

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. ULRICH BOGDAHN  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

---

**Vorbereitungen zur Validierung einer neuen Methode (MUNIX) zur Abschätzung  
motorischer Einheiten**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Franziska Maria Elisabeth Stein

2016



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR NEUROLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. ULRICH BOGDAHN  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

---

**Vorbereitungen zur Validierung einer neuen Methode (MUNIX) zur Abschätzung  
motorischer Einheiten**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Franziska Maria Elisabeth Stein

2016

Dekan:

Prof. Dr. Dr. med. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Wilhelm Schulte-Mattler

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Göran Hajak

Tag der mündlichen Prüfung:

03.03.2017

## **I Inhaltsverzeichnis**

<b>I Inhaltsverzeichnis</b> .....	3
<b>II Abkürzungsverzeichnis</b> .....	4
<b>III Abbildungsverzeichnis</b> .....	5
<b>IV Tabellenverzeichnis</b> .....	6
<b>V Deutsche Zusammenfassung der Originalpublikation</b> .....	7
<b>1 Einleitung</b> .....	7
<b>2 Methoden</b> .....	8
<b>2.1 Gesunde Probanden</b> .....	8
<b>2.2 ALS-Patienten</b> .....	9
<b>2.3 Ethik</b> .....	9
<b>2.4 Neurophysiologische Untersuchungen</b> .....	9
<b>2.5 Incremental stimulation motor unit number estimation (IS-MUNE)</b> .....	10
<b>2.6 Spike-triggered averaging motor unit number estimation (STA-MUNE)</b> .....	10
<b>2.7 Motor unit number index (MUNIX)</b> .....	11
<b>2.8 Statistik</b> .....	12
<b>3 Ergebnisse</b> .....	12
<b>3.1 Musculus abductor digiti minimi</b> .....	12
<b>3.2 Musculus trapezius</b> .....	15
<b>4 Diskussion</b> .....	16
<b>VI Literaturverzeichnis</b> .....	19
<b>VII Danksagung</b> .....	22
<b>VIII Originalpublikation</b> .....	23

## II Abkürzungsverzeichnis

ADM	Musculus abductor digiti minimi
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
CMAP	engl. compound muscle action potential, Muskelsummenaktionspotential
IS-MUNE	engl. incremental stimulation motor unit number estimation
MU	engl. motor unit, Motorische Einheit
MUAP	engl. motor unit action potential, Aktionspotential der motorischen Einheit
MUNE	engl. motor unit number estimation
MUNIX	engl. motor unit number index
SD	engl. standard deviation, Standardabweichung
SIP	engl. surface interference pattern, Oberflächeninterferenzmuster
SMUP	engl. single motor unit potential, Einzelpotential der motorischen Einheit
STA-MUNE	engl. spike-triggered averaging motor unit number estimation
TRA	Musculus trapezius

### III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Streudiagramm der MUNIX und IS-MUNE Werte (n = 108) im M.abductor digiti minimi von gesunden Probanden (●) und Patienten mit ALS (○).

Korrelation: Spearman's-Rho  $r = 0,88$ ;  $p < 0,001$  ..... 13

Abbildung 2:

Streudiagramm der MUNIX und STA-MUNE Werte (n = 49) im M.trapezius von gesunden Probanden (●) und Patienten mit ALS (○).

Korrelation: Spearman's-Rho  $r = 0,46$ ;  $p = 0,001$  ..... 15

*Die Abbildungen sind gemäß Stein et al. (Stein et al., 2016) erstellt worden.*

#### **IV Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:

MUNIX- und CMAP-Amplituden von gesunden Probanden und ALS-Patienten im Vergleich zu anderen Studien im M.abductor digiti minimi ..... 14

*Die Tabelle ist gemäß Stein et al. (Stein et al., 2016) erstellt worden.*



## **V Deutsche Zusammenfassung der Originalpublikation**

### **Vorbereitungen zur Validierung einer neuen Methode (MUNIX) zur Abschätzung motorischer Einheiten**

#### **1 Einleitung**

Trotz der besonderen medizinischen Bedeutung ist die Abschätzung der Anzahl motorischer Einheiten in einem Muskel bis dato schwierig. Um dies zu verbessern und die Nachteile, wie großen Zeitaufwand und schwierige Durchführbarkeit, der Motor Unit Number Estimation (MUNE) Techniken zu überwinden, wurde eine neue nicht-invasive neurophysiologische Methode (Motor Unit Number Index – MUNIX) entwickelt, welche zunehmend im klinischen Alltag verwendet wird (Ahn et al., 2010; Nandedkar et al., 2010; Nandedkar et al., 2004; Neuwirth et al., 2010). Es ist jedoch noch unklar, ob MUNIX direkt mit der Anzahl motorischer Einheiten in einem Muskel korreliert und wie genau eine mögliche Korrelation wäre. Notwendig ist hierzu die Untersuchung der Korrelation von MUNIX zu den etablierten MUNE-Methoden, um MUNIX als einen Index für die Anzahl motorischer Einheiten validieren zu können.

In dieser Studie wurde die Korrelation von MUNIX am Musculus abductor digiti minimi (ADM) vergleichend zur Incremental stimulation MUNE-Methode (IS-MUNE) (McComas, 1995; McComas et al., 1971) und am Musculus trapezius zur Spike-triggered averaging MUNE-Methode (STA-MUNE) (Brown et al., 1988) untersucht. Hervorzuheben ist, dass keine der beiden Methoden, weder MUNIX noch MUNE, die exakte Anzahl motorischer Einheiten wiedergibt (Nandedkar et al., 2010; Slawnych et al., 1990; Stein and Yang, 1990). Die genannten MUNE-Methoden sind die aktuell verwendeten Verfahren zur Abschätzung der Anzahl intakter motorischer Einheiten eines Muskels. Die Verfahren basieren auf derselben Annahme: Man geht davon aus, dass sich das Summenaktionspotenzial (CMAP) eines Muskels aus der Summe aller Einzelaktionspotenziale (SMUP) zusammensetzt. Die verschiedenen Techniken variieren hauptsächlich in der Erlangung der SMUP (Bromberg and Brownell, 2008; Daube, 2006; McComas et al., 1971). Leider sind die Untersuchungsmethoden zeitaufwändig und technisch anspruchsvoll, sodass sie im klinischen Alltag schwer zu etablieren sind.

Ein verlässliches und klinisch praktikierbares Verfahren wäre von großer Bedeutung für die Bewertung der Effektivität neuer Therapieansätze und klinischer Studien von Motoneuron-Erkrankungen.

Für diesen Zweck bietet sich die Anwendung von MUNIX als nicht-invasives Verfahren an (Ahn et al., 2010; Nandedkar et al., 2010; Nandedkar et al., 2004; Neuwirth et al., 2010). MUNIX basiert auf einem mathematischen Modell, welches das Summenaktionspotenzial und, anstatt der SMUP, als weitere Variable das elektromyographische Interferenzmuster der Oberflächenableitung in die Berechnung mit einbezieht. MUNIX hat im Vergleich zu den etablierten MUNE-Verfahren den Vorteil, dass es zum einen sehr viel schneller und einfacher durchzuführen und zum anderen komfortabler für den Patienten ist.

Der Musculus trapezius wurde untersucht, um festzustellen, ob die Methode auch an einem proximalen, hirnervenversorgten Muskel anwendbar ist. Hierzu wurde im Vergleich zur Untersuchung an der Hand nicht IS-MUNE, sondern STA-MUNE verwendet. Grund dafür ist, dass die Methoden, die hauptsächlich an distalen und damit eher kleinen Muskeln verwendet werden, ungeeignet für die Untersuchung proximaler, größerer Muskeln sind (Brown et al., 1988).

## **2 Methoden**

Um eine Vielzahl von Muskeln mit einer hohen Anzahl von motorischen Einheiten als auch Muskeln mit einer niedrigen Anzahl von motorischen Einheiten in die Studie einzuschließen, wurden sowohl gesunde Probanden als auch Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS) untersucht. Die ALS wird durch eine rasch progrediente Degeneration der Nervenzellen im primär motorischen Cortex sowie der motorischen Vorderhornzellen verursacht, sodass die Anzahl funktionierender motorischer Einheiten bei den Betroffenen erniedrigt ist.

