

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus der
Klinik für Kinderchirurgie

Direktor: (emeritus) Prof. Dr. med. Wolfgang Lambrecht

**Die Morphologie des Enterischen Nervensystems bei
der Dünndarmatresie: Untersuchungen an einem
Tiermodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christina Oetzmann v. Sochaczweski
aus Frankfurt am Main

Hamburg 2011

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.12.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. D. Kluth

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof Dr. T. Strate

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof Dr. G. Rune

Diese Arbeit wurde durch ein zweijähriges Werner-Otto-Stipendium
zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses in der Medizin
an der Universität Hamburg unterstützt.

Meiner Großmutter

Publikationsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	11
1.1 Entwicklung der Fragestellung	11
1.2 Überblick über Aufbau und Gliederung der Arbeit	12
1.3 Einführung in die Ätiologie kongenitaler Dünndarmatresien	13
1.4 Intestinale Atresien und Stenosen	14
1.4.1 Historie	14
1.4.2 Epidemiologie	15
1.4.3 Klassifikation	16
1.5 Der Dünndarm beim Menschen	19
1.6 Der Dünndarm beim Huhn	20
1.7 Das enterische Nervensystem (ENS)	22
1.8 Die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC)	24
2 Materialien	25
2.1 Mikrochirurgische Instrumente	25
2.2 Laborgeräte	25
2.3 Verbrauchsmaterialien	26
2.4 Chemikalien	26
3 Methoden	29
3.1 Operative Technik	29
3.2 Versuchsaufbau	33
3.3 Aufarbeitung der Gewebeproben	34
4 Ergebnisse	42
4.1 Makroskopie	45
4.1.1 Atresieformen	45
4.1.2 Kinetik der Atresieentwicklung: Makroskopie	46

4.1.3	Kinetik der Atresieentwicklung: Acetylcholinesterase (AChE)	47
4.1.4	Kinetik der Atresieentwicklung: Versilberungsmethode nach Späthe	51
4.1.5	Semidünnschnitttechnik	54
4.1.6	Transmissionselektronenmikroskopie	56
4.2	Regenerationsfähigkeit des enterischen Nervensystems	65
4.2.1	Regenerationsfähigkeit des ENS: Makroskopie	65
4.2.2	Regenerationsfähigkeit des ENS: Acetylcholinesterase	66
4.2.3	Regenerationsfähigkeit des ENS: Versilberung nach Späthe	67
4.2.4	Regenerationsfähigkeit des ENS: Elektronenmikroskopie	68
5	Diskussion	70
5.1	Modell Hühnerembryo	70
5.2	Makroskopische Befunde	71
5.3	Wahl der histologischen Techniken	72
5.3.1	Acetylcholinesterasefärbung	74
5.3.2	Versilberungstechnik nach Späthe	75
5.3.3	Semidünnschnitttechnik und Transmissionselektronenmikroskopie	75
5.4	Mikroskopische Befunde	76
6	Zusammenfassung	87
7	Referenzen	88
	Dank	98
	Lebenslauf	99
	Eidesstattliche Versicherung	100

Publikationsverzeichnis

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits an anderen Orten publiziert.

Kongressbeiträge

CHRISTINA OETZMANN V. SOCHACZEWSKI, HENNING FIEGEL, UDO ROLLE, HOLGER TILL, DIETRICH KLUTH. Secondary changes of gut morphology in experimental intestinal atresia: Are these changes reversible after fetal intervention? International Symposium on Paediatric Surgical Research. Leipzig, Oktober 2008.

CHRISTINA OETZMANN V. SOCHACZEWSKI, HENNING FIEGEL, ROMAN METZGER, HOLGER TILL, DIETRICH KLUTH. Secondary changes of the Enteric Nervous System in experimental intestinal atresia: an electron microscopy study. European Congress of Paediatric Surgery and British Association of Paediatric Surgery. Graz, Juni 2009.

CHRISTINA OETZMANN V. SOCHACZEWSKI, HOLGER TILL, DIETRICH KLUTH. Das Enterische Nervensystem am Modell der Dünndarmatresie im Hühnerembryo: Morphologie und Reversibilität der Veränderungen. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderchirurgie 106. Potsdam, September 2010.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Übersicht bekannter Atresieformen	18
Abbildung 2	Schematischer Aufbau des Intestinaltraktes beim Huhn	21
Abbildung 3	Schematischer Darmwandaufbau mit Lokalisation des ENS	23
Abbildung 4	Schematische Darstellung: Hühnerembryo	30
Abbildung 5	Operationsgebiet nach Eröffnen der Amnionhöhle	31
Abbildung 6	Fotodokumentation der Ligaturinduktion	31
Abbildung 7	Schematischer Versuchsaufbau	33
Abbildung 8	Gewebeprobenentnahme schematisch	34
Abbildung 9	Gewebeprobenentnahme fotodokumentiert	34
Abbildung 10	Einteilung des Atresietypen nach Bland und Sutton	45
Abbildung 11	Makroskopie, Atresieentwicklung im zeitlichen Verlauf	46
Abbildung 12	Kontrollserie AChE-Färbung Darmquerschnitte	47
Abbildung 13	Kinetik AChE- Färbung V1 Tag 12–15	48
Abbildung 14	Kinetik AChE- Färbung V1 Tag 16–19	49
Abbildung 15	Proximal der Atresie Tag 19, AChE-Färbung	50
Abbildung 16	Kontrollserie Versilberung nach Späthe	51
Abbildung 17	Kinetik V1 Versilberung Tag 12–15	52
Abbildung 18	Kinetik V1 Versilberung Tag 16–19	53
Abbildung 19	Kontrollschnitt Semidünnschnitttechnik	54
Abbildung 20	Kinetik V1 Semidünnschnitttechnik, Tag 12 proximal/distal Tag 15	55
Abbildung 21	Übersichtsaufnahme Semidünnschnitt Kontrolle Tag 19, PM und PS	56
Abbildung 22	Aufbau Plexus myentericus; Kontrolle Tag 19	57
Abbildung 23	Kontrolle Plexus myentericus Tag 15	58
Abbildung 24	Kontrolle Plexus submucosus Tag 15	59
Abbildung 25	Kinetik V1 Tag 12, Plexus myentericus proximal	60
Abbildung 26	Kinetik V1 Plexus myentericus Tag 12 distal	61
Abbildung 27	Kinetik V1, Plexus myentericus Tag 19 proximal	62
Abbildung 28	Kinetik V1, Plexus myentericus Tag 19 distal	64
Abbildung 29	Fotodokumentation der Größenverhältnisse proximal/distal	65
Abbildung 30	Regenerationsfähigkeit AChE- Färbung V2 Tag 15–19	66
Abbildung 31	Regenerationsfähigkeit Versilberung V2 Tag 15- 19	67
Abbildung 32	Plexus myentericus Tag 19 proximal nach Ligaturentfernung	68
Abbildung 33	Plexus myentericus Tag 19 distal nach Ligaturentfernung	69
Abbildung 34	Schematischer Querschnitt der Darmwand mit ENS-Komponenten	73
Abbildung 35	Darmwandgrößenverhältnisse, makroskopisch, V2	78
Abbildung 36	Darmwandgrößenverhältnisse Tag 19, V2	79
Abbildung 37	AChE: Gegenüberstellung ausgesuchter Zeitpunkte	81
Abbildung 38	Versilberung Kontrolle Tag 19, Axonnetzwerkverbindungen	82
Abbildung 39	Versilberung: Gegenüberstellung ausgesuchter Zeitpunkte	83
Abbildung 40	Plexus myentericus Tag 19, Elektronenmikroskopie	84
Abbildung 41	Plexus myentericus Tag 19, Kontrolle	84
Abbildung 42	Elektronenmikroskopie: Gegenüberstellung ausgesuchter Zeitpunkte	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Häufigkeitsverteilung von Atresien im Intestinaltrakt	15
Tabelle 2	Anzahl verwendeter Versuchstiere und Angaben zur Letalität	43
Tabelle 3	Häufigkeitsverteilung der Atresietypen	72
Tabelle 4	Übersicht über die verwendeten Färbetechniken	73

Abkürzungsverzeichnis

ENS	Enterisches Nervensystem
PS	Plexus submucosus
PM	Plexus myentericus
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
EM	Elektronenmikroskopie
ICC	Interstitial Cells of Cajal
AChE	Acetylcholinesterase
Ach	Acetylcholin
rER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
ED	Embryonal Day
V1	Versuchsreihe 1
V2	Versuchsreihe 2
V3	Versuchsreihe 3
ICC	Interstitielle Zellen nach Cajal
IND	Intestinale Neuronale Dysplasie
ATP	Adenosinriphosphat
VIP	Vasointestinales Polypeptid
NO	Nitritoxid

1 Einleitung

1.1 Entwicklung der Fragestellung

Fortschritte in der pränatalen Diagnostik sowie der intra- und postoperativen Therapie neugeborener Kinder haben auch bei Dünndarmatresien dazu geführt, dass die mit der Korrektur verbundenen Probleme heute wesentlich seltener zu ernststen Komplikationen führen. Standen in der Vergangenheit nach der Korrektur intestinaler Atresien Anastomosekomplikationen mit einer Letalität von 80 % (Thomas and Carter 1974) im Vordergrund, sind heute Motilitätsstörungen des Dünndarmes die Hauptursache postoperativer Probleme.

Überwiegend wird davon ausgegangen, dass diese die Folge von Entwicklungsstörungen im enterischen Nervensystem (ENS) darstellen, die auch im Rahmen inflammatorischer, infektiöser, metabolischer oder neurologischer Erkrankungen sekundär bedingt sein können (De Giorgio and Camilleri 2004); (Di Lorenzo 1999); (Kapur 2001).

Kürzlich durchgeführte tierexperimentelle Studien zur intestinalen Atresie ergaben morphologisch nachweisbare Änderungen im Bereich nervaler Strukturen (Nachweis von hypoplastischen Nervenzellen im Plexus submucosus (PS) und/oder Plexus myentericus (PM), vollständiger Verlust von Ganglienzellen im Magen-Darm-Trakt) (Schoenberg and Kluth 2002); (Parisi Salvi et al. 2004). Morphologische Änderungen des ENS fanden sich auch bei Untersuchungen an Gewebeproben, die während Korrekturoperationen bei Dünndarmatresien an Neugeborenen gewonnen wurden (Masumoto et al. 1999).

Es erscheint einleuchtend, diese Veränderungen des ENS mit den beobachteten Motilitätsstörungen in Verbindung zu bringen, da die neuronalen Strukturen im PS und insbesondere im PM für eine geregelte Darmperistaltik verantwortlich sind.

Während in früheren Arbeiten (Schoenberg und Kluth 2002) die resultierenden Änderungen im ENS bei sehr alten Feten untersucht worden waren, fehlen bisher Untersuchungen zur Entwicklungsdynamik der ENS-Veränderungen.

Über die morphologischen Veränderungen im zeitlichen Verlauf sind keine Details bekannt (Berger et al. 1998). Ebenfalls ist unbekannt, ob eine Unterbrechung dieses Prozesses zu einer Regeneration des ENS führen kann.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, sekundäre Veränderungen des ENS, die sich während der Entstehung einer Dünndarmatresie einstellen, morphologisch zu beschreiben. Das ENS soll außerdem auf eine mögliche Regenerationsfähigkeit hin, nach Unterbrechung der eingesetzten pathologischen Veränderungen, überprüft werden. Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

Wie wirkt sich die Induktion einer Darmligatur am Hühnerembryo während der Fetalzeit auf die Entwicklung des ENS aus?

Welche genauen morphologischen Veränderungen werden im ENS nach der Induktion der Obstruktion bis hin zur Ausbildung der Atresie im zeitlichen Verlauf beobachtet? Sind diese Veränderungen reversibel, wenn die Prozesse zur Atresieentwicklung hin unterbrochen werden?

1.2 Überblick über Aufbau und Gliederung der Arbeit

Zur Beantwortung der oben genannten Fragen wurde ein von Schoenberg und Kluth etabliertes Tiermodell verwendet. Die Arbeit untergliedert sich in folgende Abschnitte:

a) Im ersten experimentellen Teil werden die pathologischen Veränderungen des ENS in der Darmwand im zeitlichen Verlauf am Modell des Hühnerembryos beschrieben. Durch einen mikrochirurgischen Eingriff am Entwicklungstag 11 wird beim Hühnerembryo die Entstehung einer Dünndarmatresie induziert. Im Verlauf kommt es zunächst zu einer Dilatation des proximalen Segments. Im weiteren Verlauf bilden sich Dünndarmatresien in ihren verschiedensten Formen aus, welche makroskopisch den humanen Darmatresien ähneln.

Mithilfe von immunhistochemischen und histochemischen Nachweismethoden wurden die pathologischen Veränderungen im dilatierten proximalen Segment dem distalen, normo- bis hypotrophen Segment im zeitlichen Verlauf gegenübergestellt.

Zusätzlich werden transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen durchgeführt, um morphologische Veränderungen des ENS auf zellulärer Ebene nachzuweisen.

b) Im zweiten experimentellen Teil wird aufbauend auf den zuvor erhobenen Daten überprüft, ob das Lösen der Ligatur in ovo nach Fortsetzen der Bebrütung eine Rückbildung der pathologischen Verhältnisse im ENS zur Folge hat.

1.3 Einführung in die Ätiologie kongenitaler Dünndarmatresien

1) Okkussionstheorie

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts galt die Hypothese, dass es im Rahmen der normalen Dünndarmentwicklung zu einem vorübergehenden Lumenverschluss (physiologischer Darmverschluss) durch epitheliale Okklusion kommt. Bildet sich diese im weiteren Verlauf aufgrund einer fehlerhaften Rekanalisierung nicht zurück, soll dies zur Entstehung einer Atresie führen (Tandler 1900).

2) Atresie infolge „fetaler Katastrophen“

Heute wird überwiegend angenommen, dass es im Rahmen der Fetalentwicklung zu mesenterialen Perfusionsstörungen kommt, die sekundär zur Atresie führen. Ursachen sind Invaginationen, Volvulus, Inkarzerierungen oder Obstruktion (Spriggs 1912); (Davis and Poynter 1922).

3) Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der Dünndarmatresie

Experimentelle Belege, die diese Hypothese stärkten, erbrachten Louw und Barnard (Louw and Barnard 1955) erstmalig durch Versuche an Hundefeten. Barnard gelang es, durch eine Ligatur von Mesenterialgefäßen in utero Dünndarmatresien zu erzeugen (Louw 1952). Dabei wurde gezeigt, dass devaskularisierte, sterile Darmsegmente sich entweder in fibröse Stränge umwandeln oder völlig verschwinden (Louw and Barnard 1955).

Aktuell besteht die Vorstellung, dass membranöse Atresien (z. B. im Duodenum, aber auch im restlichen Dünndarm) am ehesten die Folge einer Okklusion durch pathologische Proliferation des Darmepithels sind.

Im Gegensatz dazu wird für die klassische Dünndarmatresie im Bereich des Jejunum und Ileum eine vaskuläre Störung während der Fetalzeit als pathogenetische Ursache angenommen (Barnard and Louw 1956). Atresien des Duodenums sind häufiger mit anderen Fehlbildungen und bekannten genetischen Defekten, wie zum Beispiel der

Trisomie 21, vergesellschaftet als die des Jejunums oder des Ileums (Safra, Oakley and Erickson 1976).

1.4 Intestinale Atresien und Stenosen

Im folgenden Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die Morphologie, Epidemiologie und Klassifikation der Dünndarmatresien erfolgen.

1.4.1 Historie

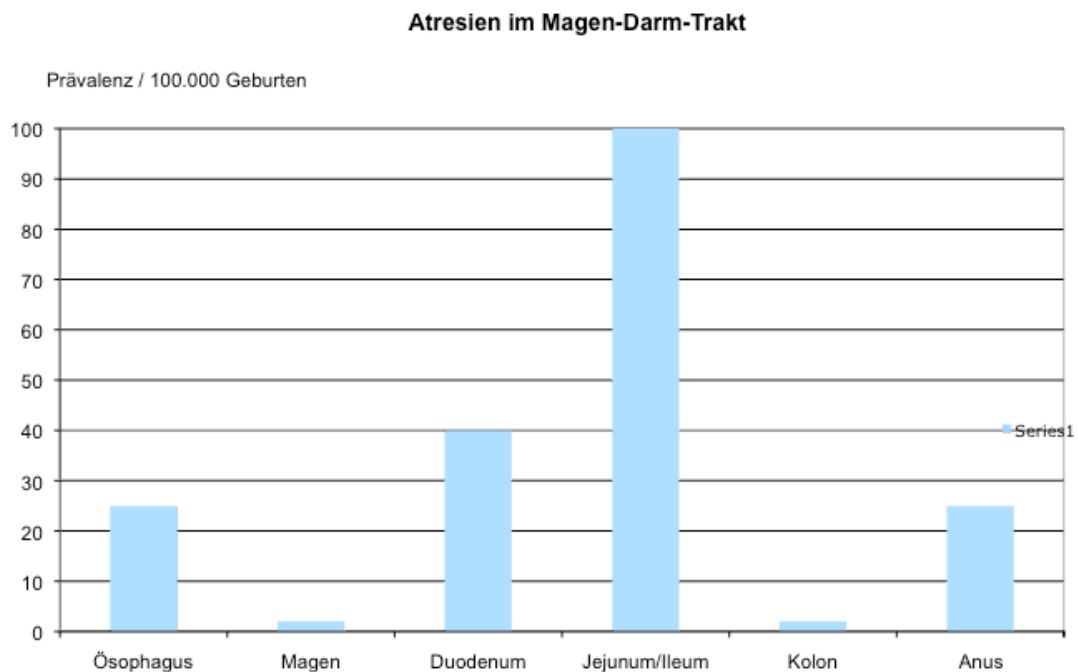
Die erste Beschreibung einer Ileumatresie stammt von Goelle (Goelle 1683) und wurde 1683 in „abortus humani monstrosi“ als Sektionsbefund publiziert. Erst im Jahre 1889 diagnostizierten Bland und Sutton bereits präoperativ eine Ileumatresie und versuchten den Patienten durch eine Operation zu retten. Der Versuch blieb erfolglos. 1911 operierte Fockens erstmals erfolgreich eine Dünndarmatresie; sein Patient konnte später über 40 Jahre verfolgt werden (Weisschedel 1953). Der erste Fall einer erfolgreich operierten Kolonatresie wurde 1947 von Potts (Potts 1947) beschrieben.

Bis in die frühen 50er-Jahre waren die Resultate bei operierten Kindern mit Atresien und Stenosen distal des Ligaments von Treitz äußerst schlecht. So überlebten zum Beispiel von 52 Patienten des Boston Children Hospital bis 1941 nur neun Kinder (Evans 1951). Nachdem Nixon 1971 (Nixon and Tawes 1971a) auf die pathophysiologische Bedeutung des proximalen dilatierten, meist funktionslosen Darmabschnittes und die Notwendigkeit von dessen ausgedehnter Resektion hingewiesen hatte, waren in den nächsten Jahren allgemein bessere Operationsresultate und höhere Überlebensraten zu verzeichnen (DeLorimier, Fonkalsrud and Hays 1969); (Halsband and Rehbein 1969); (Handelsman, Abrams and Corry 1963); (Louw 1967).

1.4.2 Epidemiologie

Die Angaben zur Häufigkeit angeborener intestinaler Atresien schwanken in der Literatur zum Teil beträchtlich. Sie treten zurzeit in Mitteleuropa mit einer Frequenz von 1 : 1500 bis 7000 bei Neugeborenen auf. Eine Studie aus den USA, Atlanta/Georgia (Cragan et al. 1993); (Safera et al. 1976) spricht von 2,8 auf 10.000 Lebendgeburten. Bei der weißen Bevölkerung beträgt das Verhältnis 2,4 auf 10.000, bei der afroamerikanischen Bevölkerung hingegen 3,7 Dünndarmatresien auf 10.000 Lebendgeburten.

Hier ein Überblick über die Verteilung der Atresien im Intestinaltrakt:



Ashcraft KW (edt), Pediatric Surgery (2006)

Tabelle 1. Häufigkeitsverteilung von Atresien im Intestinaltrakt; Louw 1966, Kapstadt

1.4.3 Klassifikation

Kongenitale Defekte der Darmkontinuität werden morphologisch in Stenosen oder Atresien eingeteilt und sind eine der häufigsten Ursachen für neonatale Obstruktion (Cywes, Davies and Rode 1980); (Louw 1952); (Irving and Rickham 1978); (Grosfeld 1986)). Die erstmalig von Bland und Sutton 1889 (Bland-Sutton 1889) vorgestellte Einteilung der Dünndarmatresien in drei Typen wurde von verschiedenen Autoren mehrfach geändert (Grosfeld and Rescorla 1979); (Lister and Rickham 1978); (Martin and Zerella 1976), welche sich hinsichtlich ihrer Prognose und therapeutischen Intervention stark voneinander unterscheiden (Bland-Sutton 1889); (Louw 1959).

In Anlehnung an die von Bland und Sutton beschriebenen Typen wurde die noch heute gebräuchlichste Klassifikation um die Kategorie Typ IIIb, dem Apple-Peel-Erscheinungsbild, sowie Typ IV, dem Auftreten multipler Atresien, erweitert (Grosfeld and Rescorla 1979); (Santulli and Blanc 1961).

Die am weitesten proximal gelegene Atresie determiniert, ob es sich um eine jejunale oder ileale Atresie handelt. Multipel atretische Darmabschnitte finden sich in 6 bis 21 % der Fälle (Cywes et al. 1980); (Louw 1952); (DeLorimier et al. 1969). In den meisten Fällen handelt es sich jedoch um einzeln betroffene Darmabschnitte.

Stenosen

Stenosen sind definiert als eine lokalisierte Einengung des intestinalen Lumens, ohne die Darmkontinuität zu unterbrechen. Das Mesenterium ist intakt. Mikroskopisch zeigt sich häufig im eingengten Anteil eine irreguläre Tunica muscularis mit verdickter Tela submucosa. Stenosen können makroskopisch nicht von der Atresie Typ I unterschieden werden. Nach Fenestrierung der Darmwand wird bei der Form der Atresie Typ I eine Membran sichtbar, die zu einer Unterbrechung der Darmkontinuität führt. Bei der Stenose ist dies nicht der Fall. Die Länge des Dünndarms ist nicht beeinträchtigt.

Atresie Typ I

Hier ist die Darmkontinuität erhalten, die Passage durch ein oder mehrere hintereinanderliegende, quergestellte Diaphragmen unterbrochen. Der Darmwandaufbau ist regelgerecht. Die Membran wird durch die Tunica mucosa und Tela submucosa

gebildet. Auch bei dieser Form ist das Mesenterium intakt, und die Darmlänge ist nicht verkürzt.

Atresie Typ II

Zwei blinde Darmenden werden durch ein fibröses Band bei intaktem Mesenterium verbunden. Der proximale Darmabschnitt ist immer dilatiert und hypertrophiert über mehrere Zentimeter Länge. Er erscheint häufig zyanotisch, bedingt durch den dort vorherrschenden erhöhten intraluminalen Druck. Die Länge des Darmes ist meist nicht beeinträchtigt.

Atresie Typ IIIa

Hier erscheinen zwei blinde Enden, ähnlich wie beim Typ II, die jedoch nicht an der Unterbrechungsstelle miteinander verbunden sind. Das Mesenterium weist hier einen keilförmigen Einschnitt auf, welcher in unterschiedlichen Größen vorkommt (Bland-Sutton 1889); (Davies et al. 1982). Der dilatierte proximale Darmanteil ist meistens atonisch, und häufiger kommt es hier zu einer Torsion oder durch den erhöhten Druck sekundär zu Nekrosen und Perforation. Die Darmlänge variiert, abhängig von der intrauterinen Absorption des komprimierten Darmes. Die zystische Fibrose ist oft mit dieser Form assoziiert.

Atresie Typ IIIb

Diese Form der Atresie, auch Apple-Peel (Santulli and Blanc 1961), Christmas Tree (Weitzman and Vanderhoof 1966) oder Maypole deformity (Nixon and Tawes 1971b) genannt, liegt im Jejunum nahe des Treitz-Bandes. Pathognomonisch ist das Fehlen der Arteria mesenterica superior. Es kommt zu einem signifikanten Längenverlust des Darmes und einem großen Defekt im Mesenterium. Der Dünndarm liegt frei im Abdomen und dreht sich dabei helixartig um eine perfundierte Vene, welche aus der rechten Kolonarkade gespeist wird.

Atresie Typ IV

Bei dieser Form handelt es sich um multiple atretisch veränderte Dünndarmsegmente, welche aus einer Kombination aus Typ I und III bestehen.

Für die klinische Prognose und letztendlich die Mortalität spielt das in der postoperativen Phase häufig einhergehende Kurzdarmsyndrom eine bedeutende Rolle. (Mishalany and Kaloustian 1971); (Blyth and Dickson 1969).

Die folgende Abbildung zeigt eine Übersicht der beschriebenen Atresietypen :

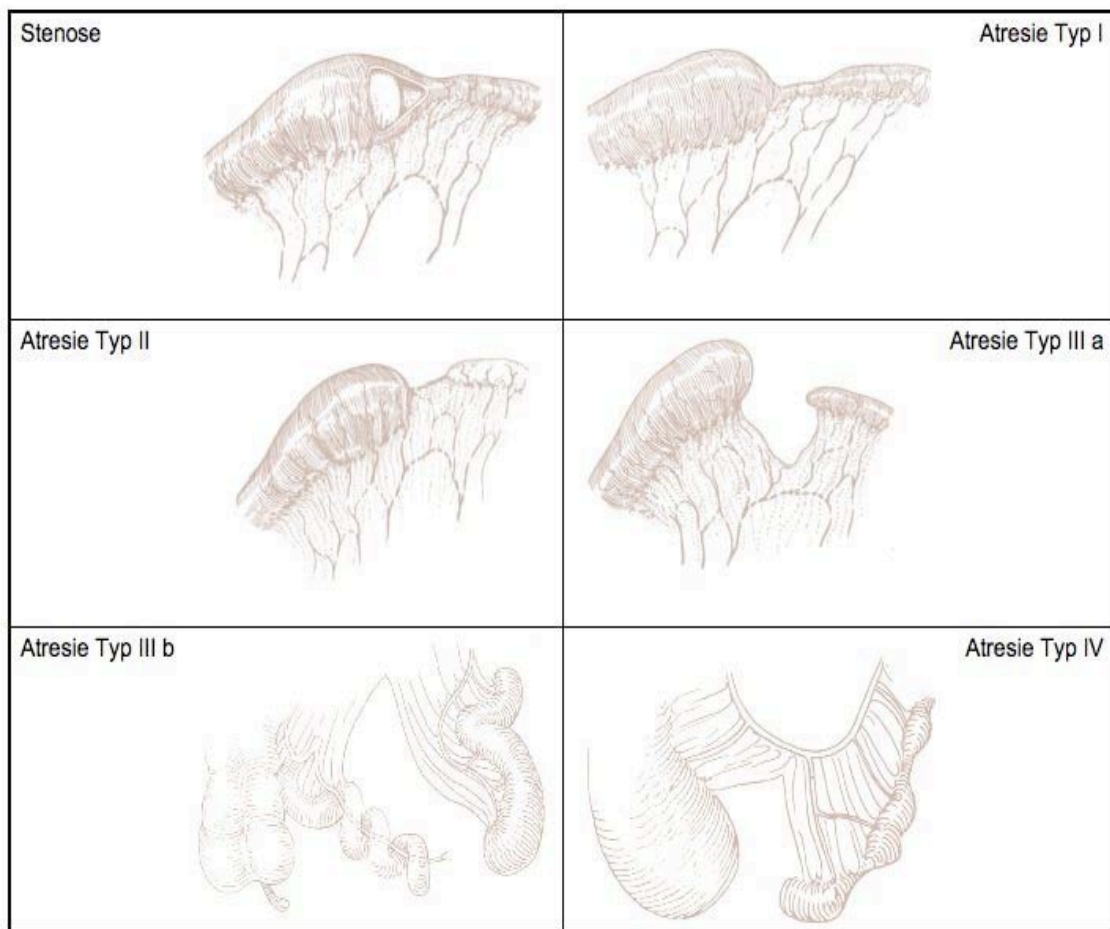


Abbildung 1. Schematische Übersicht bekannter Atresieformen (modifiziert nach Schweinitz and Ure 2009)

Der Verdauungstrakt beim Menschen und beim Huhn, makroskopisch und mikroskopisch:

1.5 Der Dünndarm beim Menschen

Der insgesamt etwa sechs Meter lange, vielfach gewundene Dünndarm setzt sich aus drei Abschnitten zusammen: Duodenum, Jejunum und Ileum.

Der erste Abschnitt, das Duodenum, misst bei Erwachsenen ca. 25 cm, liegt weitgehend retroperitoneal und verläuft um den Pankreaskopf, wo es in der Papilla Vateri den Gallen- und den Pankreasgang (Ductus pancreaticus Wirsungiani) aufnimmt. Das Jejunum schließt sich an das Duodenum an und geht übergangslos ins Ileum über, welches mit der Ileocöcalklappe den Dünndarm abschließt. In das Ileum mündet während der Embryonalzeit der Ductus omphaloentericus, der eine Verbindung zwischen Dottersack und Darm darstellt (Fleischhauer und Drenckhahn 1994).

Der Dünndarm liegt in gefalteten Schlingen im zentralen Teil der Bauchhöhle und ist, bis auf Teile des Duodenums, mit einem Mesenterium an der hinteren Bauchwand aufgehängt. An drei Seiten wird er vom Kolon eingerahmt. Das Mesenterium ist eine fächerartig ausgebreitete Gewebeschicht, die den Dünndarm mit Blutgefäßen versorgt und ihm ausreichend Bewegungsfreiheit in der Bauchhöhle ermöglicht.

Im Dünndarm gelangen Nährstoffe über Epithelgewebe, das Körperober- und Innenflächen bedeckt, in den Organismus. Die Venen des Dünndarms führen ebenso wie die meisten Magen- und Dickdarmvenen nicht direkt zum Herzen, sondern münden in der Pfortader. Diese transportiert das nährstoffreiche Blut in das Lebergewebe, und von dort aus gelangt es zurück in den Blutkreislauf. Die Hauptaufgabe ist die Resorption von über die Nahrung aufgenommenen Substanzen und Wasser.

Der Dünndarm wird mit arteriellem Blut aus der Arteria mesenterica superior versorgt. Hiervon zweigt die Arteria ileocolica ab, die sich weiter in Arteria cecalis anterior und posterior sowie Arteria appendicularis und verschiedene Eingeweidearterien aufteilt, die Ileum und Jejunum versorgen (Arteriae ileales und Arteriae jejunales).

Jejunum und Ileum sind von Omentum majus überzogen, über das sie mit Nerven, Blut- und Lymphgefäßen in Verbindung stehen.

Die Darmwand hat einen vierschichtigen Aufbau, mit Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis und Tunica serosa/Adventitia.

Die Tunica mucosa besteht aus drei Blättern, der Lamina epithelialis, der Lamina propria und der Lamina muscularis mucosae. Die Tunica muscularis hat zwei Blätter, eine innere Ring- und eine äußere Längsmuskelschicht.

1.6 Der Dünndarm beim Huhn

Das Huhn (*Gallus gallus domesticus*) gehört zur Klasse der Vögel und verfügt über einen im Vergleich zu den Säugetieren zu unterscheidenden Verdauungstrakt.

