

**Aus dem Institut für Pathologie
Der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink**

**Morphologie und Pathologie des menschlichen Thymus im Alter und bei Myasthenia
gravis: eine morphometrische Studie.**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von
Regina Moritz
aus Würzburg**

Würzburg, Juli 2005

Referent: Prof. Dr. med. A. Marx

Koreferent: Prof. Dr. med. P. Rieckmann

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.12.2005

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

INHALT

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1 Patientendaten	3
2.2 Standardisierte Gewebebearbeitung	3
2.3. Immunhistochemie	5
2.4. Mikroskopisch-morphologische Auswertung	5
2.5. Morphometrische Auswertung	8
3. Ergebnisse.....	12
3.1. Validierung des histologischen Zuschnitt-Protokolls	12
3.2. Thymusveränderungen im Rahmen der normalen Involution.....	13
3.2.1. Thymusveränderungen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht.....	13
3.2.1.1. Morphologische Parameter, die eine Veränderung im Zuge der Thymusinvolution erfahren	13
3.2.2.2. Morphologische Parameter, die sich im Laufe der Thymusinvolution nicht verändern	16
3.3. Morphologische Veränderungen des Thymus in verschiedenen Altersgruppen.....	17
3.3.1. 1 - 20 Jahre.....	17
3.3.2. 21 - 30 Jahre.....	20
3.3.3. 31 – 40 Jahre	22
3.3.4. 41 - 60 Jahre.....	23
3.3.5. 61 Jahre und älter	24
3.4. Der Thymus bei Myasthenia gravis	26
3.4.1. Der Thymus bei Patienten mit “early-onset” (AChR+) MG (EOMG).....	26
3.4.2. Der Thymus bei Patienten mit “late-onset” (AChR+) MG (LOMG)	28
3.4.3. Der Thymus bei Patienten mit MUSK (+) MG	29
3.4.4. Thymus bei Patienten mit paraneoplastischer MG	32
4. Diskussion	33

5. Zusammenfassung.....	35
6. Abkürzungsverzeichnis.....	37
7. Abbildungsverzeichnis.....	38
8. Literaturverzeichnis.....	40

Einleitung

Der Thymus spielt in der Entwicklung eines reifen, selbst-toleranten T-Zell-Repertoires eine entscheidende Rolle. Dabei scheint die Mikrostruktur des Thymus selbst Signale für Migration, Proliferation und funktionelle Entwicklung an die unreifen Lymphozytenvorstufen aus dem Knochenmark weiterzugeben. Die im Thymus ausgereiften T-Zellen werden anschließend ins periphere Blut exportiert, wo sie an immunologischen Prozessen teilnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der exportierten, naiven T-Zellen von der Produktionsrate des Thymus und nicht von der Replikation peripherer T-Lymphozyten abhängig ist (Aspinall and Andrew 2000). Aus bisher unbekanntem Gründen macht der Thymus im Laufe eines Lebens eindrucksvolle, altersabhängige Veränderungen durch, die in ihrer Gesamtheit als Thymusinvolution bezeichnet werden. Im Rahmen dieses Prozesses wird Thymusgewebe durch Fett-, und/oder Bindegewebe ersetzt. Abhängig von diesen morphologischen Veränderungen verringert sich auch die Zahl der reifen, naiven T-Lymphozyten im peripheren Blut mit zunehmendem Alter (Douek, McFarland et al. 1998). Dieser Prozess wird als Immunseneszenz bezeichnet (Luciani, Turchetti et al. 2001). Immunseneszenz wird mit der Zunahme von Infektionen und malignen Erkrankungen im höheren Lebensalter in Verbindung gebracht (Pawelec, Barnett et al. 2002). Die Involution des Thymus beginnt bereits in der frühen Kindheit und setzt sich dann mit unterschiedlicher Intensität in den einzelnen Lebensabschnitten fort (Steinmann, Klaus et al. 1985). Tierexperimente haben gezeigt, dass die Stimuli für Proliferation und Differenzierung der Stromazellen in erster Linie vom Thymus selber ausgehen (Bodey, Bodey et al. 1997). Als weitere Faktoren mit Bedeutung für die Involution werden Hormone, Cytokine und Wachstumsfaktoren diskutiert. Es scheinen z.B. im Serum gelöste Interleukine (IL-7) (Aspinall and Andrew 2000) und membrangebundene Somatostatinrezeptoren (Ferone, van Hagen et al. 2000) eine Rolle zu spielen.

Neben dem Schutz des Organismus gegenüber fremden Antigenen ist der Thymus für die Prävention von Autoimmunkrankheiten sehr wichtig. Er bewerkstelligt dies durch Deletion autoreaktiver T-Zellen (Laufer, DeKoning et al. 1996). Störungen dieser thymischen Selektionsprozesse scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese zahlreicher

Autoimmunerkrankungen zu spielen, wie z.B. beim Typ 1-Diabetes mellitus (Redondo and Eisenbarth 2002), bei der Multiplen Sklerose (Klein, Klugmann et al. 2000), bei der rheumatischen Arthritis (Goronzy and Weyand 2001) und beim M. Basedow (Dutton, Joba et al. 1997). Die Myasthenia gravis (MG) ist die Autoimmunkrankheit, bei der die pathogenetische Rolle des Thymus am besten erforscht und verstanden ist (Vincent 2002). Es scheint sich bei der MG um keine monokausal bedingte Krankheit zu handeln, sondern vielmehr ist sie ein Symptom, das bei einer Vielfalt von autoimmunologischen Prozessen mit unterschiedlicher Pathogenese auftritt. So wurde z.B. vor kurzem ein weiterer Subtyp der MG mit Antikörpern gegen eine muskelspezifische Tyrosinkinase (MUSK) entdeckt (Hoch, McConville et al. 2001). Diese so genannte "seronegative" MG weist im Wesentlichen dieselbe Symptomatik auf, wie sie bei der klassischen MG mit Antikörpern gegen ACh-Rezeptoren (sog. "seropositive" MG) vorkommt.

Patienten mit MG werden drei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet, die sich in Bezug auf Alter, Klinik und Epidemiologie signifikant voneinander unterscheiden:

- (1) Patienten im Alter zwischen 10 und 40 Jahren, bei denen die Thymusveränderungen hauptsächlich auf einer Entzündung (Thymitis) beruhen; man spricht hier von einer sog. "early-onset-MG" (EOMG).
- (2) Patienten älter als 40 Jahre, bei denen die (nicht neoplastischen) Thymusveränderungen hauptsächlich atrophischer Natur sind; man spricht hier von einer sog. late-onset-MG (LOMG).
- (3) Patienten jeden Alters mit einem Thymom, die an einer so genannten neoplastischen MG leiden.

Die morphologischen Veränderungen des Thymus im Rahmen von Autoimmunkrankheiten und im Rahmen der physiologischen Altersinvolution sind bislang noch wenig charakterisiert. Da es aber möglich scheint, Thymi von Patienten mit autoimmunologischen Erkrankungen von solchen mit normaler, altersabhängiger Involution mit einfachen histologischen Mitteln zu unterscheiden, widmet sich diese Studie einer umfassenden morphologischen und morphometrischen Charakterisierung und Quantifizierung des menschlichen Thymus. Dabei werden sowohl Thymi von Probanden ohne, als auch von Patienten mit autoimmunologischen Erkrankungen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Patientendaten

Die klinischen Daten der in die Studie eingeschlossenen Patienten, werden in **Tab. 1** zusammengefasst.

Es wurden insgesamt 129 Normalthymy aus dem Autopsiegut des Pathologischen und des Rechtsmedizinischen Instituts der Universität Würzburg untersucht. Ebenso 55 Restthymy (nicht neoplastischer Abschnitt eines Thymus, der in unmittelbarer Nähe eines Thymoms lokalisiert ist), 40 EOMG-, 11 MUSK- und 26 LOMG Thymy, die aus den Archiven des Pathologischen Institutes stammten. Die Diagnose einer MG wurde anhand von klinischen, elektromyographischen und serologischen Untersuchungen gestellt. Dabei war bei den elektrophysiologischen Untersuchungen das für die MG charakteristische Dekrement der Aktionspotentiale ein Kriterium für eine positive Diagnose. Serologisch war der Nachweis von Antikörpern gegen ACh-Rezeptoren, oder spezifische Muskeltyrosinkinasen (MUSK) ausschlaggebend. Patienten mit einem ACh- bzw. MUSK-Titer > 0,4 U/ml wurden je nach Alter in die "early-onset" (< 40 Jahre) -, oder in die "late-onset" (> 40 Jahre) - MG eingeteilt.

Diagnose	Fälle (n)	Geschlecht		Alter								MG	
		m	w	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	ja	nein
Normalthymus	129	73	56	9	11	28	23	11	15	16	16	0	129
Restthymus	26	15	11	---	---	---	2	5	13	6	---	21	5
EOMG.	90	14	76	1	21	38	14	14	1	1	---	90	0
SNMG (MUSK)	11	2	9	1	5	2	1	1	1	---	---	11	0
LOMG	24	21	3	---	---	---	---	6	10	5	3	24	0
Σ	280	125	155	11	37	68	40	37	40	28	19	14	134

Tab. 1: Patientendaten (MG: Myasthenia gravis; D: Dekade; EOMG: early onset Myasthenia gravis; SNMG: seronegative Myasthenia gravis; MUSK: muskelspezifischer Antikörper; LOMG, late onset Myasthenia gravis)

2.2. Standardisierte Gewebeparbeitung

Um die Frage nach der Notwendigkeit einer standardisierten Aufarbeitung zu beantworten, wurden die einzelnen Thymi aller Probanden ohne Myasthenia gravis nach einem vor Beginn der Studie festgelegten Protokoll aufgearbeitet. Damit sollte gesichert werden, dass die gewonnenen Resultate ohne Vorbehalte miteinander verglichen werden können (**Abb. 1a**). Durch die Stelle des größten Durchmessers wurde ein Schnitt A gelegt, um eine Vorstellung von Verteilung und Quantität des Thymusgewebes zu gewinnen, der dann auf einen speziellen 6 mal 9 cm großen Objektträger aufgezogen wurde. Jeweils 1,5 cm ober- und unterhalb von Schnitt A, wurden die Schnitte B und C gefertigt, die auf handelsübliche Objektträger aufgebracht wurden, um weitere morphologische und morphometrische Analysen durchführen zu können. Die einzelnen Gewebstücke wurden in 10%igem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin (H.E.) gefärbt.

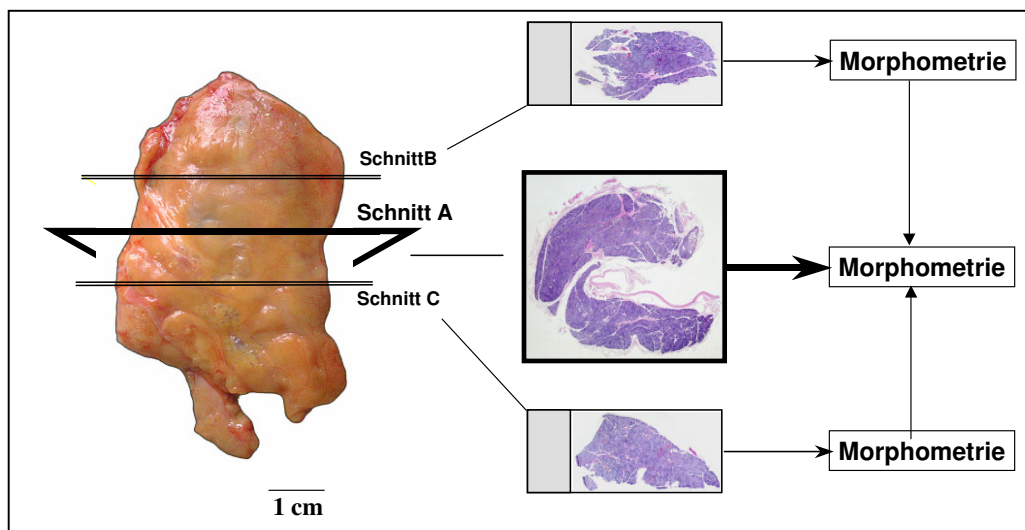


Abb. 1a: Standardisierter Gewebezuschnitt

2.3. Immunhistochemie

Schnitt C wurde zusätzlich immunhistochemisch bearbeitet, wobei ein monoklonaler CD20-Antikörper (L26) (1:1000; DAKO) verwendet wurde.

Das vorliegende Paraffinmaterial wurde zunächst über 20 Minuten mit Xylol entparaffinisiert, rehydriert und anschließend in Zitronensäure und 10mM TRIS (pH5) für 5 Minuten im Dampfkochtopf erhitzt. Die so bearbeiteten Objektträger wurden nachdem sie einige Minuten in PBS abgespült und 15 Minuten mit einem „Blocking Reagenz“ (Histostain-Plus, Zymed) behandelt wurden, mit dem Primärantikörper (CD20-Antikörper (1:1000; DAKO, Germany)) beschichtet. Nach 60 Minuten wurde der Primärantikörper mit PBS (pH 7,4) abgespült und der biotinierte Sekundärantikörper für 20 Minuten aufgetragen. Der nächste Schritt war die Inkubation mit Streptavidin und Peroxidase über einen Zeitraum von 20 Minuten. Nach dem erneuten Spülen des Objektträgers mit PBS wurde für 10 Minuten DAB (Diaminobenzidin) aufgetragen und anschließend mit Hämalaun gegengefärbt.

2.4. Mikroskopisch-morphologische Auswertung

Die H.E. gefärbten Schnitte wurden zunächst gemäß eines standardisierten Protokolls mikroskopisch ausgewertet (**Abb. 1b**).

Besonderer Wert wurde auf die subjektive Einschätzung von Atrophiegrad (Grad 1 bis 4) und die Cortexverteilung gelegt, um abschätzen zu können ob alleine der mikroskopische Aspekt des Gewebes ohne computergesteuerte Analysen Rückschlüsse auf eventuelle pathologische Vorgänge zulässt. Außerdem wurden in dem nachfolgend vorgestellten Formular die objektiven Ergebnisse der morphometrischen Untersuchung festgehalten. Um die Frage nach einer Thymitis beantworten zu können, wurden die vorhandenen Lymphfollikel ausgezählt. Je nach Läppchenbeteiligung wurde der entsprechende Entzündungsgrad zugeteilt (Grad I: Lymphfollikel in 1/3 der Läppchen; Grad II: Lymphfollikel in 2/3 der Fälle; Grad III: Lymphfollikel in allen Läppchen). Ebenso wurde die Anzahl der Hassall-Körperchen bestimmt, indem drei Läppchen ausgezählt wurden und

aus der erhaltenen Anzahl der Mittelwert errechnet wurde. Außerdem wurde das Vorhandensein von Epithelproliferaten (rosettenförmig oder nodulär) und sonstige Auffälligkeiten wie Verkalkungen, Zysten etc. protokolliert.