### **2.1 Gesunde Probanden**

Das Probandenkollektiv bestand aus 20 gesunden Teilnehmern im Alter zwischen 21 und 31 Jahren mit einem mittleren Alter von 24 Jahren. Es nahmen 13 Frauen und 7 Männer teil. Der gesundheitliche Status wurde durch eine Anamneseerhebung und eine orientierende neurologische Untersuchung gewährleistet. Somit wurden Erkrankungen, die Nerven oder Muskeln betreffen, wie beispielsweise Diabetes mellitus oder Neuropathien durch Kompression, ausgeschlossen.

## **2.2 ALS-Patienten**

Das Patientenkollektiv bestand aus 17 ALS-Patienten im Alter zwischen 26 und 68 Jahren mit einem mittleren Alter von 49 Jahren. Es nahmen 6 Frauen und 11 Männer teil. Die Patienten waren entweder von einer definitiven oder von einer wahrscheinlichen ALS gemäß den El Escorial-Kriterien der World Federation of Neurology (Brooks, 1994) betroffen. Zum Zeitpunkt der Studiendatenerhebung wurden sie in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg behandelt. Bei der ersten Untersuchung lag die mittlere Erkrankungsdauer bei 1,5 Jahren (Spannweite 0 - 4 Jahre) und der mittlere ALSFRS-R score bei 32 (Spannweite 12 – 46). Die Patienten, die die neurophysiologischen Untersuchungen gut tolerierten und mehreren Untersuchungen zustimmten, erhielten weitere Untersuchungen in einem Abstand von 6 Monaten.

## **2.3 Ethik**

Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg genehmigt.

## **2.4 Neurophysiologische Untersuchungen**

Zur Ableitung der Oberflächenpotenziale wurden selbstklebende Einweg-Oberflächenelektroden (Leonhard Lang GmbH, Innsbruck, Österreich, 1,1 cm x 3,5 cm) und zur Ableitung der Einzelaktionspotenziale am Musculus trapezius Einweg-Nadelektroden (Oxford, 37 mm x 0,46 mm) verwendet. Die Stimulation des Nervus ulnaris und des Nervus accessorius wurde mit einem elektrischen Stimulator des Typs DS7 (Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, Hertfordshire, England) durchgeführt. Ein PC-basiertes EMG-System wurde für die Signalaufzeichnung, digitale Speicherung und nachfolgende Signalverarbeitung verwendet (Natus, Schwarzer Topas System). Die Filtereinstellungen lagen bei 5 Hz bis 5 kHz, die Abtastrate bei 20 kHz und die ADC-Auflösung bei 20 bit. Die MUNIX-Berechnung erfolgte mittels einer Software, welche von W.J.S.M., einem der Autoren der Originalpublikation (Stein et al., 2016), unter LabView Ver 11 (National Instruments Corporation, Austin, Texas) erstellt wurde. Die Software folgte dem originalen MUNIX-Algorithmus (Nandedkar et al., 2004).

### **2.5 Incremental stimulation motor unit number estimation (IS-MUNE)**

IS-MUNE wurde gemäß der originalen Beschreibung durchgeführt (McComas et al., 1971). Die Ableitelektroden wurden im Sinne einer belly-tendon-Ableitung über dem ADM positioniert und der Nervus ulnaris proximal des Handgelenkes stimuliert. Unter Verschiebung der Elektrode bei schwellennahe Stimulation ist durch Maximierung des CMAP (negativer Ausschlag) die optimale Position der Reizstelle ermittelt worden. Anschließend wurde über die Reizelektrode ein supramaximaler Reiz abgegeben, um alle motorischen Einheiten des Muskels vollständig zu erregen. Blieb die Amplitude auch unter nochmals gesteigertem Reiz unverändert, so konnte man annehmen, dass sich alle motorischen Einheiten entladen haben und das abgeleitete Potenzial dem Summenaktionspotenzial entsprach. Die Verstärkung wurde auf 200  $\mu\text{V}/\text{div.}$  reguliert und anschließend ein Minimalreiz generiert, der kein Aktionspotenzial auslöste. Langsam wurde die Stromstärke bis zur Ableitung eines einzelnen Potenzials, welches eine motorische Einheit darstellt, gesteigert. Um sich dessen zu vergewissern, wiederholte man die Reizgabe und beobachtete, ob das Potenzial in seiner Morphologie unverändert blieb. War dies gegeben, wurde die Stromstärke stetig gesteigert, bis ein weiteres Potenzial sichtbar wurde. Auch dieses Potenzial musste bei ähnlicher Stromstärke reproduzierbar sein. Dieses Verfahren wurde zehn Mal wiederholt und aus den Aktionspotenzialen die mittlere SMUP-Amplitude errechnet. Um den Effekt der Alternation (Brown and Milner-Brown, 1976; Doherty et al., 1995) und die Untersucher-Bias zu reduzieren wurde eine minimale Amplitudendifferenz von 20  $\mu\text{V}$  zwischen zwei Stufen gewählt.

### **2.6 Spike-triggered averaging motor unit number estimation (STA-MUNE)**

Da IS-MUNE bei der Beurteilung von großen, proximalen Muskeln ungenau ist, wurde die STA-MUNE-Technik (Bromberg, 1993; Brown et al., 1988) für die Untersuchung des Musculus trapezius gewählt. Hierzu wurden Oberflächenelektroden zur Ableitung des Oberflächen-Elektromyogramms etwa 5 cm lateral des Dornfortsatzes C7 angelegt.

Die Positionierung der Reizelektrode über dem Nervus accessorius am Musculus sternocleidomastoideus erfolgte mittels supramaximaler Stimulation und Lageanpassung analog zum Vorgehen am ADM. Zuerst wurde die MUNIX-Messung durchgeführt und danach alle Oberflächenelektroden an ihrem Ort belassen. Anschließend erfolgte der Einstich der Nadelelektrode in der Nähe der Oberflächenelektrode. Die Testperson wurde gebeten den Muskel zur Rekrutierung der motorischen Einheiten leicht anzuspannen.

Unterdessen wurde die Elektrode bis zum Sichtbarwerden der Muskelaktionspotenziale in den Muskel eingeführt und sowohl Position der Elektrode als auch Muskelspannung so aufeinander abgestimmt, dass ein SMUP separat von den übrigen Potenzialen abgeleitet werden konnte. Der Ausschlag (Spike) einer isolierten motorischen Einheit triggerte die synchrone Ableitung und Mittelung des registrierten Oberflächen- Elektromyogramms. Das durchschnittlich abgeleitete Oberflächensignal wurde als Einzelpotenzial registriert und reproduziert. Zur Erlangung mehrere SMUP wurde die Position der Nadelelektrode sowohl in die Tiefe als auch in der horizontalen Ebene mit einer Mindestdistanz von 5 mm variiert. Die mittlere Amplitude wurde aus den erlangten SMUP errechnet und die Anzahl von motorischen Einheiten durch dividieren der CMAP-Amplitude durch die mittlere SMUP-Amplitude geschätzt.

### **2.7 Motor unit number index (MUNIX)**

Die Oberflächenelektroden zur Messung von MUNIX wurden, nachdem die MUNE-Messungen durchgeführt worden waren, an den einzelnen Muskeln belassen. MUNIX basiert auf einem mathematischen Modell, welches das Summenaktionspotenzial und das elektromyographische Interferenzmuster der Oberflächenableitung (surface interference pattern - SIP) miteinander verrechnet (Nandedkar et al., 2004).

Da das Summenaktionspotenzial (CMAP) schon während der MUNE-Messungen generiert wurde, musste beim folgenden Schritt nur noch das Interferenzmuster der Oberflächenableitung erfasst werden. Der Proband wurde gebeten seinen Muskel zuerst sehr leicht und dann mit stetig steigender Kraft gegen einen Widerstand isometrisch zu kontrahieren und bei maximaler Kraft zu halten. Das verwendete MUNIX-Programm bietet die Möglichkeit das SIP kontinuierlich bei allmählich sich steigernder Muskelkontraktion abzuleiten. Es nutzt etwa 50 gleichmäßig verteilte SIP Segmente aus dem Interferenzmuster zur weiteren Messung. Dies unterscheidet sich von der Originalmethode, welche fünf verschiedene SIP-Segmente zu fünf verschiedenen Kontraktionsstärken separat verwertet.

