

## Immunhistochemische Untersuchungen bei verschiedenen menschlichen Myopathien

F. MITTELBACH und D. PONGRATZ

II. Medizinische Klinik der Universität München (Komm. Direktor: Prof. Dr. M. M. Forell)

Eingegangen am 12. Juni 1969

### *Evidence of Antibody Demonstration in Human Myopathies by Means of an Immune Fluorescence Technique*

*Summary.* By means of an immune fluorescence technique cell-bound antibodies in biopsies of skeletal muscle in patients with muscular dystrophy and myositis could be demonstrated. The significance of the results in the pathogenesis of these diseases is discussed.

*Zusammenfassung.* Mit Hilfe der Immunofluoreszenz kann an biopsisch gewonnener menschlicher Skelettmuskulatur sowohl bei der Muskeldystrophie als auch bei der Polymyositis das Vorhandensein zellgebundener Autoantikörper wahrscheinlich gemacht werden. Die Bedeutung des Befundes für die Pathogenese dieser Erkrankungen wird diskutiert.

Obwohl seit einer Reihe von Jahren ein erheblicher Arbeitsaufwand darauf verwendet wird, auf dem Gebiet der Myopathien mit Hilfe der modernen Methoden der Biochemie, Histochemie und Elektronenmikroskopie neue Erkenntnisse zu gewinnen, sind die Ergebnisse bezüglich der Klärung pathogenetischer und ätiologischer Zusammenhänge bisher eigentlich recht enttäuschend.

Parallel dazu wurden aber klinische Erfahrungen über eine gelegentliche Syn- tropie von Myasthenie und Erkrankungen aus dem Formenkreis der Autoaggressionskrankheiten gesammelt (Denney und Rose; Fischer u. Mitarb., Harvey und John, Mittelbach und Pongratz, 1968; Sahay u. Mitarb.; u. a.). Weiterhin fand man im Serum mancher Myasthenie-Patienten Antikörper, die gegen Muskelprotein gerichtet waren und sich als Gamma-G-Globuline herausstellten (Fischer u. Mitarb.; Ricken; u. a.). Diese Antikörper erbrachten in vitro eine komplement-verbrauchende Reaktion und ließen sich auch am Muskelschnitt mit Hilfe immunfluoreszenzhistochemischer Methoden nachweisen. Zu betonen ist allerdings, daß der Nachweis ihrer Wirksamkeit in vivo noch aussteht.

Die Tatsache, daß Antikörper gegen Muskeleiweiß vorwiegend bei Myasthenikern mit Thymomen auftreten (Beutner u. Mitarb.; Van der Geld u. Mitarb.; Klein und Lennartz) weist ebenfalls auf einen pathologischen Immunprozeß hin. Allerdings bleibt bislang die Frage, offen, ob es sich hierbei um einen primären, d. h. pathogenetischen Vorgang analog den sog. Autoimmunerkrankungen handelt, wo das Auftreten von Antikörpern eine führende Rolle in der Auslösung des Krankheitsprozesses spielt, oder ob es sich nur um sekundär im Rahmen des pathologischen Muskelprozesses aufgepfropfte Immunphänomene handelt. Für die übrigen Myopathien existieren bis heute noch weit weniger Anhaltspunkte für eine Autoimmunogenese, obwohl z. B. bei der Muskeldystrophie der Befund einer pathologischen Membrandurchlässigkeit für potentiell immunogen wirksame Proteine theoretisch ohne weiteres an eine solche denken läßt.

Als erste Anhaltspunkte sind experimentelle Untersuchungen von Tal und Liban zu werten, die bei Tieren durch die Verabreichung homologer und heterologer Muskelextrakte myopathische Veränderungen hervorrufen konnten.

Da bisher immunhistochemische Methoden bei Myopathien, außer bei der Myasthenie noch nicht durchgeführt wurden, erschien es uns zunächst angebracht, auf diesem Wege die anstehenden Probleme einer Klärung zuzuführen.

