Aus der Klinik für Kinderchirurgie
der Universität zu Lübeck
Komm. Direktor: PD Dr. med. L. Wünsch

Immunhistologische und *in-vitro* Kontraktilitäts-Untersuchungen des Dünndarms bei Kindern mit chronisch intestinaler Pseudoobstruktion (CIPO)

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Sonja Schmidt
aus Hamburg

Lübeck, 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Lucas Wessel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Göpel

Tag der mündlichen Prüfung: ….....17.03.2010

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den.....17.03.2010

gezeichnet: Prof. Dr. med. Werner Solbach
-Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen 5
Einleitung 6
Die chronisch intestinale Pseudoobstruktion 6
Definition 6
Symptomatik und Prognose 6
Bakterielle Fehlbesiedlung bei der CIPO 8
Parenterale Ernährung bei der CIPO 8
Therapeutische Optionen der CIPO 9
Ätiologie der CIPO 10
Das enterische Nervensystem 12
Die Organbadtechnik als *in-vitro* Funktionsuntersuchung des Dünndarms 14
Fragestellungen 15
Patienten, Material und Methoden 16
Patienten 16
Kontrollpatienten 16
CIPO-Patienten 17
Material und Methoden 20
Histologische Untersuchungen 20
Aufarbeitung und Fixierung der Präparate 20
Konventionelle Histologie 21
Immunhistologie 21
Fotodokumentation und Morphometrie 22
Immunhistologische Marker 23
Glattmuskuläre Marker 23
Neuronale Marker 23
Marker für interstitielle Cajal-Zellen 24
In-vitro Untersuchung der glattmuskulären Kontraktilität 26
Erstellen der Muskelstreifenpräparate 26
Versuchsablauf 28
Statistische Auswertung 31
Ergebnisse 32
Histologie 32
Konventionelle Histologie 32

Immunhistologie 33
Glattmuskuläre Marker 33
Neuronale Marker 35
Interstitielle Cajal-Zellen 39

Ergebnisse der glattmuskulären Kontraktilitätsmessung 42
Spontanaktivität 43
Cholinerge Stimulation mittels Acetylcholin 45
Pharmakologische Zusätze 48
Elektrische Feldstimulation 52
Diskussion 56
Die CIPO und ihre Diagnostik 56
Diskussion der einzelnen Patienten 59
Diskussion der Methodik 64
Histologie 65
Organbadtechnik 67
Diskussion der Ergebnisse 69
Richtungsweisende Befunde der Immunhistologie 69
Richtungsweisende Befunde der Organbadtechnik 72
Zusammenfassung 75
Literaturverzeichnis 77
Anhang 88
Übersicht der verwendeten Antikörper 89
Immunhistologie-Färbeprotokoll OHNE Antigen-Retrieval 90
Immunhistologie-Färbeprotokoll MIT Antigen Retrieval 91
Organbad-Versuchsprotokoll 92

Ethikantrag 93
Lebenslauf 94
Danksagung 96

Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
AEC	Aminoethylcarbazol (Chromogen rot)
BFD	bakterielle Fehlbesiedlung des Darmes
BGA	Blutgasanalyse
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CIPO	chronisch intestinale Pseudoobstruktion
DAB	Diaminobenzidin (Chromogen braun)
DWL	Darmwandlänge
EFS	elektrische Feldstimulation
ENS	enterisches Nervensystem
GIT	Gastrointestinaltrakt
HDAC 8	Histone-Deacetylase 8
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICC	interstitielle Cajal-Zellen
ICC-DPM	interstitielle Cajal-Zellen, sog. „deep muscular plexus“
ICC-IM	interstitielle Cajal-Zellen intramuskulär
ICC-MY	interstitielle Cajal-Zellen des Plexus myentericus
IND	intestinale neuronale Dysplasie
KCl	Kaliumchlorid
L-NNA	N-Nitro-L-Arginin
MMC	Migrating Motor Complex
MMHS	Megazystis-Mikrokolon-Hypoperistalsis-Syndrom
NaCl	Natriumchlorid
NANC	non-adrenerg non-cholinerg
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NMGID	neuromuscular gastrointestinal disorder
NO	Stickstoffmonooxyd
NSE	neuron-spezifische Enolase
NZ	Nervenzelle
PCO	primär chronische Obstipation
PGP 9.5	Protein Gene Product 9.5
SMA	smooth muscle actin
SMMHC	smooth muscle myosin heavy chain
TBS	Tris-Buffer-System
ZNS	zentrales Nervensystem

Einleitung

Die chronisch intestinale Pseudoobstruktion

Definition

Bei der chronisch intestinalen Pseudoobstruktion (CIPO) im Kindesalter handelt es sich um eine seltene, angeborene Motilitätsstörung des Darmes, ohne dass ein erkennbares mechanisches Hindernis vorliegt.

Symptomatik und Prognose

Bei den Kindern mit CIPO entwickelt sich durch die angeborene Motilitätsstörung des Darmes eine Hypomotilität, welche zu einer chronischen Subileussituation führt. Klinisch fallen die Kinder durch eine abdominelle Distension, Schmerzen, Erbrechen, Gedeihstörung und therapieresistente Obstipation auf. Hierbei ist der Krankheitsverlauf umso dramatischer, je jünger die Kinder bei Erstmanifestation sind. In der Neonatalperiode ist unter Umständen bereits der Mekoniumabgang verzögert oder nur durch mechanische Manipulationen möglich. Einige Kinder präsentieren schon in den ersten Lebensstunden das klinische Bild eines akuten Abdomens. Da hier differentialdiagnostisch an einen Volvulus, eine Darmatresie oder einen Mekoniumileus anderer Ursache zu denken ist, erscheint die rasche Durchführung einer Laparotomie gerechtfertigt. Aber auch bei späterem Manifestationsbeginn oder im weiteren Verlauf der Erkrankung ist die abdominelle Symptomatik durch die Hypomotilität des Darmes geprägt und zeigt chronische bis subakute Ileussituationen mit entsprechenden Symptomen (Faure et al., 1999) (Abbildung 1).

Die angeborene CIPO des Kindesalters ist sehr selten im Gegensatz zur erworbenen CIPO des Erwachsenenalters, wie z.B. im Rahmen eines Diabetes mellitus. In den USA wird von ca. 100 Neuerkrankungen jährlich berichtet (Di Lorenzo, 1999). Zahlen zur Inzidenz im deutschsprachigen Raum liegen nicht vor. Man schätzt jedoch, dass ca. 16 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland

auftreten. In ca. 5 % der Fälle scheint eine familiäre Häufung mit Erkrankung von Geschwistern oder einer milden Erkrankungsform anderer Familienmitglieder zu bestehen (Mousa et al., 2002). Außerdem wurden verschiedene autosomal dominante, autosomal rezessive und X-chromosomale Mutationen gefunden, die mit dem Krankheitsbild in Verbindung gebracht werden (De Giorgio et al., 2001; Gargiulo et al., 2007; Deglincerti et al., 2007). Durch die Ernährung mit Muttermilch und anderer faserarmer Kost bei Kindern mit Verdacht auf CIPO können erste Anzeichen der Erkrankung hinausgezögert, bzw. der Verlauf günstig beeinflusst werden (Wess et al., 1996).

Abbildung 1:
4 jährige Patientin mit CIPO: charakteristische abdominelle Distension, dystrophe Extremitäten, Ileostoma im rechten Unterbauch, zentraler Venenkatheter für die parenterale Ernährung (rosa umwickelt)

Klinische Probleme entstehen vor allem durch die häufig bestehende chronische bakterielle Fehlbesiedlung des Darmes und die bekannten Komplikationen der teils notwendigen parenteralen Ernährung wie rezidivierende Katheter-Infektionen und Leberinsuffizienz. Zusätzlich sind Assoziationen mit weiteren Fehlbildungen insbesondere anderer glattmuskulärer Organsysteme bekannt.
Die CIPO zeigt somit eine hohe Co-Morbidität und Letalität und ist trotz der Seltenheit der Erkrankung eine der häufigsten Ursachen für die chronische

intestinale Insuffizienz im Kindesalter (Di Lorenzo, 1999; Stanghellini et al., 2007). Die Letalität der CIPO beträgt je nach Literaturangabe zwischen 10% und 26% der erfassten Patienten (Faure et al., 1999; Heneyke et al., 1999; Mousa et al., 2002). Hierbei dürfte die tatsächliche Letalität bei Erreichen der Volljährigkeit aber deutlich höher sein, da die meisten Patienten weniger als 18 Jahre in Follow-up-Studien erfasst werden. Insgesamt ist jedoch nicht nur die Lebenserwartung, sondern auch die bis dahin erlebte Lebensqualität deutlich eingeschränkt (Schwankovsky et al., 2002).

Bakterielle Fehlbesiedlung bei der CIPO

In den hypomotilen Darmabschnitten der CIPO-Patienten entwickelt sich eine pathologische Dilatation. Die daraus entstehende Stase fördert die bakterielle Fehlbesiedelung des Dünndarms (BFD) mit konsekutiver chronischer Enteritis, Störung der Blut-Darm-Schranke und Beeinträchtigung der Resorptionskapazität des Darmes. Klinisch manifestiert sich die BFD in einer weiteren Progredienz der schon schweren Symptomatik und Gedeihstörung. Durch die enterale Einnahme von nicht resorbierbaren Antibiotika kann die BFD im Darmlumen teilweise reduziert werden; suffizient zu beherrschen ist sie dadurch jedoch nicht (Vanderhoof, 2004). Die BFD verursacht zudem selbst wiederum eine intestinale Motilitätsstörung, so dass ein Circulus vitiosus einsetzen kann (Husebye et al., 2001). Eine der gefürchteten Komplikationen der CIPO ist daher, dass die Kinder an einer generalisierten Infektion durch eine bakterielle Translokation vom Darmlumen in die Blutbahn versterben.

Parenterale Ernährung bei der CIPO

Die Einschränkung der Propulsivität des Darmes ist oftmals derart gravierend, dass die Kinder enteral nicht ausreichend ernährbar sind. Aufgrund der zunehmenden Dystrophie und Wachstumsretardierung benötigen 62% der Patienten im Laufe ihres Lebens eine teil- oder totalparenterale Ernährung über einen permanenten zentralvenösen Zugang (Mousa et al., 2002).

Bekannte Komplikationen der parenteralen Ernährung sind zum einen wiederholte Katheterinfektionen mit systemischer Bakteriämie oder Sepsis und cholestatische

Hepatopathien mit konsekutiver Leberfibrose und nachfolgender Leberinsuffizienz. Die Ursache der Hepatopathie ist multifaktoriell (Cavicchi et al., 2000). Neben Bestandteilen der Infusionslösung (Lipidemulsion und Weichmacher aus den Infusionsschläuchen) spielen akute und chronische Infektionen eine Rolle (Bindl et al., 2000, Loff et al., 2000, Cavicchi et al., 1998). Außerdem führen systemische Infektionen, wie z.B. die oben erwähnten bakteriellen Translokationen aus dem Darmlumen, zu einer Zunahme der Leberschädigung (Kubota et al., 2000). Die Toxine der intestinalen Bakterien gelangen über den Pfortaderkreislauf in die Leber und können dort Entzündungsreaktionen auslösen, die die Hepatopathie unterhalten (Trauner et al., 1999). Histologisch findet sich neben der Cholestase ein entzündliches Infiltrat und eine ausgeprägte Fibrosierung (Teitelbaum, 1997).

Therapeutische Optionen der CIPO

Eine kausale Therapie der CIPO ist derzeit nicht möglich. Es steht die symptomatische Therapie im Vordergrund, die hauptsächlich in einer faserarmen Ernährung der Kinder und der Entlastung des dilatierten Darmes besteht. Ca. 68% der Kinder werden im Laufe des ersten Lebensjahres operiert. Dabei steht die Anlage eines oder mehrerer Stomata zur Darmentlastung bei 55% der Patienten im Vordergrund (Faure et al., 1998). Da die Dünndarmsekretion ungestört ist, aber das Sekret aufgrund der Hypomotilität nicht in ausreichendem Maße an die vorhandene Resorptionsfläche transportiert wird, ist die tatsächlich resorbierte Sekretmenge deutlich vermindert. Ist jedoch eine Entleerung des Darminhaltes gewährleistet, kann sich ein dilatierter Darm ggf. wieder tonisieren und eine langsame erneute Motilität aufbauen. Durch die Anlage von Dünndarmstomata ist die Entleerung der Darmschlingen mit Kathetern möglich. Um große Flüssigkeitsverluste mit entsprechenden Elektrolytimbalanzen zu minimieren und eine optimale Resorption zu ermöglichen, kann bei den Kindern der über das orale Stoma aspirierte Stuhl in den distalen Schenkel umgefüllt werden. Hierdurch können die Atrophie der Dünndarmzotten und die Hepatopathie unter Umständen hinausgezögert werden. Das Umfüllen des Stuhles bietet sich insbesondere bei Kindern mit mehreren Stomata an, weil so möglichst viele Dünndarmabschnitte erreicht werden. Da die Resorptionsleistung von Nährstoffen im Dünndarm einen bedeutenderen Anteil als

die Flüssigkeitsresorption des Kolons hat, kann die partielle oder totale Kolektomie eine weitere therapeutische Option sein.

Im Verlauf der Erkrankung besteht die Hoffnung Stomata, nach einigen Jahren zurückverlegen zu können, da der Energiebedarf pro Kilogramm Körpergewicht im Laufe der kindlichen Entwicklung abnimmt und zum anderen Hinweise darauf bestehen, dass die Entwicklung des enterischen Nervensystems nicht mit der Geburt abgeschlossen ist (Sri Paran et al., 2006; Faussone-Pellegrini, 2008; Matini et al., 1997).

Bei zunehmender Hepatopathie und/oder irreversibler intestinaler Insuffizienz kann die Dünndarm- bzw. Multiorgantransplantation als letzte therapeutische Option in Erwägung gezogen werden. Die technischen Möglichkeiten und das Verständnis um das Immunsystem des Darmes haben sich deutlich verbessert, dennoch sprechen die Langzeitergebnisse nach Transplantation auch im Kindesalter von einer 5-Jahres-Überlebensrate von derzeit lediglich 50% (Loinaz et al., 2005).

Leider bedeutet jeder operative Eingriff auch eine weitere beeinträchtigende Belastung für die ohnehin geschädigte Darmfunktion, so dass jede dieser oben angeführten Optionen einer sehr kritischen Indikationsprüfung unterzogen werden muss. Zusätzlich kann sich jede Laparotomie prognostisch ungünstig auf die spätere intestinale Autonomie auswirken, weshalb die Möglichkeiten zur Probengewinnung für eine weiterführende Diagnostik deutlich eingeschränkt sind.

Ätiologie der CIPO

Die Ätiologie des Krankheitsbildes ist weitgehend ungeklärt. Zwei Unterformen wurden bisher differenziert: Bei der myogenen Form der CIPO handelt es sich vorrangig um eine Erkrankung der glatten Muskelzellen, bei der neurogenen Form um eine Dysfunktion der enterischen Nervenzellen. Assoziationen mit anderen Fehlbildungen wie Malrotation des Darmes oder Uropathien sind sowohl bei der neurogenen als auch der myogenen Form der CIPO bekannt. Diese Assoziationen kommen bei der myogenen Form deutlich häufiger vor als bei der neurogenen CIPO und beeinflussen somit Morbidität und Mortalität. Urologische Erkrankungen treten insgesamt bei 30-40% der CIPO-Patienten auf (Faure et al. 1999, Mousa et al., 2002). Andere Autoren sprechen hingegen von der Ausbildung einer Megazystis in

96% der Fälle (Lapointe et al., 2002). In der Tat stehen vor allem Blasenentleerungsstörungen mit Ausbildung einer Megazystis und ggf. konsekutivem vesico-uretero-renalen Reflux im Vordergrund. Seltener bilden sich Konkremente, wie z.B. Blasensteine, wenn es aufgrund der Hypomotilität im Urogenitaltrakt zu einer chronischen Infektsituation kommt (Wendt-Nordahl et al., 2006). Das Megazystis-Mikrokolon-Hypoperistalsis-Syndrom (MMHS) fällt ebenfalls als Sonderform in die Entität CIPO, da auch hier eine ausgeprägte Hypomotilität der glattmuskulären Organsysteme besteht (Annerén et al., 1991; Masetti et al., 1999).

Anhand manometrischer Untersuchungen der antroduodenalen Motilität mit Hilfe intraluminal platzierter Sonden wurden ebenfalls myogene und neurogene Störungen beschrieben (Cucchiara et al., 1994). Es wurden, je nach Form der Störung, eine verminderte spontane Aktivität mit niedriger Amplitude bei der myogenen CIPO oder gestörte Motilitätsmuster bei der neurogenen CIPO beschrieben. In-vivo Untersuchungen sind allerdings mit dem Nachteil nicht standardisierter Messmethoden, ungenauer Differenzierung der veränderten Motilitätsmuster und begrenzter Vergleichbarkeit verbunden.

In anderen Studien wurden wiederum histologische Differenzierungen zwischen muskulären und neuronalen Ursachen der Erkrankung vorgenommen. Hierbei sind die Zahlen zur Verteilung der beiden Formen in der Literatur jedoch sehr unterschiedlich. Leider zeigten sowohl konventionelle histologische als auch immunhistochemische Untersuchungen glattmuskulärer und neuronaler Strukturen keine pathognomonischen Veränderungen. Häufig wurden entweder Normalbefunde oder nur unspezifische diskrete Veränderungen bei Anfärbungen der Muskulatur oder der enterischen Ganglien erhoben. Neuere Veröffentlichungen sprechen zusätzlich von einer mesenchymalen Form mit Auffälligkeiten im Verteilungsmuster der interstitiellen Cajal-Zellen (Isozaki et al., 1997; Huizinga et al., 1997; Feldstein et al., 2003; Struijs et al., 2008).

Voraussetzungen für eine normale Darmmotilität sind zum einen die normale Anlage und Funktion der intestinalen Muskelzellen sowie die Innervation der Muskulatur durch das enterische Nervensystem inklusive der intestinalen Schrittmacher. Für das Verständnis der Motilität des Dünndarmes spielt daher das enterische Nervensystem eine entscheidende Rolle.

Das enterische Nervensystem

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) verfügt über ein ausgedehntes und komplexes intramurales Nervensystem, das enterische Nervensystem (ENS). Zum ENS gehören alle neuronalen und glialen Elemente innerhalb des Gastrointestinaltraktes, in der Gallenblase, in den extrahepatischen Gallenwegen sowie des Pankreas (Costa et al., 1987). Es koordiniert und kontrolliert wesentliche gastrointestinale Funktionen wie Motilität, Resorption und Sekretion (Surprenant, 1994). Das ENS stellt die größte Ansammlung von Nervenzellen außerhalb des Zentralnervensystems (ZNS) dar und agiert als intrinsisches System weitgehend unabhängig von übergeordneten nervalen Zentren. Diese Eigenschaften rechtfertigen die Abgrenzung des ENS als eigenständigen Teil des autonomen Nervensystems im Sinne eines “brain within the gut“ (Wood, 1987). Die Gesamtanzahl der im GIT befindlichen Nervenzellen wird auf etwa 150 Millionen beziffert und ist damit der Anzahl der Rückenmarksneurone vergleichbar (Furness und Costa, 1987). Diesem hohen intramuralen Nervenzellgehalt steht eine relativ geringe Anzahl von circa 2000 efferenten Fasern des Nervus vagus gegenüber (Hoffmann und Schnitzlein, 1969). Deshalb wird trotz einer möglichen divergenten nervalen Versorgung eine sinnvolle, allein zentral gesteuerte Koordinierung der Darmfunktionen bezweifelt und das Konzept einer relativen Unabhängigkeit des ENS propagiert (Gershon, 1981).

Kleinste Baueinheiten des ENS sind die enterischen Nervenzellen als eigentliche erregungsleitende Strukturen sowie die enterischen Gliazellen mit Nähr-, Stütz-, und motilitätsmodulierenden Funktionen (Bassotti et al., 2007). Beide Zellpopulationen gruppieren sich zu Ganglien, die durch interganglionäre Nervenfaserstränge verbunden sind und flächenhafte Netzwerke, die sog. Plexus, innerhalb der Darmwand bilden. Die intramuralen Plexus befinden sich in verschiedenen Ebenen und zeigen eine für jede Darmwandschicht charakteristische Architektur. Es lassen sich bei allen Säugetieren in zwei Etagen der Darmwand ganglionäre Plexus nachweisen (Abbildung 2).

Der Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) befindet sich in der Tunica muscularis zwischen Längs- und Ringmuskelschicht. Der Plexus submucosus durchzieht die Tela submucosa und lässt sich wiederum in drei verschiedene Schichten

unterteilen: Plexus submucosus internus (Meissner-Plexus), Plexus submucosus externus (Schabadasch-Plexus) und Plexus extremus.

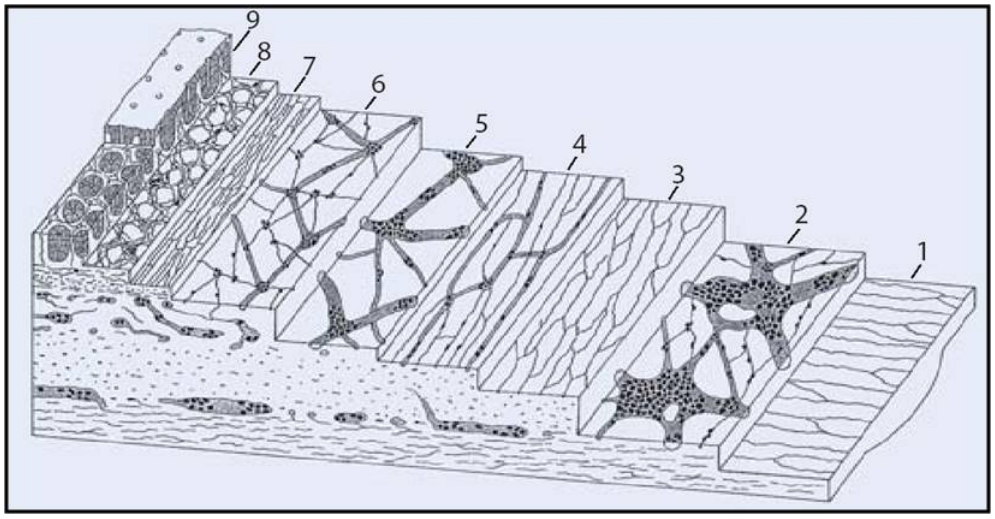


Abbildung 2:
Die 9 Nervenplexus der humanen Darmwand (nach Wedel et al., 2000):
1-3: Plexus der Muskelschicht
4-6: Plexus der Submucosa
7-9: Plexus der Mucosa

1: Plexus der Längsmuskulatur
2: Plexus myentericus (Auerbach)
3: Plexus der Ringmuskulatur
4: Plexus submucosus extremus
5: Plexus submucosus externus (Schabadasch)
6: Plexus submucosus internus (Meissner)
7: Plexus der muscularis mucosae
8: Plexus subglandularis
9: Plexus periglandularis

Zusätzlich befinden sich in der Darmwand die interstitiellen Cajal-Zellen (interstitial cells of Cajal, ICC), die wie die Muskelzellen aus mesenchymalem Gewebe entstammen und eine Vermittlerfunktion zwischen den Nervenzellfortsätzen der enterischen Plexus und dem Erfolgsorgan Muskelzelle übernehmen (Hirst und Ward, 2003). Auch die ICC sind in Form von Plexus angelegt und werden gemäß ihrer Lage in der Darmwand unterschiedlich benannt. Der größte Anteil der ICC legt sich mit seinen Zellkörpern und deren Fortsätzen um den Plexus myentericus und „flankiert“ damit den Plexus nahezu vollständig. Daher wird dieser ICC-Plexus als ICC-MY bezeichnet (Furness, 2006). Die Fortsätze der ICC-MY ragen insbesondere

in die zirkuläre Muskulatur hinein und bilden hier ein Geflecht, das als „deep muscular plexus“ (ICC-DMP) bezeichnet wird. Der ICC-MY ist bereits bei menschlichen Foeten der 17.-20. Schwangerschaftswoche (SSW) nachweisbar, hingegen sich der ICC-DMP als letzter in der 38.-40. SSW differenziert (Faussone-Pellegrini et al., 2007).

Eine der vorrangigen Aufgaben des ENS ist die Generierung und Koordinierung einer regelrechten gastrointestinalen Motilität (Wood, 1987). Der gerichtete Transport des Darminhaltes wird durch rhythmische Kontraktionen der oralen und Dilatationen der aboralen Darmabschnitte ermöglicht. Diese auch als „slow waves“ benannten Kontraktionen werden durch die ICC generiert (Thuneberg, 1982; Suzuki et al., 1986). Während einer Nahrungspause kommt es zum Auftreten eines sog. migrating myoelectric complex (MMC), welcher aus einer gebündelten Abfolge von slow waves entsteht und ca. 8-10 Mal pro Minute den Darm durchläuft. Das Auftreten dieser MMC‘s verursacht eine kräftige peristaltische Welle, die einen Weitertransport des Darminhaltes bewirkt. Den MMC‘s wird eine Reinigungsfunktion zugeschrieben (intestinal housekeeper), die u.a. die bakterielle Fehlbesiedlung verhindert (Hasler, 2003).

