren die Muskelbiopsien relativ spät im klinischen Verlauf durchgeführt worden, zumeist erst nach Beenden der Sedierung, als die ICUAW klinisch deutlich präsent war (9–12). Die allerersten Tage der frühen Phase der kritischen Erkrankung sind bis dato nie elektronenmikroskopisch untersucht worden. Da sich eine anormale Muskelaktivität mittels Elektromyographie (EMG) schon in den ersten Behandlungstagen nachweisen lässt (38), ist ein früher pathologischer Umbauvorgang im Muskel anzunehmen.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Die Arbeit fokussiert die frühe Phase der ICUAW. Gezielt soll erörtert werden, inwiefern die ultrastrukturelle Morphologie der Extremitätenmuskulatur von Hochrisikopatienten für ICUAW bereits in der Frühphase der kritischen Erkrankung betroffen ist. Durch die Elektronenmikroskopie soll ein Abgleich zuvor beschriebener Charakteristika der CIM erfolgen und möglicherweise weitere Merkmale detektiert werden. Die Ergebnisse sollen zur Aufklärung der Pathogenese von ICUAW und CIM beitragen und nicht eine diagnostische Methode etablieren.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. Gibt es bereits in der Frühphase der kritischen Erkrankung ultrastrukturelle Veränderungen im Skelettmuskel bei Hochrisikopatienten für ICUAW?
2. Wie verändert sich die ultrastrukturelle Morphologie der Skelettmuskulatur im zeitlichen Verlauf der kritischen Erkrankung?
3. Sind Patienten mit einer elektrophysiologisch diagnostizierten CIM stärker bzw. frühzeitiger von den ultrastrukturellen Umbauvorgängen betroffen?
Ist die elektrophysiologisch diagnostizierte CIM immer assoziiert mit einem Verlust von Myosinfasern und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt manifestiert sich dieser?
4. Korreliert das elektronenmikroskopische Bild des Skelettmuskels mit der Dauer der kritischen Erkrankung?

2. Methoden

2.1 Studiensetting

An der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, wurde eine Observationsstudie mit dem Titel „Der Skelettmuskelstoffwechsel und die Critical-Illness-Myopathie während des frühen Verlaufs systemischer Entzündung“ durchgeführt. Die Studie wurde als Teilprojekt der Klinischen Forschergruppe 192 in Kooperation mit dem „Experimental and Clinical Research Center Berlin“ von der Deutschen Forschungsgesellschaft gefördert. Ein positives Ethikvotum erteilte die Ethikkommission der Charité (EA2/061/06).

Einschlusskriterien für diese Studie waren kritisch kranke Patienten auf den Intensivstationen der Charité-Universitätsmedizin, Campus-Virchow Klinikum mit einem SOFA von ≥ 8 an 3 aufeinanderfolgenden Tagen innerhalb der ersten 5 Tage nach ITS-Aufnahme – entsprechend einem Patientenkollektiv mit hohem Risiko für die Entwicklung einer ICUAW, wie in früheren Analysen ermittelt (29). Im Folgenden wird dieses Patientenkollektiv als Hochrisikopatienten definiert. Nicht eingeschlossen wurden Minderjährige, Schwangere, insulinpflichtige Diabetiker, Patienten mit einer bekannten neuromuskulären Erkrankung oder bei Vorliegen von ≥ 7 Tagen ITS-Aufenthalt und/oder ≥ 72 Stunden künstlicher Beatmung zum Zeitpunkt des Screenings. Eine schriftliche Einverständniserklärung des gesetzlich bestellten Betreuers war Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie.

Das Spektrum der Intensivstationen umfasst die Bereiche Neurochirurgie, Neurologie, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Allgemein-, Thorax- und Viszeralchirurgie, Hals-Nasen-Ohren- und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Gynäkologie und stellt ein Kompetenzzentrum für „Acute Respiratory Distress Syndrom“ (ARDS) dar.

In der Studienphase erfolgte eine tägliche Dokumentation klinischer Parameter. Zum Aufnahmezeitpunkt wurden „Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II“, „Simplified Acute Physiology Score (SAPS)-II“, „SAPS-III“ sowie „Therapeutic Interventions Scoring System-28“ erhoben. Sedierungstiefe wurde durch die „Richmond Agitation Sedation Scale“ (RASS), das Vorliegen eines Delirs mit Hilfe des „Confusion Assessment Method – ICU“ und des „Delirium Detection Scores“ abgebildet. Des Weiteren erfolgte die Dokumentation von Glucose- und Insulinspiegel, Bioimpedanz, inflammatorischen Markern und das Auftreten einer eventuellen Organdysfunktion, Infektion oder Sepsis. Der Verlauf und Schweregrad der Erkrankung wurde mithilfe des SOFA-Scores bis zur Entlassung von der ITS dokumentiert.

Bei adäquater Wachheit (RASS -1 bis +1) und wenn die Patienten mindestens drei von fünf verbale Aufforderungen korrekt befolgen konnten, wurde der klinische Kraftgrad mithilfe der MRC-Skala bestimmt und zusätzlich am Folgetag validiert. Hierbei wurden an beiden oberen und unteren Extremitäten je 3 Muskelgruppen getestet und die Kraft von 5 (normale Muskelkraft) bis 0 (Paralyse) bewertet. In Summe ergeben sich somit maximal 60 Punkte, wobei De Jonghe et al. die ICUAW ab <48 Punkte definieren (36). Demzufolge kann die ICUAW auch als Mittelwert aus den 12 erfassten Muskelgruppen definiert werden und entspricht dann einem MRC<4.

Zur elektrophysiologischen Kategorisierung in „CIM-“ und „non-CIM-Patient“ ist die Höhe des Muskelsummenaktionspotentials („compound muscle action potential“, CMAP) nach direkter Muskelstimulation (dmCMAP) ausschlaggebend. An zwei Zeitpunkten - Median: Studientag 5 und 15 - sowie bei ITS-Entlassung wurde eine EMG inklusive dmCMAP-Bestimmung durchgeführt. Der entscheidende „cut-off“ war eine Amplitude von dmCMAP <3.0mV für die Diagnose „CIM“ und dmCMAP \geq 3.0mV für „non-CIM“ (39).

Muskelbiopsien wurden wenn möglich zweimal während der ITS-Behandlung entnommen.

Zur morphologischen Beurteilung wurden die Muskelbiopsien für die Histologie und Elektronenmikroskopie entsprechend präpariert (siehe auch Kapitel 2.2 und 2.3).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den Ergebnissen der elektronenmikroskopischen Auswertung der Muskelbiopsien. Das Mikroskopieren aller Schnitte sowie deren Auswertung und digitale Analyse fand ausnahmslos verblindet durch mich statt.

2.2 Entnahme der Muskelbiopsien

Die Entnahme von Muskelgewebeproben wurde nach Risikoauflärung und Einverständnis zweimal pro Patient während der Studienphase von einem chirurgischen Kollegen durchgeführt. Es wurde der „Musculus vastus lateralis“ offen biopsiert. Informationen über eine Gerinnungsstörung des Patienten sowie eventuell bereits bestehende Sensibilitätsstörungen im Bereich der Entnahmestelle mussten im Rahmen des Risikomanagements vor der Intervention ermittelt werden. Der Eingriff erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Patienten wurden wenn nötig sediert und erhielten einen Bolus eines systemisch wirksamen Schmerzmittels. Auf die Verwendung von Lokalanästhetika wurde verzichtet, da diese toxische Gewebeveränderungen verursachen können. Es wurden mehrere Gewebestücke entnommen und für die weiteren Spezialuntersuchungen entsprechend präpariert. Für die Elektronenmikroskopie wurde ein ca. 2cm langes Gewebstück an einer

Kunststoffschiene aufgespannt und bei Raumtemperatur in einem mit 4,5ml Glutaraldehyd (Firma Serva) gefülltem Röhrchen primär fixiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei 8°C im Kühlschrank. Am nächsten Morgen wurde das Glutaraldehyd abpipettiert und das Röhrchen mit Cacodylatpuffer (Firma Merck) aufgefüllt. Bis zur weiteren Verarbeitung verblieben die Proben bei 8°C im Kühlschrank.

Der Wundverschluss am Patienten erfolgte durch Nähte und anschließender Anlage eines sterilen Verbandes. Am ersten Tag wurde die Wunde prophylaktisch gegen Ödembildung gekühlt. Verbandwechsel sowie Inspektionen der Schnittstelle zur Vorbeugung und rechtzeitigem Erkennen von Wundinfektionen wurden standardmäßig alle zwei Tage unternommen. Die Fäden konnten im Schnitt nach 12 Tagen gezogen werden.

Die erste Biopsie fand an Tag 5 (Median) nach Studieneinschluss statt. Eine zweite Biopsie folgte am 16. Studientag (Median), sofern der Patient nicht bereits von der ITS entlassen wurde oder verstorben war.

2.3 Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie

Die Gewebeproben wurden für die Transmissionselektronenmikroskopie von einer Mitarbeiterin der Multi-User-Abteilung für Elektronenmikroskopie am Institut für Vegetative Anatomie, Standort Virchow Klinikum, Charité-Universitätsmedizin Berlin aufbereitet. Die Präparation ist ein aufwändiges Prozedere, welches sich über vier wesentliche Schritte erstreckt: Fixierung, Einbettung, Schneiden und Kontrastierung.

Alle Muskelbiopsien wurden zunächst in mehrere kleine Gewebestücke geteilt, welche der späteren Aufbereitung von Längs- und Querschnitten diene.

Fixierung: Die Proben wurden nach der Primärfixierung erneut mit einer 2,5%-haltigem Glutaraldehyd und 0,1M Natrium-Cacodylatpuffer-Lösung fixiert. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der Probe mit der Natrium-Cacodylatpufferlösung für 10 Minuten. Anschließend wurde das Gewebe in 2% Osmiumtetroxid (Firma ChemPur, Karlsruhe) für zwei Stunden postfixiert.

Einbettung: Das postfixierte Gewebe wurde drei- bis viermal für 10 Minuten mit Natrium-Cacodylatpuffer gespült. Es folgte die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe beginnend bei 50% (dann 70%, 95%), abschließend dreimal mit absolutem Alkohol (Firma Merck) jeweils für 10 Minuten. Dann begann die Immersion der Biopsien mit Propylenoxid (Firma Serva) als Intermedium für zweimal 15 Minuten. Im Anschluss wurden weitere Immersionen mit verschiedenen Mischungen aus Propylenoxid und Epon® (Firma Serva)

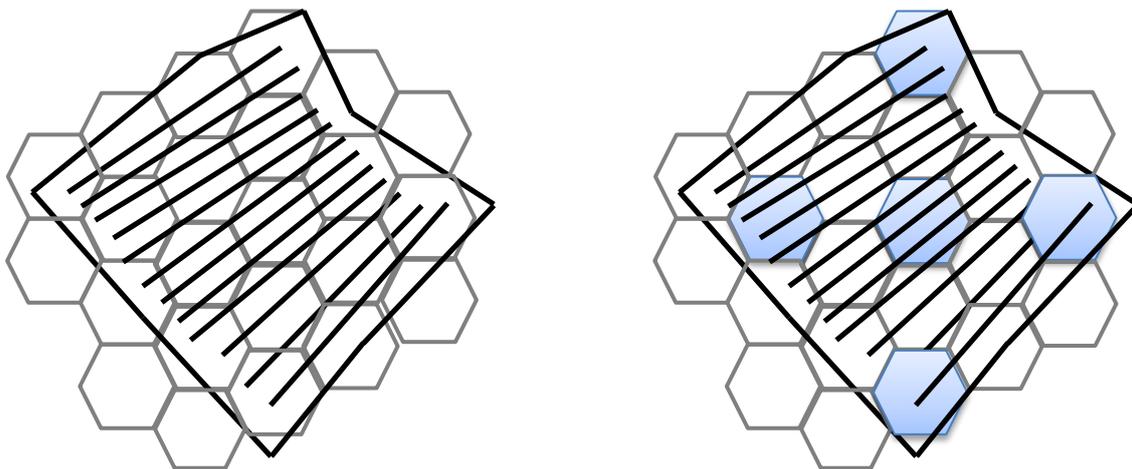
durchgeführt: 2:1, 1:1 und 1:2 für jeweils 1 Stunde. Epon® ist ein Epoxidharz bestehend aus drei Komponenten: DDSA (2-Dodeceny succinic acidanhydride), MNA (Methylnacidanhydride) und Glycidether 100- und einem Beschleuniger- DMP 30 (2, 4, 6-Trisdimethylaminomethylphenol). Zuletzt erfolgte eine Immersion mit reinem Epon® über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Proben in einer kleinen Einbettkapsel platziert und das restliche Volumen mit frischem Epon® aufgefüllt. Für die Längsschnitte gab es hohe zylinderförmige, für die Querschnitte flache quaderförmige Kapseln. Abhängig von der zur Verfügung stehenden Gewebemenge, wurden je ein bis drei Kapseln für die Längs- bzw. Querschnitte befüllt. Abschließend wurden die befüllten Einbettkapseln für 48 Stunden bei 60°C polymerisiert.

Herstellen der Gewebsschnitte: Die ausgehärteten Epon®-Blöcke wurden aus den Einbettkapseln entnommen und mit einem Glasmesser zunächst getrimmt, um das überschüssige Epon® zu entfernen. Für eine lichtmikroskopische Erstbeurteilung der Schnitte wurden zunächst sogenannte Semidünnschnitte angefertigt. Verwendet wurde hierfür das Mikrotom RM 2065 der Firma Leica, Bensheim, welches mithilfe eines Diamantmessers 0,5 bis 10µm dicke Präparate erzeugte. Diese wurden anschließend mit einer Richardson Färbelösung angefärbt: Methylenblau (Firma Merck) in 1% Boraxlösung (Firma Sigma) und Azur (Firma Sigma) in 1% Aqua dest.-1:1-Gemisch. Unterm Lichtmikroskop erfolgte die Kontrolle, ob der Muskel ausreichend längs bzw. quer angeschnitten wurden und welche der Schnitte für eine elektronenmikroskopische Auswertung geeignet wären. Die ausgewählten Präparate wurden nachfolgend für die Herstellung der Ultradünnschnitte benutzt. Mit dem Ultracut S von der Firma Leica wurden ca. 70nm dicke Präparate angefertigt. Das Ultracut S benutzt als Schneideelement ebenfalls ein Diamantmesser. Die Ultradünnschnitte wurden auf sogenannten „Mesh-Nickel-Grids“ (Nickelgitter, Firma Plano) aufgebracht und mit Uranylacetat (3-4% in 50% Ethanol) und Bleicitrat (nach Reynolds) kontrastiert.

2.4 Mikroskopierstrategie

2.4.1 Mikroskopieren der Längsschnitte

Das Mikroskopieren aller Muskelbiopsieschnitte wurde durch mich und verblindet, d.h. ohne Kenntnis über Vorliegen von CIM oder non-CIM, durchgeführt. Für die Analyse der Muskellängsschnitte verwendete ich das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) Zeiss EM 906, Oberkochen, der Multi-User-Abteilung für Elektronenmikroskopie am Institut für Vegetative Anatomie, Standort Virchow Klinikum, Charité-Universitätsmedizin Berlin. Zunächst verschaffte ich mir einen systematischen Überblick über die Größe des Schnittes. Der Gebrauch der „Mesh-Nickel-Grids“ erwies sich dafür als hilfreich. Unter dem TEM sieht man, wie das „Mesh“ gleich einem Raster über dem Schnitt liegt. Entlang der Längs- und Breitseite kann man so die einzelnen Waben abzählen und erhält damit die Größenausdehnung des jeweiligen Präparats. Ziel war es, eine standardisierte Auswahl an Bildern von jedem Schnitt zu treffen, die möglichst repräsentativ für die Biopsie bzw. für den entsprechenden Muskel sein konnte. Mithilfe des Rasters wurden fünf Stellen pro Schnitt ausgewählt. Größtenteils hatten die Muskelpräparate eine rechteckige Ausdehnung, sodass ich zentral und jeweils in der Mitte der vier Seitenränder eine Wabe wählte. Bei unregelmäßiger Form versuchte ich in ähnlicher Weise Ausschnitte zu bestimmen. Dieses Vorgehen wandte ich für die Längsschnitte aller Biopsien einheitlich an (siehe beispielhaft Grafik 2.1).



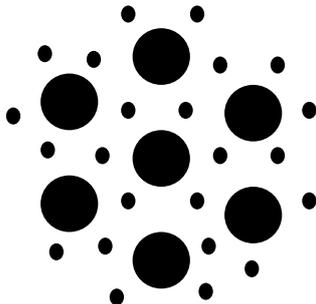
Grafik 2.1: schematische Darstellung der Ansicht unterm TEM; grau=Waben des Mash-Grids, schwarz=Muskelschnitt, rechts: blaue Felder=Auswahlfelder

Nicht aufgenommen wurden Bereiche, die mechanisch zerstört waren, z.B. durch Rissartefakte, die beim Schneiden entstanden sind, oder in denen zwei Schichten des

Präparats überlappten, sodass keine Beurteilung der Struktur möglich war. Wenn solch ein Areal in eines der fünf geplanten Aufnahmen fiel, wurde ein alternativer, im Raster nahe liegender Ausschnitt gewählt. Die Bilder wurden mit einer 1670- bzw. 2156fachen Vergrößerung dargestellt, damit ein möglichst großer Ausschnitt für die morphologische Betrachtung zur Verfügung steht. Repräsentative und auffällige Befunde fotografierte ich mit höherer Auflösung (je nach Bereich 4640-, 6000-, 7750- und 10 000-fach), pro Längsschnitt zusätzlich ein bis zwei Bilder. Als Belichtungszeit wählte ich standardmäßig eine Sekunde.

2.4.2 Mikroskopieren der Querschnitte

Zur Mikroskopie der Muskelquerschnitte aller vorhandenen Biopsien verwendete ich ebenso das TEM Zeiss EM 906. Ich suchte nach Bereichen in der A-Bande, in denen sowohl Myosin- als auch Aktinfilamente quer getroffen waren (siehe beispielhaft Grafik 2.2.), unabhängig von weiteren Kriterien. Ich fotografierte jeweils drei Bilder pro Biopsie mit einer 60000-fachen Vergrößerung, von denen ich dann später je ein Bild – das mit der besten Auflösung - für die Auswertung mit Image J (Version 1.37c) auswählte.



Grafik 2.2: Zielbereich A-Bande im Querschnitt;
große Punkte=Myosin, kleine Punkte=Aktin

2.5 Digitalisierung und Bearbeitung der Negative

Die angefertigten Negative wurden innerhalb der Multi-User-Abteilung durch eine Mitarbeiterin entwickelt und anschließend von mir für die digitale Bearbeitung und Auswertung eingescannt. Hierfür wurde der Scanner UMAX Astra 4700 mit Durchlichtaufsatz bzw. den Durchlichtscanner Epson Perfection V700 Photo verwendet. Die Digitalisierung wurde mit der Lasersoftware SilverFast Epson-SE 6.6 realisiert, die weitere Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop CS3. Zum Teil musste eine Tonwertkorrektur oder eine Kontrasterhöhung eingesetzt werden. Die Bilder speicherte ich im JPEG- und im TIFF-Format.

2.6 Auswertung der EM-Bilder

2.6.1 Auswertung der Längsschnitte

Die Auswertung der EM-Bilder aller Biopsien erfolgte ausschließlich durch mich. Dazu war eine Betrachtung jeder einzelnen Aufnahme am Computer obligat. Obwohl in der Lichtmikroskopie signifikante Unterschiede zwischen CIM- und non-CIM-Patienten bezüglich der Fasertypen nachgewiesen werden konnte (23), beurteilte ich die Schnitte ohne Wissen des Muskelfasertyps (I, IIa oder IIb). Die Unterscheidung der Fasertypen nach ultrastrukturellen Merkmalen im EM ist praktisch nicht möglich (51). Ferner stellte dies nicht das Ziel der Untersuchung dar. Bei der kleinen Größe der Präparate sind je Muskellängsschnitt ca. 30-50 Fasern insgesamt und etwa zwei bis vier Fasern pro ausgewählter Wabe (s. Grafik 2.1) angeschnitten.

Um eine einheitliche und vergleichbare Bewertung der pathologischen Veränderungen im Skelettmuskel zu erzielen, erstellte ich einen Score aus sieben Kriterien mit je 2 bis 4 Subkriterien (siehe Tabelle 2.1). Ausschlaggebend für die Punktevergabe war immer das am stärksten pathologische von 5 ausgewählten Bildern, unabhängig von der Häufigkeit des entsprechend Merkmales. Pro Patient und Kriterium wurde somit nur ein Bild bewertet und nicht mehrere, so sollte eine Summation bei wiederholt getroffenen Fasern vermieden werden. Alle Kriterien werden für die Gesamtwertung des Scores gleich gewichtet. Daher ist die Höchstpunktzahl stets auf 3 Punkte (P.) festgelegt und spiegelt die stärkste Pathologie wider, unabhängig von der Anzahl der Subkriterien. Ein Normalbefund wurde mit 0P. bewertet.