Der Magen wird in drei anatomisch unterschiedliche Strukturen eingeteilt: Kropf, Drüsen- und Muskelmagen. Da Vögel einen sehr hohen Stoffwechsel haben, benötigen sie eine kontinuierliche Energiezufuhr. Im Kropf wird die aufgenommene Nahrung zwischengelagert, sodass die harten Körner eingeweicht werden, um dann leichter gemahlen und verdaut werden zu können. Der Kropf steuert ebenfalls die Entleerung der Nahrung in den Magen und reguliert den pH-Wert des Futters, damit die Verdauungsfermente des Drüsenmagens die Verdauung des Futters bewirken können. Im Anschluss gelangt die eingeweichte Ingesta in den Drüsenmagen. Dort werden Enzyme zugesetzt und die Aufspaltung der Nährstoffe begonnen. Da bei den Vögeln die Zähne fehlen, müssen kleine Steinchen mit der Nahrung aufgenommen werden, die sich im Muskelmagen sammeln. Das Futter, das vom Drüsenmagen in den kräftigen Muskelmagen gelangt, wird mithilfe der kleinen Steinchen zermahlen, sodass die Oberfläche des Futters vergrößert wird und die Verdauungsenzyme effektiver das Futter zersetzen können.

Der Darm der Vögel unterscheidet sich von dem der Säugetiere, da der Darm im Verhältnis zur Körperlänge deutlich kürzer ist. Im Zwölffingerdarm ist nur ein Teil der Drüsen angelegt, die bei Säugetieren üblich sind. Wie auch beim Säugetier enden Gallen- und Pankreassekret im Duodenum. Der jejunoileale Anteil ist in Wandaufbau und Enzymaktivität, bis auf eine deutlich verkürzte Länge, im wesentlichen vergleichbar. Auch hier mündet während der Embryonalzeit der Ductus omphaloentericus in den Ileumanteil. Beim Dickdarm zeigt der Blinddarm eine Kuriosität. Im Gegensatz zu den Säugern ist dieser doppelt ausgelegt. Beim Huhn erreicht der Blinddarm ein erhebliches Ausmaß.

Die im Blinddarm ansässigen Bakterien tragen zur Verdauung der Zellulose bei. Das recht kurze Kolon, das eher als Rektum fungiert, endet im Gegensatz zu den

Säugetieren in der Kloake, in die auch Eileiter und Harnleiter der Geflügeltiere einmünden. Histologisch wird der Darm, vergleichbar mit dem Menschen, in eine Vierschichtung bestehend aus Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis und die Tunica serosa/Adventitia eingeteilt.

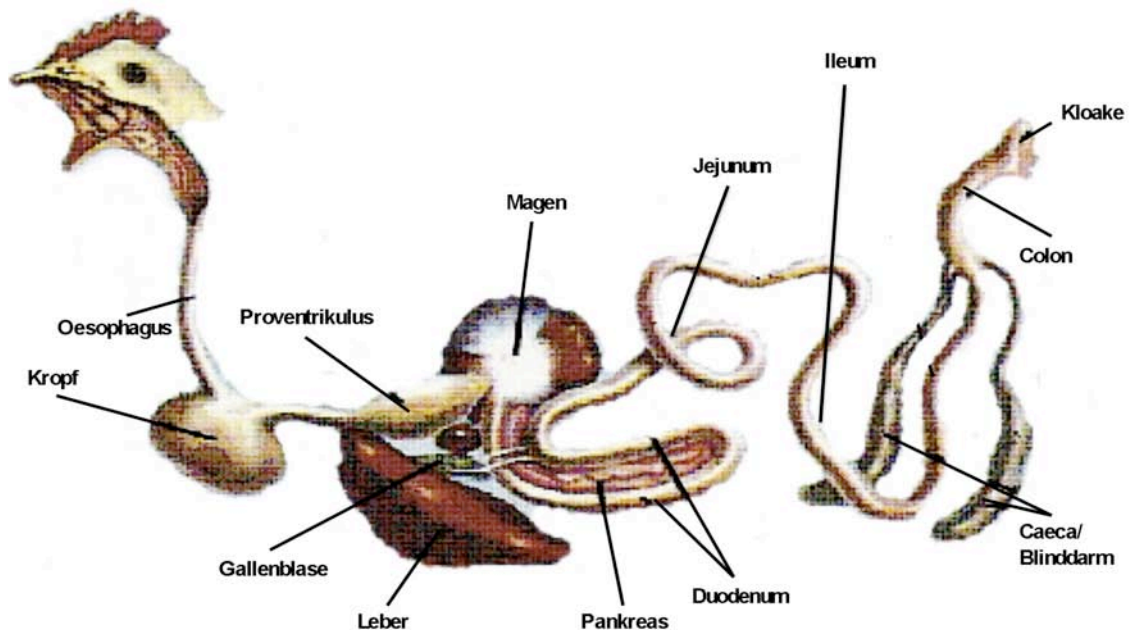


Abbildung 2. Schematischer Aufbau des Intestinaltraktes beim Huhn (modifiziert nach König 2008)

Huhn

Die Darmlänge eines erwachsenen Huhns beträgt ungefähr das Fünf- bis Sechsfache der Körperlänge. Die Größe eines ausgewachsenen Huhns der Rasse White Horn Leg ist in etwa 30 cm, somit hat der Dünndarm eine Länge zwischen 150 und 180 cm.

Die einzelnen Abschnitte des Magen-Darm-Traktes bei einem 11 Tage alten Hühnerembryo haben in etwa Längen von:

Duodenum: 200 mm

Jejunum/Ileum: 1100 mm

Caecae: 100 mm

Rektum/Cloaca: 100 mm

1.7 Das enterische Nervensystem (ENS)

Das ENS ist mit mehr als zehn Millionen Nervenzellen die größte Ansammlung von Neuronen außerhalb des Zentralnervensystems beim Menschen (Krammer 1997). Es erstreckt sich vom Oesophagus bis zum Anus entlang des Gastrointestinaltrakts, einschließlich der Gallenblase, des Gallenganges und des Pankreas, und weist in jedem Darmabschnitt einen ähnlichen Aufbau auf. Neben dem sympathischen, dem parasympathischen Nervensystem und dem Nervengeflecht der ICC stellt es eine weitere Komponente des autonomen Nervensystems dar, welche im komplexen Zusammenspiel die Darmperistaltik reguliert (Krammer 1997).

Das ENS des Menschen besteht aus dem PM und dem PS, welcher noch mal in drei separate Plexus unterschieden wird.

Der innere Plexus submucosus, auch Meissner genannt, liegt unterhalb der Tela muscularis mucosae. Der äußere PS (Schabadasch oder Henle) grenzt direkt an die zirkuläre Muskelschicht an und bildet gemeinsam mit dem PM (Auerbach-Plexus genannt) die drei Hauptansammlungen von Perikarien und deren Verflechtungen untereinander. Zwischen dem inneren und äußeren PS befindet sich eine dritte Ansammlung von Perikarien, welche als intermittierender PS beschrieben wird (Schemann and Neunlist 2004); (Hoyle and Burnstock 1989).

Das ENS beinhaltet sensorische und motorische Neurone und dazwischen gelegene Interneurone, wovon die meisten Neurone nicht direkt vom zentralen Nervensystem innerviert werden (Krammer 1997). Die Funktion des parasympathischen und sympathischen Nervensystems besteht in Bezug auf das ENS aus einer Modulation. Schon im Jahre 1921 wurde von Langley der Begriff des „Enteric Nervous System“ geprägt, der sich erst in den letzten Jahrzehnten allgemein durchgesetzt hat (Krammer 1997).

Die Morphologie der Plexus ist speziesabhängig. Schon 1896 wurde von Dogiel begonnen, verschiedene Ganglienzelltypklassifikationen zu erstellen (Dogiel 1896). Diese Arbeiten setzen sich mit Stach und Brehmer (Brehmer, Schrodler and Neuhuber 1999) bis heute fort. In der neueren Zeit wird neben der reinen morphologischen Beschreibung zumeist mithilfe von Versilberungen, histochemischen und immunhistochemischen Methoden versucht, funktionelle Erkenntnisse über die Neuronen der Plexus und ihre unterschiedlichen Ganglienzelltypen zu erlangen (Stach

1981); (Stach 1980); (Brehmer et al. 1999). Die folgende Abbildung, übernommen aus dem Netter-Atlas für Anatomie, zeigt die Lokalisation des inneren Plexus (Meissner) sowie des äußeren Plexus (Auerbach) im schematischen Wandaufbau.

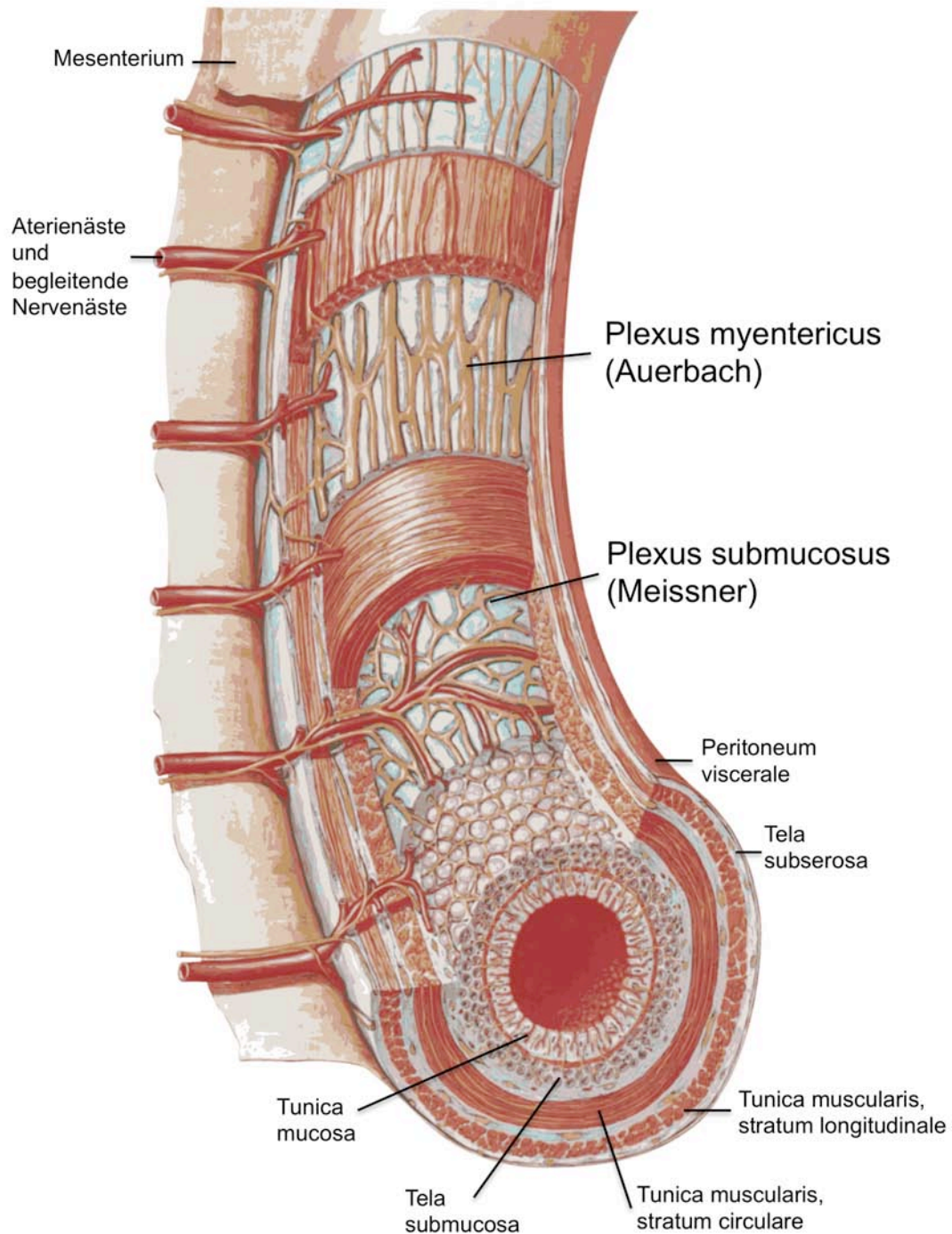


Abbildung 3. Schematischer Darmwandaufbau mit Lokalisation des ENS (Netter 2005)

1.8 Die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC)

In enger Beziehung zum ENS findet sich ein Geflecht, das zwischen Nerven und Muskulatur liegt und von interstitiellen Zellen gebildet wird. Diese Zellpopulation wurde nach ihrem Entdecker, dem spanischen Neuroanatom Ramon Santiago y Cajal benannt (Cajal 1893), der die intramuralen Zellen als primitive Neurone bezeichnete. Bereits 1914 vermutete Keith, damals nur anhand von spärlichen Belegen, hinter diesen Zellen ein Schrittmachersystem der Darmwandmuskulatur (Thuneberg 1999), was erst in den letzten Jahren als wissenschaftlich gesichert gilt (Huizinga et al. 1995); (Thomsen et al. 1998); (Horowitz, Ward and Sanders 1999).

Durch komplexe Interaktion mit dem ENS spielen die ICC eine wichtige Rolle in der Vermittlung intestinaler Motilität (Thuneberg 1999); (Lecoin, Gabella and Le Douarin 1996).

Die Interaktion zur Erzeugung einer effizienten Peristaltik findet nicht nur zwischen den ganglionären Nervengeflechten, sondern auch im Zusammenspiel mit den ICC und der glatten Muskulatur statt. Die aus mesenchymalen Vorläuferzellen eingewanderten Zellen sind in der Lage, neuronale Stimuli auf glatte Muskelzellen zu übertragen und so genannte „slow waves“ zu generieren, die ihrerseits rhythmische Segmentationen des Darmes auslösen (Thuneberg 1999). Sie gehören zur Familie der glatten Muskelzellen. Bisher wurden sie im Ösophagus, Magen, Dünn-, Dickdarm und Rektum nachgewiesen. Durch die Entdeckung, dass Cajal-Zellen die Rezeptortyrosinkinase c-Kit (CD 117) exprimieren, konnten in den letzten 10 bis 15 Jahren große Fortschritte zum Verständnis der ICC gewonnen werden, da sie so mittels Antikörpernachweis spezifisch angefärbt werden können (Burns 2007). Morphologische Studien mittels TEM haben gezeigt, dass zwischen phänotypisch unterschiedlichen ICC eine unterschiedliche Aktivität differenziert werden kann.

Vereinfacht kann man sagen, dass die Zellen, die mit dem PM interagieren, die Motilität regulieren, indem sie als Schrittmacherzellen fungieren, während die intramuskulären ICC die nervalen Signale des ENS auf die glatte Muskulatur übertragen (Ward, McLaren and Sanders 2006).

2 Materialien

2.1 Mikrochirurgische Instrumente

Metallsägeblatt	Fine Science Tools
1er-Kanüle	Fine Science Tools
Stumpfe Pinzette	Fine Science Tools
Splitterpinzette	Fine Science Tools
Anatomische Pinzette	Fine Science Tools
Nadelhalter	Fine Science Tools
Mikroschere	Fine Science Tools

2.2 Laborgeräte

Brutschrank	Sanyo (MCO- 20-AIC)
Gefriermikrotom	SLEE Mainz (MTE, B 6000200)
Paraffinschneidegerät	Microm (MM 400)
Pipettierhilfe	Eppendorf instruments
PH-Meter	Mettler Toledo (MP 220)
Magnetrührer	Heidolph (MR 3001 K)
Kaltlichtstrahler	Olympus (FLQ 85 E)
Mikroskop	Olympus (SC 40)
Mikroskop	Olympus (SCH Makro)
Mikroskop	Olympus (BX 60)
Lichtmikroskop	Olympus (CH 40)
Trimmgerät	Stemi (DV4)
Kamera	Color View
Paraffineinbettautomat	Microm (AP 280- 2)
Dewargefäß	Neolab
Stickstofftank	Harsco cryogenic products
Gefriertruhe –80 °C	Hareus
Gefriertruhe –20 °C	Liebherr

Wärmeschrank	Hareus
Autoklave	Wolf
Schleifgerät	Proxxon
Mikrotom	Leica (RM 2065)
Mikrotom	Reichert- Jung (Ultracut)
Transmissionselektronenmikroskop	Philips (CM 100)
Diamantmesser	Histo Diatome/Ultra Diatome

2.3 Verbrauchsmaterialien

Faden	Ethicon (Stärke: 9-0)
Objektträger	Assistent (Superfrost/Plus)
Pipettieraufsätze 2/5/10 ml	Sarstedt
Flüssiger Stickstoff	
Einmalhandschuhe	Hartmann
Einbettungsbehälter	Polysciences, INC. (PEEL-A-WAY)
Kryozellbox	Neolab
Einbettmedium	Sakura (Sakura)
Pilzprophylaxe	Neolab (Bad stabil)
Versiegelung/Entelan	Merck
Platinösen	Plano
Rasierklingen	Invateck (Prep Blades)
Schlitzträger	Plano (200 Mash)

2.4 Chemikalien

Histochemie	
Acetylcholinjodid	Fluka
Aqua dest	Baxter
Natriumcitrat	Merck
Kupfersulfat	Merck

Kaliumferricyanid	Merck
Essigsäure	Merck
Formaldehyde	Merck
Phosphatpuffer	Merck
Meyers Hämalaun	Roth
Xylolersatz	Vogel
Eukitt	Roth

Versilberung nach Späthe

Paraffin	Merck
Ethanol unvergällt	Merck
Isopropanol	Merck
Silbernitrat	Merck
Formol	Merck
Natriumchlorid	Roth
Phosphatpuffer	Merck
Ammoniak	Merck
Natriumthiosulfat	Fluka
Essigsäure	Merck
Paraformaldehyde	Fluka
Pikrin	Merck
Rothistol	Vogel
Entelan	Merck

Semidünnschnitte

Natrium-dihydrogen-phosphat Monohydrat	Merck
Di-Natrium-hydrogen-phosphat Heptahydrat	Merck
Saccharose	Merck
Glutaraldehyd 25 %	Merck
Osmiumtetroxid	Merck

Glycidether 100	Serva
2-Dodecanylsuccinic acid anhydride	Serva
Methylnadic anhydride	Serva
2,4,6-Tris(dimethyl-aminomethyl)phenol	Serve
unvergällter Alkohol	Merck
Propylenoxid	Serva
Aqua dest	Baxter
Azur 2 1 %	Merck
Natriumkarbonat	Merck
Fuchsin	Chroma
Methylenblau 1 %	Merck
Crystal Mount	Biomeda

Elektronenmikroskopie

Uranylacetat 1 %	Merck
Blei-II-Nitrat	Merck
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck

3 Methoden

3.1 Operative Technik

Für die Versuche wurden befruchtete Eier der Rasse White Leghorn (Lieferant: Lohman; Cuxhaven) verwendet. Diese wurden bei 37,5 °C und 85 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank, ohne zu wenden, horizontal liegend inkubiert. Am embryonalen Entwicklungstag 11 erfolgte die Operation. Zuerst wurde das Ei mit einem Kaltlichtstrahler durchleuchtet, um die Position der Luftblase, der Allantois und des Dottersacks zu erfassen. Unbefruchtete oder abgestorbene Eier konnten mit dieser Methode erkannt und ausgesondert werden. Die Luftblase wurde in ihrer Ausdehnung auf der Eierschale eingezeichnet. Das Operationsfeld wurde so markiert, dass der Abgang der Umbilikalgefäße aus der Allantois in der Mitte eines Rechtecks zu liegen kam. Mit dem Blatt einer Metallsäge wurde ein kreuzförmiges Loch in die Mitte der Schale über der Luftblase gesägt und später mit einer Kanüle die darunter liegende äußere Eihaut durchstoßen. Jetzt wurde vorsichtig an der vorher markierten Stelle ein rechteckiges Loch gesägt. Dabei war besonders darauf zu achten, dass es zu keinen Rissen in der Eierschale und keinen Verletzungen der darunter liegenden Eihaut kam. Diese nämlich führten unweigerlich zu heftigen Blutungen aus den Kapillaren der unter der Eihaut gelegenen Allantois und damit zum Scheitern aller weiteren Schritte. Mit einer feinen Pinzette wurde dann die entstandene rechteckige Scherbe entfernt. Gelang es nicht, die Scherbe in toto zu entfernen, wurden die übrigen Splitter mit einer Splitterpinzette unter dem Präparationsmikroskop entfernt und der Staub mit reiner Luft weggeblasen. Mit einer Pipette wurde dann ein Tropfen steriler Locke-Lösung (Zusammensetzung siehe unten) auf die frei liegende Eihaut getropft und mit einer Splitterpinzette nur die äußere Schicht der Eihaut perforiert. Die Flüssigkeit verteilte sich daraufhin in dem Kapillarspalt zwischen den beiden Eihäuten und ermöglichte damit die Trennung der beiden Schichten. Durch das Perforationsloch konnte nun Luft in den Spalt dringen, sodass der Inhalt des Eies, der Schwerkraft folgend, nach unten sackte und den Raum der Luftblase ausfüllte, aus der die Luft über das oben erwähnte Loch entweichen konnte. Die jetzt frei hängende äußere Eihaut wurde vorsichtig von der unteren getrennt und vom Rand der Eierschale gelöst.

Nachdem jetzt die innere Eihaut freigelegt war, wurde der kapillare Gefäßbaum sichtbar. Mit einer Mikroschere wurde die Eihaut in der Nähe eines Kapillarastes scharf durchtrennt und hierdurch, möglichst ohne Blutung, die Amnionhöhle eröffnet.

Abbildung 4 soll einen schematischen Überblick über die anatomischen Verhältnisse des Operationsgebietes geben.

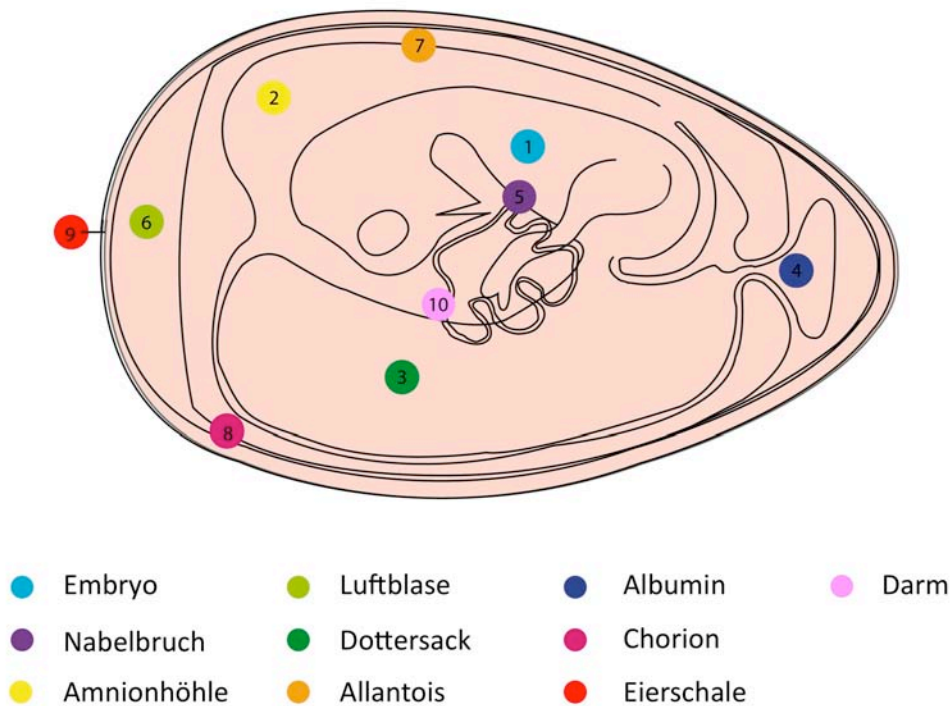


Abbildung 4. Schematische Darstellung der verschiedenen Membranen in Bezug zum Hühnerembryo (modifiziert nach Tibboel 1979)

(1) Embryo; (2) Amnionhöhle; (3) Dottersack; (4) Albumin; (5) Nabelbruch; (6) Luftblase; (7) Allantois (8) Chorion (9) Eierschale mit äußeren und inneren Membranen (10) Darm

Anhand der Gefäßaufzweigungen wurde der Abgang der Chorda umbilicalis aufgesucht und entlang der Gefäße abwärts präpariert, da zu diesem Zeitpunkt während der Vollziehung des physiologischen Nabelbruchs der Darm außerhalb des Embryos liegt und somit leicht zu identifizieren ist.

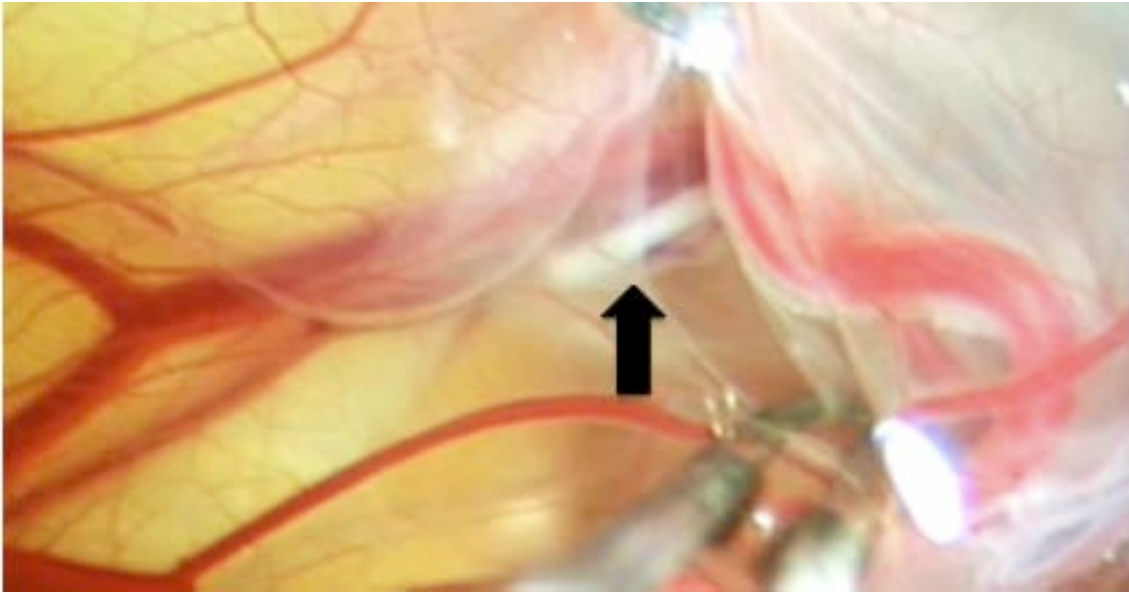


Abbildung 5. Einsicht in das Operationsgebiet nach Eröffnen der Amnionhöhle
Der Dünndarm in Höhe jejunolealer Übergang befindet sich am 11. Entwicklungstag, während Vollzug des physiologischen Nabelbruches, außerhalb der Bauchwand.
(Standbild Videodokumentation)

Die Ligatur wurde mit einem Propylen-9-0-Faden in Höhe des jejunolealen Überganges circa 8 cm distal des Ductus omphaloentericus nach Austreten des Darms aus der Bauchhöhle indiziert.

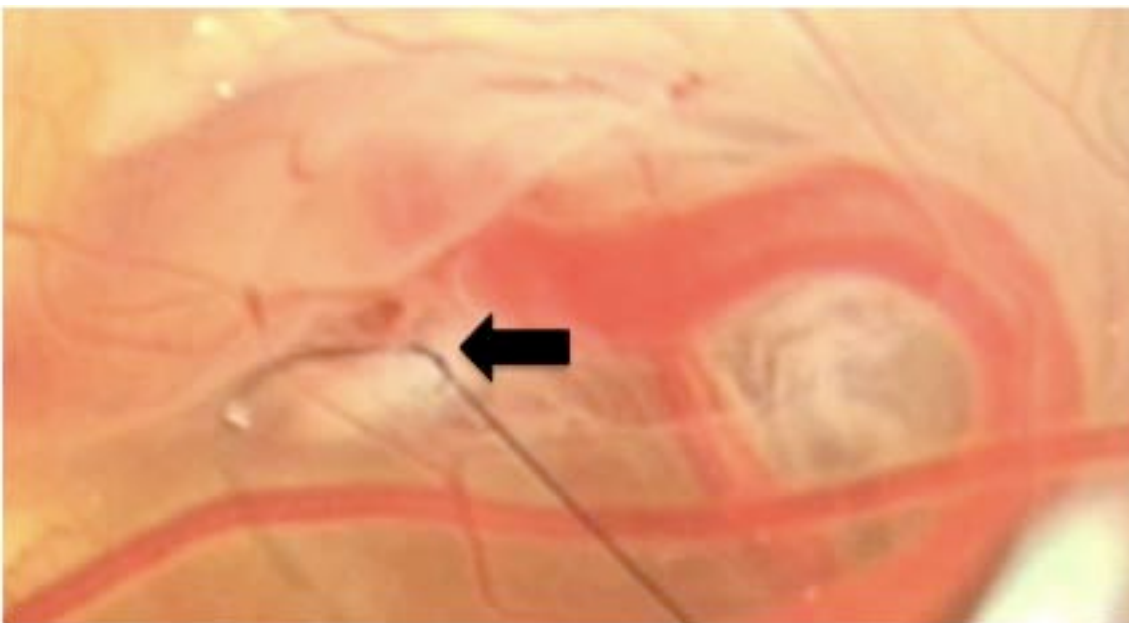


Abbildung 6. Fotodokumentation der induzierten Ligatur am Entwicklungstag 11
Entscheidend ist, dass der Faden gleichmäßig zirkulär um die Darmwand herum anliegt, ohne diese dabei zu verletzen oder das Lumen komplett zu verlegen.
(Standbild Videodokumentation)

Anschließend wurde das Ei mit Parafilm verschlossen, nachdem zum Ausgleich des geschätzten Flüssigkeitsverlustes einige Tropfen Locke-Lösung in das Ei gegeben wurden und die Bebrütung je nach gewünschtem Zeitraum bis maximal zum embryonalen Entwicklungstag 19 mit verschlossener Wunde nach oben fortgesetzt werden konnte. Erfahrungsgemäß schlüpft das Hühnchen zwischen Tag 21 und 22. Das Überleben der Embryonen war nur gegeben, wenn die Operationszeit deutlich weniger als zehn Minuten betrug.

Die tägliche Pflege beinhaltet das Durchleuchten der Eier, um tote oder ausgetrocknete Embryonen zu erkennen. Die zu trockenen Eier wurden aufgeschnitten und mit etwa 1 ml Locke-Lösung aufgefüllt und wieder verschlossen. Von besonderer Bedeutung war die Erkennung infizierter Eier, da von diesen ausgehend sich schnell eine Infektion, vor allem durch Pilze, auf alle anderen Eier des Brutschrankes hin ausbreiten konnte.

Für die Versuchsreihe 2 wurde die Ligatur am dritten postoperativen Tag, nachdem sich der Darm sichtbar unter dem Lichtmikroskop dilatiert hatte, durch einen zweiten operativen Eingriff mithilfe einer Mikroschere eingeschnitten und, ohne die Darmwand zu verletzen, entfernt. Auch hier erfolgte nach erfolgreich durchgeführter mikrochirurgischer Intervention die Bebrütung, wie oben beschrieben, bis maximal zum Tag 19.