The image shows a screenshot of a Microsoft Access form titled "Atrophie". The form is displayed in a window with a standard menu bar (Datei, Bearbeiten, Ansicht, Einfügen, Format, Datengänge, Extras, Fenster) and a toolbar. The form itself is a data entry form with the following fields and controls:

- Fall-Nr**: Text input field.
- H/E/S?**: Check box.
- Verdachtsdiagnose:** Text input field.
- Name**: Text input field.
- endgültige Diagnose:** Text input field.
- DOB**: Text input field.
- Alter**: Text input field.
- MG**: Text input field.
- Geschlecht**: Check box.
- andere Erkrankungen?**: Text input field.
- Präparatdurchmesser (längs)**: Text input field.
- Cortex erhalten**: Check box.
- Präparatdurchmesser Histo längs**: Text input field.
- Cortex überw erhalten**: Check box.
- Präparatdurchmesser Histo quer**: Text input field.
- Cortex herdf erhalten**: Check box.
- Volumen (cm³)**: Text input field.
- Cortex nicht erhalten**: Check box.
- Atrophiegrad (subj)**: Text input field.
- LFH (1-3)**: Text input field.
- Fläche Fett (Morphometrie)**: Text input field.
- Hassal (1-3)**: Text input field.
- Fläche Thymus**: Text input field.
- Epithelproliferate**: Text input field.
- Sonstiges**: Text input field.
- Photo-Fall**: Text input field.

At the bottom of the form, there is a status bar showing "Datensatz: 1 von 1" and "Formularansicht". The Windows taskbar at the bottom shows the Start button and the active window "Microsoft Access - [A...]" with a system clock showing 17:30.

Abb. 1b: Protokollformular:

Aufgenommen wurden Fallnummer, Name, Geburtsdatum (DOB), Alter, Geschlecht, Verdachtsdiagnose, endgültige Diagnose, sowie das Vorhandensein einer MG, oder einer anderen Erkrankung.

Ebenso wurde die Größe des vom Obduzenten entnommenen mediastinalen Fettkörpers (Präparatdurchmesser (längs)) und die histologisch festgestellten Maße (Präparatedurchmesser Histo längs / quer) und das resultierende Volumen protokolliert.

Wichtig war auch das Festhalten des subjektiv empfundenen Atrophiegrades (Atrophiegrad (subj)), wobei vier verschiedene Abstufungen der Atrophie definiert wurden (25% Fettgewebe (FG) im Thymusgewebe (TG) = Grad 1, 50% FG im TG = Grad 2, 75% FG im TG = Grad 3, mehr als 90% FG im TG = Grad 4).

Die wichtigsten Werte im Protokoll waren die morphometrisch festgestellte Fläche des Fett-, bzw. Thymusgewebes

Es wurde aber auch das Ausmaß des erhaltenen Cortex dokumentiert (Cortex erhalten / Überwiegend erhalten / herdförmig erhalten / nicht erhalten).

Der Grad der Entzündung wurde im LFH (1-3)-Feld dokumentiert, wobei bei Grad 1 in 1/3 der Thymusläppchen Lymphfollikel vorhanden waren, bei Grad 2 in 2/3 und in Grad 3 in allem Läppchen.

Auch die Hassall-Körperchen (HK) wurden gezählt und in das Hassall (1-3)-Feld eingetragen.

Epithelproliferate wurden als nodulär, oder rosettenförmig beschrieben.

2.5. Morphometrische Auswertung

Die morphometrische Auswertung erfolgte mittels einer digitalen Farbdifferenzanalyse. Mit dieser Methode wurde untersucht, welcher Anteil des Gesamtgewebes vom spezifischen Thymusgewebe eingenommen wurde. Im folgenden Text soll unter „Gesamtgewebe“ die Summe aus spezifischen Thymusgewebe und umgebendem, sowie interlobulärem Fett- und Bindegewebe einschließlich der Blutgefäße verstanden werden. Als „Thymusgewebe“ bezeichnen wir diejenigen Bereiche des Schnittes, die ausschließlich aus thymusspezifischen Zellen (Thymozyten, Myoidzellen, dendritische Zellen etc.) bestehen.

Dafür wurden von jedem Schnitt (A bis C) eine Sequenz von 10-15 Bildern angefertigt. Dies geschah mit Hilfe eines Axioplan-Mikroskops (Zeiss, Oberkochen) und einer Nikon DXM D1200 Digital-Kamera. Die digitalen Bilder hatten jeweils eine Größe von 640 mal 512 Pixeln, was einer Fläche von 2.27cm² pro Bild entsprach. Auch dies erfolgte auf eine standardisierte Art und Weise in Form eines „Fadenkreuzes“, das durch die größten Durchmesser des Thymusgewebes in den Schnittebenen A bis C gelegt wurde (**Abb. 1c**).

Das Computerprogramm, das zur Analyse der einzelnen Bilder verwendet wurde, besaß drei Farbkanäle (rot, grün, blau) und jeder Kanal hatte einen Dynamikbereich von 8 bit, d.h. der Wertebereich der einzelnen Kanäle erstreckte sich von 0 bis 255, wobei 0 dem dunkelsten und 255 dem hellsten Punkt auf dem Schnittbild entsprach.

Zum Verständnis für die Funktionsweise der Anlage kann man vereinfachend Folgendes sagen: die Software war in der Lage, zwischen den drei Farben (rot, grün, blau) zu unterscheiden: weiß erkannte sie als Fett, rot als Erythrozyten und blau als Thymuszellen.

Der zentrale Schritt der computergesteuerten Bildanalyse war das „image-processing“: ein Filter erlaubte es dem Computer, den Kontrast zwischen den einzelnen Farben zu verstärken (**Abb. 1d**), und mit Hilfe eines weiteren Filters erkannte er, dass die weißen Bildpunkte Fett, und die dunklen Areale Thymusgewebe repräsentierten (**Abb. 1e**).

Ein anderer, spezieller Filter ermöglichte es, zwischen Cortex (hell) und Medulla (dunkel) zu unterscheiden (**Abb. 1f**). Das Computerprogramm war außerdem in der Lage CD20 positive B-Zellen zu detektieren, und ihren Anteil am Gesamtgewebe zu berechnen. Dafür wurden die nach CD20 gefärbten C-Schnitte verwendet (**Abb. 1g**).

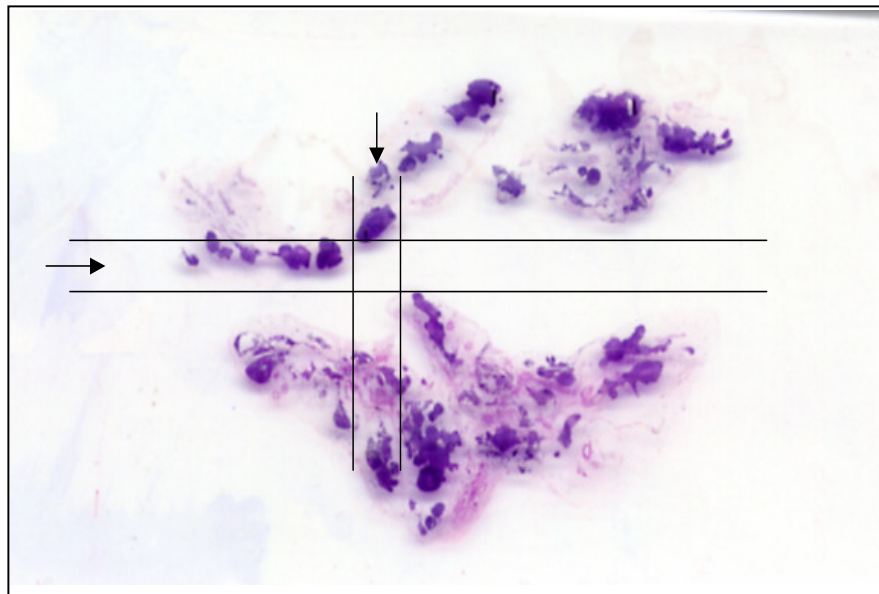


Abb. 1c: Standardaufnahmen zur morphometrischen Analyse des Thymusgewebes:
Es wurde eine Fotoserie durch den größten Durchmesser (Pfeil) des Thymusschnittes gelegt und der Computer war mittels der Farbdifferenzanalyse in der Lage einzelne Farbpunkte voneinander zu unterscheiden und daraus den Anteil des Thymusgewebes am Gesamtgewebe zu berechnen

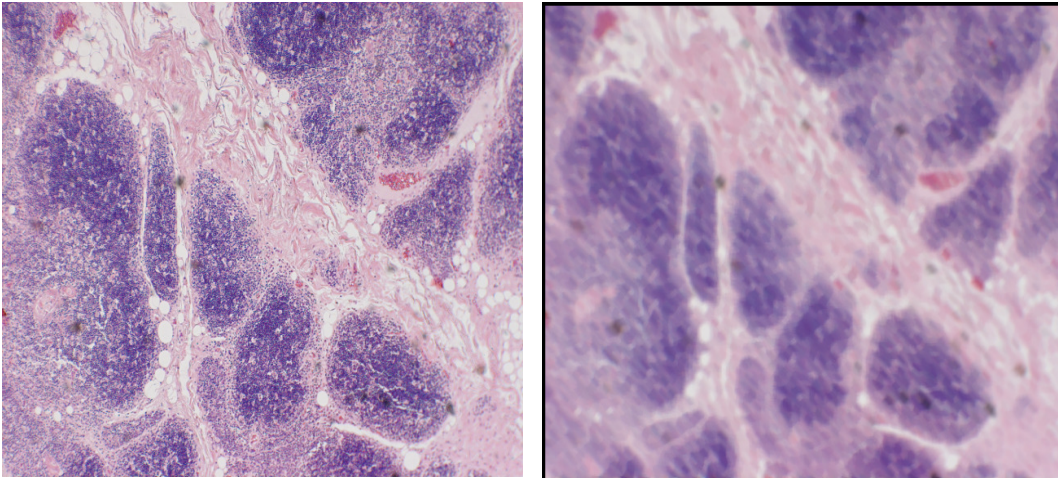


Abb. 1d: Verstärkung des Kontrastes mittels “image processing”

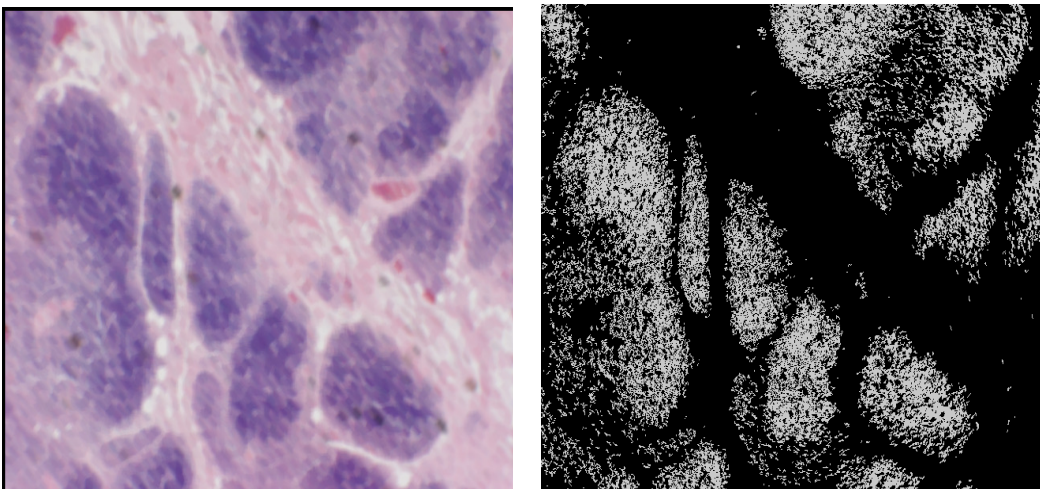


Abb. 1e: Analyse des Thymusgewebes mittels eines Computerfilters, wobei die hellen Punkte Thymuszellen und die dunklen Areale Fett bzw. Stroma repräsentieren.

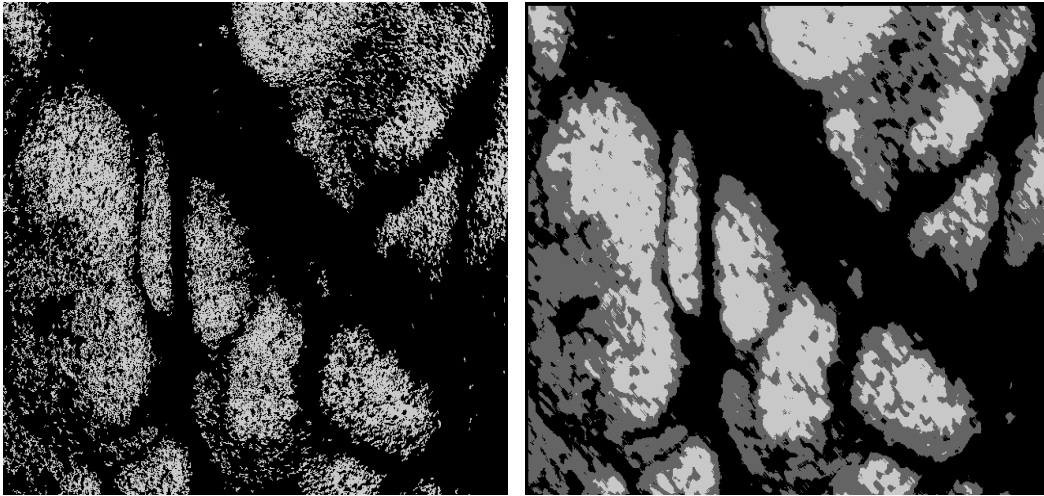


Abb. 1f: Unterscheidung von Kortex und Medulla mittels eines speziellen Computerfilters, der dunkler gefärbte Kortexareale (grau), von heller gefärbten Medulla-Arealen (weiß) unterscheidet.

