

**Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Tübingen**

Abteilung Kinderchirurgie, Klinikum Schnarrenberg

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Fuchs

**Untersuchungen zur Methodik der immunhistochemischen
Darstellung von Synapsen beim Morbus Hirschsprung und der
Intestinalen Neuronalen Dysplasie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Ulrike Thuselt

aus

Leipzig

2002

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Schweizer

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. A. Bornemann

Meiner Mutter und meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung

1.1	Historischer Überblick	1
1.2	Zielsetzung	6

2. Beschreibung der Krankheitsbilder und Diagnostik

2.1	Anatomischer Aufbau und Physiologie des Kolons	7
2.2	Innervationsstörungen des Kolons	9
2.2.1	Morbus Hirschsprung	9
2.2.2	Intestinale Neuronale Dysplasie	10
2.2.3	Hypoganglionose	12
2.3	Prinzipien der Therapie der Innervationsstörungen	13
2.4	Ätiologie der Innervationsstörungen des Kolons und Rektums	14
2.5	Diagnostik der Innervationsstörungen	16
2.5.1	Morphologische Untersuchung	16
2.5.2	Histologische Beurteilung	16
2.5.3	Histochemische Diagnostik	17
2.5.4	Immunhistochemie	18

3. Material und Methoden

3.1	Untersuchungsmaterial	20
3.2	Untersuchungsmethoden	22
3.2.1	Aufbereitung des Untersuchungsmaterials	22
3.2.1.1	Prinzip der Antikörperreaktion und deren Nachweis	23
3.2.1.2	Immunozytometrische Färbemethoden	24
3.2.1.3	Antikörperreaktionen	24

3.2.2	Auswertung der Proben	31
3.2.2.1	Registrierung der Antikörpermarkierungen	31
3.2.2.2	Statistische Methoden zur Auswertung der Messungen	34
3.3	Chemikalien und Geräte	37
4.	Ergebnisse	
4.1	Anti-Synaptophysin-gefärbte Kolonbiopsien	38
4.2	Erhobene Daten	41
4.3	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Messergebnisse	46
4.3.1	Übersicht über die Einflussgrößen (Effekte)	46
4.3.2	Einzeldarstellung der Effekte	48
4.3.2.1	Einflussgröße Art der Erkrankung	48
4.3.2.2	Einflussgröße Lokalisation	53
4.3.2.3	Einflussgröße Lokalisation*Erkrankung	56
4.3.2.4	Einflussgröße Schnittrichtung	62
4.3.2.5	Einflussgröße Probe[Erkrankung]	66
5.	Diskussion	
5.1	Diagnostische Möglichkeiten und Schwierigkeiten	70
5.2	Darstellung der Synapsen und neuromuskulären Verbindungen	75
5.3	Aussagewertigkeit der erarbeiteten Ergebnisse mit Methodenkritik	77
5.3.1	Stellungnahme zur Art der Erkrankung	77
5.3.2	Stellungnahme zur Lokalisation	78
5.3.3	Stellungnahme zur Frage nach der Schnittrichtung	79
5.3.4	Stellungnahme zu den Biopsien	80
5.3.5	Stellungnahme zum Alter der Patienten	83
5.3.6	Stellungnahme zur Art der Schnittfertigung	84
5.3.7	Stellungnahme zum Antikörper	84

5.3.8	Beurteilung der immunhistochemischen Färbung	85
5.3.9	Stellungnahme zur Auswertung	90
5.3.10	Stellungnahme zur Statistik	93
5.4	Perspektiven zur Verbesserung der Methode	95
6.	Zusammenfassung	98
7.	Literaturverzeichnis	100

1. Einführung

1.1 Historischer Überblick

Bereits 1886 stellte der dänische Arzt Harald Hirschsprung in der Berliner Gesellschaft für Kinderheilkunde ein Krankheitsbild vor, das ihm durch die Ausbildung eines massiven Megakolons auffiel.

Zwei seiner Patienten, beide männlichen Geschlechts, waren nach schwerer Obstipation seit Geburt innerhalb ihres ersten Lebensjahres verstorben. Bei der Autopsie fand er in beiden Fällen Colon sigmoideum und descendens abnorm erweitert vor, am Rektum konnte er keine Veränderungen feststellen. Hirschsprung vermutete hinter diesem Krankheitsbild eine angeborene Missbildung (33).

Obwohl er sich nicht als erster mit dem Symptomenkomplex Obstipation und Kolondilatation bei Säuglingen auseinandersetzte, lieferte Hirschsprung doch die erste umfassende Beschreibung des Megacolon congenitum, weshalb dieses Krankheitsbild bis heute seinen Namen trägt.

Nach der Präsentation dieser bis dahin weitgehend unbekanntes Erkrankung wurde eine beträchtliche Anzahl weiterer, ähnlich gearteter Fälle beschrieben und Spekulationen über deren Ätiologie angestellt. Das Hauptaugenmerk wurde dabei zunächst auf die auffälligste Veränderung, das Megakolon, gerichtet. Deshalb bestand das operative Vorgehen vor allem in der Anlage von Kolostomien oder der Resektion des dilatierten Darmabschnittes.

Als Untersuchungen über eine neurogene Imbalance im Sinne einer sympathischen oder parasympathischen Überaktivität als mögliche Ursache des Megakolons auftauchten, wurden zahlreiche Patienten mit einer lumbalen Sympathektomie therapiert. Weiterhin war jedoch postoperativ die Anwendung von Abführmitteln und Einläufen notwendig, und die als gut beschriebenen

Ergebnisse der Operateure konnten in Nachuntersuchungen nicht bestätigt werden (103).

Weitere Therapieversuche bestanden in der Anwendung von Darmrohren, Einläufen, Myotomien des Rektosigmoids, Dilatationen des Analsphinkters, der elektrischen Stimulation oder Gabe von anticholinerg beziehungsweise parasymphomimetisch wirkenden Medikamenten (11).

Obwohl schon 1898 Sir Frederick Treves (111) das Megakolon als Folge eines veränderten Rektums ansah, gelang es ihm jedoch nicht, dort strukturelle Veränderungen nachzuweisen. Folglich konnte er sich mit seinen Ansichten nicht durchsetzen. Auch als wenig später der nur schwach entwickelte Nervenplexus im Kolon eines Hirschsprung-Patienten erwähnt (109) und erstmals das völlige Fehlen von Ganglienzellen beschrieben wurde (14), maß man diesen Veränderungen keine ursächliche Bedeutung im Krankheitsgeschehen bei (11).

Ehrenpreis äußerte 1946 ebenfalls die Vermutung, dass die bisherige Annahme, das Megakolon stelle die zugrunde liegende Störung dar, falsch sei. Er belegte die nachgeburtliche Ausbildung dieser Veränderung anhand von Röntgenuntersuchungen Neugeborener. Doch auch er sah den distalen verengten Kolonabschnitt nicht als eigentliche Ursache der Erkrankung an. Vielmehr bezeichnete er das Megakolon als eine Störung ungeklärter Ursache (19, 103).

Schließlich wurde durch die umfassenden Arbeiten von Whitehouse & Kernohan (116) und Zuelzer & Wilson (124) die Aganglionose des verengten Segments endgültig als zugrunde liegende pathologische Veränderung bestätigt.

Die Therapie des Morbus Hirschsprung wurde erst entscheidend verbessert, als Swenson & Bill (104) im Jahre 1948 eine neue Operationsmethode vorstellten, die in der radikalen Entfernung des engen Segments bestand. Die operierten Patienten konnten durch dieses Verfahren geheilt werden.

Weitere chirurgische Ansätze wurden im Folgenden durch Duhamel, Soave und Rehbein entwickelt (103).

Eine sichere Diagnostik blieb dennoch ein Problem. 1949 wurden erstmals elektromanometrische Untersuchungen von Kindern mit Megakolon durchgeführt. Es fanden sich abnorme Reaktionsmuster im engen Segment und Sphinkter ani internus (58, 97, 105). Das Verfahren der Elektromanometrie wurde in die Diagnostik der Hirschsprung'schen Erkrankung einbezogen.

Auch bei der morphologischen Beurteilung gab es Fortschritte. So konnte im aganglionären Kolonsegment eine etwa drei- bis vierfach gesteigerte Acetylcholinesterase (AChE)-Aktivität nachgewiesen werden (38, 40, 61). Doch erst die Entwicklung der Thiocholin-Methode zur direkten Färbung der AChE-haltigen Strukturen durch Karnovsky und Roots (1964) (41) ermöglichte eine zuverlässige und einfache Anwendung in der Routinediagnostik (63).

Ein weiterer Ansatz zur Abgrenzung des pathologischen Darmabschnitts vom regelrecht innervierten bestand in der Darstellung katecholaminhaltiger sympathischer Nervenfasern, die in größerer Dichte distal des Megakolons vorkommen (3, 24). Allerdings erwies sich diese Methode der AChE-Färbung nicht überlegen, da die Katecholamine in den Biopsien rascher als Acetylcholinesterase abgebaut und dann nicht mehr nachgewiesen werden können (63).

In jüngerer Zeit wurden zahlreiche immunhistochemische Ansätze zur Darstellung neuronaler Strukturen und Synapsen entwickelt und Veränderungen der Darminnervation bei Morbus Hirschsprung nachgewiesen. Beispiele sind Untersuchungen mit MAb 171B5 (monoklonaler Antikörper B5) (117, 118, 120) und Synaptophysin (46, 81), Antikörpern gegen PGP 9.5 (Protein Gene Product 9.5), NSE (Neuronenspezifische Enolase), NFILs (Neurofilament Triplet Protein), S-100 Protein, GAP-43 (Growth Associated Protein-43), NCAM (Neural-Cell Adhesion Molecule) (44) sowie verschiedene Neuropeptide (88).

Im Rahmen der verbesserten Diagnostik von Innervationsstörungen des Darmes, insbesondere der enzymhistochemischen Methoden, wurden neben der klassischen Aganglionose andere assoziierte Störungen gefunden. So stellte Meier-Ruge 1971 ein Krankheitsbild vor, das klinisch Ähnlichkeit mit dem Morbus

Hirschsprung aufwies, sich von ihm aber histologisch durch den Nachweis von Ganglienzellen in den Darmplexus unterschied: Die Neuronale Kolondysplasie (62). Daneben kennt man heute weitere intestinale Malformationen, wie die Hypoganglionose, Ganglienzellunreife und einige nicht klassifizierbare Dysganglionosen (36).

Histopathologische und histochemische Untersuchungen entnommener Gewebeproben sind heute essentieller Bestandteil in der Diagnose neuronaler Funktionsstörungen des Gastrointestinaltraktes und finden auch intraoperativ für die Festlegung des oberen Resektionsrandes Verwendung. Dennoch können fortbestehende Dysfunktionen nach erfolgter Operation eines Morbus Hirschsprung ein Problem darstellen (2, 21, 46, 55, 88, 95).

Es konnten in diesen Fällen beispielsweise ganglienträgende, jedoch fehlinnervierte Darmbereiche nachgewiesen werden, die Veränderungen im Sinne einer Intestinalen Neuronalen Dysplasie (2, 46, 55, 65, 72, 94) oder Zeichen der Hypoplasie (70) zeigten. Welchen Krankheitswert diese Abweichungen besitzen, ist bislang nicht eindeutig geklärt.

Nicht zwangsläufig führen neuronal dysplastische Darmanteile im Übergangsegment bei Morbus Hirschsprung, die bei der Korrekturoperation nicht reseziert wurden zu persistierenden Problemen. So liegen Untersuchungen vor, die bei der Nachbeobachtung von derartigen Patienten keine Unterschiede bezüglich der Früh- und Spät komplikationen ergaben, im Vergleich zu Patienten mit isolierter Hirschsprung`scher Erkrankung (28).

Daneben gibt es jedoch einige Hinweise darauf, dass die verbliebenen pathologisch innervierten Darmsegmente die Ursache fortdauernder Probleme darstellen können. So wird von „verzögerter postoperativer Normalisierung“ beziehungsweise „weiter bestehenden obstruktiven Symptomen“ in Fällen von Morbus Hirschsprung assoziierter Intestinaler Neuronaler Dysplasie berichtet (45, 72, 95). Zusätzlich konnte eine positive Korrelation zwischen Ausprägung der Innervationsstörung und klinisch obstruktiven Symptomen ermittelt werden (71).

Entscheidend ist wahrscheinlich die Länge des belassenen Übergangsegmentes mit Intestinaler Neuronaler Dysplasie.

Es stellt sich daher die Frage nach einer Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten. Insbesondere konventionelle histopathologische Färbemethoden scheinen bei der prä- und intraoperativen Bestimmung der Ausdehnung von Segmenten mit gestörter Innervation nicht immer auszureichen.

Vor diesem Hintergrund wurde von Kobayashi et.al. (46) eine Untersuchung vorgestellt, in der ein polyklonaler Antikörper gegen Synaptophysin als Ein-Schritt-Technik für die intraoperative Untersuchung von Darmgewebe eingesetzt wurde. Es konnte eine veränderte Verteilung der Anti-Synaptophysin-markierten Strukturen in der Ring- und Längsmuskulatur bei Morbus Hirschsprung und IND gezeigt werden.

1.2 Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, unter Verwendung der Ein-Schritt-Technik mit Anti-Synaptophysin (EPOS Anti-Synaptophysin/HRP, DAKO®) Synapsen der Kolonwand bei Morbus Hirschsprung und der Intestinalen Neuronalen Dysplasie (IND) soweit darzustellen, dass eine morphologische Unterscheidung zwischen den Krankheitsbildern möglich ist, was unter anderem zu einer Verbesserung der herkömmlichen, immer noch mit Unsicherheiten behafteten, diagnostischen Verfahren beitragen könnte.

Dies soll besonders unter dem Gesichtspunkt der angewandten Methode, Konjugatantikörper-Reaktion und nachfolgende quantitative Auswertung mit dem Bildanalyse-System Quantimet 600, geschehen.

Die Untersuchungen verfolgten also das folgende Ziel:

Ist die von uns angewandte Methode für die differenzierende Darstellung von Synapsen beim Morbus Hirschsprung und der Intestinalen Neuronalen Dysplasie geeignet?

2. Beschreibung der Krankheitsbilder und Diagnostik

2.1 Anatomischer Aufbau und Physiologie des Kolons

Die Kolonwand wird mikroskopisch gebildet von Mukosa, bestehend aus hochprismatischem Epithel mit zahlreichen zwischengelagerten Becherzellen, der Lamina propria und einer gut ausgebildeten Lamina muscularis mucosae, anschließend folgen Tela submucosa sowie Ring- und Längsmuskelschicht (10). Durch deren Tonus und lokale Kontraktionen der Ringmuskulatur erfolgen unregelmäßig und an verschiedenen Stellen zur gleichen Zeit segmentale Kontraktionen. Sie führen lediglich zu einer Durchmischung oder allenfalls einem Weitertransport des Darminhaltes über kleine Strecken, sowohl nach distal als auch nach proximal. Diese nichtpropulsive Peristaltik stellt den Hauptanteil der Kolonmotilität dar.

Seltener treten echte peristaltische Wellen auf, die nach vorangegangener Relaxation des Darmes den Inhalt etwa 20 cm weiterbefördern, wiederum jedoch in aborale sowie orale Richtung. Echte Massenbewegungen, die einen Transport über lange Strecken zum Sigma hin bewirken, können nur ein- bis zweimal am Tage beobachtet werden (20).

An der Innervation des Kolons sind zwei Systeme beteiligt. Man findet ein intrinsisches, darmeigenes Nervensystem, das von nervalen Strukturen gebildet wird, die im Meissner-Plexus der Submukosa (Plexus submucosus) und im Auerbach-Plexus zwischen Ring- und Längsmuskulatur (Plexus myentericus) zu finden sind, sowie ein extrinsisches, zu dem Fasern des Sympathikus und Parasympathikus gehören, die von außen an den Darm gelangen. Letztgenanntes System moduliert die Funktion der intrinsischen Strukturen, welche ansonsten weitgehend autonom arbeiten (84).

Die Ganglien im Plexus submucosus sind vegetativ sympathischer Natur und versorgen die Lamina muscularis mucosae und Drüsenzellen in der Schleimhaut.

Im Plexus myentericus findet man neben Interneuronen, die die Zellen des Auerbach-Plexus untereinander und mit denen des Meissner-Plexus verknüpfen, motorische Neurone, die exzitatorisch auf die Kolonmuskulatur wirken und inhibitorische nicht-adrenerge Ganglienzellen. Die Ausläufer dieser Neurone strahlen in die Darmmuskulatur ein (39).

Wandert Darminhalt analwärts, registrieren submuköse Mechanorezeptoren die Aufweitung des Darmlumens und projizieren in den Plexus myentericus. Dort erregen sie über Interneurone nach distal gerichtete inhibitorische Nervenzellen mit denen sie über cholinerge Synapsen in Verbindung stehen. Es kommt zu einer neurogen vermittelten Relaxation der Ringmuskulatur sowie einer Kontraktion der längsgerichteten Muskelfasern, was die Dilatation des unterhalb des Bolus gelegenen Darmabschnittes zur Folge hat. Gleichzeitig führt die Dehnung der Kolonwand zu einer cholinerg vermittelten Kontraktion der Ringmuskulatur im oral gelegenen Bereich. Der Darminhalt wird in den relaxierten Bereich vorwärts geschoben. Dort wiederholt sich der Vorgang (36).

Gelangt der Bolus schließlich ins Rektum, führt wird über parasympathische Fasern die unwillkürliche Relaxation des Sphinkter ani internus ausgelöst. Dies stellt die Erschlaffungsphase des peristaltischen Reflexes am unteren Ende des Gastrointestinaltraktes dar, und wird über Ganglienzellen im Rektum vermittelt. Gleichzeitig verstärkt sich über parasympathische Äste des Sakralmarks (S2 - S4) die Kontraktion des äußeren Sphinkters (35, 98).

An die intrinsischen exzitatorischen und inhibitorischen Neurone des Plexus myentericus treten von außen präganglionäre Parasympathikusausläufer und stimulieren die Darmmotilität (84). Ihre Anzahl nimmt zum Rektum hin zu, da das Kolon ab der linken Kolonflexur zusätzlich von Fasern aus dem Sakralmark (S2 - S4) versorgt wird (63).

Sympathische Fasern aus dem Ganglion mesentericum superius beziehungsweise inferius modulieren die Acetylcholinfreisetzung an cholinergen Synapsen des Plexus myentericus (93).

2.2 Innervationsstörungen des Kolons

Gegenwärtig sind vier angeborene Krankheitsbilder mit gestörtem Innervationsmuster des Kolons eindeutig klassifizierbar, die Aganglionose, die Intestinale Neuronale Dysplasie Typ A und Typ B und die Hypoganglionose (65). Daneben können Ganglienzellen Zeichen der Unreife aufweisen, und schließlich existiert noch eine weitere Gruppe nicht eindeutig zuzuordnender Dysganglionosen (36).

Alle genannten Anomalien können sowohl für sich als auch kombiniert auftreten (65). Ebenso wurden erworbene Formen dieser Innervationsstörungen beschrieben (63, 114).

2.2.1 Morbus Hirschsprung

Es handelt sich um eine angeborene Erkrankung, der pathophysiologisch ein Darmabschnitt zu Grunde liegt, der durch das völlige Fehlen intramuraler Ganglienzellen und purinerge Interneurone gekennzeichnet ist (36). Sympathische und parasympathische extrinsische Nervenfasern sind vermehrt und hypertrophiert. Da sämtliche Ganglienzellen in den Plexus fehlen, kann es nicht zu koordinierter propulsiver Aktivität kommen. Die hemmende Wirkung der inhibitorischen Neurone auf die extramuralen parasympathischen Fasern bleibt aus, und sie können im betroffenen Bereich ihre Wirkung auf die Ringmuskulatur ungehindert entfalten. Es resultiert eine spastische Kontraktion des aganglionären Darmes, die auch den Sphinkter ani internus einschließt. Erst sekundär kommt es proximal zur Ausbildung des Megakolons.

Die parasympathischen Fasern der Lamina propria mucosae, der Muscularis mucosae und Ringmuskulatur hypertrophieren und die Acetylcholinausschüttung ist erhöht. Kompensatorisch steigt daher die Aktivität der Acetylcholinesterase, was zum Nachweis eines Morbus Hirschsprung genutzt werden kann (36, 81, 107).

Im proximal gelegenen Übergangsegment zwischen gesundem und erkranktem Darmabschnitt lässt sich eine allmähliche Abnahme der Ganglienzelldichte bis hin zur vollständigen Aganglionose nachweisen.

Neben dem klassischen Morbus Hirschsprung, mit erkranktem Segment im Sigmoidbereich, lassen sich je nach Ausdehnung des betroffenen Abschnitts weitere Erscheinungsformen der Aganglionose unterscheiden. So kommt die Erkrankung auch als totale Kolonaganglionose eventuell mit Dünndarmbeteiligung (Zuelzer-Wilson-Syndrom), ultrakurzes Hirschsprung-Segment und neurogene Sphinkterachalasie vor (65).

Die erkrankten Kinder fallen meist schon im Neugeborenenalter oder der frühen Säuglingsperiode durch eine Subileussyndromatik mit Stuhlretention, beziehungsweise verspätetem Mekoniumabgang, Erbrechen und aufgetriebenem Leib auf. Sie gedeihen schlecht. Die Entwicklung einer lebensbedrohlichen Enterokolitis gilt auch heute noch als die häufigste Todesursache bei Morbus Hirschsprung (75).

Bei älteren Kindern findet man hauptsächlich eine chronische, weitgehend therapieresistente Obstipation. Typische Dystrophiesymptome können beobachtet werden. Als schwerwiegende Komplikation gilt auch hier die Entwicklung einer Enterokolitis (30).

2.2.2 Intestinale Neuronale Dysplasie

Die Erkrankung wird heute nach der Aganglionose als die häufigste kongenitale Innervationsstörung des Kolons betrachtet (106), von manchen Autoren sogar als ebenso häufig angesehen (21). Zusätzlich existieren vielfältige Mischformen aganglionärer und dysplastischer Fehlbildungen (65).

Von der Intestinalen Neuronalen Dysplasie existieren zwei, sich klinisch und bioptisch unterscheidende Formen, die einzeln und als Kombination auftreten können.

IND Typ A

Diese Form ist gekennzeichnet durch eine Anlagehemmung des Sympathikus. Im Bereich des Auerbach-Plexus und im Umfeld arterieller Gefäße ist die sympathische Innervation hochgradig hypo- oder aplastisch. Die Fehlentwicklung der adrenergen Innervation führt zu einer ungehemmten Überstimulation der cholinergen Strukturen der Muskelschichten und aufgrund der Erweiterung der Blutgefäße zu einer erhöhten Schleimhautpermeabilität (36, 65).

Der Plexus myentericus zeigt manchmal Hyperplasiezeichen, während der Plexus submucosus meist keine Veränderungen aufweist. In der Lamina propria mucosae, der Muscularis mucosae und der Ringmuskulatur ist die Acetylcholinesterase-Aktivität mäßig erhöht. Die Kolonschleimhaut ist entzündlich verändert (21, 36).

Die betroffenen Kinder zeigen frühzeitig einen akuten Krankheitsverlauf mit schwerer Obstipation, teilweise blutigen Diarrhöen und ulzerierender Enterokolitis (9, 36).

IND Typ B

Bei diesem Krankheitsbild findet man eine Hyperplasie des Plexus submucosus und myentericus (94). Es treten als charakteristisches Merkmal Riesenganglien auf, deren Größe das Zwei- bis Dreifache der Norm beträgt. Im Schnitt weisen sie sieben oder mehr Nervenzellen auf. Die normale Ganglienzellanzahl liegt etwa bei vier.

Ektopie Ganglienzellen in der Mukosa, der Submukosa oder zwischen Fasern der Ring- und Längsmuskelschicht können vorkommen. Im Plexus submucosus fehlen propriozeptorische Zellen, so dass sowohl die reflektorische Kontraktion der

Ringmuskulatur oral eines Bolus als auch die Relaxation distal gehemmt sind (36, 65, 94).

Eine Erhöhung der Acetylcholinesterase in Nervenfasern der Muscularis mucosae und der Ringmuskulatur sowie eine Hyperplasie des Plexus submucosus kann bei jungen Kindern beobachtet werden, jedoch nur noch selten jenseits des zweiten Lebensjahres oder bei Erwachsenen. Die AChE-Erhöhung wird als Zeichen der Unreife angesehen, das mit zunehmender Ausdifferenzierung des Meissner-Plexus verschwindet. Dieser Prozess kommt um das zweite Lebensjahr in Gang (36, 68, 94).

IND B kann unter anderem zusammen mit einer Aganglionose auftreten und ist dort im Übergangsegment zum normal innervierten Kolon beobachtet worden (2, 9, 57). Es wurde darüber hinaus eine lokalisierte und eine disseminierte Form beschrieben (94).

Die klinischen Symptome können von einer Obstipationsneigung bis zu primär chronischer Obstipation mit nachfolgender Ausbildung eines Megakolons reichen (36, 68). Die Patienten werden erst später, meist als ältere Säuglinge bis hin zum Schulalter auffällig. Zuweilen werden sogar Erwachsene mit Verdachtsdiagnose einer IND vorgestellt (21).

2.2.3 Hypoganglionose

Kennzeichnend ist die verminderte Anzahl von Ganglienzellen des Plexus myentericus, bisweilen auch des Plexus submucosus und intramuraler parasymphathischer Nervenfasern. Dementsprechend ist die Acetylcholinesterase-Aktivität verringert. Auch Plexuslänge und -fläche sind reduziert (63, 73). Klinisch resultiert daraus ebenfalls Obstipation bis hin zur Pseudoobstruktion.

Die Hypoganglionose kommt als eigenes Krankheitsbild, aber auch in Kombination mit einem Morbus Hirschsprung, vor. In letzterem Falle sind die

Veränderungen im proximal des aganglionären Bereichs gelegenen Übergangsegment gefunden worden (36).

2.3 Prinzipien der Therapie der Innervationsstörungen

Beim Morbus Hirschsprung besteht die einzig wirksame und dauerhaften Erfolg versprechende Therapie in der Resektion des aganglionären Darmabschnitts und Behandlung der abnormen Innervation des Analsphinkters (11). Um die Ausdehnung der pathologisch innervierten Anteile intraoperativ zu erkennen, ist es notwendig, oberhalb des engen Teilstückes am vorgesehenen proximalen Resektionsrand Biopsien zu entnehmen. Bieten diese keinen Anhalt für eine Innervationsstörung, kann die Resektion in diesem Bereich vorgenommen werden (102).

Ebenfalls nur durch die operative Resektion des betroffenen Darmsegments ist eine wirksame Therapie der Intestinalen Neuronalen Dysplasie vom Typ A möglich (21, 36).

Bei der IND B besteht die Behandlung meist in der chirurgischen Entfernung des distalen Segments (63). Jedoch sind Darmspülungen, Laxantien und Sphinkterdehnungen als konservative Therapieansätze möglich (21, 36, 99).

Als chirurgische Therapiekonzepte stehen im wesentlichen vier Verfahren zur Verfügung, die verschiedentlich modifiziert wurden:

- Methode nach SWENSON (1948): Rektosigmoidektomie mit extraanaler Anastomose (102)
- Methode nach DUHAMEL (1956): Retrorektaler und transanaler Durchzug (17)
- Methode nach REHBEIN (1958): tiefe anteriore Resektion (86)
- Methode nach SOAVE (1962): endorektaler Durchzug (100)

2.4 Ätiologie der Innervationsstörungen des Kolons und Rektums

Fasern des Parasympathikus aus dem Spinalmark wachsen zwischen der 6. und 7. Embryonalwoche in das Kolon ein. Gleichzeitig wandern Neuroblasten aus dem Nervus Vagus zwischen der 6. und 12. Woche in die Region des späteren Plexus myentericus ein, wobei sie die linke Kolonflexur etwa in der 9. Woche erreichen und in weiteren vier Wochen bis hinunter ins Rektum gelangen. Neuroblasten aus dem Gebiet des Plexus myentericus wandern durch die Ringmuskulatur hindurch und bilden den Plexus submucosus (78). Infolgedessen wurde vermutet, dass den kongenitalen intestinalen Innervationsstörungen eine Migrationsstörung der Neuroblasten zugrunde liegt (12, 78, 112). In embryologischen Studien an Mäusen, die eine Aganglionose als autosomal rezessive Erkrankung entwickeln, konnte gezeigt werden, dass die Migrationszeit der Neuroblasten derart verlangsamt war, dass sie nie bis ins Rektum gelangten (112).

Neben der Diskussion einer ursächlichen Migrationsstörung gibt es auch Hinweise auf eine möglicherweise anoxische Schädigung der bereits eingewanderten Zellen (77).