Kontrollen:

Als Kontrollen dienten Embryonen, welche in gleicher Weise wie oben beschrieben bebrütet wurden und an welchen, ohne vorangehende Eröffnung der Eierschale, die Entwicklung der vorherrschenden Verhältnisse am gesunden Embryo an den Entwicklungstagen 11 bis 19 studiert werden konnte. Die Sham-operierten Eier durchliefen ebenso wie die Versuchsreihen 1 und 2 die Eröffnung der Eierschale am Entwicklungstag 11. Mithilfe der Pinzette wurde der Darm berührt, ohne die Ligatur zu induzieren und anschließend die Öffnung mit Parafilm verschlossen.

Locke-Lösung:

NaCl 4,4553 g

KCl 0,2103 g

CaCl₂-2H₂O 0,1569 g

Ad 500 ml Aqua dest.

3.2 Versuchsaufbau

Für den mikrochirurgischen Eingriff wird, um quantitativ und qualitativ hochwertige Ergebnisse zu erhalten, eine hohe Anzahl an operierten Hühnerembryos benötigt. Berücksichtigt werden muss, dass nur 30 % der operierten Versuchstiere überleben. Dieses Ergebnis entspricht den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen, die mit dem Modell Hühnerembryo gearbeitet hatten.

Für die Versuchsreihe 1 wurden 10 Embryonen für jeden folgenden Entwicklungstag (ED), ab dem Tag 12 bis Tag 19, dekapitiert und Gewebeproben wie unten beschrieben fixiert, um sie für die ausgesuchten Färbetechniken weiterzubearbeiten. Für die Versuchsreihe 2 wurden 5 Eier ab Tag 16, nachdem der zweite operative Eingriff erfolgreich an Tag 15 durchgeführt werden konnte, für jeden folgenden Entwicklungstag bis Tag 19 getötet und Gewebeproben entnommen (Abbildung 7).

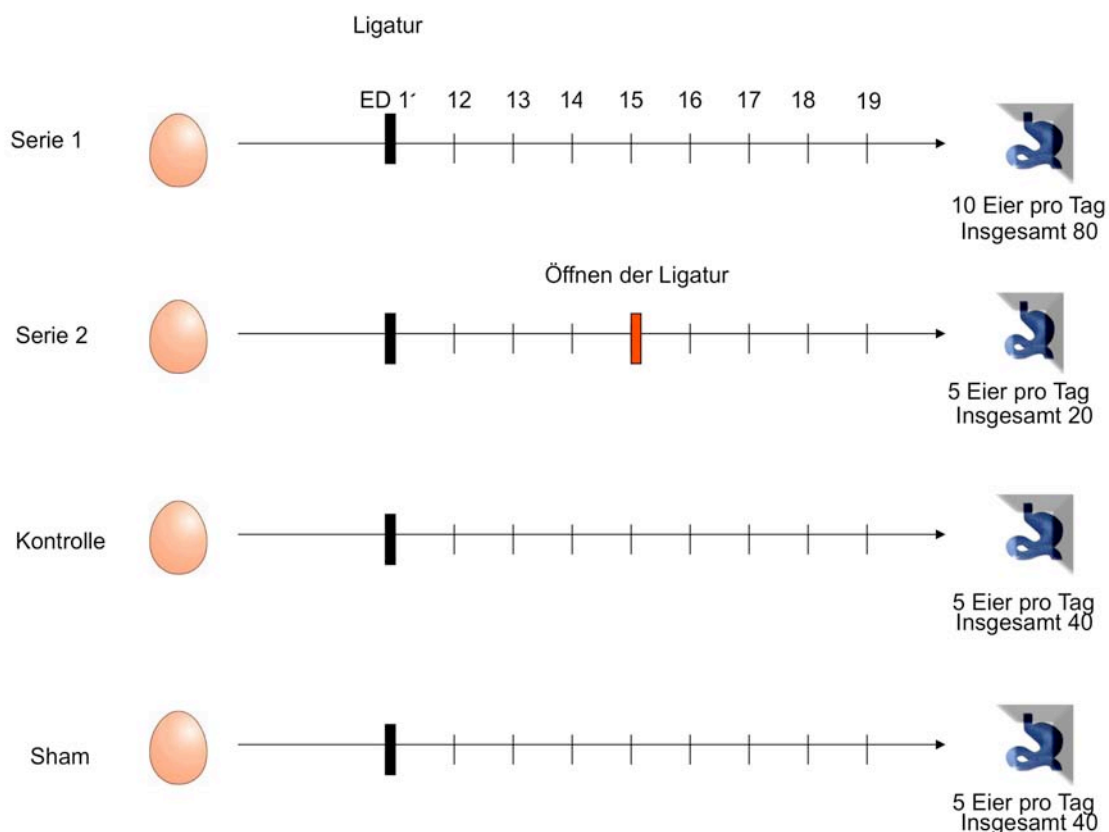
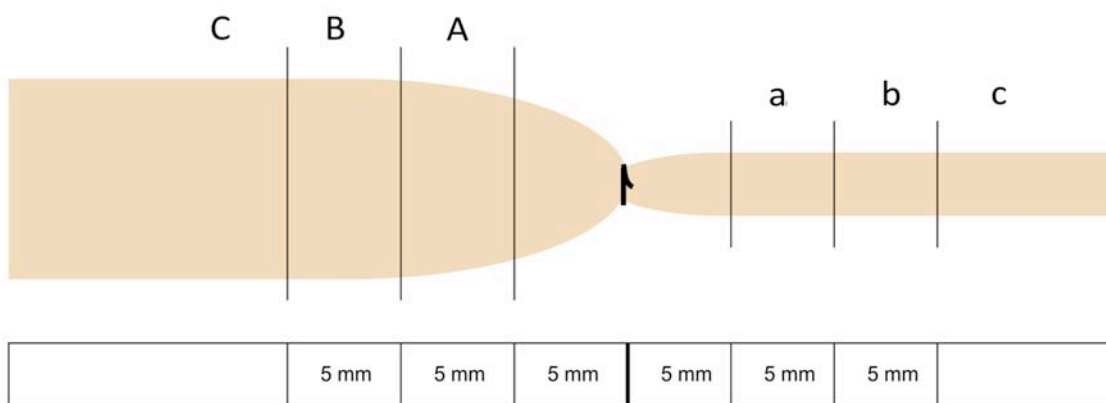


Abbildung 7. Schematischer Versuchsaufbau

3.3 Aufarbeitung der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden aus dem proximalen dilatierten oralen Segment und dem distalen, normo- bis hypotrophen, anoralen Segment entnommen (Abbildung 8) und präpariert. Es wurde darauf geachtet, Abstand zu beiden Seiten der Atresie einzuhalten. Das Gewebe zwischen A und a wurde auf das Vorhandensein einer Membran, zur Unterscheidung zwischen einer Stenose oder einer Atresie Typ I hin untersucht, da sich diese makroskopisch nicht voneinander unterscheiden lassen



- | | |
|--|--|
| A proximal Semidünnschnitt / Elektronenmikroskopie | a distal Semidünnschnitt / Elektronenmikroskopie |
| B proximal Acetylcholinesterase | b distal Acetylcholinesterase |
| C proximal Versilberung / Immunhistochemie | c distal Versilberung / Immunhistochemie |

Abbildung 8. Gewebeprobenentnahme schematisch



Abbildung 9. Gewebeprobenentnahme fotodokumentiert

In gleicher Weise wurde bei den gesunden nicht operierten Kontrolltieren verfahren. Das Gewebe wurde hier ebenfalls circa 8 cm distal vom Ductus omphaloentericus entfernt, am Übergang von Jejunum ins Ileum entnommen. Das so gewonnene Gewebe wurde für die verschiedenen histologischen Untersuchungstechniken unterschiedlich fixiert und eingebettet.

Acetylcholinesterasefärbung

Gewebeproben wurden in Einbettgefäße mit Kryoprotektivum gegossen und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die so gewonnenen Proben konnten nun bis zur Weiterbearbeitung bei -80 °C zwischengelagert werden.

Von den Blöcken wurden mithilfe eines Gefriermikrotoms bei etwa -15 °C 8 µm dicke Schnitte angefertigt und jeweils ein Schnitt auf einen mit Polylysin beschichteten Objektträger aufgetragen und luftgetrocknet.

Die verschiedenen Färbeschritte wurden wie folgt durchgeführt:

Die mit dem Darm beschichteten Objektträger wurden in die Inkubationslösung eingetaucht und nach dem unten beschriebenen Inkubationsverfahren gefärbt.

Inkubationslösung:

0,1 M Phosphatpuffer 53 ml

0,1 M Natriumcitrat 4 ml

0,03 M Kupfer-II-Sulfat 8 ml

Aqua dest. 8 ml

0,005 M Kaliumhexacyanoferrat 8 ml

Acetylcholiniodid 40 mg

Die Lösung wird auf pH 6,0 eingestellt und dann auf 37 °C erwärmt.

Inkubationsverfahren:

Kryoschnitte 30 min lufttrocknen

Schnitte 5 min in 4 % Formalin bei Raumtemperatur inkubieren

2-mal in Aqua dest. waschen

Inkubieren in der frisch angesetzten Inkubationslösung für etwa 90 min bei Raumtemperatur

2-mal in Aqua dest. spülen

Bläuen mit Meyers Hämalaun für 30 sec

Gut spülen in Aqua dest.

Eindecken in Eukitt

Schnitte lufttrocknen bis zum nächsten Tag

Eindecken mit Entellan und einem Deckgläschen

Versilberungstechnik nach Späthe

Fixierung

Die gewonnenen Gewebeproben wurden für die Anfertigung von Paraffinschnitten in künstlich gealterter Bouin-Lösung (Späthe 1991) fixiert.

Künstlich gealterte alkoholische Bouin-Lösung (aBaa):

Formol 40 %	5 ml
Ethanol 96 %	25 ml
Essigsäure 100 %	5 ml
Ethylacetat	5 ml
Diethoximethan (Formaldehyddiethylacetat)	15 ml
Pikrinsäure	0,5 g
Aqua dest.	45 ml

Einbettung

Das Gewebe wurde erst in 70 % Ethanol, dann in einer aufsteigenden 2-Propanol-Reihe gewaschen und anschließend in Paraffin eingebettet. Die entstandenen Paraffinblöcke konnten nun bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank beliebig lange

zwischengelagert werden, ohne Qualitätseinbußen im weiteren Verfahren befürchten zu müssen.

6 µm dicke Schnitte wurden mithilfe eines Mikrotoms angefertigt, auf mit Chromalaungelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und nach folgendem Protokoll versilbert:

Stammlösung

20 % AgNO₃ in Aqua dest. (29 g AgNO₃ + 80 g H₂O)

10 % AgNO₃ in Aqua dest. (10 g AgNO₃ + 90 g H₂O)

9 % Na₂CO₃ in Aqua dest. (9 g Na₂CO₃ + 91 g H₂O)

10 % Formol (10 % HCHO) in 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,6–6,8

1 % Formol (10 % HCHO) in 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,6–6,8

0,6 % NaCl in Aqua dest. (6 g NaCl + 99 g H₂O)

Leitungswasserersatz: 10 ml 0,6 % NaCl + 1 ml Phosphatpuffer pH 7 + 989 ml Aqua dest.

33 % Ammoniaklösung, reinst, bei 5 °C gelagert

Pyridin, reinst

5 % Na₂S₂O₃ in Aqua dest. (5 g Na₂S₂O₃ + 95 g H₂O)

Vorbehandlung

Entparaffinieren in Xylol 3-mal 10 min

Absteigende Ethanolreihe bis Aqua dest. Pyridin, reinst 12–24 h

Spülen in Aqua dest. (4- bis 5-mal), bis der Pyridingeruch verschwunden ist

Stammlösung 4 für 2 h

Spülen in Aqua dest. (4- bis 5-mal)

Einstellen der Schnitte in Aqua dest. 1 h

Färbung

Vorwärmen der Stammlösung 1 auf 60 °C

Einstellen der Schnitte aus dem Aqua dest. in die vorgewärmte Stammlösung 1 für 15 min Spülen der imprägnierten Schnitte Aqua dest. je 5 sek, 3-mal Leitungswasser je 5 sek, einstellen in Aqua dest. für 1 min

Aqua dest ablaufen lassen. Schnitte in trockenen Färbetrog einstellen

Entwickler durch Zufügen von 1,5 ml Stammlösung 5 starten

Den gestarteten Entwickler über die Schnitte gießen; Entwicklungszeit ca. 10 min

Spülen

In Stammlösung 10 für 5 min

Wässern in Aqua dest. für 10 min

Aufsteigende Ethanolreihe, 3-mal Xylol

Eindecken mit Entelan und einem Deckgläschen

Semidünnschnittechnik

Fixierung

Die Gewebeprobe sollte so schnell wie möglich in ein Glas, mit 2 ml 3 %igem Glutaraldehyde versetzt, für 30 min gegeben werden. Anschließend das Glutaraldehyde in ein Schälchen unter dem Abzug abgießen und 0,2 M Phosphatpuffer auf die Gewebeprobe gießen, sodass das Gewebe großzügig bedeckt ist. Die Probe sollte mindestens zwei Stunden, maximal eine Woche im Kühlschrank zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden.

Herstellung von 0,2 M Natriumphosphatpuffer

5,52 g Natrium-dihydrogen-phosphat Monohydrat und

42,88 g Di-Natrium-hydrogen-phosphat Heptahydrat in 1000 ml Aqua dest. lösen und

6,84 g Saccharose in 100 ml 0,2 M Natriumphosphatpuffer lösen

Herstellung von 1 % Osmiumbromid

1 g Osmiumtetroxid in 50 ml Aqua dest. für min. 24 h lösen

Entwässerung und Einbettung

Puffer in Schälchen abgießen

1 ml Saccharose hinzupipettieren

1 ml Osmiumbromid hinzupipettieren unter der Abzugshaube

mit einem Deckel fest verschließen, durchschütteln, und für 90 min im Kühlschrank ruhen lassen

In der Zwischenzeit erfolgt die Zubereitung des Glycidether 100 für die Einbettung

Stammlösung A: 77 ml Glycidether 100
 125 ml 2-Dodecananylsuccinic acid anhydride
 (DDSA)

Stammlösung B: 100 ml Glycidether 100
 89 ml Methylnadid anhydride (MNA)

Gebrauchslösung: 4 Teile Lösung A + 6 Teile Lösung B
 + 2 % Accelerator (2,4,6-Tris(dimethyl-
 aminomethyl)phenol)

Mithilfe eines Glasspatels in einem Glasgefäß gut verrühren und 1 ml Accelerator hinzugeben. Erneut gut umrühren, bis keine Schlieren mehr sichtbar sind, und unter der Abzugshaube stehen lassen.

Osmiumbromid abgießen und mit der Entwässerung beginnen

35 % Alkohol 10–15 min

50 % Alkohol

70 % Alkohol

96 % Alkohol

100 % Alkohol

100 % Alkohol

Propylenoxid 15 min

das zubereitete Glycidether in zwei Portionen aufteilen

Gläschen 1 wird am Schluss für die Einbettung benötigt

Gläschen 2 wird mit Propylen wie folgt versetzt:

Propylenoxid : Glycidether 1 : 3 und gut verrührt

die Proben mit 2 ml aus Gläschen 2 hinzupipettieren und mit geöffneten Gläschen für 3 Stunden unter der Abzugshaube stehen lassen, die Proben sollten am Ende auf dem Boden schwimmen

anschließend die Proben mit einem Holzstäbchen in Gummiformen mit Glycidether aus Gläschen 1 übergießen, die Probe sollte senkrecht zur Mitte ausgerichtet werden die Gummiform bis zum nächsten Morgen im Brutschrank bei 60 °C polymerisieren lassen und hart gewordene Proben aus der Form drücken

Die fertigen Blöcke wurden mithilfe von Rasierklingen grob zurechtgestutzt und anschließend mithilfe einer Schleifmaschine fein zurechtgetrimmt, sodass der Darm quer zum Lumen angeschnitten werden konnte. Mit einem Mikrotom wurden Schnitte von 1 µm Dicke angefertigt.

Die Färbung erfolgte mit einer modifizierten Färbung nach Laczkó und Lévai (Laczkó und Lévai 1975).

Farblösungen:

25 ml 1 % Azur 2 in Aqua dest.

1 Teil 1 % Methylenblau (Chroma) in Aqua dest.

2 Teile 1 % Natriumcarbonat (Na_2CO_3)

vor Gebrauch frisch ansetzen und Farbkomponente vorher filtrieren

2) 0,5 % bas. Fuchsin (Chroma) in Aqua dest. vor Gebrauch filtriert

Färbevorgang:

Bei etwa 20 °C

90 min Farblösung 1

20 min. spülen mit 0,5 % Na_2CO_3

2-mal spülen in Aqua dest.

20 min Farblösung 2

3-mal spülen mit Aqua dest.

Eindecken mit Deckgläschen DePex

Ultradünnschnitte- Transmissionslektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Ultrastruktur des ENS wurden Schnitte von 80 μm Dicke von den in Glycidether eingebetteten Gewebeproben angefertigt, auf Schlitzträger aufgelegt und nach dem Verfahren von Reynolds kontrastiert (Reynolds 1963):

1 Tropfen Uranylacetat auf die Schlitzträger auftropfen und für 20 min im Dunkeln inkubieren lassen

mit 1 Tropfen Aqua dest. spülen

Bleicitrat für 5 min drauftropfen

erneut mit 1 Tropfen Aqua dest. spülen

Die Untersuchung erfolgte mit einem TEM Philips EM 300.

4 Ergebnisse

Das Kollektiv der verwendeten Hühnerembryonen

Versuchsreihe 1

Für die Beantwortung der Frage, inwiefern sich morphologische Veränderungen des ENS während der Entwicklung zur Atresie hin bemerkbar machen, wurden insgesamt 444 Embryonen an den unterschiedlichen Entwicklungstagen operiert. 80 Eier dienten als Kontroll- und Sham-Gruppen.

Von den verbliebenen 364 Eiern konnten, gemäß dem Protokoll, 80 Embryonen erfolgreich operiert und Gewebeproben für die Auswertung an den festgelegten Entwicklungstagen gewonnen werden. Insgesamt sind 284 Embryonen frühzeitig verstorben. Gründe waren hierfür intraoperative Komplikationen oder Infektionen.

Versuchsreihe 2

Hierfür wurden insgesamt 254 Embryonen zweimalig operiert, um eine Vorstellung zu gewinnen, ob die eingesetzten pathologischen Prozesse nach Entfernung der Obstruktion reversibel sind. Hierfür mussten 254 Embryonen operiert werden, um auf die gewünschte Anzahl von 20 Embryonen zu kommen, die erfolgreich die zweimalige Manipulation des Darmes überlebt hatten.

234 Embryonen der Versuchsreihe sind verstorben, ohne in die Gewebegewinnung und Auswertung eingeschlossen worden zu sein.

Der Grund für die hohe Mortalität liegt zum einen darin, dass die Experimente die fortgeschritteneren Entwicklungstage betreffen und damit eine sehr viele höhere Wahrscheinlichkeit einhergeht, Komplikationen in der Embryonalentwicklung zu verursachen, und zum anderen daran, dass sich der Eingriff als technisch schwierig erweist. Häufig hatten sich die Embryonen in ovo gedreht, und der Zugriff zum Darm war somit verwehrt. Auf der Allantois hatten sich häufig vermehrt Blutgefäße um die Narbe des ehemaligen Operationszuganges gebildet, sodass dann eine Blutung nicht verhindert werden konnte und es dadurch zu postoperativen Komplikationen kam. Auch war die Infektionsgefahr durch den zweiten operativen Eingriff wesentlich erhöht und der Eingriff endete häufig letal.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

Für alle Versuchsreihen einschließlich der unoperierten Kontrollen und Sham-operierten Embryonen wurden 857 befruchtete Eier bestellt. Davon waren 159 Eier nicht befruchtet geliefert worden oder waren fehlentwickelt und wurden somit nicht in die Datenerhebung eingeschlossen.

Insgesamt wurden 618 Eier operiert, davon sind 483 Embryonen innerhalb des Beobachtungszeitraums verstorben, was einer Letalität von 78,2 % entspricht.

180 Eier konnten gemäß Protokoll für die Datenauswertung verwendet werden.

	Erfolgreich operiert	Tot	Insgesamt	Letalität (%)
V1 Kinetik	80	284	364	78
V2 Regeneration	20	234	254	92
Sham	40	0	40	0
Kontrolle	0	0	40	0

Tabelle 2. Tabellarische Übersicht der Anzahl verwendeter Versuchstiere und Angaben zur Letalität

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist inhaltlich in drei Abschnitte gegliedert.

4.1 Makroskopie

Im ersten Teil werden die makroskopischen Ergebnisse aufgezeigt und mit den intraoperativen Befunden beim Menschen verglichen. Die Auswertung und Einteilung der Atresien in die unterschiedlichen Atresietypen ist hier mit aufgeführt.

4.2 Kinetik der Atresieentwicklung

Im zweiten Teil soll mithilfe von Licht- und Elektronenmikroskopie ein Verständnis der morphologischen Veränderungen während der Entstehung einer jejunalen Dünndarmatresie gewonnen werden und mithilfe der unterschiedlichen Färbemethoden die Kinetik der einsetzenden Rarifizierungen im ENS im proximalen und distalen Segment in Reaktion auf eine induzierte Obstruktion aufgezeigt und beurteilt werden.

4.3 Regenerationsfähigkeit des Enterischen Nervensystems

Im dritten Teil wird die vorherrschende morphologische Situation beurteilt, nachdem die Obstruktion vor vollständiger Ausbildung der Atresieform wieder entfernt worden ist. Dies erlaubt Rückschlüsse auf eine mögliche Regenerationsfähigkeit des Gewebes nach den einmal eingesetzten pathologischen Veränderungen des ENS.

4.1 Makroskopie

4.1.1 Atresieformen

Bei der täglichen Inspizierung der Embryonen durch die Öffnung in der Eierschale fiel auf, dass die Peristaltik bis etwa zum dritten postoperativen Tag kräftig gegen die Ligatur arbeitete, von diesem Zeitpunkt an schwächer wurde und am vierten postoperativen Tag schließlich vollständig zum Erliegen kam. Der Darm war jetzt proximal der Ligatur bis einschließlich des Magens erweitert. Ab dem sechzehnten Entwicklungstag konnte erstmalig die Herausbildung einer Dünndarmatresie mit vollständiger Verlegung des Lumens beobachtet werden.

Typ I, II und IIIa wurde wie folgt gefunden:

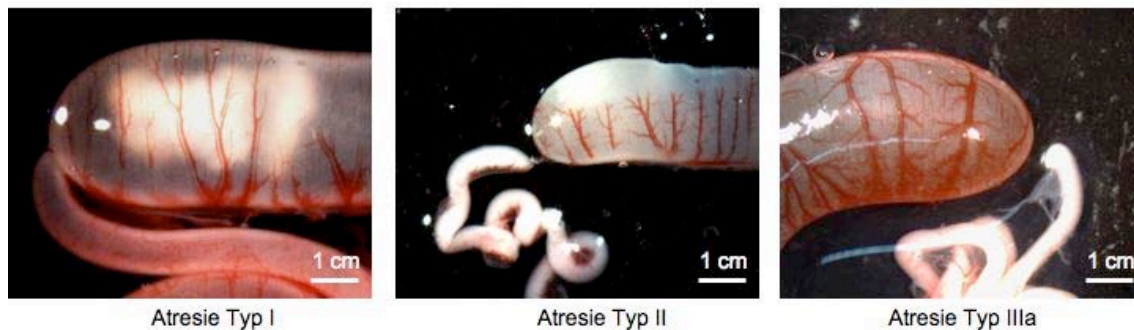


Abbildung 10. Einteilung des Atresietypen nach Bland und Sutton (Bland-Sutton 1889)

Die experimentellen Atresien im Hühnermodell entsprachen makroskopisch dem Erscheinungsbild menschlicher Formen und konnten der gängigen Klassifikation nach Bland und Sutton zugeordnet werden (Bland-Sutton 1889). Formen von multiplen Atresien oder die Apple-Peel-Form wurden nicht beobachtet.

Ein Beispiel für eine Atresie des ersten Typs, ohne sichtbare Trennung zwischen dem oberen und unteren Darmabschnitt, zeigt das erste Bild (Abbildung 10). Der zweite Typ, mit einem bindegewebigen Band zwischen dem oralen und dem aboral blinden Ende, ist im zweiten Bild der Abbildung 10 aufgezeigt. Das dritte Bild zeigt eine Atresie des dritten Typs a, die durch das Fehlen des Mesenteriums zwischen dem proximalen und dem distalen Darmabschnitt definiert ist. Der Durchmesser der dilatierten oral gelegenen Darmabschnitte variierte zum Teil beträchtlich. Die aboralen hypoplastischen Abschnitte waren stets kleiner im Durchmesser als die Kontrollen (Abbildung 11).

4.1.2 Kinetik der Atresieentwicklung: Makroskopie

Die unten aufgezeigten Bilder geben einen Überblick über die Größenverhältnisse der Darmsegmente proximal und distal der induzierten Ligatur im zeitlichen Verlauf. Die Daten wurden am ersten postoperativen Tag (entspricht Entwicklungstag 12), aufsteigend bis einschließlich des achten postoperativen Tages (entspricht Entwicklungstag 19) zu acht unterschiedlichen Zeitpunkten erhoben und miteinander verglichen. Hierbei wurde jeweils ein repräsentatives Bild von den 10 Gewebeproben fotografiert und in dieser Arbeit gezeigt. Eine deutliche Dilatation des proximalen Segmentes lässt sich ab dem 14. Und ganz eindeutig ab dem 15. Entwicklungstag erkennen. Ab Tag 17 sind die Kaliber extrem groß. Der proximale Darmabschnitt kann bis auf das 20-Fache der Größe im Vergleich zum distalen Segment vergrößert sein.

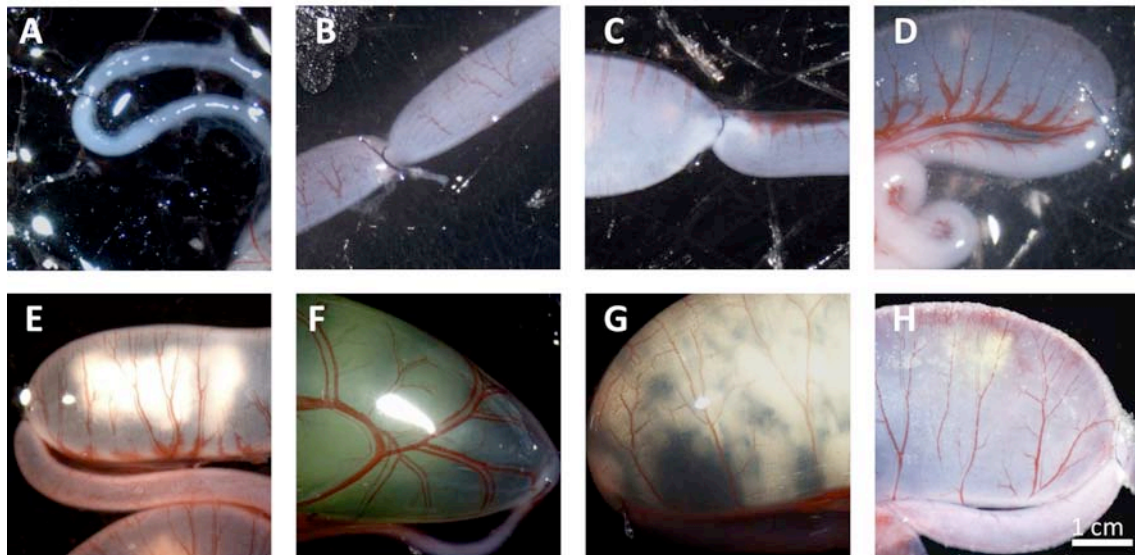


Abbildung 11. Ergebnisse makroskopische Bilder der Atresieentwicklung im zeitlichen Verlauf vom embryonalen Entwicklungstag 12 bis 19 (A–H)

4.1.3 Kinetik der Atresieentwicklung: Acetylcholinesterase (AChE)

Kinetik: Kontrollen

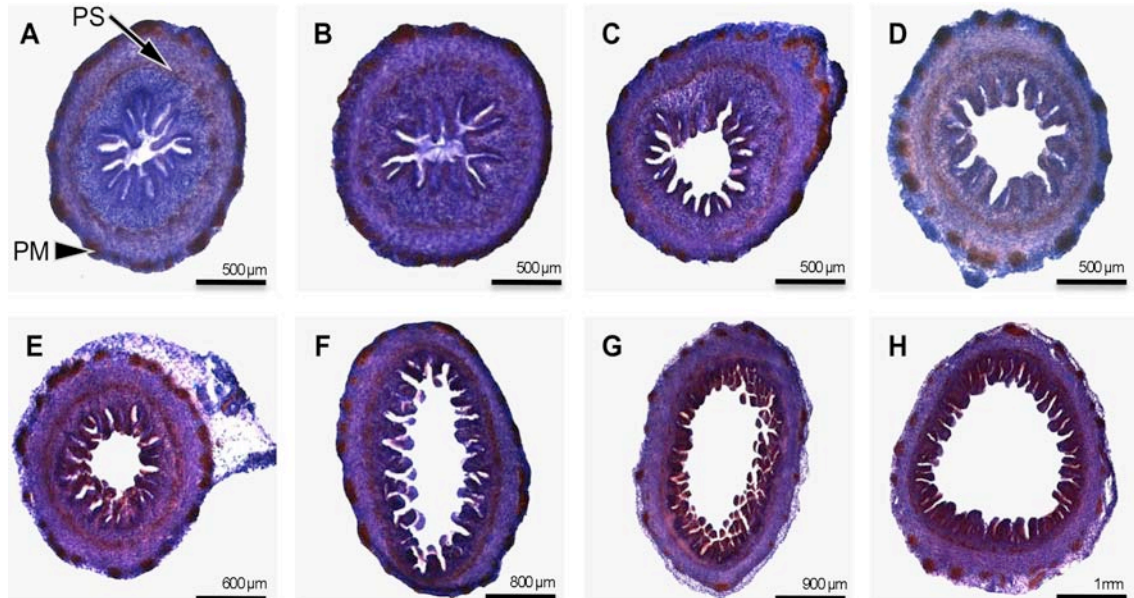


Abbildung 12. Kontrollserie AChE-Färbung Darmquerschnitte

Die oben gezeigte Abbildung gibt einen Überblick über die normale Verteilung der Acetylcholinesterase im PS und PM in den Kontrollschnitten, Entwicklungstag 12–19 (Abbildung A–H). Es zeigt sich die typische Vierschichtung der Darmwand in Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis und Tunica serosa. Am Übergang von Tunica muscularis zu Tunica serosa liegt der PM zirkulär angeordnet. Sowohl die Ganglien des PS als auch die des PM sind gleichmäßig zirkulär in der Tela submucosa und Tunica muscularis verteilt. Die Größenverhältnisse haben sich während der embryonalen Entwicklung verdoppelt, mit deutlicher Größenzunahme ab Entwicklungstag 17 und folgende (Abbildung F). Gefrierschnitte 8 µm; Färbung AChE

Kinetik: Acetylcholinesterase

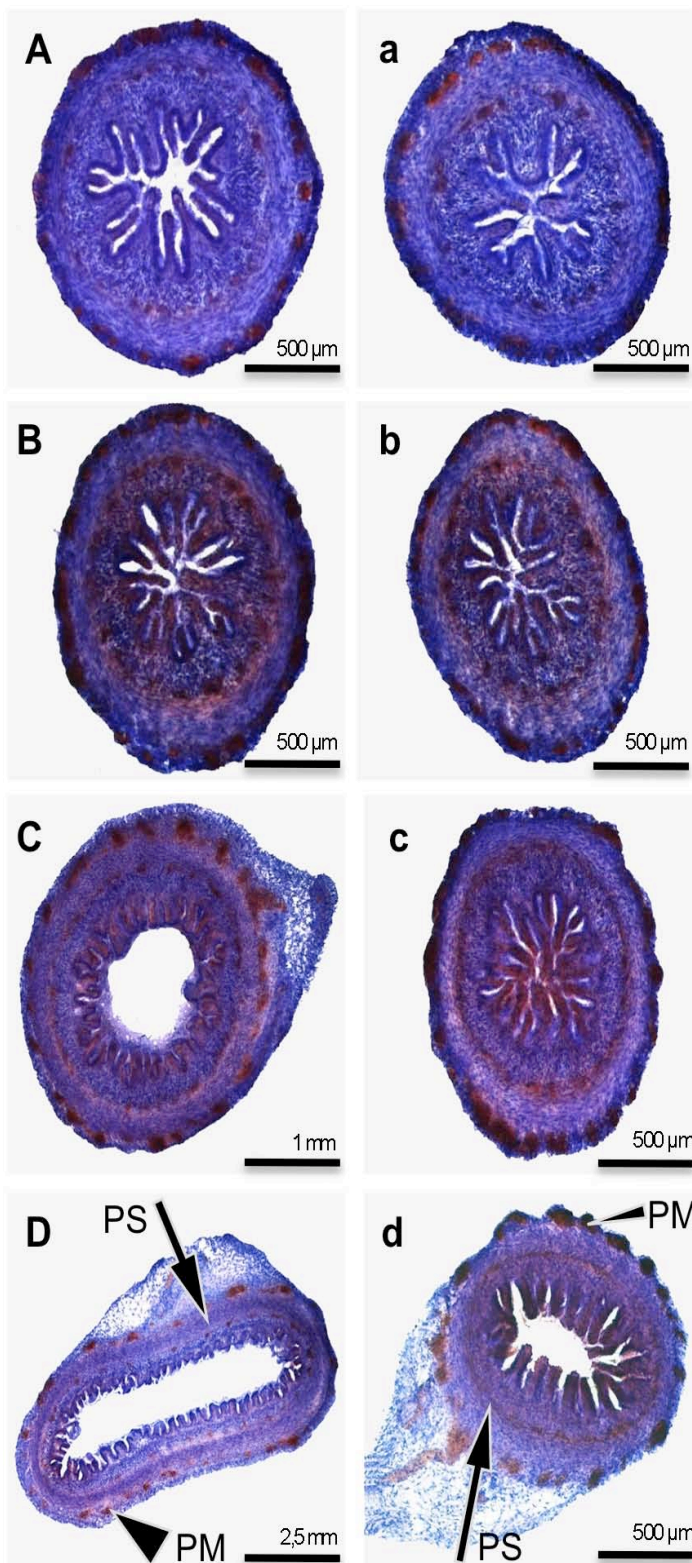


Abbildung 13. V1
Übersichtsfärbung im
Querschnitt AChE-
Färbung Tag 12–15
proximal (Bild A, B, C, D)
und distal (Bild a, b, c, d)
der Ligatur

Die AChE-Enzymverteilung im PS und PM erscheint bis zum Tag 14 (siehe Aa, Bb, Cc) vergleichbar, sowohl im proximalen als auch im distalen Darmwandabschnitt, mit den Kontrollschnitten. Erste Rarifizierungen lassen sich ab Tag 15, insbesondere im PS im proximalen Darmabschnitt nachweisen. Hingegen erscheint die Verteilung distal der Ligatur in beiden Nervengeflechten regelrecht.