### Methodik <sup>1</sup>

Die erstmals von Coons u. Mitarb. entwickelte Methode der Immunfluoreszenz gestattet es, zellfixierte Antikörper im Mikroskop sichtbar zu machen und zusätzlich Anhaltspunkte für ihre Lokalisation zu gewinnen.

Als Untersuchungsmaterial wurden 10  $\mu$  dicke Kryostatschnitte bioptisch gewonnener Gewebeproben menschlicher Muskelkrankheiten verwendet.

Nach der Methode von Rinderknecht wurden vom Kaninchen oder von der Ziege gewonnene Antiseren gegen Human-Gamma-G-, Gamma-A-, Gamma-M- sowie Beta-1C/1A-Globulin und Fibrinogen verwendet, die mit Fluorescein-Isothiocyanat markiert waren, um die entsprechenden Globulinfraktionen am Muskel nachzuweisen. Es wurden Kontrollen auf Spezifität durchgeführt, um jegliche unspezifischen Fluoreszenzphänomene auszuschließen. Zum Nachweis von Serumantikörpern im Blut der jeweiligen Patienten diente der Hämagglutinationstest nach der Methode von Djanian u. Mitarb. mit formalinisierten, tannierten Erythrocyten, die mit normalem Muskelprotein beladen waren.

Zur Untersuchung gelangten Muskelproben von 5 Patienten mit einer chronischen Polymyositis, 8 Patienten mit einer progressiven Muskeldystrophie (sowohl Typ Duchenne als auch solche vom Typ der Facio scapulo humeralen Lokalisation) und 5 Patienten mit einer neurogenen Atrophie (progrediente spinale Muskelatrophie). Die Auswahl der Patienten erfolgte unwillkürlich. Als Kontrollen dienten Patienten, die weder histologisch noch elektromyographisch noch biochemisch Anhaltspunkte für eine Muskelaaffektion erkennen ließen, insgesamt wurden 5 normale Muskelproben verwendet.

### Ergebnisse

Die *chronische Polymyositis* (Abb. 1), die am ehesten die Möglichkeit eines Antikörpernachweises erwarten läßt, zeigt eine deutliche Reaktion des Anti-Human-Gamma-G-Globulins. Außerdem scheint es aber auch zu einer Komplementfixierung zu kommen, da sich zusätzlich mit Anti-Beta-1C-Serum eine spezifische Fluoreszenz finden läßt. Zu betonen ist, daß es zu einer Reaktion im Bereich der Muskelfasern selbst, sowie der entzündlichen Infiltrate kommt.

Bei der *Muskeldystrophie* (Abb. 2) zeigt sich in jedem der untersuchten Fälle ebenfalls eine deutliche spezifische Reaktion mit Anti-Gamma-G-Serum. Bei weit fortgeschrittenen Fällen werden die Ergebnisse am deutlichsten. Eine ausgesprochen nekrotisierende Form der progressiven Muskeldystrophie, die im van Gieson-Bild einen erheblichen Zerfall der Muskelfasern aufweist, erbringt nicht nur eine Reaktion mit Anti-Gamma-G- und Anti-Beta-1C-Serum, sondern gestattet auch den Nachweis der sonst kaum zu findenden Antikörper-Gamma-A und

<sup>1</sup> Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Friedrich Baur-Stiftung, München, und der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Abb. 2a u. b. Progressive Muskeldystrophie. a Erheblich myosklerotischer Umbau mit ausgeprägten Kaliberschwankungen der Muskelfasern und sekundären Abräumphänomenen. Van Gieson-Färbung, Vergr. 100  $\times$ . b Fluoreszenzimmunhistochemischer Nachweis von Gamma-G-Globulinen in den Muskelfasern mit Anti-Gamma-G-Globulin vom Kaninchen. Vergr. 100  $\times$