Bewertungskriterien der Muskellängsschnitte am Elektronenmikroskop		
<u>Hauptkriterium</u>	<u>Subkriterien</u>	<u>Punkte</u>
1. Sarkomerstruktur	A und I Banden und H-Zone voneinander abgrenzbar	0
	Banden nicht sicher voneinander abgrenzbar	3
2. Z-Scheiben	Z-Scheiben intakt	0
	Z-Scheiben gewellt	1
	Z-Scheiben verschoben >25% der Sarkomerlänge	2
	Z-Scheiben zerstört / abwesend	3
3. Mitochondrien	Normal	0
	Geschwollen	1
	Verlust der Christae	2
	Fragmente	3
4. Myosinfilamente	Normal	0
	„Myosin-loss“ beginnend	1
	„Myosin-loss“ fortgeschritten	3
5. Aktinfilamente	Normal	0
	„Aktin-loss“ beginnend	1
	„Aktin-loss“ fortgeschritten	3
6. Myofibrillen	Normal	0
	Kalibervariation und Auflockerung	1
	Unterbrechung der Kontinuität	2
	Zerstörung der fibrillären Struktur	3
7. Einlagerung	Glykogen	1
	Fett	1
	Lysosomale Vakuolen	1

Tabelle 2.1: semiquantitativer Score für die Bewertung der Muskellängsschnitte

Die Score Merkmale werden im Folgenden einzeln genannt und erläutert:

Veränderungen im Bandenmuster der Sarkomere oder in der Form der Z-Scheiben geben Hinweise auf Desintegration der Myofilamente bzw. auf Abweichung von ihrer regelmäßigen Anordnung. Dabei waren das Streifenmuster der Sarkomere und die Form der Z-Scheiben im Fokus. A-,I-,H- und M-Bande sind im gesunden Muskel deutlich voneinander abzugrenzen, die Z-Scheiben stellen sich als dicke, gerade Linie dar. Erschienen die Z-Scheiben gewellt bzw. über ein Viertel der Sarkomerlänge hinaus verschoben, gab ich 1P. bzw. 2P.. Ist die Bandenstruktur der Sarkomere nicht mehr abgrenzbar, zählte dies 3P., ebenso bei vermehrtem Nicht-Auffinden von Z-Scheiben. Einen Sonderfall stellen Muskelfasern dar, die scheinbar in kontrahiertem Zustand fixiert wurden – in denen also die Aktinfilamente in die Myosinfilamente gleiten und somit die I-Bande verschwinden lassen. Diese sind durch

geradlinige Z-Scheiben begrenzt, die M-Bande ist deutlich erkennbar und auch die Myofilamente zeigen eine reguläre Dichte. Die Sarkomerstruktur bewertete ich dann folglich als nicht pathologisch.

Die Mitochondrien analysierte ich nach ihrer Größe, Form und Christastruktur. Ein Anschwellen und Verlust der Christae sind Zeichen für Hypoxie und nekrotische Umbauvorgänge in der Muskelfaser. Dies kann allerdings auch artifiziell durch übermäßiges Spülen mit saliner Lösung entstehen (52), ist in dieser Studie aber unwahrscheinlich, da keine NaCl-Lösung bei der Fixierung verwendet wurde. Der Score berücksichtigte die pathologischen Abstufungen „geschwollene Mitochondrien“ (1P.), „Verlust der intramitochondrialen Christae“ (2P.) und Vorhandensein von nur noch „Fragmenten“ (3P.).

Die Qualität der Myofilamente zu beurteilen – insbesondere der dicken bzw. der Myosinfilamente – gehörte zu den Hauptfragestellungen. Dabei war der Grad des Abbaus, also der Verlust von Myosin und Aktin entscheidend. Die Stadieneinteilung umfasste „kein“ (0P.), „beginnender“ (1P.) oder „fortgeschrittener Myosin-bzw. Aktinverlust“ (3P.). Beginnender Filamentverlust heißt, dass die Filamente innerhalb einer Faser nur zum Teil zerstört, an anderer Stelle jedoch noch erkennbar sind. Fortgeschrittener Verlust bedeutet demnach, dass keine Filamente mehr abgrenzbar sind.

Ein nächstes Kriterium war die Präsentation der Myofibrillenstruktur. Vergrößerung der Fibrillenzwischenräume, sogenannte „Auflockerungen“ – z.B. durch Auseinanderweichen bei stark geschollenen Mitochondrien – und Verschmälerung der Sarkomerreihen, sogenannte „Kaliberveränderung“ erhielten 1P., Abbrüche oder Fehlen von mehreren Sarkomereinheiten bereits 2P.. Als „zerstört“ (3P.) wurden Abschnitte befundet, in denen die regelmäßige Fibrillenstruktur komplett aufgehoben war – etwa durch starken Myofilament- und Z-Scheibenverlust und bei verschwommenem Bandenmuster.

Darüber hinaus wurden Einlagerungen von Lysosomen, Fetttröpfchen oder Glykogen, in Hinblick auf weitere mögliche Kriterien in der Skelettmuskelmorphologie kritisch kranker Patienten dokumentiert. Hierzu vergab ich bei Auffinden eines der o.g. Merkmale je 1P. unabhängig von der Quantität.

Mithilfe der Längsschnitte wurde außerdem die Durchschnittslänge der Sarkomere bestimmt. Mit zunehmender Sarkomerlänge vergrößert sich die Dichte der Myofilamente (Packdichte), respektive der dicken Myosinfilamente, im Querschnitt (53–56). Daher war die Kenntnis der Durchschnittssarkomerlänge aus jeder Muskelbiopsie essentiell zur Bestimmung der

Filamentdichte. Die Sarkomerlänge kann innerhalb einer Muskelfibrille stark variieren (51). Angelehnt an Riley et al. bestimmte ich die Länge von vier intakten Sarkomeren hintereinander in je 5 Biopsielängsschnitten eines Patienten mit dem „straight-tool“ von WCIF Image J-Software (Version 1.37c) und berechnete daraus den Mittelwert (51,57).

2.6.2 Auswertung der Querschnitte

Ziel in der Auswertung der Querschnitte war die Ermittlung der quantitativen Dichte von dicken und dünnen Myofilamenten innerhalb einer festgelegten Fläche (Filamentdichte), die Durchmesserbestimmung der dicken Myosinfilamente (Morphometrie) sowie das Ausmessen von gesunden und zerstörten Flächenanteilen in einem größeren Ausschnitt (Planimetrie). Sowohl das Auszählen der Filamente als auch die Morpho- und Planimetrie führte ich mit der Software WCIF Image J (Version 1.37c) durch. Pro Biopsiequerschnitt stand ein Bild zur Auswertung zu Verfügung.

Bestimmung der Filamentdichte: Eine Standardfläche wurde definiert mit $0,7\mu\text{m}^2$ (SD 0,05). Die dicken und dünnen Filamente markierte ich mit dem „point-tool“ in zwei verschiedenen Farben, sodass eine automatische Zählung erfolgen konnte. Die Gesamtanzahl wurde auf eine Fläche von $1\mu\text{m}^2$ verrechnet. Anschließend erfolgte die Korrektur anhand des Sarkomerlängenfaktors, um die reale Packdichte zu erhalten – Standardsarkomerlänge $2,5\mu\text{m}$, entsprechend der Durchschnittsarkomerlänge aller Muskelbiopsien.

Vorgehen Planimetrie: Es erfolgte die Bestimmung von „zerstörten“ und „gesunden“ Flächenanteilen pro Biopsiequerschnitt zur Etablierung eines zweiten Korrekturfaktors. Das Auszählen von Aktin- und Myosinfilamenten kann wie in Kapitel 2.4.2 erwähnt nur in Bereichen der A-Bande erfolgen. Dort erscheinen die Myofilamente allerdings intakt. Die Planimetrie wurde für jede Biopsie in dem gesamten Querschnittsbild vorgenommen (Mittelwert $1,7\mu\text{m}^2$, SD 0,04). Alle dunklen Stellen wurden als „gesund“ und alle hellen als „zerstört“ bewertet. Per „freehand selection“ wurde die Fläche mit Image J-Software umkreist und anschließend automatisch vermessen. Für jede Biopsie bestimmte ich somit den individuellen Anteil an gesunder und zerstörter Fläche. Ausgehend von einer Filamentdichtebestimmung aus dem „gesunden“ Flächenanteil, ergibt sich folgende Umrechnung: gesunde Fläche nimmt z.B. 80% ein, Multiplikation der Filamentdichte mit Korrekturfaktor 0,8.

Vorgehen Morphometrie: In jedem Querschnittsbild bestimmte ich per „straight-tool“ den Durchmesser von 50 zufällig gewählten Myosinfilamenten. Aus diesen wurde der Mittelwert berechnet.

Das Studiendesign sah keine gesunden Probanden als Kontrollgruppe vor. Als Referenz für Normalwerte der Myofilamentdichte bei Gesunden dienten die Ergebnisse aus zwei Studien von Riley et al.. Sie untersuchten Skelettmuskelbiopsien von 8 bzw. 4 Astronauten vor und nach Bettruhe bzw. Weltraumflug (51,57). Die Astronauten hatten ein Durchschnittsalter von 43+/-3 bzw. 43+/-4 Jahre. Der BMI betrug 24,75 und 25,68 kg/m². Die Muskelbiopsien wurden durch perkutane Nadelbiopsie aus dem Musculus soleus entnommen.

2.6.3 Statistische Auswertung

Vergleiche zweier Gruppen bzgl. verschiedener Merkmale erfolgten mittels Mann-Whitney-U-Test. Vergleiche desselben Merkmals zu unterschiedlichen Zeitpunkten (verbundene Proben von Biopsie 1 und 2) wurden mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Der Chi-Quadrat-Test wurde zur Untersuchung von Häufigkeitsverteilung verwendet. Des Weiteren erfolgten statistische Bestimmungen von Median, Mittelwert, Maximum und Minimum. Außerdem wurden Korrelationsanalysen durchgeführt mit Bestimmung von Spearman Korrelationskoeffizient und r^2 .

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 30 Patienten in die Untersuchung des elektronenmikroskopischen Korrelates der erworbenen Muskelschwäche im Rahmen einer kritischen Erkrankung einbezogen. Die allgemeine Patientencharakteristik sowie klinische Merkmale zu den Zeitpunkten der Biopsien geben Tabelle 3.1 und 3.2 wieder.

Patienten insgesamt [n]	30
Alter [Jahre]	49 (40/67)
Geschlecht [weiblich/männlich]	8/22 (27%/73%)
BMI [kg/m²]	28 (23/31)
Diagnose bei ITS-Aufnahme	ARDS: 11 (37%) Sepsis: 7 (23%) Trauma: 6 (20%) Intrakranielle Blutung: 6 (20%)
Krankheitsschwere bei ITS-Aufnahme	SOFA: 12 (10/14) SAPS-II: 41 (36/54)
Überlebende [n]	23 (77%), davon CIM 11, non-CIM 11
MRC-Skala	3,3 (3,0/4,2) davon 14 mit ICUAW, 6 ohne ICUAW
Max. Beatmungstunden	465,5 (342,5/661,4)
ITS-Verweildauer [Tage] nur Überlebende	27 (22/38)
CIM (n=11)	31 (27/42)*
non-CIM (n=11)	23 (13/35)*

Tabelle 3.1: Patientencharakteristik; Angaben in Median (25./75.Perzentile) bzw. n (%);
*p=0,02

	ITS-Aufnahme bis 1. Biopsie	1. bis 2. Biopsie
Patientenzahl	30	19
Tage ITS	5,5 (4/7)	16 (15/19)
CIM/non-CIM	16/11	12/7
Sepsis an % Tagen	38,75 (0,0/66,7)	
CIM (n=16)	50 (40/71,4)*	k.A.
non-CIM (n=11)	0,0 (0,0/40)*	
Sedierung [RASS]	-4 (-5/-2,8)	-3 (-4/-1)
Hydrokortison mean mg/Tag	95 (0,0/169)	0,0 (0,0/69)
Noradrenalin mean mg/Tag	15,75 (9/23)	4,25 (0,8/10)

Tabelle 3.2: Sepsistage und Therapie während Studienzeit, Angaben in Median (25./75.Perzentile), *p=0,01, k.A.=keine Angabe

Die Muskelbiopsien wurden aus dem Musculus vastus lateralis sowohl während der sehr frühen Phase (Median Tag 5) als auch im Verlauf (Median Tag 16) der kritischen Erkrankung entnommen. Es wurde pro Patient je ein Längs- und ein Querschnittpräparat für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Für die qualitative, morphologische Auswertung wurden von den Biopsielängsschnitten jeweils fünf elektronenmikroskopische Bilder aufgenommen und wie im Methodenteil beschrieben mit Hilfe des entwickelten Scores beurteilt (siehe Tabelle 2.1). Zur quantitativen Analyse wurde von den Querschnittpräparaten der Muskelbiopsien jeweils eine elektronenmikroskopische Aufnahme angefertigt. Aus diesen Aufnahmen wurden morphometrisch visuell gesunde und beschädigte Flächen ausgemessen, sowie der Durchmesser von 50 Myosinfilamenten bestimmt. Anschließend erfolgte die Auszählung von dicken und dünnen Filamenten in einer festgelegten Fläche. Zur quantitativen Auswertung gehörte außerdem die Bestimmung der Sarkomerlängen, welche mithilfe der Längsschnitte durchgeführt wurde.

3.1 Frühe Phase

An Median Tag 5 als früher Zeitpunkt während des ITS-Aufenthalts wurden Muskelbiopsien von 29 Patienten entnommen und qualitativ sowie quantitativ ausgewertet. Ein Patient hatte keine frühe Muskelbiopsie. Von einer Muskelbiopsie war die Qualität des elektronenmikroskopischen Präparates im Längsschnitt leider sehr schlecht, sodass die morphologischen Strukturen nicht eindeutig befundet werden konnten. Die Bilder dieses Präparats wurden daher von der Analyse ausgeschlossen.

3.1.1 qualitative Auswertung der Längsschnitte

Schon in der Frühphase des ITS-Aufenthalts zeigten sich in den Längsschnitten von allen Muskelbiopsien deutliche Pathologien wie Myosinverlust, Fibrillenstrukturveränderungen und deformierte Mitochondrien. Details von Art und Ausprägung der Veränderungen erfasste ich mit dem in Kapitel 2.6.1 beschriebenen Score. Der durchschnittliche Punktwert aller Erstbiopsien lag bei 10,6 von maximal 21 Punkten. 12 der 28 Biopsien erhielten in der Bewertung ≥ 11 Punkte und 10 Biopsien sogar ≥ 14 .

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Scorekriterien dargestellt und die Befunde erläutert:

Die Sarkomerstruktur beurteilte ich hinsichtlich ihrem eindeutig abgrenzbarem Bandenmuster. In 15 Biopsien fand ich Areale, wo sich die Bandenstruktur schon nach fünf Tagen nicht sicher abgrenzen ließ (Bild 1+2). Demnach vergab ich bei 54% der Patienten bereits in der ersten Biopsie die Höchstpunktzahl für dieses Kriterium.

Einhergehend damit waren in fast allen Erstbiopsien Areale zu finden, in denen die Z-Scheiben verschoben oder gar zerstört waren. Ich konnte die Z-Scheiben in lediglich zwei der Erstbiopsien als „normal“ werten. In ca. 3% der Biopsien waren sie gewellt (Bild 2), in 29% verschoben (Bild 3+4) und in bereits 61% zerstört bewertet (Bild 5+6).

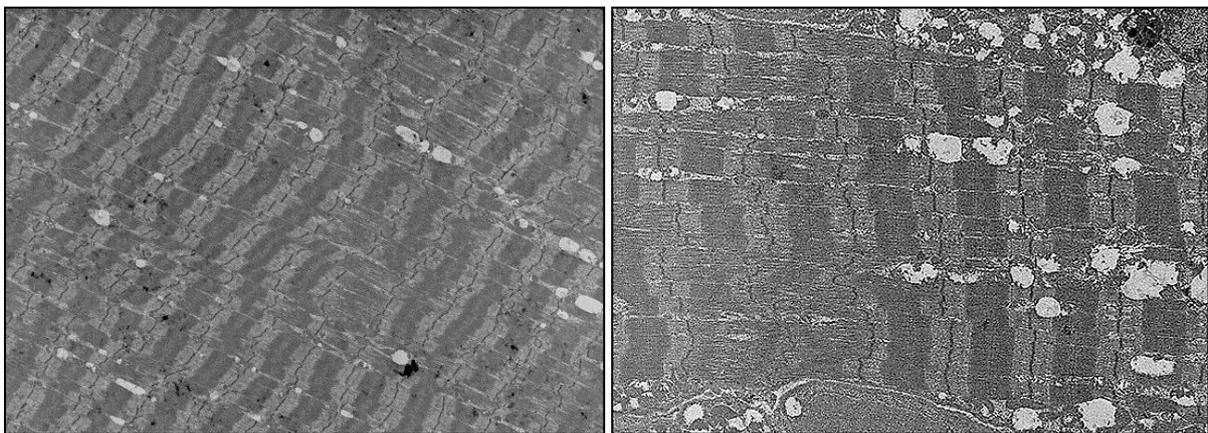


Bild 1 (links): Bandenstruktur z.T. schlecht abgrenzbar; verschobene, sowie fehlende Z-Scheiben; x1670

Bild 2 (rechts): Bandenmuster verschwommen; gewellte Z-Scheiben; x2156

Für das Kriterium der Myofilamente bewertete ich, ob dicke (Myosin-) bzw. dünne (Aktin-) Filamente zerstört, teilweise zerstört oder intakt waren. Es war stets der schlechteste Ausschnitt ausschlaggebend für die Bewertung, unabhängig davon ob ein Befund flächenhaft oder punktuell vorzufinden war. In 32% der Frühbiopsien (absolut: 9/28) war ein beginnender

und in 18% (5/28) ein fortgeschrittener Verlust der dicken Filamente zu sehen. Einen beginnenden Verlust des dünnen Filaments fand ich in 36% der Muskelbiopsien (10/28). Es ließ sich jedoch in keinen der Muskelbiopsien ein fortgeschrittener Abbau feststellen. Zusammenfassend stellt sich in der Hälfte (50%) der Frühbiopsien bereits ein Myosinverlust (ML) dar, gegenüber einem Aktinverlust (AL) in ca. einem Drittel (36%). Die Muskelbiopsien hatten ein heterogenes Befallsmuster. Einerseits gab es Biopsien, in denen der Myofilamentverlust nur punktuell innerhalb einer Faser zu sehen war (Bild 3+4). Andererseits waren pathologische Filamente in jedem der 5 elektronenmikroskopischen Bilder zu finden, häufig mit großflächiger Zerstörung mehrerer Fasern (Bild 5+6). Vergleicht man die Häufigkeit von beginnendem und fortgeschrittenem Filamentabbau zwischen dicken und dünnen Filamenten im Chi-Quadrat-Test (CQT), zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,03$) mit verstärktem Abbau der dicken Myosinfilamente während der frühen Phase.

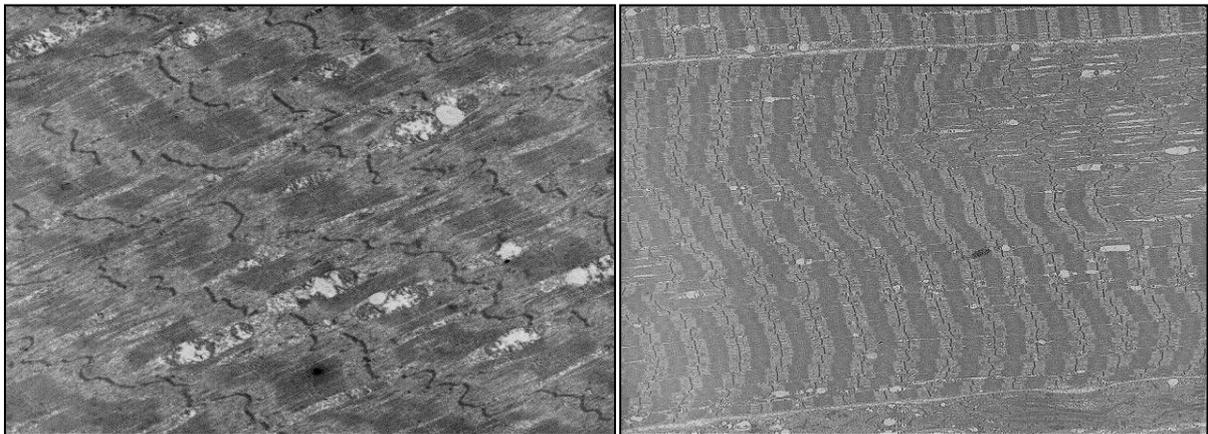


Bild 3 (links): beginnender ML, stark verschobene Z-Scheiben, ballonierete Mitochondrien; x6000

Bild 4 (rechts): Areal inmitten einer Faser mit aufgehobener Sarkomerstruktur und ML; untere Faser zerstört; x1670

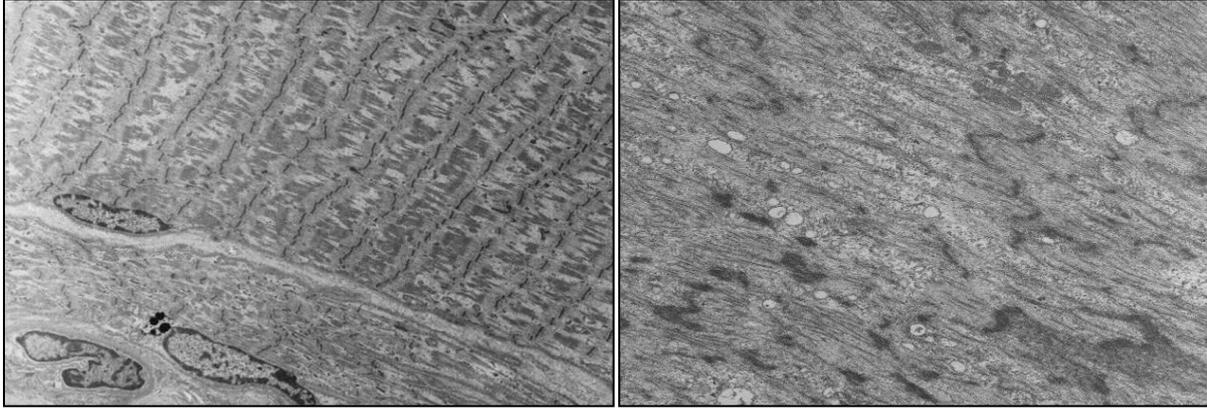


Bild 5 (links): selektiver ML beginnend in oberer Faser, untere Faser fortgeschrittener ML, Faser quasi zerstört mit vereinzelt Z-Scheiben; x1670

Bild 6 (rechts): fortgeschrittener ML und beginnender AL, Zerstörung der Faserstruktur; x10 000

Hinsichtlich der Faserstruktur (Kriterium „Myofibrillen“) waren in beinahe allen Biopsien der frühen Phase pathologische Befunde zu finden. Nur zwei von 28 Frühbiopsien wiesen in dem Kriterium einen Normalbefund auf. In ca. einem Drittel aller Präparate (ca.32%) war eine aufgelockerte Anordnung der Sarkomerreihen sowie Kaliberänderung mit Z-Scheibenschmälerung und Faserverlust im Sinne einer Atrophie festzustellen (Bild 7+8). In etwa 39% waren Kontinuitätsunterbrechungen innerhalb der Längsachse der Myofibrillen mit Zerstörung mehrerer Sarkomere (Bild 9+10) zu finden. Bei einem Fünftel (22%) der Frühbiopsien war die fibrilläre Struktur in einigen Arealen komplett zerstört, d.h. mehrere Sarkomerreihen waren nicht mehr zu erkennen und die Faser als solche lediglich erahnbar durch die begrenzende Sarkolemm und teilweise stehen gebliebenen Z-Scheiben (Bild 11+12).