Größenveränderungen im proximalen Darmabschnitt werden ab Tag 14 sichtbar und nehmen im weiteren Verlauf deutlich zu. Gefrierschnitte 8 µm; Färbung AChE

Kinetik: Acetylcholinesterase

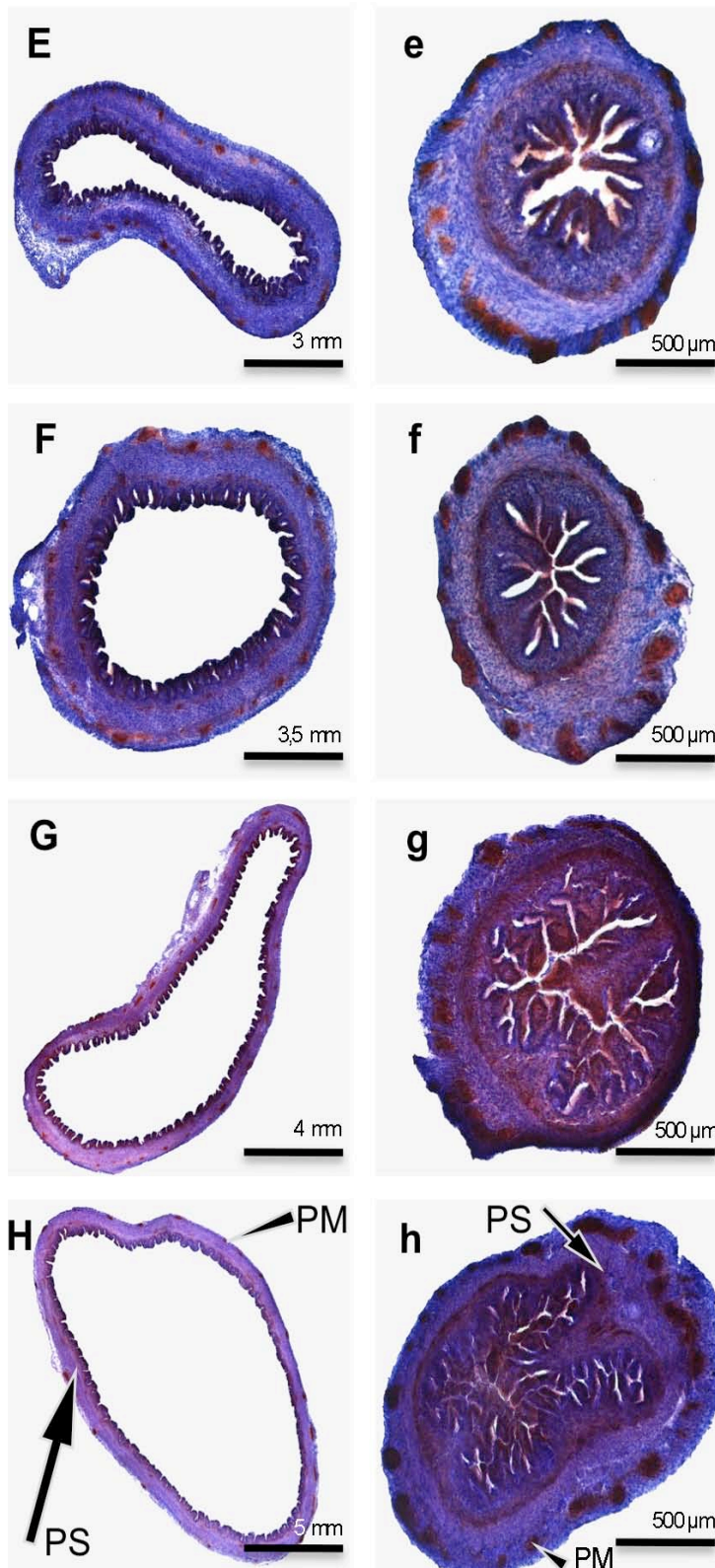


Abbildung 14. V1
Übersichtsfärbung im
Querschnitt, AChE-
Färbung Tag 16–19
proximal (Bild E, F, G,
H) und distal (Bild e, f,
g, h) der Ligatur
 Ab Tag 16 (Bild E) werden Rarifizierungen der Enzymverteilung innerhalb der Nervengeflechte im proximalen Abschnitt zunehmend sichtbar und erreichen ab Tag 18, in Abhängigkeit von der Größenzunahme, ein Maximum bis hin zum völligen Verlust über weite Darmabschnitte. Mithilfe der Übersichtsvergrößerung fällt der deutlich kleinere Durchmesser des distalen Darmabschnittes auf. Das Lumen ist vollständig durch die Zotten der Darmschleimhaut verschlossen, ein geregelter Darmtransport erscheint bei diesem histologischen Befund nicht möglich (Bild f, g, h). Gefrierschnitte 8 µm; Färbung AChE

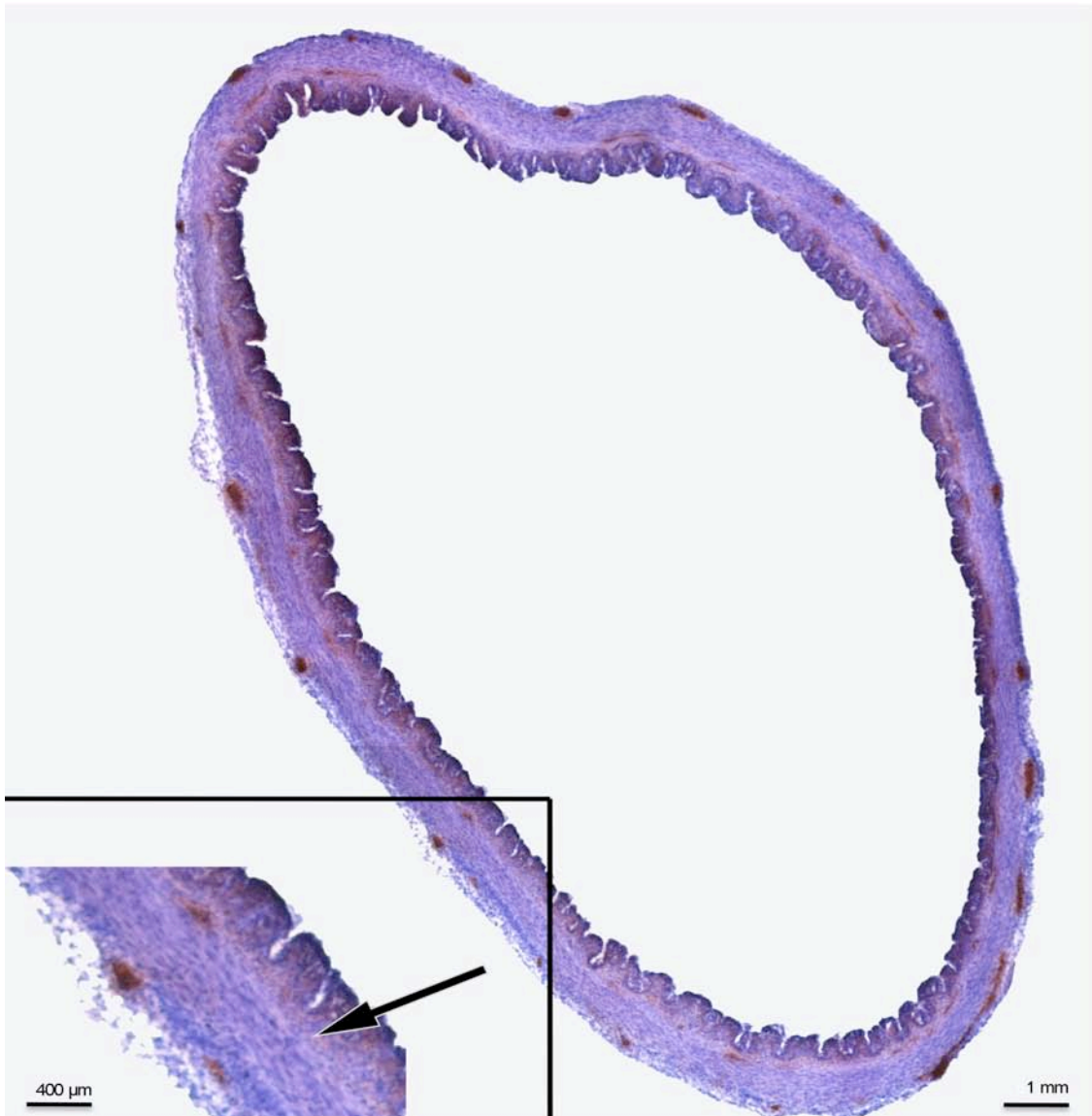


Abbildung 15. Proximal der Atresie gelegener Darmwandabschnitt Tag 19, AChE-Färbung im Querschnitt

Die Übersichtsfärbung zeigt einzelne Ganglien des PM und PS. Diese erscheinen weit auseinandergezogen, eingebettet in eine insgesamt verschmälerte Darmwand, die in ihrer Vierschichtigkeit erhalten bleibt. Die Aktivität der AChE ist in beiden Plexus über weite Strecken abstinent und erscheint insgesamt ausgedünnt. Die Tunica mucosa ist abgeflacht und die Zotten sind verstrichen. Es imponiert ein lang gezogenes weites Lumen, verglichen mit den Größenverhältnissen eines Kontrolldarms in 20-facher Vergrößerung. Gefrierschnitt 8 µm; Färbung AChE

4.1.4 Kinetik der Atresieentwicklung: Versilberungsmethode nach Späthe

Kinetik: Kontrollen

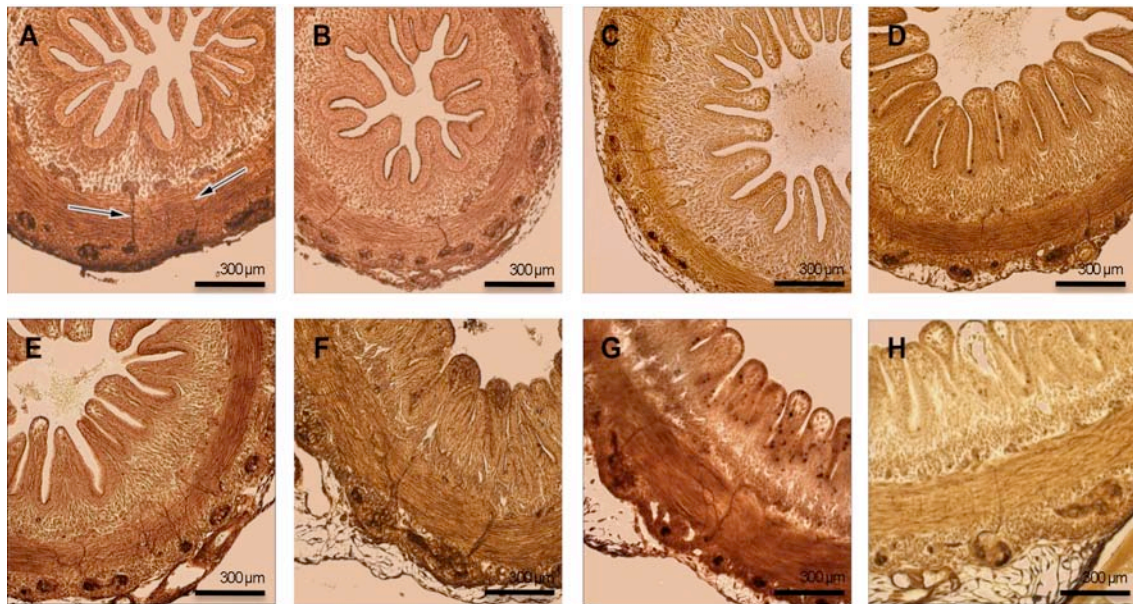


Abbildung 16. Kontrollserie Versilberung nach Späthe; Teildarmquerschnitte Höhe jejunoilealer Übergang

Die Wandschichtung ist schon bei Übersichtsvergrößerung deutlich sichtbar und gut abgrenzbar. Anhand der Bilder sind die axonalen Verbindungen zwischen den einzelnen Plexus gut sichtbar (Pfeile). Die axonalen Geflechte zwischen den Ganglien des PS und des PM durchbrechen die Ringmuskelschicht durch alle Wandschichten hindurch und sind bereits ab dem frühen Tag 11 und an allen Folgentwicklungstagen nachweisbar. Paraffinschnitt 6 µm; Versilberung nach Späthe

Kinetik: Versilberungsmethode

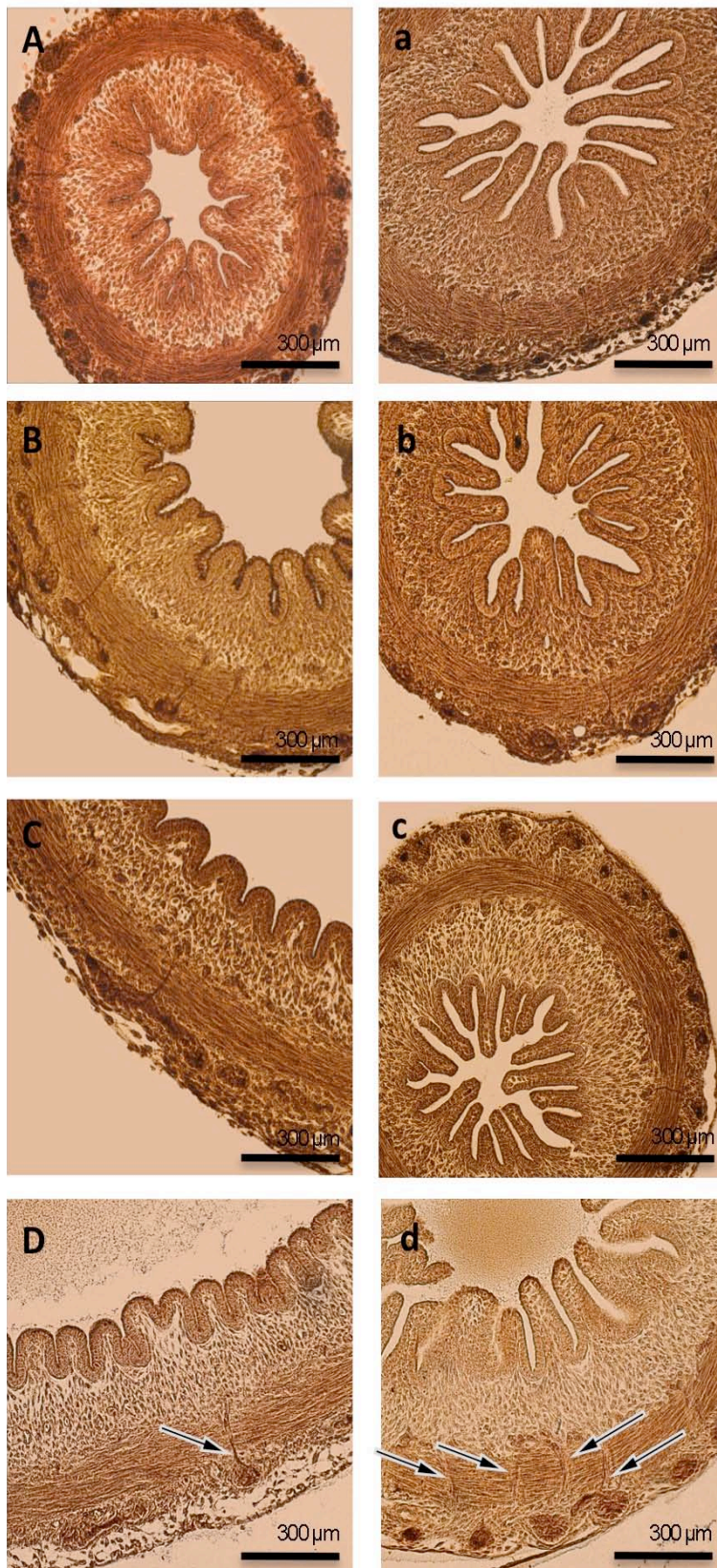


Abbildung 17. V1
Versilberungs-
technik im
Teilquerschnitt, Tag
12–15 proximal (Bild
A, B, C, D) und distal
(Bild a, b, c, d) der
Ligatur

Das axonale Netzwerk zwischen PS und PM zeigt im proximalen Abschnitt erstmals deutliche Rarifizierungen ab dem Tag 15 (Bild D), wohingegen im distalen Darmabschnitt multiple nervale Netzwerkverbindungen nachzuweisen sind. Paraffinschnitt 6 µm; Versilberung nach Späthe

Kinetik: Versilberungsmethode

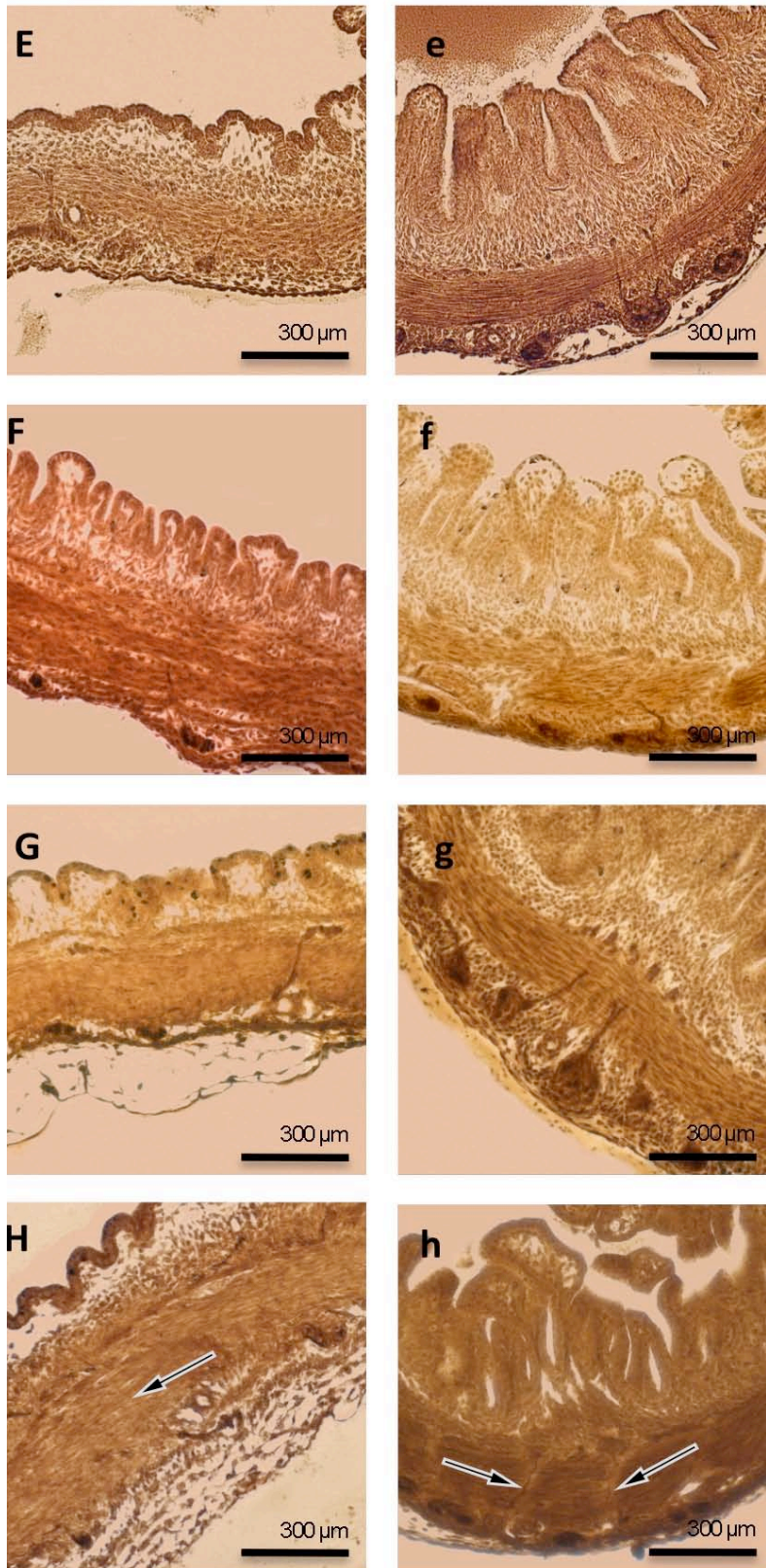
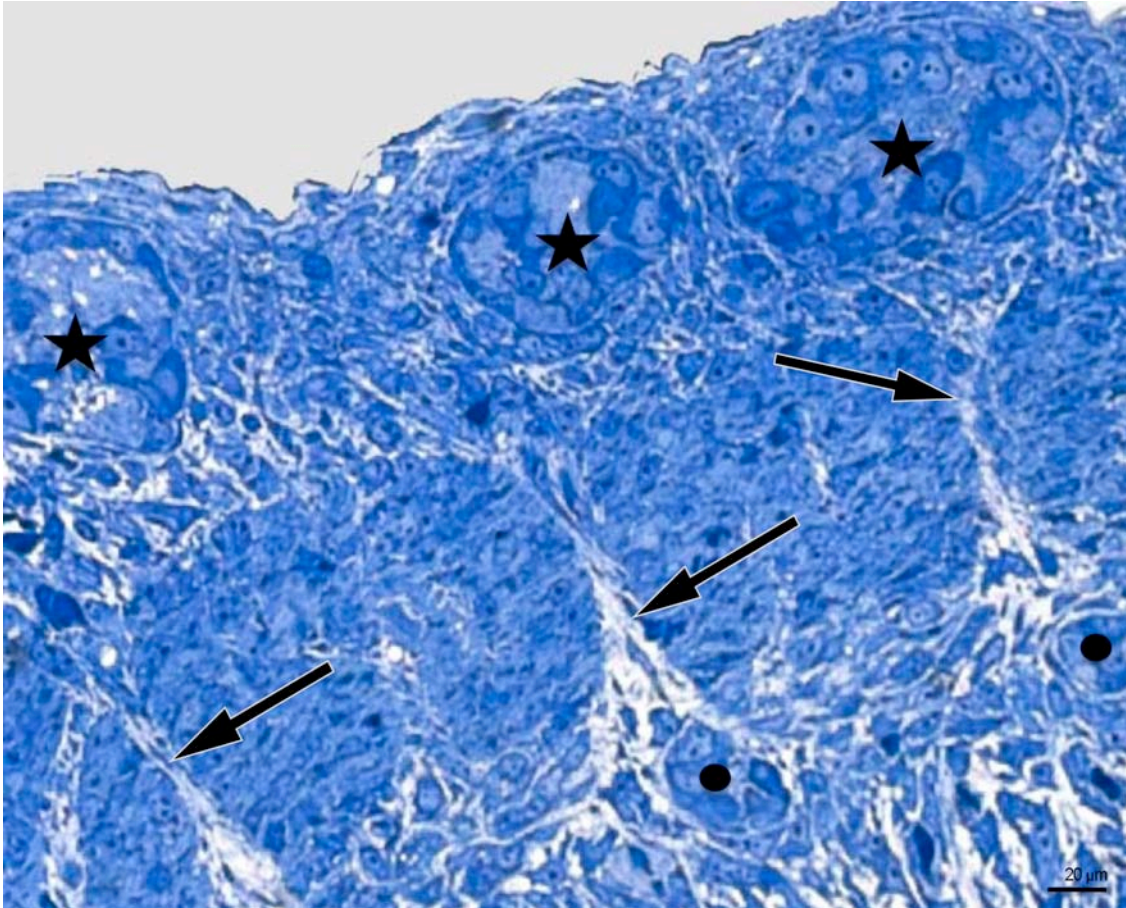


Abbildung 18. V1
Versilberungstechnik im
Teilquerschnitt, Tag
16–19 proximal (Bild
E, F, G, H) und distal
(Bild e, f, g, h) der
Ligatur

Die Rarifizierungen der kommunizierenden Nervenverbindungen zwischen den beiden Plexus nehmen im proximalen Darmanteil immer weiter zu, bis hin zum endgültigen Verlust am Tag 19 (Bild H, Pfeil). Vereinzelt finden sich noch transmurale Axone, welche aber nicht mehr in gleicher Stärke und Dichte auftreten wie in den Kontrollen. Wie bereits anhand der AChE-Färbung gezeigt wurde, lässt sich auch hier eine deutliche Veränderung der Ganglienform und -größe nachweisen. Paraffinschnitt 6 µm; Versilberung nach Späthe

4.1.5 Semidünnschnitttechnik

Kontrolle



**Abbildung 19. Kontrollschnitt Semidünnschnitttechnik; Teildarmquerschnitte
Höhe jejunolealer Übergang**

Die Morphologie der Ganglien lässt sich anhand von Semidünnschnitten besonders gut beurteilen. Die Ganglien des PM, zwischen Ringmuskel- und Längsmuskelschicht, haben eine ovale Form (siehe Stern) und stehen durch Nervenfasern (Pfeil) mit dem PS (Punkt) in der Submucosa in Verbindung. Anhand dieses Darmausschnittes lässt sich ein regelrechtes Netzwerk mit gleichmäßig verteilten Ganglien, eingebettet in eine intakte Darmwandschichtung, darstellen. Semidünnschnitt 1 μm; Färbung Laczkó und Lévai; Vergrößerung x 1250

Kinetik: Semidünnschnitt

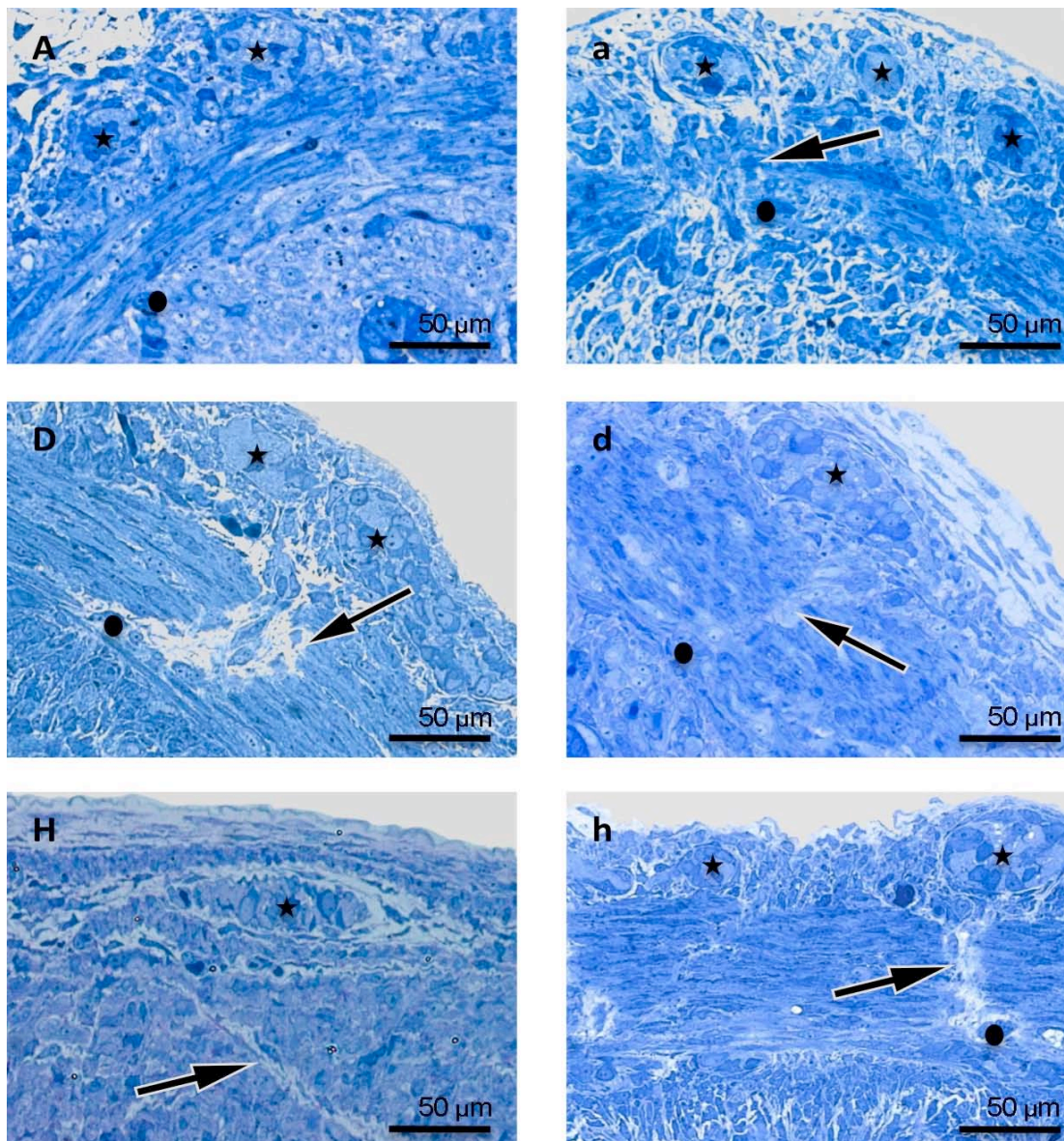


Abbildung 20. Kinetik V1 Semidünnschnitttechnik im Teilquerschnitt, Tag 12 (proximal A und distal a), Tag 15 (proximal D und distal d) und Tag 19 (proximal H und distal h) durch einen Darmabschnitt

In allen Abbildungen an Tag 12, 15 und 19 lassen sich proximal und distal kommunizierende nervale Faserbündel zwischen PM und PS nachweisen. Eine zunehmende Auflockerung des zwischen den Ganglienzellen liegenden Gewebes zeigt sich an Tag 15 proximal der Ligatur (Bild D) und hat an Tag 19 (Bild H) seinen Höhepunkt. Hingegen erscheint das Gewebe distal der Ligatur (siehe Bild d und h) vergleichbar mit dem der Kontrollsnitte. Im Bild H, acht Tage nach operativer Induktion der Ligatur im präretischen Darmabschnitt haben die Ganglien ihre typisch kugelförmige Form verloren, erscheinen lang gezogen, eingebettet in auseinandergesogenes aufgelockertes Gewebe. Die Längsachse der Ganglienzellkerne ist senkrecht zum Lumen hin pathologisch ausgerichtet. Semidünnschnitt 1 µm; Färbung Laczkó und Lévai.