Die Ergebnisse der nichtlinearen Regressionsanalyse, welche Teil des MUNIX-Algorithmus ist, wurden auf Konvergenz geprüft. Ergebnisse nichtkonvergenter Regressionsanalysen wurden verworfen. Ein elektronisch generiertes Kalibrierungssignal wurde zur Äquivalenzkontrolle des Aufbaus mit einem etablierten MUNIX Labor (Michael Drey, Institute for Biomedicine of Ageing (IBA), Nürnberg) verwendet.

## 2.8 Statistik

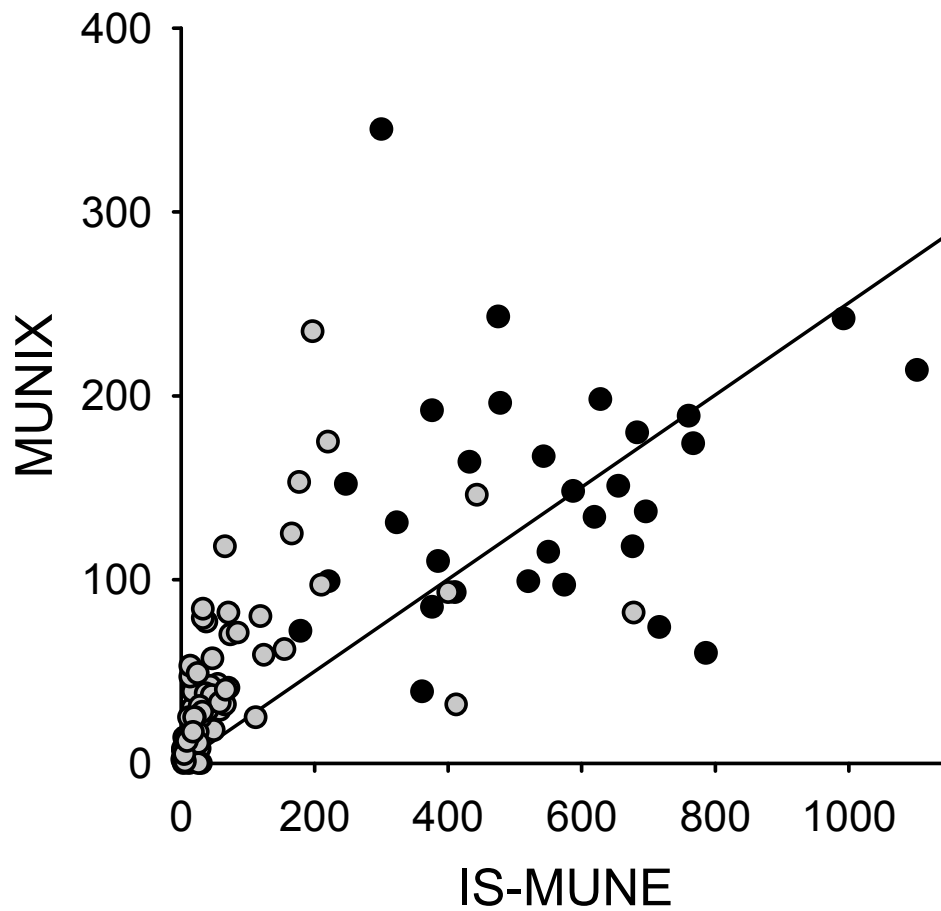
Die statistischen Berechnungen wurden mittels SPSS Version 22 durchgeführt. Nur bei normalverteilten Daten wurden parametrische Tests angewendet. Ergebnisse mit p-Werten  $<0,05$  wurden als signifikant gewertet.

## 3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 195 Messungen durchgeführt (N = Anzahl der Personen; n = Anzahl der Messungen; gesunde Probanden: N = 20, n = 80; Patienten: N = 17, n = 115). Alle gesunden Probanden und 3 Patienten wurden am ADM beidseits und zu einem Zeitpunkt untersucht. Bei 14 ALS-Patienten erfolgten die Messungen zu zwei bis vier unterschiedlichen Zeitpunkten. Der Musculus trapezius von allen gesunden Probanden und 2 Patienten wurde beidseits zu einem Zeitpunkt gemessen. Zwei weitere Patienten wurden einseitig zu einem Zeitpunkt getestet. Ein Patient wurde einmal beidseits und einmal einseitig untersucht. Die Messungen von IS-MUNE und STA-MUNE dauerten etwa dreißig Minuten pro Muskel, wohingegen die MUNIX-Werte in weniger als fünf Minuten pro Muskel bestimmt werden konnten.

### 3.1 Musculus abductor digiti minimi

Zwischen den MUNIX- und den MUNE-Werten besteht eine signifikante Korrelation (Abb. 1). Es wurden 146 Messungen durchgeführt (gesunde Probanden: n = 40; Patienten: n = 106). Bei 24 Messungen aus dem Patientenkollektiv konnte kein MUNIX-Wert berechnet werden. In diesen Fällen war die CMAP-Amplitude sehr niedrig (Mittelwert CMAP  $< 0,2$  mV). Die Korrelation war bei separater Betrachtung des Patientenkollektivs ebenfalls signifikant ( $r = 0,83$ ,  $p < 0,001$ ). Die erhobenen MUNIX-Werte und CMAP-Amplituden waren im Bereich der publizierten Daten (Tabelle 1). Der MUNE-Mittelwert des Probandenkollektivs lag bei 547 (SD 218) und bei 55 (SD 104) im Patientenkollektiv.



**Abbildung 1:** Streudiagramm der MUNIX und IS-MUNE Werte ( $n = 108$ ) im M.abductor digiti minimi von gesunden Probanden (●) und Patienten mit ALS (○). Korrelation: Spearman's-Rho  $r = 0,88$ ;  $p < 0,001$

**Tabelle 1:** MUNIX und CMAP-Amplitude im Vergleich zu anderen Studien am ADM bei gesunden Probanden und ALS-Patienten

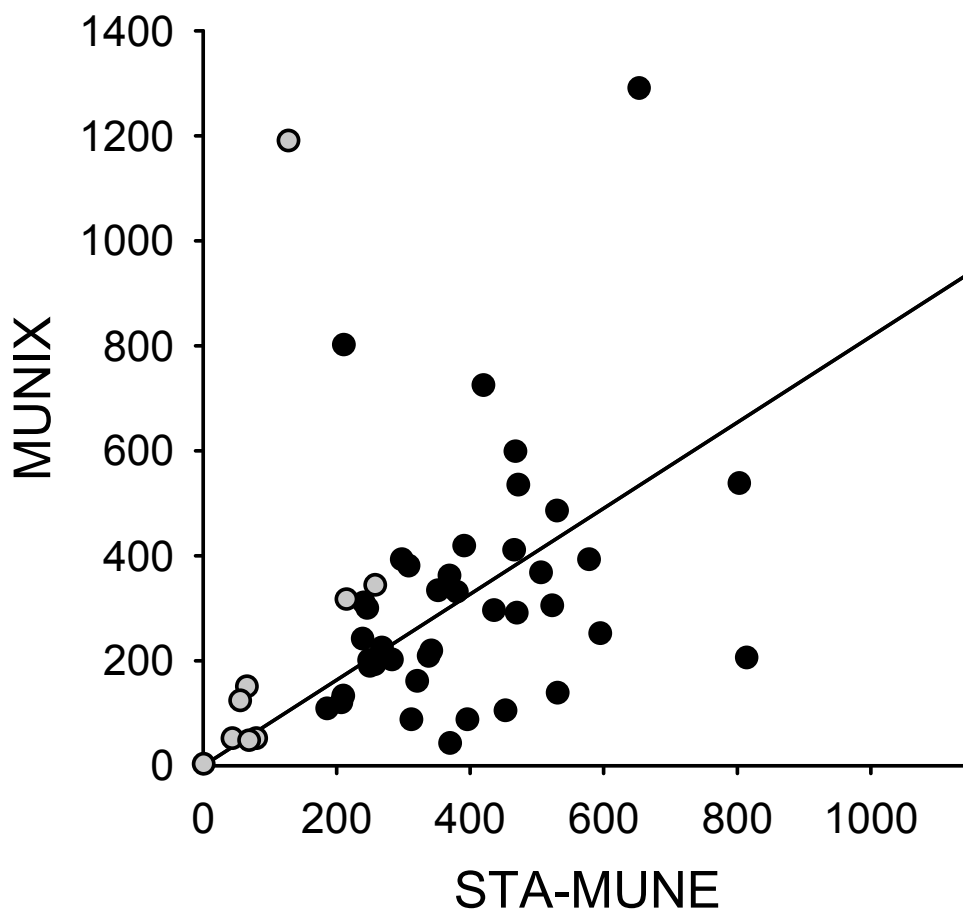
Autor	Probanden		MUNIX			CMAP-Amplitude	
	Alter	N	Mittelw.	SD	Spannw.	Mittelw.	SD
<i>Gesunde Probanden</i>							
Nandedkar et al. (2004)	20-78	33	148	37	50-280	9,9	2,3
Neuwirth et al. (2010)	23-45	7	176	37	#	#	#
Nandedkar et al. (2010)	29-67	34	158	40	91-247	10,4	2,2
Ahn et al. (2010)	#	62	142	42	61-266	#	#
Neuwirth et al. (2011)	49±18	66	163	47	51-302	10,4	1,9
Furtula et al. (2013)	26-70	48	176	46	#	#	#
Diese Studie	21-31	20	152	66	39-345	11,8	2,2
<i>ALS-Patienten</i>							
Nandedkar et al. (2004)	#	44	56	#	1-147	5,6	#
Ahn et al. (2010)	40-72	22	61	51	3-189	5,5	#
Nandedkar et al. (2011)	#	18	81	53	4-170	7,1	2,8
Nandedkar et al. (2011)	#	18	81	60	7-211	7,3	3
Furtula et al. (2013)	52-79	13	55	#	2-221	#	#
Diese Studie	26-68	17	40	44	0-235	4,0	3,2

