2. Pathophysiologische Studien

2.1 Hormone

Dehydratation wird als einer der Mechanismen für die Entstehung der chronischen Obstipation diskutiert. Es wird beispielsweise postuliert, dass Obstipation durch Volumenmangel eine "Sommerkrankheit" sei[54]. Es gibt tatsächlich ernst zu nehmende Hinweise dafür, dass eine geringe Flüssigkeitsaufnahme (< 500 ml pro Tag) die Stuhlfrequenz minimal, aber signifikant vermindert, das Stuhlgewicht reduziert und die Transitzeit des Kolons verlangsamt[55]. Allerdings findet man, wenn unselektierte oder selektierte Gruppen obstipierter Patienten mit gesunden Kontrollpersonen verglichen werden, keinen Unterschied bezüglich deren Flüssigkeitsaufnahme[33,56]. Die Annahme, dass die aufgenommene Flüssigkeit direkt die Stuhlkonsistenz beeinflusst, scheint tatsächlich zu einfach. In den oberen Anteilen des Gastrointestinaltrakts werden pro Tag ca. 7-9 l Flüssigkeit sezerniert[57], so dass ein Unterschied von 500 ml Flüssigkeitsaufnahme pro Tag vernachlässigbar scheint. Offenbar müssen zusätzlich noch andere Mechanismen in Betracht gezogen werden.

Die Plasmaspiegel von Arginin- Vasopressin (AVP), Aldosteron und Angiotensin II (ANG II) sind bei Volumenmangel erhöht[58-60]. Wenn es i.v. gegeben wird, stimuliert AVP die kontraktile Aktivität des menschlichen Kolons[61] oder des vivo Rattenkolons[62]. Außerdem ist schon länger bekannt, dass die glatte Muskulatur des Gefäßsystems durch das Renin - Angiotensin - System beeinflusst wird[63]. Diese Hormone könnten somit eine Rolle bei der Regulation der kontraktilen Aktivität des Kolons spielen und so zur Pathogenese der chronischen Obstipation beitragen. Um zu testen, ob diese Hormone einen direkten Einfluss auf die Kolonmotilität ausüben, wurden die folgenden in vitro - Untersuchungen am Rattenkolon durchgeführt[64].

Außerdem wurde zum Thema „Hormone“ eine Probandenstudie durchgeführt[65]. Der aussichtsreichste Kandidat war das Vasopressin bzw. Antidiuretische Hormon ADH. Sowohl bei hypertoner Dehydratation als auch im Alter, beides Zustände, bei denen die Inzidenz der chronischen Obstipation zunimmt, steigen die ADH - Spiegel an[43, 66]. Bei Ratten führt ADH tatsächlich zu einer erhöhten Resorptionsrate von Flüssigkeit aus dem Kolon[67]. Bei Affen hat ADH auch einen inhibierenden Effekt auf die propulsive Motilität des Kolons[62]. In der vorliegenden Studie wurde deshalb getestet, ob ADH in physiologischen Dosen einen inhibierenden Effekt auf die objektiven Parameter der Kolonfunktion hat. Die Studie wurde ebenfalls an gesunden Probanden durchgeführt, und zwar unter guter Hydratation, um die in der Vorläuferstudie dargestellten Effekte vom Dursten unabhängig nur auf das ADH zurückzuführen zu können.

2.1.1 Der Einfluss von Hormonen und Peptiden, die den Wasserhaushalt beeinflussen, auf die Motilität des Rattenkolons in vitro

Methode

Es wurden männliche Wistar- Ratten (200-300g) verwendet. Unter intraperitonealer Anästhesie mit Pentobabital- Natrium wurde bei der noch lebenden Ratte das Kolon entnommen und unmittelbar in oxygenierte modifizierte Krebs-Ringer-Lösung (millimolare Zusammensetzung: NaCl 115, $NaHCO_3$ 20, KCl 4,6, $MgSO_4$x7 H_20 1,16, NaH_2PO_4 x H_2O 1,16, $CaCl_2$

2,5, Glukose 10) eingebracht. Die Flüssigkeit im Organbad wurde mit Carbogen (5 % CO_2/95 % O_2) begast und bei einer Temperatur von 37° C gehalten. Es wurden jeweils sechs Segmente mit in toto belassenen Muskelstreifen (1-1,5 cm Länge) präpariert und an Organhaltern befestigt. Jeweils 2 Muskelstreifen wurden von den Abschnitten Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens von jeweils einem Rattenkolon entnommen. Ein Ende jedes Muskelstreifens wurde an einem Haken des Organhalters angebunden, das andere Ende wurde mit einem Kraftwandler (Grass Modell FT 03, Stag Instruments Ltd., UK) verbunden. Die isometrische Kraftänderung wurde auf einen Analogschreiber bei einer Grundspannung von 10 mN aufgezeichnet. Jedes Experiment wurde mit insgesamt 3 Rattendärmen durchgeführt.

Hormonstimulation

Der Einfluss von AVP (10^{-12} - 10^{-10} M), Aldosteron (3 x 10^{-10} - 3 x 10^{-8} M) oder Angiotensin II (10^{-13} - 10^{-6} M) auf die basale Kontraktilität und auf die Kontraktilität nach Prästimulation mit Carbachol und neuronaler Stimulation wurde untersucht. Da nur Angiotensin II einen Effekt hatte, wurde dieser Effekt weiter charakterisiert, indem der Nervenblocker Tetrodotoxin (TTX), der cholinerge Blocker Atropin und der NO - Synthase Inhibitor L-Nitro-N-Arginin (L-NNA) verwendet wurden.

Carbacholstimulation

Nach einer Äquilibrierungsphase von 20 Minuten wurde eine kumulative CCH- Dosis- Wirkungsbeziehung bei CCH- Konzentrationen von 10^{-7} bis 3 x 10^{-5} M dargestellt. Zwischen den einzelnen Stimulationen wurde die Lösung im Organbad jeweils 3 Mal innerhalb von 10 Minuten ausgewaschen. Im Anschluss an die jeweils zweite CCH- Dosis-Wirkungskurve wurden die Muskelstreifen mit den Hormonen AVP

entweder bei 10^{-12} M oder bei 10^{-10} M für 2 Minuten vor der Carbachol-Gabe wiederholt. Die Reihenfolge der beiden unterschiedlichen AVP-Konzentrationen wurde jeweils randomisiert. Die gleiche Prozedur wurde mit Aldosteron (3 x 10^{-10} M und 3 x 10^{-8} M) und mit Angiotensin II bei Konzentrationen von 10^{-13} M, 10^{-10} M und 10^{-6} M wiederholt. Um mögliche metabolische Einflüsse von Aldosteron auszuschalten, wurde sein Effekt auch nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde gemessen.

Elektrische Feldstimulation

Isolierte Muskelstreifen wurden analog zu den oben beschriebenen Experimenten im Organbad befestigt. Zusätzlich wurden in jedem Organbad die Darmsegmente zwischen die zwei Platin - Elektroden (1 cm Abstand zwischen den Elektroden) platziert.
Zunächst wurde die elektrische Feldstimulation charakterisiert. Bei 40 Volt wurde eine Dosis - Wirkungskurve in Abhängigkeit von Stimulusdauer und Frequenz durch schrittweise Variation von Impulsdauer (0,5, 1, 5, 10 ms) und Pulsfrequenz (1, 3, 5, 10 Pulse pro Sekunde (pps)) durchgeführt.
Die elektrische Feldstimulation bei 3 und 10 pps (1 ms, 40 Volt, 10 Sekunden Dauer) wurde dann in Anwesenheit von AVP (10^{-12} und 10^{-10} M), Aldosteron (3 x 10^{-8} M) und Angiotensin II (10^{-13} M, 10^{-10} M, 10^{-6} M) durchgeführt. Jedes der erwähnten Reagentien wurde jeweils 2 Minuten vor der Stimulation ins Organbad zugegeben.

Kontrollexperimente

Entsprechende Kontrollexperimente wurden mit den Lösungsmitteln für jede Substanz durchgeführt. Damit wurden unspezifische Effekte der jeweiligen Lösungsmittel ausgeschlossen.

Auswertung der Daten

Die Aufzeichnungen wurden visuell analysiert. Ausgewertet wurden die Kontraktionsmaxima, definiert als die Differenz zwischen dem maximalen Absolutwert an der jeweiligen Aufzeichnungsstelle und seinem korrespondierenden Grundspannungswert. Für die Aufzeichnungen der Basalaktivität wurde die maximale Amplitude der spontanen Kontraktionen innerhalb 2 Minuten vor der Applikation eines Hormons genommen. Für die Auswertung der kumulativen Carbacholstimulation wurde die maximale Kontraktionsamplitude 2 Minuten nach jeder Stimulation gemessen.
Die elektrische Feldstimulation in jedem Versuchsaufbau wurde wiederholt, bis mindestens 3 konsekutive Stimulationen konstant waren. Der Mittelwert von 3 "peaks" der jeweiligen Off-Kontraktionen wurde für die weitere Auswertung benutzt.

Ergebnisse

Muskuläre Stimulation: Basale Charakterisierung

Eine kumulative CCH- Stimulation in Konzentrationen von 10^{-7} bis 3×10^{-5} M ergab ansteigende Kontraktionsamplituden in dosisabhängiger Beziehung. Es kam zu einer signifikanten Verschiebung der Schwellenkonzentration der Dosis - Wirkungskurve nach links, wenn die

Daten vom Colon ascendens mit denen des Colon transversum und descendens verglichen wurden.