Neuerdings werden jedoch Veränderungen der Extrazellulärmatrix, das heißt des Mesenchyms oder der Basallaminae, im Verdauungstrakt für die Pathogenese der Aganglionose sowie verwandter Innervationsstörungen verantwortlich gemacht. Im betroffenen Bereich wird aufgrund des gestörten „microenvironment“ die Neuroblastenmigration und -differenzierung gehemmt, die auf eine intakte Extrazellulärmatrix angewiesen ist (66, 79, 101, 113).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass glatte Muskelzellen des aganglionären Kolons die normale Ganglienzellreifung in vitro ungünstig beeinflussen. Vermutlich spielen bei der gestörten Interaktion auf zellulärer Ebene membran-gebundene Faktoren eine Rolle (56).

In den letzten Jahren konnten, vor allem in Fällen familiär gehäufte Erkrankungen, verschiedene Genmutationen bei Morbus Hirschsprung, der schon zuvor als zumindest teilweise genetisch bedingt angesehen wurde (63, 87), identifiziert

werden (8, 25, 26, 53, 91, 108, 123). Bekannt sind zur Zeit Veränderungen des RET-, GDNF- (glial cell line-derived neurotrophic factor), Endothelin-B-Rezeptor- und Endothelin-3-Gens. Das RET-Proto-Onkogen ist hierbei am häufigsten betroffen (83). Fast 50% der familiär gehäuften Fälle von Morbus Hirschsprung erwiesen sich als heterozygot für RET-Mutationen mit unvollständiger Penetranz. Es wurde ein Gen auf Chromosom 9 (9q31) gefunden, dass als Modifikator der Penetranz gelten kann (8). Als alleinige Ursache des Morbus Hirschsprung scheinen RET-Mutationen seltener anzutreffen zu sein, als vermutet, was als Hinweis auf eine polygenetische Ursache der Erkrankung gewertet werden kann (91). Das RET-Proto-Onkogen ist auf Chromosom 10 (10q11.2) lokalisiert und kodiert für das RET-Protein, eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase (25, 108). Mutationen des RET-Proto-Onkogens führen zu Reduktion beziehungsweise Funktionsverlust dieses Proteins, das als Rezeptor, unter anderem für GDNF, dient. Die Bindung von Effektoren an diesen Rezeptor wird behindert und die Signalübertragung gestört (25). Verminderte RET-Expression sowie reduzierte GDNF-Level wurden in aganglionären Därmen gefunden (123). Die normale Entwicklung der Innervation des Darmes scheint wesentlich von GDNF abhängig zu sein (26, 123). Mutationen in Genen, die für GDNF, seinen bevorzugten Rezeptor GFRalpha1 oder RET, das Element in der Signalübertragung, kodieren, konnten, wie Versuche mit transgenen Mäusen zeigten, zu aganglionären und dysplastischen Veränderungen des Darmes führen (26).

Daneben existieren Hinweise auf ein immunologisches Geschehen in der Entwicklung intestinaler Innervationsstörungen. In aganglionärem und dysplastischem Kolongewebe wurde eine erhöhte Expression von ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) und MHC (major histocompatibility complex)-Klasse-II-Antigenen nachgewiesen (32, 43, 54).

2.5 Diagnostik der Innervationsstörungen

Typische klinische Symptome lenken bereits den Verdacht auf einen Morbus Hirschsprung oder verwandte Erkrankungen. Aber insbesondere die Abgrenzung der verschiedenen Krankheitsbilder kann sich schwierig gestalten.

Als diagnostische Verfahren stehen verschiedene Röntgenaufnahmen, Abdomenleeraufnahme, Barium-Kontrasteinlauf, Defäkogramm, sowie Elektromanometrie und Elektromyographie zur Verfügung. Eine endgültige Diagnosestellung ist bisher jedoch nur anhand der Untersuchung von Biopsiematerial möglich.

2.5.1 Morphologische Untersuchung

Seit 1948 Whitehouse & Kernohan (116) und Zuelzer & Wilson (124) den Nachweis der Aganglionose im engen Darmsegment bei Morbus Hirschsprung erbringen konnten, ist die histologische Beurteilung von Biopsiematerial das wichtigste Verfahren in der Diagnostik der Innervationsstörungen.

Eine morphologische Begutachtung setzt die Entnahme von Darmgewebe voraus. Es wurden zunächst die gesamte Kolonwand umfassende Biopsien entnommen, eine Methode, die mit einigen Risiken behaftet ist, da die Probengewinnung unter direkter Sicht erfolgen muss und eine Allgemeinnarkose sowie die Naht der Wunde erfordert (52, 63).

Die Gewinnung von Gewebe wurde daher durch die von Dobbins & Bill 1965 eingeführte, lediglich Mukosa und Submukosa enthaltende, Saugbiopsie erheblich erleichtert (16).

2.5.2 Histologische Beurteilung

Charakteristischerweise fehlen beim Morbus Hirschsprung im betroffenen, in der Länge variierenden Darmsegment, das stets am Anus beginnt, die Ganglienzellen.

Bei der Intestinalen Neuronalen Dysplasie sind Ganglien vorhanden, die jedoch eine erhöhte Zellzahl aufweisen. Die Ganglienzellen können, sofern vorhanden, in tiefgreifenden Gewebeproben in der Hämatoxylin&Eosin (H&E)-Übersichtsfärbung dargestellt werden. Jedoch ist die eindeutige Identifikation der Ganglienzellen bisweilen schwierig (63).

Häufig angewandt wird die enzymhistochemische Darstellung mittels Natriumtetrazoliumreduktase (NADH)-Reaktion. Nervenzellen stellen sich aufgrund ihres hohen Gehalts an rauem endoplasmatischem Retikulum in dunkelblauer Farbe dar. Eine Verwechslung mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen der Gefäßwände ist jedoch möglich, da diese bisweilen ebenfalls stark NADH-positiv sind (81).

Die Unterscheidung vorhandener Nervenzellen von Schwann-Zellen wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH)-Reaktion erleichtert (31, 88). Unreife Ganglienzellen können in der Succinatdehydrogenase (SDH)-Reaktion gut nachgewiesen werden, während sie in der in der LDH-Reaktion keine oder ungenügende Anfärbung zeigen (21).

2.5.3 Histochemische Diagnostik

Die Standardmethode für den Nachweis pathologischer Innervationsmuster anhand von Biopsien stellt die Acetylcholinesterase-Reaktion dar. Hier macht man sich die erhöhte Aktivität dieses Enzyms in den hypertrophierten parasymphatischen Fasern bei Morbus Hirschsprung zunutze.

Erste Arbeiten in dieser Richtung erfolgten durch Kamijo et al. (1953) (40) und Koelle (1954) (49), die einen im Vergleich zum regelrecht innervierten Kolon zwei bis vierfach erhöhten Gehalt an Acetylcholinesterase im Homogenisat der aganglionären Darmwand sowie eine erhöhte AChE-Ausschüttung in diesem Bereich nach Stimulation des Kolons nachwiesen. Karnovsky und Roots (1964) (41) führten für den direkten Acetylcholinesterase-Nachweis die Thiocholin-Methode, die als eine einfache und sichere Methode die Diagnostik eines Morbus

Hirschsprung in der Routine verbesserte und bis heute dafür genutzt wird (69). Sie erlaubt die direkte Darstellung der cholinergen Ganglienzellen und Nervenfasern (93).

Auch bei der Intestinalen Neuronalen Dysplasie B kann eine erhöhte AChE-Aktivität beobachtet werden, die allerdings nicht Ausmaße wie bei der Aganglionose erreicht (63). Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, dass man sich bei der Gewebeentnahme auf oberflächliche Saugbiopsien beschränken kann. Die Diagnosestellung eines Morbus Hirschsprung ist auch ohne den Nachweis fehlender Ganglienzellen in den beiden Plexus aufgrund der AChE-Erhöhung in den parasympathischen Nervenfasern der Lamina propria und muscularis mucosae möglich (64).

Für die sichere Diagnostik anderer Innervationsstörungen wie der Hypoganglionose werden tiefgreifende Proben gefordert, die eine zusätzliche Beurteilung des Plexus myentericus erlauben (63).

Ein anderer Ansatz in der Diagnostik der Innervationsstörungen wurde mit dem histochemischen Nachweis der vermehrten sympathischen, katecholaminhaltigen Nervenfasern in Lamina propria mucosae und Ringmuskelschicht des distalen aganglionären Segments präsentiert (3, 24). Dabei erwies sich der Acetylcholinesterase-Nachweis jedoch als zuverlässiger, da die Katecholamine der sympathischen Nervenfasern rasch zugrunde gehen und dann für die Diagnostik nicht mehr zur Verfügung stehen, wohingegen Acetylcholinesterase noch in 24-Stunden alten Biopsien und sogar in Kryostatschnitten, die eine Woche zuvor entnommen wurden, zuverlässig dargestellt werden kann (63).

2.5.4 Immunhistochemie

Zahlreiche allgemeine Marker nervaler Strukturen wie PGP 9.5 (Protein Gene Product 9.5), NSE (Neuronenspezifische Enolase), NFILs (Neurofilament Triplet Protein) und S-100-Protein oder verschiedene Neuropeptide, wie Neuropeptid Y und VIP (vasoaktives intestinales Polypeptid), sind geeignet, um an der

Darminnervation beteiligte Strukturen sichtbar zu machen und Veränderungen aufzudecken (88).

Neuromuskuläre Verbindungen und Synapsen lassen sich durch Markierung mit Antikörpern gegen Bestandteile synaptischer Vesikel darstellen. Verwendung fanden hier beispielsweise Antikörper gegen GAP-43 (Growth Associated Protein-43) und NCAM (Neural-Cell Adhesion Molecule) (44)

Eine Reihe von Untersuchungen wurden mit Anti-Synaptophysin (46, 81) beziehungsweise MAb 171B5 (monoklonaler Antikörper B5) (6,7,8) durchgeführt. Beide Antikörper sind gegen Synaptophysin gerichtet. Synaptophysin ist ein Transmembranglykoprotein, das in kleinen Vesikeln präsynaptisch in Neuronen sowie in Neuroendokrinen Zellen vorkommt (59) und cholinerge, adrenerge und neuroendokrine Strukturen gleichermaßen darstellt, also keinem spezifischen Transmittersystem zuzuordnen ist (81). Da das Molekül wohl in allen Synapsen gefunden wird (85), kann sein quantitativer Nachweis als Marker für die Synapsendichte verwendet werden (18).

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Mit einem Konjugatantikörper gegen Synaptophysin wurden Synapsen in aganglionärem, dysplastischem und gesundem Darmgewebe dargestellt und anschließend mit dem Bildanalysesystem Quantimet 600 quantitativ ausgewertet. Verwendung fanden Wand-durchgreifende Kolonbiopsien von Patienten, die zwischen 1991 und 1997 unter dem Verdacht eines Morbus Hirschsprung oder einer Intestinalen Neuronalen Dysplasie in der Kinderchirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen aufgenommen wurden. Im Rahmen der Diagnostik mussten diesen Kindern Gewebeproben entnommen werden. In diesen bestätigten Mitarbeiter des Tübinger Institutes für Hirnforschung anhand der neuropathologischen Begutachtung eine Innervationsstörung. Mögliche Diagnosen waren Aganglionose und Übergangsegment bei Morbus Hirschsprung beziehungsweise Intestinale Neuronale Dysplasie Typ B. Auf diese Befunde konnte zurückgegriffen werden, und sie bilden die Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen.

Als Kontrolle diente Kolongewebe, das sechs Kindern mit anderen Erkrankungen, wie anorektalen Missbildungen, im Rahmen chirurgischer Interventionen entnommen wurde und einen regelrechten Aufbau und Ganglienzellbesatz aufwies. Es wurden 20 Präparate von insgesamt 19 Kindern untersucht. Pro Patient ging jeweils ein Präparat in die Auswertung ein. Nur von einem Jungen fanden zwei Proben Verwendung, die jedoch von verschiedenen Darmabschnitten stammen und unterschiedliche histologische Diagnosen aufweisen. Das Alter der Kinder mit Innervationsstörung lag zum Termin der Gewebeentnahme zwischen 10 Tagen und 22 Monaten, im Mittel bei 11 Monaten. Die Gewebeblöcke waren in flüssigem Stickstoff bei -196°C konserviert.

Proben, die eine Innervationsstörung im Sinne einer Intestinalen Neuronalen Dysplasie B beziehungsweise eines dysplastischen Übergangsegmentes bei Morbus Hirschsprung aufweisen, unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihres histologischen Bildes. So stellt die Übergangszone eine nach oralwärts zunehmende Normalisierung des aganglionären Befundes dar. IND B tritt als eigenständiges Krankheitsbild, jedoch auch in Kombination mit einem Morbus Hirschsprung auf. In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Befunde dysplastisches Übergangsegment und IND B zu einer Gruppe zusammengefasst (IND/Ü-Segment).

Die Proben mussten für die vorliegenden Untersuchungen Anteile der Ring- und Längsmuskulatur enthalten, das heißt oberflächliche Saugbiopsien waren nicht geeignet. Das ausgewählte Biopsiematerial wurde entsprechend der bereits vorliegenden Befundung in drei Untergruppen eingeteilt:

1. Aganglionäres Segment bei Morbus Hirschsprung: 6 Proben
2. IND/Ü-Segment: 6 Proben, davon 2 Proben dysplastisches Übergangsegment bei Morbus Hirschsprung, 4 Proben isolierte Intestinale Neuronale Dysplasie
3. Regelrechtes Innervationsmuster: 6 Proben

Die histologischen Diagnosekriterien waren:

Aganglionose

In der NADH-Dehydrogenase-Reaktion sind sowohl im Plexus submucosus als auch im Plexus myentericus keine Ganglien beziehungsweise Ganglienzellen nachweisbar. Zusätzlich sieht man in der Acetylcholinesterase (AChE)-Reaktion als Zeichen der parasymphatischen Fehlinnervation vermehrt AChE-positive Fasern in der Mukosa sowie diffuse Aktivitätssteigerungen im Bereich der Lamina propria mucosae und der Muskelschichten (Lamina muscularis mucosae, Ring- und Längsmuskulatur).

Dysplastisches Übergangsegment bei Morbus Hirschsprung/IND B

Es lassen sich in der NADH-Reaktion Ganglien darstellen, die sich jedoch teilweise als sehr zellreich (z.B. Ganglien mit mehr als 10 Zellen), hyperplastisch, erweisen. Etliche der Ganglienzellen selbst sind klein und werden in der NADH-Reaktion nur schwach angefärbt, zeigen also Hypo- beziehungsweise Dysplasiezeichen. Ektope Nervenzellen im Bereich der Submukosa oder der Muskelschichten können vorhanden sein.

Die AChE-Reaktion zeigt eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Aktivitätssteigerung, die jedoch nicht die des aganglionären Bereichs bei Morbus Hirschsprung erreicht.

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Von jeder Probe wurden mindestens fünf Gefrierschnitte von 8 µm Dicke gefertigt und in frischem, -20°C kaltem Azeton 10 Minuten lang fixiert. Während der anschließenden 45-minütigen Lufttrocknung erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle der Objekte auf ihre Verwendbarkeit hin (mögliche Fehler, z.B. Einrollen der Schnittränder, Zerreißen des Präparats, ungenügende Haftung auf dem Objektträger) und die Auswahl der qualitativ besten drei Schnitte aus der Serie einer Gewebeprobe für die Antikörperfärbung. Die verbleibenden wurden für die Negativkontrolle vorgesehen. Danach erfolgte die Inkubation der Proben für 10 Minuten in einer Wasserstoffperoxid-/Tris-Puffer-Lösung (6 ml H₂O₂ 30%, 200 ml Tris-Puffer) zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität. Es folgten Spülvorgänge in destilliertem Wasser und zweimal fünf Minuten in jeweils frischem Tris-Puffer.

Die Schnitte wurden nun mit je zwei Tropfen EPOS Anti-Synaptophysin/HRP, DAKO®, beziehungsweise EPOS Immunglobulins/HRP, DAKO®, als

Negativkontrolle bedeckt und 60 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Verdünnung der Antikörper war nicht notwendig, da sie bereits entsprechend vorliegen. Nach einem weiteren Spülvorgang von jeweils zweimal fünf Minuten in Tris-Puffer erfolgte die Entwicklung der Proben mit einer DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)-Lösung von 1mg/ml DAB und 0,02% Wasserstoffperoxid. Die Reaktionsdauer betrug neun Minuten.

Anschließend wurden die Gefrierschnitte in destilliertem Wasser gespült und zur besseren Darstellung der Gewebestrukturen, Muskelfasern und Zellkerne, mit Hämalun gegengefärbt. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Einbettung in Einschlußmittel.

3.2.1.1 Prinzip der Antikörperreaktion und deren Nachweis

Grundlage für die Antikörperreaktion ist die Bindung des poly- oder monoklonalen Antikörpers an das Epitop des nachzuweisenden Antigens. Polyklonale Antikörper, die sehr oft vom Kaninchen gewonnen werden, reagieren dabei mit verschiedenen Epitopen des Antigens, monoklonale Antikörper sind lediglich gegen ein einzelnes spezifisches Antigen gerichtet (5). Der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex kann anschließend durch ausgewählte Markersubstanzen sichtbar gemacht werden. Dazu zählen beispielsweise Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe oder partikuläre Marker, zum Beispiel Goldpartikel. Voraussetzungen für die Antikörperreaktion sind die Spezifität des verwendeten Antikörpers sowie die Stabilität der Antigen-Determinanten, das heißt diese müssen zum Beispiel die Gewebepreparation überstehen (15).

3.2.1.2 Immunoenzymatische Färbemethoden

Beim Einsatz von Enzymen, zum Beispiel Peroxidase oder Alkalischer Phosphatase, als Markersubstanzen können diese in einer Färbereaktion histochemisch nachgewiesen werden.

In den vorliegenden Untersuchungen fand Meerrettichperoxidase Verwendung. Dieses Enzym besitzt eine eisenhaltige Hämgruppe (Hämatin). Hämatin kann mit Wasserstoffperoxid einen Enzym-Substrat-Komplex bilden, der unter Abspaltung von Wasser und atomarem Sauerstoff zerfällt. Dazu ist jedoch ein Elektronendonator notwendig, der anschließend oxidiert wird. Stoffe, die durch diesen Oxidationsvorgang in unlösliche, farbige Reaktionsprodukte umgewandelt werden, sogenannte Chromogene, sind zum Nachweis der Antikörperreaktion einsetzbar. Eine solche Substanz ist 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB). Es bildet ein braunes und in organischen Lösungsmitteln unlösliches Reaktionsprodukt an der Stelle des nachzuweisenden Zielantigens.

Die Peroxidaseaktivität kann durch einen Substratüberschuss gehemmt werden, was zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität genutzt wird (5).

3.2.1.3 Antikörperreaktionen

a) Direkte Methode

Bei dieser Technik bindet ein enzymmarkierter Antikörper an das nachzuweisende Gewebeanigen. In einer anschließenden Färbereaktion wird das Enzym dargestellt (6) (Abb. 3.1.).

b) Indirekte Methode

Hier bindet ein primärer Antikörper an das Gewebeanigen. In einem weiteren Schritt wird ein enzymmarkierter Sekundärantikörper zugegeben, der gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet ist. Danach erfolgt wie oben beschrieben die Substrat-Chromogen-Reaktion (2-Schritt-Methode) (Abb. 3.2.).

Diese Methode ist empfindlicher als die direkte Technik, da sich mehrere sekundäre Antikörper mit verschiedenen Epitopen des primären verbinden können. So erhält man eine höhere Enzymkonzentration am Ort des nachzuweisenden Antigens.

Eine weitere Signalverstärkung kann auch durch Einführung zusätzlicher Markierungsschritte mit enzymkonjugierten Antikörpern erreicht werden. Durch Zugabe eines ebenfalls enzymgekoppelten, gegen den Zweitantikörper gerichteten, Tertiärantikörpers, erreicht man wiederum eine stärkere Farbintensität (6) (Abb. 3.3.).

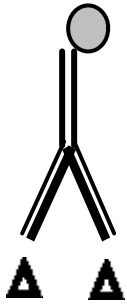


Abb. 3.1.: Direkte Methode:
Der enzymmarkierte Primärantikörper bindet an das Gewebsantigen

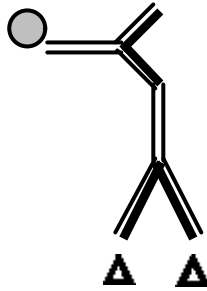


Abb. 3.2.: Indirekte 2-Schritt-Methode:
Der enzymmarkierte Sekundärantikörper reagiert mit dem an das Gewebsantigen gebundenen unmarkierten Primärantikörper

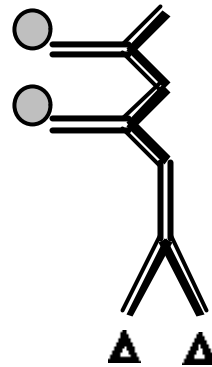
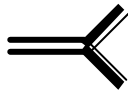


Abb. 3.3.: Indirekte 3-Schritt-Methode:
Der enzymmarkierte Tertiärantikörper reagiert mit dem ebenfalls enzymmarkierten Sekundärantikörper

Legende zu den Abbildungen 3.1. - 3.4.



Primärantikörper

Sekundär (Brücken)-
Antikörper

Enzym

Gewebsantigen

c) Lösliche Enzym-Immunkomplexe (Unmarkierte Antikörpertechnik)

Bei diesem Verfahren wird zuerst mit einem unkonjugierten Primär-, dann einem unmarkierten Sekundärantikörper behandelt. Anschließend wird ein löslicher Enzym-anti-Enzym-Komplex zugegeben, der mit dem zweiten Antikörper, dem sogenannten Brückenantikörper, reagiert.

Am häufigsten verwendet man die PAP-(Peroxidase-anti-Peroxidase) und APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase). Bei dieser Technik handelt es sich um ein sehr empfindliches Verfahren. Da der Enzym-Immunkomplex jeweils mehrere, im Falle von PAP drei, bei APAAP zwei Enzymmoleküle enthält, wird eine größere Anzahl Enzymmoleküle am Antigenort und damit eine höhere Sensitivität erreicht (6) (Abb. 3.4.).

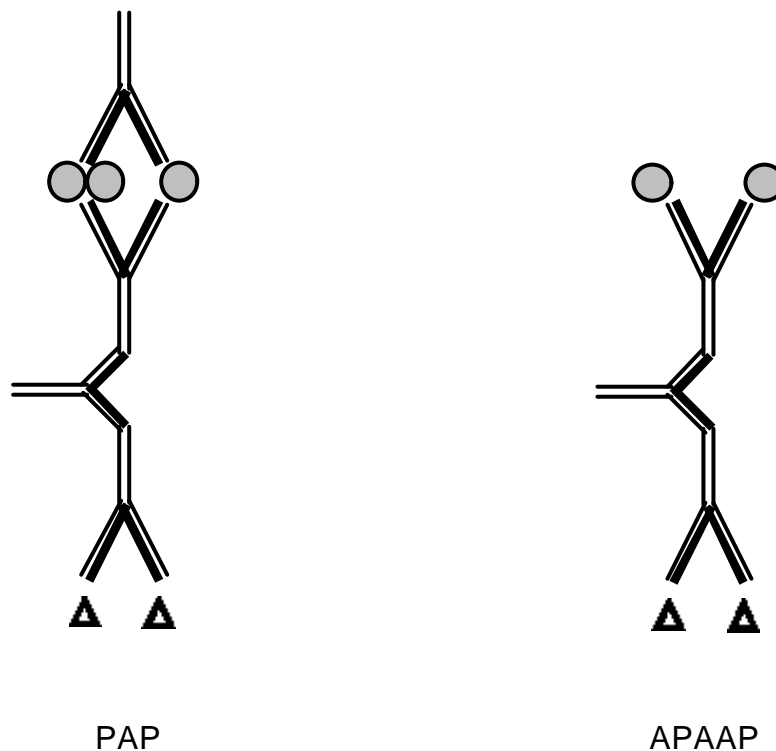
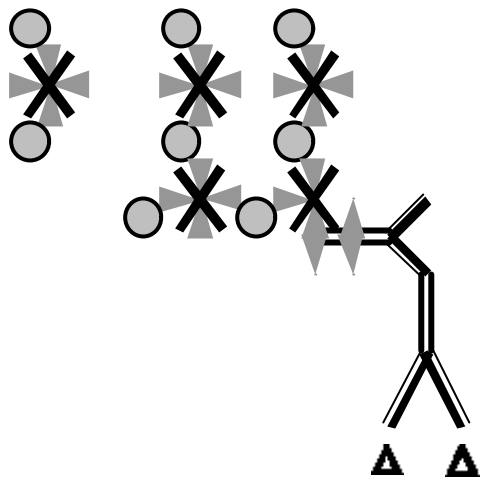


Abbildung 3.4.: Lösliche Enzym-Immunkomplex-Methoden: Vorgeformte Komplexe (PAP oder APAAP) binden an den Sekundär (Brücken)-Antikörper

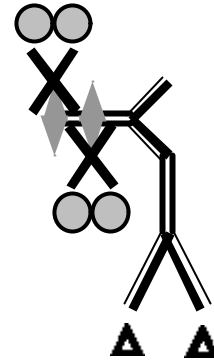
d) Avidin-Biotin-Methode

Hier wird die hohe Bindungsaffinität von Avidin zu Biotin ausgenutzt.

Ein primärer Antikörper reagiert mit dem nachzuweisenden Antigen. Anschließend wird ein biotinylierter sekundärer Antikörper zugegeben, der nachfolgend über Avidin mit dem Markerenzym, zum Beispiel Peroxidase, verbunden wird. Dies kann über vorgeformte Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe (ABC-Methode) oder enzymmarkiertes Avidin (LAB-Methode) erfolgen. Mit dem biotinylierten Zweitantikörper können jeweils mehrere markierte Avidinmoleküle beziehungsweise Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe reagieren. Letztere bilden auch untereinander vernetzte Verbindungen. Dies trägt zu verbesserter Sensitivität durch Erhöhung der Enzymkonzentration am Ort des Nachweises bei (6, 15) (Abb.3.5.).



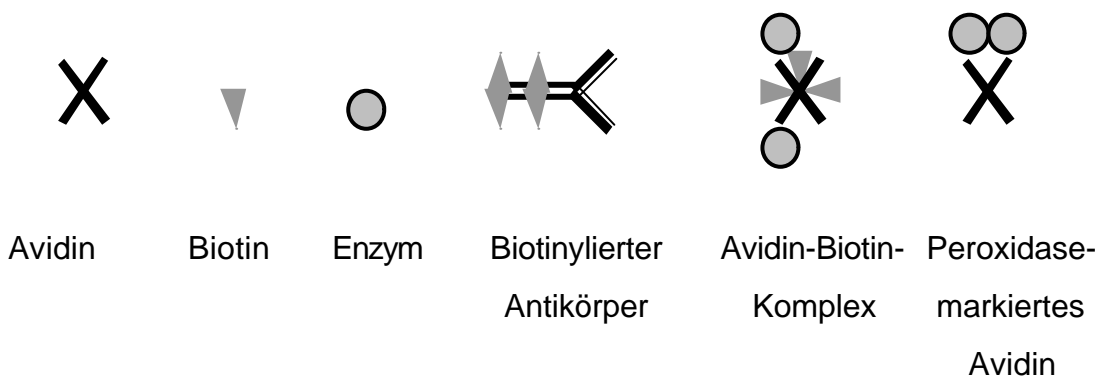
ABC-Methode



LAB-Methode

Abbildung 3.5.: Avidin-Biotin-Methoden: Vorgeformte Avidin-Biotin-Komplexe (ABC) oder enzymmarkiertes Avidin (LAB) reagieren mit dem biotinylierten Sekundärantikörper

Legende zu Abb. 3.5.



e) Ein-Stufen-Nachweis

Da die oben beschriebenen Techniken aus mehreren Arbeitsschritten bestehen, bei denen jeweils bestimmte Inkubationszeiten einzuhalten sind, beläuft sich die Zeitdauer vom Anfertigen der Gefrierschnitte bis zum Ende der Färbung auf ungefähr fünf Stunden.

Diese kann durch die Verwendung eines Antikörper-Konjugats, wie es auch in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzt wurde, verkürzt werden. Im Falle des Synaptophysin-Antikörper-Konjugats liegen, chemisch gebunden an ein inertes Polymer, mehrere Primärantikörper vom Kaninchen gegen menschliches Synaptophysin und Meerrettichperoxidase als nachzuweisendes Markerenzym vor. Zusätzlich ist ein Blockierungsgagens zur Verminderung unspezifischer Hintergrundaktivitäten zugesetzt.

Es handelt sich bei dieser Technik um eine Ein-Stufen-Nachweismethode (Enhanced Polymer One-Step Staining, EPOS, DAKO®) (13)

Hier entfällt die Verwendung eines sekundären Antikörpers und außerdem die getrennte Zugabe des Markerenzym, da dieses bereits an den Antikörper gebunden ist. Die Reaktionsdauer verkürzt sich auf eine Stunde.