CMAP-Amplitude = compound muscle action potential-Amplitude gemessen von der Grundlinie zur Spitze in mV; ADM = Musculus abductor digiti minimi; N = Anzahl der Probanden; SD = Standardabweichung; Mittelw. = Mittelwert; Spannw. = Spannweite; # = keine Daten verfügbar



### 3.2 Musculus trapezius

Die MUNIX-Werte korrelieren signifikant mit den STA-MUNE-Werten (Abb. 2). Es wurden 49 Messungen am Musculus trapezius durchgeführt (gesunde Probanden:  $n = 40$ ; Patienten:  $n = 9$ ). Bei separater Analyse des Patientenkollektivs ergab sich eine signifikante Korrelation ( $r = 0,74$ ,  $p = 0,028$ ). Im Probandenkollektiv lag der CMAP-Mittelwert bei 8,9 mV (SD 1,5 mV), der MUNE-Mittelwert bei 393 (SD 154) und der MUNIX-Mittelwert bei 325 (SD 232). Im Patientenkollektiv war der Mittelwert der CMAP-Amplitude 5,0 mV (SD 2,6 mV), der MUNE-Mittelwert 102 (SD 84) und der MUNIX-Mittelwert 254 (SD 372).



**Abbildung 2:** Streudiagramm der MUNIX und STA-MUNE Werte ( $n = 49$ ) im M.trapezius von gesunden Probanden (●) und Patienten mit ALS (○). Korrelation: Spearman's-Rho  $r = 0,46$ ;  $p = 0,001$

## 4 Diskussion

Zwischen MUNIX und den beiden MUNE-Methoden besteht eine signifikante Korrelation, wobei diese am ADM enger als am Musculus trapezius ausfällt. Sie liegt dort, auch wenn sie nicht sonderlich hoch ausfällt, im Bereich der Test-Retest-Korrelation von STA-MUNE. Diese entspricht 0,54 im Kollektiv der ALS-Patienten und 0,86 im Probandenkollektiv (Bromberg, 1993). Die Test-Retest Reproduzierbarkeit, durch den Variationskoeffizienten von MUNIX beschrieben, liegt in der Größenordnung der etablierten MUNE-Methoden (Ahn et al., 2010). Demzufolge unterstützen die Ergebnisse der Arbeit die Verwendung von MUNIX als vergleichbar validen Index für motorische Einheiten in einem Muskel, da sie mit den MUNE-Werten in hohem Grad korrelieren.

Der Vorteil von MUNIX gegenüber MUNE ist die Praktikabilität und die einfache Handhabung. Zudem ist MUNIX nicht-invasiv und die Untersuchung schnell durchgeführt. Das kontinuierlich registrierte Interferenzmuster der Oberflächenableitung (SIP) bei graduell steigender Muskelspannung ermöglicht eine objektivere Grundlage zur Kalkulation des MUNIX-Wertes. Nichtsdestotrotz ist ein Nachteil gegenüber IS-MUNE, dass die Mitarbeit des Patienten zur Bestimmung von MUNIX erforderlich ist.

Es sei daran erinnert, dass der Zweck von MUNIX nicht die exakte Bestimmung der Anzahl von Motoneuronen in einem Muskel ist, wenn auch die Ergebnisse darauf hindeuten, dass ein linearer Zusammenhang zwischen MUNIX und MUNE besteht. In diesem Fall liegt das MUNIX/IS-MUNE-Verhältnis für den ADM bei etwa 0,25 und das MUNIX/STA-MUNE-Verhältnis für den Musculus trapezius bei 0,82. Ungeklärt bleibt, warum es in den untersuchten Muskeln zu unterschiedlichen Verhältnissen kommt.

Bei 24 Messungen, in welchen kein MUNIX-Wert ermittelt werden konnte, ist die CMAP-Amplitude sehr niedrig. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Nandedkar et al. (2010) (Nandedkar et al., 2010). Folglich sollten MUNIX Messungen basierend auf einem sehr niedrigen CMAP als ungenau betrachtet werden.

Es ist zu erwähnen, dass beide Methoden, sowohl MUNE als auch MUNIX, genauere Ergebnisse bei Patienten mit einer reduzierten Anzahl von motorischen Einheiten hervorbringen als bei gesunden Probanden. Bei MUNE tritt das Phänomen der Alternation bei einer hohen Anzahl von motorischen Einheiten vermehrt auf und führt bei gesunden Probanden zu einer Überschätzung der Anzahl von motorischen Einheiten (Doherty et al., 1995).

Dies mag auch im Vergleich zu Furtula et al. die höheren IS-MUNE-Werte erklären, da in dieser Studie kleinere Inkremental-Stufen verwendet werden (Furtula et al., 25  $\mu$ V; diese Studie, 20  $\mu$ V) (Furtula et al., 2013). Wie in Tabelle 1 aufgeführt, sind die MUNIX-Werte dieser Studie am ADM im Wertebereich vorangegangener Studien.

Boekstein et al. beschreiben eine signifikant positive Korrelation zwischen MUNIX- und High-density-MUNE-Werten in der Thenarmuskulatur bei ALS-Patienten, jedoch nicht bei gesunden Probanden (Boekstein et al., 2012). Furtula et al. bestätigen dies (Furtula et al., 2013). In beiden Studien werden explizit ALS-Patienten und gesunde Probanden separat zur Beurteilung der Unterschiede untersucht. Der Schwerpunkt der vorliegenden Studie liegt auf der Feststellung einer potentiellen Korrelation zwischen MUNIX und MUNE und nicht auf der Unterscheidung von kranken und gesunden Muskeln. Die Kollektive werden deshalb absichtlich nicht separat analysiert. Stattdessen sind die Variablen über eine große Spannweite verteilt, um aussagekräftige Korrelationsanalysen durchführen zu können, die bis dato nicht vorlagen.

Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass MUNIX ein guter Biomarker für den Zerfall von motorischen Einheiten in kleinen, distalen Muskeln ist (Boekstein et al., 2012; Furtula et al., 2013). Sandberg et al. beschreiben die Anwendbarkeit von MUNIX in großer Muskulatur (Sandberg et al., 2011). Durch die Miteinbeziehung des Musculus trapezius soll die Anwendbarkeit von MUNIX in einem proximalen Muskel zur Evaluierung der kranio bulbären Region untersucht werden (Cho et al., 2006).

Aufgrund der Dauer und der Invasivität der Messungen wurde in der hier durchgeführten Studie die Untersuchung mittels STA-MUNE häufig durch die Patienten abgelehnt, sodass nur fünf ALS-Patienten am Musculus trapezius untersucht werden konnten. Trotz dieser relativ geringen Anzahl konnte in Kombination mit den Messungen an gesunden Probanden eine signifikante Korrelation zwischen MUNIX und STA-MUNE festgestellt werden, sodass die Anwendbarkeit von MUNIX ebenfalls am Musculus trapezius gezeigt werden konnte.

