

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im  
Dr. von Haunerschen Kinderspital  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein



**Qualitativer und Quantitativer Ultraschall der Muskulatur - ein  
Parameter zur Verlaufsbeurteilung bei der Muskeldystrophie  
Duchenne**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Mehdi Sehri  
aus  
Kiel  
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Müller-Felber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dirk-André Clevert

PD Dr. med. Peter Reilich M.A.

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin:

PD Dr. med. Katharina Vill

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 01.2022

meinen Eltern

## **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die vorliegende Dissertation wurde im Dr. von Haunerschen Kinderspital im Zentrum für neuromuskuläre Erkrankungen unter Betreuung von PD Dr. Katharina Vill durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch PD Dr. Katharina Vill. Die sonographischen Untersuchungen wurden von drei erfahrenen Ärzten mit Schwerpunkt auf neuromuskulären Erkrankungen durchgeführt. Sämtliche Datenerhebungen wurden eigenständig durchgeführt. Diese Daten umfassen mehr als 900 sonographische Untersuchungsbefunde. Die computergestützte Datenerhebung erfolgte nach initialer Schulung durch PD Dr. Vill eigenständig. Die statistischen Auswertungen dieser erhobenen Daten wurden von mir selbstständig durchgeführt und interpretiert. Ferner wurden die aus den statistischen Analysen hervorgehenden Graphiken, Abbildungen, Tabellen und Schlussfolgerungen eigenständig von mir erstellt. Teile dieser Dissertation wurden im Rahmen einer Publikation veröffentlicht (siehe Vill, et al. (2020) [133]).

# Inhaltsverzeichnis

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift .....	4
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1 Klinisches Krankheitsbild.....	7
1.2 Pathophysiologische Grundlagen der Erkrankung .....	8
1.3 Diagnosestellung.....	12
1.4 Behandlung .....	12
1.4.1 Standard of Care .....	12
1.4.2 Pharmakotherapie .....	15
1.5 Parameter zur Verlaufsbeurteilung.....	18
1.5.1 Klinische Funktionsuntersuchungen .....	18
1.5.2 Bildgebende Verfahren .....	20
<b>2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>3 Patienten und Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.1 Patientenkohorte .....	24
3.2 Muskelultraschall.....	27
3.3 Statistische Auswertung.....	29
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
4.1 Messung der Echogenität .....	30
4.2 Altersbezogene Zunahme der Muskelechogenität .....	34
4.3 Statistischer Vergleich von Patienten und Kontrollen .....	39
4.4 Exemplarische Darstellung von Muskelultraschallbefunden .....	41
4.5 Alter bei ersten Veränderungen im Muskelultraschall und Vergleich zum motorischen Plateau .....	47
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>48</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>52</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>62</b>
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	62
8.2 Danksagung.....	63
8.3 Eidesstaatliche Versicherung nach §2 Abs. Nr. 6 und 7 PromO .....	64

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Dystrophin-Gens .....	8
Abbildung 2 Komponenten des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes (DAPC) .....	10
Abbildung 3 Ausschnitt eines physiologischen und pathologisch veränderten Muskels.....	11
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Entstehung eines Ultraschallbildes. ....	22
Abbildung 5 Auswertung der computergestützten Analyse via ImageJ.....	32
Abbildung 6 Auswertung des visuellen Ratings via modifizierter Heckmatt-Skala.. .....	33
Abbildung 7 Altersbezogene Darstellung der Echogenität aller Muskelgruppen der untersuchten Patienten via quantitativer Graustufenanalyse (GSL). ....	35
Abbildung 8 Altersbezogene Darstellung der Echogenität aller Muskelgruppen der untersuchten Kontrollkohorte via quantitativer Graustufenanalyse (GSL). ....	36
Abbildung 9 Qualitative Bewertung der Muskelechogenität der Patientenkohorte im verblindeten visuellen Rating via modifizierter Heckmatt-Skala.. .....	37
Abbildung 10 Qualitative, verblindete Bewertung der Muskelechogenität via visuellem Rating der Kontrollkohorte mittels modifizierter Heckmatt-Skala.. .....	38
Abbildung 11 Graphische Gegenüberstellung der Normalverteilungen.....	40
Abbildung 12 Exemplarische Darstellung einer Ultraschalluntersuchung eines Patienten. ...	41
Abbildung 13 Exemplarische Darstellung einer Ultraschalluntersuchung einer gesunden Kontrolle. ....	42
Abbildung 14 Sonographische Verlaufsuntersuchungen .....	44

# 1 Einleitung

Die Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) ist eine x-chromosomal vererbte Erkrankung, die progressiven Muskelschwund und -schwäche verursacht. Die Krankheit betrifft in etwa eines von 3500 männlichen Neugeborenen. Mutationen im Dystrophin-Gen führen zu einem wesentlichen Funktionsverlust des Dystrophin-Proteins in den Muskelzellen [1, 2] und damit zu einer fortschreitenden Schwäche von Skelett-, Atem- und Herzmuskulatur.

Zu Beginn der neunziger Jahre lag die durchschnittliche Lebenserwartung der DMD Patienten bei knapp 20 Jahren [3, 4]. In den letzten zwei Jahrzehnten haben sich Behandlung und Management so weit verändert, dass die Patienten unter antikongestiver Therapie der Kardiomyopathie und mit Atemhilfe ein durchschnittliches Lebensalter von 30 – 40 Jahren erreichen [3-5].

## 1.1 Klinisches Krankheitsbild

In der Regel fallen die Jungen klinisch im Kindergartenalter mit einer motorischen Entwicklungsverzögerung auf. Initial stehen Schwierigkeiten beim Treppensteigen sowie gehäufte Stürze im Vordergrund. Die betroffenen entwickeln häufig eine Pseudohypertrophie der Waden. Zum klinischen Erscheinungsbild gehören im Weiteren ein watschelnder Gang und Schwierigkeiten beim Aufstehen (positives Gowers Zeichen); die Patienten stützen sich dabei beim Aufstehen mit den Armen auf den Oberschenkeln ab. Die betroffenen Jungen machen bis zum Alter von etwa 6 Jahren noch motorische Fortschritte (wenn auch in geringerem Maße als ihre Altersgenossen); danach kommt es zu einer Plateauphase und schließlich zur Abnahme der motorischen Fähigkeiten [6].

Die zunächst beinbetonte proximale Schwäche im Alter von 8 bis 12 Jahren zum Verlust der Gehfähigkeit. Im weiteren Verlauf kommt es dann auch zur Abnahme der Kraft der oberen Extremität [7-9].

Eine fortschreitende Kardiomyopathie, häufig mit Arrhythmien als Komplikation, manifestiert sich im zweiten Lebensjahrzehnt und betrifft im Alter von 14 Jahren bereits ein Drittel der Patienten [10].

Hinsichtlich der Lungenfunktion steigt die Vitalkapazität wachstumsbedingt bis zum 12. Lebensjahr an und sinkt dann durch die zunehmende Schwäche der Atemhilfsmuskulatur um

ca. 4-8% pro Jahr ab [11, 12]. Im zweiten Lebensjahrzehnt wird die zunächst meist nächtliche Hypopnoe üblicherweise behandlungsbedürftig [13, 14]. Zudem kann es zu einer obstruktiven Schlafapnoe kommen und es besteht häufig eine Makroglossie [15].

Neben der Beteiligung der Muskulatur hat ein relevanter Anteil der DMD Patienten kognitive Einschränkungen. Patienten mit DMD weisen einen durchschnittlichen Intelligenzquotienten von 85 auf, dieser liegt eine Standardabweichung unter der Norm. Der Verbal-IQ ist dabei stärker beeinträchtigt als der Leistungs-IQ [16]. Jungen mit DMD haben auch eine höhere Inzidenz an Aufmerksamkeits- und Hyperaktivitäts-, und Autismus-Spektrum-Störungen [17].

## 1.2 Pathophysiologische Grundlagen der Erkrankung

Das Dystrophin-Gen ist das größte im Menschen beschriebene Gen. Es umfasst 2,4 MB, was etwa 0,1% des gesamten menschlichen Genoms beziehungsweise etwa 1,5% des gesamten x-Chromosoms entspricht. 99% des Dystrophin-Gens bestehen aus Introns, während die kodierende Sequenz 79 Exons umfasst.

Dystrophin ist ein großes, stabförmiges Protein mit einem Molekulargewicht von 427 kDa [18]. Die aminoterminal Domäne (N) hat Verwandtschaft mit  $\alpha$ -Actinin und enthält je nach Isoform zwischen 232 und 240 Aminosäurereste. Die zentrale Rod-Domäne ist eine Abfolge von 24 helikalen Windungen vom Spektrin-Typ (R1-R24) und vier Scharnierregionen (H1-H4). Darauf folgt eine Cysteinreiche-Domäne (CR), gefolgt von einer letzten, carboxyterminalen Domäne (C) [18-20].

Gesamtlänge des Dystrophin-Gens (Hoffman et al (1987))



**Abbildung 1** Schematische Darstellung des Dystrophin-Gens, erstmals beschrieben von Hoffman et al (1987) [21].

Im gesunden Muskel ist das Dystrophin-Protein auf der intrazellulären Oberfläche des Sarkolemmas entlang der gesamten Länge der Muskelfasern lokalisiert [22] und liegt in Verbindung mit einem Glykoprotein-Komplex (Dystrophin-assoziiierter Glykoprotein-Komplex (DAPC)) vor.

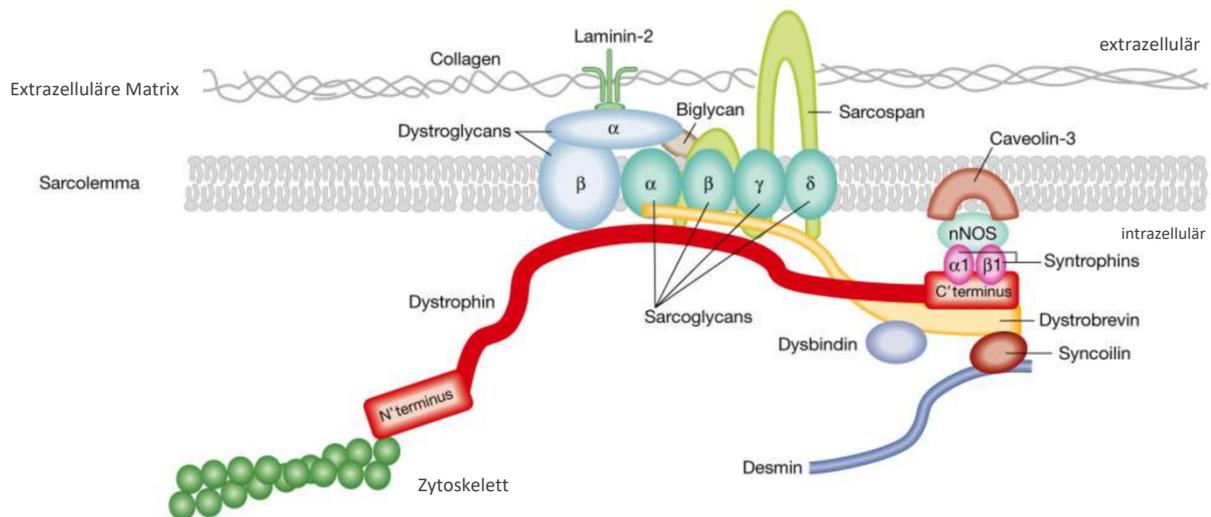
Die wesentliche Funktion des Dystrophins im Muskel ist die Stabilisierung der Fasern bei Kontraktionen durch Bindung an F-Actin mit seiner N-terminalen Domäne und an  $\beta$ -Dystroglykan mit der C-terminalen Domäne. Auf diese Weise fungiert Dystrophin als Brücken- und Ankerprotein [23, 24].

Obwohl das verantwortliche Gen und sein Produkt Dystrophin seit mehr als 20 Jahren charakterisiert sind, ist der Pathomechanismus zwischen fehlendem Dystrophin und Muskeldegeneration noch nicht vollständig verstanden.

Mutationen im Dystrophin-Gen führen zu einem verkürzten, instabilen und nicht-funktionsfähigen Dystrophin-Protein mit entsprechend niedrigerem Molekulargewicht. Größere out-of-frame Deletionen machen bei der DMD ca. 65-70% aller Mutationen aus. Diese liegen am häufigsten in einer "Hotspot"-Region, die die Exons 45-53 umfasst. Duplikationen, Nonsense-Mutationen oder kleine Deletionen/Insertionen, die zu einer Verschiebung des Leserahmens führen, machen den restlichen Anteil aus [25]. In-frame Deletionen, die keine Verschiebung des Leserasters aufweisen, führen zu der phänotypisch milderen Muskeldystrophie vom Typ Becker-Kiener (BMD) [26]. Bei der BMD bleibt im Gegensatz zur DMD das Leseraster unverändert und die Genverluste beschränken sich auf nicht-essentielle Bereiche in der Rod-Domäne. Patienten mit BMD weisen durch das teilweise funktionelle Dystrophin weniger schwere Symptome auf.

Die aus dem Dystrophin-Gen transkribierte messenger-RNA wird überwiegend im Skelett- und Herzmuskel exprimiert [27]. Interessanterweise werden Spleißvarianten von Dystrophin auch im Gehirn, der Netzhaut und den Schwann-Zellen exprimiert [28, 29]. Die veränderte Dystrophin-Expression in diesen Neuronen könnte die häufig beobachteten kognitiven Beeinträchtigungen bei Patienten mit DMD erklären.

Der Dystrophin-assoziierte Glykoprotein-Komplex ist mit der Plasmamembran des Herz- und Skelettmuskels (Sarkolemm) assoziiert. Dessen Hauptaufgabe am Sarkolemm besteht darin, mit integralen Membranproteinen (Sarkoglykan, Dystroglykanen, Syntrophin, Dystrobrevin-Komplexen) zu interagieren, die im DAPC eingebettet sind. Dieser fungiert als mechanische Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett [30, 31]. Dabei stabilisiert es vor allem die Plasmamembran und schützt die Muskelfasern vor kontraktionsbedingten Schäden.

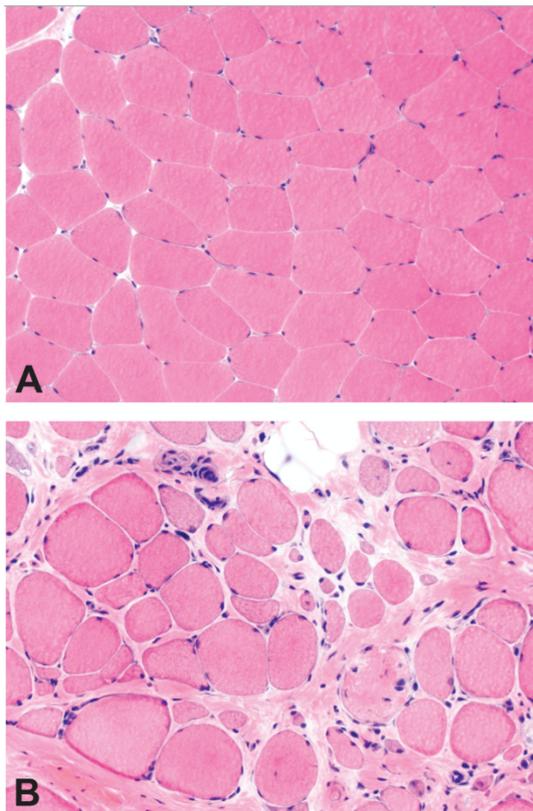


**Abbildung 2** zeigt die Komponenten des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes (DAPC) am Sarkolemm des Skelettmuskels. Der Dystrophin-assoziierte Proteinkomplex im Muskel verbindet das innere Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix (angepasst, aus Nowak et al., 2004) [32].

Der DAPC wirkt entsprechend als mechanischer Koppler, um die im Sarkomer erzeugten kontraktile Kräfte seitlich durch das Sarkolemm auf die Basallamina zu verteilen und so eine gleichmäßige Sarkomerlänge entlang der Muskelfaser beizubehalten [33]. Das Fehlen von Dystrophin führt zum vollständigen Verlust des DAPC und zum Zerfall dieses costameren Gerüsts, was vermutlich die Membranfragilität erklärt [34, 35].

Zusätzliche Umwelt- und Entwicklungsfaktoren scheinen die Instabilität der Membran nach dem Verlust des DAPCs zu erhöhen, was eine gewisse klinische Variabilität im individuellen Verlauf der Erkrankung erklären könnte. Aufgrund der Größe und der erhöhten Belastung scheinen proximale Muskelgruppen zuerst betroffen [36]. Die Muskelfasern werden durch exzentrische Kontraktionen stark beansprucht und es werden Mikroläsionen provoziert, die schließlich zum Verlust der Kalziumhomöostase und zum Zelltod führen.

Die Muskelbiopsie zeigt bei Patienten mit Duchenne-Muskeldystrophie charakteristischerweise nekrotische oder degenerierende Muskelfasern, die häufig in Gruppen vorliegen. Diese nekrotischen Fasern sind von Makrophagen und CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten umgeben. Kleine, unausgereifte Fasern mit zentralen Nuklei spiegeln die Muskelregeneration aus den Myoblasten wider. Diese regenerativen Prozesse sind in der Frühphase der Erkrankung zu beobachten [37, 38]. Später scheint die Regenerationsfähigkeit der Muskeln erschöpft zu sein und die Muskelfasern werden allmählich durch Binde- und Fettgewebe ersetzt (Abbildung 3).



**Abbildung 3** (A) zeigt einen Ausschnitt aus einem physiologischen Muskel. Der Muskel eines DMD Patienten (B) zeigt eine erhöhte Variabilität der Muskelfasergrößen (Atrophie und Hypertrophie) mit erkennbaren Nekrosen und Verfettung (Blake et al.,2002) [39].

## 1.3 Diagnosestellung

Wie bereits weiter oben erwähnt, wird die Verdachtsdiagnose zumeist im Kindergartenalter durch klinische Anzeichen einer proximalen Schwäche gestellt [40, 41]. Erhöhte Serumenzyme wie Transaminasen, Laktatdehydrogenase oder Kreatinkinase können bereits früher im Sinne einer Zufallsdiagnose richtungsweisend sein.

Die Bestätigung der Diagnose erfolgt molekulargenetisch; die früher eingesetzte Muskelbiopsie entspricht nicht mehr dem Goldstandard und sollte nur noch durchgeführt werden, wenn trotz persistierendem Verdacht keine Mutation festgestellt werden kann. Eine vollständige Charakterisierung der Mutation (Deletionsendpunkte oder genaue Position einer beliebigen Punktmutation) ist erforderlich, um eine Korrelation der vorhergesagten Wirkung der Mutation auf das Leseraster des Gens zu ermöglichen, da Letzteres die Hauptdeterminante der phänotypischen Ausprägung der Dystrophinopathie darstellt [42-44].

## 1.4 Behandlung

### 1.4.1 Standard of Care

Die Behandlung von Jungen mit DMD erfolgt multidisziplinär und adressiert die Antizipation, Früherkennung und Behandlung der respiratorischen, kardialen, orthopädischen, ernährungs- und allgemeinmedizinischen Komplikationen sowie die medikamentöse Therapie mit Kortikosteroiden und die genetische Beratung. Die Fortschritte im symptomatischen Behandlungsmanagement haben in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten zu einer deutlichen Verbesserung der Überlebenschancen und der Lebensqualität geführt [4, 45-47]. Internationale Standards über den Umgang mit Patienten mit DMD sind seit 2010 verfügbar [3, 48].