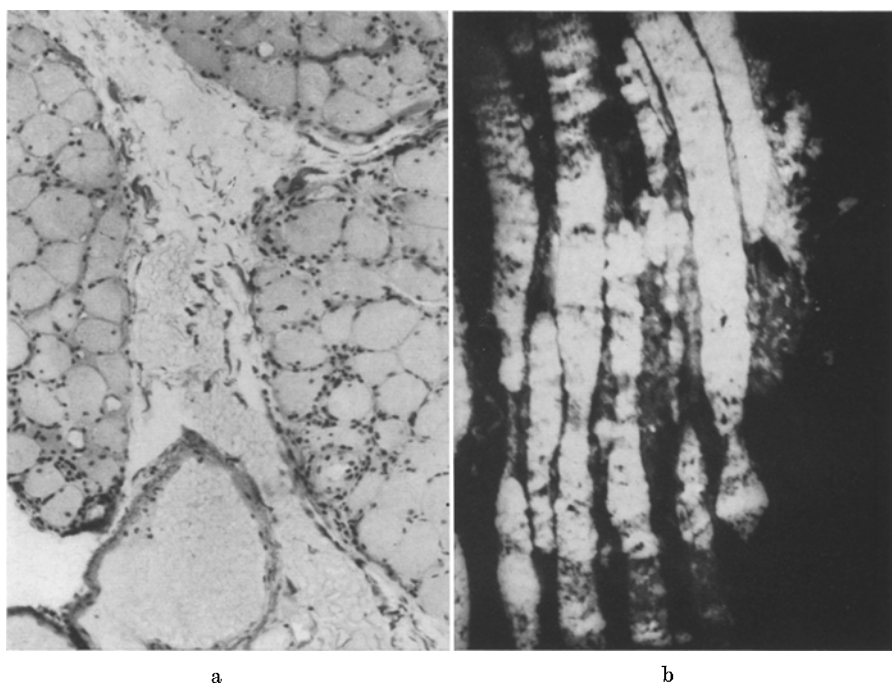
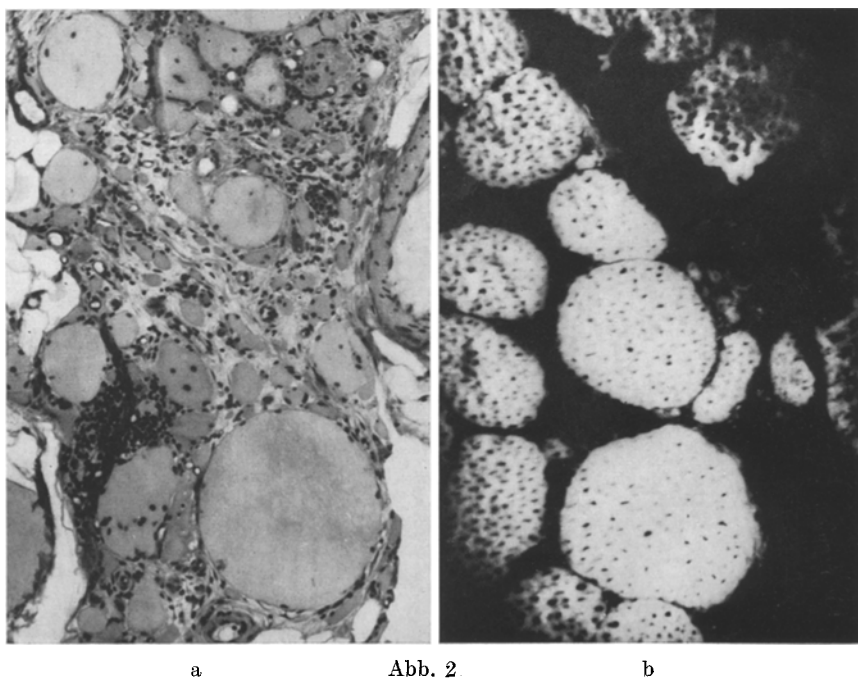


Abb. 1a u. b. Chronische Polymyositis. a Bereits beginnender Umbau des Muskels mit geringen Restinfiltraten und vereinzelt Faseruntergängen. Van Gieson-Färbung, Vergr. 100  $\times$ . b Fluoreszenzimmunhistochemischer Nachweis von Gamma-G-Globulinen in den Muskelfasern, sowie im umgebenden Bindegewebe mit Anti-Gamma-G-Globulin vom Kaninchen. Vergr. 100  $\times$



