

Aus der Abteilung für Pathologie und Neuropathologie der  
Asklepios Klinik Nord – Heidberg  
Hamburg

DISSERTATION

**Neuropathologische Veränderungen in der Duodenalschleimhaut  
bei Kindern mit Zöliakie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Ann-Christin Nehlsen  
aus Hamburg

2010

Gutachter :           1. Prof. Dr. med. J. Gottschalk  
                              2. Priv.-Doz. Dr. med. W. Stenzel  
                              3. Prof. Dr. med. H. Lobeck

Datum der Promotion: 19.11.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Thematische Zielsetzung und Fragestellung.....	5
1.2 Definition der Zöliakie.....	6
1.2.1 Historie.....	6
1.2.2 Epidemiologie.....	7
1.2.3 Ätiologie.....	8
1.2.4 Pathogenese.....	8
1.2.5 Prognose.....	9
1.3 Klinische Symptomatik.....	9
1.4 Diagnostik und Labor.....	10
1.5 Histomorphologie.....	11
1.5.1 Makroskopie (Shmerling).....	12
1.5.2 Mikroskopie (Marsh).....	12
1.6 Neuronale und neuroendokrine morphologische Veränderungen.....	13
1.7 Therapieoptionen und Konsequenzen.....	14

<b>2. Material und Methodik</b> .....	<b>16</b>
2.1 Materialauswahl.....	16
2.2 Die Antikörper.....	17
2.3 Erstellung Immunhistochemischer Präparate.....	20
2.4 Immunhistologische Anwendung der Antikörper.....	23
2.5 Auswertung der Immunhistochemischen Präparate.....	25
2.6 Verwendete Statistische Verfahren.....	27
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
3.1 Synaptophysin.....	29
3.2 Peripherin.....	33
3.3 Protein S-100.....	37
3.4 Chromogranin.....	41
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>51</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>56</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>58</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>67</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Thematische Zielsetzung und Fragestellung

Zunehmend treten Wechselwirkungen von Nervensystem und gastrointestinalen Erkrankungen in den Mittelpunkt des Interesses. Achalasie, intestinale Pseudoobstruktion, Reizdarm und funktionelle Dyspepsie, Polyneuropathien und Morbus Parkinson – sie alle weisen ein Wechselspiel zwischen beiden Organsystemen auf. Führendes gastrointestinales Symptom ist meist eine unterschiedlich stark ausgeprägte Dyspepsie. Aber auch schwere neurologische Komplikationen sind bekannt. Ursachen und Zusammenhänge dieser Neurogastroenterologie sind häufig noch unklar. Dies gilt insbesondere für die Pathogenese. Eine Erkrankung, bei der es im Verlauf nicht selten zu neurologischen Begleiterkrankungen kommen kann, ist die Zöliakie. Obgleich die ursächlichen Faktoren bei der Entstehung der Krankheit relativ gut erforscht sind, gilt dies nicht für die neurologischen Komplikationen (Wills 2000).

Die Zöliakie tritt durch die ständige Erweiterung ihres klinischen Spektrums häufiger auf als bisher angenommen. Oligosymptomatische Formen schließen extraintestinale Manifestationen (Haut, Zentralnervensystem, Knochen) mit ein. Die klassische Form der Zöliakie wird seltener, das Diagnosealter steigt. Durch verstärkte Diagnostik werden immer mehr Patienten mit Zöliakie identifiziert (Stern 2005). Die Korrelation zwischen morphologischen Parametern (Klassifikation nach Marsh) und den wichtigsten serologischen Markern ist zwar schon mehrfach geprüft worden, jedoch sind die Ergebnisse in der Literatur mehrdeutig und unübersichtlich. Nach wie vor ist unklar, wie verlässlich die serologischen Voraussagen wirklich sind und ob damit eine Verlaufskontrolle erfolgen kann.

Neben all den bekannten Fakten der Zöliakie (siehe folgende Kapitel) gibt es bislang kaum morphologische Untersuchungen zu neuronalen und neuroendokrinen Veränderungen in der duodenalen Schleimhaut. Diese könnten aber eine "Triggerfunktion" für eine Vielzahl der bekannten neurologischen Störungen und Komplikationen bei Patienten mit Zöliakie darstellen. Somit ergab sich für die vorliegende Arbeit die Frage:

Lassen sich in der Lamina propria mucosae und den Glandulae intestinales der Duodenalschleimhaut von Patienten mit Zöliakie neuropathologische Veränderungen aufzeigen?

## 1.2 Definition der Zöliakie

Die Gluten-sensitive Enteropathie (Zöliakie) zeichnet sich durch eine charakteristische entzündliche Degeneration der Dünndarmschleimhaut aus. Der damit einhergehende Verlust der Darmzotten führt zu unterschiedlich stark ausgeprägten Mangelerscheinungen, deren Ursache in dem, in vielen Getreideprodukten enthaltenen, Gliadin zu finden ist.

Bei der Autoimmunkrankheit Zöliakie handelt es sich um eine genetische Prädisposition, die mit den Genen HLA-DQ2 und HLA-DQ8 assoziiert ist. Es besteht eine familiäre Häufung.

Die Symptome sind unterschiedlich und oft unspezifisch. Zu den klassischen Symptomen gehören massive Durchfälle, Blähungen, psychiatrische oder neurologische Auffälligkeiten verbunden mit schweren Mangelerscheinungen aufgrund von Malabsorption. Häufig sind auch weniger typische Formen, die mit einer Anämie, Minderwuchs, Osteoporose oder Gelenksbeschwerden einhergehen (Marsh 1992, Schuppan 2001).

### 1.2.1 Historie

Als Erstbeschreiber der Zöliakie wird der römische Arzt Aretaeus von Kappadozien im 2. Jahrhundert nach Christus genannt. Aufgrund der für die Krankheit charakteristischen Fettstühle und Mangelzustände verleiht er ihr den Namen, der von dem griechischen Wort „koliakos“ stammt und übersetzt „den Bauch betreffend“ heißt (Aretaeus 1945, Caspary 1989, Paveley 1988). Das Synonym „Sprue“ leitet sich von dem niederländischen „Sprouw“ ab und heißt Schwamm (Rodeck und Zimmer 2008).

Samuel Gee bemerkt 1888, dass die umschriebene Krankheit in allen Altersklassen vorkommt, aber vor allem Kinder zwischen dem ersten und fünften Lebensjahr betrifft. In seinem ersten Bericht „On the coeliac affection“ äußert Gee bereits die Vermutung, dass es einen Zusammenhang zwischen der Krankheit und bestimmten Nahrungsmitteln gibt (Caspary 1989, Paveley 1988).

Der niederländische Pädiater Willem Karel Dicke weist 1950 in seiner Dissertation auf einen möglichen Zusammenhang zwischen glutenhaltiger Ernährung und dem Auftreten der typischen Zöliakie-Symptome hin. 1953 identifiziert er Gluten (Weizengliadin) als toxisches Agens (Dicke 1950).

Die histologische Diagnostik der Zöliakie wird 1954 von Paulley durch intraoperativ gewonnenes Biopsiematerial erstmals festgehalten, mit der er auf die Zottenatrophie und

Kryptenhyperplasie hinweist (Paulley 1954). 1958 erfolgt mit der Erstbeschreibung der Gliadin-Antikörper durch E. Berger aus Basel die Einführung der serologischen Diagnostik.

Aus den achtziger Jahren datiert die Entdeckung der Endomysium-Antikörper als hochspezifischer serologischer Marker.

Der britische Pathologe Michael N. Marsh stellt 1992 ein histologisch progredientes Fortschreiten in den Dünndarmbiopsien fest. Er teilt die Schleimhautveränderungen in drei Stadien ein (Oberhuber und Caspary 2001, Marsh 1992). Schließlich wird 1997 die Gewebetransglutaminase als entscheidendes Antigen für die Antikörper erkannt.

### **1.2.2 Epidemiologie**

Die Prävalenz der klinisch manifesten Zöliakie reicht von 1:270 in Finnland bis 1:5000 in Nordamerika (Holtmeier und Caspary 2006). Doch wie kommt eine so große Spannweite zustande?

Die Krankheit ist häufiger als angenommen, aber seltener symptomatisch als vermutet. Früher wurde angenommen, dass hauptsächlich kaukasische Kinder mit Gewichtsverlust und Diarrhö von Zöliakie betroffen seien. Durch zunächst ausschließliche Betrachtung der heute selten gewordenen klassischen Leitsymptome (Gedeihstörung, Fettstühle, vorgewölbter Bauch) entstand der Anschein einer recht niedrigen Prävalenz von z.B. 1:5000 in Nordamerika. Doch mit der Entdeckung asymptomatischer Formen der Krankheit kamen groß angelegte Studien in den USA und Europa zu viel höheren Prävalenzen. In den Studien wurden große Kohorten auf Transglutaminase und Endomysium-Antikörper getestet, wobei sich einem positiven Ergebnis eine Dünndarmbiopsie anschloss. Somit wurde eine Prävalenz von 1:100 bis 1:500 ermittelt. Diese Zahlen gelten nahezu weltweit. Nur Chinesen, Japaner und Menschen aus Afrikanisch-Karibischen Ländern sind etwas seltener und Mädchen doppelt so häufig wie Jungen betroffen. Trotzdem ist weiterhin zu vermuten, dass auf einen bekannten Zöliakie-Patienten sieben bis zehn undiagnostizierte kommen. Aufgrund von atypischen, häufig minimalen Symptomen erfolgt die Diagnosestellung bei Erwachsenen oft erst nach 10 Jahren. Zu beachten ist außerdem, dass ca. 10% der Verwandten ersten Grades ebenfalls Zöliakie haben. 70% der an Zöliakie leidenden eineiigen Zwillinge sind gleichfalls betroffen (Bai und Zeballos 2005, Holtmeier und Caspary 2006, Hill und McMillan 2006).