3.2.2 Auswertung der Proben

3.2.2.1 Registrierung der Antikörpermarkierungen

Die Analyse der gewonnenen Präparate erfolgte mit dem digitalen Bildanalysesystem Quantimet 600 (Leica, Bensheim). Dieses ermöglicht die halbautomatische Registrierung von gefärbten Strukturen in histologischen Schnitten mit anschließender Planimetrie und fand im vorliegenden Fall bei der Ermittlung von Synaptophysin-Markierungen in der Ring- und Längsmuskulatur der Kolonproben Verwendung.

Dabei wird das Bild des lichtmikroskopisch 100fach vergrößerten Ausschnittes der Probe mit einer angeschlossenen Videokamera aufgenommen. Elektronische Signale, proportional zur Helligkeit einzelner elektronischer Bildpunkte (sog. Pixel), werden für jedes Bild ermittelt und für die Analyse herangezogen. Ein Bild setzt sich dabei aus einer definierten Anzahl Grauwerte zusammen. Alle Messungen erfolgen auf Pixelbasis mit nachfolgender Umwandlung in metrische Werte.

Die Auswertung der Kolonproben erfolgte jeweils getrennt nach Ring- und Längsmuskulatur. Die Antikörper-markierten Strukturen wurden in einem durch den Programm-internen Zählrahmen begrenzten Ausschnitt des Gesamtbildes von $94169,1\mu\text{m}^2$ registriert. Bei 100facher Vergrößerung betrug die kleinstmögliche noch zu erfassende Markierung $0,522\mu\text{m}^2$.

Die Anzahl der innerhalb des Bildausschnittes registrierten Markierungen (*Signale*) sowie deren jeweiliger Flächeninhalt (*Fläche* in μm^2) wurden vom Rechner bestimmt und aufsummiert. Pro Fenster konnte so je ein Wert für die insgesamt Antikörper-markierte Fläche und die Gesamtanzahl der Markierungen bestimmt werden.

Die Detektion der braunen Anti-Synaptophysin-markierten Strukturen, die andere Grauwerte als der Hintergrund des Bildes aufweisen, erfolgte manuell per Mausklick, durch Quantimet 600 wurden anschließend automatisch weitere Bereiche gleicher Farbintensität im Bildausschnitt registriert. Hierbei war es wichtig, möglichst optimale Kontrastwerte für die Registrierung der braunen Antikörpermarkierungen zu erreichen, das heißt auch schwächere Anfärbungen noch detektieren zu können, aber unmarkierte Strukturen nicht fälschlich einzuschließen.

Innerhalb eines Präparates wurden in Ring- und Längsmuskulatur die beim ersten Einzelbild einer Probe festgelegte Einstellung des Gesamtbildes (Kontrast, Helligkeit) und die bei der Detektion bestimmten Kontrastwerte für die Erkennung der Synaptophysin-Markierungen in diesem Bild beibehalten. Jedes einzelne Präparat erforderte aber aufgrund individueller Gewebeeigenschaften eine Neueinstellung dieser Werte.

Die Auswertung beider Muskelschichten in den mit dem Antikörper behandelten Präparaten erfolgte getrennt voneinander. Der erste Schritt bestand darin, die Richtung der Muskelfasern zu bestimmen, in der sie im Verlauf angeschnitten worden waren, das heißt quer, längs oder schräg, um dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigen zu können. Als *Quer* wurde derjenige Anschnitt bezeichnet, bei dem die Muskelfasern mehrheitlich als rund, in ihrem Querschnitt angeschnittene Fasern, dargestellt erschienen, längs getroffene Bereiche wiesen langgestreckte Faserverläufe auf (Schnittrichtung *Längs*). Die Einteilung in die Schnittebene *Schräg* war eine Ausschlussdiagnose. Präparate, die sich weder der einen noch der anderen Gruppe zuordnen ließen, da die Fasern in ihrem Verlauf nicht so langstreckig dargestellt waren, wie bei den längs angeschnittenen, jedoch auch keine hauptsächlich runden Faserquerschnitte aufwiesen, wurden hier hinzugezählt.

Pro Muskelschicht wurden sechs repräsentative, unmittelbar nebeneinander liegende durch den Rechner-internen Zählrahmen begrenzte, Bildausschnitte mit einer Größe von jeweils $94169 \mu\text{m}^2$ ausgewertet, das heißt zwölf Messungen je Präparat durchgeführt. Anzahl (*Signale*) und Flächeninhalt (*Fläche*) der im jeweiligen Areal registrierten Antikörpermarkierungen wurden bestimmt. Auf dem linken oder oberen Rand des Rahmens liegende Markierungen wurden dabei mitgezählt, nicht dagegen auf der rechten oder unteren Begrenzung befindliche.

Aus den aufsummierten Flächenwerten der verschieden großen Markierungen ergibt sich die insgesamt Anti-Synaptophysin-markierte Fläche jedes Einzelfeldes (Bildausschnittes), die für die Auswertung verwendet wurde.

Die Zählareale (Bildausschnitte) lagen, je nach Ausdehnung des Schnittes, möglichst in der Mitte desselben. Das erste Feld wurde an der Submukosa-/ Ringmuskulatur-Grenze gewählt, die folgenden schräg in einer Reihe fortlaufend zur Längsmuskulatur hin, gegebenenfalls v-förmig wieder zurück. Auf diese Weise wurde versucht, möglichst die verschiedenen Bereiche der Schicht zu erfassen.

In der Längsmuskulatur, die sich in der Breite meist wesentlich schmäler als die Ringmuskelschicht darstellte, war es nur möglich, sechs Zählrahmen so nebeneinander zu platzieren, dass diese etwa in die Mitte der Schicht zu liegen kamen (Abb. 3.6.).

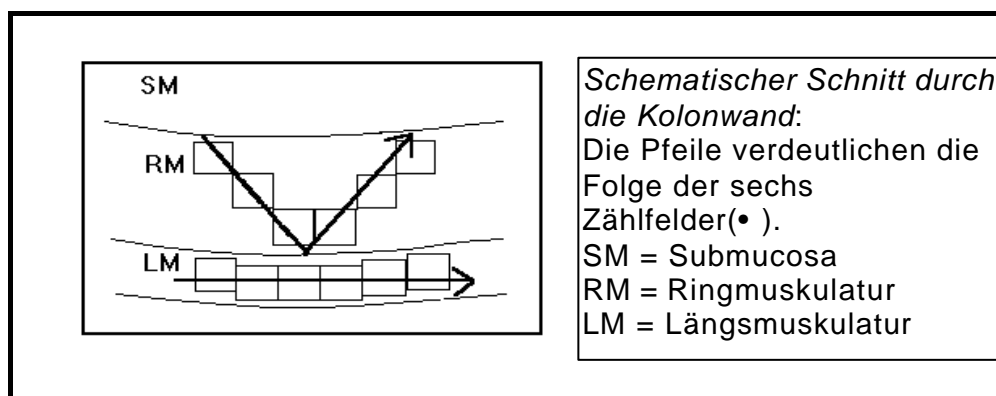


Abbildung 3.6.: Lage von zwölf Zählrahmen im Schnitt

3.2.2.2 Statistische Methoden zur Auswertung der Messungen

Die Analyse mit Quantimet 600 ergab für jedes Element aus der Stichprobe, das heißt für jede Einzelprobe, jeweils sechs Einzeldaten pro Muskelschicht für die Anzahl der Synaptophysin-Markierungen (*Signale*) und die markierte Fläche (*Fläche* in μm^2).

Es wurden Gruppen gebildet, die nach folgenden Merkmalen mit den jeweiligen Ausprägungen definiert sind:

1. Erkrankung
 - a) Aganglionär
 - b) IND
 - c) Gesund
2. Lokalisation
 - a) Ringmuskulatur (RM)
 - b) Längsmuskulatur (LM)
3. Schnittrichtung
 - a) Quer
 - b) Längs
 - c) Schräg
4. Lokalisation*Erkrankung
 - a₁) RM der aganglionären Proben
 - b₁) RM der IND/Ü-Segment Proben
 - c₁) RM der gesunden Proben
 - a₂) LM der aganglionären Proben
 - b₂) LM der IND/Ü-Segment Proben
 - c₂) LM der gesunden Proben
5. Probe[Erkrankung]

Ziel dieser Untersuchung ist es, zu testen, ob Unterschiede im Färbeverhalten zwischen den einzelnen Gruppen, die sich in der Größe der Anti-Synaptophysin

(SP)-gefärbten Fläche (*Fläche*) sowie in der Anzahl der Antikörpermarkierungen (*Signale*) zeigen, lediglich zufallsbedingt (Nullhypothese) oder auf den jeweiligen Gruppeneffekt zurückzuführen sind (Alternativhypothese).

Unter Gruppeneffekten sind hier die oben erwähnten Faktoren *Erkrankung*, *Lokalisation*, *Lokalisation*Erkrankung* und *Schnittrichtung* sowie die Einflussgröße Einzelprobe mit jeweils definierter Erkrankung (*(Probe[Erkrankung])*) zu verstehen.

*Lokalisation*Erkrankung* kennzeichnet die Interaktion Lokalisation mit Erkrankung, das heißt die Gruppe *Lokalisation* wird noch einmal getrennt nach den jeweiligen Erkrankungen betrachtet.

Es soll eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Art der Innervationsstörung (*Erkrankung*), die Richtung der angeschnittenen Fasern (*Schnittrichtung*) und die Ring- beziehungsweise Längsmuskulatur des Darmgewebes (*Lokalisation*) in signifikanter Weise die gemessenen Werte für die Synaptophysin-Markierungen beeinflussen. Da es hier mehr als zwei verschiedene Gruppenmittelwerte zu vergleichen galt, wurde die Varianzanalyse für die deskriptive Statistik gewählt. Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm JMP® durchgeführt.

Es wurde programmintern ein lineares Regressionsmodell auf der Basis der Methode der Kleinsten Quadrate gebildet, das heißt die Schätzung der Regressionskoeffizienten erfolgt unter der Bedingung, dass die Summe der Abweichungsquadrate der vorhergesagten von den beobachteten Werten minimal ist (110).

Das vorliegende Modell enthält die Einflussgrößen *Erkrankung*, *Schnittrichtung*, *Lokalisation*, *Lokalisation*Erkrankung* sowie *Probe innerhalb Erkrankung* (*(Probe[Erkrankung])*). Letztere wird als randomisierte Einflussgröße betrachtet, da davon auszugehen ist, dass die Proben der einzelnen Patienten nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wurden. Bei *Probe innerhalb Erkrankung* ist die Gruppe *Probe* in die Kategorie *Erkrankung* eingebunden, aus der Population der an einer

bestimmten Form der untersuchten Erkrankungen leidenden Patienten wurden jeweils einige Proben für die Untersuchungen herausgenommen („nested effects“) (90).

Zur Prüfung auf Signifikanz dienten F-Tests. Bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% wurde die Nullhypothese jeweils zurückgewiesen, wenn die Signifikanzwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug. In diesem Fall ist von der Gültigkeit der Alternativhypothese auszugehen. Beim Test der Effekte des Modells bedeutet dies, dass sich ein, die interessierende Einflussgröße beinhaltendes, Modell von einem hypothetischen Modell, welches dem zu untersuchenden Effekt nicht unterliegt, unterscheidet, das heißt Schwankungen innerhalb der Messwerte können durch diesen Effekt erklärt werden.

Zur weitergehenden Darlegung der Verhältnisse innerhalb der oben genannten Gruppen, zum Beispiel der Gegenüberstellung aganglionärer und gesunder Proben innerhalb der Gruppe *Erkrankung*, wurde zum Vergleich zweier Mittelwerte der zweiseitige (two-tailed) t-Test verwendet. Auch hier wurde die Nullhypothese, die die Gleichheit der verglichenen Mittelwerte besagt, bei einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ abgelehnt.

Die graphische Darstellung der jeweiligen Gruppenmittel verwendet den Mittelwert, der über die minimalen quadratischen Abweichungen der einzelnen Messpunkte definiert wird. Er wird im Folgenden als *Mittelwert_{LS}* (*MW_{LS}*) bezeichnet (LS für Least Squares). Es handelt sich dabei um Vorhersagewerte, geschätzt unter der Annahme, dass die anderen, in diesem Fall nicht untersuchten, Einflussgrößen des Modells „neutral“ gehalten werden. Ein Schätzwert ist auch der jeweils angegebene Standardfehler (90).

Die erhobenen Daten erwiesen sich als extrem schief verteilt. Sie wurden durch logarithmische Transformation in eine annähernd normalverteilte Darstellung (Gauß'sche Verteilung) gebracht, wie sie für Varianzanalysen gefordert wird. Da Nullzählungen vorkamen (keine Markierungen im Zählfeld), wurde jeweils der

Rohwert mit eins addiert ($\log_{10}(\text{Fläche}+1)$, $\log_{10}(\text{Signale}+1)$). Die Addition eines im Vergleich zu den Messdaten derart kleinen Betrages nimmt keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

Durch die logarithmische Umwandlung werden die Beziehungen der erhobenen Werte zueinander nicht verändert, so dass Tendenzaussagen weiterhin möglich sind.

3.3 Chemikalien und Geräte

Folgende Chemikalien und Geräte wurden eingesetzt:

- Tris-Puffer pH7,5
- EPOS Anti-Human Synaptophysin/HRP, fertige Gebrauchslösung (DAKO®, Hamburg)
- EPOS Immunglobulins/HRP, Negative Control, fertige Gebrauchslösung (DAKO® Hamburg)
- DAB Chromogen tablets (DAKO® Hamburg)
- Mayers Hämalunlösung (MERCK®, Darmstadt)
- Hico-Mic Mikroskopier-Einschlussmittel
- digitales Bildanalysesystem Quantimet 600 (Leica, Bensheim), Leitz Mikroskop DMR
- Programme: Microsoft Word für Windows 97
 Microsoft Excel 97
 JMP Version 3.1.5.

4. Ergebnisse

4.1 Anti-Synaptophysin-gefärbte Kolonbiopsien

Es wurden aganglionäre, dysplastische und regelrecht innervierte Kolonbiopsien (Kryostatschnitte) mit Anti-Synaptophysin gefärbt. Nachfolgend sind die Färbungen exemplarisch an je einer Probe bei den verschiedenen Innervationsstörungen dargestellt.

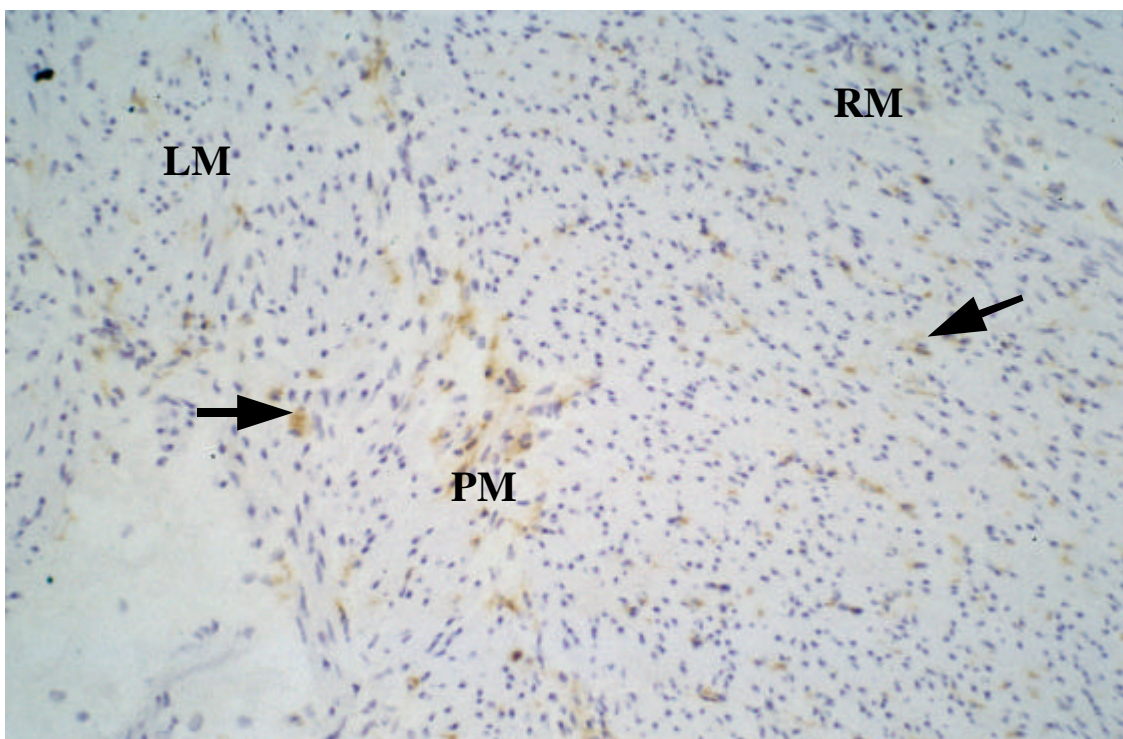


Abbildung 4.1a: Aganglionäres Darmsegment bei M. Hirschsprung.

Muskelfasern der Ring- und Längsmuskulatur (RM, LM) im Verlauf schräg angeschnitten. Nur wenige Synaptophysin-Markierungen (Pfeil) erkennbar im Vergleich zu dysplastischen (Abb. 4.1b.) und gesunden (Abb. 4.1c.) Proben. Fehlende Ganglien im Gebiet des Plexus myentericus (PM)

Synaptophysin (SP), 100x

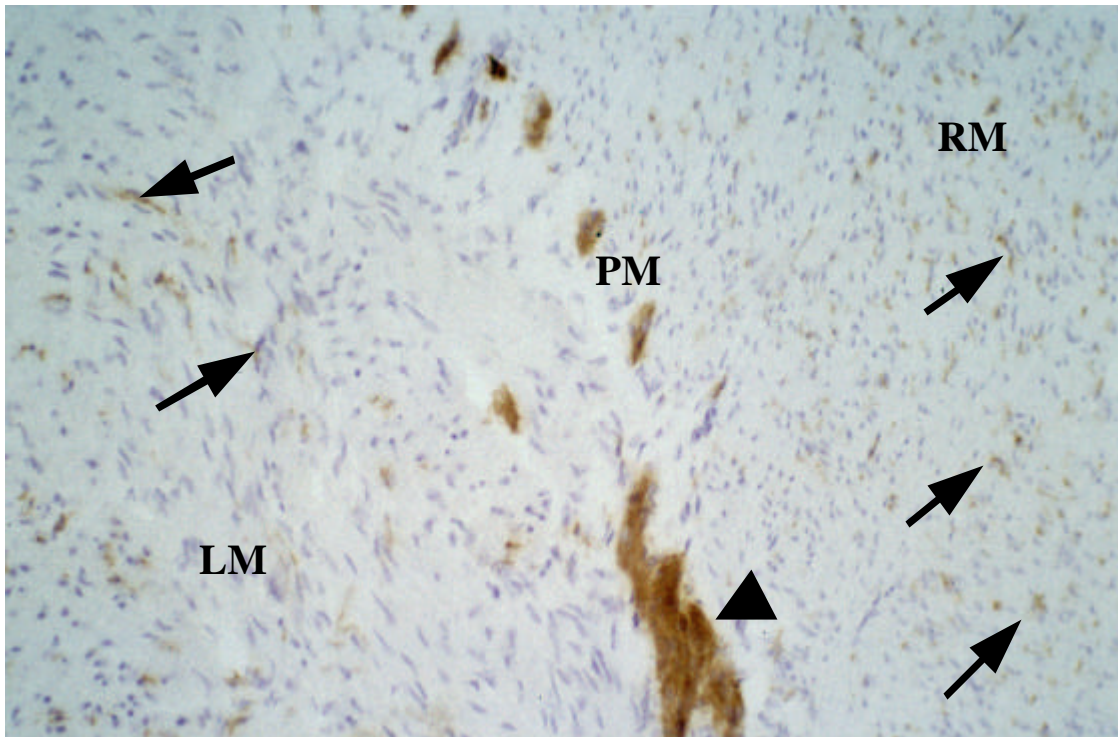


Abbildung 4.1b.: dysplastisches Darmsegment (IND)

Ring- und Längsmuskulatur (RM, LM) eines dysplastischen Segmentes, schräg angeschnittene Fasern. In der Mitte des Bildes der Plexus myentericus (PM) mit Riesenganglion (Pfeilspitze). In der Muskulatur Synaptophysin-markierte Nervenendigungen und Synapsen (Pfeil).

SP, 100x

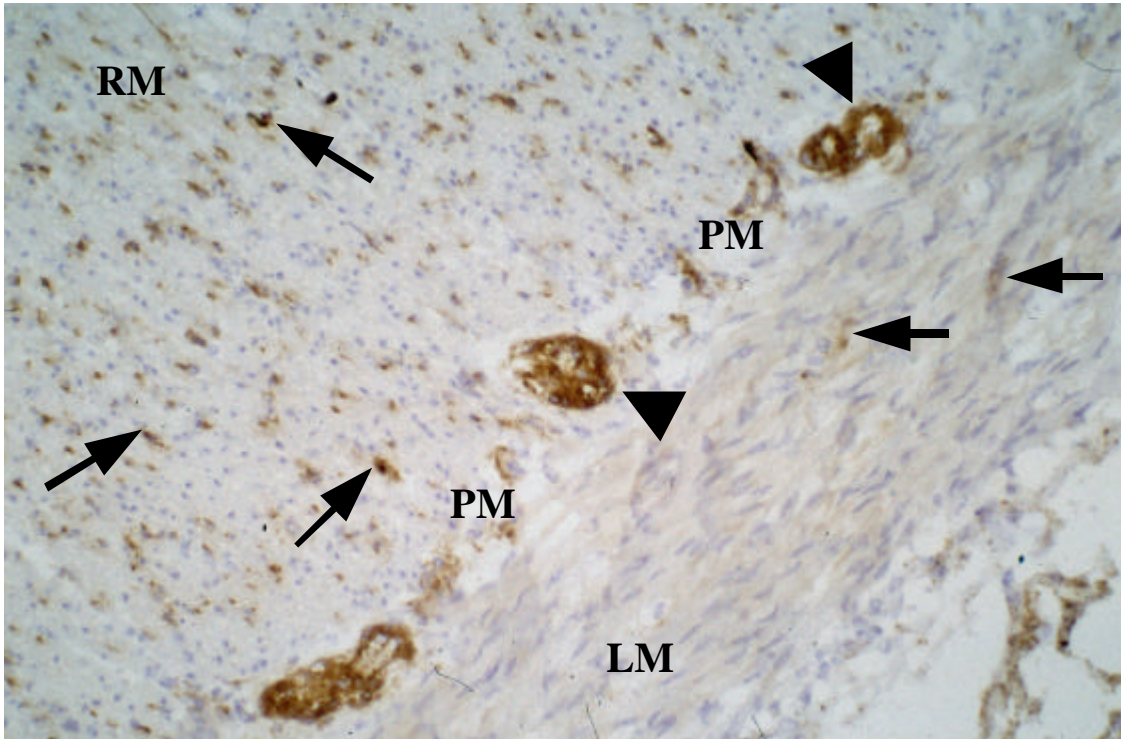


Abbildung 4.1c.: regelrecht innervierter Darmabschnitt

Plexus myentericus (PM) mit Ganglien in regelrechter Größe (Pfeilspitze).
Zahlreiche Synaptophysin-markierte Nervenendigungen und Synapsen (Pfeil)
in Ring- und Längsmuskulatur (RM, LM); hier deutlich erkennbarer Quer- (RM)
bzw. Längsanschnitt (LM) der Fasern.

SP, 100x

4.2 Erhobene Daten

An 18 Präparaten (Biopsien) wurden Synaptophysin (SP)-markierte Strukturen untersucht hinsichtlich:

- 1) Fläche der Antikörpermarkierungen im Zählfeld (*Fläche*)
- 2) Anzahl der Antikörpermarkierungen im Zählfeld (*Signale*)

Bei zwölf unterschiedlichen Messungen pro Objekt erhält man jeweils einen Stichprobenumfang von $(12 \times 18) = 216$ Daten.

Alle Daten beziehen sich auf den vorgegebenen Bildausschnitt ($94169,1 \mu\text{m}^2$).

Anhand der nachfolgenden Grafiken soll die Verteilung der erhobenen Daten dargestellt werden.

Für die im Bildausschnitt insgesamt angefärbte Fläche liegen 75% der Messungen unterhalb 1877 μm^2 . Über 100 Messungen von insgesamt 216 befinden sich im Bereich zwischen 0 und 1000 μm^2 , etwa 50 Messungen ergeben Werte von 1000 bis 2000 μm^2 . In die oberen Messbereiche fallen lediglich einzelne Messungen, der größte Wert wird zwischen 13000 und 14000 μm^2 (13227 μm^2) registriert (Abb. 4.2., Tab. 4.2.).

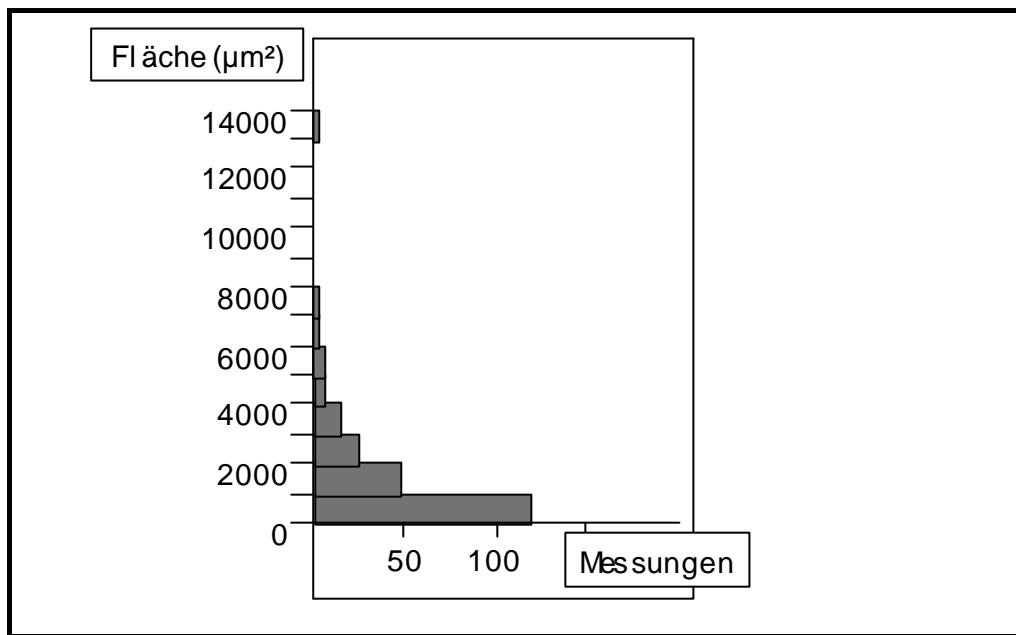


Abbildung 4.2.: Verteilung der Synaptophysin (SP)-markierten Fläche pro Bildausschnitt (Fläche) bei 216 Messdurchgängen (Messungen)

Tabelle 4.2.: Maßzahlen des Datensatzes SP-Fläche pro Bildausschnitt (Fläche)

Streuungs- und Lagemaße	Fläche (μm^2)
Maximum	13227
Minimum	0
75.0%-Quantil	1877
25.0%-Quantil	293
Standardabweichung	1615,89
arithmetischer Mittelwert	1371,25

Auch bei der Anzahl an Signalen im Bildausschnitt fällt eine schiefe Verteilung zu Gunsten der Ergebnisse im unteren Messbereich auf. So ergeben 75% der Messungen eine Signalanzahl von weniger als 228,75. Verhältnismäßig wenige Bildausschnitte weisen Werte über 300 Signale auf. Nur vereinzelt werden über 600 Signale registriert. Der Maximalwert liegt bei 781 Signalen pro Bildausschnitt (Abb. 4.3., Tab. 4.3).