Elektrische Feldstimulation: Basale Charakterisierung:

Die Kontraktionsamplituden der Off-Kontraktionen waren positiv zur Stimulationsfrequenz korreliert. Wenn die Stimulusfrequenz konstant gehalten wurde, wurde eine maximale Kontraktionsamplitude bei einer Stimulusdauer von 1 ms erreicht. Repräsentative Aufzeichnungen zeigt Abb. 2.1.1. Die Off-Kontraktionen wurden durch Atropin und TTX supprimiert (Tabelle 2.1.1).

Effekt von physiologischen Konzentrationen von Aldosteron, AVP und Angiotensin II

Weder AVP (5×10^{-12} M 5×10^{-10} M) noch Aldosteron (3×10^{-10} M, 3×10^{-8} M) noch Angiotensin II (10^{-13} M, 10^{-10} M) hatten einen direkten Effekt auf Basalaktivität, CCH- Stimulation (Tabelle 2.1.2) oder auf die elektrische Feldstimulation (Tabelle 2.1.3).

Effekt von physiologischen Konzentrationen von Aldosteron, AVP und Angiotensin II

Weder AVP (5×10^{-12} M 5×10^{-10} M) noch Aldosteron (3×10^{-10} M, 3×10^{-8} M) noch Angiotensin II (10^{-13} M, 10^{-10} M) hatten einen direkten Effekt auf Basalaktivität, CCH - Stimulation (Tabelle 2.1.2) oder auf die elektrische Feldstimulation (Tabelle 2.1.3).

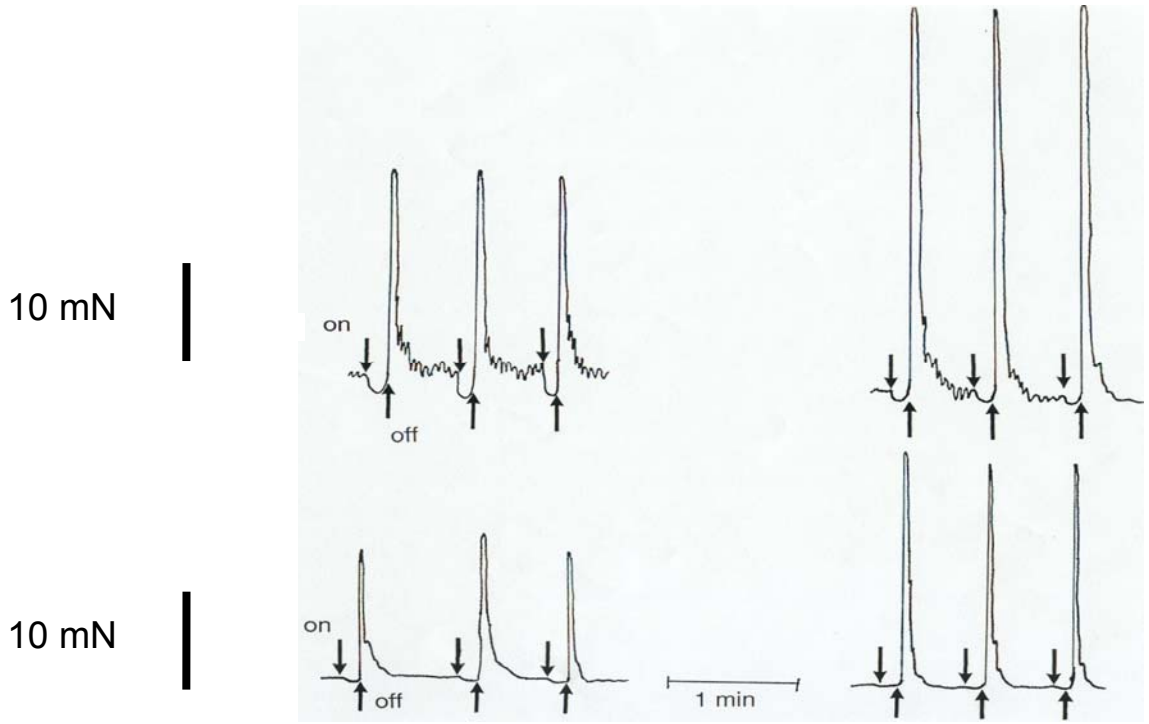

Abbildung 2.1.1: Elektrische Feldstimulation am Colon ascendens (oben) und Colon descendens (unten) bei 3 pps (links) und 10 pps (rechts). Die Pfeile markieren den Anfang und das Ende einer Stimulationsperiode von 10 Sekunden. Die Graphen zeigen 3 von mindestens 5 konsekutiven Stimulationen.

Effekt von supraphysiologischen Konzentrationen von Angiotensin II

Angiotensin II hatte einen signifikanten stimulierenden Effekt bei Konzentrationen von 10^{-7} bis 3 x 10^{-6} M. Dieser Effekt unterschied sich nicht im Hinblick auf die verschiedenen Kolon-Segmente. Außerdem war dieser Effekt nicht durch Atropin 10^{-6} M beeinflusst (Tabelle 2.1.4). Die Gabe von TTX (10^{-6} M) und L-NNA (3 x 10^{-4} M) allein stimulierte bereits die basale muskuläre Aktivität. Dies zeigt, dass die Kolonmuskulatur unter

einem ständigen inhibitorischen neuronalen Tonus steht, welcher durch die Anwendung von TTX aufgehoben und zumindest teilweise abhängig von der NO-Synthese ist. Dies verursachte einen Anstieg im basalen Tonus in der Anwesenheit von TTX und in der Anwesenheit des NOS-Inhibitors L-NNA. Von dieser erhöhten Basallinie wurde der kontraktile Effekt von Angiotensin II vermindert, wohingegen die maximale Kontraktionskraft (Basaltonus + Angiotensin II - Effekt) nicht beeinflusst war (Abb. 2.1.2).

Versuche mit Schwellendosen von CCH (10^{-7} M) und Angiotensin II (10^{-7} M) zeigten einen signifikanten Effekt, wenn beide Substanzen zusammen gegeben wurden, als wenn die Substanzen einzeln bei einer Konzentration von jeweils 10^{-7} M gegeben wurden (Abb. 2.1.3).
Bei einer Konzentration von 10^{-6} M erhöhte Angiotensin II die Antwort auf die elektrische Feldstimulation bei 3 PPS, 40 Volt, 1 ms Pulsdauer und 10 s Stimulusdauer (Abb. 2.1.4).

Tabelle 2.1.1: Basale Charakterisierung der elektrischen Feldstimulation für longitudinale Muskelstreifen (n = 12, alle Segmente gepoolt) allein und in Anwesenheit von Atropin und TTX. Die Werte stellen den Mittelwert ± SEM von 3 konsekutiven Off-Kontraktionen dar. Alle Mittelwerte von Atropin und TTX unterschieden sich signifikant von Kontrollen. pps=Pulse pro Sekunde, EFS=Elektrische Feldstimulation, TTX=Tetrodotoxin

Frequenz [pps]	Pulsdauer [ms]	Kontraktionskraft [mN±SEM] EFS alleine	+ Atropin	+TTX
1	0.5	6.3±2.3	2.0±1.5	3.0±1.2
	1.0	6.6±2.3	2.4±1.3	3.6±1.4
	5.0	8.0±2.1	2.7±1.3	4.1±0.9
	10.0	6.5±1.5	3.1±1.2	3.9±1.1
3	0.5	10.6±3.1	5.9±2.1	3.8±1.4
	1.0	12.0±3.4	5.2±1.9	5.8±1.4
	5.0	9.7±2.6	5.3±1.6	4.1±1.3
	10.0	8.2±2.1	5.4±1.5	4.0±1.1
5	0.5	14.4±3.5	3.7±1.6	3.1±1.0
	1.0	14.5±3.4	4.2±1.6	3.7±1.5
	5.0	11.8±2.4	5.6±1.6	4.9±1.2
	10.0	10.7±2.2	4.8±1.5	5.1±1.6
10	0.5	14.9±3.8	3.6±1.9	2.8±1.2
	1.0	17.3±4.2	5.5±2.1	3.9±1.7
	5.0	11.4±2.4	5.4±2.1	5.1±1.0
	10.0	9.9±3.2	6.3±2.2	7.4±2.0

Tabelle 2.1.2: Charakterisierung (Mittelwert ± SEM) von basaler Aktivität und CCH Stimulation (nur zwei Konzentrationen ausgewählt, n = 24 Streifen pro Experiment, alle Segmente gepoolt) in Anwesenheit von AVP, Aldosteron und Angiotensin II. Ohne oder mit steht für ein Experiment, durchgeführt ohne oder mit AVP, Aldosteron oder Angiotensin II. Unterschiede zu den jeweiligen Kontroll ("ohne") - Experimenten sind nicht signifikant. Die Daten zeigen die maximalen Kontraktionsamplituden (mN ± SEM).