### **1.2.3 Ätiologie**

Für die Genese der Zöliakie sind unter anderem Umwelt- und genetische Faktoren verantwortlich. Das schädigende Umwelt-Agens ist die alkohollösliche Form des Glutens, das Gliadin. Gluten ist ein Bestandteil von Weizen, Dinkel, Roggen, Gerste, Grünkern und Hafer (Deutsche Zöliakie Gesellschaft e.V. 2007). Durch Einbringen von Gluten in das distale Ileum oder Rektum von Zöliakie-Patienten lassen sich innerhalb weniger Stunden morphologische Schleimhautveränderungen feststellen (Binder 2005). Was die genetische Komponente anbelangt exprimieren ca. 95% aller Zöliakie-Patienten auf ihren Leukozyten den HLA-Klasse-2-Locus DQ2, bzw. DQ8. Allerdings werden 20% der gesunden Bevölkerung, die ebenfalls dieses Gen tragen, niemals eine Zöliakie entwickeln. Soweit die Krankheit durch Einhalten einer speziellen Diät beherrschbar bleibt, ist ein genetisches Screening jedoch nicht erforderlich. Nur bei unsicherer Diagnose wäre ein Test in Erwägung zu ziehen, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass ein HLA-DQ2/DQ8 negativer Patient betroffen ist (Holtmeier und Caspary 2006).

### **1.2.4 Pathogenese**

Die mit der Nahrung aufgenommenen Gliadine enthalten besonders viele der Aminosäuren Prolin und Glutamin. Die Gliadinpeptide dienen der in der Darmmukosa vorkommenden Gewebstransglutaminase als Substrat. Die Gewebstransglutaminase, ein bei der Wundheilung essenzielles Enzym, quervernetzt und verändert die Gliadine. Die entstandenen Autoantigene (Gliadin-Transglutaminase-Komplexe) werden vom Immunsystem der Zöliakie-Patienten erkannt und bewirken eine starke Aktivierung der körpereigenen Lymphozyten. Bestimmte Abschnitte der Gliadinpeptide binden an die vermehrt von den Enterozyten gebildeten HLA-DQ2- und HLA-DQ8-Antigene. Dieser Komplex aus Gliadinpeptid und HLA-DQ2-Antigen wird mit Hilfe Antigen präsentierender Zellen den T-Lymphozyten (CD4+-T-Lymphozyten) präsentiert und ruft in diesen eine vermehrte Produktion von verschiedenen Entzündungsmediatoren (Zytokine) hervor. Die TH1-Zytokine führen zu einer Stimulierung intestinaler Fibroblasten, die für die Schleimhautschädigung (Zottenatrophie) verantwortlich sind. Die TH2-Antwort führt zur Reifung von B-Zellen und somit zur Vermehrung von Plasmazellen, die IgA-Antikörper gegen Gliadinpeptide oder Gewebstransglutaminase bilden. Durch die verkleinerte Resorptionsfläche ist die geschädigte Dünndarmschleimhaut nicht mehr

in der Lage, die zugeführte Nahrung in ausreichendem Umfang in die Blutbahn zu überführen. (Holtmeier und Caspary 2006, Schuppan 2001)

### **1.2.5 Prognose**

Patienten mit klinisch manifester Zöliakie haben eine geringere Lebenserwartung. Es besteht eine überdurchschnittliche Sterblichkeit. Die Mortalität sinkt jedoch deutlich mit der Einhaltung einer strengen Diät, die in einem Zeitraum von einer Woche bis hin zu wenigen Monaten zu einer kompletten Remission führen kann. Der Nachteil liegt in der lebenslangen Einhaltung dieser Diät, da es sich bei Zöliakie um eine lebenslange Intoleranz gegenüber Gliadin handelt.

Das Krebsrisiko (ohne Colonkarzinom) ist bei erwachsenen Zöliakiepatienten zwei bis drei Mal höher. Besonders das Non-Hodgkin-Lymphom des Darms ist bis zu fünf Mal häufiger. Eine glutenfreie Diät heilt die Symptome und schützt vor Neoplasien (Rodeck und Zimmer 2008).

### **1.3 Klinische Symptomatik**

Das Auftreten der ersten Zöliakie-Symptome variiert vom ersten Lebensjahr bis hin zur achten Lebensdekade (Binder 2005). Etwa drei Monate nach Beginn der Zufütterung von getreidehaltiger Kost treten die ersten Durchfälle auf. Sie sind übelriechend, voluminös und fettglänzend. Die Kinder imponieren durch einen dicken, vorgewölbten Bauch, magere Extremitäten, Tabaksbeutelgesäß und durch Eisenmangelanämie hervorgerufene Blässe. Im Vergleich zu Gleichaltrigen fällt eine Wachstumsverminderung auf. Die Kinder neigen zu Misslaunigkeit und Stimmungsschwankungen.

Wird nicht rechtzeitig mit einer glutenfreien Diät begonnen, setzt sich die Schleimhautschädigung weiter fort und es kommt zu schweren Mangelzuständen, weil dem Körper lebenswichtige Nährstoffe fehlen. Diese Mangelercheinungen können unter anderem Taubheitsgefühle (Vitamin-B12 und -B1-Mangel), Anämie (Eisen-, Vitamin-B12-Mangel), Nachtblindheit (Vit.-A-Mangel), Blutungsneigung (Vit.-K-Mangel), Knochenschmerzen (Vit.-D-, Calciummangel), Ödeme (Proteinmangel) und Muskelschmerzen (Magnesiummangel) verursachen.

Zöliakie ist außerdem mit diversen extraintestinalen Erkrankungen assoziiert, die nicht mit dem Nährstoffmangel in Verbindung stehen und daher den Untersucher auf eine falsche Fährte führen

können. Zu diesen Krankheiten zählen unter anderem Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, Sjögren-Syndrom, Hashimoto-Thyreoiditis und die Autoimmun-Hepatitis. Des Weiteren sind Dermatitis herpetiformis Duhring, Turner-Syndrom, Down-Syndrom und selektiver IgA-Mangel zu nennen (Holtmeier und Caspary 2006).

Das Spektrum der Zöliakie ist äußerst vielfältig und weicht zunehmend von der oben genannten Beschreibung ab. Es lassen sich verschiedene Ausprägungsformen unterscheiden: Die klinisch manifeste Zöliakie mit ihren typischen gastrointestinalen Symptomen und Zeichen der Malabsorption. Sie zeigt das histologische Bild der Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie (Marsh 3-Läsion).

Die silente oder asymptomatische Zöliakie dagegen wird definiert durch die in vollem Umfang vorliegende zöliakietypische Dünndarmschleimhautläsion mit gleichzeitig minimaler oder zumindest ungewöhnlicher klinischer Symptomatik.

Die latente Zöliakie kennzeichnet sich durch eine normale Dünndarmschleimhaut zum Zeitpunkt der Untersuchung. Durch erhöhte Transglutaminase-Antikörper oder eine Vermehrung der T-Zellen in der Darmmukosa kann jedoch der Nachweis für eine bereits zurückliegende oder noch anstehende Schleimhautläsion erbracht werden. Bei den betroffenen Patienten besteht das Risiko, dass sich die Latenzform ihrer Zöliakie in eine manifeste Form umwandeln kann. Ebenso kann sich aber auch ein manifestes Stadium wieder zurückentwickeln.

#### **1.4 Diagnostik und Labor**

Die Diagnostik beginnt, wie allgemein üblich, mit einer sorgfältigen Anamnese. Führt diese in Kombination mit der anschließenden körperlichen Untersuchung durch die oben genannten Symptome zu dem Verdacht einer Zöliakie, wird eine serologische Diagnostik durchgeführt. Dies geschieht in Form der Antikörperbestimmung.

Die Autoantikörper, bei denen es sich um den Endomysium-Antikörper (abgekürzt: EMA-Ak) bzw. den Gewebstransglutaminase-Antikörper (engl.: tissue transglutaminase, abgekürzt: tTG-Ak) handelt, haben die höchste Spezifität und Sensitivität (>90%). Primär erfolgt die Bestimmung des IgA-Typs. Ein negativer Antikörper-Test kann das Vorliegen einer Zöliakie/Sprue mit relativ großer Sicherheit ausschließen. Da allerdings bis zu 5% der Zöliakie-Patienten einen selektiven IgA-Mangel aufweisen, ist darauf zu achten, immer die

Gesamtkonzentration an Immunglobulin A mit zu bestimmen. Im Fall eines IgA-Mangels ist der IgG-Typ des Antikörpers zu bestimmen, da es sonst zu falsch-negativen Befunden kommt (Rodeck und Zimmer 2008).

Antikörper gegen Gliadin (abgekürzt: IgA/IgG-AGA) waren die ersten Antikörper, die zur Zöliakie-Diagnostik um 1958 verwendet wurden. Ihre Aussagekraft ist allerdings weniger zuverlässig, da sie ebenfalls bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie auch bei völlig Gesunden auftreten können (Deutsche Zöliakie Gesellschaft e.V. 2007).