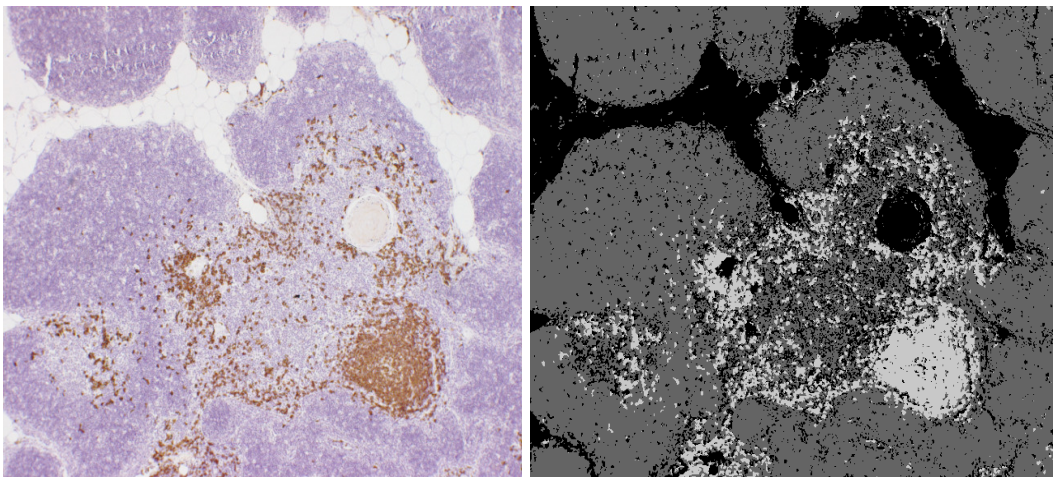


Abb. 1g: Identifizierung von Arealen mit B-Zellen im Thymus. Links die CD20 gefärbten, durch Immunperoxidase relativ dunkel dargestellten B-Zellen, rechts das transformierte Bild, wobei B-Zellen als helle Bildpunkte dargestellt sind und die übrigen Thymusanteile grau erscheinen.

3. Ergebnisse

3.1. Validierung des histologischen Zuschnitt-Protokolls

Die quantitative, morphometrische Analyse der drei verschiedenen standardisierten Schnitte, die von jedem einzelnen Organ gewonnen wurden, zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede im Gehalt von Thymusgewebe zwischen den einzelnen Präparaten (t-Test, $p > .05$) (**Abb. 2a**).

Dieser Befund beweist, dass die Involution in allen Teilen des Thymus gleichmäßig erfolgte. Als weiteres Ergebnis konnte festgehalten werden, dass für eine adäquate morphometrische Analyse kein standardisierter Zuschnitt erforderlich war, und dass jeder beliebige Horizontalschnitt durch den Thymus für solche Untersuchungen verwendet werden könnte.

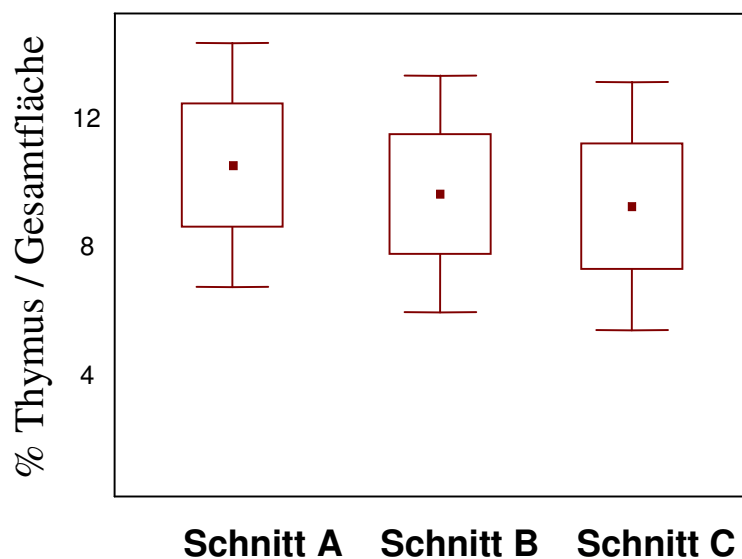


Abb. 2a: Vergleich der Schnittebenen des standardisierten Zuschnitts. Der Gehalt an Thymusparenchym ist unabhängig von der Schnittebebe durch den thymushaltigen Teil des mediastinalen Fettgewebes.

3.2. Thymusveränderungen im Rahmen der normalen Involution

3.2.1. Thymusveränderungen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

3.2.1.1. Morphologische Parameter, die eine Veränderung im Zuge der Thymusinvolution erfahren

Im Allgemeinen zeigten die Ergebnisse der morphologischen und morphometrischen Untersuchungen innerhalb einer Altersgruppe wenig Variabilität. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Pido-Lopez, Imami et al. 2001) konnten wir bezüglich des Ablaufes der Thymusinvolution keine Unterschiede zwischen Männern und Frauen feststellen. Es kam innerhalb der ersten fünf Lebensdekaden zum Verlust von mehr als 90% des Thymusparenchyms (63.7 +/- 10.3% verbleibendes Thymusgewebe in der ersten Dekade, zu 5.3 +/- 4.2% in der fünften Dekade) (**Abb. 2b**). Danach verringerte sich das Gewebe bis zum 90. Lebensjahr nur noch minimal. Pro Dekade kam es zu einem Verlust von 5% funktionellem Thymusgewebe bezogen auf das noch vorhandene spezifische Thymusgewebe.

Obwohl sowohl Cortex als auch Medulla von der Involution betroffen waren, ging der Verlust des Kortex schneller voran, und war in der fünften Lebensdekade beendet. Sehr auffällig erscheint der dramatische Verlust des Kortexgewebes zwischen der ersten und zweiten Dekade (**Abb. 2c**).

Auch Steinmann beschreibt in einer Arbeit das Phänomen der rapiden Thymusinvolution zwischen dem 10. und dem 25. Lebensjahr und vermutet einen Zusammenhang mit den hormonellen Veränderungen in der Pubertät (Steinmann, Klaus et al. 1985). In neueren Untersuchungen wird diese dramatische Veränderung während der Pubertät mit einer vermehrten Ausschüttung des Geschlechtshormons Östrogen in Verbindung gebracht. Über das Fas/FasL System kommt es dabei zu einer Östrogen-induzierten Atrophie des Thymus mit einer Verminderung der Zahl der Thymozyten im Organ (Mor, Munoz et al. 2001).

Hilfreiche diagnostische Kriterien zur Erfassung von altersbedingten Veränderungen des Thymus waren Läppchengliederung, Prozentsatz von Thymusgewebe gegenüber Fett- bzw. Bindegewebe, Größe und Anordnung kortikaler Areale und die Anzahl der Hassall-

Körperchen. Hassall-Körperchen waren bei Kindern am zahlreichsten, und bei Personen älter als 70 Jahre nicht mehr vorhanden (**Abb. 2d/2e**). Vorhandensein und Quantität dieser thymusspezifischen Strukturen schien mit der Größe des Kortex zu korrelieren.

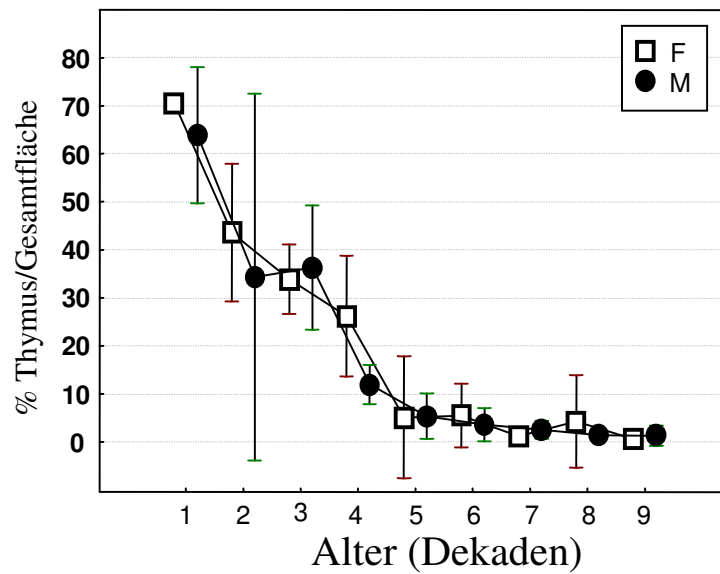


Abb. 2b: Physiologische Thymusinvolution (erstellt anhand von Normalthymi) in in Abhängigkeit vom Alter bei Frauen und Männern.

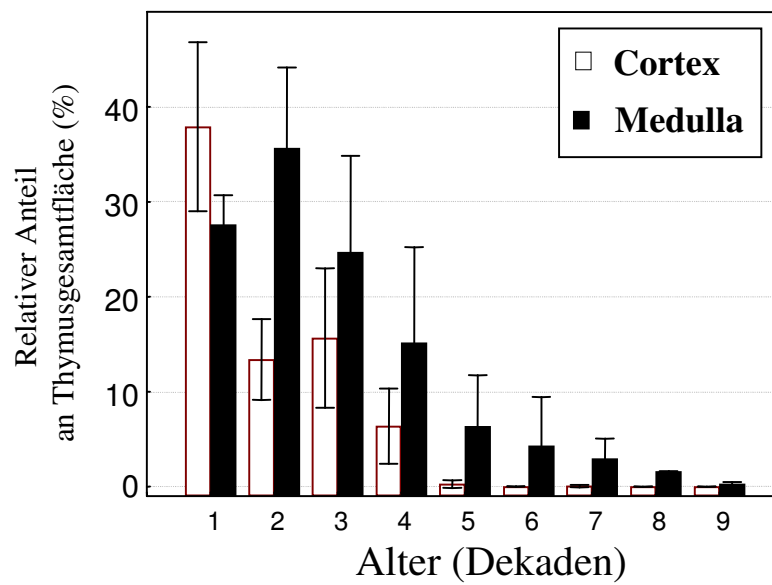


Abb. 2c: Verteilung von Cortex und Medulla im Thymusgewebe (einschließlich Fett-, und Bindegewebe) in Abhängigkeit vom Alter.

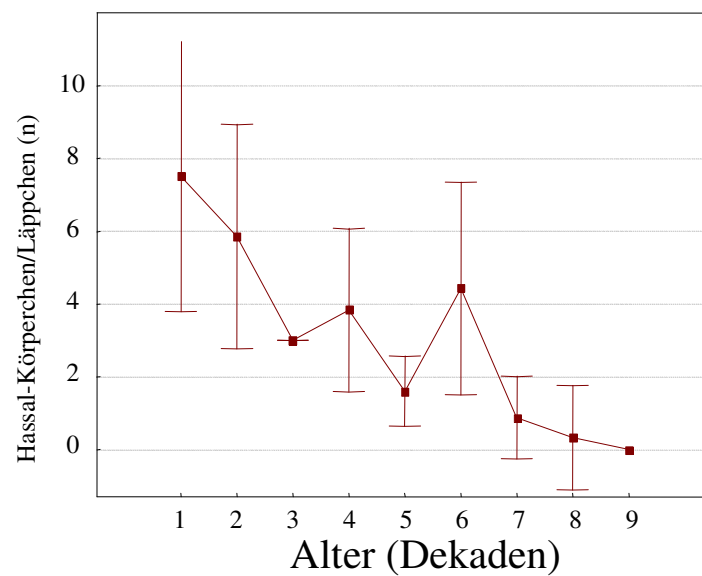


Abb. 2d: Häufigkeit von Hassall-Körperchen in Abhängigkeit vom Alter

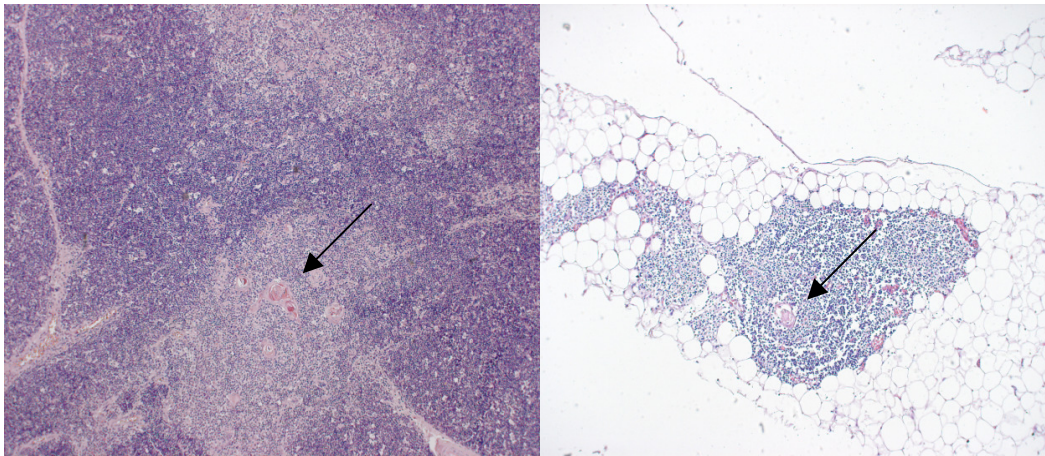


Abb. 2e: Abnahme der Häufigkeit von Hassall-Körperchen (Pfeile) mit dem Alter.

3.2.2.2. Morphologische Parameter, die sich im Laufe der Thymusinvolution nicht verändern

Die Histomorphologie und Größe der Hassall-Körperchen zeigte keine altersabhängigen Veränderungen (**Abb. 2e**). Kalkablagerungen und Zystenbildung konnten schon in Kinderthymi nachgewiesen werden.

Die absolute Zahl der B-Zellen in der Medulla (morphometrische Analyse der CD20-exprimierenden Zellen in den Schnitten) wies eine relativ geringe Änderung über die gesamte Lebensdauer auf (**Abb. 2f**).

Lymphfollikel sowohl mit als auch ohne Keimzentrum waren keine Seltenheit in Normalthymi (20 von 60 Personen, 33 %), wurden aber nur in einzelnen Läppchen, und nur in geringer Anzahl lokalisiert (0-9 Lymphfollikel, durchschnittlich 1 Lymphfollikel pro Läppchen).

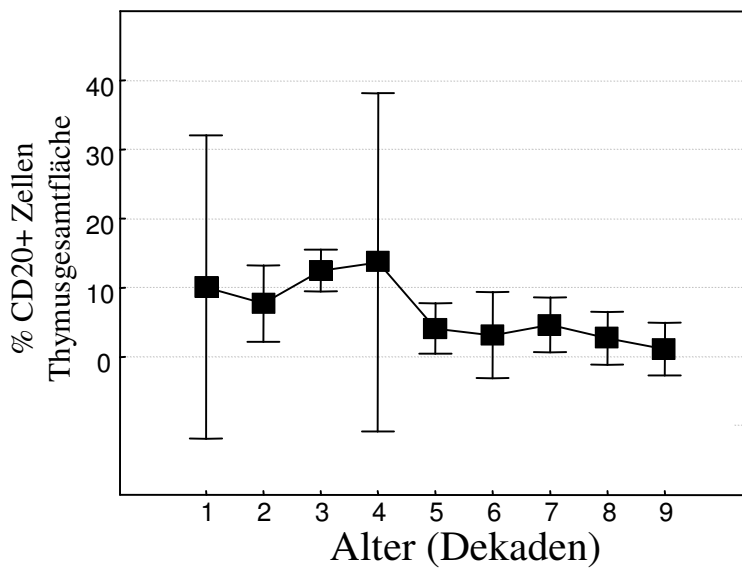


Abb. 2f: Anteil der B-Zellen am gesamten Thymusgewebe in Abhängigkeit vom Alter, wobei sich weder eine signifikante Zu-, oder Abnahme der B-Zellen erkennen lässt.

