

Aus der Klinik für Kinderchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Veränderungen der Interstitiellen Zellen nach Cajal bei der
infantilen hypertrophischen Pylorusstenose

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jonas Herzberg

aus Hildesheim

Datum der Promotion: 09. September 2016

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
ABSTRACT	9
ABSTRACT	11
1 EINLEITUNG	13
1.1 SYMPTOME DER INFANTILEN HYPERTROPHISCHEN PYLORUSSTENOSE (IHPS).....	13
1.2 RISIKOFAKTOREN FÜR DIE ENTWICKLUNG DER IHPS	14
1.2.1 Mögliche Ursachen.....	14
1.2.1.1 Genetische Risikofaktoren.....	14
1.2.1.2 Exogene Risikofaktoren.....	15
1.2.1.3 Hormonelle Risikofaktoren	16
1.2.2 Zusammenschau der Risikofaktoren.....	17
1.3 VERÄNDERUNG DER INZIDENZ DER IHPS.....	18
1.4 AKTUELLES THERAPIEKONZEPT DER IHPS	18
1.5 INTERSTITIELLE ZELLEN NACH CAJAL (ICC).....	19
1.5.1 Einteilung der ICC	20
1.5.2 Funktionen der ICC	21
1.5.3 Histologische Betrachtung.....	22
1.5.3.1 Lichtmikroskopische Identifikation	23
1.5.3.2 Elektronenmikroskopische Identifikation	23
1.6 BEDEUTUNG DER CAJAL-ZELLEN IM MAGEN-DARM-TRAKT.....	23
1.7 MÖGLICHE STÖRUNGEN DER CAJAL-ZELLEN BEI DER IHPS	24
2 FRAGEN UND ZIELSTELLUNG DIESER DISSERTATION	25
2.1 HYPOTHESEN DIESER DISSERTATION	25
3 MATERIAL UND METHODIK	26
3.1 DATENERHEBUNG UND -AUSWERTUNG	26
3.1.1 Auswertung der bundesweiten Daten	26
3.1.2 Erhebung der Daten am Studienzentrum.....	26
3.2 PROBENGWINNUNG	26
3.2.1 Kontrollgruppe	26
3.2.2 Probanden.....	27
3.3 MATERIALIEN.....	28

3.4	PROBENAUFBEREITUNG	31
3.5	PROBENEINBETTUNG	32
3.6	FÄRBUNGEN	33
3.6.1	Histologische Standard-Färbungen	33
3.6.2	Immunhistochemische Reaktion	34
3.6.2.1	Hitzeinduzierte Antigendemaskierung im Dampfgerar	34
3.6.2.2	Antikörpermarkierung in EnVision™-Technik	35
3.6.2.3	Gegenfärbung mit Hämalan	36
3.6.2.4	Positiv- und Negativkontrolle	37
3.7	METHODIK DER AUSWERTUNG	37
3.8	STATISTISCHE METHODEN	40
3.9	ETHIKVOTUM ZUR STUDIE	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	EPIDEMIOLOGISCHE ERGEBNISSE	42
4.1.1	Änderung der Inzidenz in Deutschland von 2000 bis 2013	42
4.1.2	Änderung der Inzidenz am Studienzentrum von 2005 bis 2014	44
4.2	AUSWERTUNG DER GEWEBEPROBEN	47
4.2.1	Studienkollektiv	47
4.2.2	Vergleich der Cajal-Zellzahlen	47
4.3	HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE	49
4.3.1	Morphologische Unterscheidung zwischen Mastzellen und Cajal-Zellen	49
4.3.2	Detaildarstellung der Cajal-Zellen	51
4.3.3	Vergleich zwischen gesundem und erkranktem Gewebe mit wenig Cajal-Zellen ...	54
4.3.4	Vergleich zwischen gesundem und erkranktem Gewebe mit vielen Cajal-Zellen ...	55
5	DISKUSSION	60
5.1	INZIDENZRÜCKGANG DER IHPS	60
5.1.1	Inzidenzrückgang deutschlandweit	60
5.1.2	Inzidenzentwicklung am Studienzentrum	61
5.2	VERÄNDERUNG DER CAJAL-ZELLEN	62
5.3	VERGLEICH MIT ANDEREN STUDIENERGEBNISSEN	63
5.3.1	Rückgang der Inzidenz	63
5.3.2	Veränderungen der Cajal-Zellen bei der IHPS	63
5.4	VERGLEICH DER BEDEUTUNG DER ICC BEI ANDEREN KRANKHEITSBILDERN	64
5.4.1	Morbus Hirschsprung (Kongenitales Megakolon)	64
5.4.2	Primäre Uretermündungsstenose (Megaureter)	65
5.5	STUDIENLIMITATION	66
5.5.1	Patientenkollektiv der histologischen Untersuchung	66

5.5.1.1 Heterogene Altersstruktur der Kontrollgruppe	67
5.5.2 Histologische Möglichkeiten	68
5.5.3 Grenzen der Auswertung	69
5.5.4 Tatsächliche Zellzahlverringering versus Wirkung der Hypertrophie	69
5.6 AUSBLICK.....	70
6 ZUSAMMENFASSUNG	71
LITERATURVERZEICHNIS.....	72
ANHANG.....	87
EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	92
LEBENS LAUF	93
DANKSAGUNG	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – OP-Situs nach erfolgter Pyloromyotomie	28
Abbildung 2 – Ausschnitt Pylorus mit eingezeichneten Feldern entsprechend der Auswahl der HPFs; Vergrößerung: 5-fach.....	38
Abbildung 3 – Mastzellen in der Mucosa; Vergrößerung: 100-fach	39
Abbildung 4 – Cajal-Zellen in der Muscularis mit deutlichen Zellausläufern; Vergrößerung: 100-fach.....	39
Abbildung 5 – Ausgezähltes HPF; alle gewerteten Zellen sind mit einem schwarzen Punkt versehen; Vergrößerung: 40-fach.....	40
Abbildung 6 – Graphischer Verlauf des Inzidenzrückgangs der IHPS	43
Abbildung 7 – Operationen bei IHPS im Studienzentrum pro Jahr	44
Abbildung 8 – Geschlechterverteilung am Studienzentrum zwischen 2005 und 2014	45
Abbildung 9 – Alter der Patienten mit IHPS bei OP im Studienzentrum	46
Abbildung 10 – Boxplot zur Anzahl an Cajal-Zellen im Vergleich zwischen gesundem und erkranktem Gewebe	48
Abbildung 11 – Mastzellen in der Mucosa; Vergrößerung: 40-fach	49
Abbildung 12 – Mastzellen in der Mucosa; Vergrößerung: 100-fach	50
Abbildung 13 – Cajal-Zellen in der Muscularis; Vergrößerung: 100-fach.....	50
Abbildung 14 – Ausschnitt aus gesundem Gewebe; Vergrößerung: 20-fach	51
Abbildung 15 – Ausschnitt aus gesundem Gewebe; Vergrößerung: 40-fach	52
Abbildung 16 – Ausschnitt aus gesundem Gewebe, zentral ist eine horizontal getroffene spindelförmige Cajal-Zelle mit ihren Ausläufern zu erkennen. Die übrigen Anschnitte lassen sich als tangential getroffene Zellausläufer oder wie unten links als tangential getroffener Zellkörper werten; Vergrößerung: 100-fach .	52
Abbildung 17 – Gewebeausschnitt aus einem OP-Präparat; Vergrößerung: 40-fach..	54
Abbildung 18 – Gewebeausschnitt aus der Kontrollgruppe mit unspezifischer Auflockerung der Muscularis; Vergrößerung: 40-fach	55
Abbildung 19 – Gewebeprobe aus der Kontrollgruppe, deutlich erkennbares Netzwerk der Cajal-Zellen über mehrere Schichten hinweg mit unterschiedlicher Orientierung der Zellausläufer; Vergrößerung: 20-fach.....	56

Abbildung 20 – Gewebeprobe aus der Kontrollgruppe, Übergangszone zwischen spindelförmigen Cajal-Zellen im unteren Bildausschnitt und multipolaren Cajal-Zellen im oberen Ausschnitt; Vergrößerung: 40-fach	56
Abbildung 21 – Ausschnitt mit vielen Cajal-Zellen im erkrankten Gewebe. Eine Netzwerkarchitektur ist kaum noch erkennbar; Vergrößerung: 40-fach	57
Abbildung 22 – Ausschnitt aus erkranktem Gewebe mit vielen Cajal-Zellen. Zellausläufer sind nur noch sehr eingeschränkt erkennbar; Vergrößerung: 40-fach	57
Abbildung 23 – Cajal-Zellen im erkrankten Gewebe; Vergrößerung: 100-fach.....	58
Abbildung 24 – Cajal-Zellen im erkrankten Gewebe; Vergrößerung: 100-fach.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Ein- und Ausschlusskriterien für die Patienten zur Datenerhebung im Studienzentrum.....	26
Tabelle 2 – Ein- und Ausschlusskriterien für die histologischen Kontrollproben	27
Tabelle 3 – Ein- und Ausschlusskriterien zur intraoperativen Probengewinnung	27
Tabelle 4 – Materialien und Geräte	28
Tabelle 5 – Protokoll des Gewebeeinbettautomaten zur Einbettung der Gewebeproben	32
Tabelle 6 – Schritte der Entparaffinierung (soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur).....	33
Tabelle 7 – Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung (soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur).....	34
Tabelle 8 – Färbeprotokoll CD117-Reaktion (soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur).....	36
Tabelle 9 – Übersicht über die Anzahl der Lebendgeburten und Q40.0-Diagnosen in Deutschland in den Jahren 2000 bis 2013	42
Tabelle 10 – Übersicht über die Geschlechterverteilung der Lebendgeburten und Q40.0-Diagnosen in Deutschland 2000 – 2013.....	43
Tabelle 11 – Statistischer Vergleich der Anzahl an Cajal-Zellen in der Fall- und Kontrollgruppe	47

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
α -SMA	α -smooth muscle actin
abs.	absolut
Aqua dest.	Aqua destilata
CD	Cluster of Differentiation
DAB	3,3 Zoll-Diaminobenzidinchromogenlösung
g	Gramm
HPF	high-power field
HRP	Meerrettich-Peroxidase
ICC	Interstitielle Zellen nach Cajal / Cajal-Zellen
ICC-CM	Interstitielle Zellen nach Cajal der Ringmuskulatur
ICC-DMP	Interstitielle Zellen nach Cajal des tiefen Muskelplexus
ICC-LM	Interstitielle Zellen nach Cajal der Längsmuskulatur
ICC-MP	Interstitielle Zellen nach Cajal des Plexus myentericus
ICC-SM	Interstitielle Zellen nach Cajal der Submukosa
ICC-SMP	Interstitielle Zellen nach Cajal des submukösen Plexus
ICC-SS	Interstitielle Zellen nach Cajal der Subserosa
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Version 2013
IGF	insulin-like growth factor
IHPS	infantile hypertrophische Pylorusstenose
min	Minute
μ m	Mikrometer
ml	Milliliter
OP	Operation
PGE	Prostaglandin E
SIDS	Sudden infant death syndrom
SSW	Schwangerschaftswoche
TBS	Tris-Waschpuffer
TGF	transforming growth factor

Abstract

Einleitung und Fragestellung:

Die Inzidenz der infantilen hypertrophischen Pylorusstenose (IHPS) nimmt in Deutschland, aber auch in anderen industriellen Staaten, seit einigen Jahren ab. Die Pathogenese dieser Erkrankung ist multifaktoriell und bis heute noch nicht vollständig geklärt.

Insbesondere den Interstitiellen Zellen nach Cajal (ICC) kommt als funktionellem Bindeglied zwischen dem enterischen Nervensystem und der glatten Muskulatur mutmaßlich eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der IHPS zu.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war zu prüfen, ob die regrediente Inzidenzentwicklung auch im eigenen Zentrum (Studienzentrum) nachweisbar ist.

Zur Pathogeneseforschung wurden immunhistochemische Vergleichsuntersuchungen des Verteilungsmusters der ICC in der Pylorusmuskulatur von Kindern mit IHPS und gesundem Kontrollmaterial aus Sektionspräparaten durchgeführt.

Materialien und Methodik:

Für die epidemiologischen Erhebungen wurden die bundesweiten Daten zur Diagnose Q40.0 und dem Geschlecht der Patienten vom Statistischen Bundesamt aus den Jahren 2000 bis 2013 ausgewertet. Am Studienzentrum wurden entsprechende Daten sowie das Alter bei der Operation für den Zeitraum 2005 bis 2014 erhoben.

Für die prospektive Studie wurden von August 2013 bis August 2015 im Rahmen der Pyloromyotomien bei IHPS nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Eltern entsprechende Gewebeproben entnommen. Als Kontrolle dienten Pylorusproben aus Sektionspräparaten verstorbener Neugeborener ohne Vorerkrankungen des Gastrointestinaltrakts. Daran schloss sich die Auszählung der im Paraffinschnitt CD117-positiven Zellen in jeweils 15 high-power fields (HPF) innerhalb der Muscularis an. Die univariate statistische Analyse erfolgte mittels des Man-Whitney-U-Tests (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Ergebnisse:

Im Unterschied zur bundesweiten Verringerung im Untersuchungszeitraum von 3,67 auf 1,63 Fällen pro 1000 Lebendgeburten bei etwa gleichbleibender Geschlechterverteilung bestätigte sich im Studienzentrum dieses Phänomen nicht.

Im Untersuchungszeitraum konnten vier männliche Patienten ($n=4$) mit IHPS in die Studie eingeschlossen werden. 14 Proben von Sektionspräparaten verstorbener

Neugeborener bildeten die Kontrollgruppe. In den intraoperativ gewonnenen Proben fanden sich in 15 HPFs $194,5 \pm 222,5$ Zellen (Mittelwert \pm Standardabweichung), während die Kontrollgruppe $635,8 \pm 496,5$ Zellen aufwies ($p=0,034$). Somit zeigten sich bei den Patienten mit Pylorusstenose im Vergleich zu den Proben aus gesundem Pylorus-Gewebe signifikant weniger Cajal-Zellen.

Schlussfolgerung:

Die epidemiologischen Ergebnisse verdeutlichen einen konsequenten Rückgang der IHPS im deutschlandweiten Vergleich.

Die histologischen Untersuchungsergebnisse bestätigen die Hypothese der verminderten Anzahl von ICC als einen der wesentlichen pathophysiologischen Faktoren bei der Entstehung der IHPS.

Abstract

Introduction and aims:

The incidence of infantile hypertrophic pyloric stenosis (IHPS) has been decreasing in Germany and in other industrialised countries for a number of years. The pathogenesis of this disease is multifaceted and currently not fully clear. Particularly, the Interstitial cells of Cajal (ICC) may play an essential role in the development of IHPS, as they form the functional link between the enteric nervous system and smooth muscle.

The aim of this study was to verify whether this decreasing incidence could also be shown in our own institution (study centre).

The immunohistochemical examination compared the ICC distribution patterns of pyloric biopsies from children with IHPS to healthy control tissue from section preparations.

Materials and methods:

For the epidemiological evaluation, nationwide data for diagnosis Q40.0 and gender from the Federal Statistics Office for the years 2000 to 2013 was evaluated. Equivalent data was collected at the study centre in addition to the age at the time of surgery during the years 2005 to 2014.

For the prospective study we collected tissue samples at pyloromyotomies from August 2013 to August 2015 after obtaining informed written parental consent. Specimens of pyloric tissue from autopsies of infants without pre-existing gastrointestinal diseases served as a control.

Subsequently, manual counting of the CD117-positive cells in paraffin sections in 15 high-power fields (HPF) in the lamina muscularis was performed.

Univariate statistical analysis was performed using the Man-Whitney-U-test (significance level $p < 0.05$).

Results:

The nationwide decreased from 3.67 to 1.63 cases of IHPS per 1000 live births with constant gender distribution could not be shown at the study centre. During the study period, four male patients with IHPS were included. The control group consisted of post-mortem specimens from 14 infants.

The number of ICC counted in the intraoperatively obtained samples ($n=4$) in 15 HPFs showed 194.5 ± 222.5 cells (mean \pm SD) in the muscularis while the control group showed 635.8 ± 496.5 cells ($p=0.034$).

Thus significantly fewer ICC were seen in patients with pyloric stenosis compared to samples from healthy pyloric tissue.

Conclusion:

The epidemiological findings clearly show a consistent decline in IHPS cases in Germany.

The histological findings support the hypothesis of the reduced number of ICC as one of the main pathophysiological factors in the development of IHPS.

1 Einleitung

Die infantile hypertrophische Pylorusstenose (IHPS) ist eine Erkrankung des frühen Neugeborenenalters, bei der es zu einer Hypertrophie der zirkulären Muskelfasern des Pylorus kommt.¹

In der Regel tritt die IHPS zwischen der zweiten und zwölften Lebenswoche² auf, zeigt einen Häufigkeitsgipfel in der dritten bis fünften Woche² und präsentiert sich mit klassischen klinischen Symptomen (siehe Abschnitt 1.1).

Die Erstbeschreibung der Pylorusstenose als klinisch relevante Erkrankung stammt von dem deutschen Wundarzt Wilhelm Fabry aus dem Jahre 1627.³ Unser heutiges Verständnis der IHPS geht auf die Beschreibung von Harald Hirschsprung aus dem Jahre 1888 zurück.⁴ Weitere 20 Jahre später führte Conrad Ramstedt die erste erfolgreiche Pyloromyotomie durch.^{5,6}

1.1 Symptome der infantilen hypertrophischen Pylorusstenose (IHPS)

Die Kinder mit IHPS fallen durch plötzlich einsetzendes schwallartiges postprandiales Erbrechen auf. Dieses ist möglicherweise auf eine eingeschränkte Koordination zwischen Magenperistaltik und Kontraktion des Pylorus zurückzuführen.⁷ Durch die hochgradige Stenose des Pylorus ist das Erbrochene dabei nicht gallig tingiert, sondern durch den Kontakt der gefütterten Milch mit der Magensäure meist aus geronnener Milch bestehend.⁶

Die Diagnose der IHPS ist oft klinisch anhand der Krankengeschichte zu stellen. In früherer Zeit zeigten sich die Kinder bei ihrer Vorstellung je nach Dauer und Ausprägung der Stenose apathisch und wiesen ein grau-fahles Hautkolorit auf. Inzwischen findet sich eine solche Ausprägung der sichtbaren Veränderungen nur noch selten.⁶

Weiterhin lässt sich im teilweise eingesunkenen Abdomen eine olivenförmige Verdickung im Oberbauch tasten, die besonders kurz vor dem Erbrechen palpabel wird und dem verdickten Pylorus entspricht.⁶ Der Ausprägungsgrad der Hypertrophie hängt nicht mit dem Alter und der Dauer der Symptome zusammen.⁸

Neben dieser klinischen Diagnostik sind auch bildgebende Verfahren möglich. Die sonografische Darstellung des Pylorus stellt heute bei breiter Verfügbarkeit das diagnostische Kernelement dar. Bei dieser schnellen Diagnostik, die vergleichsweise günstig und nicht-invasiv ist, wird der Patient keiner Strahlung ausgesetzt. Diese

Untersuchung weist eine Sensitivität von etwa 99,5% auf und hat eine Spezifität von 100%.⁹ Ältere diagnostische Instrumente wie die Fluoroskopie finden heute aufgrund der Strahlenbelastung und der oben beschriebenen Alternative keine Anwendung mehr.¹⁰

Laborchemisch ist eine Elektrolytverschiebung typisch. Kinder mit IHPS zeigen üblicherweise eine hypochlorämische, hypokaliämische metabolische Alkalose. Diese Verschiebung liegt im beständigen Erbrechen begründet, da die Kinder infolge dessen Salzsäure, Natrium und Kalium verlieren.^{1,11} Zusätzlich kann bei andauernder Beschwerdesymptomatik ein renaler Kompensationsmechanismus hinzukommen, der zu einer paradoxen Azidurie führt.¹

Der Elektrolythaushalt sollte vor einer operativen Versorgung ausgeglichen werden¹² und die Kinder sollten bis zur operativen Therapie eine intravenöse Flüssigkeitszufuhr erhalten.¹

1.2 Risikofaktoren für die Entwicklung der IHPS

1.2.1 Mögliche Ursachen

Die Ursache für die IHPS im Neugeborenenalter ist größtenteils noch ungeklärt. Zahlreiche Studien belegen, dass sich die infantile hypertrophische Pylorusstenose nicht durch eine Ursache erklären lässt, sondern vielmehr ein multifaktorieller Ansatz zur Ursachenklärung herangezogen werden muss.¹³ Aus diesem Grund wird im Folgenden nicht von denkbaren Ursachen für das Auftreten einer IHPS gesprochen, sondern lediglich mögliche Risikofaktoren genannt, die das Auftreten einer IHPS begünstigen können. Diese möglichen unterschiedlichen Risikofaktoren wurden von Panteli et al. übersichtlich in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2009 dargestellt.¹³

1.2.1.1 Genetische Risikofaktoren

Nach aktuellem Kenntnisstand scheinen genetische Ursachen eine Rolle bei der Entwicklung der IHPS zu spielen.¹³ Das Risiko zu erkranken ist, wie eine Untersuchung auf Hawaii aus dem Jahre 1970 zeigte, für verschiedene ethnische Gruppen sehr unterschiedlich.¹⁴ Aus der Studie geht hervor, dass Menschen vom kaukasischen Typ ein deutlich höheres Risiko für eine IHPS haben als solche vom asiatischen Typ.¹⁴

Jungen sind von dieser Erkrankung insgesamt viermal häufiger betroffen als Mädchen.¹³ Jungen von in der Kindheit betroffenen Müttern haben eine 20-prozentige Wahrscheinlichkeit zu erkranken.¹⁵ Im Vergleich dazu liegt die

Erkrankungswahrscheinlichkeit für Töchter von betroffenen Müttern lediglich bei 7%.¹⁵ Kinder betroffener Väter erkranken ebenfalls seltener (Erkrankungswahrscheinlichkeit für Söhne 5,5%, für Töchter 2,5%).¹⁵ Die Wahrscheinlichkeit für Geschwister von Betroffenen ist im Vergleich zur Normalbevölkerung um etwa das 30-Fache erhöht.¹⁵ Studien konnten bisher kein Gen identifizieren, welches für die IHPS hauptverantwortlich ist. Allerdings wurden bereits mehrere unterschiedliche Gen-Loci identifiziert, die im Zusammenhang mit der Ausbildung der IHPS zu stehen scheinen. So wurden zwei Regionen des Chromosoms 16 (16q12-p13 und 16q24)^{16,17} und Loci auf den Chromosomen 11 und dem X-Chromosom (Xq23) identifiziert.¹⁸ Neben diesen Gen-Loci wurde ein Zusammenhang der IHPS mit unterschiedlichen genetischen Syndromen beschrieben. Beispielhaft genannt seien hier das Cornelia-de-Lange-Syndrom¹⁹ und das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom.^{20,21} Auch bei numerischen Chromosomenanomalien scheint die IHPS vermehrt aufzutreten. Es wurde eine erhöhte Inzidenz bei der partiellen Trisomie 9²², der partiellen Trisomie 13 und der partiellen Monosomie 18²³ beschrieben. Weitere genetische Veränderungen werden von einigen Autoren als mitverantwortlich für die IHPS angesehen.^{16,24}

1.2.1.2 Exogene Risikofaktoren

Umweltfaktoren spielen nach der aktuellen Studienlage ebenfalls eine Rolle: So verdeutlichen mehrere Studien eine Verknüpfung zwischen der Ausbildung der Pylorusstenose und dem Plötzlichen Kindstod (SIDS).^{25,26} Als möglicher Grund für dieses Phänomen, welches besonders durch den Abfall der Inzidenz der Pylorusstenose auffiel, der sich parallel zum Inzidenzabfall des SIDS gestaltete, wird die Schlafposition des Kindes und der dadurch verminderte Druck auf den Pylorus in Rückenlage genannt.²⁶

Studien zum Zusammenhang der Ernährung des Kindes mit dem Auftreten der IHPS waren bisher nicht eindeutig, legen allerdings einen schützenden Einfluss des Stillens nahe.^{27,28}

Auch medikamentöse Ursachen der Pylorusstenose werden diskutiert. Durch eine Kohortenstudie in Dänemark konnte vor kurzem gezeigt werden, dass eine Makrolid-Therapie nicht nur bei der Mutter ab der 28. Schwangerschaftswoche oder während der Stillzeit, sondern auch beim Kind in den ersten 120 Lebenstagen, das Risiko für eine IHPS um das bis zu 25-Fache – abhängig vom Alter des Kindes – erhöht.²⁹ Dieser Effekt konnte auch in einer Studie aus den USA bestätigt werden.³⁰ Als

Pathomechanismus ist hier die erhöhte Magen- und Darmmotilität mit verstärkter Pyloruskontraktur unter einer Makrolid-Therapie anzusehen.²⁹ *Helicobacter pylori* als infektiöse Ursache der IHPS konnte bisher nicht nachgewiesen werden.³¹

Weiterhin wurde aufgezeigt, dass der Bildungsgrad der Mutter eine Rolle bei der Entwicklung einer IHPS beim Kind spielt: Ein geringerer Bildungsgrad ist mit einer höheren Auftretenswahrscheinlichkeit der IHPS beim Kind verknüpft.²⁵

Ebenfalls wird teilweise die Herkunft aus einer ländlichen Region als Risikofaktor angeführt, wobei noch nicht geklärt werden konnte, welcher Zusammenhang zwischen der Urbanität und dem Auftreten der IHPS besteht.³²

Mehrere Studien verdeutlichten das Ansteigen des Risikos für eine IHPS, wenn die Mutter jung ist.^{21,33,34} Bei Müttern unter 24 Jahren war eine deutliche Inzidenzsteigerung feststellbar.²¹ In diesem Zusammenhang sei auch genannt, dass das Risiko einer IHPS für das erstgeborene Kind deutlich höher ist und für alle folgenden Kinder beständig abnimmt.^{21,25}

Auch Rauchen während der Schwangerschaft und der ersten Lebenswochen des Kindes erhöht für die betroffenen Kinder das Risiko einer IHPS.^{25,34} Eine neue Studie legt auch die Bedeutung einer Hyperthyreose der Mutter während der Schwangerschaft als möglichen Risikofaktor nahe.³⁵

1.2.1.3 Hormonelle Risikofaktoren

Hormonelle Faktoren, die zur Entstehung der Erkrankung beitragen, werden ebenfalls diskutiert, konnten jedoch bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Eine mögliche Rolle kommt unter anderem dem Gastrin zu, das die Sekretion der Magensäure stimuliert und in Zusammenhang mit der Kontraktion des Pylorus steht.³⁶

Bei einer vermehrten Gastrin-Sekretion zeigt sich eine Zunahme der Pylorus-Kontraktion, die eine eventuelle Hypertrophie verursachen könnte.³⁷ Die Studienlage zu einem erhöhten Gastrin-Spiegel ist jedoch zu heterogen, um aktuell von einem Beleg dieses Faktors als ausschlaggebend zu sprechen.^{38,39}

Ein weiterer Erklärungsansatz in der Ursachenforschung der IHPS ist die Annahme, eine Azidose, ausgelöst durch eine Vielzahl von Faktoren, sei an der Ausprägung der Erkrankung beteiligt und nicht Gastrin selbst.⁴⁰ Dieser Erklärungsansatz geht davon aus, dass es nach einer vermehrten Säuresekretion im Magen zu einer stärkeren Ansäuerung des Duodenalinhalts kommt, der die Ausschüttung von Sekretin und

Cholezystokinin folgt. Diese Mediatoren führen als Schutzmechanismus zu einer Kontraktion des Pylorus, wodurch eine Hypertrophie begünstigt werden kann.^{38,39}

Prostaglandine als Mediatoren der Magen-Darm-Motilität standen aufgrund ihrer proliferativen Wirkung ebenso im Fokus der Ursachenforschung der IHPS.¹³ Insbesondere Prostaglandin E2 (PGE2) und F2a (PGF2a) fanden sich in Untersuchungen erhöht.⁴¹ Dieser Feststellung steht jedoch der relaxierende Effekt von Prostaglandinen auf die glatte zirkuläre Muskulatur gegenüber.⁴²

Die genaue Zuordnung von hormonellen Veränderungen bei der Ausbildung der IHPS ist ähnlich den genetischen Faktoren aktuell noch nicht möglich.

Ein durch Studien relativ gut untersuchter Einflussfaktor scheinen Wachstumsfaktoren zu sein.⁴³⁻⁴⁵ Hier zu nennen sei der insulin-like growth factor-1 (IGF-1), dessen entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung in vielfältigen Geweben und Lokalisationen bei entsprechender Defizienz erkennbar wird.⁴⁶ Bei der IHPS ist nach Untersuchungen die Expression der mitochondrialen Ribonukleinsäure (mRNA) für IGF-1 erhöht.⁴⁵ Dieser Effekt ist gegenüber gesundem Gewebe vor allem in der zirkulären Muskulatur anzutreffen, zeigt sich aber auch in der Längsmuskulatur.⁴³

Neben diesem Wachstumsfaktor konnten weitere Faktoren, die für die Ausbildung und Proliferation von glatter Muskulatur entscheidend mitverantwortlich sind, nachgewiesen werden. Unter anderem sind hier der transforming growth factor- α (TGF- α)⁴⁷ und transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)⁴⁸ anzuführen; beide sind bei der IHPS deutlich erhöht.