#### *Atemmanagement*

Die Beurteilung der Atmung sollte grundsätzlich jährlich und bei nicht-gehfähigen Jungen halbjährlich erfolgen. Neben der Beurteilung von klinischen Hinweisen auf nächtliche Hypopnoe sollten Pulsoximetrie- oder Schlafstudien zur Objektivierung ab dem Jugendlichenalter in Betracht gezogen werden.

Akute Atemwegsinfektionen erfordern eine frühzeitige Behandlung mit Antibiotika, Atemtherapie und gegebenenfalls auch eine passagere Beatmung. Die (zunächst nächtliche) nicht-invasive intermittierende Überdruckbeatmung ist die Behandlung der Wahl bei Symptomen einer Hypoventilation und/oder Hyperkapnie. Die Lebenserwartung ist bei Patienten, die mittels NIV beatmet werden, signifikant angestiegen [4, 45-47].

### *Herz-Kreislauf-Management*

In früheren Leitlinien wurde ab Diagnosestellung bis zum Alter von 10 Jahren alle zwei Jahre und danach jährlich ein Elektrokardiogramm und ein Echokardiogramm empfohlen. Aufgrund der zunehmenden Erkenntnis, dass unerwünschte myokardiale Veränderungen vor einer kardialen Dysfunktion und in einem jüngeren Alter als bisher angenommen auftreten, wird in den aktuellen Leitlinien empfohlen, jährliche kardiologische Untersuchungen bereits bei Diagnosestellung im ersten Lebensjahrzehnt zu beginnen [49]. Zur initialen Therapie der Kardiomyopathie werden beispielsweise ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptor-Antagonisten eingesetzt. Neuere Studien geben Hinweise darauf, dass die Kombinationstherapie aus Mineralokortikoid-Rezeptorantagonisten und ACE-Hemmern gegenüber der alleinigen Therapie mit einem ACE-Hemmer Vorteile haben könnte [50, 51]. Betablocker können bereits initial zur antikongestiven Therapie oder bei erhöhter Herzfrequenz eingesetzt werden (häufiges Zeichen einer beginnenden Kardiomyopathie) oder bei anhaltender ventrikulärer Dysfunktion die Therapie erweitern. Weitere Medikamente wie Diuretika oder Herzglykoside stellen Möglichkeiten der erweiterten Herzinsuffizienztherapie dar [52]. Ab dem Jugendlichenalter müssen zur Erkennung von Rhythmusanomalien regelmäßig Langzeit-EKGs durchgeführt werden. Bei Patienten, die mit Kortikosteroiden therapiert werden, muss eine regelmäßige Überwachung des Blutdrucks erfolgen [48].

### *Orthopädisches Management*

Die Aufrechterhaltung der Gehfähigkeit stellt im ersten Lebensjahrzehnt den Schwerpunkt der Behandlung eines Kindes mit DMD dar. Frühe Kontrakturen stellen eine häufige Komplikation dar. Konservativ werden passive und aktive Dehnung, insbesondere der Wadenmuskulatur, des Tractus iliotibialis und der Hüftbeuger, eingesetzt, um die Entwicklung oder das Fortschreiten von Kontrakturen zu verhindern. Der Einsatz von Nachtschienen kann erwogen werden, dennoch entwickeln sich häufig noch während erhaltener Gehfähigkeit Kontrakturen und in einigen Fällen wird eine kontrakturlösende Operation notwendig, um die Stabilität und Funktion zu erhalten.

Wenn die Patienten rollstuhlpflichtig werden, ist eine fortschreitende Skoliose häufig. Es müssen daher in 6-monatigen Abständen klinische, und je nach Befund gegebenenfalls radiologische, Kontrollen der Wirbelsäule erfolgen. Die operative Aufrichtung der Wirbelsäule wird ab einem Cobb-Winkel von mehr als 20-25 Grad in Betracht gezogen [48]. Zu den Vorteilen der Skoliose-Operation gehören die Prävention weiterer Deformitäten, insbesondere der Erhalt der Sitzfähigkeit im Rollstuhl. Zudem birgt die fortschreitende Skoliose das hohe Risiko einer zusätzlichen Einschränkung von Herz- und Lungenfunktion. Sekundär leiden die Patienten nach Spondylodese seltener an pathologischen Wirbelkörperfrakturen [53].

Der Erhalt der Knochenmineralisation ist wichtig, um Frakturen zu vermeiden. Die Messung von Kalzium, Phosphat, alkalischer Phosphatase, dem Vitamin-D-Spiegel und der Knochendichte sind daher Teil des Standard of Care. Die Nahrungsergänzung mit Vitamin D und gegebenenfalls auch Kalzium stellt, insbesondere bei Patienten, die Steroide erhalten, die Basisversorgung dar. Einige Patienten benötigen zusätzlich eine Bisphosphonattherapie [48].

## 1.4.2 Pharmakotherapie

Derzeit sind Kortikosteroide die einzigen pharmakologischen Wirkstoffe mit klar dokumentiertem Langzeitnutzen im Sinne einer Verlängerung der Gehfähigkeit [54, 55], auch wenn sie erhebliche Nebenwirkungen verursachen (am häufigsten Gewichtszunahme, Osteoporose, Verhaltensauffälligkeiten, je nach Therapieschema Cushing-Syndrom, Kleinwuchs u.a.) [29,30].

Kortikosteroide werden seit 1974 eingesetzt [23] und es wurde in mehreren Studien versucht, die optimale Dosis, den Zeitpunkt des Behandlungsbeginns und das Einnahmeregime zu definieren [24,25,26,27,28]. Die beiden Wirkstoffe, die hauptsächlich in der DMD-Behandlung verwendet werden, sind Prednison/Prednisolon und Deflazacort, ein Oxazolinderivat von Prednisolon. Für diese Wirkstoffe existieren zwei unterschiedliche Therapieschemata: tägliche Dosierung und intermittierende Dosierung. Üblicherweise werden entweder Prednisolon 0,75 mg/kg Körpergewicht/Tag, Deflazacort 0,9 mg/kg Körpergewicht/Tag oder Prednisolon 0,75 mg/kg Körpergewicht/Tag in einem 10 Tage on/10 Tage off Schema eingesetzt [31]. Prednisolon und Deflazacort zeigten sich in Kurzzeitstudien (sechs Monate bis zwei Jahre) gleichermaßen wirksam, verbesserten die Muskelkraft und -funktion und zeigten Nebenwirkungen, die klinisch als nicht-schwerwiegend angesehen wurden [56-59]. Darüber hinaus wurden in nicht-randomisierten Studien signifikant positive Effekte auf die Gehfähigkeit und Herzfunktion, ein verzögerter Beginn einer Skoliose sowie eine allgemeine Verbesserung der Lebensqualität nach mehr als zwei Jahren Behandlung mit Prednison oder Deflazacort beobachtet [54, 60-63].

Es gibt keine hinreichenden Daten zum optimalen Alter für den Beginn der Behandlung mit Kortikosteroiden oder der Dauer der Behandlung. Aktuell wird empfohlen, die Therapie spätestens zu dem Zeitpunkt zu beginnen, an dem die motorische Entwicklung des Patienten ein Plateau erreicht (normalerweise im Alter von 4-6 Jahren) beziehungsweise sich zu verschlechtern beginnt [49]. Die aktuellen Richtlinien sind zum Teil aus einem empirischen Konsens entstanden und es gibt noch vieles, was hinsichtlich der optimalen Dosis und der Langzeitwirkung der Glukokortikoidtherapie unklar ist [3, 64].

Einige Zentren beginnen die Behandlung mit Kortikosteroiden bereits, wenn klinische Symptome auftreten. Viele Zentren setzen die Kortikosteroidbehandlung nach Verlust der

Gehfähigkeit empirisch fort, mit dem Ziel, das Skolioserisiko und das Fortschreiten der kardiopulmonalen Beteiligung zu verzögern [3].

Die sorgfältige Überwachung und Behandlung von kortikosteroidbedingten Nebenwirkungen ist unerlässlich. Gewichtszunahme, Cushing-Symptome und Kleinwuchs treten bei den meisten nach durchgehendem Schema behandelten Jungen auf. Bei schwerwiegender Gewichtszunahme und Verhaltensauffälligkeiten kann eventuell ein Präparatwechsel von Vorteil sein [3, 61].

Das Auftreten einer Osteoporose mit dem Risiko für pathologische Frakturen ist bei Patienten mit Kortikosteroidehandlung sehr häufig [54].

#### *Stop-Codon-Readthrough (Translarna™, Wirkstoff: Ataluren)*

Kortikosteroide und optimierte klinische Therapieansätze haben in den letzten Jahrzehnten das Outcome bei Patienten mit DMD verbessert [42, 65], zielen jedoch nicht spezifisch auf den Dystrophinmangel ab [66-68]. Einen neuen Ansatz zur Behandlung genetischer Störungen auf Basis von Nonsense-Mutationen, die bei ca. 10-15% der DMD-Patienten ursächlich sind [69], stellt das Medikament Ataluren (Translarna®) dar. Eine Nonsense-Mutation führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon in der codierenden Region der entsprechenden mRNA und führt so zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und Entstehung eines verkürzten, instabilen, nicht-funktionalen Proteins. Der sogenannte „Readthrough“-Mechanismus des Wirkstoffes Ataluren zielt darauf ab, die zugrunde liegende Mutation gezielt auszuschalten [66]. Ataluren soll eine Überbrückung dieses vorzeitigen Stopp-Codons bewirken, um so ein vollwertiges, funktionsfähiges Protein zu translatieren.

In mehreren Studien konnte eine gewisse Wirksamkeit von Ataluren belegt werden. In einer 48-wöchigen multizentrischen, internationalen, doppelblinden, placebokontrollierten Studie mit 174 DMD-Patienten konnte in der mit Ataluren behandelten Kohorte in einer Subgruppe von Patienten mit mäßiger Einschränkung eine Verzögerung der Erkrankungsprogression festgestellt werden. Nach einem Behandlungsjahr war bei diesen Patienten im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Patienten eine längere Gehstrecke innerhalb von sechs Minuten messbar [70]. Seit Juli 2018 ist das Medikament in Europa zugelassen und kann Patienten mit Nonsense-Mutation im Dystrophin-Gen, die noch gehfähig und älter als 2 Jahre sind, verabreicht werden.

### *Exon-Skipping durch Antisense-Oligonukleotide (Wirkstoff: Eteplirsen)*

Out-of-frame Deletionen im Dystrophin-Gen führen zur Entstehung eines verkürzten, nicht-funktionellen Proteins. Ein pharmakotherapeutischer Ansatz mittels Antisense-Oligonukleotiden soll das Überspringen von Exons auf der Pre-mRNA-Ebene induzieren, um den Dystrophin-Leserahmen wiederherzustellen. Das Skippen der Exons, die an den Abschnitt der Deletionen angrenzen, führt zur Entstehung eines teilweise funktionellen, wenn auch verkürzten, Proteins [71]. Dieses semifunktionelle Dystrophin soll mit einem besseren klinischen Outcome verbunden sein als das absolute Fehlen von Dystrophin wie bei der Becker-Kiener Dystrophinopathie.

Etwa 14% der Patienten mit DMD haben Mutationen, die therapeutisch durch Überspringen des Exons 51 adressierbar sind [72]. Im September 2016 genehmigte die FDA die Zulassung des Medikaments Eteplirsen, einem Phosphorodiamidat-Morpholinoligomer, welches das Skipping des Exons 51 ermöglicht [73]. Es konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass Eteplirsen eine dosisabhängige Wirkung auf die Dystrophin-Expression hat [74] und dass mit Eteplirsen behandelte Patienten im Vergleich zur Placebogruppe durchschnittlich eine längere Gehstrecke zurücklegen konnten [75]. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Kopfschmerzen und Proteinurie. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Eteplirsen gut verträglich ist und das Fortschreiten der DMD verlangsamt.

### *Gentherapie (Virale Vektoren)*

Der synthetische Ersatz des defekten DMD-Gens, mithilfe von Trägervehikeln wie rekombinanten adeno-assoziierten-Viren (rAAV), ist ein weiterer gentherapeutischer Ansatz. Das rAAV ist ein kleines, nicht pathogenes Parvovirus, welches ein 4,7 kb einzelsträngiges DNA-Genom enthält. Bei der Erzeugung von rAAV-Vektoren werden die viralen, pathogenen Bestandteile entfernt und durch ein therapeutisches Gen ersetzt.

Allerdings ist das Dystrophin-Gen zu groß, um es in einen rAAV einzufügen. Aus diesem Grund wird aktuell versucht, eine verkleinerte Dystrophin-Version (ein sogenanntes Mikrodystrophin) zu entwickeln; mit dem Ziel, ein, wenn auch nur verkürztes, Dystrophin-Protein zu generieren, welches nur die wichtigsten funktionellen Domänen enthält [76]. Klinisch soll die DMD somit in einen mildereren BMD-Phänotyp verwandelt werden [77, 78].

Der Einsatz von Gentherapie mittels rAAV-basierten Vektoren befindet sich momentan in der klinischen Studienphase; finale Ergebnisse zu Effektivität und Sicherheit am Menschen sind noch nicht verfügbar [79] [80-83].

## 1.5 Parameter zur Verlaufsbeurteilung

### 1.5.1 Klinische Funktionsuntersuchungen

Der 6-Minuten-Gehtest (6MWT) stellt den am häufigsten eingesetzten klinischen Parameter zur Beurteilung der körperlichen Funktionsfähigkeit bei Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen dar. Er wurde initial für Patienten mit verschiedenen kardiopulmonalen und metabolischen Erkrankungen entwickelt [84-86] und wird bei DMD Patienten in vereinfachter Form ohne die Messung von Blut- und Atemgasen eingesetzt.

Der Test misst die Entfernung, die ein Patient in einem Zeitraum von 6 Minuten auf einer ebenen, harten Oberfläche gehen kann. Der 6MWT bewertet das submaximale Niveau der Leistungsfähigkeit des kardiovaskulären und motorischen Systems. Die meisten Patienten erreichen während des 6MWT keine maximale Belastung, sondern wählen ihre eigene Trainingsintensität und dürfen während des Tests Pausen machen und ruhen. Somit soll der 6MWT den funktionellen Belastungsgrad für tägliche körperliche Aktivitäten widerspiegeln [87].

Normwerte für den 6MWT bei gesunden Kindern sind verfügbar [88]. 2010 veröffentlichte eine Arbeitsgruppe zudem altersbezogene Werte für DMD Patienten anhand einer großen Kohorte [89]. Im Alter von <7 Jahren konnte im Allgemeinen eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr gezeigt werden, während Patienten im Alter von >7 Jahren einen Rückgang der Gehstrecke zeigten [90].

Weitere klinische Tests zur Beurteilung der körperlichen Funktionsfähigkeit sind verschiedene Zeitfunktionstestungen (Timed Function Test (TFT)). Es werden am häufigsten die folgenden Parameter gemessen:

- Die Zeit, die der Patient benötigt, um aus einer liegenden Position aufzustehen.
- Die Zeit, die der Patient benötigt, um auf einer Treppe 4 Stufen so schnell wie möglich hinaufzusteigen.

- Die Zeit, die der Patient benötigt, um eine Strecke von 10 Metern so schnell wie möglich zurückzulegen.

Der TFT und 6MWT bieten die Möglichkeit, die motorische Funktionsfähigkeit bei noch gehfähigen Patienten sowohl zu Beginn des Auftretens von klinischen Symptomen als auch im Verlauf zu messen. Insgesamt sind die klinischen Tests sehr gut reproduzierbar und einfach zu handhaben [91, 92].

#### *North Star Ambulatory Assessment (NSAA)*

Das North Star Ambulatory Assessment (NSAA) stellt eine validierte und funktionelle Bewertungsskala dar, die speziell zur Messung der Gehfähigkeit beziehungsweise motorischen Leistungsfähigkeit bei Jungen mit DMD entwickelt wurde [93-95]. Die NSAA-Skala besteht aus 17 Items und wurde entwickelt, um Veränderungen der motorischen Fähigkeit (beispielsweise die Fähigkeit, sich vom Boden aufzurichten, sich vom Sitzen ins Stehen zu bewegen, zu springen, zu rennen und Treppen auf- und abzustiegen) zu erfassen und zu bewerten [93, 96]. Der Bewertungsmaßstab umfasst Werte von 0-34 (0-100 für die linearisierte Version [97]), wobei höhere Punktzahlen eine bessere Motorik indizieren. Jedes Item wird mit 0 bis 2 bewertet (0 = nicht in der Lage, unabhängig zu agieren, 1 = in der Lage, mit Unterstützung zu agieren, 2 = normal, in der Lage, ohne Unterstützung zu agieren). Das NSAA hat sich in einem multizentrischen Umfeld als zuverlässig erwiesen [94] und zeigt klinische Validität. Die Gesamtpunktzahl hat, insbesondere mit den Komponenten der körperlichen Funktion, ebenfalls eine signifikante Korrelation mit der Lebensqualität gezeigt [98].

Ricotti et. al konnten zeigen, dass der NSAA-Score ab einem Alter von 7 Jahren auf der linearisierten Skala (0-100) im Durchschnitt um ca 8 Punkte/Jahr abnimmt [99]. Es wird jedoch eine große klinische Variabilität unter Patienten mit DMD beobachtet. Daher gibt es multiple Studien, die den Einfluss von Faktoren analysieren, die zu dieser Variabilität beitragen könnten, darunter verschiedene Glukokortikoid-Schemata und patientenspezifische DMD-Genotypen [100-102].

## 1.5.2 Bildgebende Verfahren

### *MRT*

Neben der physikalischen Verlaufstestung finden in der Verlaufsbeurteilung der DMD auch bildgebende Verfahren Anwendung. Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist eine gut etablierte und validierte, nicht-invasive Methode zur Beurteilung der selektiven Muskelbeteiligung bei neuromuskulären Erkrankungen. In der klinischen Praxis (meist mit einem qualitativen Ansatz) hat sie als Methode zur Unterstützung der Diagnose von erblichen und metabolischen Myopathien zunehmend Verwendung gefunden [103-105].

Im Vergleich zum Ultraschall ist die MRT nicht vom behandelnden Arzt abhängig und verwendet im Gegensatz zur Computertomographie keine ionisierende Strahlung. Darüber hinaus kann die MRT, mittels T1-gewichteter Sequenzen, fettreiche Gewebe beziehungsweise den Umbau in Fettgewebe darstellen. Durch STIR (Short Tau Inversion Recovery) oder T2-gewichteter Sequenzen, wodurch Muskelödeme aufzeigt werden können (wie beispielsweise bei entzündlichen Myopathien), bietet die MRT im Vergleich zum Ultraschall einen besseren Gewebekontrast für die Darstellung tieferliegender Muskeln [106-108].