In wie weit Faktoren wie beispielsweise die Reihenfolge der Rekrutierung der motorischen Einheiten, Myopathien oder Pyramidenbahnläsionen auf MUNIX Einfluss nehmen, ist noch unklar (Marciniak et al., 2015; Schulte-Mattler et al., 2015).

Zusammenfassend untermauern die Daten dieser Studie, dass MUNIX die Anzahl von motorischen Einheiten in einem Muskel beschreibt und demzufolge ein guter Biomarker für Krankheitsverläufe zu sein scheint, die mit einem pathologischen Verlust motorischer Einheiten

einhergehen. Da es jedoch noch erhebliche Unterschiede zwischen MUNIX und MUNE gibt, sind weitere Studien notwendig, um zu untersuchen, wie MUNIX durch andere Faktoren beeinflusst wird.

### **Interessenkonflikt**

Es besteht kein Interessenkonflikt.

## VI Literaturverzeichnis

- Ahn SW, Kim SH, Kim JE, Kim SM, Kim SH, Park KS et al.** Reproducibility of the motor unit number index (MUNIX) in normal controls and amyotrophic lateral sclerosis patients. *Muscle & Nerve* 2010;42(5):808–13.
- Boekestein WA, Schelhaas HJ, van Putten MJAM, Stegeman DF, Zwarts MJ, van Dijk JP.** Motor unit number index (MUNIX) versus motor unit number estimation (MUNE): A direct comparison in a longitudinal study of ALS patients. *Clinical Neurophysiology* 2012;123(8):1644–9.
- Bromberg MB.** Motor unit estimation: reproducibility of the spike-triggered averaging technique in normal and ALS subjects. *Muscle & Nerve* 1993;16(5):466–71.
- Bromberg MB, Brownell AA.** Motor unit number estimation in the assessment of performance and function in motor neuron disease. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* 2008;19(3):509–32.
- Brooks BR.** El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 1994;124(Suppl.):96–107.
- Brown WF, Milner-Brown HS.** Some electrical properties of motor units and their effects on the methods of estimating motor unit numbers. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1976;39(3):249–57.
- Brown WF, Strong MJ, Snow R.** Methods for estimating numbers of motor units in biceps-brachialis muscles and losses of motor units with aging. *Muscle & Nerve* 1988;11(5):423–32.
- Cho JY, Sung JJ, Min JH, Lee KW.** Clinical utility of trapezius muscle studies in the evaluation of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience* 2006;13(9):908–12.
- Daube JR.** Motor unit number estimates--from A to Z. *Journal of the Neurological Sciences* 2006;242(1-2):23–35.
- Doherty T, Simmons Z, O'Connell B, Felice KJ, Conwit R, Chan KM et al.** Methods for estimating the numbers of motor units in human muscles. *Journal of Clinical Neurophysiology* 1995;12(6):565–84.

- Furtula J, Johnsen B, Christensen PB, Pugdahl K, Bisgaard C, Christensen MK et al.** MUNIX and incremental stimulation MUNE in ALS patients and control subjects. *Clinical Neurophysiology* 2013;124(3):610–8.
- Marciniak C, Li X, Zhou P.** An examination of motor unit number index in adults with cerebral palsy. *Journal of Electromyography and Kinesiology* 2015;25(3):444–50.
- McComas AJ.** Motor unit estimation: anxieties and achievements. *Muscle & Nerve* 1995;18(4):369–79.
- McComas AJ, Fawcett PRW, Campbell MJ, Sica REP.** Electrophysiological estimation of the number of motor units within a human muscle. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1971;34(2):121–31.
- Nandedkar SD, Barkhaus PE, Stålberg EV.** Motor unit number index (MUNIX): principle, method, and findings in healthy subjects and in patients with motor neuron disease. *Muscle & Nerve* 2010;42(5):798–807.
- Nandedkar SD, Barkhaus PE, Stålberg EV.** Reproducibility of MUNIX in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve* 2011;44(6):919–22.
- Nandedkar SD, Nandedkar DS, Barkhaus PE, Stålberg EV.** Motor unit number index (MUNIX). *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 2004;51(12):2209–11.
- Neuwirth C, Nandedkar S, Stålberg E, Barkhaus PE, Carvalho Md, Furtula J, et al.** Motor unit number index (MUNIX): a novel neurophysiological marker for neuromuscular disorders; test–retest reliability in healthy volunteers. *Clinical Neurophysiology* 2011;122(9):1867–72.
- Neuwirth C, Nandedkar S, Stålberg E, Weber M.** Motor unit number index (MUNIX): a novel neurophysiological technique to follow disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve* 2010;42(3):379–84.
- Sandberg A, Nandedkar SD, Stålberg E.** Macro electromyography and motor unit number index in the tibialis anterior muscle: differences and similarities in characterizing motor unit properties in prior polio. *Muscle & Nerve* 2011;43(3):335–41.
- Schulte-Mattler WJ, Grimm T, Stein F, Kobor I, Bogdahn U.** MUNIX – ein viel versprechender Biomarker bei der ALS. *Klinische Neurophysiologie* 2015;46(4):186–9.

**Slawnych MP, Laszlo CA, Hershler C.** A review of techniques employed to estimate the number of motor units in a muscle. *Muscle & Nerve* 1990;13(11):1050–64.

**Stein F, Kobor I, Bogdahn U, Schulte-Mattler WJ.** Toward the validation of a new method (MUNIX) for motor unit number assessment. *Journal of Electromyography and Kinesiology* 2016;27:73–7.

**Stein RB, Yang JF.** Methods for estimating the number of motor units in human muscles. *Annals of Neurology* 1990;28(4):487–95.

## **VII Danksagung**

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Schulte-Mattler für die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Mit viel Geduld und Zeit hat er mich von der Themenfindung bis zur Vollendung der Arbeit begleitet und unterstützt.

Besonders danken möchte ich auch den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität Regensburg. Sie haben mir die letzten Jahre durch viele wertvolle Anregungen und ihre Fachkompetenz allzeit Hilfe geleistet und mir bei der Durchführung der Studie in jeglicher Hinsicht unterstützend zur Seite gestanden.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie, die mir durch ihre liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung mein Studium und das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht haben. Ebenso möchte ich meinem Freund Armin Mattes und meinen Freunden danken. Sie haben mich stets motiviert und mir die letzten Jahre immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden.



## **VIII Originalpublikation**

### **Toward the validation of a new method (MUNIX) for motor unit number assessment**

#### **Authors**

Franziska Stein<sup>1</sup>, Ines Kobor<sup>1</sup>, Ulrich Bogdahn<sup>1</sup>, Wilhelm J. Schulte-Mattler<sup>1</sup>

#### **Affiliations**

<sup>1</sup>Department of Neurology, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany

publiziert in:

Journal of Electromyography and Kinesiology 27 (2016)

DOI: 10.1016/j.jelekin.2016.02.001

Impact Factor: 1.530



## Toward the validation of a new method (MUNIX) for motor unit number assessment



Franziska Stein, Ines Kobor, Ulrich Bogdahn, Wilhelm J. Schulte-Mattler\*

Department of Neurology, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 August 2015

Received in revised form 21 January 2016

Accepted 1 February 2016

#### Keywords:

Amyotrophic lateral sclerosis

Motor unit number index

Motor unit number estimation

Spike-triggered averaging motor unit number estimation

Incremental stimulation motor unit number estimation

### ABSTRACT

**Introduction:** This prospectively designed study analyzed the correlation of a new, non-invasive neurophysiological method (Motor Unit Number Index – MUNIX) with two established Motor Unit Number Estimation (MUNE) methods. **Methods:** MUNIX and incremental stimulation MUNE (IS-MUNE) were done in the abductor digiti minimi muscle (ADM), while MUNIX and spike-triggered averaging MUNE (STA-MUNE) were tested in the trapezius muscle. Twenty healthy subjects and 17 patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) were examined. **Results:** MUNIX and MUNE values correlated significantly (ADM:  $n = 108$ ; Spearman-Rho;  $r = 0.88$ ;  $p < 0.01$ ; trapezius muscle:  $n = 49$ ; Spearman-Rho;  $r = 0.46$ ;  $p < 0.01$ ). **Discussion:** MUNIX indeed reflects the number of motor units in a muscle, and may sensibly be recorded from the trapezius muscle. With MUNIX being both much more patient friendly and much more rapid to assess than MUNE, the results support the use of MUNIX when motor unit number assessment is desired.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Assessing the number of motor units in a muscle is desirable yet cumbersome. To overcome the drawbacks of Motor Unit Number Estimation (MUNE), a new non-invasive neurophysiological method (Motor Unit Number Index – MUNIX) was proposed and is increasingly used in clinical practice (Ahn et al., 2010; Nandedkar et al., 2010, 2004; Neuwirth et al., 2010). However, it is not yet clear whether MUNIX indeed directly correlates with the number of motor units in a muscle and how close an eventual correlation would be. The intent is to examine the correlation of MUNIX with established MUNE methods. In this study MUNIX is compared to the incremental stimulation MUNE method (IS-MUNE) (McComas, 1995; McComas et al., 1971) at the abductor digiti minimi muscle (ADM) and the spike-triggered averaging