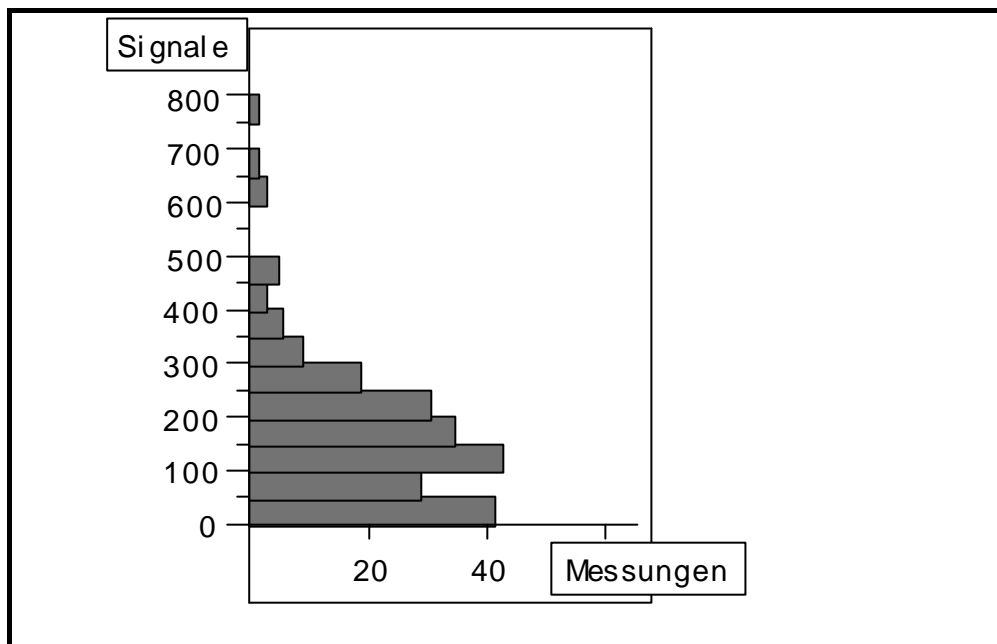


Abbildung 4.3.: Verteilung der Gesamtanzahl der SP-Markierungen pro Bildausschnitt (Signale) bei 216 Messdurchgängen (Messungen)

Tabelle 4.3.: Maßzahlen des Datensatzes SP-Markierungen pro Bildausschnitt (Signale)

Streuungs- und Lagemaße	Signale
Maximum	781
Minimum	0
75.0%-Quantil	228,75
25.0%-Quantil	65,75
Standardabweichung	126,80
arithmetischer Mittelwert	163,60

Durch logarithmische Transformation der Daten können diese sowohl in der Kategorie *Fläche* als auch *Signale* in eine annähernd normalverteilte, symmetrische Darstellung gebracht werden, wie sie für Varianzanalysen notwendig ist. Da Nullzählungen vorkamen (keine Markierungen im Zählfeld), wurde jeweils der mit eins addierte Rohwert verwendet ($\log_{10}(\text{Fläche}+1)$, $\log_{10}(\text{Signale}+1)$) (Abb. 4.4., Tab. 4.4.).

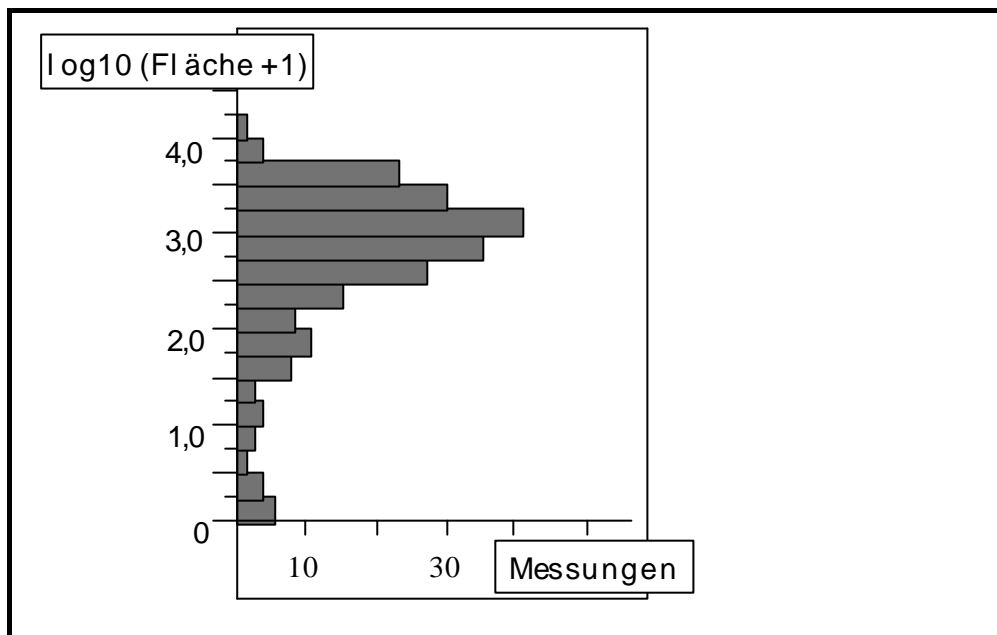


Abbildung 4.4.: Verteilung der logarithmierten SP-Fläche pro Bildausschnitt ($\log_{10}(\text{Fläche}+1)$) bei 216 Messdurchgängen (Messungen)

Tabelle 4.4.: Maßzahlen des Datensatzes logarithmierte SP-Fläche pro Bildausschnitt ($\log_{10}(\text{Fläche}+1)$)

Streuungs- und Lagemaße	$\log_{10}(\text{Fläche}+1)$
Maximum	4,12
Minimum	0
75.0%-Quantil	3,27
25.0%-Quantil	2,47
Standardabweichung	0,81
arithmetischer Mittelwert	2,74

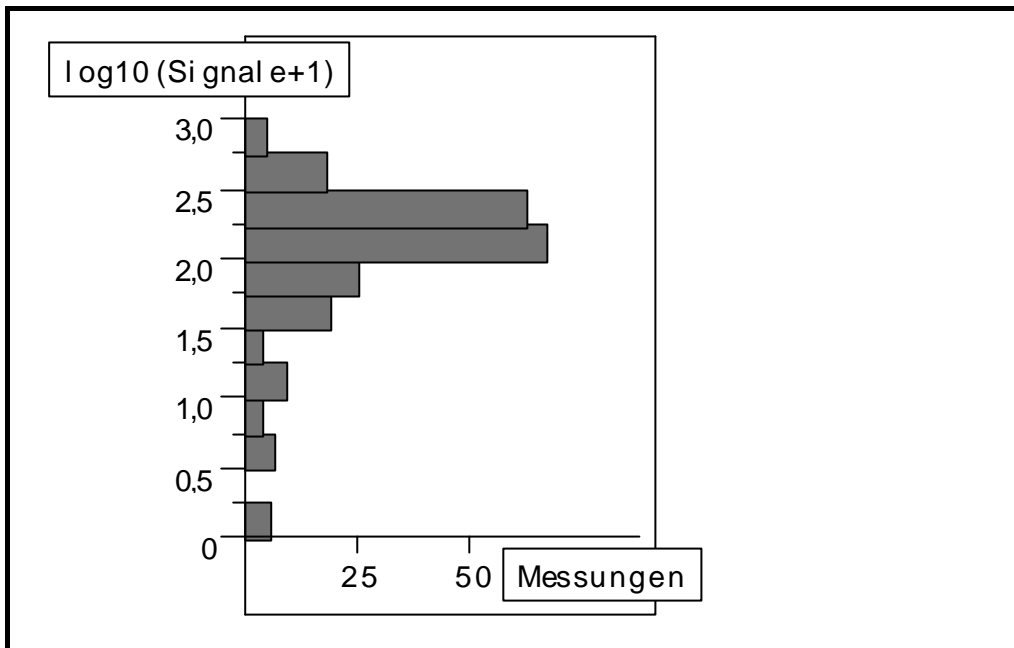


Abbildung 4.5.: Verteilung der logarithmierten SP-Markierungen pro Bildausschnitt ($\log_{10}(\text{Signale}+1)$) bei 216 Messdurchgängen (Messungen)

Tabelle 4.5.: Maßzahlen des Datensatzes logarithmierte SP-Markierungen pro Bildausschnitt ($\log_{10}(\text{Signale}+1)$)

Streuungs- und Lagemaße	$\log_{10}(\text{Signale}+1)$
Maximum	2,89
Minimum	0
75.0%-Quantil	2,36
25.0%-Quantil	1,83
Standardabweichung	0,54
arithmetischer Mittelwert	2,02

4.3 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Messergebnisse

Als Faktoren, die Einfluss auf die Ergebnisse nehmen können, kommen in Frage:

1. Innervationsmuster (*Erkrankung*),
2. Lokalisation,
3. Lokalisation*Erkrankung (*Lok*Erkrankung*),
4. Schnittrichtung,
5. Einzelprobe (*Probe [Erkrankung]*).

4.3.1 Übersicht über die Einflussgrößen (Effekte)

Es soll geprüft werden, ob die verschiedenen Effekte jeweils in signifikanter Weise auf Fläche ($\log_{10}(\text{Fläche}+1)$) und Anzahl ($\log_{10}(\text{Signale}+1)$) der Synaptophysin-Markierungen Einfluss nehmen (Tab. 4.6a.-b.).

Tabelle 4.6a.: Test der Effekte für die Kategorie SP–Fläche ($\log_{10}(\text{Fläche}+1)$)

Effekt	SAQ	FG	F-Statistik	p
Erkrankung	20,00	2	3,0624	0,0761
Lokalisation	11,90	1	72,2501	<0,0001
Lok*Erkrankung	3,02	2	9,1527	0,0002
Schnittrichtung	3,96	2	12,0342	<0,0001
Probe[Erkrankung]	59,84	15	24,2245	<0,0001

SAQ: Summe der Abweichungsquadrate

FG: Freiheitsgrade

p: Signifikanzwahrscheinlichkeit

signifikante Einflüsse in Fettschrift

Tabelle 4.6b.: Test der Effekte für die Kategorie SP-Signale
($\log_{10}(\text{Signale}+1)$)

Effekt	SAQ	FG	F-Statistik	p
Erkrankung	6,37	2	1,92	0,18
Lokalisation	3,49	1	49,90	<0,0001
Lok*Erkrankung	0,40	2	2,86	0,0599
Schnittrichtung	2,27	2	16,28	<0,0001
Probe[Erkrankung]	30,52	15	29,13	<0,0001

<p>SAQ: Summe der Abweichungsquadrate FG: Freiheitsgrade p: Signifikanzwahrscheinlichkeit signifikante Einflüsse in Fettschrift</p>
--

Für diese Varianzanalyse wurde das Signifikanzniveau mit $p = 0,05$ festgelegt. Für die Kategorien *Fläche* und *Signale* kann beim Effekt *Erkrankung* die Nullhypothese – Abweichungen treten unabhängig vom Effekt *Krankheitsbild* auf – nicht sicher verworfen werden. Gleiches gilt für *Lokalisation*Erkrankung* in der Kategorie *Signale*.

Für die anderen Effekte *Schnittrichtung*, *Lokalisation*, *Lokalisation*Erkrankung* (Kategorie *Fläche*) und *Probe[Erkrankung]*, ist dagegen bei einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von jeweils deutlich kleiner als 0,05 davon auszugehen, dass sie in hochsignifikanter Weise Einfluss auf die Messdaten nehmen (Tab. 4.6a.-b.).

4.3.2 Einzeldarstellung der Effekte

Die in der Zusammenfassung aufgeführten Einflussgrößen (Effekte) sollen im Folgenden einzeln betrachtet werden.

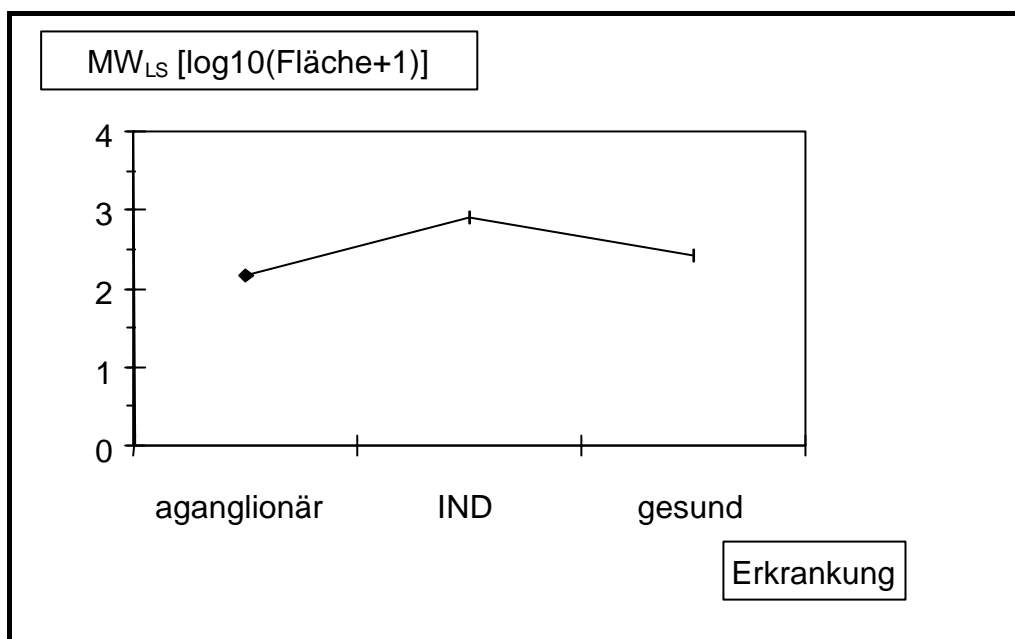
Der graphischen Darstellung der Gruppenmittel dient der für die Modellberechnungen geschätzte und über die minimalen quadratischen Abweichungen der einzelnen Messpunkte definierte Mittelwert. Er wird hier als Mittelwert_{LS} (MW_{LS}) bezeichnet (LS für Least Squares). Die Gruppenmittelwerte (*Mittelwert*) der tatsächlich gemessenen Daten, beziehungsweise des logarithmierten Datensatzes sowie der, ebenfalls für die Modellberechnungen geschätzte, Standardfehler sind jeweils zusätzlich angegeben.

4.3.2.1 Einflussgröße *Art der Erkrankung*

Die aganglionären Proben weisen, sowohl was die Fläche der Synaptophysin-Markierungen (*Fläche*) als auch deren Anzahl (*Signale*) betrifft, die wenigsten Anfärbungen auf. Ähnlich geringe Werte werden jedoch auch im regelrechten, gesunden Gewebe gefunden. Die dysplastischen (IND)-Präparate zeigen im Mittel die größten Antikörper-markierten Flächen und die meisten Signale (Abb. 4.7., 4.8., Tab. 4.7., 4.8.).

Im Test der Effekte ist jedoch bei einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von $p = 0,0761$ bzw. $p = 0,18$ kein signifikanter Einfluss der Art der *Erkrankung* auf die Ergebnisse der Messungen für SP-Fläche und SP-Signale nachzuweisen (Tab. 4.6a.-b.).

Fläche der Synaptophysin-Markierungen



MW_{LS} = Mittelwert_{LS}

Abbildung 4.7.: Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Fläche für die verschiedenen Krankheitsbilder

Tabelle 4.7.: Mittelwerte und Standardfehler der SP-Fläche (log10(Fläche+1)) für den Effekt Art der Erkrankung

Erkrankung	Mittelwert _{LS}	Standardfehler	Mittelwert
aganglionär	2,18	0,23	2,28
IND	2,91	0,29	3,12
gesund	2,41	0,44	2,82

Anzahl der registrierten Antikörper-Signale

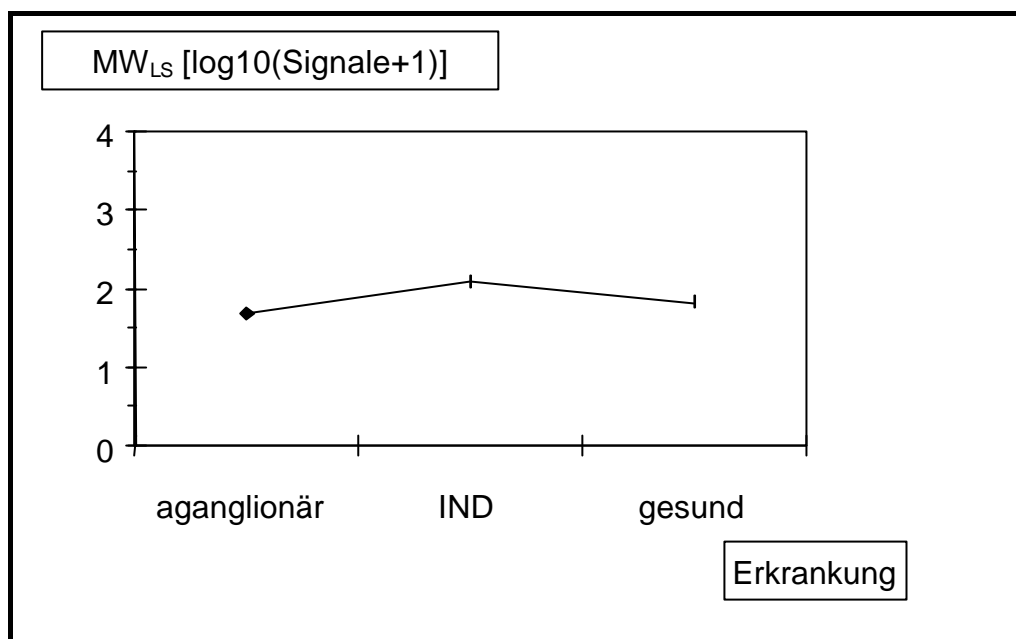


Abbildung 4.8.: Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Signale für die verschiedenen Krankheitsbilder

Tabelle 4.8.: Mittelwerte und Standardfehler der SP-Signale ($\log_{10}(\text{Signale}+1)$) für den Effekt Art der Erkrankung

Erkrankung	Mittelwert _{LS}	Standardfehler	Mittelwert
aganglionär	1,68	0,17	1,74
IND	2,10	0,20	2,23
gesund	1,82	0,31	2,09

Um darüber hinaus die Beziehungen der drei Untergruppen *Aganglionär*, *IND* und *Gesund* zueinander aufzudecken, werden deren Mittelwerte einzeln miteinander verglichen (Tab. 4.9a.-b.).

Tabelle 4.9a.: Vergleich der SP-Fläche (log10(Fläche+1)) der verschiedenen Erkrankungen (t-Test)

Vergleich... gegen...	aganglionär IND	aganglionär gesund	IND gesund
t-Statistik	2,3127	0,5429	-1,416
Prob> t	0,0353	0,5952	0,1773

Prob>|t| = Signifikanzwahrscheinlichkeit
signifikante Unterschiede in Fettschrift

Tabelle 4.9b.: Vergleich der SP-Signale (log10(Signale+1)) der verschiedenen Erkrankungen untereinander (t-Test)

Vergleich... gegen...	aganglionär IND	aganglionär gesund	IND gesund
t-Statistik	1,8407	0,4622	-1,092
Prob> t	0,0855	0,6506	0,2922

Prob>|t| = Signifikanzwahrscheinlichkeit
signifikante Unterschiede in Fettschrift

Die Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Flächen und -Signale von aganglionären und gesunden Proben liegen sehr eng beieinander (Abb. 4.7., 4.8., Tab. 4.7., 4.8.). Zwischen ihnen lässt sich sowohl für die SP-Flächen als auch die SP-Signale kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen. Im Test auf Gleichheit dieser zwei Mittelwerte (t-Test) ergeben sich Signifikanzwahrscheinlichkeiten von $p = 0,5952$ (*Fläche*) und $p = 0,6506$ (*Signale*) (Signifikanzniveau $p = 0,05$) (Tab. 4.9a.-b.)

Bei den Untergruppen *IND* und *Gesund* liegen die Mittelwerte von SP-Fläche und -Signalen insgesamt über denen der aganglionären Präparate. Insbesondere die dysplastischen (*IND-*) Proben weisen jeweils die höchsten Werte auf. Es kann jedoch auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen *dysplastische (IND-)* und *gesunde Präparate* festgestellt werden (Tab. 4.9a.-b.).

Betrachtet man die Krankheitsausprägungen *Aganglionär* und *IND*, so lässt sich hinsichtlich der SP-Signale eine Abweichung zwischen den beiden Untergruppen ebenfalls nicht statistisch belegen ($p = 0,0855$), während dies jedoch für die SP-Fläche möglich ist ($p=0,0353$) (Tab. 4.9a.-b.).

Fazit

IND-Proben weisen im Mittel die flächenmäßig größten und zahlreichsten Synaptophysin (SP)-Anfärbungen auf, aganglionäres Gewebe die kleinsten und wenigsten. Der Unterschied ließ sich jedoch nur zwischen aganglionären und dysplastischen Proben für die SP-Fläche als signifikant belegen.

Insgesamt ist für die Art der *Erkrankung* kein signifikanter Einfluss auf die gemessenen Werte für SP-Fläche und -Anzahl nachzuweisen. (Abb. 4.7., 4.8., 4.9a.-b., Tab. 4.7., 4.8., 4.9a.-b.)

4.3.2.2 Einflussgröße *Lokalisation*

Die Daten der drei Innervationsmuster (*Erkrankungen*) werden für diese Auswertung zunächst zusammengenommen. Die nach Krankheitsbildern getrennte Darstellung (*Lokalisation* verknüpft mit *Erkrankung* (*Lokalisation*Erkrankung*)) erfolgt anschließend.

Sowohl die Gesamtfläche der angefärbten Synaptophysin-haltigen Strukturen (*Fläche*) als auch deren Anzahl im Bildausschnitt (*Signale*) sind in hochsignifikanter Weise abhängig davon, in welcher Muskelschicht (RM oder LM) die jeweilige Messung vorgenommen wurde (jeweils $p < 0,0001$) (Tab. 4.6a.-b.). In der Ringmuskulatur werden dabei höhere Werte für die mittlere Fläche der Markierungen (*Fläche*) und die mittlere Anzahl der Antikörper-Signale (*Signale*) registriert als in der Längsmuskelschicht (Abb. 4.10., 4.11., Tab. 4.10., 4.11.).

Fläche der Synaptophysin-Markierungen

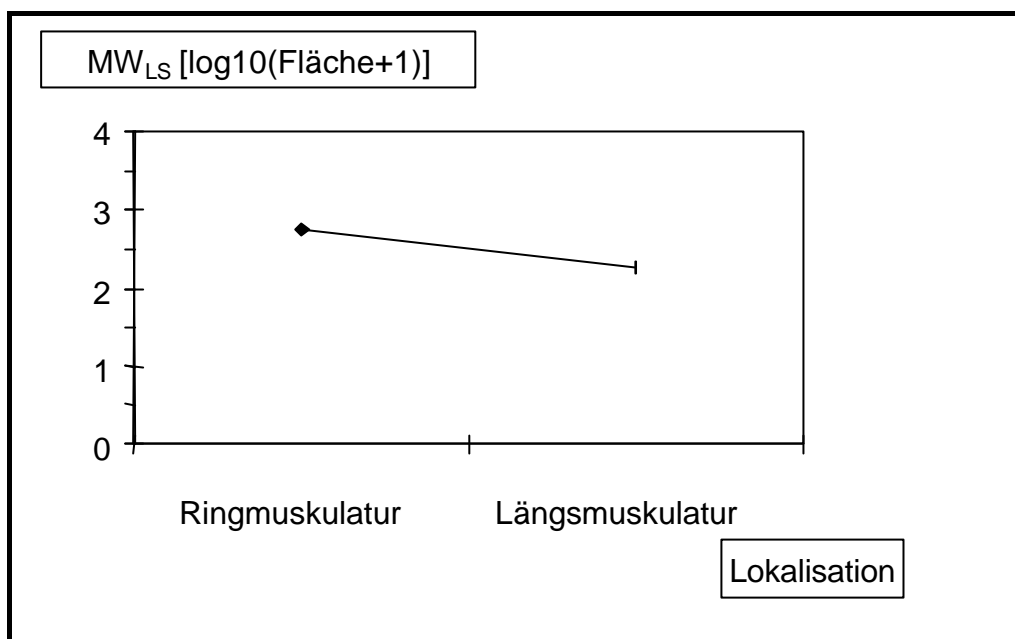


Abbildung 4.10.: Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Fläche für die zwei verschiedenen Lokalisationen

Tabelle 4.10.: Mittelwerte und Standardfehler der SP-Fläche ($\log_{10}(\text{Fläche}+1)$) für den Effekt Lokalisation

Lokalisation	Mittelwert _{LS}	Standardfehler	Mittelwert
Ringmuskulatur	2,75	0,07	3,02
Längsmuskulatur	2,25	0,06	2,45

Anzahl der registrierten Antikörper-Signale

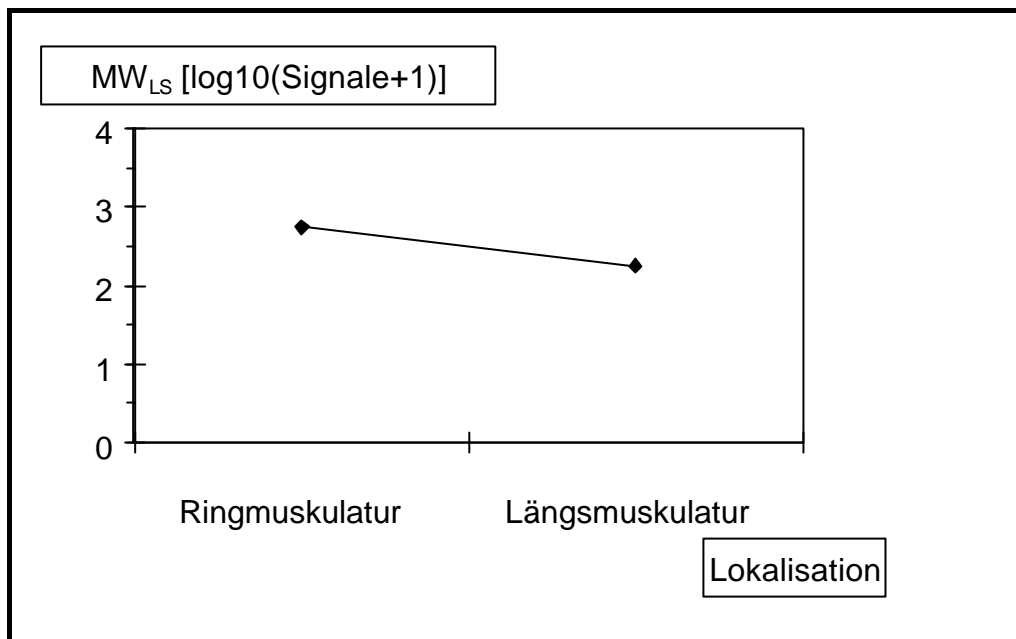


Abbildung 4.11.: Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Signale für die zwei verschiedenen Lokalisationen

Tabelle 4.11.: Mittelwerte und Standardfehler der SP-Signale ($\log_{10}(\text{Signale}+1)$) für den Effekt Lokalisation

Lokalisation	Mittelwert _{LS}	Standardfehler	Mittelwert
Ringmuskulatur	2,00	0,05	2,19
Längsmuskulatur	1,73	0,04	1,86

Fazit

SP-Fläche und -Signale sind hochsignifikant davon abhängig, in welcher Muskelschicht gemessen wurde. Die Ringmuskulatur weist jeweils höhere Werte auf. (Abb. 4.10., 4.11, Tab. 4.10., 4.11.)

4.3.2.3 Einflussgröße *Lokalisation*Erkrankung*

Es sollen Unterschiede der Messdaten für die SP-Fläche und SP-Signale in der Ring- und Längsmuskulatur getrennt nach Krankheitsbildern untersucht werden.

Für die zwei verschiedenen *Lokalisationen* getrennt nach *Erkrankungen* (Lokalisation*Erkrankung) ist hinsichtlich der Synaptophysin-markierten Fläche ein hochsignifikanter Einfluss nachzuweisen ($p = 0,0002$). Was jedoch die Anzahl der Markierungen (*Signale*) betrifft, so kann man anhand eines p-Wertes von 0,0599 gerade nicht mehr von einer derartigen Wirkung ausgehen (Tab. 4.6a.-b.).

