

**Aus der Klinik für Orthopädie, dem Institut für  
Medizinische Neurobiologie der Medizinischen Fakultät der  
Otto-von-Guericke Universität Magdeburg**

**Zellbiologische und bioptische Analysen des  
Regenerationsverhaltens des *M. multifidus* bei Patienten mit  
lumbalem Bandscheibenvorfall**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. med.  
(Doctor medicinae)

an der medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

vorgelegt von                    Thomas Hesse  
aus                                    Magdeburg  
Magdeburg 2003

Thomas Hesse

Zellbiologische und bioptische Analysen des Regenerationsverhaltens  
des M. multifidus bei Patienten mit lumbalem Bandscheibenvorfall  
2003 , 82 Bl. : 13 Abb., 12 Tab., 5 Diagr.

### **Kurzreferat**

Der lumbale Bandscheibenvorfall ist eine der häufigsten Wirbelsäulenerkrankungen des Menschen. Die Pathogenese der degenerativen Veränderungen der Wirbelsäule, die zum Bandscheibenvorfall führen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Jüngste bioptische Untersuchungen des M. multifidus sprechen für eine über die zu erwartende rein neurogene Veränderung hinausgehende Alteration von Muskelfasern [32]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Myopathologie und der Regenerationsfähigkeit des M. multifidus untersucht. Der Fusionsindex mittels aus Biopsien isolierter Satellitenzellen *in-vitro* – zelluläre Quelle für die Regeneration von Muskelfasern – wurde analysiert und mit Befunden der Muskelbiopsien quantitativ korreliert. Die Ergebnisse zeigen eine Steigerung der Fusionsrate der Satellitenzellen, bei allerdings nur spärlicher Regenerationsaktivität der Muskelfasern *in-vivo* unter den Bedingungen der durch den Diskusprolaps induzierten radikulär neurogenen Muskelalteration. Die Daten stützen die Annahme einer Insuffizienz der Muskelregeneration mit der Folge der myogenen Destabilisierung als Ursache rezidivierender Lumbalgien.

## **Schlüsselwörter**

Lumbaler Bandscheibenvorfall

Musculus multifidus

Satellitenzelle

Regeneration

Fusionsindex

## Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
BA	Bewegungsausmaß
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DMEM	Dulbecco´s Modification of Eagle´s Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
dmZ	doppelmarkierte Zelle
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazineN'-[2-ethanesulphonate]
Fa.	Firma
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GS	Gewebssyndrom
NCAM	nerval cell adhesion molecule
NPP	Nucleus pulposus Prolaps
PE	Phycoerythrin
PBS	Phosphat Buffered Saline
SMA	spinale Muskelatrophie
SZ	Satellitenzelle

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einführung</b>	<b>7</b>
1.1. Lumbaler Bandscheibenprolaps (LBP)	7
1.1.1. Ätiologie	7
1.1.2. Klinik	10
1.1.3. Therapie	12
1.2. Autochthone Rückenmuskulatur	13
1.2.1. Musculus multifidus	13
1.2.2. Myopathologie	15
1.2.3. Myopathologie des M. multifidus beim LBP	17
1.3. Satellitenzelle	18
1.3.1. Biologie	18
1.3.2. Muskelregeneration	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1. Übersicht	22
2.2. Patienten	22
2.3. Muskelbiopsie	23
2.4. Satellitenzellkultur	24
2.4.1. Zellisolierung	24
2.4.2. Trypsination	25
2.4.3. Einfrieren und Auftauen	26
2.4.4. May-Grünwald Färbung	27
2.4.5. Fusionsindex	28
2.5. Muskelhistologie	28
2.5.1. Kryofixierung und Schnittpräparate	28
2.5.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung	28
2.5.3. Immunfluoreszenzfärbung der Satellitenzellen	30
2.6. Datenkorrelation	31
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1. Übersicht	32
<b>Teil I</b>	
3.2. Klinische Daten	32
3.2.1. Altersstruktur und Geschlechtsverteilung	33
3.2.2. Patientendaten	35
3.3. Fusionsverhalten primärer Satellitenzellen des M. multifidus in-vitro	38

3.4.	Myopathologie des M. multifidus	41
3.5.	Quantifizierung der Muskelsatellitenzellen des M. multifidus in-situ	48
	<b>Teil II</b>	
3.6.	Korrelation der Daten	51
3.6.1.	Korrelation des Fusionsindex mit quantitativen Daten der Myopathologie	51
3.6.2.	Korrelation zellbiologisch-bioptischer Daten mit der Krankheitsdauer	52
4.	<b>Diskussion</b>	<b>54</b>
4.1.	Übersicht	54
	<b>Teil I</b>	
4.2.	Patientengut	54
4.2.1.	Klinische Daten	55
4.3.	Fusionsindex	57
4.4.	Myopathologie	58
4.5.	Fluoreszenzdaten	60
	<b>Teil II</b>	
4.6.	Schlussfolgerungen	61
5.	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
6.	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
7.	<b>Danksagung</b>	<b>79</b>
8.	<b>Erklärung</b>	<b>80</b>
9.	<b>Lebenslauf</b>	<b>81</b>

## 1. Einführung

### 1.1. Lumbaler Bandscheibenprolaps

#### 1.1.1. Ätiologie

Die Wirbelsäule ist das Achsenskelett des Rumpfes. Sie muss zwei sich widersprechende Funktionen erfüllen: einerseits muss sie starr, andererseits aber auch biegsam sein. Möglich ist dies durch den Aufbau als gegliederter, beweglicher Stab, der aus den knöchernen Wirbeln sowie den sie verbindenden Zwischenwirbelscheiben und Bändern besteht und durch die Muskelzüge, welche die Wirbelsäule in Form von Haltetauen stabilisieren [49]. Unter dem Einfluss der zunehmenden Belastung werden Wirbelkörper und Zwischenwirbelscheiben von kranial nach kaudal breiter und höher, die Bänder kräftiger und die Muskelzüge kürzer, wodurch sie im unteren Lendenbereich eine kompakte Muskelmasse bilden. Die freie Wirbelsäule, oberhalb des Kreuzbeines, besitzt 24 Bewegungssegmente mit 23 Bandscheiben, wobei die obersten Segmente zwischen Axis und Atlas, sowie Atlas und Schädel keine besitzen [53]. Da die Bezeichnung der Bandscheiben nach den benachbarten Wirbeln erfolgt, gibt es (bei 7 Hals-, 12 Brust- und 5 Lendenwirbeln je) 5 Hals-, 11 Brust- und 4 Lendenbandscheiben, sowie je eine am zervikothorakalen, thorakolumbalen und lumbosakralen Übergang. Frontal betrachtet ist die Wirbelsäule gerade, in sagittaler Ansicht hingegen zeigt sie im freien Teil doppelt S-förmig drei Krümmungen: die Halslordose, die Brustkyphose und die Lendenlordose. Sie sind die Anpassung an die phylogenetische Entwicklung von der quadripeden zur bipeden Fortbewegung [49].

An der Wirbelsäule unterscheidet man zwischen einem ventralen, von den Wirbelkörpern und den Zwischenwirbelscheiben gebildet, und einem dorsalen Pfeiler, welcher von den Wirbelbögen mit ihren Gelenkfortsätzen gebildet wird. Der ventrale Pfeiler hat vornehmlich statische, der dorsale dynamische Funktionen. Nach *Schmorl* ist zwischen einem vom Wirbel gebildeten passiven und einem bewegenden Segment zu unterscheiden [90]. Das Bewegungssegment nach „Junghans“ stellt die Bau- und

Funktionseinheit der Wirbelsäule dar [53]. Es besteht aus dem Discus intervertebralis, mit Nucleus pulposus und Anulus fibrosus, den Hälften der benachbarten Wirbel, dem Foramen intervertebrale, den Facettengelenken, sowie dem Lig. flavum, den Ligg. longitudinale anterius und posterius, dem Lig. interspinale und allen Muskeln die sich in gleicher Höhe zwischen Dorn- und Querfortsätzen befinden. Zwischen dem vorderen und dem hinteren Pfeiler besteht eine funktionelle Verknüpfung. Aufgrund ihres strukturellen Aufbaus kann man die Wirbel mit Hebeln vergleichen, deren Drehpunkt vom Wirbelgelenk gebildet wird. Dieses System erlaubt eine Aufnahme und Weiterleitung von axialen Druckkräften, direkt und passiv durch die Zwischenwirbelscheibe und indirekt aber aktiv durch die tiefen autochthonen Rückenmuskeln [49,58].

Der Discus intervertebralis verbindet zwei Wirbel in Form einer Synchronrose. Er besteht aus dem Anulus fibrosus und dem Nucleus pulposus. Die äussere Zone des Anulus fibrosus besteht aus Lamellen mit vertikalen Kollagenfibrillen. Die Innenzone mit fast horizontalen Fibrillenzügen gleicht einem faserknorpeligen Gewebe und geht ohne scharfe Grenze in den Gallertkern über. Die Grundlage des Nucleus pulposus stellt restliches Gewebe der Chorda dorsalis dar. Er enthält grösstenteils Typ II Kollagen, bläschenförmige Chordazellen und Glykosaminoglykane [21,37,83]. Diese Makromoleküle binden aufgrund ihres hohen effektiven hydrodynamischen Volumens einen grossen Teil der Bandscheibenflüssigkeit [57], wodurch der Gallertkern unter einem inneren Druck steht [84]. Der Nucleus liegt in einer zugfesten Hülle, kranial und kaudal von den Wirbelkörperendflächen und peripher vom Anulus fibrosus gebildet, die den Austritt von Gallertgewebe verhindert.

Die Bandscheibe steht mit ihren angrenzenden Gewebsstrukturen im Stoff- und Flüssigkeitsaustausch und stellt somit ein osmotisches System dar [57,59]. Durch druckabhängige Flüssigkeitsverschiebungen kommt es zu einer vorerst reversiblen Bandscheibenerniedrigung [5], welche zu einem Stabilitätsverlust im Bewegungssegment führt. Dieser hat funktionell solange keine Bedeutung, wie die autochthonen Rückenmuskeln die Insuffizienz der passiven Verspannungsstrukturen kompensieren können [83]. Durch Versorgungs- und Stoffwechsel-



probleme des bradytrophen Bandscheibengewebes, hervorgerufen durch Störungen der aktiven und passiven Transportmechanismen an der Bandscheibengrenze, wie zum Beispiel Bewegungsarmut und Haltungsfehler [54], kommt es zu regressiven Veränderungen des Gewebes der Zwischenwirbelscheibe. Diese gehen mit einer Verringerung des Wasseraufnahmevermögens einher, beruhend auf qualitativen und quantitativen Veränderungen der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix [83,107]. Auch können anlagebedingte Faktoren bei der Degeneration eine Rolle spielen [9].

Die ersten Anzeichen einer Bandscheibendegeneration sind meistens radiär, seltener zirkulär angeordnete Fissuren, welche von zentral gelegenen Anteilen des Anulus fibrosus ausgehen [40,41,54,62]. Bei Überlastung oder asymmetrischer Belastung können Teile des Nucleus in diese Fissuren gedrückt werden und den äusseren Anulus und das hintere Längsband unter Zugspannung setzen [50]. Durch Reizung der R. meningeus im Längsband kommt es zum so genannten Lumbago [55,78]. Es kann akut bei Fehlbelastung in Rumpfvorbeuge oder langsam [28,29] durch allmähliche Verlagerung entlang der Einrisse zu einer Dorsalverschiebung des Nucleus pulposus und einer Bedrängung des Lig. longitudinale posterius und des äusseren Anulus kommen. Diese Bandscheibenprotrusion kann sich wieder zurückbilden [35,102] oder weiter vordringen und den Bandscheibenring sprengen. Man spricht dann vom Bandscheibenprolaps. Dieser erfolgt meist paramedial oder lateral, da das hintere Längsband medial am kräftigsten ist. Es kommt dann zur Bedrängung der Nervenwurzel der entsprechenden Etage, was sich dann als Ischialgie äussert.

Das Prolapsgewebe kann nach kranial, kaudal, medial oder lateral weiterwandern und dadurch die Beteiligung von anderen Etagen vortäuschen. Durch Prolabierung grösserer Mengen kann es zu einer raschen Sinterung im Segment kommen [74,90], verbunden mit Problemen an den Wirbelgelenken sowie am Foramen intervertebrale, was zu einer zusätzlichen Bedrängung der Nervenwurzel und damit zur Entstehung eines chronischen Wurzelreizsyndromes führen kann [55].

Im Bereich der Lendenwirbelsäule nehmen die Bandscheiben von kranial nach kaudal an Höhe zu, bis auf den lumbosakralen Übergang. Hier ist sie ungefähr um ein Drittel niedriger als die nächsthöhere. Auch sind im Lendenbereich die Zwischenwirbelscheiben ventral höher als dorsal. Im Gegensatz zum thorakalen Bereich befindet sich das Foramen intervertebrale in Höhe der Bandscheibe [55]. Spinalganglien und Wurzeln, deren Kaliber von L1 nach L5 ebenfalls zunimmt [55], liegen weiter ventral und befinden sich somit unmittelbar neben der Bandscheibe. Grund für das häufige Auftreten von lumbalen Wurzelreizsyndromen sind die enge topografische Situation und die besondere mechanische Beanspruchung in den unteren zwei Bewegungssegmenten [55,99]. Selbst geringe degenerative Veränderungen der knöchernen Strukturen sowie der Bandscheiben führen zu einer Bedrängung der Nervenwurzel.

### 1.1.2. Klinik

Die Anamnese eines Prolapspatienten ist fast immer durch das plötzliche Auftreten einer Lumbalgie bei Fehlbelastung der flecktierten Wirbelsäule oder abrupten Rotationsbewegungen gekennzeichnet. Begleitend tritt eine konstante Schonhaltung in Form einer skoliotischen Fehlstellung der Wirbelsäule auf, die in Abhängigkeit von der Lokalität der Wurzelbedrängung ipsilateral oder kontralateral erfolgt [80].

Das Hauptsymptom ist der tiefe Kreuzschmerz, der bei monoradikulärer bandförmig und bei polyradikulärer Bedrängung eher inselförmig ins Bein ausstrahlt. Die Schmerzen werden beim Husten, Niesen und Pressen durch Druckerhöhung im epiduralen Venengeflecht, sowie in den lumbalen Bandscheiben [75] verstärkt und sind typischerweise positionsabhängig. Im Allgemeinen sind die Schmerzen proportional dem Druck, der auf die Nervenwurzel ausgeübt wird. Die Patienten klagen über Hyper- oder Hypästhesien sowie Parästhesien (Kribbeln, Ameisenlaufen). Die oberflächlichen Sensibilitätsstörungen, mit teils individuell differierenden Dermatombegrenzen [77,112] und bei älteren Patienten mit peripheren Neuropathien konkurrierend, sind aufgrund ihrer Subjektivität eher

unspezifisch für die Festlegung einer direkten Wurzelbeteiligung. Es gibt nur kleine Autonomiegebiete für die einzelne Nervenwurzel, wie in Tabelle 1 dargestellt. Eventuell berichten die Patienten im frühen Stadium schon über motorische Störungen, die jedoch gegen schmerzbedingte oder reflektorische Ruhigstellung abzugrenzen sind. Motorische Störungen im Sinne der Abschwächung von Kennmuskeln oder Reflexen sind im Hinblick auf die Diagnosefindung spezifischer.

Tabelle 1 Symptome und Zeichen bei Radikulärsyndrom L3-S1

	L3	L4	L5	S1
Schmerz	anteromedialer Oberschenkel	anteriorer Oberschenkel	posterolateraler Oberschenkel, lateraler Unterschenkel	posteriorer Ober- und Unterschenkel
sensibles Autonomiegebiet	mediales Knie	medialer Unterschenkel	lateraler Unterschenkel, Fußrücken	Aussenkante Fuß
Muskel schwäche	Adduktoren, Quadrizeps	Quadrizeps	Ext.hall.longus, Tibialis anterior	Triceps surae, Gluteus max.
abgeschwächter Reflex	Adduktoren-Reflex, PSR	PSR	TPR	ASR

PSR: Patellarsehnenreflex, TPR: Tibialis-posterior-Reflex, ASR: Achillessehnenreflex, Ext.hall.longus: Extensor hallucis longus, max.: maximus

Bei der klinischen Untersuchung fallen eine rigide Wirbelsäule mit entsprechenden Haltungsfehlern, ein Spasmus der lumbalen paravertebralen Muskulatur sowie eine Teilfixierung der LWS auf [55]. Der Patient zeigt dabei eine seitenbetonte Bewegungseinschränkung der Wirbelsäule und bei motorischen Störungen eventuell Defizite beim Fersen- oder Zehenstand. Mit dem Lasegue-Test, dem gekreuzten Lasegue-Test, die eine Dehnung des N. ischiadicus provozieren, und dem umgekehrten Lasegue-Test, der zur Dehnung des N. femoralis führt [97] und anderen spezifischen Tests lassen sich differentialdiagnostische Ausschlüsse treffen und die Nervenwurzel diagnostik festigen.

Radiologisch kann man im konventionellen Röntgenbild der LWS in zwei Ebenen eine reflektorische Steilstellung, sowie eine skoliotische Schonhaltung finden und gleichzeitig ursächliche degenerative oder neoplastische Veränderungen ausschliessen. Bildgebendes Mittel der

Wahl beim Bandscheibenvorfall ist heute die Magnetresonanztomographie, aufgrund der besseren Darstellung der Weichteilstrukturen in verschiedenen Wichtungen, der Erfassung aller Segmente und der Darstellungsmöglichkeit mehrerer Ebenen. Auch Computertomografie, Myelografie und Diskografie können zur Diagnostik eingesetzt werden, wurden aber durch das MRT und seine Vorteile verdrängt.

### 1.1.3. Therapie

Trotz moderner bildgebender Verfahren gilt auch heute der Grundsatz, es wird kein Röntgenbild behandelt [15,110]. Hauptaufgabe der Therapie ist zuerst die Schmerzbeseitigung. Die Therapie von Patienten mit einem Bandscheibenvorfall hat zwei Säulen: die Konservative und die Operative. Bei akut auftretenden Beschwerdebildern sind angezeigt eine Entlastung der Wirbelsäule und eine Traktion zur Unterstützung einer eventuellen Rückverlagerung des Prolapses [60].

Medikamentös kann die Gabe von Analgetika und Antiphlogistika erfolgen, um eine Abschwellung der gereizten Wurzel zu erreichen, sowie die Verabreichung von Muskelrelaxantien, um den Circulus vitiosus aus Schmerz – Fehlhaltung – Muskelverspannung – Schmerz zu unterbrechen. Mit physikalischen Mitteln kann man die Therapie je nach Stadium unterstützen. Akupunktur als zusätzliche Option senkt den Analgetikaverbrauch und durchbricht ebenfalls den Circulus vitiosus [31,34]. Bei jüngeren Patienten mit rezidivierenden Schmerzepisoden bietet sich die peridurale Anästhesie (PDA) an, wobei es durch Injektion eines Analgetikums in Kombination mit einer Kortisonverbindung zur Wurzelabschwellung und Reizlinderung kommt und somit eine schnellere Aufnahme von konservativen Therapieoptionen ermöglicht wird.

Perkutane lumbale intradiskale Therapien wie Chemonukleolyse oder Laserdiskotomie werden bei Bandscheibenprotrusionen, diskogen bedingten Ischialgien über 6 Wochen oder Patienten mit hohem Leidensdruck eingesetzt. Indikationen zur operativen Behandlung sind konservativ frustan verlaufende Fälle, zunehmende sensible oder

motorische Störungen, sowie grosse Vorfälle mit dadurch erhöhter Komplikationsrate. Absolute Indikationen sind akute Lähmungen, das Kauda – Equina Syndrom und Reithosenanästhesien. Bevorzugte operative Methoden sind die mikroskopische oder endoskopische Diskektomie. Der Einsatz beider Operationstechniken wird in der Literatur kontrovers diskutiert [76,105]. Bei postoperativer Segmentinstabilität kann zusätzlich eine dorsale Spondylodese oder eine Interbodyfusion indiziert sein. Der Outcome des operativen Ergebnisses ist abhängig von der Grösse des Vorfalles, dem Alter des Patienten, dem Zustand des Bandscheibenrestgewebes und der OP-Methode [19,76]. Ursachen für das Bestehen bleiben oder Wiederauftreten einer Ischialgie postoperativ sind unter anderem eine unzureichende Nervenwurzeldekompression, ein Rezidivprolaps im selben Segment, Prolaps oder Protrusion in einem anderen Segment, sowie Narbengewebsbeschwerden (Postdiskektomie-syndrom) [55].

Zur Festigung des Therapieergebnisses dienen Muskelstabilisierung und Kräftigung durch physiotherapeutische Maßnahmen. Die Schulung der Patienten in bandscheibenschonenden Bewegungsabläufen, Rundrücken- und Hohlkreuzprophylaxe sind ebensowichtig wie die Wiederherstellung der Beweglichkeit im betroffenen Wirbelsäulenabschnitt, um einer Überlastung benachbarter Segmente vorzubeugen und die physiologische Lordose der LWS zu unterstützen.

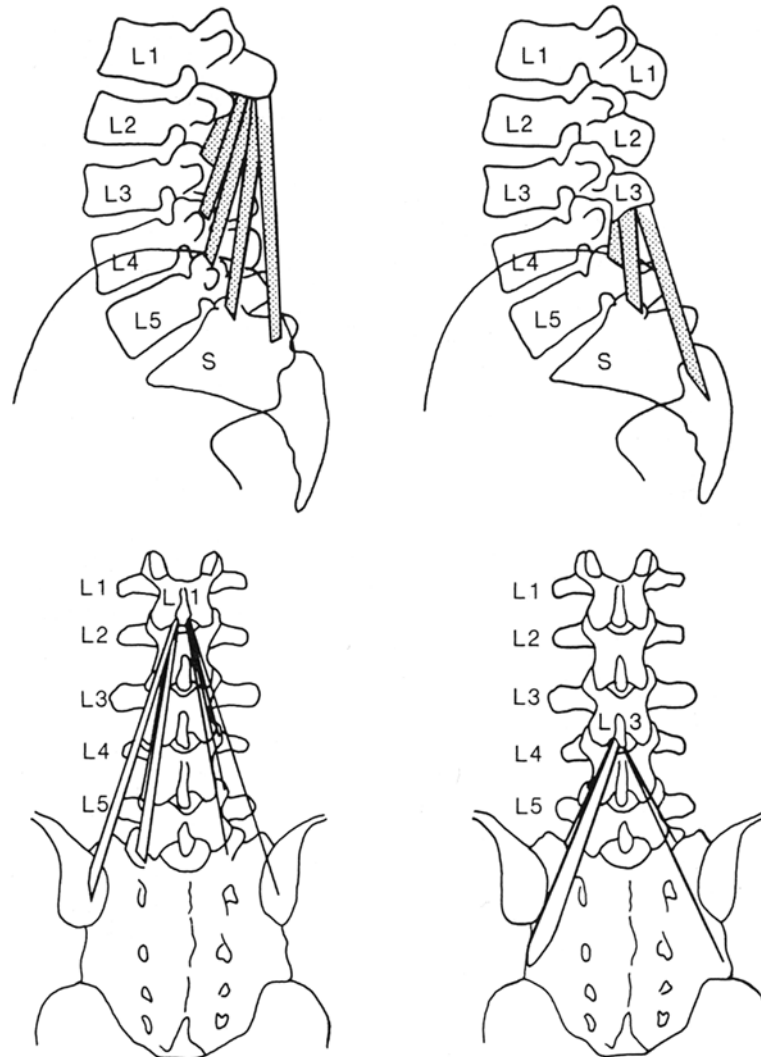
## 1.2. Autochthone Rückenmuskulatur

### 1.2.1. Musculus multifidus

Die dem Achsenskelett dorsal unmittelbar aufliegenden Muskeln werden als autochthone Rückenmuskeln bezeichnet und entsprechen dem M. erector spinae [83]. Man unterteilt ihn in einen medialen und einen lateralen Trakt. Die Einteilung erfolgt nach Lage und Innervation. Der laterale, oberflächliche Trakt, der hauptsächlich aus langen Muskelzügen besteht, wird nochmals in ein intertransversales, ein sakrospinales und ein transversospinales System unterteilt. Der mediale, tiefe Trakt besteht aus

kurzen und langen Muskelzügen und wird in ein spinales und ein spinotransversales System untergliedert [83]. Zu letzterem gehört der M. multifidus. Er ist besonders in der zervikalen und lumbalen Region ausgeprägt und nimmt nach kaudal an Masse zu.