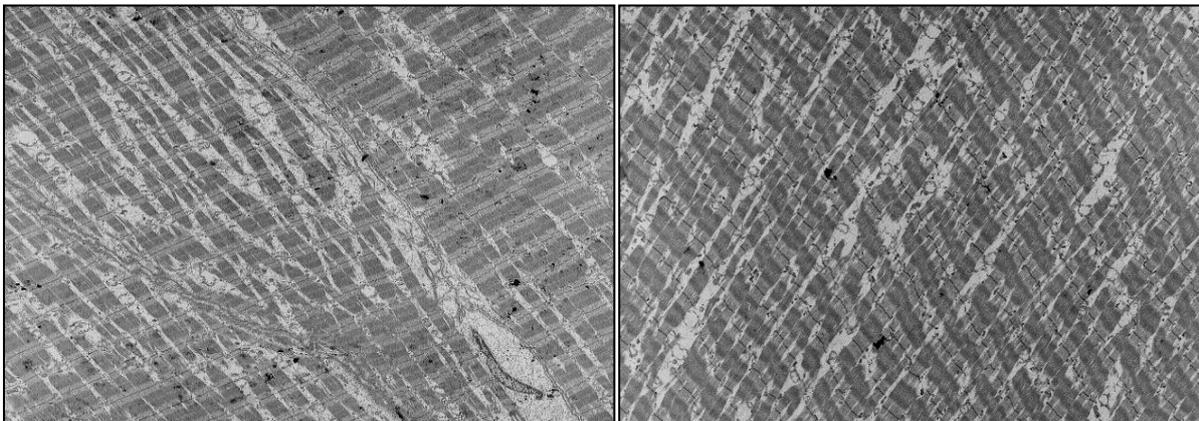


Bild 7+8: aufgelockerte Fibrillenstruktur; links x1670; rechts x3350

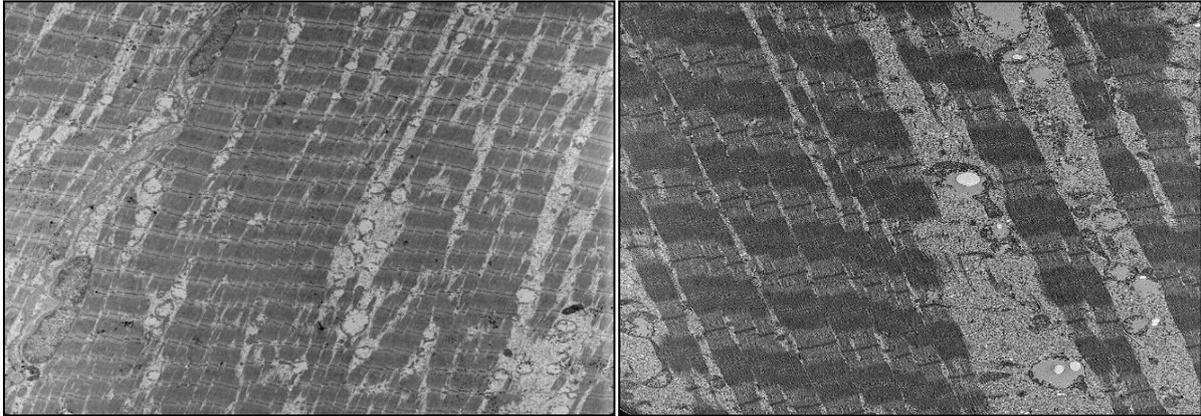


Bild 9+10: Auflockerungen und Reihenabbrüche; viele ballonierte Mitochondrien; links x1670; rechts x4646

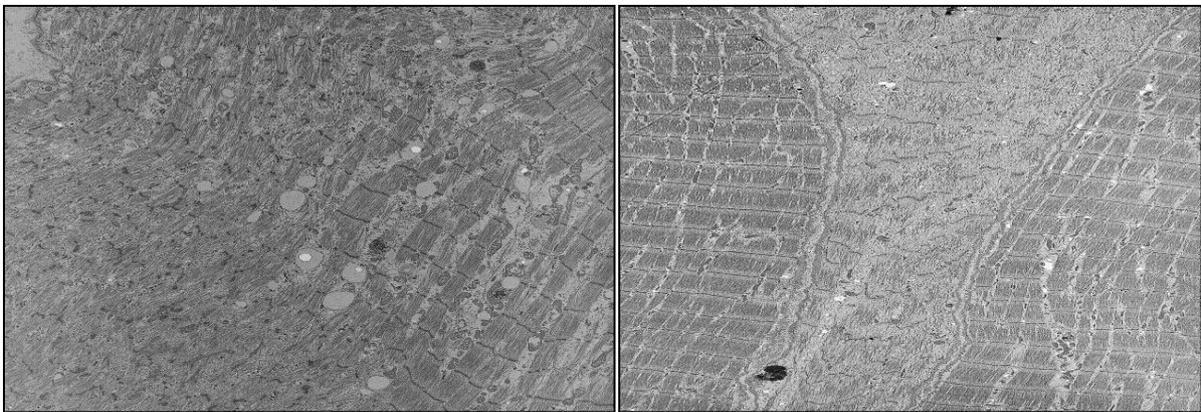


Bild 11+12: zerstörte Faser mit fortgeschrittenem ML und stehenden Z-Scheiben; z.T. erhaltenen Sarkomerreihen; x2784 (links), zerstörte Faser umrahmt von zwei intakten Fasern; x1670 (rechts)

Als nächstes Kriterium untersuchte ich die Morphologie der Mitochondrien. Diese zeigten sich nur in 14% der frühen Muskelbiopsien normal konfiguriert. Zum großen Teil waren sie geschwollen und mit Verlust der intermitochondralen Christae vorzufinden. In einem Drittel der Proben befanden sich teilweise nur noch Überreste der Mitochondrien, Fragmente der Mitochondrienwände (Bild 13+14).

Ein weiteres Kriterium für pathologische Umbauvorgänge im Muskel ist das Vorliegen von Einlagerungen wie z.B. Glykogen, Fett oder lysosomale Vakuolen. All diese Merkmale waren in den Frühbiopsien vorhanden, wie etwa in Zwischenräumen der Myofibrillen bzw. der Sarkomerreihen oder auch oft in Zellkernnähe (Bild 13+14).

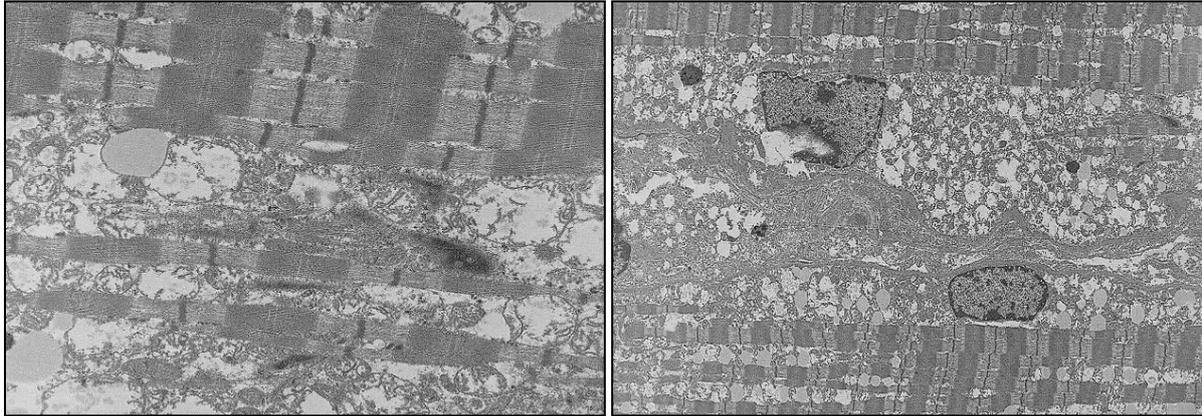


Bild 13+14: extrem ballonierte Mitochondrien mit Christaeverlust; flüssigkeitsgefüllte und lysomale Vakuolen (rechts); Glykogen zwischen den Fibrillen (links); links x7750; rechts x1670

3.1.2 quantitative Auswertung der Längs- und Querschnitte

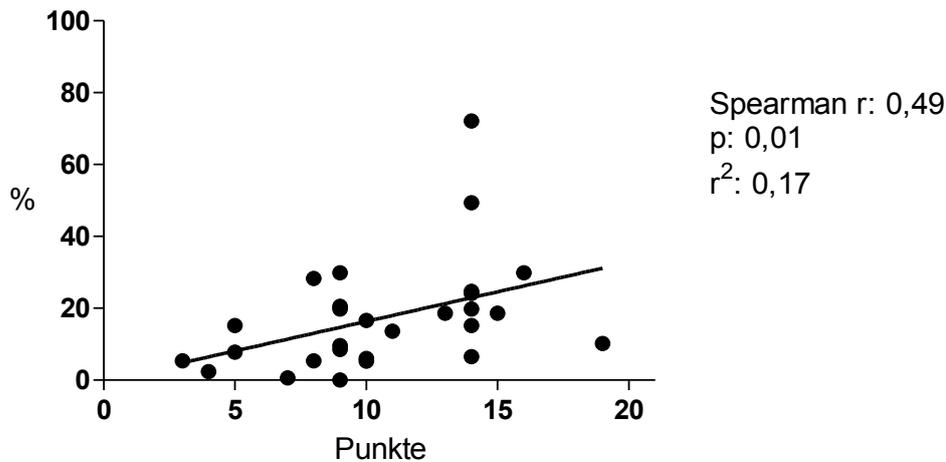
Es wurde wie die durchschnittliche Sarkomerlänge aus insgesamt 20 Sarkomeren (5x vier hintereinander) für jede Muskelbiopsie bestimmt. Eine Übersicht aller Werte gibt Tabelle 3.6 in Kapitel 3.2.2 wieder. In drei Biopsien war der Myosinverlust schon so weit fortgeschritten bzw. die Myofibrillen derart zerstört, dass ein valides Ausmessen der Sarkomerlänge nicht möglich war. Sie wurden demnach nicht in die Auswertung einbezogen. Die durchschnittliche Sarkomerlänge in den Frühbiopsien betrug $2,5\mu\text{m}$ mit einer Standardabweichung (SD) von $0,5\mu\text{m}$ und einem 95%-Konfidenzintervall (KI) von $2,29\mu\text{m}$ - $2,73\mu\text{m}$. Das kürzeste Sarkomer war $1,6\mu\text{m}$ und das längste $3,5\mu\text{m}$ (MD $2,4\mu\text{m}$). Ausgehend von der Normallänge eines Sarkomers von $2,2\mu\text{m}$ (siehe Kapitel 1.4) entspräche dies einer mittleren Längszunahme um ca. 11%.

Weiterhin wurden in jedem Querschnittsbild der Muskelbiopsien die gesunden und die zerstörten Anteile der Gesamtfläche gemessen. Bei einer mittleren Fläche von $1,67\mu\text{m}^2$ betrug der Anteil zerstörter Areale $0,25\mu\text{m}^2$ (Median) in der frühen Phase, entsprechend 15,2% der Gesamtfläche. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Score (Gesamtscore aller 7 Kriterien) der Längsschnitte und den zerstörten Flächenanteilen in den Querschnitten (siehe Grafik 3.1). Eine Übersicht der berechneten Flächenanteile jedes einzelnen Querschnittsbilds ist in Tabelle 3.3 zu finden.

Flächen						
Pat.	μm^2 gesamt	μm^2 gesund	μm^2 destruiert	%gesund	%destruiert	Flächenfaktor
4	1,65	0,46	1,19	27,9	72,1	0,28
5	1,65	1,51	0,14	91,5	8,5	0,92
6	1,68	1,03	0,65	61,3	38,7	0,61
7	1,69	1,45	0,23	85,8	13,6	0,86
8	-	-	-	-	-	-
9	1,66	1,19	0,47	71,7	28,3	0,72
10	1,44	1,01	0,43	70,1	29,9	0,70
11	1,64	1,39	0,25	84,8	15,2	0,85
12	1,66	1,49	0,17	89,8	10,2	0,90
13	1,67	1,34	0,33	80,2	19,8	0,80
14	1,65	1,4	0,25	84,8	15,2	0,85
15	1,65	1,61	0,04	97,6	2,4	0,98
16	1,38	1,29	0,09	93,5	6,5	0,94
17	1,68	1,58	0,1	94,0	6,0	0,93
18	1,69	1,6	0,09	94,7	5,3	0,95
19	1,67	1,58	0,09	94,6	5,4	0,95
20	1,45	1,21	0,24	83,4	16,6	0,83
21	1,67	1,36	0,31	81,4	18,6	0,81
22	1,67	1,51	0,16	90,4	9,6	0,90
23	1,67	1,17	0,5	70,1	29,9	0,70
24	1,67	1,67	0	100,0	0	1,00
25	1,7	1,28	0,42	75,3	24,7	0,75
26	1,67	1,54	0,13	92,2	7,8	0,92
27	1,67	1,34	0,33	80,2	19,8	0,80
28	1,68	1,59	0,09	94,6	5,4	0,95
29	1,69	1,68	0,01	99,4	0,6	0,99
30	1,67	1,36	0,31	81,4	18,6	0,81
31	1,61	1,28	0,33	79,5	20,5	0,80
32	1,64	0,83	0,81	50,6	49,4	0,51
33	1,7	1,29	0,41	75,9	24,1	0,76

Tabelle 3.3: absolute und relative Flächenanteile der Querschnittsbilder;
Biopsie 1; Patienten n=29

Zerstörte Fläche & Score aus Längsschnitt B1



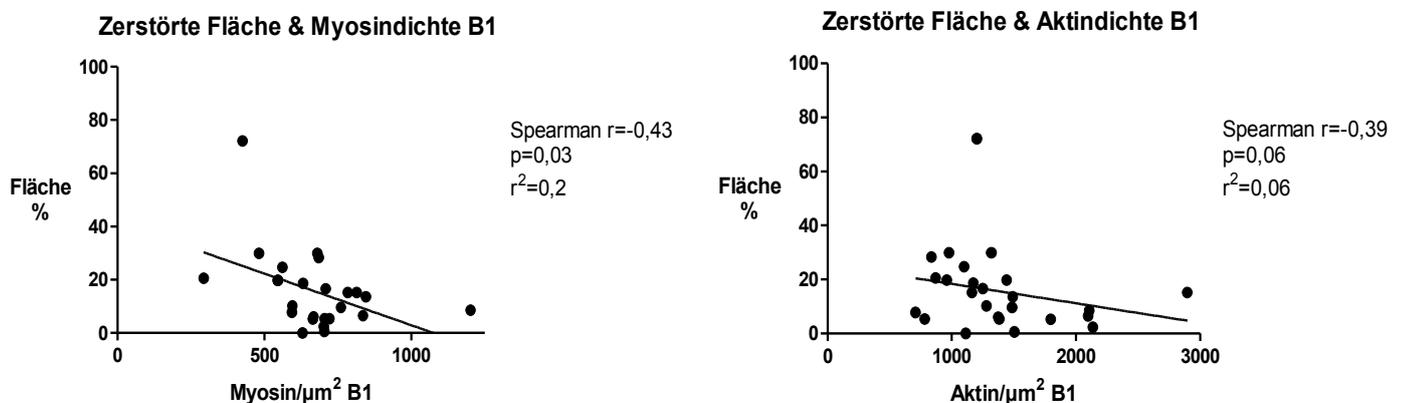
Grafik 3.1: Korrelation von zerstörten Flächenanteilen der Querschnitte mit dem Gesamtscore der Längsschnitte, je höher der Score im Längsschnitt, desto größer der Anteil zerstörter Fläche im Querschnitt; B1=Biopsie 1 (n= 28)

In einer Durchschnittsfläche von $0,7\mu\text{m}^2$ wurden dicke und dünne Filamente mit der Image J-Software für wissenschaftliche Bildanalyse gezählt und auf eine Fläche von $1\mu\text{m}^2$ umgerechnet. Dabei musste die Biopsie eines Patienten aus der Wertung genommen werden, weil eine zuverlässige Zählung bei mangelnder Bildschärfe nicht möglich war. Wie bereits gezeigt, ist die Filamentdichte proportional zur Sarkomerlänge (51,57). Mit den Werten aus der vorliegenden Arbeit konnte das bestätigt werden (siehe Grafik 3.8 in Kapitel 3.2.2). Die Filamentdichte wurde auf eine Standardsarkomerlänge von $2,5\mu\text{m}$ (durchschnittliche Sarkomerlänge aller Biopsien, n=25) umgerechnet. Unter der Hypothese einer intakten Darstellung der Myofilamente innerhalb der A-Bande ergibt sich die Notwendigkeit eines Flächenkorrekturfaktors. Die ermittelte Filamentdichte wurde nochmals mit einem individuellen Flächenfaktor verrechnet, nämlich dem Anteil an tatsächlich gesunder Fläche pro Querschnitt (Tabelle 3.3). Schließlich ergibt sich daraus eine um etwa 50% verminderte Filamentdichte in den untersuchten Muskelbiopsien (n=25) im Vergleich zu den Referenzwerten von Riley et al. (Tabelle 3.4). Durchschnittlich wurden 577 Myosinfilamente pro μm^2 (SD: 193; KI: 497-657) und 1180 Aktinfilamente pro μm^2 (SD: 521; KI: 966-1395) gezählt. Die Mediane betragen $628\text{ Myosin}/\mu\text{m}^2$ bzw. $1115\text{ Aktin}/\mu\text{m}^2$.

	Diese Arbeit* (n=25)	Riley et al. 1998*(51) (n=8)	Riley et al. 2000**(57) (n=4)
Myosinfilament / μm^2	577 (193)	1054 (71)	1071 (9)
Aktinfilament / μm^2	1180 (521)	2643 (393)	2976 (161)

Tabelle 3.4: Myofilamentdichte im Vergleich mit Literaturwerten aus zwei Studien, Werte sind in *Mean (SD) bzw. **Mean (Standard error)

Die Myosinfilamentdichte, nicht jedoch die Aktinfilamentdichte, korreliert signifikant mit dem zerstörten Flächenanteil (siehe Grafik 3.2).



Grafik 3.2: Korrelation von zerstörten Flächenanteilen mit den Myofilamentdichten der Querschnitte; mit abnehmender Myosindichte ist der Anteil zerstörter Fläche signifikant größer; B1=Biopsie 1 (n=25)

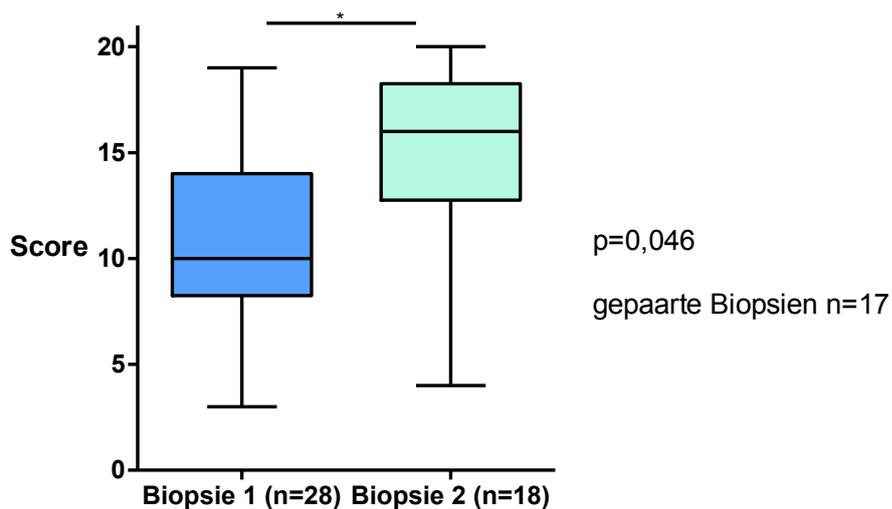
3.2 Verlauf

Von 19 verbleibenden ITS-Patienten wurde an Median Tag 16 eine zweite Muskelbiopsie aus dem Musculus vastus lateralis entnommen und anhand derselben Kriterien wie bereits die Frühbiopsien analysiert. Darunter stammen 17 Biopsien von Patienten, die ebenfalls eine erste Biopsie an Median Tag 5 erhalten hatten. Ein Patient hatte keine frühe Biopsie bekommen. Auch hier konnte eine Muskelbiopsie aufgrund zu vieler Artefakte nicht für eine valide Bewertung berücksichtigt werden.