1.2.2 Zusammenschau der Risikofaktoren

Die sporadisch auftretende IHPS ist ein gutes Beispiel für die von Carter 1961 beschriebene Theorie der Vererbung.⁴⁹ Für die Ausbildung der Erkrankung müssen zahlreiche exogene und endogene Faktoren zusammenkommen, die gemeinsam mit der genetisch determinierten Labilität zum Entstehen der Krankheit führen.⁴⁹ Dadurch lässt sich erklären, warum einzelne Faktoren nicht zwingend zur Ausprägung der Erkrankung führen, sondern erst bei Überschreitung einer gewissen Toleranzschwelle für Risikofaktoren eine klinisch manifeste IHPS auftritt. Diese Theorie deckt sich auch mit dem so genannten „triple-risk-model“⁵⁰ für das SIDS, welches auch Lisonkova et al. 2014 auf die IHPS übertragen.²⁵

1.3 Veränderung der Inzidenz der IHPS

Die Inzidenz der IHPS zeigt eine deutliche Abhängigkeit zur untersuchten Region und ethnischen Gruppe. So ist die Inzidenz in der chinesischen Ethnie wie beispielsweise in Taiwan mit durchschnittlich 0,39 Fällen je 1000 Lebendgeburten in den vergangenen Jahren sehr gering und vergleichsweise stabil.^{27,51} Im Unterschied dazu weist die Inzidenz für die kaukasische Ethnie in den europäischen Ländern einen wesentlich variableren Verlauf in den vergangenen 30 Jahren auf.⁵² In Schottland lag die Inzidenz 1981 noch bei 4,42 Fällen pro 1000 Lebendgeburten und fiel bis 2004 auf 1,39 Fälle.⁵² Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich auch in anderen europäischen Ländern.^{26,33,53,54}

Als Ursache wird von den Autoren der genannten Studien eine Veränderung im Risikoprofil der Mütter und Kinder beschrieben. Große Aufklärungskampagnen zum Plötzlichen Kindstod führten zu einer veränderten Schlafposition der Säuglinge, die für den Rückgang der Inzidenz im europäischen Raum mitverantwortlich gemacht wurde.⁵⁵ In Deutschland war die Inzidenz in den vergangenen Jahren ebenfalls stetig rückläufig; sie lag nach den Untersuchungen von de Laffolie et al. aus dem Jahr 2011 zuletzt bei 2,02 Fällen pro 1000 Lebendgeburten im gesamtdeutschen Raum.⁵⁶

1.4 Aktuelles Therapiekonzept der IHPS

Die konservative Therapie der IHPS mittels oral oder intravenös appliziertem Atropin konnte teilweise gute Heilungsraten zeigen, stellt jedoch aufgrund möglicher Nebenwirkungen wie einer Tachykardie keine vollständige Alternative dar.⁵⁷⁻⁵⁹ Aus diesem Grund ist die operative Versorgung weiterhin der Goldstandard für dieses Erkrankungsbild.^{1,59,60}

Aktuell existieren sowohl ein offenes als auch ein laparoskopisches Operationsverfahren zur Therapie der IHPS.

Die offene Pyloromyotomie nach Weber-Ramstedt⁵ kam auch in dieser Studie bei der Probengewinnung zum Einsatz. Der operative Zugang zur Bauchhöhle hat sich im Laufe der Jahre deutlich verändert. Während zu Beginn des 20. Jahrhunderts noch die Längslaparotomie den üblichen Zugangsweg bildete (Fredet, 1908)¹¹, wurde 1986 von Tan und Bianchi der Paraumbilicalschnitt für die Pyloromyotomie entwickelt.⁶¹ Dabei wird der Nabel zu $\frac{3}{4}$ innerhalb der natürlichen Hautfalte umschnitten. Es erfolgt die Öffnung des Peritoneums durch die Linea alba rechts der Vena umbilicalis. Anschließend wird der hypertrophische Pylorus aufgesucht und vor die Bauchdecke gezogen. Der Pylorus wird ohne Verletzung der Mucosa mittels einer Längsinzision

durch die gesamte Muscularis gespalten. Anschließend wird die inzidierte Muskulatur unter Zuhilfenahme des Pylorusspreizers nach Weber-Ramstedt auseinandergespreizt. Um eine mögliche Verletzung der Mucosa auszuschließen, wird zum Abschluss des Eingriffs eine Luftprobe mithilfe einer liegender Magensonde durchgeführt.⁶¹

Die laparoskopische Pyloromyotomie stellt seit einiger Zeit eine Alternative zur offenen Operationstechnik dar und wurde erstmals von Alain et al. 1991 beschrieben.⁶² Es existieren diverse Vergleiche zwischen dem offenen und dem laparoskopischen Verfahren, die verdeutlichen, dass es keine signifikanten Unterschiede bei Komplikationen, Wundinfektionen oder OP-Länge gibt.^{11,63,64}

Da eine Probenentnahme bei der laparoskopischen OP-Technik jedoch nur sehr eingeschränkt möglich ist, wurde diese Technik in der vorliegenden Studie nicht angewendet.

1.5 Interstitielle Zellen nach Cajal (ICC)

Die Interstitiellen Zellen nach Cajal (ICC) gehen auf den Neurowissenschaftler Santiago Ramón y Cajal zurück, der diesen Zelltyp bereits Ende des 19. Jahrhunderts in Gewebeproben des Gastrointestinaltrakts als eine besondere Form von Neuronen beschrieben hat.⁶⁵ Später konnte in elektronenmikroskopischen Darstellungen gezeigt werden, dass diese Zellen weder Neurone noch Gliazellen sind, jedoch durch ihre Lokalisation einen wichtigen Beitrag zur Neurotransmission leisten und so eine vermittelnde Stellung zwischen Muskelzellen und Nervenzellen einnehmen.^{66,67} Embryologisch gehen die ICC aus mesenchymalem Gewebe hervor.⁶⁸

1982 wurde durch Thuneberg postuliert, dass die ICC im Magen-Darm-Trakt als sogenannte Pacemaker-Zellen fungieren und ein Reizleitungssystem ähnlich dem des Herzens darstellen.⁶⁹ Diese Hypothese konnte in den folgenden Jahren bestätigt werden⁷⁰⁻⁷², sodass ICC nun als Pacemaker-Zellen und neuromodulierende Zellen angesehen werden.⁷³

ICC lassen sich im gesamten Gastrointestinaltrakt vom Oesophagus⁷⁴ bis zur inneren Sphinkterregion des Anus⁷⁵ nachweisen. In den einzelnen Regionen weisen sie unterschiedliche Verteilungsmuster sowie verschiedene Funktionen und morphologische Besonderheiten auf.

1.5.1 Einteilung der ICC

Aufgrund der genannten Unterschiede lassen sich die ICC in mehrere Subgruppen einteilen.^{76,77}

ICC des Plexus myentericus (ICC-MP)

Rund um den Plexus myentericus bilden diese multipolaren Zellen ein zelluläres Netzwerk. Die Ausprägung der Dichte dieses Netzwerkes ist dabei abhängig vom jeweiligen Darmabschnitt.

ICC der Ringmuskulatur (ICC-CM)

Diese Subgruppe besteht aus vornehmlich bipolaren Zellen, die längsorientiert den Zellen der glatten Muskulatur anliegen. Ein eigenständiges Netzwerk ist in dieser Gruppe nicht erkennbar.

ICC der Längsmuskulatur (ICC-LM)

Diese Gruppe ist ähnlich zu den ICC-CM und wird daher häufig auch mit diesen unter der Bezeichnung intramuskuläre ICC (ICC-IM) zusammengefasst. Im Unterschied zu den ICC-CM ist die zahlenmäßige Ausprägung jedoch geringer.

ICC des tiefen Muskelplexus (ICC-DMP)

Hierbei handelt es sich um multipolare Zellen, die in engem Kontakt zwischen dem Nervengeflecht des tiefen Muskelplexus und den glatten Muskelzellen stehen. Dieser Kontakt ist für die Ausrichtung der Zellausläufer in einer Ebene verantwortlich.

ICC der Submukosa (ICC-SM) und des submukösen Plexus (ICC-SMP)

In der Pylorusregion des Magens ist besonders diese Gruppe ausgeprägt⁷⁸⁻⁸⁰ und besteht hauptsächlich aus bipolaren Zellen, die gemeinsam mit einzelnen multipolaren Zellen ein loses Netzwerk bilden. Die Ausrichtung der bipolaren Zellen ist parallel zur Ringmuskulatur.

ICC der Subserosa (ICC-SS)

Auch in der Subserosa scheint es eine Population der ICC zu geben.⁶⁹ Eine genauere morphologische Untersuchung dieser Zellen ist jedoch aktuell noch nicht erfolgt.

Die Ausprägung der ICC in den einzelnen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes ist unterschiedlich, wobei der Magen eine Besonderheit darstellt. Hier unterscheidet sich die Verteilung der Zellen innerhalb seiner Teilbereiche wesentlich.^{79,81} In der Pylorusregion beispielsweise ist die Dichte an ICC-MP erhöht, wohingegen die ICC-CM und ICC-LM in diesem Bereich abnehmen. Wie bereits erwähnt, kommt im Pylorusbereich auch die Subgruppe ICC-SM vor.⁷⁶

1.5.2 Funktionen der ICC

Die Funktionen, die die ICC im Gastrointestinaltrakt ausüben, sind vielgestaltig und lassen sich in mindestens vier Aufgabenfelder einteilen, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.⁸²

1) Generierung von slow-waves

Bei den Cajal-Zellen handelt es sich um elektrisch aktive Zellen. Für die Ausbildung der slow-waves, die durch die ICC generiert werden,^{83,84} bedarf es eines entsprechenden Pacemaker-Kanals.⁸⁵ Bisher konnten weder der genaue Mechanismus zur Entstehung der Pacemaker-Aktivität noch die molekulare Struktur des entsprechenden Kanals geklärt werden.⁸⁶

2) Mediatorfunktion bei der Neurotransmission

Untersuchungen haben gezeigt, dass die ICC für eine effektive Neurotransmission bei cholinergen und nitrinergen Transmittern als Zwischenstation zwischen dem enterischen Nervensystem und der glatten Muskulatur wichtig sind.^{66,87,88} Bei einer Transmission über peptidische Neurotransmitter sind die ICC jedoch nach aktuellen Studien nicht involviert.⁸⁶

3) Beeinflussung des Membranpotentials der glatten Muskulatur

Es konnte gezeigt werden, dass Cajal-Zellen in der Lage sind, Kohlenstoffmonoxid über eine Hämoxxygenase zu synthetisieren.⁸⁹ Dieses Kohlenstoffmonoxid wirkt an der glatten Muskulatur über einen Kalium-Kanal, wodurch eine Beeinflussung des Membranpotentials der glatten Muskulatur durch die Cajal-Zellen möglich ist.^{89,90}

4) Mechanotransduktion

Die Bedeutung der Cajal-Zellen als Mechanosensor und damit einhergehend als Mediator der Mechanotransduktion ist in den letzten Jahren verstärkt untersucht worden. Aktuell werden drei unterschiedliche Modelle für die Mechanotransduktion durch die Cajal-Zellen diskutiert.

Einerseits ist eine direkte Mechanotransduktion über bestimmte Zellkontakte, die als peg-and-socket-junctions bezeichnet werden, denkbar. Hierbei reichen Zellausläufer der ICC in eine Einfaltung der glatten Muskelzelle hinein.⁹¹

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung der Mechanotransduktion ist ein mechanosensibler Natriumkanal, der in den letzten Jahren in den Cajal-Zellen entdeckt worden ist.⁹² Dieses aus dem Herzen bekannte Prinzip findet sich nach aktuellen Untersuchungen lediglich bei größeren Lebewesen und wird durch mechanische Scherkräfte aktiviert.

Das genaue Wirkprinzip und die Verknüpfung dieser Kanalwirkung mit der Generierung von slow-waves ist jedoch bisher noch ungeklärt.⁹²

Aktuell wird als drittes Prinzip der mechanischen Beeinflussung der Cajal-Zellen die Wirkung von Prostaglandinen – gebildet als Folge von mechanischen Reizen – auf die Generierung von slow-waves diskutiert.⁹³

1.5.3 Histologische Betrachtung

Cajal-Zellen waren lange Zeit einer lichtmikroskopischen Betrachtung nur sehr eingeschränkt zugänglich, da keine Möglichkeit bestand, diese Zellen selektiv darzustellen. Färbungen, wie die Methylen-Blau-Färbung, die schon der Erstbeschreiber Santiago de Ramón y Cajal nutzte, ließen zwar auch eine Untersuchung dieses Zelltyps zu, eine Differenzierung zwischen Cajal-Zellen und Nervenzellen war jedoch nicht eindeutig möglich.^{65,73,94} Es folgten diverse Versuche mit unterschiedlichen Färbungen, die jedoch insgesamt keine speziesübergreifende selektive Darstellbarkeit der Cajal-Zellen erbrachten.⁹⁵

Diese Problematik konnte mit der Entdeckung, dass Cajal-Zellen den sogenannten c-Kit-Rezeptor exprimieren, gelöst werden.⁹⁶ Dabei handelt es sich um eine transmembranöse Rezeptortyrosinkinase, für die das Protoonkogen c-Kit kodiert, das auf Chromosom 4 lokalisiert ist.⁹⁷ Neben der Expression auf Cajal-Zellen⁸³ kommt dieser Rezeptor auch auf anderen Zellarten vor (Mastzellen⁹⁸, unterschiedliche Drüsenepithelzellen⁹⁹). Defekte in dem kodierenden Protoonkogen c-Kit finden sich in unterschiedlichen Neoplasien, wie beispielsweise dem gastrointestinalen Stromatumor.^{100,101} Dieser Rezeptor dient seit der Entdeckung als primärer Oberflächenmarker für die lichtmikroskopische Identifikation von Cajal-Zellen in allen Gewebearten, da sich die so erzielten Darstellungen am besten mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen decken.¹⁰² Weiterhin wurde in den letzten Jahren CD44 als ein weiterer möglicher Marker zur selektiven Darstellung der ICC identifiziert,¹⁰³ der gegenüber dem auch als CD117 bekannten c-Kit-Rezeptor den Vorteil hat, dass er neben den Cajal-Zellen keine Mastzellen anfärbt.

Auch morphologisch ist eine Identifizierung der Cajal-Zellen möglich. Da diese Methode sehr untersucherabhängig ist, dient sie in der histologischen Begutachtung lediglich der Differenzierung zwischen CD117-positiven Mastzellen und CD117-positiven Cajal-Zellen in den entsprechenden Färbungen.

1.5.3.1 Lichtmikroskopische Identifikation

Die lichtmikroskopische Identifikation der Cajal-Zellen ist ohne spezielle Marker wie den CD117-Antikörper praktisch ausgeschlossen. Hierzu wurden bereits zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, wie von Rumessen und Vanderwinden 2003 übersichtlich dargestellt.⁹⁵

Der CD117-Antikörper zur Beurteilung der Cajal-Zellen ist weit verbreitet und in vielen Studien eingesetzt.^{7,102,104}

Darüber hinaus lassen sich jedoch – besonders in jüngerer Vergangenheit – andere potenzielle Marker für Cajal-Zellen finden. Yu et al. konnten 2008 zeigen, dass Cajal-Zellen im Meerschweinchen neben CD117 auch CD44 exprimieren und somit einen neuen potenziellen Marker für die Darstellung der Cajal-Zellen bieten.¹⁰³ Eine mögliche entsprechende Anwendung in humanem Gewebe ist aktuell noch nicht geklärt.

1.5.3.2 Elektronenmikroskopische Identifikation

Ultrastrukturell lassen sich eindeutige Charakteristika für die Cajal-Zellen finden. Zu diesen gehören das Vorhandensein von Intermediärfilamenten, zahlreichen Mitochondrien, ein gering ausgeprägter Golgi-Apparat sowie enge Kontakte zu Nerven- und glatten Muskelzellen.^{82,102} Die Ausprägung dieser Charakteristika ist allerdings variabel. So lassen sich Cajal-Zellen darstellen, die in ihrer Struktur eher an Fibroblasten erinnern, ebenso wie solche, die der Struktur von glatter Muskulatur ähneln.¹⁰²

1.6 Bedeutung der Cajal-Zellen im Magen-Darm-Trakt

Durch die in Abschnitt 1.5.2 beschriebenen Funktionen, wie beispielsweise die Generierung von slow-waves, kommt den Cajal-Zellen im Gastrointestinaltrakt und bei unterschiedlichen Erkrankungen dieses Systems eine entscheidende Bedeutung zu.^{82,105,106}

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Verminderung der Cajal-Zellen im Magen-Darm-Trakt bei verschiedenen mit Motilitätsstörungen einhergehenden Erkrankungen vorliegt.¹⁰⁷ In Untersuchungen zeigte sich, dass auch bei einigen Formen chronisch idiopathischer Pseudoobstruktionen die Zellzahl vermindert war.^{95,108} Auch beim Morbus Hirschsprung ist die Zelldichte im aganglionären Segment verringert.¹⁰⁹ In einer weiteren Untersuchung konnte diese Feststellung nicht bestätigt werden.¹¹⁰

Doch nicht nur bei Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts mit verminderter Motilität scheinen Cajal-Zellen eine Rolle zu spielen, sondern es konnte auch eine vermehrte

Ausprägung von Cajal-Zellen und eine bessere Vernetzung bei Erkrankungen mit erhöhter Motilität wie zum Beispiel der Colitis ulcerosa gezeigt werden.¹¹¹

1.7 Mögliche Störungen der Cajal-Zellen bei der IHPS

Bereits in der Vergangenheit wurde in unterschiedlichen Studien die Verminderung der CD117-positiven Zellen im Pylorus bei Patienten mit IHPS nachgewiesen.^{7,112} Bisher erfolgte die Einteilung dieser Reduktion lediglich semiquantitativ mittels Stufenskala: keine, wenig, moderat und viele positive Zellen.¹¹² Eine genaue Quantifizierung eines möglicherweise bestehenden Mangels an Cajal-Zellen steht aktuell noch aus.

2 Fragen und Zielstellung dieser Dissertation

Die Inzidenz der IHPS hat sich in der Literatur der vergangenen Jahre regredient gezeigt.^{30,56,113} In der vorliegenden Arbeit wird anhand der aktuellen Zahlen zur Inzidenz in Deutschland überprüft, ob sich diese Tendenz weiter fortsetzt. Gezielt werden für die Klinik für Kinderchirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin die IHPS-Fälle aus den Jahren 2005 bis 2014 ausgewertet und mit den gesamtdeutschen Zahlen verglichen.

Darüber hinaus möchte diese Arbeit mögliche Veränderungen der Cajal-Zellen bei der IHPS darstellen. Hierzu werden die bereits vorliegenden Untersuchungsergebnisse der vergangenen Jahre um eine eigene Studie der Klinik für Kinderchirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie ergänzt und die Ergebnisse verglichen.

Nach immunohistochemischer Markierung werden dafür zum ersten Mal absolute Zahlenwerte der Cajal-Zellen im Pylorus bei IHPS und bei einer gesunden Kontrollgruppen erhoben und miteinander verglichen. Dieses Verfahren dient der besseren Beurteilung von Veränderungen und erhöht die Vergleichbarkeit mit anderen Studienergebnissen.

2.1 Hypothesen dieser Dissertation

- Die rückläufige Inzidenz der Pylorusstenose in Deutschland setzt sich fort und spiegelt sich auch am Studienzentrum wider.
- In den am Studienzentrum gewonnenen Gewebeproben aus erkrankter Pyloursmuskulatur bestätigt sich der Mangel an Cajal-Zellen.
- Der erneut nachgewiesene Mangel an Cajal-Zellen bei der Pylorusstenose gibt einen weiteren Hinweis auf einen möglichen Pfeiler der Pathogenese dieser Erkrankung.

3 Material und Methodik

3.1 Datenerhebung und -auswertung

3.1.1 Auswertung der bundesweiten Daten

Die Auswertung der bundesweiten Daten zur Inzidenz der IHPS basiert auf dem medizinischen Informationssystem des Statistischen Bundesamtes.¹¹⁴ Hierfür wurden die bundesweiten Daten für die ICD-10-Diagnose Q40.0 (Angeborene hypertrophische Pylorusstenose, angeboren oder infantil) aus den Jahren 2000 – 2013 erfasst. Neuere Zahlen lagen bei Erstellung der Arbeit noch nicht vor. Der Abruf aus der Online-Datenbank erfolgte am 21.09.2015. Diese Daten wurden in Beziehung gesetzt zu den in den jeweiligen Jahren erfolgten Lebendgeburten. Die entsprechenden Zahlen sowie die geschlechtsspezifische Zuordnung basieren ebenfalls auf den Daten des medizinischen Informationssystems.¹¹⁴

3.1.2 Erhebung der Daten am Studienzentrum

Die Datenerhebung am Studienzentrum bezog sich auf Patienten mit der nach ICD-10 als angeborene Pylorusstenose (Q40.0) verschlüsselten Diagnose in dem Zeitraum 2005 bis 2014. Die Ein- und Ausschlusskriterien für diese Datenerhebung sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 – Ein- und Ausschlusskriterien für die Patienten zur Datenerhebung im Studienzentrum

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
IHPS	Ausschluss einer IHPS
OP im Studienzentrum (2005-2014)	OP nicht nachvollziehbar

3.2 Probengewinnung

3.2.1 Kontrollgruppe

Die Proben der Kontrollgruppe wurden im Institut für Pathologie durch die Abteilung der Paidopathologie bei routinemäßig durchgeführten Sektionen verstorbener Kinder im Zeitraum von 2011 bis 2014 entnommen. Ausgeschlossen wurden verstorbene Kinder mit bekannten Vorerkrankungen des Gastrointestinaltrakts. In die Untersuchung eingeschlossen wurden männliche und weibliche Probanden, welche ab der 25.

Schwangerschaftswoche als Totgeburten sezirt oder lebendig geboren und im weiteren Verlauf verstorben waren (siehe Tabelle 2).

Die Proben der Kontrollgruppe wurden in Form von Vollwandpräparaten als Längsschnitt aus dem Pylorus entnommen.

Tabelle 2 – Ein- und Ausschlusskriterien für die histologischen Kontrollproben

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Zustimmung zur Sektion (2011-2014)	Keine Zustimmung zur Sektion
Totgeburten \geq 25. Schwangerschafts- woche	Totgeburten $<$ 25. Schwangerschafts- woche
	Verstorbene Kinder $>$ 5 Jahre
	Bekannte Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts

3.2.2 Probanden

Die Probenentnahme bei den Probanden erfolgte nach Aufklärung und Einverständniserklärung der Eltern gemäß informierter Einwilligung (siehe Anhang 1 und 2).

Die intraoperative Probenentnahme erfolgte nach konventioneller Pyloromyotomie nach Weber-Ramstedt. Eine einheitliche Probengewinnung war - begründet durch die unterschiedlichen operativen Verhältnisse - nicht gewährleistet. Je nach Operationssitus konnte ein gesamter Längsschnitt der Muscularis oder bei geringer Hypertrophie lediglich einzelne Muskelbiopsien entnommen werden. In Tabelle 3 sind die Ein- und Ausschlusskriterien für die intraoperative Probengewinnung dargestellt.

Tabelle 3 – Ein- und Ausschlusskriterien zur intraoperativen Probengewinnung

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
IHPS	Ausschluss einer IHPS
Erfolgte Aufklärung und Einwilligung	Keine Einwilligung zur Studienteilnahme
OP zwischen August 2013 und August 2015	OP außerhalb des Untersuchungszeitraums
OP im Studienzentrum	Keine OP
Probenentnahme intraoperativ möglich	Keine Probengewinnung möglich

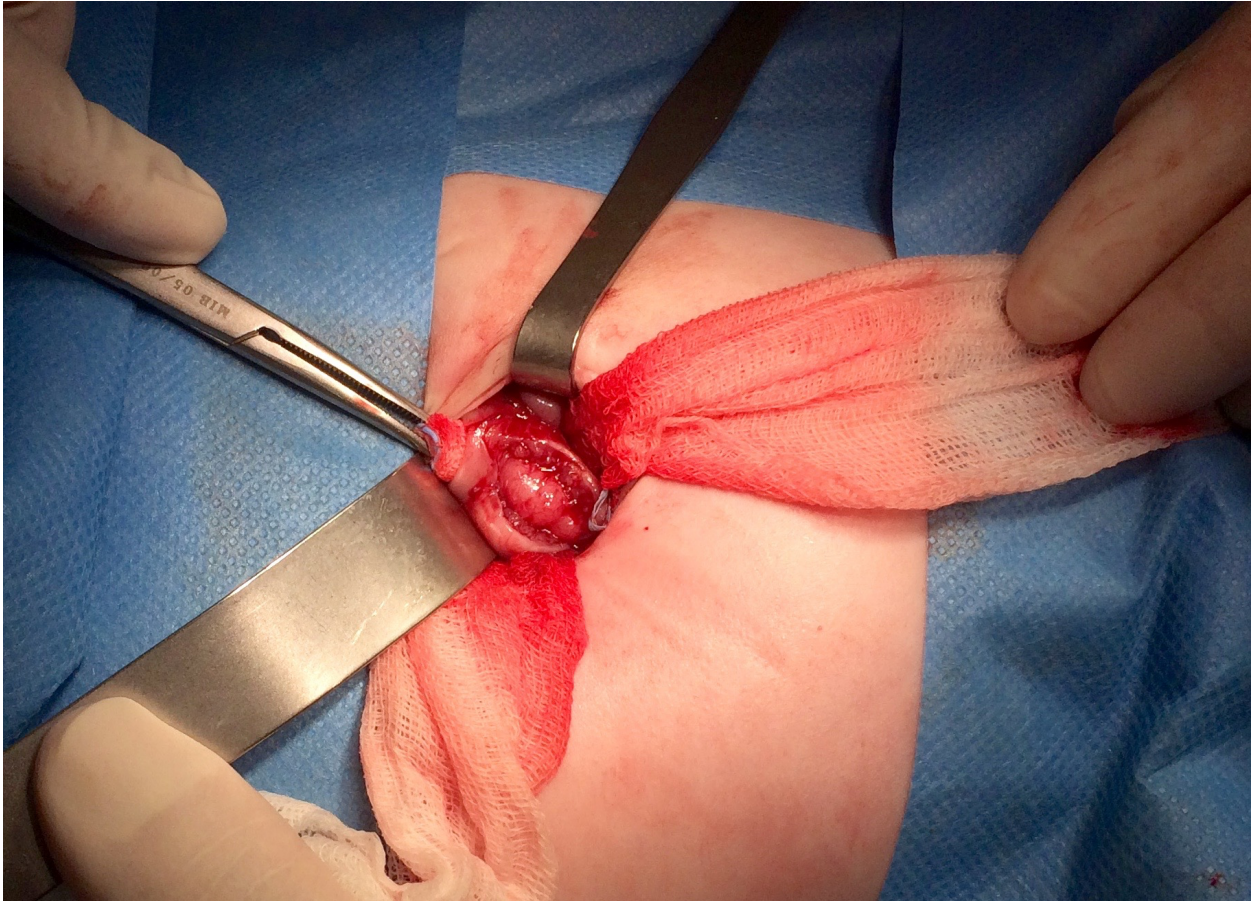


Abbildung 1 – OP-Situs nach erfolgter Pyloromyotomie

3.3 Materialien

Tabelle 4 – Materialien und Geräte

Material	Hersteller
<u>Substanzen für die Einbettung der Proben</u>	
Formaldehydlösung 4%ig, neutral gepuffert	Firma SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland Charge: 11088863
Äthylalkohol vergällt, $\geq 99,8\%$ mit 1% Methylethylketon	Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Charge 305231598
Äthylalkohol 70% vergällt, $\geq 70\%$ mit 1% Methylethylketon	Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Charge 305232434

Xylene J.T.Baker (Xylol)	Firma Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Niederlande
Medite pure Paraffin Polymer free	Firma Medite Inc., Winter Garden, USA
Aqua dest.	Charité – Universitätsmedizin Berlin
<u>Geräte und Verbrauchsmaterialien</u>	
Entwässerungsgerät Shandon Excelsior ES	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
Ausgießstation EG 1160	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Schlittenmikrotom Leica SM 2000 R	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Microtome Blade R35	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Kühlplatte	MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
Wasserbad HIS-2	Kunz Instruments, Nynashamn, Schweden
Einbettkapseln	Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG, Gudensberg, Deutschland
Thermo Scientific Objektträger, 76mm x 26mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Heißluftsterilisator Typ 221	MELAG Medizintechnik oHG, Berlin, Deutschland
Dampfgarer Typ 3216 MultiGourmet	Braun GmbH, Kronberg im Taunus, Deutschland
S 220 SevenCompact pH-Messgerät	Mettler-Toledo Intl. Inc, Columbus, USA
Vibrax VXR basic	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Universalaufsatz Janke&Kunkel Typ VX8	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Voatex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA

DMRB Mikroskop	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
AxioCam MRc	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Kunststoffküvette	Dako North America Inc., Carpinteria, USA
<u>Substanzen für die HE-Färbung</u>	
Hämalaunlösung nach Mayer	Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Charge 424220820
Eosin G	Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Charge 07676604
Xylol Isomere	Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Charge 49422
Äthylalkohol 99%ig, vergällt (absoluter Alkohol)	Firma Dr. K. Hollborn & Söhne, Charge 1114
Aqua dest.	Universitätsklinik Leipzig
<u>Substanzen für die immunhistochemische Färbung</u>	
Xylol Isomere	Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Charge 494222432
Äthylalkohol 99%ig, vergällt (absoluter Alkohol)	Firma Dr. K. Hollborn & Söhne, Charge 1114
Target Retrieval Puffer, pH 9,0	Dako North America Inc., Carpinteria, USA, S2367
Tris-Base	Sigma-Aldrich Co. LLC., Missouri, USA
Tris-Hydrochlorid	Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Charge 192185953

Natriumchlorid	Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Charge 343202923
Hydrogenperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Antibodydiluent	Dako North America Inc., Carpinteria, USA, S0809
Labelled Polymer-HRP goat-anti-rabbit	Dako North America Inc., Carpinteria, USA, K4011
3,3 Zoll- Diaminobenzidinchromogenlösung (DAB)	Dako North America Inc., Carpinteria, USA, K4011
DAB+-Substratpuffer	Dako North America Inc., Carpinteria, USA, K4011
Hämalaunlösung nach Mayer	Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Charge 424220820
<u>Substanzen zum Eindecken der Proben</u>	
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
<u>Bildverarbeitungsprogramme</u>	
ImageJ Version1.49v	National Institutes of Health, USA
Vorschau	Apple Inc., California, USA

3.4 Probenaufbereitung

Nach Entnahme der OP-Präparate wurden die Proben in 4%ige Formaldehydlösung überführt und über das Eingangslabor des Instituts für Pathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin in das dortige Institut für Paidopathologie transportiert.