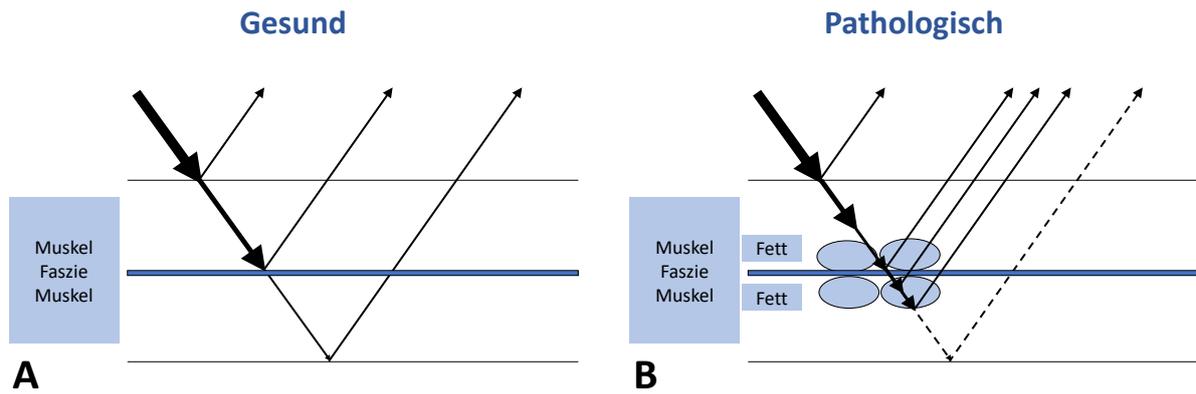
In mehreren Studien wurden diffuse fibrös-fettreiche Veränderungen auf MRT-Scans der T1-gewichteten-Muskeln von DMD-Patienten dargestellt und das ausgeprägte Beteiligungsmuster der unteren Gliedmaßen beschrieben [103, 109, 110]. Marden et al. waren die Ersten, die mit Hilfe von STIR-Sequenzen muskuläre ödematöse Veränderungen nachwiesen und die Bedeutung dieser Veränderungen aus der Perspektive des Therapiemanagements als Index des reversiblen Entzündungsstadiums der Erkrankung aufzeigten [111].

Ohne Sedierung kann die MRT jedoch bei kleinen Kindern eine Herausforderung darstellen, da sie in der Regel ein hohes Maß an Compliance über längere Zeiträume erfordert. Daher wurden in den letzten Jahren andere nicht-invasive bildgebende Verfahren zur Beurteilung der Muskelbeteiligung bei DMD etabliert, unter anderem der quantitative und qualitative Muskelultraschall.

### *Muskelultraschall*

Schallwellen und ihre Reflektionen (Echos) bilden die Grundlage für Ultraschallbilder. Ein Schallkopf sendet Impulse (hochfrequente Schallwellen) aus und empfängt deren Echos. Die Erzeugung eines Bildes aus allen zurückkehrenden Echos basiert auf einer Computeranalyse der zeitlichen und akustischen Eigenschaften der Echos. Vereinfacht ausgedrückt bestimmt die Zeit zwischen dem Senden und Empfangen des Ultraschallimpulses die Position des entsprechenden Pixels, während die Amplitude der Schallwelle der Helligkeit des Bildes entspricht [112, 113]. Die Reflektion von Schallwellen tritt auf, wenn der Ultraschallstrahl auf Gewebe mit unterschiedlichen akustischen Eigenschaften trifft. Dieser, auch als „akustische Impedanz“ bezeichnete Parameter, ist abhängig von der Schallgeschwindigkeit und der Dichte des jeweiligen Gewebes [112-114].

Biologisches Gewebe enthält hauptsächlich Wasser und Fett. Beide sind dazu in der Lage, Schall zu übertragen und zeigen hinsichtlich der akustischen Impedanz nur einen geringen Unterschied. Beim Auftreffen auf ein anderes Gewebe (beispielsweise Muskel zu Faszie) wird die Schallwelle teilweise reflektiert, während der größte Teil des Schalls auf tiefere Schichten übertragen wird (Abbildung 4A). Die Anzahl der zurückkehrenden Echos pro Quadratfläche bestimmt den Grauwert des Bildes, also die Echogenität. Die größten Unterschiede in der akustischen Impedanz bestehen zwischen Knochen und Luft, die Schallgeschwindigkeiten von ca. 300 beziehungsweise 4000 m/s aufweisen, während die Schallgeschwindigkeit im Muskel ca. 1580 m/s beträgt [113]. Der Übergang in Knochen oder Luft führt daher zu einer starken Reflektion, was zu einem hellen Punkt auf dem Ultraschallbild führt. Da kaum Schallwellen durchdringen, können daher keine Strukturen unter einem solchen Übergang dargestellt werden.



**Abbildung 4** Schematische Darstellung der Entstehung eines Ultraschallbildes. Teilreflexionen des Ultraschallbündels treten auf, wenn der Schallstrahl auf ein anderes Gewebe trifft (A). Das Ultraschallbild wird auf der Grundlage dieser Echos und ihrer zeitlichen und akustischen Eigenschaften erstellt. Die Anzahl der reflektierten Echos pro Fläche bestimmt den Grauwert des Bildes, also die Echogenität. Bei erkrankter oder älterer Muskulatur kommt es zu einem Ersatz durch Fett- und Bindegewebe. Sowohl Fett- als auch Bindegewebe weisen eine unterschiedliche akustische Impedanz auf, wodurch die Anzahl der reflektierenden Zwischenflächen im Muskel erhöht wird, was dem Muskel ein weißeres Aussehen verleiht (B).

Ultraschall wird in der Medizin seit Anfang der 1950er Jahre eingesetzt, als Wild et al. die Fähigkeit der hochfrequenten Ultraschallwellen entdeckten, vitales Gewebe zu visualisieren [115]. Seitdem hat sich die Technik des Ultraschalls weltweit etabliert und ist aufgrund ihrer Non-Invasivität und Echtzeitdarstellung in fast allen Bereichen der Medizin verbreitet.

#### *Muskelultraschall bei neuromuskulären Erkrankungen*

1980 wurde erstmals berichtet, dass dystrophe Muskulatur im Ultraschall ein anderes Erscheinungsbild hat als gesunde Muskeln [116].

Der dystrophische Umbau der Muskulatur verursacht eine erhöhte Muskelechogenität [116, 117]. Zur Einteilung des Schweregrades entwickelten Heckmatt und seine Mitarbeiter eine visuelle Bewertungsskala, in der Grad I den normalen Muskel und Grad IV eine stark erhöhte Muskelechogenität mit Totalverlust des Knochen-Echos darstellt (siehe Tabelle 1) [118].

Neuromuskuläre Erkrankungen können mehr oder weniger spezifische Veränderungen im Muskelultraschall zeigen, die bei der Differentialdiagnose hilfreich sein können. So führt die Duchenne-Muskeldystrophie zu einem starken, homogenen Anstieg der Muskelechogenität bei zunächst normalem Volumen, während beispielsweise bei der spinalen Muskelatrophie

(neurogener Umbau) ein inhomogener Anstieg der Echogenität und eine frühe Atrophie zu beobachten sind. Ein großer Vorteil des Muskelultraschalls im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren ist zudem seine Fähigkeit, Muskelbewegungen wie Muskelkontraktionen und Faszikulationen zu visualisieren.

Mehrere Studien konnten die hohe Sensitivität und Spezifität des Ultraschalls bei der Erkennung von neuromuskulären Störungen belegen [118-122]. Mittels moderner Ultraschalltechnik ist aktuell die Darstellung von Muskelgewebe mit Auflösungen von bis zu 0,1 mm möglich [114].

**Tabelle 1** Heckmatt-Score: Visuelle Bewertungsskala zur Klassifizierung der Echogenität des Muskelultraschalls [118].

<b>Grad</b>	<b>Darstellung im Ultraschall</b>
Grad I	Normal
Grad II	Erhöhte Muskelecho-genität mit ausgeprägtem Knochenecho
Grad III	Deutlich erhöhte Muskelecho-genität bei reduziertem Knochenecho
Grad IV	Sehr stark erhöhte Muskelecho-genität und vollständiger Verlust des Knochenechos

Die visuelle Erkennung einer subtil erhöhten Muskelecho-genität kann schwierig sein; ihre genaue Interpretation hängt von der Erfahrung des Untersuchers ab. Grundsätzlich nimmt die Intensität des Muskelechos mit zunehmendem Alter zu. Darüber hinaus können Veränderungen in den Systemeinstellungen wie beispielsweise eine erhöhte Verstärkung, den Muskeln ein helleres Aussehen verleihen, das mit einer pathologisch erhöhten Echogenität verwechselt werden kann. Aus diesem Grund wurden computergestützte Techniken in die Bildinterpretation eingeführt. Die Quantifizierung der Muskelecho-genität kann mit einer Graustufenanalyse (GSL) erreicht werden [117, 121, 123-125].

Prospektive Studien bei Kindern haben bei visueller Auswertung der Muskelechogenität das Vorliegen einer neuromuskulären Erkrankung mit einer Sensitivität von 67-81% und einer Spezifität von 84-92% ergeben [120, 126, 127]. Die Quantifizierung der Muskelechogenität verbesserte die Sensitivität sogar auf 87-92% [117, 124, 128], was im Bereich der Voraussetzungen für Screeninguntersuchungen liegt [128]. Diese Werte gelten allerdings nicht für alle Arten von Muskelerkrankungen. Erkrankungen, die keinen primären dystrophischen oder neurogenen Umbau verursachen, wie beispielsweise mitochondriale Erkrankungen, erbringen weit weniger häufig erkennbare sonographische Befunde [129].

## **2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Klinische Studien zur DMD basieren bislang im Allgemeinen auf Funktions- und Kraftmessungen als primäre Outcome-Parameter [130-132].

Fragestellung dieser Studie war es, ob ein reproduzierbares Muster der Muskelbeteiligung anhand des Muskelultraschalls in frühen Stadien zu erkennen ist, möglicherweise sogar bereits vor Beginn des Verlustes motorischer Fähigkeiten.

## **3 Patienten und Methoden**

### **3.1 Patientenkohorte <sup>1</sup>**

In unserer Studie wurden 25 Patienten im Alter von einem bis sechs Jahren mit genetisch nachgewiesener DMD wurden über einen Zeitraum von drei Jahren (2015-2018) klinisch und sonographisch untersucht (Mittelwert 4,5 Jahre, Median 4,8 Jahre). Zehn Patientin wurden nur einmalig untersucht, während 15 Patienten im Verlauf wiederholt untersucht wurden. Im Rahmen der Studie wurden so insgesamt 60 Ultraschalluntersuchungen und klinische Funktionstests durchgeführt, sofern Alter und Verhalten dies erlaubten. Hinsichtlich der Ultraschalluntersuchungen wurden bei jeder Verlaufskontrolle 13 Muskeln sonographiert. Die Intervalle zwischen den Untersuchungen betragen 3,1-20,5 Monate (Mittelwert 7,2 Monate, Median 6,2 Monate), wobei routinemäßige Verlaufskontrolle in unserem

---

<sup>1</sup> Teile dieses Kapitels sind bereits in Vill et al. 2020 veröffentlicht [133].

Behandlungszentrum regelmäßig alle sechs Monate angeboten wurden. Das Höchstalter bei der letzten Untersuchung betrug 9 Jahre. Die erste Ultraschalluntersuchung fand bei allen Patienten vor dem Verlust motorischer Fähigkeiten statt. Die sonographische Untersuchung einer Kohorte von 16 gesunden, motorisch altersgerecht entwickelten Kindern (Alter bei der Untersuchung 1-9 Jahre, Mittelwert 5,25 Jahre, Median 5,26 Jahre) diente als Kontrollkollektiv, um den Normbereich des Graustufenniveaus (GSL) zu definieren und als verblindete Kontrolle für die Bewertung des visuellen Ratings.

Genetischer Befund, Alter bei Erreichen der Gehfähigkeit, Alter bei Erreichen des motorischen Plateaus sowie Therapie der einzelnen Patienten sind in Tabelle 2 dargestellt. Das Alter, in dem die motorische Plateauphase erreicht wurde, lag zwischen 3 und 8 Jahren (Mittelwert 6,0 Jahre, Median 6,0 Jahre). Bei circa einem Drittel der Patienten (8/25) war am Endpunkt der Studie noch eine Zunahme von motorischen Fähigkeiten erkennbar.

**Tabelle 2** Patientencharakteristika; Behandlungsbeginn und –schema; Ergebnisse.

Patientencharakteristika				Behandlung (Alter)				Ergebnisse		
Patient Nr.	Genetische Mutation	Alter bei Gehfähigkeit	Alter bei der letzten Untersuchung	Prednisolon	Deflazacort	Steroid Behandlungsschema	Ataluren	Alter bei Erreichen des motorischen Plateaus	Alter, in dem erste Veränderungen im Ultraschall erkennbar wurden	Erster involvierter Muskel
1	Nonsense Mutation c.4084 C>T (p. Gln1362 *)	20 Mo	6,6 J	5 - 6,5 J	6,5 J	10d on/off	5 J	noch nicht erreicht	noch nicht erreicht	-
2	Deletion Exon 45-52	verzögert	8,8 J	8 J	-	10d on/off	-	<7 J	7,0 J oder früher	A.M. (IV) und R.F. (II)
3	Out of frame Mutation c.6286delC	26 Mo	6,0 J	5 J	-	10d on/off	-	4,5 J	3,7 J	A.M.
4	Splice Mutation c.6762+1G>T	18 Mo	6,8 J	5,5-6 J	6 J	10d on/off	-	6 J	4,5 J	A.M.
5	Deletion Exon 3-13	18 Mo	7,0 J	-	-	-	-	7 J	3,9 J	A.M.
6	Deletion Exon 49-50	15 Mo	3,3 J	-	-	-	-	noch nicht erreicht	3,3 J	A.M.
7	Deletion Exon 6	24 Mo	6,7 J	5 J	-	10d on/off	-	5 J	5,3 J	A.M.
8	Nonsense Mutation c.3544G>T,	14 mo	9,3 J	5,5 J	-	10d on/off	6 J	7 J	6,4 J	A.M.
9	Nonsense Mutation c.3544G>T	14 Mo	7,4 J	5,25 J	-	10d on/off	5 J	6 J	5,7 J	A.M.
10	Nonsense Mutation c.3544G>T	24 Mo	7,2 J	5,75 J	-	10d on/off	5 J	6 J	5,1 J	A.M.
11	Out of frame Mutation del559del G	15 Mo	11,1 J	6,25-9 J	9-9,5 J	10d on/off	-	8 J	8,1 J	A.M.
12	Nonsense Mutation c.5131C>T	22 Mo	5,9 J	5,38 J	-	10d on/off	5 J	3 J	2,8 J	A.M.
13	Nonsense Mutation c.8713C>T	14 Mo	6,4 J	-	-	-	5 J	6 J	5,5 J	A.M.
14	Deletion Exon 53-55	15 Mo	7,8 J	5,33 J	-	10d on/off	-	7 J	4,9 J	A.M.
15	Deletion Exon 49-54	14 Mo	6,7 J	5 J	-	ongoing	-	noch nicht erreicht	5,7 J	A.M.
16	Deletion Exon 49-54	17 Mo	4,5 J	-	-	-	-	noch nicht erreicht	4,5 J	A.M.
17	Deletion Exon 45-54	18 Mo	5,7 J	5,5-5,8 J	-	10d on/off	-	5 J	4,1 J	A.M.
18	Duplikation Exon 3-19	12 Mo	3,3 J	-	-	-	-	noch nicht erreicht	noch nicht erreicht	A.M.
19	Out of frame Mutation c.6557delG	18 Mo	11,0 J	5,25 J	-	10d on/off	-	7 J	7,4 J	A.M.
20	Duplikation Exon 42-43	18 Mo	5,9 J	-	5,6 J	10d on/off	-	6 J	4,8 J	A.M.
21	Deletion Exon 53	18 Mo	3,9 J	-	-	-	-	noch nicht erreicht	3,8 J	A.M.
22	Deletion Exon 46 -47	24 Mo	4,9 J	-	-	-	-	noch nicht erreicht	noch nicht erreicht	-
23	Deletion Exon 3-30	15 Mo	7,1 J	5 J	-	10d on/off	-	6 J	5,6 J oder früher	A.M. (III) und R.F.) (II)
24	Deletion Exon 53	18 Mo	8,2 J	5,5 J	-	10d on/off	-	7 J	5,6 J	A.M.
25	Deletion Exon 45-46	noch nicht erreicht	2,5 J	-	-	-	-	noch nicht erreicht	2,5 J	A.M.

*Diese Tabelle wurde bereits publiziert [133] und darf mit Genehmigung des Journals in dieser Dissertation abgebildet werden.*

### 3.2 Muskelultraschall

Für die Ultraschalluntersuchungen wurde ein GE LOGIQ E (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Großbritannien) mit einer Frequenz von 11 MHz verwendet. Tiefe und Fokus wurden individuell angepasst und die Verstärkung auf 59 dB eingestellt.

Der Muskelultraschall wurde an den 13 folgenden Muskeln durchgeführt:

M. rectus femoris

M. adductor longus

M. gracilis

M. adductor magnus

Mm. semimembranosus und semitendinosus

M. biceps femoris

M. tibialis anterior

M. gastrocnemius

M. erector spinae

M. rectus abdominis

M. biceps brachii

M. triceps brachii

M. deltoideus

Die Ultraschallbilder wurden mit Hilfe einer visuellen Vier-Punkte-Skala sowie einer computergestützten Analyse der Graustufenniveaus (Gray Scale Levels (GSL)) bewertet. Zur visuellen Beurteilung der sonographischen Muskelstruktur wurde eine modifizierte Heckmatt-Skala [67] verwendet, die in vier Stufen unterteilt ist:

**Tabelle 3** Modifizierte Heckmatt-Skala: Visuelle Bewertungsskala zur Klassifizierung der Echogenität des Muskelultraschalls

<b>Grad</b>	<b>Darstellung im Ultraschall</b>
Grad I	Normale Muskelechogenität mit klar definierten intramuskulären Septen
Grad II	Leicht erhöhte Muskelechogenität bei noch abgrenzbaren intramuskulären Septen
Grad III	Mäßig erhöhte Muskelechogenität bei weniger erkennbaren intramuskulären Septen
Grad IV	Stark erhöhte Muskelechogenität ohne erkennbare Septen

Für die visuelle Beurteilung der sonographischen Befunde war eine Modifikation der ursprünglichen Heckmatt-Skala [65] notwendig, da im überwiegenden Teil der untersuchten Muskeln kein darunterliegender Knochen liegt, sodass das Knochenecho nicht in die Bewertung einfließen konnte. Die Skala wurde bereits in einer anderen Studie unserer Gruppe verwendet [85] und zeigt eine hohe Intra- und Interrater-Reliabilität. In der vorliegenden Studie bewerteten drei, im Muskelultraschall sehr erfahrene, Ärzte bei neuromuskulären Erkrankungen die Bilder. Die Beurteilung der sonographischen Befunde erfolgte doppelblind mit zufälliger Bildfolge.

Für die computergestützte Graustufenanalyse wurde bei Patienten und Kontrollen das Softwareprogramm "ImageJ", Version 1.47 (Autor: Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), genutzt. Das Programm ermittelt für die Auswertung anhand der weißen und schwarzen Pixel einen gemittelten Grauwert. Dieser ergibt eine ganze Zahl auf einer Skala von 0-256 (Graustufen) und spiegelt die durchschnittliche Echogenität im jeweiligen Muskel wider. Die Grauwerte wurden im größten zusammenhängenden Teil der Muskeln ohne die umgebenden Muskelfaszien gemessen.

### 3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit Microsoft Excel 2020 durchgeführt. Bei den 60 sonographischen Befunden der Patienten und den 16 Befunden der Kontrollkohorte wurden für jeden der 13 untersuchten Muskeln (via ImageJ und verblindetem visuellen Rating) verschiedene Parameter der Echogenität (Median, Mittelwert und Standardabweichung) ermittelt und anschließend tabellarisch/graphisch gegenübergestellt. Insgesamt wurden bei beiden Kohorten insgesamt mehr als 900 Ultraschallbefunde qualitativ und quantitativ ausgewertet. Die Befunde der Kontrollgruppe wurden zur Definition der Normwerte verwendet. In einer sekundären Subgruppenanalyse wurde die Korrelation zwischen dem Alter, in dem das freie Gehen gelernt wurde, und dem Auftreten von Ultraschallveränderungen untersucht.