3.3. Morphologische Veränderungen des Thymus in verschiedenen Altersgruppen

3.3.1. 1 - 20 Jahre:

Während der ersten fünf Lebensjahre konnten keine auffälligen morphologischen oder morphometrischen Involutionerscheinungen beobachtet werden. Die H.E. Färbung zeigte einen voll entwickelten Thymus mit symmetrischer Läppchengliederung, sehr dünnen, zarten interlobulären Septen, die Bindegewebe, aber kein Fett enthielten, und eine gute Abgrenzbarkeit zwischen Kortex und Medulla. Innerhalb der Läppchen war der Kortex breit angelegt und umgab die Medulla kontinuierlich, ohne Unterbrechung. Zahlreiche Hassall-Körperchen wurden in der Medulla angetroffen (**Abb. 3a**).

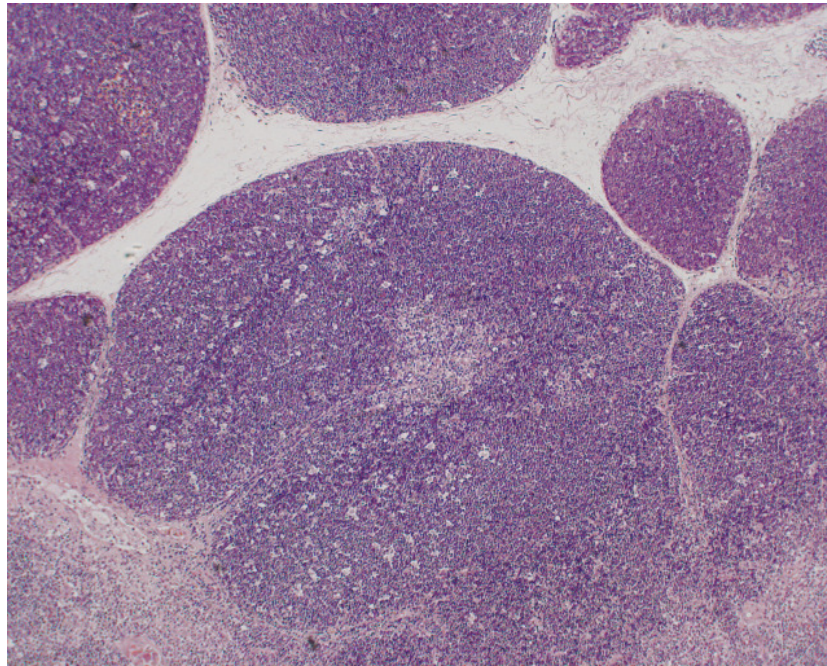


Abb. 3a: Thymus eines Neugeborenen mit deutlicher Dominanz der sich dunkler darstellenden kortikalen Arealen.

Im Alter zwischen fünf und 20 Jahren war die Thymusstruktur weiterhin voll ausgebildet, mit einer guten Abgrenzbarkeit zwischen Kortex und Medulla. Auch in dieser Altersgruppe umgab der Kortex die Medulla noch vollständig. Dagegen war die Fläche des Kortex in Bezug auf die Gesamtfläche (im Gegensatz zur Medulla) deutlich verringert. Die Septen zwischen den Lobuli waren etwas breiter und muteten zudem ödematös an. In den Thymi von Patienten älter als zwölf Jahre, also bei Personen, die sich in der Pubertät befinden, wurden kleinere Fettgewebsstränge gesehen. Hassall-Körperchen blieben weiterhin zahlreich. Bei der morphometrischen Analyse war die Reduktion des Thymusgewebes zwischen der ersten und zweiten Dekade sehr auffällig (**Abb. 3b+c**).

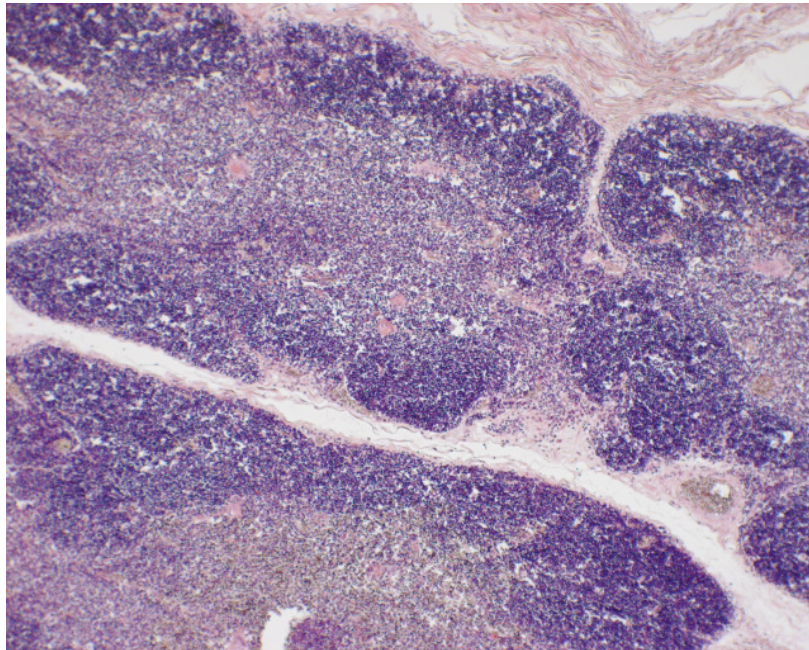


Abb. 3b: Thymus eines 11jährigen Mädchens, mit Verringerung der kortikalen Areale, die aber die Medulla noch vollständig umgeben.

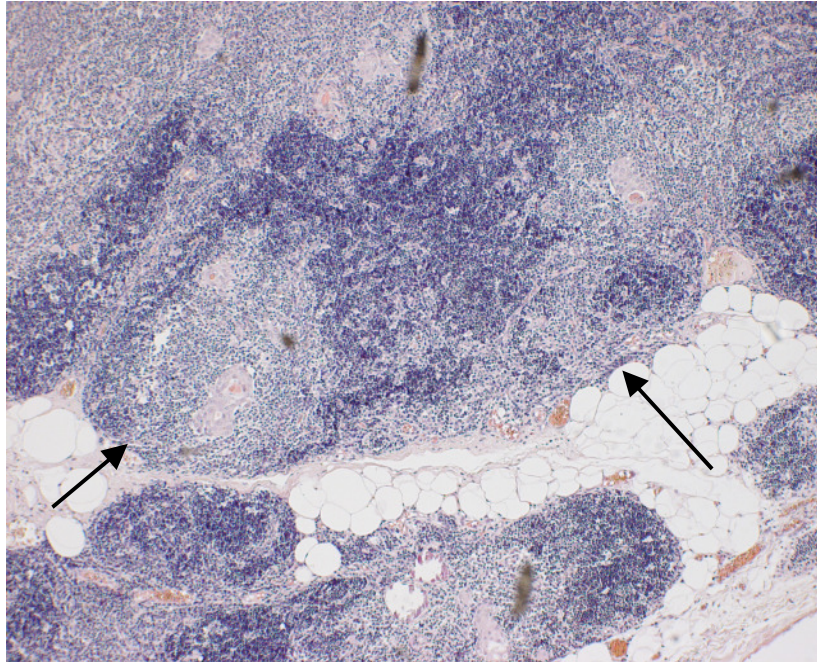


Abb. 3c: Thymus einer 20jährigen Frau, bei dem sich der Verlust der kortikalen Areale schon deutlich zeigt. An manchen Stellen wird die Medulla nicht mehr vollständig vom Kortex umgeben (Pfeil).

3.2.2. 21 - 30 Jahre

Zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr gab es wenig morphologische und morphometrische Veränderungen. Die absolute Größe und die Architektur des Thymus blieb stabil, bis auf eine geringfügige weitere Verbreiterung der interlobulären Septen, die in dieser Altersgruppe hauptsächlich Fett enthielten. Die Läppchengliederung war immer noch deutlich erkennbar. Der Kortex war klar abgrenzbar und breit, umgab die Medulla aber nicht mehr vollständig. Vielmehr hatte die Medulla jetzt direkten Kontakt mit dem umgebenden Fett. Hassall-Körperchen blieben weiterhin zahlreich (**Abb. 3d**).

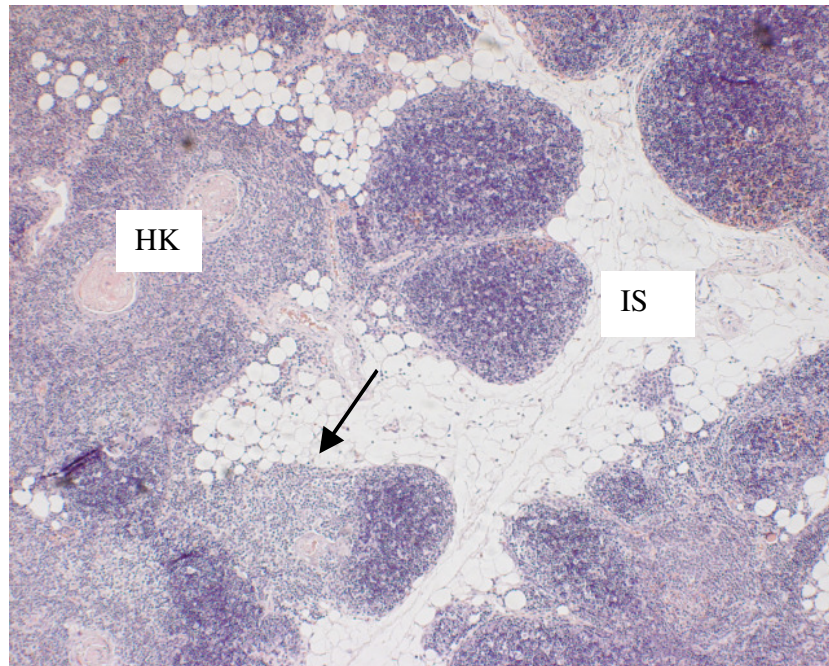


Abb. 3d: Thymus eines 30jährigen Mannes mit geringfügiger Verbreiterung der interlobulären Septen (IS), unterbrochener Kortexstruktur (Pfeil), aber weiterhin weiterhin zahlreich vorhandenen Hassal-Körperchen (HK).

3.3.3. 31 – 40 Jahre:

Im Alter zwischen 30 und 40 Jahren verbreiterten sich die interlobulären Areale, und der Ersatz des Thymusgewebes durch Fett ging außerordentlich schnell vor sich. Die Läppchengliederung konnte noch erahnt, aber nicht mehr sicher nachgewiesen werden. Viele medulläre Areale wurden nur noch sehr unvollständig vom Kortex umgeben. (**Abb. 3e**).

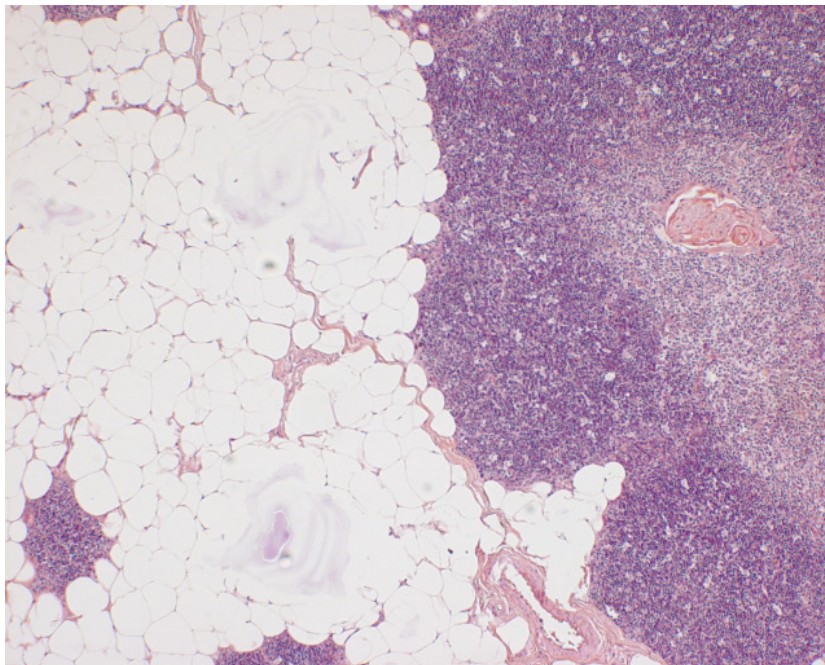


Abb. 3e: Thymus eines 39jährigen Mannes mit deutlichem Ersatz des Thymus durch Fettgewebe.

3.3.4. 41 - 60 Jahre:

Diese Zeitspanne wurde von einem Verlust von Thymusgewebe und seinem Ersatz durch Fett geprägt, das schließlich (bei 60-jährigen) 95% der Gesamtfläche einnahm. Vor allem nach dem 50. Lebensjahr konnte keine geordnete Läppchengliederung mehr nachgewiesen werden. Der Kortex war schmal und flächenmäßig klein. Es kam nun auch zu einer auffälligen Reduktion des medullären Areals durch Atrophie, oder Ersatz durch zystisch-epitheliale Veränderungen, sowie durch sogenannte Epithelproliferationen. Diese Erscheinung trat in nodulärer oder azinärer Form auf (**Abb. 3f/3g**). Hassall-Körperchen kamen nur noch in geringer Anzahl vor (0-10 Hassall-Körperchen pro medullärem Areal, also durchschnittlich 3, wobei der medulläre Anteil eines Thymusläppchens als medulläres Areal bezeichnet wird).