Abbildung 1 Anordnung des Musculus multifidus (nach Kalimo et al. [48])



Im lumbalen Bereich untergliedert sich der M. multifidus in 5 separate Gruppen, wie in Abbildung 1 dargestellt ist. Jede dieser Gruppen entspringt von einem Processus spinosus von L1 bis L5 und besteht aus mehreren Faszikeln, von fünf bei L1 zu einem bei L5. Der kürzeste Faszikel inseriert am Processus mammillares zwei Wirbel tiefer und der nächstlängere immer einen Wirbel tiefer, wobei der Längste am Sakrum inseriert. Dabei liegen die kranialen Anteile oberflächlich über den Kaudalen [48].

Der M. multifidus wird innerviert vom Ramus medialis des Ramus dorsales der segmental entsprechenden Spinalnerven. Die Innervation ist unisegmental, wobei jeder Faszikel der an L(x) [x=1-5] entspringenden Gruppe vom Spinalnerven L(x) versorgt wird und keine Kollateralinnervation existiert. Im Gegensatz dazu zeigt der M. erector spinae intersegmentale Kollateralisationen [48].

Die Funktionen des M. multifidus sind Extension der Wirbelsäule, jedoch ohne Translation der Wirbel, bei einseitiger Aktivität Rotation und Seitneige, sowie Antagonist der Bauchmuskulatur. Vor allem sein sakrolumbaler Anteil ist ein wichtiger Teil des Verspannungssystems der Wirbelsäule und trägt so zu ihrer Stabilisierung bei. Insuffizienzen in diesem muskulären System führen zu Instabilitäten mit dadurch erhöhter Verletzungsgefahr im lumbalen Bereich oder typischen Schmerzsyndromen [48,65,81].

Alle Muskeln enthalten zwei Haupttypen von Muskelfasern. Typ-1 Fasern sind langsam kontrahierend (slow-switch) mit einem oxidativen Stoffwechsel. Sie sind vor allem für tonische Muskelarbeit zuständig. Typ-2 Fasern sind schnell kontrahierend (fast-switch), haben einen mehr glykolytischen Stoffwechsel und sind hauptsächlich in phasischen Muskeln anzutreffen. Bei der Muskelkontraktion reagieren zuerst die Typ-1 Fasern und erst bei grösserer oder schneller Rekrutierung die Typ-2 Fasern. Die relative Anzahl der unterschiedlichen Fasertypen in den einzelnen Muskeln variiert in Abhängigkeit von deren Funktion und, wie in einigen Studien gezeigt wurde, der Veranlagung interindividuell [48,65,69]. Im M. multifidus dominieren, laut Literaturangaben, die Typ-1 Fasern mit 64% - 66% gegenüber den Typ-2 Fasern [47,65,69] mit individuellen Schwankungen der Untersuchten von 36% - 93% [47].

### 1.2.2. Myopathologie

Die Skelettmuskulatur zeigt unter pathologischen Bedingungen morphologische Veränderungen wie andere Gewebe auch, aber sie hat zwei spezielle Charakteristiken, die ihre Reaktionen bei Verletzungen oder Krankheiten beeinflussen.

Erstens ist jede Muskelfaser ein Synzytium, welches durch Fusion von vielen hundert Myoblasten entstanden ist und zweitens besteht ein grosser Anteil aus kontraktilen Elementen [68]. Veränderungen können also einen kleinen Teil einer Faser betreffen oder zu verschiedenen Zeiten unterschiedliche Teile der Faser. Des Weiteren kann dadurch, dass der Muskel ein funktionell spezialisiertes Gewebe ist, eine primäre Pathologie zu sekundären Begleiterscheinungen führen, welche nur schwer von der initialen Schädigung zu unterscheiden sind. In der Diagnostik werden die einzelnen Prozesse meistens drei Hauptsyndromen zugeteilt, da das Einzelsymptom oft keine genügende Aussagekraft besitzt. Man unterscheidet ein neurogenes, ein myopathisches und ein myositisches Gewebssyndrom [45].

Pathologische Muskelreaktionen die dem Neurogenen zugeordnet werden, sind elongierte atrophische Fasern, Gruppenatrophien, polygonal atrophische Fasern, Kernkonglomerate, Faser-Typ-Gruppierung, hypertrophe Muskelfasern und die Zentralisation von Muskelfaserkernen. Die meisten beruhen auf der Tatsache, dass das Motoneuron den Muskelfasertyp bestimmt. Dazu gehört die Gruppenatrophie, hervorgerufen durch insuffiziente Reinnervation, und die durch De- und Reinnervation in einem Muskelfaszikel auftretende Faser-Typ-Gruppierung. Da die Fasern verschiedener motorischer Einheiten in Form eines Mosaiks verteilt sind, erscheinen die atrophierten Fasern, aufgrund der Rauminanspruchnahme der benachbarten noch innervierten Fasern und die Abnahme der Myofibrillenanzahl, elongiert. Kernkonglomerate, als Restbestandteil von atrophischen Muskelfasern, Faserspaltbildungen, sowie zentralisierte Kerne sind Zeichen von chronischen Denervierungsprozessen. Bei diesen treten oft auch myopathische Veränderungen als Zeichen einer sekundären Begleitmyopathie auf.

Zum myopathischen Gewebssyndrom gehören degenerative und regenerative Muskelfasern, die Invasion von Makrophagen, eine Begleitentzündung sowie eine peri- oder endomysiale Bindegewebsvermehrung. Die regenerierenden Fasern erscheinen in der Hämatoxylin-Eosin Färbung, aufgrund erhöhter RNA Synthese, basophil und zeigen viele vesikuläre Kerne mit prominenten Nucleoli [24]. Die Abräumung der



wachsig, hyalinen Degeneration erfolgt als Myophagie durch invasive Makrophagen.

Die Degeneration kann je nach Lokalität und zeitlichem Auftreten auf ihre Ursache hinweisen. Monophasisch-monofocal meist bei Muskeltraumen, monophasisch-polyfocal tritt sie eher bei toxischen oder ischämischen Schäden auf und polyphasische-polyfocale Prozesse sind ein Hinweis auf genetisch bedingte oder chronische Myopathien.

Das myositisches Gewebssyndrom ist vor allem durch die Prädominanz von Rundzellinfiltraten, welche perivaskulär, peri- oder endomysial liegen können, gekennzeichnet oder das Auftreten von granulomatösen Infiltraten. Bei der primären Myositis dringen Lymphozyten und Makrophagen oft in gesunderscheinende Muskelfasern ein. Da bei den anderen Gewebssyndromen sekundär ebenfalls mononucleäre Infiltrationen beobachtet werden können, ist die Abgrenzung des rein myositisches Syndroms schwierig.

Es gelingt nicht immer die pathologischen Prozesse einer Muskelbiopsie einem speziellen Gewebssyndrom zuzuordnen. Die Beurteilung lautet dann „diagnostisch unspezifische myopathologische Veränderungen“ [45].

### 1.2.3. Myopathologie des M. multifidus beim lumbalen Bandscheibenvorfall

Die paraspinale Muskulatur spielt eine grosse Rolle bei der funktionell korrekten Bewegung und Stabilität der Wirbelsäule, aber ihre Rolle im Rahmen der muskulären Dysbalance ist noch unklar [39]. Der M. multifidus ist der grösste und medialste Muskel im lumbalen Bereich und für zwei Drittel der Stabilität in der LWS verantwortlich [111].

Es gibt viele Studien die sich mit den pathologischen Veränderungen des M. multifidus im Zusammenhang mit dem lumbalen Bandscheibenvorfall beschäftigt haben. Das Hauptinteresse richtete sich dabei auf die Verteilung und Pathologie der Muskelfasertypen. Die Ergebnisse sind sehr kontrovers. Einige Autoren beschreiben eine signifikante Abnahme sowohl des Typ-1 als auch des Typ-2 Faserdurchmessers [113,114,116], andere hingegen sehen keinen Zusammenhang mit der Atrophie beider Fasertypen [26,69], oder nur mit einer Abnahme des Typ-2

Faserdurchmessers [117]. Ebenfalls fanden sich klassische Zeichen der Denervation wie Faser-Typ-Gruppierung, elongierte atrophische Fasern, Gruppenatrophien und zentralisierte Kerne [116]. Einige myogene Schäden wurden, etwas stärker auf der betroffenen als auf der normalen Seite, gefunden und als Folge muskelspasmusinduzierter Ischämien oder muskulärer Überlastungen gewertet [116]. Trotz dieser Diskrepanzen lässt sich eine Schädigung und Schwächung der erkrankten Seite feststellen und dadurch bedingt eine Instabilität der Wirbelsäule.

Die Frage ist, ob diese Pathologie Ursache oder Konsequenz einer bandscheibenbedingten Erkrankung ist. Ob die Muskelatrophie bei diesem Krankheitsbild [39] nun durch Denervation, schmerzreflektorische Verspannungen, Fehlbelastung, auch im täglichen Leben der heutigen Zeit, oder Inaktivität hervorgerufen wird, so führt sie doch zu einem Kraft- und Kontrollverlust [61,81], verbunden mit einer erhöhten Disposition für Instabilitäten, Überlastungen, Verletzungen oder degenerative Veränderungen im LWS Bereich [38,39,81,96]. Da der M. multifidus den grössten Anteil an der Stabilisierung der unteren LWS hat, kann jede pathologische Veränderung einen Effekt auf die lumbale Segmentstabilität und damit die physiologische Funktion haben.

### 1.3. Satellitenzelle

#### 1.3.1. Biologie

Satellitenzellen sind spindelförmige, mononucleäre Zellen, die zwischen dem Plasmalem und der Basalmembran von Skelettmuskelfasern liegen und zuständig für das Muskelwachstum und die Regeneration sind [70]. Sie können sich in myogene, osteogene und adipogene Zelllinien differenzieren [3]. Ihre Verteilung im Muskel ist abhängig von Ort, Muskeltyp und Alter [16,25]. In der Nähe der neuromuskulären Verbindung ist die Satellitenzellzahlfrequenz bis auf das zwanzigfache erhöht, morphologisch besteht aber keine Verbindung zur Nervenendigung [25].

Bei der Geburt stellen sie ca. 32% und im Erwachsenenalter nur noch 5 - 8% der Muskelfaserkerne, die unter der Basalmembran liegen, dar

[18,89,94]. In Typ-1 Fasern (slow switch) ist ihr Anteil 1 – 4%, wohingegen ihre Anzahl in Typ-2 Fasern (fast switch) auf das 3 – 4fache steigt [25,28,89]. Während des Muskelwachstums sind die Satellitenzellen durch Proliferation, Differenzierung und Fusion mit den Muskelfasern für die Erhöhung der Muskelfaserkerne verantwortlich. Dabei entstehen zuerst aus jeder Satellitenzelle zwei Tochterzellen. Die eine proliferiert und differenziert sich weiter, die zweite bleibt in der G<sub>0</sub> Phase des Zellzyklus zurück und fungiert als Reserve- oder Stammzelle [18,25,95]. Durch diesen Selbsterhalt nimmt die absolute Zahl der Satellitenzellen nicht ab.

In der Literatur findet man ihre Unterscheidung in zwei Populationen, mit Differenzen in Zellzykluszeit und Morphologie, wobei eine das Reservezellkompartiment darstellt, dessen Zellen erst mehrere Zellzyklen durchlaufen müssen, bevor sie zur Fusion bereit sind, und die andere das Kompartiment mit proliferationsbereiten Zellen [71,73,95]. Asakura et al. [4] beschrieben neben den Satellitenzellen die „side population cells“ im Skelettmuskel, welche pluripotent sind, einen positiven Einfluss auf die Proliferation von Myoblasten haben und unter bestimmten Bedingungen sogar selbst zu Myocyten differenzieren können. „Muscle-derived stem cells“ werden von Deasy et al. [22] beschrieben und durch ihr größeres Differenzierungspotentials im Vergleich zur Satellitenzelle als weitere Stammzellpopulation betrachtet.

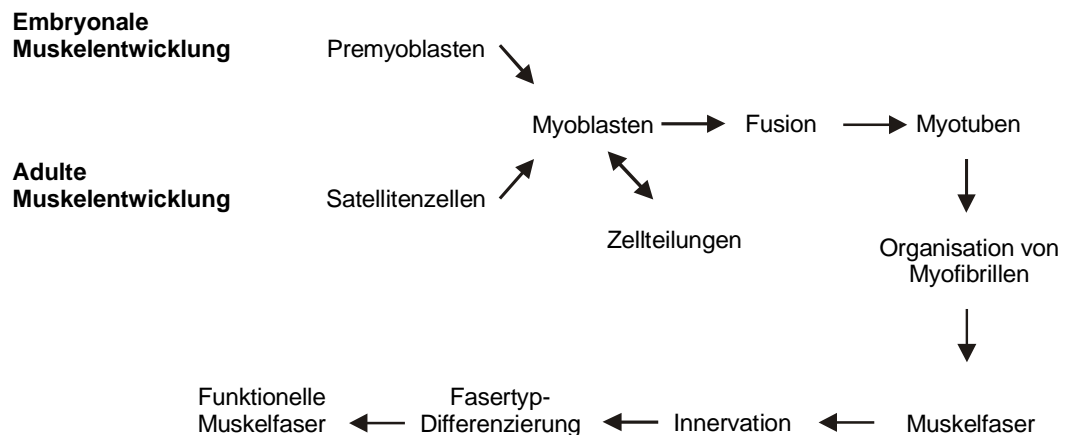
Aufgrund der eingeschränkten lichtmikroskopischen Identifizierung der Satellitenzellen hat man sich verschiedene Antikörper gegen spezifische Strukturen als Marker zunutze gemacht. Einige Bewährte sind *N-CAM* (neural cell adhesion molecule, CD56), *Desmin* oder Transkriptionsfaktoren wie *myogenin*, *MyoD1*, *myf-5* und *6*, mit denen auch der Funktionszustand erfasst werden kann [30,43,94].

### 1.3.2. Regeneration

Die Regeneration von geschädigten Muskelfasern erfolgt durch die Satellitenzellen, als Grundlage für die Myoblasten, die für die Reparatur nötig sind [94]. Abbildung 2 zeigt eine grafische Darstellung der Stadien während der embryonalen und adulten Muskelregeneration. Sie ist

abhängig von der Schwere der Schädigung, der Innervation, der Vaskularisation und der Anwesenheit von diffusiblen Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren [11,13,94]. Der physiologische Kontakt der Satellitenzelle mit der Muskelfaser inhibiert deren Proliferation durch Desensibilisierung gegen mitogene Reize [13].

Abbildung 2 Stadien der Muskelregeneration



Bei fokalen Schädigungen beschränkt sich die Aktivierung meist auf die Satellitenzellen der betroffenen Faser [25]. Grössere Alterationen bewirken durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Chemotaxinen einen grossen Proliferationsreiz auf die Umgebung [12,25]. 16-18 Stunden nach dem mitogenen Stimulus beginnt die DNA-Synthese in den Satellitenzellen [11,25]. Die frühe Proliferation mit anschließender Myotubenbildung durch Fusion ist innervationsunabhängig. Die Reifung zur Muskelfaser benötigt hingegen eine nervale Versorgung [13,25]. Bei besonders schweren Muskelschäden mit Satellitenzelluntergang, können durch Migration Satellitenzellen aus weiter entfernten Faszikeln die Regenerationsfunktion übernehmen [12,25,94]. Dabei penetrieren sie die Basalmembran, um an den Ort der Schädigung zu gelangen. Diese Erkenntnis ist wichtig für den Einsatz von autologen Transfer - Therapien in der Zukunft [12].

Man unterscheidet bei der Regeneration eine Kontinuierliche, durch Fusion von Myoblasten mit noch vitalen Muskelfaserstümpfen, von einer Diskontinuierlichen, bei der aus Satellitenzellen neufusionierte Myotuben die zerstörten Strukturen im Plasmalemschlauch überbrücken [25,20].

Das Proliferationspotential der Satellitenzellen, in Form von verbleibenden Zellteilungen, vermindert sich mit jeder durchgemachten Regeneration, da es zu Telomerverkürzungen kommt, was bei alten Menschen und Myopathien nachgewiesen wurde [85,93]. Muskelerkrankungen wie Dystrophien, Polymyositis, Myotonien, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Spinale Muskelatrophie (SMA) zeigen eine gegenüber dem Normalen erhöhte Satellitenzellzahl von 10 -20% [14,42,103,109]. Die Dystrophien zeichnen sich durch ein ständiges Nebeneinander von Degeneration und Regeneration aus, wodurch die Zellteilungskapazität der Satellitenzellen herabgesetzt ist [42,63]. Trotz erhöhter Zellzahlen und in einigen Studien gezeigter Aktivierung der Satellitenzellen kommt es zur Abnahme der Muskelfasern [44,109]. Dieser Widerspruch lässt eine ineffiziente Regeneration vermuten. Ein eventuell kongenitaler Defekt der Satellitenzellen wurde noch nicht untersucht. Bei Denervierungsprozessen erhöht sich die Anzahl der Satellitenzellen bis auf das 2-3fache [98]. Dies ist jedoch auf eine kurzzeitige Denervierung beschränkt und geht bei chronischen Verläufen in eine Zellzahlabnahme über [63]. Da bei neurogenen Schäden keine nekrotischen Fasern ersetzt werden müssen, erfolgt die Myotubenbildung im Interstitium [20,25]. Die Bildung von Tochterfasern erscheint wie eine Fragmentierung der Muskelfaser. Bei längerfristiger Denervation kommt es zu einer Veränderung der muskelspezifischen Isoenzyme und die Muskelfaserreifung stagniert [25,67]. Eine Studie zeigte bei ALS, trotz erhöhter Aktivierung der Satellitenzellen und anfänglich erhöhter Zahl der Satellitenzellen, kaum oder keine regenerativen Muskelfasern *in-vivo*, was auf eine Störung der Regeneration hinweisen kann [44]. Sollte es primäre Störungen der Satellitenzelle geben, so könnten diese durch insuffiziente Regeneration zu einer Schwächung der Muskulatur führen, verbunden mit muskulären Instabilitäten im Bewegungsapparat.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Übersicht

In diesem Kapitel wird zuerst das Patientengut dargestellt und dann die Gewinnung der Muskelbiopsien beschrieben. Anschliessend werden die zellbiologischen Methoden ausführlich dargelegt. Am Ende des Kapitels wird auf die Schnittpräparategewinnung und die verschiedenen histologischen Färbemethoden eingegangen.

### 2.2. Patienten

Bei 24 Patienten (Tabelle 2, S. 23), die sich zwischen Mai 2000 und Juni 2001 in stationärer Behandlung in der Klinik für Orthopädie der Universitätsklinik Magdeburg befanden, wurde im Rahmen eines operativen Eingriffes eine Muskelbiopsie aus dem Musculus multifidus entnommen. Die Biopsieentnahme erfolgte entsprechend der Richtlinien der Ethikkommission der Universitätsklinik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. (Alle Patienten wurden mindestens 24 Stunden vor der Operation über die Studie aufgeklärt. Voraussetzung für die Gewinnung einer Muskelbiopsie war die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten nach ausreichender Aufklärung und Bedenkzeit.)

20 Patienten unterzogen sich einer Diskotomie bei lumbalem Bandscheibenvorfall. Die Kontrollbiopsien wurden von 4 Patienten gewonnen, wobei 2 Patienten zur Frakturversorgung und 2 Patienten zur diagnostischen Entnahme bei Tumorverdacht kamen. Dabei handelte es sich um 17 Männer und 6 Frauen im Alter zwischen 19 und 79 Jahren.

Bei einem Patienten konnte aufgrund einer zu geringen Biopsiemasse weder eine Zellkultur noch ein auswertbarer Muskelkryoschnitt angefertigt werden.

Die demographischen, anamnestischen und klinischen Patientendaten wurden den Krankenakten entnommen.

### 2.3. Muskelbiopsie

Bei der Diskotomie erfolgte nach der Lagerung auf dem Wilson-Rahmen ein Hautschnitt neben der Dornfortsatzreihe in Höhe des betroffenen Segments. Nach der Spaltung der Fascie und Darstellung der paravertebralen Muskulatur entnahm der Operateur eine Muskelbiopsie aus dem segmental versorgten Bereich des M. multifidus. Diese wurde auf direktem Wege in das Institut für medizinische Neurobiologie gebracht und im Labor weiterverarbeitet. Die Biopsie wurde in zwei Teile zerlegt, ein Teil für die histologische Diagnostik und der andere für die zellbiologische Aufarbeitung.

Tabelle 2 Patientenkollektiv

	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Diagnose</b>
<b>Fall 1</b>	m	46	NPP L4-5
<b>Fall 2</b>	m	58	NPP L4-5
<b>Fall 3</b>	w	49	NPP L4-5
<b>Fall 4</b>	m	51	NPP L2-3 u L3-4
<b>Fall 5</b>	m	40	NPP L5-S1
<b>Fall 6</b>	w	60	NPP L4-5
<b>Fall 7</b>	w	47	NPP L4-5
<b>Fall 8</b>	m	37	NPP L4-5 u L5-S1
<b>Fall 9</b>	m	35	NPP L5-S1
<b>Fall 10</b>	m	52	NPP L5-S1
<b>Fall 11</b>	m	49	NPP L4-5
<b>Fall 12</b>	m	41	NPP L5-S1
<b>Fall 13</b>	m	49	NPP L4-5
<b>Fall 14</b>	m	29	NPP L4-5 u L5-S1
<b>Fall 15</b>	m	44	NPP L4-5
<b>Fall 16 K</b>	m	31	BWK 11 Fraktur
<b>Fall 17 K</b>	w	50	V.a. Met. Th8
<b>Fall 18 K</b>	m	75	V.a. Met. L5
<b>Fall 19</b>	w	79	NPP L4-5
<b>Fall 20</b>	m	56	NPP L4-5
<b>Fall 21</b>	w	42	NPP L5-S1
<b>Fall 22 K</b>	m	20	LWK 1 Fraktur
<b>Fall 23</b>	m	19	NPP L5-S1

NPP: Nucleus pulposus prolaps, V.a.: Verdacht auf, K: Kontrolle, u: und, Met.: Metastase, m: männlich, w: weiblich

## 2.4. Satellitenzellkultur

### 2.4.1. Zellisolierung

Die Isolierung der adulten Satellitenzellen erfolgte nach der Methode von Allen R.E. et al. (1982) [2] mit Modifizierungen.