Die Organbadtechnik als *in-vitro* Funktionsuntersuchung des Dünndarms

Zur *in-vitro*-Untersuchung der glattmuskulären Kontraktilität, sowohl in der tierexperimentellen als auch humanen Forschung, hat sich die Organbadtechnik gut etabliert (Bär et al., 2009). Damit steht eine neurophysiologische Untersuchungstechnik zur Verfügung, welche die Möglichkeit bietet, Art und Ausmaß der muskulären Kontraktionsleistung standardisiert und reproduzierbar zu erfassen. Durch eine physiologische Nährlösung bleiben die Muskelstreifenpräparate vital und lassen sich über mehrere Stunden untersuchen. Es besteht die Möglichkeit, Muskulatur und enterisches Nervensystem eines beliebigen Darmabschnittes hinsichtlich der jeweiligen Funktion mittels Applikation von Transmittern bzw. deren Antagonisten sowie durch Gabe von direkten Muskelstimulantien bzw. Anwendung einer elektrischen Feldstimulation *in-vitro* zu untersuchen.

Fragestellungen

Insgesamt ist das diagnostische und therapeutische Vorgehen bei Kindern mit CIPO sehr inhomogen, da einheitliche diagnostische Kriterien derzeit nicht vorliegen. In vorangegangenen Studien zur angeborenen CIPO wurde bereits versucht, diagnostische Kriterien anhand histologischer oder manometrischer Untersuchungen zu gewinnen. Ein standardisiert erfassbares und jederzeit reproduzierbares Diagnostikum fehlt jedoch weiterhin. Allerdings erschließen die in den letzten Jahren neu entwickelten histologischen Marker und die Etablierung der Organbadtechnik als *in-vitro* Kontraktilitäts-Untersuchung neue Möglichkeiten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese innovativen histologischen und funktionellen Untersuchungsmethoden für eine verbesserte Diagnostik bei CIPO-Patienten einzusetzen. Im Einzelnen sollten die folgenden Fragestellungen geklärt werden:

- Ist durch spezielle immunhistochemische Marker für nervale und muskuläre Strukturen eine Differenzierung in eine neurogene bzw. myogene Form der CIPO möglich?
- Liegt eine pathologische Verteilung bzw. Anordnung der interstitiellen Cajal-Zellen bei der CIPO vor?
- Lassen sich durch *in-vitro* Untersuchungen der glattmuskulären Aktivität abnorme Kontraktionsmuster bei der CIPO nachweisen und eine Differenzierung in eine neurogene bzw. myogene Form vornehmen?
- Lässt sich die *in-vitro* Untersuchung der glattmuskulären Aktivität als zusätzliches Diagnostikum der CIPO nutzen?

Patienten, Material und Methoden

Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Dünndarmteilresektate von 5 Kindern mit den klinischen Anzeichen einer chronisch intestinalen Pseudoobstruktion untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Dünndarmteilresektate von 10 Erwachsenen ohne nachweisbare intestinale Motilitätsstörung.

Alle Kontrollpatienten und CIPO-Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigte wurden ausführlich über die zusätzlich am Operationspräparat durchgeführten Untersuchungen ärztlich aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. Es wurde betont, dass keine zusätzliche Darmentfernung oder Verlängerung der Operationszeiten hierfür notwendig war oder vorgenommen werden würde.

Die Untersuchungen der Darmanteile wurden durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, mit dem Aktenzeichen 07-116 genehmigt und mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, schriftlich vereinbart.

Kontrollpatienten

Zur Untersuchung der normalen *in-vitro* Kontraktilität und Immunhistologie des Dünndarms dienten Resektate des terminalen Ileums. Diese konnten von 10 Erwachsenen im Rahmen einer Rechtshemikolektomie entnommen werden. Bei den Kontrollpatienten handelte es sich um 5 Männer und 5 Frauen im Alter von 53-84 Jahren (Median 71 Jahre), welche zwischen August 2007 und Juli 2008 operiert wurden. Hierbei lag in 6 Fällen ein Karzinom des Zökums oder des Kolon aszendens und in 4 Fällen eine Adenomatose derselben Region vor. Ausschlusskriterien zur Gewinnung der Präparate waren chronisch entzündliche Darmerkrankungen, lumeneinengende Prozesse des Darmes oder Hinweise auf das Vorliegen einer intestinalen Motilitätsstörung in der Anamnese.

Bei der Probengewinnung wurde grundsätzlich ein Abstand von mind. 5 cm zum krankhaften Prozess und mind. 1 cm zum oralen Resektionsrand eingehalten, um eine uneingeschränkte Beurteilung der Präparate durch das Institut für Pathologie zu gewährleisten. Demzufolge konnten teils flächige Präparate von ca. 2 cm x 4 cm oder aber komplette, zirkuläre Dünndarmrohrabschnitte von einer Länge bis 4 cm gewonnen werden.

CIPO-Patienten

Insgesamt wurde der Dünndarm von 5 Patienten mit den klinischen Anzeichen einer CIPO in der Zeit von Juli 2006 bis Juli 2008 untersucht. Hierbei handelte es sich um 4 Mädchen und einen Jungen. Die Mädchen waren zum Zeitpunkt der Organbaduntersuchung zwischen 2 und 7 10/12 Jahren und der Junge 2 5/12 Jahre alt (Median 4 Jahre). Die Verdachtsdiagnose der CIPO wurde bei drei Kindern bereits innerhalb der ersten Lebenstage gestellt, bei zwei Kindern innerhalb der Säuglingsperiode. Bei allen Patienten sind in anderen Krankenhäusern Untersuchungen zum Ausschluss der Differentialdiagnosen der CIPO gemacht worden, so dass die Überweisung zur Diagnosebestätigung und Therapieoptimierung in unsere Klinik erfolgte.

Allen Kindern gemeinsam war eine starke abdominelle Distension mit ziehenden Schmerzen und rezidivierendem Erbrechen bei zunehmender Darmfüllung. Die Stuhlentleerung war bei keinem Kind spontan möglich und wurde entweder durch die Applikation von Klistieren oder durch bestehende Stomata erreicht.

Eine parenterale Ernährung über einen zentralen Venenkatheter wurde bei 3 Kindern bei Aufnahme durchgeführt, ein weiteres Mädchen benötigte die teilparenterale Ernährung während des stationären Aufenthaltes. 2 der 4 Kinder mit parenteraler Ernährung wiesen erhöhte Leberparameter und eine beginnende portale Hypertension auf. Lediglich der Junge war jederzeit vollständig oral ernährbar. Den Kindern wurde faserarme Kost oral angeboten; die enteral zugeführten und vertragenen Nahrungsmittel schwankten bei den Kindern jedoch zwischen einem Toast oder einem Löffel Nudeln pro Tag bis hin zu normalen Kinder-Portionen. Unter diesen individuell angepassten Ernährungsregimen lagen

die Perzentilen für das Gewicht meist in der Norm. Die Perzentilen für die Länge lagen jedoch im unteren Normbereich oder gar unter der 3. Perzentile.

Um eine Darmentleerung zu verbessern, wurden zwei Kinder erstmalig elektiv laparotomiert und ein Ileostoma angelegt. Bei den übrigen 3 Kindern waren bereits mehrere Operationen (4 - 13, Median 11) sowohl in auswärtigen als auch in unserer Klinik durchgeführt worden (Tabelle 1). Die Organbadtechnik ist seit 2006 in unserer Klinik als Diagnostikum verfügbar, was die Differenz zwischen ersten Symptomen, multiplen Voroperationen und Alter bei Organbaduntersuchung erklärt.

Bei 4 Kindern konnte ausreichend Material für alle Versuchsabschnitte gewonnen werden. Bei einem Kind (Patientin Nr. 5) reichte das entnommene Darmsegment lediglich für die Organbaduntersuchung, sodass keine histologischen Untersuchungen des Dünndarms möglich waren.

Tabelle 1: Übersicht der CIPO-Patienten

CIPO-Patient-ID	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Geschlecht	weiblich	weiblich	männlich	weiblich	weiblich
Alter bei Organbad-Diagnostik	7 10/12 Jahre	7 8/12 Jahre	2 5/12 Jahre	3 2/12 Jahre	2 Jahre
Anzahl Vor-Operationen (Darm)	11	4	keine	13	keine
Stomata	Gastro-, Jejuno-, Ileo-, Colostoma	Gastro-, Ileo-, Vesicostoma	Ileo-, Vesicostoma	Gastro-, Ileo-, Coecostoma	Ileo-, Vesicostoma
Perzentilen	Länge: <3. Gewicht: 10.	Länge: <3. Gewicht: 3.	Länge und Gewicht: 10-25	Länge: 3-10 Gewicht: 50-75	Länge und Gewicht: 25.
Ernährung	total-parenteral	total-parenteral	enteral	teilparenteral (ca. 40-50%)	initial enteral, teilparenteral im Verlauf
Pränatale Auffälligkeiten	Megazystis	Anlage vesico-amnialer Shunt bei Megazystis	Megazystis (600ml)	Keine	Megazystis
Alter bei Beginn der Symptomatik	2 Tage	2 Tage	1. Lebensjahr	1 Tag	1. Lebensjahr
Neben-Diagnosen	Hepatopathie Cholezystitis Megazystis	Cholecysto-lithiasis Hepatopathie Miktions-störung komp. Nieren-insuffizienz	Megazystis Megakolon	*Initial* Mekonium-ileus, NEC *Später* Ileumstenosen interenterische Fisteln Kurzdarm	Megazystis Megakolon
Diagnose nach Organbad	myogene CIPO	myogene CIPO	neurogene CIPO	neurogene CIPO	myogene CIPO

Legende: CIPO: chronisch intestinale Pseudoobstruktion
NEC: Nekrotisierende Enterokolitis

Material und Methoden

Die Größe des entnommenen Resektionspräparates variierte zwischen einem 3-4 cm langen intakten Dünndarmring und einem flächigen Ausschnitt des Dünndarmes von mind. 2 cm x 4 cm. Unmittelbar nach der chirurgischen Entnahme wurde das Dünndarmsegment in 4 °C gekühlter Präparierlösung (Na^+ 144, K^+ 5.9, Ca^{2+} 3.7, Cl^- 157 [mmol/l]) von Stuhlresten befreit und umgehend ins Labor zur weiteren Bearbeitung transferiert. Im Labor wurde das Gewebe für die verschiedenen Versuchsabschnitte aufgeteilt in einen mindestens 2 cm x 1 cm großen Anteil für die histologische Untersuchung und einen circa 2 cm x 3 cm großen Anteil zur *in-vitro* Untersuchung im Organbad.

Histologische Untersuchungen

Aufarbeitung und Fixierung der Präparate

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Präparate entweder flächig mit dünnen Fixiernadeln in vorsichtiger physiologischer Ausdehnung auf Korkplatten befestigt oder, wenn möglich, als Ring belassen und in Paraformaldehyd 4 % über mindestens 72 h fixiert. Bei der Ausrichtung der Präparate wurde darauf geachtet, dass die Ringmuskulatur der Länge nach und die Längsmuskulatur quer angeschnitten wurde.

Anschließend erfolgte die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und Einbettung in Paraffin über ca. 10 Tage. Die Schnitte der Präparate wurden am Ultramikrotom (Messer Medite GmbH, R-35) mit einer Dicke von 5 µm vorgenommen und anschließend für mindestens 3 Tage im Wärmeschrank getrocknet. Für die konventionelle Histologie wurden je 2-3 Schnitte eines Präparates auf einen Objektträger Superfrost (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig) aufgebracht. Speziell beschichtete Objektträger X-tra™ Adhesive (Surgipath, UK) wurden für je 2-3 Schnitte eines Präparates für die Immunhistologie verwendet.

Konventionelle Histologie

Die allgemeine histologische Orientierung und Beurteilung der Dünndarmwand und Fibrosierung wurde mittels konventioneller histologischer Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Azan durchgeführt.

Immunhistologie

Zur gezielten Beurteilung der Muskulatur, des ENS und der ICC wurden immunhistochemische Färbungen der Darmwand mit spezifischen Antikörpern vorgenommen.

Für alle immunhistologischen Färbungen wurde die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) (Abbildung 3) angewendet, bei der zunächst der unkonjugierte Primärantikörper an das nachzuweisende Epitop bindet. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird von einem biotinylierten Sekundärantikörper markiert, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. In einem dritten Inkubationsschritt erfolgt die Markierung mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Zuletzt erfolgt die eigentliche Farbreaktion durch enzymatische Umsetzung mit dem Chromogen, wobei in diesen Versuchen AEC (Aminoethylcarbazol) zur Rotfärbung oder DAB (Diaminobenzidin) zur Braunfärbung des Epitops verwendet wurde.

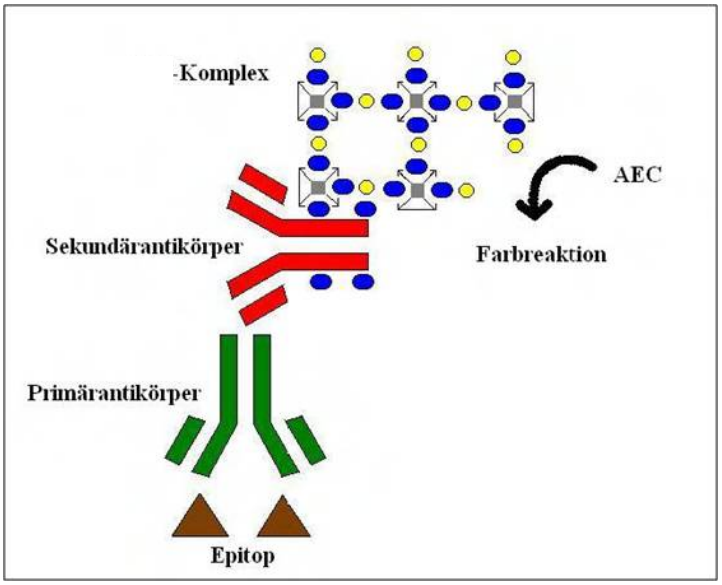


Abbildung 3:
schematische Darstellung der Bindungsreaktionen bei der Immunhistochemie (ABC-Methode)

In ausführlichen Vorversuchen wurden alle folgenden primären Antikörper an Paraffinschnitten getestet und die optimale Verdünnung und Vorbehandlung (Antigen-Retrieval mit drei verschiedenen Puffersystemen) der einzelnen Epitope für Dünndarmgewebe ermittelt. Des Weiteren wurde die Farbdarstellung der darzustellenden Strukturen mit 2 verschiedenen Chromogenen (DAB und AEC) getestet und die jeweils optimale Visualisierung der interessierenden Strukturen gewählt (Tabelle: „Liste der verwendeten Antikörper“).

Bei allen Schnitten wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun nach Meyer zur besseren morphologischen Orientierung an den Präparaten durchgeführt. Die entsprechenden Färbeprotokolle und verwendeten Antikörper sind aus den Tabellen im Anhang ersichtlich (Tabelle: „Immunhistologie-Färbeprotokoll mit/ohne Antigen-Retrieval“).

Fotodokumentation und Morphometrie

Die Beurteilung und die morphometrische Analyse der immunhistologischen Färbungen sowie die Fotodokumentation erfolgten an einem Durchlichtmikroskop (Axiophot, Zeiss) und über eine PC-gekoppelte Digitalkamera (Axiocam, Zeiss).

Zur Bestimmung der Darmwandlänge (DWL) und der topographischen ICC-Verteilung wurde das histologische Präparat bei einheitlicher Vergrößerung und Pixel-Auflösung gescannt und die vermessene Pixel-Anzahl mittels eines zuvor bestimmten Umrechnungsfaktors in Millimeter umgerechnet. Die Messung der DWL erfolgte stets entlang des Plexus myentericus.

Immunhistologische Marker

Glattmuskuläre Marker

Die glatten Muskelzellen der Dünndarmwand wurden durch die bereits gut etablierten glattmuskulären Marker anti-alpha-smooth-muscle-actin (SMA) und anti-smooth-muscle-myosin-heavy-chain (SMMHC) sowie die neu beschriebenen Marker anti-histone-deacetylase 8 (HDAC 8) und anti-smoothelin (R4A) dargestellt. Für die Auswertung der immunhistologischen Befunde der muskulären Marker wurde aufgrund der bereits in der Literatur erwähnten sehr inhomogenen Erscheinungsbilder der Erkrankung ein rein deskriptives Verfahren gewählt.

Neuronale Marker

Für die Beurteilung der enterischen Ganglien einschließlich der Nervenfaserstränge wurde anti-protein gene product 9.5 (PGP 9.5) verwendet. Zur Beurteilung der enterischen Nervenzellen, d.h. der neuronalen Somata, wurde der hierfür gut etablierte Marker anti-Hu C/D (Hu C/D) eingesetzt. Hierbei erfolgte eine Berechnung der Anzahl der Nervenzellen pro 100 mm DWL in Plexus myentericus und Plexus submucosus.

Eine statistische Analyse der Nervenzellen und Ganglien war aufgrund der zu erwartenden inhomogenen Verteilung bei den CIPO-Patienten nicht sinnvoll. Daher wurde anhand der Erwachsenenpräparate zunächst die normale Anzahl der Nervenzellen pro 100 mm DWL ermittelt. Der Normbereich des Kontrollkollektivs entsprach den Werten innerhalb der 10%- und 90%-Grenzen und diente zum Vergleich der bei den CIPO-Patienten erhobenen Daten.

Marker für interstitielle Cajal-Zellen

Zur Darstellung der ICC wurde der c-kit-Rezeptor-Antikörper CD 117 angewendet. Für die Auswertung der ICC in der Nachbarschaft des Plexus myentericus (ICC-MY) wurden 2 neue Verfahren herangezogen:

Die ICC-MY umgeben die Ganglien des Plexus myentericus bei Gesunden nahezu lückenlos. Diese Umrahmung oder sog. periganglionäre ICC-Flankierung wurde morphometrisch quantifiziert. Unterbrechungen der periganglionären ICC-Flankierung wurden ausgemessen und von dem Gesamtumfang des Ganglions abgezogen, um somit den relativen Anteil (Prozentangabe) der ICC-Flankierung eines Ganglions zu ermitteln (Abbildung 4). Es wurden mindestens 5 repräsentative Ganglien pro Präparat ausgewertet.

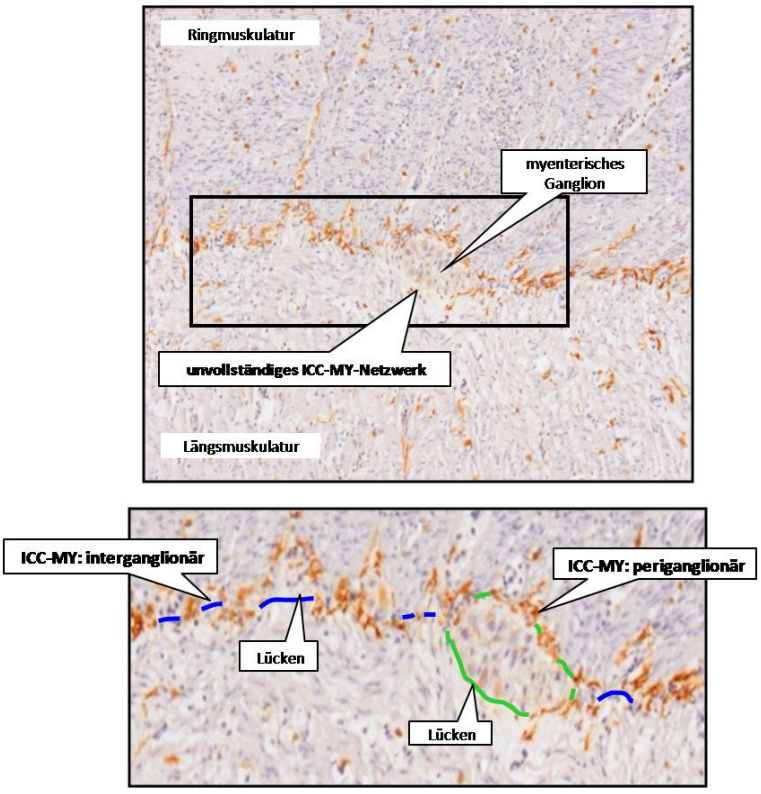


Abbildung 4:
unvollständige periganglionäre ICC-Flankierung (grüne Linien) und diskontinuierliches interganglionäres ICC-Netzwerk (blaue Linien) bei einer CIPO-Patientin (Färbung mit CD 117)

Die Abschnitte zwischen den Ganglien des Plexus myentericus werden ebenfalls nahezu kontinuierlich von einem sog. interganglionären ICC-Netzwerk durchzogen. Entsprechend diente die Kontinuität dieses interganglionären ICC-Netzwerkes als zweites Beurteilungskriterium. Die vorhandenen Lücken wurden ausgemessen, von der Gesamtlänge des Präparates abgezogen und als relative Diskontinuität in Prozent des interganglionären ICC-Netzwerkes angegeben (Abbildung 5).

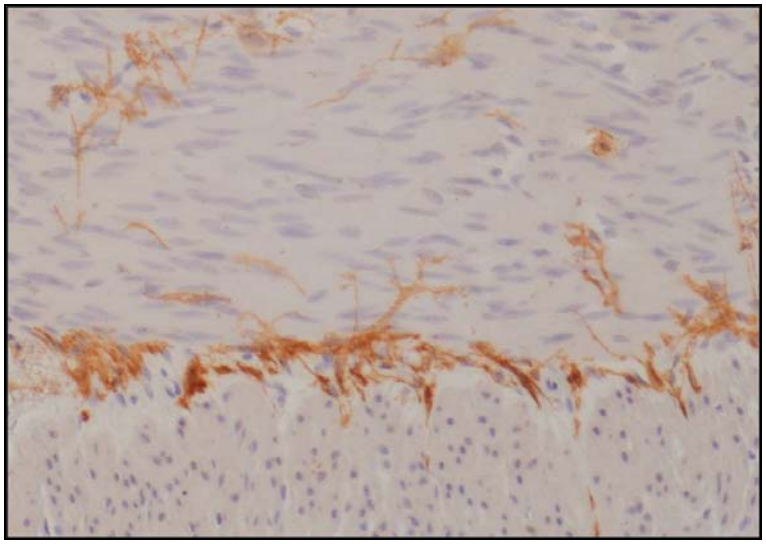


Abbildung 5:
Darstellung des interganglionären ICC-Netzwerkes eines normalen Dünndarms (Färbung mit CD 117)

In-vitro Untersuchung der glattmuskulären Kontraktilität

Erstellen der Muskelstreifenpräparate

Für die Untersuchung der glattmuskulären Kontraktilität mittels Organbadtechnik wurden die Dünndarmsegmente auf einer Korkplatte flächig ausgebreitet und mit kleinen Fixiernadeln vorsichtig auf ihre physiologische Länge gedehnt (Abbildung 6). Mit der Mikroschere wurde die Mukosa und größtenteils die Submukosa lumenseitig abpräpariert. Um sicherzustellen, dass der Plexus myentericus zwischen Ring- und Längsmuskelschicht vollständig erhalten blieb, wurde keine Präparation der einzelnen Muskelschichten vorgenommen. Mit Hilfe eines speziellen Stanzinstruments wurden 1 mm breite und 15-20 mm lange Muskelstreifen parallel zur Ringmuskelschicht aus der Tunica muscularis herausgeschnitten. Auf diese Weise entstanden Muskelstreifenpräparate mit einheitlichem Kaliber, die beide Muskelschichten enthielten, wobei die quer durchtrennte Längsmuskelschicht in den anschließenden Kontraktionsmessungen funktionslos blieb. Die Funktionstüchtigkeit der Muskelstreifen ließ sich schon während der Präparation durch ein spiralförmiges Zusammenziehen erkennen.

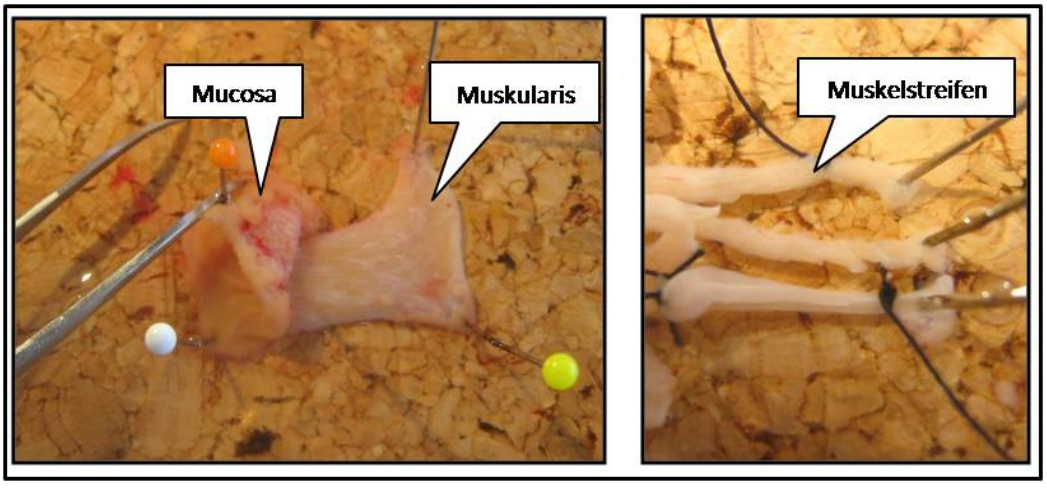


Abbildung 6:
Entfernung der Tela mucosa und submucosa von der humanen Dünndarmwand und Präparation der Muskelstreifenpräparate

Jeweils fünf Ringmuskelstreifen konnten pro Untersuchungsgang mit der Organbadtechnik untersucht werden. Bei unseren Probanden wurden die Ringmuskelstreifen auf o.g. Weise angefertigt und in den beiden Organbadkammern befestigt. Pro Kammer wurden zwei bzw. drei Streifenpräparate an einer Platinreizelektrode fixiert (Abbildung 7).