Um die Patienten- und Kontrollkohorte statistisch zu vergleichen, wurde eine Normalverteilung mittels Z-Score berechnet. Der Z-Score ist ein numerischer Messwert, der die Beziehung eines Wertes zum Erwartungswert (entspricht näherungsweise dem Mittelwert) beschreibt und in Form von Standardabweichungen vom Erwartungswert gemessen wird. Beträgt ein Z-Score 0, so zeigt dies an, dass der Wert des Datenpunkts mit dem Erwartungswert identisch ist. Ein Z-Score von 1,0 zeigt einen Wert an, der eine Standardabweichung vom Erwartungswert entfernt ist. Ferner wurde zur Feststellung eines statistisch signifikanten Unterschieds innerhalb der ermittelten Grauwerte beider Kohorten ein doppelseitiger t-Test durchgeführt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität München (UE 141-14) genehmigt.

## 4 Ergebnisse<sup>2</sup>

### 4.1 Messung der Echogenität

Die visuellen und computergestützten Messwerte der Echogenität der sonographischen Befunde von Patienten und Kontrollen wurden tabellarisch und graphisch gegenübergestellt. Die Tabellen 4 und 5 zeigen den ermittelten Median der Grauwerte aus der computergestützten Analyse und den des verblindeten visuellen Ratings. Die ermittelten Werte für die untersuchten Muskeln sind in absteigender Reihenfolge dargestellt. Die in den Tabellen 4 und 5 aufgeführten Werte sind in den Abbildungen 5 und 6 graphisch dargestellt. Sowohl im verblindeten Rating als auch in der computergestützten Analyse zeigt sich der M. adductor magnus bei den DMD Patienten als derjenige Muskel mit der höchsten Echogenitätssteigerung.

Das Signifikanzniveau wurde auf 0,001 beziehungsweise 0,05 festgelegt und ist in den Abbildungen 5 und 6 integriert.

---

<sup>2</sup> Teile dieses Kapitels sind bereits in Vill et al. 2020 veröffentlicht [133].

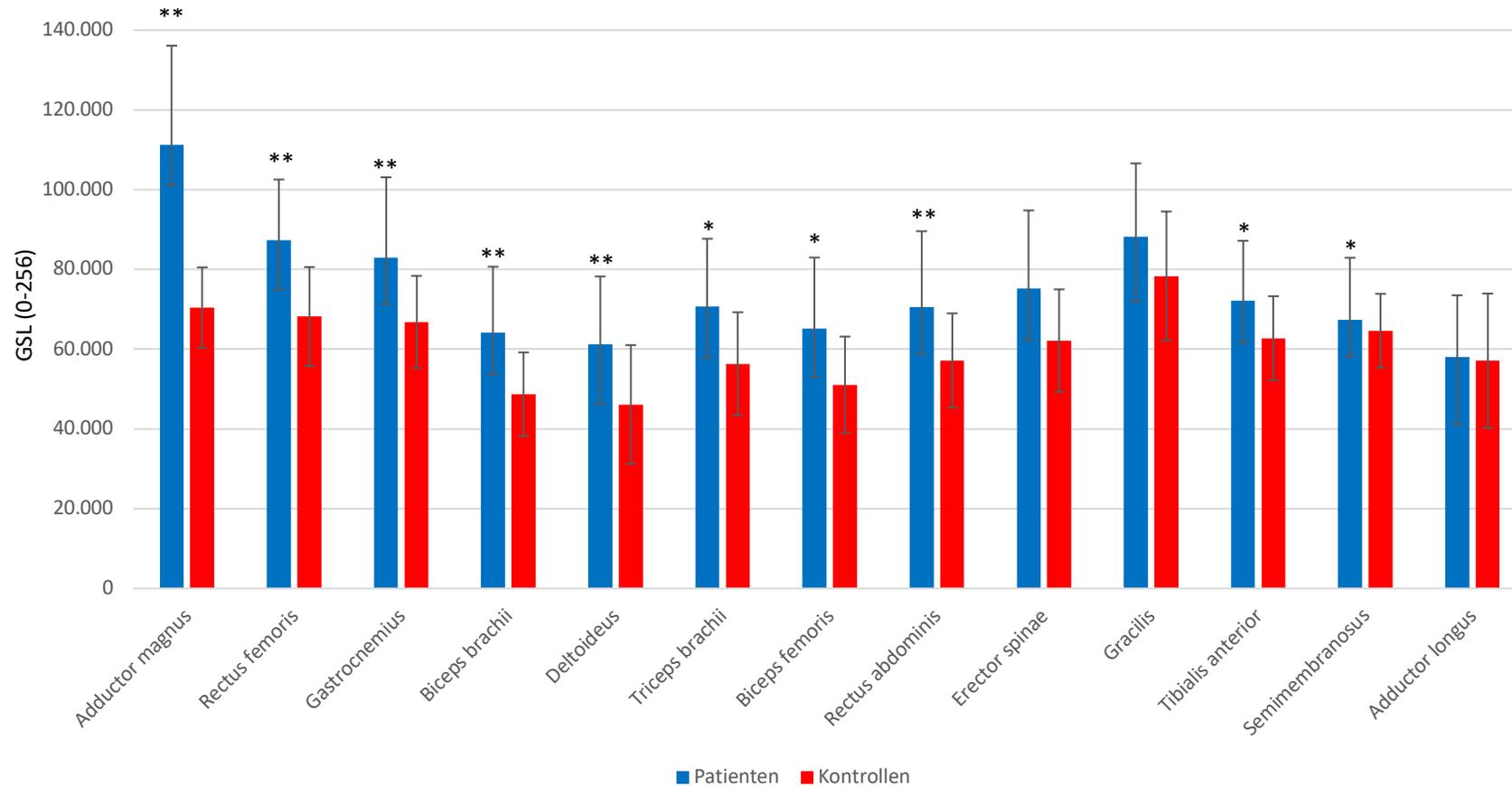
**Tabelle 4** Medianwerte der Patienten- und Kontrollkohorte via computergestützer Analyse (Skala 0-256)

	Patienten / St.abw.	Kontrollen / St.abw.
Adductor magnus	111 / 25	70 / 10
Gracilis	88 / 18	78 / 16
Rectus femoris	87 / 15	68 / 12
Gastrocnemius	83 / 20	67 / 11
Erector spinae	75 / 20	62 / 13
Tibialis anterior	72 / 15	63 / 11
Biceps brachii	71 / 17	56 / 10
Biceps femoris	71 / 18	57 / 12
Semimembranosus	67 / 16	65 / 10
Rectus abdominis	65 / 19	51 / 12
Deltoideus	64 / 17	49 / 15
Triceps brachii	61 / 17	46 / 13
Adductor longus	58 / 16	57 / 17

**Tabelle 5** Medianwerte der Patienten- und Kontrollkohorte mittels verblindetem Rating via modifizierter Heckmatt-Skala (1-4)

	Patienten	Kontrollen
Adductor magnus	2,53	1,10
Gastrocnemius	1,55	1,02
Rectus femoris	1,39	1,04
Erector spinae	1,33	1,02
Biceps femoris	1,33	1,02
Semimembranosus	1,32	1,02
Tibialis anterior	1,3	1,00
Biceps brachii	1,23	1,04
Gracilis	1,21	1,06
Deltoideus	1,16	1,02
Adductor longus	1,13	1,02
Rectus abdominis	1,11	1,00
Triceps brachii	1,12	1,02

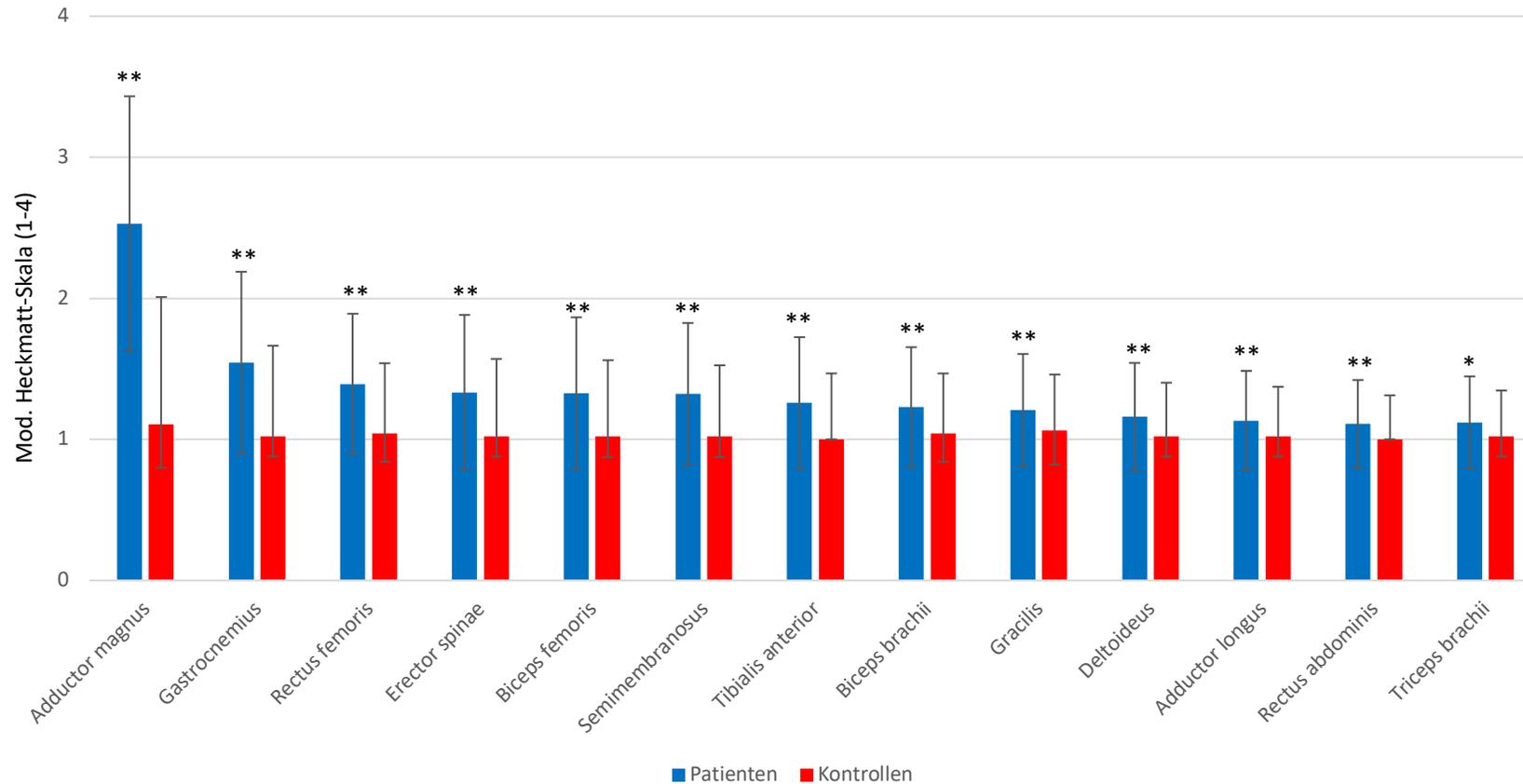
## Echogenität Patienten vs Kontrollen - computergestützte Analyse via ImageJ



**Abbildung 5** Auswertung der computergestützten Analyse via ImageJ. Dargestellt sind die Grauwerte der 13 untersuchten Muskelgruppen. Die Patienten sind mit blauen Balken dargestellt, die Kontrollen mit roten. Die Höhe der Balken gibt den ermittelten Median der 60 Patienten- und 16 Kontrolluntersuchungen wieder. Die Muskeln sind in absteigender Reihenfolge nach der Größe der Differenz zwischen Patienten- und Kontrollgruppen sortiert (\*\*=  $p < 0,001$  / \*=  $p < 0,05$ ).

*Diese Graphik wurde bereits publiziert [133] und darf mit Genehmigung des Journals in dieser Dissertation abgebildet werden.*

## Echogenität Patienten vs Kontrollen - visuelles Rating via modifizierter Heckmatt-Skala



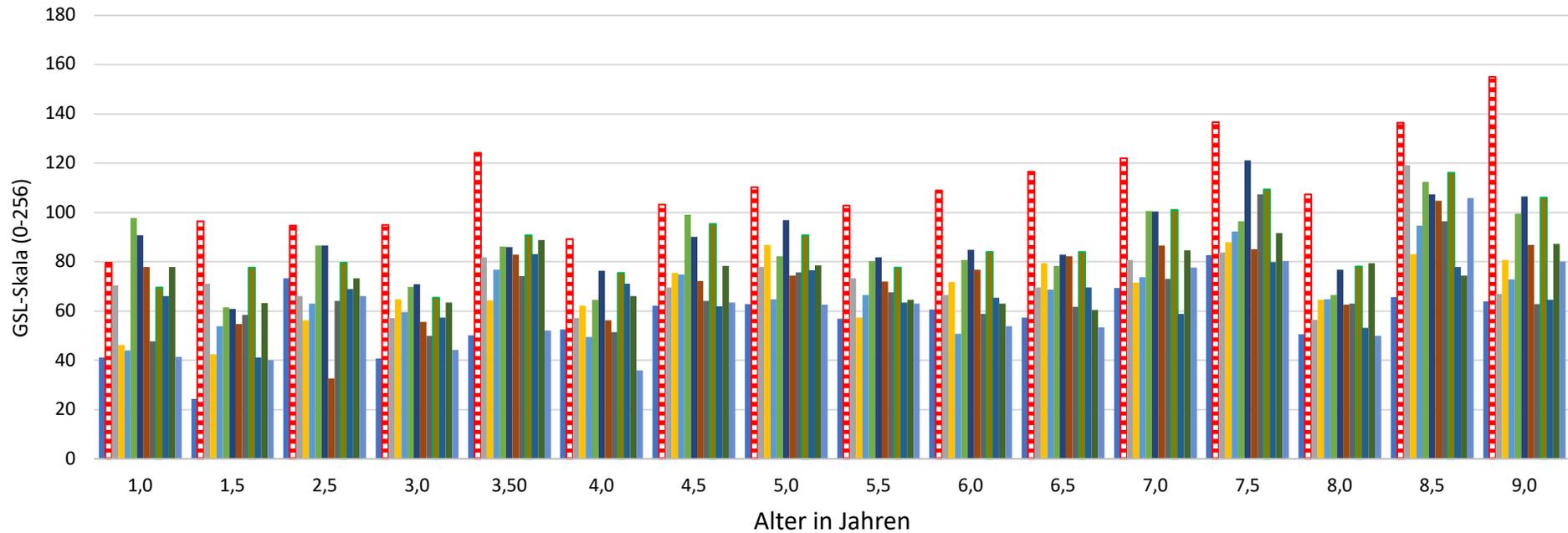
**Abbildung 6** Auswertung des visuellen Ratings via modifizierter Heckmatt-Skala. Dargestellt sind die 13 untersuchten Muskelgruppen. Die Patienten sind mittels blauen Balken dargestellt, die Kontrollen mittels roten Balken. Die Höhe der Balken stellt den Median der 60 Patienten- und 16 Kontrolluntersuchungen dar. Die Muskeln sind in absteigender Reihenfolge nach der Größe der Differenz zwischen Patienten- und Kontrollgruppen sortiert (\*\*=  $p < 0,001$  / \*=  $p < 0,05$ ).

*Diese Graphik wurde bereits publiziert [133] und darf mit Genehmigung des Journals in dieser Dissertation abgebildet werden.*

## 4.2 Altersbezogene Zunahme der Muskelechogenität

Die Abbildungen 7-10 zeigen altersbezogene Veränderungen der Echogenität aller untersuchten Muskeln. Dabei konnte sowohl bei der computergestützten Analyse als auch beim verblindeten visuellen Rating in der Patientenkohorte eine positive Korrelation zwischen dem Anstieg der Echogenität und dem Alter der Patienten festgestellt werden. Beim M. adductor magnus ist diese Korrelation am stärksten ausgeprägt. Die Abbildung 14 visualisiert die Zunahme der Echogenität anhand sonographischer Befunde von zwei Patienten im zeitlichen Verlauf. Die Ergebnisse des computergestützten und verblindeten visuellen Ratings sind auf den Seiten 45 und 46 tabellarisch dargestellt.

## Patienten – computergestützte Analyse via GSL



n=1

1

3

2

1

5

6

7

10

6

6

4

1

3

1

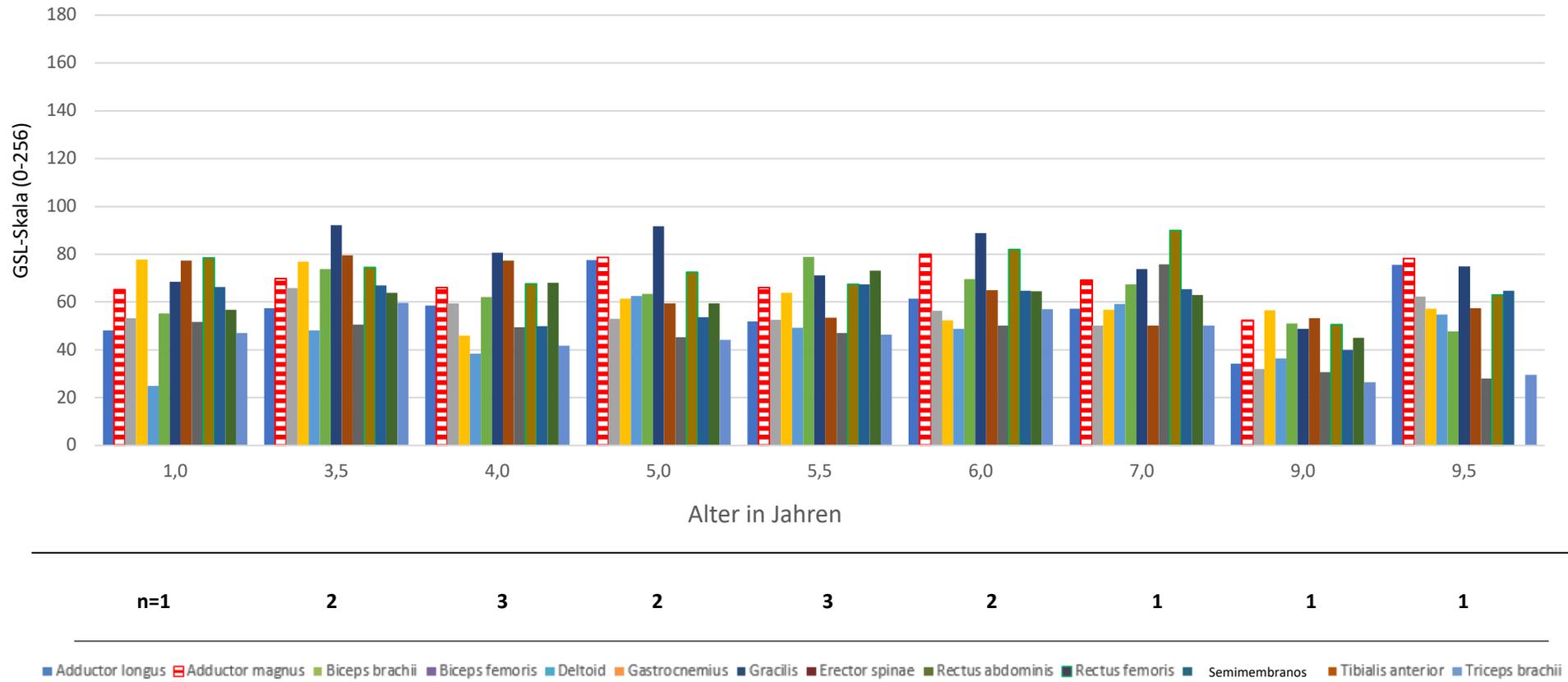
3

■ Adductor longus ■ Adductor magnus ■ Biceps brachii ■ Biceps femoris ■ Deltoid ■ Gastrocnemius ■ Gracilis ■ Erector spinae ■ Rectus abdominis ■ Rectus femoris ■ Semimembranosus ■ Tibialis anterior ■ Triceps brachii

**Abbildung 7** Altersbezogene Darstellung der Echogenität aller Muskelgruppen der untersuchten Patienten via quantitativer Graustufenanalyse (GSL). Dargestellt sind die Mittelwerte in der jeweiligen Altersgruppe. Die prominentesten Veränderungen sind beim M. adductor magnus erkennbar („n“ gibt die Anzahl der Untersuchungen in der jeweiligen Altersgruppe an).