Fläche der Synaptophysin-Markierungen

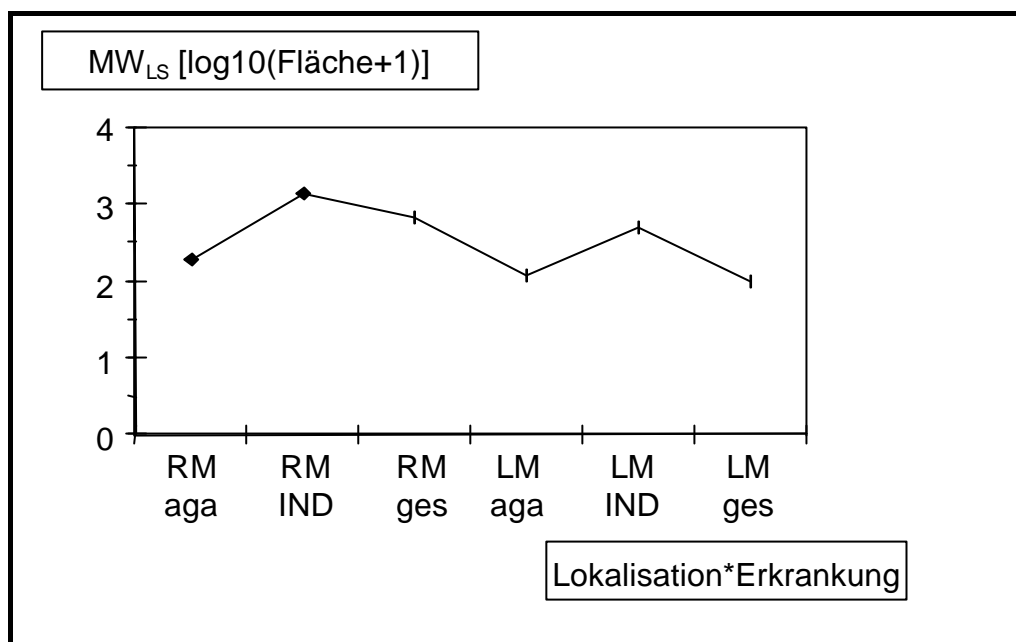


Abbildung 4.12.: Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Fläche für die zwei verschiedenen Lokalisationen getrennt nach Erkrankungen

Tabelle 4.12.: Mittelwerte und Standardfehler der SP-Fläche ($\log_{10}(\text{Fläche}+1)$) für den Effekt Lokalisation*Erkrankung

Lokalisation*Erkrankung	Mittelwert _{LS}	Standardfehler	Mittelwert
RM, aganglionär	2,29	0,08	2,50
RM, IND	3,13	0,08	3,33
RM, gesund	2,82	0,11	3,24
LM, aganglionär	2,07	0,07	2,06
LM, IND	2,69	0,08	2,90
LM, gesund	2,00	0,11	2,40

Anzahl der registrierten Antikörper-Signale

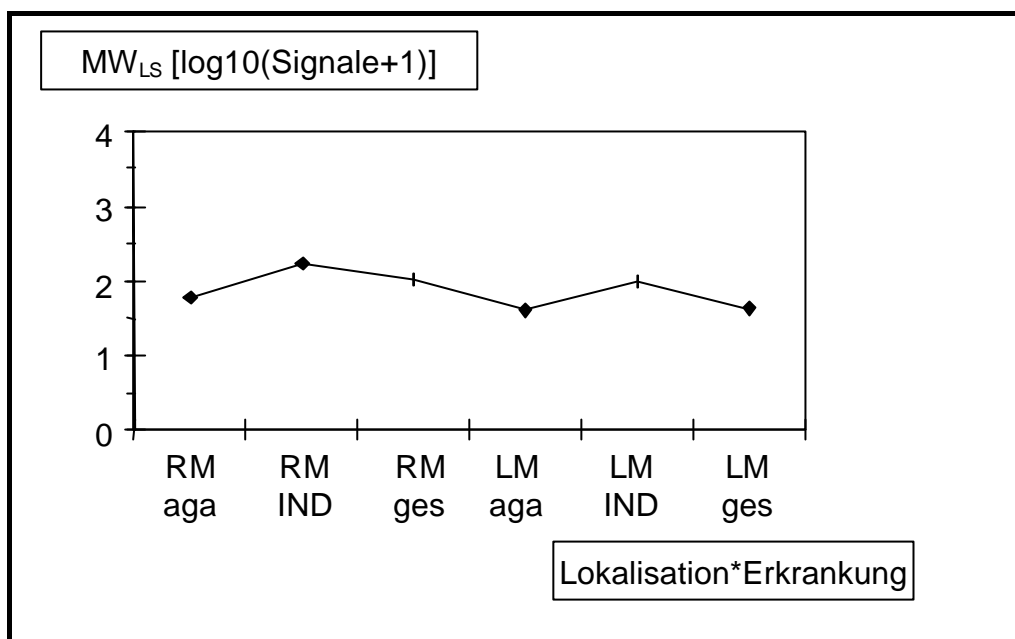


Abbildung 4.13.: Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Signale für die zwei verschiedenen Lokalisationen getrennt nach Erkrankungen

Tabelle 4.13.: Mittelwerte und Standardfehler der SP-Signale ($\log_{10}(\text{Signale}+1)$) für den Effekt Lokalisation*Erkrankung

Lokalisation*Erkrankung	Mittelwert _{LS}	Standardfehler	Mittelwert
RM, aga	1,77	0,052	1,92
RM, IND	2,22	0,05	2,34
RM, gesund	2,01	0,07	2,31
LM, aga	1,60	0,05	1,57
LM, IND	1,98	0,05	2,12
LM, gesund	1,63	0,08	1,87

Betrachtet man nun allein die Messungen in der Ringmuskulatur getrennt nach *Erkrankungen*, so findet man die im Mittel (MW_{LS}) größte angefärbte Fläche und höchste Signalanzahl bei den IND-Proben, gefolgt von den gesunden Präparaten. Die geringsten Markierungen weist die Aganglionose auf (Abb. 4.12., 4.13., Tab. 4.12., 4.13.).

Dass es sich hierbei um ein jeweils signifikant unterschiedliches Färbeverhalten handelt, zeigen die Einzelvergleiche im t-Test (Tab. 4.14a.-b.) Alle verglichenen Paare sind in ihren Mittelwerten (MW_{LS}) hochsignifikant verschieden. Die Anfärbungen in der Ringmuskulatur unterscheiden sich bei den verschiedenen *Erkrankungen* demnach deutlich voneinander.

*Vergleich der SP-Flächen ($\log_{10}(\text{Fläche}+1)$) und -Signale ($\log_{10}(\text{Signale}+1)$) innerhalb der Gruppe Lokalisation*Erkrankung (t-Test)*

Tabelle 4.14a.: Gegenüberstellung der Lokalisation Ringmuskulatur bei verschiedenen Erkrankungen (Fläche)

Vergleich... gegen...	RM, aganglionär RM, IND	RM, aganglionär RM, gesund	RM, IND RM, gesund
t-Statistik	8,7119	5,0161	-2,987
Prob> t	1e-15	1,2e-6	0,0032

Tabelle 4.14b.: Gegenüberstellung der Lokalisation Ringmuskulatur bei verschiedenen Erkrankungen (Signale)

Vergleich... gegen...	RM, aganglionär RM, IND	RM, aganglionär RM, gesund	RM, IND RM, gesund
t-Statistik	7,1244	3,5865	-2,951
Prob> t	2e-11	0,0004	0,0036

Prob> t = Signifikanzwahrscheinlichkeit signifikante Unterschiede in Fettschrift
--

In der Längsmuskulatur herrschen die größten Flächen- und Signalwerte ebenfalls bei den IND-Proben vor. Dicht beieinander liegen die Messdaten (MW_{LS}) der Untergruppen *aganglionär* und *gesund*. Zwischen ihnen ist zahlenmäßig lediglich ein minimaler Unterschied zu verzeichnen (Abb. 4.12., 4.13., Tab. 4.12., 4.13.). Im Test der einzelnen Untergruppen lässt sich schließlich auch kein signifikanter Unterschied für *Fläche* und *Signale* bei diesen Arten der *Erkrankung* (aganglionär, gesund) aufzeigen. Anders verhält es sich bei den IND-Proben. Sie weisen hochsignifikant verschiedene Messwerte im Vergleich mit den aganglionären und den gesunden Präparaten auf (Tab. 4.14c.-d.).

Tabelle 4.14c.: Gegenüberstellung der Lokalisation Längsmuskulatur bei verschiedenen Erkrankungen (Fläche)

Vergleich... gegen...	LM, aganglionär LM, IND	LM, aganglionär LM, gesund	LM, IND LM, gesund
t-Statistik	5,8139	-0,582	-6,408
Prob> t 	2,5e-8	0,561	1,1e-9

Tabelle 4.14d.: Gegenüberstellung der Lokalisation Längsmuskulatur bei verschiedenen Erkrankungen (Signale)

Vergleich... gegen...	LM, aganglionär LM, IND	LM, aganglionär LM, gesund	LM, IND LM, gesund
t-Statistik	5,5009	0,347	-4,994
Prob> t 	1,2e-7	0,7289	1,3e-6

Prob> t = Signifikanzwahrscheinlichkeit signifikante Unterschiede in Fettschrift
--

Die in der Ringmuskulatur gemessenen Mittelwerte (MW_{LS}) für *Fläche* und *Signale* bei den verschiedenen Arten der *Erkrankung* liegen jeweils über denen der Längsmuskulatur. Dies gilt in allen drei Fällen, aganglionär, IND und gesund (Abb. 4.12., 4.13., Tab. 4.12., 4.13.).

Im t-Test erhält man bei der Gegenüberstellung der zwei Lokalisationen (RM, LM) bei allen drei *Erkrankungen* jeweils einen signifikanten Unterschied. Dieser ist lediglich bei den aganglionären Proben ($p = 0,0415$, *Fläche*) und ($p = 0,0136$, *Signale*) nicht hochsignifikant wie in den übrigen Fällen (Tab. 4.14e.-f.).

Tabelle 4.14e.: Gegenüberstellung von Ring- und Längsmuskulatur jeweils einer Erkrankung (Fläche)

Vergleich... gegen...	RM, aganglionär LM, aganglionär	RM, IND LM, IND	RM, gesund LM, gesund
t-Statistik	-2,053	-4,582	-8,178
Prob> t 	0,0415	8,3e-6	4e-14

Tabelle 4.14f.: Gegenüberstellung von Ring- und Längsmuskulatur jeweils einer Erkrankung (Signale)

Vergleich... gegen...	RM, aganglionär LM, aganglionär	RM, IND LM, IND	RM, gesund LM, gesund
t-Statistik	-2,491	-3,82	-5,953
Prob> t 	0,0136	0,0002	1,2e-8

Prob> t = Signifikanzwahrscheinlichkeit signifikante Unterschiede in Fettschrift
--

Fazit

*Lokalisation*Erkrankung* zeigt einen hochsignifikanten Einfluss auf die gemessene SP-Fläche, jedoch gerade nicht mehr auf die Signalanzahl.

SP-Fläche und SP-Anzahl sind jeweils in der Ringmuskulatur größer bzw. zahlreicher als in der Längsmuskelschicht. Alle drei *Erkrankungen* zeigen hier signifikante Unterschiede zwischen RM und LM.

In beiden Muskelschichten (RM, LM) weisen die IND-Proben die flächenmäßig größten und zahlreichsten SP-Anfärbungen auf, die aganglionären die kleinsten und wenigsten Markierungen. Unterschiede zwischen den Krankheitsbildern sind jeweils signifikant, mit Ausnahme der Werte zwischen *Aganglionär* und *Gesund* in der Längsmuskulatur sowohl für *Fläche* als auch *Signale*. (Abb. 4.12., 4.13., 4.14a.-f., Tab. 4.12., 4.13., 4.14a.-f.)

4.3.2.4 Einflussgröße *Schnitttrichtung*

Es werden hier jeweils die Daten aller Proben, die in der entsprechenden Schnitttrichtung erfasst wurden, zusammengenommen.

Die Richtung, in der die Fasern in der Gewebeprobe angeschnitten wurden (quer, längs, schräg), wirkt sich in hochsignifikanter Weise auf die Messungen im Bereich *Fläche* und *Signalanzahl* der Antikörper-Markierungen aus (Tab. 4.6a.-b.).

Die Mittelwerte (MW_{LS}) der Untergruppen *Quer*, *Längs* und *Schräg* liefern sowohl für die *SP-Fläche* als auch die *SP-Signale* ein ähnliches Bild. In beiden Fällen sind die höchsten Mittelwerte (MW_{LS}) jeweils in der Kategorie *schräger Anschnitt* zu verzeichnen, gefolgt von den Messungen in quer getroffenen Gewebe. Die geringsten mittleren Werte liefern längs angeschnittene Proben. Diese differieren allerdings zahlenmäßig weniger stark von quer getroffenen Biopsien als es bei schrägen Proben im Vergleich zu beiden übrigen Untergruppen der Fall ist (Abb. 4.15., 4.16., Tab. 4.15., 4.16.).

Fläche der Synaptophysin-Markierungen

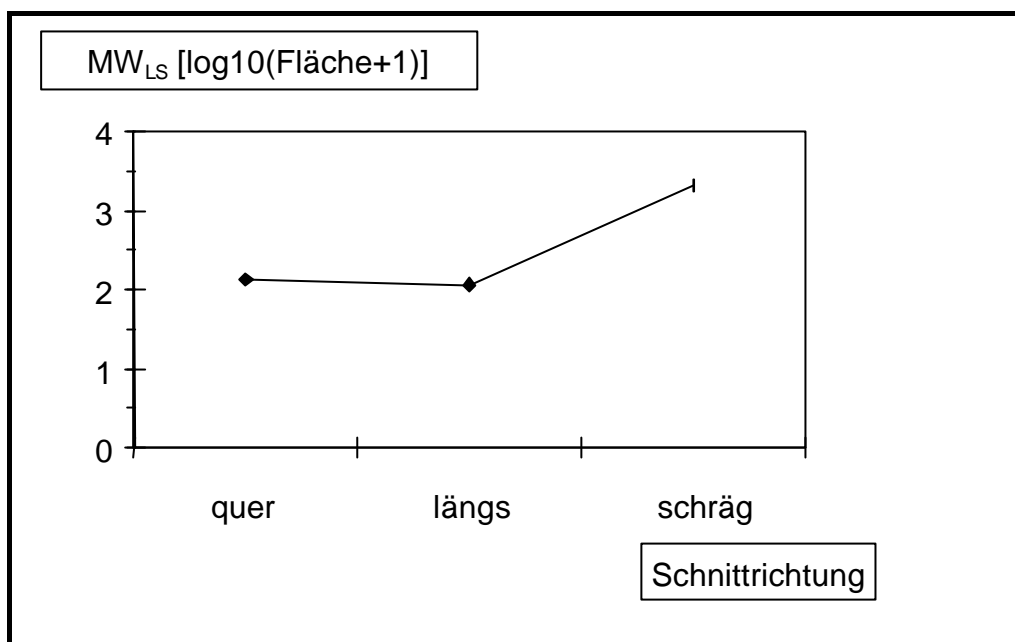


Abbildung 4.15.: Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Fläche (log₁₀(Fläche+1)) für die verschiedenen Schnitttrichtungen

Tabelle 4.15.: Mittelwerte und Standardfehler der SP-Fläche (log₁₀(Fläche+1)) für den Effekt Schnitttrichtung

Schnitttrichtung	Mittelwert _{LS}	Standardfehler	Mittelwert
quer	2,12	0,15	2,73
längs	2,06	0,14	2,39
schräg	3,32	0,12	2,91

Anzahl der registrierten Antikörper-Signale

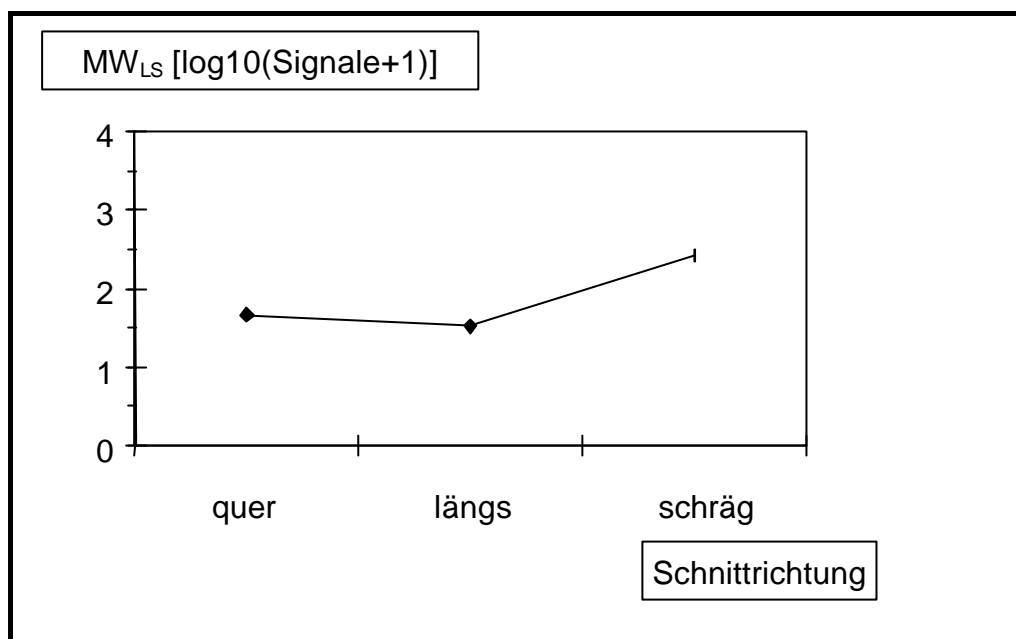


Abbildung 4.16.: Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Signale (log₁₀(Signale+1)) für die verschiedenen Schnitttrichtungen

Tabelle 4.16.: Mittelwerte und Standardfehler der SP-Signale (log₁₀(Signale+1)) für den Effekt Schnitttrichtung

Schnitttrichtung	Mittelwert _{LS}	Standardfehler	Mittelwert
quer	1,67	0,10	2,04
längs	1,52	0,09	1,75
schräg	2,41	0,08	2,15

Betrachtet man die Mittelwerte (MW_{LS}) der Untergruppen, so fällt vor allem der Sprung zwischen den schräg angeschnittenen und den übrigen Proben (quer, längs) (Abb. 4.15., 4.16., Tab. 4.15., 4.16.) auf. Der Einzelvergleich bestätigt auch einen jeweils hochsignifikanten Unterschied im Färbeverhalten der schräg getroffenen Fasern und den längs beziehungsweise quer getroffenen für beide Kategorien, *SP-Fläche* und *-Signale*.

Auch die mittleren Werte (MW_{LS}) der Untergruppen *Quer* und *Längs* erweisen sich für die Signalanzahl (*SP-Signale*) als signifikant voneinander verschieden (bei allerdings deutlich größerem p-Wert als jeweils im Vergleich mit den schräg geschnittenen Proben), während ein solcher Unterschied zwischen *Quer* und *Längs* hinsichtlich der gemessenen SP-Fläche nicht auszumachen ist (Tab. 4.17a.-b.).

Tabelle 4.17a.: Vergleich der SP-Fläche ($\log_{10}(\text{Fläche}+1)$) der verschiedenen Schnittrichtungen (t-Test)

Vergleich... gegen...	längs quer	längs schräg	quer schräg
t-Statistik	0,6116	4,8983	4,5283
Prob> t 	0,5415	2e-6	1e-5

Tabelle 4.17b.: Vergleich der SP-Signale ($\log_{10}(\text{Signale}+1)$) der verschiedenen Schnittrichtungen (t-Test)

Vergleich... gegen...	längs quer	längs schräg	quer schräg
t-Statistik	2,5304	5,2773	4,2549
Prob> t 	0,0122	3,5e-7	3,3e-5

Prob> t = Signifikanzwahrscheinlichkeit signifikante Unterschiede in Fettschrift
--

Fazit

Die Werte für SP-Fläche und –Signale sind im Mittel bei schrägem Anschnitt am größten, bei längs geschnittenen Proben am geringsten.

Zwischen *Schräg* und *Quer* beziehungsweise *Längs* bestehen hochsignifikante Unterschiede für SP-Fläche und –Signale. *Quer* und *Längs* sind hinsichtlich der SP-Signale signifikant verschieden, nicht hinsichtlich der SP-Fläche. (Abb. 4.15., 4.16., 4.17a.-b., Tab. 4.15., 4.16., 4.17a.-b.)

4.3.2.5 Einflussgröße *Probe[Erkrankung]*

Nach den Einflussgrößen-Tests besteht ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Einzelprobe (mit jeweils definierter *Erkrankung*) (*Probe[Erkrankung]*) und dem Ergebnis der Messungen von *SP-Fläche* und *-Signalen* (Tab. 4.6a.-b.). Das Gewebe des einzelnen Patienten unterscheidet sich in der Untersuchung demnach erheblich von dem eines anderen.

Die graphischen Darstellungen der mittleren Daten (Mittelwerte_{LS}) für Fläche und Signale der Synaptophysin-Markierungen liefern eine Vorstellung von den Schwankungen der Messwerte zwischen den verschiedenen Proben (Abb. 4.18., 4.19., Tab. 4.18., 4.19.).

Die einzelnen Proben erhielten eine fortlaufende willkürliche Nummer, um die Diagramme im Folgenden übersichtlicher gestalten zu können.

Fläche der Synaptophysin-Markierungen

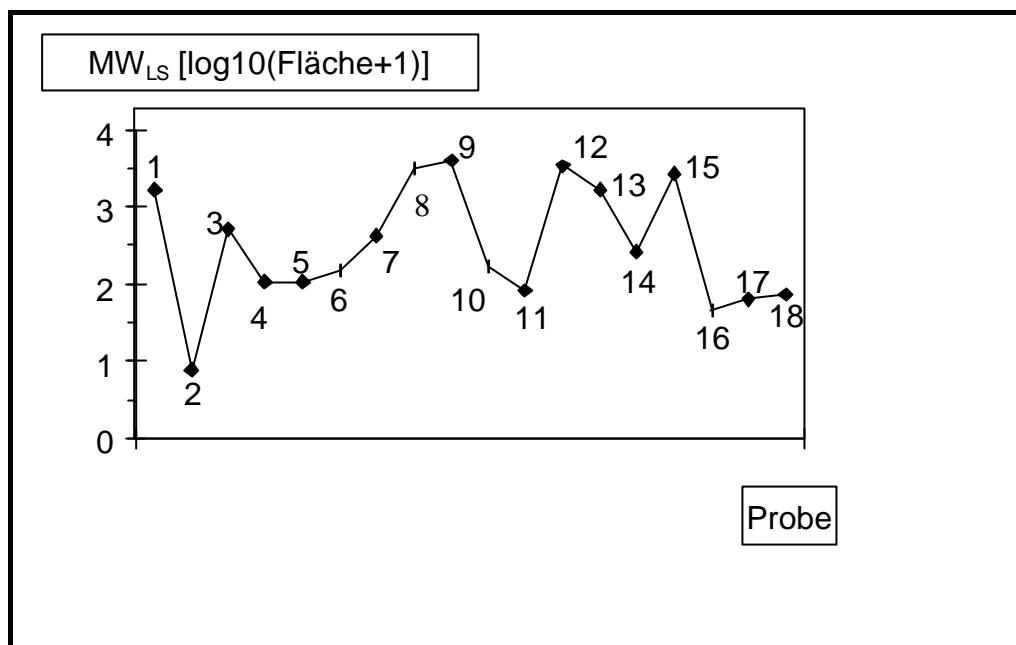


Abbildung 4.18.: Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Fläche (log₁₀(Fläche+1)) für die verschiedenen Einzelproben (Probe[Erkrankung])

Tabelle 4.18.: Mittelwerte und Standardfehler der SP-Fläche (log₁₀(Fläche+1)) für den Effekt Einzelprobe (Probe[Erkrankung])

Probe[Erkrankung]	Nummer	Mittelwert _{LS}	Standardfehler	Mittelwert
396/96(M)[aganglionär]	1	3,24	0,15	2,83
468/93[aganglionär]	2	0,90	0,15	0,48
5/95(3)[aganglionär]	3	2,71	0,15	2,30
606/96(4)[aganglionär]	4	2,03	0,21	2,85
627/93(2)[aganglionär]	5	2,04	0,13	2,22
670/96(2)[aganglionär]	6	2,17	0,21	2,99
1030/95[IND]	7	2,64	0,21	3,46
12/94(1)[IND]	8	3,50	0,15	3,09
325/94(2b)[IND]	9	3,61	0,15	3,20
363/94(8)[IND]	10	2,24	0,21	3,06

Probe[Erkrankung]	Nummer	Mittelwert _{LS}	Standardfehler	Mittelwert
4/95(1)[IND]	11	1,94	0,21	2,76
561/96[IND]	12	3,55	0,15	3,14
1213/96(2)[gesund]	13	3,23	0,15	2,81
122/96[gesund]	14	2,43	0,21	3,25
606/96(1)[gesund]	15	3,45	0,15	3,04
677/96[gesund]	16	1,66	0,21	2,48
998/94(1)[gesund]	17	1,80	0,21	2,62
c-1/97[gesund]	18	1,87	0,21	2,69

Anzahl der registrierten Antikörper-Signale

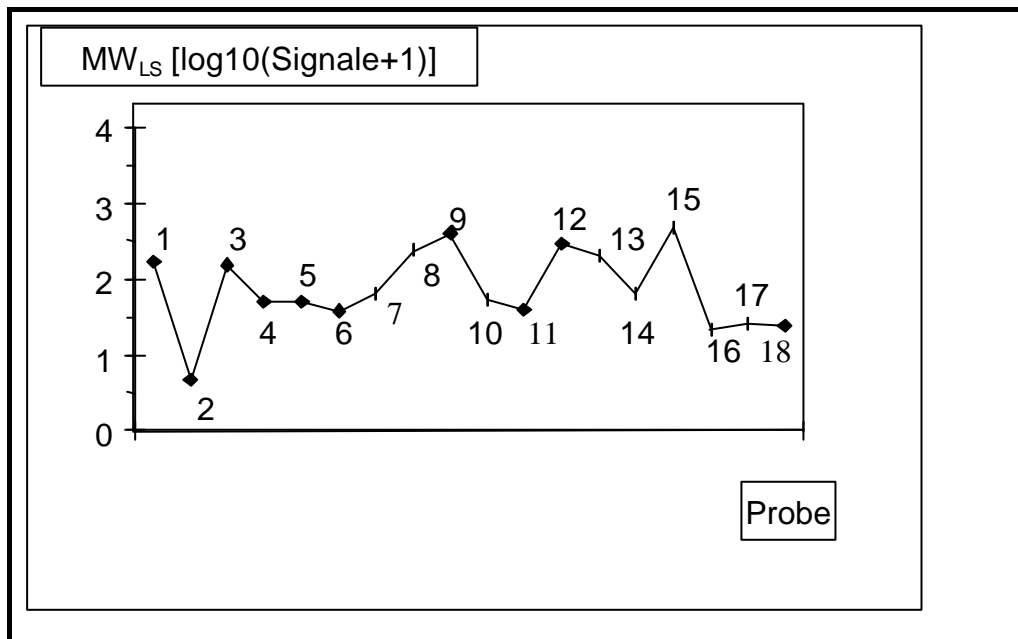


Abbildung 4.19.: Mittelwerte (MW_{LS}) der SP-Signale ($\log_{10}(\text{Signale}+1)$) für die verschiedenen Einzelproben (Probe[Erkrankung])

Tabelle 4.19.: Mittelwerte und Standardfehler der SP-Signale ($\log_{10}(\text{Signale}+1)$) für den Effekt Einzelprobe (Probe[Erkrankung])

Probe[Erkrankung]	Nummer	Mittelwert_{LS}	Standardfehler	Mittelwert
396/96(M)[aganglionär]	1	2,23	0,09	1,95
468/93[aganglionär]	2	0,68	0,09	0,41
5/95(3)[aganglionär]	3	2,20	0,09	1,92
606/96(4)[aganglionär]	4	1,71	0,14	2,25
627/93(2)[aganglionär]	5	1,71	0,08	1,79
670/96(2)[aganglionär]	6	1,57	0,14	2,11
1030/95[IND]	7	1,81	0,14	2,35
12/94(1)[IND]	8	2,38	0,09	2,11
325/94(2b)[IND]	9	2,60	0,09	2,33
363/94(8)[IND]	10	1,73	0,14	2,27
4/95(1) [IND]	11	1,61	0,14	2,15
561/96[IND]	12	2,45	0,09	2,18
1213/96(2)[gesund]	13	2,32	0,09	2,04
122/96[gesund]	14	1,80	0,14	2,34
606/96(1)[gesund]	15	2,68	0,09	2,40
677/96[gesund]	16	1,32	0,14	1,85
998/94(1)[gesund]	17	1,42	0,14	1,96
c-1/97[gesund]	18	1,38	0,14	1,92

5. Diskussion

In der Diskussion soll auf folgende Probleme näher eingegangen werden:

1. Diagnostische Möglichkeiten und Schwierigkeiten in der Darstellung und Bewertung pathologischer Strukturen bei intestinalen neuronalen Fehlbildungen (Morbus Hirschsprung, Intestinale Neuronale Dysplasie),
2. Darstellung von Synapsen und neuromuskulären Verbindungen,
3. Aussagewert der erarbeiteten Ergebnisse mit Methodenkritik,
4. Perspektiven zur Verbesserung der vorgestellten Methode.

5.1 Diagnostische Möglichkeiten und Schwierigkeiten

Histopathologische und histochemische Untersuchungen von Gewebeproben sind zur Sicherung der Diagnose und zur Therapieplanung intestinaler Innervationsstörungen unerlässlich. Eine eindeutige Identifikation von Hirschsprung-verwandten Störungen, insbesondere der IND, ist bislang schwierig, da der alleinige Nachweis vorhandener Ganglienzellen nicht ausreicht, eine regelrechte Funktion des Darmsegmentes anzunehmen. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass nach erfolgter Operation eines Morbus Hirschsprung fortbestehende Dysfunktionen in nicht resezierten, ganglienträgenden, jedoch trotzdem fehlinnervierten Darmbereichen auftreten (2, 21, 46, 55, 63, 88, 95). Bei derartigen klinischen Symptomen wurden Veränderungen im Sinne einer Intestinalen Neuronalen Dysplasie (2, 46, 55, 65, 72, 94) oder Zeichen der Ganglienzellhypoplasie (70) beschrieben.