Auch die Bestimmung der HLA-Klasse kann zur Diagnostik genutzt werden. 95% aller Zöliakie-Patienten exprimieren auf ihren Leukozyten den HLA-Klasse-2-Locus DQ2, bzw. DQ8. 25% aller Menschen tragen diese HLA-Konstellation, von denen ca. 98% eine Toleranz gegen Gliadin entwickeln. Somit sind HLA-DQ2/DQ8 negative Patienten nicht betroffen.

Weiterhin empfiehlt es sich auch Vitamine (z.B. D3, B12), Zink und Eisen zu untersuchen, da diese Werte u. a. Aufschluss über die Auswirkungen der Malabsorption geben können.

Die Bedeutung der Antikörperbestimmung für die Diagnose der Zöliakie/Sprue ist heute sehr hoch. Sie wird vor allem für die Erstdiagnose bei Verdacht auf Zöliakie/Sprue eingesetzt, als Verlaufsuntersuchung unter Diät oder als Screening-Test, um in Familien von Zöliakie/Sprue-Patienten nach möglichen weiteren Betroffenen zu suchen (Holtmeier und Caspary 2006).

## **1.5 Histomorphologie**

Bei Verdacht auf eine Zöliakie/Sprue muss die Diagnose in jedem Fall durch eine endoskopische Biopsie aus dem Duodenum und oberen Jejunum gesichert werden. Bei der Gastroduodenoskopie handelt es sich auch weiterhin um den Goldstandard der Zöliakie-Diagnostik. Der erfahrene Gastroenterologe hegt bereits bei einer matten, also nicht gesund glänzenden, grob gefelderten Schleimhaut, den Verdacht auf eine Zöliakie. Er entnimmt an mehreren Abschnitten in Magen (Pars cardiaca, Corpus ventriculi, Antrum pyloricum), Duodenum und oberen Jejunum mit Hilfe einer Biopsie-Zange Proben aus der Schleimhaut.

### 1.5.1 Makroskopie (Shmerling)

Die entnommenen Schleimhautproben werden im Anschluss an die Gastroduodenoskopie unter einem Lupenmikroskop betrachtet. So kann der Gastroenterologe „makroskopisch“ feststellen, ob die entnommene Schleimhaut noch Darmzotten aufweist oder ob diese bereits atrophiert sind. Dieses Verfahren wurde von dem Pädiater David H. Shmerling eingeführt und erlaubt eine erste Einteilung der Zottenhöhenreduktion.

### 1.5.2 Mikroskopie (Marsh)

Der britische Pathologe Michael N. Marsh klassifizierte die Übergänge der Schleimhautveränderungen. Die verschiedenen Kategorien dienen zur Einteilung des Schweregrades der Schleimhautläsion. Zur Diagnosestellung der Zöliakie/Sprue ist zumindest eine Veränderung der Schleimhaut nach Typ 2 erforderlich.

Die Einteilung erfasst die Anzahl der intraepithelialen Lymphozyten pro 100 Epithelzellen, die Tiefe der Schleimhautkrypten und die Ausprägung der Darmzotten.

Die intraepithelialen Lymphozyten sowie die Tiefe der Krypten nehmen mit steigendem Schweregrad der Schleimhautläsion zu, wohingegen sich die Darmzottengröße zunehmend verkleinert (Oberhuber und Caspary 2001).

Tabelle 1

Modifizierte Marsh-Klassifikation

	<b>Typ 0</b>	<b>Typ 1</b>	<b>Typ 2</b>	<b>Typ 3a</b>	<b>Typ 3b</b>	<b>Typ 3c</b>
<b>IEL*</b>	<b>&lt;40</b>	<b>&gt;40</b>	<b>&gt;40</b>	<b>&gt;40</b>	<b>&gt;40</b>	<b>&gt;40</b>
<b>Krypten</b>	<b>normal</b>	<b>normal</b>	<b>Hyperplasie</b>	<b>Hyperplasie</b>	<b>Hyperplasie</b>	<b>Hyperplasie</b>
<b>Zotten</b>	<b>normal</b>	<b>normal</b>	<b>normal</b>	<b>Leichte/ mäßige Atrophie</b>	<b>Subtotale Atrophie</b>	<b>Totale Atrophie</b>

\* Zahl der intraepithelialen Lymphozyten/100 Epithelzellen

(Tabelle: Oberhuber und Caspary 2001)

## 1.6 Neuronale und neuroendokrine morphologische Veränderungen

Gastrointestinale Entzündungserkrankungen können zu extraintestinalen neurologischen Komplikationen führen. Hierbei können sowohl das Zentralnervensystem als auch das neuromuskuläre System betroffen sein. Neurologische und gastrointestinale Erkrankungen in Korrelation zu setzen ist häufig durch die bereits vorbestehende Darmerkrankung möglich. Bei ausgeprägter neurologischer Symptomatik ohne gastrointestinale Beschwerden ist eine abklärende Diagnostik nicht nur für die korrekte Diagnosestellung, sondern auch für die anschließende Therapie unerlässlich. So kann die Behandlung der Darmerkrankung zu einer Besserung der neurologischen Symptomatik führen.

Im Falle der Zöliakie finden sich nur selten neurologische Manifestationen im Kindesalter. Im Erwachsenenalter wird die Häufigkeit neurologischer Symptome mit ca. 10% angegeben. Wobei eine deutlich erkennbare gastrointestinale Symptomatik meist einige Jahre zurückliegt. Bei der Zöliakie werden die so genannte „Gluten-Ataxie“ und periphere Neuropathien als häufigste neurologische Manifestationen genannt. Weiter sind Fälle von bioptisch gesicherten Zöliakie-Patienten mit fokalem Epilepsiesyndrom, Myoklonus-Ataxien, chronisch progressiver Leukenzephalopathie, Myelopathien oder demenziellem Syndrom beschrieben (Dietrich und Erbguth 2003).

Im Kleinhirn lassen sich lymphozytäre Infiltrate und degenerierte Purkinje-Zellen neuropathologisch nachweisen. Ferner sind im Hirnstammbereich sowie in den Hinter- und Seitensträngen Infiltrationen nachweisbar. Basalganglien oder das limbische System sind eher selten betroffen. Der Darmschleimhautentzündung liegt weniger ein Vitaminmangel als viel mehr eine sowohl humoral- als auch T-Zell-vermittelte Immunantwort zugrunde. Dabei sind Anti-Gliadin-Antikörper und HLA determinierte T-Zellen systemisch nachweisbar. In Studien gelang der Nachweis von Purkinje-Zell-Antikörpern im Serum, die als Anti-Gliadin-Antikörper identifiziert werden konnten (Hadjivassiliou et al. 2002).

Für die Patienten mit neurologischen Symptomen kommt dem Nachweis der Anti-Gliadin-IgA- und -IgG-Antikörper, sowie der Anti-Endomysium-IgA- und natürlich der Transglutaminase-Antikörper eine sehr große Bedeutung zu. Im Kernspintomogramm lassen sich häufig auch bei unspezifischer Symptomatik periventrikuläre T2-hyperintense Herde nachweisen. Im Liquor der

Patienten können entzündliche Liquorsyndrome mit erhöhter Zellzahl und erhöhtem Eiweißgehalt auftreten.

Therapeutisch bessern sich die neurologischen Symptome im Einklang mit der Zöliakie durch Einhalten einer strikt glutenfreien Diät. Besonders für die Gluten-Ataxie und die peripher-neurologischen Komplikationen ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung ausschlaggebend. Je rechtzeitiger die Diagnose gestellt wird, desto besser ist das therapeutische Ansprechen. Ebenso bietet sich beim bioptischen Nachweis einer entzündlichen Veränderung eine immunsuppressive Therapie durch intravenöse oder orale Kortikosteroid- und Immunsuppressivagabe an (Dietrich und Erbguth 2003).

### **1.7 Therapieoptionen und Konsequenzen**

Bislang ist die einzig gesicherte Therapie der Zöliakie eine strikte, lebenslange glutenfreie Diät. Dies bedeutet für die Betroffenen eine radikale Ernährungsumstellung, die aber bereits schon nach wenigen Tagen zu einer Besserung der Symptome und bei Einhalten der Diät normalerweise zu dauerhafter Beschwerdefreiheit führt. Allerdings sprechen nur 90% der Patienten auf eine komplett glutenfreie Diät an. Die übrigen 10% stellen eine heterogene Gruppe dar, die als refraktäre Sprue bezeichnet wird und für die andere Therapieoptionen wie z. B. Glukokortikoide gefunden werden müssen (Binder 2005).

Schon geringste Glutenmengen können zu erneuten Schleimhautschädigungen und damit auch zu Durchfällen und Verschlechterung des Allgemeinbefindens führen. Wie lange es dauert bis die Betroffenen eine völlige Beschwerdefreiheit erlangen, hängt unter anderem vom Grad der vorbestehenden Schleimhautschädigung, dem Alter des Patienten und den anfänglichen Diätfehlern ab. Um diese Fehler möglichst rechtzeitig zu umgehen, gibt die Deutsche Zöliakie Gesellschaft eine regelmäßig aktualisierte Liste von glutenfreien Lebensmitteln und Tipps im Umgang mit der Erkrankung heraus.