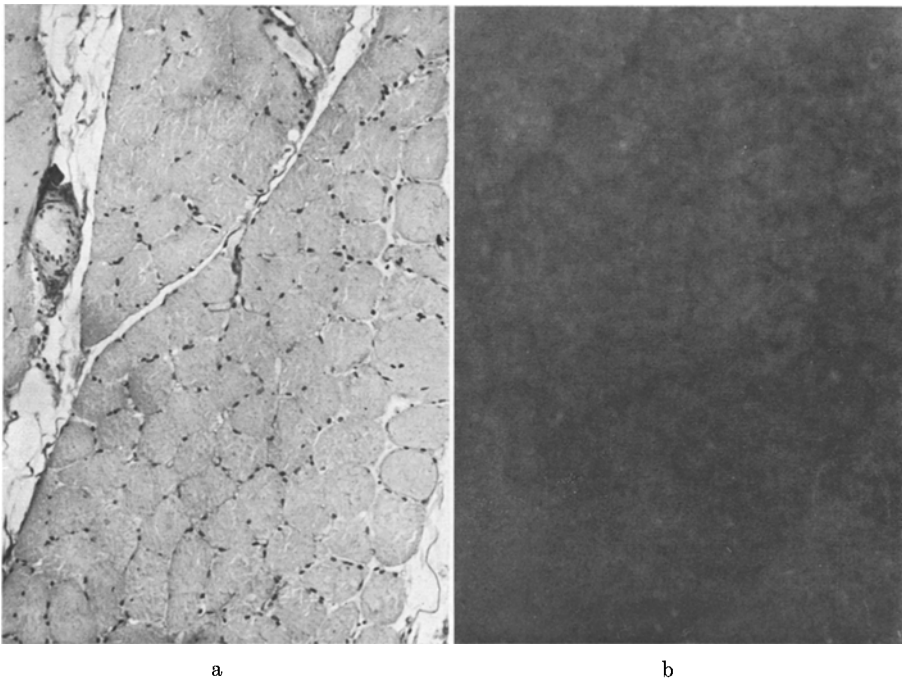


Abb. 3a u. b. Normaler menschlicher Skelettmuskel. a Van-Gieson-Färbung, Vergr. 100  $\times$ .  
b Negative Immunfluoreszenz für Gamma-G-Globuline mit Anti-Gamma-G-Globulin vom Kaninchen. Vergr. 100  $\times$

Gamma-M. Zu betonen ist, daß sich häufig auch im Bindegewebe eine spezifische Fluoreszenz findet, die vorwiegend bei Fällen von fortgeschrittener Dystrophie mit lipomatös-sklerotischem Umbau deutlich zutage tritt. Im Gegensatz dazu finden sich bei nur geringgradigen histologischen Veränderungen im Rahmen einer oculären Myopathie auch nur geringe Fluoreszenzphänomene allein mit Anti-Gamma-G-Serum.

Bei *neurogener Atrophie* läßt sich keine spezifische Fluoreszenz nachweisen.

Der *normale Skelettmuskel* (Abb. 3) erbringt ebenfalls keinerlei spezifische Reaktionen.

Im *Serum* können bei keinem der untersuchten Fälle mittels des Hämagglutinationstestes Antikörper nachgewiesen werden.

### Diskussion

Die dargestellten Untersuchungen lassen im Falle der Muskeldystrophie und Myositis das Vorhandensein von Antikörpern gegen die Proteine der Muskelfasern wahrscheinlich machen. In der normalen Skelettmuskulatur oder bei neurogenen Atrophien findet sich dagegen keine spezifische Immunofluoreszenz. Da mit dem Hämagglutinationstest im Serum bei keinem der untersuchten Fälle ein Antikörpernachweis gelingt, handelt es sich im Muskel um zellgebundene Antikörper, die nicht im strömenden Blut nachweisbar sind. Ihre Entstehung ist möglicherweise so zu erklären, daß primär Muskelprotein in die Blutbahn austritt und durch seine vorübergehende Anwesenheit im Blut den Körper zur Antikörperbildung