mN ± SEM	Basalaktivität		CCH- Stimulation			
			10^{-6} M		10^{-5} M	
Substanz	ohne	mit	ohne	mit	ohne	mit
AVP $5x10^{-12}$ AVP $5x10^{-10}$	1,0±0,7	1,5±0,8 1,4±0,7	10,3±2,1	10,8±2,4 8,8±1,1	31,3±4,6	30,0±4,3 34,8±4,2
ALD $3x10^{-10}$ nach 1 h ALD $3x10^{-8}$ nach 1 h	3,0±1,3	2,3±0,6 2,0±0,5	9,0±2,5	9,0±2,5 8,5±3,0 6,2±1,8 7,7±3,3	20,6±5,5	21,2±4,5 20,4±5,8 21,3±5,0 19,5±5,4
ANG II 10^{-13} ANG II 10^{-10}	1,0±0,7 4,0±2,5	1,3±0,5 5,0±2,2	9,2±2,9	9,6±2,7 11,8±4,0	32,0±6,4	30,3±6,9 31,5±7,0

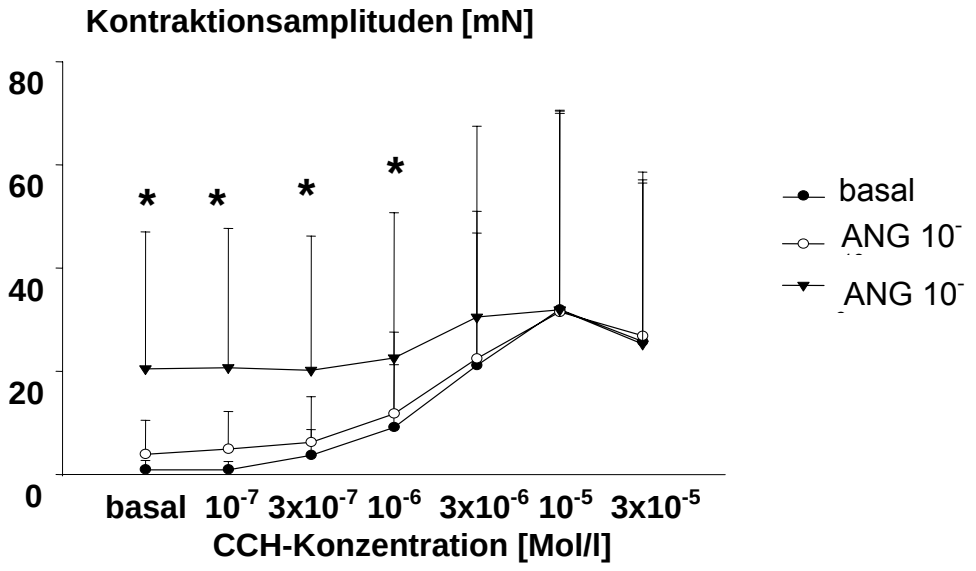

Abbildung 2.1.2: Effekt von Angiotensin II (=ANG) auf die CCH- stimulierte Rattenkolonmotilität. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert + SD von 6 korrespondierenden Werten (alle Segmente gepoolt unbehandelt, Angiotensin II 10^{-10} M, Angiotensin II 10^{-6} M). Angiotensin II stimulierte die basale Aktivität, veränderte jedoch nicht die maximale kontraktile Antwort auf CCH. * $p<0,05$ vs. basal.

Tabelle 2.1.3: Charakterisierung (mN ± SEM) von elektrischer Feldstimulation bei 3 und 10 pps in Anwesenheit von AVP, Aldosteron und Angiotensin II (n = 24 Muskelstreifen pro Experiment, alle Segmente gepoolt). Ohne oder mit stehen für Experimente, durchgeführt ohne oder mit AVP, Aldosteron oder Angiotensin II. Die Unterschiede zu den jeweiligen Kontroll ("ohne") - Experimenten sind nicht signifikant.

[mN ± SEM]	Elektrische Feldstimulation			
	3 pps		10 pps	
Substanz	ohne	mit	ohne	mit
AVP $5x10^{-12}$	24,3±4,8	23,3±4,7	34,2±8,8	34,0±9,1
AVP $5x10^{-10}$	24,3±4,8	22,9±4,2	34,2±8,8	37,7±10,9
ALD $3x10^{-10}$	27,2±4,5	22,9±4,7	33,0±7,9	32,5±7,5
Nach 1 h		34,0±8,2		34,4±7,4
ALD $3x10^{-8}$	27,2±4,5	23,0±4,4	33,0±7,9	35,8±8,8
Nach 1 h		29,6±6,6		33,4±6, 9
ANG II 10^{-13}	24,6±6,8	36,6±9,4	42,4±11,5	45,1±10,0
ANG II 10^{-10}	24,6±6,8	34,8±7,2	42,4±11,5	48,6±10,5

Tabelle 2.1.4: Mittlere Kontraktionsamplituden [mN ± SEM] bei ansteigenden Konzentrationen von Angiotensin II allein und in Anwesenheit von Atropin (n = 18 Muskelstreifen pro Experiment, alle Segmente gepoolt). Atropin zeigt keinen signifikanten Effekt.

ANG II [M]	ohne Atropin	+ Atropin 10^{-6} [M]
10^{-8}	1,9±0,7	2,7±1,1
$3x10^{-8}$	2,3±0,9	2,4±1,1
10^{-7}	5,1±1,7	3,3±1,5
3×10^{-7}	3,5±3,1	13,6±4,7
10^{-6}	15,0±4,7	4,5±1,6
$3x10^{-6}$	19,6±5,8	21,9±6,5

Tabelle 2.1.5: Mittlere maximale Kontraktionsamplituden auf ansteigende Konzentrationen von Angiotensin II (± SEM) allein und in der Anwesenheit von L-NNA ($3x10^{-4}$ M, n=10) oder TTX (10^{-6} M, n=14). L-NNA und TTX zeigten eine Prästimulation aber beeinflussten nicht die Kontraktionsamplituden von Angiotensin II.

ANG II (mol/l)	ohne L-NNA	mit L-NNA	Ohne TTX	Mit TTX
10^{-8}	2,3±,8	8,3±2,2*	5,1±1,5	17,9±5,9*
$3x10^{-8}$	3,0±,8	8,0±3,7*	5,9±1,7	19,1±6,0*
10^{-7}	6,5±1,7	12,3±2,7	6,9±1,9	20,7±5,8*
3×10^{-7}	15,1±3,1	15,8±2,7	13,3±2,8	24,1±6,3*
10^{-6}	20,8±4,3	20,2±3,1	22,2±4,8	26,7±6,8
$3x10^{-6}$	20,7±3,8	24,8±3,1	28,0±5,9	36,9±7,3

*: $p<0,05$ vs Kontrollen (Wilcoxon Matched-Pairs Test)

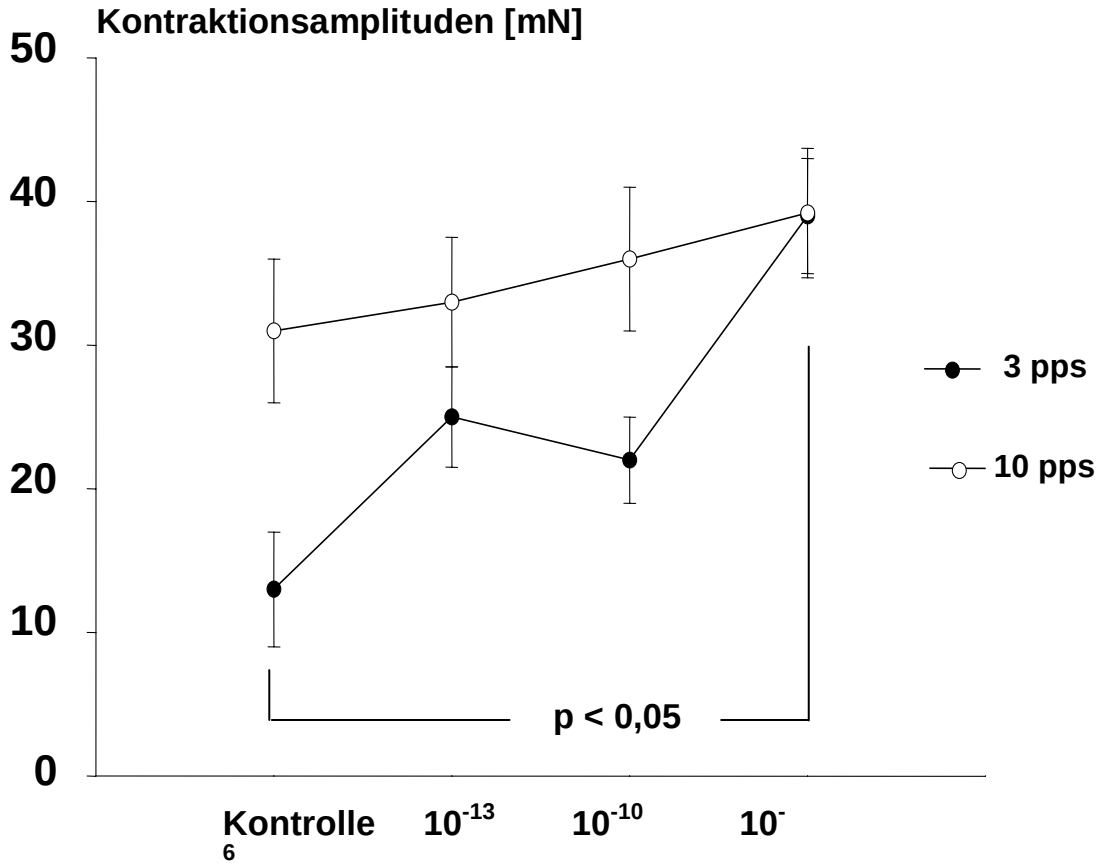

Abbildung 2.1.3: Effekt von Angiotensin II auf im elektrischen Feld stimulierte Rattenkolonmotilität bei 2 verschiedenen Stimulations-frequenzen. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert + SEM von Off-Kontraktionen von jeweils 18 Muskelstreifen (alle Segmente gepoolt, 3 pps, 10 pps) dar. Es gab eine signifikante Verstärkung der Off-Kontraktionen bei 3 PPS durch Angiotensin II im Vergleich zu den Kontrollexperimenten.