Die aus dem Institut für Paidopathologie stammenden Kontrollproben wurden nach Entnahme ebenfalls in 4%ige Formaldehydlösung überführt.

3.5 Probeneinbettung

Im Institut für Paidopathologie wurden die Proben nach makroskopischer Begutachtung mittels geschlossenem Gewebereinbettautomaten Shandon Excelsior ES (Firma Thermo Fisher Scientific Inc.) über Nacht entwässert. Hierbei wurden die Proben zuerst erneut mit 4%iger Formaldehydlösung behandelt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis Xylol entwässert (siehe Tabelle 5). Diesen Schritten schloss sich das Einbetten der Proben in Paraffin an.

Tabelle 5 – Protokoll des Gewebereinbettautomaten zur Einbettung der Gewebeproben

Schritt	Material	Zeit
1.	Entwässern Formaldehydlösung 4%ig neutral gepuffert (Firma SAV Liquid Production GmbH)	90 Minuten
2.	Formaldehydlösung 4%ig,	150 Minuten
3.	Äthylalkohol 70% vergällt, $\geq 70\%$ mit 1% Methylethylketon (Firma Carl Roth GmbH & Co. KG)	50 Minuten
4.	2x Äthylalkohol 70%	je 50 Minuten
5.	Äthylalkohol vergällt, $\geq 99,8\%$ mit 1% Methylethylketon (Firma Carl Roth GmbH & Co. KG)	60 Minuten
6.	2x Abs. Alkohol	je 60 Minuten
7.	3x Xylol (Xylene J.T.Baker; Firma Avantor Performance Materials B.V.)	je 60 Minuten
8.	Einbetten 3x Paraffin (Meditate pure Paraffin Polymer free (Firma Mediate Inc.))	je 60 Minuten

Nach erfolgter Entwässerung im Automaten wurden die Proben in Einbettkapseln der Firma Süsse an einer Ausgießstation (Firma Leica EG1160) in Paraffin gegossen.

Nach dem Abkühlen der gegossenen Blöcke bei Raumtemperatur erfolgte das Vorkühlen auf einer Kühlplatte (Firma Medax) bei -19°C - -20°C . Von jedem Block konnten anschließend mittels Schlittenmikrotom (Firma Leica SM 2000 R) und einer R35-Klinge $5\mu\text{m}$ dicke serielle Dünnschnitte angefertigt werden. Diese wurden bei

Bedarf in kaltem Aqua dest. entfaltet und anschließend zur Streckung in warmes Aqua dest. überführt.

Von dort erfolgte der Transfer auf Thermo-Objekträger. Die so gewonnenen Schnitte wurden für 20 Minuten im Wärmeschrank (Firma MELAG Medizintechnik oHG) bei 80°C getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung licht- und wärmegeschützt gelagert.

3.6 Färbungen

Zur Vorbereitung der Färbungen wurden alle Schnitte einer Entparaffinierung unterzogen: Die Proben wurden zunächst zweimal jeweils 10 Minuten mit Xylol behandelt. Darauf folgte die Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe, bei der die Proben jeweils zweimalig in jeder Verdünnungsstufe (abs. Alkohol, 96%iger Alkohol und 70%iger Alkohol) für je 3 Minuten entparaffiniert wurden. Diesen Schritten schloss sich ein abschließender dreiminütiger Spülvorgang in Aqua dest. an (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 – Schritte der Entparaffinierung (soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur)

Schritt	Material	Zeit
1.	Entparaffinieren Xylol Isomere (Firma Carl Roth GmbH & Co. KG)	10 Minuten
2.	Xylol Isomere	10 Minuten
3.	absteigende Alkoholreihe: 2x absoluter Alkohol, 2x 96%iger Alkohol, 2x 70%iger Alkohol (Firma Dr. K. Hollborn & Söhne) und entsprechende Verdünnungen	je 3 Minuten
4.	Spülen Aqua dest. (Universitätsklinikum Leipzig)	3 Minuten

3.6.1 Histologische Standard-Färbungen

Die Färbung eines Schnittes von jedem Präparat mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) nach dem Standard des kinderchirurgischen Forschungslabors der Klinik für Kinderchirurgie – Universitätsklinikum Leipzig bildete die Grundlage für das weitere Vorgehen. Hierfür wurden die entparaffinierten Schnitte bei Raumtemperatur zuerst für 10 Minuten in Hämalaunlösung nach Mayer gefärbt. Es folgten 10 Minuten zum Bläuen der Proben in

Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte für 1 Minute in einer 1%igen Eosin-G-Lösung gegengefärbt. Daran schloss sich das Waschen der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis hin zu Xylol an (siehe Tabelle 7).

Dieser Färbung nachfolgend wurden die Schnitte unmittelbar mit Entellan eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

Tabelle 7 – Färbeprotokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung (soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur)

Schritt	Material	Zeit
1.	Kernfärbung Hämalaunlösung nach Mayer (Firma Carl Roth GmbH & Co. KG)	10 Minuten
2.	Nachfärben Leitungswasser	10 Minuten
3.	Gegenfärbung Eosin G (Firma Carl Roth GmbH & Co. KG), 1%ige Lösung mit 70% Ethanol	1 Minute
4.	Waschen 70%iger Ethanol	20 Sekunden
5.	2x 96%iger Ethanol	je 20 Sekunden
7.	2x Absoluter Alkohol	je 3 Minuten
9.	2x Xylol	je 3 Minuten

3.6.2 Immunhistochemische Reaktion

Zur immunhistochemischen Untersuchung des Gewebes wurde ein CD117-Antikörper-Kit der Firma Dako North America Inc., Carpinteria, USA, genutzt und mittels der schnell ablaufenden EnVision™-Technik dargestellt, bei der der Sekundärantikörper mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist.

3.6.2.1 Hitzeinduzierte Antigendemaskierung im Dampfgarer

Eine Alternative zur enzymatischen Demaskierung der Antigene stellt die hitzeinduzierte Antigendemaskierung dar, die bei dieser Färbung unter Nutzung eines Dampfgarers zur Anwendung kam. Diese bereits im Labor (Forschungslabor der Klinik für Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Leipzig) standardisierte Methode stellt eine sehr gewebeschonende Alternative zur Mikrowellentechnik oder dem Autoklaven dar.

Die Objektträger wurden in einer Kunststoffküvette (Firma Dako) angeordnet und mit Demaskierungspuffer (Target Retrieval Puffer, pH 9,0) bedeckt. Anschließend wurde die Küvette im Dampfgarer der Firma Braun (Typ 3216) für 20 Minuten dem Wasserdampf ausgesetzt. Die Wattzahl (715-850 Watt) ist vom Gerät vorgegeben und

kann nicht individuell angepasst werden. Zum Abkühlen wurde die Küvette für 20 Minuten im Demaskierungspuffer platziert und mit kaltem Wasser umspült.

3.6.2.2 Antikörpermarkierung in EnVision™-Technik

Nach der Demaskierung im Dampfgerarer folgte in Aqua dest. ein ausgiebiges Spülen der Proben. Alle weiteren Schritte fanden bei Raumtemperatur statt.

Zunächst wurden die Proben zum Spülen in Tris-Waschpuffer (TBS) (pH 7,56) überführt und 3 Minuten gespült. Die Stammlösung dazu wurde aus 9g Tris-Base, 68,5g Tris-Hydrochlorid und 87,8g NaCl in 1 Liter Aqua dest. hergestellt und anschließend auf 30 Liter mittels Aqua dest. verdünnt. Die pH-Kontrolle erfolgte mittels Mettler Toledo Seven Compact.

Die Proben wurden anschließend in neue Tris-Base überführt und dieser 1ml Hydrogenperoxid 30% in 50ml TBS zugesetzt. In dieser Lösung wurden die Proben für 10 Minuten auf einer Schüttelplatte (IKA Vibrax VXR basic) mit Aufsatz Janke&Kunkel Typ VX8 bei 150 Motions/min bewegt und anschließend erneut in TBS gespült.

Daran schloss sich das Auftragen des Primärantikörpers an. Dieser polyclonal-rabbit-Primärantikörper wurde im kiteigenen Antikörperverdünnungsmedium (Antibody Diluent, Firma Dako, S0809) im Verhältnis 1:400 verdünnt und so 4ml Lösung hergestellt. Gemischt wurde diese Probe mit Voatex Genie 2 (Firma Scientific Industries) auf Stufe 6 (mittel). Nach dem Auftragen dieser Lösung wurden die Proben in einer feuchten Kammer für 60 Minuten inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wurden die Schnitte zweimal in TBS gespült und anschließend nochmals für 8 Minuten mit TBS behandelt.

Nun folgte das Auftragen des Sekundärantikörper-Systems, eines goat-anti-rabbit-Antikörpers, HRP-konjugiert (DAKO EnVision™ + System-HRP (DAB) K4011). Mit diesem Antikörper wurden die Proben 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Der zuvor bereits beschriebene Spülvorgang mit zweimaligem Spülen mit TBS und 8-minütigem Spülen ebenfalls in TBS schloss sich an.

Es folgte die Entwicklung des DAB (3,3 Zoll-Diaminobenzidinchromogenlösung) mittels eines Tropfens DAB-Chromogen in 1ml DAB-Substratpuffer, wobei ein brauner Farbkomplex entstand. Nach 10 Minuten wurden die Proben erst in TBS und dann in Leitungswasser gespült.

3.6.2.3 Gegenfärbung mit Häkalaun

Zur Gegenfärbung wurde Häkalaun genutzt. Die antikörpermarkierten Proben wurden 5 Minuten mit frischem Häkalaun behandelt und anschließend für 10 Minuten in Leitungswasser gespült. Es folgte zur Spülung eine aufsteigende Alkoholreihe beginnend bei 70%igem Alkohol für 3 Minuten, nachfolgend mit 96%igem Alkohol (3 Minuten) und absolutem Alkohol (3 Minuten). Daran schlossen sich zwei Behandlungen mit Xylol für jeweils 3 Minuten an. Abschließend wurden die Proben mit Entellan eingedeckt und mit einem Deckglas versehen.

Tabelle 8 – Färbeprotokoll CD117-Reaktion (soweit nicht anders angegeben bei Raumtemperatur)

Schritt	Material	Zeit
1. Antigenmaskierung (bei etwa 100°C)	Target Retrieval Puffer (Firma Dako S2367), pH 9,0 in Dampfgerar	20 Minuten
2. Abkühlen	Target Retrieval Puffer	20 Minuten
3. Spülen	Aqua dest.	5 Sekunden
4.	Tris-Waschpuffer	3 Minuten
5. Blocken der endogenen Peroxidase	Hydrogenperoxid 30% (Firma Merck) 1ml in 50ml Tris-Waschpuffer	10 Minuten
6. Spülen	Tris-Waschpuffer	5 Sekunden
7. Antikörpermarkierung mit primärem Antikörper (in feuchter Kammer)	Primärantikörper polyclonal rabbit in Antibodydiluent (S0809); 1:400	60 Minuten
8. Spülen	Tris-Waschpuffer	5 Sekunden
9.	Tris-Waschpuffer	5 Sekunden
10.	Tris-Waschpuffer	8 Minuten
11. Antikörpermarkierung mit sekundärem Antikörper	Labelled Polymer-HRP goat-anti-rabbit (Firma Dako, DAKO EnVision™ + System HRP (DAB) K4011)	30 Minuten

12.	Spülen	Tris-Waschpuffer	5 Sekunden
13.		Tris-Waschpuffer	5 Sekunden
14.		Tris-Waschpuffer	8 Minuten
15.	Entwicklung (in feuchter Kammer, abgedunkelt)	1 Tropfen DAB+-Chromogen in 1ml DAB+-Substratpuffer	10 Minuten
16.	Spülen	Tris-Waschpuffer	5 Sekunden
17.		Leitungswasser	5 Sekunden
18.	Gegenfärbung	Hämalaunlösung nach Mayer (Firma Roth, Charge 424220820)	5 Minuten
19.	Spülen	Leitungswasser	10 Minuten
20.	Entwässern	Aufsteigende Alkoholreihe (70%ig, 96%ig, absoluter Alkohol)	je 3 Minuten
21.		Xylol	3 Minuten
22.		Xylol	3 Minuten

3.6.2.4 Positiv- und Negativkontrolle

Zur internen Überprüfung wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle vom Schweinedarm über den gesamten Färbeprozess mitbehandelt.

3.7 Methodik der Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte über 15 high-power fields je Schnitt. Diese HPFs wurden in einer 40-fachen Vergrößerung an einem Durchlichtmikroskop Typ DMRB (Firma Leica Wetzlar, Deutschland) mit AxioVision-Kamera (Firma Zeiss Göttingen, Deutschland) aufgenommen.

Mit dieser Methode erfolgten an 15 benachbarten Bereichen in der Muscularis fotografische Aufnahmen (siehe Abbildung 2).

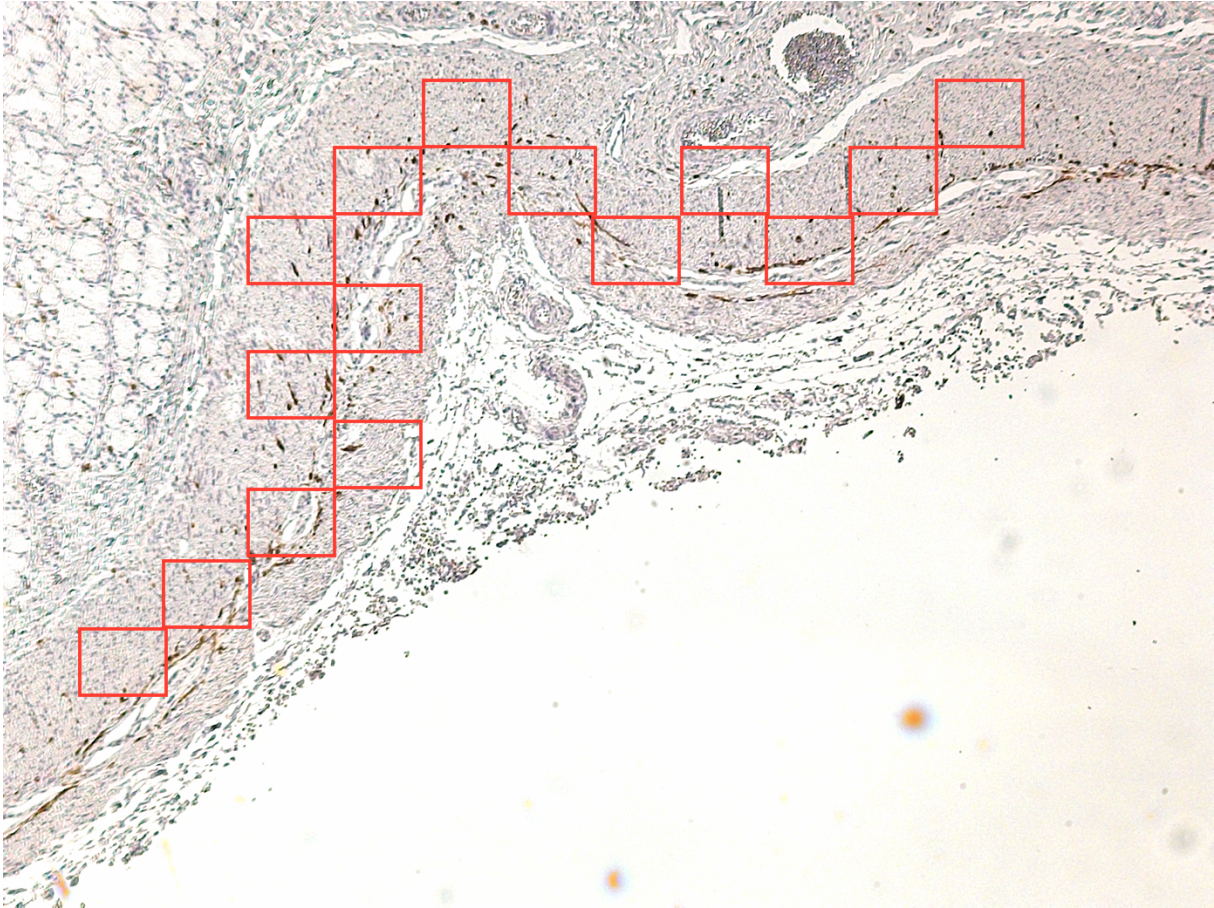


Abbildung 2 – Ausschnitt Pylorus mit eingezeichneten Feldern entsprechend der Auswahl der HPFs; Vergrößerung: 5-fach

Im Anschluss wurden am Computer die CD117-positiven Bereiche ausgezählt und dabei alle CD117-positiven Zellfortsätze gewertet, auch wenn kein direkter Anschnitt des Zellkörpers zu sehen war. Jeder als eigenständiger Bereich identifizierbare Abschnitt wurde als CD117-positive Zelle gewertet. Zellansammlungen, die aufgrund ihrer Morphologie oder mehrerer dargestellter Zellkerne als unterschiedliche Zellen identifiziert werden konnten, zählten separat.

CD117-positive Mastzellen wurden aufgrund ihrer Morphologie und der Lokalisation in der Mucosa nicht gewertet. Eine solche Mastzelle ist vergleichend mit einer charakteristischen Cajal-Zelle zum morphologischen Vergleich in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

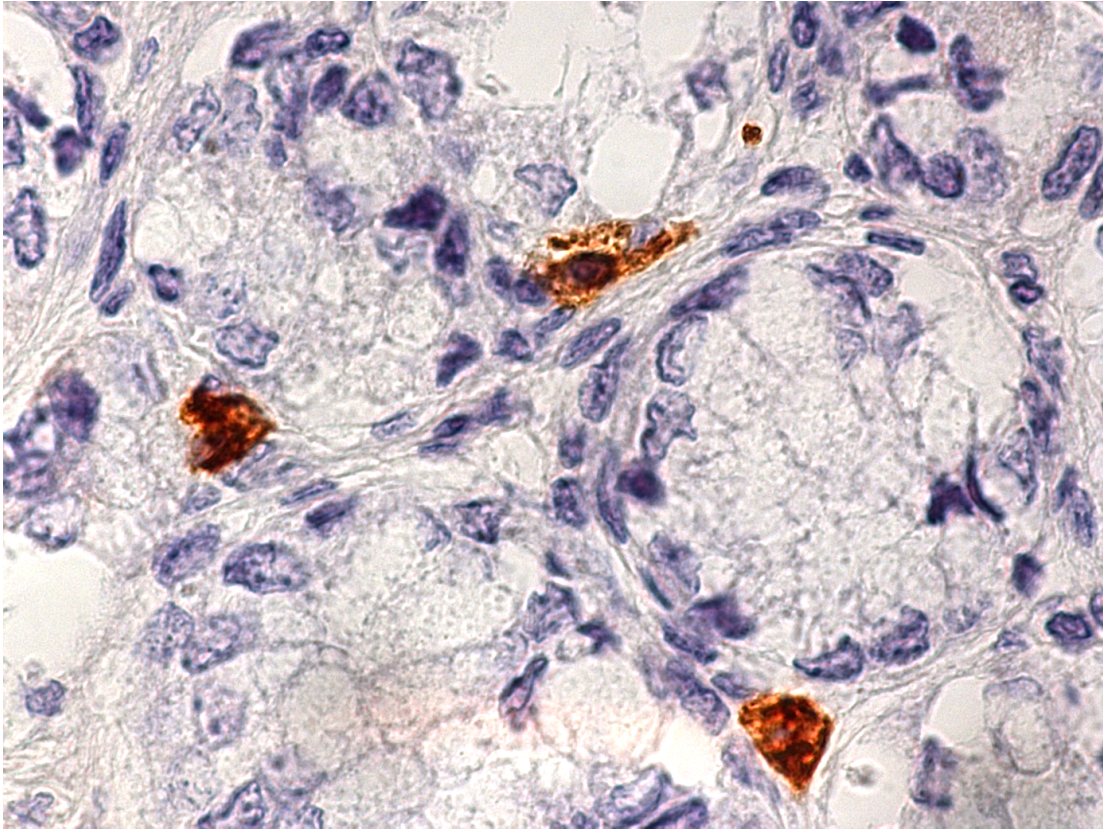


Abbildung 3 – Mastzellen in der Mucosa; Vergrößerung: 100-fach

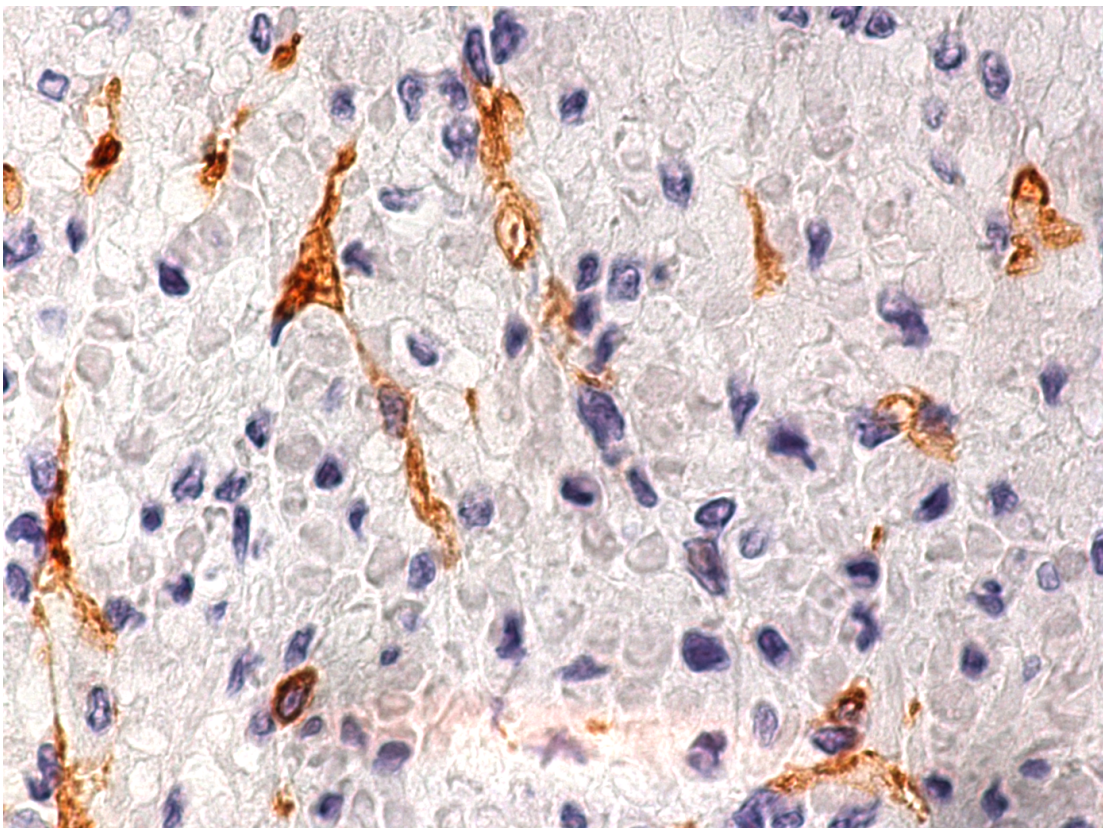
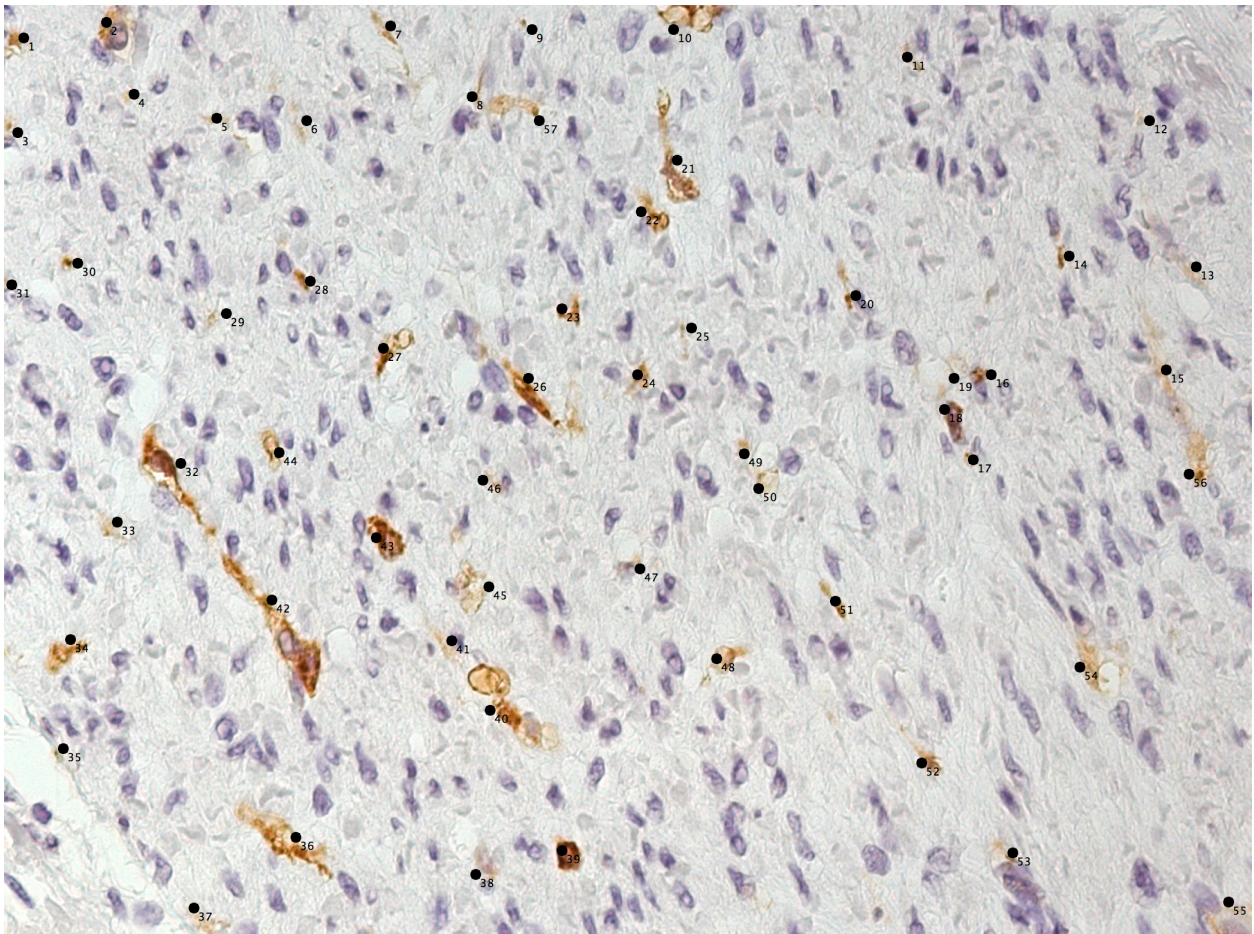


Abbildung 4 – Cajal-Zellen in der Muscularis mit deutlichen Zellausläufern; Vergrößerung: 100-fach

Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Zählweise an einem solchen HPF.



**Abbildung 5 – Ausgezähltes HPF; alle gewerteten Zellen sind mit einem schwarzen Punkt versehen;
Vergrößerung: 40-fach**

3.8 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mittels IBM SPSS Statistic Data Editor 22.