anregt. Nun weiß man ja von den Myopathien, sowohl der Dystrophie als auch der Polymyositis, daß es zum Austritt von Muskelproteinen in die Blutbahn kommt. Wir bedienen uns ihrer ja als diagnostisches Hilfsmittel, wenn wir die Enzymproteine im Serum nachweisen. Das würde bedeuten, daß zunächst eine Schädigung der Muskelfaser bzw. eine Schädigung des Sarkolemmes im Bereich der Capillaren auftritt, die das Durchtreten von Muskelproteinen erlaubt. Durch deren immunogene Wirkung wird möglicherweise eine Antikörperproduktion ausgelöst, die ihrerseits wieder zusätzlich den Zerfall der Muskelfasern unterstützt, also wahrscheinlich einem sekundären immunologischen Phänomen entspricht.

Besonders ist noch auf die Tatsache hinzuweisen, daß im dystrophischen Muskel der Antikörpernachweis nicht nur in der Muskelfaser selbst, sondern auch im Bindegewebe gelingt, wobei es sich wahrscheinlich um Antigen-Antikörper-Komplexe handelt, die im Rahmen des Muskelzerfalls hier liegen bleiben. Wir haben an anderer Stelle bereits darauf hingewiesen, daß die zunehmende Bindegewebsproliferation bei vielen Formen der Muskeldystrophie vielleicht als ein Versuch zu deuten ist, den Abstrom von Muskelproteinen aus den Fasern einzudämmen. Außerdem konnten wir zeigen (Mittelbach und Pongratz, 1969), daß sich sowohl bei der Myositis als auch bei der Muskeldystrophie im Bindegewebe des Muskels, eine deutliche Leucinaminopeptidase-Aktivität findet, die möglicherweise in den Abbau der aus den Fasern austretenden Muskelproteine eingreift. Berücksichtigt man zusätzlich Befunde von De Weck, der zeigen konnte, daß bei künstlichen Polypeptiden als Antigene nur L-Polypeptide wirksam sind, die in Anwesenheit einer L-Peptidase entstehen, so bietet sich vielleicht eine einleuchtende Erklärung für die Entstehung der nachgewiesenen Muskelantikörper.

Eine präzisere Darstellung dieser Vorgänge zu geben, ist aber nach dem heutigen Stand unserer Kenntnisse noch nicht möglich. Nach allem, was wir bisher von der Autoantikörperbildung wissen, gibt es verschiedene Möglichkeiten ihrer Entstehung (Haurowitz, Hermann und Grabar, Hoppe und Gerhartz, Schuboth, Steffen). Nach Steffen lassen sie sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Freiwerden abgekapselter Antigene.
2. Alteration von Antigenen.
3. Bruch der natürlichen Immuntoleranz.
4. Reaktivierung vorübergehend ausgeschalteter Cloni.
5. Aberrierte Gamma-Globulinbildung.

Daraus geht hervor, daß immunologische Phänomene im Sinne einer Autoaggression sowohl durch Alteration auf der Seite der Antigene, als auch des immunologischen Zellsystems entstehen können.

Nach Witebsky ist die Annahme einer Autoaggressionskrankheit erst dann gerechtfertigt, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

1. Direkter Nachweis frei zirkulierender Antikörper, die bei Körpertemperatur reagieren, oder indirekter Nachweis zellständiger Antikörper.
2. Identifizierung des spezifischen Antigens, gegen das sich der Antikörper richtet.
3. Erzeugung von Antikörpern gegen dasselbe Antigen im Tierversuch.
4. Auftreten von pathologischen Veränderungen in den entsprechenden Geweben eines aktiv immunisierten Tieres, die denen bei derselben Erkrankung des Menschen grundsätzlich gleichen.

5. Erfolgreiche Übertragung der Erkrankung entweder durch antikörperhaltiges Serum, oder durch immunologisch kompetente Zellen von aktiv immunisierten Tieren auf normale.