Die gewonnene Muskulatur wurde von Sehnen, Fascien und Fettgewebe befreit, gewogen, mit warmem PBS (phosphat buffered saline) gespült und in ca. 1mm<sup>3</sup> kleine Stücke zerkleinert. Diese wurden zusammen mit 3 ml PBS/g Muskulatur, welches 1,25 mg/ml Protease Typ XVII vom Streptomyces griseus enthielt (Fa. Sigma P5147), in ein Falconröhrchen (50 ml Zentrifugationsröhrchen, Fa. Greiner) gegeben und anschließend 1 Stunde bei 37°C, unter viertelstündigem Schütteln, inkubiert. Dann wurde die Suspension bei 2000 U/min für 4 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, 40 ml (Gesamtvolumen) warmes PBS zugefügt und auf dem Vortex-Mixer (Reax 2000, Fa. Heidolph) 20 Sekunden gemischt. Diese Suspension wurde für je 10, 8 und 5 Minuten bei 700 U/min zentrifugiert, wobei als Zwischenschritt der Überstand gesammelt, neues PBS hinzugefügt und die Gewebesuspension wieder gemischt wurde. Die Überstände wurden zusammengeführt und für 3 min bei 2000 U/min zentrifugiert um die Zellen zu pelletieren.

Abbildung 3 Kulturmedien für adulte Satellitenzellen

Medium	Prozent	
<b>Isolationsmedium</b>	88	DMEM mit HEPES
	10	HS (horse serum)
	1	Penicillin/Streptomycin
	1	L-Glutamin
<b>Proliferationsmedium</b>	78	DMEM mit HEPES
	20	FCS (foetal calf serum)
	1	Penicillin/Streptomycin
	1	L-Glutamin
<b>Differentiationsmedium</b>	96	DMEM mit HEPES
	2	HS (horse serum)
	1	Penicillin/Streptomycin
	1	L-Glutamin



Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte die Zugabe von DMEM + 10% HS (Isolationsmedium siehe Abb. 3) zum Zellpellet unter Volumen Anpassung auf 1 ml Medium pro g Biopsieausgangsmasse. Die Zellsuspension wurde durch ein steriles Metallsieb gegossen, mit DMEM + 10% HS gespült, dann durch ein Zell-Dissoziationssieb gegossen und nochmals mit DMEM + 10% HS gespült. Im Anschluss daran wurde diese Zellsuspension bei 700 U/min für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit Isolationsmedium resuspendiert und auf eine finale Konzentration von 1 g Ausgangsgewebe pro ml gebracht. Abschliessend wurden die Zellen in einer sterilen Kulturschale (Fa. NUNCA, Nunclon) ausgesät (1 g Muskelgewebe/ 400 mm<sup>2</sup>) und bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Beim ersten Mediumwechsel nach 2 Tagen wurde auf das Proliferationsmedium umgestiegen. Dieses wurde jeden dritten Tag gewechselt und nach ausreichendem Wachstum erfolgte das Umsetzen der Satellitenzellen in eine kleine Kulturflasche (Fa. NUNCA, Nunclon). Nach jedem Vollwachsen der Flasche wurden die Zellen in drei nächstgrössere Flaschen umgesetzt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Kulturmedien zeigt Abbildung 3.

#### 2.4.2. Trypsination

Das Umsetzen der Satellitenzellen erfolgte durch Trypsination bei sterilen Bedingungen unter einer Laborwerkbank. Zuerst wurde das Medium entfernt, die Kulturflasche mit HBSS zweimal behutsam gewaschen und dann Trypsin-EDTA (Accutase), in gleicher Menge wie sonst das Medium, zugegeben. Das entsprach 4 ml für kleine, 8 ml für mittlere und 20 ml für grosse Kulturflaschen. Nach 5-10 min Inkubation bei 37°C wurde die Trypsination der Zellen durch Zugabe der gleichen Menge Medium geblockt. Danach wurde die Flasche zweimal mit einer grossen Pipette gespült, um eventuell noch anhaftende Zellen abzulösen. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt, 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 100-1000 µl Medium

resuspendiert, um sie anschliessend auf drei mit Medium gefüllte Kulturflaschen zu verteilen.

#### 2.4.3. Einfrieren und Auftauen

**Einfrieren:** Nach 5-6 Passagen wurden die Satellitenzellen eingefroren, um für eventuelle spätere Experimente noch genügend Zellen zur Verfügung zu haben. Die Satellitenzellen wurden, wie unter 2.4.2. beschrieben, abtrypsiniert. Ein spezielles Einfriermedium wurde angefertigt, entsprechend 70 % Proliferationsmedium, 20% FCS und 10% DMSO, und dann auf Eis gelegt. Das bei der Trypsination gewonnene Zellpellet wurde bei Raumtemperatur mit 100-1000 µl Einfriermedium resuspendiert und anschliessend in entsprechender Konzentration in auf Eis stehende Kryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden für 2 Stunden bei -20°C und dann über Nacht bei -80°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen (Fa. NUNCA) mit der Satellitenzellsuspension zur Lagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

**Auftauen:** Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und im 37°C warmen Wasserbad unter ständiger Bewegung aufgetaut, bis kein Eis mehr sichtbar war. Die Zellsuspension wurde zusammen mit warmem Proliferationsmedium in ein 15 ml Röhrchen gegeben und 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 4 ml warmem Proliferationsmedium resuspendiert und in 25 cm<sup>2</sup> kleine Kulturflaschen, die Medium enthielten, gegeben. Dann wurden die Satellitenzellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### Material, Puffer (2.4.1.-2.4.3.)

- PBS: Fa. Fluka (10 x Konz.), Cat.Nr.79383
- Protease Typ XVII: Fa. SIGMA, Cat.Nr. P5147
- DMEM (low glucose) Fa. PAA, Cat.Nr. 15-007
- Horse Serum: Fa. Gibco, Cat.Nr. 26050-039
- FCS: Fa. PAA, Cat.Nr. A11-042

- HEPES Fa. Sigma, Cat.Nr. H-0887  
 1 M = 1,55 % = 15,5 mM  
 500 ml + 7,75 ml
- PENICILLIN/STREPTOMYCIN Fa. Life Technologies, Cat.Nr. 15140-114  
 5000 IU/ml / 5000 IG/ml = 1%  
 500 ml + 5 ml
- L-GLUTAMIN: Fa. Life Technologies, Cat.Nr. 25030-024  
 29,2 mg/ml  
 200 Mm/ml = 1% = 2 mM/ml  
 500 ml + 5 ml
- HBSS Fa. PAA, Cat.Nr. H15010  
 (Hanks balanced salt solution):
- Trypsin-EDTA (Accutase): Fa. PAA, Cat.Nr. L11-007
- DMSO: Fa. Sigma, Lot.Nr. 99H0020
- Metallsieb (60 mesh): Fa. Sigma, Cat.Nr. S-1020
- Zell-Dissoziationssieb (200 mesh): Fa. Sigma, Cat.Nr. S-4145
- Zentrifuge (Megafuge 1.0R): Fa. Heraeus

#### 2.4.4. May-Grünwald Färbung

Zur Beurteilung des Fusionsindex der Satellitenzellen der jeweiligen Biopsie wurden die Zellen von einer grossen Kulturflasche abtrypsinisiert und in 20 kleine Kulturschalen ausgesät. Diese Zellen bekamen dann anstatt des Proliferationsmediums ein Differenzierungsmedium, welches für die Fusion nötig ist. Einen Tag nach dem Aussäen wurde mit der Auswertung begonnen. Dafür wurden 10 Tage lang jeden Tag zwei Schälchen nach May-Grünwald gefärbt und anschliessend unter dem Axiophot (Fa. Zeiss) ausgezählt und für die Datenarchivierung fotografiert (Kamera: Microview RTE/CCD-768K/1, Fa. Visitron Systems GmbH; Software: WinView). Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

Das Differenzierungsmedium wurde entfernt, die Schalen mit HBSS gespült und ca. 1,5 ml May-Grünwald-Lösung (Fa. Fluka, Cat.Nr. 63590) für 10 min dazugegeben. Anschliessend wurde mit Aqua dest. ausgiebig gespült und für 15 min 10% Giemsa-Lösung (Fa. Fluka, Cat.Nr. 48900) dazugefügt. Dann wurde noch einmal mit Aqua dest. gespült.

Zur Auswertung wurde mit einem 10x oder 20x Acroplan-Objektiv mikroskopiert. Es wurden pro Schälchen 8 Gesichtsfelder in verschiedenen zentralen und lateralen Positionen fotografiert und

ausgezählt. Dabei ergaben sich pro Tag und Biopsie 200 bis 600 Zellkerne.

#### 2.4.5. Fusionsindex

Der Fusionsindex ist die Prozentzahl der Myoblasten die fusioniert sind. Er berechnet sich aus der Zahl der Zellkerne, die sich im Gesichtsfeld innerhalb einer vielkernigen Zelle oder Myotube befinden, dividiert durch die Gesamtzahl der Kerne im gleichen Feld, multipliziert mit 100.

#### 2.5. Muskelhistologie

##### 2.5.1. Kryofixierung und Schnittpräparate

Das Stück der Muskelbiopsie, welches für die histologische Aufarbeitung bestimmt war, wurde entsprechend der Faserrichtung mit Tissue-Tek (Fa. Miles) auf einem entsprechend nummerierten Korkplättchen fixiert. In der Zwischenzeit wurde ein Becher mit 2-Methylbutan (Fa. Roth) in flüssigen Stickstoff gestellt, um es für das Einfrieren der Biopsie vorzubereiten. Zum Schockgefrieren wurde das Korkplättchen mit dem Muskelgewebe für 1 min in das 2-Methylbutan getaucht und dann zur weiteren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff gebracht.

Von diesen tiefgefrorenen Muskelbiopsien wurden mit einem Mikrotom (HM505, Fa. MicroM) Kryoschnitte von 5-10µm Stärke hergestellt. Diese wurden auf Objektträger (Fa. Merck, Cat.Nr. 6319403) aufgezogen und sofort gefärbt oder für spätere Färbungen bei -20°C gelagert.

##### 2.5.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Zur histologischen Beurteilung der Biopsien wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Die Objektträger mit den bei -20 °C gelagerten Muskelkryoschnitten wurden in eiskaltem Aceton (Fa. Fluka, Cat.Nr. 00560) für 10 min fixiert und dann luftgetrocknet. Danach wurden sie für 15 min in Hämatoxylin

nach Mayer (Fa. Merck, Best.Nr. 1.09249.0500) gegeben, dann mit Aqua dest. gespült und für 15-20 min unter laufendem Wasser „gebläut“. Zu den Schnitten wurde für 5 min Eosin 0,5% (Fa. Sigma, Best.Nr. HAT 110-2-16) mit 1 Tropfen/ml Eisessig (Fa. Roth) gegeben, dann wieder mit Aqua dest. gespült und anschliessend wurden sie in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80% und 96%) differenziert. Zuletzt wurden sie in Xylol (Fa. Roth, Cat.Nr. 9713.1) getaucht und dann mit DePex (Fa. Serva, Best.Nr. 18243) eingebettet.

Die histologische Auswertung erfolgte mit dem Axiophot (Fa. Zeiss), einem 10x oder 20x Acroplan-Objektiv, unter Benutzung definierter Gesichtsfelder. Die myopathologischen Kriterien wurden wie folgt festgelegt:

- neurogen:
  - regenerative Muskelfasern (Basophilie)
  - elongierte Muskelfasern
  - Gruppenatrophien
  - polygonal atrophische Muskelfasern
  - Kernkonglomerate
  - hypertrophierte Muskelfasern
  - zentralisierte Muskelfaserkerne
  
- unspezifisch myopathologisch:
  - regenerative Muskelfasern (Basophilie)
  - degenerative Muskelfasern
  - Invasion von Makrophagen
  - Begleitentzündung
  
- myositisch:
  - prädominante Rundzellinfiltrate
    - perivaskulär
    - perimysial
    - endomysial

Pro Gesichtsfeld wurden die Muskelfasern gezählt und die histopathologischen Veränderungen auf 100 gezählte Muskelfasern bezogen.

### 2.5.3. Immunfluoreszenzfärbung der Satellitenzellen

Zur Beurteilung der Satellitenzellsituation *in-situ* entschieden wir uns für eine Immunfluoreszenzfärbung der Muskelschnitte mit dem satellitenzell-spezifischen Antikörper gegen das Antigen CD<sup>1</sup>56 [30,88,91], um einen Vergleich zur Zellkultur zu haben. Ausserdem haben wir einen zweiten Antikörper in Form des Endothelzellmarkers CD36 [88,92] eingesetzt, um der Hypothese einer früheren Studie nachzugehen [92]. Die Autoren hatten beobachtet, dass CD36 positive Zellen aus dem Gefäßsystem in den Muskel einwanderten und dort zu einer Art myogener Stammzelle differenzierten.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung unterscheidet man eine direkte von einer indirekten Methode. Benutzt man einen spezifischen Antikörper, welcher mit einem Farbstoff markiert ist, um die gesuchte Struktur darzustellen, so nennt man dies eine direkte Färbung. Bei der indirekten Variante benutzt man zuerst einen unmarkierten spezifischen Antikörper gegen die gesuchte Struktur. Im zweiten Schritt wird nun ein mit Farbstoff markierter Antikörper, welcher spezifisch am ersten Antikörper bindet, benutzt, um die gesuchte Struktur sichtbar zu machen. Dabei verbessert sich die Darstellbarkeit, da sich mehrere Zweitantikörper am Erstantikörper binden können. Zur Sichtbarmachung müssen die Farbstoffmarkierungen Licht mit einer bestimmten Wellenlänge ausgesetzt werden, um die Fluoreszenz zu aktivieren.

Wir wählten eine indirekte Markierung der Satellitenzellen mit CD56-PE und eine direkte Markierung der CD36 positiven Zellen mit CD36-FITC.

Dazu wurden die Muskelkryoschnitte 10 min in -20°C kaltes Aceton gestellt, 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschliessend wurde ein Fettrand um jeden Schnitt gezogen. Nach 10 min in PBS wurden alle Schnitte mit NGS (normal goat serum, Fa. Gibco, Cat.Nr. 16210-015) im

---

<sup>1</sup> Cluster of Differentiation

Verhältnis 1:30 bedeckt. Die Muskelschnitte wurden nach 30 min ausgiebig mit PBS gespült und mit dem ersten Antikörper, CD56 (Leu 19; Fa. Becton-Dickinson, CatNr 347740), in der Verdünnung 1:10 bedeckt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde wieder ausgiebig mit PBS gespült, um dann den zweiten Antikörper GAM-PE (goat anti mouse – Phycoerythrin; Fa. Dianova, Lot.Nr. 51247) im Verhältnis 1:10 für weitere 30 min auf die Schnitte zu geben.

Zum Abbinden unspezifischer Bindungen wurde nach wiederholtem Spülen mit PBS für 30 min NMS (normal mouse serum, Fa. Sigma, CatNr M-9505) im Verhältnis 1:5 auf die Kryoschnitte gegeben. Danach wurde mit PBS gespült und die Schnitte mit dem dritten Antikörper, CD36-FITC (CD36 – Fluoresceinisothiocyanat, Fa. Immunotech, Cat.Nr. 0766), im Verhältnis 1:10 für 30 min bei 4°C inkubiert. Am Schluss wurden alle Schnitte mit 100 µl PBS bedeckt und aufgrund der kurzen Beständigkeit der fluoreszierenden Farbstoffe unverzüglich mikroskopiert, dabei fotografiert und anschliessend ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte am Inversmikroskop Axiovert 135 M der Firma Zeiss-Germany, welches mit der Kamera CH250/A der Firma Photometrics ausgerüstet war. Von jedem Präparat wurden in zufälliger Auswahl 15 Gesichtsfelder im Phasenkontrast, im PE-Kanal und im FITC-Kanal fotografiert.

Zur Beurteilung wurden die mit CD56-PE spezifisch markierten Satellitenzellen pro Muskelfaser ausgezählt und eine eventuelle Doppelmarkierung mit dem Endothelmarker CD36-FITC registriert.

## 2.6. Datenkorrelation

Die Patienten wurden entsprechend der histologischen Daten den drei Gewebssyndromen zugeteilt. Es waren 12 Patienten in der neurogenen, 8 in der unspezifisch myopathologischen Diagnosegruppe und 3 in der Kontrollgruppe. Diese Daten wurden dann mit den entsprechenden Fusionsindizes und den in der Klinik für Orthopädie, Universitätsklinik Magdeburg, erhobenen anamnestischen und klinischen Patientendaten korreliert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Übersicht

Der Ergebnisteil ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil werden die Auswertungsergebnisse der klinischen, zellbiologischen, und myopathologischen Daten und die durch Immunfluoreszenzfärbung gewonnenen Daten beschrieben. Im zweiten Ergebnisteil werden die erhobenen Daten korreliert.

#### Teil I

#### 3.2. Klinische Daten

Im Zeitraum zwischen dem 11. Mai 2000 und dem 21. Juni 2001 wurde in der Klinik für Orthopädie, Universitätsklinik Magdeburg, bei 20 Patienten im Rahmen einer Diskotomie, bei 2 im Rahmen einer Frakturversorgung und bei 2 Patienten im Rahmen einer diagnostischen Entnahme bei Metastasenverdacht eine Muskelbiopsie aus dem Musculus multifidus entnommen.

Tabelle 3 Patientenverteilung

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
neurogenes Gewebssyndrom	unspezifisch, myopathologisches Gewebssyndrom	normal
Fall 1	Fall 2	Fall 17 (Kontrolle)
Fall 3	Fall 5	Fall 18 (Kontrolle)
Fall 4	Fall 7	Fall 23 (Kontrolle)
Fall 6	Fall 10	
Fall 8	Fall 12	
Fall 9	Fall 13	
Fall 11	Fall 14	
Fall 15	Fall 21	
Fall 19 (Kontrolle)		
Fall 20		
Fall 22		
Fall 24		



Entsprechend der histologischen Diagnose wurden sie 3 Gruppen zugeteilt, wie in Tabelle 3 dargestellt ist.

Gruppe 1 enthält Patienten mit einem neurogenen, Gruppe 2 mit einem unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom (GS) und die Gruppe 3 besteht aus Patienten mit einem normalen histologischen Befund. Gruppe 1 besteht aus 12, Gruppe 2 aus 8 und die dritte Gruppe aus 3 Patienten. Ein Patient fiel wegen unzureichend gewonnenem Biopsiegewebe, sowohl aus der zellbiologischen als auch aus der histologischen Beurteilung, aus.

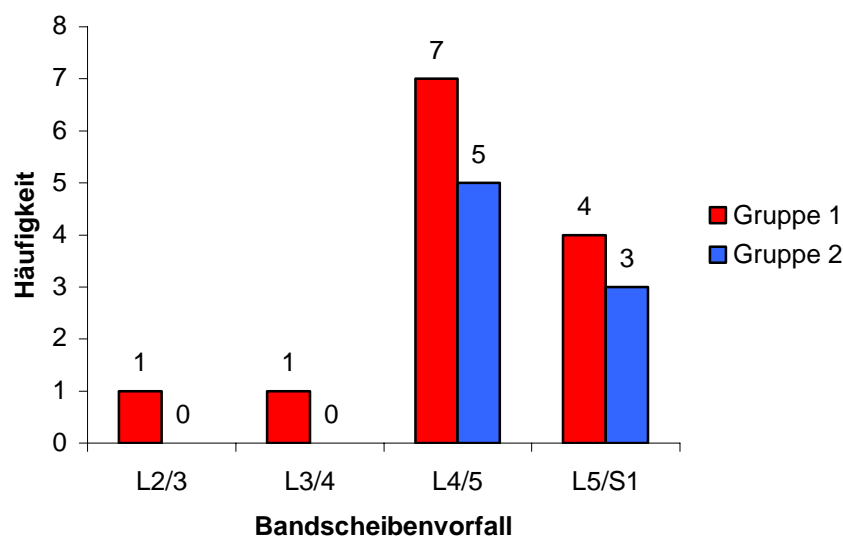


Diagramm 1 Verteilung der lumbalen Bandscheibenvorfälle: Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS)

In Diagramm 1 ist die Verteilung der betroffenen lumbalen Segmente im Patientengut dargestellt, wobei sich eine Häufung von Bandscheibenvorfällen L4/5 vor L5/S1 zeigt.

### 3.2.1. Altersstruktur und Geschlechtsverteilung

Das Patientenkollektiv bestand aus 17 Männern und 6 Frauen. Diagramm 2 zeigt die Geschlechterverteilung mit einer relativen und absoluten Häufung der Männer in allen drei Gruppen.

Das Durchschnittsalter des gesamten Patientengutes betrug 46 Jahre, wobei der jüngste 19 und der älteste Patient 79 Jahre alt war. Die Frauen waren im Durchschnitt 54,5 und die Männer 43 Jahre alt. In Diagramm 3 ist die Altersverteilung dargestellt.

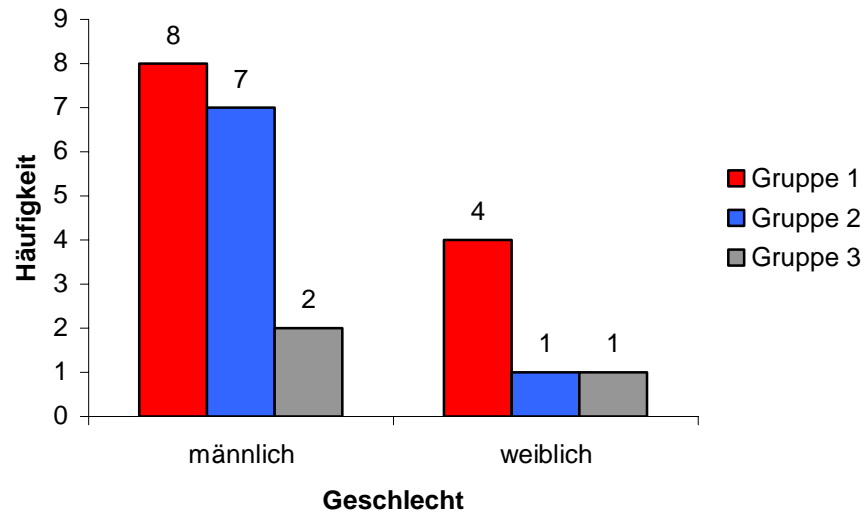


Diagramm 2 Geschlechterverteilung: Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS), Gruppe 3 (normal)

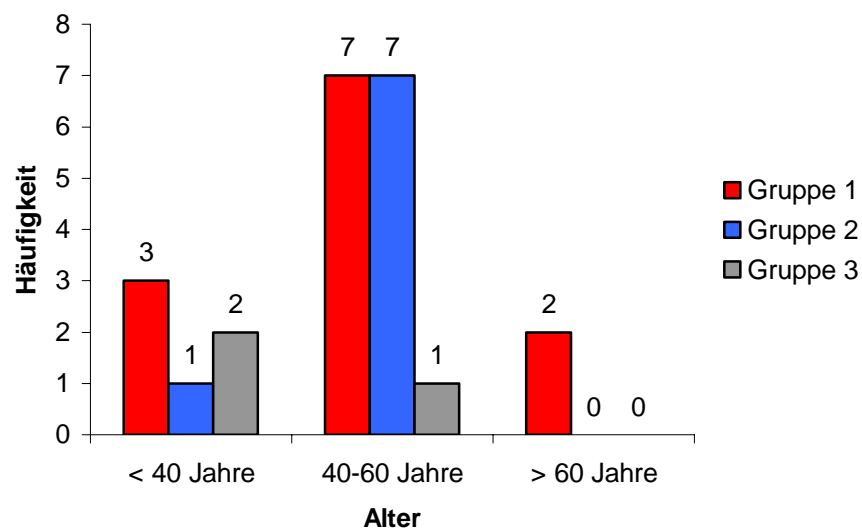


Diagramm 3 Altersverteilung in den einzelnen Gruppen: Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS), Gruppe 3 (normal)

Wie in Diagramm 4 dargestellt ist, lag das durchschnittliche Alter der Patienten mit einem Bandscheibenvorfall L5/S1 mit 33 Jahren in Gruppe 1 unter dem von Patienten mit einem Bandscheibenvorfall von L2/3 bis L4/5 (Durchschnittsalter 51,33 Jahre). Bei der Gruppe 2 zeigte sich mit einem Durchschnittsalter von 40 Jahren, bezogen auf Patienten mit einem Bandscheibenvorfall L5/S1, die gleiche unterdurchschnittliche Verteilung im Vergleich mit den anderen Segmenthöhen (Durchschnittsalter 48 Jahre).