*Diese Graphik wurde bereits publiziert [133] und darf mit Genehmigung des Journals in dieser Dissertation abgebildet werden.*

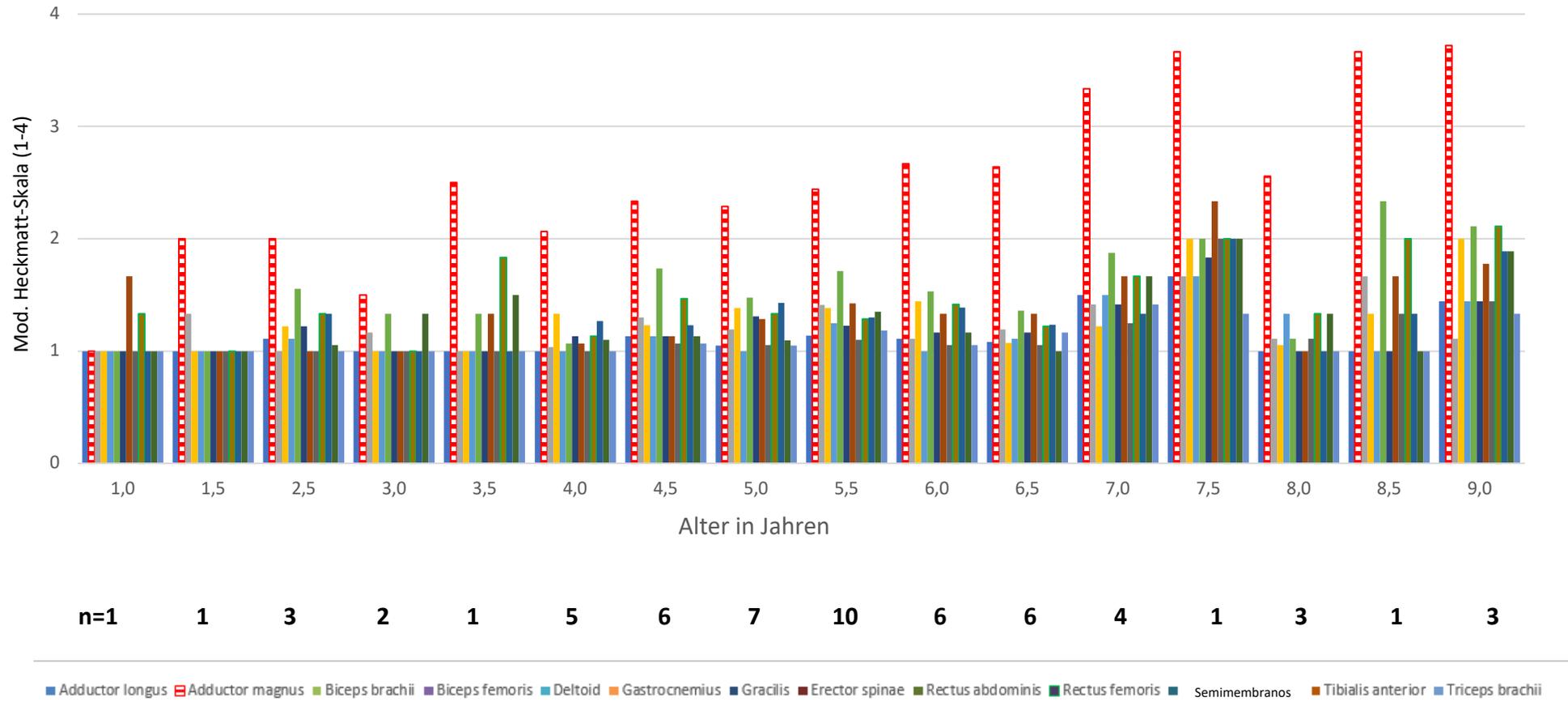
## Kontrollen - computergestützte Analyse via GSL



**Abbildung 8** zeigt die altersbezogene Darstellung der Echogenität aller Muskelgruppen der untersuchten Kontrollkohorte via quantitativer Graustufenanalyse (GSL). Dargestellt sind die Mittelwerte in der jeweiligen Altersgruppe. Insgesamt lassen sich bei den Kontrollpatienten keine signifikanten Unterschiede in der ermittelten Echogenität der untersuchten Muskeln erkennen.

*Diese Graphik wurde bereits publiziert [133] und darf mit Genehmigung des Journals in dieser Dissertation abgebildet werden.*

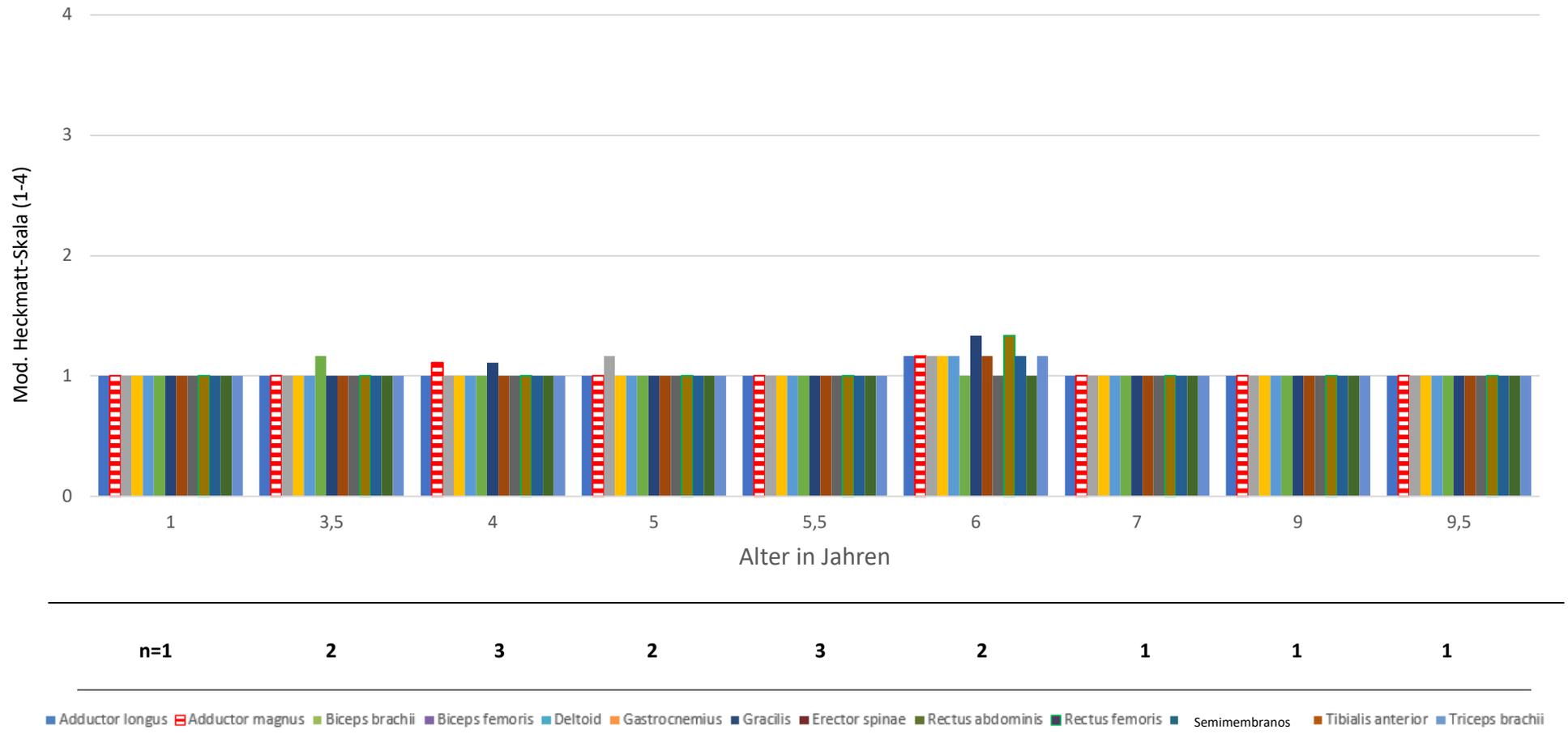
## Patienten - verblindetes visuelles Rating



**Abbildung 9** Qualitative Bewertung der Muskelechogenität der Patientenkohorte im verblindeten visuellen Rating via modifizierter Heckmatt-Skala. Dargestellt sind die Mittelwerte in der jeweiligen Altersgruppe. Analog zur GSL-Auswertung in Abbildung 7 ist der M. adductor magnus als der Muskel mit den prominentesten Veränderungen erkennbar.

*Diese Graphik wurde bereits publiziert [133] und darf mit Genehmigung des Journals in dieser Dissertation abgebildet werden.*

### Kontrollen - verblindetes visuelles Rating



**Abbildung 10** Qualitative, verblindete Bewertung der Muskelechogenität via visuellem Rating bei den Kontrollen mittels modifizierter Heckmatt-Skala. Dargestellt sind die Mittelwerte in der jeweiligen Altersgruppe. Analog zur GSL-Auswertung in Abbildung 8 sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Muskelechogenität erkennbar.

*Diese Graphik wurde bereits publiziert [133] und darf mit Genehmigung des Journals in dieser Dissertation abgebildet werden.*

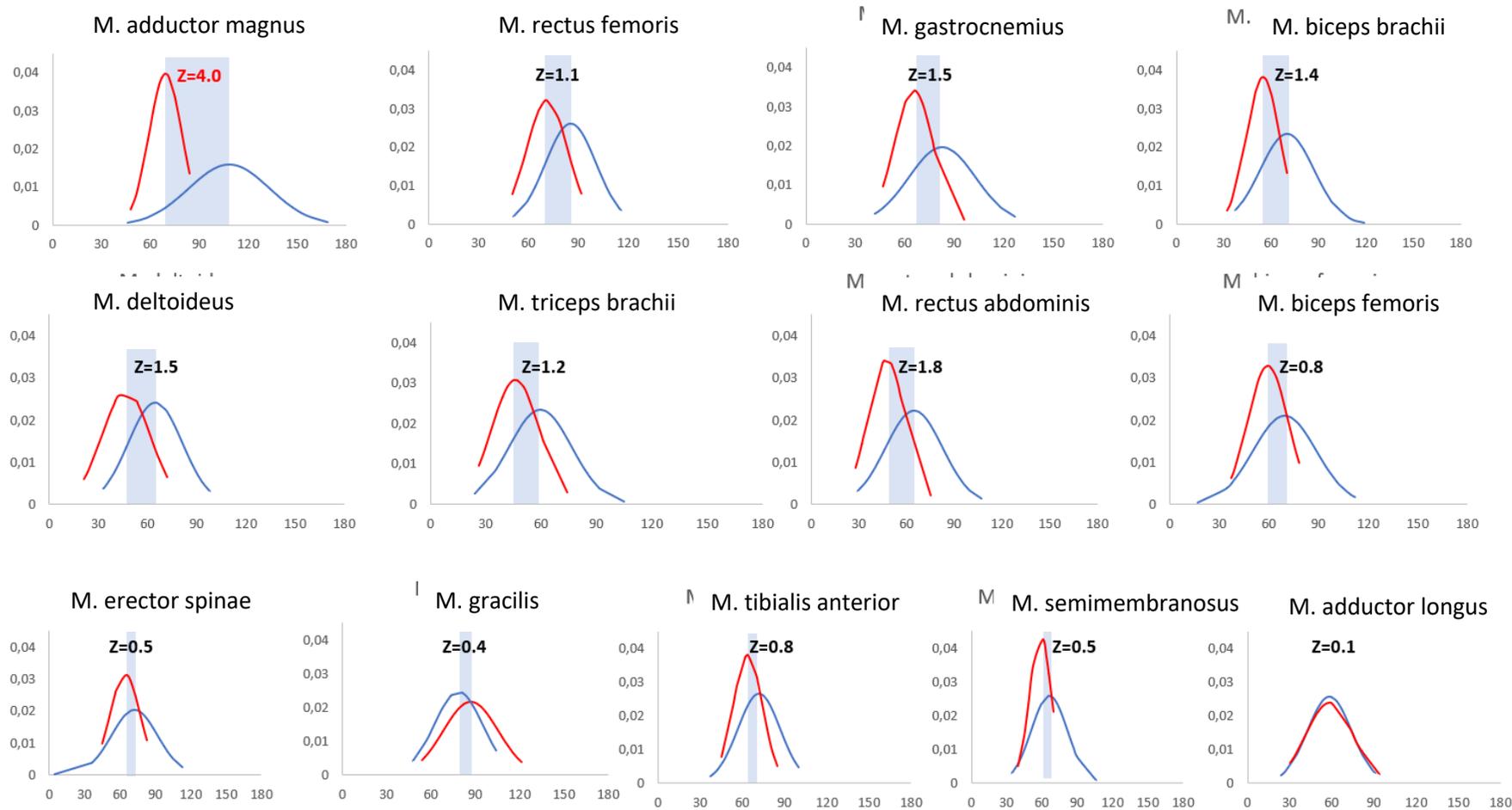
### 4.3 Statistischer Vergleich von Patienten und Kontrollen

Abbildung 11 zeigt die graphische Darstellung der Normalverteilung aller computergestützt ermittelten Grauwerte (Mediane) der Patienten und Kontrollen. Zur Veranschaulichung wurde der Z-Score integriert.

Für den M. adductor magnus wurde ein Z-Score von 4,0 errechnet. Dies bedeutet, dass die mittleren Grauwerte der Patienten (Mittelwert GSL Patienten: 109) um vier Standardabweichungen höher als die Mittelwerte der Kontrollen (Mittelwert GSL Kontrollen: 69, Standardabweichung: 10) liegen.

In der folgenden Tabelle sind die Z-Scores und p-Werte basierend auf der computergestützten Analyse aufgelistet:

	Z-Score	p-Wert
M. adductor magnus	4,0	p < 0,001
M. rectus abdominis	1,8	p < 0,001
M. gastrocnemius	1,5	p < 0,001
M. deltoideus	1,5	p < 0,001
M. biceps brachii	1,4	p < 0,001
M. triceps brachii	1,2	p < 0,05
M. rectus femoris	1,1	p < 0,001
M. biceps femoris	0,8	p < 0,05
M. tibialis anterior	0,8	p < 0,05
M. erector spinae	0,5	nicht signifikant
M. semimembranosus	0,5	p < 0,05
M. gracilis	0,4	nicht signifikant
M. adductor longus	0,1	nicht signifikant



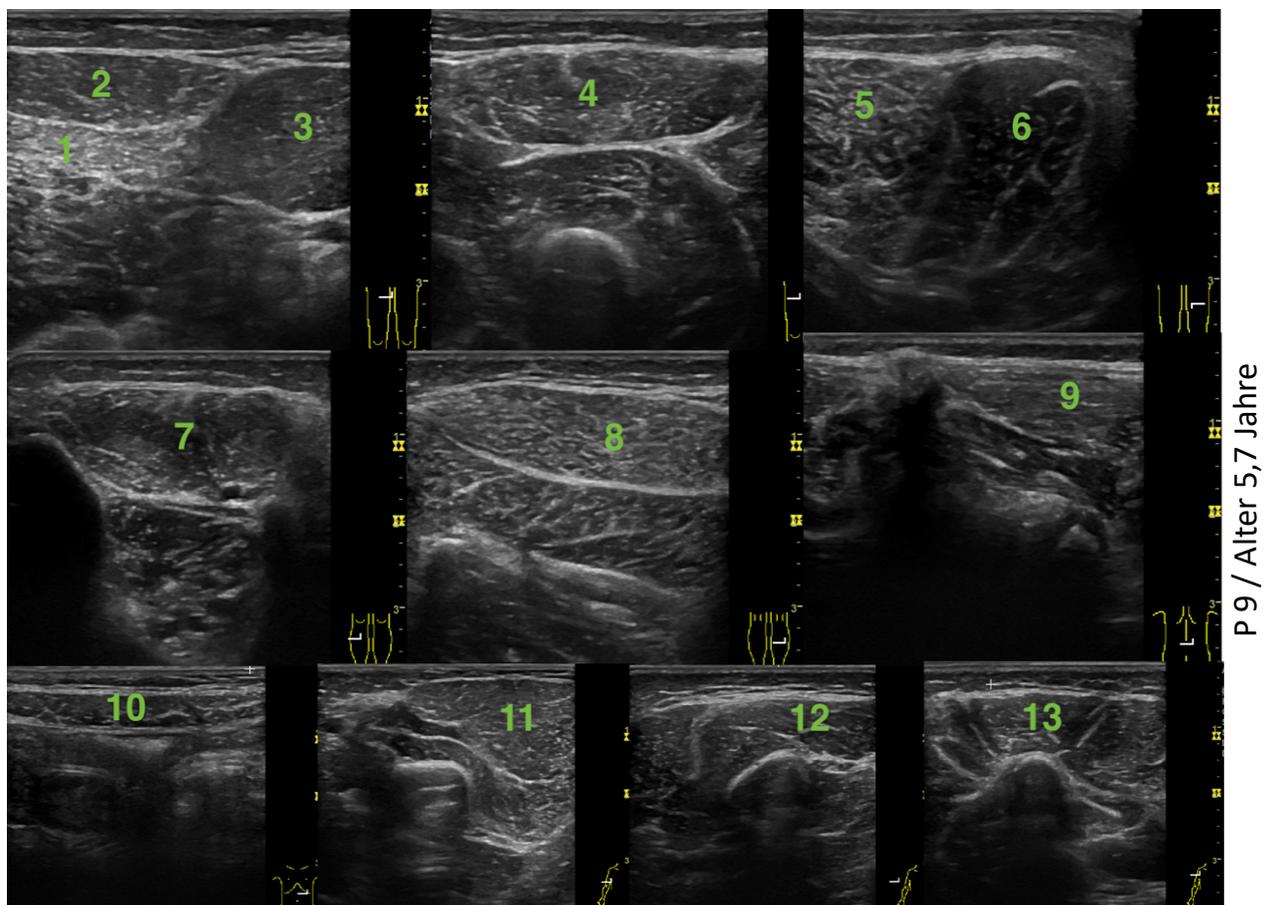
**Abbildung 11** Graphische Gegenüberstellung der Normalverteilungen (computergestützte Analyse) und Veranschaulichung anhand des Z-Scores. Dargestellt sind alle 13 untersuchten Muskelgruppen. Die blauen Graphen repräsentieren die Patienten, die roten die Kontrollen. Beim M. adductor magnus wurde für den Z-Score der höchste Wert ermittelt. (Die Y-Achse zeigt die Wahrscheinlichkeitsdichte, auf der X-Achse liegen die Echogenitätswerte der computergestützten Auswertung).