MUNE method (STA-MUNE) (Brown et al., 1988) at the trapezius muscle to potentially validate MUNIX as an index assessing the number of motor units. This study does not pursue the question of the applicability of MUNIX as a marker of disease progression in motor neuron diseases and it must be emphasized that both methods, neither MUNIX nor MUNE, exactly count motor units (Nandedkar et al., 2010; Slawnych et al., 1990; Stein and Yang, 1990). Currently used methods to estimate the number of motor units are the mentioned MUNE methods, which are all based on the same assumption: a supramaximal compound muscle action potential (CMAP) is the sum of all single motor unit action potentials (SMUPs). The techniques mainly vary in the acquisition of the SMUPs (Bromberg and Brownell, 2008; Daube, 2006; McComas et al., 1971). Unfortunately, the methods are time-consuming and technically laborious, therefore difficult to apply in clinical practice. A reliable and clinically practical method would be of great significance for the evaluation of the effectiveness of new therapies and clinical studies of motor neuron diseases. MUNIX, a non-invasive neurophysiological method, has been recommended for this purpose (Ahn et al., 2010; Nandedkar et al., 2010, 2004; Neuwirth et al., 2010). It is based on a mathematical model that sets the CMAP off against the surface interference pattern instead of the SMUPs. Compared to established MUNE methods, MUNIX can be done faster, easier and less stressful for patients. In addition to the basic question of correlation between MUNE and MUNIX, the trapezius muscle was investigated in order to determine whether MUNIX is also applicable to a very proximal muscle

**Abbreviations:** ADM, abductor digiti minimi muscle; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CMAP, compound muscle action potential; IS-MUNE, incremental stimulation motor unit number estimation; MU, motor unit; MUAP, motor unit action potential; MUNE, motor unit number estimation; MUNIX, motor unit number index; SD, standard deviation; SIP, surface interference pattern; SMUP, single motor unit potential; STA-MUNE, spike-triggered averaging motor unit number estimation.

\* Corresponding author at: Department of Neurology, University Hospital Regensburg, Universitätsstraße 84, 93053 Regensburg, Germany. Tel.: +49 941 941 3311; fax: +49 941 941 3015.

E-mail address: [wilhelm.schulte-mattler@klinik.uni-regensburg.de](mailto:wilhelm.schulte-mattler@klinik.uni-regensburg.de) (W.J. Schulte-Mattler).

innervated by a cranial nerve. For this purpose, two different MUNE methods have been used, because the MUNE methods more commonly used in distal muscles are less suitable for proximal muscles (Brown et al., 1988).

## 2. Methods

To gain a large diversity of muscles with a high number of motor units as well as muscles with a low number of motor units, healthy subjects and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients were investigated. ALS is a disease defined by the gradual loss of motor units over time.

### 2.1. Healthy subjects

The group consisted of 20 healthy volunteers with a mean age of 24 years (range 21–31), including 13 female and 7 male persons. Health status was confirmed and documented by a brief medical history and by a neurological examination to rule out any condition that could be related to nerve or muscle pathology, such as diabetes mellitus or compression neuropathies.

### 2.2. ALS patients

Seventeen patients (6 female and 11 male) with a mean age of 49 years (range 26–68) were included. All patients were affected either by definite or probable ALS according to the El Escorial criteria of the World Federation of Neurology (Brooks, 1994). Throughout the duration of the study the patients were under medical treatment at the Department of Neurology of the University Hospital Regensburg. The mean disease duration at the first MUNIX examination was 1.5 years (range 0–4), the mean ALSFRS-R score was 32 (range 12–46). In patients who well tolerated the neurophysiological examinations and agreed to undergo multiple examinations, the interval between the examinations was 6 months.

### 2.3. Ethics

The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Regensburg.

### 2.4. Neurophysiological investigations

Disposable self-adhesive electrodes were used for all surface recordings (Leonhard Lang GmbH, Innsbruck, Austria, 1.1 cm × 3.5 cm). For recording the SMUPs of the trapezius muscle disposable needle electrodes (Oxford, 37 mm × 0.46 mm) were used. Ulnar and accessory nerve stimulations were accomplished with an electric stimulator type DS7 (Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, Hertfordshire, England). A PC based EMG system was used for signal recording, digital storage and subsequent signal processing (Natus, Schwarzer topas system). Filter settings were 5 Hz to 5 kHz, the sampling rate was 20 kHz, the ADC's resolution was 20 bits. MUNIX calculations were done with a software developed by one of the authors (W.J.S.M.) under LabView Ver 11 (National Instruments Corporation, Austin, Texas). The software strictly followed the original MUNIX-algorithm (Nandedkar et al., 2004).

### 2.5. Incremental stimulation motor unit number estimation (IS-MUNE)

IS-MUNE was carried out following the original description (McComas et al., 1971). Recording electrodes were attached to

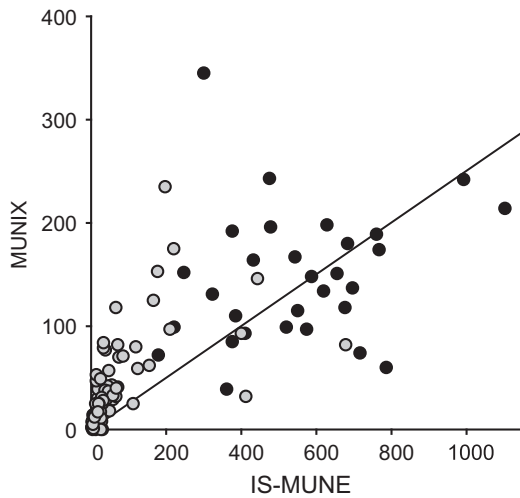
the ADM in a belly-tendon fashion. The ulnar nerve was stimulated at the wrist. The optimal position of the stimulation electrode was determined by moving the electrode while maximizing the CMAP amplitude (negative peak) under submaximal stimulation. During the next step the CMAP was recorded upon supramaximal stimulation, and the position of the recording electrode was adjusted to get the highest possible CMAP amplitude. Subsequently, the stimulus intensity was reduced to subthreshold, the amplifier gain was set to 200  $\mu\text{V}/\text{division}$  and the incremental stimulation procedure was done until a total of ten different action potentials were reproducibly recorded, from which the average SMUP amplitude was calculated. To reduce the effects of alternation (Brown and Milner-Brown, 1976; Doherty et al., 1995) and to reduce examiner bias, an amplitude difference of 20  $\mu\text{V}$  was chosen as a minimum for the incremental steps.

### 2.6. Spike-triggered averaging motor unit number estimation (STA-MUNE)

As the IS-MUNE may be inaccurate in large proximal muscles, the STA-MUNE technique (Bromberg, 1993; Brown et al., 1988) was chosen for the trapezius muscle. For this purpose, surface electrodes were superficially applied to the trapezius muscle approximately 5 cm lateral from the C7 spinous process and the stimulating electrode was placed above the accessory nerve at the sternocleidomastoid muscle. Supramaximality of Stimulation and optimal position of the recording electrode were assured as described for the ADM. Subsequently, MUNIX was measured. Afterwards, any surface electrodes above the trapezius muscle remained in place and a needle electrode was inserted into the muscle in close vicinity to the surface electrode. To recruit motor units the test person was asked to slightly contract the muscle. Needle position and muscle contraction were adjusted until the potentials of a single motor unit could be isolated from the activity of other recruited motor units. The spike of the isolated motor unit was the trigger signal for the synchronous recording and averaging of the surface EMG. The averaged surface signal was acknowledged as SMUP if it could be reproduced twice in a row. By repositioning the needle electrode close to the surface electrode ten different SMUPs were recorded. The minimum distance to the primary needle electrode had to be at least 5 mm, both in depth as well as in horizontal plane. The mean amplitude was calculated from the acquired SMUPs. By dividing the CMAP amplitude by the mean SMUP amplitude, the number of motor units was estimated.