Subjektive Beschwerdefreiheit nach versuchsweise wieder eingeführter Gluten enthaltender Nahrung kann trügerisch sein, da die Symptome erst viel später, teilweise nach Jahren, wieder auftreten können. Die Spätfolgen nach Abbruch der Diät können schwere Erkrankungen sein, deren Heilungserfolg dann viel schlechter als gewöhnlich ist. Zöliakie-Patienten haben eine erhöhte Inzidenz sowohl von gastrointestinalen Tumoren und T-Zell-Lymphomen als auch von nicht-gastrointestinalen Neoplasien. Deshalb sollte immer an die Entwicklung eines Lymphoms

gedacht werden, wenn ein Patient trotz eingehaltener Diät plötzlich wieder Symptome entwickelt oder ein neu diagnostizierter Patient nicht auf die Diät anspricht. Insgesamt haben die Betroffenen bei entsprechend eingehaltener Diät eine gute Prognose (Binder 2005, Deutsche Zöliakie-Gesellschaft e.V.2007).

Ist durch einen langen Malabsorptionszustand ein erheblicher Mangel an Vitaminen und Mineralstoffen entstanden, so muss dieser durch parenterale Substitution von fettlöslichen (A, D, E, K) und wasserlöslichen Vitaminen, sowie Calcium, Eisen und Zink ausgeglichen werden. Beim Vollbild der Zöliakie besteht auch fast immer ein Laktasemangel, so dass auch auf Milch und Milchprodukte verzichtet werden muss. Haben sich die Darmzotten wieder regeneriert, werden Milchprodukte wieder vertragen (Caspary und Wehrmann 2005).

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Materialauswahl

Im Rahmen dieser retrospektiven Arbeit wurde das Archiv der Kindertagesklinik der Asklepios Klinik Nord - Heidberg in Hamburg genutzt. Es wurden nur Patientenakten aus dem Zeitraum 2002 - 2005 ausgewertet, die einen histopathologischen Befund der stattgefundenen Ösophago-Gastro-Duodenoskopie, sowie eine Bestimmung des Transglutaminase-, bzw. Gliadin-Wertes enthielten. Die Geburtsjahre der Patienten lagen zwischen 1988 und 2003.

Anhand von erstellten Listen wurden die Patienten in vier verschiedene Gruppen unterteilt: Gruppe 1 beinhaltete die sowohl histologisch als auch serologisch eindeutig gesicherten Zöliakien der Kategorie Marsh 3. In der Gruppe 2 befanden sich die Patienten, bei denen zwar Antikörper nachgewiesen werden konnten, die aber keinerlei histologische Rückschlüsse auf eine Zöliakie zuließen. Gruppe 3 bildeten die Patienten bei denen es sich gerade anders herum verhielt, sie hatten eine negative Serologie, also keine Antikörper, aber eine positive Histologie, die mit einer Zöliakie zu vereinbaren war. Die Gruppe 4 schließlich bildete die Referenzgruppe, sie hatten sowohl eine negative Histologie, als auch eine negative Serologie.

1. Transglutaminase/Gliadin- AK positiv, Biopsie mit Zottenschwund: Zöliakie gesichert

2. Transglutaminase/Gliadin-AK positiv, Biopsie normal: Latente Zöliakie möglich oder Glutenüberempfindlichkeit

3. Transglutaminase/Gliadin-AK negativ, Biopsie mit Zottenschwund: IgA-Mangel möglich oder andere Ursache des Zottenschwunds

4. Transglutaminase/Gliadin-AK negativ, Biopsie normal: Zöliakie ausgeschlossen

Von den 333 ausgewerteten Fällen wurden aus dem Kollektiv der Patienten mit einer gesicherten Zöliakie der Kategorie Marsh 3 a, b oder c, zufällig 20 Patienten ausgewählt. Als Referenzgruppe wurden ebenfalls zufällig, 12 Patienten aus dem Kollektiv der Nicht-Zöliakie-Patienten ausgewählt.

Von all diesen Patienten existieren konservierte Biopsien von bereits durchgeführten Magen-Darm-Spiegelungen. Diese wurden zur erneuten Diagnostik herausgesucht und nach unten beschriebenen Verfahren bearbeitet.

Um die neuronalen und neuroendokrinen morphologischen Veränderungen in der Dünndarmschleimhaut der Zöliakiepatienten im Vergleich zu den Gesunden beurteilen zu können, wurden 6 verschiedene Antikörper verwendet. Bei diesen Antikörpern handelt es sich um Synaptophysin, Peripherin, Protein S-100, Chromogranin A, MAP 2a, b und Neurofilament Protein.

## **2.2 Die Antikörper**

### **Synaptophysin**

Als eines der häufigsten synaptischen Vesikelproteine, weist Synaptophysin mit seinen 38kDa und 4 Transmembrandomänen starke antigene Eigenschaften auf und interagiert mit dem 18kDa schweren SNARE-Protein Synaptobrevin (SNARE = soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor). Es kommt in neuroendokrinen Zellen und praktisch allen Neuronen des Gehirns und Rückenmarks vor, die an synaptischen Interaktionen beteiligt sind. Synaptophysin wird deshalb bereits seit langem als vesikulärer Marker, vor allem für neuroendokrine Tumoren, genutzt. Das Gen für dieses Protein befindet sich auf dem X Chromosom (Xp11.23-p11.22). Seine Funktion ist bisher allerdings nur wenig verstanden (Calakos und Scheller 1994).

### **Peripherin**

Peripherin ist ein Intermediärfilament. Intermediärfilamente bestehen aus Proteinen, die der mechanischen Stabilisierung der Zelle dienen. In Verbindung mit zum Beispiel Desmosomen sind sie für die Zellverknüpfung zuständig. Mit einem Durchmesser von 10 Nanometer bewegen sich die Intermediärfilamente in einer Größenordnung zwischen den Aktinfilamenten (7 nm) und den Mikrotubuli (25 nm). Dies brachte ihnen den Namen ein. Zusammen mit den Mikrotubuli und Aktinfilamenten bilden die Intermediärfilamente das Zytoskelett der Zelle. Gliederfüßer und Pflanzen besitzen keine Intermediärfilamente. Man unterscheidet derzeit fünf Typen von Intermediärfilamenten (saure Keratine, basische Keratine, Desmine, Neurofilamente und

Lamine). Peripherin ist ein Vertreter der Desmine und kommt in peripheren Neuronen, Gliazellen, Astrozyten und Muskelzellen vor. Peripherin hat ein Molekulargewicht von 57 kD (Jastrow 2008).

### **Protein S-100**

Das Protein S-100 wurde 1965 von Moore aus Rinderhirnen extrahiert. Die Namensgebung resultiert aus der Tatsache, dass es bei pH 7 in einer 100%-igen Lösung von Ammoniumsulfat löslich ist. Es handelt sich um ein thermolabiles, Calcium bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 9-13 kDa und einer biologischen Halbwertszeit von circa zwei Stunden. Als Dimer besitzt es zwei isomere Untereinheiten. Die S-100 Proteine werden in den unterschiedlichsten Zelltypen exprimiert. So kommt S-100B in Astrogliazellen im ZNS und in geringerem Umfang auch in den Schwann-Zellen des PNS, in Chondrozyten, Adipozyten sowie Langerhanszellen vor. S-100A macht 5% des ZNS-Gesamtanteils aus, wobei sein Hauptvorkommen allerdings in Melanomzellen liegt. Ihre Hauptfunktionen als „second messenger“ liegen in der Steuerung chemotaktischer Aktivitäten, intrazellulärer Enzymaktivitäten und extrazellulärer apoptotischer Vorgänge.

S-100-Antikörper werden in der Immunhistochemie eingesetzt, um bestimmte Tumorzellen, die typischerweise S-100-positiv sind (z. B. chondroide Tumoren, Gliome, Nervenscheidentumoren, Melanome) von S-100-negativen Tumoren abzugrenzen. Besteht der Verdacht auf eine Hirnschädigung kann die Bestimmung der S-100B-Protein-Konzentration zur neurologischen Diagnostik genutzt werden, da Gliazellen nach einer Hirnschädigung (z. B. Schlaganfall oder Schädelhirntrauma) S-100B-Proteine freisetzen (Schäfer und Heitzmann 1996, Hagemann 2008)

### **Chromogranin A**

Chromogranin A ist ein vesikelassoziiertes saures Protein neuroendokriner Zellen, das an der Bildung, Prozessierung und Exozytose chromaffiner neuroendokriner Vesikel und der Sequestrierung von Hormonen beteiligt ist. Es wurde zuerst in Vesikeln von Adrenalin und Noradrenalin produzierenden Zellen des Nebennierenmarks gefunden. Untersuchungen ergaben, dass Chromogranine als sogenannte Secretogranine zumindest auch an der vesikulären

Speicherung von Peptiden in Neuronen und Hormondrüsen beteiligt sind. Die Bedeutung als sensitiver Tumormarker für Diagnosen und Verlaufskontrollen kommt bei verschiedenen neuroendokrinen Tumoren zum Tragen, da es unter anderem in chromaffinen Zellen der Nebennierenrinde (Phäochromozytom), Karzinoiden, Nebenschilddrüsen, C-Zellen der Schilddrüse (C-Zell-Karzinom), ZNS (Neuroblastom), Lunge (kleinzelliges Bronchialkarzinom) und anderen Geweben vorkommt. Es sind verschiedene Subtypen bekannt. Die Genloci befinden sich auf Chromosom 14, 20 bzw. 2 (Pschyrembel 2004, Lackner 2008).