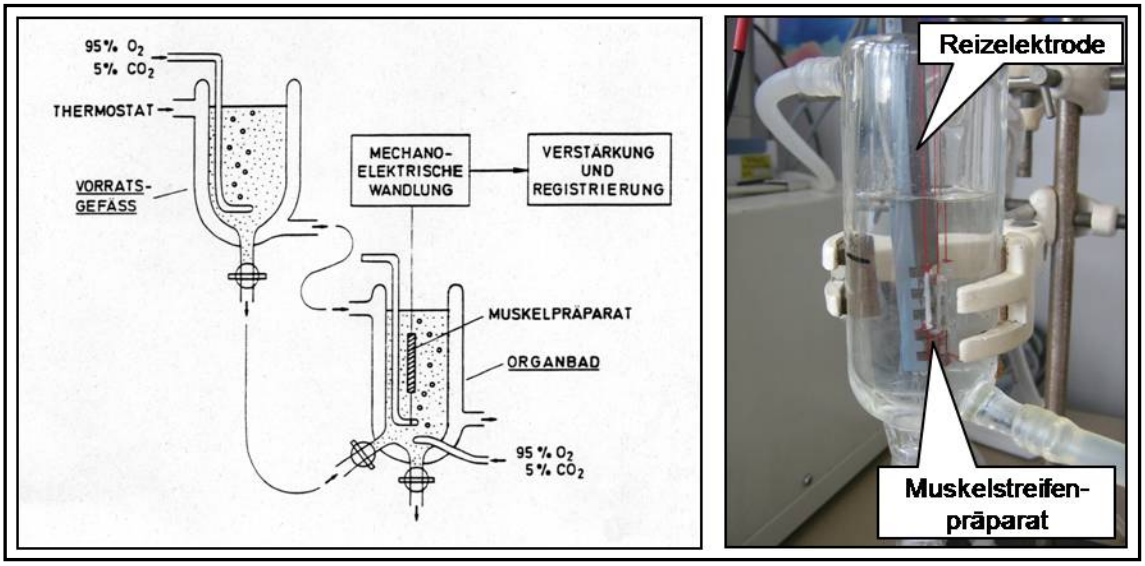


Abbildung 7:
schematischer Aufbau des Organbades nach Golenhofen (1983) und Fixierung der Muskelstreifenpräparate an Platinreizelektrode in doppelwandiger Organbadkammer mit gewärmter und begaster Krebslösung (95 % O_2 / 5 % CO_2)

Um die Funktionsfähigkeit der Streifenpräparate für die Dauer der Experimente aufrechtzuerhalten, wurde eine nach Krebs-Henseleit modifizierte physiologische Salzlösung (Na^+ 137, K^+ 5.9, Ca^{2+} 2.5, Mg^{2+} 1.2, Cl^- 124.1, HCO_3^- 25, H_2PO_4 1.2, Glucose 11.5 [mmol/l]) mit einem pH-Wert zwischen 7.3 - 7.4 verwendet. Die Lösung in den Kammern wurde kontinuierlich auf 37 °C erwärmt und mit Carbogen-Gas (95 % O_2**,** 5 % CO_2) durchperlt. Ein Transducer setzte die isometrischen Kontraktionen der Muskelstreifen in ein elektrisches Signal um, welches über einen AD-Wandler digital aufgezeichnet wurde (Data Translation GmbH, Bietigheim-Bissingen, Typ DT21-EZ). Nach Einbringen der Muskelstreifen in das Organbad erfolgte zunächst eine Vordehnung mit 1 mN. Die Notwendigkeit einer Vordehnung ergibt sich aus der Tatsache, dass ein glatter Muskel nur bei Vordehnung eine konstante Spannung aufrechterhält und Kontraktionen und Spontanaktivität

entwickelt. Durch diese stets gleiche Präparation und den stets gleichen Versuchsaufbau wurden standardisierte Bedingungen erreicht.

Bei der gewählten Vordehnung von 1 mN entwickelten die Muskelstreifen innerhalb der Adaptationsphase von ca. 60-90 min eine optimale Spontanaktivität mit regelmäßigen Oszillationen (Abbildung 8).

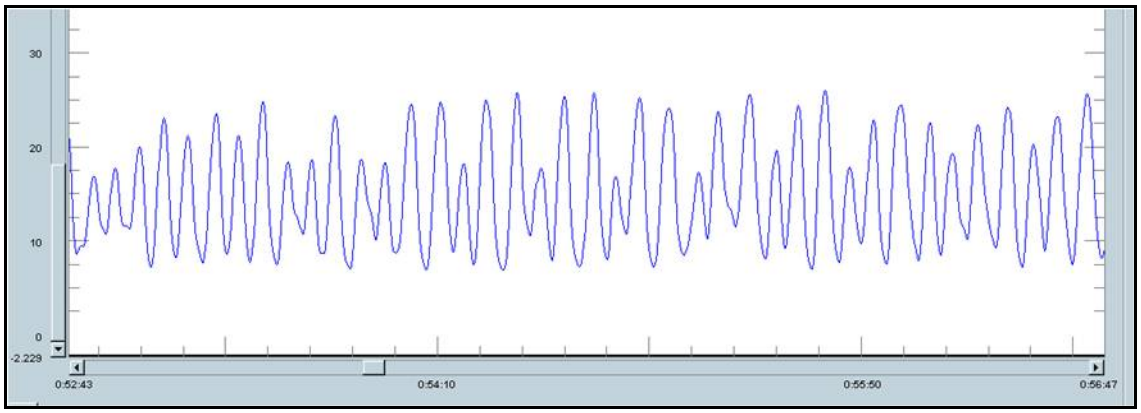


Abbildung 8:
normale Spontanaktivität mit regelmäßigen Oszillationen eines Muskelstreifenpräparates des Dünndarmes

Versuchsablauf

Nachdem die Muskelstreifenpräparate in den Organbadgefäßen zwischen den Platinreizelektroden und dem Kraftaufnehmer befestigt wurden, begann die Aufzeichnung der Kraftentwicklung. Nach ca. 30 min einer sog. Äquilibrationsphase setzte eine gleichförmige Spontanaktivität der Muskelstreifen ein.

Die anschließende Applikation der Pharmaka und die Durchführung der elektrischen Feldstimulation erfolgte nach einem festgelegten Schema (Tabelle: „Organbad-Versuchsprotokoll“ im Anhang)

Bei der cholinergen Stimulation mittels Acetylcholin (ACh) in steigender Konzentration mit 10^{-7}-10^{-4} mol/l im Abstand von je 3 min entwickelten die Muskelstreifen eine stetige Zunahme der Kontraktionen auf maximale Werte – die sog. „Acetylcholintreppe“ (Abbildung 9). Nach erfolgter Aufzeichnung wurde das

Organbad gründlich ausgespült, um die weiteren Versuchsabschnitte nicht zu beeinflussen.

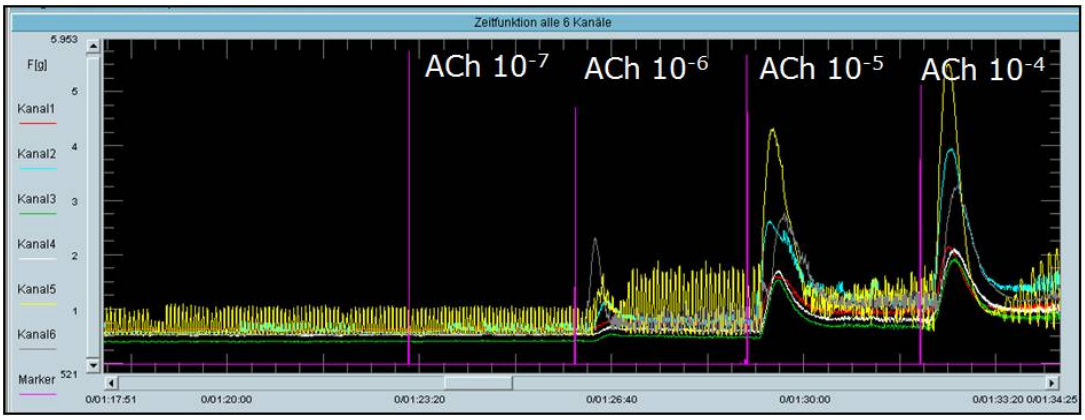


Abbildung 9:
„Acetylcholin-Treppe“: Zunahme der Kontraktionen der Dünndarm-Muskelstreifenpräparate unter steigender ACh-Konzentration eines Kontrollpatienten

Anschließend erfolgte die Blockade des adrenergen und cholinergen Systems, um sog. non-adrenerge, non-cholinerge (NANC-) Bedingungen herzustellen, die eine Beurteilung der NANC-Transmitter des ENS erlauben. Die Blockade der sympathischen Nerven erfolgte durch Phentolamin [10^{-5} mol/l] und Propranolol [10^{-5} mol/l], die der parasympathischen Nerven durch Atropin [5 x 10^{-6} mol/l].

Durch Applikation von Kaliumchlorid (KCl) [2 x 10^{-2} mol/l] wurde eine direkte chemische Depolarisierung der Muskulatur erreicht, um die Kontraktilität der Myozyten unabhängig von nervalen Einflüssen zu überprüfen.

Zum Abschluss jeder Versuchsreihe wurde das Muskelrelaxanz Papaverin [10^{-3} mol/l] in das Organbad gegeben, um durch komplette Relaxation der Muskelstreifen die elastische Komponente des Muskeltonus bestimmen zu können. Damit ließ sich die tatsächliche Kraftzunahme der Muskelstreifenpräparate in den einzelnen Versuchsabschnitten ermitteln.

Ein weiterer Teil des Versuches bestand in der Durchführung der elektrischen Feldstimulation (EFS). Über eine Platinelektrode wurden Rechteck-Impulse mit niedriger Spannung und kurzer Reizdauer periodisch appliziert. Die niedrige Reizfrequenz (5 Hz) bewirkt hierbei die selektive Stimulation der Nervenzellen ohne

direkte Stimulation der Myozyten, wodurch eine Beurteilung des ENS möglich ist. Eine optimale Relaxation („ON-Relaxation“) der Muskelstreifen wurde erreicht, wenn periodische Impulse mit einer Spannung von 50 V, 1 ms Dauer und einer Wiederholungsrate von 5 Hz appliziert wurden. Die Relaxation ist durch die Ausschüttung von inhibitorischen Neurotransmittern durch die EFS bedingt. Nach Beendigung der EFS folgte eine Kontraktion („Rebound-Phänomen“ oder „OFF-Kontraktion") (Abbildung 10).

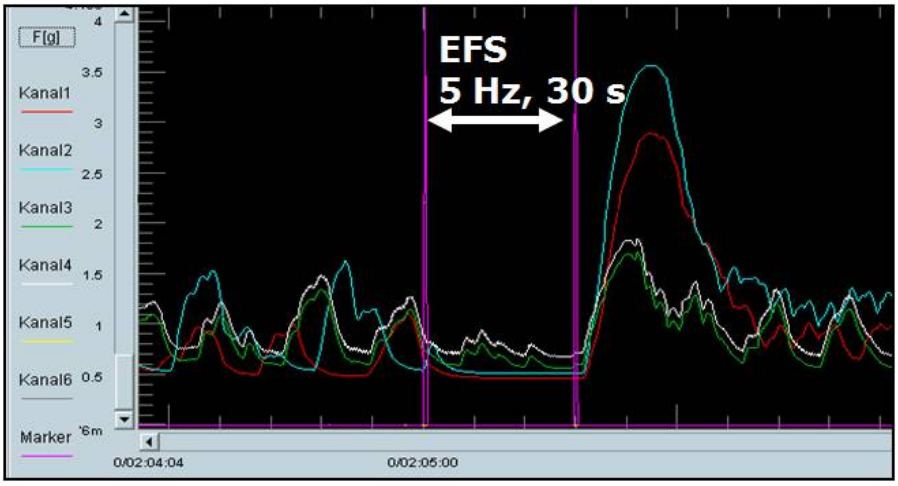


Abbildung 10:
normale ON-Relaxation und OFF-Kontraktion des Dünndarms durch die EFS

Zu Beginn der Messungen sowie nach jeder Applikation der o.g. Pharmaka erfolgte eine EFS zur Untersuchung der ENS-Effekte unter den verschiedenen Bedingungen.

Für jede Untersuchung wurden 5 Muskelstreifenpräparate eines Darmabschnittes eines CIPO-Patienten bzw. eines Kontrollpatienten verwendet. Für die Auswertung wurden jedoch nur Muskelstreifenpräparate herangezogen, die im Laufe des Versuches eine ausreichende Vitalität zeigten. Als Vitalitätskriterien wurden eine adäquate Reaktion auf ACh-Stimulation bzw. eine Zunahme der Kontraktionsamplitude nach KCl-Gabe gewertet.

Statistische Auswertung

Als statistisches Verfahren für den Gruppenvergleich der Ergebnisse aus den *in-vitro* Untersuchungen der glattmuskulären Kontraktilität sowie der morphometrischen Befunde der ICC-Verteilung kam der Mann-Whitney-U-Test für verteilungsfreie, unabhängige Stichproben zur Anwendung. Hierbei wurden der Median, der Interquartilbereich (50% der Werte) sowie der 99%-Bereich angegeben und als Box-Plot-Diagramm dargestellt, da man von einer Nicht-Normalverteilung der Werte ausgehen muss. Die statistische Auswertung der weiteren histologischen Untersuchungen war aufgrund der erwähnten Inhomogenität der zu erwartenden Befunde nicht möglich.

Bei Untersuchungsabschnitten, die charakteristisch für beide Unterformen der CIPO sind, wurden die Ergebnisse aller 5 Kinder mit CIPO zusammengefasst. Bei Untersuchungsabschnitten, die auf eine Unterscheidung zwischen myogener und neurogener Form der CIPO hindeuten, wurden die Daten nach den entsprechenden Untergruppen getrennt aufgeführt und wie o.g. statistisch berechnet. Hierbei wurden für die verschiedenen Versuchsabschnitte stets die Daten der CIPO-Patienten mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl der Muskelstreifenpräparate der einzelnen Patienten im Organbad, wurde für jeden Meßpunkt der Median aller auswertbaren Muskelstreifen eines Patienten berechnet und die jeweiligen Medianwerte der einzelnen Patienten miteinander verglichen. Somit lagen für jeden Meßpunkt 3 Werte für die myogene CIPO, 2 Werte für die neurogene CIPO und 9 Werte für die Kontrollpatienten vor.

Ein p-Wert ≤ 0,05 wurde als signifikant bezeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit entsprechenden Software-Paketen (Excel 2007, SPSS 16 und 17) in beratender Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Statistik des UKS-H, Campus Lübeck (Direktor Prof. Ziegler).

Ergebnisse

Im Folgenden werden zunächst die histopathologischen Befunde der CIPO und im Anschluss die Ergebnisse der *in-vitro* Untersuchungen der glattmuskulären Kontraktilität bei der myopathischen bzw. neuropathischen Form der CIPO im Vergleich zum Kontrollkollektiv dargestellt.

Histologie

Für die histologische Auswertung konnten die Befunde des gesamten Kontrollkollektivs (n=10) verwendet werden. Innerhalb der CIPO-Gruppe konnte bei 4 Kindern ausreichend Material für alle Versuchsabschnitte gewonnen werden. Bei einem Kind (Patientin Nr. 5) reichte das entnommene Darmsegment lediglich für die Organbaduntersuchung, sodass keine histologischen Untersuchungen des Dünndarms möglich waren.

Konventionelle Histologie

In der HE- und Azan-Färbung wurden bei den Kontrollpatienten keine Auffälligkeiten im Sinne einer fibrotisch-degenerativen Umwandlung der Muskulatur oder entzündliche Prozesse festgestellt.

Bei den Patienten mit CIPO wurden in der HE-Färbung in 2 von 4 Fällen (Pat.-Nr. 1 und 2) eosinophile Granulozyten als Ausdruck einer verstärkten Immunantwort beobachtet. Außerdem wurde in dieser Färbung die Beurteilung der Dünndarmzotten vorgenommen, welche bei den gleichen Patientinnen eine deutliche Zottenatrophie zeigte.

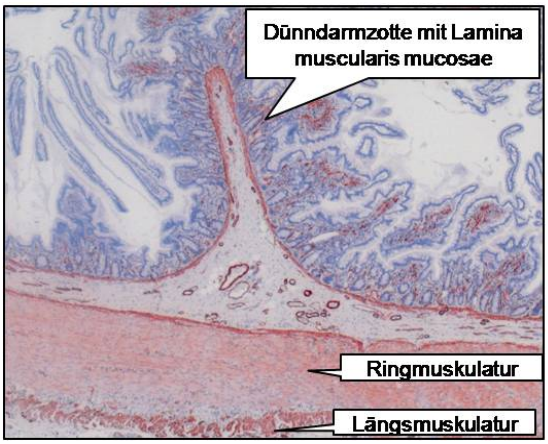
In der Azan-Färbung konnte bei 2 Patienten (Pat.-Nr. 1 und 2) eine deutliche Fibrosierung der Muskulatur dargestellt werden. Bei Patient Nr. 3 war eine diskrete Fibrosierung darstellbar.

Immunhistologie

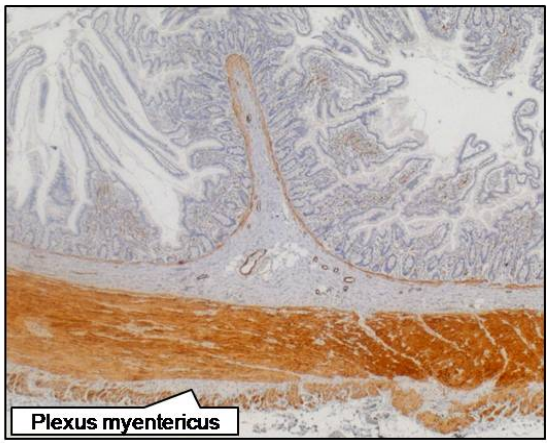
Glattmuskuläre Marker

Bei den durchgeführten immunhistochemischen Markierungen der Dünndarmmuskulatur zeigten sich durchaus interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Färbeintensität. Allerdings ließen sich diese Unterschiede innerhalb beider Gruppen beobachten, sodass die Expressionsmuster der angewendeten glattmuskulären Marker keine eindeutige histopathologische Differenzierung zwischen Kontroll- und CIPO-Gruppe erlaubten.

Die Darstellung der Tunica muscularis mit SMA (Abbildung 11a) zeigte eine homogene Anfärbung der außen gelegenen Längsmuskelschicht. Die innere Ringmuskelschicht war meist weniger kräftig gefärbt und bildete an der Grenze zur Tunica submucosa einen kräftigeren Randsaum. Auffällig war die schwächere Färbung insbesondere der Ringmuskulatur bei den beiden Patientinnen (Nr. 1 und 2) mit der deutlichen Fibrosierung bei gleichzeitig erhaltener kräftiger Färbung von Gefäßwänden und der Muscularis mucosae (als interne Kontrolle). Eine Quantifizierung der unterschiedlich ausgeprägten Färbeintensitäten war hierbei jedoch nicht möglich.



11a



11b

Abbildung 11:
Normaler Dünndarm eines Kontollpatienten
a: Färbung mit SMA (rot): Während die Längsmuskelschicht homogen kräftig angefärbt ist, stellt sich die Ringmuskulatur bis auf einen intensiv gefärbten inneren Randsaum insgesamt schwächer gefärbt dar. Zusätzlich kommen die Myozyten der Gefäße, der Lamina muscularis mucosae und der Zottenpumpe zur Darstellung.
b: Färbung mit SMMHC (braun): Sowohl Längs- als auch Ringmuskulatur sind homogen und gleich intensiv angefärbt. In gleicher Intensität stellen sich Myozyten der Gefäße, der Lamina muscularis mucosae und der Zottenpumpe dar.

Ähnliche Färbemuster zeigte auch die Markierung der Muskulatur mit HDAC 8. Die Färbungen mit R4A und SMMHC hingegen führten zu einer homogenen Darstellung beider Muskelschichten (Abbildung 11b) ohne Ausbildung eines Randsaumes der Ringmuskulatur.

Neuronale Marker

Hu C/D

Anhand der Hu C/D-markierten Schnitte wurden die Nervenzellen (NZ) von Plexus myentericus und Plexus submucosus quantifiziert und pro 100 mm DWL berechnet. Bei den Kontrollpatienten ergab sich ein sehr homogenes Bild (Abbildung 12) sowohl für den Plexus myentericus mit 889 NZ/100 mm DWL im Median (Spannweite 527-1127 NZ/100 mm DWL) als auch für den Plexus submucosus mit 289 NZ/100 mm DWL im Median (Spannweite 216-536 NZ/100 mm DWL). Bezeichnet man, wie für statistische Erhebungen üblich, die 10 %- Grenze als untere und die 90 %- Grenze als obere Normgrenze, so ergibt sich ein Normbereich von 580-1014 NZ/100 mm DWL für den Plexus myentericus und 126-482 NZ/ 100 mm DWL für den Plexus submucosus.

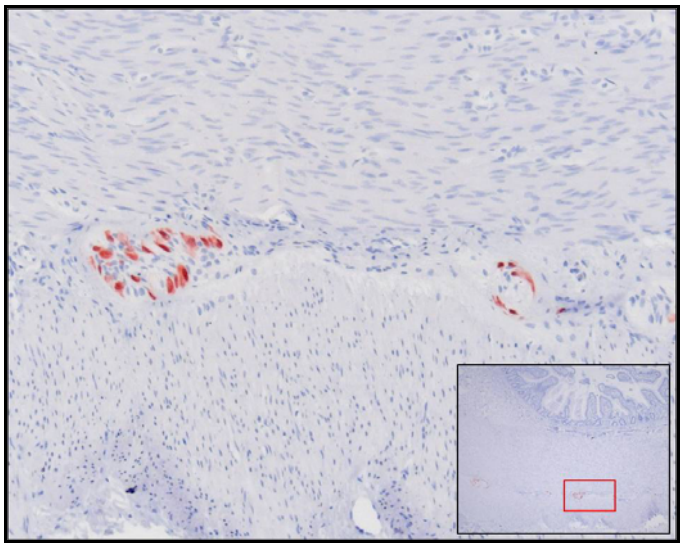


Abbildung 12:
normale Verteilung der Nervenzellen im Plexus myentericus des Dünndarms (Färbung mit Hu C/D)

Eine sehr inhomogene Verteilung der Nervenzellen zeigte sich dagegen bei den CIPO-Patienten (Abbildung 14). Patientin 1 zeigte eine ausgeprägte Hyperganglionose mit 1706 NZ/100 mm DWL im Plexus myentericus und 1720 NZ/100 mm DWL im Plexus submucosus. Dagegen bestand bei Patientin 4

eine ausgeprägte Hypoganglionose im Plexus myentericus mit 136 NZ/100 mm DWL (Abbildung 13), wobei die Nervenzelldichte des Plexus submucosus im Normbereich lag. Bei Patientin 2 zeigte sich eine diskrete Hypoganglionose des Plexus myentericus und eine normale Nervenzelldichte im Plexus submucosus. Die Auswertung des Patienten 3 ergab eine im Normbereich gelegene Anzahl von Nervenzellen im Plexus myentericus und eine mäßig erhöhte Anzahl der Nervenzellen im Plexus submucosus.

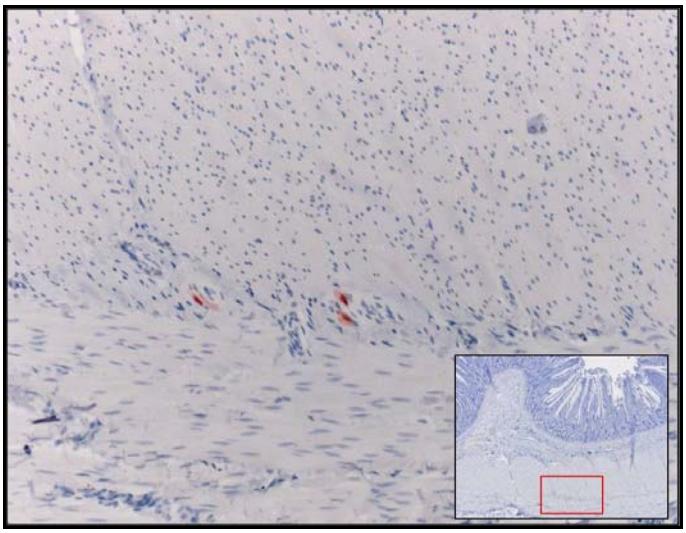


Abbildung 13:
ausgeprägte Verminderung der Nervenzellen im Plexus myentericus (Hypoganglionose) bei der CIPO-Patientin 4 (Färbung mit Hu C/D)

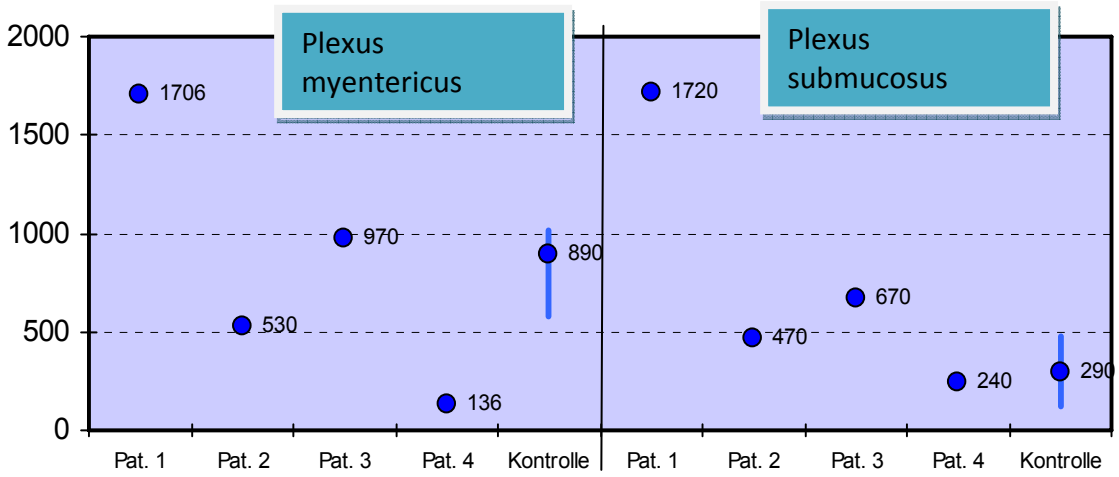


Abbildung 14:
Anzahl der Nervenzellen pro 100 mm DWL der 4 CIPO-Patienten im Vergleich zum Normbereich des Kontrollkollektivs.