4.1.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Kontrolle: Übersicht

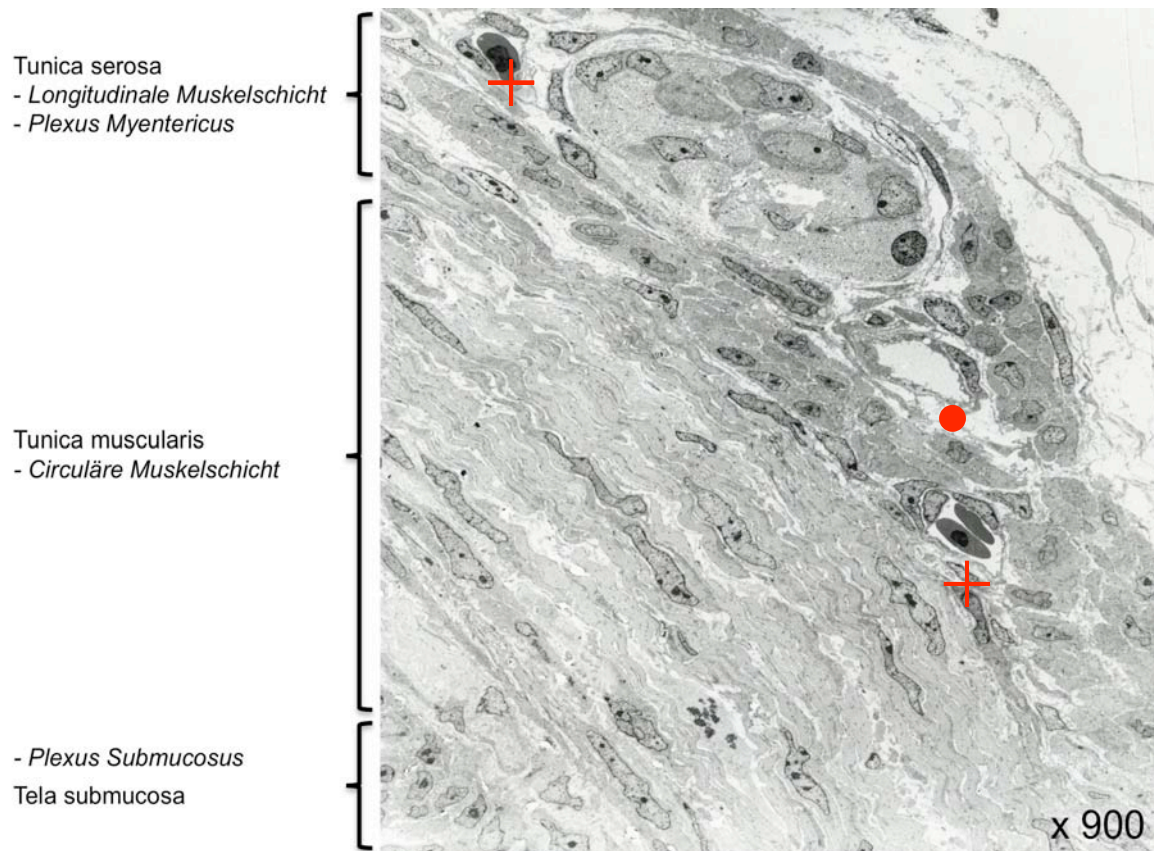
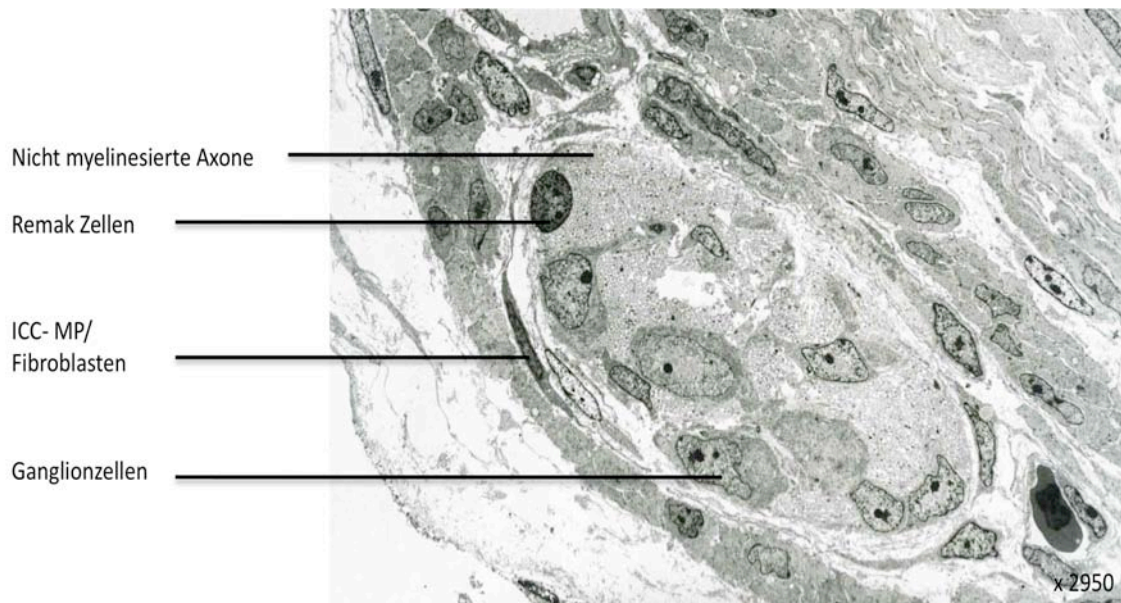


Abbildung 21. Übersichtsaufnahme, Kontrollschnitt Tag 19, PM und PS innerhalb der einzelnen Darmwandschichten

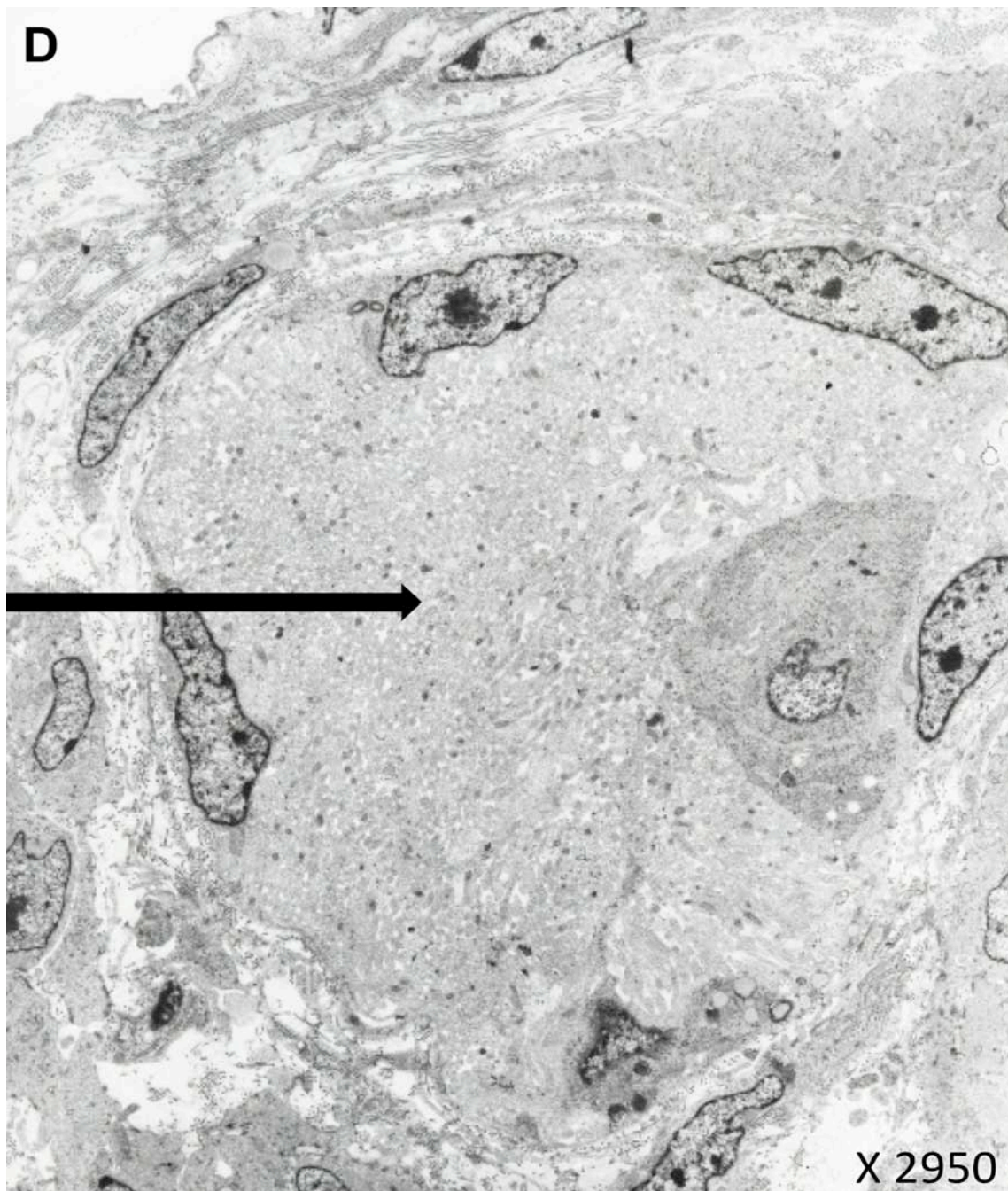
Abbildung 21 gibt einen Überblick der Lagebeziehung des Plexus zu den einzelnen Schichten innerhalb der Darmwand. In der rechten oberen Bildhälfte sieht man einen Ausschnitt aus dem Stratum longitudinale, der scharf an das Stratum zirkulare grenzt. Im Stratum longitudinale der Tunica muscularis befindet sich ein Ganglion des PM mit unten angrenzender intramuraler Vene (Punkt) sowie ober- und unterhalb des PM jeweils eine Arterie (Kreuz). Ultradünnschnitt 80 μm

Kontrolle: Plexus myentericus

**Abbildung 22. Aufbau Plexus myentericus; Kontrolle Tag 19**

Morphologisch gleicht der PM einer organisierten Lamelle innerhalb der longitudinalen Muskelschicht, separiert durch sich verbindende Septen, welche in Kontinuität mit den longitudinalen äußeren und den zirkulären inneren Muskelzellen stehen. Der PM hat eine ovale Form. Innerhalb der Ganglien sieht man Anschnitte von Ganglion- und Gliazellen (Remak-Zellen) sowie zahlreiche quer angeschnittene nicht myelinisierende Axone, die das Hauptvolumen der Ganglien ausmachen. Es ist deutlich eine scharfe Abgrenzung der Ganglien von ihrer Umgebung zu erkennen. Diese Abgrenzung wird von Bindegewebe und den ICC gebildet, die den PM umlagern, ohne ihn zu penetrieren, und dabei ein dichtes Netzwerk erstellen. Hier ein ICC mit typisch schmalen Zellkörper, zwei Nervenfortsätzen sowie länglich glatten Zellkern. Ultradünnschnitt 80 μm

Kontrolle Elektronenmikroskopie: Plexus myentericus

**Abbildung 23. Kontrolle Plexus myentericus Tag 15**

In diesem Anschnitt soll vor allem das Augenmerk auf die Axonmasse innerhalb des PM gerichtet werden. Die sich innerhalb des PM befindenden nicht myelinisierenden Axone sind in den Kontrollschnitten zahlreich und flächendeckend vertreten, hier sichtbar an einem Kontrollschnitt Entwicklungstag 15. Vereinzelt Nachweis von Ganglien- und Remak-Zellen, welche eingebettet zwischen den Axonen liegen. Remak-Zellen unterscheiden sich von Ganglienzellen durch ein flächiger ausgebreitetes Zytoplasma. Der Nukleolus der Remak-Zellen weist eine sehr viel höhere Elektronendichte auf. Ultradünnschnitt 80 μm

Kontrolle Elektronenmikroskopie: Plexus submucosus

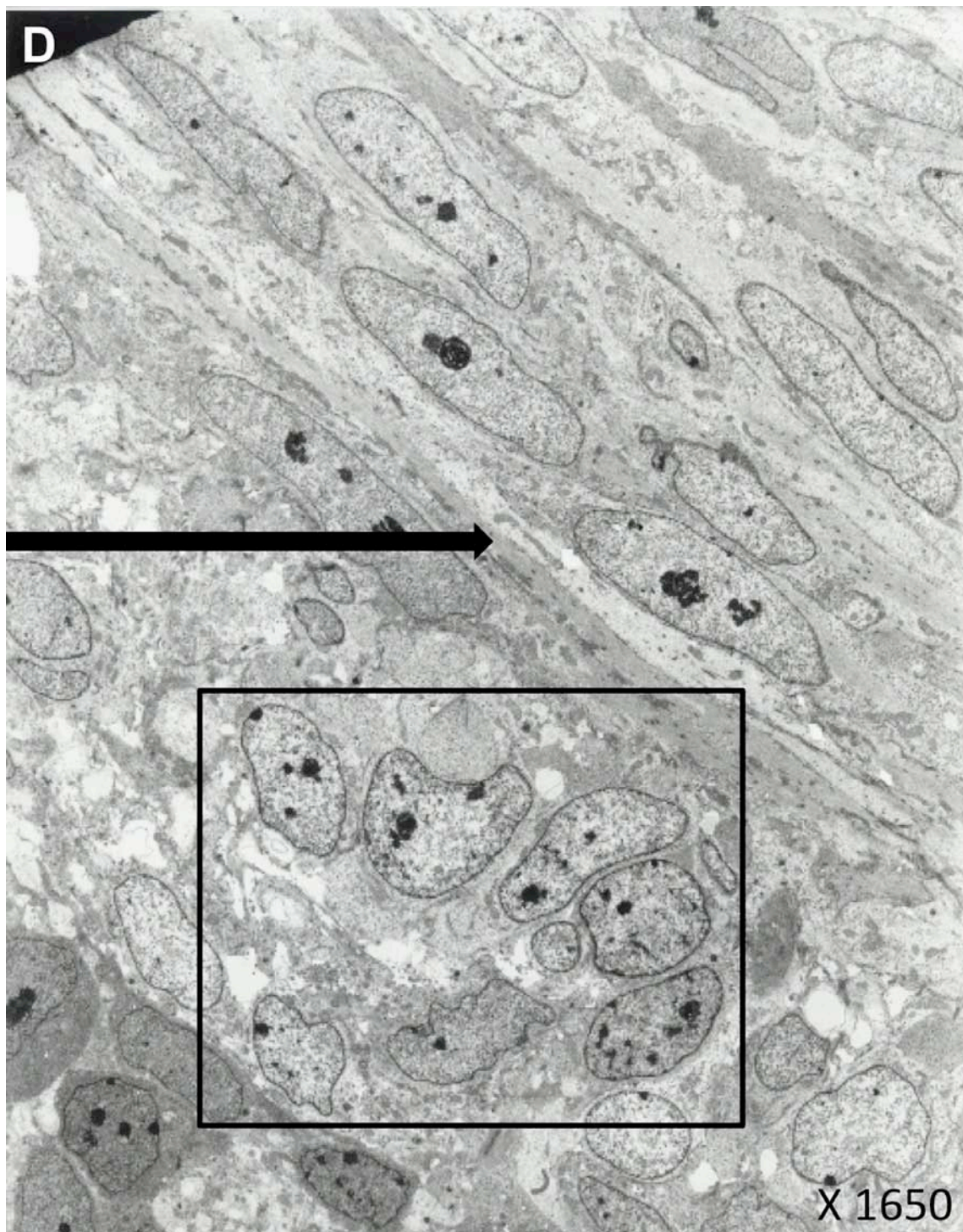


Abbildung 24. Kontrolle Plexus submucosus Tag 15

Der schwarz umrandete Ausschnitt zeigt Ganglienzellen des PS innerhalb der Tela submucosa. Das Bindegewebe grenzt hier scharf an die Tunica muscularis des Stratum circulare. Die Ganglienzellen des PS liegen hier eingebettet in locker-fasriges Bindegewebe, noch oberhalb der Basalmembran. Ultradünnschnitt 80 μm

Kinetik Elektronenmikroskopie: Plexus myentericus Tag 12 proximal

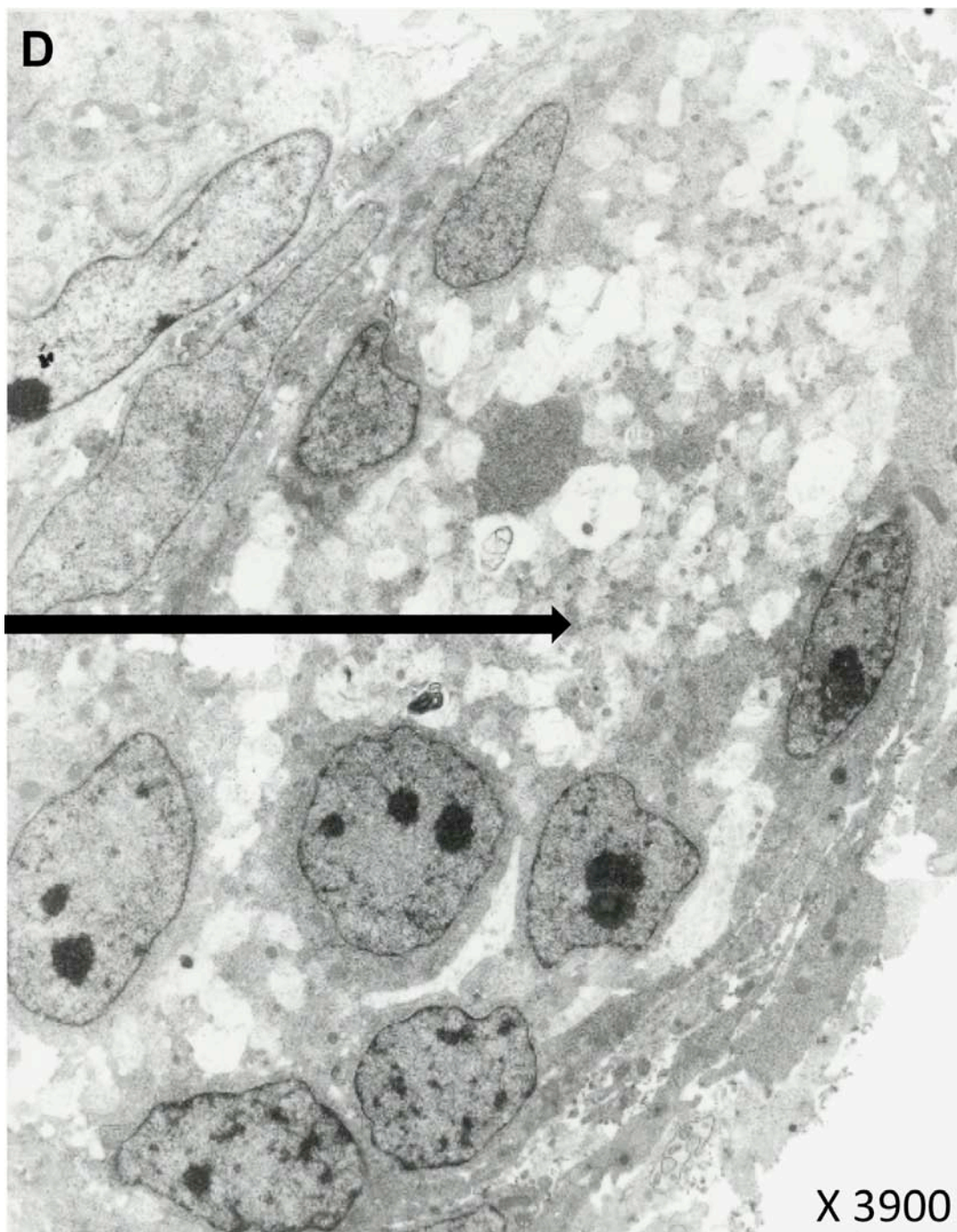


Abbildung 25. Kinetik V1 Tag 12; Plexus myentericus proximal

Im frühen Entwicklungsstadium Tag 12 proximal und distal (Abbildung 26) der Ligatur zeigt sich im Aufbau des PS im Vergleich zum distalen Abschnitt wenig Unterschied. Die Anzahl der nicht myelinisierenden Axone ist anfangs deutlich reduziert (siehe Pfeil) und nicht flächendeckend innerhalb des PM nachzuweisen. Dies ändert sich in den nachfolgenden Entwicklungstagen zunehmend. Hingegen sind Ganglien- und Remak-Zellen vergleichbar wie in den Kontrollschnitten vertreten. Ultradünnschnitt 80 μm .

Kinetik Elektronenmikroskopie: Plexus myentericus Tag 12 distal

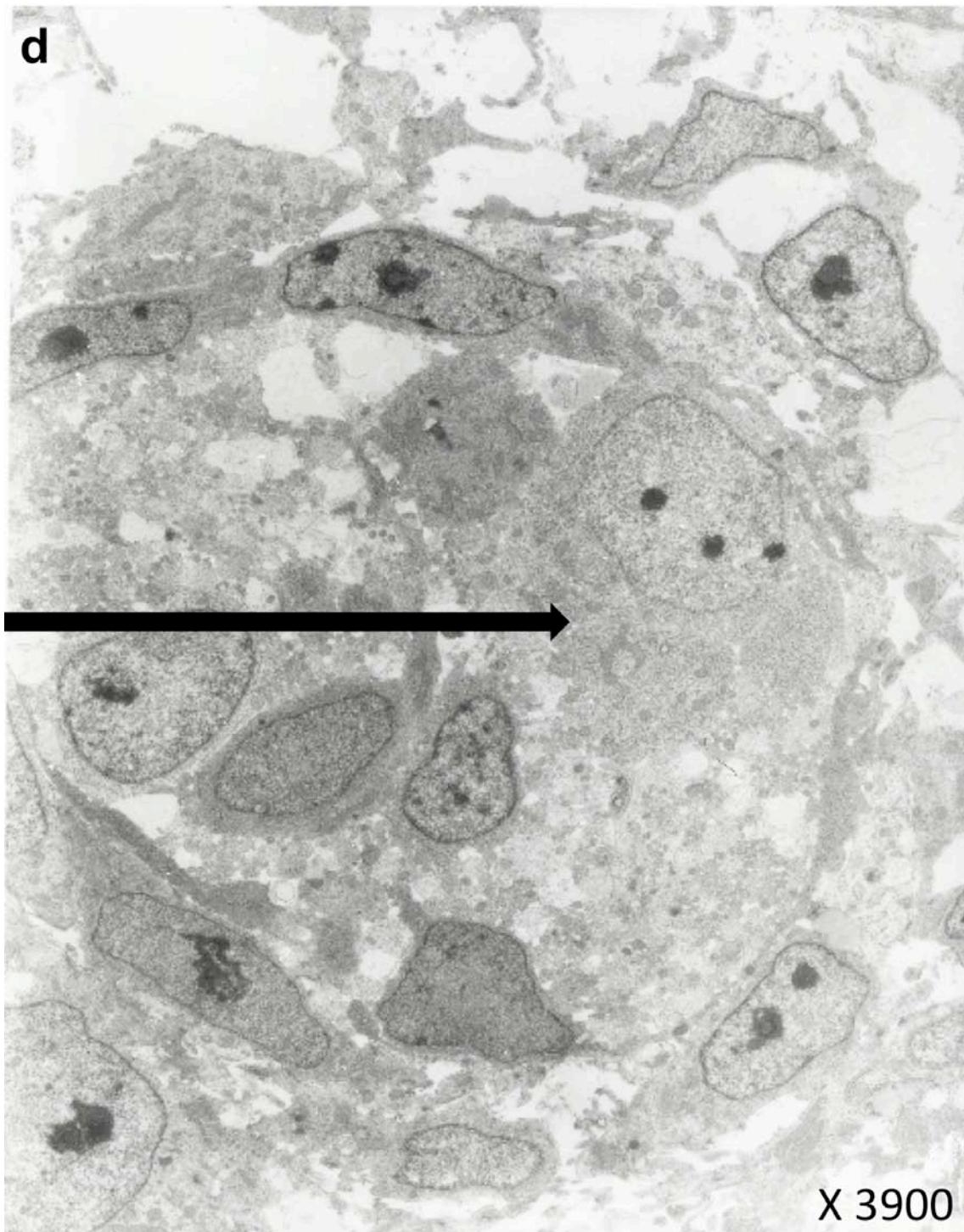


Abbildung 26. Kinetik V1 Plexus myentericus Tag 12 distal
Ein weiteres Ganglion des PM. Ultradünnschnitt 80 μm

Kinetik Elektronenmikroskopie: Plexus myentericus Tag 19 proximal

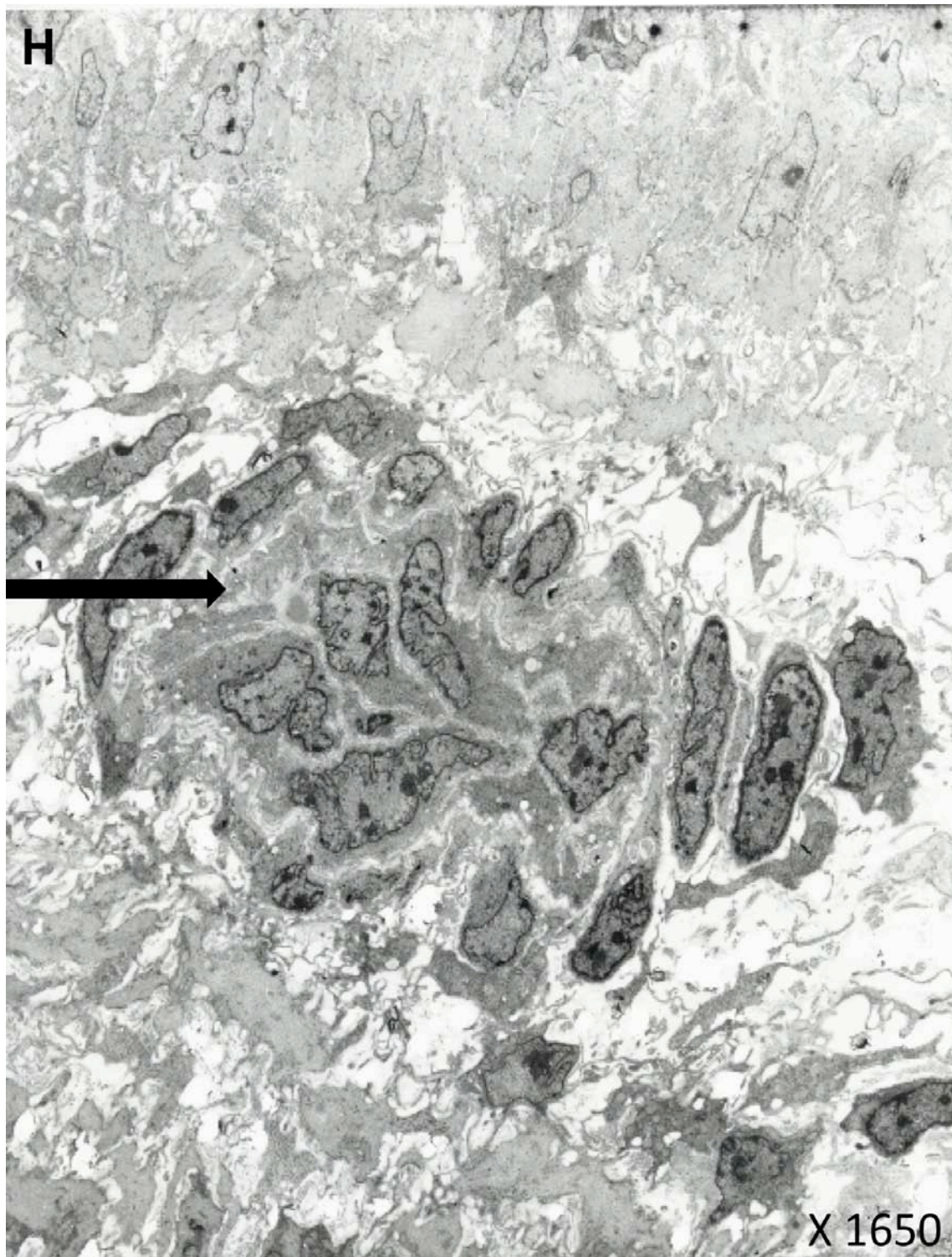
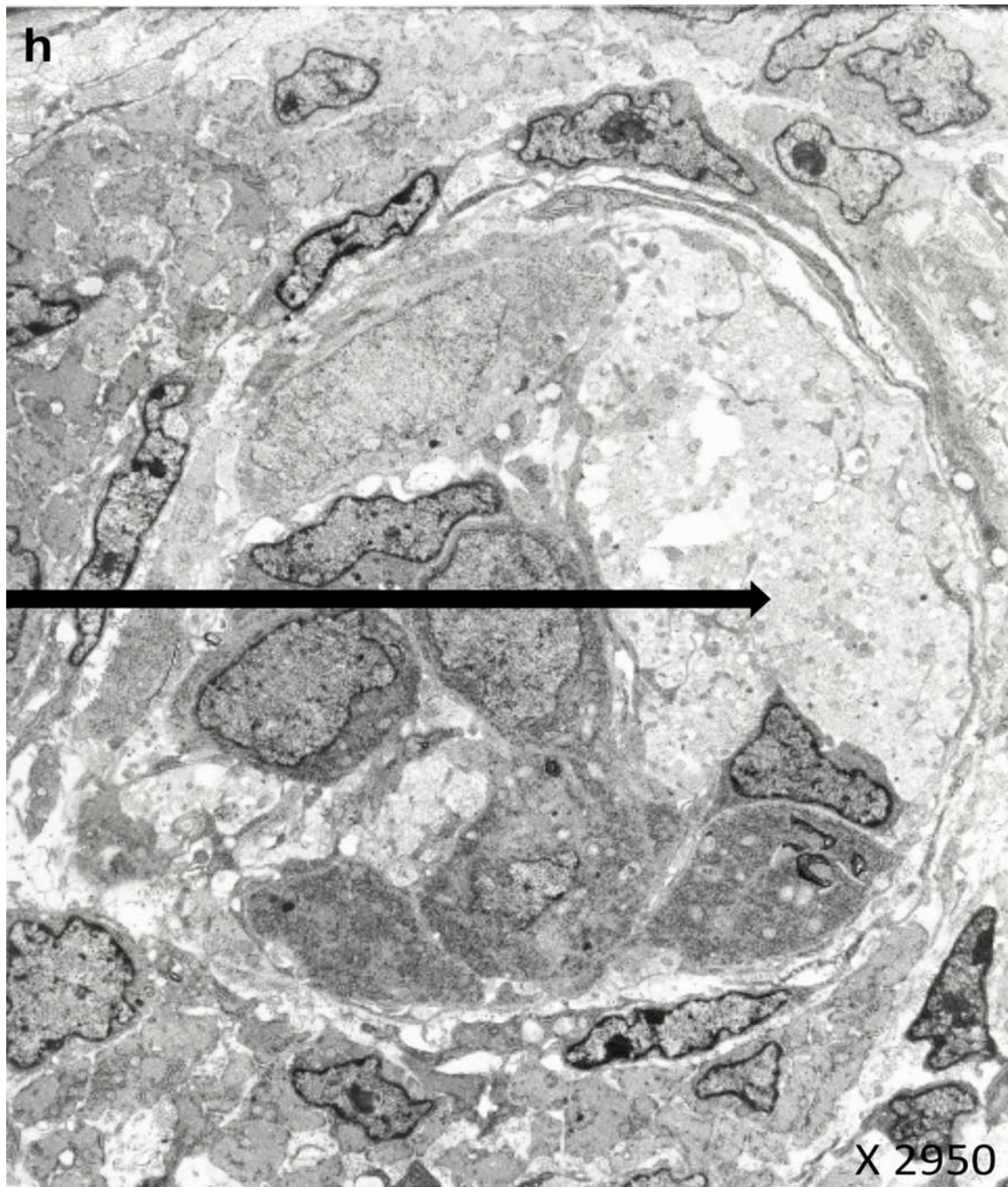