### **MAP 2a, b Microtubule-Associated Protein**

MAP 2a, b reagiert mit den Dendriten und Zytoplasma neuronaler Zellen, wird aber auch in der Neuroonkologie für die Diagnostik astrozytärer Tumoren eingesetzt (Blümcke et al. 2001). Die Expression von MAP 2a, b ist präzise geregelt während der Hirnentwicklung und Reifung (Riederer et al. 1995). Darüber hinaus wird MAP 2a, b in der Diagnostik des Morbus Hirschsprung zur Darstellung der neuronalen Zellen eingesetzt. Hier sollte untersucht werden, ob auch in der Lamina propria sich nervale Fortsetze darstellen lassen (Savidge et al. 2007, Burtelow und Longace 2009).

### **Neurofilament Protein (70 kDalton)**

Neurofilamente sind Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts und gehören zur Familie der Intermediärfilamente. Im Zytoplasma sind sie mit weiteren Zytoskelettproteinen wie den Mikrotubuli eng verzahnt. Sie treten in 3 Untereinheiten auf (70 kDa, 150-160 kDa und 200 kDa). Antikörper gegen Neurofilamente kommen in der Tumordiagnostik zur Abklärung einer neuronalen Differenzierung zum Einsatz (Schlaefter 1987), aber auch in der Diagnostik degenerativer Hirnerkrankungen sowie bei Abnormitäten des enterischen Nervensystems finden sie Verwendung (Luider et al. 1992). Da sich die Axone gut anfärben, wurde der Antikörper zur Darstellung möglicher nervaler Veränderungen in der Lamina propria eingesetzt.

## 2.3 Erstellung Immunhistochemischer Präparate

### Herstellung und Entparaffinierung von Schnitten für die Immunhistochemie:

Das in Paraffin gebettete Präparat wird im Block am Schlittenmikrotom mit einer Schnittstärke von 2 Mikrometern geschnitten. Mit einer Kantenlänge von 10 x 10 mm wird es auf dem oberen Drittel des Objektträgers platziert und anschließend über Nacht bei ca. 50 Grad im *Memmert* Wärmeofen im Schneiderraum getrocknet.

Es folgt die Entparaffinierung im HE-Färbeautomat *Varistain*:

#### Tabelle 3

#### Vorgehen bei der Entparaffinierung

<b>Lösung</b>	<b>Zeit/Aktion</b>
Xylol	1 min
Xylol	1 min
Xylol	8 min
Xylol	10 min
Xylol	10 min
100% Alkohol	5 min
100% Alkohol	5 min
96% Alkohol	1 min
70% Alkohol	1 min
Tris-Puffer	5 min
Tris-Puffer	5 min

### Vorbereitung der Immunhistologie:

Für die Immunhistologie werden frisch angeschnittene paraffineingebettete Proben verwandt, um eine Denaturierung der Antigene zu vermeiden. Die anzuwendenden Vorbehandlungen der Schnittpräparate zur Blockierung endogener Enzymaktivität, zur Antigenfreilegung (Demaskierung) und die Detektionsverfahren werden für die einzelnen Primärantikörper vom

Produkthersteller vorgegeben und vor der routinemäßigen Anwendung im Labor auf die Gebrauchsfähigkeit überprüft.

### **Demaskierung der Antigene:**

Für bestimmte primäre Antikörper muss vor ihrer Inkubation das zu detektierende Antigen im Präparat freigelegt werden (Demaskierung), um ein eindeutig sichtbares und spezifisches Färbesignal zu erzielen.

### **Antigen-Demaskierung mittels Dampfgeräts:**

Die Objektträger werden in einen Ständer gestellt und mit 180 ml Aqua dest. + 20 ml DAKO-Target Retrieval Solution 10 x Concentrate (ChemMate) im Dampfgerät 30 Min. lang bei 99°C inkubiert. Danach werden die Objektträger im Ständer in einem Behälter ca. 10 min unter fließendem Leitungswasser abgekühlt.

### **Blockierung endogener Peroxidasen:**

Bei der Anwendung von Peroxidase-basierten Detektionsverfahren muss die endogene Peroxidase zur Vermeidung falsch positiver Resultate blockiert werden.

Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgt vor der Inkubation mit dem Primärantikörper, also nach der Dehydrierung der Schnitte oder wenn eine Demaskierung vorgesehen ist, nach der Demaskierung. Der Objektträger wird zwei mal 5 min in Tris-Puffer gespült. Die Schnitte der Zytozentrifugate werden in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% Stammlösung 1:10 verdünnt) in einer Schnurküvette für 10 min inkubiert. Die Schnitte werden in Tris-Puffer zwei mal 2 min gewaschen.

### **Inkubation mit dem Primärantikörper:**

Die Inkubation der Objektträger mit dem Primärantikörper erfolgt im immunhistochemischen Automaten *DakoCytomation Autostainer Plus*. Der Automat wird über PC programmiert, wobei die sichere Zuteilung der Antikörper durch Barcodes auf den Objektträgern gewährleistet ist.

### **Detektion mit dem DAKO ChemMate-Kit:**

Der Primärantikörper muss mit einem Verstärkungs- und Visualisierungssystem detektiert werden. Das System ist zur Detektion von Mäuse- und Kaninchen-Antikörpern (poly- und monoklonal) geeignet. Das Detektionssystem besteht aus einem biotinyliertem Sekundärantikörper, einem Komplex aus Streptavidin und Peroxidase (HRP) und einem DAB + Chromogen. Der Automat arbeitet nach folgendem Programm:

#### Tabelle 4

#### Vorgehen bei der Detektion

<b>Lösung</b>	<b>Zeit/Aktion</b>
Tris-Puffer pH 7,6	5 min
Primär-Antikörper	45 min
Tris-Puffer pH 7,6	5 min
Sekundär-Antikörper	15 min
Tris-Puffer pH 7,6	5 min
HRP-Komplex	15 min
Tris-Puffer pH 7,6	5 min
Tris-Puffer pH 7,6	5 min
Chromogen	8 min
Chromogen	8 min
Tris-Puffer pH 7,6	5 min
Gegenfärbung	5 min (Hämatoxylin DAKO 2020)
Tris-Puffer pH 7,6	5 min

Nach der Bearbeitung im Automaten werden die Objektträger den Racks entnommen. Die Objektträger werden entwässert und mit Eukitt eingedeckt.

## **2.4 Immunhistologische Anwendung der Antikörper**

### **Synaptophysin**

Bei dem Antikörper Synaptophysin handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper. Die Demaskierung erfolgt mittels Dampfgeräts mit anschließender Peroxidase-Blockierung. Die Arbeitslösung ist 1:50 verdünnt und benötigt eine Inkubationszeit von 45 Minuten. Das Detektionsverfahren wird mit dem DAKO ChemMate K5001 durchgeführt.

Bei einer positiven Kontrolle handelt es sich um neuroendokrine Zellen bzw. neuronale Strukturen (Synapsen). Eine negative Kontrolle weist auf Bindegewebe hin.

### **Peripherin**

Bei dem Antikörper Peripherin handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper (IgG2b, clone PJM50). Für das Aufschlussverfahren wird erneut der Dampfgerät verwendet, dem sich eine Peroxidase-Blockierung anschließt. Die Verdünnung der Arbeitslösung beträgt 1:50 und erfordert eine Inkubationszeit von 45 Minuten. Das folgende Detektionsverfahren wird auch hier mit dem DAKO ChemMate K5001 durchgeführt.

Fällt die Kontrolle positiv aus, handelt es sich um periphere Nerven, Ganglienzellen bzw. Neuroblastome. Eine negative Kontrolle ist hinweisend auf Epithel.

### **Protein S-100**

Bei dem Antikörper S-100 handelt es sich um einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper. Es erfolgt eine Demaskierung mittels Dampfgeräts mit anschließender Peroxidase-Blockierung. Die Arbeitslösung besitzt eine Verdünnung von 1:1000, wobei es sich bei dem Diluent (wie auch bei den anderen verwendeten Antikörpern) um das Antikörperverdünnungsmedium DAKO S2022

handelt. Es wird eine Inkubationszeit von 45 Minuten benötigt. Das anschließende Detektionsverfahren wird mit dem DAKO ChemMate Kit K5001 durchgeführt.

Ist die Kontrolle positiv, handelt es sich um Melanozyten bzw. Nerven. Bei einer negativen Kontrolle handelt es sich um Bindegewebe.

### **Chromogranin A**

Der Antikörper Chromogranin A ist ein monoklonaler Maus-Antikörper (IgG2b, kappa, clone DAK-A3). Das Aufschlussverfahren wird auch hier wieder mit Hilfe des Dampfgeräts vollzogen. Es folgt die Peroxidase-Blockierung. Die Arbeitslösung beträgt 1:200 und es wird 45 Minuten inkubiert. Es folgt die Detektion mittels DAKO ChemMate K5001.

Ist die Kontrolle positiv, handelt es sich um Neuroendokrine Zellen. Ist die Kontrolle negativ, weist dies auf Bindegewebe hin.

### **MAP 2a, b**

MAP 2a, b ist ein AB-2 (Clone AP20) der Firma Thermo Scientific und zeigt keine Kreuzreaktion mit MAP1 oder MAP5. Dieser monoklonale Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:200 im Dampfgerät und mittels DAKO ChemMate K 5001 eingesetzt.

Als Kontrollgewebe dient normales Hirngewebe und ein Glioblastom.