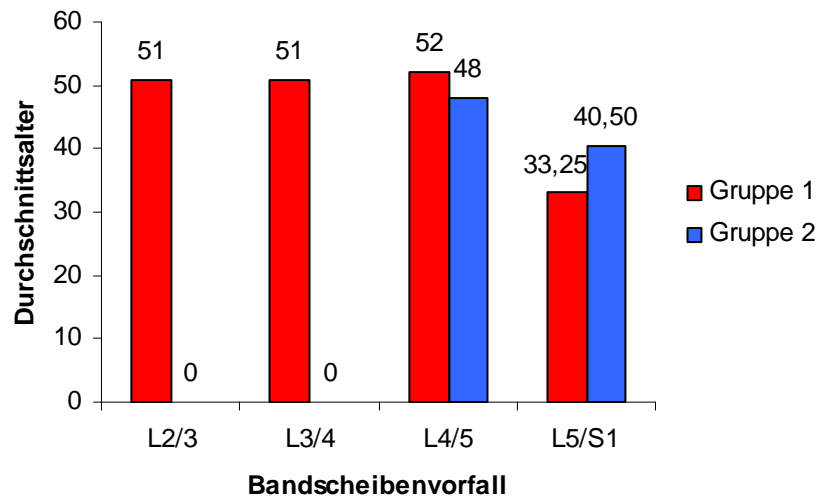


Diagramm 4 Altersverteilung der Bandscheibenvorfälle: Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS)

### 3.2.2. Patientendaten

Vergleichskriterien bei den Patientendaten (Tabelle 6, S. 37) waren die Krankheitsdauer, Sensibilitätsstörungen, motorische Störungen und die Muskelkraft. Die Krankheitsdauer galt dabei als Zeitraum zwischen dem ersten Auftreten von Symptomen, wie Schmerzen, sensiblen oder motorischen Defiziten und der Operation. Zu den sensiblen Störungen wurden Hypästhesien, Hyperästhesien und Parästhesien im betroffenen Segment gezählt. Die Abnahme der Muskelkraft der entsprechenden Kennmuskeln galt als motorische Störung. Die Muskelkraft wurde nach Janda in 5 Kraftgrade eingeteilt, welche in Tabelle 4 dargestellt sind.

Tabelle 4 Muskelkraftgrade nach **Janda**

Grad	Beurteilung	Beschreibung
5	normal	volles BA gegen starken Widerstand
4	gut	volles BA gegen leichten Widerstand
3	schwach	volles BA gegen die Schwerkraft
2	sehr schwach	volles BA ohne Einwirkung der Schwerkraft
1	Spur	sicht-/tastbare Aktivität, BA nicht vollständig
0	Null	komplette Lähmung, keine Kontraktion

BA: Bewegungsausmaß

Kein Patient mit einem lumbalen Bandscheibenvorfall hatte Anzeichen eines Kauda- oder Konus-Syndromes. Die 4 Kontrollpatienten hatten keine sensiblen oder motorischen Defizite.

Beim Vergleich der Krankheitsdauer zeigte sich bei Gruppe 1 eine Durchschnittsdauer von 10,58 Monaten. Der Maximalwert entsprach 24 Monaten und der Minimalwert betrug 1 Monat.

Gruppe 2 zeigte eine durchschnittliche Krankheitsdauer von 4,38 Monaten mit einer Maximaldauer von 12 Monaten und einer Minimaldauer von 1 Monat und lag damit deutlich unter der Krankheitsdauer der Gruppe 1 mit dem neurogenen Gewebssyndrom. Die Gruppe 3 als Kontrollgruppe zeigte eine Krankheitsdauer die im Durchschnitt unter 1 Monat lag, da die beiden Frakturpatienten akut innerhalb weniger Tage operiert wurden und ein Patient mit Metastasenverdacht keine Symptome hatte. Der zweite Tumorverdachtspatient klagte nach einem Sturz auf den Rücken seit 6 Monaten über Rückenschmerzen. Dieser Patient wurde jedoch aufgrund seiner histopathologischen Veränderungen der Gruppe 1 zugeordnet.

Tabelle 5 Verteilung der Krankheitsdauer

<b>Monate</b>	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>
<b>1-3</b>	2	4	3
<b>4-6</b>	4	2	0
<b>7-9</b>	1	1	0
<b>10-12</b>	1	1	0
<b>&gt;12</b>	4	0	0

Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS), Gruppe 3 (Kontrollgruppe)

In Tabelle 5 ist die Verteilung der Krankheitsdauer für die 3 Gruppen dargestellt.

Alle Patienten der 3 Gruppen, außer der 4 Kontrollpatienten, hatten zum Anamnesezeitpunkt sensible Ausfälle im Bereich des durch den Bandscheibenvorfall gestörten Segments.

Tabelle 6 Patientendaten

	<b>KD</b>	<b>sensSt</b>	<b>motorSt</b>	<b>MuKr</b>
<b>Gruppe 1 (neurogenes GS)</b>				
<b>Fall 1</b>	24	+	+	<b>4</b>
<b>Fall 3</b>	2	+	+	<b>3</b>
<b>Fall 4</b>	4	+	-	<b>5</b>
<b>Fall 6</b>	5	+	+	<b>3</b>
<b>Fall 8</b>	24	+	+	<b>4</b>
<b>Fall 9</b>	10	+	-	<b>5</b>
<b>Fall 11</b>	1	+	+	<b>3</b>
<b>Fall 15</b>	6	+	-	<b>5</b>
<b>Fall 19</b>	6	-	-	<b>5</b>
<b>Fall 20</b>	18	+	-	<b>5</b>
<b>Fall 22</b>	18	+	-	<b>5</b>
<b>Fall 24</b>	9	+	-	<b>5</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>10,58</b>			<b>3,4</b>
<b>Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS)</b>				
<b>Fall 2</b>	12	+	+	<b>1</b>
<b>Fall 5</b>	1	+	+	<b>3</b>
<b>Fall 7</b>	3	+	+	<b>1</b>
<b>Fall 10</b>	4	+	-	<b>5</b>
<b>Fall 12</b>	2	+	-	<b>5</b>
<b>Fall 13</b>	1	+	-	<b>5</b>
<b>Fall 14</b>	7	+	+	<b>4</b>
<b>Fall 21</b>	5	+	+	<b>4</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>4,38</b>			<b>2,6</b>
<b>Gruppe 3 (Kontrollgruppe)</b>				
<b>Fall 17</b>	<1	-	-	<b>5</b>
<b>Fall 18</b>	<1	-	-	<b>5</b>
<b>Fall 23</b>	<1	-	-	<b>5</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>&lt;1</b>			<b>5</b>

KD: Krankheitsdauer in Monaten, sensSt: sensible Störungen,  
 motorSt: motorische Störungen, MuKr: Muskelkraftgrad,  
 + : vorhanden, - : nicht vorhanden

5 von 12 Patienten der Gruppe 1 hatten motorische Störungen mit einer durchschnittlichen Abnahme der Muskelkraft um 1,6 Kraftgrade nach Janda. Bei der Gruppe 2 zeigten 5 von 8 Patienten motorische Defizite mit durchschnittlich 2,4 Kraftgraden Abschwächung der Muskelkraft bei den Betroffenen.

Damit hatten im Vergleich zur Gruppe 1 relativ mehr Patienten der Gruppe 2 motorische Defizite. Die Patienten der Gruppe 2 hatten ebenfalls eine

durchschnittlich stärkere Abnahme der Muskelkraft gegenüber der Gruppe 1 mit dem neurogenen Gewebssyndrom.

### 3.3. Fusionsverhalten primärer Satellitenzellen des *M. multifidus* in-vitro

Wie im Material- und Methodenteil genauer beschrieben wurde, berechnet sich der Fusionsindex aus dem Verhältnis der Zellkerne innerhalb der Myotuben zur Gesamtanzahl der Zellkerne pro Gesichtsfeld. Zu diesem Zweck wurden die Satellitenzellen gefärbt und ausgezählt, um anschliessend den Fusionsindex zu berechnen.

Entsprechend der Erwartungen [7] zeigten die Kurven der Fusionsindizes (Abbildung 4) 3 Phasen. Eine *lag*-Phase vom Anfang bis Tag 2, eine *log*-Phase bis Tag 5 und bis Tag 10 eine *Plateauphase*.

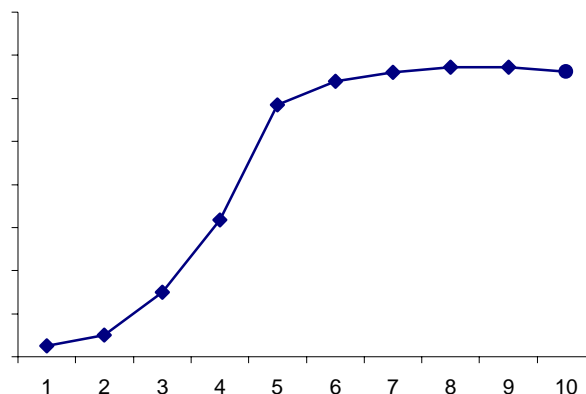
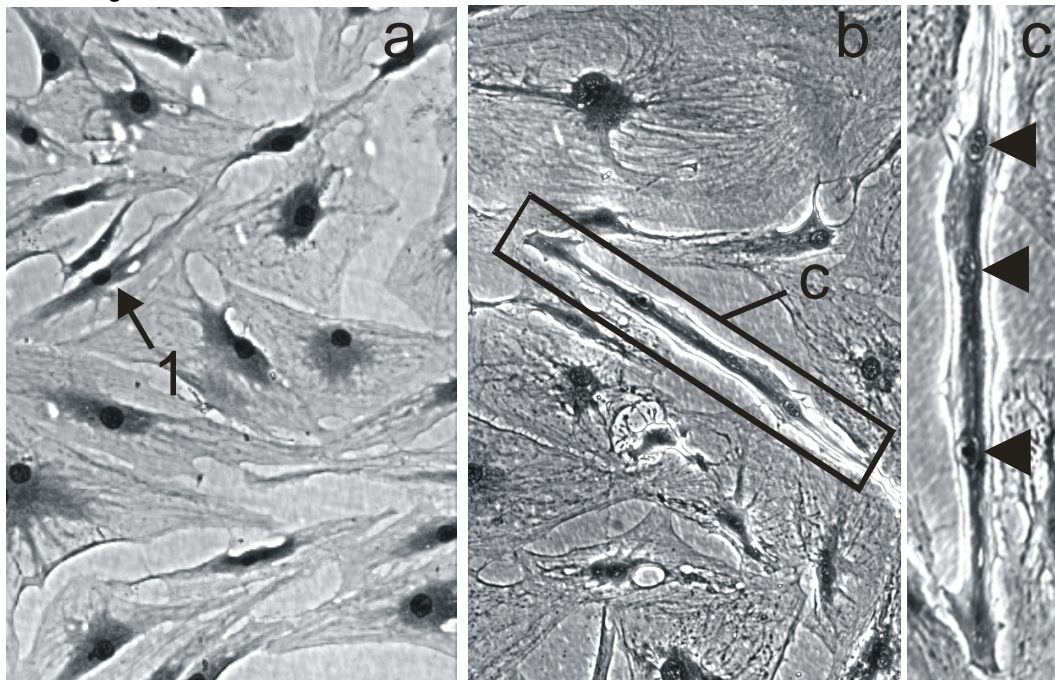


Abbildung 4 logarithmische Phasen der Fusionskurven

Zellkulturen konnten nicht von jeder Biopsie bis zur Auswertungsgrösse gezüchtet werden. Insgesamt standen sieben Satellitenzellkulturen von Gruppe 1, drei von Gruppe 2 und eine Zellkultur von Gruppe 3 zur Auswertung zur Verfügung. Man muss dabei verschiedene Probleme und Störungen unterscheiden.

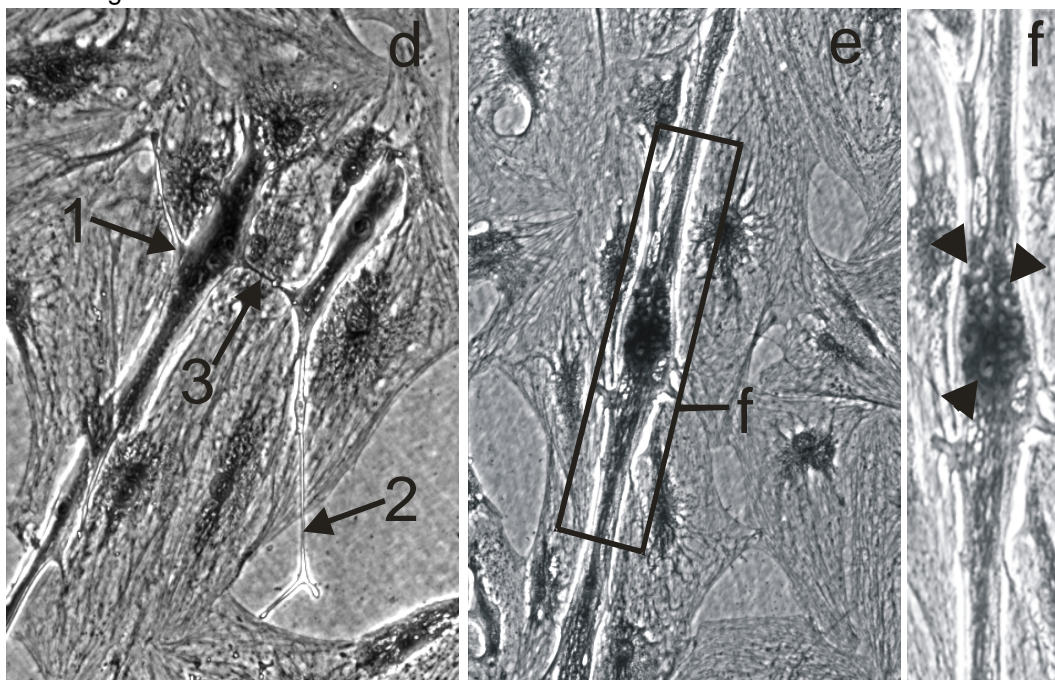
Die Abbildungen 5 und 6 zeigen verschiedene Stadien der Satellitenzellkultur.

Abbildung 5



**Abb. 5a:** zeigt mononucleäre (5a1) Satellitenzellen an Tag 1 nach dem Umsetzen auf das Differenzierungsmedium, **Abb. 5b:** zeigt die Satellitenzellen an Tag 6 der Differenzierung, in der Mitte ist eine multinucleäre Myotube (5c) zu sehen, die Pfeile (◄) in **Abb. 5c** zeigen 3 Kerne in der fusionierten Myotube

Abbildung 6



**Abb. 6d:** zeigt zwei multinucleäre Myotuben (6d1) an Tag 7 der Differenzierung, sie bilden lange Ausläufer (6d2) und nehmen Kontakt zu anderen Myotuben auf (6d3), **Abb. 6e:** zeigt eine grosse Myotube an Tag 9 mit einer zentralen Ansammlung von > 10 Kernen (6f), welche in **Abb. 6f** gesondert dargestellt (◄) sind

Aufgrund einer Hefepilzinfektion der Kultur mussten die Zellkulturansätze von Fall 14 und 15 verworfen werden. Bei den Biopsien von Fall 1, 6 und 7 war das Ausgangsmaterial zur erfolgreichen Anlegung einer Zellkultur zu gering. Während der Auswertungsperiode von Fall 9 kam es zu einer Kontamination mit zeitgleich im Inkubator gezüchteten Rhabdomyosarkomzellen. Dadurch konnten die Tage 8, 9 und 10 der Differenzierung und Fusion nicht ausgewertet werden.

Die restlichen Ansätze von Satellitenzellkulturen (Gruppe 1: Fall 19, 20; Gruppe 2: Fall 10,13,21 und Gruppe 3: Fall 17,18) zeigten keine ausreichende Proliferation der gewonnenen Zellen und wurden deshalb nach dem ersten Mediumwechsel verworfen.

Tabelle 7 Fusionsindizes pro Fall

Gruppe 1			Gruppe 2			Gruppe 3		
Fall	FI max	Tag des Maximum	Fall	FI max	Tag des Maximum	Fall	FI max	Tag des Maximum
Fall 3	37,6	7	Fall 2	23,2	8	Fall 23	10,3	8
Fall 4	28,5	8	Fall 5	23,1	5			
Fall 8	17,5	10	Fall 12	19,5	8			
Fall 9	22,9	6						
Fall 11	21	9						
Fall 22	21,4	7						
Fall 24	27,8	6						
<b>Mw</b>	<b>25,24</b>			<b>21,93</b>			<b>10,3</b>	

FI: Fusionsindex in %, max: maximal, Mw: Mittelwert, Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS), Gruppe 3 (Kontrollgruppe)

In Tabelle 7 ist der maximale Fusionsindex je Fall und Gruppe dargestellt. Der durchschnittliche Fusionsindex von Gruppe 1 betrug 25,24%  $\pm$  6,19% mit dem Maximum der Werte zwischen dem 6. und 10. Tag nach dem Umsetzen auf das Differenzierungsmedium. Der Maximalwert betrug 37,6% und der Minimalwert 17,5%.

In der Gruppe 2 betrug der Durchschnitt 21,93%  $\pm$  1,72% mit dem Maximum der Werte zwischen Tag 5. und 8. Der Maximalwert betrug 23,2%, der Minimalwert 19,5%.

Da in Gruppe 3 nur eine Zellkultur erfolgreich gezüchtet und dadurch ausgewertet werden konnte, existiert in dieser Gruppe ein Einzelwert. Der Fusionsindex dieser normalen Biopsie betrug 10,3% am 8. Tag.



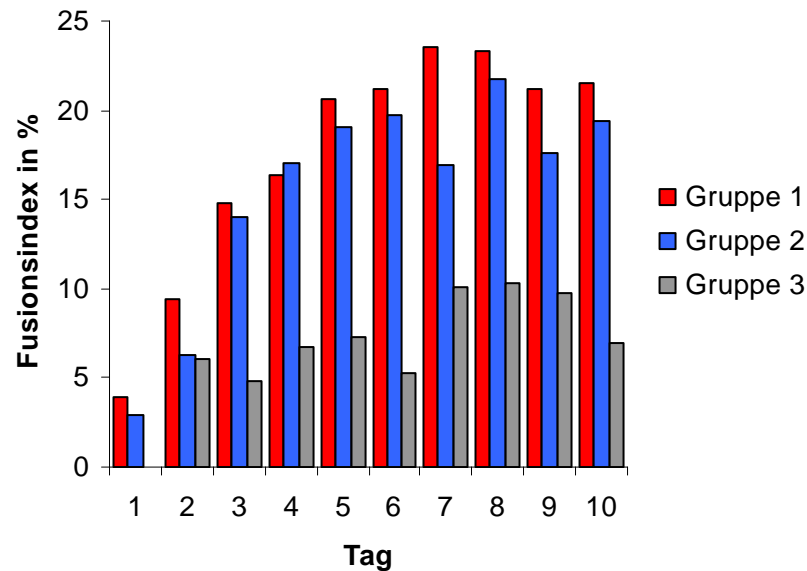


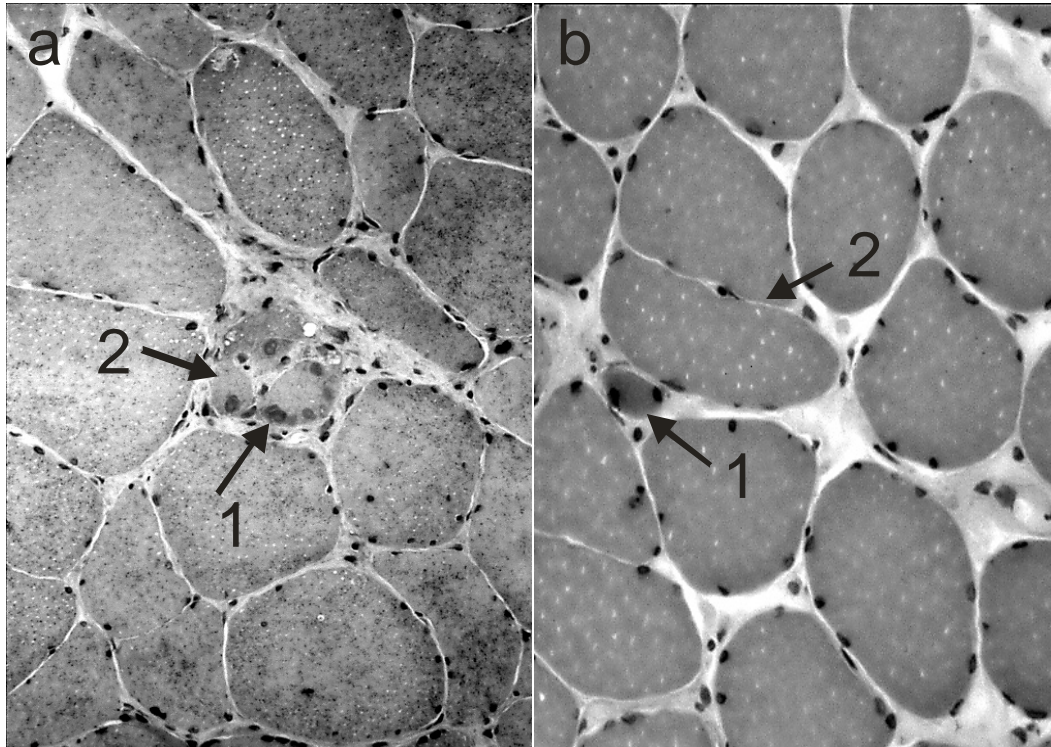
Diagramm 5 Vergleich der Fusionsindizes: Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS), Gruppe 3 (Kontrollgruppe)

Der Fusionsindex der Gruppe 1 mit dem neurogenen Gewebssyndrom war mehr als doppelt so hoch wie der Fusionsindex der Gruppe 3 ohne myopathologische Veränderungen, wie aus Diagramm 5 erkennbar ist. Er war aber nur leicht erhöht im Vergleich zur Gruppe 2, welche durch ein unspezifisch myopathologisches Gewebssyndrom gekennzeichnet war.