Abbildung 27. Kinetik V1; Plexus myentericus Tag 19 proximal

Der vorliegende Querschnitt zeigt ein Ganglion des PM aus dem oral der Atresie gelegenen Darmabschnitt. Die Ganglien des PM sind deutlich in ihrer Morphologie verändert. Während sie in den Kontrollen eher als elipsoide Haufen imponieren, zeigen sie sich hier als längliche, zum Teil extrem lange Ansammlungen von Ganglienzellen. Die Anzahl der zwischen den Ganglien liegenden und sie umgebenden Axone ist

gegenüber den Kontrollen deutlich vermindert, bis hin zu einem völligen Untergang. Dies hat die Folge, dass durch Verlust der ausfüllenden homogenen Axonmasse die zurückbleibenden Ganglien- und Remak-Zellen sich häufig berühren und das Ganglion in sich zusammengezogen erscheint. Die Orientierung der Achsen von Nerven- und Gliazellen steht senkrecht zum Lumen ausgerichtet, anders als bei den Kontrollen.
Ultradünnschnitt 80 μm

Kinetik Elektronenmikroskopie: Plexus myentericus Tag 19 distal

**Abbildung 28. Kinetik V1; Plexus myentericus Tag 19 distal**

Im aboral der Ligatur gelegenen PM ist der Aufbau der Ganglienstruktur weitestgehend vergleichbar mit dem PM aus Kontrollschnitten mit typisch ovaler Ganglienform, zahlreichen Ganglien- und Gliazellen und den zwischen ihnen gelegenen Axonen, die zahlreich vertreten sind. Proximal dem PM anliegend eine ICC mit umrahmenden Ausläufern entlang des Ganglions. Ultradünnschnitt 80 μm

4.2 Regenerationsfähigkeit des enterischen Nervensystems

4.2.1 Regenerationsfähigkeit des ENS: Makroskopie



Abbildung 29. Fotodokumentation der Größenverhältnisse proximal und distal der induzierten Atresie (weißer Pfeil), nach Entfernung der Ligatur

Die oben gezeigte Abbildung gibt makroskopisch die Größenverhältnisse nach Entfernung am Tag 15 wieder. Der weiße Pfeil markiert die ehemalige Position der Ligatur mit sichtbarer Einengung des Lumens, bei noch erhaltener Darmkontinuität. Der proximale Darmabschnitt ist im Vergleich zum distalen Anteil um etwa das Dreifache vergrößert. Der proximal der Ligatur gelegene Darm lässt eine deutliche Zunahme der Gefäßzeichnung erkennen

4.2.2 Regenerationsfähigkeit des ENS: Acetylcholinesterase

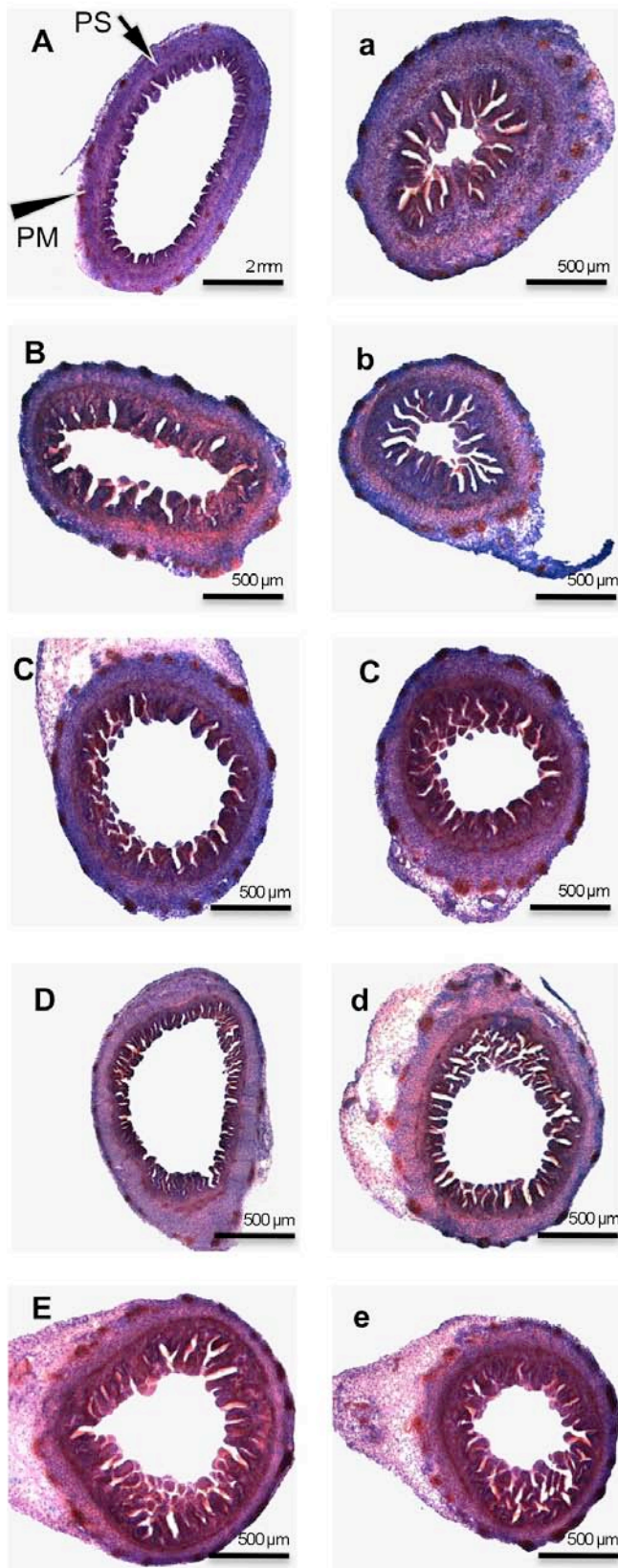


Abbildung 30. V2
Übersichtsfärbung im
Querschnitt, AChE-Färbung
Tag 15–19 proximal (Bild A,
B, C, D, E) und distal (Bild
a, b, c, d, e) nach
Entfernung der Ligatur und
viertägiger Weiterbe-
brütungszeit

Bild A im proximalen Darmabschnitt zeigt eine unregelmäßige Verteilung der AChE mit im Vergleich zu den Kontrollen und distalen Wandabschnitten weit auseinanderliegenden Abständen der einzelnen Plexus. Das Darmlumen ist erweitert. Die Zotten erscheinen abgeflacht. Eine Abnahme des Enzymsignals erscheint im PS und im PM abgebildet (Bild A). Die Verteilung der AChE im Übersichtsbild zeigt sich proximal abhängig von dem Ausmaß der Dilatation und nimmt am Ende, nach viertägiger Regenerationszeit, wieder Normalverhältnisse an (Bild E) mit regelrechter Verteilung von AChE, vergleichbar mit den Kontrollen. Die Enzymverteilung im PS und PM distal, nach Lösen der Ligatur ist in allen Bildern (siehe a, b, c, d, e) vergleichbar mit den Kontrollen. Gefrierschnitte 8 µm; Färbung AChE

4.2.3 Regenerationsfähigkeit des ENS: Versilberung nach Späthe

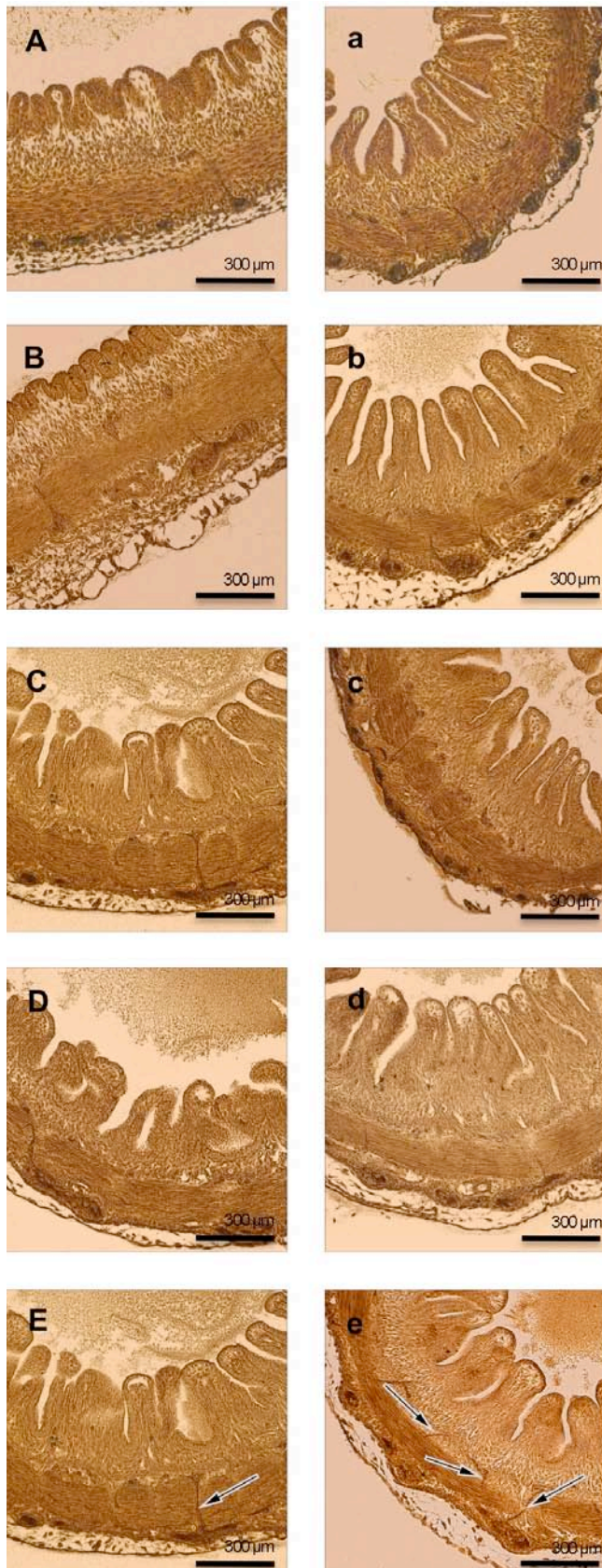


Abbildung 31. V2
Versilberungstechnik im
Teilquerschnitt, Tag 15–19
proximal (Bild A, B, C, D, E)
und distal (Bild a, b, c, d, e)
nach Entfernung der
Ligatur und viertägiger
Weiterbebrütungszeit

Auch hier zeigen sich Rarifizierungen der kommunizierenden Nervenverbindungen zwischen PS und PM, am stärksten ausgeprägt am Tag 15 proximal der Ligatur (Bild A). Diese Veränderungen/Rarifizierungen sind abhängig von der Stärke der Dilatation der Darmwand. Mit ausreichender Regenerationszeit (Bild C und E) bildet sich ein regelrechtes Nervennetzwerk zwischen den Plexus aus, vergleichbar mit Kontrollschnitten. Im distalen Darmabschnitt sind von Anfang an multiple nervale Netzwerkverbindungen nachzuweisen (Bilder a, b, c, d, e).

Paraffinschnitt 6 µm;
 Versilberung nach Späthe

4.2.4 Regenerationsfähigkeit des ENS: Elektronenmikroskopie

Regenerationsfähigkeit des ENS: Plexus myentericus Entwicklungstag 19 proximal

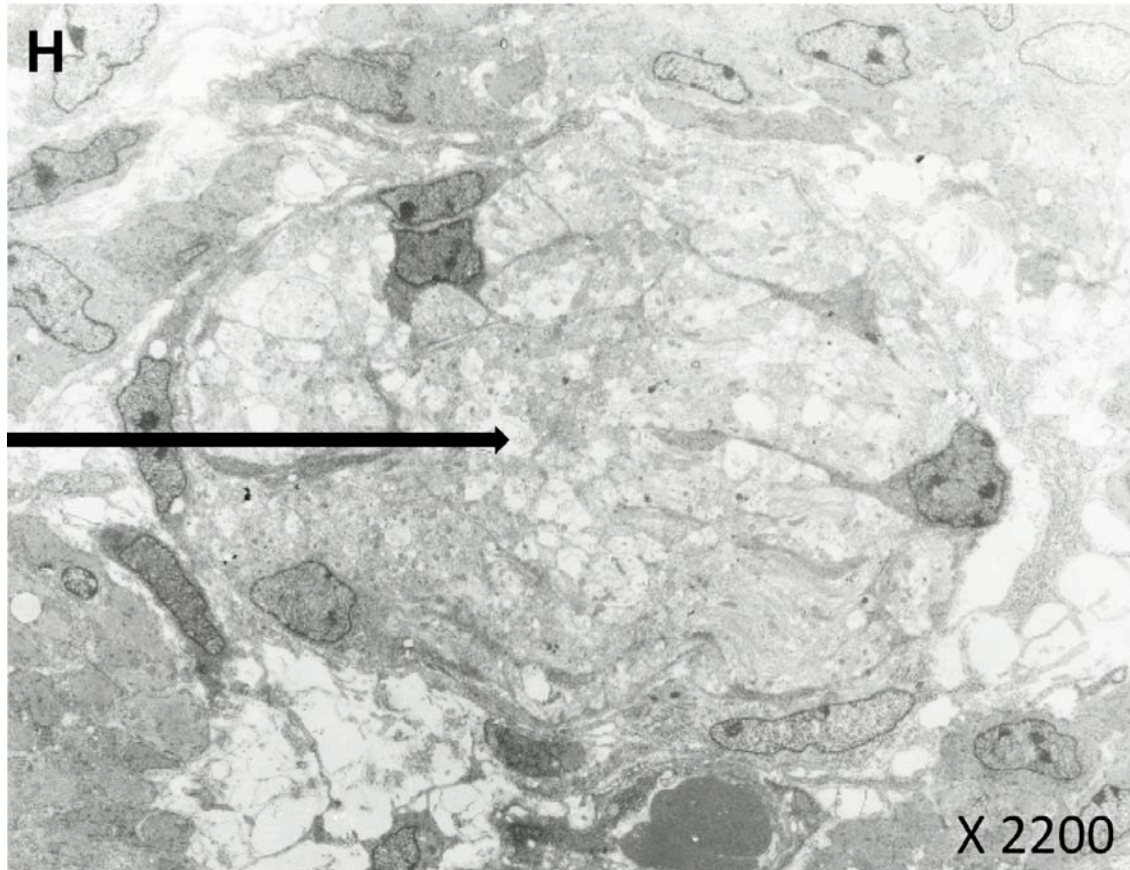


Abbildung 32. Darstellung des Plexus myentericus eines 19 Tage alten Hühnerembryos im proximal gelegenen Darmabschnitt nach Lösen der Ligatur und anschließender viertägiger Weiterbebrütungszeit

Vergleicht man das oben abgebildete Ganglion Tag 19 nach Lösen der Ligatur und anschließender viertägiger Regenerationszeit mit einem Ganglion von Tag 19 ohne Entfernung der Ligatur (Versuchsreihe 1; Abbildung 27), entsteht auf den ersten Blick der Eindruck einer erhaltenen Ganglienstruktur mit regelrecht ausgerichteten Nerven- und Gliazellen und nachweislich vorhandenen, nicht myelinisierenden Axonen. Die Remak- bzw. Gliazellen erscheinen hier vermehrt vorhanden, was auf eine vermehrte Reparatur und Proliferation deuten lässt. Diese Beobachtungen sind nur auf zellulärer Ebene mithilfe der EM nachweisbar und nicht aus vorangegangenen Methoden (AChE, Versilberung oder der Semidünnschnitttechnik) erkennbar. Ultradünnschnitt 80 μm

Regenerationsfähigkeit des ENS: Plexus myentericus Tag 19 distal

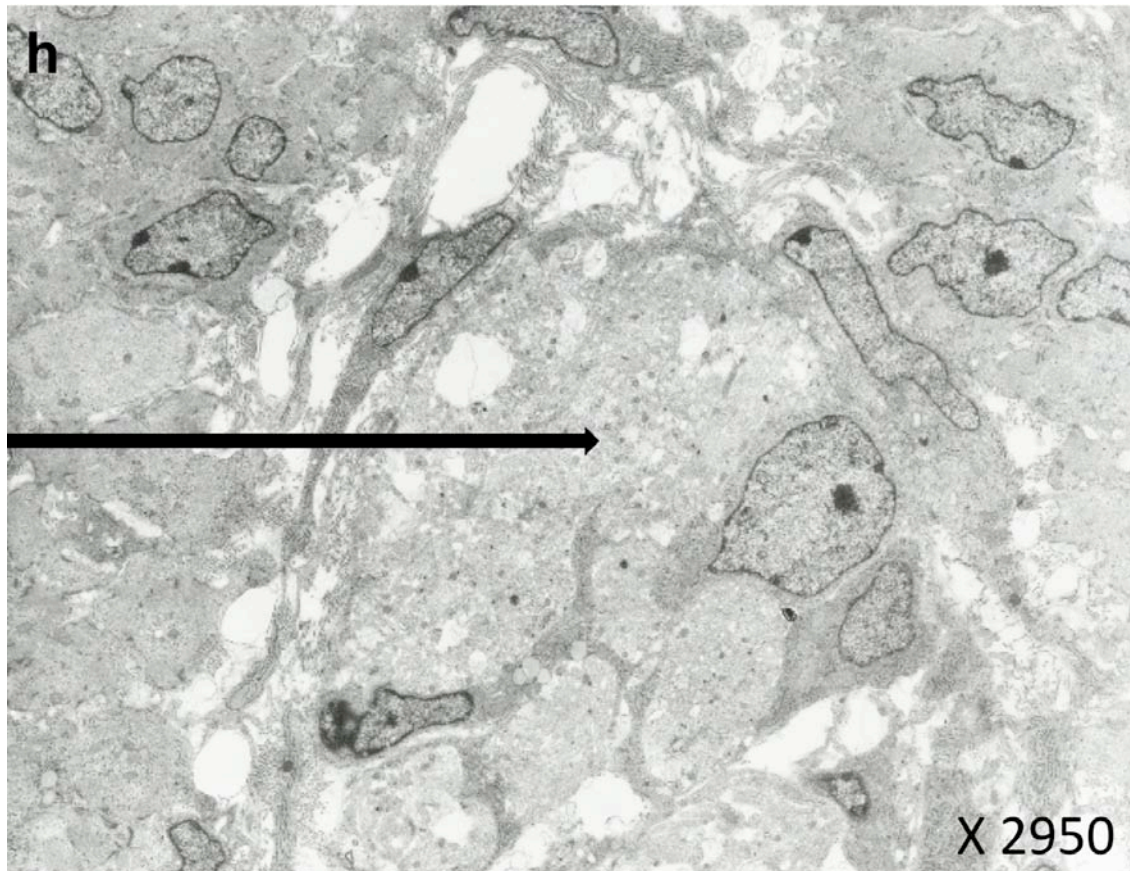


Abbildung 33. Darstellung des Plexus myentericus eines 19 Tage alten Hühnerembryos im distal gelegenen Darmabschnitt nach Lösen der Ligatur und anschließender viertägiger Weiterbebrütungszeit

In dieser Abbildung ist mittig ein Ganglion des Plexus myentericus aus einem aboral der operativ erzeugten Atresie gelegenen Darmabschnitt abgebildet, nachdem die Ligatur nach viertägigem Verbleib gelöst und das Ei anschließend für vier Tage weiterbebrütet wurde. Der PM zeigt einen regelrechten Aufbau, vergleichbar mit Kontrollschnitten. Es finden sich Ganglienzellen mit großen, runden Zellkernen sowie Remak-Zellen mit kleinen, unregelmäßig geformten Zellkernen, die eine Vielzahl von Axonen mit ihrem Zytoplasma umschließen (Pfeil). Links oben liegt eine ICC dem PM an. Ultradünnschnitt 80 μm

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, folgende Fragen zu beantworten:

- 1.) Wie wirkt sich die Induktion einer Darmligatur am Hühnerembryo während der Fetalzeit auf die Entwicklung des ENS aus?
- 2.) Welche genauen morphologischen Veränderungen werden im ENS nach der Induktion der Obstruktion bis hin zur Ausbildung der Atresie im zeitlichen Verlauf beobachtet?
- 3.) Sind diese Veränderungen reversibel, wenn die Prozesse zur Atresieentwicklung hin unterbrochen werden?

Die Beantwortung der Fragen befindet sich am Ende der Diskussion in der Zusammenfassung.

Dazu ist es notwendig, ein eindimensionales Tiermodell zu verwenden, bei dem der Zusammenhang von Ursache und Wirkung leichter abzuschätzen ist. Aus diesem Grunde erfolgte der Entschluss, ein Modell zu entwickeln, bei dem die Darmwanddilataion das hauptsächlich pathogenetische Moment darstellt. Andere Einflüsse, wie zum Beispiel primäre Ischämien, sollten ausgeschlossen sein. Zusätzlich sollte die Operationstechnik standardisiert und leicht reproduzierbar sein. Aus diesem Grund ist das Hühnerembryonenmodell gewählt worden.

5.1 Modell Hühnerembryo

Tibboel (Tibboel, Molenaar and Van Nie 1979) hat 1979 das von Louw und Barnard (1955) inaugurierte Ischämie-Modell beim Hühnerembryo angewandt. Er konnte Atresien nachweisen, wodurch das Modell Hühnerembryo ins Blickfeld der experimentellen Atresie-Forschung geriet.

Das Modell hat wesentliche Vorteile gegenüber einem Säugetiermodell:

- geringe Beschaffungskosten
- geringe Haltungskosten

Nach der Operation kann der weitere Verlauf mit der Entstehung der Atresie durch die Fenestrierung der Eierschale leicht beobachtet werden.

Folgeeingriffe sind am selben Tier prinzipiell problemlos möglich, was in der vorliegenden Arbeit für die Beantwortung der Frage nach der Reversibilität einer einmal induzierten pathologischen Veränderung im ENS besonders wichtig ist.

Ein weiterer großer Vorteil gegenüber Säugetiermodellen ist der einfache operative Zugang durch die Eierschale. Somit kann ein Großteil von möglichen Komplikationen umgangen, die Anzahl der Tierversuche potenziell verringert und die Zahl der analysierbaren Proben gesteigert werden. Die Versuche selbst haben eine kurze Laufzeit. Fetale Eingriffe sind am Hühnermodell möglich ohne Mitoperation der Muttertiere.

5.2 Makroskopische Befunde

Die durch die Operation erzeugten Atresien ähneln makroskopisch stark den beim Menschen vorkommenden Atresien im Bereich des Jejunum und Ileum.

In dieser Arbeit sind nach dem 16. Tag (Tag 16, 17, 18 und 19) insgesamt 40 Atresien nachgewiesen worden. Vor dem 16. Tag kam es lediglich zum Nachweis von Stenosen (Lumeneinengungen) im Bereich der Ligatur. Ursache war in diesem Fall die noch nicht ausreichende Wanddicke vor dem 16. Entwicklungstag. Ab dem 14. Tag war jedoch eine Darmdilatation im vor der Ligatur gelegenen Darmabschnitt zu erkennen, die am Tag 15 deutlich ausgeprägt war.

Als Folge der Atresie-Induktion konnten drei unterschiedliche Atresietypen unterschieden werden (Tabelle 3):

Von den 40 beobachteten Atresien entsprachen 33 dem Typ I (Bland and Sutton 1889). Teilweise war eine eindeutige Zuordnung zu der Typisierung nach Bland und Sutton nicht immer möglich, da das fibröse Band zwischen den beiden Darmsegmenten, welches den Typ II nach Bland und Sutton charakterisiert, bei der Präparation des Embryos leicht zerrissen werden konnte.

Typ I, II und IIIa wurde in unterschiedlicher Häufigkeit wie folgt gefunden:

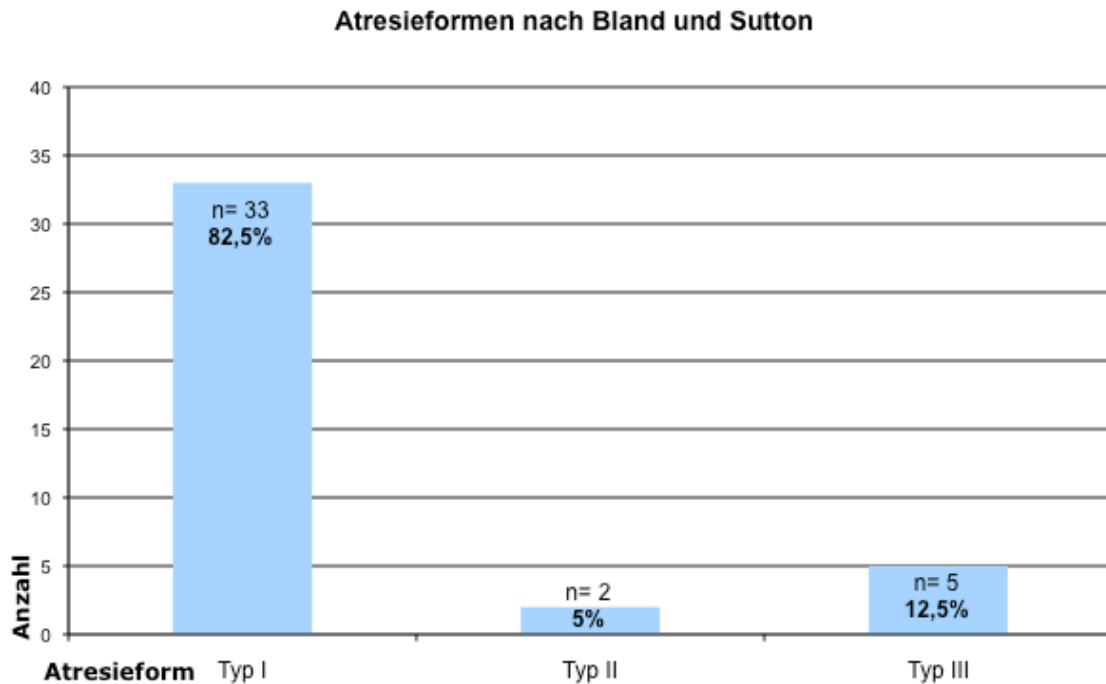


Tabelle 3. Häufigkeitsverteilung der Atresietypen

Aus der oben beschriebenen Beobachtung ergab sich für die Versuchsreihe 2, dass die Beseitigung der Ligatur vor dem 16. Tag, d. h. vor Ausbildung der Atresie erfolgen musste.

5.3 Wahl der histologischen Techniken

Mit ausschlaggebend für die Wahl der immunhistochemischen und histochemischen Marker waren vorangegangene Studien am Hühnermodell, in denen selektive Färbemethoden erfolgreich angewendet worden waren (Schoenberg and Kluth 2002); (Parisi Salvi et al. 2004). Bei der Auswahl der histologischen Techniken (Tabelle 4) wurde der Schwerpunkt auf die Morphologie der Darmwand und auf das Sichtbarmachen der einzelnen Komponenten des ENS gelegt (Abbildung 34).

Methode	Darstellung	Untersuchung
Histochemie	Acetylcholinesterase	morphologisch
Versilberungstechnik	Axongeflecht und Ganglien	morphologisch
Semidünnschnitttechnik	Axongeflecht und Ganglien	morphologisch
TEM	Ganglienzellen	morphologisch

Tabelle 4. Übersicht über die verwendeten Färbetechniken

Die Abbildung 34 zeigt schematisch das ENS in typischer Anordnung und Organisation.