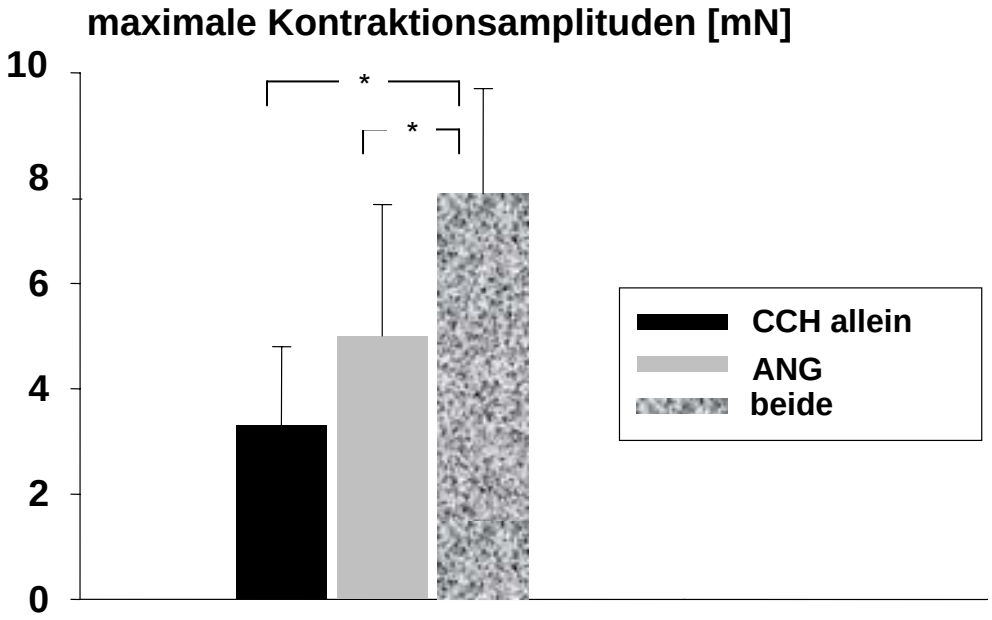

Abbildung 2.1.4: Effekt einer simultanen Stimulation der Rattenkolonmotilität mit äquimolaren Dosen von Angiotensin II (=ANG, 10^{-7} M) und Carbachol (=CCH) allein und simultan (n = 18 Segmente, alle Segmente gepoolt). Die Unterschiede sind statistisch signifikant für den Vergleich von simultaner Stimulation versus jede Substanz allein. * $p<0,05$.

2.1.2 Der Einfluss von antidiuretischem Hormon auf die Kolonfunktion

Methode

Fünf gesunde Probanden wurden eingeschlossen (mittleres Alter 28,8 Jahre, Spannweite 23-34), dann wurde die Studie abgebrochen (s.u.). Zunächst mussten die Probanden zwei Tage dursten (Flüssigkeitszufuhr weniger als 500 ml/Tag). Am Ende jedes Tages wurde um 8:00 Uhr morgens Blut abgenommen und die ADH - Spiegel und Elektrolyte bestimmt. Nach einer fünftägigen Auswaschphase begannen die Probanden für vier Wochen jeweils um 9:00 und 21:00 Uhr 10 Marker für

die Kolontransitzeitbestimmung einzunehmen (s.a. Kolontransitzeit Kapitel 2). Während der Wochen 2 und 4 wurde einfach blind in randomisierter Reihenfolge mit einer Insulinpumpe (Nordisk Infuser Dänemark) entweder leere 0,9% NaCl oder 7,5 ug/Tag 8 Arginin- Vasopressin (Pitressin, Parke-Davis, Berlin) subkutan infundiert. Während der Woche 2 führte der Proband ein Ernährungstagebuch, das dann für die Woche 4 als verbindliche Grundlage diente. Als Flüssigkeit war nur Leitungswasser erlaubt. Als Mindesttrinkmenge wurde 1000 ml pro Tag festgelegt.
Die Kolontransitzeiten wurden mit der Markermethode bestimmt (s. Kap. 3.2). Am Ende der Woche 2 und 4 wurde jeweils eine Röntgenaufnahme des Abdomens angefertigt, um aus der Markerverteilung die gesamte und segmentale Transitzeit zu errechnen. Alle Stühle wurden mit einem Toiletteneinsatz zur Bestimmung der Stuhlfrequenzen und Stuhlgewichte gesammelt. Am Tag 1 und 7 der Woche 2 und 4 wurde jeweils Blut für die ADH - Bestimmung abgenommen. Zusätzlich wurde in Sammelurinen der Tage -1, 4 und 7 der Woche 2 und 4 die Konzentration von ADH im Urin bestimmt. Die ADH - Bestimmung erfolgte mit einem Radioimunoassay (IBL, Hamburg).

Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte $\pm$ Standard Irrtum des Mittelwerts angegeben. Die statistischen Vergleiche wurden mit dem Wilcoxon- Test für gepaarte Daten durchgeführt. Ein p-Wert von 0,05 im zweiseitigen Test wurde als signifikant definiert. Die Auswertung erfolgte auf einem Computer mit dem Statistik-Programm SPSS/PC+ von SPSS Inc. Chikago, Illinois, USA. Mit den Daten der früheren Untersuchungen wurden für die fünf Probanden eine Abschätzung des Betafehlers durchgeführt. Bei fünf Probanden würde eine Differenz der Transitzeit von mehr als 20h, ein Unterschied der Stuhlgewichte von 111g/Tag und ein

Stuhlfrequenzunterschied von 5,3/Woche mit einer Power von 80 % (Betafehler 20 %) erkannt werden[68].

Ergebnisse

Während des zweitägigen Durstens verdoppelten und durch die ADH-Infusion vervierfachten sich die ADH- Spiegel im Blut und im Urin (Tabelle 2.1.6.). Alle Probanden entwickelten etwa einen halben Tag nach Stop der ADH- Infusion eine Harnflut. Die Probanden hatten einen Trend (p<0,10) zu höheren Körpergewichten während der ADH - Infusion. Die objektivierbaren Parameter der Kolonfunktion wurden nicht beeinflusst.

Tabelle 2.1.6: Zielgrößen bei Plazebo- und ADH- Infusion.

[mean+SEM]	Dursten	Placebo	ADH
SerumADH [pg/ml[	1,17+0,4	0,56+0,31	2,3+0,67*
UrinADH [ng/Tag]	121+33	60+11	251+30*§
Urin [l/Tag]	0,80+0,43	1,59+0,14	1,2+0,16*§
Körpergewicht [kg]	77,5+4,1	77,3+4,8	79,6+4,8
Stuhlfrequenz [n/W]	-	6,8+0,8	6,8+0,5
Stuhlgewicht [g/W]	-	200+25	211+21
Transit [h]	-	23+7,0	26+5,8
- rechtes Hemikolon	-	6,0+1,7	5,3+2,9
- linkes Hemikolon	-	5,5+4,4	8,9+3,1
- Rektosigmoid	-	11,4+3,1	11,5+4,1

*p < 0,05 vs. Placebo, § p<0,05 vs. Dursten. Die übrigen Vergleiche waren nicht signifikant. Als Anhaltspunkt für die physiologischen Werte sind die unter Dursten erhobenen Messgrößen mit angegeben.

2.2 Morphometrische Befunde am enterischen Nervensystem

Bei Patienten mit chronischer Obstipation gibt es eine Untergruppe mit besonders schwerer Transitstörung. Klinisch fällt bei diesen Patienten ein fehlendes Ansprechen auf Ballaststoffe auf. Diese offensichtlich fehlende Antwort der Kolonmotilität auf luminale Distension spricht für einen Defekt des enterischen Nervensystems des Kolons. Das wohl bekannteste Beispiel für einen solchen Defekt ist die Hirschsprungsche Erkrankung, die durch ein Fehlen der myenterischen und submukösen Ganglien, einer vermehrten Anzahl von Azetylcholinesterase - positiven Nervenfasern innerhalb der lamina propria mucosae und einer tonischen Kontraktion des erkrankten Kolonsegments charakterisiert ist[69, 70]. Jedoch ist dies eine pädiatrische Erkrankung, die bei Erwachsenen nur sehr selten beobachtet und bei diesen als Morbus Hirschsprung des kurzen Segmentes bezeichnet wird[14]. Klinisch fällt eine obstruierte Defäkation auf. Bei Kindern mit schwerer funktioneller Obstipation wurde eine weitere Abnormalität des enterischen Nervensystems beschrieben, die mit dem Begriff “Intestinale neuronale Dysplasie“ (IND) Typ B bezeichnet wird. Sie soll charakterisiert sein durch eine vermehrte Anzahl von Ganglien-Zellen pro Ganglion, in die lamina propria oder muscularis mucosae dislozierte Ganglien (dystope Ganglien), verdickte submuköse Nervenfasern und fokal vermehrt innerhalb der Mukosa auftretende Nervenfasern[71]. Allerdings wurden diese Merkmale bisher nicht mit Untersuchungen bei gesunden Kontrollpersonen verglichen.