Sowohl für die Fall- wie auch für die Kontrollgruppe wurden jeweils 15 high-power fields je Probe ausgezählt und der Median der gezählten Zellen statistisch ausgewertet.

Die Analyse für stetige Variablen erfolgte angesichts der kleinen Fallzahl ausschließlich mittels Man-Whitney-U-Test, sodass die Testung auf Normalverteilung dadurch entfiel.

Alle Tests wurde zweiseitig durchgeführt. Unter Einbeziehung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde eine statistische Signifikanz von $p < 0,05$ angenommen.

Die Darstellung kategorialer Variablen erfolgte als n (%).

Die Darstellung stetiger Variablen erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung (Spannweite).

Für die Darstellung von Histogrammen sowie Boxplots wurde IBM SPSS Statistic Data Editor 22 verwendet.

Die Erstellung von Tabellen, Grafiken und Texten geschah mit Microsoft Office für Mac 2011 unter Verwendung von Microsoft Word und Microsoft Excel.

3.9 Ethikvotum zur Studie

Zur Durchführung dieser Studie, insbesondere zur operativen Probengewinnung aus dem Pylorus des Magens bei Patienten mit infantiler hypertrophischer Pylorusstenose, liegt ein positives Ethikvotum (Antragsnummer EA2/020/12) vom Ethikausschuss 2 am Campus Virchow-Klinikum vom 28.08.2013 vor. Die Durchführung der Studie fußt auf den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki.

Die Grundsätze der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Guten Wissenschaftlichen Praxis wurden zu jeder Zeit eingehalten.

4 Ergebnisse

4.1 Epidemiologische Ergebnisse

4.1.1 Änderung der Inzidenz in Deutschland von 2000 bis 2013

In die Auswertung der Inzidenz der IHPS in Deutschland gingen die Daten für die Diagnose Q40.0 und die Zahl der Lebendgeburten ein.

Wie in Tabelle 9 dargestellt ging sowohl die Anzahl an Lebendgeburten in Deutschland als auch die Häufigkeit der Diagnose Q40.0 deutlich zurück.

Die Lebendgeburten haben sich im Untersuchungszeitraum (2000-2013) von 766.999 pro Jahr auf 682.069 reduziert. Das entspricht einem Rückgang von 11,07%. Im gleichen Zeitraum sank die Zahl der IHPS-Diagnosen von 2.818 jährlich auf 1.111 und stellt somit eine Abnahme von 60,57% dar.

Tabelle 9 – Übersicht über die Anzahl der Lebendgeburten und Q40.0-Diagnosen in Deutschland in den Jahren 2000 bis 2013

Jahr	Anzahl der Lebendgeburten in Deutschland pro Jahr	Anzahl der Diagnosen Q40.0 in Deutschland pro Jahr	Diagnosen Q40.0 pro 1000 Lebendgeburten in Deutschland pro Jahr
2000	766.999	2.818	3,67
2001	734.475	2.217	3,02
2002	719.250	1.856	2,58
2003	706.721	1.575	2,23
2004	705.622	1.574	2,23
2005	685.795	1.454	2,12
2006	672.724	1.445	2,15
2007	684.862	1.464	2,14
2008	682.514	1.463	2,14
2009	665.126	1.367	2,06
2010	677.947	1.290	1,90
2011	662.685	1.236	1,87
2012	673.544	1.176	1,75
2013	682.069	1.111	1,63

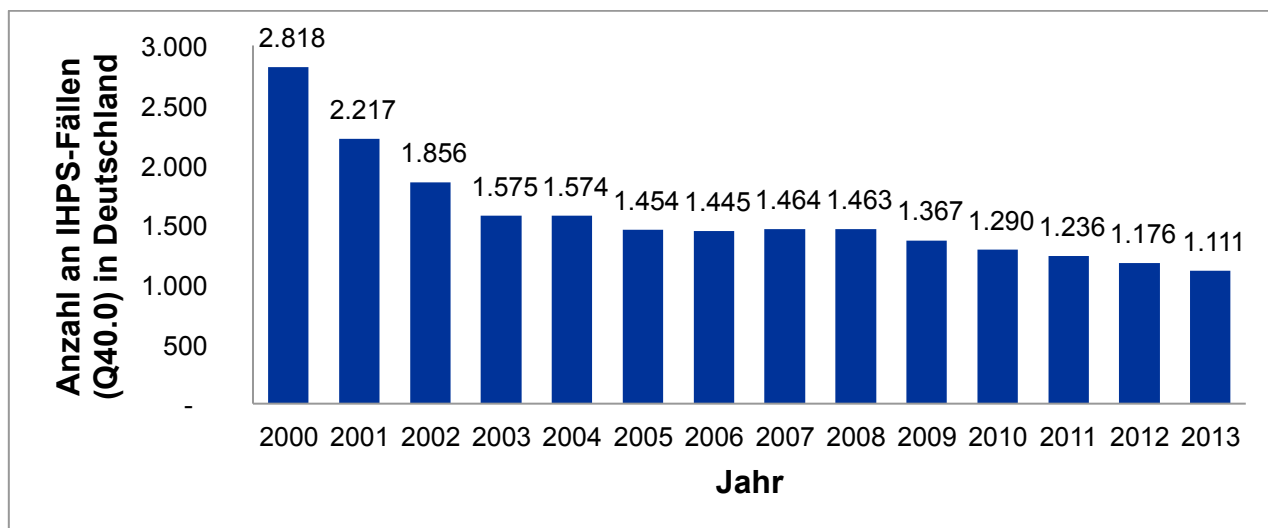


Abbildung 6 – Graphischer Verlauf des Inzidenzrückgangs der IHPS

Tabelle 10 – Übersicht über die Geschlechterverteilung der Lebendgeburten und Q40.0-Diagnosen in Deutschland 2000 – 2013

Jahr	Anzahl der Jungen an Lebendgeburten	Anzahl der Mädchen an Lebendgeburten	Anzahl der Jungen mit IHPS	Anzahl der Mädchen mit IHPS	Anteil Jungen mit IHPS [%]	Anteil Mädchen mit IHPS [%]
2000	393.323	373.676	2.061	757	73,1	26,9
2001	377.586	356.889	1.679	538	75,7	24,3
2002	369.277	349.973	1.450	406	78,1	21,9
2003	362.709	344.012	1.236	339	78,5	21,5
2004	362.017	343.605	1.223	351	77,7	22,3
2005	351.757	334.038	1.158	296	79,6	20,4
2006	345.816	326.908	1.176	269	81,4	18,6
2007	351.839	333.023	1.153	311	78,8	21,2
2008	349.862	332.652	1.178	285	80,5	19,5
2009	341.249	323.877	1.080	287	79,0	21,0
2010	347.237	330.710	1.064	226	82,5	17,5
2011	339.899	322.786	963	273	77,9	22,1
2012	345.629	327.915	947	229	80,5	19,5
2013	349.820	332.249	891	220	80,2	19,8

Aus diesen Zahlen ergibt sich die in Tabelle 9 dargestellte Diagnosehäufigkeit pro 1000 Lebendgeburten. Dabei ist ein Rückgang von 3,67 Diagnosen pro 1000 Lebendgeburten im Jahr 2000 auf 1,63 Fälle im Jahr 2013 in der Bundesrepublik Deutschland zu verzeichnen.

Die vorliegenden Zahlen wurden zudem nach Geschlechtern ausgewertet. Hierbei ließ sich, wie in Tabelle 10 dargestellt, keine wesentliche Änderung feststellen. Der prozentuale Anteil der Jungen an den Patienten mit IHPS stieg leicht an, unterlag jedoch teilweise deutlichen Schwankungen mit einem minimalen Anteil an Jungen von 73,1% (2000) und einem maximalen Anteil von 82,5% (2010).

4.1.2 Änderung der Inzidenz am Studienzentrum von 2005 bis 2014

Im Untersuchungszeitraum wurde bei 119 Patienten die Diagnose Q40.0 vergeben, von denen 82 (65 männlich) in die Untersuchung mit eingeschlossen werden konnten.

Für die einzelnen Jahrgänge ergab sich die in folgender Abbildung dargestellte Verteilung.

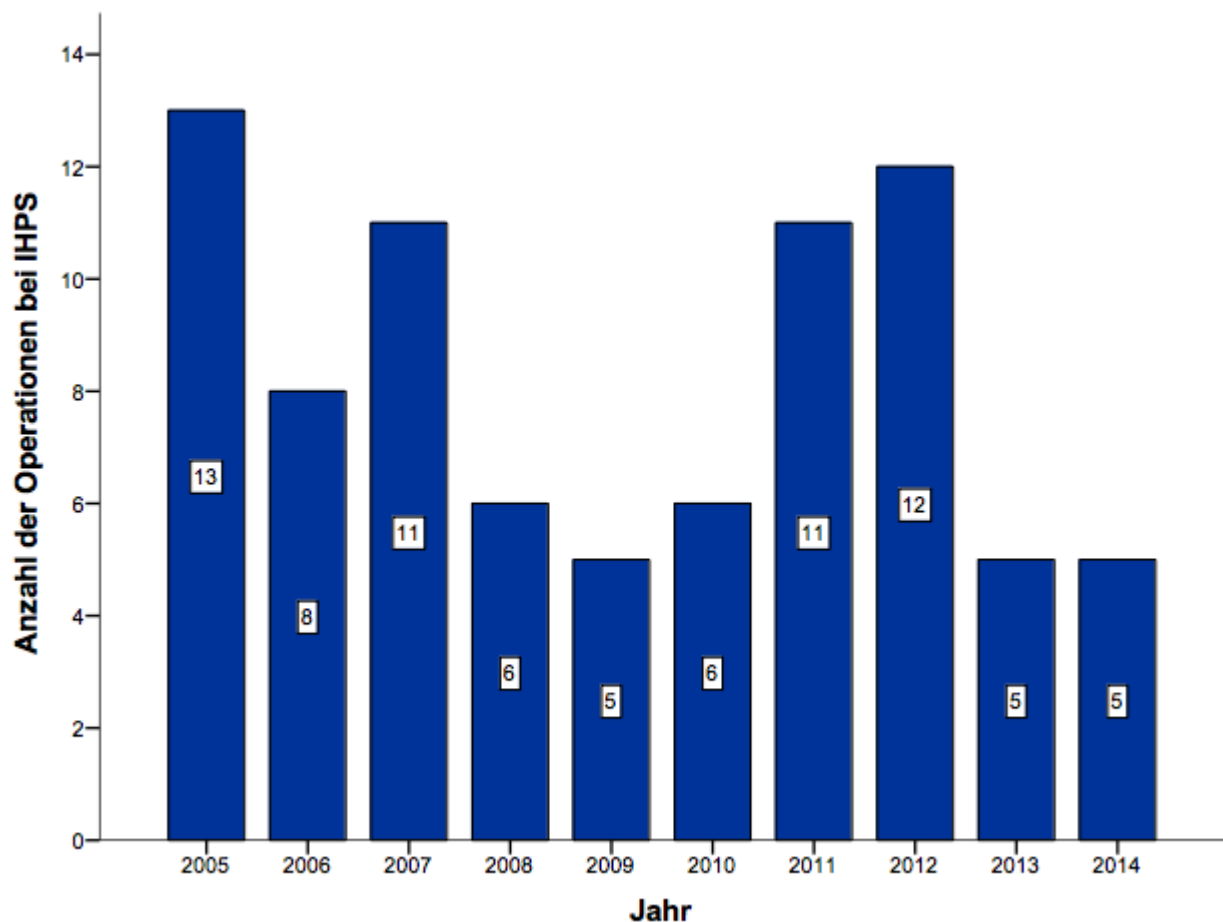


Abbildung 7 – Operationen bei IHPS im Studienzentrum pro Jahr

Wie in Abbildung 7 dargestellt gab es – anders als bei den bundesweiten Zahlen – keinen eindeutigen Abwärtstrend der Inzidenz. Zwar zeigen sich Jahrgänge, in denen die Diagnose Q40.0 seltener vergeben wurde, es folgten jedoch immer wieder Jahre mit häufigerer Diagnosestellung.

Die Geschlechterverteilung beim untersuchten Patientenkollektiv stellte sich ähnlich wie im deutschlandweiten Vergleich dar. Im Studienzentrum lag die Quote zwischen männlichen und weiblichen Patienten bei 3,8:1, im deutschlandweiten Vergleich lag sie bei 3,5:1.

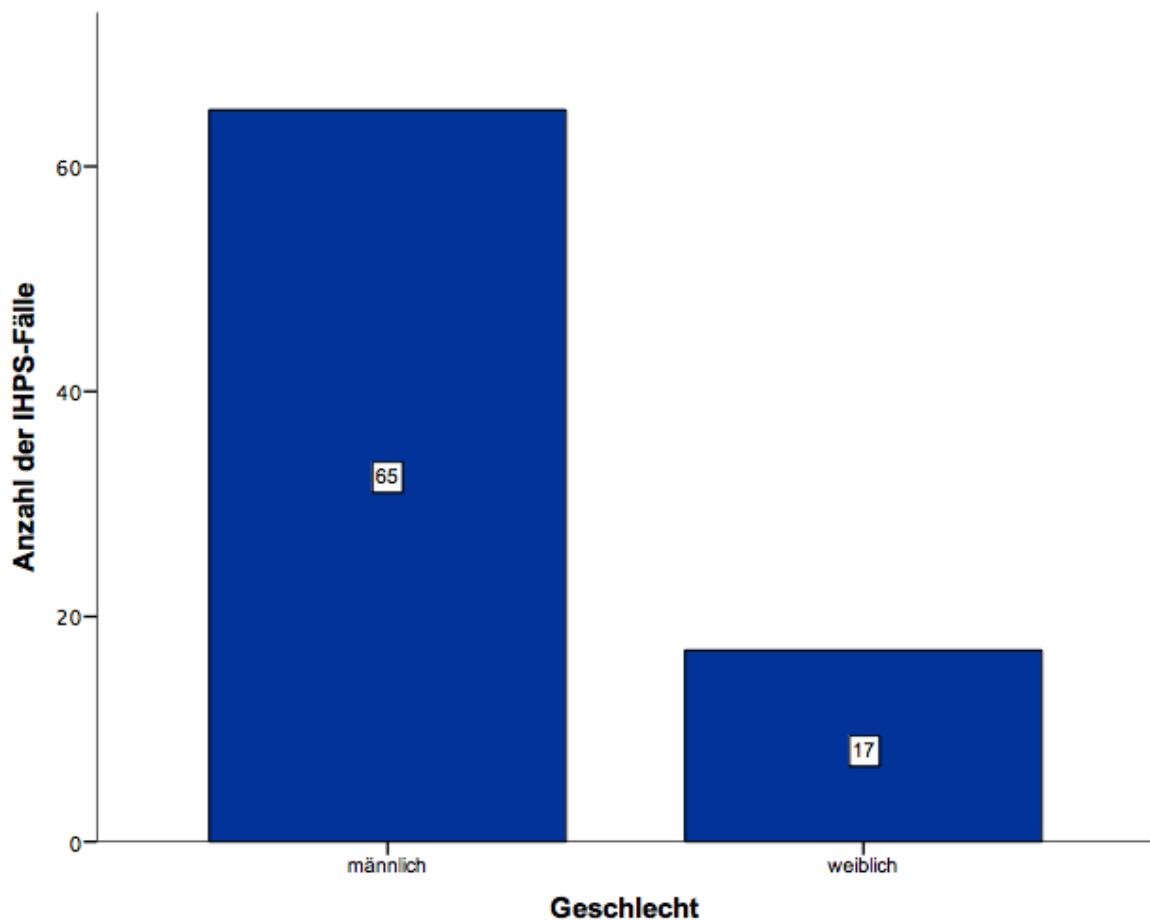


Abbildung 8 – Geschlechterverteilung am Studienzentrum zwischen 2005 und 2014

Der Altersdurchschnitt der Patienten im Studienzentrum deckte sich mit den vorbekannten Daten zum Erkrankungsalter bei der IHPS.² In der Klinik für Kinderchirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin waren die Patienten bei der Operation im Mittel 42 Lebensstage alt. Der jüngste Patient war bei der Operation 15 Tage alt, der älteste 106 Tage.

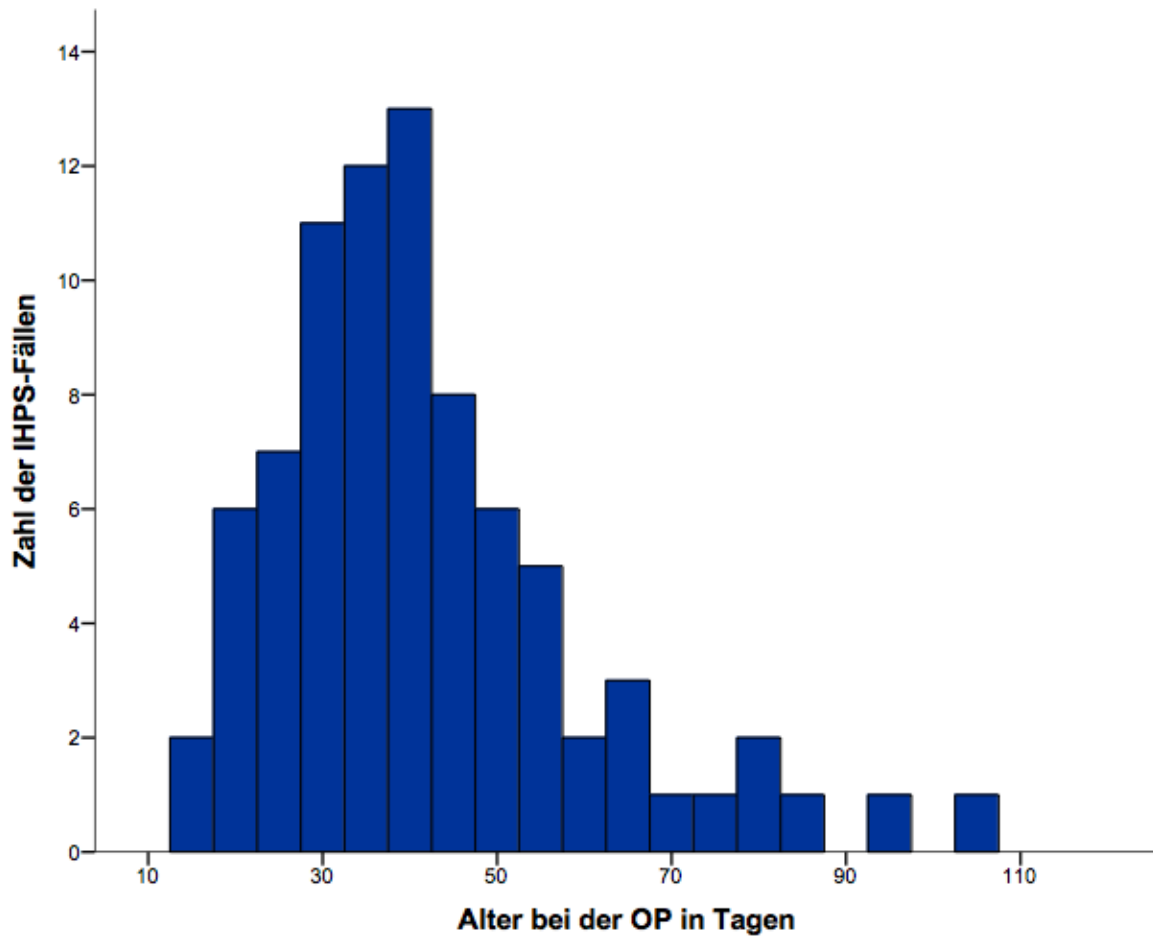


Abbildung 9 – Alter der Patienten mit IHPS bei OP im Studienzentrum

Somit lässt sich für das Studienzentrum zusammenfassen, dass die Patienten sowohl im Altersdurchschnitt bei der Operation als auch in der Geschlechterverteilung im Wesentlichen den vorbeschriebenen Daten und dem Bundesdurchschnitt entsprechen. Die Inzidenz hat sich jedoch – anders als im deutschlandweiten Vergleich – nicht konsequent rückläufig entwickelt.

4.2 Auswertung der Gewebeproben

4.2.1 Studienkollektiv

In die histologische Begutachtung gingen Proben von 4 Patienten (4 männlich) ein, welche im Untersuchungszeitraum in der Klinik für Kinderchirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin operiert wurden.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus Gewebeproben von 14 Probanden (8 männlich) zusammen, die postmortal im Institut für Paidopathologie sezziert wurden. Das jüngste Kind aus dieser Gruppe war eine Totgeburt in der 27. SSW, das älteste starb im Alter von 4 Jahren.

4.2.2 Vergleich der Cajal-Zellzahlen

In der Kontrollgruppe fanden sich in 15 HPFs durchschnittlich $635,8 \pm 496,5$ Zellen (Mittelwert \pm Standardabweichung). Der niedrigste Wert lag bei 92 Cajal-Zellen in 15 HPFs. Das Maximum betrug 1686 Cajal-Zellen in 15 HPFs im gesunden Gewebe.

Im Vergleich dazu zeigten sich in den intraoperativ gewonnenen Proben (n=4) lediglich $194,5 \pm 222,5$ Zellen. Bei dieser Gruppe differierte der Wert von 0 Cajal-Zellen in 15 HPFs bis maximal 509 Cajal-Zellen.

Bei der statistischen Analyse der Mediane dieser Werte mittels Man-Whitney-U-Test ergab sich ein p-Wert von 0,034, sodass eine statistische Signifikanz angenommen werden kann (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11 – Statistischer Vergleich der Anzahl an Cajal-Zellen in der Fall- und Kontrollgruppe

	Fallgruppe (n=4)	Kontrollgruppe (n=14)	Signifikanz (p)
Anzahl an Cajal-Zellen in 15 high-power fields [Mittelwert \pm Standardabweichung (Spannweite)]	$194,5 \pm 222,5$ (0 – 509)	$635,8 \pm 496,5$ (68 – 1686)	0,034

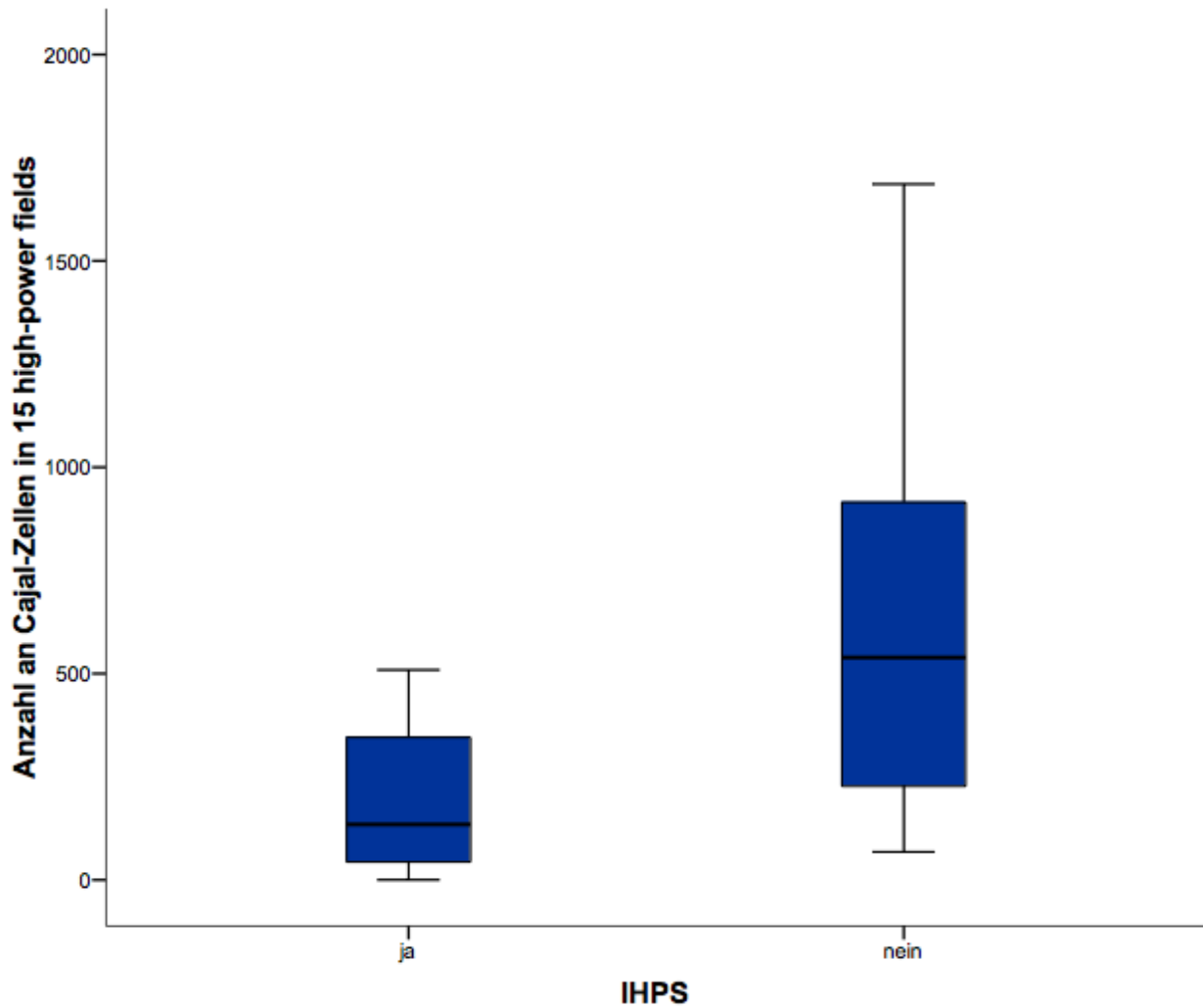


Abbildung 10 – Boxplot zur Anzahl an Cajal-Zellen im Vergleich zwischen gesundem und erkrankten Gewebe

Dieses Ergebnis zeigt, dass bei der IHPS statistisch signifikant weniger Cajal-Zellen zu finden sind, als dieses im gesunden Gewebe der Fall ist.

4.3 Histologische Ergebnisse

Im Folgenden sind die histologischen Ergebnisse der CD117-Färbung vergleichend zwischen gesundem und erkranktem Gewebe dargestellt.

4.3.1 Morphologische Unterscheidung zwischen Mastzellen und Cajal-Zellen

Wie im Abschnitt 3.7 beschrieben, wurden die ebenfalls positiv gefärbten Mastzellen bildmorphologisch aus der Zählung ausgeschlossen.