Die Routinefärbung mit Hämatoxylin & Eosin (H&E) wird von einigen Autoren als unzulänglich für die sichere Abgrenzung fehlinnervierter Bereiche von gesundem Darm angesehen (46, 63, 88).

Bessere Ergebnisse liefern histochemische Verfahren mit Darstellung der Acetylcholinesterase (AChE)-Reaktion (47, 48, 80).

Seit Einführung der AChE-Technik ist die enzymhistochemische Färbung von Gewebeproben fest in der Diagnostik gastrointestinaler Innervationsstörungen etabliert (69). Die AChE-Methode erlaubt mit hoher diagnostischer Genauigkeit die Darstellung von Nervenfasern und Ganglienzellen durch den Nachweis der Acetylcholinesterase-Aktivität (80). In aganglionären Kolonsegmenten ist eine etwa drei- bis vierfach gesteigerte Acetylcholinesterase (AChE)-Aktivität nachweisbar (38, 40, 61). Beim Typ A der Intestinalen Neuronalen Dysplasie ist die AChE-Erhöhung mäßig ausgeprägt, beim Typ B bei Kindern unter zwei Jahren zu beobachten, jenseits des zweiten Lebensjahres oder bei Erwachsenen nur noch selten (36, 68, 94).

Die Methode kann für die Identifikation pathologisch innervierter Darmabschnitte und insbesondere die intraoperative Bestimmung der Ausdehnung des aganglionären Hirschsprung-Segmentes genutzt werden (48). Allerdings ist von Nachteil, dass die Methode einige Zeit in Anspruch nimmt und nicht für in Paraffin eingebettete Proben geeignet ist (23).

Neuere Ansätze zur Erfassung pathologischer Innervationsmuster an Darmbiopsaten gehen von der Anwendung von Antikörper-basierten Verfahren aus. Auf diese Weise konnten einerseits die bekannten Veränderungen der Ganglien und Nervenfasern dargestellt, daneben aber auch Abweichungen der Synapsenverteilung beziehungsweise -anzahl in den fehlinnervierten Segmenten beschrieben werden (44, 46, 50, 51, 74, 81, 82, 92, 115, 117, 118, 120, 121).

Das enterale Nervensystem weist zahlreiche Antigene auf, die mit entsprechenden Antikörpern sichtbar gemacht werden können und somit die Analyse von neuronalen Veränderungen erlauben. So existieren Untersuchungen mit dem monoklonalen D7-Antikörper, der spezifisch mit Antigenen der Ganglienzellen der beiden Darmwandplexus und einem axonalen Antigen, eventuell nonadrenerger, noncholinerg (purinerg) Fasern, reagiert. Aufgrund des Fehlens der genannten Elemente in aganglionären Darmsegmenten ließ sich in den erkrankten Abschnitten keine D7-Reaktivität nachweisen (82, 92).

Weitere im intestinalen Nervensystem vorkommende Antigene sind PGP 9.5 (Protein Gene Product 9.5), Neuronen-spezifische-Enolase (NSE) oder Neurofilament Proteine. Auch der Nachweis von glialen Markern wie S100-Protein und GFAP (glial fibrillary acidic protein) ist möglich.

Unter Verwendung von Antikörpern gegen diese antigenen Strukturen konnten pathologische Veränderungen, das heißt dysplastische Ganglien und hypertrophierte Nervenfasern bei der Intestinalen Neuronalen Dysplasie präzise dargestellt werden. (50, 51)

Neuromuskuläre Kontakte und Synapsen, aber auch Ganglienzellen und Nervenfasern können mit Anti-Synaptophysin beziehungsweise dem monoklonalen Antikörper 171B5 markiert werden (46, 76, 81, 117, 118, 120).

In neueren Untersuchungen wurde für die Identifikation von Ganglienzellen in gesundem Darmgewebe und in Hirschsprung-Segmenten ein Antikörper gegen bcl-2 Protein eingesetzt. Dieses Protein kommt im zentralen und peripheren Nervensystem vor und blockiert den programmierten Zelltod (115).

Es ist nun von Interesse, ob sich die immunologischen Techniken den längst etablierten Verfahren wie der H&E- oder der AChE-Färbung in der Darstellung von Nervenstrukturen und der Aussagekraft der Befunde als überlegen erweisen.

Besondere Anforderungen werden an den Einsatz immunologischer Techniken in der Schnellschnittdiagnostik während der Korrekturoperation einer intestinalen neuronalen Fehlbildung gestellt. Übersichtsdarstellungen mit Hämatoxylin & Eosin gelingen rasch, werden jedoch in der Aussagekraft von der, allerdings zeitaufwendigeren, enzymhistochemischen Methode der AChE-Färbung übertroffen (47, 48, 80). Durch die Einführung eines zusätzlichen Reaktionsschrittes konnte bei letzterer jedoch eine Beschleunigung des Ablaufes, bei vergleichbarer Aussagekraft, erreicht werden (47).

Die Verwendung von Antikörpern eignet sich, bedingt durch längere und mehrfache Inkubationsschritte primär weniger zur intraoperativen Untersuchung

von Darmgewebe. Jedoch bieten speziell für Schnellschnittuntersuchungen entwickelte Antikörper neue Möglichkeiten. Es wurden zum Beispiel Konjugate entwickelt, bei denen der Antikörper bereits gebunden mit Markerenzym und Blockierungssagens vorliegt. Dadurch werden mehrere zeitaufwendige Inkubationsschritte zusammengefasst. Um ein solches Konjugat handelt es sich bei dem in den vorliegenden Untersuchungen zur Darstellung der neuronalen Strukturen verwendeten polyklonalen Antikörpers gegen Synaptophysin (EPOS Anti-Human-Synaptophysin/HRP DAKO®, Hamburg). Die nötige Inkubationszeit wurde, verglichen mit der Mehrschrittmethode für Antikörperfärbungen, wesentlich verkürzt. Mit dieser Ein-Schritt-Technik gelingt die Darstellung von Ganglienzellen und der Synapsenverteilung in der glatten Darmmuskulatur. Die Reaktionsdauer wird auf etwa eine Stunde herabgesetzt, was für die intraoperative Diagnostik einen erheblichen Zeitgewinn bedeuten würde beziehungsweise diesen Einsatz erst ermöglichen könnte (46).

An derartige Antikörper werden besondere Voraussetzungen gestellt, wie starke Affinität und hoher Titer des Primärantikörpers sowie stärker konzentrierte Antisera. Antisera mit niedrigeren Titern führen durch den meist größeren Anteil unspezifischer Antikörper verstärkt zu unerwünschten Hintergrundreaktionen (6).

Bezüglich Spezifität und Sensitivität erbrachte die Untersuchung von Kobayashi et al. (42), bei der ein monoklonaler Antikörper gegen Nerve Growth Faktor (NGFR) in Hirschsprung-Biopsien eingesetzt wurde, ähnlich verlässliche Ergebnisse wie die AChE-Technik.

Der von Galvis und Yunis (23) durchgeführte Vergleich PGP-9.5- und Neuropeptid-Y-behandelter Gewebeproben mit AChE-gefärbten lieferte sogar bessere Resultate der enzymhistochemischen Methode, das heißt keine falsch-positiven Befunde und erlaubt eine leichtere Interpretation.

Verglichen mit den Ergebnissen der AChE-Reaktion scheint der Einsatz immunhistochemischer Methoden allein zur Darstellung von Ganglienzellen und

Nervenfasern keine wesentlichen diagnostischen Zusatzinformationen zu erbringen.

Auch ein typisches Innervationsmuster in der Mukosa, das die Diagnose eines Morbus Hirschsprung in oberflächlichen Saugbiopsien erleichtern könnte, zeigte sich in entsprechenden immunhistochemischen Untersuchungen nicht (81).

Jedoch gehen andere Untersucher durchaus von einem Beitrag immunologischer Verfahren zu einem umfassenderen Verständnis der ursächlichen pathophysiologischen Veränderungen sowie einer verbesserten Diagnostik bei intestinalen Innervationsstörungen, vor allem der Abgrenzung fehlinnervierter Bereiche von gesunden Segmenten, aus (92).

Insbesondere neuronale Verbindungen in innervationsgestörten Darmbiopsien konnten unter Verwendung von Antikörpern genauer analysiert werden. Dies ist auch das Ziel der vorliegenden Arbeit.

5.2 Darstellung der Synapsen und neuromuskulären Verbindungen

Bei den intestinalen dys- oder aganglionären Innervationsstörungen sind die Ganglienzellen in den Plexus fehl- oder gar nicht ausgebildet. Demzufolge bleibt die adäquate Wirkung der inhibitorischen Neurone aus und der Parasympathikus kann im betroffenen Bereich seine Wirkung auf die Ringmuskulatur ungehindert entfalten. Es resultiert die spastische Kontraktion des erkrankten Darmes, die Achalasie.

Dies könnte bedeuten, dass die Innervation im betroffenen Segment zwar ausreichend, das heißt die Anzahl neuromuskulärer Verbindungen regelrecht, aber nicht durch die Plexus moduliert ist (36).

Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, dass die Nervenfasern in den gestörten Bereichen trotz ihrer zahlenmäßigen Vermehrung weniger neuromuskuläre Verbindungen ausbilden und die Innervation deshalb abgeschwächt ist.

Unter Verwendung von gegen Synapsen und neuromuskuläre Verbindungen gerichteten Antikörpern konnten eine abnorme Verteilung oder quantitative Veränderungen dieser Elemente bei Morbus Hirschsprung und verwandten Störungen festgestellt werden (44, 46, 74, 81, 115, 117, 118, 119, 120, 121).

Es wurden Antikörper gegen Synaptophysin zur Darstellung neuronaler Verbindungen eingesetzt. Synaptophysin ist ein 38000-D-Transmembranglykoprotein cholinerg, adrenerg und neuroendokriner Strukturen, das wohl in allen Synapsen vorkommt (46, 81, 85).

Der monoklonale Antikörper 171B5 erwies sich in mehreren Untersuchungen als ein solcher Marker zur Darstellung von Synapsen (76, 117, 118, 120). Mit ihm ließ sich in Hirschsprung-Proben eine deutliche Verminderung der Anzahl an Synapsen und neuromuskulären Verbindungen in Ring- und Längsmuskulatur zeigen, verglichen mit normalem Darm. Dabei wurde im oligoganglionären Übergangsegment eine allmähliche Abnahme dieser neuronalen Elemente nach

distal, in Richtung des aganglionären Abschnittes hin festgestellt. Gleichzeitig nahmen erwartungsgemäß AChE-positive Nervenfasern zu (117).

Kobayashi et.al. (46) setzten in ihrer Untersuchung einen konjugierten polyklonalen Antikörper gegen Synaptophysin als Ein-Schritt-Technik ein (EPOS, DAKO®). Bei Morbus Hirschsprung und IND wurde eine deutlich reduzierte Synapsendichte in der Ring- und Längsmuskulatur aganglionärer und dysplastischer Proben nachgewiesen.

Diese Befunde konnten mit den hier vorgestellten Untersuchungen, bei denen ebenfalls der konjugierte Synaptophysin-Antikörper (EPOS, DAKO®, Hamburg) verwendet wurde, nicht bestätigt werden. Anhand der Ergebnisse kann nicht von statistisch signifikanten quantitativen Unterschieden der neuromuskulären Kontakte in der glatten Muskulatur aganglionären, dysplastischen und gesunden Darmgewebes ausgegangen werden ($p = 0,0761$ [Fläche], $p = 0,18$ [Signale]) (Tab. 4.6a. und b.).

Yamataka et al. (118) richteten ihr Interesse auf die Analyse von Veränderungen in der Synapsenanzahl in oberflächlicheren Schichten des Darmes (Mukosa, Submukosa). Unter Verwendung des Antikörpers 171B5 wurde in aganglionären Proben eine deutliche Verminderung der Synapsenanzahl in der Mukosa (Lamina propria und Muscularis mucosae) und Submukosa festgestellt, verglichen mit den Befunden regelrecht innervierter Präparate.

Im aganglionären Darm wurden statistisch signifikant weniger Synapsenvesikel-Proteine bei gleichzeitig erhöhtem Anteil an Nervenfaserkomponenten nachgewiesen. Als Marker für neuronale Fasern diente hier ein monoklonaler Antikörper gegen den 70000-D Neurofilament-Bestandteil (Neurofilament70K) (120).

5.3 Aussagewertigkeit der erarbeiteten Ergebnisse mit Methodenkritik

5.3.1 Stellungnahme zur Art der Erkrankung

In der vorliegenden Arbeit wurden neuronale Kontakte (Synapsen, neuromuskuläre Kontakte) mit einem polyklonalen Antikörper gegen Synaptophysin (SP) in Kryostatschnitten aganglionärer, dysplastischer und regelrecht innervierter Proben markiert und anschließend quantitativ ausgewertet (Fläche der Anfärbung [*Fläche*], Anzahl der registrierten Anfärbungen [*Signale*]).

Ein statistisch signifikanter Einfluss der *Art der Erkrankung* auf die Ergebnisse der Messungen für SP-Fläche und SP-Signale konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0,0761$ [Fläche], $p = 0,18$ [Signale]) (Tab. 4.6a. und b.). Das heißt, Unterschiede im Färbeverhalten der Proben können nicht durch den Effekt *Art der Erkrankung* erklärt werden.

Insgesamt kann damit Folgendes herausgehoben werden:

Da für Fläche und Anzahl der Synaptophysin-Markierungen keine Abhängigkeit von der *Art der Erkrankung* festgestellt werden konnte (Tab. 4.6a. und b.), ist die verwendete Methode nicht hinreichend geeignet, differentialdiagnostische Aussagen zu erhalten. Ob Modifikationen bessere Ergebnisse liefern können, ist in weiterführenden Untersuchungen zu prüfen. Eine Diskussion möglicher methodischer Abwandlungen soll anschließend erfolgen.

5.3.2 Stellungnahme zur Lokalisation

In der hier vorgestellten Arbeit zeigte sich, dass die Anzahl neuronaler Kontakte im Kolongewebe unter anderem hochsignifikant vom Ort der Messung (Ring- bzw. Längsmuskulatur) abhängt (Tab. 4.6a. und b.).

Es wurden bei jeder der drei Diagnosen (Aganglionär, Dysplastisch, Gesund) jeweils signifikant mehr neuronale Verbindungen in der Ring- als in der Längsmuskulatur beobachtet. (Abb. 4.12., 4.13., Tab. 4.12., 4.13., Tab. 4.14e. und f.)

Auch in Untersuchungen von Munakata et al. (74) konnte mittels monoklonaler Antikörper gegen synaptische Vesikel ein Überwiegen neuronaler Verbindungen in der zirkulären Muskelschicht bei normalem Darm aufgezeigt werden. Bei dysplastischen Proben verhielt es sich hier jedoch entgegengesetzt; sie wiesen mehr synaptische Vesikel in der Längs- als in der Ringmuskelschicht auf. Diese Beobachtung konnte im Rahmen der vorgelegten Arbeit nicht bestätigt werden (Tab. 4.14e. und f.).

Das heißt zusammengefasst, es wurde in den vorgestellten Untersuchungen eine signifikant höhere Anzahl neuronaler Kontakte in der Kolon-Ring- als in der Längsmuskelschicht bei allen drei *Erkrankungen* (Aganglionär, Dysplastisch, Gesund) gefunden (Tab. 4.14e.), was in Voruntersuchungen (74) nur für normal innervierten Darm gezeigt werden konnte.

Die gemessenen Werte für SP-Fläche und -Signale hängen insgesamt hochsignifikant vom Ort der Messung (RM bzw. LM) ab. Eine getrennte Betrachtung beider Muskelschichten ist daher notwendig.

5.3.3 Stellungnahme zur Frage nach der Schnittrichtung

Neben dem unterschiedlichen Färbeverhalten der beiden Muskelschichten zeigten die durchgeführten Analysen einen hochsignifikanten Einfluss der Schnittrichtung, das heißt der Richtung, in der die Fasern in der jeweiligen Muskelschicht getroffen worden waren (*Schnittrichtung*), auf das Ergebnis der Antikörper-Markierungen (Tab. 4.6a und b.).

Die meisten Anfärbungen wiesen schräg angeschnittene Proben sowohl in der Kategorie *Fläche* als auch *Signale* auf (Abb. 4.15., 4.16., Tab. 4.15., 4.16.). Der Unterschied zu den quer oder längs getroffenen Biopsien stellte sich als statistisch signifikant heraus (t-Test: Tab. 4.17a. und b.).

Bei schräg angeschnittenen Nervenfasern können in einem wesentlich längeren Abschnitt synaptische Vesikel immunhistochemisch markiert und nachgewiesen werden, als dies bei den nur in ihrem Querschnitt dargestellten Fasern in quer geschnittenen Proben der Fall ist. Allerdings wäre danach gleichfalls zu erwarten, dass die Schnittrichtung *Längs* mehr Synaptophysin-Markierungen zeigte als *Quer*. Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse der Untersuchungen. Sie ergaben weniger Anfärbungen der längs als der quer angeschnittenen Proben (Tab. 4.15., 4.16.), wobei sich der Unterschied nur hinsichtlich der Signalanzahl, nicht jedoch der SP-Fläche, als schwach signifikant herausstellte (Tab. 4.17a. und b.).

Aufgrund der beobachteten Unterschiede ist eine möglichst eindeutige Zuordnung der Muskelschichten zur Faserrichtung (quer, längs, schräg) anzustreben. Dies erwies sich jedoch mitunter als problematisch. Insbesondere zwischen schräg und längs getroffenen Muskel- und Nervenfasern war die Unterscheidung teilweise recht schwierig. Die Betrachtung der zweiten, gegenläufigen Muskelschicht konnte oft bei der Klärung helfen.

Die Kategorie *Schräg* weist die größten Unsicherheiten bezüglich der Zuordnung und Beurteilung auf. Die Verwendung von Proben, die eindeutig quer und längs

angeschnittene Faserverläufe erkennen lassen, ist für die diagnostische Sicherheit zu fordern.

Die genannten Schwierigkeiten der Zuordnung ergeben sich aus den Eigenschaften des organischen Materials sowie nicht auszuschließender Ungenauigkeiten beim Einfrieren und Schneiden der Proben.

Eine Methode, die eine möglichst exakte Zuordnung der Muskelschichten zu der jeweiligen Schnittrichtung erlaubt, wäre die Herstellung von Serienschnitten der zu untersuchenden Gewebeprobe mit anschließender Beurteilung hinsichtlich der angeschnittenen Fasern jedes Einzelpräparates. Bei einer genügend großen Anzahl von betrachteten Einzelschnitten erhält man eine repräsentative Stichprobe aus den möglichen Faserverläufen innerhalb des Gewebeblockes. Anhand dieser Stichprobe ist die mehrheitlich zutreffende Einteilung in eine der Schnittformen (*Schnittrichtung*) zuverlässiger zu treffen als bei Betrachtung lediglich einer einzelnen Biopsie eines Gewebeblocks.

Es ist also die Verwendung von Proben, die eine eindeutige Beurteilung der Schnittrichtung und Zuordnung zu den Kategorien *Quer* beziehungsweise *Längs* erlauben anzustreben. Dies bedeutet die Herausnahme der Kategorie *Schräg*, die jedoch im vorliegenden Fall bei einem Großteil der Proben gefunden wurde.

5.3.4 Stellungnahme zu den Biopsien

Die Auswertungen konnten nur mit jeweils sechs Proben pro Art der Erkrankung (Aganglionär, Dysplastisch, Gesund) durchgeführt werden. Es war nicht möglich, auf eine größere Anzahl geeigneter Biopsien zurückzugreifen. Da der Gehalt an neuromuskulären Verbindungen und Synapsen in der Ring- und Längsmuskulatur interessierte, konnten nur Wand-durchgreifende Proben verwendet werden, die im Rahmen operativer Eingriffe entnommen wurden. Von derartigem Gewebe existierten weit weniger geeignete Proben als oberflächliche Saugbiopsien, die

zur präoperativen Abklärung bei Verdacht auf Morbus Hirschsprung üblicherweise entnommen werden. Die glatten Muskelschichten sind in solchen Proben nicht enthalten, bestenfalls findet man Anteile der Submukosa.

Um eine Aganglionose diagnostizieren zu können, ist dieses Verfahren ausreichend, da die Erkrankung aufgrund der AChE-Erhöhung in den parasympathischen Nervenfasern der Lamina propria und muscularis mucosae zu erkennen ist (64).

Bei der Erkennung Ganglien-tragender aber dennoch innervationsgestörter Bereiche, beispielsweise bei der IND oder der Hypoganglionose, wird dagegen die Verwendung oberflächlicher Saugbiopsien für unzureichend gehalten. Hier sollten Gewebeproben mindestens Anteile der Submukosa enthalten (29, 94, 96). Andere Untersucher fordern sogar Wand-durchgreifende Biopsien, die zusätzlich eine Beurteilung des Plexus myentericus erlauben (1, 63).

Allerdings ist die Entnahme von tiefergreifenden Proben mit größeren Risiken verbunden als die unkomplizierte Gewinnung von Saugbiopsien. So muss die Gewebeentnahme unter direkter Sicht erfolgen und setzt eine Allgemeinnarkose sowie die Naht der Wunde voraus (52).

Die Probenauswahl wurde weiterhin dadurch beeinträchtigt, dass die einzelnen Präparate starke interindividuelle Unterschiede zeigten.

Schon makroskopisch wiesen die verwendeten eingefrorenen Gewebeblöcke hinsichtlich ihrer Größe beträchtliche Differenzen auf, von „stecknadelkopf-“ bis „fingerkuppengroß“. Dies erschwerte später vor allem die Platzierung der Zählfelder bei der Auswertung der daraus gefertigten Schnitte.

Bei der Auswertung wurden dementsprechend auch starke Unterschiede in der Anzahl neuromuskulärer Verbindungen und Synapsen für die Einzelbiopsien, das heißt die jeweiligen Proben mit definierter Erkrankung (Probe[Erkrankung]), gefunden. Das Ergebnis der registrierten Antikörper-Markierungen hängt daher in statistisch hochsignifikanter Weise von der Einzelprobe (Probe [Erkrankung]) ab (p jeweils $< 0,0001$ für *Fläche* und *Signale*) (Tab. 4.6a. und b.).

Vor diesem Hintergrund wäre eine Angleichung der Proben anzustreben, zum Beispiel hinsichtlich der Präparatgröße. Auch könnte sich die Verwendung von aufgerolltem Gewebe als hilfreich erweisen.

Hierzu werden intraoperativ entnommene längere Darmanteile longitudinal aufgeschnitten, in mehrere kleinere Längsstreifen zerteilt und in kaudokraniel Richtung aufgerollt. Der vormals distale Abschnitt liegt nun im Inneren der Spirale, nach außen hin folgen die proximalen Bereiche. Dieser Gewebeblock wird möglichst gerade ausgerichtet eingefroren, so dass später ein exakter Anschnitt durchführbar ist (63, 67).

Vorteil dieser Methode ist die gleichzeitige Verfügbarkeit unterschiedlich stark innervationsgestörter Areale innerhalb eines hergestellten Präparates. Bei entsprechendem Material ist es beispielsweise möglich, eine Übergangszone bei Morbus Hirschsprung im Zusammenhang zu verfolgen, während dies bei herkömmlichen Proben nur durch Betrachtung verschiedener Einzelschnitte erfolgen kann. Das aufgerollte Gewebe bietet Einblick in die segmentalen nervalen Veränderungen des Darmes, nicht nur eine „Momentaufnahme“ des Innervationsmusters. So ist eine bessere Einschätzung der Schädigung, insbesondere die Festlegung des Resektionsrandes möglich, da die Anwesenheit regelrechter Ganglien und die Abnahme hypertrophierter Nervenfasern im Verlauf beurteilt werden können.

Allerdings bringt die Verwendung von Serienschnitten eines Gewebeblocks oder die Auswertung von mehreren Proben eines Patienten neue Schwierigkeiten mit sich. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass der Einfluss der Einzelprobe eines Individuums (Probe[Erkrankung]) auf das Messergebnis als hochsignifikant einzustufen ist (Tab. 4.6a. und b.). Die Auswertung jeweils mehrerer Biopsien des gleichen Patienten nach der vorgestellten Methode könnte demnach das Ergebnis verfälschen.

Auch für diese Arbeit konnte deshalb nur jeweils eine Probe eines Patienten verwendet werden. Auf diese Weise war es nicht möglich, Übergänge, das heißt

die fortschreitende Normalisierung des Innervationsmusters bei einem Patienten zu erfassen.

Insgesamt wiesen die verwendeten Biopsien starke interindividuelle Unterschiede auf, der Einfluss der Einzelproben auf die Anfärbungen ist hochsignifikant (Tab. 4.6a. und b.). Dies schränkt den Einsatz der vorgestellten Methode für die Diagnostik intestinaler Innervationsstörungen ein.

Die Verwendung mehrerer Proben eines Individuum, somit auch Auswertungen von Übergangsbereichen eines Patienten ist nach den vorgestellten Untersuchungen nicht möglich.

5.3.5 Stellungnahme zum Alter der Patienten

Bei der Auswahl der Patienten ist zu berücksichtigen, dass morphologische Veränderungen in dysplastischen Darmsegmenten mit zunehmendem Alter, hauptsächlich im Laufe des ersten Lebensjahres, rückläufig sein können (60, 66, 68, 88, 99).

Das Alter der Kinder, von denen Proben für die vorliegenden Untersuchungen verwendet wurden, lag zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme zwischen 10 Tagen und 22 Monaten, im Mittel bei 11 Monaten. Die Biopsie des jüngsten, 10 Tage alten Kindes wies eine Aganglionose auf. Bei dieser Störung wurden Ausreifungsabläufe, die zur Normalisierung der histologischen Befunde führen, nicht beschrieben, so dass hier von dieser Seite her keine Verfälschung der Aussagen zu erwarten ist. Bei den dysplastischen Befunden, die jeweils zwischen dem vierten und achten Monat gewonnen wurden, ist eine spätere Veränderung des histologischen Bildes aufgrund von Ausreifungsvorgängen denkbar.

Die gesunden Proben stammten von Kindern, deren Alter bei der Entnahme, wie das der Patienten mit Innervationsstörung, unter 24 Monaten lag.

Vor dem Hintergrund von Ausreifungsvorgängen bei der Intestinalen Neuronalen Dysplasie wäre es daher interessant, das Innervationsmuster unter besonderer Berücksichtigung des Alters des Kindes (unter beziehungsweise über dem 1. Lebensjahr) zu untersuchen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mögliche Ausreifungsvorgänge in dysplastischen Darmsegmenten hauptsächlich innerhalb des ersten Lebensjahres stattfinden. Unsere Patienten waren jünger als 24 Monate, eine gezielte Untersuchung morphologischer Veränderungen in Abhängigkeit vom Patientenalter erfolgte nicht.

5.3.6 Stellungnahme zur Art der Schnittfertigung

Von den verwendeten Gewebeproben wurden Kryostatschnitte hergestellt, die prinzipiell für die vorgestellten Untersuchungen geeignet waren. Kryostat-schnitte bieten für die Immunhistochemie gegenüber Paraffinpräparaten den Vorteil, dass Antigene wesentlich besser erhalten bleiben. Allerdings werden morphologische Einzelheiten bei der Bearbeitung eher zerstört, da das Material sehr empfindlich ist (22).

5.3.7 Stellungnahme zum Antikörper

Der Anfärbung neuronaler Verbindungen diene ein polyklonaler Antikörper gegen Synaptophysin.

Polyklonale Antikörper reagieren mit verschiedenen Epitopen des Antigens. Sie weisen deshalb gegenüber ihren monoklonalen Äquivalenten den Vorteil auf, dass sie auch dann noch einen Nachweis des Antigens erlauben, wenn einzelne Epitope zum Beispiel durch die Fixation zerstört wurden. Monoklonale Antikörper zeichnet indessen eine hohe Spezifität für das jeweilige Epitop, gegen das sie

gerichtet sind, aus. Gewebeveränderungen können hier eher den Antigennachweis unmöglich machen als dies bei Verwendung polyklonaler Antikörper der Fall ist.

Ist das Epitop nicht spezifisch für das nachzuweisende Antigen, ist mit dem Auftreten von Kreuzreaktionen monoklonaler Antikörper mit anderen Strukturen zu rechnen. Dies kann bei polyklonalen Antikörpern, aufgrund ihrer Reaktion mit verschiedenen Epitopen der nachzuweisenden Struktur, vermindert werden.

Polyklonale Antiseren enthalten ein mehr oder weniger konstantes Antikörperspektrum, sind also prinzipiell chargenabhängigen Schwankungen unterworfen. Sie weisen aber auch Antikörper mit verschieden hoher Affinität zum Antigen auf. Dies macht den Verlust spezifischer Anfärbungen, beispielsweise in Waschvorgängen unwahrscheinlich. Die Möglichkeit einer zu geringen Affinität muss dagegen bei monoklonalen Antikörpern bedacht werden (4).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass der verwendete polyklonale Antikörper gegen Synaptophysin an Kryostatschnitten von Darmgewebe anwendbar ist. Vorausgesetzt, es handelt sich bei den Markierungen um Synapsen und neuromuskuläre Verbindungen, so ist er geeignet, die entsprechenden Strukturen darzustellen.