#### 3.4. Myopathologie des M. multifidus

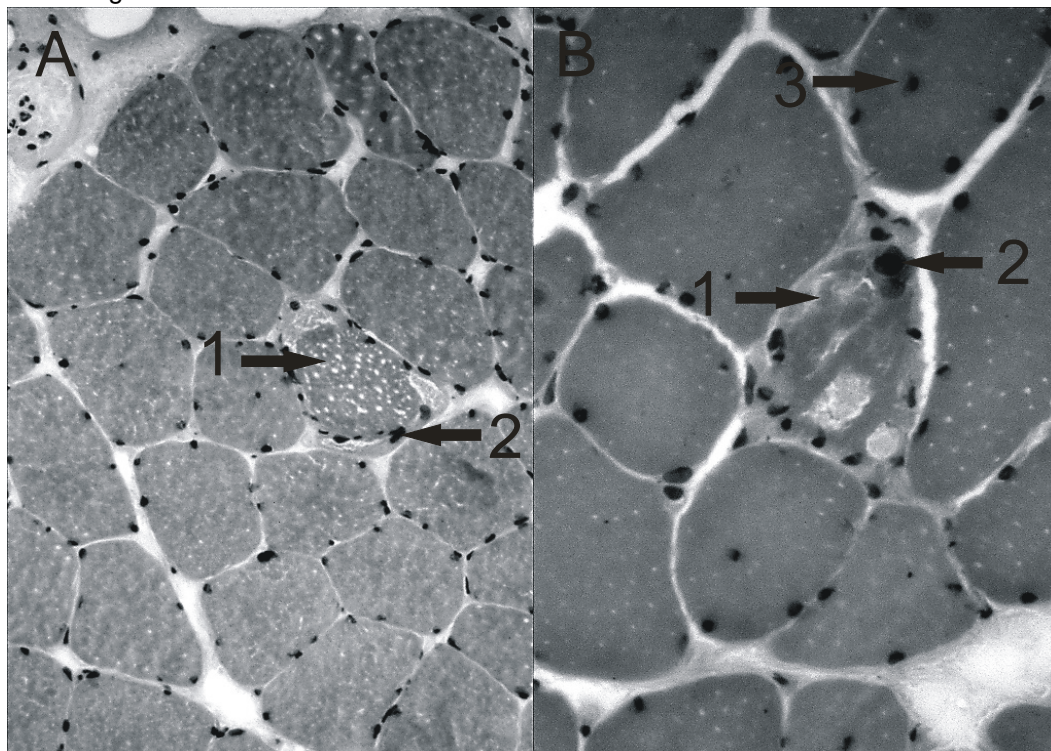
Die 23 Patienten wurden entsprechend der histologischen Diagnose den 3 Gruppen zugeteilt. Wie im Einführungsteil ausführlich dargestellt wurde, entsprechen myopathologische Veränderungen in Form von elongiert atrophischen Fasern, Kernkonglomeraten und Faserhypertrophien dem neurogenen Gewebssyndrom und degenerative Fasern dem unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom. Das Auftreten von regenerativen Fasern kann beiden Gewebssyndromen zugeordnet werden. Die Prädominanz von Rundzellinfiltraten ist charakteristisch für ein myositisches Gewebssyndrom. In Abbildung 7-12 sind diese Alterationen *in-situ* dargestellt.

Abbildung 7



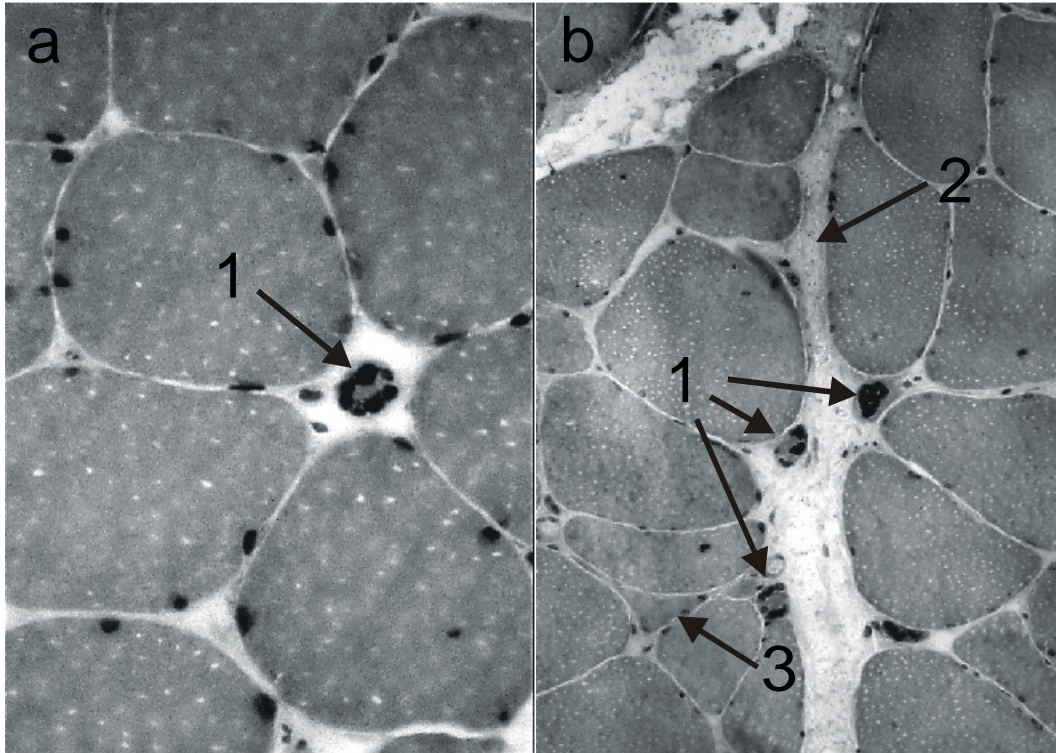
**Abb. 7a/b** (10x Objektiv) zeigen das Auftreten von regenerativen Fasern (regF) *in-situ*, **7a** zeigt 3 regF (7a2) mit vakuolisierten Zellkernen (7a1) mit prominenten Nucleoli von aktivierten Satellitenzellen, **7b** zeigt eine basophile Muskelfaser (7b1) und eine Muskelfaserspaltung (7b2)

Abbildung 8



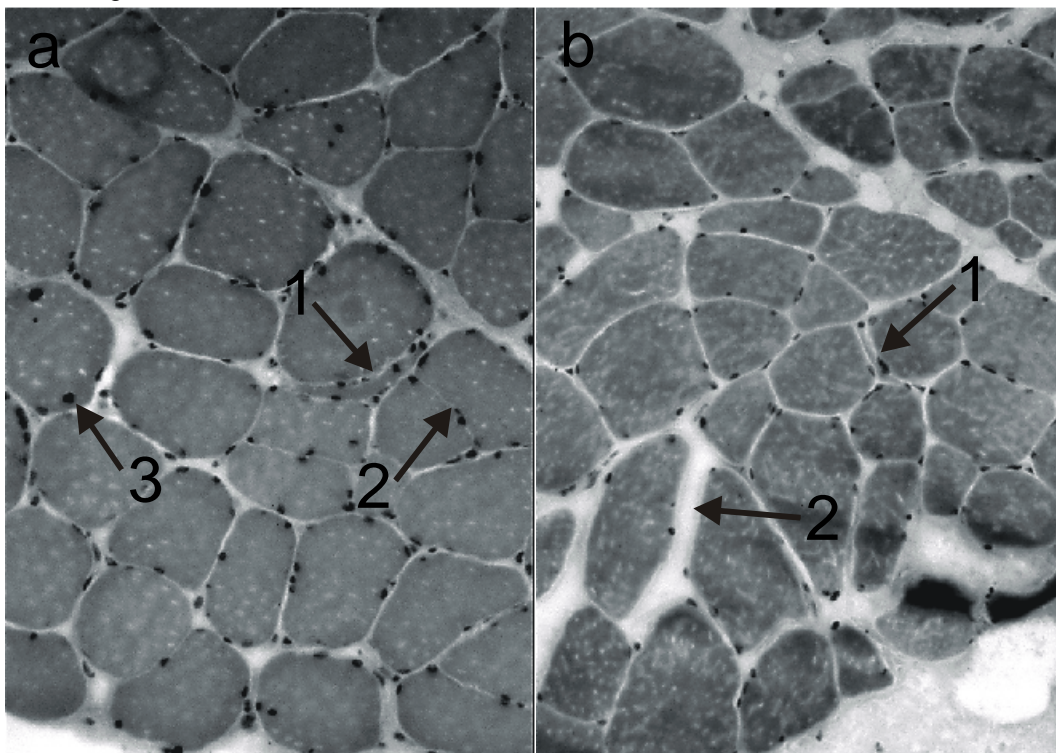
**Abb. 8a** (10x Objektiv) zeigt eine degenerative Muskelfaser (degF) (8a1) mit randständigen mononucleären Zellen (8a2) und geringem Resorptionssaum, **Abb. 8b** (20x Objektiv) zeigt eine grobschollige Degeneration (8b1) einer Muskelfaser mit invasiven Makrophagen (8b2), (8b3) zeigt einen zentralisierten Kern

Abbildung 9



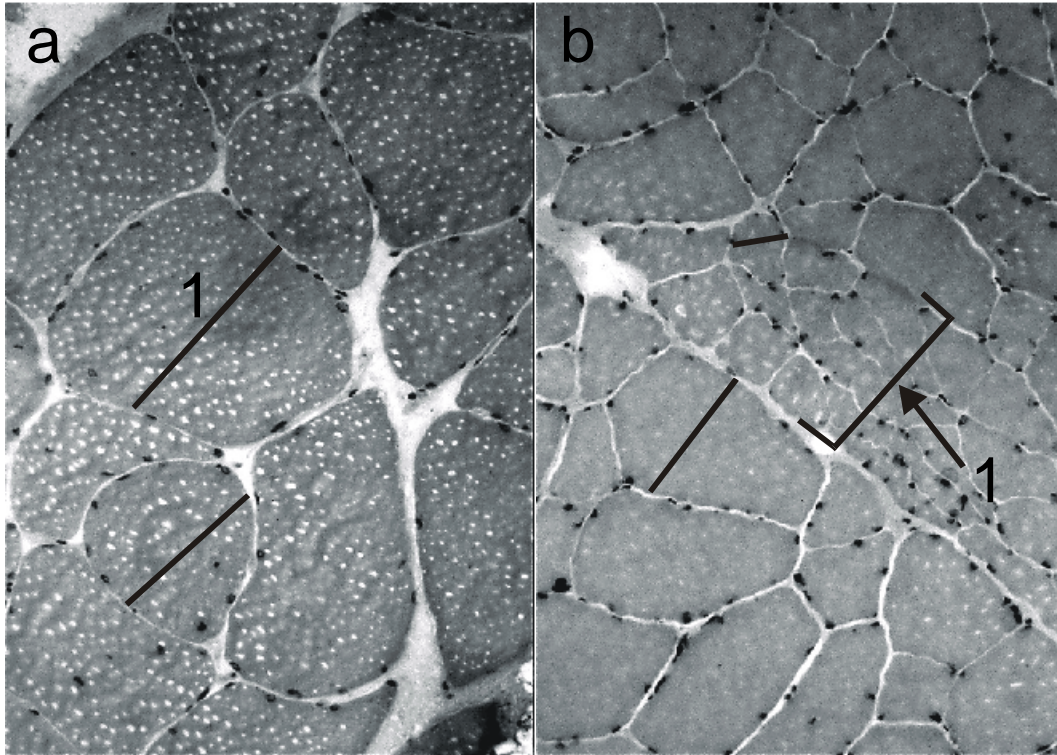
**Abb. 9a** (20x Objektiv) zeigt ein Kernkonglomerat (9a1) als Folge einer Muskelfaseratrophie, **Abb. 9b** (10x Objektiv) zeigt mehrere Kernkonglomerate (9b1) und Kaliberschwankungen, (9b2) Perimysium, (9b3) polygonal atrophische Muskelfaser

Abbildung 10



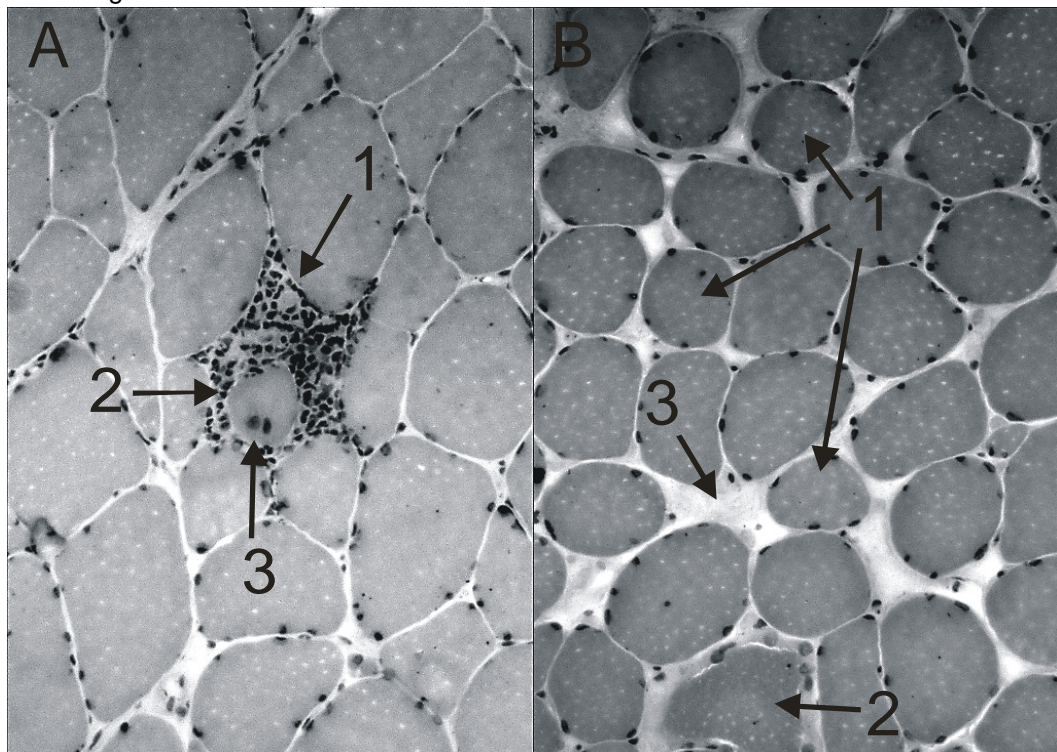
**Abb. 10a** (10x Objektiv) zeigt eine elongierte atrophische Muskelfaser (10a1) und eine Muskelfaserspaltbildung (10a2), (10a3) zeigt eine Faser mit dem Beginn einer Zentralisierung von Kernen, **Abb. 10b** (10x Objektiv) zeigt ebenfalls eine elongierte atrophische Faser (10b1), daneben sieht man eine Kaliberschwankung der Fasern und eine Vermehrung des endomysialen Bindegewebes (10b2)

Abbildung 11



**Abb. 11a** (10x Objektiv) Muskelfaserhypertrophie (11a1), **Abb. 11b** (10x Objektiv) zeigt eine Gruppe atrophischer Fasern (11b1) und Kaliberschwankungen im restlichen Muskelschnitt

Abbildung 12



**Abb. 12a** (10x Objektiv) zeigt eine herdförmige Rundzellinfiltration (12a1) um eine degenerative Muskelfaser (12a2) mit invasiven Makrophagen (12a3), **Abb. 12b** (10x Objektiv) zeigt abgerundete Muskelfasern (12b1) und eine Vermehrung des endomysialen Bindegewebes (12b3), am unteren Bildrand ist eine degenerative Muskelfaser (12b2) mit einem Saum von mononucleären Zellen zu sehen

Ein Kontrollpatient (Fall 19) zeigte in der Histologie trotz fehlender Symptomatik chronisch neurogene Veränderungen mit Zeichen einer sekundären Begleitmyopathie. Aufgrund dessen konnten nur drei der vier Kontrollpatienten in die normale Gruppe eingeteilt werden.

Tabelle 8 Daten der histologischen Auswertung

	regF	degF	elongF	KG	Fh	FI in %
<b>Gruppe 1 (neurogenes GS)</b>						
Fall 1	0	0	7,9	0	-	-
Fall 3	0	0	2,5	0,4	+	37,6
Fall 4	0	0	0	0	+	28,5
Fall 6	0,6	0,6	0	0	+	-
Fall 8	1,1	0	4,3	0	-	17,5
Fall 9	3,4	1,45	3,8	3,4	-	22,9
Fall 11	0	0	0	5,4	+	21
Fall 15	0	0	2	3	+	-
Fall 19	0	1,4	0,9	2,25	+	-
Fall 20	0	1,7	0	4,8	+	-
Fall 22	0	0,8	0,8	0,8	+	21,4
Fall 24	0	0	1,56	0	-	27,8
<b>Mittelwert</b>	<b>0,43</b>	<b>0,49</b>	<b>1,98</b>	<b>1,67</b>	<b>+</b>	<b>25,24</b>
<b>Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS)</b>						
Fall 2	1,25	2,9	0	0,83	-	23,2
Fall 5	0	2,7	1,3	0	-	23,1
Fall 7	0,45	0,9	3,1	0,5	-	-
Fall 10	0,41	4,1	0,41	2	+	-
Fall 12	0,85	0,85	0,85	2,1	+	19,5
Fall 13	0,4	1,6	2,4	2	-	-
Fall 14	0	0	0,86	0,86	-	-
Fall 21	0	0,4	0,4	0,4	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>0,42</b>	<b>1,68</b>	<b>1,17</b>	<b>1,08</b>	<b>-</b>	<b>21,93</b>
<b>Gruppe 3 (Kontrollgruppe)</b>						
Fall 17	0	0	1,8	0	-	10,3
Fall 18	0	0	0	0	-	-
Fall 23	0	0	0,46	0	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,75</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>10,3</b>

regF: regenerative Fasern, degF: degenerative Fasern, elongF: elongierte Fasern, KG: Kernkonglomerate, Fh: Faserhypertrophie, FI: Fusionsindex, GS: Gewebssyndrom

Zur histologischen Auswertung wurden die regenerativen, die degenerativen und die elongiert atrophischen Muskelfasern, die Kernkonglomerate und das Auftreten von Faserhypertrophien

herangezogen. Die Zahlenwerte entsprechen der Anzahl alterierter Muskelfasern oder der Anzahl von Kernkonglomeraten bezogen auf 100 ausgezählte Muskelfasern. Das Auftreten von Faserhypertrophien wurde mit einem „+“ gekennzeichnet und das Fehlen mit einem „-“.

Die exakten Daten sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Durchschnittshäufigkeiten in der Gruppe 1 betragen 0,43 regenerative Fasern (regF), 0,49 degenerative Fasern (degF), 1,98 elongierte Fasern (elongF) und 1,67 Kernkonglomerate (KG). Eine Faserhypertrophie war in 8 von 12 Fällen zu sehen.

In der Gruppe 2 betragen die durchschnittlichen Häufigkeiten an pathologischen Veränderungen 0,42 regF, 1,68 degF, 1,17 elongF und 1,08 Kernkonglomerate. Faserhypertrophien zeigten sich bei 2 von 8 Muskelschnitten.

Bei der Gruppe 3 wurde ein Auftreten von 0,75 elongierten Muskelfasern beobachtet. Andere myopathologische Kriterien wurden in dieser Gruppe nicht erfüllt.

Die Anzahl der elongierten Fasern und der Kernkonglomerate ist in der neurogenen Gruppe 1 im Vergleich zur unspezifisch myopathologischen Gruppe 2 erhöht. Das Auftreten von Faserhypertrophien überwiegt ebenfalls in der Gruppe 1. Die degenerativen Fasern sind dagegen in der Gruppe 2 erhöht. Die regenerativen Fasern zeigen eine relative Gleichverteilung zwischen den beiden Gruppen.

Bei der Auswertung der Muskelhistologie zeigten sich Häufigkeitsunterschiede hinsichtlich der myopathologischen Kriterien in Abhängigkeit vom zellbiologischen Verhalten in den einzelnen Gruppen, wie in Tabelle 9 dargestellt ist. Jede Gruppe konnte in 2 Untergruppen unterteilt werden. Untergruppe x.1 entsprach dabei Fällen mit erfolgreich angewachsener Satellitenzellkultur und Untergruppe x.2 Fällen ohne erfolgreiche Satellitenzellkultur. Die durch Kontamination oder Ausgangsmaterialmangel verursachten Ausfälle wurden dabei nicht berücksichtigt.

### Gruppe 1

Untergruppe 1.1 : Fall 3, Fall 4, Fall 8, Fall 9, Fall 11,  
Fall 22, Fall 24

Untergruppe 1.2 : Fall 19, Fall 20

Gruppe 2

Untergruppe 2.1 : Fall 2, Fall 5, Fall 12

Untergruppe 2.2 : Fall 10, Fall 13, Fall 21

Gruppe 3

Untergruppe 3.1 : Fall 23

Untergruppe 3.2 : Fall 17, Fall 18

Tabelle 9 Untergruppen

	regF	degF	elongF	KG
<b>Gruppe 1 gesamt</b>	<b>0,43</b>	<b>0,43</b>	<b>0,43</b>	<b>0,43</b>
Untergruppe 1.1 mit Zellkultur	0,64	0,32	1,85	1,43
Untergruppe 1.2 ohne Zellkultur	0,00	1,55	0,45	3,50
<b>Gruppe 2 gesamt</b>	<b>0,42</b>	<b>1,68</b>	<b>1,17</b>	<b>1,08</b>
Untergruppe 2.1 mit Zellkultur	0,70	2,15	0,72	0,98
Untergruppe 2.2 ohne Zellkultur	0,27	2,33	1,07	1,46
<b>Gruppe 3 gesamt</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,75</b>	<b>0,00</b>
Untergruppe 3.1 mit Zellkultur	0,00	0,00	0,46	0,00
Untergruppe 3.2 ohne Zellkultur	0,00	0,00	0,90	0,00

regF: regenerative Fasern, degF: degenerative Fasern, elongF: elongierte Fasern, KG: Kernkonglomerate, Fh: Faserhypertrophie  
 Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS), Gruppe 3 (Kontrollgruppe)

Bei den Gruppen mit einem neurogenen oder einem unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom zeigte sich in der Untergruppe x.1 eine Erhöhung der Häufigkeit der regenerativen Fasern im Vergleich zum Gesamtdurchschnitt. In der Untergruppe x.2 zeigte sich bei beiden

Gruppen eine Erniedrigung der regenerativen Muskelfasern. Besonders auffällig ist diese Beobachtung bei Muskelbiopsien ohne erfolgreiche Anlegung einer Satellitenzellkultur in Untergruppe 1.2. Hier ließen sich im Muskelkryoschnitt keine regenerativen Fasern finden.

Eine Erhöhung der degenerativen Fasern zeigte sich in der Untergruppe x.2 bei Gruppe 1 und 2.

In der Gruppe mit einem neurogenen Gewebssyndrom ist trotz Erhöhung des Fusionsindex *in-vitro* (Zellkultur) kaum oder keine echte Regeneration *in-vivo* (Histologie) vorhanden.

### 3.5. Quantifizierung der Muskelsatellitenzellen des M. multifidus in-situ

Mit der immunhistologischen Färbung der Muskelkryoschnitte sollte die Anzahl der detektierbaren Satellitenzellen der Probanden erfasst werden, da die Anzahl der Zellen einen gewissen Aufschluss über die Regeneration der Muskelfasern gibt.