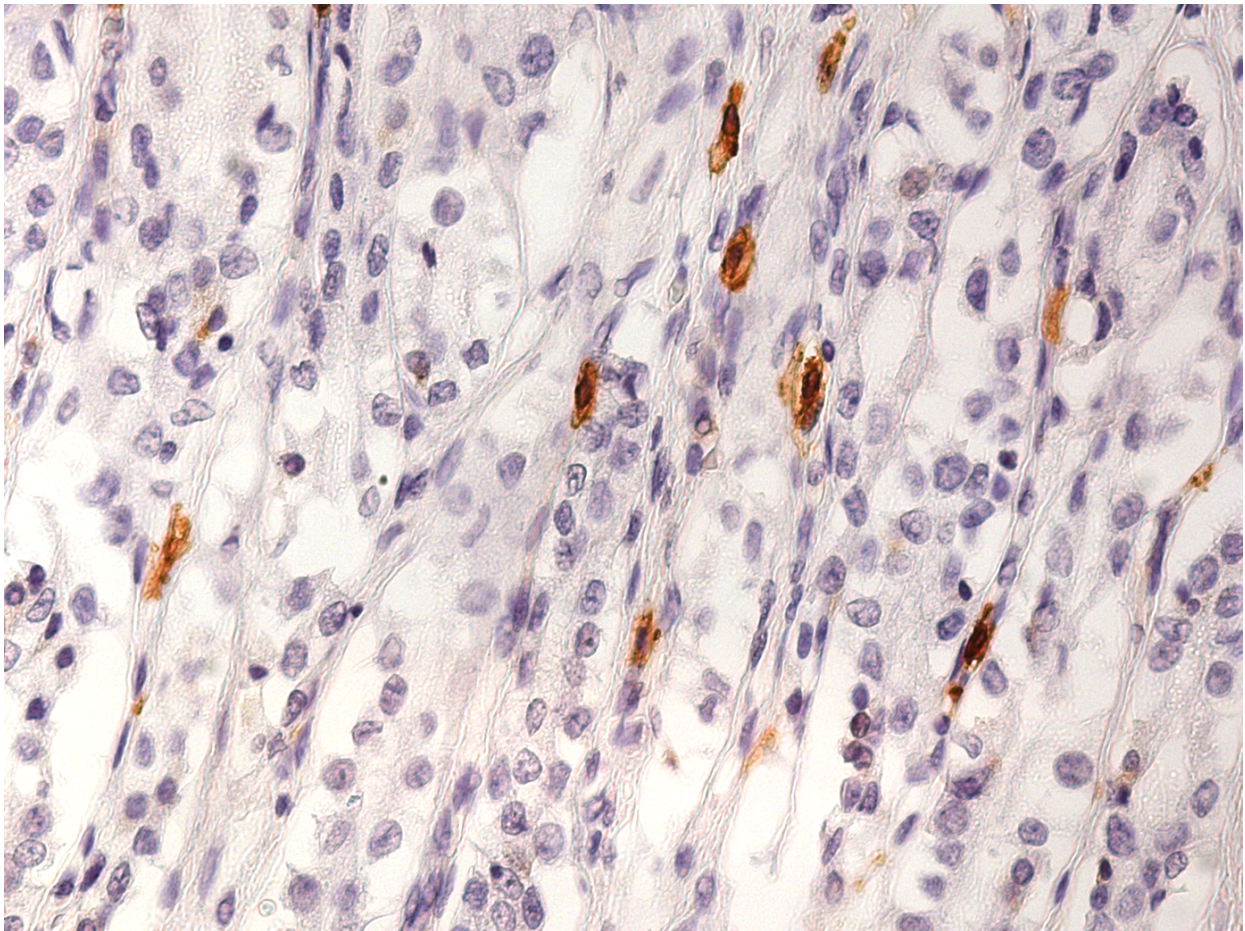


Abbildung 11 – Mastzellen in der Mucosa; Vergrößerung: 40-fach

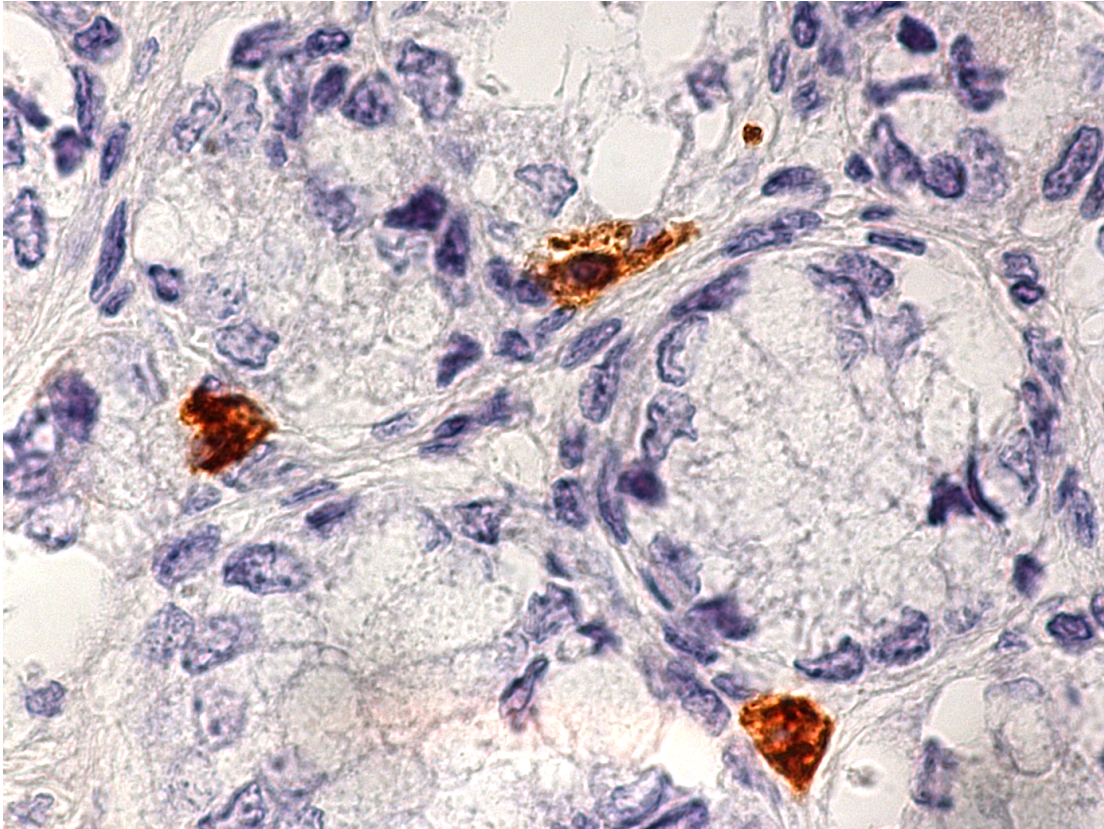


Abbildung 12 – Mastzellen in der Mucosa; Vergrößerung: 100-fach

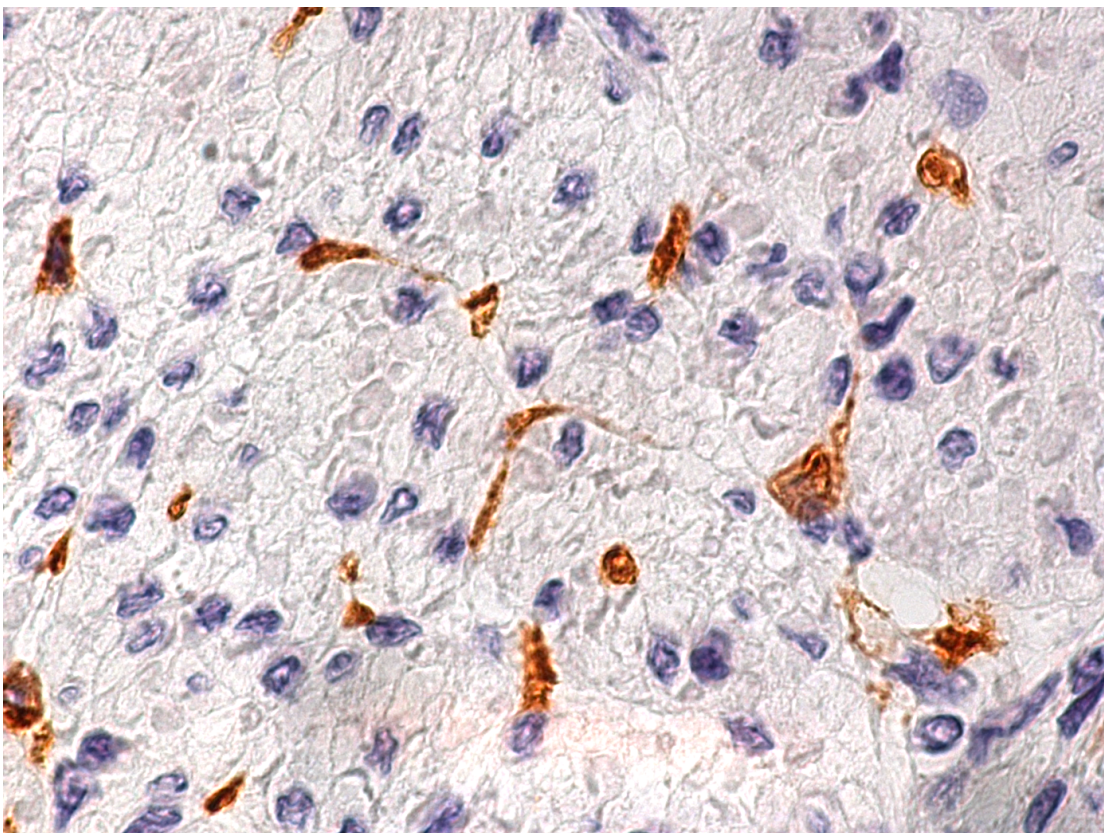


Abbildung 13 – Cajal-Zellen in der Muscularis; Vergrößerung: 100-fach

In den Abbildungen 11 und 12 sind unterschiedliche Ausschnitte der Mucosa dargestellt. Lediglich in diesem Bereich fanden sich bildmorphologisch Mastzellen. Diese ließen sich eindeutig von den Cajal-Zellen (Abbildung 13) unterscheiden, weil sie nicht wie jene über teilweise mehrere Zellausläufer verfügen. Auch die Lage in der Mucosa ist charakteristisch für Mastzellen.

Da die Mucosa bei den OP-Präparaten aufgrund der Operationstechnik nicht vorhanden war, konnten in den Proben des erkrankten Gewebes keine Mastzellen nachgewiesen werden.

4.3.2 Detaildarstellung der Cajal-Zellen

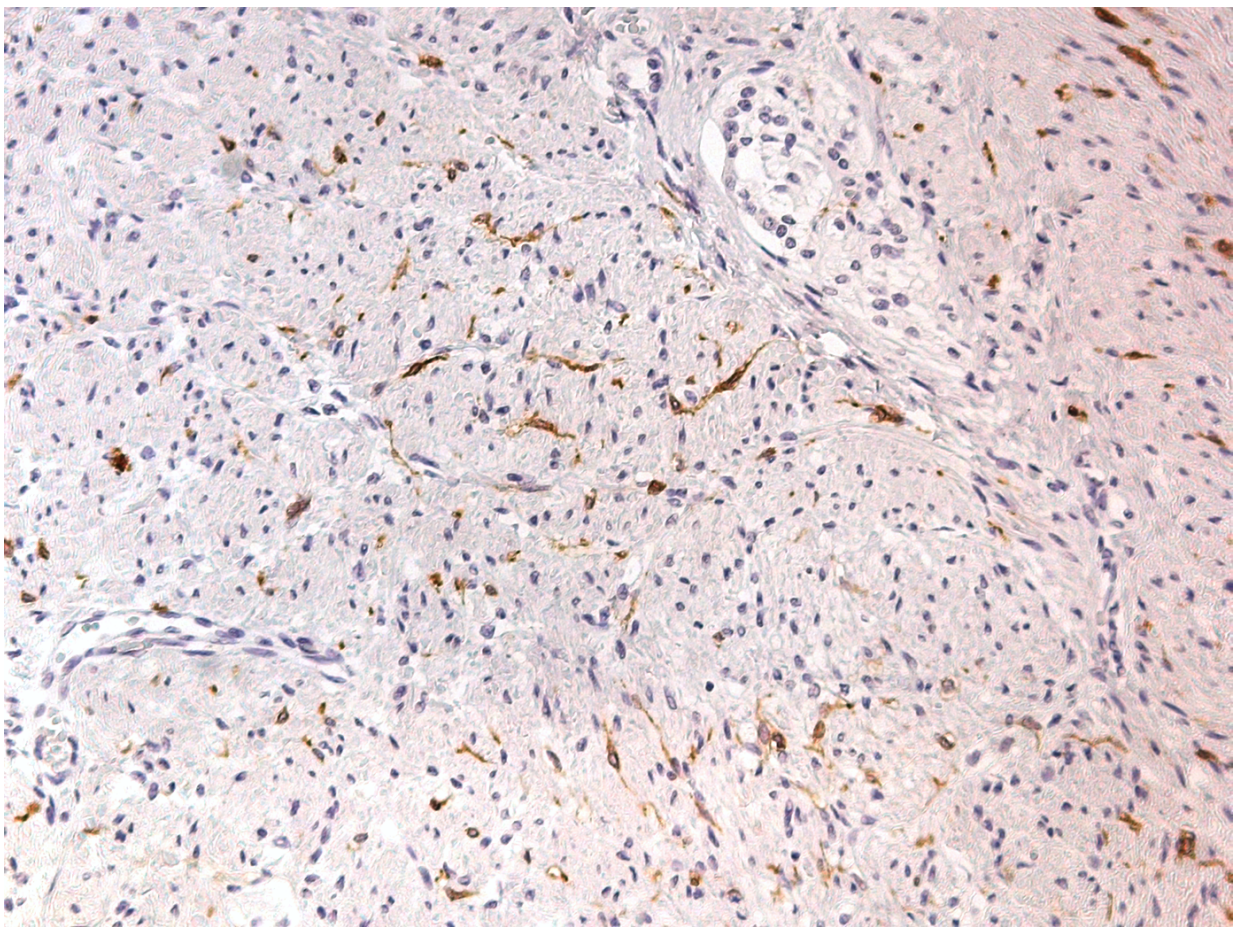


Abbildung 14 – Ausschnitt aus gesundem Gewebe; Vergrößerung: 20-fach

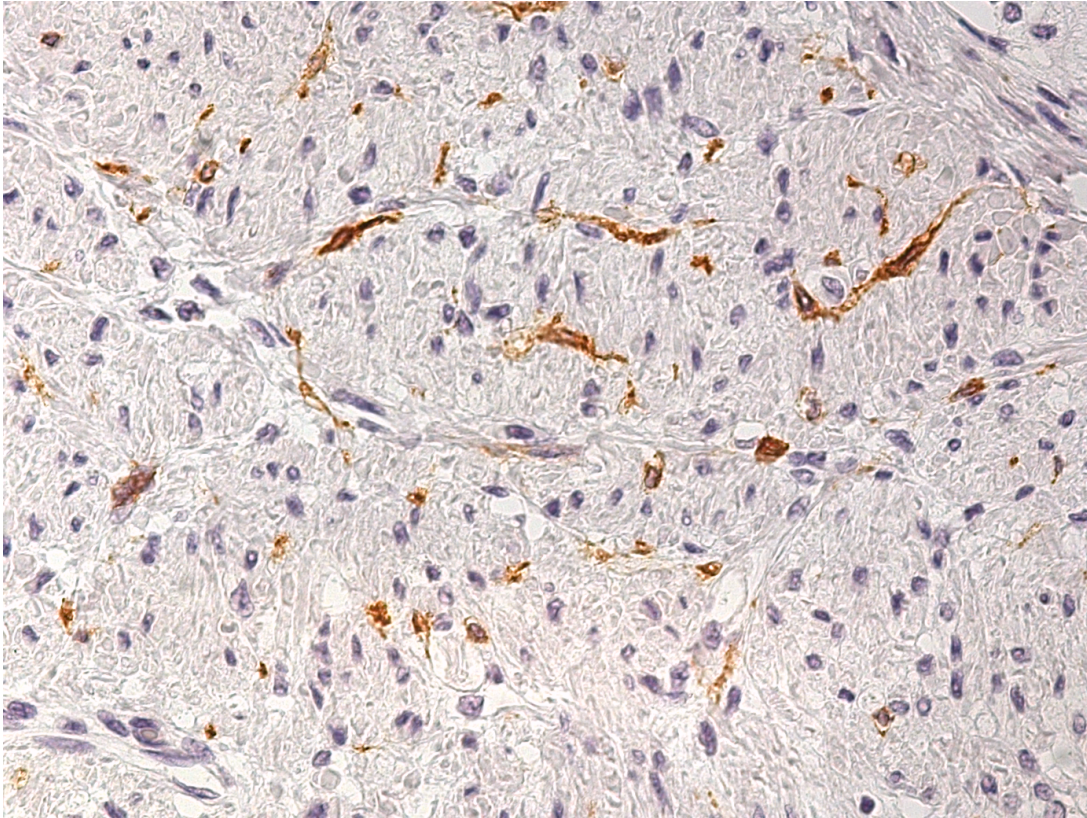


Abbildung 15 – Ausschnitt aus gesundem Gewebe; Vergrößerung: 40-fach

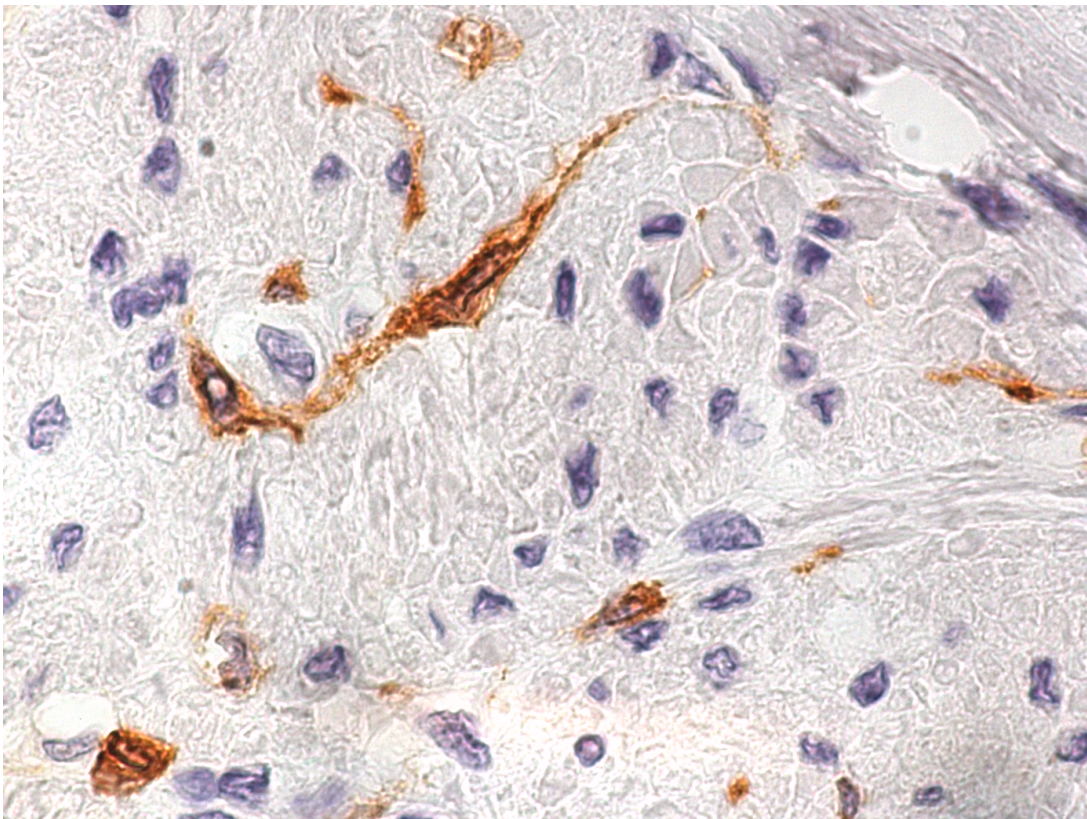


Abbildung 16 – Ausschnitt aus gesundem Gewebe, zentral ist eine horizontal getroffene spindelförmige Cajal-Zelle mit ihren Ausläufern zu erkennen. Die übrigen Anschnitte lassen sich als tangential getroffene Zellausläufer oder wie unten links als tangential getroffener Zellkörper werten; Vergrößerung: 100-fach

In den Abbildungen 14, 15 und 16 ist eine Vergrößerungsreihe aus gesundem Gewebe dargestellt. Bereits in der 20-fachen Vergrößerung ist ein ausgeprägtes Netzwerk der Cajal-Zellen erkennbar. Dieses durchsetzt, wie Abbildung 14 verdeutlicht, die gesamte Muscularis mit den Zellausläufern.

Abbildung 15 verdeutlicht bei einer höheren Vergrößerung, dass die Cajal-Zellen mit ihren teils multipolaren, teils spindelförmigen Ausläufern nahezu ineinander übergehen. Die letzte Abbildung dieser Reihe (Abbildung 16) zeigt in 100-facher Vergrößerung eine eindeutig erkennbare spindelförmige Cajal-Zelle und diverse kleine, ebenfalls CD117-positiv gefärbte Zellanschnitte, bei denen es sich vermutlich um Anschnitte der beschriebenen Zellausläufer handelt. Am linken unteren Bildrand befindet sich eine Zelle, die auf den ersten Blick auch als Mastzelle gewertet werden könnte. Bei genauer Betrachtung der Form und Lokalisation ist hier eher ein tangential getroffener Zellkörper einer Cajal-Zelle zu vermuten.

4.3.3 Vergleich zwischen gesundem und erkranktem Gewebe mit wenig Cajal-Zellen

Im Folgenden sind Gewebeausschnitte aus gesundem Gewebe und aus OP-Präparaten einander gegenübergestellt. Zum Vergleich erfolgte die Auswahl von Abschnitten, die eine möglichst geringe Anzahl an Cajal-Zellen aufweisen.

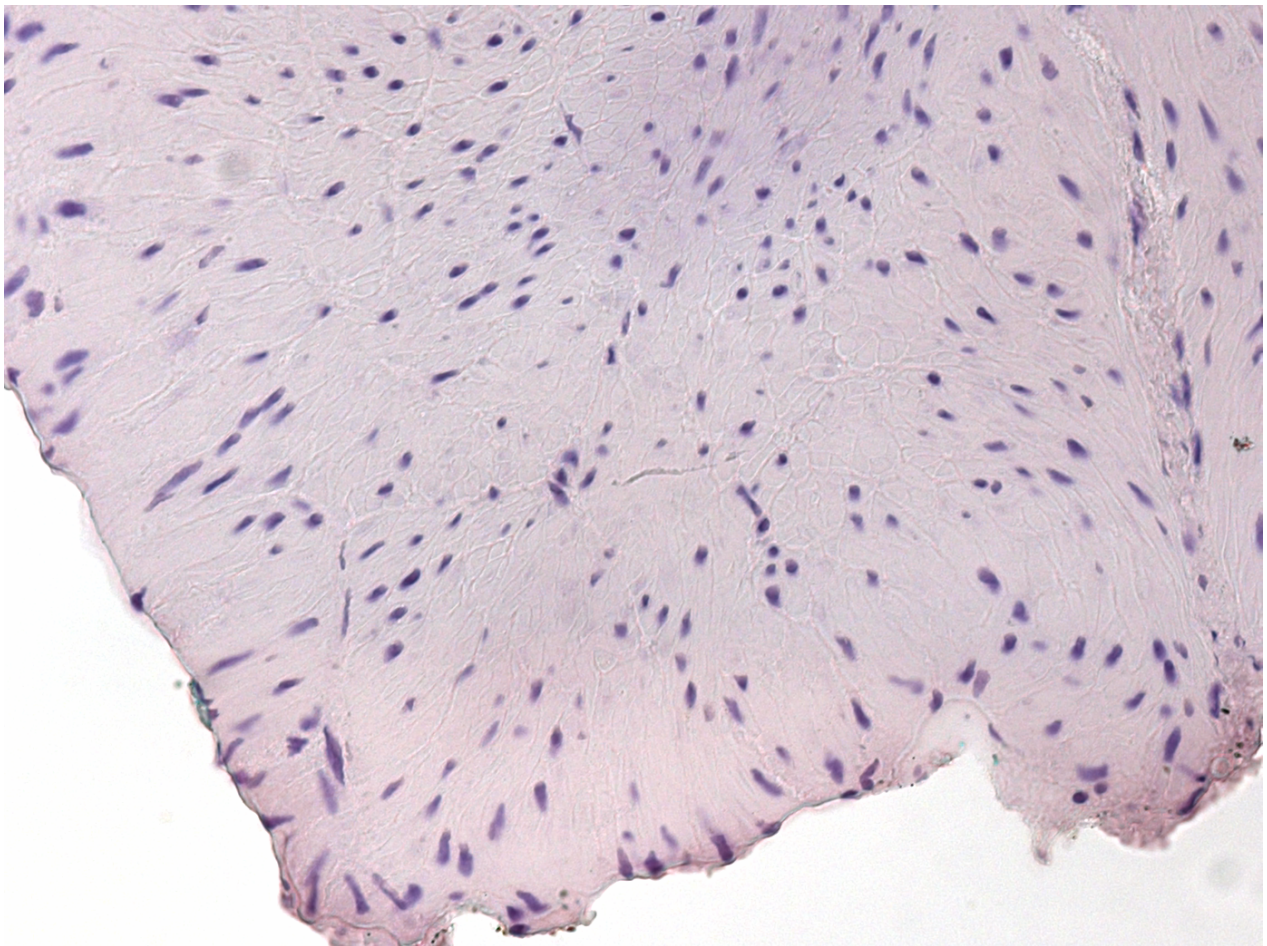


Abbildung 17 – Gewebeausschnitt aus einem OP-Präparat; Vergrößerung: 40-fach

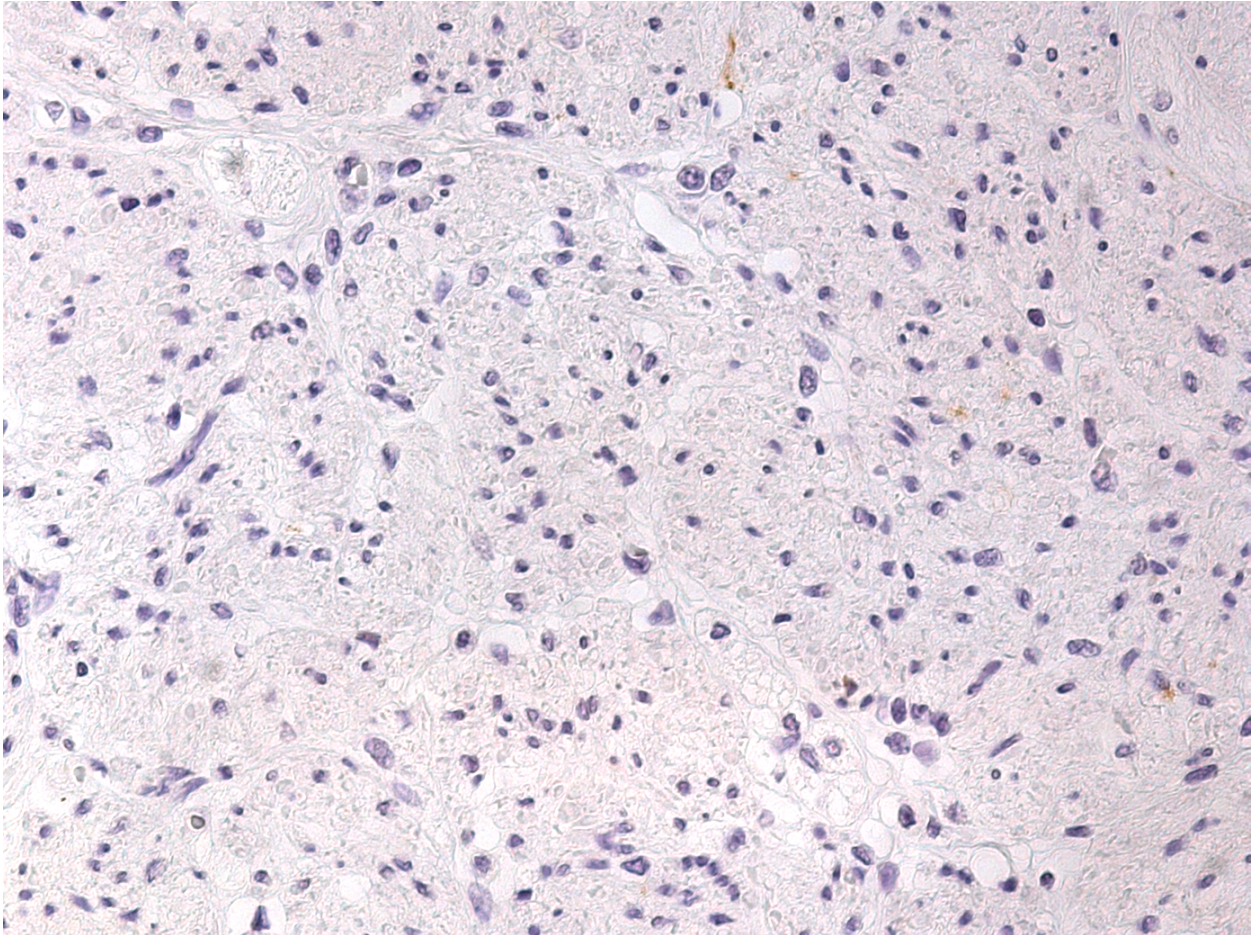


Abbildung 18 – Gewebeausschnitt aus der Kontrollgruppe mit unspezifischer Auflockerung der Muscularis; Vergrößerung: 40-fach

Deutlich wird, dass – wie auch in der statistischen Auswertung ersichtlich – sowohl OP-Präparate als auch einige Kontrollproben eine besonders geringe Anzahl an positiv gefärbten Zellanschnitten aufweisen. Die beiden Abbildungen 17 und 18 stellen dieses Phänomen – soweit es in dieser Färbung möglich ist – eindrücklich dar: In Abbildung 17 ist ein sehr dichtes Muskelgewebe ohne die Abgrenzung einzelner Zellen oder vermehrte Auflockerungen erkennbar, während in Abbildung 18 das Gewebe teilweise deutliche Auflockerungen aufweist.

4.3.4 Vergleich zwischen gesundem und erkranktem Gewebe mit vielen Cajal-Zellen

Im Gegensatz zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Gewebeproben mit wenig Cajal-Zellen fanden sich sowohl im erkrankten als auch im gesunden Gewebe Abschnitte mit einer hohen Zahl an Cajal-Zellen.