Aufgrund dieser Kriterien konnte bisher nur für einige wenige Erkrankungen (z. B. Immunthyreoiditis) die Autoimmunogenese mit Sicherheit belegt werden, für eine große Zahl anderer Erkrankungen, unter ihnen auch für die Myopathien, bei denen sich ja bisher nur gewisse Anhaltspunkte ergeben haben, daß Immunphänomene in der Pathogenese eine Rolle spielen, stehen weitere Untersuchungen noch aus.

### Literatur

- Beutner, E. H., Witebsky, E., Ricken, D., Adler, R. H.: Studies on autoantibodies in Myasthenia gravis. *J. Amer. med. Ass.* **182**, 46—58 (1962).
- Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N., Berliner, E.: The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* **45**, 159—170 (1942).
- Denney, D., Rose, R. L.: Myasthenia gravis followed by systemic lupus erythematosus. A case Report. *Neurology (Minneapolis)* **11**, 710—713 (1961).
- Djanian, A. I., Beutner, E. H., Witebsky, E.: Tanned-cell haemagglutination test for detection of antibodies in sera of patients with myasthenia gravis. *J. Lab. clin. Med.* **63**, 60—71 (1964).
- Fischer, K., Mertens, H. G., Schimrigk, K.: Ein Beitrag zur Immunpathologie bei Myasthenia gravis. *Dtsch. med. Wschr.* **90**, 1760—1764 (1965).
- Geld, H. van der, Feltkamp, T. E. W., Loghem, J. J. van, Oosterhuis, H. J. G. H., Biemond, A.: Multiple antibody production in myasthenia gravis. *Lancet* **1963 II**, 373—375.
- Harvey, A. G., John, R. J.: Myasthenia gravis and the thymus. *Amer. J. Med.* **32**, 1—5 (1962).
- Haurowitz, F.: Role of antigen in antibody formation. In: *Immunchemie*, S. 240—254 Berlin-Göttingen-New York: Springer, 1965.
- Hermann, G., Grabar, P.: Organantigene und Autoantikörperbildung. *Internist (Berl.)* **6**, 153—164 (1965).
- Hoppe, I., Gerhartz, H.: Autoimmunisationskrankheiten. *Internist (Berl.)* **6**, 115—120 (1965).
- Klein, H. O., Lennartz, K. J.: Zur Syntropie von Myasthenia gravis, Polymyositis, Myocarditis und Thymon—zugleich ein Beitrag zur Pathogenese. *Dtsch. med. Wschr.* **91**, 1727—1730 (1966).
- Mittelbach, F., Pongratz, D.: Behandlung des myasthenischen Syndroms mit Mestinon retard. *Münch. med. Wschr.* **110**, 1375—1380 (1968).
- — Über den histochemischen Leucin-Aminopeptidase-Nachweis in der menschlichen Skelettmuskulatur bei verschiedenen Myopathien. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* **346**, 68—73 (1969).
- Ricken, D.: Myasthenia gravis und humorale Antikörper gegen menschliche Skelettmuskelproteine. *Dtsch. med. Wschr.* **90**, 1717—1721 (1965).
- Rinderknecht, H.: Ultra-rapid fluorescent labelling of proteins. *Nature (Lond.)* **193**, 167—168 (1962).
- Sahay, B. M., Blendis, L. M., Greene, R.: Relation between myasthenia gravis and thyroid disease. *Brit. med. J.* **1965 I**, 762—765.
- Schubotho, H.: Die cytotropen Autoaggressionskrankheiten des Blutes. *Internist (Berl.)* **6**, 148—156 (1965).
- Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunopathologie und ihre klinische Anwendung. Stuttgart: Georg Thieme 1968.
- Tal, C., Liban, E.: Experimental production of muscular dystrophylike lesions in rabbits and guinea-pigs by an autoimmune process. *Brit. J. exp. Path.* **43**, 525—529 (1962).
- Witebsky, E.: Immunologie und klinische Bedeutung der Autoantikörper. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **68**, 349—362 (1962).

Priv.-Doz. Dr. F. Mittelbach  
II. Medizinische Klinik der Universität München  
8 München 15, Ziemssenstr. 1