*Diese Graphik wurde bereits publiziert [133] und darf mit Genehmigung des Journals in dieser Dissertation abgebildet werden.*

#### 4.4 Exemplarische Darstellung von Muskelultraschallbefunden

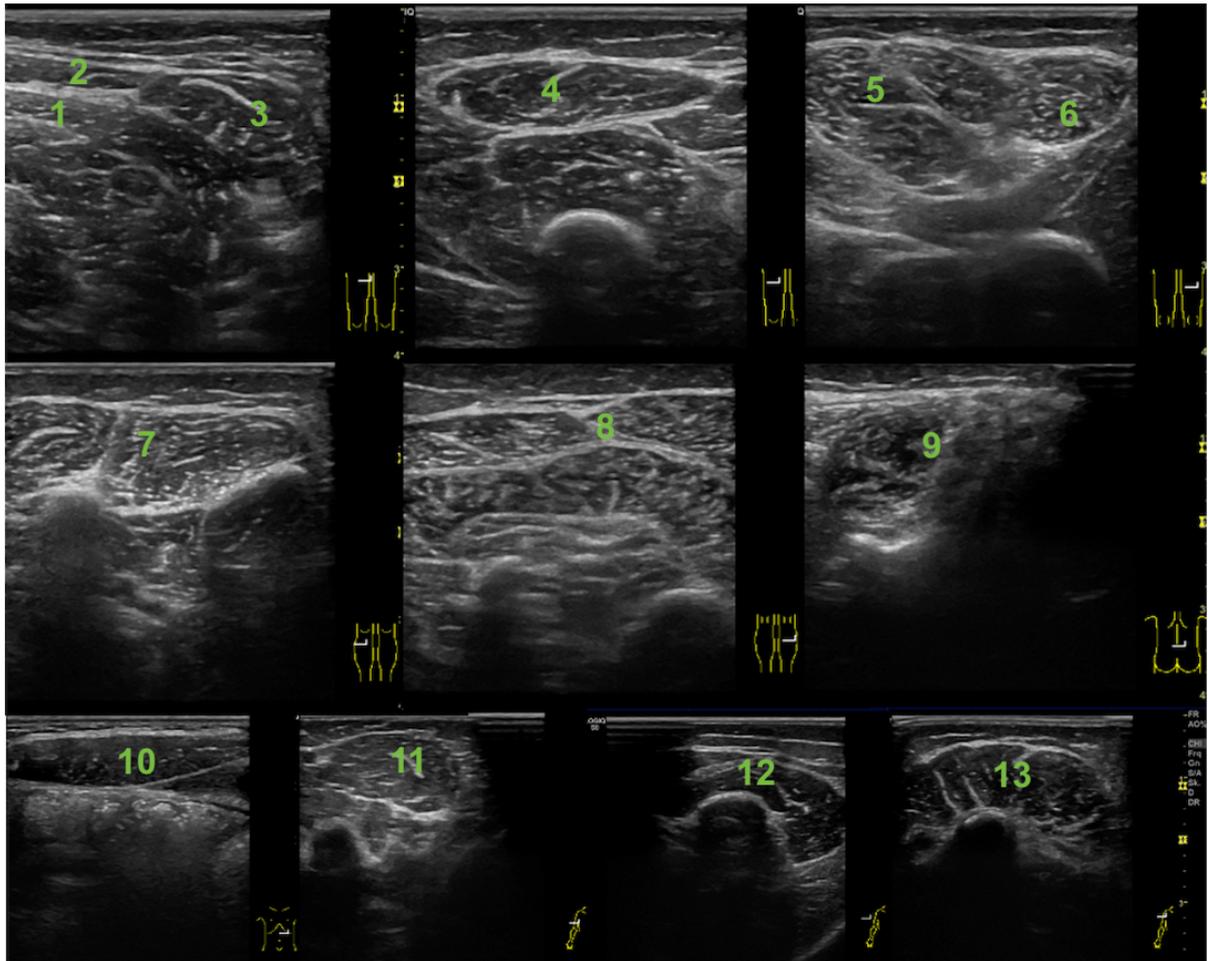
Für die visuelle Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse dieser Studie werden im Folgenden die Bilder einer Untersuchung eines Patienten und einer etwa gleichaltrigen Kontrolle sowie die individuelle Veränderung der Ultraschallbefunde im Zeitverlauf zweier unterschiedlich alter Patienten exemplarisch abgebildet.

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen Bilder von Muskelultraschalluntersuchungen eines 5,7-jährigen DMD-Patienten und einer 5,8-jährigen Kontrolle. Beide Abbildungen zeigen alle 13 untersuchten Muskel(-gruppen).



**Abbildung 12** Exemplarische Darstellung einer Ultraschalluntersuchung eines Patienten. Der M. adductor magnus des Patienten weist der M. adductor magnus bereits eine erhöhte Echogenität auf (Pat 9, Alter 5,7 Jahre). Im verblindeten visuellen Rating des Patienten wurden fast alle dargestellten Muskeln, abgesehen vom M. adductor magnus, mit einer „1“ bewertet. Der M. adductor magnus wurde in diesem Befund unabhängig und einheitlich mit einer „2“ bewertet.

(1=M. adductor magnus, 2=M. gracilis, 3=M. adductor longus, 4=M. rectus femoris, 5=M. semimembranosus, 6=M. biceps femoris, 7=M. tibialis anterior, 8=M. gastrocnemius, 9=M. erector spinae, 10=M. rectus abdominis, 11=M. biceps brachii, 12=M. triceps brachii, 13=M. deltoideus)



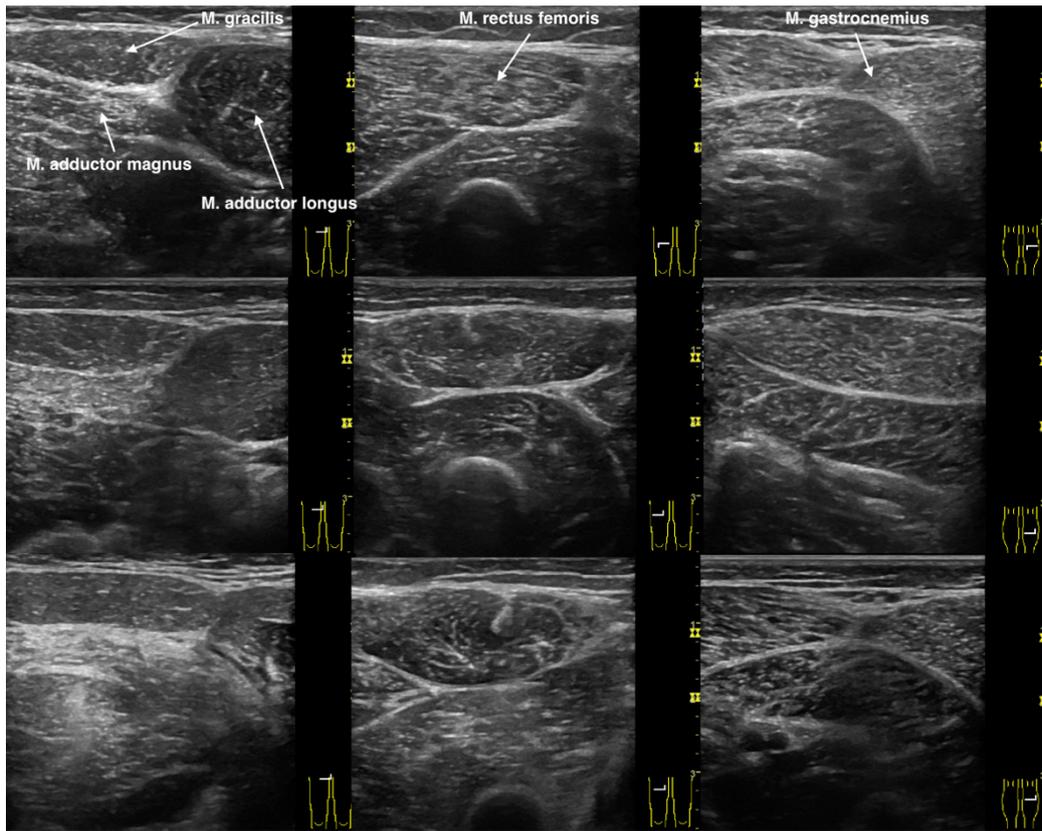
**Abbildung 13** Exemplarische Darstellung einer Ultraschalluntersuchung einer gesunden Kontrolle. Keiner der sonographisch untersuchten Muskeln weist eine erhöhte Echogenität auf (Kontrolle 10, Alter 5,8 Jahre). Im visuellen Rating via modifizierter Heckmatt-Skala wurden alle Muskeln von den drei bewertenden Ärzten unabhängig voneinander mit einer „1“ bewertet.

(1=M. adductor magnus, 2=M. gracilis, 3=M. adductor longus, 4=M. rectus femoris, 5=M. semimembranosus, 6=M. biceps femoris, 7=M. tibialis anterior, 8=M. gastrocnemius, 9=M. erector spinae, 10=M. rectus abdominis, 11=M. biceps brachii, 12=M. triceps brachii, 13=M. deltoideus)

In der computergestützten GSL-Analyse wurden für die in Abbildung 8 dargestellten Muskeln eines Patienten und der in Abbildung 9 dargestellten Muskeln einer altersgerechten Kontrolle folgende Werte ermittelt:

	Mittlerer Grauwert Patient / 5,7 Jahre	Mittlerer Grauwert Kontrolle / 5,8 Jahre
M. rectus femoris	65	56
M. adductor longus	55	45
M. gracilis	67	61
M. adductor magnus	114	63
M. semimembranosus	39	64
M. biceps femoris	17	60
M. tibialis anterior	48	71
M. gastrocnemius	74	72
M. erector spinae	75	54
M. rectus abdominis	50	33
M. biceps brachii	48	55
M. triceps brachii	68	28
M. deltoideus	45	32

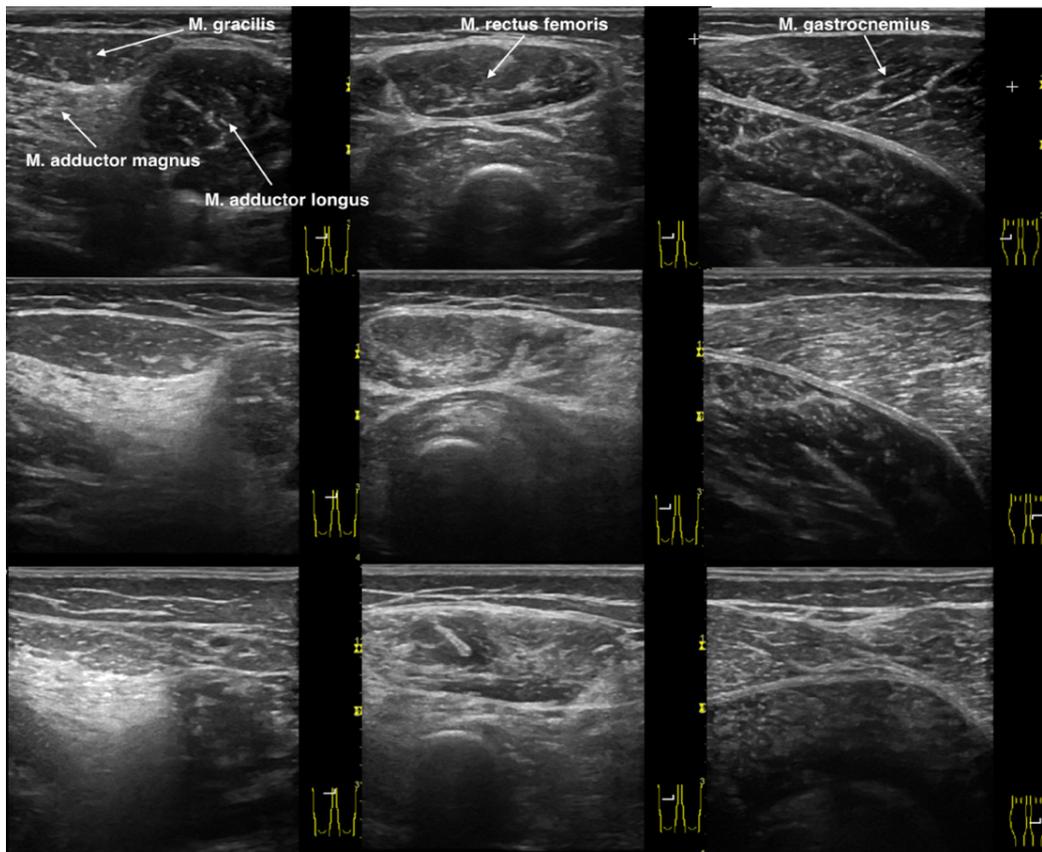
Die Abbildungen 14 zeigt nun ausschnittsweise die Veränderungen im Bereich der Adduktoren, des M. rectus femoris und des M. gastrocnemius des Patienten 9 (Alter 5-6,5 Jahre) sowie des Patienten 11 (Alter 8-9,5 Jahre) über einen zeitlichen Verlauf von 18 Monaten. Die überproportionale Zunahme der Echogenität beim M. adductor magnus ist deutlich zu erkennen.



P 9 / Alter 5 Jahre

P 9 / Alter 5,7 Jahre

P 9 / Alter 6,5 Jahre



P 11 / Alter 8 Jahre

P 11 / Alter 9 Jahre

P 11 / Alter 9,5 Jahre

**Abbildung 14** Sonographische Verlaufsuntersuchungen von zwei Patienten mit Darstellung der medialen und ventralen Muskeln des Oberschenkels und des M. gastrocnemius (ermittelte Grauwerte siehe Tabellen auf Seite 43).

Die computergestützten Analysen der sonographischen Befunde der Patienten P9 und P11 (Abbildung 14) im zeitlichen Verlauf ergaben folgende GSL-Werte (Skala 0-256); zum Vergleich wurden GSL-Werte von altersgerechten Kontrollen ergänzt:

	P 9 / Alter 5 Jahre	P 9 / Alter 5,7 Jahre	P 9 / Alter 6,5 Jahre	Kontrolle / Alter 6 Jahre
<b>M. adductor magnus (1)</b>	103	114	136	76
<b>M. gracilis (2)</b>	85	67	67	73
<b>M. adductor longus (3)</b>	48	55	57	50
<b>M. rectus femoris (4)</b>	95	66	61	72
<b>M. gastrocnemius (8)</b>	69	75	58	62

	P 11 / Alter 8 Jahre	P 11 / Alter 9 Jahre	P 11 / Alter 9,5 Jahre	Kontrolle / Alter 9,5 Jahre
<b>M. adductor magnus (1)</b>	92	157	169	78
<b>M. gracilis (2)</b>	57	85	117	75
<b>M. adductor longus (3)</b>	28	64	61	75
<b>M. rectus femoris (4)</b>	66	102	101	63
<b>M. gastrocnemius (8)</b>	55	102	84	47

Im verblindeten visuellen Rating wurden dieselben Befunde hinsichtlich der Echogenität von den drei bewertenden Ärzten anhand der modifizierten Heckmatt-Skala wie folgt bewertet:

	P 9 / Alter 5 Jahre	P 9 / Alter 5,7 Jahre	P 9 / Alter 6,5 Jahre	Kontrolle / Alter 6 Jahre
<b>M. adductor magnus (1)</b>	2/1/2	2/2/2	3/2/3	1/1/1
<b>M. gracilis (2)</b>	1/1/1	1/1/1	1,5/1/1,5	1/1/1
<b>M. adductor longus (3)</b>	1/1/1	1/1/1	1,5/1/1	1/1/1
<b>M. rectus femoris (4)</b>	1/1/1	1/1/2	1,5/1/1	1/1/1
<b>M. gastrocnemius (8)</b>	2/1/2	2/1/2	1/1/1	1/1/1

	P 11 / Alter 8 Jahre	P 11 / Alter 9 Jahre	P 11 / Alter 9,5 Jahre	Kontrolle / Alter 9,5 Jahre
<b>M. adductor magnus (1)</b>	2/3/2	4/3/4	4/3/4	1/1/1
<b>M. gracilis (2)</b>	1/1/1	1/1/1	2/2/1	1/1/1
<b>M. adductor longus (3)</b>	1/1/1	1/1/1	2/2/2	1/1/1
<b>M. rectus femoris (4)</b>	1/1/1	2/2/2	3/2/2	1/1/1
<b>M. gastrocnemius (8)</b>	1/1/1	2/2/2	2/2/2	1/1/1

Sowohl bei der computergestützten Auswertung als auch bei der visuellen Auswertung zeigte der M. adductor magnus die größten Veränderungen im Echogenitätsniveau. Bei den Kontrollkohorten konnten bei beiden Methoden keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

#### 4.5 Alter bei ersten Veränderungen im Muskelultraschall und Vergleich zum motorischen Plateau

Unter dem motorischen Plateau versteht man die Phase 2 der Duchenne Muskeldystrophie, bei der der Patient zwar keine motorischen Fortschritte mehr macht und zeitgleich noch keine relevanten dystrophischen Umbauprozesse stattgefunden haben. Für diese Studie wurde das motorische Plateau über den 6 min Gehstest definiert (keine weitere Zunahme der Gehstrecke), in die Bewertung flossen aber noch weitere Befunde, die Geschwindigkeit und Technik beim Treppensteigen bzw. beim Aufstehen vom Boden. Vier unserer Patienten, die bereits Veränderungen im Ultraschall zeigten, hatten zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung das motorische Plateau noch nicht erreicht, da sie bis zu diesem Zeitpunkt noch konstant motorische Fortschritte aufwiesen. Diese Kinder waren 2, 3,4, 5,3 und 5,7 Jahre alt.

Beim einem Patienten lässt sich der zeitliche Ablauf der Veränderungen nicht mehr eindeutig nachvollziehen. Bei diesem Patienten waren zum Zeitpunkt der ersten klinischen und sonographischen Untersuchung bereits deutliche Veränderungen im M. adductor magnus sichtbar. Seine motorische Plateauphase hatte der Patient zu diesem Zeitpunkt ebenfalls bereits erreicht.

Bei allen anderen Patienten zeigte sich ein einheitliches Muster, unabhängig vom Alter (Tabelle 2; Abbildungen 7-11), mit sonographischen Veränderungen im M. adductor magnus früher und überproportional ausgeprägter als im M. rectus femoris und im M. gastrocnemius.

Unsere Patienten zeigten die ersten sonographischen Veränderungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Insgesamt konnten Veränderungen der Echogenität in einer Altersspanne von 3,3-8,1 Jahren beobachtet werden. Dies galt sowohl für die visuellen Befunde als auch für die computergestützten Berechnungen. Das Alter der ersten Veränderungen im Ultraschall wurde mit dem motorischen Plateau der Patienten verglichen. Die Daten von 13 Kindern lassen den Rückschluss zu, dass das motorische Plateau innerhalb eines Zeitraums von einigen Monaten bis mehr als 2 Jahre nach dem Auftreten von ersten Veränderungen eintrat.

Drei Patienten unserer Studienkohorte lassen zu dieser Fragestellung keine Rückschlüsse zu. Diese drei Kinder hatten bis zur letzten Untersuchung im Alter von 3,3, 4,9 und 6,6 Jahren noch keinerlei sichtbare Veränderungen im Ultraschall. Zudem hatten sie das motorische Plateau noch nicht erreicht.