Die in 2.2.1 vorgestellte Studie untersuchte, ob dysplastische Veränderungen des submukösen Plexus bei erwachsenen Patienten mit Slow- transit- Obstipation im Vergleich mit gesunden Kontroll-Personen vorliegen. Dabei wurde sowohl eine Morphometrie als auch eine

persönliche Auswertung der Daten des untersuchenden Pathologen durchgeführt[72].

Nachteil der im vorigen Kapitel geschilderten Untersuchung war, dass in vielen Biopsien nicht ausreichend Submukosa vorhanden war, um die Nervenplexus ausreichend zu evaluieren. Außerdem setzte sie voraus, dass es Normalwerte gibt, die eine klare Unterscheidung zwischen „pathologisch“ und „gesund“ ermöglichen sollten. Erfahrungsgemäß ist es schwierig, solches Material am Menschen zu gewinnen.

Einen solchen Versuch stellt die in 2.2.2 dargestellte Studie dar[73], in der sowohl Darmpräparate von Obduktionen und auch OP- Resektate verglichen wurden und die es insbesondere ermöglichte, eine quantitative Auswertung des Plexus submucosus zu unternehmen. Die Frage, welche Streubreite der Einzelparameter als Norm anzusehen ist und welche Kombination von Befunden als diagnostisch relevant betrachtet werden kann, soll damit näher beleuchtet werden.

2.2.1 Dysplasie des submukösen Nervenplexus bei Patienten mit langsamem Kolontransit: Gibt es die Erkrankung "Intestinale neuronale Dysplasie" beim Erwachsenen?

Methode

Patienten

Es wurden von 27 ambulanten Patienten Rektumbiopsien entnommen. Alle Patienten klagten über eine schwere und langdauernde (> 6 Jahre) Obstipation, hatten einen Normalbefund in der Koloskopie (ausgenommen

Melanosis coli), einen dokumentierten langsamen Kolontransit, jedoch keine Zeichen einer obstruierenden Defäkation bei der proktologischen Untersuchung. Als Kontrolle dienten Biopsien von 23 Patienten, die aus anderen Gründen zur Koloskopie überwiesen wurden und dort weder einen pathologischen Befund noch klinische Zeichen der Obstipation wie eine niedrige Stuhlfrequenz, eine gestörte Defäkation oder einen Laxantienabusus aufwiesen.
Die demographischen Daten der Patienten und Kontroll-Personen sind in Tabelle 2.2.1 angegeben. Alle Patienten gaben ihre Zustimmung zur Rektumbiopsie. Das Studienprotokoll war durch die Ethikkommission genehmigt worden.

Transitzeit-Messung

Die Patienten schluckten für 14 Tage je eine Gelatine-Kapsel mit je 20 röntgendichten Markern (499/000/000, Portex Ltd, Hythe Kent, UK), jeweils um 9 Uhr morgens. Gleichzeitig wurde allen Patienten eine Ballaststoffmedikation mit Psyllium (Mukofalk®, Falk Pharma GmbH, Freiburg, Deutschland) 30 g pro Tag gegeben. 24 Stunden nach der Einnahme der letzten Kapsel wurde eine Abdomen-Röntgenaufnahme durchgeführt. Dabei wurden die retinierten Marker gezählt. Die oroanale Transitzeit wurde durch Multiplizieren der Gesamtmarkerzahl mit 1,2 berechnet[74]. Eine Transitzeit von > 60 Stunden wurde als pathologisch definiert.

Rektumbiopsien

Von jedem Patienten wurden 6 cm oral der linea dentata je 2 Rektumbiopsien entnommen. Dabei wurde eine spezielle Saugbiopsiezange benutzt (Doppel-Saug-Biopsie Instrument, Ulrich, Ulm,

Tabelle 2.2.1: Demographische Daten von Patienten und Kontrollen mit und ohne ausreichender Submukosa bei Rektumbiopsien.

	Patienten *		Kontrollen*	
ausreichend Submukosa	ja	nein	ja	nein
n	21	6	15	8
Geschlecht (m/w)	6/15	0/6	12/3	5/3
Alter [J][range]	47 (16-88)	34 (19-50)	54 (27-85)	67 (50-83)
Beschwerdedauer [J± SEM]	18±4	8±6	0	0
Laxantieneinnahme	21	6	0	0
Oroanaler Transit [h±SEM]	116±8	132±28		-

*Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Untergruppen mit und ohne ausreichender Submukosa. Die Patientengruppe bestand aus mehr Frauen ($p < 0,01$).

Deutschland). Eine der Biopsien wurde sofort in 4%- Formaldehyd fixiert, die zweite wurde unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Formalin-fixierte Bioptat wurde später in Paraffin weiterverarbeitet.

Das unfixierte Material wurde im Kryostat geschnitten (Schichtdicke 10-15 μm), luftgetrocknet, und nach der Methode von Karnovsky und Roots für Azetylcholin- Esterase[75] sowie für Laktat - Dehydrogenase[76] gefärbt. Die Schnitte wurden dabei mit Glyzeringelatine bedeckt.

Das in Paraffin eingebettete Material wurde in Schnitte à 2-3 μm geschnitten und mit Antikörpern gegen neuronen-spezifische Enolase (=NSE) (polyklonal) sowie gegen S 100 -Protein nach der ABC-Methode gefärbt [77].

Die Pathologen waren bezüglich der Herkunft der Biopsien (Patienten oder Kontrollen) verblindet.

Quantitative Auswertung

Die quantitative morphometrische Auswertung wurde mittels eines okulären Rasters und eines okulären Mikrometers bei einer 400fachen Vergrößerung durchgeführt. Folgende Parameter wurden ausgewertet:

Mittlere und maximale Anzahl von Zellen pro Ganglion, mittlere Anzahl von Ganglien und mittlere Anzahl von Ganglien pro mm^2 submukösen Gewebes, mittlerer und maximaler Durchmesser der Ganglienzellen, maximale Dicke der submukösen Nervenfasern.

Qualitative Auswertung

Folgende Parameter wurden qualitativ ausgewertet: Dichte der submukösen Ganglien, Vorkommen heterotoper Ganglienzellen, Intensität der Färbung der Adventitia der submukösen Arterien, Dichte der Nervenfasern in der Submukosa und der lamina propria. Alle Parameter wurden nach dem Kriterium fehlend / normal versus anwesend, erhöht, gekennzeichnet.

Subjektive Klassifizierung durch den Pathologen

Die subjektive Auswertung durch einen erfahrenen Pathologen erfolgte auf der Basis der oben erwähnten publizierten Kriterien[71]. In jedem Falle wurde die Dysplasie des enterischen Nervensystems als fehlend, möglich, wahrscheinlich oder vorhanden beurteilt. Diese Auswertung wurde ohne Kenntnis der morphometrischen Befunde durchgeführt.

Statistik

Die qualitativen Daten wurden mit dem χ^2 – Test durchgeführt, die quantitativen Daten nach dem Mann- Whithney- U Test. Die Diskriminanzanalyse mit Minimierung von Wilk´s Lambda (SPSS/PCPLUS Software) wurde aus zwei Gründen durchgeführt: Erstens, um zu ermitteln, ob irgendeine Kombination der morphometrischen Parameter die Unterscheidung zwischen Patienten und Kontrollen verbessern würde, zweitens, um zu testen, ob die subjektive Klassifizierung durch den Pathologen mit den morphometrischen Befunden korreliert war. In Kürze dargestellt, identifiziert das Programm zunächst diejenige Variable mit dem größten diskriminatorischen Einfluss. Anschließend wird ermittelt, welche weitere Variable den höchsten zusätzlichen diskriminatorischen Einfluss hat. Auf diese Weise werden eng in Beziehung stehende Variablen entfernt. Dieser Prozess wird wiederholt, bis keine weitere Variable wesentlich zur Unterscheidung der beiden Gruppen beiträgt (F-Test). Schließlich wird eine Diskriminanz- Funktion generiert, welche die Personen in jeweils so viele Gruppen klassifiziert als es Gruppierungsvariablen gibt. Auf diese Weise werden 2 Gruppen in unserer ersten Analyse generiert (Vergleich zwischen Morphometrie und klinischer Diagnose). In der zweiten Analyse werden dagegen vier Gruppen definiert (Vergleich zwischen Morphometrie und der Diagnose durch den Pathologen).

Ergebnisse

Bei 36 der 50 Personen wurde eine ausreichende Menge an Submukosa erhalten, welche die Bestimmung der Zielvariablen erlaubt (Tabelle 3.2.1). Die Subgruppen der Patienten und Kontrollpersonen mit und ohne ausreichend tiefgehenden Biopsien unterschied sich nicht. Ein Beispiel für ein Riesenganglion und einer dicken Nervenfaser in der Submukosa ist in Abbildung 3.2.1 gezeigt.