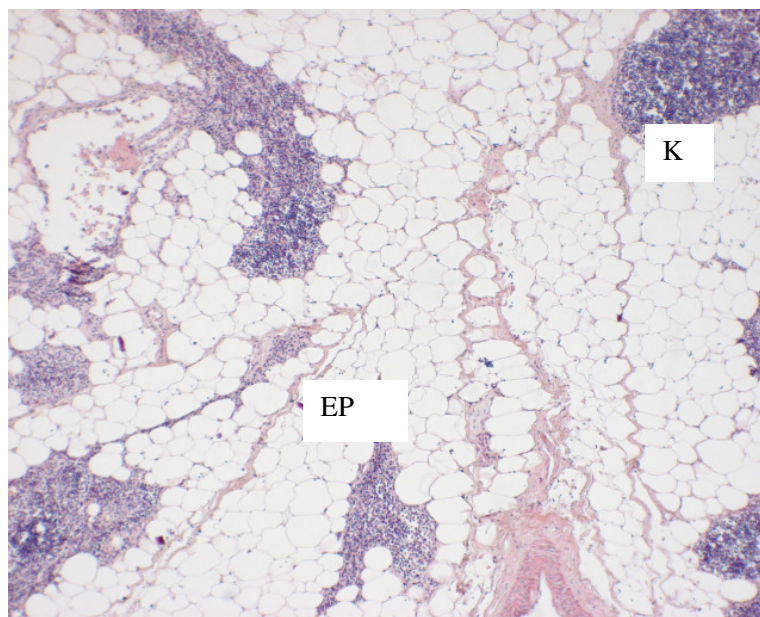


Abb. 3f: Thymus eines 42jährigen Mannes. Das Fettgewebe nimmt nun ca. 95% der Gesamtfläche ein. Der Kortex (K) erscheint schmal und umgibt die Medulla sehr unvollständig. Auffällig sind sog. Epithelproliferationen (EP).

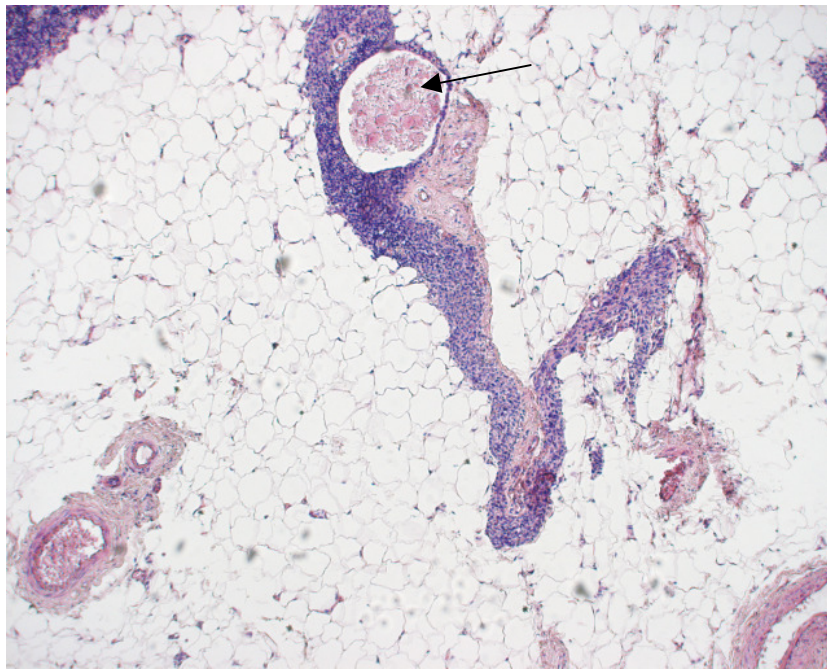


Abb. 3g: Thymus einer 57jährigen Frau mit kleiner Thymuszyste (Pfeil)

3.3.5. 61 Jahre und älter:

Die morphologischen und morphometrischen Veränderungen des Thymus waren vom 60. bis zum 80. Lebensjahr (und auch älter) nur noch minimal. Es konnten so gut wie keine kortikalen Areale konventionell lichtmikroskopisch nachgewiesen werden, und die Thymusinvolutionschritt in Form von Atrophie v.a. der medullären Areale voran. Mehr als 95% des analysierten Gewebes bestand aus Fett und kleinen, dünnwandigen Blutgefäßen. Bindegewebe war nicht mehr nachweisbar. Das übrig gebliebene Thymusgewebe bestand meist aus Strängen von atrophischem Epithel. Meist wurden keine Hassall-Körperchen mehr gesehen (**Abb. 3h**). Überraschenderweise konnten aber immer wieder kleine Inseln mit angedeuteten kortikalen Strukturen auch bei Individuen älter als 80 Jahre gefunden werden (**Abb. 3i**).

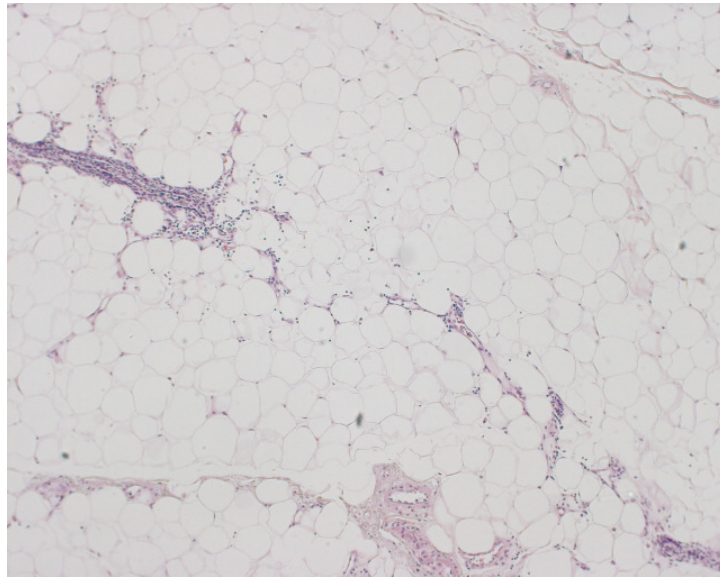


Abb. 3h: Thymus eines 62jährigen Mannes mit deutlicher Thymusinvolution. Sichtbar sind Stränge medullären Gewebes und kleine kortikale Areale.

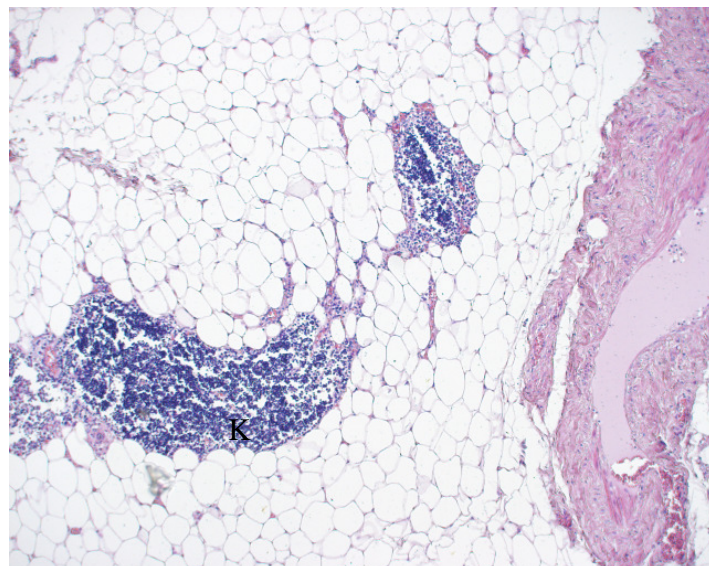


Abb. 3i: Thymus einer 72jährigen Frau mit winzigen (dunklen) Arealen kortikalen Gewebes

3.4. Der Thymus bei Myasthenia gravis

3.4.1. Der Thymus bei Patienten mit "early-onset" (AChR+) MG (EOMG)

EOMG war in unserem Kollektiv bei Frauen neunmal häufiger als bei Männern.

Das wichtigste und beständigste Merkmal einer EOMG im Vergleich zu Kontroll-Thymi war die Thymitis, also die stark erhöhte Zahl von B-Zellen, die in Lymphfollikeln organisiert waren (**Abb. 4a/4b**). Morphometrisch ließ sich feststellen, dass der Anteil von Thymusgewebe am Gesamtgewebe im Vergleich zu Normalthymi stark erhöht war. Statistische Tests zeigten eine signifikante Zunahme des Thymusgewebes, das mit Thymitis assoziiert war, v.a. zwischen der dritten und achten Dekade (**Abb. 4c**).

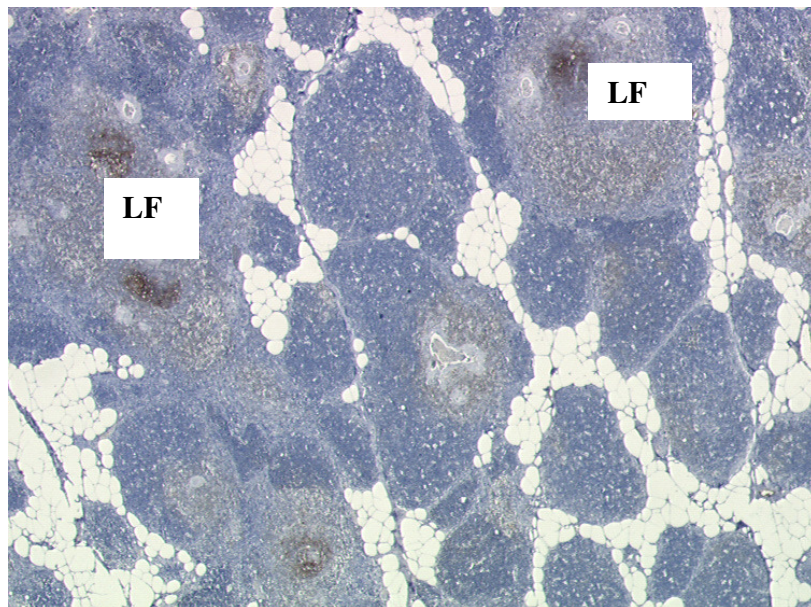


Abb. 4a: Thymusgewebe eines 73-jährigen Mannes mit EOMG-MG (Immunhistochemie, CD20). Erkennbar ist eine Vermehrung CD20-positiver B-Zellen, die sich in Lymphfollikeln (LF) organisiert haben. Das Thymusgewebe erscheint in Anbetracht des Alters vermehrt.

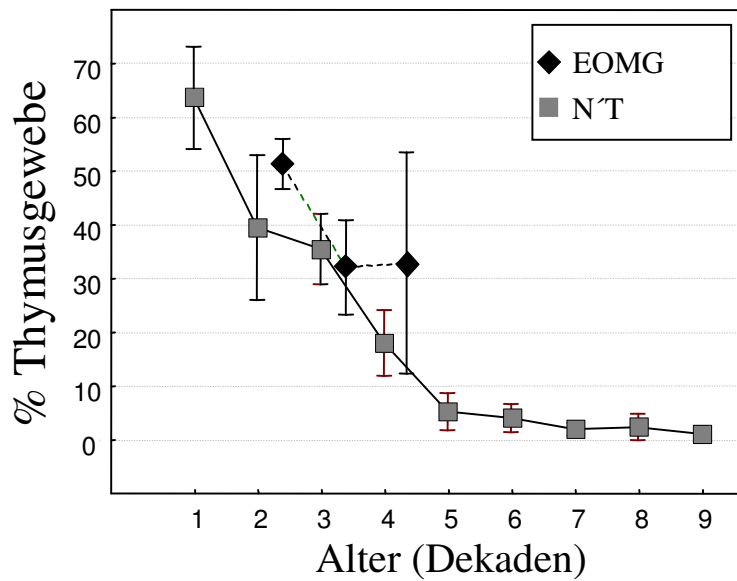


Abb. 4b: Vergleich von Normalthymi (NT) mit EOMG-Thymi, wobei eine Vermehrung des Thymusgewebes bei den EOMG-Thymi auffällt.

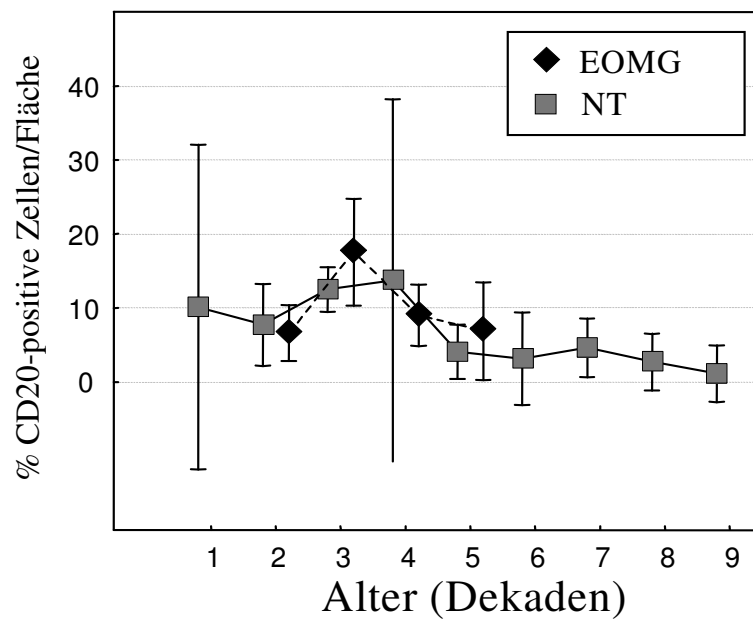


Abb. 4c: Vergleich von CD20-positiven Zellen bei Normalthymi und EOMG-Thymi ohne signifikante Unterschiede in der Anzahl der B-Zellen.

3.4.2. Der Thymus bei Patienten mit "late-onset" (AChR+) MG (LOMG)

Im Gegensatz zur EOMG war die LOMG bei Männern viermal häufiger als bei Frauen. Obwohl die Thymi dieser Patienten häufig als atrophisch beschrieben wurden, gab es keinen signifikanten Unterschied zu altersentsprechenden Normalthymi (**Abb. 4d/e**). Außerdem konnte in den meisten Fällen kein Anzeichen immunologischer Stimulation im Sinne einer Entzündung entdeckt werden.