## 5 Diskussion

Hinsichtlich der Therapie der DMD gibt es bislang keinen kurativen Ansatz. Kortikosteroide sind bislang die einzigen pharmakologischen Wirkstoffe, die den dystrophischen Umbauprozess der Muskulatur verlangsamen und so die Gehfähigkeit der Patienten verlängern [54, 55]. Dennoch müssen hierbei die Nebenwirkungen einer Behandlung mit Glucocorticoiden (Stammfettsucht, Wachstumshemmung, Osteoporose) berücksichtigt werden. Zum optimalen Behandlungszeitpunkt und dem Therapieschema mit Kortikosteroiden gibt es bislang keinen gemeinsamen Konsens. Es wird allerdings empfohlen, die Therapie zu beginnen, sobald die motorische Entwicklung des Patienten ein Plateau erreicht beziehungsweise sich zu verschlechtern beginnt [49]. Seit Juli 2018 ist das Medikament Ataluren in Europa zugelassen. Die Therapie zielt darauf auf Nonsense-Mutationen zu überbrücken [66] und dementsprechend ein funktionsfähiges Protein zu translatieren. Bei Patienten, die mit Ataluren behandelt wurden, konnte nach einem Behandlungsjahr im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Patienten eine längere Gehstrecke innerhalb von sechs Minuten gemessen werden [70]. Weitere Gentherapeutika werden derzeit erforscht.

Zur Beurteilung der Krankheitsprogression bei der DMD sind reproduzierbare und valide Outcome-Parameter beziehungsweise Methoden notwendig. Klinische Funktionsuntersuchungen (6MWT, TFT, NSAA) sind stark von der Compliance jüngerer Patienten und den kognitiven Fähigkeiten abhängig. Die Beurteilbarkeit der Krankheitsprogression mittels klinischer Funktionstestungen beschränkt sich dadurch auf ältere und mental weniger beeinträchtigte Patienten. Analog verhält es mit der Testung neuer Medikamente [70, 134]. Zusätzlich begrenzt der physiologische Verlauf der DMD den Stellenwert rein motorischer Tests zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs. Das hängt damit zusammen, dass die Kinder bis zur präpubertären Phase weiterhin motorische Fähigkeiten erlangen, obwohl der Krankheitsprozess bereits begonnen hat. Die Geschwindigkeit der normalen Entwicklung "überholt" quasi die frühe Phase der Muskeldegeneration, was schließlich zu einer Plateauphase im Grundschulalter führt (in unserer Kohorte im mittleren Alter von 7 Jahren). Das individuelle Alter des Plateaus ist entsprechend nicht genau vorhersagbar, wie es die Fälle in der Abbildung 14 unserer Kohorte veranschaulichen. Folglich muss die Verbesserung der motorischen Fähigkeiten infrage gestellt werden, solange nicht klar ist, ob sich der Patient bereits in der Phase der motorischen Regression befindet. Eine

Vergleichbarkeit ist nur dann möglich, wenn der Patient bereits einen gewissen Grad des dystrophischen Umbauprozesses durchlaufen hat. Daher scheint die Messung der Verbesserung in rein motorischen Tests im Wesentlichen erst ab dem Alter von 6-7 Jahren valide.

Einige Studien verwenden als Surrogatmarker die Dystrophin-Expression in Muskelbiopsien [134], was ein invasives Verfahren darstellt. Die Entwicklung weiterer valider und funktioneller Outcome-Parameter sind somit Grundvoraussetzung, um die Evidenz für klinische Studien bei Jungen mit frühzeitig erkannter DMD zu erhöhen [135].

Der Muskelultraschall und die Magnetresonanztomographie werden zu diesem Zweck bereits eingesetzt. In mehreren MRT-Studien wurden diffuse fibrös-fette Veränderungen auf MRT-Scans der T1-gewichteten-Muskeln von DMD-Patienten dargestellt und das ausgeprägte Beteiligungsmuster der unteren Gliedmaßen beschrieben [103, 109, 110]. Die MRT ist zwar nicht vom behandelnden Arzt abhängig, sie stellt bei jüngeren Patienten jedoch oft eine Herausforderung dar, da sie stark von der Mitarbeit des Patienten abhängt und in der Regel eine Narkose oder Sedierung der jungen Patienten notwendig ist. Im Vergleich zur MRT bedürfen Ultraschalluntersuchungen keiner Sedierung oder Narkose und sind in der klinischen Praxis zur Verlaufsbeurteilung kostengünstig und nahezu ubiquitär verfügbar.

Dem aktuellen Stand der Literatur nach, ist die frühe und deutlich sichtbare sonographische Beteiligung des M. adductor magnus allerdings noch nicht beschrieben. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der M. adductor magnus im Verhältnis zu anderen Muskelgruppen überproportional früh und deutlich betroffen ist. Bei allen Patienten, die im Muskelultraschall bereits nachweisbare Veränderungen aufwiesen, war einheitlich der M. adductor magnus der erste betroffene Muskel. Diese Veränderungen waren sowohl in der computergestützten Auswertung als bei der visuellen Auswertung ersichtlich. In unserer Studie gingen diese Veränderungen der sichtbaren Degeneration des M. rectus femoris und des M. gastrocnemius voraus, welche bislang üblicherweise in Ultraschallstudien zur DMD untersucht wurden [121, 136]. Die sonographischen Veränderungen des M. adductor magnus waren zudem bei der Mehrheit der Patienten vor Erreichen ihrer motorischen Plateauphase nachweisbar, traten bei der Hälfte der Patienten vor dem Alter von 5 Jahren auf und gingen der motorischen Regression voraus. Dementsprechend können die Ergebnisse dieser Studie einen eindeutigen Beitrag hinsichtlich des Untersuchungsprotokolls leisten. Unsere Daten zeigen, dass ein erweitertes Standardprotokoll dazu beitragen könnte, dass vor allem auch jüngere Patienten,

die bereits einen relevanten dystrophischen Prozess durchlaufen haben, im Verlauf leichter beurteilt werden. Ferner kann mit unseren Ergebnissen die Erkennungsrate von frühen Veränderungen in der DMD verbessert und die Differentialdiagnose einer neuromuskulären Erkrankung durch Mustererkennung erleichtert werden. Mehrere Studien konnten die hohe Sensitivität und Spezifität des Ultraschalls bei der Erkennung von neuromuskulären Störungen belegen [118-122]. Insbesondere sollte der M. adductor magnus, der den Beginn des sonographischen Umbaus darstellt, in das sonographische Untersuchungsprotokoll mit einbezogen werden. Angesichts der verfügbaren MRT-Daten kann diskutiert werden, ob der Musculus gluteus maximus auch bei sehr jungen Patienten, insbesondere in klinischen Studien, in das Untersuchungsprotokoll aufgenommen werden sollte. Technisch gesehen ist dies allerdings recht schwierig, da der M. gluteus maximus aufgrund des subkutanen Fettgewebes am Gesäß nicht gut durch den Ultraschall darzustellen ist.

In unserer Studie wurden die sonographischen Befunde sowohl visuell als auch computergestützt ausgewertet. In beiden Methoden konnte ein signifikanter Anstieg in etwa der Hälfte der untersuchten Muskelgruppen festgestellt werden. In früheren Studien wurden eine höhere Sensitivität und Spezifität der GSL-Analyse im Vergleich zur visuellen Analyse beschrieben [128, 137, 138] und es wurde empfohlen, den quantitativen Ultraschall als Outcome-Parameter für die Beurteilung von Jungen mit DMD zu nutzen. Ein Anstieg des GSL korrelierte dabei mit der Gehfähigkeit, der funktionellen Einstufung, der Muskelkraft und den motorischen Fähigkeiten [139]. Je früher ein dystrophischer Umbau in der Sonographie quantifiziert werden konnte, umso später wurde das freie Gehen erlernt und ferner war umso früher ein Verlust ein Verlust motorischer Fähigkeiten zu erwarten. Ein schwerer Phänotyp könnte demnach mit einem verspäteten Erreichen motorischer Meilensteine assoziiert sein. Dennoch sollte berücksichtigt werden, dass diese Studie keine Daten zu kognitiven Defiziten enthält und dass solche die frühe motorische Entwicklung ebenfalls beeinflussen können.

Die computergestützte Analyse kann gegenüber dem qualitativen Ultraschall jedoch nicht als deutlich überlegen angesehen werden. Da die visuelle Bewertung von Muskelveränderungen in der Regel auf einer Vier-Punkte-Skala basiert, ist die GSL-Analyse im Durchschnitt zwar etwas präziser, erst kürzlich wurden die Sensitivität und Spezifität des qualitativen Muskelultraschalls durch einen Vergleich der sonographischen Klassifikation von Muskelgewebsveränderungen mit klinischen und elektrophysiologischen Ergebnissen in einer

Studie mit mehr als 130 Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen bewertet. Die Autoren konnten dabei eine Genauigkeit von 82% bei der Erkennung myopathischer Veränderungen erzielen [135]. Diese Genauigkeit hängt jedoch maßgeblich von den Erfahrungen des Untersuchers ab. Ein großer Nachteil der GSL-Analyse gegenüber des qualitativen Ultraschalls ist der Zeitfaktor. Bei der GSL-Analyse müssen die Ultraschallbefunde nach der Aufnahme schließlich noch ausgewertet werden. Die ermittelten Werte hängen außerdem stark von dem jeweils benutzten Ultraschallgerät ab. Entsprechend würde man für eine valide Auswertung für das jeweilige Gerät eine Kontrollgruppe benötigen, um standardisierte Werte festzulegen. Dadurch, dass bei der GSL-Analyse Momentaufnahmen der sonographischen Untersuchungen dargestellt werden, geht die Dynamik, welche grundsätzlich ein entscheidender Charakterzug des Ultraschalls ist, verloren.

Aufgrund dessen und der Tatsache, dass die Ergebnisse der visuellen und computergestützten Analyse in dieser Studie vergleichbar sind (siehe Abbildungen 7-11 und Tabellen 4 und 5), wird somit durch unsere Arbeitsgruppe nahegelegt, dass in Kliniken der qualitative Muskelultraschall die Methode der ersten Wahl bleiben sollte. Die GSL-Bestimmung könnte in der klinischen Arzneimittelentwicklung jedoch durchaus einen Stellenwert finden. Dabei müsste jedoch eine zentrenübergreifende Vergleichbarkeit durch Vorgabe von Geräten und Einstellungen an den einzelnen Standorten angestrebt werden.

## 6 Zusammenfassung

Mit etwa einem von 3500 betroffenen männlichen Neugeborenen ist die DMD die am häufigsten x-chromosomal vererbte muskuläre Erkrankung im Kindesalter [1, 2]. Betroffene Jungen fallen durch eine verzögerte motorische Entwicklung auf und werden im weiteren Verlauf schließlich rollstuhlpflichtig. Pathophysiologisch zeichnet sich die Erkrankung durch Mutationen im Dystrophin-Gen aus, welches im gesunden Zustand die Muskelfasern vor kontraktionsbedingten Schäden schützt. Bei erkrankten Kindern resultiert durch die Mutationen ein Dystrophinmangel, der zu einem Untergang der Muskelfasern führt, welche nachfolgend durch Binde- und Fettgewebe ersetzt werden [25, 34, 35].

Durch bildgebende Verfahren können diese dystrophischen Umbauprozesse dargestellt werden. Hierzu eignen sich die MRT und der Muskelultraschall. Mittels beider Untersuchungen ist das Remodelling durch einen Anstieg der Intensität (MRT) beziehungsweise der Echogenität (Sonographie) erkennbar. Im Vergleich zur MRT bedürfen Ultraschalluntersuchungen keiner Sedierung oder Narkose und sind in der klinischen Praxis zur Verlaufsbeurteilung kostengünstig und nahezu ubiquitär verfügbar. Prospektive Studien bei Kindern haben bei der Auswertung der Muskelechogenität via Ultraschalldiagnostik eine Sensitivität von 87-92% (durch Quantifizierung der Echogenität des Muskels) und eine Spezifität von 84-92% ergeben [120, 126, 127].

Ziel dieser Studie war es, ein reproduzierbares Muster der Muskelbeteiligung anhand des Muskelultraschalls in frühen Stadien zu erkennen, möglicherweise sogar bereits vor dem Nachweis eines motorischen Regresses.

Dafür wurden 25 Kinder mit genetisch nachgewiesener DMD über einen Zeitraum von drei Jahren (2015-2018) mittels qualitativem und quantitativem Ultraschall an 13 Muskelgruppen untersucht. Die Patienten waren bei der Erstuntersuchung zwischen 1 und 6 Jahre alt und zeigten noch keine Verschlechterung in ihren motorischen Fähigkeiten. Zur Definition der Normwerte wurde eine Kontrollkohorte an gesunden Kindern nach identischem Schema untersucht. Die Ultraschallbefunde wurden quantitativ mittels GSL durch das Programm ImageJ und qualitativ mittels verblindeter visueller Beurteilung via modifizierter Heckmatt-Skala durch drei im Muskelultraschall bei neuromuskulären Erkrankungen erfahrene Ärzte bewertet. Die statistische Analyse wurde mit Microsoft Excel 2020 durchgeführt.

Mithilfe des Muskelultraschalls konnte der M. adductor magnus als der Muskel mit den frühesten und auffälligsten Veränderungen identifiziert werden. Diese Veränderungen gingen der motorischen Regression der Patienten voraus. Beim Muskelultraschall-Screening setzen bislang viele Zentren den Fokus auf den M. quadriceps femoris, den M. biceps brachii oder die Wadenmuskulatur [121, 136]. Die aus dieser klinischen Studie gewonnenen Daten zeigen, dass ein erweitertes Untersuchungsprotokoll, unter Einbeziehung der Adduktoren, die Erkennung von frühen Veränderungen in der DMD verbessern könnte. Bei der Hälfte der Patienten traten die dystrophischen Veränderungen am M. adductor magnus bereits vor dem 5. Lebensjahr auf. Dementsprechend könnten jüngere Patienten, die bereits dystrophische Veränderungen aufweisen, von einer standardisierten Verlaufsbeurteilung profitieren, insbesondere was die individuelle Therapieentscheidung betrifft. Bislang sind noch keine eindeutigen Daten zum optimalen Behandlungsbeginn mit Kortikosteroiden veröffentlicht. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Birnkrant et al. wird empfohlen, die Behandlung mit Kortikosteroiden zu beginnen, bevor die motorischen Fähigkeiten signifikant abnehmen [140]. Da das Alter des Erreichens der motorischen Plateauphase variabel ist, könnte der sonographische Nachweis eines dystrophischen Remodellings in einzelnen Muskelgruppen in die Entscheidung über den Zeitpunkt des Therapiebeginns mit Kortikosteroiden miteinbezogen werden. Zudem lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass der Einsatz des Muskelultraschalls zur Beurteilung der Wirksamkeit neuer pharmakologischer Substanzen in der jüngeren Patientenkohorte sinnvoll sein könnte.

### Schlussfolgerung

Wir erhoffen uns, mit dem aus dieser klinischen Studie erworbenen Wissen einen Mehrwert in den Therapieansätzen der DMD zu schaffen, den Muskelultraschall als routinemäßig genutztes klinisches Untersuchungsinstrument in neuropädiatrischen Zentren weiter zu etablieren und den M. adductor magnus mit in das Untersuchungsprotokoll aufzunehmen. Ferner könnte der Muskelultraschall insbesondere bei jüngeren Patienten als zusätzliche Methode zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs, eventuell auch standardisiert im Rahmen klinischer Studien und zur Entscheidungsfindung bezüglich des optimalen Zeitpunkts zum Therapiebeginn mit Kortikosteroiden, bei DMD-Patienten eingesetzt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Emery, A.E., *The muscular dystrophies*. Lancet, 2002. **359**(9307): p. 687-95.
2. Zubrzycka-Gaarn, E.E., et al., *The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle*. Nature, 1988. **333**(6172): p. 466-9.
3. Bushby, K., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management*. Lancet Neurol, 2010. **9**(1): p. 77-93.
4. Eagle, M., et al., *Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation*. Neuromuscul Disord, 2002. **12**(10): p. 926-9.
5. Kohler, M., et al., *Disability and survival in Duchenne muscular dystrophy*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009. **80**(3): p. 320-5.
6. Darras, B., et al., *Chapter 30. Neuromuscular disorders of infancy, childhood, and adolescence a clinicians approach*, 2015. **2**: p. 551-92.
7. Brooke, M.H., et al., *Duchenne muscular dystrophy: patterns of clinical progression and effects of supportive therapy*. Neurology, 1989. **39**(4): p. 475-81.
8. Boland, B.J., et al., *Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy*. Pediatr Neurol, 1996. **14**(1): p. 7-12.
9. McDonald, C.M., et al., *Profiles of neuromuscular diseases. Duchenne muscular dystrophy*. Am J Phys Med Rehabil, 1995. **74**(5 Suppl): p. S70-92.
10. Nigro, G., et al., *The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy*. Int J Cardiol, 1990. **26**(3): p. 271-7.
11. Khirani, S., et al., *Respiratory muscle decline in Duchenne muscular dystrophy*. Pediatr Pulmonol, 2014. **49**(5): p. 473-81.
12. Phillips, M.F., et al., *Changes in spirometry over time as a prognostic marker in patients with Duchenne muscular dystrophy*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(12): p. 2191-4.
13. Suresh, S., et al., *Sleep-related breathing disorder in Duchenne muscular dystrophy: disease spectrum in the paediatric population*. J Paediatr Child Health, 2005. **41**(9-10): p. 500-3.
14. Ragette, R., et al., *Patterns and predictors of sleep disordered breathing in primary myopathies*. Thorax, 2002. **57**(8): p. 724-8.
15. Symons, A.L., G.C. Townsend, and T.E. Hughes, *Dental characteristics of patients with Duchenne muscular dystrophy*. ASDC J Dent Child, 2002. **69**(3): p. 277-83, 234.
16. Leibowitz, D. and V. Dubowitz, *Intellect and behaviour in Duchenne muscular dystrophy*. Dev Med Child Neurol, 1981. **23**(5): p. 577-90.
17. Hendriksen, J.G. and J.S. Vles, *Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive--compulsive disorder*. J Child Neurol, 2008. **23**(5): p. 477-81.
18. Sadoulet-Puccio, H.M. and L.M. Kunkel, *Dystrophin and Its Isoforms*. Brain Pathology, 1996. **6**(1): p. 25-35.
19. Roberts, R.G., *Dystrophins and dystrobrevins*. Genome biology, 2001. **2**(4): p. reviews3006. 1.
20. Cohn, R.D. and K.P. Campbell, *Molecular basis of muscular dystrophies*. Muscle & Nerve, 2000. **23**(10): p. 1456-1471.

21. Duan, D., *Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy*. *Mol Ther*, 2018. **26**(10): p. 2337-2356.
22. Ljubicic, V., M. Burt, and B.J. Jasmin, *The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets*. *Faseb j*, 2014. **28**(2): p. 548-68.
23. Ogura, Y., et al., *Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy*. *Front Cell Dev Biol*, 2014. **2**: p. 11.
24. Cirak, S., et al., *Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study*. *Lancet*, 2011. **378**(9791): p. 595-605.
25. Aartsma-Rus, A., et al., *Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule*. *Muscle Nerve*, 2006. **34**(2): p. 135-44.
26. Okubo, M., et al., *Exon skipping induced by nonsense/frameshift mutations in DMD gene results in Becker muscular dystrophy*. *Hum Genet*, 2020. **139**(2): p. 247-255.
27. Muntoni, F., S. Torelli, and A. Ferlini, *Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes*. *Lancet Neurol*, 2003. **2**(12): p. 731-40.
28. Blake, D.J., et al., *Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle*. *Physiological reviews*, 2002. **82**(2): p. 291-329.
29. Sironi, M., et al., *The dystrophin gene is alternatively spliced throughout its coding sequence*. *FEBS letters*, 2002. **517**(1-3): p. 163-166.
30. Rando, T.A., *The dystrophin–glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies*. *Muscle & Nerve*, 2001. **24**(12): p. 1575-1594.
31. Campbell, K.P. and S.D. Kahl, *Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein*. *Nature*, 1989. **338**(6212): p. 259-262.
32. Nowak, K.J. and K.E. Davies, *Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment*. *EMBO reports*, 2004. **5**(9): p. 872-876.
33. Danowski, B.A., et al., *Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes*. *The Journal of cell biology*, 1992. **118**(6): p. 1411-1420.
34. Rybakova, I.N., J.R. Patel, and J.M. Ervasti, *The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin*. *The Journal of cell biology*, 2000. **150**(5): p. 1209-1214.
35. Williams, M.W. and R.J. Bloch, *Differential distribution of dystrophin and  $\beta$ -spectrin at the sarcolemma of fast twitch skeletal muscle fibers*. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 1999. **20**(4): p. 383-393.
36. Hoffman, E.P. and D. Dressman, *Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy*. *Trends in pharmacological sciences*, 2001. **22**(9): p. 465-470.
37. Schmalbruch, H., *Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: a serial section study*. *Neurology*, 1984. **34**(1): p. 60-60.
38. McDouall, R.M., M.J. Dunn, and V. Dubowitz, *Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy*. *Journal of the neurological sciences*, 1990. **99**(2-3): p. 199-217.
39. Blake, D.J., et al., *Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(2): p. 291-329.