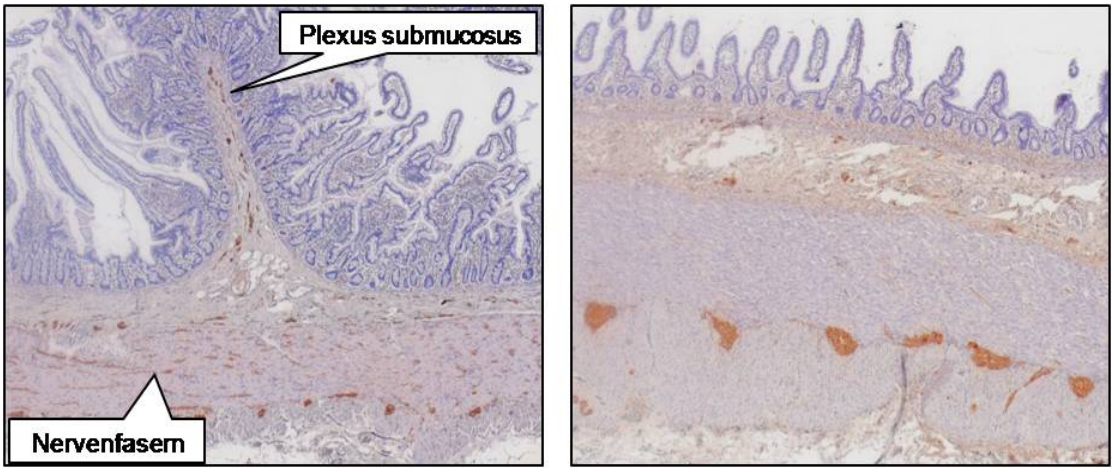
Die Relation zwischen der Nervenzelldichte im Plexus myentericus und Plexus submucosus lag im Kontrollkollektiv bei einem Quotienten von 3:1. Aufgrund der deutlichen Unterschiede der Nervenzelldichte der beiden Plexus zeigten die CIPO-Patienten teilweise erhebliche Verschiebungen dieses Quotienten. So war die Nervenzelldichte bei Patientin 1 in beiden Plexus gleich hoch (Quotient 1:1), bei Patientin 2 bestand ein Quotient von 1,2:1, bei Patient 3 betrug der Quotient 1,45:1 und bei Patientin 4 war der Quotient sogar invers mit 0,57:1 (Tabelle 2).

Tabelle 2:
Quotient zwischen Anzahl der Nervenzellen in Plexus myentericus zu Plexus submucosus bei CIPO-Patienten und Kontrollkollektiv

Patient	**1**	**2**	**3**	**4**	**Kontroll-kollektiv**
Quotient	1:1	1,2:1	1,45:1	0,57:1	3:1

PGP 9.5

Mit dieser Färbung wurde lediglich deskriptiv die Verteilung der Nervenfasern innerhalb der Ring- und Längsmuskelschicht beurteilt, da eine Beurteilung der Nervenzellzahl bereits durch die Markierung mit Hu C/D erfolgte. Bezüglich der Dichte der Nervenfaserverteilung waren sowohl in der Ring- als auch der Längsmuskulatur Unterschiede zwischen Kontrollpatienten und CIPO-Patienten auszumachen, jedoch unabhängig von der Ausbildung einer Hyper- oder Hypoganglionose (Abbildung 15). Die Dichte der Nervenfasern waren bei der Patientin 1 deutlich vermindert und bei den Patienten 2 und 4 leicht vermindert. Patient 3 zeigte eine Nervenfaserdichte, wie sie bei der Kontrollgruppe beobachtet wurde (siehe auch Gesamtübersicht der Befunde S. 55).



15a **15b**

Abbildung 15:
Färbung der Ganglien und Nervenfasern mit PGP 9.5:
a: Normalbefund eines Kontrollpatienten mit regelrecht verteilten Nervenfasern in Tunica muscularis und submucosa
b: Patientin 1 mit Hyperganglionose des Plexus myentericus und verminderten Nervenfasern; nebenbefundlich partielle Zottenatrophie

Interstitielle Cajal-Zellen

Bei den Kontrollpatienten zeigte sich eine sehr homogene Verteilung der ICC mit einer perigangliönären ICC-Flankierung von 89,0% im Median und einem fast durchgehenden interganglionären ICC-Netzwerk von 92,7% im Median (Abbildung 16).

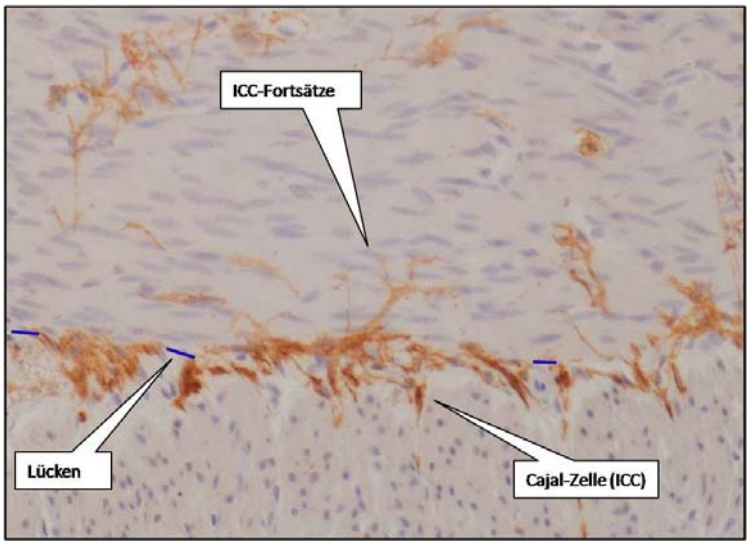
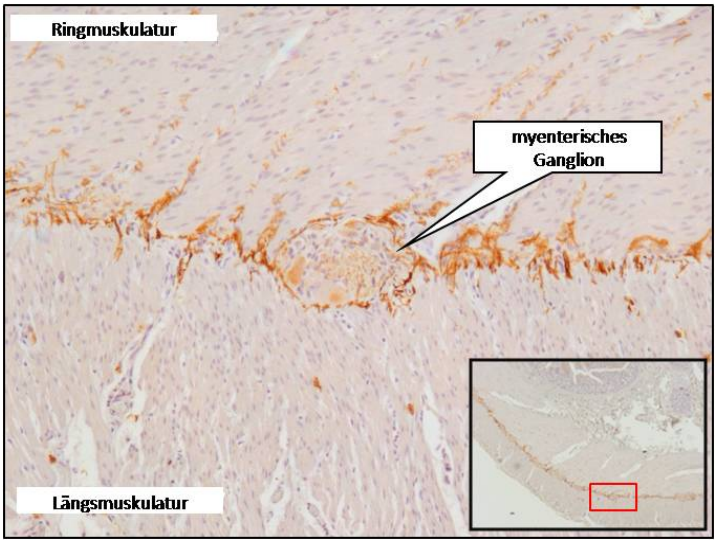


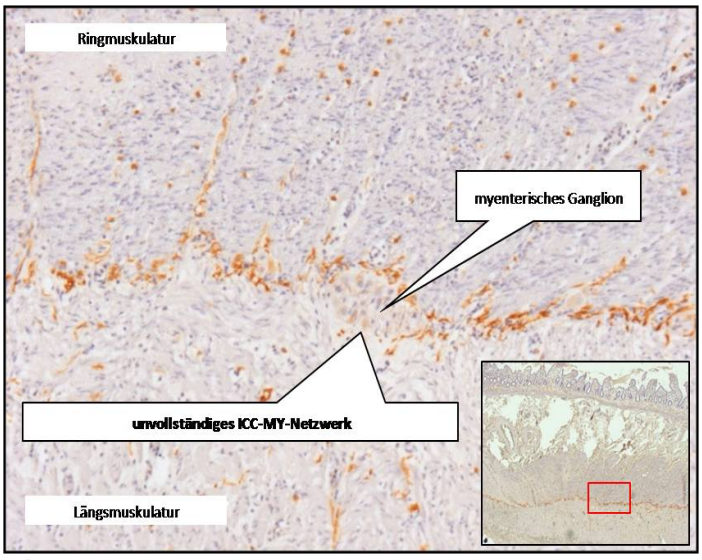
Abbildung 16:
Darstellung des interganglionären ICC-Netzwerkes an einem Kontrollpatienten (Färbung mit CD117)

Bereits bei der groben Durchmusterung der Präparate der CIPO-Patienten fielen eine deutliche Verminderung und schwächere Anfärbbarkeit der ICC auf. Bei den CIPO-Patienten bestanden große Lücken sowohl bei der perigangliönären ICC-Flankierung der myenterischen Ganglien als auch entlang des interganglionären ICC-Netzwerkes. Teils bestand eine große Variationsbreite innerhalb eines Präparates mit streckenweise sehr kräftiger und andererseits nahezu ausbleibender ICC-Flankierung der Ganglien. Im Median betrug die perigangliönäre ICC-Flankierung 69,5% und war gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert ($p= 0,01$).

Auffällig war außerdem, dass teils innerhalb der perigangliönären ICC-Flankierung größere Lücken zur Längsmuskulatur bestanden als zur Ringmuskulatur (Abbildung 17). War die Flankierung zur Längsmuskulatur gut ausgebildet, so war sie es auch stets zur Ringmuskulatur hin.



17a



17b

Abbildung 17:
a: normale ICC-Flankierung eines Dünndarmganglions bei einem Kontrollpatienten
b: Verminderung der perigangliönären ICC-Flankierung bei Patientin 1 (Fehlen der ICC-Flankierung insbesondere an der Seite zur Längsmuskulatur)

Bei der Beurteilung des interganglionären ICC-Netzwerkes ergab sich bei den CIPO-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verminderte Kontinuität von lediglich 76,2% im Median (p= 0,019) (Abbildung 18).

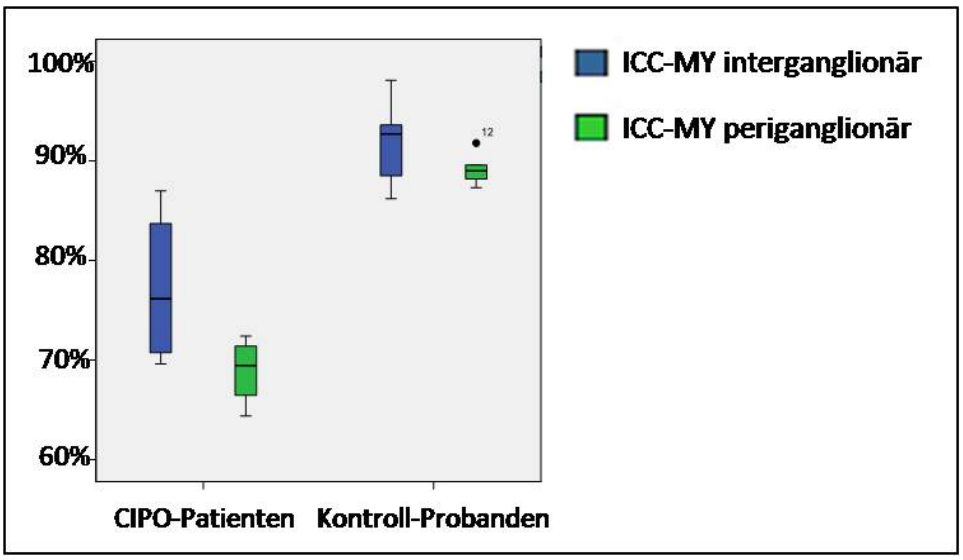


Abbildung 18:
Ausprägung der interganglionären ICC-Netzwerke (blau) und der periganglionären ICC-Flankierung (grün) bei CIPO-Patienten und Kontrollgruppe. Für beide Parameter zeigte sich bei den CIPO-Patienten eine signifikant verminderte Dichte der ICC-Geflechte.

Ergebnisse der glattmuskulären Kontraktilitätsmessung

Mit der Organbadtechnik wurden die glatte Muskulatur und das enterische Nervensystem der gewonnenen Darmabschnitte *in-vitro* untersucht. Durch Aufzeichnung der isometrischen Kontraktionen der Muskelstreifenpräparate wurden die Reaktionen auf Pharmaka und elektrische Feldstimulation sichtbar. Bei der Aufzeichnung erfolgte die Messung der Muskelkraft in Milli-Newton (mN). Um Einflüsse durch unterschiedliche Dicken der Präparate zu berücksichtigen, wurde anhand von Länge und Gewicht der Muskelstreifenpräparate der Querschnitt ermittelt und die gemessene Kraft der einzelnen Muskelkontraktionen auf den Querschnitt bezogen (mN/mm^2).

In die Auswertung wurden Muskelstreifenpräparate einbezogen, die Zeichen von Vitalität entweder in Form einer adäquaten Reaktion auf ACh oder einer Zunahme der Kontraktionsamplitude durch KCl zeigten. Aufgrund dieser Kriterien konnten jeweils alle 5 Muskelstreifen der 5 CIPO-Patienten und insgesamt 41 Muskelstreifen von 9 Kontrollpatienten ausgewertet werden.

4 Muskelstreifenpräparate von 3 verschiedenen Kontrollpatienten mussten ausgeschlossen werden. Ebenso war die Organbaduntersuchung eines Kontrollpräparates aufgrund längerer Lagerungszeiten im Operationssaal nicht auswertbar.

Nach Auswertung der Organbad-Daten zeigte sich in einigen Versuchsabschnitten eine gute Differenzierung zwischen der neurogenen und myogenen Form der CIPO, sodass die statistischen Berechnungen bereits aufgrund dieser Differenzierung durchgeführt werden konnten. So wurden die Patienten 1, 2, und 5 der myogenen CIPO und die Patienten 3 und 4 der neurogenen CIPO zugeordnet (siehe auch Patientenliste auf Seite 19). Eine Gesamtübersicht aller Befunde der CIPO-Patienten befindet sich auf Seite 55.

Spontanaktivität

Erste Muskelkontraktionen traten bereits innerhalb von 10-20 min nach dem Einspannen in die Organbad-Vorrichtung auf. Um präparatorische und pharmakologische Einflüsse der Narkose abklingen zu lassen, wurde insgesamt eine Adaptationsphase von ca. 60-90 min eingehalten. Bei der gewählten Vordehnung von 1 mN entwickelten die Muskelstreifen der Kontrollpatienten innerhalb dieser Zeit eine gute spontane Aktivität mit regelmäßigen Oszillationen und einer Kontraktionsamplitude von 4,4 mN/mm^2 im Median (Spannweite 0,9 mN/mm^2 -10,2 mN/mm^2). Bei den Muskelstreifen der CIPO-Patienten waren die Muskelkontraktionen mit einer Amplitude von 1,4 mN/mm^2 im Median (Spannweite 0,13 mN/mm^2-3,5 mN/mm^2) signifikant geringer (p=0,04). Modifikationen, wie z.B. eine Verlängerung der Adaptationszeit, erbrachten hierbei keine Verbesserung der Oszillationen bei den CIPO-Patienten.

Zur Ermittlung des sog. „aktiven Grundtonus“ wurde der Tonus nach Gabe des Muskelrelaxanz Papaverin vom jeweils betrachteten Grundtonus abgezogen. Dadurch sind die erhobenen Daten unabhängig von der tatsächlich angelegten Vorspannung und der elastischen Komponente der Muskelstreifen. Oszillationen ohne Einfluss von Pharmaka wurden hierbei als „nativ“ bezeichnet. Für den nativen aktiven Grundtonus ergaben sich für die CIPO-Patienten zwar niedrigere Werte (2,6 mN/mm^2 versus 4,0 mN/mm^2 bei der Kontrollgruppe), diese waren jedoch nicht signifikant (p=0,11).

Zur Bestimmung der erwähnten elastischen Komponente der Muskelstreifen wurde der aktive Anteil der Muskelkontraktionen ins Verhältnis zum Papaverintonus gesetzt. Je höher der aktive Anteil der Muskelstreifen an den Kontraktionen war, desto höher war die Prozentzahl. So zeigte sich bei den Kontrollpatienten im Median ein aktiver Muskeltonus von 50 % am Gesamttonus. Der aktive Anteil am Muskeltonus für die neurogene CIPO war mit 36 % gegenüber der Kontrollgruppe vermindert, aber nicht signifikant (p= 0,073). Für die myogene CIPO bestand jedoch gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Verminderung des aktiven Muskeltonus auf 11 % des Gesamttonus (p=0,009) (Abbildung 19).

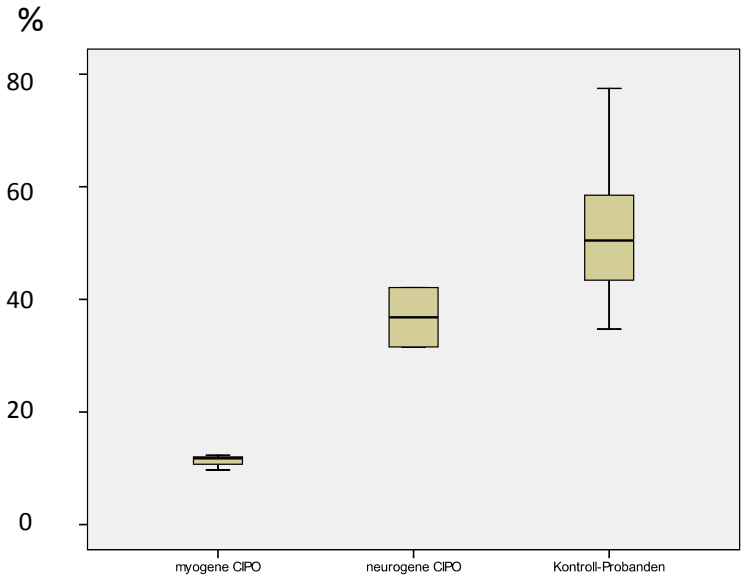
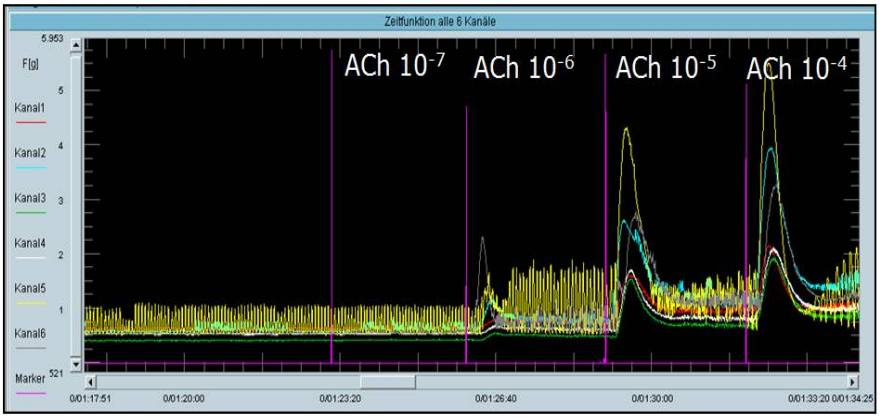


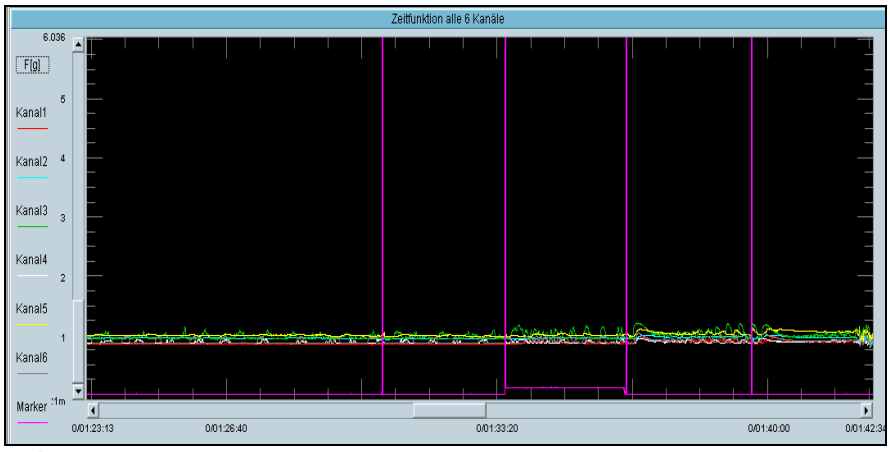
Abbildung 19:
Der Anteil des aktiven Muskeltonus am Gesamttonus ist bei der myogenen CIPO mit lediglich 11 % signifikant vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 50 %.

Cholinerge Stimulation mittels Acetylcholin

Nach der Adaptationsphase erfolgte die cholinerge Stimulation mit ACh in vier steigenden Dosierungen. Durch ACh werden insbesondere die glattmuskulären muskarinergen Rezeptoren stimuliert und bewirken beim Gesunden eine starke Zunahme der Muskelkontraktionen. Nach Abzug des Grundtonus, der vor der Applikation des ACh bestand, ergab sich die „reine“ Tonuszunahme durch die Wirkung des ACh. Bei den Kontrollpatienten zeigte sich wie erwartet eine deutliche Kraftzunahme (Abbildung 20).



20a



20b

Abbildung 20:
Cholinerge Stimulation mit ACh in steigender Konzentration
a: Normalbefund mit steigender Muskelkontraktion bei einem Kontrollpatienten
b: verminderte Tonuszunahme bei myogener CIPO unter ACh-Stimulation

In der Gruppe der myogenen CIPO bestand nahezu keine Reaktion auf das ACh, und die 3 höheren Dosierungen ergaben signifikant verminderte Werte für die Tonuszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe (p= 0,036 für ACh 10^{-6} mol/l, p= 0,009 für ACh 10^{-5} mol/l und ACh 10^{-4} mol/l) (Tabelle 3).

Tabelle 3:
Zunahme des Muskeltonus unter cholinerger Stimulation mit ACh in steigender Konzentration bei Patienten mit neurogener und myogener CIPO versus Kontrollpatienten (# = signifikant, p<0,05)

	Tonuszunahme bei Patienten mit myogener und neurogener CIPO versus Kontrollpatienten		
	myogene CIPO	neurogene CIPO	Kontrollpatienten
ACh-Konzentration	Median [mN/mm^2]	Median [mN/mm^2]	Median [mN/mm^2]
ACh 10^{-7} mol/l	0,41	2,6	4,6
ACh 10^{-6} mol/l	0,17 #	5,2	7,1
ACh 10^{-5} mol/l	1,0 #	9,1	17,3
ACh 10^{-4} mol/l	1,3 #	10,6	18,4

In der Gruppe der neurogenen CIPO war hingegen eine Tonuszunahme auf ACh zu registrieren. Diese war zwar weniger kräftig als in der Kontrollgruppe, aber dennoch ohne statistische Signifikanz.

Auffällig war hierbei die mangelnde Kraftzunahme der Muskelstreifen auf die 4. Stufe der ACh-Konzentration, die fast keine Steigerung zur 3. ACh-Dosis aufwies (Abbildung 21). Der Vergleich der Tonuszunahme zwischen myogener und neurogener CIPO war ebenfalls nicht signifikant.

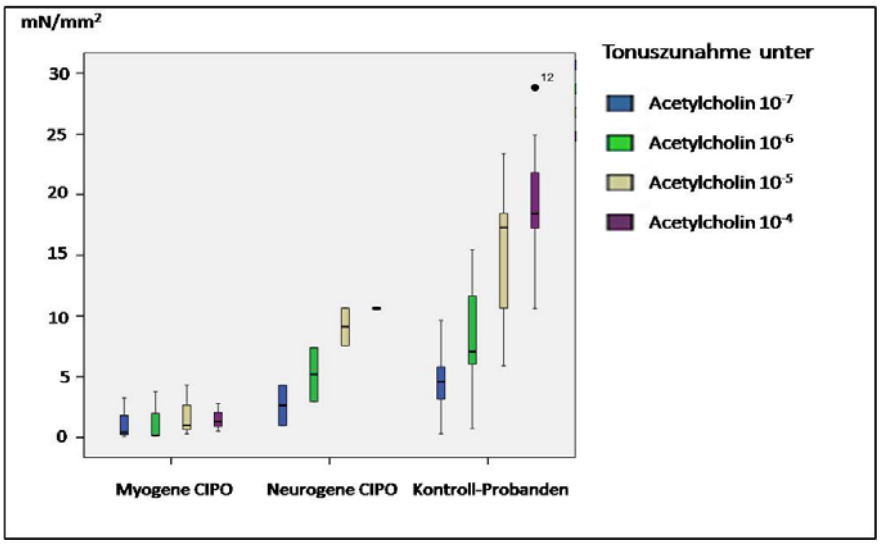


Abbildung 21:
Die Zunahme des Muskeltonus unter cholinerger Stimulation mit ACh in steigender Konzentration ist bei Patienten mit neurogener CIPO gegenüber den Kontrollpatienten vermindert ohne statistische Signifikanz, bei Patienten mit myogener CIPO hingegen signifikant reduziert.