3.2.1 qualitative Auswertung der Längsschnitte

In der Gesamtbewertung aller Muskellängsschnitte im Elektronenmikroskop ließ sich eine signifikante Verschlechterung im Vergleich zu den ersten Biopsien feststellen (Wilcoxon-Test (WT): $p=0,046$). Berücksichtigt wurden 28 Erstbiopsien und 18 Zweitbiopsien, davon 17 sequentielle Muskelbiopsien. Nach Score ergaben sich durchschnittlich 14,7 von maximal 21 Punkten in den späten Biopsien – 4,1 Punkte mehr als in den Frühbiopsien. In der Bewertung der sequentiellen Biopsien gab es 12 Patienten, die sich verschlechterten und vier Patienten sich verbesserten. Bei einem Patienten hat sich der Score von der ersten zur zweiten Biopsie nicht verändert (siehe Grafik 3.3).

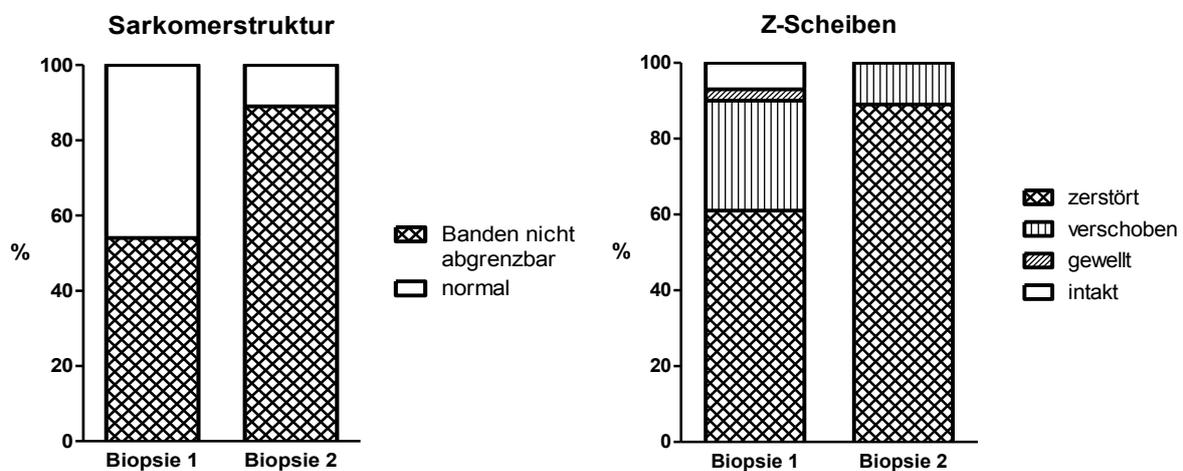
Verlauf Längsschnitte Gesamtpunktzahl



Grafik 3.3: Scoregesamtwerte (max. 21 Punkte) aller Muskelbiopsien über den ITS-Verlauf; 17 sequentielle Biopsien; signifikante Verschlechterung

Im Folgenden wird auf die Ergebnisse der einzelnen Scorekriterien eingegangen.

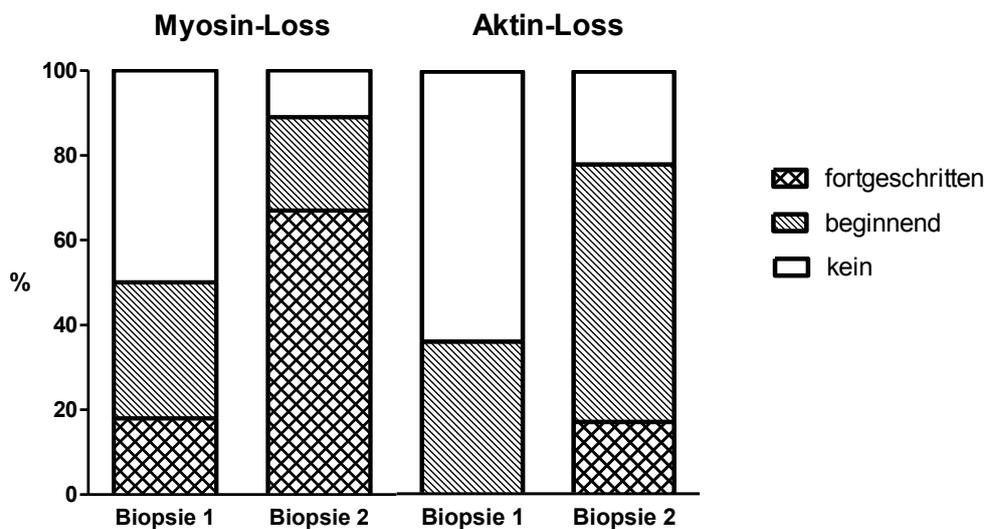
Bei Betrachtung der Sarkomerstruktur konnte man bis auf zwei Ausnahmen in allen Muskelbiopsien Bereiche vorfinden, in denen das Bandenmuster komplett aufgehoben war. Somit stieg der Anteil pathologischer Befunde nochmals um 35%, von 54% auf 89%. Von den Verlaufsbiopsien zeigten sich 11% mit bereits deutlich verschobenen und sogar 89% mit zerstörten Z-Scheiben (siehe Grafik 3.4). Beim statistischen Vergleich von Früh- und Spätbiopsie ergibt sich kein signifikanter Unterschied für die beiden Kriterien (WT: $p=0,3$ für Sarkomerstruktur und $p=0,1$ für Z-Scheiben).



Grafik 3.4: prozentuale Verteilung der Subkriterien für Sarkomerstruktur und Z-Scheiben in beiden Muskelbiopsien (Längsschnitte); Biopsie 1: $n=28$; Biopsie 2: $n=18$

Bezüglich des Abbaus der Myofilamente waren deutlich mehr pathologische Areale in den elektronenmikroskopischen Bildern der Zweibiopsien zu finden. In insgesamt 89% war ein Myosinverlust (ML) zu sehen – in 22% (absolut: 4/18) nur beginnend und in 67% (12/18) bereits fortgeschritten (siehe Grafik 3.5 und Bilder 13–18). Auch der Aktinverlust (AL) hat zugenommen und war in insgesamt 88% der Muskelbiopsien vertreten – in 61% (11/18) beginnend und in 17% (3/18) fortgeschritten. Somit lässt sich eine relative Zunahme von 39% Verlust der dicken Filamente und 52% Verlust der dünnen Filamente im zeitlichen Verlauf feststellen. Die Biopsien aufgetragen im zeitlichen Verlauf zeigen für beide Kriterien eine signifikante Verschlechterung im Score (WT: $p=0,01$ für ML und $p=0,02$ für AL). Jedoch unterscheidet sich das qualitative Ausmaß des Filamentverlusts deutlich zwischen dickem und dünnem: während in den Frühbiopsien bereits ein fortgeschrittener ML zu sehen war, zeigte

sich ein fortgeschrittener AL erst in den Spätbiopsien (siehe Tabelle 3.5). Vergleicht man beide Kriterien analog den Frühbiopsien bezüglich der Häufigkeit von beginnendem und fortgeschrittenem Filamentverlust im Chi-Quadrat-Test, bestätigt sich in der zweiten Biopsie wieder ein signifikanter Unterschied im Ausmaß von ML und AL (CQT: $p=0,003$). Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen sowohl ein zeitlich früherer als auch ein qualitativ stärkerer Abbau von Myosinfilamenten im Vergleich zu Aktinfilamenten nachweisen.



Grafik 3.5: prozentuale Verteilung von ML und AL in Biopsie 1 (n=28) und 2 (n=18), Längsschnitte

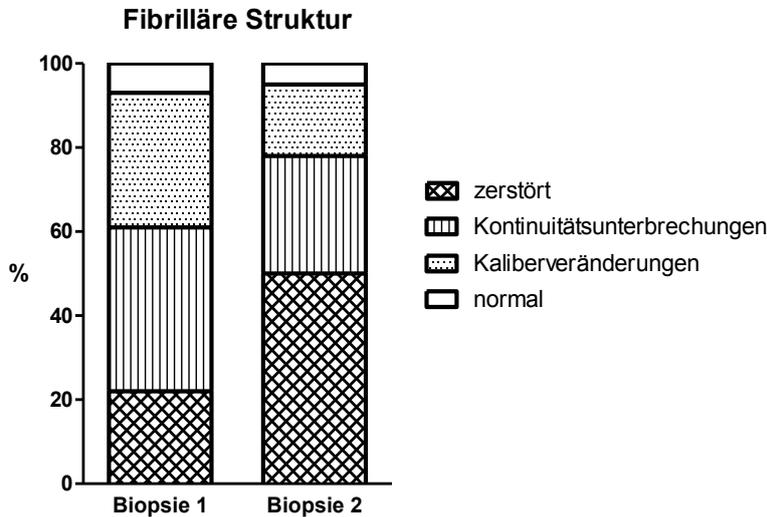
Scorewert	ML B1	AL B1	ML B2	AL B2
0	14	18	2	4
1	9	10	4	11
3	5	0	12	3

Tabelle 3.5: absolute Verteilung der Scorewerte; ML=Myosinverlust; AL=Aktinverlust; B1=Biopsie 1 (n=28); B2=Biopsie 2 (n=18)

Die zweiten Muskelbiopsien erhielten bzgl. des Kriteriums „Myofibrillen“ eine deutlich schlechtere Bewertung als zum früheren Zeitpunkt. Es wurden zunehmend Strukturunterbrechungen und Kaliberveränderungen vorgefunden. Die Faserstruktur zeigte sich in bereits 50% der Biopsien komplett zerstört war, dies entspricht einer Steigerung von

28% gegenüber den Frühbiopsien. Allerdings war der Unterschied zwischen erster und zweiter Biopsie nicht signifikant (WT: $p=0,4$).

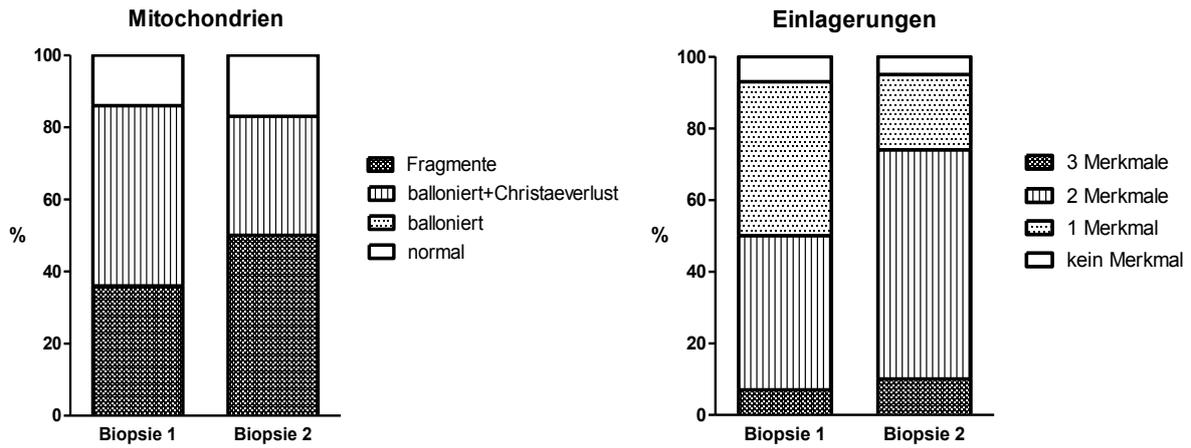
Zur Veranschaulichung der Subkriterien siehe Bilder 15–20 sowie Grafik 3.6.



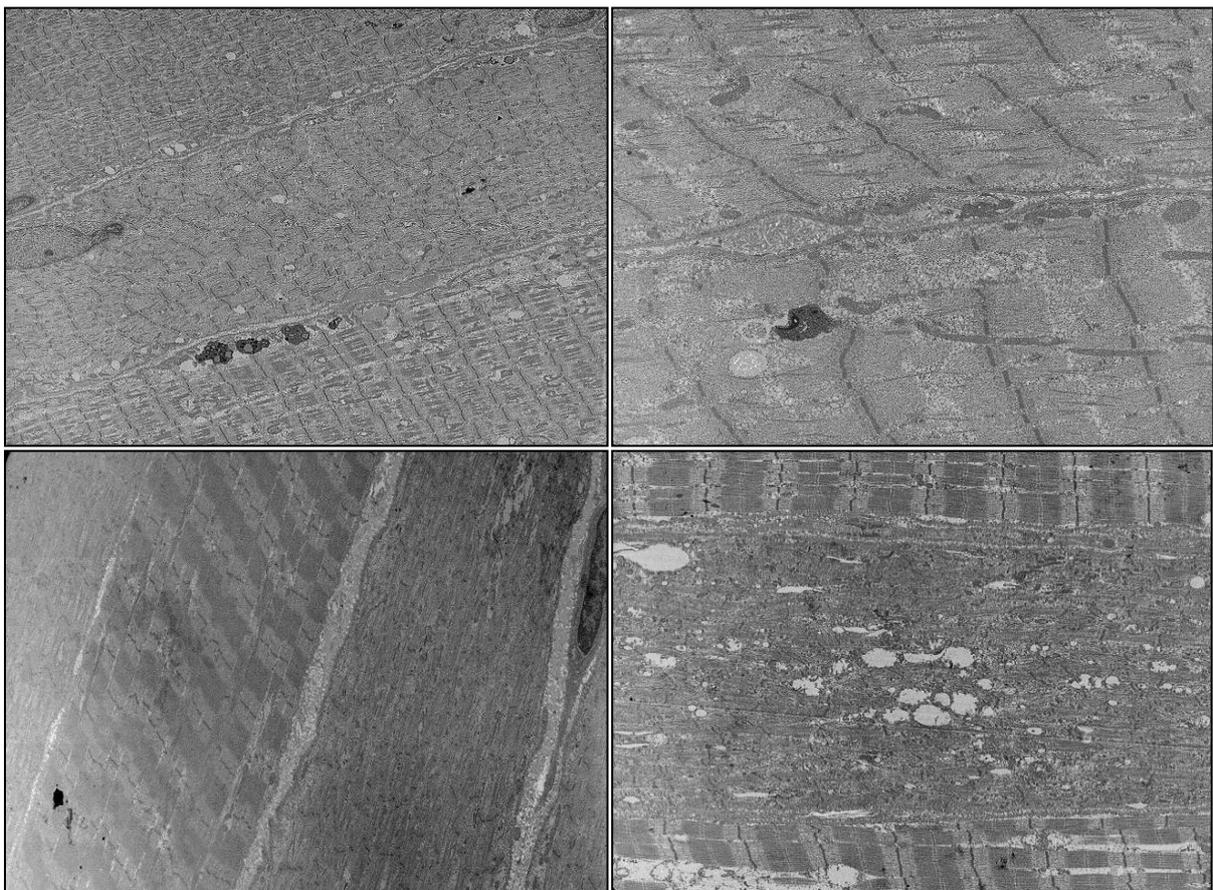
Grafik 3.6: prozentuale Verteilung im Score-Kriterium Myofibrillen und Subkriterien; Biopsie 1: $n=28$; Biopsie 2: $n=18$; Längsschnitte

Die Analyse der Spätbiopsien ergibt sowohl eine tendenzielle Verbesserung als auch Verschlechterung der Morphologie Mitochondrien. Der Anteil an „normalen“ Mitochondrien nahm verglichen mit den ersten Proben um 3% zu. Es waren wie bereits in den Frühbiopsien zahlreiche ballonierte Mitochondrien vorzufinden, relativ gesehen jedoch rückläufig (33% in Biopsie 2 vs. 50% in Biopsie 1). Dafür hatte sich der Anteil an zerstörten Mitochondrien etwas vermehrt (50% in Biopsie 2 vs. 36% in Biopsie 1). Vergleicht man die Scorewerte aller Biopsien miteinander, ergibt sich kein Unterschied (WT: $p=0,6$).

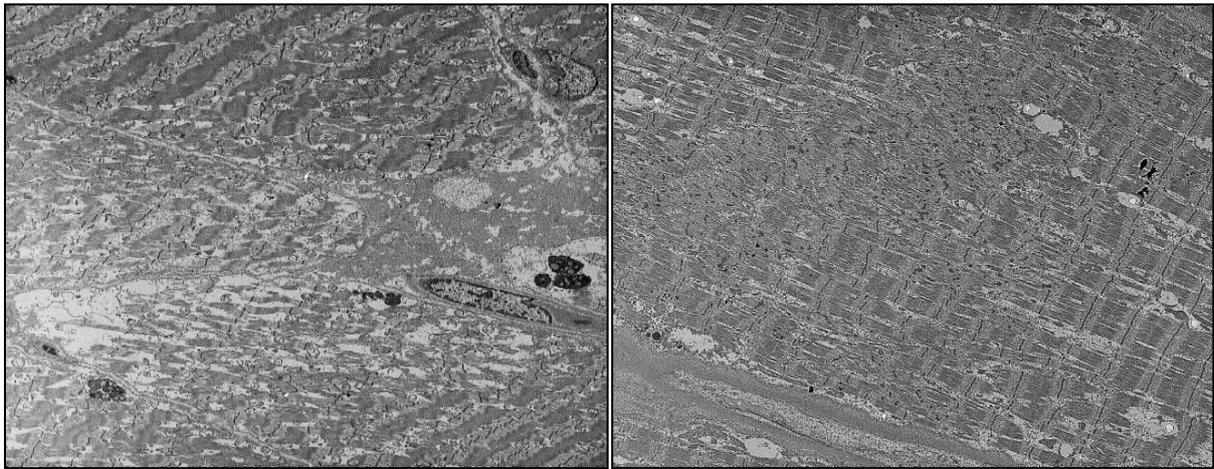
Beim Vergleich von Vakuolen, Glykogen- und Fetteinlagerungen in den Muskelbiopsien gab es ebenfalls keine Unterschiede zwischen frühem und spätem Zeitpunkt der Biopsieentnahme (WT: $p=0,4$) (siehe Grafik 3.7).



Grafik 3.7: prozentuale Verteilung der Scorekriterien für Mitochondrien und Einlagerungen in beiden Muskelbiopsien; Biopsie 1: n=28; Biopsie 2: n=18; Längsschnitte



Bilder 15-18: oben links: ML in unterschiedlichen Stadien; 1670x
 oben rechts: Myosin fast komplett abgebaut; 6000x
 unten links: zerstörte Faser neben gesunder; x1670;
 unten rechts: komplett zerstörte Faser, Z-Scheiben kaum zu sehen; ballionierte Mitochondrien ohne Christae; 3597x;

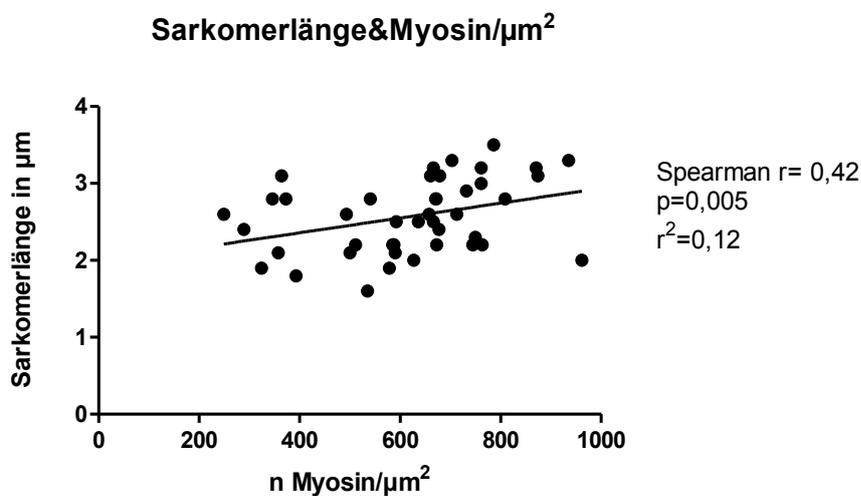


Bilder 19-20: links: beginnender Abbau einer Faser mit zerstörten Sarkomerreihen; Glykogenablagerungen + Lysosomen erkennbar; 1670x;
rechts: ML innerhalb einer Faser; 1670x

3.2.2 quantitative Auswertung der Längs- und Querschnitte

Analog der ersten Muskelbiopsien wurde die Sarkomerlänge in den Längsschnitten der 19 Spätbiopsien bestimmt (siehe Tabelle 3.6). Dabei zeigte sich keine signifikante Veränderung von erster zu zweiter Biopsie (WT: $p=0,9$; $n=26$ vs. 19 , sequentielle Biopsien $n=16$). Die durchschnittliche Sarkomerlänge betrug $2,64\mu\text{m}$ (Biopsie 1 $+0,13\mu\text{m}$) mit einer SD von $0,3\mu\text{m}$ und einem 95%-KI von $2,47\mu\text{m}$ - $2,81\mu\text{m}$. Unter allen gemessenen betrug der kleinste Wert $2,1\mu\text{m}$ und der größte $3,3\mu\text{m}$ mit Median $2,6\mu\text{m}$ (Biopsie 1 $+0,2\mu\text{m}$).