### 2.7. Motor unit number index (MUNIX)

After MUNE was carried out in each muscle the surface electrodes remained in position for the measurement of MUNIX. MUNIX is based on a mathematical model that sets the CMAP off against the surface interference pattern (SIP) (Nandedkar et al., 2004). As CMAPs had already been recorded during the MUNE measurements, this following step only required the recording of the SIP signal at various levels of muscle contraction. The used MUNIX program offered the possibility to record the SIP continuously at gradually increasing muscle contractions of which shorter segments of the SIP could be extracted later. At least 50 SIP segments were used equally distributed within the SIP signal. This differs from the original method in which only five different SIPs are recorded at five different levels of muscle contraction. The result of the nonlinear regression analysis procedure, which is part of the MUNIX-algorithm, was checked for convergence. Results of non-convergent regression analyses were discarded. An electronically generated calibration signal was used to check for the equivalence of this setting with an established MUNIX laboratory (Michael Drey, Institute for Biomedicine of Ageing (IBA), Nuremberg).



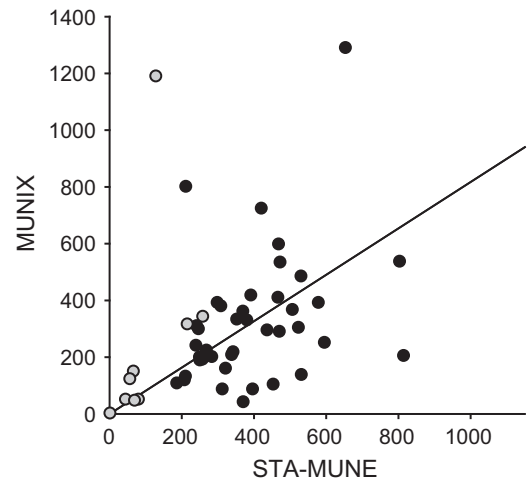
**Fig. 1.** Scatter-plot of the MUNIX and IS-MUNE values ( $n = 108$ ) in the abductor digiti minimi muscle of healthy controls (●) and patients with ALS (○). Correlation: Spearman's-Rho  $r = 0.88$ ;  $p < 0.001$ .

2.8. Statistics

Statistical calculations were done with SPSS version 22. Parametric tests were only used on normally distributed data, as assessed by the Shapiro-Wilk test. Otherwise nonparametric tests, namely Spearman's rho were used. Results with  $p$ -values  $< 0.05$  were deemed significant.

3. Results

In total, 195 measurements were done ( $N =$  number of subjects;  $n =$  number of measurements; healthy subjects:  $N = 20$ ,  $n = 80$ ; patients:  $N = 17$ ,  $n = 115$ ). All healthy subjects and 3 patients were investigated at the ADM bilaterally at one point in time. Measurements of 14 ALS patients were done at two to four points in time. The trapezius muscles of all healthy subjects and of 2 patients were tested bilaterally at one point in time. Two other patients were tested unilaterally at one point in time. One patient was investigated once bilaterally and another time unilaterally. IS-MUNE and STA-MUNE required at least thirty minutes per muscle, whereas MUNIX values could be recorded in less than five minutes per muscle.



**Fig. 2.** Scatter-plot of the MUNIX and STA-MUNE values ( $n = 49$ ) in the trapezius muscle of healthy controls (●) and patients with ALS (○). Correlation: Spearman's-Rho  $r = 0.46$ ;  $p = 0.001$ .

3.1. Abductor digiti minimi muscle

There was a significant correlation between the MUNIX and the MUNE values (Fig. 1). One hundred forty-six measurements were done (healthy subjects:  $n = 40$ ; patients:  $n = 106$ ). Of 24 measurements in the patient group no MUNIX value could be calculated. In these cases the CMAP amplitude was very low (mean CMAP = 0.2 mV) or the MUNIX values were considered invalid due to inaccurate nonlinear regression. The correlation remained significant when the data of the ALS group were analyzed separately ( $r = 0.83$ ,  $p < 0.001$ ).

MUNIX and CMAP amplitude were within the range of published data (Table 1). The mean MUNE value in the group of healthy subjects was 547 (SD 218), in the group of patients 55 (SD 104).

3.2. Trapezius muscle

The MUNIX values correlated significantly with the STA-MUNE values (Fig. 2). Forty-nine measurements were done in the trapezius muscle (healthy subjects:  $n = 40$ ; patients:  $n = 9$ ). The correlation remained significant when the data of the ALS group were analyzed separately ( $r = 0.74$ ,  $p = 0.028$ ).

**Table 1**  
MUNIX and CMAP amplitude in comparison to other studies in the ADM in healthy subjects and ALS patients.

Author	Subjects		MUNIX			CMAP amplitude	
	Age	N	Mean	SD	Range	Mean	SD
<i>Healthy subjects</i>							
Nandedkar et al. (2004)	20–78	33	148	37	50–280	9.9	2.3
Neuwirth et al. (2010)	23–45	7	176	37	#	#	#
Nandedkar et al. (2010)	29–67	34	158	40	91–247	10.4	2.2
Ahn et al. (2010)	#	62	142	42	61–266	#	#
Neuwirth et al. (2011)	49 ± 18	66	163	47	51–302	10.4	1.9
Furtula et al. (2013)	26–70	48	176	46	#	#	#
This study	21–31	20	152	66	39–345	11.8	2.2
<i>ALS patients</i>							
Nandedkar et al. (2004)	#	44	56	#	1–147	5.6	#
Ahn et al. (2010)	40–72	22	61	51	3–189	5.5	#
Nandedkar et al. (2011)	#	18	81	53	4–170	7.1	2.8
Nandedkar et al. (2011)	#	18	81	60	7–211	7.3	3
Furtula et al. (2013)	52–79	13	55	#	2–221	#	#
This Study	26–68	17	40	44	0–235	4.0	3.2

CMAP amplitude = compound muscle action potential amplitude measured from baseline to peak in mV; ADM = abductor digiti minimi muscle; N = number of subjects; SD = standard deviation; # = no data available.

In the group of healthy subjects the mean CMAP amplitude was 8.9 mV (SD 1.5 mV), the mean MUNE value 393 (SD 154) and the mean MUNIX value 325 (SD 232). In the group of patients the mean CMAP amplitude was 5.0 mV (SD 2.6 mV), the mean MUNE value 102 (SD 84), and the mean MUNIX value 254 (SD 372).

#### 4. Discussion

The aim of this study was to compare MUNIX with established MUNE methods in order to contribute to the validation of a new, easily applicable and less time consuming technique to assess motor axon loss. It was demonstrated that MUNIX correlates significantly with both MUNE methods, wherein the correlation in the ADM is higher than in the trapezius muscle. This correlation is not particularly high but it is well within the range of the test-retest correlation of STA-MUNE, in which it is 0.54 in ALS patients and 0.86 in controls (Bromberg, 1993). The test-retest reproducibility as indicated by the coefficient of variation of MUNIX is of similar magnitude as of established MUNE methods (Ahn et al., 2010). Thus, our data support that MUNIX could provide indeed a valid index of motor units correlating to the estimation by MUNE in a muscle.

The advantage of MUNIX over MUNE is practicability and fairly simple handling. Moreover MUNIX is non-invasive and quickly carried out. The continuously recorded surface interference pattern (SIP) at gradually increasing muscle tension levels enables a more objective base to calculate the MUNIX value. Nevertheless, a disadvantage is, that in comparison to IS-MUNE, the compliance of the patient is required for MUNIX.

It should be kept in mind that the purpose of MUNIX is not to provide exact values for the number of motor units in a muscle. However, our results suggest that a linear conversion from MUNIX to MUNE is possible. In this case the MUNIX/MUNE ratio is about 0.25 for the ADM and 0.82 for the trapezius muscle. It remains unclear why there are different ratios in different muscles.

In the 24 measurements of which no MUNIX value could be obtained, the CMAP amplitude was very low. This is in accordance with the results of Nandedkar et al. (2010). Consequently, MUNIX measurements on a very low CMAP should be considered inaccurate.