Die quantitativen Daten sind in Tabelle 3.2.2 dargestellt. Es konnte mit Ausnahme der Dicke der submukösen Nervenfasern kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden. Allerdings war auch bei diesem Parameter eine beträchtliche Überlappung der Daten festzustellen. Ferner hebt sich die Signifikanz auf, wenn das Signifikanzniveau für multiple Vergleiche korrigiert wird. Bei den qualitativ erhobenen Daten war lediglich das Vorkommen heterotoper Ganglienzellen grenzwertig häufiger bei Patienten (32 %) als bei Kontrollpersonen (6%, $p = 0,04$). Die Dichte der submukösen Nervenfasern, das Vorkommen von Nervenfasern in der lamina propria, Intensität der Anfärbung der Adventitia der submukösen Arterien und die Intensität der ACE-Färbung unterschied sich nicht bei beiden Gruppen.

Diskriminanzanalyse

Die Diskriminanzanalyse der quantitativen und qualitativen Daten identifizierte lediglich die maximale Anzahl der Ganglienzellen pro Ganglien als einzigen signifikanten Parameter, der zur Diskriminanzfunktion beitrug. Nach der resultierenden Diskriminanzfunktion wurden nur 58 % der Fälle korrekt klassifiziert.

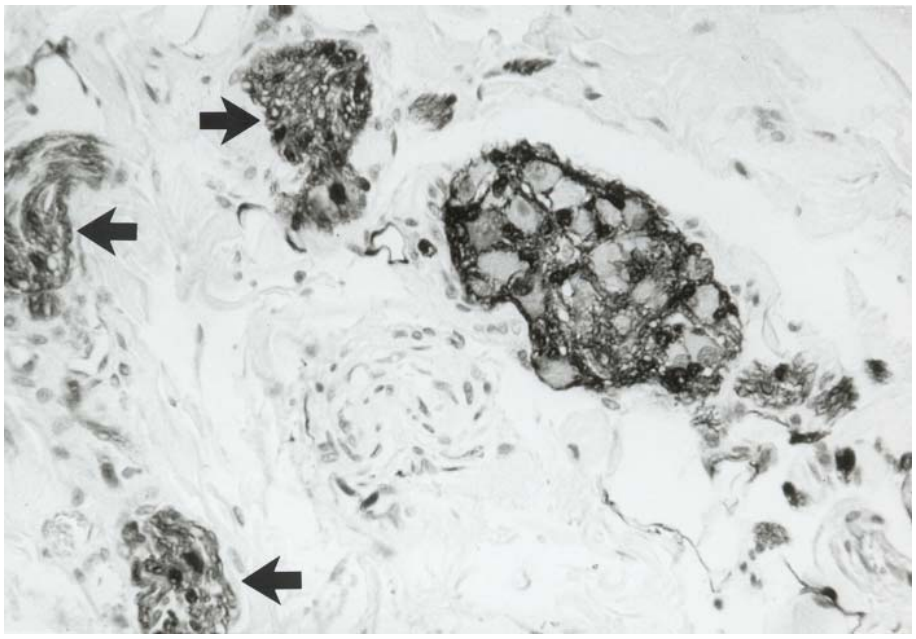

Abbildung 2.2.1: Riesenganglion mit mehr als 10 Ganglienzellen (negative Färbung) und dicke Nervenfasern in der Submukosa (Pfeile). Immunhistochemische Reaktion für S - 100 Protein.

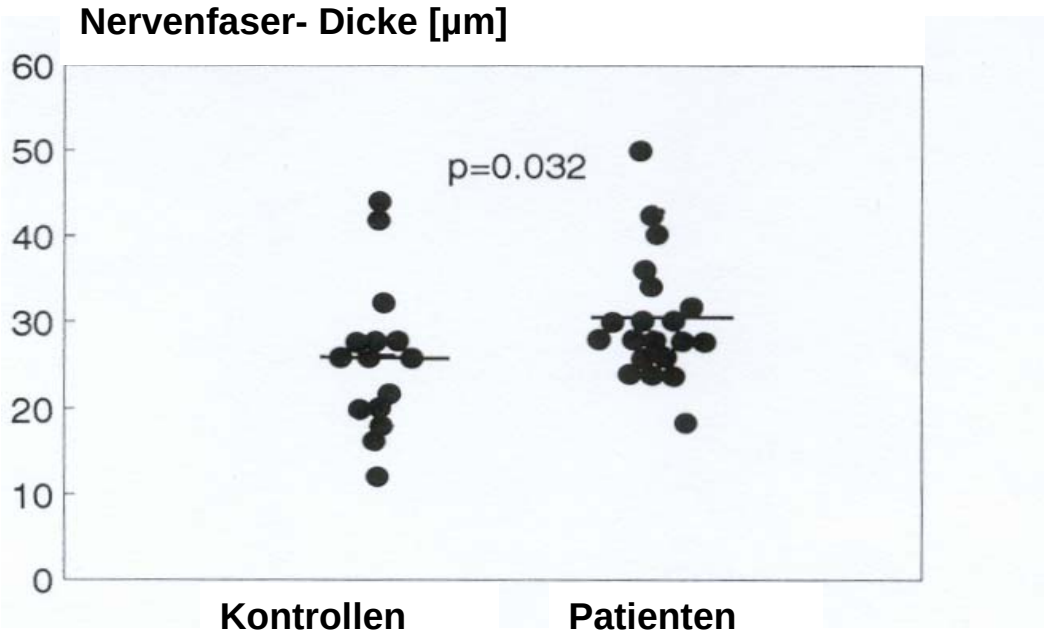

Abbildung 2.2.2: Maximaler Durchmesser der submukösen Nervenfasern bei Patienten mit langsamem Kolontransit und bei Kontrollen. Bei einem Patienten war keine Submukosa miterfasst.

Tabelle 2.2.2: Quantitative Parameter (Mittelwert ± SEM) der morphometrischen Analyse des submukösen Nervenplexus.

	Patienten	Kontrollen
max. Dicke submuköser Nerven [µm]	30,8±1,6	25,5±2,0 *
Ganglien		
- mittlere Anzahl von Ganglienzellen	2,8±0,2	2,8±0,2
- maximale Anzahl von Ganglienzellen	8,1±0,9	7,2±1,0
Ganglienzellen		
- mittlerer Durchmesser [µm]	15,4±0,5	16,2±0,7
- maximaler Durchmesser [µm]	22,9±1,4	21,3±1,5
Dichte (n/mm^2) von		
- S100 positiven Zellen (Mukosa)	133,5±15,3	123,0±16,1
- submukösen Ganglien	5,6±0,7	4,7±0,6
- submukösen Ganglienzellen	15,7±1,9	12,6±1,6

*$p < 0,05$ für Gruppenvergleich

Subjektive Klassifizierung

Obwohl es einen Trend zur korrekten Klassifizierung durch die subjektive Evaluation gab, war dies weit vom statistischen Signifikanzniveau entfernt (Abbildung 2.2.3). Im Gegensatz dazu war die Korrelation zwischen der subjektiven Klassifizierung und der Klassifizierung durch die Diskriminanzanalyse der morphometrischen Daten gut (p = 0,012).

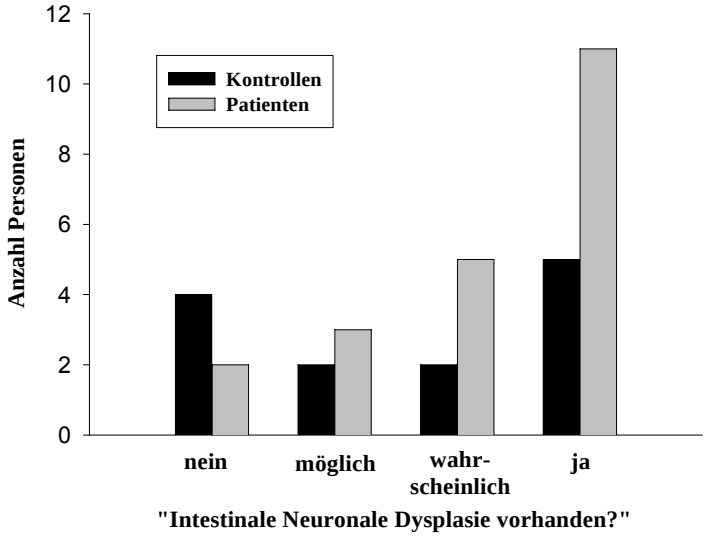

Abbildung 2.2.3: Ergebnisse der subjektiven Klassifikation durch den Pathologen bezüglich der Wahrscheinlichkeit des Vorliegens der IND (keine IND / möglich / wahrscheinlich / vorhanden). Der Pathologe war bezüglich der Herkunft der Bioptate verblindet. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (χ^2).