Die Myosindichte und Sarkomerlänge aller Biopsien (früh und spät) korrelieren miteinander (siehe Grafik 3.8). Insgesamt ergab sich für die Sarkomerlänge der Früh- und Spätbiopsien ein Mittelwert von $2,5\mu\text{m}$ (SD: $0,5\mu\text{m}$, KI: $2,4$ - $2,7\mu\text{m}$).

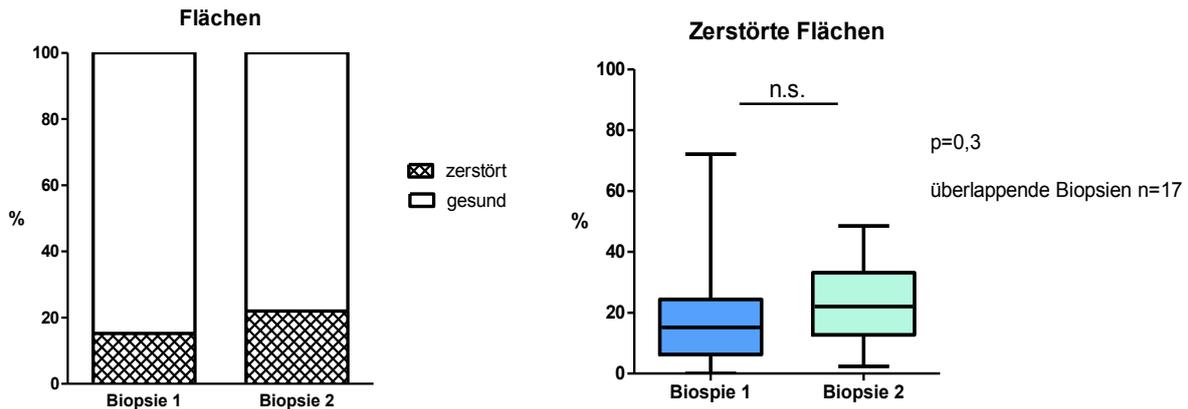


Grafik 3.8: Korrelation von Myosin-Dichte und Sarkomerlänge; $n=43$

Sarkomerlängen [μm]		
Patient	Biopsie 1	Biopsie 2
4	1,9	2,6
5	2,0	3,0
6	0,5*	-
7	2,2	-
8	-	2,6
9	2,6	3,2
10	2,8	-
11	2,0	-
12	2,1	2,1
13	1,8	-
14	2,3	-
15	2,1	-
16	1,6	2,8
17	2,2	2,4
18	2,2	2,2
19	2,4	2,5
20	3,3	2,6
21	2,4	2,8
22	1,9	-
23	3,2	-
24	2,9	-
25	3,5	2,8
26	3,2	2,8
27	3,1	2,2
28	2,8	
29	3,1	3,3
30	2,6	2,5
31	3,1	2,5
32	3,4*	2,1
33	3,1*	3,1

Tabelle 3. : Sarkomerlängen aller Muskelbiopsie (Mittelwert aus 20 Sarkomeren/ Biopsie);
 * nicht in die Wertung genommen aufgrund von Artefakten;
 - keine Biopsie erfolgt

Die Flächenbestimmung der Querschnittsbilder ergab eine leichte Zunahme der zerstörten Anteile, jedoch war diese nicht signifikant (WT: $p=0,3$; $n=29$ vs.18, sequentielle Biopsien $n=17$). Aus einer mittleren Fläche von $1,7\mu\text{m}^2$ ließen sich $1,3\mu\text{m}^2$ (78%) gesunde und $0,4\mu\text{m}^2$ (22%) zerstörte Flächen differenzieren. In der ersten Muskelbiopsie fanden sich zu 15,2% (Median) zerstörte Areale. Demnach betrug die relative Zunahme 6,8% (siehe Grafik 3.9).



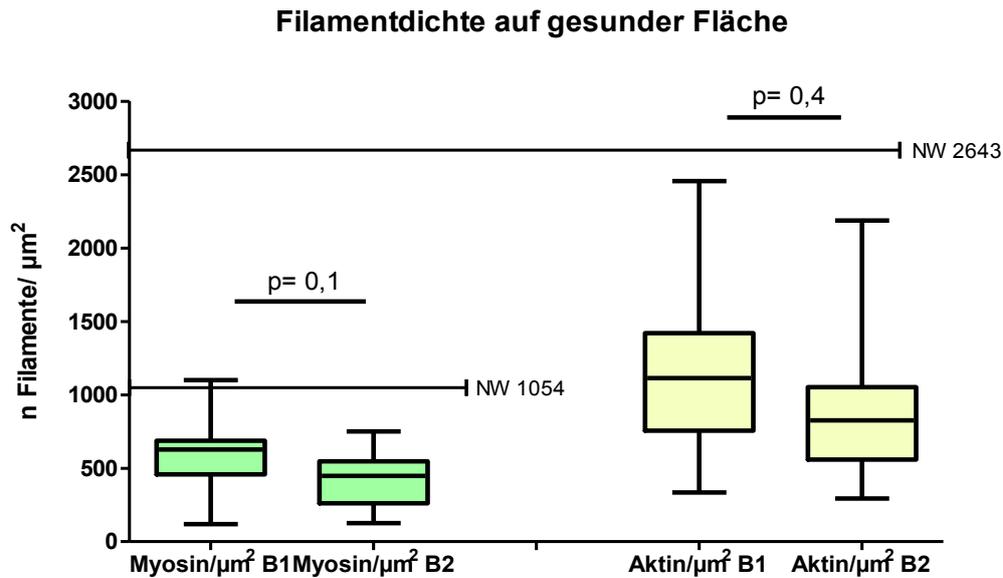
Grafik 3.9: links: gesunde und zerstörte Flächenanteile im Vergleich (Mediane);
rechts: Vergleich der relativen Verteilung zerstörter Flächenanteile;
Biopsie 1 (n=29); Biopsie 2 (n=18)

Die ausgezählten Filamente pro μm^2 wurden auf eine durchschnittliche Sarkomerlänge von $2,5\mu\text{m}$ umgerechnet, anschließend um ihren individuellen Flächenfaktor korrigiert. Betrachtet man alle untersuchten Muskelbiopsien (25 Früh- und 18 Spätbiopsien) zeigt sich keine signifikante Veränderung im zeitlichen Verlauf (WT: $p=0,1$ für Myosin bzw. $p=0,4$ für Aktin, sequentielle Biopsien $n=14$). Das Verhältnis von Myosin zu Aktin (Myosin/Aktin-Ratio) bleibt ebenfalls gleich (WT: $p=0,8$). Tabelle 3.7 sowie Grafik 3.10 illustrieren dies.

Es ließ sich keine Korrelation zwischen der Myofilamentdichte der Zweitbiopsien und dem Anteil zerstörter Flächen im Querschnitt finden. Auch die Scorewerte aus den Längsschnittbildern zeigten keinen Zusammenhang mit dem Ausmaß des Filamentabbaus.

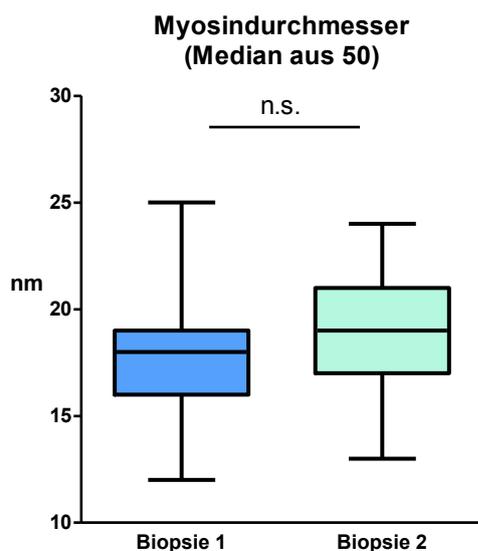
	Myosin/μm^2 B1	Myosin/μm^2 B2	Aktin/μm^2 B1	Aktin/μm^2 B2	Myosin/Aktin B1	Myosin/Aktin B2
Mittelwert	577	416	1180	868	0,52	0,52
SD	193	172	521	446	0,16	0,19
95%-KI	497-657	331-502	966-1395	646-1090	0,46-0,59	0,43-0,62
Median	628	447	1115	827	0,51	0,51

Tabelle 3.7: Myofilamentdichte pro μm^2 - Vergleich B1 (=Biopsie 1; $n=25$) und B2 (=Biopsie 2; $n=18$); Werte gerundet



Grafik 3.10: Myofilamente pro μm^2 (Querschnitte) - Vergleich B1 (=Biopsie 1; n=25) und B2 (=Biopsie 2; n=18): nicht signifikant verändert; Normalwert (NW) aus Riley et al 1998 (51); sequentielle Biopsien n=14

In den Querschnitten von Früh- und Spätbiopsie wurde der Durchmesser von jeweils 50 Myosinfilamenten pro Bild gemessen. Hierbei war ein Myosinfilament im Median 18nm in Biopsie 1 - SD 2,8nm, 95%-KI 16,7-19nm - und 19nm in Biopsie 2 dick - SD 2,6nm, 95%-KI 17,5-20nm. Grafik 3.11 stellt die nicht signifikante Veränderung zwischen Früh- und Spätbiopsie dar (WT: p=0,6, n=28 vs.18, sequentielle Biopsien n=16).



Grafik 3.11: Myosindurchmesser in nm; Median aller Biopsien (Querschnitte); Biopsie 1 (n=25) vs. Biopsie 2 (n=18); sequentielle Biopsien n=16

3.3 Gruppenvergleich

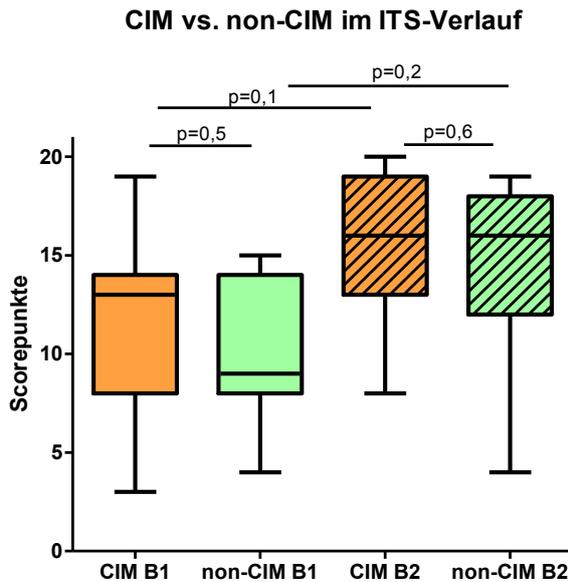
Die untersuchten ITS-Patienten wurden durch EMG-Untersuchung (dmCMAP) in zwei Gruppen unterteilt. Wie zuvor beschrieben fanden elektrophysiologische Untersuchungen mehrmals während der Studienphase statt. Wenn nach direkter Muskelstimulation ein Summenaktionspotential von $\geq 3.0\text{mV}$ ableitbar war, wurde dieser Patient als non-CIM klassifiziert, wenn ein Summenaktionspotential mit $< 3.0\text{mV}$ ableitbar war, als CIM-Patient. Insgesamt ergaben sich daraus 16 CIM-Patienten und 11 non-CIM-Patienten. Bei drei Patienten konnte keine Zugehörigkeit mittels der Elektrophysiologie bestimmt werden. Siehe Tabelle 3.8 zur Verteilung der Gruppen an beiden Zeitpunkten der Muskelbiopsien.

	Biopsie 1 (Tag 5)	Biopsie 2 (Tag15)
CIM	15*	12~
Non-CIM	11	7
Keine Zuordnung	3	-

Tabelle 3.8: Übersicht Verteilung CIM und non-CIM in den untersuchten Proben;
* ein Patient hatte keine Erstbiopsie;
~ eine Biopsie wurde aufgrund von Artefakten aus der Wertung genommen

3.3.1 qualitative Auswertung der Längsschnitte

Im Gesamtscore der qualitativen Auswertung der Muskelbiopsien konnte weder in den Früh- noch in den Spätbiopsien ein Unterschied zwischen der CIM- und der non-CIM-Gruppe festgestellt werden - Mann-Whitney-U-Test (MWT): $p=0,5$ bzw. $p=0,6$ (siehe Grafik 3.12). Bei 21 erreichbaren Punkten hatte die CIM-Gruppe in den Frühbiopsien im Durchschnitt 11,3 Punkte, die non-CIM-Gruppe 9,7 gegenüber 15,6 (CIM) und 14,3 (non-CIM) Punkten in den Spätbiopsien. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich auch nicht im sequentiellen Vergleich innerhalb der Gruppen – 10 CIM-Patienten (WT: $p=0,1$) und 7 non-CIM-Patienten (WT: $p=0,2$).



Grafik 3.12: Gesamtscore im Gruppenvergleich über ITS-Verlauf;
 B1=Frühbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=15:11;
 B2=Spätbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=11:7;
 sequentielle Biopsien n=10 (CIM) und n=7 (non-CIM)

Zu den Einzelkriterien des Scores:

Die Bandenstruktur der Sarkomere war in der CIM-Gruppe geringfügig, jedoch nicht signifikant öfter als nicht mehr abgrenzbar bewertet worden: 60% vs. 46% in Biopsie 1 und 91% vs. 86% in Biopsie 2 (CIM vs. non-CIM).

Ähnlich verhielt es sich bei der Pathologie der Z-Scheiben. In beiden Gruppen waren in je einem Drittel der Erstbiopsien die Z-Scheiben verschoben und in ca. der Hälfte der non-CIM-Gruppe bzw. zu zwei Dritteln bei der CIM-Gruppe zerstört. In allen Zweitbiopsien der CIM-Gruppe waren zerstörte Z-Scheiben zu finden und in 71% der non-CIM-Gruppe.

Deutlicher hingegen war die Differenz zwischen den Patientengruppen in der Bewertung des Myofilamentabbaus. In den Frühbiopsien gab es einen signifikanten Unterschied im Ausmaß von ML. Ungefähr die Hälfte jeder Gruppe zeigte ML, allerdings waren 33% der CIM-Patienten mit fortgeschrittenem ML betroffen, während in der non-CIM-Gruppe nur beginnender ML zu finden war (CQT: p=0,02). In den Spätbiopsien gab es statistisch keinen Unterschied mehr in diesem Kriterium zwischen den Gruppen (CQT: p=0,55). Betrachtet man lediglich den Fakt, ob ML auftrat oder nicht, waren beide Gruppen gleich stark betroffen – 55% bzw. 46% früh und 91% bzw. 86% spät (CIM bzw. non-CIM).

Die Aktinfilamente waren zum Zeitpunkt der frühen Biopsie erst in beginnendem Stadium des Abbaus in beiden Gruppen zu sehen – in der Hälfte der CIM-Biopsien und in einem Drittel

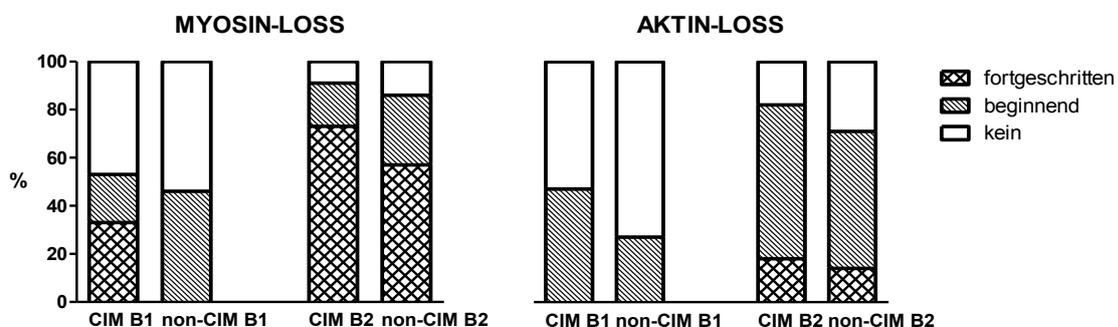
der non-CIM-Biopsien. Im Verlauf ließen sich in 18% bei CIM und in 14% bei non-CIM Patienten ein fortgeschrittener Aktinverlust (AL) finden. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Im zeitlichen Verlauf verändern sich die Score-Werte innerhalb der Gruppen jeweils signifikant für ML (MWT: $p=0,03$ bei CIM und $p=0,02$ bei non-CIM). Innerhalb der CIM-Gruppe verschlechtern sich auch die Scorewerte für AL (MWT: $p=0,04$), die non-CIM-Gruppe bleibt unbeeinflusst.

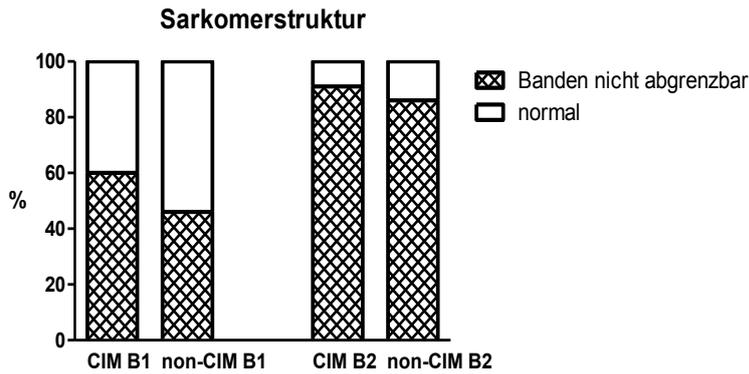
Das Kriterium der Myofibrillenstruktur in den Muskelbiopsien zeigte zum frühen Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (MWT: $p=0,04$). In ca. der Hälfte der CIM-Biopsien ließen sich Kontinuitätsunterbrechungen der Sarkomerreihen finden und in einem Drittel sogar zerstörte Fibrillenanteile. Hingegen war in den Muskelbiopsien der non-CIM-Gruppe das dominierende Merkmal die Kaliberabnahme und Auflockerung der Fibrillenstruktur (in 55%). In den späteren Biopsien gab es statistisch keinen Unterschied mehr in der Score-Bewertung (MWT: $p=0,2$).

Die Auswertung der Mitochondrienmorphologie ergab in der vergleichenden Analyse ebenfalls einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen zum Zeitpunkt der Erstbiopsie. Hier wiesen allerdings die Muskelbiopsien der non-CIM-Gruppe signifikant mehr pathologische Mitochondrien auf, als die der CIM-Gruppe (MWT: $p=0,03$). In der CIM-Gruppe verschlechterten sich im Verlauf die Scorewerte, während sie sich in der non-CIM-Gruppe verbesserten. Die Spätbiopsien zeigen damit keinen Unterschied (MWT: $p=0,32$).

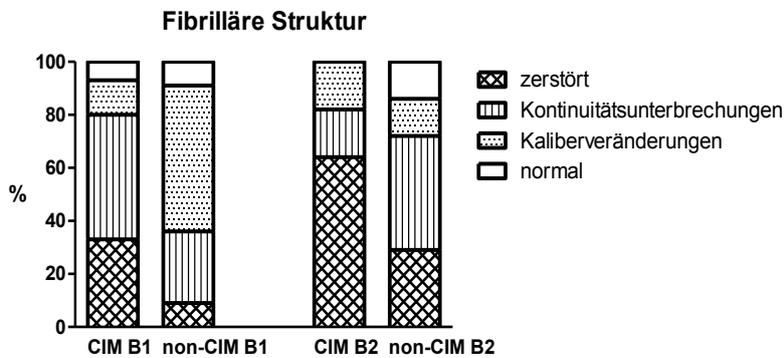
Die zusätzlichen Einlagerungen wie Glykogen, Fett oder Vakuolen waren nicht signifikant vermehrt in einer Gruppe gefunden worden: in der ersten Biopsie MWT: $p=0,1$ und in der zweiten MWT: $p=0,09$. Siehe Grafiken 3.13 bis 3.18 zur Darstellung der Häufigkeit der Scoreäquivalente.