Pharmakologische Zusätze

In den folgenden Versuchsabschnitten wurden verschiedene Pharmaka zugesetzt, um Änderungen des Grundtonus und der Kontraktionsamplitude zu erfassen. Hierbei wurde ein für humanes Kolon etabliertes Versuchsprotokoll für die Dünndarm-Präparate übernommen. Unter sog. NANC-Bedingungen wurden die Einflüsse des extrinsischen parasympathischen und sympathischen Nervensystems durch Atropin, Phentolamin und Propranolol blockiert und somit Kontraktionen aufgezeichnet, die allein durch das enterische Nervensystem generiert wurden.

In der Kontrollgruppe ließen sich unter NANC-Bedingungen im Median keine Änderungen des aktiven Grundtonus beobachten (Tabelle 4). Bei den CIPO-Patienten fiel der aktive Grundtonus unter NANC-Bedingungen ab, wobei der Abfall lediglich bei der myogenen CIPO signifikant gegenüber der Kontrollgruppe war (p= 0,009).

Tabelle 4
Änderung des aktiven Grundtonus unter verschiedenen Pharmaka
(# = signifikant, p<0,05)

	Patienten mit myogener und neurogener CIPO versus Kontrollpatienten		
	myogene CIPO	neurogene CIPO	Kontrollpatienten
aktiver Grundtonus…	Median [mN/mm^2]	Median [mN/mm^2]	Median [mN/mm^2]
nativ	1,32	3,40	4,03
unter NANC-Bed.	0,70 #	2,81	4,03
unter KCL	0,61 #	2,91	2,47
unter L-NNA	0,62	2,80	2,75

Anschließend wurde Kaliumchlorid zugesetzt, welches eine direkte chemische Depolarisierung der enterischen Muskelzellen bewirkt.

Darunter kam es bei den Kontrollpatienten zu einer leichten Abnahme des Grundtonus. So auch bei den CIPO-Patienten, wobei ein signifikant verminderter Grundtonus erneut nur bei der myogenen CIPO gegenüber der Kontrollgruppe registriert wurde (p= 0,009) (Abbildung 22).

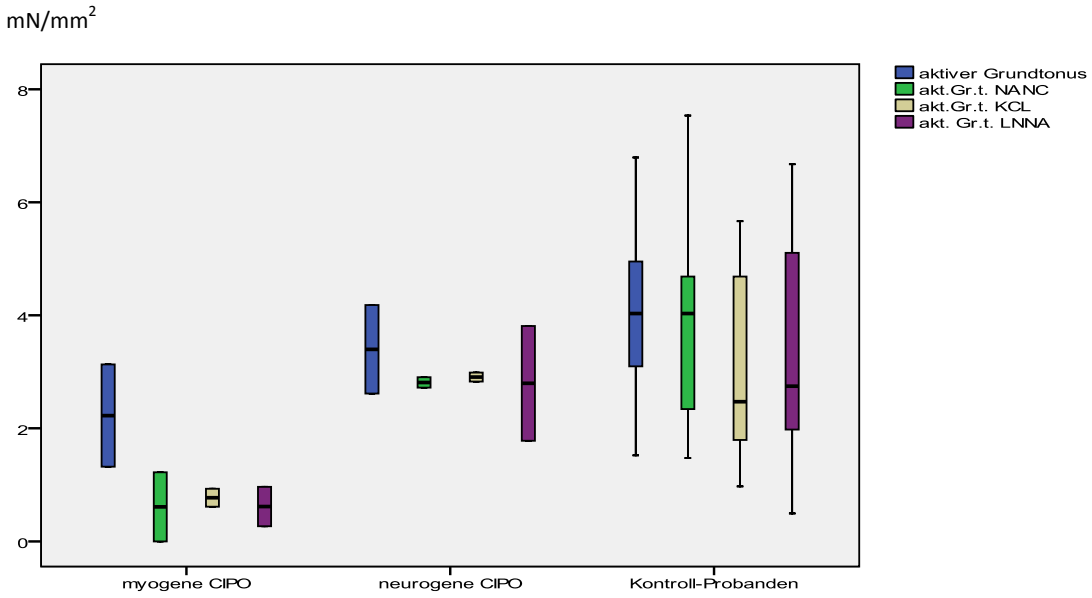


Abbildung 22:
Änderung des aktiven Grundtonus unter Einfluss verschiedener Pharmaka.

Die Zugabe von L-NNA, einem Stickoxid-(NO-)Synthetase-Blocker, führt normalerweise durch die ausbleibende Wirkung des inhibitorisch wirkenden, relaxierenden NO zu einer Anhebung des Grundtonus – so, wie es sich in Vorversuchen für das humane Kolon aufzeigen ließ. Dieses Phänomen war bei den Kolon-Präparaten, unabhängig von den vorherigen Zusätzen (Atropin, Phentolamin/Propranolol und KCl), zu beobachten. Bei den Dünndarm-Präparaten zeigte sich im Gegensatz dazu keine Änderung des aktiven Grundtonus nach Applikationen von L-NNA. Auch bei den Muskelstreifen der CIPO-Patienten blieb der aktive Grundtonus nach Gabe von L-NNA auf dem Niveau des Tonus unter KCl-Stimulation und brachte keine erneute Tonusänderung mit sich.

Neben dem Vergleich der durchschnittlichen Zu- oder Abnahme des Muskeltonus ist darüber hinaus auch die Betrachtung der Kontraktionsamplituden aufschlussreich, d.h. der maximal entwickelten Muskelkräfte unter den verschiedenen Bedingungen.

Die Kontraktionsamplituden aller 5 CIPO-Patienten waren unter nativen Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert (im Median 1,14 mN/mm^2 versus 4,44 mN/mm^2) (p= 0,04).

Unter NANC-Bedingungen hingegen war die Kontraktionsamplitude der myogenen CIPO im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert (p= 0,036). In der Gruppe der neurogenen CIPO war die Kontraktionsamplitude wiederum nicht signifikant vermindert (p= 0,33). Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden CIPO-Formen.

Unter Kaliumchlorid zeigten sich bei den Kontrollpatienten kräftige Kontraktionsamplituden mit 5,24 mN/mm^2 im Median (Spannweite 1,41 mN/mm^2 - 11,79 mN/mm^2). Bei der neurogenen CIPO fielen die Kontraktionsamplituden im Median mit 5,29 mN/mm^2 nicht schwächer aus (p= 1,0). Bei der myogenen CIPO bestand keinerlei Reaktion auf Kaliumchlorid (Abbildung 23); die Kontraktionsamplituden waren mit 0,24 mN/mm^2 im Median (Spannweite 0,1 mN/mm^2 - 0,85 mN/mm^2) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert (p= 0,009).

Unter Zugabe von L-NNA kam es in der Kontrollgruppe zu einer Verminderung der Kontraktionsamplitude. Aufgrund der schon sehr kleinen Kontraktionsamplitude der CIPO-Patienten unter nativen Bedingungen war eine Auswertung der Kontraktionsamplitude unter L-NNA bei den CIPO-Patienten daher nicht möglich.

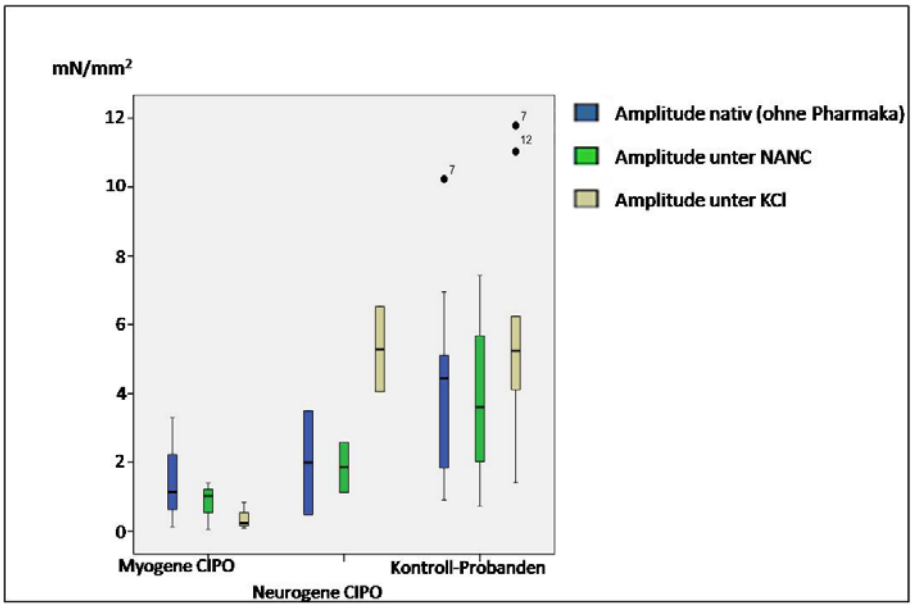


Abbildung 23:
Bestimmung der Kontraktionsamplitude nativ, unter NANC-Bedingungen und nach KCl-Gabe: Bei Patienten mit myogener CIPO ist die Kontraktionsamplitude unter KCl-Stimulation signifikant geringer als bei den Kontrollpatienten.

Elektrische Feldstimulation

Durch die EFS kommt es zur Depolarisierung der enterischen Nerven mit Freisetzung sämtlicher Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. NO als stärkster Muskeldilatator bewirkt dabei die sog. „ON-Relaxation“. Nach Beendigung des Stromflusses kommt es zu einem Rebound-Phänomen mit einer sog. „OFF-Kontraktion“.

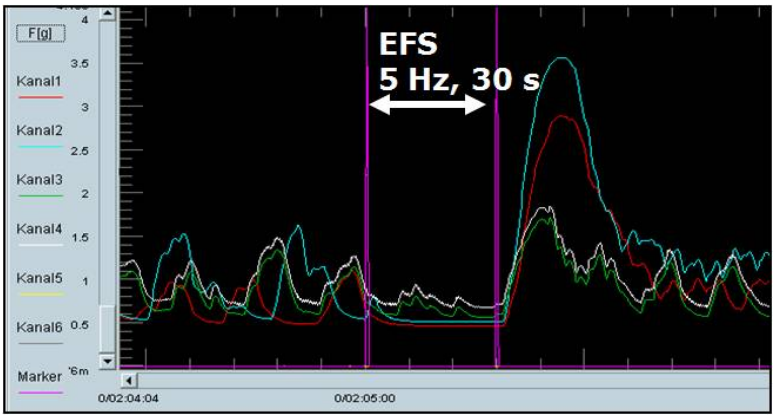
Die ON-Relaxation der EFS war bei den Muskelstreifen des normalen Dünndarms insgesamt weniger ausgeprägt als bei den Vorversuchen mit Kolon-Muskelstreifenpräparaten. Auch unter NANC-Bedingungen und unter Zugabe von KCl waren kaum Veränderungen der EFS zu verzeichnen, weshalb hier nur die EFS unter nativen Bedingungen berücksichtigt werden soll:

Die ON-Relaxation zeigte eine Tonusabnahme in der Gruppe der Kontrollpatienten im Median um 1,1 mN/mm^2. Bei den Patienten mit myogener CIPO war keine Tonusänderung während der EFS zu verzeichnen (Median 0,0 mN/mm^2), was einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe bedeutet (p= 0,036). Die Muskelstreifen der Patienten mit neurogener CIPO hingegen reagierten eher mit einer diskreten Kontraktion (ersichtlich an den *negativen* Messwerten). Somit zeigt die ON-Relaxation auch für die neurogene Form der CIPO eine statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe (p= 0,036) (Tabelle 5).

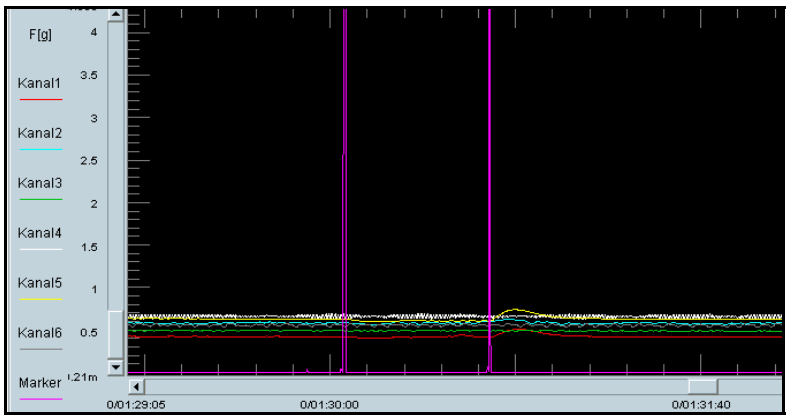
Tabelle 5:
Tonusänderung unter der EFS (Negativwerte der ON-Relaxation entsprechen Kontraktionen) (# = signifikant, p<0,05)

Tonusänderung unter EFS, nativ	Patienten mit myogener und neurogener CIPO versus Kontrollpatienten		
	myogene CIPO	neurogene CIPO	Kontrollpatienten
	Median [mN/mm^2]	Median [mN/mm^2]	Median [mN/mm^2]
Tonusabnahme während EFS	0,00 #	-1,21 #	1,19
Tonuszunahme nach EFS	0,01 #	4,02	8,23

Nach Beendigung des Stromflusses führte die Off-Kontraktion – ebenfalls unter nativen Bedingungen - in der Kontrollgruppe zu einer Tonuszunahme von 8,23 mN/mm^2 im Median. Bei den Patienten mit myogener CIPO kam es zu keiner nennenswerten Tonuserhöhung (Median 0,01 mN/mm^2), sodass die OFF-Kontraktion signifikant gegenüber der Kontrollgruppe vermindert war (p= 0,009). Im Rahmen der OFF-Kontraktion war bei den Patienten der neurogenen CIPO eine mäßige Tonuszunahme um 4,02 mN/mm^2 zu verzeichnen, welche im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant vermindert, aber auch im Vergleich zur myogenen CIPO nicht signifikant erhöht war.



24a



24b

Abbildung 24:
ON- Relaxation und OFF-Kontraktion unter elektrischer Feldstimulation
a: normale Reaktion eines Kontrollpatienten mit Relaxation der Muskelstreifen für die Dauer des Stromflusses und typischer „OFF-Kontraktion“ nach Beendigung des Stromflusses
b: Reaktion eines Patienten mit myogener CIPO auf die EFS: keine Relaxation während des Stromflusses und minimale Kontraktion von 2 Muskelstreifen nach Beendigung des Stromflusses

Insgesamt zeigte sich bei den Muskelstreifen der myogenen CIPO weder eine ON-Relaxation noch eine OFF-Kontraktion (Abbildung 24). Im Vergleich zur Kontrollgruppe reagierten die Muskelstreifen der neurogenen CIPO auf den Stromreiz eher mit einer diskreten Kontraktion als mit einer Relaxation und nach Beendigung der EFS mit einer geringeren OFF-Kontraktion (Abbildung 25).

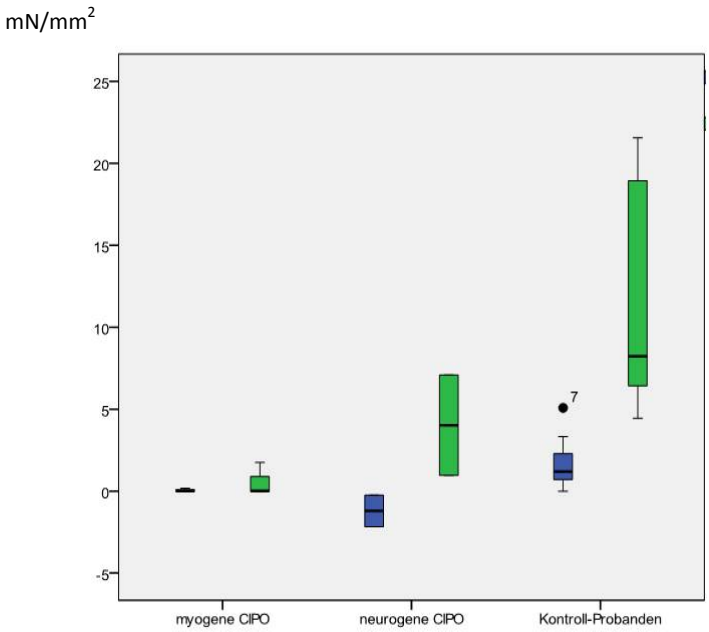


Abbildung 25:
Tonusabnahme (blau) während der ON-Relaxation der EFS und Tonuszunahme (grün) der OFF-Kontraktion nach der EFS (Negativwerte während der ON-Relaxation [blau] entsprechen Kontraktionen)

Alle Daten der Organbad-Versuche zusammenfassend betrachtet, zeichnet sich die CIPO durch verminderte Spontanaktivitäten und eine mangelnde Reaktion auf die elektrische Feldstimulation aus. Die Versuchsabschnitte unter NANC-Bedingungen und NO-Blockade waren nicht richtungsweisend. Diagnostisch wertvoll waren hingegen die Beurteilung des aktiven Grundtonus und der EFS unter nativen Bedingungen sowie die Auswertung der Kontraktionsamplitude nach muskulärer Stimulation durch KCl. Letztere erlaubte am deutlichsten eine Differenzierung zwischen myogener und neurogener Form der CIPO.

Gesamtübersicht der Ergebnisse von Histologie und Organbad

Untersuchung	Merkmal / Patienten-Nummer	1	2	3	4	5	Kontrolle Erwachsene
Histologie	eosinophiles Infiltrat	+	+	-	-	n.m.	2/10
	Zottenatrophie	+	+	-	-	n.m.	-
	Fibrose der Muskulatur	++	+	(+)	-	n.m.	1/10
	Nervenfasergehalt (Muskulatur)	↓↓	↓	n	↓	n.m.	regelmäßig
	NZ-Zahl pro 100 mm DWL (Pl. my.)	↑↑↑	↓	n	↓↓	n.m.	580-1014
	ICC-Verteilung	↓↓	↓↓	↓	↓	n.m.	regelmäßig
	Muskelmarker SMA	schwach	schwach	kräftig	kräftig	n.m.	gleichmäßig, kräftig
	SMA mit Randsaum	-	-	+	+	n.m.	10/10
	HDAC 8 mit Randsaum	-	-	-	-	n.m.	8/10
Organbad	ACh-Treppe	kaum	kaum	mäßig	mäßig	kaum	gut
	aktiver Grundtonus (Median [mN/mm^2])	0,7	1,3	4,2	2,6	3,1	4
	ON-Relaxation	-	-	Kontraktion	-	-	mild
	OFF-Kontraktion	-	-	gut	↓↓	↓↓	gut
	Amplitude nativ (Median [mN/mm^2])	1,2	0,12	3,5	0,5	3,3	4,4
	Amplitude KCl (Median [mN/mm^2])	0,2	<0,1	6,5	4	0,8	5,2
CIPO-Form		**Myogen**	**Myogen**	**Neurogen**	**Neurogen**	**Myogen**	***I***

Legende
n.m.: nicht möglich
Pl. my.: Plexus myentericus
NZ: Nervenzellen
DWL: Darmwandlänge
ICC: interstitielle Cajal-Zellen

Diskussion

Die CIPO und ihre Diagnostik

Die koordinierte neuromuskuläre Funktion des Magen-Darm-Traktes ist Voraussetzung für eine normale Darmtätigkeit und Ernährbarkeit des Menschen. Störungen dieser Funktion werden als neuromuskuläre gastrointestinale Erkrankung bezeichnet (NMGID, **n**euro**m**uscular **g**astro**i**ntestinal **d**isorder). Die NMGID ist dennoch unscharf definiert und stützt sich meist auf klinische, radiologische, spezielle physiologische oder histologische Kriterien (Knowles, 2007). Entsprechend sind die Einteilungen der einzelnen unter NMGID subsummierten Erkrankungen eher basierend auf Symptomen (z.B. Reizdarmsyndrom, idiopathische Obstipation, funktionelle Dyspepsie) oder auf spezielle Messverfahren (z.B. enterische Dysmotilität, Slow-Transit-Obstipation, adulte CIPO) (Wingate et al., 2002). Eindeutige ursächliche Kriterien zur Einteilung der verschiedenen Erkrankungen zu finden, insbesondere durch spezielle histologische Untersuchungen (wie z.B. die Erhöhung der Acetylcholinesterase beim Morbus Hirschsprung), sind Gegenstand aktueller Studien. Die Problematik besteht u.a. darin, dass die histologischen Auffälligkeiten vieler NMGID entweder nur als diskrete Histopathologien vorliegen oder lediglich durch aufwändige immunhistologische oder elektronenmikroskopische Untersuchungen detektierbar sind. Da viele verschiedene NMGID zudem ähnliche Auffälligkeiten der enterischen Nervenplexus oder der enterischen Muskulatur zeigen, eignen sich diese nur bedingt für eine genauere Differenzierung. Außerdem steht die rein deskriptive Beurteilung von morphologischen Auffälligkeiten nicht unbedingt in kausalem Zusammenhang zur Motilitätsstörung.

Eine erste Beschreibung und Prägung des Begriffes CIPO wurde 1958 durch Dudley vorgenommen (Dudley et al., 1958). Es folgten Einteilungen der CIPO in den 1980’er Jahren durch Krishnamurthy und Schuffler, basierend auf histologischen Untersuchungen (Krishnamurthy und Schuffler, 1987). Inzwischen werden die Unterformen nach immunhistologischen Kriterien anhand von Ganzwandbiopsien in neuropathische, myopathische und mesenchymale Ursachen eingeteilt, entsprechend der Auffälligkeiten des enterischen Nervensystems, der glatten

Muskulatur oder der interstitiellen Cajal-Zellen. Dabei wird betont, dass jede dieser Pathologien bereits eine Motilitätsstörung auslösen kann, kombinierte Formen jedoch wahrscheinlicher sind (de Giorgio et al., 1994).

Es gibt eine Vielzahl von Studien über die CIPO mit großen Patientenkollektiven, die sich mit Diagnostik und Therapie befassen. Dabei handelt es sich jedoch meist um Studien, die Erwachsene oder gemischte Patientenkollektive mit Jugendlichen und Erwachsenen untersuchten. Gerade im Erwachsenenalter unterscheidet sich die CIPO jedoch erheblich von der angeborenen Form, da es sich meist um eine Erkrankung geringerer Ausprägung handelt oder diese im Rahmen einer anderen Grunderkrankung erworben wird, wie z.B. Diabetes mellitus, systemischer Lupus erythematodes, Amyloidose, Chagas Erkrankung, Muskeldystrophie oder Nebenwirkungen von Medikamenten (Hirano und Pandolfino, 2000). Die CIPO im Kindesalter ist zwar ebenfalls gekennzeichnet durch eine Störung der neuromuskulären intestinalen Funktion im Sinne einer starken Hypomotilität, welche im Gegensatz zum Erwachsenenalter allerdings durch die konsekutiven Komplikationen mit einer frühen hohen Morbidität und Mortalität einhergeht. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung ist das diagnostische und therapeutische Vorgehen bei Kindern mit CIPO immer noch sehr inhomogen. So werden in der Literatur wiederholt Erfahrungen in Form von Fallberichten mit eher kleiner Patientenzahl ausgetauscht. Die beiden größten Studien über Outcome und Lebensqualität der CIPO bei Kindern stammen von Mousa und Faure, die 85 bzw. 105 Kinder über ca. 20 Jahre verfolgten, allerdings keine standardisierte Diagnostik an die Hand gaben (Mousa et al., 2002; Faure et al., 1999).

Letztendlich handelt es sich auch heute noch um eine Ausschlussdiagnose, d.h. die Diagnose der angeborenen CIPO wird nach Ausschluss multipler anderer Diagnosen gestellt und im Rahmen einer histologischen Untersuchung von Ganzwandbiopsien „bestätigt“. Im frühen Kindesalter ist der Ausschluss eines Morbus Hirschsprung von herausragender Bedeutung, da hier die Symptomatik sehr ähnlich ist und eine Differenzierung allein anhand der Klinik häufig nicht möglich ist. Die Diagnose des Morbus Hirschsprung wird radiologisch gestellt, enzymhistochemisch durch Nachweis erhöhter Acetylcholinesteraseaktivität in der Mukosa sowie durch Fehlen von Ganglien in der Submucosa bestätigt und kann

durch Resektion des aganglionären Segmentes behoben werden. Bei allen in dieser Studie untersuchten Patienten wurde entweder im Rahmen der Routine-Diagnostik im Institut für Pathologie oder bereits im Vorfeld in anderen Kliniken ein Morbus Hirschsprung ausgeschlossen.

Da fast alle Patienten mit CIPO die Zeichen eines Subileus aufweisen, sind wiederholte Laparoskopien oder Laparotomien zum Ausschluss einer mechanischen Obstruktion häufig. Im Rahmen dieser operativen Revisionen sind definitionsgemäß keine mechanischen Obstruktionen ersichtlich und die in der Routine durchgeführten histologischen Untersuchungen liefern keine spezifischen Pathologien.