### **Neurofilament Protein**

Eingesetzt wird ein monoklonaler Antikörper von der Maus (Clone 2F11) der Firma DakoCytomation. Dieser markiert Neurofilamente der 70 kDalton-Gruppe. Die Arbeitsverdünnung beträgt 1:500 mit Kochen im Dampfgerät. Es erfolgt die Detektion mittels DAKO ChemMate K5001. Als Kontrollgewebe dient Hirngewebe sowie die enteralen Nervenplexi.

## **2.5 Auswertung der Immunhistochemischen Präparate**

### **Synaptophysin:**

Ausgewertet wurden die feinen immunreaktiven Verzweigungen zwischen den Glandulae intestinales nach Jones und Elmes (1982). Da bei den einzelnen Subtypen der Zöliakie und den Normalfällen die Schleimhauthöhe unterschiedlich ist, wurden nur die Räume zwischen den beiden direkt über der Lamina muscularis mucosae liegenden Glandulae berücksichtigt. Die Größe der markierten Nervenfasern wurde semiquantitativ nach einem 3-stufigen Gradingssystem bewertet. Insgesamt wurden jeweils 10 fortlaufende Zwischenfelder pro histologischem Schnitt ausgewertet, bei zusammen 5 Schnitten (insgesamt 50 Zwischenfelder). Markierte Zellen wurden nicht beachtet.

Gradingsschema:

- 0 - keine markierten Fasern oder Spots zwischen den Glandulae intestinales
- 1+ - vereinzelte markierte, wenig verzweigte Fasern. Nicht jeder Zwischenraum markiert
- 2+ - mindestens jeder 2. Zwischenraum wies gut erkennbare Fasern auf
- 3+ - jeder Zwischenraum wies deutlich markierte Fasern auf

**(Siehe Abbildung Nr. 1 im Anhang)**

### **Peripherin:**

Für Peripherin erfolgte die Auswertung prinzipiell wie unter Synaptophysin beschrieben. Die Zahl der markierten Nervenfasern war allerdings geringer als bei Synaptophysin. Dies gilt auch für die Kontrollen. Um Unterschiede deutlich werden zu lassen, wurden die Kriterien für die semiquantitative Messung gegenüber Synaptophysin deshalb geändert und sind nicht vergleichbar

Gradingsschema:

- 0 - keine markierten Fasern oder Spots zwischen den Glandulae intestinales
- 1+ - vereinzelte markierte Nervenfasern in weniger als jedem 3. Zwischenraum
- 2+ - markierte Nervenfasern in jedem 2.-3. Zwischenraum
- 3+ - markierte Nervenfasern in jedem Zwischenraum

**(Siehe Abbildung Nr. 2 im Anhang)**

### **Protein S-100:**

Prinzipiell erfolgte die Auszählung hier wie bei Synaptophysin. Die Auswertung war aber ungleich schwieriger, da sich zahlreiche Zellen des Monozyten-Makrophagensystems und auch andere mesenchymale Zellen zumindest schwach immunreaktiv darstellen ließen, was die Beurteilung gelegentlich problematisch machte. Es wurden deshalb nur eindeutige faserähnliche Strukturen berücksichtigt.

Gradingschema:

- 0 - keine markierten Fasern oder Spots zwischen den Glandulae intestinales
- 1+ - vereinzelte markierte, wenig verzweigte Fasern. Nicht jeder Zwischenraum markiert
- 2+ - mindestens jeder 2. Zwischenraum wies gut erkennbare Fasern auf

**(Siehe Abbildung Nr. 3 im Anhang)**

### **Chromogranin A:**

Dieser Marker diente zur Ermittlung neuroendokriner Zellen in den 3 distalen Glandulae intestinales. Ausgezählt wurden insgesamt 20 Glandulae und die Zahl der markierten Zellen auf 100 Epithelzellen berechnet. Dieser Wert wird durch das Programm, SPSS 14.0, als Dezimalzahl dargestellt. Im Gegensatz zum Synaptophysin und Peripherin stellten sich mit Chromogranin A keine Nervenfasern oder Ganglienzellen der Submukosa da.

**(Siehe Abbildung Nr. 4 im Anhang)**

### **MAP 2a,b:**

Immunhistochemisch stellten sich zwar die Ganglienzellen der Submukosa und ihre Fortsätze gut dar, in der Lamina propria ließen sich allerdings keine auswertbaren Strukturen nachweisen, so dass eine weitere Auswertung unterbleiben musste.

### **Neurofilament Protein (70 kDa):**

Es fanden sich in der Lamina propria nur sehr feine positive Nervenfasern, die sich nicht genau auswerten ließen, so dass auch hier von einer statistischen Auswertung abgesehen wurde. Die Kontrollstrukturen der Submukosa wiesen eine deutliche Markierung auf.

**(Siehe Abbildung Nr. 5 im Anhang)**

### **2.6 Verwendete Statistische Verfahren**

Alle Berechnungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf mit dem Statistikprogramm SPSS 14.0 durchgeführt. Zur Anwendung kam der Exakte Test nach Fisher. Der Exakte Fisher-Test ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in der Kontingenztafel. Er liefert auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate, weswegen er in dieser Studie verwendet wurde. Im Anwendungsgebiet entspricht er dem Chi-Quadrat-Test. Er geht auf den britischen Statistiker Ronald Aylmer Fisher (1890-1962) zurück. Im Falle des Chromogranins A wurde außerdem der T-Test verwendet. Bei dem T-Test werden die Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben verglichen. Der arithmetische Mittelwert eines quantitativen Merkmals ist die Summe aller Daten dividiert durch den Stichprobenumfang. Der Standardfehler des Mittelwertes errechnet sich durch Dividieren der Standardabweichung durch die Quadratwurzel des Stichprobenumfangs. Die Standardabweichung ist die Quadratwurzel aus der Varianz, bei der es sich um ein Streuungsmaß handelt (Berger 2002, Weiß 2007).

### 3. Ergebnisse

Berechnet wurde die Signifikanz des Vorkommens der verwendeten Antikörper in der Duodenalschleimhaut von Zöliakie-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne Zöliakie. Es wurden 20 Fälle, bei denen eine Zöliakie diagnostiziert wurde, und 12 Kontrollen, bei denen eine Zöliakie ausgeschlossen wurde, ausgewertet. Die Angaben erfolgen der Anschaulichkeit halber in Prozent, obwohl keine 100 Probanden betrachtet wurden.

Die Auswertung wurde unter Berücksichtigung der Geschlechterverteilung vorgenommen (Überblick siehe 3.1), wobei für jeden Antikörper zunächst das Gesamtkollektiv der Fälle und Kontrollen betrachtet wurde und anschließend eine Einzelanalyse für weibliche und männliche Probanden erfolgte.

Nach der Auflistung der Zöliakie-Fälle und Nicht-Zöliakie-Kontrollen erfolgt die Darstellung von Anteil und Anzahl der Fälle und Kontrollen in Bezug auf den jeweiligen Antikörper. Dem schließt sich die Berechnung des Fisher-Tests an.

Im Falle des Chromogranins A konnte neben dem exakten Test nach Fisher auch ein T-Test durchgeführt werden da hier absolute Werte vorliegen mit denen die Bildung eines Mittelwertes möglich war. Bei der Einteilung der anderen Antikörper handelt es sich um Kategorien.

#### Fallgruppenszusammensetzung

Tabelle 5

Anzahl und Anteil der Fälle und Kontrollen bezogen auf das Geschlecht

**Geschlecht \* Fall/Kontrolle Kreuztabelle**

			Fall/Kontrolle		Gesamt
			Kontrolle	Fall	
Geschlecht	männlich	Anzahl	5	9	14
		% von Geschlecht	35,7%	64,3%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	41,7%	45,0%	43,8%
		% der Gesamtzahl	15,6%	28,1%	43,8%
	weiblich	Anzahl	7	11	18
		% von Geschlecht	38,9%	61,1%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	58,3%	55,0%	56,3%
		% der Gesamtzahl	21,9%	34,4%	56,3%
Gesamt		Anzahl	12	20	32
		% von Geschlecht	37,5%	62,5%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	100,0%	100,0%	100,0%
		% der Gesamtzahl	37,5%	62,5%	100,0%

Die Tabelle 5 zeigt die Aufteilung der Fälle und Kontrollen im Verhältnis zum Geschlecht. Von den 32 Personen gehören 20 zur Fallgruppe und 12 zur Kontrollgruppe. Von den 20 Fällen sind 9 männlich und 11 weiblich. Von den 12 Kontrollen sind 5 männlich und 7 weiblich. Somit sind insgesamt 14 männliche und 18 weibliche Personen untersucht worden.

Der weibliche Anteil beträgt 55% der Fälle, 58 % der Kontrollen und insgesamt 56 %. Der männliche Anteil beträgt somit 45 % der Fälle, 42 % der Kontrollen und insgesamt 44 %.

Der größte Anteil der männlichen und weiblichen Personen liegt bei den Fällen mit 64 beziehungsweise 61%.

### **3.1 Synaptophysin**

Die Präparate waren durchweg gut auswertbar. Es gab kaum Artefakte. Auch die endokrinen Zellen der Glandulae intestinales stellten sich gut dar. Ein gleichfalls gutes Ergebnis ergab sich für die Ganglienzellen des Plexus submucosus (Meissnerscher Plexus) und die Nervenfasern. Eine quantitative Auswertung der Ganglienzellzahl erfolgte nicht. In der Lamina propria wurden die Glandulae teilweise fast vollständig von Synaptophysin-positiven Fasern umgeben. Auch eine gelegentliche Kommunikation mit den enterochromaffinen endokrinen Zellen war festzustellen. Die entzündlichen Infiltrate bei den Zöliakie-Fällen schienen den Verlauf der markierten Fasern nicht zu beeinflussen.