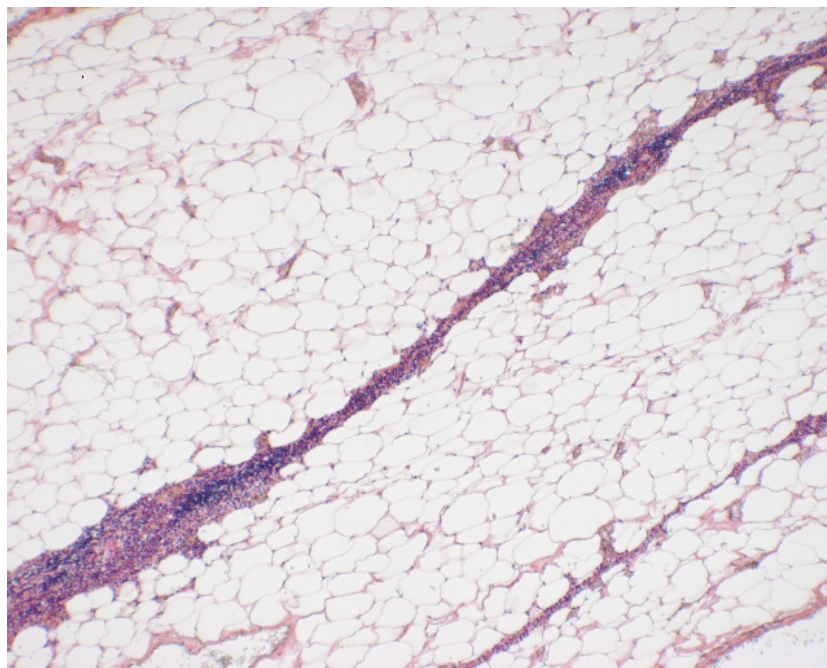


Abb. 4d: Thymus eines 60jährigen Mannes mit AChR(+) Myasthenia gravis. Histologisch entspricht das Bild dieses Thymus einem Normalbefund mit physiologischer Thymusinvolution.

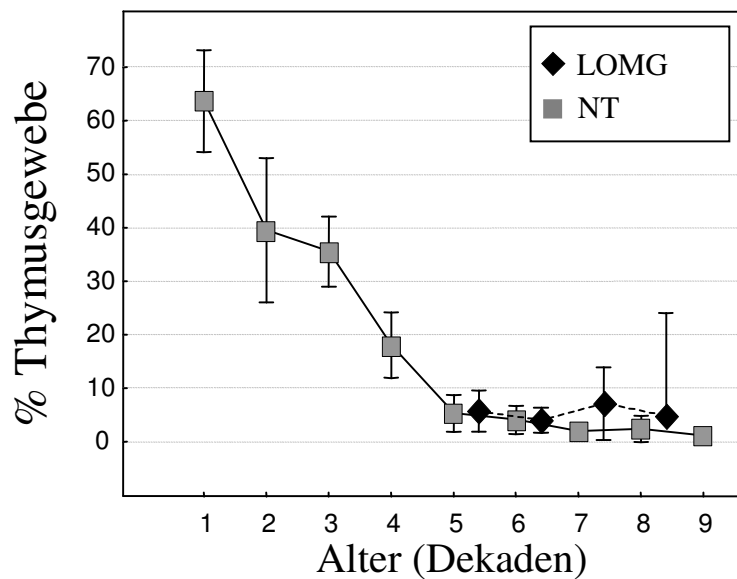


Abb. 4e: Vergleich von Normalthymi mit LOMG-Thymi, wobei morphometrisch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Vorhandensein von Thymusgewebe festgestellt werden konnte.

3.4.3. Der Thymus bei Patienten mit seronegativer, MUSK (+) MG

AChR(-), MUSK (+) MG war in unserem Kollektiv bei Frauen viermal häufiger als bei Männern.

Der Anteil von Thymusparenchym an der Gesamtfläche zeigte bei der MUSK(+) MG keine signifikanten Unterschiede zu altersentsprechenden Normalthymi. Auch die morphologischen Kennzeichen wie Größe, Anordnung und Ausdehnung des Kortex, sowie Anzahl der Hassall-Körperchen waren unauffällig (**Abb. 4f/g**).

Während Lymphfollikel in ähnlicher Anzahl wie in Kontrollthymi beobachtet wurden, war der Gehalt an diffus verstreut liegenden B-Zellen in der seronegativen MG im Vergleich zu altersentsprechenden Normalthymi vermehrt. Statistisch signifikant zeigte sich diese Entwicklung aber ausschließlich in der fünften Dekade (**Fig. 4h**).

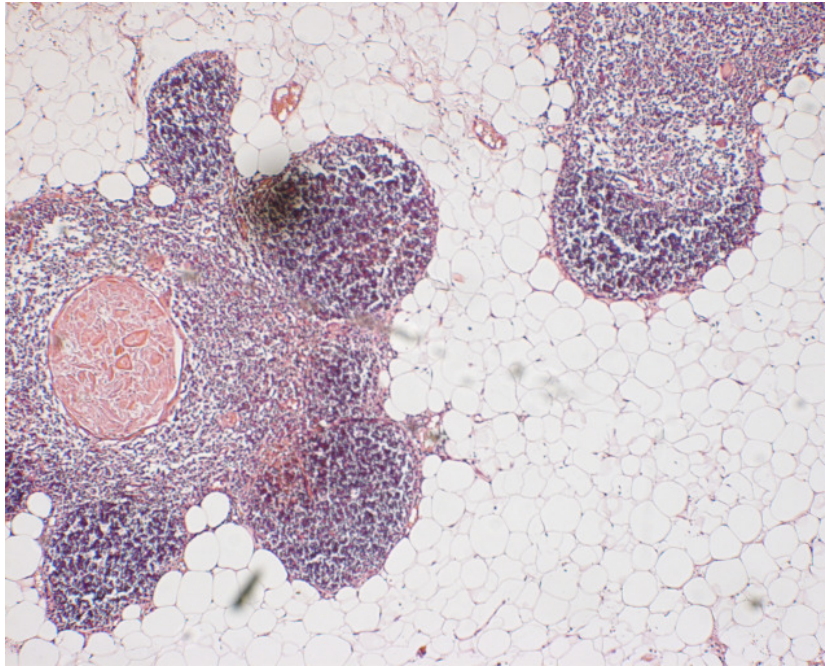


Abb. 4f: Thymus einer 27jährigen Frau mit AChR(-) MUSK(+) Myasthenia gravis, mit altersentsprechendem histologischem Befund ohne besondere pathologische Auffälligkeiten.

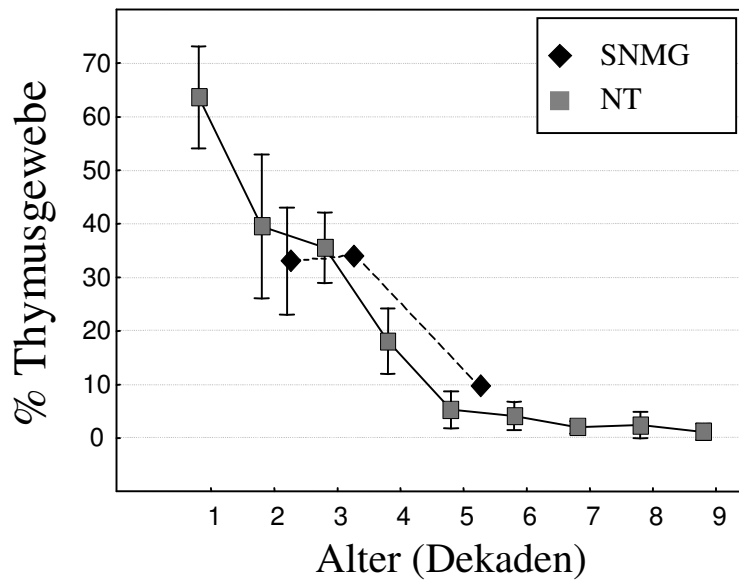


Abb. 4g: Vergleich von Normalthymi mit MUSK(+)*MG*-Thymi

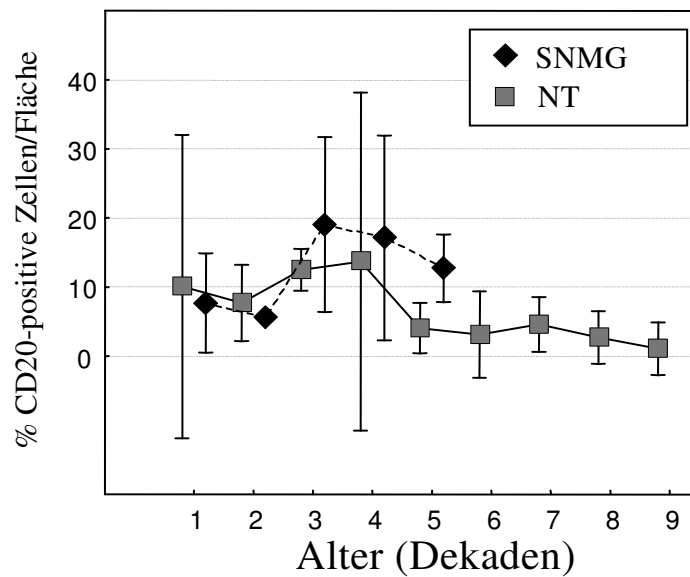


Abb. 4h: Vergleich der Anzahl von CD-20 positiven Zellen in Normalthymi mit SNMG-negativen Thymi, ohne signifikanten Unterschied bis zur 4. Dekade. Ab der 5. Dekade findet man bei SNMG vermehrt CD20 positive Zellen.

3.4.4. Thymus bei Patienten mit paraneoplastischer MG

Untersucht wurden hierbei die nicht neoplastisch veränderten Areale des Thymus (sogenannte Restthymi), von Patienten mit und ohne Assoziation mit einer MG. Die Inzidenz war bei Männern und Frauen etwa gleich häufig (Chi-Quadrat Test $p > .05$).

Eine bemerkenswerte Anzahl von Restthymi zeigte eine deutliche Entzündung (22 von 55 Fällen, 43,4%). Beim Vergleich von Restthymi, die mit einer Entzündung, also mit Lymphfollikeln assoziiert waren, zeigte sich eine signifikante Vermehrung des Thymusparenchyms in Bezug auf die Gesamtfläche (Man-Whitney-U-Test, $p < 0.01$). Bei Restthymi ohne Entzündung wurde keine nennenswerte Vermehrung des Thymusparenchyms gesehen.

Diese Beobachtung machte deutlich, dass der einzige Faktor, der zu einer Vergrößerung der Thymusfläche führte, eine Entzündung („lymphofollikuläre Hyperplasie“) war (**Abb. 4i**).

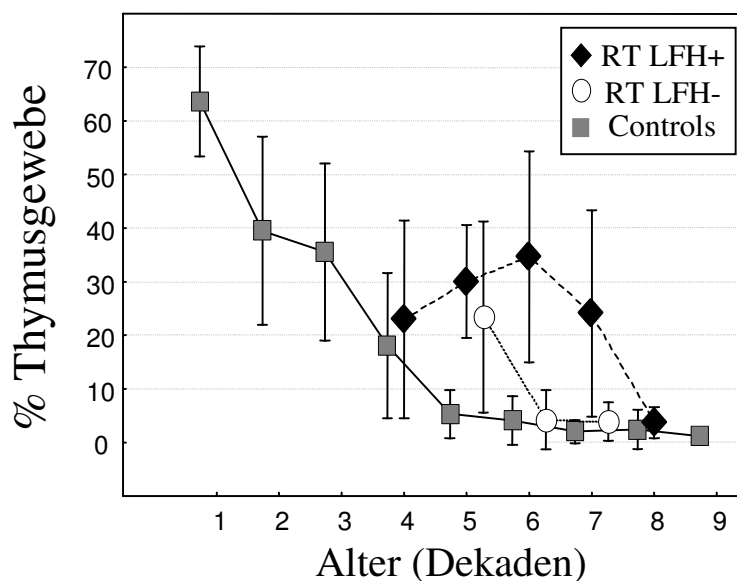


Abb. 4i: Vergleich von Normalthymi mit Restthymi von Thymomen, wobei es bei den neoplastisch veränderten Thymi zu einer signifikanten Gewebezunahme kommt

4. Diskussion

Bei der hier durchgeführten morphometrischen Analyse sollte die Dynamik der Thymusinvolution beim Menschen und seine pathologische Bedeutung für die Genese der Myasthenia gravis illustriert werden.

Die konkreten Ziele dieser Arbeit waren die Etablierung einer einfachen und sehr genauen Methode zur Bestimmung des Anteils von Thymusgewebe am Gesamtgewebe des mediastinalen Fettkörpers, was mit der Einführung der Farbdifferenzanalyse sehr gut möglich wurde. Ein weiteres Ziel war die Erstellung einer Standardkurve zur Beschreibung der physiologischen Thymusinvolution bei gesunden Probanden. Außerdem sollte ein möglichst detaillierter morphologischer Atlas zur Illustration einer normalen, physiologischen Thymusinvolution erarbeitet werden. Die morphometrisch gewonnene „Normalkurve“ der Involution des Thymus sollte nun mit den Daten der Farbdifferenzanalyse von verschiedenen den Thymus betreffenden Krankheitsbildern verglichen werden, um ein morphometrisch-morphologisches Korrelat der einzelnen Krankheitsentitäten sichtbar machen zu können. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die in der Literatur häufig beschriebene Thymusatrophie gelegt, die bei der Entstehung verschiedener Autoimmunkrankheiten eine zentrale Rolle spielen soll.

Als Ergebnis der Arbeit ist zunächst festzuhalten, dass für die computergesteuerte Farbdifferenzanalyse jeder beliebige histologische Schnitt geeignet war.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der morphologischen Analyse der physiologischen Thymusinvolution. Dabei waren folgende Ergebnisse beobachtet worden: Im Laufe des Lebens kommt es zu histologisch feststellbaren Veränderungen des Thymus. Besonders betroffen ist die lobuläre Architektur, die sich im Laufe des Lebens auflockerte und schließlich nicht mehr zu identifizieren war. Erste Anzeichen dieser Involution waren bereits nach dem 20. Lebensjahr bemerkbar: die Septen verbreiterten sich zusehends und die geordnete Läppchenstruktur wurde zunehmend verwischt und aufgelöst.

Im Rahmen der morphometrischen Analyse war ein Ersatz von intaktem Thymusgewebe durch Fett- und Bindegewebe sehr eindrucksvoll zu erkennen. Letztendlich kam es zu einem Verlust von ca. 90% des Thymusgewebes im Laufe des Lebens. Obwohl periphere Homöostasemechanismen die Anzahl der T-Lymphozyten im peripheren Blut beeinflussen können, ist der Thymus die Hauptquelle für neue T-Zellen. Im Laufe eines Lebens wird bedingt durch diese Involution der Export von naiven Effektor- und Regulator-T-Zellen dramatisch reduziert. Dieser Mechanismus könnte zu einer Beeinträchtigung der T-Zell-Funktion und zu einer Zunahme von autoimmunologischen Reaktionen führen (Berzins, Uldrich et al. 2002). Dieser Abbau von Thymusgewebe kann durch verschiedene Erkrankungen, wie z.B. HIV-Infektion forciert werden (Ye, Kirschner et al. 2004). Hierbei werden Thymozyten direkt durch das Virus zerstört, was zu einer deutlichen Schwächung der T-Zell gebundenen Immunabwehr führt.