Aktuelle histologische Kriterien speziell für die glatte Darmwandmuskulatur bei Kindern mit CIPO wurden detailliert von Smith und Milla beschrieben (Smith und Milla, 1997). Diese teilten 11 Patienten in 5 verschiedene Untergruppen ein, wobei für die Einteilung auch Klinik und Konsanguinität mit berücksichtigt wurden. Am auffälligsten waren Zeichen von Fibrose und Atrophie der Tunica muscularis propria sowie die elektronenmikroskopisch darstellbare Vacuolenbildung in den Myozyten. In einigen Fällen konnte eine zusätzliche Schicht der Ringmuskulatur, teils auch mit atypisch gelegenem oder zusätzlichem Nervenplexus nachgewiesen werden.

Ebenso wurden ausführliche histologische Untersuchungen durch Antonucci et al. vorgenommen. In dieser Studie wurden eine Reduktion der myenterischen Nervenzellen, eine Schwellung der Nervenzellkörper (Perikarien), eine Gliazell-Proliferation sowie neuronale intranukleäre Einschlüsse, axonale Degeneration und teilweise eine Hypoganglionose beschrieben (Antonucci et al., 2008). Bei Beurteilung der mesenchymalen Merkmale beschrieben Antonucci et al. eine verminderte ICC-Dichte, Verlust der ICC-Fortsätze und elektronenmikroskopisch eine Schädigung des intrazellulären Zytoskeletts der ICC. Bei der Betrachtung der muskulären Strukturen wurde, wie schon von Smith und Milla beschrieben, eine Fibrosierung und Vakuolisierung in Ring- und Längsmuskulatur ersichtlich.

Leider waren alle diese Einzelbefunde in unterschiedlicher Ausprägung auch im Rahmen anderer NMGID nachweisbar und gelten somit nicht als pathognomonisch für die angeborene CIPO. Kritisch anzumerken ist weiterhin, dass es sich in den vorhandenen Studien um Patienten mit einem langwierigen Leidensweg handelt,

welche zunächst eine unauffällige bzw. unspezifische Routine-Histologie zeigten. Erst in der weiterführenden, speziellen Immunhistologie oder Elektronenmikroskopie wurden subtilere histopathologische Auffälligkeiten ersichtlich, die Anlass für weitere, innovative Untersuchungstechniken gaben.

Obwohl die Organbadtechnik mittlerweile ebenfalls einen festen Stellenwert in der Beurteilung der Darmmotilität hat, wurde die Untersuchung des Dünndarmes von Patienten mit CIPO im Organbad bisher nicht in der Literatur berücksichtigt und diskutiert. Unseres Wissens ist diese Arbeit die erste, die Untersuchungen der Organbadtechnik und spezifischer Immunhistologie bei der angeborenen CIPO kombiniert.

Diskussion der einzelnen Patienten

Um einen Zusammenhang zwischen den erhobenen Ergebnissen aus Histopathologie und Organbaduntersuchungen herzustellen, soll zunächst eine Einzelbetrachtung der Patienten vorgenommen werden.

Patientin 1

Die Patientin 1 zeigte bereits bei ihrer Geburt Obstipationssymptome und wurde bis zur Präparategewinnung für Immunhistologie und Organbaduntersuchung bereits 11mal operiert. Aufgrund der total parenteralen Ernährung hatte sie bis zum 5. Lebensjahr bereits eine Hepatopathie mit Ikterus entwickelt. Nach konsequentem Ausschalten der Dünndarmschlingen durch 3 Stomata über 2 Jahre besserte sich ihr Zustand deutlich. Sie war zum Zeitpunkt der Untersuchung 7 10/12 Jahre alt und in der Lage, Kleinkinder-Portionen zu essen, wobei der Darm den Nahrungsbrei auch nach Umfüllen in die Stomata gut transportierte. Sie benötigte zwar weiterhin die parenterale Ernährung aufgrund einer eingeschränkten Resorptionsfähigkeit, aber die Hepatopathie war rückläufig. Es konnten die Präparate im Rahmen einer Stomarückverlagerung aus dem Ileum gewonnen werden. Die bereits pränatal bekannte Megazystis bestand postnatal weiter. Die Miktion gelang jedoch ohne Probleme, sodass es keiner weiteren Intervention bedurfte.

Die histologischen Untersuchungen der Darmpräparate zeigten eine verschmälerte Muskulatur mit Fibrosierungen. Die neuronalen Marker hingegen zeigten eine

ausgeprägte Hyperganglionose sowohl im Plexus myentericus als auch im Plexus submucosus bei gleichzeitig starker Rarefizierung der Nervenfasern in den Muskelschichten. Somit fanden sich histologische Zeichen einer myopathischen und neuropathischen Ätiologie der CIPO. Auch die Dichte der ICC war deutlich vermindert und zeigte eine atypische Verteilung mit Fehlen der periganglionären ICC an der Seite zur Längsmuskulatur. In der Organbaduntersuchung war kaum Spontanmotilität zu verzeichnen, die Antwort auf die ACh-Stimulation war sehr gering, die EFS ohne Effekt und unter KCl kam es nicht zu einer Steigerung der Kontraktionsamplitude.

Aufgrund der Organbadergebnisse wurde diese Patientin der myogenen CIPO zugeordnet. Die Muskulatur schien nur rudimentär angelegt und nicht stimulierbar zu sein. Die Nervenzellen hingegen waren in übermäßiger Zahl angelegt. Somit scheint es, als sei eine Übermittlung von neuronalen Impulsen auf die Muskelzellen nicht möglich. Angesichts der starken Hyperganglionose ist zu überlegen, ob es hier im Verlauf zu einer Art kompensatorischer Hyperplasie der enterischen Ganglien gekommen ist, wie es teilweise im Tiermodell postuliert wurde (Brehmer et al., 2000). Eine verminderte Übermittlung der neuronalen Impulse auf die Muskelzelle könnte durch die mangelhafte Ausbildung des ICC-Netzwerkes bedingt sein.

Patientin 2

Bei Patientin 2 bestand ebenfalls unmittelbar nach Geburt eine ausgeprägte Symptomatik, weshalb zügig Stomata angelegt und mit einer parenteralen Ernährung begonnen wurden. Aufgrund der Notwendigkeit der totalen parenteralen Ernährung und des Unvermögens, oral zugeführte Nahrung zu transportieren, entwickelte auch sie frühzeitig eine Hepatopathie mit Ikterus und Hepatomegalie. Die ebenfalls bestehende Blasenentleerungsstörung wurde bereits intrauterin mit einem vesico-amnialen Shunt und postnatal mittels Vesicostoma (kontinuierliche Harnableitung ohne Katheterismus) versorgt, dennoch besteht bei dieser Patientin eine kompensierte Niereninsuffizienz. Auch die Versorgung mit einem Ileostoma brachte keine wesentliche Verbesserung der enteralen Transportfähigkeit. Die Probenentnahme erfolgte im Rahmen einer Revision des Ileostomas und

entstammte dabei aus dem Bereich einer segmentalen Dilatation proximal des Stomas.

In den histologischen Untersuchungen zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der vorgenannten Patientin. Die Muskulatur war ebenfalls schmächtig ausgebildet und zeigte Fibrosierungen. Die Anzahl der Nervenzellen im Plexus myentericus lag jedoch leicht unterhalb der 10%-Grenze der Kontrollpatienten, die des Plexus submucosus hingegen im Normalbereich. Auch hier waren die Nervenfasern in der Muskulatur und die ICC deutlich verringert. Die Organbaduntersuchung dieser Patientin ergab ebenfalls eine schlechte Spontanaktivität, mit mangelhaftem Ansprechen auf ACh oder EFS und keiner Steigerung der Kontraktionsamplitude auf KCl.

Daher ordneten wir diese Patientin auch der Gruppe der myogenen CIPO zu. Hier denken wir, dass die zellulären neuronalen Strukturen leicht vermindert bis normal angelegt waren, aber ebenfalls eine Überleitung auf die Muskelzellen durch Nervenfasern und ICC nicht adäquat erfolgte. Die Diskrepanzen zwischen den klinischen Verläufen von Patientin 1 und 2 und dem unterschiedlichen histologischen Bild bei nahezu gleichen Organbadbefunden ließen jedoch weitere Fragen offen. Zu diskutieren ist, ob bei Patientin 2 die zögerliche Beschwerde-besserung trotz entlastender Stomata aufgrund einer ausbleibenden kompensatorischen Hyperganglionose erklärbar ist.

Patient 3

Patient 3 wurde uns im Alter von 2 5/12 Jahren zur weiteren Diagnostik bei zunehmender Verschlechterung der Ernährungssituation und der abdominellen Symptomatik zugewiesen. Die pränatal bestehende Blasenentleerungsstörung mit Megazystis wurde bereits im Vorfeld mit einem gut funktionierenden Vesicostoma versorgt. Im Rahmen der Anlage eines ersten Ileostomas wurden die Ganzwandbiopsien gewonnen. Eine parenterale Ernährung war weder vor noch nach dem operativen Eingriff notwendig, daher bestanden auch keine Einschränkungen der Leberfunktion.

In der histologischen Auswertung zeigte sich die Muskulatur eher unauffällig, mit lediglich diskreten Zeichen einer Fibrosierung. Die Verteilung der Nervenzellen

ergab eine im Normbereich des Kontrollkollektivs gelegene Anzahl für den Plexus myentericus und eine leichte Vermehrung der Nervenzellen im Plexus submucosus. Die Dichte der Nervenfasern war normal. Hinsichtlich der ICC-Verteilung war auffällig, dass die periganglionäre ICC-Flankierung nur mäßig reduziert, dafür aber das interganglionäre ICC-Band deutlich reduziert war. Bei der Organbad-untersuchung war die Spontanaktivität gut darstellbar, aber unter der Norm gelegen. Die Reaktion während der EFS war eher durch eine Kontraktion als durch eine Relaxation gekennzeichnet. Außerdem bestand nach Kalium eine gute Zunahme der Kontraktionsamplitude, sodass wir diesen Patienten der Gruppe der neurogenen CIPO zuwiesen. Da Muskulatur und neuronale Strukturen insgesamt dem Normalbefund entsprachen, war die verminderte Aktivität im Organbad vermutlich am ehesten auf die verminderte Anzahl von ICC (insbesondere der interganglionären ICC) zurückzuführen.

Patientin 4

Die Patientin 4 wurde uns ebenfalls nach einer bereits langwierigen und komplexen Krankheitsgeschichte vorgestellt. Sie wurde bereits 13 mal infolge nekrotisierender Kolitis, Stenosen und Ileusepisoden voroperiert, sodass bei ihr ein funktioneller Kurzdarm mit einer Darmlänge von 120 cm bestand. Trotz Anlage von 2 Stomata gelang keine suffiziente Darmentlastung. Es war frühzeitig eine ergänzende parenterale Ernährung notwendig, wobei die Leberwerte stets im Normbereich lagen. Die Probengewinnung erfolgte in einem Alter von 3 2/12 Jahren im Rahmen einer Stenosenresektion im proximalen Ileum aus dem poststenotischen Darmanteil (ca. 40 cm ab Treitz' Band).

Bei der histologischen Auswertung sahen wir eine kräftige, teils hypertrophe Muskulatur insbesondere der Ringmuskelschicht ohne fibrotische Zeichen. Andererseits bestand eine deutliche Hypoganglionose des Plexus myentericus und eine im unteren Normbereich gelegene Anzahl der Nervenzellen im Plexus submucosus sowie eine reduzierte Nervenfaserdichte. Die Auswertung der ICC ergab eine verminderte Dichte sowohl der periganglionären Flankierung als auch des interganglionären Bandes. In den Organbaduntersuchungen zeigten die Muskelstreifenpräparate zunächst eine mäßige Spontanaktivität und eine mäßige

Reaktion auf ACh. Die EFS zeigte dagegen nahezu keinerlei Reaktion. Auffällig war die deutliche Antwort mit einer Vergrößerung der Kontraktionsamplitude auf KCl.

Daher wurde diese Patientin der Gruppe der neurogenen CIPO zugewiesen. Die Muskulatur schien trotz mangelhafter neuronaler Versorgung durch das enterische Nervensystem gut auf KCl zu reagieren und war bereits hypertrophiert. Eine prästenotische Muskelhypertrophie ist ein bekanntes Phänomen und hinreichend durch wissenschaftliche Untersuchungen belegt. Ob durch die Stenose eine Muskelhypertrophie auch des poststenotischen Darmes verursacht wird, ist bisher nicht beschrieben. Allerdings war im Gegensatz zu allen anderen Patienten im Organbad auffällig, dass nach Vagolyse mit Atropin eine Verminderung der Kontraktionsamplitude eintrat und diese nach Sympathikus-Blockade rückläufig war. Somit ist ein überproportionaler Parasympathikotonus durchaus zu diskutieren.

Patientin 5

Die Patientin 5 wurde uns erstmalig im Alter von knapp 2 Jahren zur Diagnostik und Therapieoptimierung zugewiesen. Bei ihr kam es erst während der Nahrungsumstellung nach der Stillzeit zu einer typischen CIPO-Symptomatik. Im Verlauf mussten bei ihr 2 Stomata zur Darmentlastung angelegt und eine parenterale Ernährung begonnen werden. Eine Hepatopathie bestand bis dato nicht. Die bestehende Blasenentleerungsstörung wurde mit einem katheterisierbaren Stoma versorgt. Im Rahmen dieser Eingriffe wurde eine Biopsie des terminalen Ileums zur Organbad-Untersuchung entnommen. Leider reichte das zur Verfügung stehende Präparat nicht zur histologischen Untersuchung, sodass bei dieser Patientin lediglich Daten der Organbad-Untersuchung vorlagen.

Bei der durchgeführten Organbad-Untersuchung waren die spontanen Kontraktionen diskret vorhanden, der aktive native Grundtonus aber vermindert. Es ließ sich zwar keine Relaxation auf die EFS verzeichnen, dafür aber eine diskrete Rebound-Kontraktion. Unter Stimulation mit Kaliumchlorid kam es nicht zu einer Steigerung der Kontraktionsamplitude, sodass wir diese Patientin ebenfalls der Gruppe der myogenen CIPO zuordneten.

Diskussion der Methodik

Von den Patienten dieser Untersuchung lagen Vollwandpräparate aus verschiedenen Dünndarmabschnitten vor. Obwohl bei der Erkrankung der CIPO sowohl Dünn- als auch Dickdarm betroffen sind, lag das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung des Dünndarms, da dieser für die Resorptionsleistung von Nährstoffen einen bedeutenderen Anteil als das Kolon hat. Bei den Kontrollpatienten untersuchten wir jeweils das terminale Ileum, da dieses aufgrund der arteriellen Versorgung bei einer rechtsseitigen Hemikolektomie mit entfernt werden musste. Die Probenentnahme bei den CIPO-Patienten richtete sich jedoch nach der Klinik. So wurde bei 2 Patienten (Nr. 3 und 5) eine Vollwandbiopsie im Rahmen einer ersten Laparotomie zur Stomaanlage im Bereich des terminalen Ileums entnommen. Bei den anderen 3 Patienten (Nr. 1, 2 und 4) wurden die Präparate im Rahmen von Stoma-Rückverlagerung, Stoma-Revision oder Stenosenresektion entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, kein narbig verändertes Gewebe den Untersuchungen zuzuführen, sondern die Gewebe sicher im makroskopisch unauffälligen Areal zu entnehmen. Kontrollpatienten altersgemäß gematcht zu untersuchen war aus ethischen Gründen nicht möglich, da eine Laparotomie oder Laparoskopie mit Darmeröffnung und -naht mit den entsprechenden perioperativen Komplikationen zu Studienzwecken nicht vertretbar ist. Alle im Studienzeitraum in unserer Klinik laparotomierten Kinder ohne Verdacht auf CIPO, deren Darm eröffnet wurde, wiesen eine Erkrankung des Darmes in Form von Stenose, Entzündung oder eines Kurzdarms auf. Da dies jedoch definierte Ausschlusskriterien waren, wurden diese Proben zwar untersucht, jedoch nicht zum Vergleich herangezogen.

Bei dringendem klinischem Verdacht auf CIPO sollte eine Diagnostik durch Entnahme von Vollwandbiopsien durchgeführt werden. Schleimhautbiopsien oder endoskopisch zu gewinnende Zangen- oder Saugbiopsien sind hierfür nicht ausreichend. Mittlerweile ist die Laparoskopie auch im Kleinkindalter gut etabliert und sicher, sodass auch eine laparoskopische Entnahme von Ganzwandbiopsien ohne wesentliche Erhöhung von Mortalität oder Morbidität möglich ist (Knowles et al., 2008). Zu beachten ist allerdings, dass die Darmmotilität der CIPO-Patienten durch jegliche Manipulation empfindlich gestört wird und eine Erholung nur sehr zögerlich, teilweise innerhalb mehrerer Wochen, erfolgt (de Giorgio et al., 2004).

Des Weiteren wird durch jede erneute Laparotomie die spätere intestinale Autonomie gefährdet, sodass diagnostische Laparotomien oder Laparoskopien ohne weitere therapeutische Konsequenz nur zurückhaltend durchgeführt werden sollten. Dementsprechend wurden die Darmpräparate bei unseren Studienpatienten immer im Rahmen einer therapeutischen Intervention entnommen.

Histologie

Die Auswahl der histologischen Untersuchungen richtete sich nach den hypothetischen Fragestellungen bezüglich Auffälligkeiten der Darmwandmuskulatur, des ENS sowie der ICC-Verteilung und der dafür etablierten immunhistochemischen Marker (Wedel et al., 2006).

Die Beurteilung der Muskeldicke wurde in dieser Arbeit nicht herangezogen, da die Präparate zur Fixierung teilweise als Ring belassen und teilweise als Streifenpräparate auf Korkplatten fixiert wurden. Dadurch war eine artifizielle Verschmälerung der Muskulatur durch Zug nicht ausgeschlossen und die Dickenmessung der Muskulatur nicht korrekt durchführbar.

Durch Inkubation mit PGP 9.5, einem pan-neuronalen Antikörper, werden sowohl neuronale Perikarya als auch deren Fortsätze zuverlässig dargestellt. Diese Markierungseigenschaften erlaubten die eindeutige Identifikation von einzelnen Nervenzellen, Ganglienformationen und Nervenfasersträngen, d.h. von allen neuronalen Komponenten, aus denen sich das ENS zusammensetzt. Eine zusätzliche Markierung mit dem glialen Marker Protein S-100 war nicht erforderlich, da sich die Gliazellen auch durch eine einfach durchzuführende Hämalaun-Gegenfärbung klar von den immunhistochemisch markierten Nervenzellen abgrenzen ließen (Sams et al.. 1992; Romanska et al.. 1993; Krammer et al.. 1993 b; Park et al.. 1995; Wedel et al.. 1998a, b).

Durch zusätzliche Inkubation mit Hu C/D ließen sich speziell die Nervenzell-Somata innerhalb der Ganglien darstellen, sodass eine präzise und schnelle Auszählung der Nervenzellzahl gewährleistet war.

Durch c-Kit wurden die ICC und ihre Fortsätze um Ganglien herum und innerhalb der Muskelschichten eindeutig dargestellt. Die ebenfalls markierten Mastzellen ließen sich aufgrund ihrer charakteristischen Form gut von den ICC abgrenzen.

Wie bereits erwähnt, wurden von unterschiedlichen Autoren diverse Kriterien zur Beurteilung von histologischen Präparaten zugrunde gelegt und verschieden gewertet. Auch die Beurteilung eines einzigen Präparates durch mehrere unabhängige Untersucher birgt die Gefahr einer unterschiedlichen Bewertung. Dies hat sich bereits bei der Festlegung von histopathologischen Parametern zur Definition der sog. intestinalen neuronalen Dysplasie (IND) gezeigt. Dabei wurden diverse diagnostische Kriterien für die histologische Beurteilung zugrunde gelegt, die in weiteren Untersuchungen nicht reproduzierbar oder teilweise sehr von der Erfahrung und Einschätzung des jeweiligen Untersuchers abhängig waren (Koletzko et al., 1999).

Divergierende Ergebnisse aufgrund subjektiver Einschätzungen ergeben sich insbesondere bei der morphometrischen Analyse der enterischen Ganglien. Speziell im Plexus myentericus sind die Ganglien häufig großflächig und schlecht voneinander abgrenzbar, sodass die Anzahl der Nervenzellen pro Ganglion bzw. die Anzahl der Ganglien pro definierte Darmwandlänge (DWL) zwischen verschiedenen Untersuchern variieren kann. Die submucösen Ganglien sind meist kleiner und liegen in der breiten Tela submucosa in 3 verschiedenen Plexus weit auseinander, sodass hier im Allgemeinen keine Probleme in der Abgrenzung bestehen. In der immunhistochemischen Hu C/D-Markierung ist die isolierte Darstellung der Nervenzellen möglich, ohne Markierung des gesamten Ganglions. Daher ist die genaue Anzahl der Nervenzellen pro definierte DWL unabhängig von der Erfahrung des Untersuchers sicher zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Auswertung der Nervenzellen pro 100 mm DWL bevorzugt, wobei die Länge der Darmwand stets auf Höhe des Plexus myentericus gemessen wurde. Die Auswertung der enterischen Ganglienzahl wurde dementsprechend nicht berücksichtigt.

Organbadtechnik

Ergänzend zu den morphologischen Beschreibungen der strukturellen Darmwandauffälligkeiten, interessiert bei NMGID mit intestinalen Motilitätsstörungen auch das funktionelle Defizit derjenigen Zellpopulationen, die an der Vermittlung der intestinalen Motilität beteiligt sind. Mittels *in-vivo* Untersuchungen (Messung der ösophagealen oder antroduodenalen Motilität, Rektummanometrie) ist die Motilität des jeweiligen Patienten in den entsprechenden Darmabschnitten zwar untersuchbar; Wirkungen von inhibitorischen oder exzitatorischen Pharmaka sind jedoch nur begrenzt prüfbar ohne die Individuen zu gefährden (Connor und Di Lorenzo, 2006). Außerdem ist die Aussagekraft dieser Untersuchungen begrenzt, da nicht alle Bereiche des Darmes mit Sonden erreichbar sind.

Mit der Organbadtechnik ist die Kontraktilität sämtlicher glattmuskulärer Organsysteme visualisierbar. Durch Gabe von entsprechenden Neurotransmittern bzw. deren Antagonisten lassen sich die an der Motilität beteiligten Zellverbände systematisch prüfen. Mittlerweile haben viele Arbeitsgruppen die Organbaduntersuchung in tierexperimentellen Versuchen etabliert, sodass das Wissen um die Wirksamkeit von enterischen Neurotransmittern und Rezeptoren stetig wächst. Neben den physiologischen Abläufen der Darmkontraktilität/-motilität wurde in vielen Arbeiten auch der Einfluss von Medikamenten und operativen Manipulationen untersucht (Aulí et al., 2008; Wehner et al., 2009). Die meisten Arbeiten hierzu sind weitgehend tierexperimentell; es stehen nur wenige Veröffentlichungen zur Organbaduntersuchung mit humanem Gewebe zur Verfügung. Und erst 2009 haben Bär et al. bei obstipierten Patienten erste therapeutische Schlüsse ziehen können, nachdem sie die motilitätssteigernde Wirkung von E. coli Nissle 1917-Überständen auf die Kolonwand untersucht haben (Bär et al., 2009). Organbaduntersuchungen bei dem Krankheitsbild der CIPO liegen bisher nicht vor.

Bei Untersuchung der Muskelstreifenpräparate der CIPO-Patienten im Organbad fiel in allen Untersuchungsabschnitten eine verminderte Kontraktionsamplitude der Spontanmotorik auf. Eine Vitalitätsminderung durch präparatorische oder andere Einflüsse konnte ausgeschlossen werden, da nach Vorversuchen mit Kolongewebe

und Optimierung der Versuche für die Untersuchung am Dünndarm ein standardisiertes Vorgehen festgelegt und für alle weiteren Untersuchungen angewendet wurde. Außerdem wurde stets die korrekte Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung für jede neue Organbaduntersuchung durch eine Blutgasanalyse (BGA) geprüft. In der von uns verwendeten Lösung bestand ein leicht erhöhter Gehalt an Kalium und Glucose. Dies wurde bewusst so gewählt, da die Muskelstreifenpräparate über den Zeitraum der Versuche von 4 h nicht durchblutet wurden, sondern eine Ernährung per diffusionem erfolgte. Um eine ausreichende intrazelluläre Versorgung zu gewährleisten, wurden Kalium- und Glucose-Konzentrationen an der oberen physiologischen Normgrenze gewählt.

Es bestand aufgrund begrenzter Verfügbarkeit und Größe der Präparate meist nur die Möglichkeit Ring- oder Längsmuskulatur zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden stets Ringmuskelstreifen untersucht, da in Voruntersuchungen besser auswertbare Ergebnisse erzielt wurden und dies in anderen Arbeitsgruppen ebenso gehandhabt wird (Aulí et al., 2008).

Die Änderungen des Muskeltonus wurden durch Tonuszu- oder -abnahme beschrieben. Hierbei wurde die Differenz zwischen maximalem bzw. minimalem Absolutwert und dem korrespondierenden Grundtonus bestimmt. Die im Rahmen anderer Arbeiten übliche Berechnung von Relativwerten, welche unabhängig von Messungenauigkeiten bei Längen- und Gewichtsbestimmung ist, war aufgrund der sehr kleinen Kontraktionsamplituden in der CIPO-Gruppe nicht möglich. Somit birgt diese Arbeit ein diskret höheres Risiko an Messungenauigkeiten bei der Berechnung der Organbad-Daten. Da die Unterschiede der Gruppe der myogenen CIPO zur Kontrollgruppe jedoch stets signifikant waren, treten diese möglichen Messungenauigkeiten in den Hintergrund.