Tabelle 10 CD56 und CD36 Doppelmarkierung in Abhängigkeit von der Gruppenzuordnung

	<b>CD 56 positive Zellen pro 100 Muskelfasern</b>	<b>CD56 und CD 36 doppelmarkierte Zellen pro 100 Muskelfasern</b>
<b>Gruppe 1</b>		
Fall 1	10,00	1,00
Fall 3	14,34	3,30
Fall 6	14,59	0,30
Fall 15	13,20	1,70
Fall 19	13,00	2,89
Fall 20	12,27	2,15
Fall 22	11,49	1,01
Fall24	12,90	1,08
<b>Mittelwert</b>	<b>12,76</b>	<b>1,70</b>
<b>Gruppe 2</b>		
Fall 10	12,91	3,20
Fall 12	12,53	1,81
<b>Mittelwert</b>	<b>12,72</b>	<b>2,50</b>
<b>Gruppe 3</b>		
Fall 17	11,72	0,40
Fall 23	6,50	0,88
<b>Mittelwert</b>	<b>9,11</b>	<b>0,64</b>

Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS), Gruppe 3 (Kontrollgruppe)



Dazu wurden die Kryoschnitte mit Antikörpern gegen das CD56 [30,88,91] und das CD36 [88,92] Antigen markiert. Die markierten Zellen wurden ausgezählt und zum Vergleich auf 100 Muskelfasern bezogen.

Tabelle 10 zeigt die Durchschnittsanzahl der CD56 positiven Zellen und die durchschnittliche Doppelmarkierung mit CD56 und CD36 pro Gruppe, dabei wurden die Fälle mit und ohne Fusionsindex in die Auswertung eingeschlossen.

Es zeigte sich eine ungefähre Gleichverteilung der CD56 positiven Zellen in Gruppe 1 und 2. Die Anzahl in Gruppe 3 lag mit ca. 1/3 weniger CD56 positiven Zellen merklich unter dem Durchschnitt von Gruppe 1 und 2.

Gruppe 2 hatte die meisten Doppelmarkierungen mit durchschnittlich 2,5 pro 100 Muskelfasern. Gruppe 1 mit dem neurogenen Gewebssyndrom zeigte ungefähr 1/4 weniger und Gruppe 3, als normale Gruppe, sogar 3/4 weniger Doppelmarkierungen.

Aufgrund von Lagerungsproblemen der Kryoschnitte im Flüssigstickstoff konnten nicht von allen Biopsien nachträglich Muskelschnitte hergestellt und ausgewertet werden.

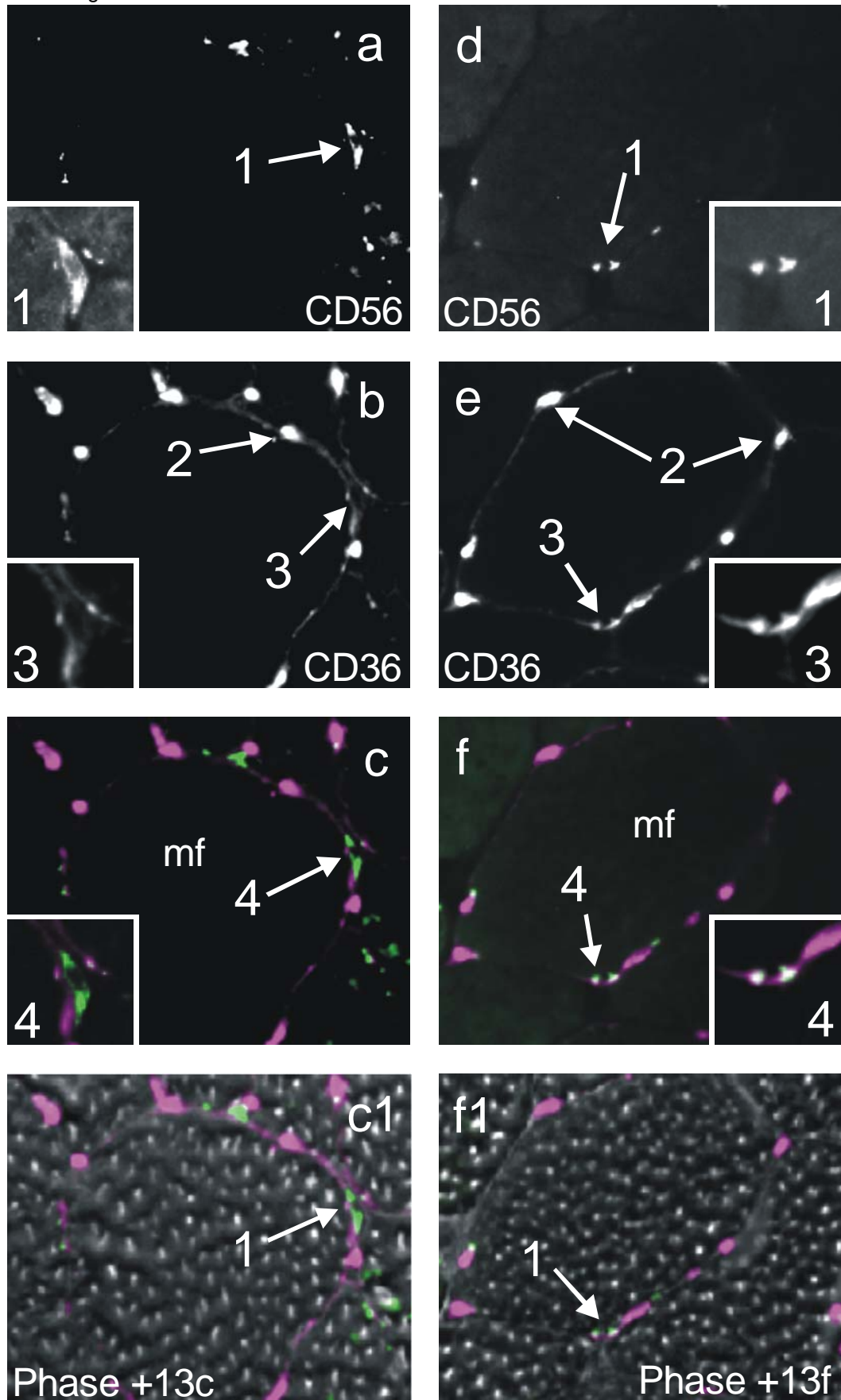
Die Satellitenzelle unterscheidet sich morphologisch von den normalen Muskelfaserkernen. Sie ist nicht in die Faser eingebettet, sondern liegt ihr auf. Ebenfalls besitzt sie dornenartige Zellfortsätze [91], welche den reifen Muskelfaserkernen fehlen. Durch ihren spindelförmigen Körper erscheint sie als kleine konvexe „Haube“ auf der Muskelfaser. Die Satellitenzelle ist durch das Plasmalemm von der Muskelfaser getrennt. Andererseits wird die Satellitenzelle genau wie die Muskelfaser von der Basalmembran umschlossen.

Die Immunhistologie sollte selektiv die Anzahl an Satellitenzellen pro Muskelfaser und die verschiedenen Populationen von myogenen Stammzellen aufzeigen.

In Abbildung 13 a-f sind 2 verschiedene Markierungen dargestellt.

Abbildungen 13 a-c zeigen eine CD56+/CD36- Zelle, die aufgrund ihrer Morphologie als Satellitenzelle einzuordnen ist. In den Abbildungen 13 d-f ist dagegen eine CD56+/CD36+ Zelle dargestellt, die wahrscheinlich einer myogen differenzierenden endothelialen Zelle entspricht [92].

Abbildung 13 a-f



## Teil II

### 3.6. Korrelation der Daten

Die Faserbasophilie und damit das Auftreten von regenerativen Fasern in der Histologie ist ein Hinweis auf die *in-situ* erfolgende Fusion von Satellitenzellen zu Myotuben und demzufolge ein Zeichen für Regenerationsaktivität. Die basophile Anfärbung der Strukturen ist eine Folge des hohen Anteils an neusynthetisierter m-RNA in aktivierten Satellitenzellen.

Dieser Zusammenhang zeigt eine Abhängigkeit der biologischen Daten voneinander, welche durch die Korrelation genauer dargestellt werden soll.

#### 3.6.1. Korrelation des Fusionsindex mit quantitativen Daten der Myopathologie

Tabelle 11 zeigt die Mittelwerte der einzelnen myopathologischen Kriterien in Abhängigkeit von der Fusionsindexhöhe. Den einzelnen Gruppen wurden zur besseren Übersichtlichkeit die Fusionsindizes in Abhängigkeit von ihrer Höhe zugeteilt.

Beim Vergleich der Werte zeigte sich bei steigendem Fusionsindex eine stete Abnahme an regenerativen Fasern in Gruppe 1 und 2. Das Auftreten von elongierten Fasern sinkt ebenfalls mit steigendem Fusionsindex.

---

**Abb. 13 a:** zeigt eine CD56+ Satellitenzelle (13a1) an einem Muskelfaserquerschnitt, sie zeigt den typischen spindelförmigen Zellkörper, **Abb. 13 b:** zeigt neben CD36+ Zellen (13b2) um die gleiche Faser auch das CD36+ Plasmalem (13b3) der Muskelfaser, welches sie von der Satellitenzelle trennt; die Zelle (13a1) aus Abb. 13a ist hier CD36-  
**Abb. 13 c:** stellt eine Überlagerung der beiden oberen Bilder (13a, 13b) dar, wobei CD56+ Strukturen grün und CD36+ Strukturen violett erscheinen; (13c4) zeigt die CD56+/CD36- Satellitenzelle, **Abb. 13c1** zeigt die CD56+ (13c1-1) und CD36+ Zellen in Verbindung mit dem normalen Phasenkontrastbild, mf: Muskelfaser  
**Abb. 13 d:** zeigt ebenfalls eine spindelförmige CD56+ Zelle in Kontakt mit einer Muskelfaser, **Abb. 13e:** zeigt neben den CD36+ endothelialen Zellen (13e2) eine positive CD36 Markierung (13e3) der CD56+ Zelle (13d1) aus Abb. 13d, in **Abb. 13 f** wurden Abb. 13d und e überlagert; die CD36+ Strukturen sind violett und die CD56+ Strukturen grün dargestellt; doppelmarkierte Strukturen, wie die CD56+/CD36+ Zelle (13f4), erscheinen weiß, in **Abb. 13f1** wurden die Fluoreszenzmarkierungen in das Phasenkontrastbild eingebunden, um die *in-situ* Lage der CD56+/CD36+ Zelle (13f1-1) besser darzustellen

Tabelle 11 Korrelation des Fusionsindex der Satellitenzellen mit dem Biopsiebefund

Gruppe 3		Gruppe 1		
Fall 23: 10,3%		Fall 8: 17,5%	Fall 9: 22,9%	Fall 3: 37,6%
			Fall 11: 21%	Fall 4: 28,5%
			Fall 22: 21,4%	Fall 24: 27,8%
Gruppe 2				
		Fall 12: 19,5%	Fall 2: 23,2%	
			Fall 5: 23,1%	
FI	<15%	15-20%	>20-25%	>25%
regF	0	0,98	0,93	0
degF	0	0,43	1,57	0
elongF	0,46	2,58	1,18	1,35
KG	0	1,05	2,09	0,13
Fh	0/1	1/2	2/5	2/3

regF: regenerative Fasern, degF: degenerative Fasern, elongF: elongierte Fasern, KG: Kernkonglomerate, Fh: Faserhypertrophie, FI: Fusionsindex in %, Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS), Gruppe 3 (Kontrollgruppe)

Die Anzahl an degenerativen Fasern und Kernkonglomeraten nimmt zuerst etwas zu, um dann bei weiterer Erhöhung des Fusionsindex wieder abzunehmen.

Die Faserhypertrophien sind als Auftreten-pro-Gruppe dargestellt. Ein erhöhter Fusionsindex trat hierbei gehäuft in Verbindung mit Muskelfaserhypertrophien auf.

### 3.6.2. Korrelation zellbiologisch-bioptischer Daten mit der Krankheitsdauer

Tabelle 12 Verteilung des durchschnittlichen Fusionsindex, der regenerativen Fasern und der CD56 positiven Zellen je Gruppe in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer

KD	Gruppe 1			Gruppe 2			Gruppe 3		
	FI	regF	CD56	FI	regF	CD56	FI	regF	CD56
1-3	29,3	0	14,34	21,3	0,43	12,53	10,3	0	9,11
4-6	28,5	0	13,59	-	0,41	12,91	-	0	-
7-9	27,8	0	12,90	-	0	-	-	0	-
10-12	22,9	3,4	-	23,2	1,25	-	-	0	-
>12	19,45	1,1	11,25	-	0	-	-	0	-

KD: Krankheitsdauer in Monaten, FI: Fusionsindex in %, regF: regenerative Fasern pro 100 Muskelfasern, CD56: CD56 positive Zellen pro 100 Muskelfasern, Gruppe 1 (neurogenes GS), Gruppe 2 (unspezifisch myopathologisches GS), Gruppe 3 (Kontrollgruppe)

Bei der Gegenüberstellung der Krankheitsdauer mit dem Fusionsindex, den regenerativen Fasern und den CD56 (spezifischer Satellitenzell-

marker) positiven Zellen, wie es in Tabelle 12 dargestellt ist, zeigte sich eine Abnahme des durchschnittlichen Fusionsindex von 29,3% auf 19,45% mit Zunahme der Krankheitsdauer.

Gruppe 2 zeigte hingegen eine Zunahme des Fusionsindex über die Zeit. Gleichzeitig zeigte sich eine Zunahme oder der Beginn des Auftretens der regenerativen Fasern in Gruppe 1 und 2 mit Zunahme der Krankheitsdauer.

Die in Tabelle 11 gezeigte Korrelation zwischen dem Fusionsindex und der Krankheitsdauer wird durch die hinzugezogenen immunhistologischen Daten gestützt. Mit Abnahme des Fusionsindex in der Gruppe 1 sank gleichzeitig die Anzahl der CD56 positiven Zellen bei zunehmender Krankheitsdauer. In Gruppe 2 zeigte sich eine Zunahme der CD56 positiven Zellen bei steigender Krankheitsdauer. Dies untermauert trotz geringer Fallzahlen die beobachtete Zunahme des Fusionsindex mit längerer Krankheitsdauer.

Schlussendlich zeigte sich eine Korrelation zwischen der Höhe des Fusionsindex *in-vivo* und der Anzahl an CD56 positiven Zellen *in-situ*.

## 4. Diskussion

Bandscheibenbedingte Erkrankungen werden schon seit der Antike beschrieben [56]. Der lumbale Bandscheibenprolaps ist auch heute noch eine der häufigsten Wirbelsäulenerkrankungen. Trotzdem ist die Pathogenese der degenerativen Veränderungen, die zum Bandscheibenprolaps führen, noch nicht vollständig aufgeklärt.

Jüngste Untersuchungen [32] zeigten eine über die zu erwartende rein neurogene Veränderung hinausgehende Alteration von Muskelfasern des M. multifidus bei Diskusprolapspatienten.

Wir wollten mit unserer Studie dieses Erkenntnis auf zellbiologischer Ebene nachgehen und fanden bei den Patienten trotz erhöhtem Fusionsindex *in-vitro* nur eine geringe Regenerationsaktivität *in-vivo*.

### 4.1. Übersicht

Der Diskussionsteil ist entsprechend dem Ergebnisteil untergliedert. Der erste Teil beinhaltet eine kritische Auseinandersetzung der gewonnenen klinischen, zellbiologischen, myopathologischen und immunhistologischen Daten mit der Literatur. Der zweite Teil zeigt die aus den kritischen Betrachtungen hervorgegangenen Schlussfolgerungen.

## Teil I

### 4.2. Patientengut

Das Patientengut dieser Studie umfasste 19 Patienten mit einem lumbalen Bandscheibenvorfall und als Kontrolle 2 Frakturpatienten und 2 Patienten mit Metastasenverdacht.

Das Patientenkollektiv bestand aus 17 Männern und 6 Frauen mit einem Durchschnittsalter von 46 Jahren. Patientenkollektive anderer Studien zeigten ebenfalls mehr männliche als weibliche Patienten und deren Durchschnittsalter lag zwischen 36,6 und 47,2 Jahren [6,101,114,117]. Auch die in unserer Studie aufgezeigte Häufung von lumbalen

Bandscheibenprolapsen im Segment L4/5 findet sich in der Literatur [94,101,116]. Dammers et al. [118] zeigten eine Kranialisierung des Bandscheibenvorfalls mit steigendem Alter, was unsere Daten unterstützt.

#### 4.2.1. Klinische Daten

Graßhoff et al. [32] zeigten in einer früheren Arbeit die Abhängigkeit der Krankheitsdauer vom muskulären Gewebssyndrom. Mit unseren Daten können wir die Beobachtung unterstützen, dass eine durchschnittlich längere Krankheitsdauer mit einem neurogenen und eine kürzere Krankheitsdauer mit einem unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom verbunden ist. Dies könnte auf eine längere Kompensation der muskulären Insuffizienz bei Patienten mit neurogenen Schäden hinweisen und im Gegensatz dazu auf eine schnellere Instabilitätssituation, mit der Folge einer beschleunigten Symptomverschlechterung, bei Patienten mit einem unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom.

Eine weitere Beobachtung bei der Auswertung der Patientendaten war, dass die Muskelkraft in Gruppe 2 im Vergleich zu Gruppe 1 häufiger und stärker herabgesetzt war. Postacchini et al. [79] beschrieben im Rahmen ihrer Studie über den Verlauf motorischer Defizite vor und nach der operativen Therapie des Bandscheibenprolaps eine unterschiedliche Verteilung von Muskelkraftgraden vor der Operation bei Ihren Patienten. Dabei war die Muskelkraft bei 67% der Patienten auf Grad 4, bei 21% auf Grad 3 und bei 12% auf Grad 1+2 herabgesetzt.

Unsere Daten zeigten auch eine Abnahme der Häufigkeit der motorischen Defizite mit sinkendem Kraftgrad, jedoch beobachteten wir mehr Patienten mit einem Muskelkraftgrad unter 4. In konkreten Zahlen ausgedrückt zeigten in unserer Studie 10 Patienten aus Gruppe 1 und 2 eine Abnahme der Muskelkraft, wobei 40% von ihnen Grad 4 erreichten, 40% Grad 3 (mit einer Mehrheit von 30% aus Gruppe 1 gegenüber 10% aus der Gruppe 2). Die 20% der Patienten, welche nur Grad 1 erreichten, stammten ausschließlich aus Gruppe 2.

Der erhöhte Anteil an Patienten mit einem Muskelkraftgrad unter 4, vor allem in Gruppe 2, könnte auf eine mangelhafte Regeneration der Muskelfasern [27,44,109] und damit eine eingeschränkte Muskelfunktion (Kraft, Stabilisierung) hinweisen.

Aufgrund der prädominanten Muskelfaserdegeneration in Gruppe 2 oder einer eventuell gestörten Muskelfaserneubildung in Gruppe 1 und 2 könnte auch die myoneuronale Kommunikation gestört sein, mit einem daraus resultierenden Innervationsdefizit der Muskulatur. Da die Muskelinnervation ein bedingender Faktor für die Muskelreifung [25] und die Muskelfunktion ist, wäre eine insuffiziente Innervation eine mögliche Ursache für muskuläre Regenerations- und Funktionsstörungen.

In unserer Studie zeigte sich eine Abnahme des Fusionsindex mit zunehmender Krankheitsdauer. Diese beobachtete Korrelation lässt sich nicht konkret mit Literaturangaben vergleichen. Einige Studien zeigten, dass nach einer anfänglichen Erhöhung der Satellitenzellzahl und deren Aktivierung bei akuter Denervierung [98], bei chronischen Denervierungsprozessen eine Zellzahlabnahme auftritt [63]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass eine erhöhte Anzahl an aktivierten Satellitenzellen einen erhöhten Fusionsindex bedingen kann und umgekehrt.

Die Zunahme von regenerativen Muskelfasern mit steigender Krankheitsdauer war eine weitere Beobachtung. Gruppe 1 unterschied sich im Vergleich zu Gruppe 2 in dem Punkt, dass erst ab einer Krankheitsdauer von mindestens 10 Monaten das Auftreten von regenerativen Fasern beobachtet werden konnte. Es wäre denkbar, dass die Satellitenzellen nach ihrer Aktivierung eine definierte Zeit benötigen, bevor sie in vollem Umfang zur Regeneration fähig sind, wie es auch von einigen Autoren beschrieben wurde [7,95,98]. Eine weitere Überlegung wäre, dass das divergierende Raumangebot bei den verschiedenen Gewebssyndromen eine Rolle beim Voranschreiten der Regeneration spielen könnte.

Beim neurogenen Gewebssyndrom kommt es zur Atrophie eines Teils der Muskelfasern und einer kompensatorischen Hypertrophie der noch innervierten Nachbarfasern, welche dadurch den ursprünglich



entstandenen Freiraum besetzen. Einige Autoren [20,25] beobachteten, dass Satellitenzellen in neurogen geschädigten Muskeln ins Interstitium auswanderten und dort neue Myotuben bildeten. Sie vermuteten, dass der fehlende Freiraum unter dem Plasmalem der atrophen Faser ein ursächlicher Faktor dafür wäre. Die Migration der Satellitenzellen und deren Neuformation im Interstitium könnte eine mögliche Verzögerung des Regenerationsbeginns begründen.

Anders stellt sich die Situation in Muskeln mit einem unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom dar. Die nekrotisch degenerierenden Muskelfasern werden durch ortsständige oder eingewanderte Makrophagen eliminiert, wodurch im Plasmalemschlauch ein Freiraum entsteht. Dies würde es den Satellitenzellen erlauben ohne physische Behinderung direkt im leeren Plasmalemschlauch auszudifferenzieren und entweder mit den vitalen Muskelfaserenden oder miteinander zu fusionieren. Chou et al. [20] vermuteten zusätzlich, dass die Fusion von Satellitenzellen mit innervierten Muskelfasern schneller vorangeht und eine fehlende Innervation oder eine langsame Reinnervation diesen Prozess verzögern würde.

Aufgrund dieser Überlegungen wäre es möglich, dass die Regeneration in den Muskeln der Gruppe 2 einige Vorteile gegenüber der Gruppe 1 hätte, was das frühere Auftreten von regenerativen Fasern in dieser Gruppe erklären könnte.

#### 4.3. Fusionsindex

In der Literatur konnten wir keine Fusionsdaten von Zellkulturen des M. multifidus finden. Renault et al. [85,86] beschrieben in früheren Studien einen Fusionsindex von 59 - 77,5% im M. quadriceps bei normalen Patienten. Delaporte et al. [23] zeigten eine Abhängigkeit des Fusionsindex von den Konditionsbedingungen in der Zellkultur mit einer Variation von 56 – 76% unter verschiedenen Kulturbedingungen und 43% bei Kontrollkulturen.

Meola et al. [71] beschrieben in Zellkulturexperimenten aus dem M. vastus lateralis 2 Populationen von muskelbildenden Zellen, wobei die Erste

Population einen Fusionsindex von 53% und die Zweite einen Fusionsindex von 10,71% aufweist. Die Autoren vermuteten einen Hinweis auf verschiedene Aktivierungszustände der Subpopulationen.

Die in unserer Studie gezeigte Erhöhung des Fusionsindex in Gruppe 1 und 2 im Vergleich zu Kontrollgruppe 3 kann eine Aktivierung der ruhenden Satellitenzellen infolge einer Alteration der Muskulatur bedeuten. Da die Erhöhung in den Gruppen mit den pathologischen Gewebssyndromen keinen grossen Unterschied aufwies, ist es denkbar, dass der primäre Aktivierungsmechanismus nicht von der Art der Alteration beeinflusst wird.

Der Einzelwert der Gruppe 3 ist für sich allein nicht repräsentativ, entspricht aber zusammengenommen mit den anderen Fusionsindizes einer Normalverteilung.

In der Literatur sind unserem Wissen nach keine Daten veröffentlicht, die einen Zusammenhang zwischen der Menge des Biopsieausgangsmaterials und dem Erfolg der Zellkultur darstellen. Bei unseren Zellkulturansätzen konnten nur Biopsien mit einem Mindestgewicht von 0,3 Gramm erfolgreich kultiviert werden.