Bei der semiquantitativen Auswertung der Synaptophysin-positiven Fasern ergaben sich zwischen Zöliakie-Fällen (1,90) und Kontrollen (2,08) keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6

Fälle und Kontrollen in Bezug auf mit Synaptophysin markierten Fasern mit zugehörigen Mittelwerten

<b>Zöliakie-Fälle Nr.</b>	<b>Synaptophysin</b>	<b>Kontrollen Nr.</b>	<b>Synaptophysin</b>
06403/04	2+	09880/05	3+
13034/03	2+	08086/04	2+
05052/05	2+	04319/03	2+
14590/04	2+	09512/02	2+
16129/02	2+	08941/04	2+
10788/03	2+	20430/04	2+
12714/03	1+	18082/02	2+
12344/04	2+	03930/04	2+
12352/04	2+	05905/04	2+
20875/04	2+	12078/02	2+
17662/04	2+	04630/03	2+
06702/04	2+	14598/04	2+
01294/05	2+		
03936/04	2+		2,08
09709/05	2+		
05632/02	1+		
00573/05	2+		
07903/02	2+		
08612/03	2+		
20305/04	2+		
	1,9		

*Tab.6 1+ - vereinzelte markierte, wenig verzweigte Fasern. Nicht jeder Zwischenraum markiert*

*2+ - mindestens jeder 2. Zwischenraum wies gut erkennbare Fasern auf*

*3+ - jeder Zwischenraum ließ deutlich markierte Fasern au*

Tabelle 7

Anzahl und Anteil der Fälle und Kontrollen in Bezug auf mit Synaptophysin markierten Fasern

			Fall/Kontrolle		Gesamt
			Kontrolle	Fall	
Synaptophysin	vereinzelte markierte, wenig verzweigte Fasern; nicht jeder Zwischenraum markiert	Anzahl	0	2	2
		% von Synaptophysin	,0%	100,0%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	,0%	10,0%	6,3%
	mindestens jeder 2. Zwischenraum wies gut erkennbare Fasern auf	Anzahl	11	18	29
		% von Synaptophysin	37,9%	62,1%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	91,7%	90,0%	90,6%
	jeder Zwischenraum wies deutlich markierte Fasern auf	Anzahl	1	0	1
		% von Synaptophysin	100,0%	,0%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	8,3%	,0%	3,1%
Gesamt	Anzahl	12	20	32	
	% von Synaptophysin	37,5%	62,5%	100,0%	
	% von Fall/Kontrolle	100,0%	100,0%	100,0%	

Die Tabelle 7 zeigt die Aufteilung der Fälle und Kontrollen in Bezug zu mit Synaptophysin markierten Fasern in der Duodenalschleimhaut. 11 Personen der Kontrollgruppe weisen in mindestens jedem 2. Zwischenraum gut erkennbare Fasern auf. Eine Person weist in jedem Zwischenraum deutliche erkennbare Fasern auf.

2 Personen der Fallgruppe haben vereinzelte markierte, wenig verzweigte Fasern, wobei nicht jeder Zwischenraum markiert ist. 18 Personen weisen in mindestens jedem 2. Zwischenraum gut erkennbare Fasern auf.

Der Großteil der Kontrollen und der Fälle weist in mindestens jedem 2. Zwischenraum gut erkennbare Fasern auf.

Das Ergebnis des exakten Tests nach Fisher ist weder mit beiden Geschlechtern zusammen noch bei beiden Geschlechtern einzeln signifikant. Beide Geschlechter gemeinsam betrachtet haben einen P-Wert von 0,29 (siehe Tabelle 8), die weiblichen Personen haben einen P-Wert von 0,64 (siehe Tabelle 9) und die männlichen Personen haben einen P-Wert von 1,0 (siehe Tabelle 10).

Tabelle 8

Exakter Test nach Fisher der Fälle und Kontrollen für Synaptophysin

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>Exakte Signifikanz (2-seitig)</b>	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,869 <sup>a</sup>	2	,23824	,28629	
Likelihood-Quotient	3,844	2	,14632	,28629	
<b>Exakter Test nach Fisher</b>	2,383			<b>,28629</b>	
Zusammenhang linear-mit-linear	2,632 <sup>b</sup>	1	,10471	,24194	,15323
Anzahl der gültigen Fälle	32				

a. 4 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,38.

b. Die standardisierte Statistik ist -1,622.

*Tab. 8 Zu berücksichtigen ist nur der exakte Test nach Fisher*

Tabelle 9

Exakter Test nach Fisher der weiblichen Fälle und Kontrollen für Synaptophysin

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>Exakte Signifikanz (2-seitig)</b>	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,221 <sup>a</sup>	2	,32943	,64052	
Likelihood-Quotient	2,887	2	,23611	,64052	
<b>Exakter Test nach Fisher</b>	2,075			<b>,64052</b>	
Zusammenhang linear-mit-linear	1,987 <sup>b</sup>	1	,15865	,50327	,25163
Anzahl der gültigen Fälle	18				

a. 4 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,39.

b. Die standardisierte Statistik ist -1,410.

*Tab. 9 Zu berücksichtigen ist nur der exakte Test nach Fisher*

## Tabelle 10

### Exakter Test nach Fisher der männlichen Fälle und Kontrollen für Synaptophysin

#### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>Exakte Signifikanz (2-seitig)</b>	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,598 <sup>b</sup>	1	,43923	1,00000	,64286
Kontinuitätskorrektur <sup>a</sup>	,000	1	1,00000		
Likelihood-Quotient	,926	1	,33592	1,00000	,64286
<b>Exakter Test nach Fisher</b>				<b>1,00000</b>	,64286
Zusammenhang linear-mit-linear	,556 <sup>c</sup>	1	,45606	1,00000	,64286
Anzahl der gültigen Fälle	14				

a. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

b. 3 Zellen (75,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,36.

c. Die standardisierte Statistik ist -,745.

*Tab. 10 Zu berücksichtigen ist nur der exakte Test nach Fisher*

## 3.2 Peripherin

Die Zahl der Peripherin-positiven Nervenfasern ist geringer als bei Synaptophysin. Dies gilt auch für die Submucosa, während die Ganglienzellen in dieser Region ähnlich wie mit Synaptophysin markiert sind. Eine quantitative Auswertung erfolgte nicht. Zellen der Glandulae intestinales waren an keiner Stelle markiert (dies gilt auch für die endokrinen Zellen). Im Gegensatz zu Synaptophysin fand sich bei den Zöliakie-Fällen (1,2) ein signifikanter Abfall gegenüber den Kontrollen (2,33) (siehe Tabelle 11). In einem Präparat (Zöliakiefall) fand sich eine ektope Ganglienzelle in der Lamina propria.

Tabelle 11

Fälle und Kontrollen in Bezug auf mit Peripherin markierte Fasern mit zugehörigen Mittelwerten

<b>Zöliakie-Fälle</b>	<b>Peripherin</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>Peripherin</b>
<b>Nr.</b>		<b>Nr.</b>	
06403/04	1+	09880/05	2+
13034/03	1+	08086/04	2+
05052/05	2+	04319/03	2+
14590/04	1+	09512/02	3+
16129/02	1+	08941/04	2+
10788/03	1+	20430/04	3+
12714/03	2+	18082/02	3+
12344/04	2+	03930/04	2+
12352/04	1+	05905/04	1+
20875/04	1+	12078/02	2+
17662/04	2+	04630/03	2+
06702/04	1+	14598/04	3+
01294/05	1+		
03936/04	1+		2,33
09709/05	1+		
05632/02	1+		
00573/05	1+		
07903/02	1+		
08612/03	1+		
20305/04	1+		
	1,2		

*Tab. 11 1+ - vereinzelte markierte Nervenfasern in weniger als jedem 3. Zwischenraum*

*2+ - markierte Nervenfasern in jedem 2.-3. Zwischenraum*

*3+ - markierte Nervenfasern in jedem Zwischenraum*

Tabelle 12

Anzahl und Anteil der Fälle und Kontrollen in Bezug auf mit Peripherin markierte Fasern

**Peripherin \* Fall/Kontrolle Kreuztabelle**

			Fall/Kontrolle		Gesamt
			Kontrolle	Fall	
Peripherin	vereinzelte markierte Nervenfasern in weniger als jedem 3. Zwischenraum	Anzahl	1	16	17
		% von Peripherin	5,9%	94,1%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	8,3%	80,0%	53,1%
	markierte Nervenfasern in jedem 2.-3. Zwischenraum	Anzahl	7	4	11
		% von Peripherin	63,6%	36,4%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	58,3%	20,0%	34,4%
	markierte Nervenfasern in jedem Zwischenraum	Anzahl	4	0	4
		% von Peripherin	100,0%	,0%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	33,3%	,0%	12,5%
Gesamt	Anzahl	12	20	32	
	% von Peripherin	37,5%	62,5%	100,0%	
	% von Fall/Kontrolle	100,0%	100,0%	100,0%	

Die Tabelle 12 zeigt die Aufteilung der Fälle und Kontrollen in Bezug zu mit Peripherin markierten Fasern in der Duodenalschleimhaut. Eine Person der Kontrollgruppe hat vereinzelte markierte Nervenfasern in weniger als jedem 3. Zwischenraum, 7 Personen haben markierte Nervenfasern in jedem 2-3 Zwischenraum, 4 haben markierte Nervenfasern in jedem Zwischenraum.