2.2.2 Die Wertigkeit morphometrischer Parameter bei Melanose und bei Normalpersonen: Untersuchungen an Resektaten und Obduktions-Material

Methode

Untersucht wurden 39 Dickdarm-, hauptsächlich Sigma- und Rektum-Resektate aus dem Routineeingangsmaterial des Pathologischen Institutes der LMU München der Jahre 1990 und '91. Dabei handelte es sich in der überwiegenden Zahl der Fälle um karzinombedingte Resektionen von Patienten beiderlei Geschlechts, Durchschnittsalter 55 Jahre. Von den proximalen und distalen Absetzungsrändern der bereits formalinfixierten (4%) Präparate wurden jeweils 6 cm lange und ca. 0,3 cm breite, in Längsrichtung zum Darm verlaufende, transmurale Gewebeproben entnommen. Die so gewonnenen Gewebestreifen wurden mit dem jeweiligen Absetzungsrand innen in Schneckenform der Länge nach aufgerollt (sog. "Swiss role technique") und in Paraffin eingebettet. Aus dem Block wurden anschließend in mehreren Stufen insgesamt 6 Schnitte von 2 µm Dicke angefertigt. Die Färbung der Schnitte erfolgte routinemäßig mit Hämatoxylin- Eosin (HE) und immunhistochemisch mit den Nachweisverfahren für S100- Protein und neuron-spezifischer Enolase (NSE). Die morphometrische (quantitative und semiquantitative) Auswertung erfolgte anhand der in Kapitel 2.2.1 geschilderten Methode.

Es wurden 132 Gewebeproben von 66 Todesfällen beiderlei Geschlechts, Durchschnittsalter 39 Jahre, die im Zeitraum von 1991-1992 im Institut für Rechtsmedizin der Universität München zur Obduktion kamen, untersucht. Berücksichtigt wurden dabei nur Fälle aus der Altersgruppe der 20 - 50

Jährigen. Als Ausschlusskriterien galten Eintritt des Todes 24 Stunden und mehr vor der Obduktion, abgeflachte Rektumschleimhaut als Zeichen fortgeschrittener Autolyse und bekannter Drogenabusus.
Aus dem rektosigmoidalen Übergang wurden je 2, ca. 6 cm lange und ca. 0,3 cm breite transmurale Gewebeproben in Längsrichtung zum Darm entnommen. Die Streifen wurden mit ihrem distalen Ende nach innen in Längsrichtung aufgerollt. Eine der beiden Proben wurde nun in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, die andere in 4-% gepuffertem Formaldehyd fixiert und nach 24 h eingebettet. Vom Gefriermaterial wurden je 6 Schnitte in mehreren Stufen (Dicke 15 µm) angefertigt. Die Darstellung erfolgte enzymhistochemisch mit der ACHE- und LDH- Reaktion. Von den eingebetteten Proben wurden 8 Schnitte (Dicke 2 -µm) in Schnittstufen angefertigt. Die Darstellung erfolgte immunhistochemisch mit dem Nachweis von S100- Protein und NSE. Routinemäßig wurde eine HE-Färbung erstellt.
Die Präparate wurden wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben nach quantitativen und semiquantitativen Parametern untersucht.
Untersucht wurden 66 Obduktionsfälle und 39 Resektate. Bei 13 Operationsfällen und 2 Obduktionsfällen ließ sich eine Melanosis coli nachweisen.
Da von den Obduktionsfällen keine und von den Operationsfällen z. T. nur unvollständige Informationen bezüglich des Stuhlverhaltens vorlagen, wurde auf die Berücksichtigung anamnestischer Daten verzichtet. Stattdessen wurde das Vorliegen einer Melanosis coli als verdächtig auf Obstipationsbeschwerden gewertet.

Neben dem Vergleich von Därmen mit und ohne Melanosis coli interessierte, inwieweit sich Darmresektate, die aufgrund pathologischer Veränderungen (meist Karzinomen) entfernt werden mussten, von unauffälligen, d. h. auch nicht melanotischen Därmen aus einem zufällig bestimmten Kollektiv (Obduktionsfälle aus dem Institut für Rechtsmedizin)

unterschieden. Neben der Auflistung der Einzelparameter wurden die verschiedenen Untersuchungsgruppen miteinander verglichen (Mann-Whithney- U- Test). Unterschiede ab einem Signifikanzniveau von p = 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Ergebnisse

Vergleich zwischen melanotischen und nicht melanotischen Därmen an Obduktionsmaterial und an Resektaten

Tabelle 2.2.3 zeigt charakteristische Merkmale und Herkunft der einzelnen Präparate. Unter den Resektaten war der relativ hohe Anteil an melanotischen Därmen auffällig. Ob es sich hierbei um eine zufällige Konstellation handelt, oder ob sich die Melanosis coli häufiger bei den vorwiegend tumorbedingten Operationsfällen findet, ließe sich nur durch größere Fallzahlen ermitteln. Dies war aber nicht Gegenstand unserer Untersuchung.
Die quantitativ und semiquantitativ erhobenen Daten sind in den Tabellen 2.2.4 und 2.2.5 separat dargestellt.

Tabelle 2.2.3: Größe der Präparate, stratifiziert nach Herkunft und Vorhandensein von Melanose

Art des Präparates		N	Fläche Submukosa [mm^2, range]	Länge Muscularis mucosae [mm, range]
Obduktion	unauffällig	64	6,53 (2,15- 22,55)	16,4 (13,4-33,3)
	Melanose	2	6,65 (3,15- 10,15)	18,5 (14,6-21,5)
Operation	unauffällig	26	11,93 (4,15-22,55)	17,2 (7,2-31,0)
	Melanose	13	13,99 (6,90-25,20)	23,5 (15,9-31,1)

Beim Vergleich der *Obduktionspräparate* konnte aufgrund der niedrigen Fallzahl der melanotischen Därme keine verwertbare statistische Auswertung vorgenommen werden. Es zeigte sich für die melanotischen Präparate ein Trend zu größeren Ganglien (Tab. 2.2.4) und bei den semiquantitativen Parametern (Tab. 2.2.5) zu einer vermehrten "fokalen Einstrahlung von Nervenfasern in die Lamina propria mucosae" und einer vermehrten "Anfärbbarkeit von Nervenfasern in der Muscularis mucosae".

Beim Vergleich der OP- Resektate untereinander zeigten die melanotischen Därme eine größere "maximale Ganglienzellzahl pro Ganglion" (p = 0,001), eine größere "maximale Dicke submuköser Nerven" (p = 0,045) und eine vermehrte Anzahl von großen Ganglien mit ">20 Ganglienzellen pro Ganglion und mm Muscularis mucosae" (p = 0,026, Tab. 2.2.4). Obwohl nicht signifikant, lagen die meisten Werte für die Gangliendichte pro mm Muscularis mucosae bei den melanotischen Därmen meist über den Werten der nicht melanotischen Därme. Ferner zeigten die melanotischen Resektate vermehrt "dystope Ganglienzellen" (p = 0,002) und einen Trend zu einer vermehrten "fokalen Einstrahlung von Nervenfasern in die Lamina propria mucosae" (p = 0,066).

Wurden nicht- melanotische Obduktionspräparate mit den entsprechenden nicht- melanotischen OP- Resektaten verglichen, war festzustellen, dass Därme aus Obduktionsmaterial signifikant mehr "Ganglien" (p = 0,001) bzw. "Ganglienzellen pro Quadratmillimeter Submukosa" (p = 0,002) hatten. Es zeigt sich allerdings auch ein (nicht signifikanter) Trend zu einer höheren Ganglienzahl pro mm Muscularis mucosae bei den Resektaten (Tab 2.2.4).

Die semiquantitativen Parameter des Vergleichs der nicht melanotischen Präparate Obduktion vs. Resektion zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 2.2.5).

Tabelle 2.2.4: Quantitative Parameter. Vergleich melanotischer / nicht melanotischer Därme am Obduktionsmaterial und an Resektaten

	Obduktionsmaterial		Resektate	
mean (SEM)	Melanose, n=2	Keine Melanose, n=64	Melanose, n=13	Keine Melanose, n=26
DGZ	3,85 (0,45)	2,60 (0,07)	3,02 (0,19)	2,88 (0,15)
MAXGZ	22,00 (4,00)	9,17 (0,53)	17,15 (1,85)	10,15 (0,97)*
MAXNDM	46,00 (14,0)	33,28 (0,88)	50,46 (5,65)	37,69 (2,74)*
DGZDM	13,75 (1,65)	14,23 (0,22)	14,91 (0,48)	14,82 (0,33)
MAXGZD	24,00 (6,00)	23,31 (0,39)	25,85 (1,37)	25,69 (1,33)
GGMM	1,3 (0,40)	1,69 (0,11)	1,91 (0,28)	1,82 (0,21)
GGQM	3,7 (0,10)	4,75 (0,31)	3,11 (0,52)	2,76 (0,16)**
GZQM	14,35 (1,35)	12,21 (0,76)	9,75 (1,77)	8,2 (0,23)**
1/MM	0,393 (0,05)	0,642 (0,05)	0,764 (0,09)	0,601 (0,95)
2/MM	0,231 (0,05)	0,385 (0,02)	0,369 (0,07)	0,439 (0,04)
3/MM	0,163 (0,12)	0,240 (0,02)	0,241 (0,03)	0,221 (0,02)
4/MM	0,092 (0,00)	0,130 (0,01)	0,107 (0,03)	0,177 (0,02)
5/MM	0,093 (0,09)	0,064 (0,01)	0,079 (0,02)	0,114 (0,03)
6/MM	0,093 (0,05)	0,069 (0,01)	0,084 (0,02)	0,072 (0,02)
7/MM	0,070 (0,02)	0,037 (0,01)	0,052 (0,01)	0,053 (0,01)
8/MM	0,0 (0,00)	0,017 (0,0)	0,032 (0,02)	0,028 (0,01)
9/MM	0,047 (0,00)	0,025 (0,01)	0,034 (0,01)	0,022 (0,01)
10/MM	0,0 (0,00)	0,011 (0,00)	0,022 (0,01)	0,015 (0,01)
11/MM	0,0 (0,00)	0,004 (0,00)	0,027 (0,01)	0,013 (0,01)
12/MM	0,047 (0,05)	0,003 (0,00)	0,024 (0,01)	0,010 (0,00)
13/MM	0,0 (0,00)	0,005 (0,00)	0,017 (0,01)	0,012 (0,01)
14/MM	0,0 (0,00)	0,0 (0,00)	0,0 (0,00)	0,052 (0,00)
15/MM	0,024 (0,02)	0,0 (0,00)	0,009 (0,00)	0,003 (0,00)
15-20/MM	0,024 (0,20)	0,001 (0,00)	0,013 (0,01)	0,005 (0,00)
>20/MM	0,024 (0,02)	0,002 (0,00)	0,012 (0,01)	0,003 (0,00)*