5.3.8 Beurteilung der immunhistochemischen Färbung

Bei der Beurteilung immunhistochemischer Befunde sind vor allem die Sensitivität des Nachweises und die Spezifität der Reaktion kritisch zu betrachten.

Sensitivität

Als Sensitivität bezeichnet man die Fähigkeit eines immunologischen Tests, ein bestimmtes Antigen tatsächlich als solches nachzuweisen, es ist der Quotient aus richtig nachgewiesenem Antigen und der Gesamtanzahl dieses Antigens.

Bei dem hier verwendeten Antikörper (EPOS Anti-Human Synaptophysin/HRP, DAKO®, Hamburg) handelt es sich um ein Konjugat, bei dem an ein inertes Trägermolekül mehrere polyklonale Primärantikörper gebunden sind. An diese ist bereits das Markerenzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Zusätzlich ist ein blockierendes Agens beigelegt (13).

Es stellt sich die Frage, ob die Zusammenlegung der verschiedenen Reaktionsschritte, einschließlich Blockierung unspezifischer Proteinbindungen und Enzymmarkierung, nicht zu Lasten der Sensitivität der Färbung geht. Es wäre beispielsweise zu prüfen, ob durch den Einsatz anderer immunhistochemischer Methoden eine Steigerung der Empfindlichkeit zu erreichen ist. Dies könnte vor allem im Hinblick auf eine Verbesserung der Detektion bei der digitalen Analyse von Bedeutung sein.

Grundsätzlich lässt sich die Sensitivität der Antikörperfärbung optimieren durch bestmögliche Antigenerhaltung, zum Beispiel durch Verwendung unfixierten Materials beziehungsweise schonende Fixierung, Verlängerung der Inkubationsdauer mit dem Antikörper, eine Erhöhung der Enzymkonzentration am Ort des nachzuweisenden Antigens und die Verminderung unspezifischer Hintergrundreaktionen (15). Auf das Problem der Hintergrundaktivität soll an späterer Stelle ausführlich eingegangen werden.

Höhere Enzymkonzentrationen am Antigen lassen sich durch eine Vermehrung der Inkubationssequenzen erreichen. Eine Möglichkeit hierfür ist die Zwei-beziehungsweise Drei-Schritt-Methode. Als Alternative zur empfindlichen Mehrschritt-Technik werden Konjugate angeboten, an die der Zweitantikörper sowie das Enzym bereits gekoppelt sind (EnVision™, DAKO®, EPOS, DAKO®). Um ein sehr sensibles Nachweissystem handelt es sich bei dem Verfahren der löslichen Immunkomplexe (PAP- und APAAP-Methode) (6). Als ein empfindlicheres Verfahren im Vergleich zur PAP-Technik wurde die Avidin-Biotin-(ABC) Methode beschrieben (37), die von der LAB-Technik in der Sensitivität noch übertroffen werden soll (27). Andere Autoren gehen dagegen von einer vergleichbaren Empfindlichkeit von ABC- und PAP-Färbung aus (15).

Bei den vorgestellten Untersuchungen waren die Antikörper-Anfärbungen oftmals schwach und somit schwierig mit Quantimet 600 zu detektieren. Auch hier könnte möglicherweise der Einsatz einer anderen Antikörper-Technik, beispielsweise die Verwendung getrennter Reaktionsschritte anstatt der Konjugat-Methode, zu einer Verbesserung der Ergebnisse führen.

Zu beachten ist, dass das Enzym Peroxidase in den beschriebenen Konjugatlösungen im Laufe der Zeit umgesetzt wird und für die Chromogenreaktion nicht mehr zur Verfügung steht. Um eine gleichbleibende Sensitivität zu erreichen, müsste strenggenommen nach längerer Lagerung des Antikörpers dessen Verdünnung verändert werden. Günstiger, weil leichter praktikabel, wäre das Einfrieren kleiner Portionen der Antikörperlösung.

Auf dieses Problem wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht näher eingegangen. Seine Berücksichtigung könnte jedoch im Rahmen einer Überarbeitung der Methodik zu einer weiteren Standardisierung der Untersuchungsbedingungen beitragen.

Spezifität und Hintergrundreaktivität

Spezifität ist die Fähigkeit eines immunologischen Tests, Strukturen ohne ein fragliches Antigen tatsächlich als solche zu erkennen und nur selektiv mit einem bestimmten Antigen zu reagieren.

Die Spezifität des verwendeten Antikörpers ist eine weitere wichtige Voraussetzung für immunhistochemische Färbungen. Falsch positive Markierungen können sich als Hintergrundaktivität zeigen. Außerdem ist an die bereits oben erwähnte Kreuzreaktivität zu denken, wenn das Epitop, gegen das der Antikörper gerichtet ist, nicht spezifisch für das nachzuweisende Antigen ist.

Unerwünschte Hintergrundfärbungen entstehen meist durch unspezifische Reaktion des Antikörpers mit Bindungsstellen des Gewebes. Hierfür werden beispielsweise hydrophobe Interaktionen zwischen Immunglobulin und hydrophoben Proteinen des fixierten Präparates verantwortlich gemacht. Diese Wechselwirkungen treten umso stärker auf, je länger IgG-Antikörper gelagert werden, da die Bildung von Aggregaten mit der Zeit zunimmt, was die hydrophoben Eigenschaften der Antikörperlösung steigert. Deshalb sollte auf die adäquate Aufbewahrung des Antikörpers geachtet werden, insbesondere müssen zu lange Lagerungszeiten vermieden werden.

Hydrophobe Wechselwirkungen können durch das Auftragen einer blockierenden Proteinlösung auf das Präparat reduziert werden. Diese Proteine konkurrieren mit dem Immunglobulin um hydrophobe Bindungsstellen im Gewebe und sollten am besten vor der Reaktion mit dem Primärantikörper zugegeben werden (7).

Bei dem in der vorgestellten Arbeit verwendeten Antikörper-Konjugat (EPOS, DAKO®) ist zu diesem Zweck ein Blockierungsgagens bereits zugesetzt (13).

Endogene Enzymaktivitäten, die unzureichend blockiert wurden, können die Hintergrundreaktivität steigern. Diese endogenen Peroxidaseaktivitäten, die wie zugegebenes Enzym eine Farbreaktion mit dem Chromogen verursachen können, müssen vor allem in Gefrierschnitten ausreichend unterdrückt werden, da hier im Gegensatz zu vielen formalinfixierten Geweben die Interpretation der spezifischen Färbung beeinträchtigt werden kann.

Die Hintergrundaktivität kann durch gründliche Waschzyklen bei sanftem Schütteln der Objektträger reduziert werden, was auch bei der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Färbung berücksichtigt wurde (7).

Zu erwähnen sind an dieser Stelle artifizielle Reaktionen, die sich in diffusen oder umschriebenen Anfärbungen zeigen. Die Ursache liegt hier oft in der mechanischen Schädigung des Materials. So kann es zum Beispiel auftreten, dass das Gewebe beim Schneiden durch das Messer Quetschungen oder Scharten bekommt. Häufig ist auch die Morphologie infolge schlechter Haftung auf

dem Objektträger oder eingerollter Schnittträger geschädigt. Daneben rufen physikalische Einflüsse, beispielsweise Austrocknung vor der Fixierung diffuse Farbreaktionen hervor. Nekrotische Areale werden von allen Reagenzien angefärbt (7).

Derartige Schädigungen der Gefrierschnitte konnten auch in den vorliegenden Untersuchungen beobachtet werden. Das beschriebene Einrollen der Schnittträger wurde häufig gesehen. Da das Erkennen jedoch lichtmikroskopisch keine großen Schwierigkeiten bereitete und zentral gelegene Gewebsareale nicht betroffen waren, hatte dies in der Regel keinen Einfluss auf die Beurteilung des Präparates. Die Ränder wurden in die Auswertung nicht einbezogen.

Insbesondere Hintergrundreaktionen durch artifizielle Ursachen können bei sorgfältiger Herstellung der Schnitte stark reduziert werden. Dies umfasst die Behandlung nach der Entnahme, den Transport des Materials auf Eis, den Schutz vor Austrocknung, ein schnelles Einfrieren der Probe, des weiteren die achtsame Aufarbeitung des Gewebes durch vorsichtiges Schneiden, Einhaltung einer genügend langen Trocknungszeit des Präparats, um eine ausreichende Haftung auf dem Objektträger zu gewährleisten, und eine ausreichende Fixation.

Unter der Annahme, dass sich dennoch aus den genannten Gründen im Laufe des Färbeprozesses einige der hergestellten Schnitte als für die Auswertung ungeeignet erweisen werden, wurden für die durchgeführte Analyse stets mehr Schnitte, als später für die Auswertung benötigt, angefertigt.

Folglich ist auf die sehr schonende und exakte Verarbeitung der Kryostatschnitte und möglichst gleichbleibende Lagerungsbedingungen und -zeiten des Antikörpers zu achten, um optimale Färbeargebnisse zu erzielen. Es wäre zu prüfen, ob durch den Einsatz von anderen Antikörper-Methoden, zum Beispiel der Mehrschritt-Technik, an Stelle der Konjugat-Technik eine höhere Sensitivität und Spezifität des Antigen-Nachweises erreicht werden könnte.

5.3.9 Stellungnahme zur Auswertung

Besonderes Augenmerk galt in der vorgestellten Arbeit der Auswertung mit dem digitalen Bildanalysesystem (Quantimet 600, Leica, Bensheim). Diese Methode wurde bereits in anderen Untersuchungen gastrointestinaler Innervationsstörungen eingesetzt zur morphometrischen Plexusvermessung mit Bestimmung von Gangliengröße, -abstand und -zellanzahl (67) und zur Registrierung des Anteils Antikörper-markierter nervaler und Gliazell-Proteine im menschlichen Ösophagus (34).

Die Registrierung neuronaler Verbindungen in der glatten Muskulatur bei Morbus Hirschsprung und verwandten Störungen mit der digitalen Bildanalyse wurde bisher in Tübingen nicht durchgeführt.

Die Verwendung des Bildanalysesystems Quantimet 600 ermöglicht eine quantitative Erfassung der immunhistochemisch dargestellten neuromuskulären Verbindungen und Synapsen und die nachfolgende statistische Auswertung. Auf diese Weise können konkrete Daten erhoben werden, die eine weitergehende Beurteilung der Befunde als die morphologische Beschreibung erlauben.

Weitere Untersucher, die sich ebenfalls mit der quantitativen Registrierung Antikörper-markierter neuromuskulärer Verbindungen in Darmproben bei Innervationsstörungen beschäftigten, verwendeten die Western-Blot-Analyse (120, 122). Hierzu ist jedoch die Homogenisierung, also die Zerstörung des Gewebeschnittes nötig. Morphologische Betrachtungen sind nachfolgend nicht mehr möglich.

In der vorliegenden Arbeit dienten über das Bildanalysesystem gewonnene Angaben über Anzahl und Fläche Anti-Synaptophysin-markierter Strukturen als Grundlage für die durchgeführte deskriptive Varianzanalyse.

Methodische Überlegungen zur Anwendung der digitalen Bildauswertung an immunhistochemisch markierten Darmbiopsien sollen im folgenden Abschnitt dargestellt werden.

Detektion

Bei den markierten Strukturen, die es auszuwerten galt, handelte es sich um kleine und nicht immer scharf begrenzte Markierungen.

Die Computer-Detektion erfolgte am gespeicherten Standbild durch Mausklick auf die zu erfassenden Areale. Auf dem Monitor wurden markierte Strukturen farbig dargestellt.

Bei einigen Präparaten war es schwierig, die Registrierung möglichst aller gefärbten Elemente zu erreichen unter Vermeidung fälschlich detektierter Bereiche. Insbesondere bei unscharf begrenzten Antikörpermarkierungen mussten eher blass gefärbte Areale bei der Auswertung ausgespart werden, da trotz optimaler Einstellung der Kontraste keine Detektion möglich war, ohne dass nicht Antikörper-markierte Bereiche fälschlich eingeschlossen wurden. Hier lagen die Farbintensitätswerte des Bildhintergrundes und der Synaptophysinmarkierung so eng beieinander, dass sie vom Analysesystem nicht unterschieden werden konnten.

Prinzipiell bietet Quantimet 600 die Möglichkeit, Bereiche manuell durch Umfahren der Struktur mit dem Mauszeiger nachträglich zu detektieren beziehungsweise von der Erfassung auszuschließen. Da sich die Anti-Synaptophysin-gefärbten Bereiche jedoch als sehr zahlreich, sehr klein und teilweise sehr unregelmäßig bis unscharf begrenzt darstellten, war diese Methode zur Modifikation der Markierung nicht geeignet.

Das Problem der geringen Kontraste zwischen Hintergrund und Markierung ließe sich durch Verstärkung der Chromogen-Reaktion bei vorsichtiger Gegenfärbung des Hintergrundes verbessern. Gleichzeitig ist die Hintergrundfärbung bestmöglich zu reduzieren.

Da jedoch nicht alle Schnitte, die von verschiedenen Patienten in einer Sitzung hergestellt wurden, das gleiche Problem zu geringer Kontraste aufwiesen, sind zusätzlich individuelle Eigenschaften des Gewebes, die sich in einem unterschiedlichen Färbeverhalten zeigen, anzunehmen. Hierauf geben auch die

Ergebnisse der statistischen Auswertung mit hochsignifikantem Einfluss der jeweiligen Einzelbiopsien (Probe[Erkrankung]) einen Hinweis (Tab. 4.6a. –b.).

Aufgrund der beschriebenen individuellen Gewebeeigenschaften erfolgte die Einstellung der günstigsten Kontrastwerte der Abbildung für jedes Präparat neu, wurde aber innerhalb desselben für jede Einzelzählung beibehalten. Dies galt auch für die bei der Detektion festgelegten Farbintensitätswerte für die Erkennung der Synaptophysin-Markierungen.

Die jeweils bestmögliche Bildqualität wurde vom Auge des Untersuchers kontrolliert. Hier sind prinzipiell Auswirkungen von Schwankungen in der optischen Wahrnehmung (Müdigkeit, Dauer der Bildschirmarbeit, Beleuchtung) auf die Qualität der Detektion und somit das Ergebnis der Messung denkbar. Derartige menschliche Einflüsse sind jedoch nur unzureichend auszuschalten. Sie stellen eine weitere Erklärungsmöglichkeit unklarer Befunde dar.

Zählfelder

Die Auswertung wurde in je sechs Einzelfeldern, begrenzt durch den internen Zählrahmen des Systems, vorgenommen. Die Auszählung des gesamten Schnittes war aufgrund der stark unterschiedlichen Probengröße nicht möglich. Die kleinsten der Präparate waren gerade groß genug, um sechs Zählfelder pro Muskelschicht (Ring- bzw. Längsmuskulatur) aufzunehmen. Deshalb wurde die Anzahl von sechs Feldern auch bei den anderen Schnitten beibehalten, um stets die gleiche Anzahl Messdaten zu erheben.

Bei den größeren Proben wurde die Zählung möglichst im zentralen Bereich des Schnittes durchgeführt und das erste Zählfeld an der Submukosa-/ Ringmuskulatur-Grenze platziert. Weitere Auswertungen folgten schräg aneinandergereiht in Richtung Längsmuskulatur (Abb. 3.6.) Dies sollte eine weitgehende Vereinheitlichung der Auswertung der Schnitte gewährleisten, was jedoch nur unzureichend möglich war, da, wie erwähnt, die Präparate hinsichtlich Größe und Aufbau (Breite der Muskelschichten) starke interindividuelle Unterschiede aufwiesen.

Nicht auszuschließen ist eine unbewusste Leitung des Untersuchers von auffälligen Strukturen, zum Beispiel intensiver gefärbten Arealen, bei der Platzierung der Zählfelder, insbesondere da die jeweilige Histologie (*Erkrankung*) der Probe bekannt war. Hier sind Mängel in der Objektivität denkbar.

Es kann hervorgehoben werden, dass die digitale Bildanalyse prinzipiell geeignet ist, Synaptophysin-markierte Strukturen in Darmbiopsien zu quantifizieren. Allerdings liegen keine Angaben zur Sensitivität dieser Methode vor. Zu lösen war das Problem einer möglichst exakten Detektion der Markierungen sowie der Auswahl zu untersuchender Ausschnitte der Biopsie (Zählfelder).

5.3.10 Stellungnahme zur Statistik

Die statistische Auswertung wurde erschwert durch eine Vielzahl von Einflussfaktoren, die die Suche nach einem geeigneten mathematischen Testmodell nicht leicht gestalteten. Diese Einflussfaktoren waren *Einzelprobe (Probe[Erkrankung])*, *Lokalisation (Ring-/Längsmuskulatur)*, *Schnitttrichtung*, *Diagnose (Erkrankung)*. Hinzu kam die vielschichtige Abhängigkeit einzelner Faktoren untereinander. So konnten von einem Patienten nicht mehrere Proben mit verschiedenen Diagnosen, wie sie zum Beispiel bei der Betrachtung von Übergangsegmenten bei Morbus Hirschsprung vorkommen (z.B. 1. Probe aganglionär, 2. Probe dysplastisch), berücksichtigt werden. Derartige Proben wurden von der Auswertung zugunsten einer eindeutigen Patient-Diagnose-Zuordnung ausgeschlossen.

Die auswertbaren Proben bildeten schließlich eine sehr kleine Stichprobe mit jeweils sechs Biopsien pro Diagnose. Bei einer derart geringen Anzahl gezogener Proben ist davon auszugehen, dass einzelne Abweichungen das Messergebnis wesentlich stärker beeinflussen als dies bei einer höheren Anzahl Proben der Fall wäre. Eine Weiterführung der Analyse mit einer größeren Stichprobe könnte

demnach beobachtete Trends in der Untergruppe *Erkrankung*, die sich nicht als signifikant bestätigen ließen, deutlicher hervorheben oder auch widerlegen.

Insgesamt wurde die statistische Auswertung durch die Vielzahl von Einflussfaktoren und die sehr kleine Stichprobe erschwert. Für nachfolgende Analysen ist vor allem eine Erhöhung der Fallzahlen und die Durchführung der Untersuchungen unter weitgehend standardisierten Bedingungen anzustreben.

5.4 Perspektiven zur Verbesserung der Methode

Die vorliegenden Untersuchungen widmen sich der immunhistochemischen Darstellung und Analyse neuromuskulärer Verbindungen und Synapsen in aganglionären, dysplastischen sowie regelrecht innervierten Darmbiopsien.

Es wurden Proben von Kindern bis zum Alter von 22 Monaten verwendet. Vor dem Hintergrund beschriebener Ausreifungsvorgänge in dysplastischen Darmabschnitten hauptsächlich innerhalb des ersten Lebensjahres (60, 68, 89, 99), sind weitere Untersuchungen, die dieses Phänomen gezielt berücksichtigen, denkbar. Dies könnte zum Beispiel durch die getrennte Analyse von Biopsien von Patienten unter beziehungsweise über einem Jahr erfolgen.

Die Proben, die untersucht wurden, wiesen starke interindividuelle Unterschiede auf. Das schlägt sich schließlich darin nieder, dass ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen den Einzelproben mit definierter *Erkrankung* (*Probe[Erkrankung]*) und den Synaptophysin-Markierungen gefunden wurde. (4.6a.–b.) Jede Probe weist natürlich individuelle Eigenheiten auf, die sich daraus ergeben, dass es sich um organisches Material handelt. Es ist künftig dennoch eine möglichst gute Angleichung der Proben anzustreben, zum Beispiel durch die Herstellung von Gewebeschnitten mit etwa vergleichbarer Größe. Dies konnte im vorliegenden Fall nicht erreicht werden. Die konservierten Gewebelöcke waren in dieser Hinsicht zu unterschiedlich.

Interessant wäre, insbesondere im Hinblick auf die intraoperative Festlegung des oberen Resektionsrandes, die gezielte Untersuchung von Übergangsegmenten bei Morbus Hirschsprung, da hier die zunehmende Normalisierung des Innervationsmusters beobachtet werden kann. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht umgesetzt werden. Da ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen

Einzelprobe (*Probe[Erkrankung]*) und den Synaptophysin-Markierungen besteht (4.6a.-b.), konnte von einem Patienten nur jeweils eine Probe verwendet werden.

Eine weitere Schwierigkeit bestand in der Bestimmung der Richtung, in der die Fasern in den Muskelschichten des jeweiligen Präparates angeschnitten waren (*Schnittichtung*). Viele Proben wurden der Untergruppe *Schräg* zugeordnet. Besser wäre eine exakte Zuordnung der Muskelschichten zu den Kategorien Quer beziehungsweise Längs. Dies wäre durch die Herstellung von Serienschnitten denkbar. Hier soll aufgrund der großen Anzahl betrachteter Einzelschnitte eine möglichst genaue Zuordnung der Gesamtprobe erreicht werden, wie in der „Stellungnahme zur Schnittichtung“ beschrieben.

Die verwendeten Kryostatschnitte waren insgesamt geeignet für die Färbung mit dem konjugierten polyklonalen Antikörper gegen Synaptophysin (EPOS, DAKO®, Hamburg). Die Zusammenlegung mehrerer Reaktionsschritte bei derartigen Antikörpern, einschließlich der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und die Enzymmarkierung könnte sich jedoch möglicherweise ungünstig auf Sensitivität und Spezifität der Markierung auswirken. Daher ist es sicherlich interessant, in folgenden Untersuchungen zu prüfen, ob die Verwendung einer anderen Antikörper-Technik, zum Beispiel einer Mehrschritt-Methode, zu verbesserten Färbeergebnissen führen kann.

Im Hinblick auf eine weitgehende Standardisierung des vorgestellten Verfahrens ist beispielsweise an eine gleichbleibende Temperatur im Raum, in dem die Antikörper-Färbung durchgeführt wird, zu denken. Temperaturschwankungen können die Intensität der Reaktion beeinflussen. Auch die Zeitspanne zwischen Anfärbung und Auswertung der Schnitte sollte dann stets konstant gehalten werden, denn mit der Zeit kann es zu einem allmählichen Abbau der farbigen Reaktionsprodukte kommen.

Im Antikörper-Konjugat wird im Laufe der Zeit die zugegebene Peroxidase

umgesetzt. Daher müssten gegebenenfalls nach längerer Lagerung des Antikörpers dessen Verdünnung geändert oder von vornherein kleine Portionen der Lösung eingefroren werden.

Die Antikörper-markierten Strukturen wurden mit Hilfe eines digitalen Bildanalyse-Systems (Quantimet 600, Leica, Bensheim) registriert.

Die Anwendung der digitalen Bildanalyse für die Erfassung der mit Anti-Synaptophysin markierten neuronalen Verbindungen in der glatten Muskulatur ist geeignet, quantitative Angaben über den Synapsengehalt der Proben zu erhalten.

Die Antikörper-Färbungen der Gefrierschnitte erwiesen sich hierbei grundsätzlich als durch das Verfahren der digitalen Bildanalyse registrierbar.

Die Detektion der Markierungen sollte immer von ein und derselben Person bei weitestgehend konstanten Lichtverhältnissen, unter Umständen sogar zur gleichen Tageszeit vorgenommen werden, um Schwankungen in der Detektionsgenauigkeit zu minimieren.

Im Hinblick auf die Auswertung der Daten sind bei weiterführenden Analysen gleiche Gruppengrößen bei der Gruppe der *Erkrankungen* anzustreben. Vor allem aber sollten höhere Fallzahlen erreicht werden. Je geringer die Anzahl gezogener Proben, desto eher ist davon auszugehen, dass einzelne Abweichungen das Messergebnis wesentlich stärker beeinflussen als dies bei einer höheren Anzahl Proben der Fall wäre.

Es sind für eine Weiterführung der Untersuchungen noch stärker standardisierte Bedingungen wünschenswert.

6. Zusammenfassung

In den vorgestellten Untersuchungen wurden Synapsen in der glatten Ring- und Längsmuskulatur von Kolongewebe bei Morbus Hirschsprung, Intestinaler Neuroner Dysplasie (IND) und in gesunden Proben mit einem Antikörper gegen Synaptophysin (SP) (EPOS, DAKO®) dargestellt. Die so markierten Areale wurden hinsichtlich ihrer Fläche und Anzahl mit einem digitalen Bildanalysesystem (Quantimet 600, Leica, Bensheim) quantitativ erfasst. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels deskriptiver Varianzanalyse unter dem Gesichtspunkt der Auswirkung verschiedener Einflussgrößen auf das Ergebnis der Messungen.

Es sollte geprüft werden, ob durch das Verfahren Unterschiede in der Synapsenanzahl und -verteilung bei den Krankheitsbildern festgestellt werden können.

Für die *Art der Innervationsstörung* (*Erkrankung*: aganglionär, dysplastisch bzw. gesund) konnte kein signifikanter Einfluss auf das Messergebnis nachgewiesen werden ($p = 0,0761$ für *SP-Fläche*, $p = 0,18$ für *SP-Signale*). Das bedeutet, dass beobachtete Unterschiede im Färbeverhalten der Proben nicht durch den Effekt *Art der Erkrankung* erklärt werden können. Somit sind durch das angewendete Verfahren keine differentialdiagnostischen Aussagen hinsichtlich Aganglionose beziehungsweise Intestinaler Neuroner Dysplasie zu treffen.

Als hochsignifikant abhängig erwiesen sich Fläche und Anzahl der Antikörpermarkierten Strukturen dagegen von den Einflussgrößen *Lokalisation* (Ort der Auswertung, d.h. Ring- bzw. Längsmuskulatur aller drei Innervationsstörungen zusammen), *Schnittrichtung* (Richtung, in der die Fasern in der Probe angeschnitten worden waren) und *Probe[Erkrankung]* (d.h. Einzelprobe mit jeweils definierter Innervationsstörung) (p jeweils $<0,0001$ für *SP-Fläche* und *-Signale*).

Für den Effekt *Lokalisation*Erkrankung* (Ring-, bzw. Längsmuskulatur getrennt nach aganglionären, dysplastischen und gesunden Proben) ließ sich eine signifikante Auswirkung auf das Messergebnis für die SP-Fläche feststellen ($p = 0,0002$), hinsichtlich der SP-Signale konnte mathematisch ein solcher Einfluss gerade nicht mehr bestätigt werden ($p = 0,0599$).

Innerhalb der Kategorie *Lokalisation* wies die Ringmuskulatur bei allen drei *Erkrankungen* (aganglionär, dysplastisch, gesund) jeweils eine signifikant höhere Anzahl neuronaler Kontakte als die Längsmuskelschicht auf. ($p_{\text{aganglionär}}=0,0136$, $p_{\text{IND}}=0,0002$, $p_{\text{gesund}}=1,2e-8$)

Von den drei Schnittrichtungen waren die Werte für Fläche und Anzahl der Synaptophysin-Markierungen bei schrägem Anschnitt signifikant größer als bei quer oder längs getroffenen Proben (p jeweils $<0,0001$).

Unter der Voraussetzung, dass es sich bei den Antikörper-Markierungen zweifelsfrei um Synapsen handelt, ist die vorgestellte Methode geeignet, diese darzustellen und mit der digitalen Bildanalyse zu registrieren.

Stellt man sich jedoch die Frage, ob differentialdiagnostische Aussagen hinsichtlich Aganglionose (Morbus Hirschsprung) beziehungsweise IND zu erhalten sind, so ist dies mit den bislang vorgestellten Untersuchungen und auch nach dem Wissen aus Vorarbeiten mit immunhistochemischen Methoden zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

Es wurden jedoch mit der hier dargestellten Methode zahlreiche Einflussgrößen (*Lokalisation, Lokalisation*Erkrankung, Schnittrichtung, Probe[Erkrankung]*) gefunden, die das Ergebnis der Messungen wesentlich bestimmen. Sie sind daher bei der Planung weiterer Untersuchungen zu berücksichtigen.