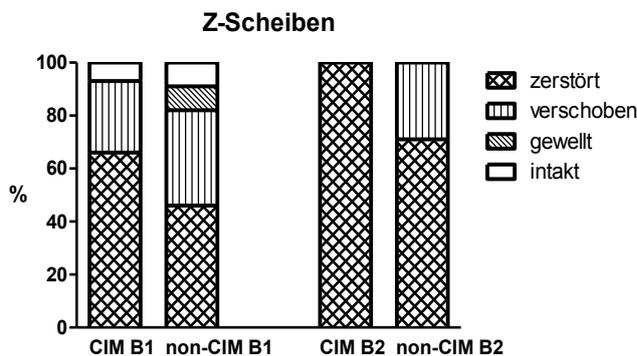
Grafik 3.13: Kriterium und Subkriterien Myofilamente: Myosin- und Aktinabbau verglichen zwischen CIM und non-CIM; B1=Frühbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=15:11; B2=Spätbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=11:7



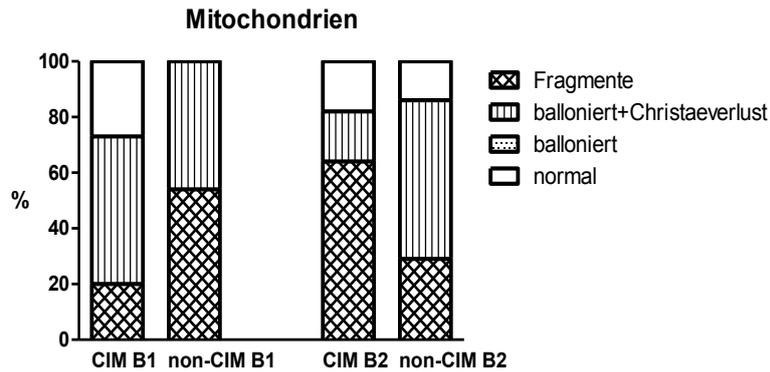
Grafik 3.14: Scorekriterium Sarkomerstruktur verglichen zwischen CIM und non-CIM;
 B1=Frühbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=15:11;
 B2=Spätbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=11:7



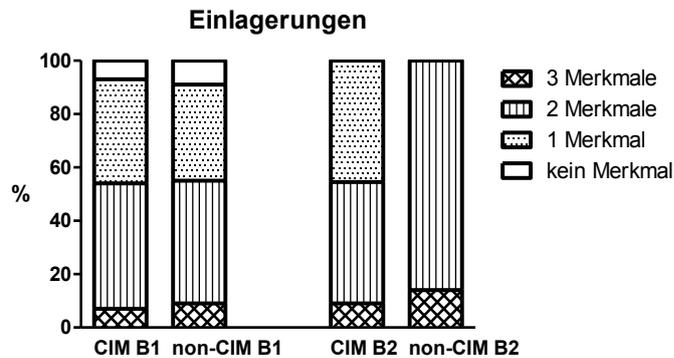
Grafik 3.15: Kriterium und Subkriterien: fibrilläre Struktur verglichen zwischen CIM und non-CIM;
 B1=Frühbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=15:11;
 B2=Spätbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=11:7



Grafik 3.16: Kriterium und Subkriterien Z-Scheiben verglichen zwischen CIM und non-CIM;
 B1=Frühbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=15:11;
 B2=Spätbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=11:7



Grafik 3.17: Kriterium und Subkriterien Mitochondrien verglichen zwischen CIM und non-CIM;
 B1=Frühbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=15:11;
 B2=Spätbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=11:7



Grafik 3.18: Kriterium Einlagerungen verglichen zwischen CIM und non-CIM;
 B1=Frühbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=15:11;
 B2=Spätbiopsie n[CIM]: n[non-CIM]=11:7

3.3.2 quantitative Auswertung der Längs- und Querschnitte

Die Sarkomerlängen in den Muskelbiopsien unterschieden sich nicht zwischen der CIM- und der non-CIM-Gruppe. Die gemessene Länge war im Mittel nur etwas größer in den Biopsien aus der CIM-Gruppe: 2,6µm (CIM, n=14) vs. 2,3µm (non-CIM, n=10) früh (MWT: p=0,6) und 2,7µm (CIM, n=12) vs. 2,5µm (non-CIM, n=7) spät (MWT: p=0,4).

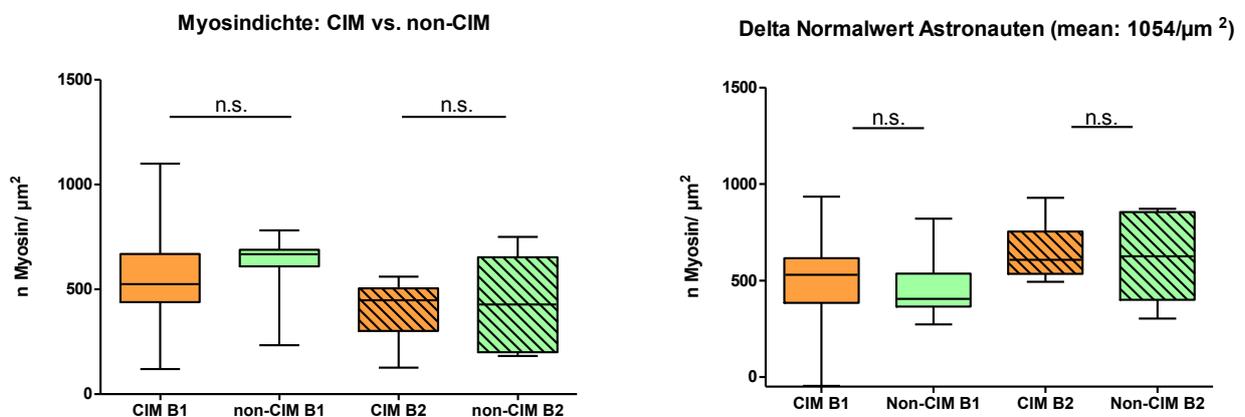
Bezüglich der Myofilamentdichten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede: die Myosindichte ist sowohl in den Früh- als auch in Spätbiopsien der CIM und non-CIM-Gruppe gleich (MWT: p=0,1 früh bzw. p=0,8 spät). Dasselbe gilt für die Aktindichte (MWT: p=0,5 früh und spät).

Innerhalb der Gruppen zeigte sich keine signifikante Abnahme für Myosin- oder Aktindichte im zeitlichen Verlauf (MWT: $p=0,06$ Myosin/CIM; $p=0,1$ Myosin/non-CIM; $p=0,16$ Aktin/CIM; $p=0,33$ Aktin/non-CIM).

Berechnet man die Differenz von der Myosindichte der CIM- bzw. non-CIM-Patienten und dem Normalwert aus der Literatur (Mittelwert der 8 Astronauten von Riley et al.) und vergleicht diese Werte, so ergibt sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 3.9 und Grafik 3.19).

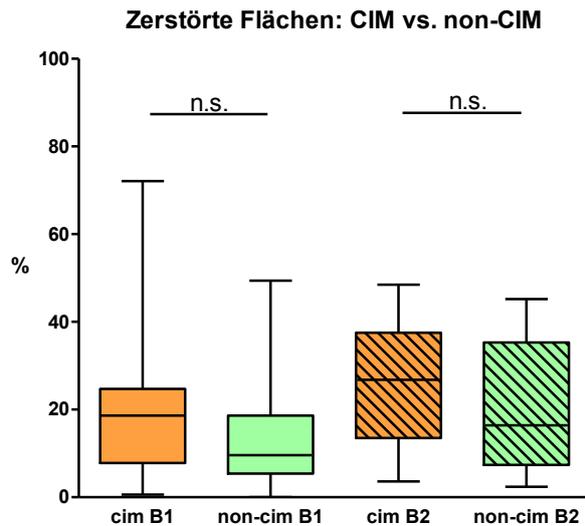
	Myosin/ μm^2 Biopsie 1		Myosin/ μm^2 Biopsie 2		Aktin/ μm^2 Biopsie		Aktin/ μm^2 Biopsie 2	
Gruppe	CIM	Non-CIM	CIM	Non-CIM	CIM	Non-CIM	CIM	Non-CIM
Anzahl	14	10	12	6	14	10	12	6
Mittelwert	554	622	407	436	1145	1251	841	920
SD	215	155	130	251	586	490	482	403
95%-KI	430-678	502-741	324-489	172-699	806-1484	875-1628	535-1147	497-1343
Median	524	667	447	427	1053	1115	805	925

Tabelle 3.9: Filamentdichte pro μm^2 / Vergleich CIM und non-CIM in 1. und 2. Biopsie; Werte sind gerundet



Grafik 3.19: Myosinfilamente pro μm^2 ;
links: Vergleich CIM und non-CIM in 1. ($n=14:10$) und 2. Biopsie ($n=12:6$);
rechts: Differenzwerte zu Normalwert der Astronauten

In der Planimetrie wurde für die CIM-Gruppe ein mittlerer Anteil zerstörter Fläche von 19% in den ersten und von 27% in den zweiten Biopsien bestimmt. Der Median der zerstörten Fläche ist damit etwas größer als in der gemessenen Fläche der non-CIM-Gruppe (10% in Biopsie 1 und 16% in Biopsie 2). Diese tendenzielle Differenz ist jedoch im Gruppenvergleich nicht signifikant (MWT: $p=0,24$ Biopsie 1 und $p=0,43$ Biopsie 2, siehe Grafik 3.20).



Grafik 3.20: Anteil zerstörter Fläche in beiden Biopsien im Gruppenvergleich; n[CIM]:n[non-CIM]=15:11 (B1) bzw. 12:6 (B2)

3.4 Verknüpfung mit den klinischen Parametern

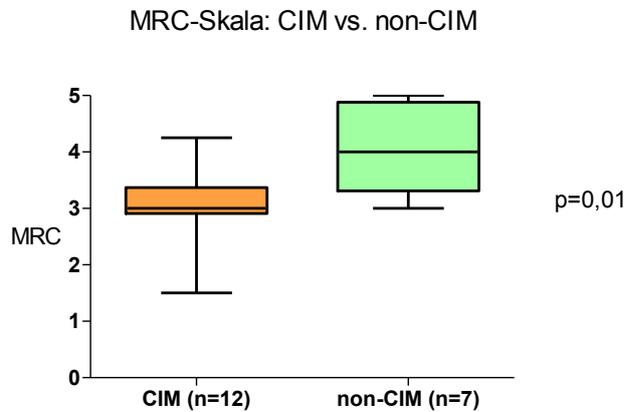
Um die Frage nach möglichen Zusammenhängen der ultrastrukturellen Veränderungen im Skelettmuskel auf die Dauer der kritischen Erkrankung beantworten zu können, wurden die Ergebnisse aus beiden Muskelbiopsien klinisch ermittelten Daten sowie Verlaufsparemtern gegenüber gestellt:

Bei adäquater Wachheit, d.h. wenn Reaktion auf Ansprache, Ausführen von Anweisungen sowie spontane Bewegung der Extremitäten vorhanden waren, wurde eine klinische Kraftgradmessung mit Einteilung nach MRC-Skala wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt – Median Tag 13 (95%-KI Tag 11-20). Hiervon waren 14 Patienten mit der klinischen Präsentation einer ICUAW (MRC<4 Punkte) und 6 Patienten ohne ICUAW (MRC≥4Punkte). Bei 10 Patienten konnte kein Kraftgrad bestimmt werden (nicht adäquat wach oder verstorben). Die MRC-Werte der beiden Patientengruppen unterschieden sich signifikant voneinander (MWT: p=0,01), mit insgesamt weniger Kraft bei den CIM-Patienten (siehe Grafik 3.21).

Außerdem konnte eine signifikante Korrelation der Höhe der MRC-Skala mit der Myosinfilamentdichte aus den ersten Muskelbiopsien gezeigt werden. Dies ließ sich nicht für die Aktindichte nachvollziehen und auch nicht für die Werte aus den späten Biopsien (siehe Grafik 3.22).

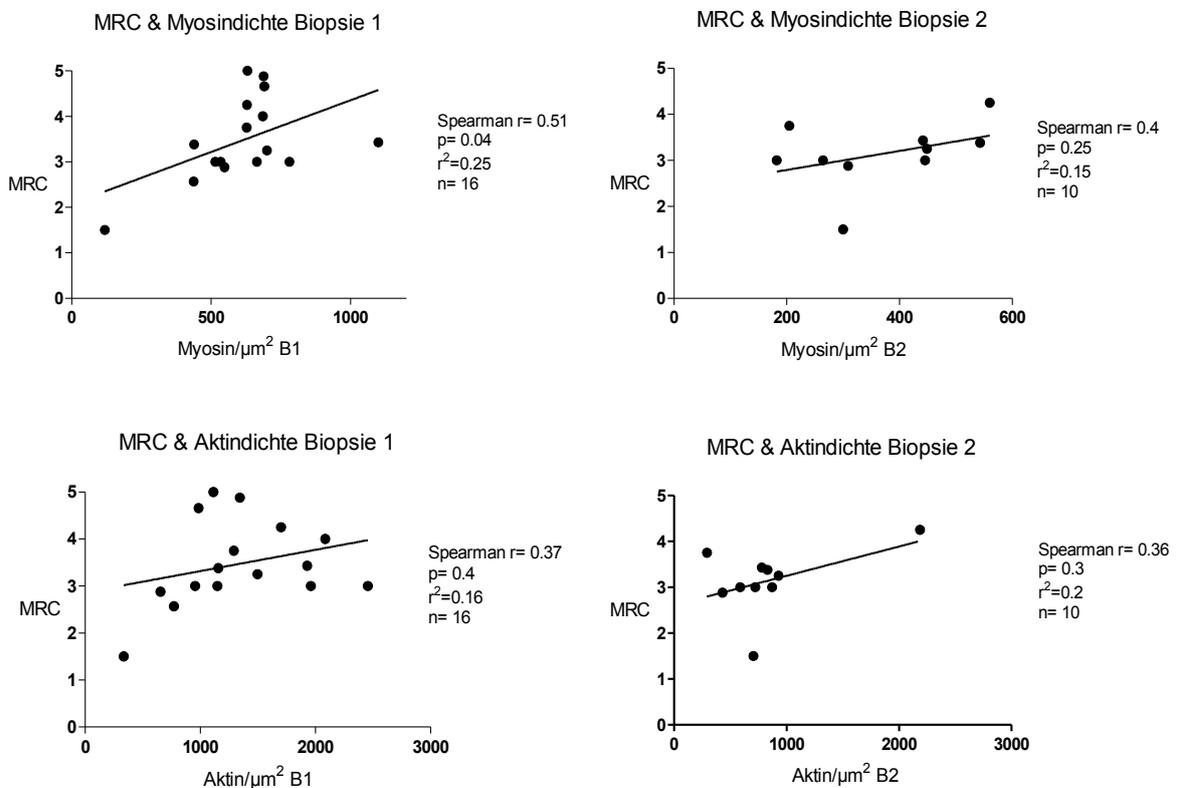
Ebenso zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen den zerstörten Flächenanteilen im Biopsiequerschnitt und dem MRC-Kraftgrad, wobei die Werte aus den ersten Biopsien nahe dem Signifikanzniveau liegen (siehe Grafik 3.23).

Es ließ sich darüber hinaus keine Korrelation zwischen dem Score aus den Längsschnitten und den MRC-Werten finden.

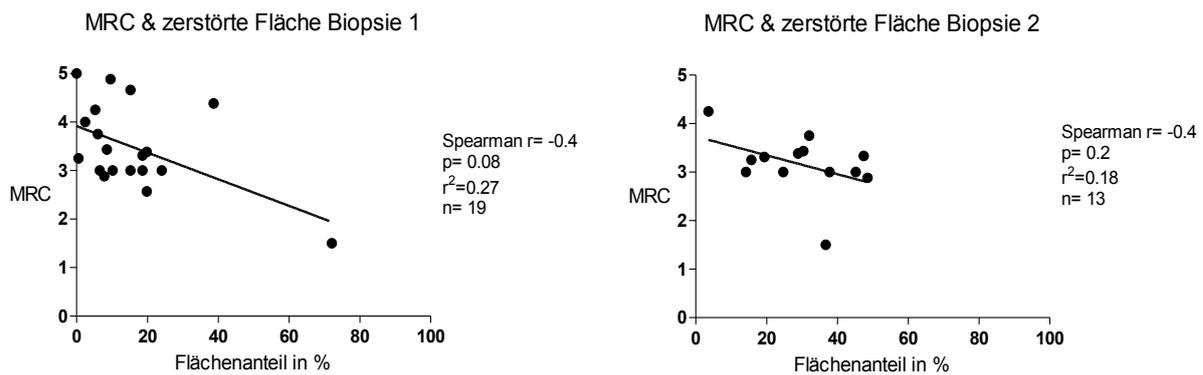


Grafik 3.21: MRC-Score-Werte von CIM- und non-CIM- Patienten

Eine vergleichende Analyse von Patientenalter und individueller Myofilamentdichte zeigt keinen Zusammenhang. Auch der Score und demnach die Schwere der morphologischen Veränderungen am Muskel waren altersunabhängig.



Grafik 3.22: MRC-Kraftgrad und Myofilamentdichte; signifikante Korrelation zwischen Myosindichte aus der 1. Biopsie und den später ermittelten Kraftgraden (o.l.)

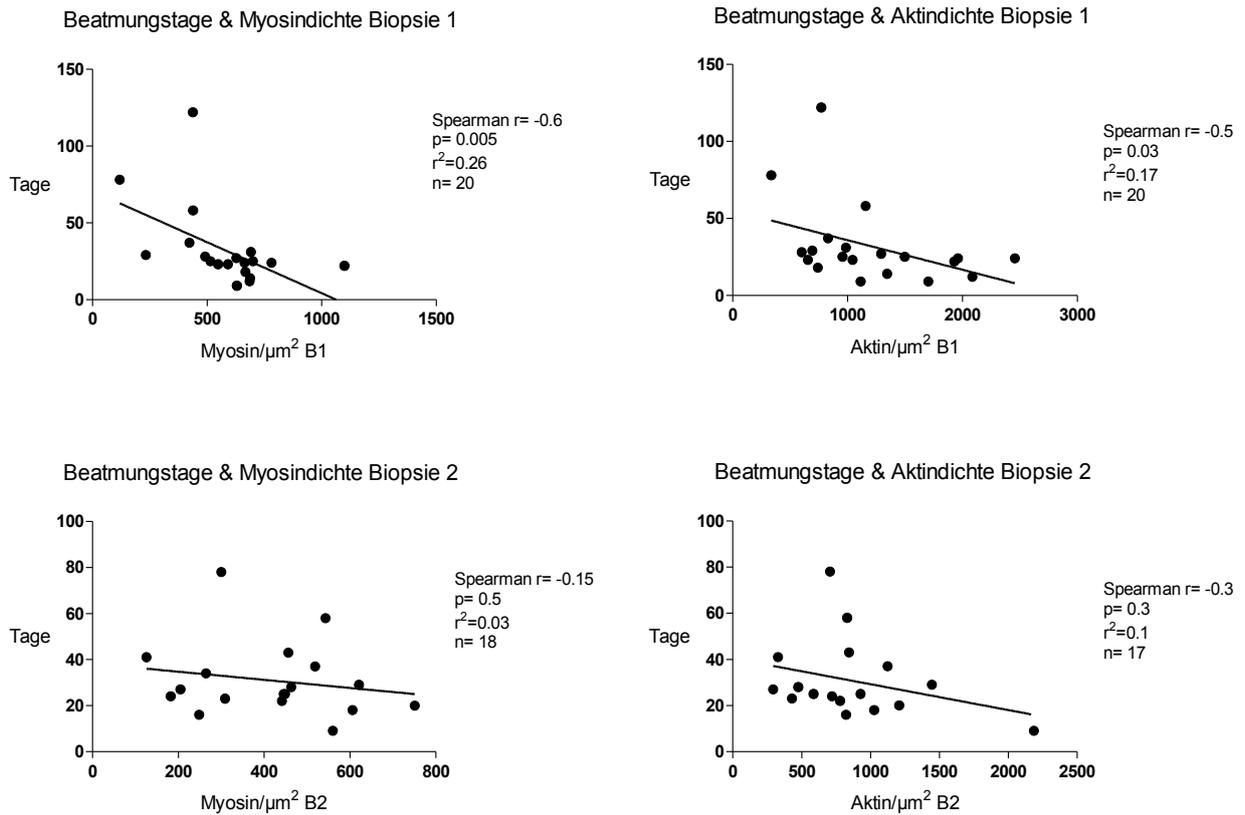


Grafik 3.23: MRC-Kraftgrad und relativer Anteil zerstörter Fläche im Querschnitt aus beiden Muskelbiopsien, beide nicht signifikant

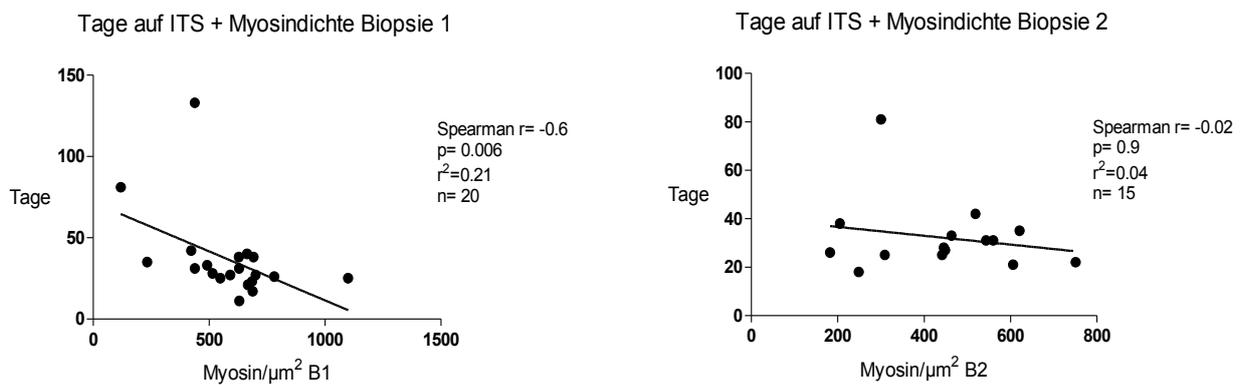
Es konnte weiterhin ein Zusammenhang zwischen der Myosindichte aus den Frühbiopsien und der Summe der Beatmungstage sowie der ITS-Verweildauer der Patienten gefunden werden – hierbei wurden allerdings nur die Überlebenden betrachtet. Je geringer die Dichte der dicken Filamente in den ersten Muskelbiopsien war, desto länger wurden die Patienten beatmet und lagen dementsprechend länger auf der ITS. Auch die Dichte der dünnen Filamente korreliert in der gleichen Weise mit den Beatmungstagen, nicht aber mit der Liegedauer auf der ITS (siehe Grafik 3.24 und 3.25). Diese Korrelationen bestätigten sich nicht für die Myofilamentdichte aus den späteren Muskelbiopsien (Median Tag 16). Es gab außerdem keinen Zusammenhang zwischen Beatmungstagen oder ITS-Verweildauer und dem Score der Biopsielängsschnitte.