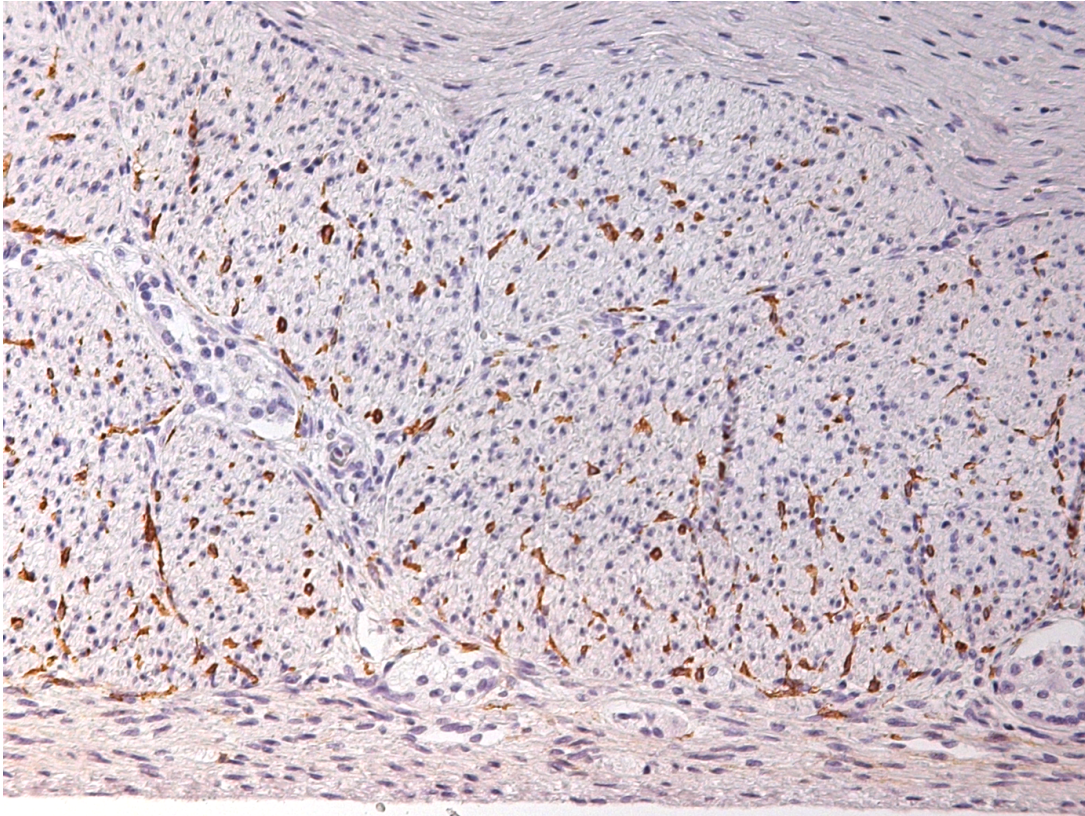


Abbildung 19 – Gewebeprobe aus der Kontrollgruppe, deutlich erkennbares Netzwerk der Cajal-Zellen über mehrere Schichten hinweg mit unterschiedlicher Orientierung der Zellausläufer; Vergrößerung: 20-fach

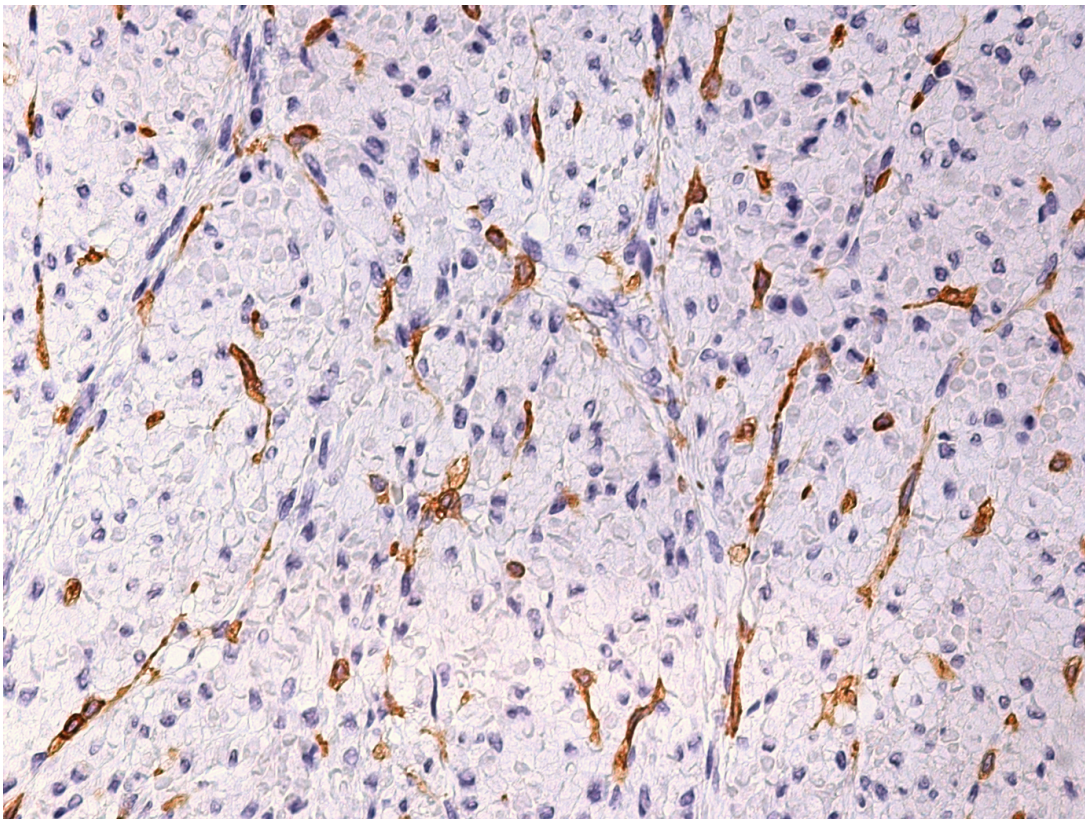


Abbildung 20 – Gewebeprobe aus der Kontrollgruppe, Übergangszone zwischen spindelförmigen Cajal-Zellen im unteren Bildausschnitt und multipolaren Cajal-Zellen im oberen Ausschnitt; Vergrößerung: 40-fach

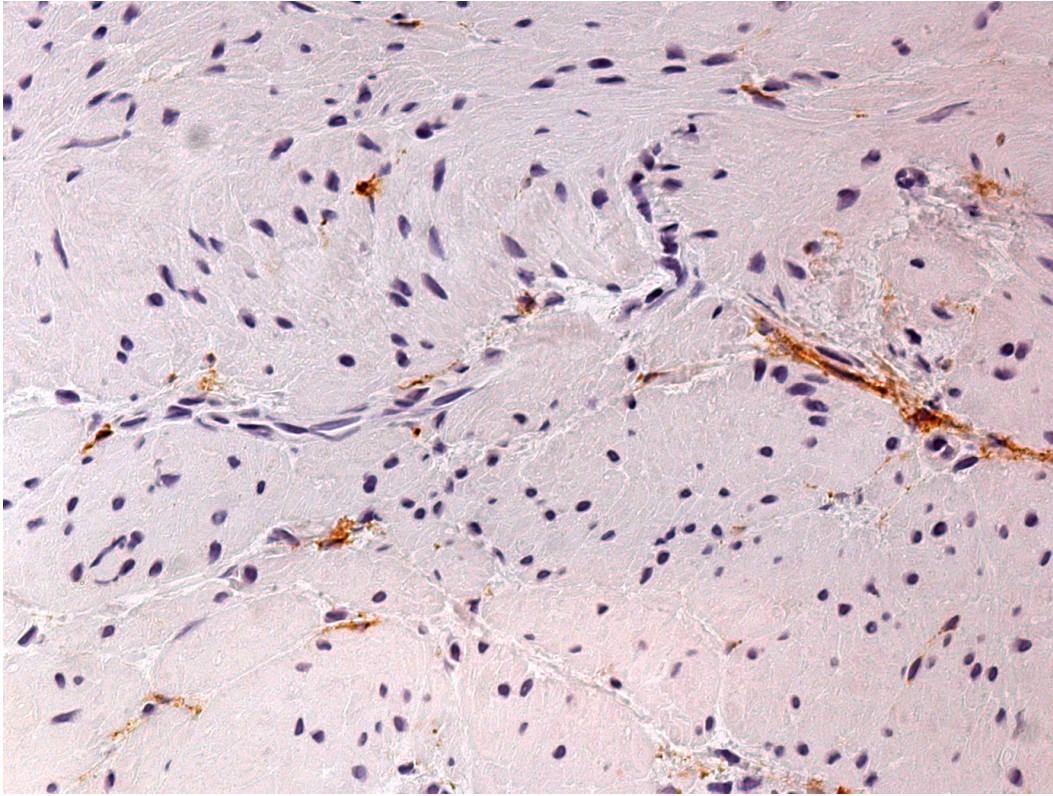


Abbildung 21 – Ausschnitt mit vielen Cajal-Zellen im erkrankten Gewebe. Eine Netzwerkarchitektur ist kaum noch erkennbar; Vergrößerung: 40-fach

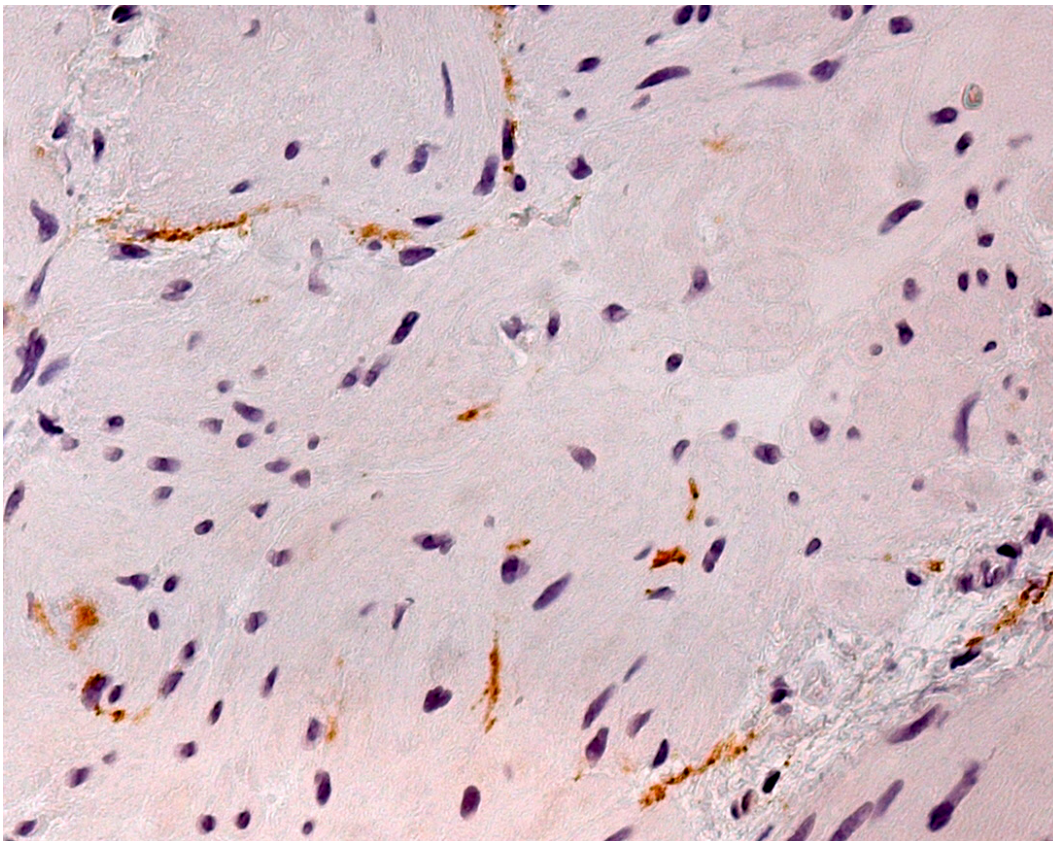


Abbildung 22 – Ausschnitt aus erkranktem Gewebe mit vielen Cajal-Zellen. Zellausläufer sind nur noch sehr eingeschränkt erkennbar; Vergrößerung: 40-fach

Anhand dieser Darstellungen (siehe Abbildung 19 - 22) lässt sich erkennen, dass sich im erkrankten Gewebe nicht nur die Zahl der positiv gefärbten Zellen geringer darstellt, sondern auch die Verteilung und Vernetzung im erkrankten Gewebe nicht deutlich werden.

Auch morphologisch unterscheiden sich die Cajal-Zellen im erkrankten Gewebe von den Zellen im gesunden (vergleiche Abbildungen 20 und 22). Die Zellen im erkrankten Gewebe wirken deutlich kleiner und weniger scharf zum umgebenden Gewebe abgegrenzt.

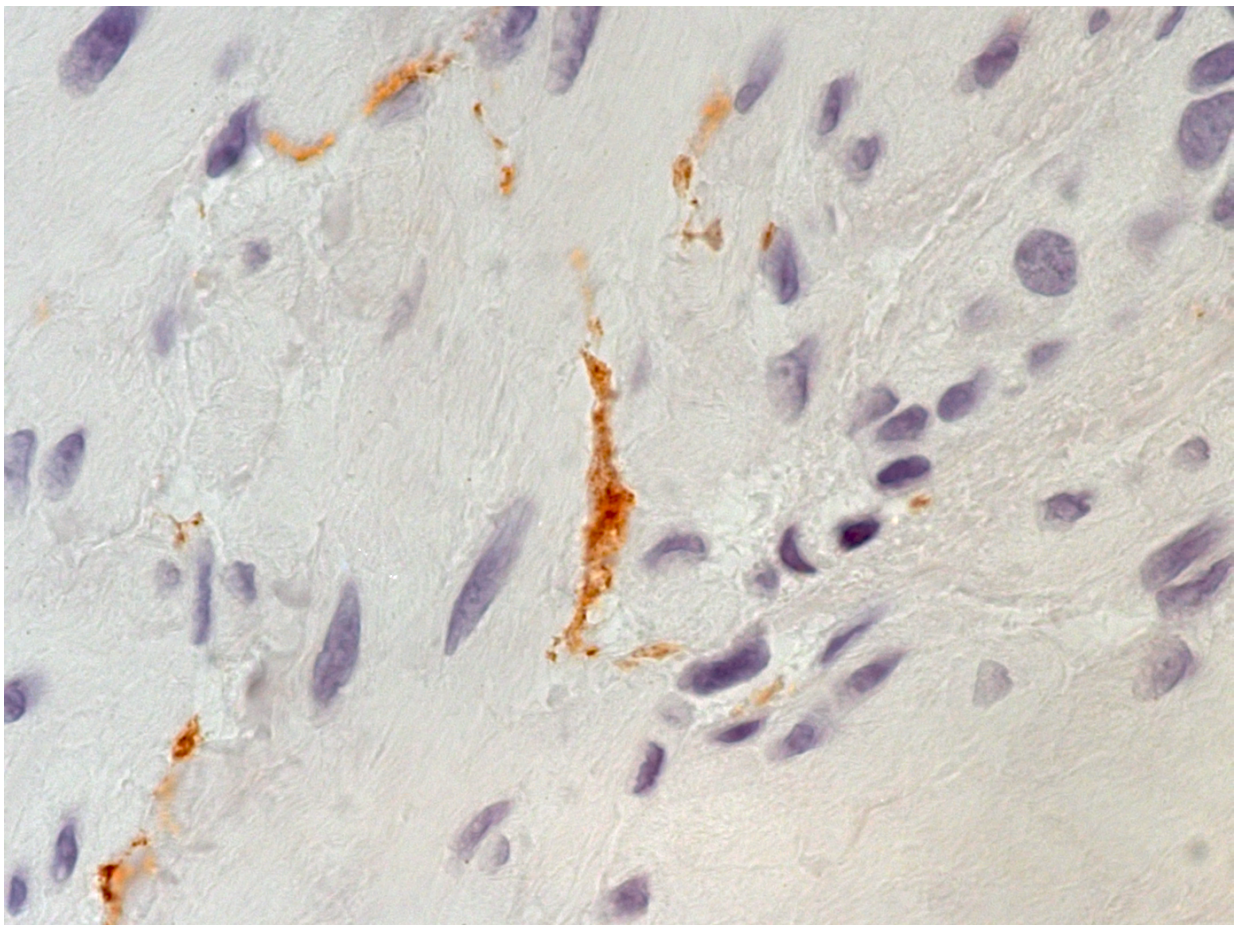


Abbildung 23 – Cajal-Zellen im erkrankten Gewebe; Vergrößerung: 100-fach

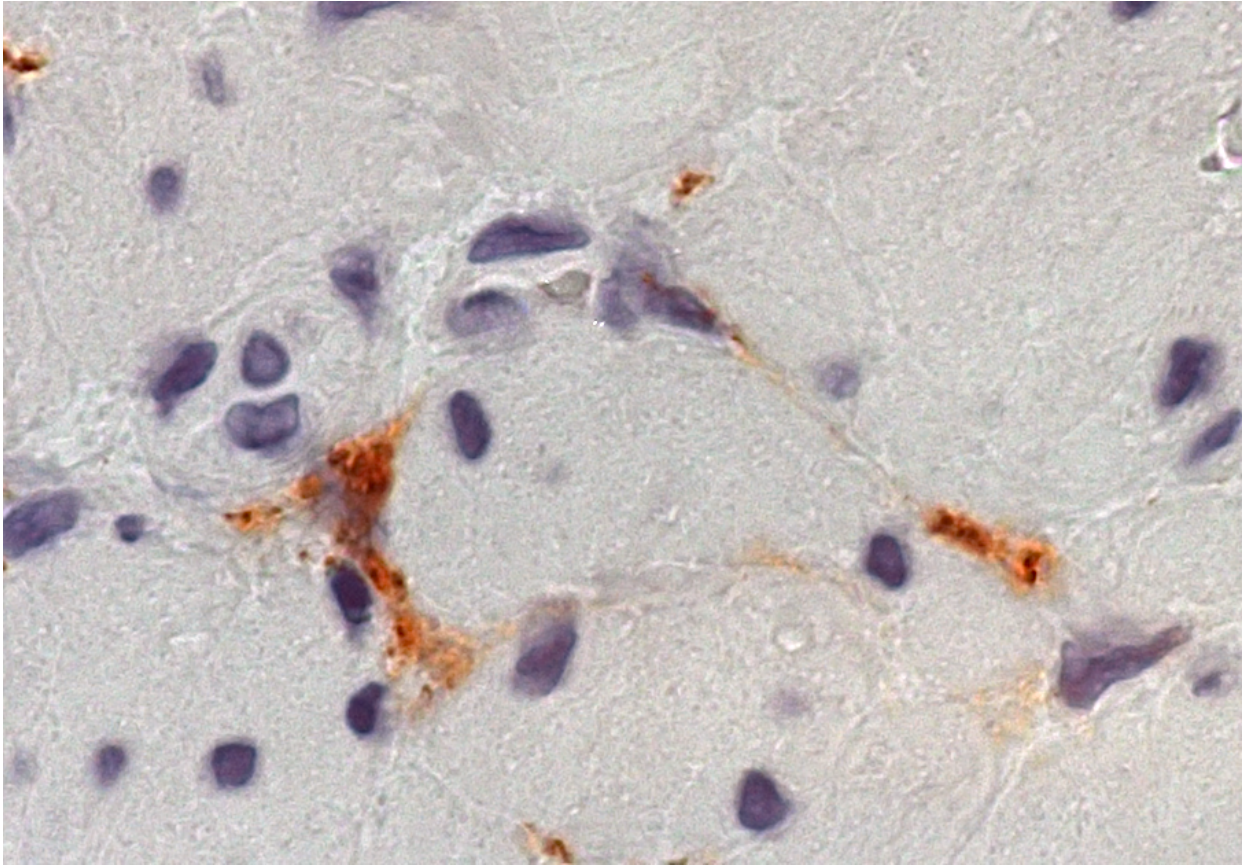


Abbildung 24 – Cajal-Zellen im erkrankten Gewebe; Vergrößerung: 100-fach

Zwar lassen sich auch im erkrankten Gewebe noch Zellausläufer erkennen, diese erscheinen jedoch deutlich feiner und kürzer (siehe Abbildung 23) als im gesunden Kontrollgewebe. Multipolare Zellen, wie man sie im gesunden Gewebe in großer Zahl findet, sind in den Proben von Kindern mit IHPS nur vereinzelt zu finden und deutlich schwieriger zu identifizieren. In Abbildung 24 ist erkennbar, dass die Zellausläufer von einer anscheinend multipolaren ICC sehr filigran wirken und ein Netzwerk, wie es im gesunden Gewebe eindeutig erkennbar ist (siehe Abbildung 19), im erkrankten Gewebe nicht zur Darstellung kommt.

5 Diskussion

5.1 Inzidenzrückgang der IHPS

5.1.1 Inzidenzrückgang deutschlandweit

Die Pathogenese der IHPS ist multifaktoriell und noch nicht vollständig erschlossen. Als mögliche Mitauslöser werden exogene Faktoren diskutiert, zu denen unter anderem das Rauchen schwangerer Frauen und der Bildungsgrad der Mutter gezählt werden.

Durch die Auswertung der Daten des Statistischen Bundesamtes konnten wir einen Rückgang der Inzidenz aufzeigen. Im deutschen Bundesdurchschnitt kam es zu einer Abnahme von 3,67 Fällen im Jahr 2000 auf lediglich noch 1,63 Fälle pro 1000 Lebendgeburten im Jahr 2013. Dieser Inzidenzrückgang lässt sich nach der aktuellen Studienlage teilweise mit einer Abnahme der oben genannten exogenen Risikofaktoren erklären.^{34,115} In der Literatur lassen sich für dieses Phänomen einerseits nur schwer statistisch fundierte Daten finden und andererseits beziehen sich diese auch nicht auf das hier untersuchte Patientenkollektiv aus Deutschland.

Bei der Auswertung der Daten des Statistischen Bundesamtes zeigt sich ein Rückgang der Anzahl rauchender Frauen zwischen 15 und 40 Jahren von 30,8% im Jahr 2003 auf 24,8% im Jahr 2013.¹¹⁴ Genaue Daten zur Prävalenz des Rauchens in der Schwangerschaft liegen jedoch nicht vor.

Bezüglich der Entwicklung des Bildungsstandes können ebenfalls nur gesamtdeutsche Zahlen zur Darstellung herangezogen werden, da entsprechende Erhebungen zum Bildungsgrad von Schwangeren nicht zur Verfügung stehen. Aus den Daten des Statistischen Bundesamtes geht hervor, dass sich der Anteil der Schulabgänger mit Fachhochschul- oder Hochschulreife von 24,4% im Jahr 2008 auf 27,9% im Jahr 2013 erhöht hat.¹¹⁶ Im gleichen Zeitraum sank die Zahl der Schulabgänger mit einer Hauptschulbildung von 39,3% auf 34,7%.¹¹⁶

Diese beiden Erhebungen durch das Statistische Bundesamt erlauben leider keine Zusammenhangsdarstellung zu Schwangerschaften in den einzelnen Bildungsgruppen oder bei Raucherinnen. Dadurch ist die Herleitung einer Abnahme der Risikofaktoren nur begrenzt möglich.

Eine neuere Studie aus Kanada weist auf eine mögliche Korrelation der einzelnen Risikofaktoren hin. In der Untersuchung von Lange et al. aus dem Jahr 2015 wird deutlich, dass die Frauen, die während der Schwangerschaft rauchen, besonders jung

sind und eher einen geringeren Bildungsgrad vorweisen.¹¹⁷ Leider stehen jedoch keine Daten zur Inzidenzentwicklung der IHPS in Kanada in den letzten Jahren zur Verfügung, um diese Ergebnisse einordnen zu können.

Darüber hinaus ist nach wie vor die Bedeutung dieser exogenen Faktoren für die Entstehung der Pylorusstenose noch nicht abschließend geklärt.

5.1.2 Inzidenzentwicklung am Studienzentrum

Am Studienzentrum ließ sich im Gegensatz zu der bundesweit sinkenden Fallzahl kein entsprechend konsequenter Rückgang feststellen. In der vorliegenden Untersuchung schwankten die jährlichen Inzidenzdaten zwischen 5 und 13 Fällen pro Jahr ohne erkennbaren Abwärtstrend.

Möglicherweise lässt sich der ausbleibende Rückgang der Inzidenz im Studienzentrum durch die genannten Risikofaktoren begründen. Aufgrund der geografischen Lage des Krankenhauses in Berlin-Wedding mit einem entsprechenden Bevölkerungsklientel rekrutiert sich das Patientenkollektiv einerseits aus potentiellen Risikoschwangerschaften – unter anderem durch das teilweise jugendliche Alter der Mütter – und andererseits aus Patientinnen einer sozioökonomisch schwächeren Bevölkerungsgruppe. Damit steigt möglicherweise die Auftretenswahrscheinlichkeit der genannten exogenen Risikofaktoren wie ein geringerer Bildungsgrad²⁵ oder Rauchen während der Schwangerschaft.^{25,115} Zur Überprüfung dieser Annahme lagen jedoch im Rahmen dieser Studie keine validen Daten vor.

Um diese Hypothese zu prüfen, könnte langfristig ein strukturierter Fragebogen helfen, der bei allen schwangeren Patientinnen ein umfassendes Risikoprofil für unterschiedliche Erkrankungen wie die IHPS erfasst. Hierfür wäre jedoch nicht nur die Erhebung von teilweise sehr sensiblen und persönlichen Daten notwendig, sondern auch die Nachverfolgung der geborenen Kinder. Durch die Vielzahl an Krankenhäusern in Berlin scheint ein solcher Ansatz an einem solitären Zentrum nicht praktikabel zu sein.

Neben dem möglicherweise divergenten Risikoprofil am Studienzentrum spiegeln die vorliegenden Daten verständlicherweise nur einen kleinen Ausschnitt aus einem überschaubaren Patientenkollektiv wider. Die Schwankungen könnten in der untersuchten Zeitspanne auch auf andere exogene Variablen zurückzuführen sein, die für die Entwicklung der IHPS nicht relevant sind: Das Zuweiser-Verhalten für das Studienzentrum in den einzelnen Jahren könnte sich verändert haben, die sichtenden

Ärzte bei einem Patienten häufiger oder seltener die Indikation für die Pyloromyotomie gestellt haben oder die exakte Kodierung nicht erfolgt sein.

Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass eine Datenerhebung für das Studienzentrum nur schwer durchführbar ist. Eine Korrelation von Fallzahl und Lebendgeburten ist nicht möglich, da im eigenen Zentrum auch zahlreiche Patienten vorgestellt werden, deren Geburt in einem anderen Krankenhaus erfolgte. Deshalb ist ein direkter Vergleich der Inzidenzentwicklung im Studienzentrum mit den deutschlandweiten Daten nicht möglich.

5.2 Veränderung der Cajal-Zellen

Bereits in vorangegangenen Studien^{7,112} konnte eine verminderte Anzahl von Cajal-Zellen im Pylorusgewebe bei der IHPS gezeigt werden. Die vorliegende Arbeit hat repräsentativ an einer kleinen Studienpopulation erneut eine signifikante Verringerung der ICC im Pylorus bei der IHPS gezeigt ($p=0,034$). Somit kann die zweite eingangs aufgestellte Hypothese einer Verringerung der Cajal-Zellzahl bei der IHPS als verifiziert betrachtet werden.

Nach der erfolgreichen Etablierung und suffizienten Durchführung der immunhistochemischen Markierung der Cajal-Zellen konnten mit dieser Arbeit erstmalig absolute Zellzahlen der ICC bei der IHPS mittels Auszählung von high-power fields erhoben werden. In der vorliegenden Untersuchung fanden sich in jeweils 15 ausgezählten high-power fields $194,5 \pm 222,5$ Zellen im erkrankten Gewebe, während das gesunde Gewebe $635,8 \pm 496,5$ Zellen aufwies ($p=0,034$). Dieser neue Ansatz zur Quantifizierung der Cajal-Zellen bei der IHPS ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit der erhobenen Zahlenwerte.

Das Ergebnis der signifikanten Verminderung der Cajal-Zellen in Zusammenhang mit der heterogenen Anzahl im gesunden Gewebe unterstützt das Mehrfaktorenmodell.^{25,50}

Es lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich beim Zusammentreffen von einer bei Geburt verringerten Anzahl an Cajal-Zellen und hinzutretenden Risikofaktoren – seien es exogene wie Rauchen der Mutter, Schlafposition des Kindes oder endogene wie eine gesteigerte Hormonwirkung¹³ – eine IHPS entwickeln kann. Mit der vorliegenden Arbeit sind jedoch keine funktionellen Aussagen zu den Cajal-Zellen im erkrankten Gewebe möglich. Eine solche Untersuchung wäre jedoch elementar, um die tatsächliche Bedeutung der Cajal-Zellen bei der IHPS bewerten und entsprechend die dritte Hypothese dieser Arbeit verifizieren zu können.

Weiterhin ist durch die vorliegende Arbeit nicht erklärbar, ob die Verringerung der Cajal-Zellen ein Grund für die Muskelhypertrophie ist oder ob es durch die Hypertrophie zu einem Verlust an Cajal-Zellen kommt, womit die Theorie des ischämischen Zelluntergangs von Kang et al. gestützt werden könnte.¹¹⁸ Dieser Ansatz würde auch eine mögliche Erklärung zu der von Vanderwinden et al. beschriebenen Restitution der Cajal-Zellen nach erfolgter Pyloromyotomie liefern.¹¹⁹

5.3 Vergleich mit anderen Studienergebnissen

5.3.1 Rückgang der Inzidenz

Ein Rückgang der Inzidenz in unterschiedlichen Ländern konnte bereits in vorangegangenen Studien beobachtet und teilweise verschiedenen Ursachen zugeschrieben werden.^{25,33,52} Dafür verantwortlich gemacht wurde bisher in erster Linie die durch Aufklärung zum SIDS veränderte Schlafposition der Kinder.^{25,26}

De Laffolie et al. haben bereits im Jahr 2012 die deutschlandweiten Daten für die Jahre 2000 bis 2008 ausgewertet und den Rückgang der Inzidenz mit dem SIDS verknüpft.⁵⁶

Die in dieser Arbeit vorgenommene Auswertung neuerer Daten zeigte eine weitere konsequente Abnahme der Inzidenz von 3,67 Fällen im Jahr 2000 auf 1,63 Fälle pro 1000 Lebendgeburten im Jahr 2013.