Auch die Häufigkeit von Hassall-Körperchen nahm im Laufe des Lebens ab. Man kann also in der Zusammenschau der Merkmale Architektur, Abbau von intaktem Thymusgewebe und Abnahme der Hassall-Körperchen mit Hilfe von rein histologischen Mitteln auf das ungefähre Alter eines Thymus schließen.

Die morphometrisch festgestellte Involution betrifft den Thymus als Ganzes. Obwohl die kortikalen Bereiche früher und schneller betroffen sind als die medullären, ist die Involution der beiden Kompartimente als gleich anzusehen. Da gezeigt werden konnte, dass die Involution vom Organ selbst determiniert wird (Bodey, Bodey et al. 1997), könnte dieser Sachverhalt in der Involution ein indirekter Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprung von kortikalen und medullären epithelialen Zellen sein (Blackburn, Manley et al. 2002).

Eine etwas überraschende Erkenntnis ergab sich beim Vergleich von männlichen und weiblichen Thymi. Denn es konnten, im Gegensatz zu anderen Arbeiten, keine Hinweise auf Unterschiede in Größe, Morphologie und Morphometrie bei gesunden Probanden

zwischen den beiden Geschlechtern festgestellt werden. Auch bei den pathologischen Krankheitsentitäten fanden sich keine signifikanten morphometrischen Unterschiede.

Was aber auffallend war, war die Tatsache, dass Frauen bei fast allen Formen der Myasthenia gravis epidemiologisch häufiger vertreten waren. Es scheinen also eher funktionelle Unterschiede (z.B. Hormoneinflüsse) eine Rolle zu spielen (Kimura, Watanabe et al. 1994). Die Untersuchung der Wirkungsweise von Hormonen auf das Immunsystem wäre hierbei von großem Interesse. Andere Arbeiten machen das etwas anders gearbete Cytokinprofil von Frauen für diese „Anfälligkeit“ für Autoimmunkrankheiten verantwortlich. Giron-Gonzalez et al. (Giron-Gonzalez, Moral et al. 2000) beschreiben in einer Arbeit von 2000 eine erniedrigte INF-gamma/IL-4 Ratio bei weiblichen Probanden, was zu einer Dominanz des TH2-Zweiges führt. Dadurch kann es zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-4 und IL-10 und nachfolgend zu einer verstärkten Antikörperproduktion und damit zu einer verstärkten Immunantwort kommen.

Des Weiteren war zu beobachten, dass sich die Häufigkeit von medullären B-Zellen im Absoluten verringerte, die Anzahl der Zellen im relativen Verhältnis aber konstant blieb (pro mm² medullären Areal).

Da nun wie bereits erwähnt die Involution in der Medulla langsamer vor sich ging als im Kortex und da die relative B-Zell Zahl in den medullären Anteilen im Laufe des Lebens ziemlich stabil blieb, nimmt das B-Zell-Kompartiment vor allem in den spätern Lebensdekaden eine prädominante Stellung gegenüber dem unreifen T-Zell-Kompartiment ein (T-.zu B-Zell-Arealen ca. 3:1 in der ersten Dekade, gegenüber T- zu B-Zell-Arealen ca. 1:4 zwischen der fünften und neunten Dekade). Da angenommen wird, dass die B-Zellen im Thymus an der negativen Selektion der autoreaktiven T-Zellen beteiligt sind (Inaba et al. 1991; Akashi, Richie et al. 2000), könnte diese Entdeckung ein Hinweis auf eine Art „Sicherheitsfunktion“ der B-Zellen gegen Autoimmunkrankheiten sein.

Im zweiten Teil unserer Untersuchungen konzentrierten wir uns auf die quantitative Analyse von Thymi, die mit MG assoziiert waren.

Zunächst wurden Normalthymi mit den Thymi von Patienten mit EOMG verglichen:

Entsprechend früherer Berichte (Marx, Wilisch et al. 1997) war die AChR(+) EOMG regelmäßig mit einer Thymitis assoziiert, was auch in der morphometrischen Analyse in Form einer signifikanten Gewebevermehrung seinen Niederschlag fand. Es scheint also innerhalb des Thymus eine ständige immunologische Stimulation abzulaufen, die zu einer chronischen Entzündung führt. Eine Theorie postuliert, dass dabei von veränderten Epithelzellen AChR-Epitope exprimiert werden und diese dann T-Helfer-Zellen prägen. Diese Helferzellen induzieren daraufhin die Produktion von spezifischen Autoantikörpern, die mit dem AChR kreuzreagieren können und die Myoidzellen im Thymus attackieren. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe führen zu einer Entzündungsreaktion mit der Ausbildung von Lymphfollikeln (Shiono, Roxanis et al. 2003).

Danach wurden die morphometrischen Unterschiede zwischen Normalthymi und LOMG-Thymi analysiert.

Im Gegensatz zu EOMG und paraneoplastischer MG zeigten die meisten Thymi mit LOMG keine Thymitis. Als Konsequenz wiesen sie weder in der Größe noch in irgendwelchen anderen morphologischen Kennzeichen einen statistisch relevanten Unterschied zu altersentsprechenden Kontrollen auf. In der Vergangenheit wurde im Zusammenhang mit LOMG häufig von "Atrophie", also einer pathologischen Reduktion des Thymusgewebes, gesprochen. Dieser Begriff wurde bereits 1656 von Thomas Wharton in seinem Buch „Adenographia sive Glandularum Totius Corporis Descriptio“ geprägt und beschrieb die Tatsache, dass bei Ochsen, die zu schwersten Arbeiten gezwungen wurden, der Thymus immer kleiner zu werden schien. Zu Beginn unseres Jahrhunderts entdeckten Jolly, Levin, Jackson und Bayd, dass Unterernährung und Krankheiten zu einer Reduktion des Thymusgewebes führten (Historische Übersicht in (Dourov 1986)). Hammar fand 1929 heraus, dass der Thymus von Kleinkindern, die eines plötzlichen Todes, z.B. durch einen Unfall ums Leben kamen, größer war als bei Kindern, die nach einer langen Krankheit

starben. Bald (1938) fanden dann Lebold und Segal heraus, dass Stress im weitesten Sinne zu einer Reduktion des thymischen Gewebes führte. Der Einfluss von Hormonen auf das mediastinale Organ wurde bereits 1945 von Dougherty und White erkannt. Alle diese Beobachtungen sind richtig und nachvollziehbar, jedoch muss die „akute“, z.B. Stress- oder medikamenteninduzierte Thymusinvolution, die in jedem Alter auftreten kann, von der physiologisch ablaufenden Involution abgegrenzt werden. Unsere morphometrischen Analysen belegten, dass der Involutionsgrad des Thymus bei Patienten mit LOMG sich nicht von dem einer gleichaltrigen immunologisch gesunden Person unterscheidet. Der Begriff „Atrophie“ als Bezeichnung eines pathologischen Zustandes ist also in diesem Zusammenhang nicht korrekt. Die historische Nomenklatur stellt sich damit als überholt heraus, und sollte revidiert werden. Weiterhin ergab unsere Analyse im Gegensatz zur EOMG keinen Hinweis auf eine im Thymus ablaufende Immunstimulation, so dass die Rolle des Thymus in der Pathogenese der LOMG derzeit nicht gesichert scheint.

Als nächstes wurden Thymi von Patienten mit sog. „seronegativer“ Myasthenia gravis analysiert und mit Normalthymi verglichen.

Hervorstechend war hierbei die Tatsache, dass es aus morphometrischer Sicht keinerlei Unterschiede zu Normalthymi gab. Lediglich die Anzahl der diffus verstreut liegenden B-Zellen war etwas vermehrt (Leite, Strobel et al. 2005). Die sog. „seronegative“ MG, oder auch MUSK(+) MG ist durch eine deutlich geringere Anzahl von Lymphfollikeln und eine niedrige IgG-Produktion gekennzeichnet (Willcox, Schlupe et al. 1991; Leite 2005; Leite, Strobel et al. 2005). Die Rolle des Thymus in der Pathogenese dieser MG-Form war somit aus diesen Daten nicht klar ersichtlich. Der therapeutische Nutzen einer Thymektomie ist im Gegensatz zur AChR(+) MG bei Fällen mit MUSK-Antikörpern derzeit nicht gesichert. Obwohl MUSK wichtig für die Organisation des AChR an der postsynaptischen Membran zu sein scheint, ist bislang nicht abschließend geklärt, ob MUSK bei der AChR „seronegativen“ MG in der Tat das krankheitsverursachende Autoantigen oder nur ein „Index“-Antigen ohne eigentliche pathogenetische Relevanz darstellt (Shiraishi, Motomura et al. 2005).

Bei Thymompatienten mit und ohne paraneoplastische Myasthenia gravis wurde der dem Tumor anhängende Restthymus mit altersadaptierten Normalthymi verglichen. Es ergab sich eine sehr starke positive Korrelation zwischen dem Auftreten einer paraneoplastischen Myasthenia gravis und dem Nachweis entzündlicher Veränderungen im Restthymus. Die Veränderungen bei paraneoplastischer MG im Restthymus entsprachen somit denen bei AChR-„seropositiver“ EOMG. Auch in dieser Gruppe war die Größe des Thymus nach Abzug des Entzündungsinfiltrates statistisch nicht signifikant von Kontrollthymi zu unterscheiden.

Die vorliegende Beschreibung der morphologischen und morphometrischen Veränderungen in den verschiedenen klinischen Subtypen könnte helfen, die Rolle des Thymus in der Pathogenese der einzelnen Gruppen besser zu verstehen.

In den letzten Jahren ist immer deutlicher geworden, dass es sich bei der MG nicht um eine monokausal bedingte Krankheit handelt. Vielmehr ist sie das Ergebnis des Zusammenwirkens verschiedener autoimmunologischer Prozesse.

Eine weiterhin offene Frage bleibt, ob der Thymus bei der Pathogenese der AChR(+) LOMG und AChR(-) MUSK(+) im Gegensatz zur paraneoplastischen MG und AChR(+) EOMG eine unterschiedliche Rolle spielt, oder ob er bei den beiden letzten Fällen gar nicht der Ort der B-Zell-Aktivierung ist. Unter diesen Gesichtspunkten scheint eine präzise Analyse der Myoid-Zellen im Thymus, von denen angenommen wird, dass sie die Hauptquelle der muskulären Antikörper bei der MG sind, ein viel versprechendes Objekt weiterer Studien zu sein. Alternativ wären hier auch zwei völlig unterschiedliche Pathomechanismen diskutieren: Bruch der „zentralen Toleranz“ im Thymus im Falle der AChR(+) EOMG und paraneoplastischen MG versus Bruch der „peripheren Toleranz“ im Falle der LOMG und AChR(-) MUSK(+) MG.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in

Leite, MI, Ströbel, P, Jones, M, Micklem, K, Moritz, R. et al.:

Fewer Thymic Changes in MuSK Antibody-Positive than in MuSK Antibody-Negative MG; *Ann Neurol* 2005;57:444–448

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 129 Normalthymi, 56 Restthymi, sowie 77 Thymi von Patienten mit nicht-paraneoplastischer Myasthenia gravis (40 EOMG, 11 MUSK (+), 26 LOMG) untersucht.

Zunächst erfolgte eine mikroskopisch-morphologische Auswertung gemäß eines standardisierten Protokolls, wobei vor allem auf Atrophieausmaß, Erhaltungszustand des Kortex, Lymphfollikel, Hassall-Körperchen und Epithelproliferate geachtet wurde.

Danach erfolgte die morphometrische Auswertung des Materials mittels einer computergesteuerten Farbdifferenzanalyse. Erstes Ziel der Arbeit war es, mit dieser Methode eine Standardkurve der normalen Thymusinvolution zu erstellen. Dabei ließ sich feststellen, dass die morphologischen und morphometrischen Ergebnisse innerhalb einer Altersgruppe sehr homogen ausfielen. Auffällig war, dass es innerhalb der ersten fünf Lebensdekaden zu einem dramatischen Verlust von mehr als 90% des Thymusgewebes kam. Im Diagramm zeigte sich eine charakteristische Kurve, die sich asymptotisch dem Null-Wert näherte. Der zweite Teil beschäftigte sich vor allem mit den morphologischen und morphometrischen Merkmalen in pathologisch veränderten Thymi. Dabei ließ sich feststellen, dass es bei entzündlich veränderten Organen (EOMG) zu einer deutlichen Vergrößerung des Anteils von Thymusgewebe am Gesamtgewebe kam. Auch bei entzündlich veränderten Thymi, die mit einer paraneoplastischen MG assoziiert waren, fiel eine Gewebevermehrung auf, wohingegen bei Thymomen ohne Entzündung keine Zunahme zu verzeichnen war. Im Gegensatz dazu konnte man bei Thymi von LOMG-Patienten, die in der Regel als atrophisch beschrieben wurden, keinen signifikanten Unterschied zu Normalthymi gesehen werden. Folglich scheint die in der Literatur in solchen Fällen beschriebene Atrophie des Thymusgewebes nicht zu existieren. Die bisher verwendete Nomenklatur stellte sich somit als überholt heraus und sollte revidiert werden.

Das gleiche Bild zeigte sich bei Patienten mit MUSK (+) MG. Eine Rolle des Thymus in der Pathogenese der LOMG und MUSK(+) war im Gegensatz zur EOMG und paraneoplastischen MG durch unsere Daten nicht eindeutig zu belegen.

6. Abkürzungsverzeichnis

AChR	Acetylcholinrezeptor
AChR (-)	Acetylcholinrezeptor – Antikörper negativ
AChR (+)	Acetylcholinrezeptor – Antikörper positiv
c-AMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DAB	Diaminobenzidin
CD-20	Cluster of Differentiation 20
DOB	date of birth
EOMG	early onset Myasthenia gravis
EOSPMG	early onset seropositive Myasthenia gravis
H.E.	Hämatoxylin – Eosin
IL	Interleukin
INF	Interferon
LFH	lymphofollikuläre Hyperplasie
LOMG	late onset Myasthenia gravis
LOSPMG	late onset seropositive Myasthenia gravis
MG	Myasthenia gravis
MUSK	muskelspezifische Tyrosinkinase
NT	Normalthymus
PBS	Phosphatbuffersaline
SNMG	seronegative Myasthenia gravis
TH-2	T – Helferzellen vom Typ 2

7. Abbildungsverzeichnis

Tab. 1: Patientendaten (MG: Myasthenia gravis; D: Dekade; EOMG: early onset Myasthenia gravis; SNMG: seronegative Myasthenia gravis; MUSK: muskelspezifischer Antikörper; LOMG: late onset Myasthenia gravis)

Abb. 1a: Standardisierter Gewebezuschnitt

Abb. 1b: Protokollformular:

Aufgenommen wurden Fallnummer, Name, Geburtsdatum (DOB), Alter, Geschlecht, Verdachtsdiagnose, endgültige Diagnose, sowie das Vorhandensein einer MG, oder einer anderen Erkrankung.