Der MRC-Kraftgrad korreliert signifikant mit der Höhe der Beatmungstage ($p=0,01$) und der ITS-Verweildauer ($p=0,02$).

Von den 23 Überlebenden waren 11 Patienten mittels EMG (dmCMAP) in CIM und 11 non-CIM klassifiziert worden. Die Liegedauer der CIM-Patienten war signifikant länger als die der non-CIM-Patienten (MWT: $p=0,02$).



Grafik 3.24: Beatmungstage und Myofilamentdichte: signifikante Korrelation in den Frühbiopsien sowohl für Myosin-als auch für Aktindichte (o.l.+o.r.)



Grafik 3.25: Liegedauer und Myosindichte; signifikante Korrelation für 1.Biopsie

4. Diskussion

4.1 Einführung

Die ICUAW stellt eine prognostisch bedeutsame Komorbidität im Verlauf einer kritischen Erkrankung dar. Seitdem dieses Phänomen einer im intensivmedizinischen Kontext erworbenen Muskelschwäche vor bereits drei Jahrzehnten erstmalig beschrieben wurde, hat das Bewusstsein für neuro-muskuläre Komplikationen auf der Intensivstation stetig zugenommen. Mittlerweile kennt man entscheidende Risikofaktoren und weiß zudem, dass eine erworbene Muskelschwäche bereits frühzeitig entsteht. Genauere Untersuchungen bezüglich der Frühphase der kritischen Erkrankung sowie morphologische Beschreibungen des Skelettmuskels existieren bisher nicht. Hier soll diese Arbeit einen Ansatz bieten.

Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeit sind folgende: Ein ultrastruktureller Skelettmuskelumbau und -abbau findet mit Beginn einer kritischen Erkrankung statt. Bei über der Hälfte der Studienpatienten war eine Aufhebung der regelmäßigen Sarkomerstruktur mit Z-Scheiben-Deviation in den Erstbiopsien zu sehen (Median Tag 5). Ein Abbau der Myofilamente, insbesondere ein fortschreitender Myosinfilamentverlust, war ebenfalls frühzeitig, also in den ersten fünf Tagen zu beobachten. Die Myofibrillenstruktur präsentierte sich bei fast allen Patienten pathologisch in den Frühbiopsien, charakterisiert durch eine aufgelockerte Struktur mit Verschmälerung, Abbrüchen und sogar z.T. kompletter Zerstörung. Der morphologische Gesamtzustand des Skelettmuskels, abgebildet durch die einzelnen Kriterien des zugrundeliegenden Scores, verschlechtert sich im Verlauf der kritischen Erkrankung signifikant (Median Tag 5 bis Tag 16).

Die Myosindichte und auch die Aktindichte unserer Hochrisikopatienten waren in der Frühphase signifikant geringer im Vergleich zu Normalwerten bei gesunden Probanden.

Im Verlauf der kritischen Erkrankung nahmen diese Dichten nicht mehr signifikant ab.

Eine niedrige Myosinfilamentdichte in den früh entnommenen Biopsien korrelierte mit der Ausprägung einer Muskelschwäche im späteren Krankheitsverlauf.

Die absolute Mehrheit unserer Hochrisikopatienten entwickelte eine ICUAW. Diese Patienten benötigten eine prolongierte Beatmungszeit und mussten länger auf der Intensivstation versorgt werden.

Es gab kaum Unterschiede in den pathologischen Veränderungen der Skelettmuskulatur bei Patienten mit elektrophysiologischem Nachweis für CIM und ohne CIM gibt, jedoch zeigte die Bewertung der Myofibrillen in den Längsschnittbildern einen signifikanten Unterschied

zum frühen Zeitpunkt der kritischen Erkrankung. Einen qualitativen Myosinverlust in den Längsschnittbildern zeigen alle Patienten, auch die Myosindichte ist quantitativ gleich. Semiquantitativ betrachtet zeigt sich in der frühen Phase der kritischen Erkrankung jedoch ein signifikant ausgeprägter Abbau von dicken Myosinfilamenten bei den CIM-Patienten.

Des Weiteren bestätigt sich eine Korrelation zwischen der Myosinfilamentdichte während der Frühphase der kritischen Erkrankung und der Beatmungs- und ITS-Verweildauer.

4.2 Einordnung in die bisher vorhandene Literatur

Bis zu dieser Arbeit war nicht bekannt, dass ein Myosinfilamentverlust im Rahmen von ICUAW und/oder CIM schon derart früh im Skelettmuskel beginnt. Allerdings schreitet der Myosinfilamentverlust im Krankheitsverlauf kaum weiter fort, sondern hat bereits wenige Tage nach Beginn der kritischen Erkrankung seinen Höhepunkt erreicht. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit mit Ergebnissen aus unserer Studiengruppe zeigt analog dazu einen signifikant reduzierten Myosingehalt im Muskel in der Frühphase, ohne weitere Reduktion im Verlauf. Analog dazu zeigt sich eine signifikant gesteigerte Synthese von den Atrophiegenen MuRF-1 und Atrogin-1, als Marker für eine über das Ubiquitin-Proteasom System stimulierte Proteindegradation in der Frühphase und eine Normalisierung dieser Marker in der Spätphase der kritischen Erkrankung. Die Synthese von „Myosin Heavy Chain“ (MyHC) im Western Blot war an ITS-Tag 5 stark reduziert und blieb im Verlauf an ITS-Tag 15 gleichbleibend reduziert (58).

Wenige Arbeiten weisen einen Myosinverlust elektronenmikroskopisch nach, der Zeitpunkt der Muskelbiopsie erfolgte zumeist relativ spät im Krankheitsverlauf. Entgegen den vorliegenden Ergebnissen berichten Lacomis et al., dass kein Myosinverlust in Muskelbiopsien kritisch kranker Patienten am Tag 12 zu finden war (14). In einer späteren Veröffentlichung beschreibt die Arbeitsgruppe bei 14 von 39 Patienten einen Myosinverlust. Leider fehlt die Angabe des Entnahmezeitpunkts der Muskelbiopsie (17). Helliwell et al. konnten lediglich bei 5 von 57 ITS-Patienten einen Myosinverlust in der Elektronenmikroskopie nachweisen. Auch hier wird kein Entnahmezeitpunkt der Muskelbiopsien genannt. Einziges Einschlusskriterium für das Patientenkollektiv bei den Arbeitsgruppen um Lacomis und Helliwell war die intensivmedizinische Behandlungspflicht. Eine Einstufung in Hochrisikopatienten wie durch den in dieser Arbeit verwendeten SOFA-Score als Marker für Krankheitsschwere sowie die Kraftgradmessung mittels MRC erfolgte nicht (15). Stibler et al. zeigten in 11 Muskelbiopsien kritisch kranker Patienten einen Verlust von Myosin, die

Probenentnahme reichte von Tag 16 bis 104. All ihre Patienten entwickelten ein multiples Organversagen und besaßen einen SAPS-II-Score von 12 (Median) (19). Sander et al. untersuchten 8 ITS-Patienten, die bereits unter ausgeprägter Muskelschwäche litten. Die Biopsien zeigten durchgehend einen Myosinverlust und wurden innerhalb des ersten Monats nach Feststellung der Muskelschwäche entnommen (keine genaue Tagangabe). Frühe und sequentiell geführte Muskelbiopsien ähnlich dieser Arbeit (Tag 4 und 14) finden sich in aktueller Literatur einzig bei der Forschergruppe um Ahlbeck et al. (18). Allerdings werteten sie die Proben nicht elektronen- sondern lichtmikroskopisch aus und konnten erste morphologische Veränderungen vereinzelt erst an Tag 14 innerhalb der kritischen Erkrankung finden. Diese Tatsache geht mit den Ergebnissen aus unserer jüngsten Publikation einher (s.o.). Wir konnten eine signifikante Reduktion der Muskelquerschnitte lichtmikroskopisch erst an Tag 15 feststellen, während MyHC im Western Blot bereits an Tag 5 signifikant reduziert war (58).

In allen genannten Studien wurden Elektromyographie und Nervenstimulation angewandt, jedoch keine direkte Muskelstimulation (dmCAMP) wie in der vorliegenden Arbeit. Somit erfolgte keine Subklassifizierung der Intensivpatienten.

Es wird deutlich, dass sich aus der bisherigen Datenlage kein adäquater Vergleich ziehen lässt, da die o.g. Studien methodisch anders aufgebaut sind bzw. die konkrete Fragestellung, welche diese Arbeit zum Ziel hat, so noch nie untersucht worden ist.

Eine große methodische Stärke dieser Arbeit ist es, morphologische Korrelate aus den ersten Tagen der kritischen Erkrankung zu haben.

Bisher wurde von niemandem die Myofilamentdichte quantitativ mittels Elektronenmikroskopie im Rahmen der Muskelschwäche bestimmt. Der Nachweis über eine deutlich geringere Myofilamentdichte bei unseren ITS-Patienten im Vergleich zu Referenzwerten, ist nach unserem Kenntnisstand somit erstmalig in der Literatur.

4.3 CIM, non-CIM und ICUAW– Zusammenhang zwischen klinischem, elektrophysiologischem und elektronenmikroskopischem Befund

Zwischen den Patientengruppen CIM und non-CIM gibt es nach Auswertung der vorliegenden Ergebnisse elektronenmikroskopisch kaum Unterschiede. Die wenigen Unterschiede sind in Kapitel 4.1 zusammenfassend genannt. Bierbrauer et al. zeigten mit Daten aus den vorliegenden Untersuchungen, dass eine Abnahme der Muskelfaserquerschnitte („cross-sectional-area“) von TypII-Fasern signifikant mit CIM

assoziiert ist (23). Die zerstörte Myofibrillenstruktur ist als elektronenmikroskopisches Korrelat für die Faseratrophie denkbar, sie liegt in den Frühbiopsien bei CIM-Patienten signifikant häufiger vor. Jedoch ist eine Unterscheidung nach Fasertypen auf ultrastruktureller Ebene leider nicht möglich (51).

Ein Myosinverlust findet bei allen Patienten dieses Studienkollektivs statt, jedoch ist er in der Frühphase der kritischen Erkrankung bei non-CIM-Patienten nur beginnend und bei CIM-Patienten schon verstärkt ausgeprägt. In der quantitativen Bestimmung der Myosindichte zeigen sich wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Auch der Vergleich mit den Referenzwerten für Myosindichte ergibt keinen Unterschied von CIM und non-CIM. Man würde erwarten, dass die Myosindichte bei CIM stärker von den Vergleichswerten abweicht als bei non-CIM. Dies bestätigte sich nicht. Die Benutzung des Scores zur Bewertung der Längsschnittbilder führt zu einem Informationsgewinn: der Verlust von Myosinmasse ist zwar für alle ITS-Patienten identisch, jedoch gibt es offenbar zu Beginn der kritischen Erkrankung einen qualitativen Unterschied in der Präsentation der Myosinfasern auf ultrastruktureller Ebene.

Wir haben Patienten mit hohem Risiko für das Entwickeln einer ICUAW (SOFA-Score ≥ 8) ausgewählt und sehen bei der Mehrheit unserer Patienten nach Erwachen aus der Sedierung eine ICUAW (Median MRC 3,3 Punkte, 14 vs. 6 Patienten). Aufgrund der Darstellung eines direkten Zusammenhangs zwischen der Myosindichte in der Frühphase und MRC-Kraftgrad, ist der Myosinabbau daher als generelles Phänomen der erworbenen Muskelschwäche zu betrachten.

Zusammenfassend ist aus den vorliegenden Daten Folgendes abzuleiten:

1. Der bisher zahlreich beschriebene selektive Myosinverlust kann unabhängig von der elektrophysiologischen Präsentation einer CIM vorliegen.
2. Ein rascher Myosinverlust bestimmt die Ausbildung ICUAW.
3. Die Patienten mit elektrophysiologischem Nachweis einer CIM sind vielmehr dadurch charakterisiert, dass der Myosinverlust – rein qualitativ betrachtet – kurz nach Krankheitsbeginn schon weit fortgeschritten ist. Die signifikante Korrelation von einem niedrigen MRC-Kraftgrad und dem Vorliegen von CIM geht mit dieser Beobachtung einher.

4.4 Elektronenmikroskopisches Korrelat für CIM – Problematik der Begrifflichkeiten

Im Zusammenhang mit Myosinverlust wird in der Literatur durchweg beschrieben, dass sowohl Aktinfilamente als auch Z-Scheiben von jeglicher Zerstörung im Rahmen einer CIM

ausgenommen sind. Genau diese Merkmale würden laut Sander et al. die CIM von einer nekrotisierenden Myopathie abgrenzen. Die ersten elektronenmikroskopischen Anzeichen einer Nekrose sind Veränderungen von Mitochondrien, Abweichen der Z-Scheiben, Risse in der Sarkolemm und der raschere Abbau dünner Filamente im Vergleich zu dicken Filamenten. Der Myosinverlust im Rahmen der CIM sei nicht assoziiert mit Nekrose, so postulieren Sander et al., da sie in den Muskelbiopsien ihrer Studie keine Anzeichen dessen gefunden hatten (16). Wie in Kapitel 1.3 erwähnt, ist eine histopathologische Subgruppe der CIM die nekrotisch-apoptotische Form (4,35). Helliwell et al. haben in ihrer Studie eine Prävalenz von 31% Nekrose in den Muskelbiopsien nachgewiesen. Allerdings beziehen sie sich dabei auf Merkmale in lichtmikroskopischen Schnitten (15). Der Wechsel der Betrachtungsebene zwischen Lichtmikroskop und Elektronenmikroskop führt zu Unstimmigkeiten in der Literatur. Das Problem bei der in Kapitel 1.3 genannten Klassifizierung ist, dass es sich nicht um eine rein histologische oder rein ultrastrukturelle, sondern um eine gemischte Einteilung handelt. In den veröffentlichten Beispielen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus o.g. Studien wäre nach den Scorekriterien aus dieser Arbeit ein Abbau von dünnen Filamenten und Z-Scheiben durchaus nachvollziehbar, obwohl in den Studienergebnisse von deren Erhalt zu lesen ist. Die Ergebnisse der aktuellen Arbeit widerlegen die meist beschriebene Unversehrtheit der Aktinfilamente im Rahmen von CIM. Sowohl semiquantitativ als auch in der Bestimmung der Filamentdichte ist ein Abbau von dünnen Filamenten bei allen untersuchten Patienten nachweisbar. Im Vergleich zu den Referenzwerten ist die Aktindichte quantitativ im gleichen Maße reduziert wie die Myosindichte. Lediglich in den Längsschnitten, anhand Differenzierung in beginnenden und fortgeschrittenen Verlust, lässt sich ein Unterschied im Ausprägungsgrad feststellen. Außerdem finden sich in allen Muskelbiopsien zerstörte Z-Scheiben und pathologisch veränderte Mitochondrien nach 16 Tagen. Die aktuellen Ergebnisse befürworten demnach das Vorhandensein nekrotischer Umbauvorgänge im Muskel während der kritischen Erkrankung. Dies könnte darauf hinweisen, dass auf elektronenmikroskopischer Ebene bestimmte Kriterien wie Aktinfilamente und Z-Scheiben in den bisherigen Studien scheinbar anders bewertet wurden. In einer neueren Review von Lacomis et al. wird die Nekrose als Subtyp nicht erwähnt, sondern neben Atrophie und Myosinverlust wird von einer Desintegration der Myofibrillen als eines der Hauptcharakteristika gesprochen (41). Letzteres wurde mithilfe des Scores in der aktuellen Arbeit nachgewiesen. In 20% der frühen Muskelbiopsien fanden sich zerstörte, also desintegrierte Bereiche der Myofibrillen.

Daraus ergibt sich zukünftig die Notwendigkeit, histopathologische von ultrastrukturellen Befunden abzugrenzen. Außerdem unterstreicht die vorliegende Arbeit, dass der Myosinverlust nicht ein isoliertes Phänomen der CIM ist, sondern die ICUAW charakterisiert. Ergänzend muss erwähnt werden, dass sich die Faseratrophie in der 17-tägigen Bed-Rest-Studie von Riley et al. durch eine signifikante Abnahme der Aktinfilamente darstellte, während die Dichte der Myosinfilamente konstant blieb (51). Diese Tatsache verdeutlicht den Unterschied zwischen einer reinen Inaktivitätsatrophie ohne kritische Erkrankung, bei der das Myosin unberührt bleibt, und der Immobilität im Rahmen einer kritischen Erkrankung, bei der neben Aktin- besonders ein signifikanter Myosinverlust zu beobachten ist, letzterer begünstigt nachgewiesen die Ausbildung einer ICUAW.

4.5 Stärken und Schwächen der eigenen Methodik

Die ultrastrukturelle Morphologie der Skelettmuskulatur wurde im Rahmen einer CIM nach unseren Kenntnissen noch nie so detailliert beschrieben. Eine Stärke dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Scores aus sieben morphologischen Kriterien mit jeweils zwei bis vier Unterkategorien. Er bietet nicht nur einen detaillierteren Vergleich zwischen den Muskelbiopsien im Krankheitsverlauf bzw. zwischen den Patientengruppen, sondern er ermöglicht darüber hinaus ein systematisches Herangehen an die morphologische Analyse. Der Score wurde nicht mit dem Ziel einer diagnostischen Anwendung oder zur Evaluierung möglicher Prognosen erstellt. Er dient als Instrument zur besseren Vergleichbarkeit von morphologischen Veränderungen auf ultrastruktureller Ebene, die nicht nur rein deskriptiv sondern auch (semi-)quantitativ erfasst werden sollten. Zum Beispiel ergab sich in der Gesamtbetrachtung von den sieben definierten Merkmalen eine signifikante Verschlechterung aller Muskelbiopsien über den zeitlichen Verlauf der kritischen Erkrankung. Insbesondere war so auch eine Zunahme des qualitativen Myosinabbaus ersichtlich, während in der rein quantitativen Analyse die Myosinfilamentdichte pro Querschnitt von Biopsie 1 zu Biopsie 2 gleich blieb.

An der Zusammenstellung des Scores und der Bildauswertung war kein ausgebildeter Pathologe beteiligt. Dennoch konnten wir zu unserem interdisziplinären Team einen erfahrenen Forscher und Elektronenmikroskopiker auf dem Gebiet der Myologie, Prof. M. Schülke (Department of Neuropediatrics & NeuroCure Clinical Research Center, Charité Berlin) gewinnen, der uns bei analytischen Fragen unterstützte.

Der Score zeigte im Verlauf der Studie auch Schwachstellen. So stellte sich das Kriterium der

„Einlagerungen“ bei bekanntlich kleinen Ausschnitten aus dem Muskel als eher irrelevante Zusatzinformation zur Beschreibung dar. Ferner erfolgte die Punktevergabe immer ausschlaggebend nach dem am stärksten ausgeprägten pathologischen EM-Bild. Um eine übertrieben hohe Bewertung bei zufällig wiederholt angeschnittenen, besonders betroffenen Muskelfasern zu vermeiden, wurde die Addition umgangen und nur ein Anschnitt pro Biopsie bewertet. Möglicherweise sind so jedoch die tatsächlich schon stärker zerstörten Muskeln gleich bewertet worden wie solche, die relativ gesehen erst anfänglich abgebaut wurden. Mit dem Elektronenmikroskop wird nur ein kleiner Teil des Muskels betrachtet. Diese Arbeit belegt, dass bereits solch ein kleiner Ausschnitt wiederholt Pathologien des Gesamtmuskels repräsentieren kann, die im Zusammenhang mit der Klinik der kritischen Erkrankung stehen. Das detaillierte Scoringsystem beschreibt Merkmale, die in der bisherigen Literatur keine oder nur wenig Beachtung fanden. In künftigen Forschungsarbeiten zu ICUAW sollten weitere Abstufungen für die Bewertungsstrategie zur noch deutlicheren Differenzierung eingearbeitet werden. Licht- und Elektronenmikroskopie sollten zur Untersuchung der erworbenen Muskelschwäche gezielt angewendet werden.