40. Ciafaloni, E., et al., *Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet)*. The Journal of pediatrics, 2009. **155**(3): p. 380-385.
41. Mirski, K.T. and T.O. Crawford, *Motor and cognitive delay in Duchenne muscular dystrophy: implication for early diagnosis*. The Journal of pediatrics, 2014. **165**(5): p. 1008-1010.
42. Manzur, A.Y., et al., *Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy*. Cochrane database of systematic reviews, 2008(1).
43. Jeppesen, J., et al., *The Duchenne muscular dystrophy population in Denmark, 1977–2001: prevalence, incidence and survival in relation to the introduction of ventilator use*. Neuromuscular Disorders, 2003. **13**(10): p. 804-812.
44. Yasuma, F., et al., *A new lease on life for patients with Duchenne muscular dystrophy in Japan*. The American journal of medicine, 2004. **117**(5): p. 363.
45. Eagle, M., et al., *Managing Duchenne muscular dystrophy--the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival*. Neuromuscul Disord, 2007. **17**(6): p. 470-5.
46. Passamano, L., et al., *Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients*. Acta Myol, 2012. **31**(2): p. 121-5.
47. Rall, S. and T. Grimm, *Survival in Duchenne muscular dystrophy*. Acta Myol, 2012. **31**(2): p. 117-20.
48. Bushby, K., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care*. Lancet Neurol, 2010. **9**(2): p. 177-89.
49. Birnkrant, D.J., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management*. Lancet Neurol, 2018. **17**(4): p. 347-361.
50. Raman, S.V., et al., *Eplerenone for early cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet Neurol, 2015. **14**(2): p. 153-61.
51. Raman, S.V., et al., *Eplerenone for early cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy: results of a two-year open-label extension trial*. Orphanet J Rare Dis, 2017. **12**(1): p. 39.
52. Buddhe, S., et al., *Cardiac Management of the Patient With Duchenne Muscular Dystrophy*. Pediatrics, 2018. **142**(Suppl 2): p. S72-s81.
53. Velasco, M.V., et al., *Posterior spinal fusion for scoliosis in duchenne muscular dystrophy diminishes the rate of respiratory decline*. Spine (Phila Pa 1976), 2007. **32**(4): p. 459-65.
54. King, W.M., et al., *Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy*. Neurology, 2007. **68**(19): p. 1607-13.
55. Kinali, M., et al., *Predictive factors for the development of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy*. Eur J Paediatr Neurol, 2007. **11**(3): p. 160-6.
56. Moxley, R.r., et al., *Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society*. Neurology, 2005. **64**(1): p. 13-20.
57. Bushby, K., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management*. The Lancet Neurology, 2010. **9**(1): p. 77-93.

58. Angelini, C., et al., *Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect*. Muscle Nerve, 1994. **17**(4): p. 386-91.
59. Mesa, L.E., et al., *Steroids in Duchenne muscular dystrophy--deflazacort trial*. Neuromuscul Disord, 1991. **1**(4): p. 261-6.
60. Balaban, B., et al., *Corticosteroid treatment and functional improvement in Duchenne muscular dystrophy: long-term effect*. Am J Phys Med Rehabil, 2005. **84**(11): p. 843-50.
61. Biggar, W.D., et al., *Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade*. Neuromuscul Disord, 2006. **16**(4): p. 249-55.
62. Daftary, A.S., et al., *Effect of long-term steroids on cough efficiency and respiratory muscle strength in patients with Duchenne muscular dystrophy*. Pediatrics, 2007. **119**(2): p. e320-4.
63. McDonald, C.M., et al., *Deflazacort vs prednisone treatment for Duchenne muscular dystrophy: A meta-analysis of disease progression rates in recent multicenter clinical trials*. Muscle Nerve, 2020. **61**(1): p. 26-35.
64. Manzur, A.Y., et al., *Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(1): p. Cd003725.
65. Eagle, M., et al., *Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation*. Neuromuscular disorders, 2002. **12**(10): p. 926-929.
66. Peltz, S.W., et al., *Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression*. Annual review of medicine, 2013. **64**: p. 407-425.
67. Welch, E.M., et al., *PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations*. Nature, 2007. **447**(7140): p. 87.
68. Finkel, R.S., et al., *Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy*. PloS one, 2013. **8**(12): p. e81302.
69. Dent, K., et al., *Improved molecular diagnosis of dystrophinopathies in an unselected clinical cohort*. American journal of medical genetics Part A, 2005. **134**(3): p. 295-298.
70. Bushby, K., et al., *Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy*. Muscle Nerve, 2014. **50**(4): p. 477-87.
71. Kole, R. and A.M. Krieg, *Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy*. Adv Drug Deliv Rev, 2015. **87**: p. 104-7.
72. Bladen, C.L., et al., *The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations*. Hum Mutat, 2015. **36**(4): p. 395-402.
73. Food, U., *FDA grants accelerated approval to first drug for Duchenne muscular dystrophy*. 2016, US Food and Drug Administration.
74. Kinali, M., et al., *Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study*. Lancet Neurol, 2009. **8**(10): p. 918-28.
75. Mendell, J.R., et al., *Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy*. Ann Neurol, 2016. **79**(2): p. 257-71.
76. Harper, S.Q., et al., *Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 253-61.

77. Seto, J.T., N.E. Bengtsson, and J.S. Chamberlain, *Therapy of Genetic Disorders-Novel Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy*. *Curr Pediatr Rep*, 2014. **2**(2): p. 102-112.
78. Guiraud, S., et al., *The Pathogenesis and Therapy of Muscular Dystrophies*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2015. **16**: p. 281-308.
79. Wright, J.F., *Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies*. *Gene Ther*, 2008. **15**(11): p. 840-8.
80. Gregorevic, P., et al., *rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice*. *Nat Med*, 2006. **12**(7): p. 787-9.
81. Gregorevic, P., et al., *Systemic microdystrophin gene delivery improves skeletal muscle structure and function in old dystrophic mdx mice*. *Mol Ther*, 2008. **16**(4): p. 657-64.
82. Banks, G.B., J.S. Chamberlain, and S.C. Froehner, *Truncated dystrophins can influence neuromuscular synapse structure*. *Mol Cell Neurosci*, 2009. **40**(4): p. 433-41.
83. Banks, G.B., et al., *Molecular and cellular adaptations to chronic myotendinous strain injury in mdx mice expressing a truncated dystrophin*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(24): p. 3975-86.
84. Boxer, R., et al., *The 6-minute walk is associated with frailty and predicts mortality in older adults with heart failure*. *Congest Heart Fail*, 2010. **16**(5): p. 208-13.
85. Baptista, V.C., et al., *Six-minute walk test as a tool for assessing the quality of life in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery*. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2012. **27**(2): p. 231-9.
86. Rhodes, J., A. Ubeda Tikkanen, and K.J. Jenkins, *Exercise testing and training in children with congenital heart disease*. *Circulation*, 2010. **122**(19): p. 1957-67.
87. *ATS statement: guidelines for the six-minute walk test*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **166**(1): p. 111-7.
88. Mylius, C.F., D. Paap, and T. Takken, *Reference value for the 6-minute walk test in children and adolescents: a systematic review*. *Expert Rev Respir Med*, 2016. **10**(12): p. 1335-1352.
89. McDonald, C.M., et al., *The 6-minute walk test in Duchenne/Becker muscular dystrophy: longitudinal observations*. *Muscle Nerve*, 2010. **42**(6): p. 966-74.
90. Hamuro, L., et al., *Developing a Natural History Progression Model for Duchenne Muscular Dystrophy Using the Six-Minute Walk Test*. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2017. **6**(9): p. 596-603.
91. Mendell, J.R., et al., *Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy*. *N Engl J Med*, 1989. **320**(24): p. 1592-7.
92. Griggs, R.C., et al., *Prednisone in Duchenne dystrophy. A randomized, controlled trial defining the time course and dose response*. *Clinical Investigation of Duchenne Dystrophy Group*. *Arch Neurol*, 1991. **48**(4): p. 383-8.
93. Scott, E., et al., *Development of a functional assessment scale for ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy*. *Physiother Res Int*, 2012. **17**(2): p. 101-9.
94. Mazzone, E.S., et al., *Reliability of the North Star Ambulatory Assessment in a multicentric setting*. *Neuromuscul Disord*, 2009. **19**(7): p. 458-61.
95. Scott, E. and S.J. Mawson, *Measurement in Duchenne muscular dystrophy: considerations in the development of a neuromuscular assessment tool*. *Dev Med Child Neurol*, 2006. **48**(6): p. 540-4.

96. Mazzone, E., et al., *North Star Ambulatory Assessment, 6-minute walk test and timed items in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy*. *Neuromuscul Disord*, 2010. **20**(11): p. 712-6.
97. Mayhew, A.G., et al., *Detecting meaningful change using the North Star Ambulatory Assessment in Duchenne muscular dystrophy*. *Dev Med Child Neurol*, 2013. **55**(11): p. 1046-52.
98. Messina, S., et al., *Health-related quality of life and functional changes in DMD: A 12-month longitudinal cohort study*. *Neuromuscul Disord*, 2016. **26**(3): p. 189-96.
99. Ricotti, V., et al., *The NorthStar Ambulatory Assessment in Duchenne muscular dystrophy: considerations for the design of clinical trials*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2016. **87**(2): p. 149-55.
100. Bello, L., et al., *DMD genotypes and loss of ambulation in the CINRG Duchenne Natural History Study*. *Neurology*, 2016. **87**(4): p. 401-9.
101. van den Bergen, J.C., et al., *Prolonged Ambulation in Duchenne Patients with a Mutation Amenable to Exon 44 Skipping*. *J Neuromuscul Dis*, 2014. **1**(1): p. 91-94.
102. Servais, L., et al., *Non-Ambulant Duchenne Patients Theoretically Treatable by Exon 53 Skipping have Severe Phenotype*. *J Neuromuscul Dis*, 2015. **2**(3): p. 269-279.
103. Mercuri, E., et al., *Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: past, present, and future*. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2007. **25**(2): p. 433-440.
104. Wattjes, M.P., R.A. Kley, and D. Fischer, *Neuromuscular imaging in inherited muscle diseases*. *European radiology*, 2010. **20**(10): p. 2447-2460.
105. Straub, V., P.G. Carlier, and E. Mercuri, *TREAT-NMD workshop: pattern recognition in genetic muscle diseases using muscle MRI: 25–26 February 2011, Rome, Italy*. *Neuromuscular Disorders*, 2012. **22**: p. S42-S53.
106. Kesper, K., et al., *Pattern of skeletal muscle involvement in primary dysferlinopathies: a whole-body 3.0-T magnetic resonance imaging study*. *Acta neurologica Scandinavica*, 2009. **120**(2): p. 111-118.
107. Degardin, A., et al., *Morphologic imaging in muscular dystrophies and inflammatory myopathies*. *Skeletal radiology*, 2010. **39**(12): p. 1219-1227.
108. Tasca, G., et al., *Upper girdle imaging in facioscapulohumeral muscular dystrophy*. *PloS one*, 2014. **9**(6).
109. Liu, G., et al., *Duchenne muscular dystrophy: MR grading system with functional correlation*. *Radiology*, 1993. **186**(2): p. 475-480.
110. Liu, M., N. Chino, and T. Ishihara, *Muscle damage progression in Duchenne muscular dystrophy evaluated by a new quantitative computed tomography method*. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 1993. **74**(5): p. 507-514.
111. Marden, F.A., et al., *Compositional analysis of muscle in boys with Duchenne muscular dystrophy using MR imaging*. *Skeletal radiology*, 2005. **34**(3): p. 140-148.
112. Fish, P., *Physics and instrumentation of diagnostic medical ultrasound*. 1990: John Wiley & Sons Incorporated.
113. Shirley, I.M., *A user's guide to diagnostic ultrasound*. 1978: Pitman Medical.
114. Cosgrove, D., C. Grainger, and D. Allison, *Diagnostic radiology. A Text book of Medical imaging*, 1992. **3**: p. 83-95.
115. Wild, J.J. and D. Neal, *Use of high-frequency ultrasonic waves for detecting changes of texture in living tissues*. *Lancet*, 1951. **1**(6656): p. 655-7.
116. Heckmatt, J.Z., V. Dubowitz, and S. Leeman, *Detection of pathological change in dystrophic muscle with B-scan ultrasound imaging*. *Lancet*, 1980. **1**(8183): p. 1389-90.

117. Pillen, S., et al., *Quantitative skeletal muscle ultrasonography in children with suspected neuromuscular disease*. *Muscle Nerve*, 2003. **27**(6): p. 699-705.
118. Heckmatt, J.Z., S. Leeman, and V. Dubowitz, *Ultrasound imaging in the diagnosis of muscle disease*. *J Pediatr*, 1982. **101**(5): p. 656-60.
119. Fischer, A.Q., et al., *Muscle imaging in neuromuscular disease using computerized real-time sonography*. *Muscle Nerve*, 1988. **11**(3): p. 270-5.
120. Heckmatt, J.Z., N. Pier, and V. Dubowitz, *Real-time ultrasound imaging of muscles*. *Muscle Nerve*, 1988. **11**(1): p. 56-65.
121. Maurits, N.M., et al., *Muscle ultrasound analysis: normal values and differentiation between myopathies and neuropathies*. *Ultrasound Med Biol*, 2003. **29**(2): p. 215-25.
122. Pillen, S., et al., *Quantitative skeletal muscle ultrasound: diagnostic value in childhood neuromuscular disease*. *Neuromuscul Disord*, 2007. **17**(7): p. 509-16.
123. Bargfrede, M., et al., *Quantitative ultrasonography in focal neuropathies as compared to clinical and EMG findings*. *Eur J Ultrasound*, 1999. **10**(1): p. 21-9.
124. Heckmatt, J., et al., *Quantitative sonography of muscle*. *J Child Neurol*, 1989. **4 Suppl**: p. S101-6.
125. Maurits, N.M., et al., *Muscle ultrasound in children: normal values and application to neuromuscular disorders*. *Ultrasound Med Biol*, 2004. **30**(8): p. 1017-27.
126. Brockmann, K., et al., *Sensitivity and specificity of qualitative muscle ultrasound in assessment of suspected neuromuscular disease in childhood*. *Neuromuscul Disord*, 2007. **17**(7): p. 517-23.
127. Zuberi, S.M., et al., *Muscle ultrasound in the assessment of suspected neuromuscular disease in childhood*. *Neuromuscul Disord*, 1999. **9**(4): p. 203-7.
128. Pillen, S., et al., *Skeletal muscle ultrasonography: Visual versus quantitative evaluation*. *Ultrasound Med Biol*, 2006. **32**(9): p. 1315-21.
129. Pillen, S., et al., *Skeletal muscle ultrasonography in children with a dysfunction in the oxidative phosphorylation system*. *Neuropediatrics*, 2006. **37**(3): p. 142-7.
130. Mayhew, J.E., et al., *Reliable surrogate outcome measures in multicenter clinical trials of Duchenne muscular dystrophy*. *Muscle Nerve*, 2007. **35**(1): p. 36-42.
131. Mazzone, E., et al., *Functional changes in Duchenne muscular dystrophy: a 12-month longitudinal cohort study*. *Neurology*, 2011. **77**(3): p. 250-6.
132. McDonald, C.M., et al., *The 6-minute walk test as a new outcome measure in Duchenne muscular dystrophy*. *Muscle Nerve*, 2010. **41**(4): p. 500-10.
133. Vill, K., et al., *Qualitative and quantitative muscle ultrasound in patients with Duchenne muscular dystrophy: Where do sonographic changes begin?* *Eur J Paediatr Neurol*, 2020. **28**: p. 142-150.
134. Finkel, R.S., et al., *Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e81302.
135. Brockmann, K., et al., *Sensitivity and specificity of qualitative muscle ultrasound in assessment of suspected neuromuscular disease in childhood*. *Neuromuscul Disord*, 2007. **17**(7): p. 517-23.
136. Young, A., et al., *Measurement of quadriceps muscle wasting by ultrasonography*. *Rheumatol Rehabil*, 1980. **19**(3): p. 141-8.
137. Zaidman, C.M., et al., *Qualitative and quantitative skeletal muscle ultrasound in late-onset acid maltase deficiency*. *Muscle Nerve*, 2011. **44**(3): p. 418-23.
138. Zaidman, C.M., et al., *Calibrated quantitative ultrasound imaging of skeletal muscle using backscatter analysis*. *Muscle Nerve*, 2008. **38**(1): p. 893-8.

139. Jansen, M., et al., *Quantitative muscle ultrasound is a promising longitudinal follow-up tool in Duchenne muscular dystrophy*. *Neuromuscul Disord*, 2012. **22**(4): p. 306-17.
140. Birnkrant, D.J., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management*. *Lancet Neurol*, 2018. **17**(3): p. 251-267.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>6MWT</b>	6-Minuten-Gehtest (6-minute walk test)
<b>BMD</b>	Muskeldystrophie vom Typ Becker-Kiener
<b>DAPC</b>	Dystrophin-assoziiertes Glykoprotein-Komplex
<b>DMD</b>	Duchenne-Muskeldystrophie
<b>GSL</b>	Graustufenniveau (Grayscale Level)
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>NSAA</b>	North Star Ambulatory Assessment
<b>TFT</b>	Zeitfunktionstestung (Timed Function Test)

## 8.2 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Müller-Felber für die Überlassung des Themas bedanken und ferner für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Katharina Vill, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie stand mir während der gesamten Zeit immer hilfsbereit zur Seite, hatte stets ein offenes Ohr für jegliche Fragen und hat mich während der gesamten Zeit hervorragend betreut. Ein herzlicher Dank gilt auch Frau PD Dr. med. Astrid Blaschek für ihre kompetente Hilfe und Anregungen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden Daniel, Djuan, Lisa, Lucas, Nikhil und Olli, die mich während der Doktorarbeit motiviert und unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Zahn- und Humanmedizinstudium ermöglicht und mir immer den Rücken gestärkt haben.

### 8.3 Eidesstaatliche Versicherung nach §2 Abs. Nr. 6 und 7 PromO

Hiermit erkläre ich, dass die der Ludwig-Maximilians-Universität in München zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Qualitativer und Quantitativer Ultraschall der Muskulatur - ein Parameter zur Verlaufsbeurteilung bei der Muskeldystrophie Duchenne“**

im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Betreuung von PD Dr. med. Katharina Vill

selbständig und ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine andere als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

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

Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

München, 11.02.2022

---

(Mehdi Sehri)