Die nichterfolgreiche Kultivierung der restlichen Biopsien, ausgenommen die durch Kontamination verworfenen, könnte auf endogenen Störungen der Satellitenzellen oder exogene Einflüsse bei der Zellisolation zurückgeführt werden. Bei den Fällen 19 und 20 könnte ein Grund das erhöhte Alter von 75 und 79 Jahren gewesen sein, zumal einige Autoren eine Abnahme der Satellitenzellzahl mit dem Alter beschreiben [18,89,94]. Fall 17 und 18 könnten aufgrund insuffizienter Satellitenzellaktivierung im normalen Muskel eine unzureichende Proliferation nach der Zellisolation aufgewiesen haben. Andererseits muss gesagt werden, dass das Protokoll zur Zellisolation aus humanen Muskelbiopsien zwar ausgereift, aber nicht vollständig vor Ausfällen geschützt ist.

#### 4.4. Myopathologie

Ein direkter Vergleich von myopathologischen Kriterien und dem Fusionsindex in der Literatur ist uns nicht bekannt.

In unserem Patientenkollektiv waren zwei Patienten über 75 Jahre alt. Bei Ihnen zeigte sich zusätzlich zum chronisch neurogenen Gewebssyndrom eine sekundäre Begleitmyopathie. Die in der Literatur beschriebene Abnahme der Satellitenzellzahl mit dem Alter lässt die Annahme zu, dass bei diesen Patienten aufgrund einer mangelhaften oder verlangsamten Muskelregeneration das histologische Bild einer Myopathie entsteht, die sich durch die neurogene Komponente noch verstärkt.

Die erhöhte Anzahl elongierter Fasern, der Kernkonglomerate und der Faserhypertrophien in Gruppe 1 untermauert ihre Zuordnung zum neurogenen Gewebssyndrom, sowie die Häufung der degenerativen Fasern in Gruppe 2 deren Zuordnung zum unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom unterstützt. Das Auftreten von elongierten Fasern in Gruppe 3 liegt im Rahmen des Normalen und ist nicht als pathologisch zu werten. Der Anteil an regenerativen Fasern, welcher in Gruppe 1 und 2 beobachtet wurde, ist als Regenerationsantwort auf die Alteration der Muskulatur anzusehen. Die Regeneration soll die Neubildung von Myotuben gewährleisten und dadurch die Aufrechterhaltung der Muskelfunktion.

In unserer Studie ist auffällig, dass trotz hoher Fusionsindizes nur eine unterdurchschnittliche Regenerationsaktivität, in Form von regenerativen Fasern, in den Muskelschnitten verifizierbar war.

In der Literatur ist beschrieben, dass in Abhängigkeit vom Entnahmeort der Muskelbiopsie eine andere Repräsentation der myopathologischen Kriterien vorhanden ist [52,114]. Der M. multifidus, welcher in unserer Studie untersucht wurde, ist ein kleiner und unisegmental versorgter Muskel im Vergleich zum M. quadriceps oder M. vastus lateralis [52,114], wodurch sich die Aussagekraft unserer Biopsien erhöht.

Eine weitere Beobachtung bei der histologischen Auswertung war, dass bei Biopsien mit erfolgreich angelegter Zellkultur die Anzahl an regenerativen Fasern *in-vivo* im Vergleich zum Gesamtdurchschnitt der jeweiligen Gruppe erhöht war. Bei Biopsien ohne erfolgreiche Zellkultur in Gruppe 1 waren dagegen keine regenerativen Muskelfasern *in-vivo* nachweisbar und bei Biopsien ohne erfolgreiche Zellkultur in Gruppe 2 war die Anzahl im Vergleich zum Gesamtdurchschnitt der Gruppe 2

herabgesetzt. Dies lässt die Vermutung zu, dass das Auftreten von regenerativen Fasern *in-vivo* auf eine gewisse Proliferations-, Differenzierungs- und Fusionsfähigkeit der Satellitenzellen hinweist, die den Erfolg der Zellkultur beeinflussen kann.

#### 4.5. Fluoreszenzdaten

Maier et al. [63] veröffentlichten in Ihrer Studie einen Vergleich von Satellitenzellen (SZ) pro Muskelfaser (MF) bei normaler Muskulatur und bei Patienten mit Muskelschäden. Die normale Muskelgruppe zeigte 5,5 SZ/100 MF, Patienten mit einer Duchenne Muskeldystrophy (DMD) zeigten eine Erhöhung auf 12 SZ/100 MF und die Patientengruppe mit einer neurogenen Atrophie zeigte ein Verhältnis von 8,6 SZ/100 MF. Diese Beobachtungen stützen unsere Daten, welche eine Erhöhung der CD56 positiven Satellitenzellen pro Muskelfaser bei den beiden pathogenen Gewebssyndromen (Gruppe 1: 12,76 SZ/100 MF, Gruppe 2: 12,72 SZ/100 MF) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe 3: 9,11 SZ/100 MF) zeigten. Wir beobachteten bei steigendem Fusionsindex eine Erhöhung der Anzahl an CD56 positiven Zellen pro Muskelfaser in Gruppe 1 und untermauerten damit unseren Verdacht, dass der Fusionsindex von der Anzahl an Satellitenzellen abhängt.

In der Literatur existiert laut unseren Recherchen keine Studie, die CD56/CD36 Doppelmarkierungen mit verschiedenen pathologischen Gewebssyndromen korreliert hat. W. Schubert [92] zeigte, dass sich invasive endotheliale Zellen am Ort der Muskelregeneration über den switch von CD56-/CD36+, CD56+/CD36+ und CD56+/CD36- in myogene Vorläuferzellen wandeln können. Unsere Daten lassen vermuten, dass diese Migration CD36 positiver Zellen in die Muskulatur und deren Umwandlung in CD56 positive Zellen von der Art der Muskelalteration abhängig ist. Der Anteil CD56+/CD36+ Zellen bei Patienten mit einem unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom war mit 2,5 doppelmarkierten Zellen pro 100 Muskelfasern (dmZ/100 MF) mäßig erhöht gegenüber Patienten mit einem neurogenen Gewebssyndrom (1,7 dmZ/ 100 MF) und stark erhöht im Vergleich zur Normalgruppe (0,64 dmZ/

100 MF). Es ist jedoch unklar in welchem Stadium der Wandlung von der endothelialen zur myogenen Zelle sich die markierten Zellen befanden, in welchem Ausmaß die Wandlung von der Art der Muskelalteration abhängt und inwieweit dies das Ergebnis verändern würde.

## Teil II

### 4.6. Schlussfolgerungen

Die bioptischen Daten aus dieser Studie (geringe Anzahl basophiler Muskelfasern) sprechen für eine relativ geringe Regenerationsaktivität der Muskelfasern im M. Multifidus beim lumbalen Bandscheibenvorfall. Demgegenüber fand sich ein deutlich erhöhter Fusionsindex der aus diesen Biopaten isolierten myogenen Zellen (mononucleäre Satellitenzellen). Dieser scheinbare Kontrast imponierte besonders bei den neurogenen Gewebssyndromen.

Bisher liegen in der Literatur keine Daten zum Regenerationsverhalten des M. Multifidus vor, so dass hier keine direkten Vergleiche mit anderen Ergebnissen vorgenommen werden können. Bezüglich des Auftretens regenerativer Zeichen in anderen Muskelgruppen, unter Bedingungen neurogener Schädigung, ist auf die Untersuchungen von Ishimoto et al. [44] hinzuweisen, die zeigten, dass bei Amyotropher Lateralsklerose wenige basophile Fasern trotz aktivierter Satellitenzellen vorliegen. Die Autoren schlossen daraus eine Beeinträchtigung der Zellteilungsfähigkeit der Satellitenzellen *in-vivo*. Als Aktivierungskriterium der Satellitenzellen wählten sie den prozentualen Anteil an Euchromatin im Zellkern. Wir benutzten zur Satellitenzellendarstellung die Markierung des CD56 Antigens, dass ein selektiver Marker dieser Zellen *in-situ* ist [91,92]. Die Vermehrung der Satellitenzellzahl und die Präsenz von CD56 auf aktivierten Satellitenzellen [30,91] sind in unserer Studie als Aktivitätskriterium anzusehen. Dieser Unterschied limitiert die Vergleichbarkeit unserer Daten mit der Ishimoto-Studie.

Die Erhöhung der Satellitenzellzahl bei verschiedenen Krankheitsbildern wurde mehrfach in Studien aufgezeigt [14,42,103,109], also auch bei

neurogenen Prozessen. Diese Daten stützen die Annahme, dass die Satellitenzellen, als die Quelle der Muskelfaserregeneration, durch neurogene Prozesse zur Proliferation stimuliert werden, ohne jedoch konsekutiv die Stadien der Myotubenbildung nach Zellfusion, sowie das Wachstum der Myotuben zu reifen Muskelfasern zu durchlaufen. Dafür spricht die Abwesenheit einer signifikanten Basophilie *in-situ*, die bei einer ausgeprägten Präsenz der genannten Stadien zu erwarten wäre.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der Zahl aktivierter Satellitenzellen bei den eindeutig neurogenen Gewebssyndromen im M. Multifidus geht einher mit einer Erhöhung der Fusionsbereitschaft dieser Zellen *in-vitro*, quantifiziert durch den Fusionsindex. Da diese Daten jeweils aus ein- und derselben Muskelbiopsie erhoben wurden, kann man davon ausgehen, dass sie das reale intrinsische Verhalten der myogenen Zellen widerspiegeln. Allerdings kontrastiert die erhöhte Fusionsbereitschaft *in-vitro* mit der Abwesenheit einer ausgeprägten Basophilie *in-situ*, denn Myotubenbildung durch Zellfusion *in-situ* ist begleitet von erheblicher Proteinsyntheseaktivität innerhalb des endomysialen Schlauches. Im Falle ihres Vorhandenseins wäre diese anhand einer gesteigerten Basophilie solcher Muskelfasern in Färbungen wie der Hämatoxylin-Eosin Färbung, die hier zur Anwendung kam, erkennbar. Man kann daher davon ausgehen, dass die isolierten myogenen Zellen *in-vitro* Bedingungen vorfinden, welche es zulassen, die durch den neurogenen Prozess aktivierte und intrinsisch gesteigerte Fusionsbereitschaft in Zellfusionen zu überführen. Zu den Faktoren, die in der Zellkultur dazu beitragen, gehören Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren im Medium. Das Entfallen von hemmenden Faktoren unter Kulturbedingungen, wie zum Beispiel der Kontakt der Satellitenzelle zur Muskelfaser [13], oder die Freisetzung von Muskelgewebefaktoren [10,11] infolge der Muskelzerkleinerung während der Zellisolation, sind ebenso denkbare Faktoren. Innerhalb der Muskulatur könnte der Zeitpunkt der Satellitenzellgewinnung eine Rolle spielen, da einige Autoren beschreiben, dass es bei einer intrinsischen oder extrinsischen Muskelalteration zu einer frühzeitigen Aktivierung und Zellzahlvermehrung der Satellitenzellen kommt [11,63,98]. Das könnte

den Erfolg der Zellkultur und den Fusionsindex bei kurzer Krankheitsdauer erklären. Möglich ist auch eine schmerzreflektorische Störung der Muskelfunktion, wie sie bei Triggerpunktstörungen der Muskulatur oder postoperativen Muskelatrophien nach Kniearthroskopien oder ähnlichen Eingriffen bekannt sind [72,106,115].

H.M. Snow [98] vermutete, dass im Vergleich zu aktiven Satellitenzellen im wachsenden Muskel von Kindern oder Jugendlichen, Satellitenzellen in der reifen Muskulatur von Erwachsenen weniger aktiv sind und es länger dauert sie zu aktivieren. Da das Durchschnittsalter in unserem Patientengut im Mittel 46 betrug, könnte dies ebenfalls ein Grund für das spätere Auftreten von regenerativen Fasern in den Muskelschnitten sein.

Wir beobachteten eine Abnahme des Fusionsindex und eine Abnahme der CD56+ Zellen mit zunehmender Krankheitsdauer in Gruppe 1. In Langzeitdenervierungen [63] wurde eine Abnahme der Satellitenzellen im Muskel beobachtet. Die exakte Bestimmung des Denervierungszeitraumes in der Klinik ist jedoch problematisch. Angenommen er stimmt mit der Krankheitsdauer der Patienten überein, so würde dies für eine Abnahme der Satellitenzellzahl mit zunehmender Krankheitsdauer sprechen. Zusammen mit unserer Vermutung, dass eine insuffiziente Innervation ein möglicher Störfaktor bei der Muskelregeneration sei, wäre es denkbar, dass aus der längeren neurogenen Schädigung bei den Patienten der Gruppe 1 eine Abnahme des Fusionsindex resultieren könnte. Eine andere Möglichkeit wäre der Verbrauch von aktivierten Satellitenzellen zur Muskelfaserneubildung und beim Aufbau hypertropher Fasern.

Bei der Auswertung unserer Ergebnisse zeigte sich, dass beim Anlegen einer Zellkultur das Vorhandensein von regenerativen Fasern *in-vivo* scheinbar von Vorteil war. Dies lässt vermuten, dass zum Zeitpunkt der *in-vivo* erfolgenden Fusion ein optimaler Aktivierungszustand der gewonnenen Satellitenzellen mit der Folge einer besseren Proliferationsbereitschaft *in-vitro* bestehen könnte. Die Beobachtung, dass Patienten mit hohem Fusionsindex *in-vitro* eine geringe Häufigkeit von regenerativen Fasern *in-vivo* (*in-situ*) zeigten, könnte ein Hinweis für eine weniger optimale Differenzierungs- und Fusionsfähigkeit trotz verbesserter

proliferativer Eigenschaften sein. Die Klärung der Frage nach der Existenz von Faktoren, welche das Verhalten der Satellitenzellen *in-vivo* und *in-vitro* divergent beeinflussen bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine interessante Beobachtung zeigte sich bei der vergleichenden Betrachtung der Krankheitsdauer und der Immunfluoreszenzdaten der entsprechenden Gewebssyndromgruppe. Wir zeigten eine Erhöhung der CD56+/CD36+ doppelmarkierten Zellen bei Patienten mit einem unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom gegenüber Patienten mit einem neurogenen Gewebssyndrom. Somit trat in unserer Studie eine erhöhte CD56+/CD36+ Doppelmarkierung zusammen mit einer verkürzten Krankheitsdauer auf. Wir hatten vermutet, dass eine im Vergleich zur Gruppe 2 verbesserte Kompensation der muskulären Instabilität der Gruppe 1 eine spätere Manifestation des Bandscheibenvorfalles und somit eine längere Krankheitsdauer bedingen könnte. Auf der Grundlage der Beobachtungen von Schubert [92], wonach die CD56+/CD36+ doppelmarkierten Zellen myogene Kompetenz besitzen, könnte eine vermehrte Anwesenheit dieser Zellen im Muskel eine Unterstützung der Muskelregeneration darstellen. Es wäre denkbar, dass eine Insuffizienz der lokalen Satellitenzellen eine vermehrte Invasion von diesen multipotenten Zellen endothelialen Ursprungs verursacht, um eine suffiziente Muskelregeneration zu gewährleisten. Die erhöhte Doppelmarkierung in Gruppe 2 könnte demzufolge ein Hinweis auf eine insuffiziente Muskelregeneration sein.

Das gegenüber der Gruppe 3 verschieden hohe Auftreten dieser Zellen in den Gruppen 1 und 2, erlaubt die Annahme, dass in Abhängigkeit von der Art der Muskelschädigung unterschiedliche Faktoren freigesetzt werden könnten, um so zusätzliche Regenerationssysteme zu rekrutieren. Ein weiterer Gesichtspunkt ist, dass die Invasion von endothelialen Zellen, mit anschließender myogener Differenzierung, oft einer Neueinsprossung von Kapillaren in den Bereich einer nekrotischen Muskeldegeneration folgt. Da degenerative Fasern vornehmlich beim unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom der Gruppe 2 auftraten, könnte das eine weitere Erklärung für das erhöhte Auftreten doppelmarkierter Zellen sein. Aufgrund von Studien [4,22], welche das Vorhandensein von anderen



Muskelregenerationssystemen neben der Satellitenzelle beschreiben, ist es auch denkbar, dass die CD56+/CD36+ Zellen eine Zusatzquelle an muskulären Stammzellen darstellen, die im Rahmen des Physiologischen liegen.

Die Stabilisierung der Wirbelsäule erfolgt durch 3 Systeme. Die knöchernen Wirbelsäule mit ihren ligamentären Strukturen, die Muskulatur und die neurale Kontrolle [66]. Die in dieser Studie gezeigten Ergebnisse unterstützen die Vermutung einer insuffizienten Muskelregeneration *in vivo* bei Patienten mit einem neurogenen Gewebssyndrom. Diese Insuffizienz der Muskelregeneration könnte zu einer myogenen Destabilisierung [38,61,81] der Wirbelsäule führen. Eine Überlastung des passiven Haltesystems, mit progredienter Degeneration, abnormaler Beweglichkeit und daraus resultierenden Lumbalgien und Verletzungen wären die Folgen [65,81]. Somit ist die muskuläre Dysbalance der Wirbelsäule ein möglicher Faktor bei der Entstehung und Unterhaltung des Rückenschmerzes.

Der Rückenschmerz ist die „Volkskrankheit“ der industrialisierten Welt. 80 – 85 % der deutschen Bevölkerung, auch in der Altersgruppe der 25 – 34 Jährigen, leiden oder litten schon einmal unter Rückenschmerzen [8,33]. Der wirtschaftliche Schaden durch Arbeitsausfall und Behandlungskosten ist immens. Im Jahr 2001 wurden in Deutschland für die Behandlung von Rückenschmerzpatienten 20 Milliarden DM und für Folgekosten durch Arbeitsausfall 30 Milliarden DM ausgegeben [33]. Als Ursache von Frühberentungen nimmt der Rückenschmerz mit 18 – 20% ebenfalls eine Spitzenposition ein [33].

Ungeachtet intensiver Forschungen auf dem Gebiet des Rückenschmerzes ist man noch weit davon entfernt die Ursachen für seine Entstehung vollständig aufzuklären und entsprechende Diagnose- und Therapieverfahren zu entwickeln. Neue Therapieansätze in der Physiotherapie zum Beispiel orientieren sich in die Richtung der funktionellen Rehabilitation mit aktiver Kräftigung geschwächter Muskelgruppen und einer Verbesserung des Bewegungsumfanges der Wirbelsäule [51,64]. In jüngsten Studien wurde gezeigt, dass dadurch eine

frühere Eingliederung in den normalen Arbeitsprozess und eine geringere Rezidivrate an Lumbalgien erreicht werden konnte [64].

Trotz der gezeigten Daten und ähnlicher Beobachtungen von Regenerationsdefiziten bei neurogen geschädigter Muskulatur in anderen Studien [44], fehlen in der Literatur Korrelationen unserer Art. Die Diskrepanz zwischen der erhöhten Aktivität der Satellitenzellen *in-vitro* und der spärlichen Regenerationsaktivität *in-vivo* spricht jedoch für eine postfusionelle oder unmittelbar präfusionelle Arretierung der Muskelregeneration. Aufgrund der geringen Fallzahlen ergibt sich kein harter Beweis für die Multifidus-Spezifität der Beobachtungen. Es bedarf daher weiterer Vergleichsstudien und gezielter Untersuchungen des neurogenen Gewebssyndromes, um diese Aussagen zu untermauern und die steuernden Faktoren und Regelmechanismen der Muskelregeneration, sowie deren Interaktion besser zu verstehen.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Regenerationsverhalten des Musculus multifidus von Patienten mit lumbalem Bandscheibenvorfall, anhand der quantitativen Analyse der Fusion myogener Zellen (Satellitenzelle) *in-vitro* und deren Anzahl *in-situ* untersucht. Diese Parameter wurden mit bioptischen und klinischen Parametern korreliert, um zu ermitteln, ob chronische Verläufe mit einer auf insuffizienter Muskelfaserregeneration beruhenden muskulären Instabilität assoziiert sein könnten.

Dazu wurde von 19 Patienten im Rahmen einer operativen Versorgung in der Klinik für Orthopädie, Universitätsklinik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, eine Biopsie aus dem segmental betroffenen M. multifidus entnommen. Kontrollbiopsien wurden von 2 Patienten, welche zur Versorgung einer Fraktur, und von 2 Patienten, welche wegen einer diagnostischen Entnahme bei Metastasenverdacht operiert wurden, gewonnen. Anschließend wurde jede Biopsie histologisch und im Rahmen der Zellkultur im Zell-Labor der Arbeitsgruppe „Molekulare Mustererkennung“ des Instituts für Medizinische Neurobiologie aufgearbeitet. Die Untersuchung erfolgte an 5 bis 10 µm dünnen Muskelkryoschnitten mittels Haematoxylin – Eosin Färbung. Die gefundenen histologischen Befunde wurden in 3 Gruppen eingeteilt: normaler Befund, neurogenes Gewebssyndrom und unspezifisch myopathologisches Gewebssyndrom. Zur Berechnung des Fusionsindex wurden die Zellkulturen der differenzierten Satellitenzellen nach May – Grünwald gefärbt und unter dem Mikroskop entsprechend ausgezählt. Zur Detektierung der Satellitenzellen der Probanden wurden die Kryoschnitte mit immunhistologischen Markern gegen CD56 und CD36 markiert und ausgewertet. Die experimentell gewonnenen Daten wurden mit den klinischen Patientendaten korreliert.

Es fanden sich in dieser Arbeit 12 Patienten mit einem neurogenen, 8 mit einem unspezifisch myopathologischen Gewebssyndrom und 3 mit normalem Befund. Bei der Gruppe der neurogen veränderten Muskulatur fand sich ein erhöhter Fusionsindex ( $25,24 \pm 6,19\%$ ) gegenüber der normalen ( $10,3\%$ ) Gruppe. Der Fusionsindex ( $21,93 \pm 1,72\%$ ) der

unspezifisch veränderten Muskulatur war im Vergleich mit der normalen Gruppe erhöht und mit der neurogenen Gruppe leicht erniedrigt.

Wegen der geringen Anzahl der Fälle (n=23) erwies sich eine statistische Analyse als nicht sinnvoll.

Unsere Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen einer früheren Studie [32], wonach Patienten mit neurogenen Muskelschäden eher eine lange und Patienten mit unspezifisch myopathologischen Veränderungen eine kürzere Krankheitsdauer aufweisen.

Die Ergebnisse zeigten eine Steigerung der Fusionsrate der Satellitenzellen von Patienten mit einem neurogenen Gewebssyndrom bei gleichzeitig geringer Regenerationsaktivität der Muskelfasern *in-situ*, gemessen an der geringen Zahl basophiler Muskelfasern.

Die Daten zeigen, dass unter den Bedingungen der neurogenen Alteration des M. multifidus durch radikuläre Schäden im Rahmen des Bandscheibenvorfalls die Satellitenzellen zur Proliferation und Fusion stimuliert werden. Es entstehen aber offenbar keine grösseren Myotuben, da die damit einhergehende Basophilie in den Routine-Färbungen der Muskelschnitte nur sehr gering ausgeprägt ist.

Dieser Zusammenhang stützt die Annahme eines Post- oder Präfusionsblockes der Muskelfaserregeneration. Hierauf könnte eine progressive Instabilität des M. multifidus beruhen.