16 Personen der Fallgruppe haben vereinzelte markierte Nervenfasern in weniger als jedem 3. Zwischenraum, 4 haben markierte Nervenfasern in jedem 2-3 Zwischenraum.

Der Großteil der Kontrollen hat somit markierte Nervenfasern in jedem 2-3 Zwischenraum, wobei nur einer vereinzelte markierte Nervenfasern in weniger als jedem 3. Zwischenraum aufweist.

Der größte Anteil der Fälle hat nur vereinzelte markierte Nervenfasern in weniger als jedem 3. Zwischenraum und keiner hat markierte Nervenfasern in jedem Zwischenraum.

Um dies als zufällige Verteilung zu widerlegen wird erneut der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Dieser ergibt ein signifikantes Ergebnis bei der gemeinsamen Auswertung von männlichen und weiblichen Personen ( $p < 0,0005$ ) (siehe Tabelle 13), sowie bei der alleinigen

Auswertung der weiblichen Personen ( $p=0,001$ ) (siehe Tabelle 14), jedoch keine Signifikanz bei den männlichen Personen allein ( $p=0,091$ ) (siehe Tabellen 15).

Tabelle 13

Exakter Test nach Fisher der Fälle und Kontrollen für Peripherin

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>Exakte Signifikanz (2-seitig)</b>	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	17,124 <sup>a</sup>	2	,00019	,00004	
Likelihood-Quotient	20,313	2	,00004	,00006	
<b>Exakter Test nach Fisher</b>	17,280			<b>,00006</b>	
Zusammenhang linear-mit-linear	16,307 <sup>b</sup>	1	,00005	,00003	,00003
Anzahl der gültigen Fälle	32				

a. 3 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,50.

b. Die standardisierte Statistik ist -4,038.

*Tab. 13 Zu berücksichtigen ist nur der exakte Test nach Fisher*

Tabelle 14

Exakter Test nach Fisher der weiblichen Fälle und Kontrollen für Peripherin

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>Exakte Signifikanz (2-seitig)</b>	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	12,951 <sup>a</sup>	2	,00154	,00050	
Likelihood-Quotient	17,327	2	,00017	,00050	
<b>Exakter Test nach Fisher</b>	13,026			<b>,00050</b>	
Zusammenhang linear-mit-linear	12,094 <sup>b</sup>	1	,00051	,00031	,00031
Anzahl der gültigen Fälle	18				

a. 5 Zellen (83,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,56.

b. Die standardisierte Statistik ist -3,478.

*Tab. 14 Zu berücksichtigen ist nur der exakte Test nach Fisher*

Tabelle 15

Exakter Test nach Fisher der männlichen Fälle und Kontrollen für Peripherin

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>Exakte Signifikanz (2-seitig)</b>	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	4,381 <sup>b</sup>	1	,03633	,09091	,06294
Kontinuitätskorrektur <sup>a</sup>	2,340	1	,12610		
Likelihood-Quotient	4,583	1	,03230	,09091	,06294
<b>Exakter Test nach Fisher</b>				<b>,09091</b>	,06294
Zusammenhang linear-mit-linear	4,069 <sup>c</sup>	1	,04369	,09091	,06294
Anzahl der gültigen Fälle	14				

a. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

b. 3 Zellen (75,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,14.

c. Die standardisierte Statistik ist -2,017.

*Tab. 15 Zu berücksichtigen ist nur der exakte Test nach Fisher*

### **3.3 Protein S-100**

Wie bereits unter "Material und Methoden" beschrieben, erwies sich die Auswertung der Protein S-100-positiven Nervenfasern als etwas schwieriger, da zahlreiche Zellen des Epithels sowie der Lamina propria positiv waren. Nach einem Übungstraining gelang die separate Trennung jedoch recht gut. In Zweifelsfällen wurden weitere Differenzierungsmarker (CD 68, CD 3, Aktin usw.) zur Abgrenzung eingesetzt. Bei der semiquantitativen Auswertung ergab sich eine leichte Reduzierung der Protein S-100 - positiven Fasern bei den Zöliakie-Patienten (1,3) gegenüber den Kontrollen (1,75) (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16

Fälle und Kontrollen in Bezug auf mit Protein S-100 markierten Fasern mit zugehörigen Mittelwerten

<b>Zöliakie-Fälle Nr.</b>	<b>Protein S-100</b>	<b>Kontrollen Nr.</b>	<b>Protein S-100</b>
06403/04	1+	09880/05	2+
13034/03	1+	08086/04	2+
05052/05	2+	04319/03	2+
14590/04	1+	09512/02	2+
16129/02	1+	08941/04	1+
10788/03	2+	20430/04	2+
12714/03	1+	18082/02	1+
12344/04	1+	03930/04	2+
12352/04	1+	05905/04	2+
20875/04	2+	12078/02	2+
17662/04	2+	04630/03	2+
06702/04	1+	14598/04	1+
01294/05	1+		
03936/04	1+		1,75
09709/05	2+		
05632/02	1+		
00573/05	2+		
07903/02	1+		
08612/03	1+		
20305/04	1+		
	1,3		

*Tab. 16 1+ - vereinzelte markierte, wenig verzweigte Fasern. Nicht jeder Zwischenraum markiert*

*2+ - mindestens jeder 2. Zwischenraum wies gut erkennbare Fasern auf*

Tabelle 17

Anzahl und Anteil der Fälle und Kontrollen in Bezug auf mit Protein S-100 markierten Fasern

**S-100 \* Fall/Kontrolle Kreuztabelle**

			Fall/Kontrolle		Gesamt
			Kontrolle	Fall	
S-100	vereinzelte markierte, wenig verzweigte Fasern. Nicht jeder Zwischenraum markiert	Anzahl	3	14	17
		% von S-100	17,6%	82,4%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	25,0%	70,0%	53,1%
	mindestens jeder 2. Zwischenraum wies gut erkennbare Fasern auf	Anzahl	9	6	15
		% von S-100	60,0%	40,0%	100,0%
		% von Fall/Kontrolle	75,0%	30,0%	46,9%
Gesamt	Anzahl	12	20	32	
	% von S-100	37,5%	62,5%	100,0%	
	% von Fall/Kontrolle	100,0%	100,0%	100,0%	

Die Tabelle 17 zeigt die Aufteilung der Fälle und Kontrollen in Bezug zu mit Protein S-100 markierten Fasern in der Duodenalschleimhaut. 3 Personen der Kontrollgruppe haben vereinzelt markierte, wenig verzweigte Fasern, wobei nicht jeder Zwischenraum markiert ist. 9 Personen weisen in mindestens jedem 2. Zwischenraum gut erkennbare Fasern auf.

14 Personen der Fallgruppe haben vereinzelt markierte, wenig verzweigte Fasern, wobei nicht jeder Zwischenraum markiert ist. 6 Personen weisen in mindestens jedem 2. Zwischenraum gut erkennbare Fasern auf.

Der Großteil der Kontrollen weist in mindestens jedem 2. Zwischenraum gut erkennbare Fasern auf.

Der größte Anteil der Fälle hat vereinzelt markierte, wenig verzweigte Fasern, wobei nicht jeder Zwischenraum markiert ist.

Um dies als zufällige Verteilung zu widerlegen wird erneut der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Dieser ergibt ein signifikantes Ergebnis bei der gemeinsamen Auswertung von männlichen und weiblichen Personen ( $p=0,027$ ) (siehe Tabelle 18), sowie bei der alleinigen Auswertung der männlichen Personen ( $p=0,031$ ) (siehe Tabelle 20), jedoch keine Signifikanz bei den weiblichen Personen ( $p= 0,33$ ) (siehe Tabelle 19).

Tabelle 18

Exakter Test nach Fisher der Fälle und Kontrollen für Protein S-100

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>Exakte Signifikanz (2-seitig)</b>	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	6,099 <sup>b</sup>	1	,01353	,02688	,01699
Kontinuitätskorrektur <sup>a</sup>	4,426	1	,03540		
Likelihood-Quotient	6,306	1	,01203	,02688	,01699
<b>Exakter Test nach Fisher</b>				<b>,02688</b>	,01699
Zusammenhang linear-mit-linear	5,908 <sup>c</sup>	1	,01507	,02688	,01699
Anzahl der gültigen Fälle	32				

a. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

b. 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 5,63.

c. Die standardisierte Statistik ist -2,431.

*Tab. 18 Zu berücksichtigen ist nur der exakte Test nach Fisher*

Tabelle 19

Exakter Test nach Fisher der weiblichen Fälle und Kontrollen für Protein S-100

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>Exakte Signifikanz (2-seitig)</b>	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	1,606 <sup>b</sup>	1	,20505	,33220	,22021
Kontinuitätskorrektur <sup>a</sup>	,595	1	,44048		
Likelihood-Quotient	1,605	1	,20516	,33220	,22021
<b>Exakter Test nach Fisher</b>				<b>,33220</b>	,22021
Zusammenhang linear-mit-linear	1,517 <sup>c</sup>	1	,21811	,33220	,22021
Anzahl der gültigen Fälle	18				

a. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

b. 3 Zellen (75,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,72.

c. Die standardisierte Statistik ist -1,232.

*Tab. 19 Zu berücksichtigen ist nur der exakte Test nach Fisher*