Da mit der Organbadtechnik die Kontraktilität glattmuskulärer Organe prüfbar ist, bietet sie sich trotz des hohen apparativen und zeitlichen Aufwandes bei Erkrankungen mit Motilitätsstörungen an. Alle unsere CIPO-Patienten wurden durch Transportstörungen des in Länge und Schichtung normal angelegten Darmes auffällig. Somit ist die Hypomotilität der Darmwand die herausragende Pathologie der CIPO-Patienten und die Erfassung und Bewertung der verminderten Kontraktilität durch die Organbadtechnik von prognostischem Wert.

Diskussion der Ergebnisse

Richtungsweisende Befunde der Immunhistologie

In der quantifizierenden Analyse war auffällig, dass trotz vergleichbarer klinischer Symptomatik der CIPO die Nervenzellanzahl nicht einheitliche Veränderungen aufzeigte, sondern entweder pathologisch erhöht, erniedrigt oder normalverteilt war. Daraus lässt sich ableiten, dass der kindlichen CIPO keine uniforme Störung des ENS zuzuordnen ist, sondern ein heterogenes Bild aus verschiedenen Formen einer intestinalen Innervationsstörung aufzeigen kann.

Darüber hinaus hatte sich die Symptomatik im Laufe der Entwicklung der von uns betreuten Patienten durchaus verändert. Einerseits kam es bei 2 Patienten (Nr. 4 und 5) innerhalb der ersten Lebensjahre zu einer Progredienz der Erkrankung, was den Beginn der parenteralen Ernährung notwendig machte. Andererseits konnten wir bei den beiden älteren Patienten (Nr. 1 und 2) eine Befundverbesserung der Transportleistung des Darmes nach suffizienter Stomaversorgung verzeichnen. Ursächlich für die Befundbesserung können verschiedene Mechanismen diskutiert werden: eine verzögerte Entwicklung oder Reifung des enterischen Nervensystems und/oder eine Adaptation der Nervenzellen auf eine muskuläre Störung.

Mehrere Publikationen u.a. von Faussone-Pellegrini et al. konnten nachweisen, dass die Entwicklung des ENS nach Geburt nicht abgeschlossen ist (Faussone-Pellegrini et al., 2007; Matini et al., 1997). Dies begründet sich u.a. auch in dem sich steigernden Anspruch an die Darmwand, innerhalb des ersten Lebensjahres zunehmend komplexere Nahrung aufspalten zu müssen. Auch die ICC-Plexus entwickeln sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten des intrauterinen Wachstums, und deren Vernetzung wird postnatal weitergeführt. Nakano et al. zeigten in ihrer Arbeit 2008 an Schweinen, dass die kontraktilen Proteine in den glatten Muskelzellen des inneren Analsphinkters bei Frühgeborenen vermindert waren, hingegen sie bei Reifgeborenen normal ausgebildet waren und schlussfolgerten damit, dass Obstipationssymptome bei frühgeborenen Kindern auf einer Unreife des ENS beruhen könnten (Nakano et al., 2008). In der Fallbeschreibung von Hugot et al. wurde 1992 berichtet, dass eine Nachreifung der enterischen Ganglienzellen bei

einem Neugeborenen im 4. Lebensmonat histologisch gesichert werden konnte (Hugot et al., 1992). Bei den CIPO-Patienten mit auffälligem ENS ist somit zu überlegen, inwieweit eine starke Verzögerung der Nervenzell-Reifung eine Rolle spielt.

Eine andere Hypothese wäre – insbesondere für unsere Patientin 1 mit myogener CIPO und der ausgeprägten Hyperganglionose – eine Adaptation des ENS an die muskulär beeinträchtigte Darmwand. Angesichts der starken Hyperganglionose mit über 1700 NZ/100 mm DWL ist zu diskutieren, ob sich im Verlauf eine kompensatorische Hyperplasie der enterischen Ganglien entwickelt hat. Im Tiermodell konnte bereits in den fünfziger Jahren gezeigt und 1995 erneut bestätigt werden, dass eine neuronale Plastizität besteht, welche Reparations- und Adaptationsvorgänge des ENS auslösen können (Filogamo, 1954; Filogamo und Cracco, 1995; Brehmer et al., 2000). Es wurde postuliert, dass hypertrophe Muskelzellen eine neuronale Differenzierung induzieren. Dies bestätigte auch ein Fallbericht von di Nardo, in dem durch eine ausgeprägte Stenose zunächst eine kompensatorische Hypertrophie und erst später eine Degeneration von enterischen Nervenzellen nachgewiesen wurde (di Nardo et al., 2006).

Andererseits könnte die bei Patient 1 und 2 vorhandene Fibrosierung der intestinalen Muskulatur eine „Verbesserung“ der Symptomatik herbeiführen. Durch die Fibrose ist, insbesondere nach Entlasten des Darmes durch Stomata, eine Darmdilatation weniger möglich. Die so herbeigeführte Verschmälerung des Darmlumens fördert zwar nicht die Peristaltik, verringert aber die Stase des Chymus und damit die BFD, die wiederum ihrerseits eine hemmende Wirkung auf die verbleibende Darmmotilität hat (Husebye et al., 2001).

Die Bedeutung der ICC für die Vermittlung der gastrointestinalen Motilität ist im letzten Jahrzehnt zunehmend in das wissenschaftliche Interesse gerückt. So gibt es mittlerweile viele Berichte über strukturelle Defizite der ICC-Netzwerke bei diversen NMGID. Meist handelt es sich dabei um eine verminderte Dichte der ICC-Geflechte in einem oder mehreren ICC-Plexus. Auch bei dem Krankheitsbild der angeborenen CIPO wurde über Auffälligkeiten der ICC berichtet. Isozaki et al. konnten bereits 1997 bei 2 Kindern mit CIPO eine verminderte Dichte der ICC beobachten (Isozaki et al., 1997). Struijs et al. konnten sogar erstmals einen totalen ICC-Verlust bei

einem Kind mit CIPO im terminalen Ileum und dem gesamten Kolon nachweisen. Die Dichte der ICC oral des terminalen Ileums war dabei normal, ebenso diverse untersuchte Muskelmarker (Struijs et al., 2008).

In unserem Kollektiv war ebenfalls bei allen CIPO-Patienten eine signifikante Verminderung der ICC-Dichte darstellbar. Diese trat homogen sowohl bei dem interganglionären ICC-Netzwerk als auch bei der periganglionären ICC-Flankierung auf.

Elektronenmikroskopisch konnte den ICC eine „Vermittlerposition“ zwischen Nerven- und Muskelzelle zugeschrieben werden. Furness postulierte, dass die enterischen Nervenzellen einen räumlich engeren Kontakt zu den ICC haben und somit die Neurotransmitter zunächst die ICC erreichen (Furness, 2006). Einem direkten Transmitterübertritt zwischen Nerven- und Muskelzelle kommt aufgrund der größeren Distanz zwischen den beiden Zelltypen eine untergeordnete Bedeutung zu, sodass eine Verminderung der ICC bei Motilitätsstörungen plausibel erscheint (Furness, 2006; Wedel, 2000). Aufgrund dieser vermuteten „Vermittlerposition“ der ICC ist zu erwähnen, dass unsere Patientin 1 neben der Hyperganglionose auch eine Rarefizierung der ICC wie die übrigen CIPO-Patienten aufwies und sich dadurch die schwere intestinale Motilitätsstörung plausibel erklären ließe. Die erwähnte klinische Besserung dieser Patientin ist andererseits eventuell auf eine bessere Vernetzung der hypertrophierten Nervenzellen zu den Muskelzellen zurückzuführen, welches dem Überspringen der ICC-Funktionsebene gleich käme.

Interessant war zusätzlich die ausgeprägtere Rarefizierung der ICC-Flankierung zwischen Ganglion und Längsmuskulatur als zwischen Ganglion und Ringmuskulatur. Dieses Phänomen wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Die Auswirkung dieser histopathologischen Variante auf die intestinale Motilitätsstörung bleibt entsprechend spekulativ.

Mit der beschriebenen „Vermittlerposition“ der ICC zwischen Nerven- und Muskelzelle ergibt sich offensichtlich eine zusätzliche ätiologische Komponente der intestinalen Motilitätsstörung, die bei allen untersuchten Kindern, unabhängig von den neuro- und myopathischen Veränderungen, auftrat. Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese von de Giorgio et al. 2004, dass der CIPO zumeist Kombinationen verschiedener histopathologischer Entitäten zugrunde liegen.

Richtungsweisende Befunde der Organbadtechnik

Obwohl sich in den letzten 2 Jahren über 200 Einträge in den medizinischen Datenbanken zur Organbadtechnik finden lassen und diverse intestinale Motilitätsstörungen mit NMGID histologisch vielfältig untersucht wurden, finden sich nur wenige Studien, die das Spektrum der NMGID mit Hilfe der Organbadtechnik näher charakterisiert haben. Die meisten Arbeiten haben vor allem physiologische Parameter der intestinalen Motilität und deren Beeinflussung durch verschiedene enterische Neurotransmittersysteme untersucht. Hinsichtlich klinisch ausgerichteter Fragestellungen wurden verschiedene gastrointestinale Erkrankungen mit der Organbadtechnik analysiert. Unter anderem gibt es Organbaduntersuchungen zu intraabdominellen Prozessen wie Ileus, Peritonitis oder Divertikulitis, in denen ebenfalls pathologische Motilitätsmuster im Sinne einer eingeschränkten Kontraktilität der Darmwand nachgewiesen werden konnten (Stoffels et al., 2009; Koyluoglu et al., 2008).

Demgegenüber stehen für das Spektrum der NMGID keine Daten über systematische Organbaduntersuchungen zur Verfügung. Dabei ist - im Gegensatz zur histologischen Untersuchung struktureller Störungen - mit der Organbadtechnik eine funktionelle Charakterisierung der beeinträchtigten intestinalen Motilität möglich. So lässt sich nach Ausschaltung des sympathischen und parasympathischen Systems unter sog. NANC-Bedingungen das ENS und die Funktionalität seiner intrinischen Transmittersysteme selektiv überprüfen. Dies ist ein gängiges Vorgehen, um die fehlerhafte Steuerung der intestinalen Motilität auf enterischer Funktionsebene zu detektieren (Undi et al., 2009).

Die normale Spontanaktivität des humanen Dünndarms unterscheidet sich deutlich von den Verhältnissen, wie sie im Kolon angetroffen werden. Im Kolon finden sich die sog. Kontraktionsgruppen im Wechsel mit motorischen Pausen. Im Dünndarm und selbst im terminalen Ileum sind solche Motilitätsmuster mit periodisch und gruppenweise auftretenden Kontraktionen nicht nachweisbar. Dies wurde bereits von Zhao beschrieben und ließ sich bei unserem Kontrollkollektiv bestätigen (Zhao et al., 2008).

Bei allen CIPO-Patienten war die Spontanaktivität hinsichtlich der Kontraktionsamplitude gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Rhythmik an sich nicht aufgehoben war und die CIPO-Patienten eine gleiche Kontraktions-Frequenz wie die Kontrollgruppe aufwiesen. Eine fehlende Koordination, wie sie für die CIPO im Rahmen der gastroduodenalen Motilitätsmessung beschrieben wurde, konnten wir somit nicht nachvollziehen (Cucchiara et al., 1994).

Auffällig bei unseren Untersuchungen war der deutlich verminderte aktive glattmuskuläre Tonus der Darmwand bei den CIPO-Patienten. Da der aktive Muskeltonus in der Gruppe der neurogenen CIPO besser war als in der Gruppe der myogenen CIPO, spricht dies zwar bei der neurogenen CIPO für vorhandene funktionsfähige Muskelzellen, die aber offensichtlich nicht ausreichend innerviert wurden, um gleichviel Kraft wie die Kontrollgruppe aufzubringen.

Der aktive Grundtonus war bei der myogenen CIPO im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Da der aktive Grundtonus bei den CIPO-Patienten unter NANC-Bedingungen abfiel, scheint insbesondere die parasympathische Komponente einen größeren Anteil an der Aufrechterhaltung der Kontraktilität bei CIPO zu haben.

Sind bei Organbadmessungen lediglich Muskelkontraktionen mit geringer Amplitude zu verzeichnen, kann die Ursache u.a. eine verstärkte inhibitorische Innervation sein. Diese ist beispielsweise bei der primär chronischen Obstipation (PCO) nachweisbar (von Koschitzky, Publikation in Vorbereitung). Im Rahmen der EFS würde diese verstärkte inhibitorische Innervation zu einer gesteigerten ON-Relaxation führen. Für die Erkrankung der CIPO ist daher bei ebenfalls geringer Kontraktionsamplitude eine wichtige Fragestellung, ob die Hypomotilität der spontanen Muskelkontraktionen nicht die Folge einer verstärkten inhibitorischen Innervation sei. Da bei den Muskelstreifenpräparaten der CIPO-Patienten im Rahmen der EFS allerdings keine verstärkte Relaxation auftrat, konnte mit den vorliegenden Daten eine verstärkte inhibitorische Innervation ausgeschlossen werden.

In der Kontrollgruppe führte die Gabe von KCl unter NANC-Bedingungen zu einer ausgeprägten Erhöhung der Kontraktionsamplitude unter Verringerung der

Kontraktionsfrequenz. Auch bei den CIPO-Patienten zeigte sich die kontrahierende Wirkung des KCl, so dass dieser Effekt als ein weiteres Vitalitätsmerkmal herangezogen werden konnte. Dabei sprachen die Muskelstreifenpräparate der myogenen CIPO signifikant geringer auf KCl an, so dass hier ein Defizit der muskulären Komponente postuliert wurde. Die Muskelstreifen der neurogenen CIPO reagierten auf die KCl-Stimulation - ähnlich wie bei der ACh-Gabe - deutlich besser als die Gruppe der myogenen CIPO, sodass hier ein Defizit in den vorgeschalteten Strukturen, den neuronalen Komponenten, vorzuliegen schien.

Diese funktionellen Unterschiede erlaubten den Schluss, dass die Applikation von KCl eine Differenzierung der beiden CIPO-Formen ermöglicht. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass mit dem Versuchsaufbau unseres Organbades das Effektororgan stets die Muskelzelle war. Bei der von uns als myogene CIPO bezeichneten Form bestand sicher ein Funktionsdefizit der Muskelzelle, wobei aber die vorgeschalteten neuronalen Elemente nicht gesondert prüfbar waren.

Darüber hinaus muss angemerkt werden, dass neben Defekten des ENS und der glatten Muskulatur bei allen CIPO-Patienten – unabhängig von der myogenen oder neurogenen Form – auch eine verminderte Dichte der myenterischen ICC vorlag. Dies spricht dafür, dass neben der neurogenen und myogenen Ätiologie auch eine mesenchymale Komponente zu berücksichtigen ist, die bisher wenig Beachtung gefunden hat.

Zusammenfassend lässt sich aufgrund der Organbad-Untersuchungen festhalten, dass sich die CIPO durch eine verminderte Spontanaktivität und eine mangelhafte Reaktion auf die EFS auszeichnete. Die Versuchsabschnitte unter NANC-Bedingungen und NO-Blockade waren nicht richtungsweisend. Diagnostisch wertvoll war hingegen die Beurteilung des aktiven Grundtonus und der EFS unter nativen Bedingungen sowie die Auswertung der Kontraktionsamplitude nach muskulärer Stimulation durch KCl. Letztere erlaubte am deutlichsten eine Differenzierung zwischen myogener und neurogener Form der CIPO.

Zusammenfassung

Die CIPO im Kindesalter ist eine schwerwiegende angeborene Erkrankung mit Hypomotilität des Darmes unklarer Ursache, die mit hoher Morbidität und Mortalität einhergeht. Das Krankheitsbild ist geprägt durch eine gravierende intestinale Motilitätsstörung, welche in eine chronische Ileussituation mündet und keine ausreichende orale Ernährbarkeit gewährleistet. Für das Überleben der Kinder ist neben der parenteralen Ernährung die Entlastung des Darmes durch Stomata und die Prophylaxe der bakteriellen intestinalen Fehlbesiedlung von herausragender Bedeutung. Der Erfolg dieser symptomatisch orientierten Therapie ist jedoch von einer gezielten und raschen Diagnosestellung abhängig, da aufgrund der unklaren Ursache eine kausale Behandlung bisher nicht möglich ist.

Hervorgerufen wird die CIPO durch eine noch unklare angeborene Erkrankung der enterischen Nerven und/oder der glatten Muskulatur des Dünndarmes und ggf. anderer glattmuskulärer Hohlorgane. Entsprechend wird zwischen einer neurogenen bzw. myogenen Form der CIPO unterschieden. Insgesamt liegen für die kindliche CIPO nur spärliche Daten zu den morphologisch fassbaren neuro- bzw. myopathischen Veränderungen vor. Funktionelle Untersuchungen zur *in-vitro* Kontraktilität der Darmwand wurden bislang nicht durchgeführt.

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, die der CIPO zugrundeliegenden Störungen sowohl auf struktureller als auch funktioneller Ebene näher zu charakterisieren. Durch spezifische immunhistochemische Techniken wurden die glatte Muskulatur, das enterische Nervensystem (ENS) sowie die intestinalen Schrittmacherzellen (interstitielle Cajal-Zellen, ICC) untersucht und morphometrisch ausgewertet. Mit Hilfe der Organbadtechnik wurde das isometrische Kontraktilitätsverhalten von Muskelstreifenpräparaten unter nativen und non-adrenergen, non-cholinergen (NANC-) Bedingungen sowie nach elektrischer Feldstimulation (EFS) und direkter muskulärer Stimulation durch Kaliumchlorid (KCl) analysiert.

Untersucht wurden Dünndarmpräparate eines Kontrollkollektivs (n=10, Altersspanne 53-84 Jahre) und Dünndarmresektate von Kindern mit CIPO (n=5, Altersspanne 2-8 Jahre).

Die histopathologischen Befunde zeigten bei Patienten mit myogener CIPO eine ausgeprägtere Fibrose der Muskelschichten als bei neurogener CIPO. Die morphometrische Analyse des ENS ergab bei CIPO-Patienten zwar deutliche quantitative Abweichungen zum Normalbefund, allerdings sowohl im Sinne einer signifikanten Abnahme (Hypoganglionose) als auch Zunahme (Hyperganglionose) des ganglionären Nervenzellgehaltes. Damit ließ sich keine einheitliche, für die CIPO pathognomonische intestinale Innervationsstörung nachweisen. Allen CIPO-Patienten gemeinsam war jedoch eine signifikant reduzierte Dichte der ICC-Geflechte.

In den *in-vitro* Kontraktilitätsuntersuchungen zeigten die CIPO-Patienten eine signifikant verminderte muskuläre Spontanaktivität und reduzierte Kontraktionsantworten auf exogene cholinerge Stimulation. Eine vermehrte inhibitorische Innervation konnte durch die EFS ausgeschlossen werden. Die direkte muskuläre Stimulation mit KCl erlaubte eine Differenzierung zwischen myogener und neurogener Form der CIPO. Während bei der neurogenen Form noch Muskelantworten registrierbar waren, zeigten sich bei der myogenen Form keine suffizienten Kontraktionen – wobei die vollständige Intaktheit des ENS während der KCl-Stimulation nicht überprüfbar war.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass mit dem kombinierten Einsatz differenzierter histopathologischer und funktioneller Untersuchungstechniken die Diagnose einer CIPO bestätigt werden kann und insbesondere eine Differenzierung zwischen neurogener und myogener Form möglich ist. Daher erscheint es sinnvoll, diese methodischen Verfahren in die Routinediagnostik bei klinischem Verdacht auf CIPO aufzunehmen. Dieses Vorgehen ermöglicht zwar keine kausale Behandlung, könnte jedoch durch eine schnelle und präzise Diagnosestellung die Nebenwirkungen der symptomatischen Therapieversuche reduzieren – und somit den kleinen Patienten einen Zugewinn an Lebensqualität verschaffen.

Literaturverzeichnis

1. Amiot A, Cazals-Hatem D, Joly F, Lavergne-Slove A, Peuchmaur M, Bouhnik Y, Bedossa P, Messing M
The role of immunhistochemistry in idiopathic chronic intestinal pseudoobstruction: a case-control study
Am J Surg Pathol (2009) 33: 749-58

2. Annerén G, Meurling S, Olsen L
Megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome (MMIHS), an autosomal recessive disorder: clinical reports and review of the literature
Am J Med Genet (1991) 41:251-4

3. Antonucci A, Fronzoni L, Cogliandro L, Cogliandro RF, Caputo C, De Giorgio R, Palotti F, Barbara G, Corinaldesi R, Stanghellini V
Chronic intestinal pseudo-obstruction
World J Gastroenterol (2008) 14 2953-61

4. Aulí M, Martínez E, Gallego D, Opazo A, Espín F, Martí-Gallostra M, Jiménez M, Clavé P
Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon *in vitro*
British J Pharmacol (2008) 155:1043-55

5. Bär F, von Koschitzky H, Roblick U, Bruch HP, Schulze L, Sonnenborn L, Böttner M, Wedel T
Cell-free supernatant of Escherichia coli Nissle 1917 modulate human colonic motility: evidence from an *in vitro* organ bath study
Neurogastroenterol Motil (2009) 21:559-66

6. Bassotti G, Villanacci V, Antonelli E, Morelli A, Salerni B
Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility
Lab Invest (2007) 87:628-32

7. Bindl L, Lutjohann D, Buderus S, Lentze MJ, v Bergmann K
High plasma levels of phytosterols in patients on parenteral nutrition: a marker of liver dysfunction
J Pediatr Gastroenterol Nutr (2000) 31:313-316

8. Bracci F, Iacobelli BD, Papadatou B, Ferretti F, Lucchetti MC, Cianchi D, Francalanci P, Ponticelli A
Role of electrogastrography in detecting motility disorders in children affected by chronic intestinal pseudo-obstruction and Crohn's disease
Eur J Pediatr Surg (2003) 13:31-34

9. Brehmer A, Göbel D, Frieser M, Graf M, Radespiel-Tröger M, Neuhuber W
Experimental hypertrophy of myenteric neurones in the pig: a morphometric study
Neurogastroenterol Motil (2000) 12:155-62

10. Cavicchi M, Beau P, Crenn P, Degott C, Messing B
Prevalence of liver disease and contributing factors in patients receiving home parenteral nutrition for permanent intestinal failure
Ann Intern Med (2000) 132:525-532

11. Cavicchi M, Crenn P, Beau P, Degott C, Boutron MC, Messing B
Severe liver complications associated with long-term parenteral nutrition are dependent on lipid parenteral input
Transplant Proc (1998) 30:2547

12. Connor FL, Di Lorenzo C
Chronic intestinal pseudo-obstruction: assessment and management
Gastroenterology (2006) 130:29-36

13. Costa M, Furness JB, Llewellyn-Smith IJ
Histochemistry of the enteric nervous system
In: Johnson LR (Hrsg.), Physiology of the gastrointestinal tract
Raven Press, New York, 1-40 (1987)

14. Cucchiara S, Annese V, Minella R, Franco MT, Iervolino C, Emiliano M, Auricchio S
Antroduodenojejunal manometry in the diagnosis of chronic idiopathic intestinal pseudoobstruction in children
J Pediatr Gastroenterol Nutr (1994) 18:294-305

15. De Giorgio R, Sarnelli G, Corinaldesi R, Stanghellini V
Advances in our understanding of the pathology of chronic intestinal pseudo-obstruction
Gut (2004) 53:1549-52

16. De Giorgio R, Seri M, Cogliandro R, Cusano R, Fava M, Caroli F, Panetta D, Forabosco P, Barbara G, Ravazzolo M, Ceccherini I, Corinaldesi R, Stanghellini V
Analysis of candidate genes for intrinsic neuropathy in a family with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction
Clin Genet (2001) 59:131-33

17. Deglincerti A, De Giorgio R, Cefle K, Devoto M, Pippucci T, Castegnaro G, Panza E, Barbara G, Cogliandro RF, Mungan Z, Palanduz S, Corinaldesi R, Romeo G, Seri M, Stanghellini V
A novel locus for syndromic chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction maps to chromosome 8q23-q24
Eur J Hum Genet (2007) 15:889-97

18. Devane SP, Ravelli AM, Bisset WM, Smith VV; Lake BD, Milla PJ
Gastric antral dysrhythmias in children with chronic idiopathic intestinal pseudoobstruction
Gut (1992) 33:1477-81

19. Di Lorenzo
Pseudo-obstruction: current appraoches
Gastroenterology (1999) 116:980-87

20. Di Nardo G, Stanghellini V, Cucchiara S, Barbara G, Pasquinelli G, Santini D, Felicani C, Grazi G, D' Pinna A, Cogliando R, Cremon C, Gori A, Corinaldesi R, Sanders KM, De Giorgio R
Enteric neuropathology of congenital intestinal obstruction: A case report
World J Gastroenterol (2006) 12:5229-33

21. Dudley HAF, Sinclair ISR, McLaren IF, McNair TJ, Newsam JE
Intestinal pseudoobstruction
J R Coll Surg Edinb (1958) 3:206-17

22. Faure C, Goulet O, Ategbo S, Breton A, Tounian P, Ginies JL, Roquelaure B, Despres C, Scaillon M, Maurage C, Paquot I, Hermier M, De Napoli S, Dabadie A, Huet F, Baudon JJ, Larchet M
Chronic intestinal pseudoobstruction syndrome: clinical analysis, outcome, and prognosis in 105 children
French-Speaking Group of Pediatric Gastroenterology, Dig Dis Sci (1999) 44:953-9