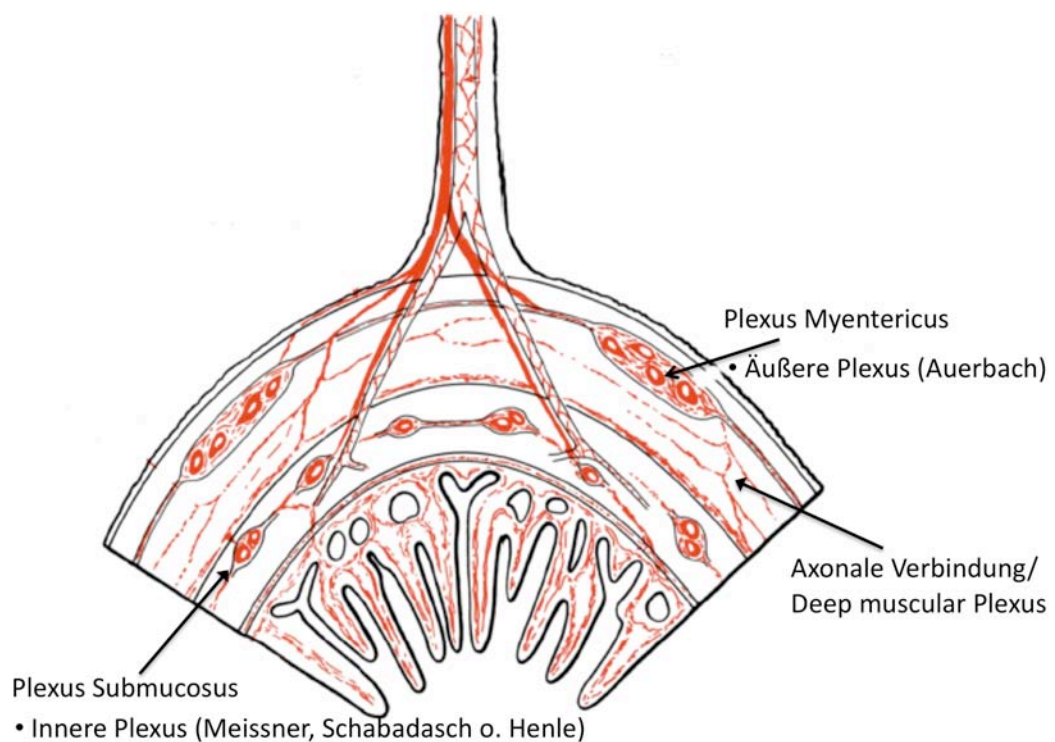


Abbildung 34. Schematischer Querschnitt der Darmwand mit ENS-Komponenten (modifiziert nach Sobotta 1993)

Es wird angenommen, dass Veränderungen im Plexus myentericus eine größere Auswirkung auf die Darmmotilität haben als die im Plexus submucosus, da dieser schwerpunktmäßig für Prozesse bei der Resorption und Sekretion verantwortlich ist

(Vanderwinden and Rumesen 1999). In dieser Arbeit wurden daher besonders Veränderungen im Plexus myentericus untersucht.

5.3.1 Acetylcholinesterasefärbung

Die enzymhistochemischen Reaktionen für Acetylcholinesterase (AChE), Laktatdehydrogenase, Succinatdehydrogenase und Nitroxidsynthetase bilden gegenwärtig den Goldstandard bei der histologischen Diagnose gastrointestinaler Motilitätsstörungen.

Erstmals wurde von Dale im Jahre 1914 die Wirkung der AChE beschrieben (Dale 1914). Nachmansohn und Rothenberg zeigten die Spezifität der Esterasen für das Substrat Acetylcholin (ACh) (Nachmansohn and Rothenberg 1945) und reinigten die AChE erstmals aus dem elektrischen Organ des Zitteraales auf. Die Erregungsübertragung zwischen Nerven und den nachgeschalteten Nerven-, Muskel oder Drüsenzellen erfolgt an den Synapsen durch Ausschüttung chemisch definierter Überträgerstoffe, sogenannter Neurotransmitter, in den synaptischen Spalt. Zu den wichtigsten Überträgerstoffen zählt das Ester Acetylcholin, welches eine große Rolle im vegetativen Nervensystem und bei der neuromuskulären Übertragung spielt. An der postsynaptischen Membran cholinergere Synapsen befindet sich in räumlicher Nähe zum ACh-Rezeptor die Acetylcholinesterase, die das ACh in Essigsäure und Cholin enzymatisch spaltet, wobei der Serinrest des Enzyms zuerst acetyliert und Essigsäure später hydrolytisch freigesetzt wird. Cholin wird wieder in das Axon aufgenommen und für die Resynthese des ACh genutzt.

Nach Aufbringen eines löslichen Substrates auf einen Gewebeschnitt entsteht bei Anwesenheit der entsprechenden ACh-Enzymaktivität im Gewebe ein unlöslicher Farbstoff. Lichtmikroskopisch lassen sich so cholinerge Nervenfasernetze der Muscularis mucosae und Muscularis propria darstellen. Da eine Gewebefixierung mit einem Enzymaktivitätsverlust einhergeht, können enzymhistochemische Untersuchungen nur am unfixierten Gefrierschnitt durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Anwendung dieses Verfahrens die Verteilung der intestinalen Neurone im Darmquerschnitt untersucht, die diese Enzyme produzieren.

5.3.2 Versilberungstechnik nach Späthe

Späthe beschreibt 1991 den Mechanismus einer Axonversilberungsmethode für Paraffinschnitte (Späthe 1991). Mit Silbernitrat imprägniertes Nervengewebe im Gewebeverband wird dabei durch das Anlagern von Silberionen im Gewebe durch einen Reduktionsprozess der Silberionen in metallisches Silber sichtbar gemacht. Mit dieser Methode gelang es, Nervengewebe sowohl des zentralen als auch des peripheren Nervensystems mit großer räumlicher Auflösung darzustellen. Späthe modifizierte die Richardson-Silbermethode (Späthe 1984), welche durch starkes Mitimprägnieren des Bindegewebes zu erschwerter Interpretation führte und mangelnde Spezifität zur Folge hatte. Das grundsätzliche Verständnis der chemischen Grundlagen der Silberimprägnierungstechnik ist noch nicht verstanden. Man weiß aber, dass erst durch genau definierte Behandlung des Gewebes (Standardprotokoll nach Späthe) die Anfärbung erzeugt wird, diese also eine nicht von vornherein bestehende Gewebeeigenschaft ist. Seither werden mit gutem Erfolg die Axone im peripheren Nervensystem in verschiedenen Geweben (Haut, Gelenkkapseln, Bänder, Verdauungstrakt, Nebennieren) sowie zentrales und peripheres Nervensystem von Säugetieren und Vögeln dargestellt (Stach 1980); (Stach 1981).

Die Axone färben sich vor hellgelbem bis gelbbraunem Hintergrund schwarz bis schwarzbraun. Sie sind bis in feinste Verästelungen gut differenzierbar. Die neuroglialen Gewebeanteile färben sich nur schwach braun, sodass eine Unterscheidung keine Schwierigkeiten bereitet. Das Bindegewebe nimmt goldgelbe bis hellbraune Tönung an.

Das Sichtbarwerden der Nervenzellen im Gewebeverband erlaubt eine Beurteilung der ultrastrukturellen Veränderungen von PS und PM und ihre Beziehung zueinander in Bezug auf die Induktion der Ligatur und lässt somit Rückschlüsse auf den Zusammenhang der Motilitätsstörungen und den Aufbau des ENS zu. Die Versilberung wird bis heute in der Erforschung des ENS als unverzichtbare Technik angewendet (Brehmer et al. 1999).

5.3.3 Semidünnschnittechnik und Transmissionselektronenmikroskopie

Die Semidünnschnittechnik hat gegenüber allen paraffinhistologischen Techniken den Vorteil, dass die Schrumpfung des Gewebes durch die Fixierung mit Glutaraldehyd

gering und die Ultrastruktur des Gewebes gut erhalten bleibt. Daher wird eine zytologische Diagnostik neben der mikroanatomisch histologischen Untersuchung am gleichen Schnitt möglich (Holstein and Wulfhegel 1971). Störende Artefakte und unterschiedliche Schrumpfung der Gewebe, bedingt durch ihren unterschiedlichen Gehalt an Wasser und Fett, sind bei dieser Technik praktisch nicht zu erwarten. Durch die Dicke der Schnitte von nur etwa 1–1,5 μm lassen sich optische Überlagerungen verschiedener Strukturen minimieren.

Zur besseren Orientierung wurden zunächst Semidünnschnitte angefertigt, um dann nach sorgfältiger Selektion aussagekräftiger Gewebeproben eine Auswahl für die Untersuchung des Plexus myentericus im Ultradünnschnitt durchführen zu können. Durch Anwendung der Transmissionselektronenmikroskopie wurde besonderes Augenmerk auf den Plexus myentericus gelegt und zur Identifikation unterschiedlicher Zellen herangezogen. Dies erlaubt eine Beurteilung der pathologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene. Sie dient auch als Goldstandard zur Untersuchung der interstitiellen Zellen nach Cajal.

5.4 Mikroskopische Befunde

Eine Reihe von klinischen und experimentellen Studien zur intestinalen Atresie zeigt deutliche Veränderungen im ENS. Im präatretischen Teil kindlicher Dünndarmatresien beobachtete Willnow (Willnow 1977) ausgeprägte regressive Veränderungen der intramuralen Plexus. Watanabe (Watanabe et al. 2001) beschreibt eine milde Hypoplasie des ENS im proximalen Segment der Atresie bei Neugeborenen. Ähnliche Beobachtungen wurden von Collure und Hameer (Collure and Hameer 1996) veröffentlicht. Sie alle berichteten in ihren histologischen Studien bei Patienten mit Dünndarmatresien von pathologischen Veränderungen im ENS im proximalen dilatierten Darmsegment.

Im Tiermodell zeigten Louw und Barnard (1966) an Hundefeten (Louw 1966); (Louw und Barnard 1966), dass es infolge einer lokalen Ischämie bei Dünndarmatresien zu sekundären Veränderungen des ENS kommen kann.

Im Jahr 1999 wurde erstmals eine experimentelle intestinale Atresie durch Koagulation der Mesenterialgefäße am Hühnerembryomodell induziert, was mit Veränderungen im ENS im proximalen dilatierten Segment einherging (Masumoto et al. 1999).

Die immunhistochemische Studie von Parisi (Parisi Salvi et al. 2004) am Hühnerembryonenmodell zeigt nach Atresie-Induktion durch Gefäßkoagulation eine deutliche Abnahme intestinaler Neuropeptide im proximalen, präatretischen dilatierten Teil.

Aus der Arbeit von Schönberg und Kluth geht hervor, dass die Induktion einer Atresie allein durch eine primär nicht einschnürende Ligatur gelingt. Ursache ist das erhebliche Dickenwachstum des Darmes, der praktisch um die Ligatur herumwächst. Die Folge ist eine zunehmende Darmobstruktion, die ab dem 16. Entwicklungstag in einer Atresie münden kann. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass hierfür die Mesenterialgefäße unbeschädigt bleiben und sekundäre Eingriffe bis zum Tag 15 der Entwicklung möglich sind. Auch hier lassen sich im dilatierten präatretischen Darmwandabschnitt deutliche Veränderungen im ENS nachweisen (Schoenberg and Kluth 2002).

Während die meisten Untersuchungen das Augenmerk auf morphologische Veränderungen des ENS bei Neugeborenen lenkten oder im Tiermodell Veränderungen des ENS in späten Fetalstadien untersucht wurden, fehlten bisher Untersuchungen zu morphologischen Veränderungen des ENS in einer Serie aufeinanderfolgender Entwicklungstage, um so während der Entstehung einer Dünndarmatresie zu einer Entwicklungskinetik zu kommen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschreiben erstmals eine solche Kinetik in der Phase der Atresieentstehung.

Die Besonderheit des angewendeten Operationsverfahrens in Kombination mit dem gewählten Tiermodell liegt in der Möglichkeit, die Ligatur am Hühnerdarm zu einem späteren Zeitpunkt zu lösen und somit die Entwicklung zum Vollbild der Atresie hin zu unterbrechen. Die bis zu diesem Zeitpunkt nachweisbaren pathologischen Veränderungen können so weiterverfolgt und daraufhin geprüft werden, ob sich der Zustand des ENS wieder normalisiert, ob also ein mögliches Potenzial zur

Regenerationsfähigkeit des ENS besteht. Die bisher angewandte Technik der irreversiblen Koagulation der Gefäßarkaden lässt eine solche Beobachtung nicht zu.

Die Auswirkung der Obstruktion

Durch die gesetzte Ligatur am Tag 11 wird eine Obstruktion mit Dilatation der vorgeschalteten Darmschlingen induziert. Diese nimmt nach der Atresiebildung erheblich zu, wie die Abbildung 35 zeigt. Der Darmdurchmesser des oralen Darmabschnittes der experimentell erzeugten Dünndarmatresie nimmt im Vergleich zum Darm beim Kontrolltier auf das bis zu 20-Fache an Größe zu

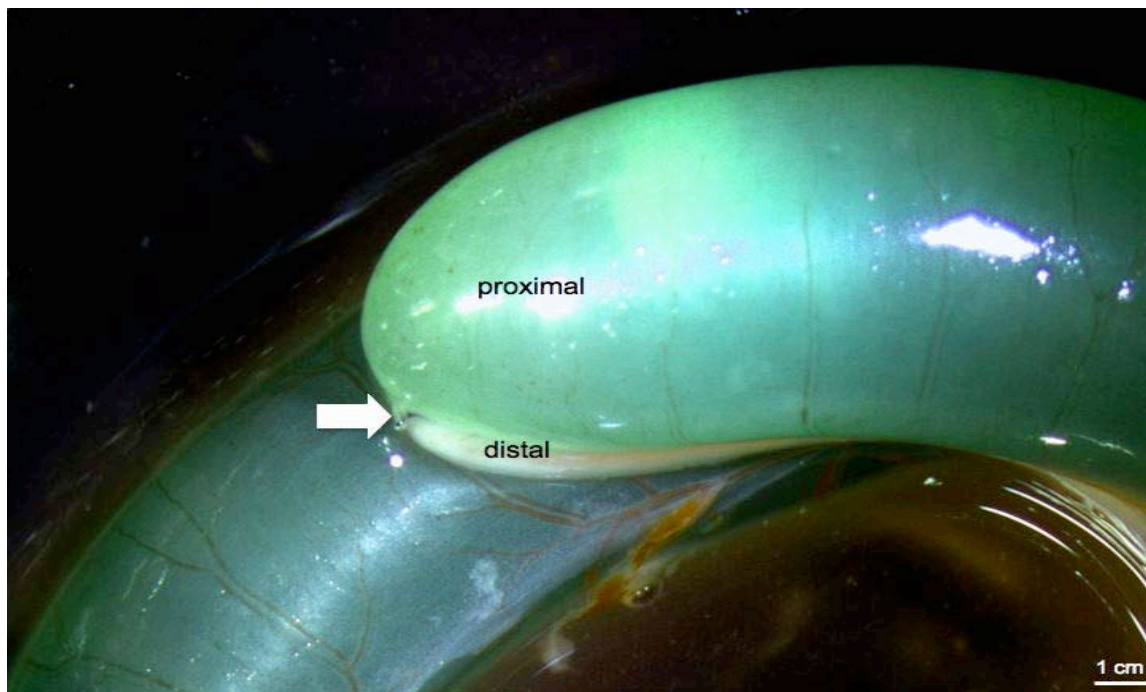


Abbildung 35. Darmwandgrößenverhältnisse, makroskopisch, eines 19 Tage alten Versuchstieres nach Ligaturinduktion vor 8 Tagen (weißer Pfeil)

Der proximale Atresieabschnitt ist bis auf das 20-Fache. Der aborale Darmabschnitt hingegen wird deutlich kleiner, im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, und zeigt im Querschnitt an den späteren Entwicklungstagen eine komplette Lumenverlegung (Abbildung 36). Dies lässt sich mit den ausbleibenden Peristaltikwellen und der fehlenden Wanddehnung durch den Darminhalt erklären. Die erkennbaren Veränderungen im ENS, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, ließen sich in diesem Zusammenhang als morphologisches Korrelat deuten.

Der aborale Darmabschnitt ist dagegen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen deutlich verschmälert. Im Querschnitt scheint eine komplette Lumenverlegung (Abbildung 36) vorzuliegen. Tatsächlich besteht hier noch ein Lumen. Es ist lediglich wegen der mangelhaften Füllung durch Darminhalt nicht ausreichend gedehnt. Die erkennbaren Veränderungen im ENS, auf die im Folgenden näher eingegangen wird, lassen sich in diesem Zusammenhang als morphologisches Korrelat deuten.

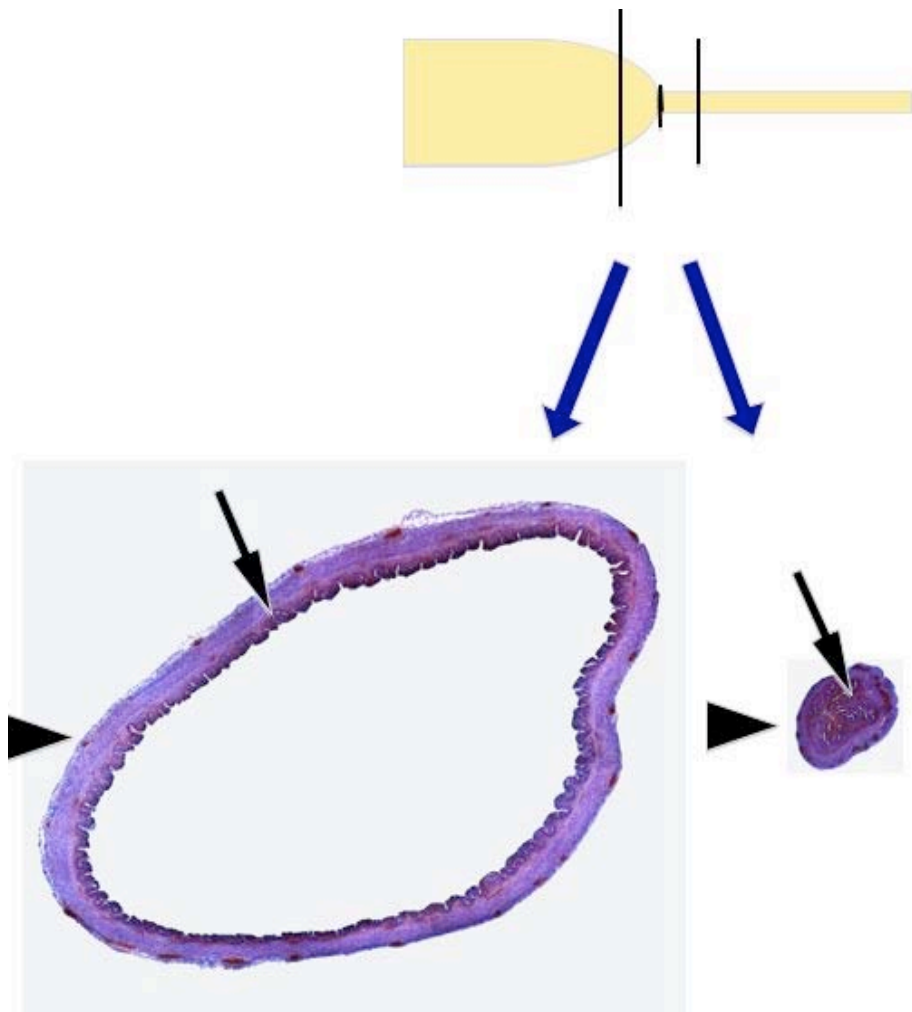


Abbildung 36. Darmwandgrößenverhältnisse im Querschnitt, eines 19 Tage alten Versuchstieres nach Ligaturinduktion vor 8 Tagen

Der proximale Atresieabschnitt ist bis auf das 20-Fache größer im Vergleich zum distalen Darmsegment. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigen im Vergleich zu nicht operierten Kontrolltieren ab dem Entwicklungstag 15 bereits eindeutige morphologische Unterschiede.

Bei den makroskopisch schon erkennbar dilatierten Darmabschnitten proximal der Ligatur kann mithilfe der Acetylcholinesterasefärbung ein Überblick der Verteilung von Plexus submucosus und Plexus myentericus an Gesamtquerschnitten zu den definierten Entwicklungstagen gewonnen werden. Die Unterschiede in der Verteilungsdichte der Plexus sowie die Änderungen in der Form der Ganglien nehmen an späteren Entwicklungstagen deutlich zu. Dagegen erscheint die Verteilung der nervalen Strukturen distal der Ligatur auch im Vergleich zu den Kontrolltieren regelrecht. Aufgrund der hier verwandten Versuchsanordnung ist für die beobachteten Veränderungen im ENS ist eine zunehmende Darmwanddehnung anzunehmen. Dies kann zu einem Auseinanderziehen der Nervengeflechte führen. Abhängig von der Größenzunahme kann es so zu unterschiedlich stark ausgeprägten Rarifizierungen nervaler Strukturen kommen.

Die experimentelle Obstruktion des Ileums eines 6 Wochen alten Hausschweins führte zu einer Hypertrophie intramuraler Ganglienzellen (Brehmer et al. 1999). Dies wurde von Lake als Folge der Dilatation gewertet (Lake 1995).

Parisi et al. beschreiben nach Koagulation der Mesenterialgefäße am Hühnerdarm und konsekutiver Atresieentwicklung ebenfalls Veränderungen am ENS mit reduziertem Nachweis von Substanz P und vaso-intestinales Peptid im dilatierten Darmabschnitt (Parisi et al. 2004).

Die Ergebnisse der Versuchsreihe 2 zeigen, dass es nach Beseitigung der Ligatur am fünfzehnten Bebrütungstag zu einer Normalisierung der Nervengeflechtsanordnung beider Plexus kommt.

Exemplarisch wird dies an den entscheidenden Zeitpunkten gezeigt. Dabei werden die Veränderungen an den Tagen 15 und 19 der ersten Versuchsreihe mit den Befunden am Tag 19 der zweiten Versuchsreihe verglichen.

Als Techniken kommen die Acetylcholinesterasefärbung (Abbildung 37), die Versilberungstechnik (Abbildung 39) und die Transmissionselektronenmikroskopie (Abbildung 40) zur Anwendung.

Abbildung 37 stellt ausgesuchte Ergebnisse mit den beschriebenen Veränderungen an den entscheidenden Entwicklungstagen mithilfe der Acetylcholinesterasefärbung einander gegenüber:

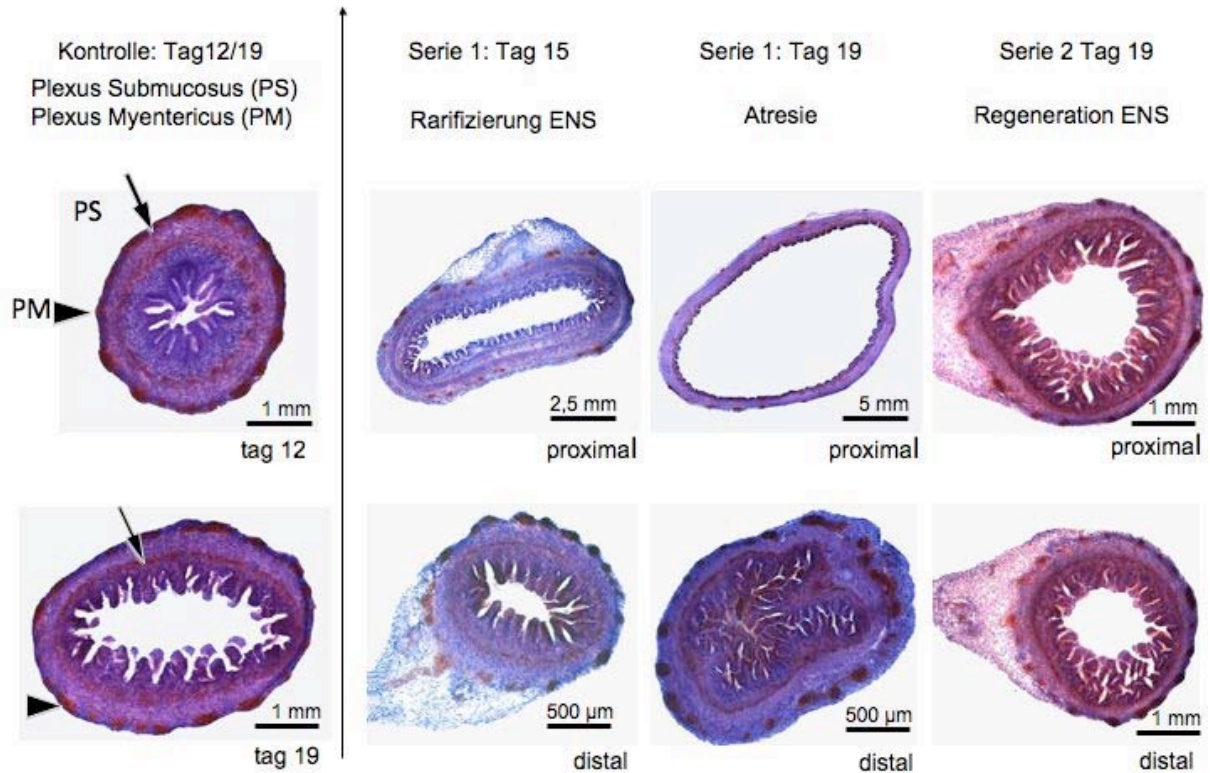


Abbildung 37. AChE: Gegenüberstellung ausgesuchter Zeitpunkte

Zeile oben: proximaler Darm Kontrolle, Tag 15 V1, Tag 19 V1 und Tag 19 V2

Zeile unten: distaler Darm Kontrolle, Tag 15 V1, Tag 19 V1 und Tag 19 V2

Beginnende Rarifizierungen sind am Tag 15 im proximalen Segment nachweisbar (oben, zweites Bild v. l.) mit deutlicher Zunahme an Tag 19 (oben, drittes Bild v. l.). Nach Entfernung der Ligatur am Tag 15 und viertägiger Weiterbebrütungszeit ist die Verteilung der AChE normalisiert (oben rechts) und vergleichbar mit Kontrollschnitten (links).

Die Versilberungstechnik erlaubt das Darstellen von axonalen Netzwerkverbindungen zwischen den einzelnen Ganglien und Plexus.

Abbildung 38 zeigt die Anordnung von Plexus submucosus und Plexus myentericus mit den kommunizierenden axonalen Verbindungen durch die Darmwandschichten:

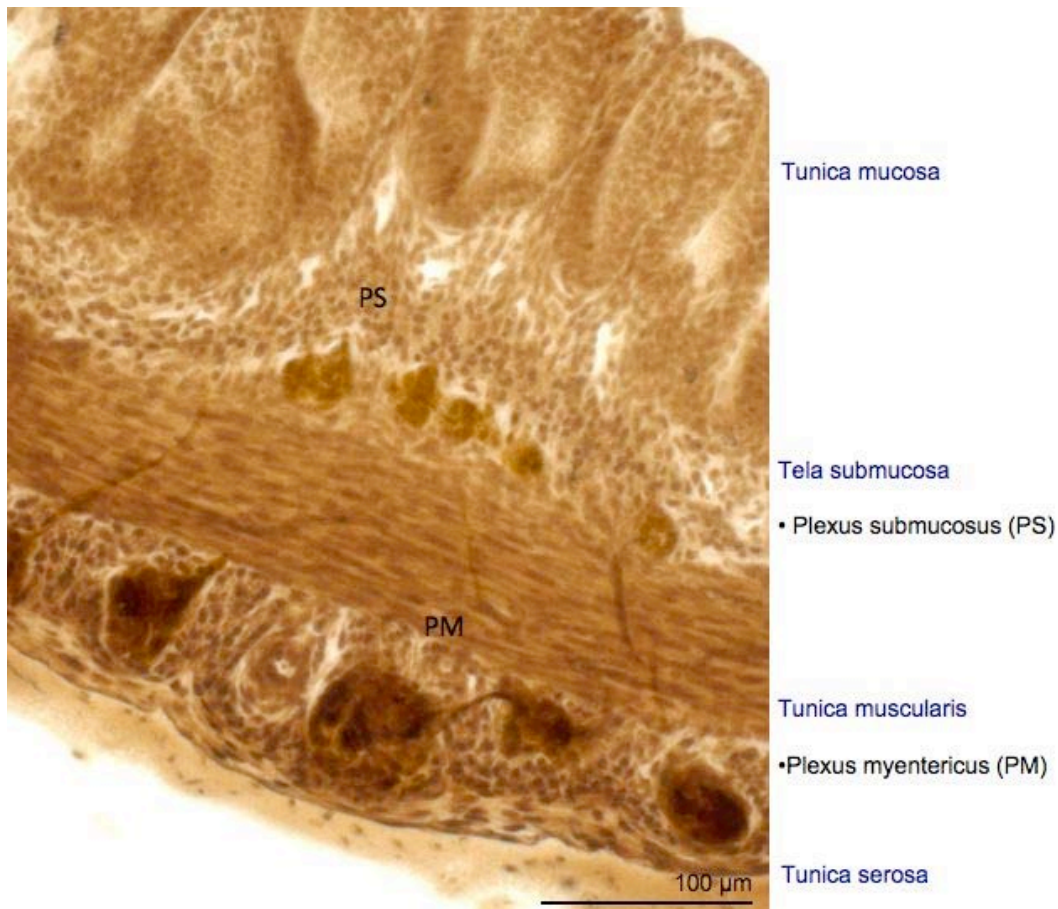


Abbildung 38. Mithilfe der Versilberungsmethode werden kommunizierende axonale Netzwerkverbindungen zwischen den einzelnen Darmwandschichten, am Beispiel eines gesunden Darmabschnittes an Tag 19, nachgewiesen

Im direkten Vergleich zeigt Abbildung 39 fehlende nervale Verbindungen zwischen den Plexus am Beispiel eines 19 Tage alten proximalen Darmwandabschnittes. Die Rarifizierungen nehmen auch hier in Abhängigkeit der Darmwanddehnung und somit fortschreitenden Lebensalter der untersuchten Hühnerfeten weiter zu, bis hin zu einem vollständigen Verlust des Axonnetzwerkes im atretischen, proximal der Ligatur gelegenen Darmabschnitt.

Wird die Ligatur nach vier Tagen, am Entwicklungstag 15, wieder gelöst, zeigt sich eine Normalisierung der eingesetzten pathologischen Verhältnisse, vergleichbar mit Kontrollschnitten.