Zukünftige vergleichende Untersuchungen werden zeigen, ob diese Befunde für die chronische neurogene Schädigung des M. multifidus im Rahmen des Bandscheibenvorfalls spezifisch sind.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adams MA, Hutton WC: The effect of posture on diffusion into the lumbar intervertebral discs  
ISSLS Meeting, Montreal 1984
2. Allen RE, Temm-Grove CJ, Sheehan SM, Rice G: Skeletal muscle satellite cell cultures  
Methods in Cell Biology 52 (1998), Chapter 8, S. 155-176
3. Asakura A, Komaki M, Rudnicki M: Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic and adipogenic differentiation  
Differentiation (2001), 68, S. 245-253
4. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA: Myogenin specification of side population cells in skeletal muscle  
The Journal of Cell Biology 159(1) (2002), S. 123-134
5. Ayotte DC, Ito K, Perren SM, Tepic S: Direction-dependent constriction flow in a poroelastic solid: the intervertebral disc valve  
J Biomech Eng (2000) Dec, 122(6), S. 587-593
6. Bajek S, Bobinac D, Bajek G, et al.: Muscle fiber type distribution in multifidus muscle in cases of lumbar disc herniation  
Acta Med Okayama 54(6) (2000), S. 235-241
7. Baroffio A, Hamann M, et al.: Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells  
Differentiation (1996), 60, S. 47-57
8. Barthels J:  
Was leistet die Physiotherapie beim Rückenschmerz?  
StK – Zeitschrift für angewandte Schmerztherapie 1/2003 (Der Deutsche Schmerztag 2003)
9. Beard H, Stevens R: Biochemical changes in the intervertebral disc.  
In Jayson M: The Lumbar Spine and Backpain, Pitman (1985)
10. Bischoff R, Heintz C: Enhancement of skeletal muscle regeneration  
Developmental Dynamics (201), (1994), S. 41-54
11. Bischoff R: Analysis of muscle regeneration using single myofibers in culture  
Medicine and Science in Sports and Exercise 21(5) (1989), S. 164-172
12. Bischoff R: Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells  
Developmental Dynamics 208 (1997), S. 505-515

13. Bischoff R: Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers  
Development 109 (1990), S. 943-952
14. Blau HM, Webster C, Chiu CP, Guttman S, Chandler F:  
Differentiation properties of pure populations of human dystrophic muscle cells  
Exp Cell Res 144 (1983), S. 495-503
15. Boden SD, Davis DO, Dina TS, Patronas NJ, Wiesel SW: Abnormal magnetic resonance scans of the lumbar spine in asymptomatic subjects  
J Bone Joint Surg Am 1990, 72-A, S. 403-408
16. Bonavaud S, Thibert P, Gherardi RK, Barlovatz-Meimon G: Primary human muscle satellite cell culture: Variations of cell yield, proliferation and differentiation rates according to age and sex of donors, site of muscle biopsy, and delay before processing  
Biology of the Cell 89 (1997), S. 233-240
17. Campion D R: The muscle satellite cell: A review  
International Review of Cytology 87, S. 225-251
18. Cardasis CA, Cooper GW: An analysis of nuclear numbers in individual muscle fibers during differentiation and growth: A satellite cell-muscle fiber growth unit  
J Exp Zool 191 (1976), S. 347-358
19. Carragee EJ, Han MY, Suen PW, Kim D: Clinical outcomes after lumbar discectomy for sciatica: the effect of fragment type and annular competence  
The Journal of Bone&Joint Surgery 85-A (2003) No 1, S. 102-108
20. Chou SM, Nonaka I: Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscle  
Journal of the Neurological Sciences 34 (1977), S. 131-145
21. De Palma A, Rothman RH: The Intervertebral Disc  
Saunders, Philadelphia (1970) In Krämer J et al.: Bandscheibenbedingte Erkrankungen, 4. Auflage, (1997) Thieme Verlag,
22. Deasy BM, Huard J: Gene therapy and tissue engineering based on muscle-derived stem cells  
Current Opinion in Molecular Therapeutics (2002), 4(4), S. 382-389
23. Delaporte C et al.: Human myotube differentiation in vitro in different culture conditions  
Biology of the Cell, 57 (1986), S. 17-22

24. Engel AG, Franzini-Armstrong C: Myology Volume 1, Second Edition (1994), McGraw-Hill INC., Chapter 35 "Basic Reactions of Muscle", S. 832- 888
25. Engel AG, Franzini-Armstrong C: Myology Volume 1, Second Edition (1994), McGraw-Hill INC., Chapter 3 "The satellite cell and muscle regeneration", S. 97-118
26. Ford D, Bagnall KM, McFadden KD, Greenhill B, Raso J: Analysis of vertebral muscle obtained during surgery for correction of a lumbar disc disorder  
Acta Anat Basel 116(2) (1983), S. 152-157
27. Furling D, Coiffier L, et al.: Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy  
Human Molecular Genetics (10/19), (2001), S. 2079-2087
28. Gibson MC, Schultz E: Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells  
Muscle & Nerve 6 (1983), S. 574-580
29. Gordon S, King H et al.: Mechanism of disc rupture  
Spine 16 (1991) S.452
30. Gosztanyi G, Naschold U, et al.: Expression of Leu-19 (CD56, N-CAM) and nitric oxide synthase (NOS) I in denervated and reinnervated human skeletal muscle  
Microscopy Research and Technique 55 (2001), S. 187-197
31. Grabow L: Analgetische Potenz der Akupunktur  
Europ J Pain 13 (1992), S. 119-123
32. Grasshoff H, Schubert W, Mahlfeld K: Myopathologie des M. multifidus bei Patienten mit lumbalem Bandscheibenvorfall,  
Orthopädische Praxis 33, 12 (1997) S. 783-785
33. Groenewald U:  
Lübecker Wissenschaftler leitet grösste jemals durchgeführte Studie zum Rückenschmerz  
Innovationsreport 16.07.2001, Forum für Wissenschaft, Industrie und Wirtschaft
34. Grifka J, Krämer J: Prospektiv randomisierte Akupunkturstudie beim Lumbalsyndrom  
Orthop Prax (1994)
35. Guinto F, Hashim H, Stumer M: CT demonstration of disk regression after conservative therapy  
AJNR Am J Roentgenol 1984, 5, S. 632-633

36. Gussoni E, Blau HM, Kunkel LM: The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients  
Nature Medicine 1997 Sep, 3 (9), S. 970-977
37. Hassler O: The human intervertebral disc  
Acta orthop scand 40 (1969) S. 765
38. Hides JA, Richardson CA, Jull GA: Multifidus muscle recovery is not automatic after resolution of acute, first episode low back pain  
Spine 21(23) (1996), S. 2763-2769
39. Hides JA, Stokes MJ, Saide M, Jull GA, Cooper DH: Evidence of lumbar multifidus muscle wasting ipsilateral to symptoms in patients with acute/subacute low back pain  
Spine 19(2) (1994), S. 165-172
40. Hirsch C, Schajowicz F: Studies in structural changes in the lumbar anulus fibrosus  
Acta orthop scand 22 (1952-53), S. 184
41. Hirsch C: Pathologie und Mechanik der aseptischen Zwischenwirbelkrankheiten. In: Die Wirbelsäule in Forschung und Praxis, Band 15, (1960), Hippokrates Verlag
42. Hurko O, McKee L, Zuurveld J, Swick HM: Comparison of duchenne and normal myoblasts from a heterozygote  
Neurology 37 (1987), S. 675-681
43. Illa I, Leon-Monzon M, Dalakas MC: Regenerating and denervated human muscle fibers and satellite cells express neural cell adhesion molecule recognized by monoclonal antibodies to natural killer cells  
Ann Neurol 31 (1992), S. 46-52
44. Ishimoto S, Goto I, Ohta M, Kuroiwa Y: A quantitative study of the muscle satellite cell in various neuromuscular disorders  
Journal of Neurological sciences 62 (1983), S. 303-314
45. Jerusalem F, Zierz St: Muskelerkrankungen, 2. Auflage (1991), Thieme Verlag, Kapitel 2 „Allgemeine Myopathologie“, S. 29-72
46. Jonsson B, Stromqvist B: Influence of age on symptoms and signs in lumbar disc herniation  
Eur Spine J 1995, 4(4), S. 202-205
47. Jowett RL, Fidler MW, Troop JOG: Histochemical changes in the multifidus in mechanical derangements of the Spine  
Orthop Clin North Am 6 (1975), S. 145-161
48. Kalimo H, Rantanen J, Viljanen T, Einola S: Lumbar Muscles: Structure and Function



- Annals of Medicine 21 (1989), S. 353-359
49. Kapandji IA: Funktionelle Anatomie der Gelenke, Band 3 Rumpf und Wirbelsäule (1999), Hippokrates Verlag, 3. Auflage, „Die Wirbelsäule als Ganzes“ S. 2-42
  50. Kapandji IA: Funktionelle Anatomie der Gelenke, Band 3 Rumpf und Wirbelsäule (1999), Hippokrates Verlag, 3. Auflage, „Lendenwirbelsäule“ S. 64-118
  51. Kaser L, Mannion AF et al.:  
Active therapy for chronic low back pain: part 2. Effects on paraspinal muscle cross-sectional area, fiber size and distribution. Spine 2001 Apr. 15, 26(8), S. 909-919
  52. King Engel W: Muscle biopsies in neuromuscular diseases Paediatric Clinics of North America (14/4), (1967), S. 963-995
  53. Krämer J et al.: Bandscheibenbedingte Erkrankungen, 4. Auflage, (1997) Thieme Verlag, Kapitel 4 „Anatomie und Physiology“ S. 15-32
  54. Krämer J et al.: Bandscheibenbedingte Erkrankungen, 4. Auflage, (1997) Thieme Verlag, Kapitel 6 „Bandscheibendegeneration (Diskose)“ S. 47-58
  55. Krämer J et al.: Bandscheibenbedingte Erkrankungen, 4. Auflage, (1997) Thieme Verlag, Kapitel 11 „Lumbalsyndrom“ S. 141-316
  56. Krämer J et al.: Bandscheibenbedingte Erkrankungen, 4. Auflage, (1997) Thieme Verlag, Kapitel 2 „Geschichte und Terminologie“, S. 3-12
  57. Krämer J, Kolditz D, Godwin R: Water and electrolyte content of human intervertebral discs under variable load Spine 10 (1985) S. 69
  58. Krämer J: Biomechanische Veränderungen im lumbalen Bewegungssegment. In Junghanns H: Die Wirbelsäule in Forschung und Praxis, Band LVIII, (1973) Hippokrates Verlag
  59. Krämer J: Fluid exchange in the intervertebral disc Orthop Clin N Amer 8 (1977) S. 211
  60. Krämer J: Klinische und experimentelle Untersuchungen mit der Wirbelsäulenstreckbandage Med-orthop Techn 93 (1973) 49
  61. Leinonen V, Kankaanpää M, Luukkonen M, et al.: Lumbar paraspinal muscle function, perception of lumbar position, and postural control in disc herniation-related back pain Spine 28(8) (2003) S. 842-848

62. Lundo K, Bolton K: Structure and function of the lumbar intervertebral disk in health, aging and pathologic conditions  
J Orthop Sports Phys Ther 2001 Jun, 31(6) S. 291-303
63. Maier F, Bornemann A: Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies  
Muscle & Nerve 22 (1999), S. 578-583
64. Mayer TG, Gatchel RJ, Mayer H et al.:  
A prospective two-year study of functional restoration in industrial low back injury. An objective assessment procedure.  
JAMA 1987 Oct 2; 258(13), S. 1763-1767
65. Mannion AF: fibre type characteristics and function of the human paraspinal muscles: normal values and changes in association with low back pain  
Journal of Electromyography and Kinesiology 9 (1999) S. 363-377
66. Manohar M, Panjabi:  
Clinical spinal instability and low back pain  
Journal of Electromyography and Kinesiology Volume 13, Issue 4, August 2003, S. 371-379
67. Martinez A, Asians V, Engel WK: Paralysis of innervated cultured human muscle fibers affects enzymes differentially  
Journal of Neurochemistry 54 (1990), S. 223-229
68. Mastaglia FL et al.: Skeletal Muscle Pathology, Second Edition (1992), Churchill Livingstone Verlag, Chapter 3 "Pathological reactions of skeletal muscle" S. 123-184
69. Mattila M, Hurme M, Alaranta H, et al.: The multifidus muscle in patients with lumbar disc herniation. A histochemical and morphometric analysis of intraoperative biopsies  
Spine 11(7) (1986) S. 732-738
70. Mauro A: Satellite cell of skeletal muscle fibers  
J Biophys Biochem Cytol 9 (1961), S. 493-495
71. Meola G, Velicogna M, Brigato C, Pizzul S, Rotondo G, Scarlato G:  
Growth and differentiation of myogenic clones from adult human muscle cell cultures  
Eur J Bas Appl Histochem 35 (1991), S. 219-231
72. Mizner RL, Stevens JE, Snyder-Mackler L:  
Voluntary activation and decreased force production of the quadriceps femoris muscle after total knee arthroplasty  
Phys Ther 2003 Apr, 83(4), S. 359-365

73. Molnar G, Ho ML, Schroedl NA: Evidence for multiple satellite cell populations and a non-myogenic cell type that is regulated differently in regenerating and growing skeletal muscle  
Tissue & Cell 28(5) (1996), S. 547-556
74. Mooney W, Robertson J: The facet syndrome  
Clin Orthop 115, (1976) S. 146
75. Nachemson A: The lumbar spine: an orthopaedic challenge  
Spine 1 (1976), 59
76. Nakagawa H, Kamimura M, et al.: Microendoscopic discectomy (MED) for lumbar disc prolapse  
Journal of Clinical Neuroscience (2003) 10(2), S. 231-235
77. Nitta H, Tajima T, Sugiyama H, et al.: Study on dermatomes by means of selective lumbar spinal nerve block  
Spine 18 (1993) S. 1782-1786
78. Ohnmeiss D, Vanharanta H, Ekholm J: Degree of Disc Disruption and Lower Extremity Pain  
Spine 22(14) 1997, S. 1600-1605
79. Postacchini F, Giannicola G, Cinotti G: Recovery of motor deficits after microdiscectomy for lumbar disc herniation  
J Bone Surg Br 2002 Sep, 84(7), S. 1040-1045
80. Postacchini F: Lumbar Disc Herniation  
1999 Springer Verlag, Chapter 8 "Clinical Features" S. 169-210
81. Quint U, Wilke HJ, et al.: Importance of the intersegmental trunk muscles for the stability of the lumbar spine  
Spine 23(18) (1998), S. 1937-1945
82. Rantanen J, Hurme M, Falck B, et al.: The lumbar multifidus muscle five years after surgery for a lumbar intervertebral disc herniation  
Spine 18(5) (1993), S. 568-574
83. Rauber/Kopsch et al.: Anatomie des Menschen, Band 1  
Bewegungsapparat, (1987), Thieme Verlag, Kapitel 5 „Rumpf“ S. 175-308
84. Reiner JC: Introduction to the Biomechanics of the lumbar spine  
Rev Rhum Mal Osteoartic 1988 Apr 1, 55(5), S. 341- 350
85. Renault V, Piron-Hamelin G, Forestier C, et al.: Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock  
Experimental Gerontology 25 (2000), S. 711-719

86. Renault V, Thornell LE, Butler-Browne G, Mouly V : Human skeletal muscle satellite cells : aging, oxidative stress and the mitotic clock  
Experimental Gerontology 37 (2002), S. 1229-1236
87. Salminen A, Friedman-Elson H, et al.: Implantation of recombinant Rat Myocytes into adult skeletal muscle: A potential gene therapy  
Human Gene Therapy 1991, 2, S. 15-26
88. Schlossmann et al.: Leucocyte Typing V, "White cell differentiation antigens", Volume I/II, Oxford University Press (1995)
89. Schmalbruch H, Hellhammer U: The number of satellite cells in normal human muscle  
Anat Rec 185 (1976), S. 279-288
90. Schmorl G, Junghanns H: Die gesunde und die kranke Wirbelsäule in Röntgenbild und Klinik, 5. Auflage, (1968) Thieme Verlag
91. Schubert W, Zimmermann K, Cramer M, Starzinski-Powitz A: Lymphocyte antigen Leu-19 as a molecular marker of regeneration in human skeletal muscle  
Proc Natl Acad Sci USA 1989 Jan, 86(1), S. 307-311
92. Schubert W: Antigenetic determinants of T lymphocyte alpha beta receptor and other leukocyte surface proteins as differential markers of skeletal muscle regeneration: detection of spatially and timely restricted patterns by MAM microscopy  
Eur J Cell Biol 1992 Aug, 58(2), S. 395-410
93. Schultz E, Jaryszak DL: Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells  
Mechanisms of Aging and Development 30 (1985), S. 63-72
94. Schultz E, McCormick KM: Skeletal muscle satellite cells  
Rev Physiol Biochem Pharmacol 123 (1994), S. 214-246  
Springer Verlag
95. Schultz E: Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles  
Developmental Biology 175 (1996), S. 84-94
96. Sihoven T, Herno A, Paljärvi L, et al.: Local denervation atrophy of paraspinal muscles in postoperative failed back syndrome  
Spine 18(5) (1993), S. 575-581
97. Smith S, Massie J, Chesnut R, Garfin S: Straight leg raising: anatomical effects  
Spine 18 (1993) S. 992-999

98. Snow MH: A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse  
The Anatomical Record 207 (1983), S. 593-604
99. Spangfort EV: The lumbar disc herniation. A computer-aided analysis of 2504 operations  
Acta Orthop Scand 142, (1972) Suppl S. 51-95
100. Straus W. (1982)  
J Histochem Cytochem 30, S. 491-493
101. Suk KS, Lee HM, et al.: Recurrent Lumbar Disc Herniation  
Spine 26(6), (2001), S. 672-676
102. Teplick JG, Haskin ME: Spontaneous regression of herniated nucleus pulposus  
AJNR Am J Roentgenol 1985, 145, S. 371-375
103. Terasawa K: Muscle regeneration and satellite cells in fukuyama type congenital muscular dystrophy  
Muscle & Nerve 9 (1986), S. 465-470
104. Trojanowski JQ, Obrocka MA, Lee VMY (1983)  
J Histochem Cytochem 31, S. 1217-1223
105. Tung Yeung A, Moody Tsou P: Posterolateral endoscopic excision for lumbar disc herniation  
Spine 27(7) (2002), S. 722-731
106. Urbach D, Nebelung W, Röpke M, Becker R, Awiszus F:  
Bilateral dysfunction of the quadriceps muscle after unilateral cruciate ligament rupture with concomitant injury central activation deficit  
Unfallchirurg 2000 Nov, 103(11), S. 949-955
107. Urban JP, Roberts S: Degeneration of intervertebral disc  
Arthritis Res 2003, 5(3), S. 120-130
108. Vitadello M, Schiaffino MV, et al.: Gene transfer in regenerating muscle  
Human Gene Ther 1994 Jan, 5(1), S. 11-18
109. Wakayama Y, Schotland DL: Muscle satellite cell populations in duchenne dystrophy  
Muscle Regeneration, edited by Mauro et al., Raven Press, New York (1979), S. 121-129
110. Weisel SE, Tsourmas N, Feffer H, Citrin CM, Patronas N: A study of computer-assisted tomography, I: The incidence of positive CAT scans in an asymptomatic group of patients  
Spine 9 (1984), S. 549-51

111. Wilke HJ, Wolf S, Claes LE, Arand M, Weisend A: Stability increase of the lumbar spine with different muscle groups: A biochemical in vitro study  
Spine 20 (1995), S. 192-198
112. Yamashita T, Kanaya K, et al.: A quantitative analysis of sensory function in lumbar radiculopathy using current perception threshold testing  
Spine 27, (2002) 14, S. 1567-1570
113. Yoshihara K, Nakayama Y, Aoki T, Ito H: Atrophy of multifidus muscle in patients with lumbar disc herniation: histochemical and electromyographic study  
Orthopaedics 26(5) 2003 May, S. 493-495
114. Yoshihara K, Shirai Y, Nakayama Y, Uesaka S: Histochemical changes in the multifidus muscle in patients with lumbar intervertebral disc herniation  
Spine 26(6) (2001), S. 622-626
115. Young A, Stokes M, Iles JF:  
Effects of joint pathology on muscle  
Clin Orthop 1987 Jun, (219), S. 21-27
116. Zhao WP, Kawaguchi Y, et al.: Histochemistry and morphology of the multifidus muscle in lumbar disc herniation  
Spine 25(17) (2000), S. 2191-2199
117. Zhu XZ, Parnianpour M, Nordin M, Kahanovitz N: Histochemistry and morphology of erector spinae muscle in lumbar disc herniation  
Spine 14(4) (1989), S. 391-397
118. Dammers R, Koehler P J:  
Lumbar disc herniation: Level increases with age  
Surg Neurol 2002, (58), S. 209-213

## **7. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Graßhoff für die freundliche Überlassung des interessanten Themas.

Ebenso möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Dr. W. Schubert für die Betreuung und Unterstützung meiner Doktorarbeit bedanken.

Während der Durchführung der Studie erhielt ich jede Unterstützung der Ärzte und Schwestern der Klinik für Orthopädie und der Mitarbeiterinnen des Instituts für medizinische Neurobiologie. Ihnen und insbesondere Dr. K. Mahlfeld, Frau Friedenberger und Frau Cersovsky gilt mein herzlicher Dank.

Schließlich möchte ich mich besonders bei meinen Eltern, Grosseltern und meiner Freundin für Geduld, Anregungen und Ansporn bedanken, die damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8.

## Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Zellbiologische und bioptische Analysen des  
Regenerationsverhaltens des M. multifidus bei Patienten mit  
lumbalem Bandscheibenvorfall**

aus der Klinik für Orthopädie und dem Institut für Medizinische Neurobiologie mit Unterstützung der Mitarbeiter ohne sonstige Hilfe angefertigt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Kreuzlingen, den 01.12.2003

Thomas Hesse



## 9. Lebenslauf

Name	Thomas Hesse
Adresse	Hofstrasse 1, CH-8280 Kreuzlingen
Geburtsdatum	29.12.1976
Geburtsort	Magdeburg
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Mutter	Roswitha Hesse, geb. Koczulla
Vater	Dipl. med. Bernd Hesse

### Bildungsweg

1983-1991	Polytechnische Oberschule „Salvador Allende“ Klötze / Sachsen Anhalt
1991-1995	Gymnasium Beetzendorf
1995	Abschluss: Hochschulreife
1995	Praktikum der Inneren Medizin im Kreiskrankenhaus Gardelegen
1995-1996	Wehrdienst im 1. Panzerlehrbatallion 334 „Celle“

### Medizinstudium

	Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
1996-1998	Vorklinik
September 1998	Physikum
1998-1999	1. Klinisches Jahr
September 1999	1. Staatsexamen
1999-2001	klinische Ausbildung
September 2001	2. Staatsexamen
2001-2002	Praktisches Jahr
November 2002	3. Staatsexamen

## **Praktische Ausbildung**

1999-2001	Famulaturen: 2 Monate Klinik für Orthopädie, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg 1 Monat Praxisfamulatur, Allgemeinarztpraxis Magdeburg 1 Monat Institut für Rechtsmedizin, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg
Oktober 01-Januar 02	1.Tertial PJ, Klinik für Orthopädie, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg
Februar-Mai 2002	2.Tertial PJ, Chirurgie, Kreuzspital Chur, Schweiz
Juni-September 2002	3.Tertial PJ, Innere Medizin, Kardiologie, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg
Februar-April 2003	Forschungspraktikum Chirurgie, CIBO, Universidad Guadalajara, Mexiko

## **Beruflicher Werdegang**

seit August 2003	Assistenzarzt in der „Orthopädie am See“ Kreuzlingen, Schweiz
------------------	---