Das Auszählen von dicken und dünnen Filamenten im elektronenmikroskopischen Bild zur Eruierung einer realistischen Myofilamentdichte ist aufwendig. Problematisch ist der bereits stattgefunden Substanzverlust im Muskel eines Schwerkranken. Für die Auswertung bedeutet dies, dass an Orten mit Verlust von Myofilamenten, diese natürlich zahlenmäßig nicht erfasst werden. Auch gibt es Bereiche im Querschnitt des Sarkomers, wo nur dünne (I-Bande) oder nur dicke Filamente (H-Zone) angeschnitten sind. So können nur Bereiche der A-Bande berücksichtigt werden, in denen dicke und dünne Filamente überlappend angeschnitten sind. Durch diese einschränkende Randbedingung wählt man tendenziell nur die gesunden Abschnitte der Fasern. Trotzdem konstatiert die vorliegende Arbeit, dass selbst die scheinbar am wenigsten pathologischen Bereiche einen deutlichen Filamentverlust aufweisen.

Eine weitere Einschränkung ist die Abwesenheit von gesunden Kontrollbiopsien. Allerdings stellt sich die Referenz von gesunden, männlichen Astronauten von Riley et al. (51,57) als sehr hilfreich heraus, zumal sich das Probandenkollektiv mit unseren Patienten in Geschlecht und BMI ähnelt. Jedoch wurde nicht der gleiche Muskel verwendet (M. soleus statt M. vastus lateralis) und die Biopsien sind durch perkutane Nadelbiopsie und nicht offen entnommen worden. Der Vergleich von physisch gut trainierten Astronauten mit kranken ITS-Patienten ist zu diskutieren. In einer Studie von Claassen et al. (59) wurde die Hypothese widerlegt, dass

eine durch Training bedingte Hypertrophie der Muskulatur von erhöhter Myofilamentdichte begleitet ist. Sie biopsierten 8 jungen Männern (Durchschnittsalter: 18 Jahre, BMI: 20kg/m²) den Musculus vastus lateralis und bestimmten die Myosinfilamentdichte durch Zählung mittels Elektronenmikroskop. Die Myosindichte war nach dem Training nicht signifikant verändert – 1604 vs. 1599 Myosinfilamente je μm^2 . Diese Ergebnisse implizieren eine Unabhängigkeit von Myosindichte und Muskelkraft beim Gesunden. Muskelmassenzunahme durch Training beruht auf einer Proliferation von Bindegewebe und Reduktion der Fettzellen (59). Einen Gegensatz dazu bildet das schwer kranke Patientenkollektiv dieser Arbeit, bei denen die Muskelkraft eine direkte Abhängigkeit zur Myosindichte aufwies.

Künftig ist – sofern ethisch vertretbar – eine eigene Kontrollgruppe mit einheitlichem Biopsieverfahren und deren Elektronenmikroskopie durch nur eine Person anzustreben. Personengebundene Unterschiede in der Bewertung (Rathke, Riley et al., Claassen et al.) würden so ausbleiben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Muskelbiopsien offen entnommen. Bisherige Studien gewannen Muskelgewebe ausschließlich durch perkutane Nadelbiopsie. Die Menge an Muskelfasern, welche man dadurch erhält ist wesentlich geringer als durch eine offene Biopsie (14). Ein weiterer Nachteil von perkutaner Biopsie ist das höhere Auftreten von mechanischen Traumata an den entnommenen Muskelfasern, was zu mehr Artefakten in den Proben führt (52).

Eine sequentielle Biopsieentnahme innerhalb schmaler Zeitfenster (Tag 4-7 und Tag 15-19) ist ein methodischer Vorteil gegenüber Voraufgezeichneten. Die zweite Muskelbiopsie wurde im Mittel am Studientag 16 entnommen – ein Zeitpunkt, zu dem in vorhandenen Studien teils noch keine einzige Biopsie vorgenommen wurde.

4.7 Fazit und Ausblick

Hochrisikopatienten zeigen wenige Tage nach Beginn der kritischen Erkrankung einen relevanten Myosinverlust im Skelettmuskel. Myosinfilamente werden unabhängig von einer neuromuskulären Antwort abgebaut und bestimmen im weiteren klinischen Verlauf die Präsentation der ICUAW. Qualitativ betrachtet wird Myosin stärker als Aktin zerstört und Myosin bei CIM frühzeitig im stärkeren Ausmaß als bei non-CIM. Jedoch ist ein Myosinverlust kein spezifisches Symptom der CIM, sondern der ICUAW. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die direkte Assoziation einer frühzeitig reduzierten Myosindichte mit einem daraus resultierenden geringen MRC-Kraftgrad und mit einer verlängerten Beatmungs- bzw. ITS-Verweildauer.

Im Zuge der fortlaufenden Entwicklung intensivmedizinischer Behandlungsmöglichkeiten wird die Zahl der therapiefähigen, kritisch kranken Patienten noch steigen und damit auch die Prävalenz der erworbenen Muskelschwäche auf der Intensivstation. Wir wissen jetzt, dass ein frühzeitiges Behandlungsmanagement ab dem ersten Tag der Aufnahme auf die Intensivstation zur Vermeidung einer ICUAW notwendig ist. Folgende Studien sollten die Entwicklung entsprechender Präventionsstrategien zum Ziel haben.

5. Literaturverzeichnis

1. Hermans G, De Jonghe B, Bruyninckx F, Van den Berghe G. Clinical review: Critical illness polyneuropathy and myopathy. *Crit Care*. 2008;12(6):238.
2. Batt J, dos Santos CC, Cameron JI, Herridge MS. Intensive care unit-acquired weakness: clinical phenotypes and molecular mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med*. 1. Februar 2013;187(3):238–46.
3. Appleton R, Kinsella J. Intensive care unit-acquired weakness. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*. 6. Januar 2012;mkr057.
4. Friedrich O, Hund E. [Critical illness myopathy in intensive care patients. Pathogenetic concepts and clinical management]. *Anaesthesist*. Dezember 2006;55(12):1271–80.
5. Friedrich O, Fink RHA, Hund E. Understanding critical illness myopathy: approaching the pathomechanism. *J Nutr*. Juli 2005;135(7):1813S – 1817S.
6. Latronico N, Tomelleri G, Filosto M. Critical illness myopathy. *Current Opinion in Rheumatology*. November 2012;24(6):616–22.
7. De Jonghe B, Bastuji-Garin S, Sharshar T, Outin H, Brochard L. Does ICU-acquired paresis lengthen weaning from mechanical ventilation? *Intensive Care Med*. Juni 2004;30(6):1117–21.
8. Bolton CF, Gilbert JJ, Hahn AF, Sibbald WJ. Polyneuropathy in critically ill patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. November 1984;47(11):1223–31.
9. Waclawik AJ, Sufit RL, Beinlich BR, Schutta HS. Acute myopathy with selective degeneration of myosin filaments following status asthmaticus treated with methylprednisolone and vecuronium. *Neuromuscul Disord*. 1992;2(1):19–26.
10. Hirano M, Ott BR, Raps EC, Minetti C, Lennihan L, Libbey NP, u. a. Acute quadriplegic myopathy: a complication of treatment with steroids, nondepolarizing blocking agents, or both. *Neurology*. November 1992;42(11):2082–7.
11. Showalter CJ, Engel AG. Acute quadriplegic myopathy: analysis of myosin isoforms and evidence for calpain-mediated proteolysis. *Muscle Nerve*. März 1997;20(3):316–22.
12. Hanson P, Dive A, Brucher JM, Bisteau M, Dangoisse M, Deltombe T. Acute corticosteroid myopathy in intensive care patients. *Muscle Nerve*. November 1997;20(11):1371–80.
13. Ramsay DA, Zochodne DW, Robertson DM, Nag S, Ludwin SK. A syndrome of acute severe muscle necrosis in intensive care unit patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. Juli 1993;52(4):387–98.
14. Lacomis D, Giuliani MJ, Van Cott A, Kramer DJ. Acute myopathy of intensive care: clinical, electromyographic, and pathological aspects. *Ann Neurol*. Oktober 1996;40(4):645–54.

15. Helliwell TR, Wilkinson A, Griffiths RD, McClelland P, Palmer TE, Bone JM. Muscle fibre atrophy in critically ill patients is associated with the loss of myosin filaments and the presence of lysosomal enzymes and ubiquitin. *Neuropathol Appl Neurobiol*. Dezember 1998;24(6):507–17.
16. Sander HW, Golden M, Danon MJ. Quadriplegic areflexic ICU illness: selective thick filament loss and normal nerve histology. *Muscle Nerve*. Oktober 2002;26(4):499–505.
17. Lacomis D, Petrella JT, Giuliani MJ. Causes of neuromuscular weakness in the intensive care unit: a study of ninety-two patients. *Muscle Nerve*. Mai 1998;21(5):610–7.
18. Ahlbeck K, Fredriksson K, Rooyackers O, Måbäck G, Remahl S, Ansved T, u. a. Signs of critical illness polyneuropathy and myopathy can be seen early in the ICU course. *Acta Anaesthesiol Scand*. Juli 2009;53(6):717–23.
19. Stibler H, Edström L, Ahlbeck K, Remahl S, Ansved T. Electrophoretic determination of the myosin/actin ratio in the diagnosis of critical illness myopathy. *Intensive Care Med*. September 2003;29(9):1515–27.
20. Schweickert WD, Hall J. ICU-acquired weakness. *Chest*. Mai 2007;131(5):1541–9.
21. Schefold JC, Bierbrauer J, Weber-Carstens S. Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. Dezember 2010;1(2):147–57.
22. Callahan LA, Supinski GS. Sepsis-induced myopathy. *Crit Care Med*. Oktober 2009;37(10 Suppl):S354–67.
23. Bierbrauer J, Koch S, Olbricht C, Hamati J, Lodka D, Schneider J, u. a. Early type II fiber atrophy in intensive care unit patients with nonexcitable muscle membrane. *Crit Care Med*. Februar 2012;40(2):647–50.
24. Gutmann L, Blumenthal D, Gutmann L, Schochet SS. Acute type II myofiber atrophy in critical illness. *Neurology*. März 1996;46(3):819–21.
25. Schweickert WD, Pohlman MC, Pohlman AS, Nigos C, Pawlik AJ, Esbrook CL, u. a. Early physical and occupational therapy in mechanically ventilated, critically ill patients: a randomised controlled trial. *Lancet*. 30. Mai 2009;373(9678):1874–82.
26. Gerovasili V, Stefanidis K, Vitzilaios K, Karatzanos E, Politis P, Koroneos A, u. a. Electrical muscle stimulation preserves the muscle mass of critically ill patients: a randomized study. *Crit Care*. 2009;13(5):R161.
27. Routsis C, Gerovasili V, Vasileiadis I, Karatzanos E, Pitsolis T, Tripodaki E, u. a. Electrical muscle stimulation prevents critical illness polyneuromyopathy: a randomized parallel intervention trial. *Crit Care*. 2010;14(2):R74.
28. Maffiuletti NA, Roig M, Karatzanos E, Nanas S. Neuromuscular electrical stimulation for preventing skeletal-muscle weakness and wasting in critically ill patients: a systematic review. *BMC Medicine*. 2013;11:137.

29. Weber-Carstens S, Deja M, Koch S, Spranger J, Bubser F, Wernecke KD, u. a. Risk factors in critical illness myopathy during the early course of critical illness: a prospective observational study. *Crit Care*. 2010;14(3):R119.
30. Spuler S, Moers A von. *Muskelkrankheiten*. 1. Aufl. Deutschland: Schattauer; 2004. 259-260 S.
31. de Jonghe B, Lacherade J-C, Sharshar T, Outin H. Intensive care unit-acquired weakness: risk factors and prevention. *Crit Care Med*. Oktober 2009;37(10 Suppl):S309–15.
32. Bercker S, Weber-Carstens S, Deja M, Grimm C, Wolf S, Behse F, u. a. Critical illness polyneuropathy and myopathy in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. April 2005;33(4):711–5.
33. Weber-Carstens S, Schneider J, Wollersheim T, Assmann A, Bierbrauer J, Marg A, u. a. Critical illness myopathy and GLUT4: significance of insulin and muscle contraction. *Am J Respir Crit Care Med*. 15. Februar 2013;187(4):387–96.
34. Lacomis D, Zochodne DW, Bird SJ. Critical illness myopathy. *Muscle & Nerve*. 2000;23(12):1785–8.
35. Alb M, Hirner S, Luecke T. [Critical illness polyneuropathy and myopathy. Pathogenesis and diagnostic]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. April 2007;42(4):250–8.
36. De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur J-P, Authier F-J, Durand-Zaleski I, Boussarsar M, u. a. Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. *JAMA*. 11. Dezember 2002;288(22):2859–67.
37. Kleyweg RP, van der Meché FG, Schmitz PI. Interobserver agreement in the assessment of muscle strength and functional abilities in Guillain-Barré syndrome. *Muscle Nerve*. November 1991;14(11):1103–9.
38. Weber-Carstens S, Koch S, Spuler S, Spies CD, Bubser F, Wernecke KD, u. a. Nonexcitable muscle membrane predicts intensive care unit-acquired paresis in mechanically ventilated, sedated patients. *Crit Care Med*. September 2009;37(9):2632–7.
39. Trojaborg W, Weimer LH, Hays AP. Electrophysiologic studies in critical illness associated weakness: myopathy or neuropathy--a reappraisal. *Clin Neurophysiol*. September 2001;112(9):1586–93.
40. Rich MM, Bird SJ, Raps EC, McCluskey LF, Teener JW. Direct muscle stimulation in acute quadriplegic myopathy. *Muscle Nerve*. Juni 1997;20(6):665–73.
41. Lacomis D. Electrophysiology of neuromuscular disorders in critical illness. *Muscle Nerve*. März 2013;47(3):452–63.
42. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. *Taschenlehrbuch Histologie*. 4., vollständig überarbeitete Auflage. Thieme, Stuttgart; 2012. 694 S.
43. Silverthorn DU. *Physiologie*. Pearson Deutschland GmbH; 2009. 1416 S.

44. Kinesiology: The Mechanics and Pathomechanics of Human Movement (Recall Series) - Kindle edition by Carol Oatis. Professional & Technical Kindle eBooks @ Amazon.com. [Internet]. [zitiert 23. Februar 2016]. Verfügbar unter: http://www.amazon.com/Kinesiology-Mechanics-Pathomechanics-Movement-Recall-ebook/dp/B00MYFAIOM#reader_B00MYFAIOM
45. Danon MJ, Carpenter S. Myopathy with thick filament (myosin) loss following prolonged paralysis with vecuronium during steroid treatment. *Muscle Nerve*. November 1991;14(11):1131–9.
46. Rouleau G, Karpati G, Carpenter S, Soza M, Prescott S, Holland P. Glucocorticoid excess induces preferential depletion of myosin in denervated skeletal muscle fibers. *Muscle Nerve*. Juni 1987;10(5):428–38.
47. Massa R, Carpenter S, Holland P, Karpati G. Loss and renewal of thick myofilaments in glucocorticoid-treated rat soleus after denervation and reinnervation. *Muscle Nerve*. November 1992;15(11):1290–8.
48. Gonzales MF, Olney RK, So YT, Greco CM, McQuinn BA, Miller RG, u. a. Subacute structural myopathy associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch Neurol*. Mai 1988;45(5):585–7.
49. Carpenter S, Karpati G. *Pathology of skeletal muscle*. 1984;(New York: Churchill Livingstone):220–1.
50. Latronico N, Bolton CF. Critical illness polyneuropathy and myopathy: a major cause of muscle weakness and paralysis. *Lancet Neurol*. Oktober 2011;10(10):931–41.
51. Riley DA, Bain JLW, Thompson JL, Fitts RH, Widrick JJ, Trappe SW, u. a. Disproportionate loss of thin filaments in human soleus muscle after 17-day bed rest. *Muscle & Nerve*. 1998;21(10):1280–9.
52. Stirling J, Curry A, Eyden B. *Diagnostic Electron Microscopy: A Practical Guide to Tissue Preparation and Interpretation*. 1. Auflage. John Wiley & Sons; 2012. 492 S.
53. Huxley HE. X-Ray Analysis and the Problem of Muscle. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 11. März 1953;141(902):59–62.
54. Elliott GF, Lowy J, Worthington CR. An X-ray and light-diffraction study of the filament lattice of striated muscle in the living state and in rigor. *Journal of Molecular Biology*. April 1963;6(4):295–IN9.
55. Brandt PW, Lopez E, Reuben JP, Grundfest H. The relationship between myofilament packing density and sarcomere length in frog striated muscle. *J Cell Biol*. 1. Mai 1967;33(2):255–63.
56. Haselgrove JC. Structure of Vertebrate Striated Muscle as Determined by X-ray-Diffraction Studies. In: Terjung R, Herausgeber. *Comprehensive Physiology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011 [zitiert 5. Juni 2013]. Verfügbar unter: <http://www.comprehensivephysiology.com/WileyCDA/CompPhysArticle/refId-cp100105.html>

57. Riley DA, Bain JLW, Thompson JL, Fitts RH, Widrick JJ, Trappe SW, u. a. Decreased thin filament density and length in human atrophic soleus muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol.* 2. Januar 2000;88(2):567–72.
58. Wollersheim T, Woehlecke J, Krebs M, Hamati J, Lodka D, Luther-Schroeder A, u. a. Dynamics of myosin degradation in intensive care unit-acquired weakness during severe critical illness. *Intensive Care Med.* April 2014;40(4):528–38.
59. Claassen H, Gerber C, Hoppeler H, Lüthi JM, Vock P. Muscle filament spacing and short-term heavy-resistance exercise in humans. *J Physiol (Lond).* Februar 1989;409:491–5.

6. Abkürzungsverzeichnis

AL	Aktin loss/ Verlust von Aktinfilamenten
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
BMI	Body Mass Index
CIM	Critical Illness Myopathie
CIP	Critical Illness Polyneuropathie
CQT	Chi-Quadrat-Test
dmCMAP	direct muscle Compound Muscle Action Potential
ED	Elektronendichte
EM	Elektronenmikroskopie
EMG	Elektromyographie
GLUT 4	Glucosetransporter Typ 4
ICUAW	Intensive Care Unit-acquired Weakness
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
ITS	Intensivstation
KI	Konfidenzintervall
Max	Maximum
Min	Minimum
ML	Myosin loss/ Verlust von Myosinfilamenten
MRC	Medical Research Council
MuRF-I	Muscle RING-finger Protein 1
MWT	Mann-Whitney-U-Test
MyHC	Myosin Heavy Chain
NaCl	Natriumchlorid
P.	Punkt(e)
RASS	Richmond Agitation Sedation Scale
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SD	Standardabweichung
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
WCIF	Wright Cell Imaging Facility
WT	Wilcoxon-Test

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Theresa Rathke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Erworbene Muskelschwäche auf der Intensivstation – Elektronenmikroskopisches Korrelat in der Frühphase der kritischen Erkrankung“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Theresa Rathke hatte Anteil an den folgenden Publikationen:

1. Wollersheim T, Woehlecke J, Krebs M, Hamati J, Lodka D, Luther-Schroeder A, Langhans C, Haas K, Rathke T, Kleber C, Spies C, Labeit S, Schuelke M, Spuler S, Spranger J, Weber-Carstens S, Fielitz J, **“Dynamics of myosin degradation in intensive care unit-acquired weakness during severe critical illness”**, Intensive Care Medicine, April 2014

Beitrag der Promovierenden: Aufbereitung und Analyse der Muskelbiopsien mithilfe der Elektronenmikroskopie

2. Teilvorstellung von Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auf dem **ESICM 2015** in Berlin

Unterschrift, Datum und Stempel
des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

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

Komplette Publikationsliste

1. Wollersheim T, Woehlecke J, Krebs M, Hamati J, Lodka D, Luther-Schroeder A, Langhans C, Haas K, Rathke T, Kleber C, Spies C, Labeit S, Schuelke M, Spuler S, Spranger J, Weber-Carstens S, Fielitz J, “Dynamics of myosin degradation in intensive care unit-acquired weakness during severe critical illness”, Intensive Care Medicine, April 2014

2. mündliche Präsentation mit dem Titel: “Critically ill patients with ICU-acquired weakness show reduced density of myosin in electron microscope early after onset of critical illness” auf dem ESICM Oktober 2015 in Berlin, Teilergebnisse aus der vorliegenden Arbeit

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mit konstruktiver Kritik und wichtigen Hinweisen zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Für die Möglichkeit meine Arbeit an der Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchzuführen danke ich Prof. Dr. Claudia Spies.

Für die Überlassung dieses äußerst spannenden Dissertationsthemas, möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Steffen Weber-Carstens bedanken. Ich danke ihm für die fachliche Betreuung, seine inhaltlichen Anregungen und die gemeinsame Erarbeitung eines gelungenen wissenschaftlichen Beitrags. Darüber hinaus möchte ich seinen persönlichen Einsatz würdigen, welchen er trotz zahlreicher anderer Aufgaben immer mit großem Enthusiasmus verfolgte.

Außerdem danke ich im Speziellen Dr. Tobias Wollersheim, Dr. Jeffrey Bierbrauer und Dr. Martin Krebs, welche zu verschiedenen Zeitpunkten während meiner Arbeit eine große Unterstützung boten, unermüdliche Diskussionen mit mir führten und eine stets ansteckende Begeisterung für das Thema hatten.

Ich danke Prof. Dr. Markus Schülke für seine Unterstützung in der Entwicklung des Scores und für seine hilfreiche Beratung in der Auswertung der Elektronenmikroskopie.

Petra Schrade danke ich für die Einführung in die Nutzung des Elektronenmikroskops und für den äußerst interessanten Einblick in die Präparation der Muskelbiopsien.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie und besonders Kristin, deren Verständnis und Unterstützung unerschöpflicher Kraftquellen sind.