7. Literaturverzeichnis

- 1) Athow, A.C., Filipe, M.I., Drake, D.P. (1991)
Hyperganglionosis mimicking Hirschsprung's disease
Arch. Dis. Childh. 66, 1300-1303
- 2) Banani, S.A., Forootan, H.R., Kumar, P.V. (1996)
Intestinal neuronal dysplasia as a cause of surgical failure in Hirschsprung's disease: a new modality for surgical management
J. Pediatr. Surg. 31, 572-574
- 3) Bennett, A., Garrett, J.R., Howard, E.E. (1968)
Adrenergic myenteric nerves in Hirschsprung's disease
Brit. Med. J. 1, 487-489
- 4) Boenisch, T. (1989)
Antikörper, 9-15
in: Naish, S.J. (Hrsg.): Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden II
4. überarbeitete Auflage, DAKO® Corporation
- 5) Boenisch, T. (1989)
Enzyme, eine Einführung, 18-21
in: Naish, S.J. (Hrsg.): Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden II
4. überarbeitete Auflage, DAKO® Corporation
- 6) Boenisch, T. (1989)
Färbemethoden, 22-27
in: Naish, S.J. (Hrsg.): Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden II
4. überarbeitete Auflage, DAKO® Corporation
- 7) Boenisch, T. (1989)
Hintergrundreaktivität, 30-33
in: Naish, S.J. (Hrsg.): Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden II
4. überarbeitete Auflage, DAKO® Corporation
- 8) Bolk, S., Pelet, A., Hofstra, R.M., Angrist, M., Salomon, R., Croaker, D., Buys, C.H., Lyonnet, S., Chakravarti, A. (2000)
A human model for multigenic inheritance: phenotypic expression in Hirschsprung's disease requires both the RET gene and a new 9q31 locus
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 268-273
- 9) Briner, J., Oswald, H.W., Hirsig, J., Lehner, M. (1986)
Neuronal intestinal dysplasia - clinical and histochemical findings and its association with Hirschsprung's disease
Z. Kinderchir. 41, 282-286
- 10) Bucher, O., Wartenberg, H. (1989)
Verdauungsapparat, Dickdarm, 411-416
in: Bucher, O., Wartenberg, H.: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
11. vollst. überarb. Aufl., Huber, Bern, Stuttgart, Toronto

- 11) Cass, D. (1986)
Hirschsprung`s disease: a historical review
Prog. Pediatr. Surg. 20, 199-214
- 12) Cass, D.T., Zhang, A.L., Morthorpe, J. (1992)
Aganglionosis in rodents
J. Pediatr. Surg. 27, 351-355
- 13) DAKO® EPOS Produktinformation (1999)
DAKO® Preis- und Produktliste
- 14) Dalla-Valle, A. (1920)
Ricerche istologiche su di un caso di megacolon congenito
Pediatria (Barcelona) 28, 740-752
- 15) Denk, H. (1989)
Immunhistochemische Färbemethoden, 251-261
in: Böck, P.: Romeis Mikroskopische Technik;
17. neubearbeitete Aufl., Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- 16) Dobbins, W.O., Bill, A.H. (1965)
Diagnosis of Hirschsprung`s disease excluded by rectal suction biopsy
N. Engl. J. Med. 272, 990
- 17) Duhamel, B. (1982)
Surgical treatment of Hirschsprung`s disease
Retrorectal and transanal pull-through (Duhamel`s procedure), 164-167
in: Holschneider, A.M.: Hirschsprung`s Disease
1. Aufl., Hippokrates, Stuttgart, Thieme-Stratton, Inc., New York
- 18) Eastwood, S.L., Burnet, P.W., McDonald, B., Clinton, J., Harrison, P.J. (1994)
Synaptophysin gene expression in human brain: a quantitative in situ hybridization and immunocytochemical study
Neuroscience. 59, 881-892
- 19) Ehrenpreis, T. (1946)
Megacolon in the newborn: a clinical and roentgenological study with special regard to the pathogenesis
Acta Chir. Scand. 94, Suppl. 112, 12-87
- 20) Ewe, K., Karbach, U. (1990)
Funktionen des Magen-Darm-Kanals, 772-777
in: Schmidt, R.F.; Thews, G.: Physiologie des Menschen
24. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- 21) Fadda, B., Maier, W.A., Meier-Ruge, W., Schärli, A., Daum, R. (1983)
Neuronale Intestinale Dysplasie: Eine kritische 10-Jahres-Analyse klinischer und bioptischer Diagnostik
Z. Kinderchir. 38, 305-311
- 22) Farmilo, A.J., Stead, R.H. (1989)
Fixierung in der Immunzytochemie, 34-40
in: Naish, S.J. (Hrsg.): Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden II
4. überarbeitete Auflage, DAKO® Corporation

- 23) Galvis, D.A., Yunis, E.J. (1997)
Comparison of neuropeptide Y, protein gene product 9.5, and acetylcholinesterase in the diagnosis of Hirschsprung's disease
Pediatr. Pathol. Lab. Med. 17, 413-425
- 24) Gannon, B.J., Noblett, H.R., Burnstock, G. (1969)
Adrenergic innervation of bowel in Hirschsprung's disease
Brit. Med. J. 2, 338-340
- 25) Geneste, O., Bidaud, C., Vita, G.D., Hofstra, R.M., Tartare-Deckert, S., Buys, C.H., Lenoir, G.M., Santoro, M., Billaud, M. (1999)
Two distinct mutations of the RET receptor causing Hirschsprung's disease impair the binding of signalling effectors to a multifunctional docking site
Hum. Mol. Genet. 8, 1989-1999
- 26) Gershon, M.D. (1999)
Lessons from genetically engineered animal models. II. Disorders of enteric neuronal development: insights from transgenic mice
Am. J. Physiol. 277, G262-267
- 27) Giorno, R. (1984)
A comparison of two immunoperoxidasestaining methods based on the avidin-biotin interaction
Diagn. Immunol. 2, 161-166
- 28) Hanimann, B., Inderbitzin, D., Briner, J., Sacher, P. (1992)
Clinical relevance of Hirschsprung-associated neuronal intestinal dysplasia (HANID)
Eur. J. Pediatr. Surg. 2, 147-149
- 29) Heitz, P.U., Komminoth, P. (1990)
Biopsy diagnosis of Hirschsprung's disease and related disorders
Curr. Top. Pathol. 81, 257-275
- 30) Helbig, D. (1982)
Hirschsprung's disease in infancy and childhood, 93-101
in: Holschneider, A.M.: Hirschsprung's Disease
1. Aufl., Hippokrates, Stuttgart, Thieme-Stratton, Inc., New York
- 31) Hess, R., Scarpelli, D.G., Pearse, A.G.E. (1958)
The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases
J. Biophys. biochem. Cytol. 4, 753-760
- 32) Hirobe, S., Doody, D.P., Ryan, D.P., Kim, S.H., Donahoe, P.K. (1992)
Ectopic class II major histocompatibility antigens in Hirschsprung's disease and neuronal intestinal dysplasia
J. Pediatr. Surg. 27, 357-363
- 33) Hirschsprung, H. (1888)
Stuhlträgheit Neugeborener in Folge von Dilatation und Hypertrophie des Colons
Jb. Kinderheilk. 27, 1-7
- 34) Hitchcock, R.J., Pemble, M.J., Bishop, A.E., Spitz, L., Polak, J.M. (1992)
The ontogeny and distribution of neuropeptides in the human fetal and infant esophagus
Gastroenterology 102, 840-848

- 35) Holschneider, A.M. (1982)
Diagnosis of Hirschsprung's disease
Manometric Diagnosis, 72-86
in: Holschneider, A.M.: Hirschsprung's Disease
1. Aufl., Hippokrates, Stuttgart, Thieme-Stratton, Inc., New York
- 36) Holschneider, A.M., Meier-Ruge, W., Ure, B.M. (1994)
Hirschsprung's disease and allied disorders - a review
Eur. J. Pediatr. Surg. 4, 260-266
- 37) Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. (1981)
Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures
J. Histochem. Cytochem. 29, 577-580
- 38) Ikawa, H., Yokoyama, J., Morikawa, Y., Hayashi, A., Katsumata, K. (1980)
A quantitative study of acetylcholine in Hirschsprung's disease
J. Pediatr. Surg. 15, 48-52
- 39) Junqueira, L.C., Carneiro, J.
übers., überarb., erg.: Schiebler, T., H., Schneider, F. (1991)
Verdauungsorgane, Intramurales Nervensystem, 506-507
in: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und Mikroskopischen Anatomie
3., erweiterte und völlig überarbeitete Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- 40) Kamijo, K., Hiatt, R.B., Koelle, F.B. (1953)
Congenital megacolon: a comparison of the spastic and hypertrophied segments with respect to cholinesterase activities and sensitivities to acetylcholine, DFP and the barium ion
Gastroenterol. 24, 173-185
- 41) Karnovsky, M.J., Roots, L. (1964)
A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases
J. Histochem. Cytochem. 12, 219-221
- 42) Kobayashi, H., Hirakawa, H., O'Briain, D.S., Puri, P. (1994)
Nerve growth factor receptor staining of suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease
J. Pediatr. Surg. 29, 1224-1227
- 43) Kobayashi, H., Hirakawa, H., Puri, P. (1995)
Overexpression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and MHD class II antigen on hypertrophic nerve trunks suggests an immunopathologic response in Hirschsprung's disease
J. Pediatr. Surg. 30, 1680-1683
- 44) Kobayashi, H., Hirakawa, H., Puri, P. (1996)
Is Intestinal Neuronal Dysplasia a disorder of the neuromuscular junction?
J. Pediatr. Surg. 31, 575-579
- 45) Kobayashi, H., Hirakawa, H., Surana, R., O'Briain, D.S., Puri, P. (1995)
Intestinal neuronal dysplasia is a possible cause of persistent bowel symptoms after pull-through operation for Hirschsprung's disease
J. Pediatr. Surg. 30, 253-259

- 46) Kobayashi, H., Miyano, T., Yamataka, A., Lane, G.J., Fujimoto, T., Puri, P. (1997)
Use of synaptophysin polyclonal antibody for the rapid intraoperative immunohistochemical evaluation of functional bowel disorders
J. Pediatr. Surg. 32, 38-40
- 47) Kobayashi, H., O`Briain, D.S., Hirakawa, H., Wang, Y., Puri, P. (1994)
A rapid technique of acetylcholinesterase staining
Arch. Pathol. Lab. Med. 118, 1127-1129
- 48) Kobayashi, H., Wang, Y., Hirakawa, H., O`Briain, D.S., Puri, P. (1995)
Intraoperative evaluation of extend of aganglionosis by a rapid acetylcholinesterase histochemical technique
J. Pediatr. Surg. 30, 248-252
- 49) Koelle, G.B. (1954)
Autonomic and pharmacologic control of colonic activity
Ann. N. Y. Acad. Sci. 58, 307-315
- 50) Krammer, H.J., Karahan, S.T., Sigge, W., Kuhnel, W. (1994)
Immunohistochemistry of markers of the enteric nervous system in whole-mount preparations of the human colon
Eur. J. Pediatr. Surg. 4, 274-278
- 51) Krammer, H.J., Meier-Ruge, W., Sigge, W., Eggers, R., Kuhnel, W. (1994)
Histopathological features of neuronal intestinal dysplasia of the plexus submucosus in whole mounts revealed by immunohistochemistry for PGP 9.5
Eur. J. Pediatr. Surg. 4, 358-361
- 52) Kurer, M.H.J., Lawson, J.O.N., Pambakian, H. (1986)
Suction biopsy in Hirschsprung`s disease
Arch. Dis. Childh. 61, 83-84
- 53) Kurihara, H., Kurihara, Y., Nagai, R., Yazaki, Y. (1999)
Endothelin and neural crest development
Cell. Mol. Biol. Noisy le grand 45, 639-651
- 54) Kuroda, T., Doody, D.P., Donahoe, P.K. (1991)
Aberrant colonic expression of MHC class II antigens in Hirschsprung`s disease
Aust. N. Z. J. Surg. 61, 373-379
- 55) Langer, J.C. (1999)
Repeat pull-through surgery for complicated Hirschsprung`s disease: indications, techniques, and results
J. Pediatr. Surg. 34, 1136-1141
- 56) Langer, J.C., Betti, P.A., Blennerhassett, M.G. (1994)
Smooth muscle from aganglionic bowel in Hirschsprung`s disease impairs neuronal development in vitro
Cell Tissue Res. 276, 181-186
- 57) Lassmann, G., Wurnig, P. (1973)
Lokale Ganglienzellhyperplasie in der Submucosa am oralen Ende des aganglionären Segments bei Morbus Hirschsprung
Z. Kinderchir. 12, 236-243

- 58) Lawson, J.O.N., Nixon, H.H. (1967)
Anal canal pressures in the diagnosis of Hirschsprung`s disease
J. Pediatr. Surg. 2, 544-552
- 59) Leube, R.E., Leimer, U.; Grund, C., Franke, W.W., Harth, N., Wiedenmann, B. (1994)
Sorting of synaptophysin into special vesicles in nonneuroendocrine epithelial cells
J.Cell.Biol. 6, 1589-1601
- 60) Lugo-Vicente, H.L. (1995)
Neuronal intestinal dysplasia: a role for surgery?
Bol. Asoc. Med. P. R. 87, 60-63
- 61) Meier-Ruge, W. (1968)
Das Megacolon, seine Diagnose und Pathophysiologie
Virchows Arch. Abt. A 344, 67-85
- 62) Meier-Ruge, W. (1971)
Über ein Erkrankungsbild des Colons mit Hirschsprung Symptomatik
Verh. Dtsch. Ges. Path. 55, 506-509
- 63) Meier-Ruge, W. (1974)
Hirschsprung`s disease: It`s aetiology, pathogenesis and differential diagnosis
Curr. Top. Pathol. 59, 131-179
- 64) Meier-Ruge, W. (1982)
Morphological diagnosis, 62-71
in: Holschneider, A.M.: Hirschsprung`s Disease
1. Aufl., Hippokrates, Stuttgart, Thieme-Stratton, Inc., New York
- 65) Meier-Ruge, W. (1991)
Zur Klassifikation der kolorektalen Innervationsstörungen
Verh. Dtsch. Ges. Path. 75, 384-385
- 66) Meier-Ruge, W., Bronnimann, P.B., Gambazzi, F., Schmid, P.C., Schmidt, C.P.,
Stoss, F. (1995)
Histopathological criteria for intestinal neuronal dysplasia of the submucosal plexus (type B)
Virchows Arch. 426, 549-556
- 67) Meier-Ruge, W., Brunner, L.A., Engert, J., Heminghaus, M., Holschneider, A., M.,
Jordan, P., Picket, G., Posselt, H.G., Schärli, A. (1999)
A correlative morphometric and clinical investigation of hypoganglionosis of the colon in children
Eur. J. Pediatr. Surg. 9, 67-74
- 68) Meier-Ruge, W., Gambazzi, R.E., Käufeler, P., Schmidt, C.P. (1994)
The neuropathological diagnosis of neuronal intestinal dysplasia (NID B)
Eur. J. Pediatr. Surg. 4, 267-273
- 69) Meier-Ruge, W., Lutterbeck, P.M., Herzog, B., Morger, R., Moser, R., Schärli, A. (1972)
Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung`s disease
J. Pediatr. Surg. 7, 11-17

- 70) Miura, H., Ohi, R., Tseng, S.W., Takahashi, T. (1996)
The structure of the transitional and aganglionic zones of Auerbach`s plexus in patients with Hirschsprung`s disease: a computer-assisted three-dimensional reconstruction study
J. Pediatr. Surg. 31, 420-426
- 71) Moore, S.W., Laing, D., Kaschula, R.O., Cywes, S. (1994)
A histopathological grading system for the evaluation of co-existing NID with Hirschsprung`s disease
Eur. J. Pediatr. Surg. 4, 293-297
- 72) Moore, S.W., Millar, A.J., Cywes; S. (1994)
Long-term clinical, manometric, and histological evaluation of obstructive symptoms in the postoperative Hirschsprung`s patient
J. Pediatr. Surg. 29, 106-111
- 73) Munakata, K., Okabe, I., Morita, K. (1992)
Hypoganglionosis
Pediatr. Surg. Int. 7, 8-11
- 74) Munakata, K., Tomita, R., Kurosu, Y. (1997)
Preliminary immunohistochemical new findings in the myenteric plexus of patients with intestinal neuronal dysplasia type B
Eur. J. Pediatr. Surg. 7, 21-29
- 75) Nixon, H.H. (1982)
Hirschsprung`s disease in the Newborn, 103-113
in: Holschneider, A.M.: Hirschsprung`s Disease
1. Aufl., Hippokrates, Stuttgart, Thieme-Stratton, Inc., New York
- 76) Obata, K., Kojima, N., Nishiye, H., Inoue, H., Shirao, T., Fujita, S.C., Uchizono, K. (1987)
Four synaptic vesicle-specific proteins: identifikation by monoklonal antibodies and distribution in the nervous tissue and the adrenal medulla
Brain Res. 404, 169-179
- 77) Okamoto, E., Iwasaki, T., Kakutani, T., Ueda, T. (1967)
Selective destruction of the myenteric plexus: ist relation to Hirschsprung`s disease, achalasia of the oesophagus and hypertrophic pyloric stenosis
J. Pediatr. Surg. 2, 444-454
- 78) Okamoto, E., Ueda, T. (1967)
Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and it`s relation to Hirschsprung`s disease, achalasia of the oesophagus and hypertrophic pyloric stenosis
J. Pediatr. Surg. 2, 437-443
- 79) Parikh, D.H., Tam, P.K., Van-Velzen, D., Edgar, D.H. (1994)
The extracellular matrix components, tenascin and fibronectin, in Hirschsprung`s disease: an immunohistochemical study
J. Pediatr. Surg. 29, 1302-1306
- 80) Park, W.H., Choi, S.O., Kwon, K.Y., Chang, E.S. (1992)
Acetylcholinesterase histochemistry of rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung`s disease
J. Korean. Med. Sci. 7, 353-359

- 81) Patt, S.; Stoltenburg-Didinger, G. (1992)
Immunohistochemische Untersuchungen mit Synaptophysin an Darmbiopsien bei Morbus Hirschsprung
Zentralbl. Pathol. 138, 325-329
- 82) Puri, P., Fujimoto, T. (1988)
Diagnosis of allied functional bowel disorders using monoclonal antibodies and electronmicroscopy
J. Pediatr. Surg. 23, 546-554
- 83) Puri, P., Ohshiro, K., Wester, T. (1998)
Hirschsprung's disease: a search for etiology
Semin. Pediatr. Surg. 7, 140-147
- 84) Rauber, A., Kopsch, F.
hrsg. und bearb.: Leonhardt, H., Tillmann, B., Töndury, G., Zilles, K. (1987)
Verdauungssystem, Bauchraum - Intramurales Nervensystem, 358-360
in: Anatomie des Menschen II: Innere Organe
20. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York
- 85) Redecker, P., Grube, D. (1992)
Synaptophysin in the nervous system and endocrine cells
Acta Histochem. Suppl. 42, 33-38
- 86) Rehbein, F., Booss, D. (1982)
Surgical treatment of Hirschsprung's disease:
Rehbein's procedure (deep anterior resection), 189-195
in: Holschneider, A.M.: Hirschsprung's Disease
1. Aufl., Hippokrates, Stuttgart, Thieme-Stratton, Inc., New York
- 87) Reyna, T.M. (1994)
Familial Hirschsprung's disease: a study of a Texas cohort
Pediatrics 94, 347-349
- 88) Romanska, H.M., Bishop, A.E., Brereton, R.J., Spitz, L., Polak, J.M. (1993)
Immunocytochemistry for neuronal markers shows deficiencies in conventional histology
in the treatment of Hirschsprung's disease
J. Pediatr. Surg. 28, 1059-1062
- 89) Ryan, D.P. (1995)
Neuronal intestinal dysplasia
Semin. Pediatr. Surg. 4, 22-25
- 90) Sall, J., Lehman, A. (1996)
JMP Start Statistics - A guide to statistical and data analysis using JMP® and
JMP IN® software
Duxbury, London
- 91) Sancandi, M., Ceccherini, I., Costa, M., Fava, M., Chen, B., Wu, Y., Hofstra, R., Laurie, T., Griffiths, M., Burge, D., Tam, P.K. (2000)
Incidence of RET mutations in patients with hirschsprung's disease
J. Pediatr. Surg. 35, 139-142

- 92) Scallen, C., Puri, P., Reen, D.J. (1985)
Identifikation of rectal ganglion cells using monoklonal antibodies
J. Pediatr. Surg. 20, 37-40
- 93) Schärli, A. (1982)
Pathophysiology of Hirschsprung`s disease, 23-40
in: Holschneider, A.M.: Hirschsprung`s Disease
1. Aufl., Hippokrates, Stuttgart, Thieme-Stratton, Inc., New York
- 94) Schärli, A., Meier-Ruge, W. (1981)
Localized and disseminated forms of neuronal intestinal dysplasia mimicking
Hirschsprung`s disease
J. Pediatr. Surg. 16, 164-170
- 95) Schmittenbecher, P.P., Sacher, P., Cholewa, D., Haberlik, A., Menardi, G., Moczulski, J.,
Rumlova, E., Schuppert, W., Ure, B. (1999)
Hirschsprung`s disease and intestinal neuronal dysplasia - a frequent association with
implications for the postoperative course
Pediatr. Surg. Int. 15, 553-558
- 96) Schmittenbecher, P.P., Schmidt, A., Meier-Ruge, W., Wiebecke, B. (1995)
Rectal suction biopsy: can it be sufficient to diagnose neuronal intestinal dysplasia?
Eur. J. Pediatr. Surg. 5, 277-279
- 97) Schnauffer, L., Talbert, J.L., Haller, J.A., Reid, N.C., Tobon, F. (1967)
Differential sphincteric studies in the diagnosis of anorectal disorders of childhood
J. Pediatr. Surg. 2, 538-543
- 98) Schuster, M. (1982)
Normal colonic development and physiology, 7-22
in: Holschneider, A.M.: Hirschsprung`s disease
1. Aufl., Hippokrates, Stuttgart, Thieme-Stratton, Inc., New York
- 99) Simpser, E., Kahn, E., Kenigsberg, K., Duffy, L., Markowitz, J., Daum, F. (1991)
Neuronal intestinal dysplasia: quantitative diagnostic criteria and clinical management
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 12, 61-64
- 100) Soave, F. (1982)
Surgical treatment of Hirschsprung`s disease
Soave`s extramucosal endorectal pull-through procedure, 175-185
in: Holschneider, A.M.: Hirschsprung`s Disease
1. Aufl., Hippokrates, Stuttgart, Thieme-Stratton, Inc., New York
- 101) Sullivan, P.B. (1996)
Hirschsprung`s disease
Arch. Dis. Childh. 74, 5-7
- 102) Swenson, O. (1982)
Surgical treatment of Hirschsprung`s disease
Swenson`s procedure, 155-161
in: Holschneider, A.M.: Hirschsprung`s Disease
1. Aufl., Hippokrates, Stuttgart, Thieme-Stratton, Inc., New York

- 103) Swenson, O. (1996)
Early history of the therapy of Hirschsprung`s disease: Facts and personal observations over 50 years
J. Pediatr. Surg. 31, 1003-1008
- 104) Swenson, O., Bill, A.H. (1948)
Resection of rectum and rectosigmoid with preservation of the sphinkter for benign lesions producing megacolon
Surgery 24, 212-220
- 105) Swenson, O., Neuhauser, E.B.D., Pickett, L.K. (1949)
New concepts of the etiology, diagnosis and treatment of congenital megacolon (Hirschsprung`s disease)
Pediatrics 2, 201-209
- 106) Szavay, P., Schweizer, P., Leriche, C. (1994)
Value of a score in the electromanometrical diagnosis of neuronal intestinal dysplasia
Eur. J. Pediatr. Surg. 4, 315-317
- 107) Tam, P.K., Boyd, G.P. (1990)
Origin, course, and endings of abnormal enteric nerve fibres in Hirschsprung`s disease defined by whole-mount immunohistochemistry
J. Pediatr. Surg. 25, 457-461
- 108) Tam, P.K., Gould, S.J., Martucciello, G., Biddolph, S., Takahashi, M., Jasonni, V. (1996)
Ret protein in the human fetal rectum
J. Pediatr. Surg. 31,568-571
- 109) Tittel, K. (1901)
Über eine angeborene Mißbildung des Dickdarmes
Wien. Klin. Wschr. 14, 903-907
- 110) Trampisch, H.J., Windeler, J. (1997)
Medizinische Statistik
Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- 111) Treves, F. (1898)
Idiopathic dilatation of the colon
Lancet 1, 276-279
- 112) Webster, W. (1973)
Embryogenesis of the enteric ganglia in normal mice and mice that develop congenital aganglionic megacolon
J. Embryol. Exp. Morphol. 30, 573-585
- 113) Wedel, T., Holschneider, A.M., Krammer, H.J. (1999)
Ultrastructural features of nerve fascicles and basal lamina abnormalities in Hirschsprung`s disease
Eur. J. Pediatr. Surg. 9, 75-82
- 114) Wedel, T., Roblick, U., Gleiss, J., Ott, V., Eggers, R., Kuhnel, W., Krammer, H.J. (1999)
Intestinale Innervationsstörungen als mögliche Ursache der chronischen Obstipation
Zentralbl. Chir. 124, 796-803

- 115) Wester, T., Olsson, Y., Olsen, L. (1999)
Expression of bcl-2 in enteric neurons in normal human bowel and Hirschsprung`s disease
Arch. Pathol. Lab. Med. 123, 1264-1268
- 116) Whitehouse, F., Kernohan, J.W. (1948)
Myenteric plexus in congenital megacolon
Arch. Intern. Med. 82, 75-111
- 117) Yamataka, A., Miyano, T., Okazaki, T., Nishiye, H. (1992)
Correlation between extrinsic nerve fibers and synapses in the muscle layers of bowels affected by Hirschsprung`s disease
J. Pediatr. Surg. 27, 1213-1216
- 118) Yamataka, A., Miyano, T., Urao, M., Nishiye, H. (1992)
Hirschsprung`s disease: diagnosis using monoclonal antibody 171B5
J. Pediatr. Surg. 27, 820-822
- 119) Yamataka, A., Miyano, T., Urao, M., Okazaki, T. (1993)
Distribution of neuromuscular junctions in the bowel affected by hypoganglionosis
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 16, 165-167
- 120) Yamataka, A., Nagaoka, I., Miyano, T., Yanai, T., Fujimoto, T. (1995)
Quantitative analysis of neuronal innervation in the aganglionic bowel of patients with Hirschsprung`s disease
J. Pediatr. Surg. 30, 260-263
- 121) Yamataka, A., Ohshiro, K., Kobayashi, H., Fujiwara, T., Sunagawa, M., Miyano, T. (1997)
Intestinal pacemaker C-KIT+ cells and synapses in allied Hirschsprung`s disorders
J. Pediatr. Surg. 32, 1069-1074
- 122) Yanai, T., Yamataka, A., Nagaoka, I., Fujimoto, T., Nishiye, H., Yamashita, T., Miyano, T. (1995)
Quantitative analysis of synaptic vesicle proteins in the aganglionic colon in rats with congenital aganglionosis (letter)
J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 20, 239-240
- 123) Zhan, J., Xiu, Y., Gu, J., Fang, Z., Hu, X.L. (1999)
Expression of RET proto-oncogene and GDNF deficit in Hirschsprung`s disease
J. Pediatr. Surg. 34, 1606-1609
- 124) Zuelzer, W.W., Wilson, J.L. (1948)
Functional intestinal obstruction on a congenital neurogenic basis in infancy
Am. J. Dis. Childh. 75, 40-64

Allen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Mein Dank gilt **Herrn Professor Dr. med. P. Schweizer** für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung bei der Bearbeitung.

Bei **Herrn Professor Dr. med. R. Meyermann** möchte ich mich für die Unterstützung im Bereich der Immunhistochemie bedanken.

Frau Patrizia Marini danke ich besonders für die Einführung in die Arbeitsmethoden und die Betreuung in der ersten Phase.

Von der Abteilung für Kinderchirurgie bedanke ich mich bei **Frau Dr. med. S. Schwarz** für die Zusammenarbeit bei der Bereitstellung geeigneten Untersuchungsmaterials.

Für die hilfreiche Unterstützung und wertvolle Tipps bei der Arbeit am Institut für Hirnforschung danke ich **Frau B. Frank sowie den übrigen Mitarbeitern** des Labors.

Besonders möchte ich mich bei **Frau E. Schröter** aus dem Forschungsbereich Allgemeine Chirurgie, Waldhörnlestraße 22, für die geduldige Einführung in das digitale Bildanalysesystem Quantimet 600 bedanken.

Herrn Dr. M. Eichner danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ganz besonderer Dank gilt **meiner Mutter und meinem Vater**, die meine Ausbildung ermöglicht haben und ihrer Hilfe, sei es durch geduldiges Zuhören und aufmunternde Worte oder anderweitige Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Ulrike Thuselt

Geburtsdatum: 21.09.1971

Geburtsort: Leipzig

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1978 – 1985 Helmholtz-Schule in Leipzig

1986 Alexander-von-Humboldt-Gesamtschule (Gymnasialzweig)
in Viernheim

1986 – 1992 Theodor-Heuss-Gymnasium in Pforzheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/1992 – 05/1999 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen

08/1994 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

04/1998 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

04/1998 – 05/1999 Praktisches Jahr am Kreiskrankenhaus Reutlingen und an
der Universitäts-Augenklinik Tübingen

04.05.99 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

01.06.00 - 30.11.01 Ärztin im Praktikum, Bürgerhospital Stuttgart, Klinik für
Psychiatrie und Psychotherapie

seit 01.12.01 Assistenzärztin am Bürgerhospital Stuttgart, Klinik für
Psychiatrie und Psychotherapie