23. Faussone-Pellegrini MS, Vannucchi MG, Alaggio R,Strojna A, Midrio P
Morphology of the intestinal cells of Cajal of the human ileum from foetal to neonatal life
J Cell Mol Med (2007) 11:482-94

24. Feldstein AE, Miller SM, El-Youssef M, Rodeberg D, Lindor NM, Burgart LJ, Szurszewski JH, Farrugia G
Chronic intestinal pseudoobstruction associated with altered interstitial cells of Cajal networks
J Pediatr Gastroenterol Nutr (2003) 36: 492-97

25. Filogamo G, Cracco C
Models of neuronal plasticity and repair in the enteric nervous system: a review
Ital J Anat Embryol (1995) 100:185-95

26. Filogamo G, Vigliani F
Ricerche sperimentali sulla correlazione tra estensione del territorio di innervazione e grandezza e numero delle cellule gangliari del plesso mienterico (di Auerbach) nel cane
Riv Patol Nerv Ment (1954) 75:441-73

27. Furness JB
The enteric nervous system
Blackwell Publishing, Melbourne, Australia (2006)

28. Furness JB, Costa M
The enteric nervous system
Churchill Livingstone, New York (1987)

29. Gargiulo A, Auricchio R, Barone MV, Cotugno G, Reardon W, Milla PJ, Ballabio A, Ciccodicola, Auricchio A
Filamin A is mutated in X-linked chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction with central nervous system involvement
Am J Hum Genet (2007) 80:751-58

30. Gershon MD
The enteric nervous system
Ann Rev Neurosci (1981) 4:227-72

31. Hasler WL
Motility of the small intestine and colon
In: Yamada T (Hrsg) Gastroenterology, vol. 1, 220-247
Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2003)

32. Heneyke S, Smith VV, Spitz L, Milla PJ
Chronic intestinal pseudo-obstruction: treatment and long term follow up of 44 patients
Arch Dis Child (1999) 81:21-27

33. Hirano I, Pandolfino J
Chronic Intestinal Pseudo-Obstruction
Dig Dis (2000) 18:83–92

34. Hirst GD, Ward SM
Interstitial cells: involvement in rhythmicity and neural control of gut smooth muscle
J Physiol (2003) 550:337-46

35. Hoffmann HH, Schnitzlein NN
The number of vagus nerves in man
Anat Rec (1969) 139:429-35

36. Hugot JP, Ferkdajdi L, Faure C, Lachassine E, Bellaiche M, Bocquet L, Gaudelus J, Navarro J, Cézard JP
Chronic intestinal pseudo-obstruction and delayed myenteric ganglion cell maturation
Arch Fr Pediatr (1992) 49:721-3

37. Huizinga JD, Thuneberg L, Vanderwinden JM, Rumessen JJ
Interstitial cells of Cajal as target for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders
Trends Pharmacol Sci (1997) 18:393-403

38. Husebye E, Hellstrom PM, Sundler F, Chen J, Midtvedt T
Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol (2001) 280:G368-380

39. Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Taniguchi M, Shinomura Y, Matsuzawa Y
Deficiency of c-kit+ Cells in patients with a myopathic form of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction
Am J Gastroenterol (1997) 92:332-4

40. Kapur RP
Neuropathology of paediatric chronic intestinal pseudo-obstruction and related animal models
J Pathol (2001) 194:277-88

41. Knowles CH
New horizons in the pathogenesis of gastrointestinal neuromuscular disease
J Pediatr Gastroenterol Nutr (2007) 45:97-102

42. Knowles CH, Veress B, Tornblom H, Wallace S, Paraskeva P, Darzi A, Martin JE, Nyberg B, Lindberg G
Safety and diagnostic yield of laparoscopically assisted full-thickness bowel biospy
Neurogastroenterol Motil (2008) 20:774-779

43. Koletzko S, Jesch I, Faus-Keßler T, Briner J, Meier-Ruge W, Müntefering H, Cordt W, Wessel LM, Keller KM, Nützennadel W, Schmittenbecher P, Holschneider AM, Sacher P
Rectal biopsy for diagnosis of intestinal neuronal dysplasia in children: a prospective multicentre study on interobserver variartion and clinical outcome
Gut (1999) 44:853-61

44. Koschitzky, H von
Elektrophysiologische *in-vitro* Untersuchungen der Kolonmuskulatur bei Patienten mit primär chronischer Obstipation
Medizinische Dissertation (in Vorbereitung), Universität Lübeck (2010)

45. Koyluoglu G, Bagcivan I, Karadas B, Guney C, Durmus N, Altun A, Kaya T
Alterations in spontaneous contractions of rat ileum and jejunum after peritonitis
Eur J Pharmacol (2008) 580:250-5

46. Krammer HJ, Karahan TK, Rumpel E, Klinger M, Kühnel W
Immunohistochemical visualization of the enteric nervous system using antibodies against protein gene product (PGP) 9.5
Ann Anat (1993) 175:321-25

47. Krishnamurthy S, Schuffler MD
Pathology of neuromuscular disorders of the small intestine and colon
Gastroenterology (1987) 93:610-39

48. Kubota A, Yonekura T, Hoki M, Oyanagi H, Kawahara H, Yagi M, Imura K, Iiboshi Y, Wasa K, Kamata S, Okada A
Total parenteral nutrition-associated intrahepatic cholestasis in infants:
25 years' experience
J Pediatr Surg (2000) 35:1049-51

49. Lapointe SP, River C, Goulet O, Fékété CN, Lortat-Jacob S
Urological manifestations associated with chronic intestinal pseudo-obstruction in children
J Urol (2002) 168:1768-70

50. Lesniewka V, Rowland I, Laerke HN, Grant G, Naughton PJ
Relationship between dietary-induced changes in intesinal commensal microflora and duodenojejunal myoelectric activity monitored by radiotelemetry in the rat *in vivo*
Exp Physiol (2006) 91:229-37

51. Loff S, Kabs F, Witt K, Sartoris J, Mandl B, Niessen KH, Waag KL
Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers
J Pediatr Surg (2000) 35:1775-1778

52. Loinaz C, Rodriguez MM, Kato T, Mittal N, Romaguera RL, Bruce JH, Nishida S, Levi D; Madariaga J, Tzakis AG
Intestinal and multivisceral transplantation in children with severe gastrointestinal dysmotility
J Ped Surg (2005) 40:1598-1604

53. Masetti M, Rodriguez MM, Thompson JF, Pinna AD, Kato T, Romaguera RL, Nery JR, DeFaria W, Khan MF, Verzaro R, Ruiz P, Tzakis AG
Multivisceral transplantation for megacystis microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome
Transplantation (1999) 68:228-32

54. Matini P, Mayer B, Faussone Pellegrini MS
Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life
Cell Tissue Res (1997) 288:11-23

55. Mousa H, Hyman PE, Cocjin J, Flores AF, Di Lorenzo C
Long-term outcome of congenital intestinal pseudoobstruction
Dig Dis Sci (2002) 47:2298-305

56. Nakano R, Sri Paran T, Rolle U, Puri P
Age-related changes in the neuromuscular development of the intestinal anal sphincter
J Pediatr Surg (2008) 43:1106-10

57. Oliver MR, Tan DT, Scott RB
Intestinal anaphylaxis: mediation of the response of colonic longitudinal muscle in rat
Am J Physiol (1995) 268:764-71

58. Park HJ, Kamm MA, Abbrasi AM, Talbot IC
Immunohistochemical study of the colonic muscle and innervation in idiopathic chronic constipation
Dis Colon Rectum (1995) 38:509-513

59. Pingault V, Girard M, Bondurand N, Dorkins H; Van Maldergem L, Mowat D, Shimotake T, Verma I, Baumann C, Goossens M
SOX10 mutations in chronic intestinal pseudo-obstruction suggest a complex physiopathological mechanism
Hum Genet (2002) 111:198-206

60. Romanska HM, Bishop AE, Brereton RJ, Spitz L, Polak JM
Immunocytochemistry for neuronal markers shows deficiencies in conventional histology in the treatment of Hirschsprung´s disease
J Pediatr Surg (1993) 28:1059-62

61. Sams VR, Bobrow LG, Happerfield L, Keeling J
Evaluation of PGP 9.5 in the diagnosis of Hirschsprung´s disease
J Pathol (1992) 168:55-58

62. Schwankovsky L, Mousa H, Rowhani A, Di Lorenzo C, Hyman PE
Quality of life outcomes in congenital chronic intestinal pseudo-obstruction
Dig Dis Sci (2002) 47:1965-68

63. Smith VV, Milla PJ
Histological phenotypes of enteric smooth muscle disease causing functional intestinal obstruction in childhood
Histopathology (1997) 31:112-22

64. Sri Paran T, Rolle U, Puri P
Enteric nervous system and developmental abnormalities in childhood
Pediatr Surg Int (2006) 22:945-59

65. Stanghellini V, Cogliandro F, De Giorgio R, Barbara G, Salvioli B, Corinaldesi R
Chronic intestinal pseudo-obstruction: manifestations, natural history and management
Neurogastroenterol Motil (2007) 19:440-52

66. Stoffels B, Schmidt J, Nakao A, Nazir A, Chanthaphavong RS, Bauer AJ
Role of interleukin 10 in murine postoperative ileus
Gut (2009), 58:648-60

67. Struijs MC, Diamond IR, Pencharz PB, Chang KTE, Viero S, Langer JC, Wales PW
Absence of the interstitial cells of Cajal in a child with chronic pseudoobstruction
J Ped Surg (2008) 43:25-29

68. Surprenant A
Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons
Ann Rev Physiol (1994) 56:117-40

69. Suzuki N, Prosser CL, Dahms V
Boundary cells between longitudinal and circular layers: essential for electrical slow waves in cat intestine
Am J Physiol (1986) 250:G287-G294

70. Teitelbaum DH
Parenteral nutrition-associated cholestasis
Curr Opin Pediatr (1997) 9:270-275

71. Thuneberg L
The interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells?
Adv Anat Embryol Cell Biol (1982) 71:1-130

72. Trauner M, Fickert P, Stauber RE
Inflammation-induced cholestasis
J Gastroenterol Hepatol (1999) 14:946-959

73. Undi S, Benko R, Wolf M, Illenyi L, Horvath OP, Antal A, Csontos Z, Vereczkei A, Bartho L
Purinergic nerves mediate the non-nitrergic relaxation of the human ileum in response to electrical field stimulation
Brain Res Bull (2006) 71:242-44

74. Undi S, Benko R, Wolf M, Illenyi L, Vereczkei, A, Kelemen D, Cseke L, Csontos Z, Horvath OP, Bartho L
The NANC relaxation of the human ileal longitudinal and circular muscles is inhibited by MRS 2179, aP2 purinoreceptor antagonist
Life Sci (2009) 84:871-85

75. Vanderhoof JA
New and emerging therapies for short bowel syndrome in children
J Pediatr Gastroenterol Nutr (2004) 39:769-771

76. Vanderhoof JA, Young RJ, Murray N, Kaufman SS
Treatment strategies for small bowel bacterial overgrowth in short bowel syndrome
J Pediatr Gastroenterol Nutr (1998) 27:155-60

77. Wedel T
Das enterische Nervensystem des human Kolons - strukturelle Organisation und morphologische Fehlbildungen bei funktionellen intestinalen Passagestörungen
Medizinische Habilitation, Universität Lübeck (2000)

78. Wedel T, Krammer HJ, Kühnel W, Sigge W
Alterations of the enteric nervous system in neonatal necrotizing enterocolitis revealed by whole-mount immunohistochemistry
Ped Pathol (1998) 18:57-70

79. Wedel T, van Eys MJJG, Waltregny D, Glenisson W, Castronovo V, Vanderwinden JM
Novel smooth muscle markers reveal abnormalities of the intestinal musculature in severe colorectal motility disorders
Neurogastroenterol Motil (2006) 18:526-38

80. Wehner S, Straesser S, Vilz TO, Pantelis D, Sielecki T, de la Cruz VF, Hirner A, Kalff JC
Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase pathway as prophylaxis of postoperative ileus in mice
Gastroenterology (2009) 136:619-29

81. Wendt-Nordahl G, Alken P, Knoll T
Harnsteinleiden
AmT (2006) 24:6-12

82. Wess L, Eastwood M, Busuttil A, Edwards C, Miller A.
An association between maternal diet and colonic diverticulosis in an animal model
Gut (1996) 39:423-7

83. Wingate D, Hongo M, Kellow J
Disorders of gastrointestinal motility: towards a new classification
J Gastroenterol Hepatol (2002) 17:1-14

84. Wood JD
Physiology of the enteric nervous system
In: Johnson LR (Hrsg.), Physiology of the gastrointestinal tract
Raven Press, New York, 67-109 (1987)

85. Zhao J, Liao D, Gregersen H
Phasic and tonic stress-stain data obtained in intact intestinal segment *in vitro*
Dig Dis Sci (2008) 53:3145-51

Anhang

Übersicht der verwendeten Antikörper und Antigen-Retrieval-Techniken (nach eigener Verdünnungstestung an Dünndarm)

Primär-AK	Lage-rung	Ursprung	Firma	Verdünng	Puffer	Antigen-Retrieval-Technik	Sekundär-AK	Chromogen	Eindeck-medium	Dargestelltes Gewebe
Hu C/D	-20°	Mouse	Invitrogen A – 21271	1:400	Bull's Eye (pH 7)	Wasserbad 95°, 60 min	GAM 1:400	AEC	Aquatex	Nervenzellen
PGP 9.5	+4°	Rabbit	Ultraclone Limited, RA 95101	1:2000	/	Ohne	GAR 1:400	DAB	Isomount	Ganglien und Nervenfasern
alpha-SMA	-20°	Mouse	DAKO M 0851	1:800	/	Ohne	GAM 1:400	AEC	Aquatex	Glatte Muskulatur
Histone deacetylase 8 (HDAC 8)	+4°	Goat	Santa Cruz Biotechnol. sc-11544	1:500	/	Ohne	RAG 1:400	DAB	Isomount	Glatte Muskulatur
Smoothelin (R4A)	+4°	Mouse	Freundliche Bereitstellung G. van Eys, Maastrich	1:50	Target Retrieval (pH 9)	Wasserbad 95° 60 min	GAM 1:400	DAB	Isomount	Glatte Muskulatur
Myosin (SMMHC)	-20°	Mouse	Sigma M-7786	1:1000	Bull's Eye (pH 7)	Wasserbad 95° 60 min	GAM 1:400	DAB	Isomount	Glatte Muskulatur
CD 117	-20°	Rabbit	DAKO A 4502	1:800	/	Ohne	GAR 1:400	DAB	Isomount	Interstitielle Cajal-Zellen (ICC)

Alle Färbungen wurden mit einer zusätzlichen Kernfärbung mit Hämalaun nach Meyer versehen (s. Färbeprotokoll)

Immunhistologie-Färbeprotokoll OHNE Antigen-Retrieval

Versuchsablauf		**Inkubationszeit**
Vor-inkubation	Entparaffinieren, Alkoholreihe absteigend bis 70 %	Je 5`
	TBS-Puffer,	10`
	H_2O_2-Bad (20 +180 ml), 3 x TBS	Je 10’
Primär-inkubation	AK in ausgetesteter Verdünnung	Über Nacht
Puffer	TBS	3 x 10`
Sekundär-inkubation	GAM/GAR/RAG 1:400	45’
Puffer	TBS	3 x 10`
Tertiär-inkubation	Elite Kit (mind. 30 min zuvor reagieren lassen),	60`
Puffer	TBS	3 x 10`
Farb-entwicklung	DAB (Differenzierung unter Mikroskop)	Ca. 1,5`
	oder AEC	4-5 min
	TBS	10`
Kernfärbung	Hämalaun Leitungswasser	40-60 sec, 10` bläuen
	Aqua dest.	10’
	DAB: aufsteigende Alkoholreihe	Je 5‘
Eindecken	DAB: aus Alkohol => Isomount AEC: aus Aqua dest. => Aquatex	

<u>1 l TBS:</u>

- 9 g Tris basis (Sigma T 1503),
- 68,5 g Tris HCl (Sigma T 3253)
- 88 g NaCl
- Titration auf pH 7,4
- Endverdünnung 1:100

Diluent: Verdünnungssubstanz für Antikörper, Zytomed Systems, ZUC 025-500
Elite-Kit, Linaris, PK 6100
Chromogene: DAB Liquid Substrate, DAKO, K3468
AEC Fertigkit, DAKO, K3464

Adhäsions-Objektträger X-tra, Labonord 00212

Immunhistologie-Färbeprotokoll MIT Antigen Retrieval

Versuchsablauf		**Inkubationszeit**
Vor-inkubation	Entparaffinieren, Alkoholreihe absteigend bis 70 %	Je 5`
	TBS-Puffer, Fixierung mit PFA 4 %, TBS 3x	Je 10`
	H_2O_2-Bad (20 +180 ml), TBS-Puffer	Je 10’
	Vorbehandlung Wasserbad 95 °C (Puffer lt. AK-Liste)	60’
	3 x TBS	5-10’
Primär-inkubation	AK in ausgetesteter Verdünnung	Über Nacht
Puffer	TBS	3 x 10`
Sekundär-inkubation	GAM/GAR/RAG 1:400	45’
Puffer	TBS	3 x 10`
Tertiär-inkubation	Elite Kit (mind. 30 min zuvor reagieren lassen),	60`
Puffer	TBS	3 x 10`
Farb-entwicklung	DAB (Differenzierung unter Mikroskop)	Ca. 1,5`
	oder AEC	4-5 min
	TBS	10`
Kernfärbung	Hämalaun Leitungswasser	40-60 sec, 10` bläuen
	Aqua dest.	10’
	DAB: aufsteigende Alkoholreihe	Je 5‘
Eindecken	DAB: aus Alkohol => Isomount AEC: aus Aqua dest. => Aquatex	

Organbad-Versuchsprotokoll

Zeit	Aktion
Nach 10 min	Spülen u Nachspannen
Ca. 60 min	
Alle 3 min	ACh 10^{-7} mol/l ACh 10^{-6} mol/l ACh 10^{-5} mol/l ACh 10^{-4} mol/l Spülen u Nachspannen
Nach…	
15 min	EFS 5 Hz, 30 s
3 min	Atropin $5x10^{-6}$ mol/l (30 µl)
6 min	EFS 5 Hz
3 min	Phentolamin & Propanolol 10^{-6} mol/l (je 30 µl)
6 min	EFS 5 Hz
3 min	KCl 2 x 10^{-2} mol/l (600 µl)
15 min	EFS 5 Hz
3 min	Spülen
10 min	EFS 5 Hz (Kontrolle)
3 min	ggf. ACh 10^{-4} mol/l (Vitalitätskontrolle)
3 min	Spülen
5 min	Papaverin 2 x 10^{-3} mol/l (500 µl)
3-5 min	ENDE

Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Frau
Dr. med. Kohl
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

im Hause

Bearbeiter: Frau Erdmann
Telefon: (0451) 500- 4639
Fax: (0451) 500- 3026
email:
janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Datum: 17.08.2007
Aktenzeichen:
(Immer angeben !) 07-116

nachrichtlich:
Herrn Prof. Wessel
Direktor der Klinik für Kinderchirurgie

Sitzung der Ethik-Kommission am 14. August 2007
Antragsteller: Frau Dr. Kohl / Herr Prof. Wessel
Titel: Untersuchung der in vitro Dünndarmkontraktilität bei Kindern mit chronisch intestinaler Pseudoobstruktion (CIPO)

Sehr geehrte Frau Dr. Kohl,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach der Berücksichtigung folgenden **Hinweises** keine Bedenken: In der Aufklärung der Eltern wird von anonymisierten Daten gesprochen, hier handelt es sich aber um pseudonymisierte Daten.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Lucas Wessel
Stellv. Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder: ☒

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe (Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)	☒ Frau H. Müller (Pflege)	Herr Prof. Dr. Klein (Medizinische Klinik I)
Prof. Dr. Schweiger (Psychiatrie)	☒ Prof. Wessel (Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)	☒ Frau Prof. Dr. M. Schrader (Plastische Chirurgie)
☒ Prof. Dr. Dendorfer (Pharmakologie)	Herr Dr. Ficher (Richter am Amtsgericht Ahrensburg)	Herr Dr. Schulze (Pädiatrie)
☒ Frau Prof. Stubbe	Prof. Schwinger	☒ Herr D. Stojan

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Schmidt
Vorname:	Sonja
Geburtsdatum, -ort:	14.06.1971, Hamburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1977 - 1987	Albert-Schweitzer-Gesamtschule, Hamburg
1987 - 1991	Heinrich-Hertz-Schule, Hamburg

Hochschulausbildung

1991 - 1994	Studium der Humanmedizin, Hamburg
1994 - 1998	Studium der Humanmedizin, Marburg
09.09.1993	Ärztliche Vorprüfung, Hamburg
23.05.1995	1. Staatsexamen, Marburg
15.04.1997	2. Staatsexamen, Marburg
28.04.1998	3. Staatsexamen, Kassel

Berufsausbildung

06/1998 - 12/1999	Ärztin im Praktikum, Kinderchirurgie, Olgahospital Stuttgart
01/2000 - 10/2000	Assistenzärztin (50% Teilzeit), Kinderchirurgie, Olgahospital Stuttgart
11/2000 - 12/2001	Assistenzärztin, Anästhesie und Intensivmedizin, Herzzentrum Coswig
01/2002 - 05/2002	Assistenzärztin, Kinderherzchirurgie, Deutsches Kinderherzzentrum Sankt Augustin
06/2002 - 12/2003	Assistenzärztin, Kinderchirurgie, DRK Kinderklinik Siegen
Seit 01/2004	Assistenzärztin, Klinik für Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Promotion

08/2007 - 03/2010	Immunhistologische und *in-vitro* Kontraktilitäts-Untersuchungen des Dünndarms bei Kindern mit chronisch intestinaler Pseudoobstruktion

Vorträge und Poster

H.v. Koschitzky, S. Schmidt, LM Wessel, U. Roblick, M. Kohl
„*In-vitro* Untersuchungen der Dünndarmmotilität bei Patienten mit chronisch intestinaler Pseudoobstruktion (CIPO): Ein neues diagnostisches Verfahren“
Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung; Gmunden (Österreich), 16.-19.04.2008 (Poster)

S. Schmidt, M. Kohl, H. v. Koschitzky, U. Roblick, T.Wedel, L. M. Wessel,
„*In-vitro* Untersuchungen der Dünndarmmotilität bei Kindern mit chronisch intestinaler Pseudoobstruktion (CIPO): ein neues diagnostisches Verfahren“
46. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie, München, 11.-14.09.08 (Vortrag)

M. Kohl, T. Wedel, L.M. Wessel, H. v. Koschitzky, D. Svoboda, S. Schmidt
„*In-vitro* intestinal motility is markedly impaired in children with chronic intestinal pseuoobstruction”
Neurogastroenterology and Motility, 2. Joint International Meeting, Luzern (Schweiz), 6.-09.11.08 (Poster)

S. Schmidt, H. v. Koschitzky, D. Svoboda, T. Wedel, LM. Wessel, M. Kohl
„Decrased motility during *in-vitro* study of small intestine and abnormal distribution of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in children with chronic intestinal pseudoobstruction”
Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität, Freising, 27.-29.03.2009 (Vortrag)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem ehemaligen Chef und dem ehemaligen Direktor der kinderchirurgischen Klinik des UKSH, Campus Lübeck, Herrn Prof. Dr. med. Lucas Wessel, für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die wertvollen Ratschläge zur Konzeption der Arbeit und die Möglichkeit, für die Dauer der Experimente im Institut für Anatomie zu arbeiten.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. med. Martina Kohl (Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, UKSH, Campus Kiel) und Herrn Prof. Dr. med. Thilo Wedel (Institut für Anatomie, Universität Kiel) sowohl für die engagierte, stets zeitnahe und umfassende fachliche Betreuung als auch für ihre humorvolle Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Westermann, Direktor des Instituts der Anatomie der Universität Lübeck, gebührt mein Dank für die Möglichkeit, 16 Monate die Räumlichkeiten, Instrumente und Expertise der verschiedenen Forschungsteams des Institutes für Anatomie zu nutzen. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Kühnel für die stetige Motivation und Unterstützung während meiner Zeit im Institut für Anatomie.

Für die sehr gute und herzliche Einarbeitung in die praktische Durchführung der Immunhistologie danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus dem Institut für Anatomie der Universität Lübeck, insbesondere Kathy Budler, Uschi Almert und Lidija Gutjahr.

Ebenso danke ich Herrn Hanno von Koschitzky (kinderchirurgische Klinik, UKSH, Campus Lübeck) für die vielen geduldigen Stunden der Einarbeitung in Versuchsdurchführung und Auswertung der Organbadtechnik.

Danken möchte ich ebenfalls allen Kollegen der kinderchirurgischen Klinik, die meine Abwesenheit aus dem klinischen Alltag während meiner Zeit im Institut für Anatomie klaglos ausgeglichen haben.

Für die freundliche und reibungslose Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Präparate danke ich Herrn Prof. Dr. med. Hans-Peter Bruch (Direktor der Klinik für Chirurgie, UKSH, Campus Lübeck) sowie seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, insbesondere im OP-Bereich.

Unermüdliche Hilfe und ständigen Ansporn habe ich außerdem von vielen Freunden erhalten, von denen ich insbesondere Britta, Christiane und meinem Patenkind Pia danke.

Unendlich dankbar bin ich meiner Familie und meinen Nichten Finja und Emilia, ohne deren physische und psychische Unterstützung diese Arbeit nicht möglich geworden wäre.