5.3.2 Veränderungen der Cajal-Zellen bei der IHPS

Die Bedeutung der Cajal-Zellen bei der IHPS wurde ebenfalls in früheren Studien untersucht. 1996 kamen Yamataka et al. zu dem Resultat, dass bei der IHPS weniger Cajal-Zellen zu finden sind als im gesunden Gewebe.¹¹² Hierbei nutzten die Autoren eine semiquantitative Stufenskala zur Darstellung der Cajal-Zellzahlen.¹¹²

Zu dem gleichen Befund kamen Vanderwinden et al. in ihrer Studie von 1996, ebenfalls unter Verwendung einer semiquantitativen Stufenskala.⁷ Zu dieser Publikation ist jedoch kritisch festzustellen, dass die Abbildungen, die die Ergebnisse visualisieren, nicht korrekt sind. In der genannten Publikation ist die Abbildung 1, die Darstellung der Verteilung der Cajal-Zellen im gesunden Gewebe, identisch mit der dortigen Abbildung 4, die wiederum die Verteilung bei der IHPS darstellen soll. Daher sind die Ergebnisse, die in der Studie von Vanderwinden et al. erhoben wurden, nicht nachvollziehbar.⁷ Ein sicherer Vergleich zu dieser Arbeit kann somit nicht hergestellt werden, wenn auch eine große Ähnlichkeit im Vergleich der relativen Dichte der ICC zwischen gesundem Gewebe und im Pylorus bei IHPS besteht.

5.4 Vergleich der Bedeutung der ICC bei anderen Krankheitsbildern

5.4.1 Morbus Hirschsprung (Kongenitales Megakolon)

Den ICC kommt nach den bisherigen Erkenntnissen bei unterschiedlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts eine nicht zu unterschätzende Rolle zu.¹⁰⁵

Als besonders wichtiges Beispiel sei der Morbus Hirschsprung genannt, bei dem die Bedeutung der ICC mit sehr differenten Befunden untersucht wurde.¹⁰⁵

Der Morbus Hirschsprung, auch kongenitales Megakolon oder Aganglionose genannt, ist eine angeborene Motilitätsstörung des Kolons, bei der das Einwandern von enterischen Nervenzellen in Teile des Kolons ausbleibt.^{120,121} Dieser fehlenden enterischen Innervation, die nahezu immer vom Anus ausgehend oralwärts verläuft,¹²¹ folgt eine Stenose im betroffenen Darmabschnitt, die mit einer entsprechenden Klinik wie verzögertem Mekoniumabgang und Obstipationen einhergeht.¹²⁰ Auch der Morbus Hirschsprung tritt, ähnlich wie die IHPS, gehäuft bei männlichen Patienten auf.¹²¹

Die bisherigen Studien zur Bedeutung der Cajal-Zellen bei diesem Krankheitsbild wiesen heterogene Ergebnisse auf. Während Horisawa et al. 1998 keinen nennenswerten Unterschied im Vorhandensein der Cajal-Zellen im aganglionären Segment beim Morbus Hirschsprung gegenüber gesunden Kontrollen feststellen konnten,¹¹⁰ zeigten andere Studien eine Verminderung der ICC im aganglionären Segment.^{109,122}

Darüber hinaus konnte in neueren Studien von Taguchi et al. nachgewiesen werden, dass ähnliche Veränderungen auch im normoganglionären Segment vorliegen. Den Autoren zufolge wäre damit ein schlechteres postoperatives Outcome erklärbar.^{123,124}

Aufgrund des wiederholten Nachweises einer ICC-Verminderung ist faktisch davon auszugehen, dass diese Veränderung tatsächlich beim Morbus Hirschsprung vorliegt. Ob es sich dabei um einen mitauslösenden Faktor der Motilitätsstörung handelt oder diese Veränderung lediglich eine Folge der längeren Obstruktion und damit der längeren Motilitätseinschränkung ist, wie es auch Gfroerer und Rolle in ihrer Studie von 2013 beschreiben, bleibt ungeklärt.¹²⁵

Der Vergleich zum Morbus Hirschsprung unterstreicht nochmals die Bedeutung der Cajal-Zellen bei der Aufrechterhaltung einer regulären und suffizienten gastrointestinalen Peristaltik.

Die Diskussion von Gfroerer und Rolle zur Ursache der Verminderung der ICC im aganglionären Segment lässt sich auf die vorliegende Studie übertragen.¹²⁵ Auch in

dieser Arbeit konnte weder die Ursache der Zellverminderung ergründet werden noch die Klärung erfolgen, ob diese, wie in Abschnitt 5.5.4 beschrieben, Folge oder Ursache der Muskelhypertrophie ist.

5.4.2 Primäre Uretermündungsstenose (Megaureter)

Während die Existenz von Cajal-Zellen im Gastrointestinaltrakt bereits lange bekannt ist und auch die Erstbeschreibung dieses Zelltyps von Ramón y Cajal in diesem Gewebe erfolgte⁶⁵, ist das Vorhandensein dieser Zellen in anderen Gewebearten und die Rolle bei entsprechenden Krankheitsbildern erst seit kurzem bekannt.

Die Erstbeschreibung von Cajal-Zellen im Harntrakt erfolgte durch McCloskey und Gurney im Jahr 2002 beim Meerschweinchen.¹²⁶ Durch Solari et al. gelang wenig später der Nachweis in humanem Gewebe des Harntrakts.¹²⁷ Es folgten zahlreiche Untersuchungen zum Vorkommen und zur Rolle der Cajal-Zellen bei unterschiedlichen Erkrankungen des harnableitenden Systems.¹²⁸⁻¹³⁰

Im Folgenden soll nun die primäre Uretermündungsstenose im Vergleich zur IHPS genauer betrachtet werden. Bei der primären Uretermündungsstenose handelt es sich um eine primäre Erweiterung des Ureters auf $>7\text{mm}$,¹³¹ die nicht durch eine infravesicale Obstruktion bedingt ist. Epidemiologisch zeigt sich ähnlich der IHPS eine Häufung bei Jungen.¹³² Die Ursachen für diese Erkrankung sind bisher ebenso wie die der IHPS noch nicht abschließend geklärt. Diskutiert werden exogene Faktoren wie ein vermehrter Druck aus dem umgebenden Gewebe¹³³ oder aber embryonale Entwicklungsstörungen wie eine fehlende Kanalisierung des Ureters.¹³⁴ Entscheidend ist – ähnlich wie beim Morbus Hirschsprung – die Ausbildung eines adynamen Segments, das zu einer Unterbrechung der Ureterperistaltik und damit zu einem Harnstau führt.¹³⁵ Ein solches adynames Element mit fehlender Peristaltik legt den Verdacht nahe, es könne eine Verteilungsauffälligkeit der Cajal-Zellen in diesem Bereich vorliegen.

So konnten beispielsweise Kang et al. 2009 eine verringerte Zellzahl der ICC im ureterovesikulären Übergang bei Patienten mit vesikouretralem Reflux gegenüber Patienten mit primärer Uretermündungsstenose nachweisen.¹¹⁸ Da bei dieser Studie eine gesunde Kontrollgruppe fehlte, war keine Aussage über die Pathogenese der Erkrankungen möglich. Eine Untersuchung der primären Uretermündungsstenose durch Kart et al. aus dem Jahr 2013 hingegen basiert auf einer ähnlichen Herangehensweise wie die vorliegende Studie.¹³⁶ Bei Kart et al. wurden Proben von

erkrankten Patienten mit einer gesunden Kontrollgruppe – ebenfalls aus Sektionsgewebe – verglichen und die Zellzahl über 10 ausgezählte HPFs bestimmt.¹³⁶ Die verringerte Zellzahl lässt sich durch die deutlich höhere Vergrößerung der einzelnen high-power fields im Vergleich zur vorliegenden Studie erklären. Das Ergebnis von Kart et al. ähnelt den in der dieser Arbeit gemachten Beobachtungen. Auch bei der primären Uretermündungsstenose zeigt sich eine verminderte Zellzahl an Cajal-Zellen gegenüber dem gesunden Gewebe.¹³⁶

Kart et al. diskutieren in ihrer Arbeit ebenfalls, dass die Ursache für die primäre Uretermündungsstenose nicht häufig auf die verringerte Anzahl an Cajal-Zellen zurückzuführen sei und diese in einigen Fällen mit Vorbelastung zur Entstehung einer primären Uretermündungsstenose beitragen könnte.¹³⁶

Die festgestellte Kongruenz der Bedeutung der Cajal-Zellen zwischen der IHPS und der primären Uretermündungsstenose lässt möglicherweise auch eine parallele Herangehensweise der Therapie zu. Die primäre Uretermündungsstenose wird nur in seltenen Fällen und bei Komplikationen operativ versorgt; im Regelfall genügt eine antibiotische Abschirmung der Patienten zum Schutz vor Harnwegsinfektionen sowie eine regelmäßige sonografische Kontrolle.¹³¹ Dieses Therapieprinzip hat sich bewährt, obwohl von einer verringerten Zellzahl der Cajal-Zellen bei der primären Uretermündungsstenose ausgegangen werden kann.

Bislang liegen noch keine Studien zur Zellzahl der Cajal-Zellen nach konservativer Behandlung der Uretermündungsstenose vor. Durch eine entsprechende Untersuchung könnte geklärt werden, ob sich die Zellzahl nach Abheilen unter konservativer Therapie wieder normalisiert und somit einen ähnlichen Effekt zeigt, wie er bei der IHPS nach operativer Versorgung durch Vanderwinden et al. 1996 nachgewiesen werden konnte.¹¹⁹ Ein solcher Nachweis wäre ein weiterer Hinweis für ein konservatives Therapieschema bei der IHPS und würde die bereits untersuchte konservative Therapie mit Atropin^{59,60} oder Alternativpräparaten wieder stärker in den Fokus rücken. Ein operativer Eingriff zur Therapie der IHPS wäre dann möglicherweise langfristig vermeidbar.

5.5 Studienlimitation

5.5.1 Patientenkollektiv der histologischen Untersuchung

Die vorliegende Studie basiert mit vier Probanden auf einer sehr geringen Stichprobe. Dieses ist mit dem Rückgang der Inzidenz bundes- und europaweit nur teilweise zu

begründen. Als weitere mögliche Ursache kann die hohe Spezialisierung des Studienzentrums gesehen werden. Die Pyloromyotomie stellt einen Eingriff dar, der meist in kleineren Krankenhäusern und teilweise auch in Kliniken für Allgemein- und Viszeralchirurgie durchgeführt wird. Nur in seltenen Fällen werden Patienten mit dem Erkrankungsbild IHPS in eine universitäre Klinik verlegt oder primär eingewiesen. Die Vorstellung von Patienten mit IHPS in der Klinik für Kinderchirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin ist häufig durch begleitende Grunderkrankungen begründet. Diese eventuell vorhandenen Grund- und Begleiterkrankungen stellen jedoch einen weiteren limitierenden Faktor für den Studieneinschluss von Patienten dar. Zwar waren Begleiterkrankungen nicht als Ausschlusskriterien definiert worden, es zeigte sich jedoch eine geringere Einwilligungsbereitschaft von Eltern, deren Kinder gesundheitlich stärker vorbelastet waren. Somit standen nach zwei Jahren lediglich vier Proben zur Untersuchung zur Verfügung.

Mit einer größer angelegten Multi-Center-Studie könnte dieses Problem gelöst werden. Ein entsprechend umfangreicheres Patientenkollektiv, nach Möglichkeit auch mit Einschluss weiblicher Studienteilnehmerinnen, wäre für eine fundiertere Aussagekraft unabdingbar.

5.5.1.1 Heterogene Altersstruktur der Kontrollgruppe

Die große Spannweite der Anzahl an Cajal-Zellen im gesunden Gewebe lässt sich unterschiedlich interpretieren. Zum einen kann das festgestellte Ergebnis in einer natürlichen Varianz im Verteilungsmuster der Cajal-Zellen im Pylorus begründet sein, zum anderen ist auch eine altersabhängige Entwicklung des Cajal-Zellnetzwerks möglich. So konnte bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass sich das Netzwerk der Cajal-Zellen und ihrer verschiedenen Subtypen (siehe Abschnitt 1.5.1) zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten der Feten anders darstellt.¹³⁷⁻¹³⁹ Zur postnatalen Entwicklung des ICC-Netzwerks liegen jedoch bisher keine Erkenntnisse vor.

Diese divergierenden Erklärungsansätze führen zu der Feststellung, dass die Kenntnis einer altersabhängigen Differenzierung der Cajal-Zellzahlen im Pylorus wichtig für die weitere Beurteilung ist.

In der Kontrollgruppe der vorliegenden Arbeit erstreckte sich das Alter der Kinder von Früh- und Reifotgeborenen über Frühgeborene bis hin zu Kindern, die in den ersten Lebensjahren verstorben waren. Bei der relativ kleinen Kontrollgruppe der vorliegenden

Studie erschien eine altersabhängige Aufteilung nicht zielführend, da in einzelnen Gruppen lediglich ein bis zwei Probanden aufgenommen worden wären.

Für eine zukünftige gezielte Auswertung der Cajal-Zellen im gesunden Pylorus ist eine altersabhängige Kategorisierung relevant, um hohe oder niedrige Zellzahlen richtig interpretieren zu können.

5.5.2 Histologische Möglichkeiten

Die histologische Auswertung der Gewebeproben erfolgte mittels der etablierten CD117-Antikörpermarkierung der Cajal-Zellen. Eine weitere histologische Aufarbeitung stand für die vorliegende Studie nicht zur Verfügung, existiert jedoch prinzipiell. Es liegen, wie in Abschnitt 1.5.3 beschrieben, Untersuchungen zur Markierung der Cajal-Zellen mit CD44-Antikörpern vor.¹⁰³

Weiterhin sei auf die Möglichkeit der selektiven Markierung der Mastzellen hingewiesen. Diese ebenfalls CD117-positiven Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit bildmorphologisch und nach der Lokalisation aus der Wertung ausgeschlossen.

Ein mögliches Vorgehen wäre die selektive Anfärbung dieser Zellen oder eine Fluoreszenzmarkierung von Mastzellen und Cajal-Zellen, die eine zweifelsfreie Identifizierung ermöglichen würden.

Zur histochemischen Darstellung wäre die Färbung nach Giemsa geeignet, die zwar nicht spezifisch den genannten Zelltypus färbt, jedoch die Identifizierung anhand der bei Mastzellen ausgeprägten metachromatischen Granula zulässt.^{97,140} Ebenfalls möglich wäre hier eine immunhistochemische Reaktion mit CD34 zur selektiven Darstellung der Mastzellen.¹¹⁸ Weiterhin steht die Mastzell-Tryptase als Antikörper zur immunhistochemischen Markierung zur Verfügung.⁹⁷

Neben den Färbemethoden wäre auch eine elektronenmikroskopische Betrachtung der Cajal-Zellen anzudenken, um morphologische Veränderungen, wie sie in den Abbildungen 22 bis 24 zu vermuten sind, besser beschreiben zu können.

Auf diese Methode wurde hier bewusst verzichtet, da die Proben der Kontrollgruppe bereits in Paraffinblöcken vorlagen und somit eine ausgeprägte Ungleichmäßigkeit in der Probenverarbeitung vor der Elektronenmikroskopie existiert hätte. Durch die damit einhergehende mangelnde Vergleichbarkeit und aufgrund der geringen Spezifität der ultrastrukturellen Veränderungen wurde dieses Verfahren nicht gewählt.

5.5.3 Grenzen der Auswertung

Die Interpretation der gefärbten Proben stellte sich teilweise problematisch dar, da es zum aktuellen Zeitpunkt keine fundierten Zahlenwerte zu Anzahl und Verteilung von Cajal-Zellen im Pylorus oder generell im Gastrointestinaltrakt gibt.

Bisherige Studien zur Bedeutung der Cajal-Zellen bei der IHPS^{7,141} haben das Vorhandensein der Cajal-Zellen lediglich semiquantitativ mithilfe eines Stufenschemas beschrieben und keine absoluten Zahlenangaben gemacht. Die in jenen Arbeiten gewonnenen Ergebnisse sind nur begrenzt reproduzierbar, da kaum Informationen zu den Schnitten hinsichtlich der vorgenommenen Auswertung nach dem Stufenschema vorlagen.

Aufgrund dieser Problematik wurden die Cajal-Zellen in dieser Arbeit nach dem System der high-power fields^{142,143} ausgewertet, wie es auch in ähnlicher Art und Weise in der Pathologie bei der Quantifizierung von atypischen Zellen zum Einsatz kommt. Bei der vorliegenden Studie wurde eine relativ große Anzahl an Feldern nach dieser Methode ausgewertet, um einen möglichst fundierten Median der Zellzahlen aus jeder Gewebeprobe zu erhalten.

Ein weiterer limitierender Faktor bestand in der fehlenden Verblindung. Dieser Prozess war in der vorliegenden Untersuchung nicht möglich, da die OP-Präparate sich durch ihre Größe und makroskopisch erkennbare Morphologie so eindeutig von den Sektionpräparaten der Kontrollgruppe unterschieden, dass am Mikroskop und in Folge auch bei der Auswertung eine Verblindung nicht realisierbar war.

5.5.4 Tatsächliche Zellzahlverringering versus Wirkung der Hypertrophie

Als entscheidender Diskussionspunkt der verringerten Zellzahl muss die Möglichkeit einer scheinbaren Verringerung der Cajal-Zellzahl durch eine Muskelhypertrophie in Betracht gezogen werden.

Wie auch bereits bei Yamataka et al. 1996 diskutiert, könnte die verringerte Zelldichte an Cajal-Zellen durch die Hypertrophie der glatten Muskulatur bedingt sein.¹¹² Entsprechend würde sich die absolute Anzahl an Cajal-Zellen im Pylorus nicht verändern, lediglich die Verteilung würde entsprechend variieren.

Zur genauen Klärung dieses Phänomens bedürfte es einer selektiven Darstellung der glatten Muskulatur durch eine Antikörpermarkierung beispielsweise mittels α -smooth muscle actin (α -SMA), wie es unter anderem von Radenkovic et al. 2010 zur Erstellung eines pränatalen Entwicklungsmusters der ICC eingesetzt wurde.¹³⁹ Nach einer

quantitativen Auswertung der glatten Muskulatur könnte abgeschätzt werden, ob die verringerte Zellzahl der ICC bei der IHPS auf eine Hypertrophie oder Hyperplasie der glatten Muskulatur zurückzuführen ist oder ob tatsächlich weniger ICC im Verhältnis zur Muskulatur vorhanden sind.

Somit lässt sich aktuell nicht sicher klären, ob die Verringerung der Cajal-Zellen, die damit einhergehende fehlende Pacemaker-Aktivität sowie die fehlenden Dehnungsrezeptoren (vergleiche Abschnitt 1.5.2) zu der bekannten Hypertrophie führen oder ob die Hypertrophie die mikroskopische Wahrnehmung der Cajal-Zellen verringert. Auch bei der letztgenannten Kausalkette, ausgelöst durch die Hypertrophie, käme es durch das erkennbar dünnere Netzwerk (siehe Abbildung 21) vermutlich zu einem progredienten Funktionsverlust im betroffenen Gewebe. Zur genauen Klärung bedarf es einer funktionellen Überprüfung der Cajal-Zellen im erkrankten Gewebe.

Für eine verringerte Darstellung der Cajal-Zellen im erkrankten Gewebe spricht eine Studie von Vanderwinden et al. aus dem Jahr 1996, in der gezeigt werden konnte, dass es nach einer erfolgten Pyloromyotomie zu einer Wiederherstellung des Cajal-Zellnetzwerks wie im Gesunden kommt.¹¹⁹ Aus dem festgestellten Ergebnis schlossen Vanderwinden et al., die verringerte Zahl an Cajal-Zellen sei eher hypertrophiebedingt als durch eine tatsächliche Verringerung verursacht.¹¹⁹

5.6 Ausblick

Bereits bei dem relativ kleinen Patientenkollektiv dieser Arbeit zeigte sich die signifikante Verringerung der Anzahl an Cajal-Zellen bei der IHPS ($p=0,034$).

Deshalb wäre es wichtig und sinnvoll, die Zahl der Cajal-Zellen im gesunden Gewebe anhand einer größeren Population zu untersuchen. Eine denkbare Methode ist die Gewinnung von Proben aus Sektionpräparaten, um altersadjustiert die Cajal-Zellzahl zu ermitteln. Zielführend wäre dabei eine alters- und geschlechtsnormierte Quantifizierung dieser Zellen in unterschiedlichen Darmabschnitten, um damit konkrete Werte festzulegen. Mittels solcher Richtwerte könnte in Zukunft eine Einordnung der im erkrankten Gewebe gefundenen Zellzahlen deutlich vereinfacht und eine höhere Vergleichbarkeit geschaffen werden. Wie die vorliegende Arbeit bestätigt, stellt das Prinzip der high-power fields für eine solche Quantifizierung einen vergleichbaren und gut standardisierbaren Rahmen dar.

6 Zusammenfassung

In Deutschland existiert gemäß den Erhebungen des Statistischen Bundesamt ein deutlicher Rückgang der Inzidenz der infantilen hypertrophischen Pylorusstenose bei annähernd gleichbleibender Geschlechterverteilung von 3,67 (2000) auf 1,63 Fälle pro 1000 Lebendgeburten (2013).

Am Studienzentrum lässt sich dieser beschriebene Trend, der sich auch mit den Daten anderer Länder deckt,^{27,34,52} nicht erkennen. Hier schwankt die Fallzahl zwischen den untersuchten Jahren erheblich zwischen 13 Fällen pro Jahr wie beispielsweise 2005 und 5 Fällen in 2013. Die Geschlechterverteilung im Studienzentrum spiegelt jedoch die Verteilung im gesamtdeutschen Raum wider.

Die multifaktorielle Pathogenese der IHPS ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Daher lässt sich der Rückgang der Inzidenz nur schwer bestimmten Veränderungen zuordnen. Ein möglicher Erklärungsansatz ist das in den letzten Jahren veränderte Rauchverhalten.

In der histologischen Untersuchung der Gewebeproben konnte gezeigt werden, dass bei der infantilen hypertrophischen Pylorusstenose signifikant weniger Cajal-Zellen in der Pylorusbildung vorhanden waren als in der Kontrollgruppe ($p=0,034$). In dieser fanden sich in den 15 untersuchten high-power fields $635,8 \pm 496,5$ Zellen. In den Operationspräparaten waren es hingegen lediglich $194,5 \pm 222,5$ Zellen.

Damit ist ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Cajal-Zellen und der IHPS sehr wahrscheinlich. Diese Ergebnisse decken sich im Wesentlichen mit den Ergebnissen früherer Studien (Yamataka et al.¹¹² und Vanderwinden et al.⁷). Bei der vorliegenden Arbeit konnte im Gegensatz zu den genannten Publikationen eine quantitative Untersuchung der Cajal-Zellen im Pylorus sowohl im gesunden Gewebe als auch bei der IHPS durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie können als Grundlage für weitere Forschungen dienen. Besonders die deutlich festgestellte Parallele zur primären Uretermündungsstenose, die aktuell primär konservativ therapiert wird, könnte bei beständig abnehmender Inzidenz die Möglichkeit einer ebenfalls konservativen Behandlung der IHPS noch stärker in den Fokus rücken und in Zukunft eine operative Intervention verzichtbar machen.

Literaturverzeichnis

1. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie – Hypertrophe Pylorusstenose. AWMF online, 2013. (abgerufen am 11.10.2015, von http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/006-056l_S1_Hypertrophe_Pylorusstenose_2013-08.pdf.)
2. Taylor ND, Cass DT, Holland AJ. Infantile hypertrophic pyloric stenosis: has anything changed? *J Paediatr Child Health* 2013;49:33-7.
3. Fabricius Hildanus W. *Guilhelmi Fabricii opera observationum et curationum medico-chirurgicarum quae extant omnia*. Francofurti: Beyer; 1646.
4. Hirschsprung H. Fälle von angeborener Pylorusstenose. *Jahrbuch Kinderheilkunde* 1888:61-8.
5. Ramstedt C. Zur Operation der angeborenen Pylorusstenose. *Med Klinik* 1912;8:1702.
6. Spicer RD. Infantile hypertrophic pyloric stenosis: a review. *Br J Surg* 1982;69:128-35.
7. Vanderwinden JM, Liu H, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ. Study of the interstitial cells of Cajal in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Gastroenterology* 1996;111:279-88.
8. Ukabiala O, Lister J. The extent of muscle hypertrophy in infantile hypertrophic pyloric stenosis does not depend on age and duration of symptoms. *J Pediatr Surg* 1987;22:200-2.
9. White MC, Langer JC, Don S, DeBaun MR. Sensitivity and cost minimization analysis of radiology versus olive palpation for the diagnosis of hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 1998;33:913-7.
10. Hernanz-Schulman M. Infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Radiology* 2003;227:319-31.

11. Aspelund G, Langer JC. Current management of hypertrophic pyloric stenosis. *Semin Pediatr Surg* 2007;16:27-33.
12. Wilkinson DJ, Chapman RA, Owen A, Olpin S, Marven SS. Hypertrophic pyloric stenosis: predicting the resolution of biochemical abnormalities. *Pediatr Surg Int* 2011;27:695-8.
13. Panteli C. New insights into the pathogenesis of infantile pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int* 2009;25:1043-52.
14. Shim WK, Campbell A, Wright SW. Pyloric stenosis in the racial groups of Hawaii. *J Pediatr* 1970;76:89-93.
15. Carter CO, Evans KA. Inheritance of congenital pyloric stenosis. *J Med Genet* 1969;6:233-54.
16. Capon F, Reece A, Ravindrarajah R, Chung E. Linkage of monogenic infantile hypertrophic pyloric stenosis to chromosome 16p12-p13 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2006;79:378-82.
17. Everett KV, Capon F, Georgoula C, Chioza BA, Reece A, Jaswon M, Pierro A, Puri P, Gardiner RM, Chung EM. Linkage of monogenic infantile hypertrophic pyloric stenosis to chromosome 16q24. *Eur J Hum Genet* 2008;16:1151-4.
18. Everett KV, Chioza BA, Georgoula C, Reece A, Capon F, Parker KA, Cord-Udy C, McKeigue P, Mitton S, Pierro A, Puri P, Mitchison HM, Chung EM, Gardiner RM. Genome-wide high-density SNP-based linkage analysis of infantile hypertrophic pyloric stenosis identifies loci on chromosomes 11q14-q22 and Xq23. *Am J Hum Genet* 2008;82:756-62.
19. Jackson L, Kline AD, Barr MA, Koch S. de Lange syndrome: a clinical review of 310 individuals. *Am J Med Genet* 1993;47:940-6.
20. Danzer E, Schier F, Giggel S, Bondartschuk M. Smith-Lemli-Opitz syndrome: case report and literature review. *J Pediatr Surg* 2000;35:1840-2.
21. Schechter R, Torfs CP, Bateson TF. The epidemiology of infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1997;11:407-27.

22. Heller A, Seidel J, Hubler A, Starke H, Beensen V, Senger G, Rocchi M, Wirth J, Chudoba I, Claussen U, Liehr T. Molecular cytogenetic characterisation of partial trisomy 9q in a case with pyloric stenosis and a review. *J Med Genet* 2000;37:529-32.
23. Cekada S, Kilvain S, Brajenovic-Milic B, Brecevic L, Kirincic-Paucic E, Franulovic J. Partial trisomy 13q22-->qter and monosomy 18q21-->qter as a result of familial translocation. *Acta Paediatr* 1999;88:675-8.
24. Hodgson SV, Berry AC, Dunbar HM. Two brothers with an unbalanced 8;17 translocation and infantile pyloric stenosis. *Clin Genet* 1995;48:328-30.
25. Lisonkova S, Joseph KS. Similarities and differences in the epidemiology of pyloric stenosis and SIDS. *Matern Child Health J* 2014;18:1721-7.
26. Persson S, Ekblom A, Granath F, Nordenskjold A. Parallel incidences of sudden infant death syndrome and infantile hypertrophic pyloric stenosis: a common cause? *Pediatrics* 2001;108:E70.
27. Leong MM, Chen SC, Hsieh CS, Chin YY, Tok TS, Wu SF, Peng CT, Chen AC. Epidemiological features of infantile hypertrophic pyloric stenosis in Taiwanese children: a Nation-Wide Analysis of Cases during 1997-2007. *PLoS One* 2011;6:e19404.
28. Osifo DO, Evbuomwan I. Does exclusive breastfeeding confer protection against infantile hypertrophic pyloric stenosis? A 30-year experience in Benin City, Nigeria. *J Trop Pediatr* 2009;55:132-4.
29. Lund M, Pasternak B, Davidsen RB, Feenstra B, Krogh C, Diaz LJ, Wohlfahrt J, Melbye M. Use of macrolides in mother and child and risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis: nationwide cohort study. *BMJ* 2014;348:g1908.
30. Eberly MD, Eide MB, Thompson JL, Nylund CM. Azithromycin in early infancy and pyloric stenosis. *Pediatrics* 2015;135:483-8.