Ebenso wurde die Größe des vom Obduzenten entnommenen mediastinalen Fettkörpers (Präparatdurchmesser (längs)) und die histologisch festgestellten Maße (Präparatedurchmesser Histo längs / quer) und das resultierende Volumen protokolliert.

Wichtig war auch das Festhalten des subjektiv empfundenen Atrophiegrades (Atrophiegrad (subj)), wobei vier verschiedene Abstufungen der Atrophie definiert wurden (25% Fettgewebe (FG) im Thymusgewebe (TG) = Grad 1; 50% FG im TG = Grad 2, 75% FG im TG = Grad 3, mehr als 90% FG im TG = Grad 4).

Die wichtigsten Werte im Protokoll waren die morphometrisch festgestellte Fläche des Fett-, bzw. Thymusgewebes-

Es wurde aber auch das Ausmaß des erhaltenen Cortex dokumentiert (Cortex erhalten / überwiegend erhalten / herdförmig erhalten / nicht erhalten).

Der Grad der Entzündung wurde im LFH (1-3)-Feld dokumentiert, wobei bei Grad 1 in 1/3 der Thymusläppchen Lymphfollikel vorhanden waren, bei Grad 2 in 2/3 und in Grad 3 in allem Läppchen.

Auch die Hassall-Körperchen (HK) wurden gezählt und in das Hassall (1-3)-Feld eingetragen.

Epithelproliferate wurden als nodulär, oder rosettenförmig beschrieben.

Abb. 1c: Standardaufnahmen zur morphometrischen Analyse des Thymusgewebes:

Es wurde eine Fotoserie durch den größten Durchmesser (Pfeil) des Thymusschnittes gelegt und der Computer war mittels der Farbdifferenzanalyse in der Lage einzelne Farbpunkte voneinander zu unterscheiden und daraus den Anteil des Thymusgewebes am Gesamtgewebe zu berechnen

Abb. 1d: Verstärkung des Kontrastes mittels “image processing”

Abb. 1e: Analyse des Thymusgewebes mittels eines Computerfilters, wobei die hellen Punkte Thymuszellen und die dunklen Areale Fett bzw. Stroma repräsentieren.

Abb. 1f: Unterscheidung von Kortex und Medulla mittels eines speziellen Computerfilters, der dunkler gefärbte Kortexareale (grau), von heller gefärbten Medulla-Arealen weiß) unterscheidet.

Abb. 1g: Identifizierung von Arealen mit B-Zellen im Thymus. Links die CD20 gefärbten, durch Immunperoxidase relativ dunkel dargestellten B-Zellen, rechts das transformierte Bild, wobei B-Zellen als helle Bildpunkte dargestellt sind und die übrigen Thymusanteile grau erscheinen.

Abb. 2a: Vergleich der Schnittebenen des standardisierten Zuschnitts. Der Gehalt an Thymusparenchym ist unabhängig von der Schnittebebe durch den thymushaltigen Teil des mediastinalen Fettgewebes.

Abb. 2b: Physiologische Thymusinvolutions (erstellt anhand von Normalthymi)

Abb. 2c: Verteilung von Cortex und Medulla im Thymusgewebe (einschließlich Fett-, und Bindegewebe) in Abhängigkeit vom Alter.

Abb. 2d: Häufigkeit von Hassall-Körperchen in Abhängigkeit vom Alter

Abb. 2e: Abnahme der Häufigkeit von Hassall-körperchen (Pfeile) mit dem Alter.

Abb. 2f: Anteil der B-Zellen am gesamten Thymusgewebe in Abhängigkeit vom Alter, wobei sich weder eine signifikante Zu-, oder Abnahme der B-Zellen erkennen lässt.

Abb. 3a: Thymus eines Neugeborenen mit deutlicher Dominanz der sich dunkler darstellenden kortikalen Arealen.

Abb. 3b: Thymus eines 11jährigen Mädchens, mit Verringerung der kortikalen Areale, die aber die Medulla noch vollständig umgeben.

Abb. 3c: Thymus einer 20jährigen Frau, bei dem sich der Verlust der kortikalen Areale schon deutlich zeigt. An manchen Stellen wird die Medulla nicht mehr vollständig vom Kortex umgeben (Pfeil).

Abb. 3d Thymus eines 30jährigen Mannes mit geringfügiger Verbreiterung der interlobulären Septen (IS), unterbrochener Kortexstruktur (Pfeil), aber weiterhin weiterhin zahlreich vorhandenen Hassalkörperchen (HK).

Abb. 3e: Thymus eines 39jährigen Mannes mit deutlichem Ersatz des Thymus durch Fettgewebe.

Abb. 3f: Thymus eines 42jährigen Mannes. Das Fettgewebe nimmt nun ca. 95% der Gesamtfläche ein. Der Kortex (K) erscheint schmal und umgibt die Medulla sehr unvollständig. Auffällig sind sog. Epithelproliferationen (EP).

Abb. 3g: Thymus einer 57jährigen Frau mit kleiner Thymuszyste (Pfeil)

Abb. 3h: Thymus eines 62jährigen Mannes mit deutlicher Thymusinvolution. Sichtbar sind Stränge medullären Gewebes und kleine kortikale Areale.

Abb. 3i: Thymus einer 72jährigen Frau mit winzigen (dunklen) Arealen kortikalen Gewebes (K).

Abb. 4a: Thymusgewebe eines 73-jährigen Mannes mit EOMG-MG (Immunhistochemie, CD20). Erkennbar ist eine Vermehrung CD20-positiver B-Zellen, die sich in Lymphfollikeln (LF) organisiert haben. Das Thymusgewebe erscheint in Anbetracht des Alters vermehrt.

Abb. 4b: Vergleich von Normalthymi (NT) mit EOMG-Thymi, wobei eine Vermehrung des Thymusgewebes bei den EOMG-Thymi auffällt.

Abb. 4c: Vergleich von CD20-positiven Zellen bei Normalthymi und EOMG-Thymi ohne signifikante Unterschiede in der Anzahl der B-Zellen.

Abb. 4d: Thymus eines 60jährigen Mannes mit AChR(+) Myasthenia gravis. Histologisch entspricht das Bild dieses Thymus einem Normalbefund mit physiologischer Thymusinvolution.

Abb. 4e: Vergleich von Normalthymi mit LOMG-Thymi, wobei morphometrisch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Vorhandensein von Thymusgewebe festgestellt werden konnte.

Abb. 4f: Thymus einer 27jährigen Frau mit AChR(-)/MUSK(+) Myasthenia gravis, mit altersentsprechendem histologischem Befund ohne besondere pathologische Auffälligkeiten..

Abb. 4g: Vergleich von Normalthymi mit MUSK (+) MG – Thymi

Abb. 4h: Vergleich der Anzahl von CD-20 positiven Zellen in Normalthymi mit SNMG-negativen Thymi, ohne signifikanten Unterschied bis zur 4. Dekade. Ab der 5. Dekade findet man bei SNMG vermehrt CD20 positive Zellen.

Abb. 4i: Vergleich von Normalthymi mit Restthymi von Thymomen, wobei es bei den neoplastisch veränderten Thymi zu einer signifikanten Gewebezunahme kommt

8. Literaturverzeichnis

- Akashi, K., L. I. Richie, et al. (2000). "B lymphopoiesis in the thymus." J Immunol **164**(10): 5221-6.
- Aspinall, R. and D. Andrew (2000). "Immunosenescence: potential causes and strategies for reversal." Biochem Soc Trans **28**(2): 250-4.
- Aspinall, R. and D. Andrew (2000). "Thymic involution in aging." J Clin Immunol **20**(4): 250-6.
- Berzins, S. P., A. P. Uldrich, et al. (2002). "Thymic regeneration: teaching an old immune system new tricks." Trends Mol Med **8**(10): 469-76.
- Blackburn, C. C., N. R. Manley, et al. (2002). "One for all and all for one: thymic epithelial stem cells and regeneration." Trends Immunol **23**(8): 391-5.
- Bodey, B., B. Bodey, Jr., et al. (1997). "Involution of the mammalian thymus, one of the leading regulators of aging." In Vivo **11**(5): 421-40.
- Douek, D. C., R. D. McFarland, et al. (1998). "Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection." Nature **396**(6712): 690-5.
- Dourov, N. (1986). Thymic atrophy and immune deficiency in malnutrition. The human thymus. Histophysiology and Pathology. H. K. Müller-Hermelink. Berlin-Heidelberg, New York, Tokyo, Springer-Verlag. **75**: 127-150.
- Dutton, C. M., W. Joba, et al. (1997). "Thyrotropin receptor expression in adrenal, kidney, and thymus." Thyroid **7**(6): 879-84.
- Ferone, D., P. M. van Hagen, et al. (2000). "Physiological and pathophysiological role of somatostatin receptors in the human thymus." Eur J Endocrinol **143** Suppl 1: S27-34.
- Giron-Gonzalez, J. A., F. J. Moral, et al. (2000). "Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women." Eur J Endocrinol **143**(1): 31-6.
- Goronzy, J. J. and C. M. Weyand (2001). "Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis." Trends Immunol **22**(5): 251-5.
- Hoch, W., J. McConville, et al. (2001). "Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies." Nat Med **7**(3): 365-8.

- Inaba, M., K. Inaba, et al. (1991). "Distinct mechanisms of neonatal tolerance induced by dendritic cells and thymic B cells." J Exp Med **173**(3): 549-59.
- Kimura, M., H. Watanabe, et al. (1994). "Female predominance of extrathymic T cells in mice: statistical analysis." Immunol Lett **39**(3): 259-67.
- Klein, L., M. Klugmann, et al. (2000). "Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells." Nat Med **6**(1): 56-61.
- Laufer, T. M., J. DeKoning, et al. (1996). "Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex." Nature **383**(6595): 81-5.
- Leite, M. I., P. Strobel, et al. (2005). "Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody-negative MG." Ann Neurol **57**(3): 444-8.
- Luciani, F., G. Turchetti, et al. (2001). "A mathematical model for the immunosenescence." Riv Biol **94**(2): 305-18.
- Marx, A., A. Wilisch, et al. (1997). "Pathogenesis of myasthenia gravis." Virchows Arch **430**(5): 355-64.
- Mor, G., A. Munoz, et al. (2001). "The role of the Fas/Fas ligand system in estrogen-induced thymic alteration." Am J Reprod Immunol **46**(4): 298-307.
- Pawelec, G., Y. Barnett, et al. (2002). "T cells and aging, January 2002 update." Front Biosci **7**: d1056-183.
- Pido-Lopez, J., N. Imami, et al. (2001). "Both age and gender affect thymic output: more recent thymic migrants in females than males as they age." Clin Exp Immunol **125**(3): 409-13.
- Redondo, M. J. and G. S. Eisenbarth (2002). "Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders." Diabetologia **45**(5): 605-22.
- Shiono, H., I. Roxanis, et al. (2003). "Scenarios for autoimmunization of T and B cells in myasthenia gravis." Ann N Y Acad Sci **998**: 237-56.
- Shiraishi, H., M. Motomura, et al. (2005). "Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis." Ann Neurol **57**(2): 289-93.
- Steinmann, G. G., B. Klaus, et al. (1985). "The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study." Scand J Immunol **22**(5): 563-75.

- Vincent, A. (2002). "Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis." Nat Rev Immunol **2**(10): 797-804.
- Willcox, N., M. Schlupe, et al. (1991). "The thymus in seronegative myasthenia gravis patients." J Neurol **238**(5): 256-61.
- Ye, P., D. E. Kirschner, et al. (2004). "The thymus during HIV disease: role in pathogenesis and in immune recovery." Curr HIV Res **2**(2): 177-83.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. H.K. Müller-Hermelink, dass er es mir ermöglicht hat diese Promotionsarbeit am Institut für Pathologie an der Universität Würzburg anzufertigen.

Herrn Prof. A. Marx danke ich herzlichst für die Bereitstellung des Projekts, für die Schaffung der Möglichkeit am Institute of Molecular Medicine (IMM) der University of Oxford (UK) die Arbeit im Themenbereich der Myasthenieforschung zu vertiefen und seine ständige Bereitschaft meine Interessen im Bereich der Wissenschaft zu fördern und zu unterstützen,

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ströbel für seine stetige Hilfsbereitschaft, seine wertvollen Ratschläge, seine tatkräftige Unterstützung und besonders dafür, dass er mir durch sein Vorbild die Freude an der Forschung vermittelt hat.

Für die Einführung in die Methode der computergesteuerten Farbdifferenzanalyse möchte ich mich bei Herrn Dr. H. Harms bedanken, der ein zuverlässiger Ansprechpartner für alle technischen Probleme war und stets eine kompetente Lösung bereit hatte.

Bedanken möchte ich mich nicht zuletzt bei meinen Eltern für ihre ständige Unterstützung und für die Möglichkeit Medizin studieren zu dürfen um das zu tun, was ich mir immer gewünscht habe.

Mein Dank gilt insbesondere auch Stephan Rauthe, der mich während meiner Studienzeit und vor allem während der Arbeit an dieser Dissertation begleitet und immer wieder motiviert hat.

Lebenslauf

Name, Vorname: Moritz, Regina
Geburtstag: 31.10.1978
Geburtsort: Freyung
Familienstand: ledig
Eltern: Friedrich Robert Moritz, Maria Theresia Moritz (geb. Hackl)

Ausbildung: - 1985 – 1989: Grund- und Teilhauptschule
Hinterschmiding
- 1989 – 1996: Staatliches Gymnasium Freyung
- 1996 – 1998: St.Gisela Gymnasium / Institut der Englischen
Fräulein Passau Niedernburg

Studium: - 05/99: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
- 03/01: Physikum
- 03/02: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 03/04: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr: - 04/04 – 09/04: Pathologie am Pathologischen Institut der
Universität Würzburg
- 09/04 – 11/04: Innere Medizin im Juliusspital/Würzburg
- 11/04 – 03/05: Chirurgie im Zentrum für operative Medizin
Würzburg

Auslandsaufenthalt: - 07/03 – 09/03: Forschungsaufenthalt an der University of
Oxford (Institute of Molecular
Medicine)