It must be mentioned that both methods, MUNE and MUNIX, more precisely display findings in patients with a reduced number of motor units than in healthy subjects. With MUNE this is because the phenomenon of alternation is more likely to occur with higher numbers of motor units and will lead in healthy subjects to an overestimation of the number of motor units (Doherty et al., 1995). In comparison to Furtula et al., this may also explain the higher IS-MUNE values, as smaller incremental steps were permitted (Furtula et al., 25  $\mu$ V; this study, 20  $\mu$ V) (Furtula et al., 2013). The MUNIX values in the ADM are well within the range of previous reports (Table 1).

Boekstein et al. found a significant positive correlation between MUNIX and high-density MUNE values in the thenar muscle in ALS patients but not in healthy subjects (Boekstein et al., 2012). Neither did Furtula et al. (2013). In both studies the approach was to examine healthy controls and ALS patients separately and demonstrate differences. In this study the focus was on a potential correlation between MUNIX and MUNE rather than distinguishing diseased from healthy muscles. Thus, the groups were intentionally not analyzed separately. Instead, the variables of this study varied over a wide range to yield meaningful correlation analyses, which have not been established until now.

Of previous studies it is known that MUNIX is a good biomarker for the loss of motor units in small, distal muscles (Boekstein et al., 2012; Furtula et al., 2013).

Sandberg et al. have already demonstrated the applicability of MUNIX in a larger muscle (Sandberg et al., 2011). The intent of examining the trapezius muscle was to test the applicability of MUNIX in a proximal muscle for the evaluation of the craniobulbar region (Cho et al., 2006). In this study patients frequently refused the examination of STA-MUNE due to the duration and invasive character of the measurement, so that only 5 ALS patients' trapezius muscles could be examined. Despite this relatively small number, in combination with the measurements of the healthy subjects, MUNIX and STA-MUNE correlated significantly, also demonstrating the feasibility of MUNIX in the trapezius muscle.

In conclusion, our data corroborate that MUNIX indeed assesses the number of motor units in a muscle and thus may be an effective biomarker for disease progression in disorders in which a loss of motor units is pathogenic, such as ALS. However, as there are considerable differences between MUNIX and MUNE, further studies are necessary to delineate how MUNIX is influenced by other factors. Such factors could be the recruitment order of motor units, the presence of a myopathy, or a lesion of the pyramidal tract (Marciniak et al., 2015; Schulte-Mattler et al., 2015).

#### Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgments

The authors thank Andrei Khomenko, Jennifer Rösl and Dobri Baldaranov for the inquiry of patients and Michael Drey for his help in calibrating our MUNIX equipment.

#### References

- Ahn SW, Kim SH, Kim JE, Kim SM, Kim SH, Park KS, et al. Reproducibility of the motor unit number index (MUNIX) in normal controls and amyotrophic lateral sclerosis patients. *Muscle Nerve* 2010;42(5):808–13.
- Boekstein WA, Schelhaas HJ, van Putten MJAM, Stegeman DF, Zwarts MJ, van Dijk JP. Motor unit number index (MUNIX) versus motor unit number estimation (MUNE): a direct comparison in a longitudinal study of ALS patients. *Clin Neurophysiol* 2012;123(8):1644–9.
- Bromberg MB. Motor unit estimation: reproducibility of the spike-triggered averaging technique in normal and ALS subjects. *Muscle Nerve* 1993;16(5):466–71.
- Bromberg MB, Brownell AA. Motor unit number estimation in the assessment of performance and function in motor neuron disease. *Phys Med Rehabil Clin North Am* 2008;19(3):509–32.
- Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1994;124(Suppl.):96–107.
- Brown WF, Milner-Brown HS. Some electrical properties of motor units and their effects on the methods of estimating motor unit numbers. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1976;39(3):249–57.
- Brown WF, Strong MJ, Snow R. Methods for estimating numbers of motor units in biceps-brachialis muscles and losses of motor units with aging. *Muscle Nerve* 1988;11(5):423–32.
- Cho JY, Sung JJ, Min JH, Lee KW. Clinical utility of trapezius muscle studies in the evaluation of amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Neurosci* 2006;13(9):908–12.
- Daube JR. Motor unit number estimates – from A to Z. *J Neurol Sci* 2006;242(1–2):23–35.
- Doherty T, Simmons Z, O'Connell B, Felice KJ, Conwit R, Chan KM, et al. Methods for estimating the numbers of motor units in human muscles. *J Clin Neurophysiol* 1995;12(6):565–84.
- Furtula J, Johnsen B, Christensen PB, Pugdahl K, Bisgaard C, Christensen MK, et al. MUNIX and incremental stimulation MUNE in ALS patients and control subjects. *Clin Neurophysiol* 2013;124(3):610–8.
- Marciniak C, Li X, Zhou P. An examination of motor unit number index in adults with cerebral palsy. *J Electromyogr Kinesiol* 2015;25:444–50.
- McComas AJ. Motor unit estimation: anxieties and achievements. *Muscle Nerve* 1995;18(4):369–79.
- McComas AJ, Fawcett PRW, Campbell MJ, Sica REP. Electrophysiological estimation of the number of motor units within a human muscle. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1971;34(2):121–31.
- Nandedkar SD, Barkhaus PE, Stålberg EV. Motor unit number index (MUNIX): principle, method, and findings in healthy subjects and in patients with motor neuron disease. *Muscle Nerve* 2010;42(5):798–807.
- Nandedkar SD, Barkhaus PE, Stålberg EV. Reproducibility of MUNIX in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2011;44(6):919–22.

- Nandedkar SD, Nandedkar DS, Barkhaus PE, Stålberg EV. Motor unit number index (MUNIX). *IEEE Trans Biomed Eng* 2004;51(12):2209–11.
- Neuwirth C, Nandedkar S, Stålberg E, Barkhaus PE, Carvalho Md, Furtula J, et al. Motor unit number index (MUNIX): a novel neurophysiological marker for neuromuscular disorders; test–retest reliability in healthy volunteers. *Clin Neurophysiol* 2011;122(9):1867–72.
- Neuwirth C, Nandedkar S, Stålberg E, Weber M. Motor unit number index (MUNIX): a novel neurophysiological technique to follow disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 2010;42(3):379–84.
- Sandberg A, Nandedkar SD, Stålberg E. Macro electromyography and motor unit number index in the tibialis anterior muscle: differences and similarities in characterizing motor unit properties in prior polio. *Muscle Nerve* 2011;43(3):335–41.
- Schulte-Mattler W, Grimm T, Stein F, Kobor I, Bogdahn U. MUNIX – a promising biomarker in ALS. *Klin Neurophysiol* 2015;46(4):186–9.
- Slawnych MP, Laszlo CA, Hershler C. A review of techniques employed to estimate the number of motor units in a muscle. *Muscle Nerve* 1990;13(11):1050–64.
- Stein RB, Yang JF. Methods for estimating the number of motor units in human muscles. *Ann Neurol* 1990;28(4):487–95.



**Ulrich Bogdahn** graduated in Medicine in 1976 at University of Marburg/L, Germany, his thesis was on “Effects of Neutral Preteases from Granulocytes upon Lymphocyte Functions”, Specialization in Neurology 1985 in Würzburg. Postdoc in UCSF – Brain Tumor Research, San Francisco, CA. Head of Dept. Neurology Regensburg University since 1995. Main Activities Transcranial Ultrasound, Neurocritical Care, Neurooncology, Neural Stem cells and ALS. GO-Bio Prize winner 2013.



**Wilhelm J. Schulte-Mattler** graduated in Medicine in 1988 at the University of Würzburg. His thesis was on Quantification of recruitment in needle-EMG. He specialized in Neurology in 1993. After heading the Clinical Neurophysiology in the Dept. of Neurology, University of Halle-Wittenberg he is head of the Clinical Neurophysiology in the Dept. of Neurology, University of Regensburg since 2000.



**Franziska Stein** graduated in Medicine in 2014 at the University of Regensburg. Her thesis is on the topic of this report. After graduation she began a residency in pediatrics in Berlin.



**Ines Kobor** graduated in Experimental & Clinical Neuroscience in 2013 at the University of Regensburg. Her thesis was on “Biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis; validation of a new method to determine the number of motor units in the muscle”. After her graduation she took part in the research department of neurooncology for six month at Harvard Medical School, Boston in 2014. Currently, she is studying Medicine as a second degree.