31. Dahshan A, Donovan KG, Halabi IM, Ranne R, Li M, Illig WP. Helicobacter pylori and infantile hypertrophic pyloric stenosis: is there a possible relationship? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:262-4.
32. To T, Wajja A, Wales PW, Langer JC. Population demographic indicators associated with incidence of pyloric stenosis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005;159:520-5.
33. Pedersen RN, Garne E, Loane M, Korsholm L, Husby S. Infantile hypertrophic pyloric stenosis: a comparative study of incidence and other epidemiological characteristics in seven European regions. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21:599-604.
34. Svenningsson A, Svensson T, Akre O, Nordenskjold A. Maternal and pregnancy characteristics and risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 2014;49:1226-31.
35. Vermes G, Laszlo D, Czeizel AE, Acs N. Maternal Factors in the Origin of Infantile Hypertrophic Pyloric Stenosis - a Population-based Case-control Study. *Congenit Anom (Kyoto)* 2015.
36. Dodge JA. Production of duodenal ulcers and hypertrophic pyloric stenosis by administration of pentagastrin to pregnant and newborn dogs. *Nature* 1970;225:284-5.
37. Rogers IM, Macgillion F, Drainer IK. Congenital hypertrophic pyloric stenosis: A gastrin hypothesis pursued. *J Pediatr Surg* 1976;11:173-6.
38. Rogers IM, Drainer IK, Moore MR, Buchanan KD. Plasma gastrin in congenital hypertrophic pyloric stenosis. A hypothesis disproved. *Arch Dis Child* 1975;50:467-71.
39. Moazam F, Rodgers BM, Talbert JL, McGuigan JE. Fasting and postprandial serum gastrin levels in infants with congenital hypertrophic pyloric stenosis. *Ann Surg* 1978;188:623-5.

40. Rogers IM. The true cause of pyloric stenosis is hyperacidity. *Acta Paediatr* 2006;95:132-6.
41. LaFerla G, Watson J, Fyfe AH, Drainer IK. The role of prostaglandins E2 and F2 alpha in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 1986;21:410-2.
42. Shinohara K, Shimizu T, Igarashi J, Yamashiro Y, Miyano T. Correlation of prostaglandin E2 production and gastric acid secretion in infants with hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 1998;33:1483-5.
43. Ohshiro K, Puri P. Increased insulin-like growth factor-I mRNA expression in pyloric muscle in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int* 1998;13:253-5.
44. Ohshiro K, Puri P. Increased insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor system in the pyloric muscle in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 1998;33:378-81.
45. Jablonski J, Gawronska R, Gawlowska A, Kobos J, Andrzejewska E. Study of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and platelet-derived endothelial cell growth factor (PDEGF) expression in children with infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Med Sci Monit* 2006;12:Cr27-30.
46. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 1996;335:1363-7.
47. Shima H, Puri P. Increased expression of transforming growth factor-alpha in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int* 1999;15:198-200.
48. Ohshiro K, Puri P. Pathogenesis of infantile hypertrophic pyloric stenosis: recent progress. *Pediatr Surg Int* 1998;13:243-52.
49. Carter CO. The inheritance of congenital pyloric stenosis. *Br Med Bull* 1961;17:251-4.
50. Kinney HC, Filiano JJ, Harper RM. The neuropathology of the sudden infant death syndrome. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992;51:115-26.

51. Tiao MM, Tsai SS, Kuo HW, Yang CY. Epidemiological features of infantile hypertrophic pyloric stenosis in Taiwan: a national study 1996-2004. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:78-81.
52. Sommerfield T, Chalmers J, Youngson G, Heeley C, Fleming M, Thomson G. The changing epidemiology of infantile hypertrophic pyloric stenosis in Scotland. *Arch Dis Child* 2008;93:1007-11.
53. O'Donoghue JM, Connolly KD, Gallagher MM, O'Hanlon D, Doyle J, Flynn JR. The increasing incidence of infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Ir J Med Sci* 1993;162:175-6.
54. Rasmussen L, Green A, Hansen LP. The epidemiology of infantile hypertrophic pyloric stenosis in a Danish population, 1950-84. *Int J Epidemiol* 1989;18:413-7.
55. Sorensen HT, Skriver MV, Pedersen L, Larsen H, Ebbesen F, Schonheyder HC. Risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis after maternal postnatal use of macrolides. *Scand J Infect Dis* 2003;35:104-6.
56. de Laffolie J, Turial S, Heckmann M, Zimmer KP, Schier F. Decline in infantile hypertrophic pyloric stenosis in Germany in 2000-2008. *Pediatrics* 2012;129:e901-6.
57. Kawahara H, Imura K, Nishikawa M, Yagi M, Kubota A. Intravenous atropine treatment in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Arch Dis Child* 2002;87:71-4.
58. Ludtke FE, Bertus M, Voth E, Lepsien G. [Long-term results following conservative and surgical treatment of infantile hypertrophic pyloric stenosis]. *Helv Chir Acta* 1989;56:15-7.
59. Koike Y, Uchida K, Nakazawa M, Inoue M, Kusunoki M, Tsukamoto Y. Predictive factors of negative outcome in initial atropine therapy for infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Pediatr Int* 2013;55:619-23.
60. Sretenovic A, Smoljanic Z, Korac G, Sindjec S, Lukac M, Krstic Z. [Conservative treatment of hypertrophic pyloric stenosis in children]. *Srp Arh Celok Lek* 2004;132 Suppl 1:93-6.

61. Tan KC, Bianchi A. Circumumbilical incision for pyloromyotomy. *Br J Surg* 1986;73:399.
62. Alain JL, Grousseau D, Terrier G. Extramucosal pyloromyotomy by laparoscopy. *Surg Endosc* 1991;5:174-5.
63. St Peter SD, Holcomb GW, 3rd, Calkins CM, Murphy JP, Andrews WS, Sharp RJ, Snyder CL, Ostlie DJ. Open versus laparoscopic pyloromyotomy for pyloric stenosis: a prospective, randomized trial. *Ann Surg* 2006;244:363-70.
64. Leclair MD, Plattner V, Mirallie E, Lejus C, Nguyen JM, Podevin G, Heloury Y. Laparoscopic pyloromyotomy for hypertrophic pyloric stenosis: a prospective, randomized controlled trial. *J Pediatr Surg* 2007;42:692-8.
65. Ramón y Cajal S. Sur les ganglions et plexus nerveux de l'intestin. *Société de Biologie* 1893;45:217-23.
66. Burns AJ, Lomax AE, Torihashi S, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12008-13.
67. Iino S, Horiguchi K. Interstitial cells of Cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Acta Histochem Cytochem* 2006;39:145-53.
68. Young HM. Embryological origin of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 1999;47:303-8.
69. Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1982;71:1-130.
70. Vanderwinden JM. Role of Interstitial Cells of Cajal and their relationship with the enteric nervous system. *Eur J Morphol* 1999;37:250-6.
71. Barajas-Lopez C, Berezin I, Daniel EE, Huizinga JD. Pacemaker activity recorded in interstitial cells of Cajal of the gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1989;257:C830-5.

72. Takaki M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res* 2003;39:137-61.
73. Garcia-Lopez P, Garcia-Marin V, Martínez-Murillo R, Freire M. Updating old ideas and recent advances regarding the Interstitial Cells of Cajal. *Brain Res Rev* 2009;61:154-69.
74. Christensen J. A commentary on the morphological identification of interstitial cells of Cajal in the gut. *J Auton Nerv Syst* 1992;37:75-88.
75. Hagger R, Gharraie S, Finlayson C, Kumar D. Distribution of the interstitial cells of Cajal in the human anorectum. *J Auton Nerv Syst* 1998;73:75-9.
76. Komuro T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2006;576:653-8.
77. Huizinga JD, Chen JH. Interstitial cells of Cajal: update on basic and clinical science. *Curr Gastroenterol Rep* 2014;16:363.
78. Horiguchi K, Semple GS, Sanders KM, Ward SM. Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum. *J Physiol* 2001;537:237-50.
79. Seki K, Komuro T. Distribution of interstitial cells of Cajal and gap junction protein, Cx 43 in the stomach of wild-type and W/W^v mutant mice. *Anat Embryol (Berl)* 2002;206:57-65.
80. Mitsui R, Komuro T. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of wild-type and Ws/Ws rats. *Anat Embryol (Berl)* 2003;206:453-60.
81. Burns AJ, Herbert TM, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. *Cell Tissue Res* 1997;290:11-20.
82. Rolle U, Piaseczna-Piotrowska A, Puri P. Interstitial cells of Cajal in the normal gut and in intestinal motility disorders of childhood. *Pediatr Surg Int* 2007;23:1139-52.

83. Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995;373:347-9.
84. Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 1994;480:91-7.
85. Koh SD, Jun JY, Kim TW, Sanders KM. A Ca(2+)-inhibited non-selective cation conductance contributes to pacemaker currents in mouse interstitial cell of Cajal. *J Physiol* 2002;540:803-14.
86. Farrugia G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20 Suppl 1:54-63.
87. Beckett EA, Horiguchi K, Khoi M, Sanders KM, Ward SM. Loss of enteric motor neurotransmission in the gastric fundus of SI/SI(d) mice. *J Physiol* 2002;543:871-87.
88. Beckett EA, Takeda Y, Yanase H, Sanders KM, Ward SM. Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *J Comp Neurol* 2005;493:193-206.
89. Farrugia G, Szurszewski JH. Heme oxygenase, carbon monoxide, and interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 1999;47:321-4.
90. Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2004;556:325-36.
91. Thuneberg L, Peters S. Toward a concept of stretch-coupling in smooth muscle. I. Anatomy of intestinal segmentation and sleeve contractions. *Anat Rec* 2001;262:110-24.
92. Strege PR, Ou Y, Sha L, Rich A, Gibbons SJ, Szurszewski JH, Sarr MG, Farrugia G. Sodium current in human intestinal interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1111-21.

93. Won KJ, Sanders KM, Ward SM. Stretch-dependent sensitization of post-junctional neural effectors in colonic muscles. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:e101-13.
94. Ramón y Cajal S. Nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos. Barcelona: Henrich; 1893.
95. Rumessen JJ, Vanderwinden JM. Interstitial cells in the musculature of the gastrointestinal tract: Cajal and beyond. *Int Rev Cytol* 2003;229:115-208.
96. Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 1992;116:369-75.
97. Metzger RP. Immunhistologische und molekularbiologische Untersuchungen zum C-kit-Rezeptor (CD117) im oberen Harntrakt: Universität Leipzig; 2008.
98. Galli SJ. Mast cell deficient mice and rats with mutations of the c-kit protooncogene. *Jpn J Cancer Res* 1993;84:inside front cover.
99. Lammie A, Drobnjak M, Gerald W, Saad A, Cote R, Cordon-Cardo C. Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1994;42:1417-25.
100. Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998;152:1259-69.
101. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-80.
102. Faussone-Pellegrini MS, Thuneberg L. Guide to the identification of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 1999;47:248-66.

103. Yu B, Han J, He YT, Guo S, Li SF, Mei F. Immunohistochemical study of CD44 immunopositive cells in the muscular layers of the gastrointestinal tract in adult guinea pigs and mice. *Acta Histochem* 2009;111:382-90.
104. Torihashi S, Horisawa M, Watanabe Y. c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. *J Auton Nerv Syst* 1999;75:38-50.
105. Mostafa RM, Moustafa YM, Hamdy H. Interstitial cells of Cajal, the Maestro in health and disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:3239-48.
106. Negreanu LM, Assor P, Mateescu B, Cirstoiu C. Interstitial cells of Cajal in the gut--a gastroenterologist's point of view. *World J Gastroenterol* 2008;14:6285-8.
107. Wedel T, Bottner M, Krammer HJ. The enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. Changes in chronic constipation in adults. *Pathologe* 2007;28:143-8.
108. Huizinga JD, Thuneberg L, Vanderwinden JM, Rumessen JJ. Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. *Trends Pharmacol Sci* 1997;18:393-403.
109. Yamataka A, Kato Y, Tibboel D, Murata Y, Sueyoshi N, Fujimoto T, Nishiye H, Miyano T. A lack of intestinal pacemaker (c-kit) in aganglionic bowel of patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1995;30:441-4.
110. Horisawa M, Watanabe Y, Torihashi S. Distribution of c-Kit immunopositive cells in normal human colon and in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1998;33:1209-14.
111. Rumessen JJ. Ultrastructure of interstitial cells of Cajal at the colonic submuscular border in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1996;111:1447-55.
112. Yamataka A, Fujiwara T, Kato Y, Okazaki T, Sunagawa M, Miyano T. Lack of intestinal pacemaker (C-KIT-positive) cells in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *J Pediatr Surg* 1996;31:96-9.

113. Nielsen JP, Haahr P, Haahr J. Infantile hypertrophic pyloric stenosis. Decreasing incidence. Dan Med Bull 2000;47:223-5.
114. Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000. Gesundheitsberichterstattung des Bundes – Statistisches Bundesamt, 2015. (abgerufen am 21.09.2015, von http://www.gbe-bund.de/gbe10/pkg_isgbe5.prc_isgbe.)
115. Sorensen HT, Norgard B, Pedersen L, Larsen H, Johnsen SP. Maternal smoking and risk of hypertrophic infantile pyloric stenosis: 10 year population based cohort study. Bmj 2002;325:1011-2.
116. Bevölkerung nach Bildungsabschluss in Deutschland. Statistische Bundesamt, 2015. (abgerufen am 04.11.2015, von <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/BildungForschungKultur/Bildungsstand/Tabellen/Bildungsabschluss.html>.)
117. Lange S, Probst C, Quere M, Rehm J, Popova S. Alcohol use, smoking and their co-occurrence during pregnancy among Canadian women, 2003 to 2011/12. Addict Behav 2015;50:102-9.
118. Kang HJ, Lee HY, Jin MH, Jeong HJ, Han SW. Decreased interstitial cells of Cajal-like cells, possible cause of congenital refluxing megaureters: Histopathologic differences in refluxing and obstructive megaureters. Urology 2009;74:318-23.
119. Vanderwinden JM, Liu H, Menu R, Conreur JL, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ. The pathology of infantile hypertrophic pyloric stenosis after healing. J Pediatr Surg 1996;31:1530-4.
120. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie – Morbus Hirschsprung. AWMF online, 2010. (abgerufen am 23.11.2015, von http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/006-001I_S1_Morbus_Hirschsprung_Aganglionose_2013-12.pdf.)
121. Parisi MA. Hirschsprung Disease Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., eds. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993.

122. Vanderwinden JM, Rumessen JJ, Liu H, Descamps D, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ. Interstitial cells of Cajal in human colon and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 1996;111:901-10.
123. Taguchi T, Suita S, Masumoto K, Nada O. Universal distribution of c-kit-positive cells in different types of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2003;19:273-9.
124. Taguchi T, Suita S, Masumoto K, Nagasaki A. An abnormal distribution of C-kit positive cells in the normoganglionic segment can predict a poor clinical outcome in patients with Hirschsprung's disease. *Eur J Pediatr Surg* 2005;15:153-8.
125. Gfroerer S, Rolle U. Interstitial cells of Cajal in the normal human gut and in Hirschsprung disease. *Pediatr Surg Int* 2013;29:889-97.
126. McCloskey KD, Gurney AM. Kit positive cells in the guinea pig bladder. *J Urol* 2002;168:832-6.
127. Solari V, Piotrowska AP, Puri P. Altered expression of interstitial cells of Cajal in congenital ureteropelvic junction obstruction. *J Urol* 2003;170:2420-2.
128. Di Benedetto A, Arena S, Nicotina PA, Mucciardi G, Gali A, Magno C. Pacemakers in the upper urinary tract. *Neurourol Urodyn* 2013;32:349-53.
129. Metzger R, Schuster T, Till H, Franke FE, Dietz HG. Cajal-like cells in the upper urinary tract: comparative study in various species. *Pediatr Surg Int* 2005;21:169-74.
130. Metzger R, Schuster T, Till H, Stehr M, Franke FE, Dietz HG. Cajal-like cells in the human upper urinary tract. *J Urol* 2004;172:769-72.
131. Farrugia MK, Hitchcock R, Radford A, Burki T, Robb A, Murphy F. British Association of Paediatric Urologists consensus statement on the management of the primary obstructive megaureter. *J Pediatr Urol* 2014;10:26-33.
132. Pfister RC, Hendren WH. Primary megaureter in children and adults. Clinical and pathophysiologic features of 150 ureters. *Urology* 1978;12:160-76.

133. Osterhage HR. Kontroverse Aspekte zur Genese des Megaureters. *Urologe A* 1985;24:198-201.
134. Alcaraz A, Vinaixa F, Tejedó-Mateu A, Fores MM, Gotzens V, Mestres CA, Oliveira J, Carretero P. Obstruction and recanalization of the ureter during embryonic development. *J Urol* 1991;145:410-6.
135. Dietz HG, Schuster T, Stehr M. Die obstruktive Uropathie – kongenitale Harntransportstörungen. *Monatsschr Kinderheilkd* 2001;149:778-87.
136. Kart Y, Karakus OZ, Ates O, Hakguder G, Olguner M, Akgur FM. Altered expression of interstitial cells of Cajal in primary obstructive megaureter. *J Pediatr Urol* 2013;9:1028-31.
137. Faussonne-Pellegrini MS, Vannucchi MG, Alaggio R, Strojna A, Midrio P. Morphology of the interstitial cells of Cajal of the human ileum from foetal to neonatal life. *J Cell Mol Med* 2007;11:482-94.
138. Mei F, Zhu J, Guo S, Zhou DS, Han J, Yu B, Li SF, Jiang ZY, Xiong CJ. An age-dependent proliferation is involved in the postnatal development of interstitial cells of Cajal in the small intestine of mice. *Histochem Cell Biol* 2009;131:43-53.
139. Radenkovic G, Savic V, Mitic D, Grahovac S, Bjelakovic M, Krstic M. Development of c-kit immunopositive interstitial cells of Cajal in the human stomach. *J Cell Mol Med* 2010;14:1125-34.
140. Aescht E, Büchl-Zimmermann S, Burmester A, Dänhardt-Pfeiffer S, Desel C, Hamers C, Jach G, Kässens M, Makovitzky J, Mulisch M, Romeis B, Nixdorf-Bergweiler B, Pütz D, Riedelsheimer B, Boom F, Wegerhoff R, Welsch U. *Romeis Mikroskopische Technik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
141. Langer JC, Berezin I, Daniel EE. Hypertrophic pyloric stenosis: ultrastructural abnormalities of enteric nerves and the interstitial cells of Cajal. *J Pediatr Surg* 1995;30:1535-43.

142. Froom P, Gross M, Froom J, Margalioth S, Benbassat J. Sensitivity of the high-power field method in detecting red blood cells in the urinary sediment. *Isr J Med Sci* 1987;23:1118-20.
143. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kolzer V, Kondi-Pafiti A, Patsouris ES, Gennatas K, Lugli A. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2013;26:295-301.

Anhang

Anhang 1 – Elterninformation



CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik

Charité | Campus Virchow-Klinikum | 13344 Berlin

**Otto-Heubner-Centrum
Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie**
Direktorin: Prof. Dr. med. Karin Rothe
stellv. Direktorin: OÄ Dr. med. Petra Degenhardt
karin.rothe@charite.de
www.charite.de/kinderchirurgie

Sekretariat: (030) 450 566 111/162
FAX: (030) 450 566 905
Station 27 a: (030) 450 566 345
Station 27 b: (030) 450 566 364
Station 25: (030) 450 566 154
Notfallaufnahme: (030) 450 566 128
Poliklinik: (030) 450 566 385

FB Neugeborenen- und Plastische Chirurgie
Päd. Onkochirurgie, Endokrine Chirurgie
Prof. Dr. Karin Rothe
OÄ Dr. Petra Degenhardt
FB Kindertraumatologie
D-Arzt: Prof. Dr. Karin Rothe
ständ. D-Arzt-Vertr.: OÄ Dr. Petra Degenhardt
FB Päd. Thoraxchirurgie/Thoraxwandfehlbildungen
Prof. Dr. Karin Rothe
FB Kinderurologie
OÄ Dr. Petra Degenhardt
FB Inkontinenz/Obstipation
OÄ Dr. Stefanie Märzheuser
FB Minimal-invasive Chirurgie
OA Dr. Axel Schneider
FB Kinderchirurgische Poliklinik
OA Dr. Axel Schneider
Hr. Siegfried David

Berlin, 01.08.2013

Elterninformation - Eingriff am Magenpförtner

„Studie: Morphologische Untersuchungen der Cajal- Zellen im Pylorus des Magens - ein Beitrag zur Pathogenese der infantilen hypertrophischen Pylorusstenose“

Sehr geehrte Eltern,

wir möchten Sie um Teilnahme an der oben genannten Studie bitten, die sich mit der Untersuchung der Innervation und Innervationsstörungen im Magenpförtner befasst. Bei Ihrem Kind ist ein operativer Eingriff am Magen geplant, bei dem die Muskulatur des Magenausgangs gespreizt werden muss. Im Rahmen dieser Operation kann ohne zusätzliche Risiken, jedoch auch ohne direkten Nutzen für Ihr Kind eine ca. 2 mm durchmessende Gewebeprobe mit einer Dicke von 4-10 mm für die Untersuchung in ausschließlich dieser Studie entnommen werden.

Mit diesem Schreiben bitten wir Sie, Gewebe entnehmen und im Rahmen der oben genannten Studie untersuchen zu dürfen. Zwar findet diese Gewebeentnahme bei dem Eingriff normalerweise nicht statt, jedoch wird der Eingriff hierdurch nicht ausgeweitet und die Operationszeit nur minimal verlängert. Es

CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Gliedkörperschaft der Freien Universität Berlin und der Humboldt-Universität zu Berlin
Augustenburger Platz 1 | 13353 Berlin | Telefon +49 30 450-50 | www.charite.de

entstehen keine zusätzlichen Belastungen für Ihr Kind. Da Ihr Kind durch die Teilnahme an der Studie keinem zusätzlichen gesundheitlichen Risiko ausgesetzt wird, ist eine Versicherung für die Studie nicht erforderlich. Die Gewebeproben werden im Rahmen der Studie an der Charité – Universitätsmedizin Berlin im Institut für vegetative Anatomie mikroskopisch untersucht und gelagert.

Die im Rahmen der Studie erhobenen Daten werden in pseudonymisierter Form gespeichert und ausgewertet. Die Weitergabe der Daten, in denen der Untersuchte nicht namentlich genannt wird, erfolgt ausschließlich zu statistischen und wissenschaftlichen Zwecken innerhalb der Charité – Universitätsmedizin Berlin. In Publikationen, die Ergebnisse dieser Studie enthalten, sind die Daten anonymisiert, sodass kein Rückschluss auf die Person des Untersuchten möglich ist.

Zugang zu den vertraulichen Daten mit Namensnennung haben nur die betreuenden Ärzte. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet.

Sämtliche im Rahmen der Studie entnommenen Gewebe, alle erfassten Daten und personenbezogenen Angaben werden 10 Jahre gelagert bzw. gespeichert und danach vernichtet.

Natürlich kann die Einwilligung jederzeit widerrufen werden, woraufhin alle Daten Ihres Kindes von der Studienleitung gelöscht werden und eventuell bereits entnommenes Probenmaterial vernichtet wird.

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig und aus einer Nichtteilnahme entstehen Ihrem Kind keinerlei Nachteile. Wir wären Ihnen dankbar, wenn Sie sich für eine Teilnahme entscheiden würden. Für weitere Fragen stehen wir Ihnen jederzeit gern zur Verfügung.

Professor Dr. K. Rothe

Direktorin der Klinik / Studienleiterin



CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik

Charité | Campus Virchow-Klinikum | 13344 Berlin

Otto-Heubner-Centrum
Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie
Direktorin: Prof. Dr. med. Karin Rothe
stellv. Direktorin: OÄ Dr. med. Petra Degenhardt
karin.rothe@charite.de
www.charite.de/kinderchirurgie

Sekretariat: (030) 450 566 111/162
FAX: (030) 450 566 905
Station 27 a: (030) 450 566 345
Station 27 b: (030) 450 566 364
Station 25: (030) 450 566 154
Notfallaufnahme: (030) 450 566 128
Poliklinik: (030) 450 566 385

FB Neugeborenen- und Plastische Chirurgie
Päd. Onkochirurgie, Endokrine Chirurgie
Prof. Dr. Karin Rothe
OÄ Dr. Petra Degenhardt
FB Kindertraumatologie
D-Arzt: Prof. Dr. Karin Rothe
ständ. D-Arzt-Vertr.: OÄ Dr. Petra Degenhardt
FB Päd. Thoraxchirurgie/Thoraxwandfehlbildungen
Prof. Dr. Karin Rothe
FB Kinderurologie
OÄ Dr. Petra Degenhardt
FB Inkontinenz/Obstipation
OÄ Dr. Stefanie Märzheuser
FB Minimal-invasive Chirurgie
OÄ Dr. Axel Schneider
FB Kinderchirurgische Poliklinik
OÄ Dr. Axel Schneider
Hr. Siegfried David

Berlin, 01.08.2013

Einverständniserklärung

für zusätzliche Untersuchungen des entnommenen Magengewebes im Rahmen der Studie: „Morphologische Untersuchungen der Cajal- Zellen im Pylorus des Magens - ein Beitrag zur Pathogenese der infantilen hypertrophischen Pylorusstenose“

Hiermit erkläre ich

Name (Erziehungsberechtigter) Vorname (Erziehungsberechtigter) Geburtsdatum
(Erziehungsberechtigter)

Anschrift (für Rückfragen): _____

Telefonnummer für Rückfragen (ggf. Handy): _____

CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Gliedkörperschaft der Freien Universität Berlin und der Humboldt-Universität zu Berlin
Augustenburger Platz 1 | 13353 Berlin | Telefon +49 30 450-50 | www.charite.de

Name (Kind): _____

Vorname (Kind): _____

Geburtsdatum (Kind): _____

Teilnehmercode (Pseudonym, wird von der Studienleitung eingetragen): _____

dass ich durch Herrn/Frau _____
(Name des Studienarztes / der Studienärztin)

mündlich und schriftlich über das Wesen, die Bedeutung und die Risiken der wissenschaftlichen Untersuchungen im Rahmen der o.g. Studie informiert wurde und ausreichend Gelegenheit hatte, meine Fragen mit dem Studienarzt/der Studienärztin zu klären.

Mir wurde verbindlich zugesichert, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen und einer Weiterverarbeitung meiner Daten und Proben widersprechen und ihre Vernichtung verlangen kann.

Ich habe eine Kopie der schriftlichen Studieninformation zu der o.g. Studie mit Versions-Datum 01.08.2013 und der Einwilligungserklärung mit Versions-Datum 01.08.2013 erhalten.

Ich erkläre, dass ich freiwillig bereit bin, an der wissenschaftlichen Studie teilzunehmen.

Ich erkläre mich damit einverstanden,

1. dass meine für den Zweck der o.g. Studie nötigen personenbezogenen Daten durch den Studienarzt erhoben und pseudonymisiert aufgezeichnet und verarbeitet werden, auch auf elektronischen Datenträgern;

2. dass die Studienergebnisse in anonymer Form, die keinen Rückschluss auf meine Person zulässt, veröffentlicht werden;

3. dass das für den Zweck der o.g. Studie entnommene Gewebe pseudonymisiert durch den Studienarzt untersucht und 10 Jahre gelagert werden kann. Nach dieser Zeit wird das entnommene Gewebe vernichtet.

Berlin, den _____ Datum _____ Unterschrift des/der Teilnehmers/in

Berlin, den _____ Datum _____ Unterschrift des gesetzlichen Vertreters (bei Kindern jedes sorgeberechtigten Elternteils) /Betreuers

Hiermit erkläre ich, den/die Teilnehmer/in am über Wesen, Bedeutung und Risiken der o.g. Studie mündlich und schriftlich aufgeklärt, alle Fragen beantwortet und ihm/ihr eine Kopie der Studieninformation und der Einwilligungserklärung übergeben zu haben.

Berlin, den _____ Datum _____ Unterschrift des aufklärenden Studienarztes

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jonas Herzberg, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Veränderungen der Interstitiellen Zellen nach Cajal bei der infantilen hypertrophischen Pylorusstenose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Rothe für die Überlassung dieses interessanten Themas und die gute Betreuung dieser Arbeit. Jederzeit konnte ich mich mit Fragen an sie wenden.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. med. Stoltenburg-Didinger, dass sie mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mich durch alle Schwierigkeiten begleitete.

Weiterhin danke ich dem gesamten Team der Kinderchirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin für die tatkräftige Mithilfe bei der Probengewinnung.

Ohne die dankenswerte Unterstützung von Frau Dr. med. Sarioglu bei der Probengewinnung der Kontrollgruppe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch danke ich dem Team der Paidopathologie und Frau PD Dr. med. Hauptmann für ihre freundliche Mithilfe bei der Probengewinnung und –verarbeitung.

Dankbar bin ich meinen Freunden für ihre beständige Hilfe und Ermutigung in allen Arbeitsphasen.

Abschließend möchte ich besonders meine Eltern hervorheben, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten, mich in meinem Vorhaben bestärkt haben und mir stets helfend zur Seite standen.