* $p<0,05$ vs. Melanose bei Resektaten, ** $p< 0,05$ vs. keine Melanose bei Obduktionsmaterial

DGZ Durchschnittliche Ganglienzellzahl/Ganglion
MAXGZ Maximale Ganglienzellzahl / Ganglion
MAXNDM Maximaler Durchmesser submuköser Nerven
DGZDM Durchschnittlicher Ganglienzelldurchmesser
MAXGZD Maximaler Ganglienzelldurchmesser
GGMM Anzahl der Ganglien / mm Muscularis mucosae
GGQM Anzahl der Ganglien pro mm^2 Submukosa
GZQM Anzahl der Ganglienzellen pro mm^2 Submukosa
n/MM Anzahl der Ganglien mit Ganglienzellzahl n pro mm Muscularis mucosae

Tabelle 2.2.5: Semiquantitative Parameter. Vergleich nicht melanotische vs. melanotische Därme am Obduktionsmaterial und Resektionsmaterial

	Melanose	Obduktion Positiv[%]	Resektion Positiv[%]
Dystope Ganglienzellen	Ja Nein	50,0 15,6	53,8* 7,6
Dichte submuköser Nerven	Ja Nein	0 15,6	15,4 19,2
Fokal erhöhte Dichte submuköser Nerven	Ja Nein	100,0 43,8	53,8 34,6
Dichte muköser Nervenfasern	Ja Nein	0,0 17,2	46,2 26,9
Fokal erhöhte Dichte muköser Nervenfasern	Ja Nein	100,0* 25,0	69,2 38,4
Anfärbbarkeit von Nervenfasern in der Gefäßwand submuköser Arterien	Ja Nein	50,0 15,6	7,7 23,1
Anfärbbarkeit von Nervenfasern in der Muscularis mucosae	Ja Nein	100,0* 11,0	23,1 11,5

* $p<0,05$ (χ^2-Test)

Vergleich aller melanotischen mit allen nicht melanotischen Präparaten

Aufgrund der nur geringen Unterschiede zwischen Resektaten und Obduktionspräparaten wurden die Daten von melanotischen und nicht melanotischen Präparaten nochmals gepoolt ausgewertet.

Bei den quantitativen Parametern (Tabelle 2.2.6) zeigten sich Signifikanzen in den Punkten "durchschnittliche" (p = 0,011) und "maximale Ganglienzellzahl pro Ganglion" (p = 0,000), "maximale Dicke submuköser Nerven" (p = 0,003) und "Ganglien mit den Zellzahlen 11 (p = 0,007), 12 (p

= 0,001), 13 (p = 0,044), 15 (p = 0,000), 16-20 (p = 0,001) und >20 (p = 0,001) pro mm Muscularis mucosae". Die ermittelten Durchschnittswerte lagen in allen Fällen bei den melanotischen Fällen höher als bei denjenigen ohne Melanose. Bei den semiquantitativen Parametern (Tabelle 2.2.7) zeigten die melanotischen Präparate signifikant vermehrt "dystope Ganglienzellen" (p = 0,001), eine erhöhte "fokale Dichte muköser Nervenfasern" (p = 0,001) und eine vermehrte "Anfärbbarkeit von Nervenfasern in der Muscularis mucosae" (p = 0,026).

Diskriminanzanalyse

Analog zu Kapitel 2.2.1 wurde eine Diskriminanzanalyse durchgeführt. Um eine möglichst große Fallzahl zu erreichen, wurden die o.g. gepoolten Daten aller melanotischen und nicht melanotischen Daten verwendet. Dabei hatten die Parameter "maximale Ganglienzellzahl pro Ganglion" (p=0,0), "maximale Dicke submuköser Nerven" (p=0,0), "Vorkommen dystoper Ganglien" (p=0,001) und die Anzahl der großen Ganglien mit "15 oder mehr Ganglienzellen pro mm Muscularis mucosae" (p=0,001, 0,001, 0,006) den größten diskriminatorischen Einfluss zwischen melanotischen und nicht melanotischen Därmen. Die Diskriminanzfunktion klassifizierte 89% aller Fälle richtig, wobei 12 % aller nicht melanotischen Därme falsch positiv, dagegen nur ein melanotischer Darm (7 %) als falsch negativ erkannt wurden.
Bei der Diskriminanzanalyse zwischen Obduktions- und Operations-Präparaten besaßen die "maximale Dicke submuköser Nerven“ (p = 0,001), die "maximale Ganglienzellzahl pro Ganglion" (p = 0,009) und die Anzahl der großen Ganglien mit "15 und -20 Ganglienzellen pro mm Muscularis mucosae" (p = 0,049; 0,018) die größte diskriminatorische Potenz. Anhand der oben erwähnten Parameter sind hier 71 % aller Fälle als richtig zu klassifizieren, wobei 83 % der Obduktionsfälle richtig, aber fast die Hälfte (49 %) der Resektate falsch zugeordnet wurden.

Tabelle 2.2.6: Vergleich aller melanotischen mit allen nicht melanotischen Därmen

mean (SEM)	Melanose, n=15	Keine Melanose, n=90
DGZ	3,13 (0,18)	2,68 (0,06)*
MAXGZ	17,80 (1,70)	9,46 (0,47)*
MAXNDM	49,87 (5,08)	34,56 (1,02)*
DGZDM	14,75 (0,46)	14,40 (0,18)
MAXGZD	25,60 (1,33)	24,00 (0,46)*
GGMM	1,83 (0,25)	1,73 (0,09)
GGQM	3,19 (0,46)	4,18 (0,25)*
GZQM	10,37 (1,59)	11,05 (0,63)*
1/MM	0,71 (0,06)	0,630 (0,04)
2/MM	0,35 (0,06)	0,401 (0,02)
3/MM	0,23 (0,03)	0,235 (0,02)
4/MM	0,00 (0,03)	0,144 (0,01)
5/MM	0,08 (0,02)	0,078 (0,01)
6/MM	0,08 (0,02)	0,070 (0,01)
7/MM	0,05 (0,01)	0,042 (0,01)*
8/MM	0,02 (0,02)	0,021 (0,00)
9/MM	0,03 (0,01)	0,024 (0,01)
10/MM	0,01 (0,01)	0,012 (0,00)
11/MM	0,02 (0,01)	0,006 (0,00)*
12/MM	0,02 (0,01)	0,005 (0,00)*
13/MM	0,01 (0,01)	0,007 (0,00)*
14/MM	0,00 (0,00)	0,002 (0,00)
15/MM	0,01 (0,01)	0,001 (0,00)*
15-20/MM	0,01 (0,01)	0,002 (0,20)*
>20/MM	0,01 (0,01)	0,002 (0,00)

* $p<0,05$ (Mann- Whithney- U- Test)

Abkürzungen:

DGZ	Durchschnittliche Ganglienzellzahl/Ganglion
MAXGZ	Maximale Ganglienzellzahl / Ganglion
MAXNDM	Maximaler Durchmesser submuköser Nerven
DGZDM	Durchschnittlicher Ganglienzelldurchmesser
MAXGZD	Maximaler Ganglienzelldurchmesser
GGMM	Anzahl der Ganglien pro mm Muscularis mucosae
GGQM	Anzahl der Ganglien pro mm^2 Submukosa
GZQM	Anzahl Ganglienzellen pro mm^2 Submukosa
n/MM	Anzahl Ganglien mit Ganglienzellzahl n pro mm muscularis mucosae

Tabelle 2.2.7: Semiquantitative Parameter. Vergleich aller melanotischer mit allen nicht melanotischen Därmen

	Melanose	0	+/++	positiv[%]	p (χ^2)
Dystope Ganglienzellen	Ja	7	8	53,3	0,001
	Nein	78	12	13,3	
Dichte submuköser Nerven	Ja	13	2	13,3	0,745
	Nein	75	15	16,7	
Fokal erhöhte Dichte submuköser Nerven	Ja	6	9	606,0	0,229
	Nein	53	37	41,1	
Dichte muköser Nervenfasern	Ja	9	6	40,0	0,097
	Nein	72	18	20,0	
Fokal erhöhte Dichte muköser Nervenfasern	Ja	4	11	73,3	0,001
	Nein	64	26	28,9	
Anfärbbarkeit von Nervenfasern in der Gefäßwand submuköser Arterien	Ja	13	2	13,3	0,747
	Nein	74	16	17,8	
Anfärbbarkeit von Nervenfasern in der Muscularis mucosae	Ja	10	5	33,3	0,026
	Nein	80	10	11,1	