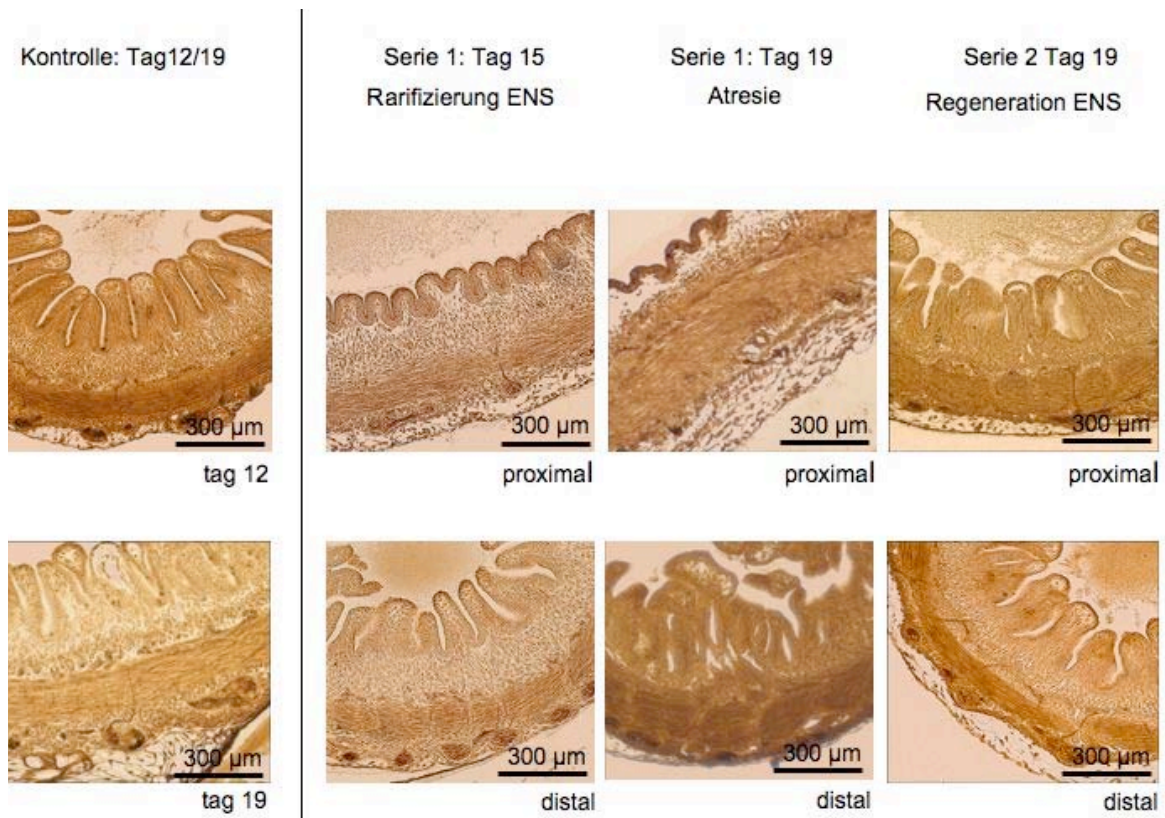


Abbildung 39. Versilberung: Gegenüberstellung ausgesuchter Zeitpunkte

Zeile oben: proximaler Darm Kontrolle, Tag 15 V1, Tag 19 V1 und Tag 19 V2

Zeile unten: distaler Darm Kontrolle, Tag 15 V1, Tag 19 V1 und Tag 19 V2

Am Tag 15 nachweislich beginnender Axonverlust proximal (oben, zweites Bild v. l.) und kompletter Verlust kommunizierender axonaler Verbindungen an Tag 19 im atretischen proximalen Darm (oben, drittes Bild v. l.). Im Vergleich hierzu Nachweis eines regelrechten Axongeflechts zwischen den Plexus nach Entfernung der Ligatur und vier tägiger Regenerationszeit. Im distal gelegenen Darmwandabschnitt sind die nervalen Verbindungen regelrecht angeordnet.

Anhand der Semidünnschnitte und elektronenmikroskopischen Bilder kann der Aufbau vorhandener Nervenzellen innerhalb des Plexus myentericus im Querschnitt eindeutig identifiziert werden. Hier wurde das Augenmerk schwerpunktmäßig auf den PM gelegt, da Veränderungen in diesem bekannterweise zu schweren Motilitätsstörungen führen (Vanderwinden and Rumessen 1999).

Mithilfe der elektronenoptischen Untersuchung der Ganglien des PM können die Befunde aus der Untersuchung der vorangegangenen Semidünnschnitte bestätigt werden.

Die interstitiellen Cajalzellen bilden eine kontinuierliche Schicht um die Ganglien der gesunden Kontrollen (Wester et al. 1999) und sind im vor der Atresie gelegenen

dilatierten Darmabschnitt nur stark vermindert zu sehen. Diese Beobachtung soll in Abbildung 40 noch einmal verdeutlicht werden.

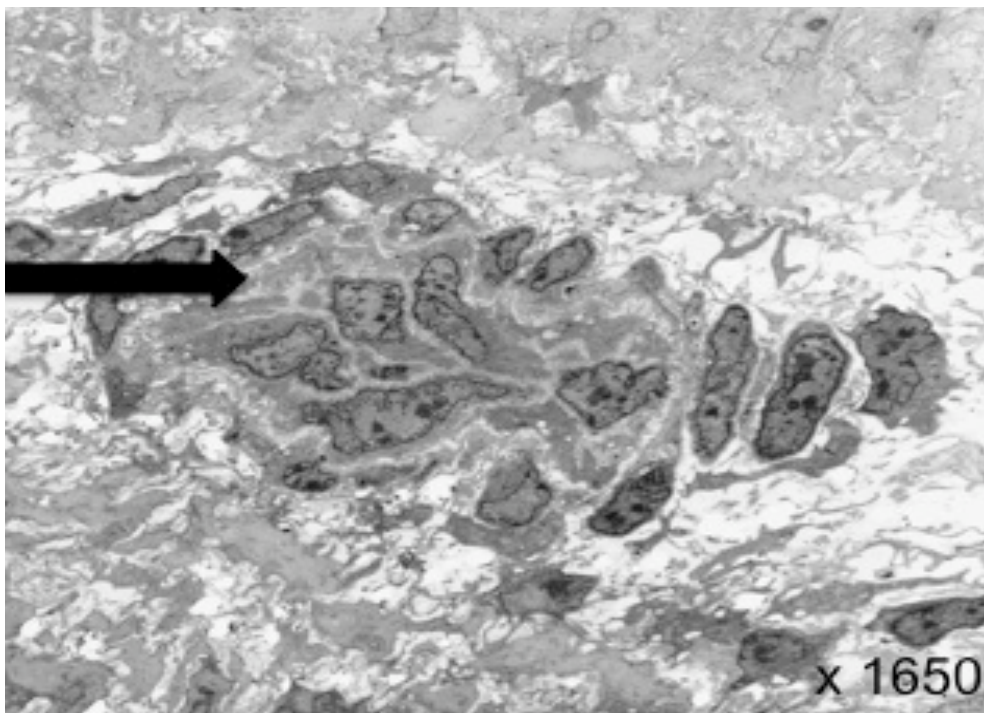


Abbildung 40. Plexus myentericus Tag 19 eines kranken Versuchstieres mit komplettem Verlust der nicht myelinisierenden Axone (Pfeil schwarz), Verlust von ICC oder ICC-ähnlichen Zellen mit Aufhebung der Plexusorganisation

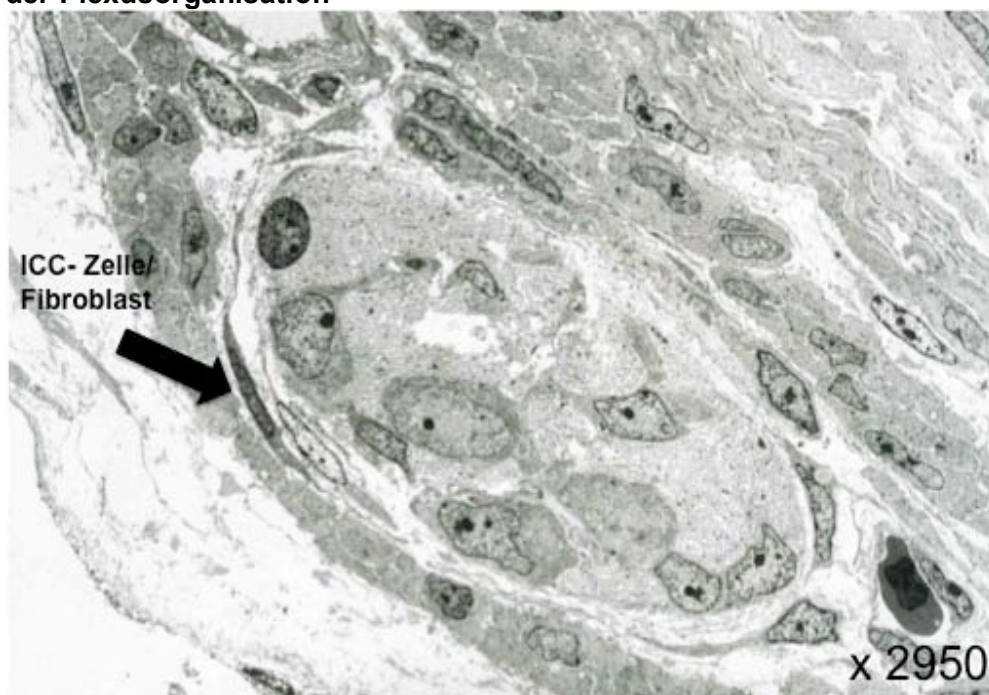


Abbildung 41. Physiologischer Aufbau eines 19 Tage alten Plexus myentericus im Kontrollschnitt, mit Erhalt aller Zellkomponenten und Nachweis von ICC-Zellen

Die Identifikation der ICC für die vorliegende Untersuchung erfolgte nach den morphologischen Kriterien der Arbeiten von Komuro, Seki und Horiguchi (Komuro, Seki and Horiguchi 1999), Wester et al. (Wester et al. 1999) sowie Vanderwinden und Rumessen (Vanderwinden and Rumessen 1999).

In der Vergangenheit wurden den ICC viele unterschiedliche Funktionen zugesprochen oder aber ihre Existenz schlicht verneint. Dies ist durch ihre Ähnlichkeit mit Fibroblasten und ihre uneinheitlichen Erscheinungsformen zu verstehen. Angeblich wurden sie schon vom Entdecker des Erregungsleitungssystems am Herzen, Keith, als Schrittmacher der Peristaltik der Darmmuskelschichten angesehen (Thuneberg 1999). Diese Idee wurde allerdings in den folgenden Jahrzehnten nicht weiterverfolgt (Thuneberg 1999).

Das Fehlen eben dieser Zellen im Bereich des PM, zusammen mit den einhergehenden Veränderungen im axonalen Verband des ENS, ist eine mögliche Erklärung für die postoperativ beobachteten Darmtransportstörungen und erklärt so auch die vielen unterschiedlichen klinischen Verläufe bei den Patienten.

In der Abbildung 40 wird – im Gegensatz zu dem Kontrollschnitt (Abbildung 41) – eine stark veränderte Struktur des PM im proximal der Atresie gelegenen, dilatierten Darmabschnitt erkennbar. Die Nervenzellen liegen dicht gedrängt und werden nicht, wie im Kontrollbild, von einer Vielzahl von Axonen umgeben. Die Remak-Zellen umschließen hier eine deutlich kleinere Anzahl von Axonen. Die äußere Randstruktur der Ganglien ist verloren gegangen. Die ICCs sind im Bereich der Ganglien ebenfalls nicht mehr nachweisbar.

Untersuchungen an erwachsenen Menschen mit chronisch dilatierten Kolonabschnitten ergaben ebenfalls eine Rarifizierung von Ganglienzellen im Bereich des Plexus myentericus (Collure and Hameer 1996).

Die Kinetik der morphologischen Veränderungen bezüglich Ganglienform, Verteilungsmuster von nichtmyelinisierten Axonen mit deutlich verminderter Axonmasse, bis hin zu einem vollständigen Axonverlust innerhalb des Plexus und Fehlen der Cajalzellen wird in den fortgeschrittenen Entwicklungstagen im proximalen

Darmabschnitt deutlich, wobei maximale pathologische Veränderungen am zuletzt untersuchten Tag 19, bei nachgewiesener maximaler Dehnung darstellbar werden. Im Gegensatz hierzu zeigen Untersuchungen in den Darmwandproben nach Entfernung der atresie-induzierenden Ligatur einen normalen Aufbau des PM am Tag 19 auf.

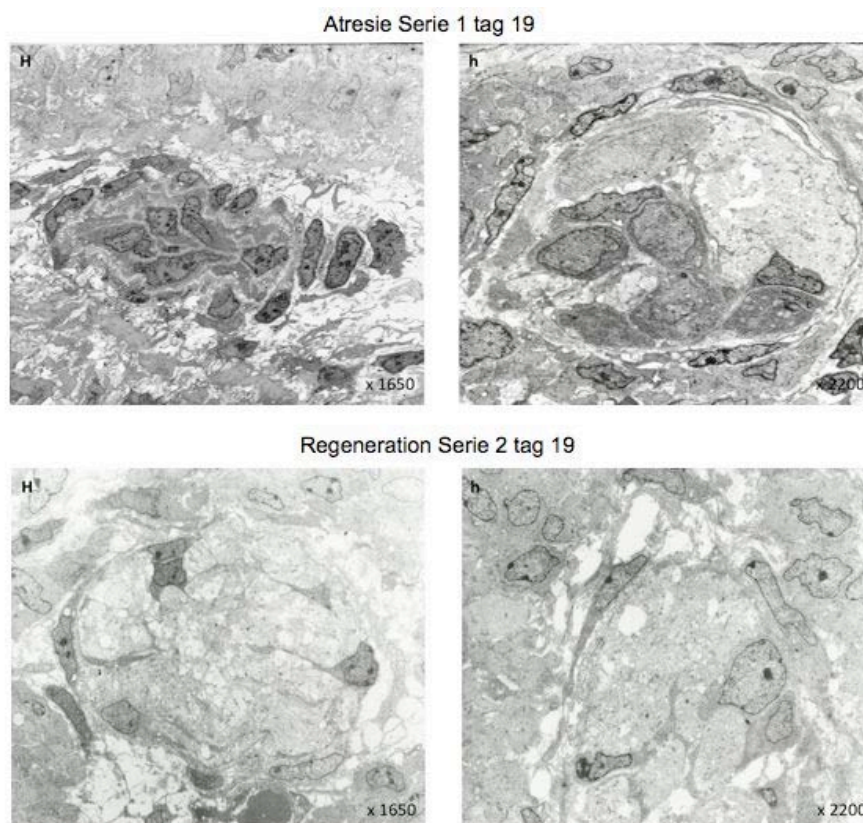
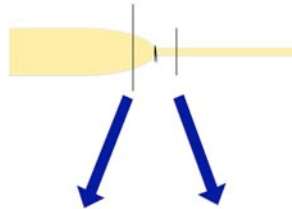


Abbildung 42. EM: Gegenüberstellung ausgesuchter Zeitpunkte

Direkter Vergleich des Plexus myentericus eines 19 Tage alten kranken Darmanschnittes proximal der Ligatur (Bild oben links) mit einem Plexus myentericus Tag 19, nach Entfernung der Ligatur und viertägiger Regenerationszeit (Bild links unten). Rechts befindet sich jeweils ein Anschnitt eines Plexus myentericus Tag 19 distal der Ligatur ohne und mit Lösen der Ligatur.

Mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie konnte also gezeigt werden, dass sich nach dem Entfernen der atresie-induzierenden Ligatur auf zellulärer Ebene die Ultrastrukturen von Nervenzellen, Remak-Zellen und der nicht myelinisierenden Axone

innerhalb der Ganglien des PM prinzipiell wieder normalisieren und von den Kontrollen nahezu nicht mehr unterschieden werden können (Abbildung 42).

6 Zusammenfassung

- 1.) Die vorliegende Arbeit beschreibt die morphologischen Änderungen im enterischen Nervensystem (ENS) nach einer Obstruktion im jejunalen Darmsegment im embryonalen Hühnermodell.
- 2.) Verursacht wird diese Obstruktion durch eine primär nicht einengende Ligatur. Zur Obstruktion kommt es allein durch das Dickenwachstum des Darmes im Verlauf der Entwicklung. Dies führt ab dem 16. Tag zum Vollbild der Atresie.
- 3.) Alle ab dem 15. Tag deutlich nachweisbaren Veränderungen im ENS entstehen im proximal der Obstruktion gelegenen Darmabschnitt und sind Folge einer Dilatation.
- 4.) Folgende Änderungen werden beobachtet:
Im proximalen dilatierten Darmabschnitt kommt es zu einer zunehmenden Verminderung des Plexus submucosus und zu strukturellen Defiziten des Plexus myentericus. In Abhängigkeit vom Ausmaß der Dilatation kommt es zu einem Verlust nicht myelinisierender Axone im Bereich des Ganglions. Die ICC-Zellen, die normalerweise um den Plexus myentericus gruppiert sind, sind nicht mehr nachweisbar. Die axonalen Verbindungen der Plexus untereinander sind ebenfalls rarifiziert.
- 5.) Im distalen Darmabschnitt erscheint das ENS regelrecht angelegt. Es ist vergleichbar mit dem bei normalen Kontrolltieren. Das Lumen erscheint komplett verlegt, was aber eher die Folge des Nichtgebrauches ist. Die Lumenverlegung ist ausgeprägt zu den fortgeschrittenen Entwicklungstagen.
- 6.) Wird am Tag 15 die Ligatur gelöst, kommt es im weiteren Verlauf zu einer zunehmenden Normalisierung der Morphologie:
Lichtmikroskopisch zeigt sich eine normale Anordnung und Verteilung des ENS mit kommunizierenden axonalen Verbindungen, die mit denen in Kontrollschnitten vergleichbar sind. Ultrastrukturelle Abbildungen des PM zeigen einen prinzipiell wiederhergestellten Aufbau.

7 Referenzen

- Anatol, T. I. & S. Hariharan (2009) Congenital intrinsic intestinal obstruction in a Caribbean country. *International surgery*, 94, 212-6.
- Arnal-Monreal, F., F. Pombo & A. Capdevila-Puerta (1983) Multiple hereditary gastrointestinal atresias: study of a family. *Acta paediatrica Scandinavica*, 72, 773-7.
- Athow, A. C., M. I. Filipe & D. P. Drake (1991) Hyperganglionosis mimicking Hirschsprung's disease. *Archives of disease in childhood*, 66, 1300-3.
- Barnard, C. N. & J. H. Louw (1956) The genesis of intestinal atresia. *Minnesota medicine*, 39, 745; passim.
- Berger, S., P. Ziebell, M. Offsler & S. Hofmann von Kapherr (1998) Congenital malformations and perinatal morbidity associated with intestinal neuronal dysplasia. *Pediatric surgery international*, 13, 474-9.
- Bernstein, J., G. Vawter, G. B. Harris, V. Young & L. S. Hillman (1960) The occurrence of intestinal atresia in newborns with meconium ileus. The pathogenesis of an acquired anomaly. *A.M.A. journal of diseases of children*, 99, 804-18.
- Bland-Sutton, J. (1889) Imperforated ileum. *Am J Med Sci*, 322.
- Blyth, H. & J. A. Dickson (1969) Apple peel syndrome (congenital intestinal atresia): a family study of seven index patients. *Journal of medical genetics*, 6, 275-7.
- Borchard, F., W. Meier-Ruge, B. Wiebecke, J. Briner, H. Müntefering, H. F. Födisch, A. M. Holschneider, A. Schmidt, P. Enck & M. Stolte (1991) [Disorders of the innervation of the large intestine--classification and diagnosis. Results of a consensus conference of the Society of Gastroenteropathology 1 December 1990 in Frankfurt/Main]. *Der Pathologe*, 12, 171-4.
- Brehmer, A., F. Schrodler & W. Neuhuber (1999) Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel. *Anatomy and embryology*, 200, 125-35.
- Burjonrappa, S. C., E. Crete & S. Bouchard (2009) Prognostic factors in jejuno-ileal atresia. *Pediatric surgery international*, 25, 795-8.
- Burns, A. J. (2007) Disorders of interstitial cells of Cajal. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 45 Suppl 2, S103-6.
- Cajal, S. (1893) Sur les ganglios nerveaux de lintstine. *CR Soc Biol V*, 45, 171-174.

-
- Coerdt, W., J.-S. Michel, G. Rippin, S. Kletzki, V. Gerein, H. Müntefering & J. Arnemann (2004) Quantitative morphometric analysis of the submucous plexus in age-related control groups. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 444, 239-46.
- Collure, D. W. & H. R. Hameer (1996) Loss of ganglion cells and marked attenuation of bowel wall in cecal dilatation. *The Journal of surgical research*, 60, 385-8.
- Cragan, J. D., M. L. Martin, C. A. Moore & M. J. Khoury (1993) Descriptive epidemiology of small intestinal atresia, Atlanta, Georgia. *Teratology*, 48, 441-50.
- Csury, L. P., A; (1995) Intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Surg Int* 441.
- Cywes, S., M. R. Davies & H. Rode (1980) Congenital jejuno-ileal atresia and stenosis. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 57, 630-9.
- Dale, H. H. (1914) Discussion on the Therapeutic Value of Hormones. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 7, 34-40.
- Dalla Vecchia, L. K., J. L. Grosfeld, K. W. West, F. J. Rescorla, L. R. Scherer & S. A. Engum (1998) Intestinal atresia and stenosis: a 25-year experience with 277 cases. *Archives of surgery*, 133, 490-6; discussion 496-7.
- Davies, M. R., J. H. Louw, S. Cywes & H. Rode (1982) The classification of congenital intestinal atresias. *Journal of pediatric surgery*, 17, 224.
- Davis, D. & C. Poynter (1922) Congenital intestinal occlusions of the intestines with report of a case of multiple atresia of the jejunum. *Surg. Gynec. Obstet.*, 34, 35-41.
- De Giorgio, R. & M. Camilleri (2004) Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 16, 515-31.
- DeLorimier, A. A., E. W. Fonkalsrud & D. M. Hays (1969) Congenital atresia and stenosis of the jejunum and ileum. *Surgery*, 65, 819-27.
- Deprest, J. A., A. W. Flake, E. Gratacos, Y. Ville, K. Hecher, K. Nicolaides, M. P. Johnson, F. I. Luks, N. S. Adzick & M. R. Harrison (2010) The making of fetal surgery. *Prenatal diagnosis*, 30, 653-67.

-
- Der-Silaphet, T., J. Malysz, S. Hagel, A. Larry Arsenault & J. D. Huizinga (1998) Interstitial cells of cajal direct normal propulsive contractile activity in the mouse small intestine. *Gastroenterology*, 114, 724-36.
- Di Lorenzo, C. (1999) Pseudo-obstruction: current approaches. *Gastroenterology*, 116, 980-7.
- Dickson, J. A. (1970) Apple peel small bowel: an uncommon variant of duodenal and jejunal atresia. *Journal of pediatric surgery*, 5, 595-600.
- Evans, C. (1951) Atresias of the gastrointestinal tract. *International abstracts of surgery*, 92, 1-8.
- Fadda, B., W. A. Maier, W. Meier-Ruge, A. Scharli & R. Daum (1983) [Neuronal intestinal dysplasia. Critical 10-years' analysis of clinical and biopsy diagnosis]. *Zeitschrift fur Kinderchirurgie : organ der Deutschen, der Schweizerischen und der Osterreichischen Gesellschaft fur Kinderchirurgie = Surgery in infancy and childhood*, 38, 305-11.
- Faussone-Pellegrini, M. S. (1989) Interstitial cells of Cajal: once negligible players, now blazing protagonists. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia*, 110, 11-31.
- Gfroerer, S., R. Metzger, H. Fiegel, P. Ramachandran & U. Rolle (2010) Differential changes in intrinsic innervation and interstitial cells of Cajal in small bowel atresia in newborns. *World journal of gastroenterology : WJG*, 16, 5716-21.
- Goelle, G. (1683) Abortus humani monstrosi. *Norimb Hist Anatom Misc Acad Nat Curios*.
- Grosfeld, J (1986) Jejunoileal atresia and stenosis, section 3: The small intestine. In *Pediatric Surgery*, ed. R. MM, 838. Chicago Year Book Medical.
- Grosfeld, J. L. & F. J. Rescorla Duodenal atresia and stenosis: reassessment of treatment and outcome based on antenatal diagnosis, pathologic variance, and long-term follow-up. *World journal of surgery*, 17, 301-9.
- (1979) Duodenal atresia and stenosis: reassessment of treatment and outcome based on antenatal diagnosis, pathologic variance, and long-term follow-up. *World journal of surgery*, 17, 301-9.
- Guttman, F. M., P. Braun, P. H. Garance, H. Blanchard, P. P. Collin, L. Dallaire, J. G. Desjardins & G. Perreault (1973) Multiple atresias and a new syndrome of

-
- hereditary multiple atresias involving the gastrointestinal tract from stomach to rectum. *Journal of pediatric surgery*, 8, 633-40.
- Halsband, H. & F. Rehbein (1969) Atresien des Jejunum und Ileum - Erfahrungsberichte über 75 Fälle. *Z. Kinderchir* 7, 411.
- Handelsman, J., S. Abrams & R. Corry (1963) Improvement of Therapy for congenital Jejunioileal Atresia. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 117, 691-702.
- Hirschsprung, H. (1887) Stuhlträgheit Neugeborener infolge Dilatationen und Hypertrophy des Colons. *Jahrb Kinderheilk*, 27.
- Holschneider, A., W. C. Hecker & R. Daum (1971) [Chronic obstruction of the small intestine in childhood]. *Monatsschrift für Kinderheilkunde*, 119, 533-8.
- Holschneider, A. M. (1983) Treatment and functional results of anorectal continence in children with imperforate anus. *Acta chirurgica Belgica*, 82, 191-204.
- Holstein, A. & U. Wulfhegel (1971) Die Semidünnschnitttechnik als Grundlage für eine cytologische Beurteilung der Spermatogene des Menschen. *Andrologie*, 3, 65-9.
- Horowitz, B., S. M. Ward & K. M. Sanders (1999) Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annual review of physiology*, 61, 19-43.
- Hoyle, C. & G. Burnstock (1989) Neuronal population in the submucous plexus of the human colon. *J Anat*, 16, 7-22.
- Huizinga, J. D., L. Thuneberg, M. Klüppel, J. Malysz, H. B. Mikkelsen & A. Bernstein (1995) W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature*, 373, 347-9.
- Irving, I. & P. Rickham (1978) Duodenal atresia and stenosis: Anular pancreas. In *Neonatal surgery*, ed. I. Irving, 355. Boston: Butterworths
- Jimenez, F. & L. Reiner (1961) Arteriographic findings in congenital abnormalities of the mesentery and intestines. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 113, 346-52.
- Jona, J. Z. (2000) Acquired ileal atresia and spontaneous reconstitution of intestinal continuity in a premature infant with necrotizing enterocolitis. *Journal of pediatric surgery*, 35, 505-7.
- Kapur, R. P. (2001) Neuropathology of paediatric chronic intestinal pseudo-obstruction and related animal models. *J Pathol*, 194, 277-88.

-
- Kobayashi, H., H. Hirakawa & P. Puri (1996) Is intestinal neuronal dysplasia a disorder of the neuromuscular junction? *Journal of pediatric surgery*, 31, 575-9.
- Koletzko, S., I. Jesch, T. Faus-Kebetaler, J. Briner, W. Meier-Ruge, H. Muntefering, W. Coerdts, L. Wessel, K. M. Keller, W. Nutzenadel, P. Schmittenbecher, A. Holschneider & P. Sacher (1999) Rectal biopsy for diagnosis of intestinal neuronal dysplasia in children: a prospective multicentre study on interobserver variation and clinical outcome. *Gut*, 44, 853-61.
- König (2008) Anatomie der Vögel.
- Komuro, T., K. Seki & K. Horiguchi (1999) Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. *Archives of histology and cytology*, 62, 295-316.
- Krammer (1997) The enteric nervous system - what can we learn from morphology? *Z Gastroenterol* 2, 5-13.
- Laczko J. & Lévai G. (1974) A simple differential staining method for semi- thin sections of ossifying cartilage and bone tissues embedded in epoxy resin *Mikroskopie* Bd. 31, 1-4.
- Lake, B. D. (1995) Intestinal neuronal dysplasia. Why does it only occur in parts of Europe? *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 426, 537-9.
- Lecoin, L., G. Gabella & N. Le Douarin (1996) Origin of the c-kit-positive interstitial cells in the avian bowel. *Development (Cambridge, England)*, 122, 725-33.
- Lister, J. & P. Rickham (1978) Intestinal atresia and stenosis excluding the duodenum. In *Neonatal Surgery*. London: Butterworth.
- Louw, J. (1952) Congenital intestinal atresia and severe stenosis in the newborn; a report on 79 consecutive cases. *South African journal of clinical science. Suid-Afrikaanse tydskrif vir kliniese wetenskap*, 3, 109-29.
- Louw, J. & C. Barnard (1955) Congenital intestinal atresia; observations on its origin. *Lancet*, 269, 1065-7.
- Louw, J. H. (1959) Congenital atresia and stenosis of the small intestine. The case for resection and primary end-to-end anastomosis. *South African journal of surgery. Suid-Afrikaanse tydskrif vir chirurgie*, 4, 57-64.
- Martin, L. W. & J. T. Zerella (1976) Jejunoileal atresia: a proposed classification. *Journal of pediatric surgery*, 11, 399-403.

-
- Masumoto, K., S. Suita, O. Nada, T. Taguchi, R. Guo & T. Yamanouchi (1999) Alterations of the intramural nervous distributions in a chick intestinal atresia model. *Pediatric research*, 45, 30-7.
- Meier-Ruge, W. (1970) The toxicology of neuroleptics on the eye. *Acta psychiatrica Belgica*, 70, 688-94.
- Meier-Ruge, W. A., L. A. Brunner, J. Engert, M. Heminghaus, A. M. Holschneider, P. Jordan, G. Pickett, H. G. Posselt & A. Schärli (1999) A correlative morphometric and clinical investigation of hypoganglionosis of the colon in children. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift für Kinderchirurgie*, 9, 67-74.
- Millar, A., H. Rode & S. Cywes (2005) Intestinal atresia and stenosis. In *Pediatric surgery*, eds. K. Ashcraft, G. Holcomb & J. Murphy, 416-34 Saunders, Philadelphia: Elsevier.
- Mishalany, H. G. & V. M. Kaloustian (1971) Familial multiple-level intestinal atresias: report of two siblings. *The Journal of pediatrics*, 79, 124-5.
- Mishalany, H. G. & F. B. Najjar (1968) Familial jejunal atresia: three cases in one family. *The Journal of pediatrics*, 73, 753-5.
- Nachmansohn, D. & M. Rothenberg (1945) Cholinesterase I. The specificity of the enzyme in nerve tissue. *J Biol Chem*, 158, 653-66.
- Netter (2005) Atlas der Anatomie.
- Nixon, H. & R. Tawes (1971a) Etiology and treatment of small intestinal atresia. *Surgery* 69, 41.
- Nixon, H. H. & R. Tawes (1971b) Etiology and treatment of small intestinal atresia: analysis of a series of 127 jejunoileal atresias and comparison with 62 duodenal atresias. *Surgery*, 69, 41-51.
- Olson, L. M., L. S. Flom, C. M. Kierney & D. W. Shermeta (1987) Identical twins with malrotation and type IV jejunal atresia. *Journal of pediatric surgery*, 22, 1015-6.
- Parisi Salvi, E., R. Vaccaro, S. M. Baglaj & T. Renda (2004) Nervous system development in normal and atresic chick embryo intestine: an immunohistochemical study. *Anatomy and embryology*, 209, 143-51.

-
- Pawlik, N. A., F. E. Hardy, Jr. & J. L. Hill (1987) Myoelectric activity differences in acute and chronic models of lamb intestinal atresia. *Journal of pediatric surgery*, 22, 1203-6.
- Pickard, L. R., S. Santoro, R. G. Wyllie & J. A. Haller (1981) Histochemical studies of experimental fetal intestinal obstruction. *Journal of pediatric surgery*, 16, 256-60.
- Potts, W. (1947) Congenital atresia of intestine and colon. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 85, 14-9.
- Puri, P. (2003) Intestinal neuronal dysplasia. *Seminars in pediatric surgery*, 12, 259-64.
- Ratan, S. K., K. N. Rattan, S. K. Mathur, J. Maheshwari & T. Sehgal (2005) Acquired ileal atresia in infancy: report of two cases. *Pediatric surgery international*, 21, 305-7.
- Reynolds, E. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology*, 17, 208-12.
- Rickham, P. P. & M. Karplus (1971) Familial and hereditary intestinal atresia. *Helvetica paediatrica acta*, 26, 561-4.
- Rumessen, J. J. (1994) Identification of interstitial cells of Cajal. Significance for studies of human small intestine and colon. *Danish medical bulletin*, 41, 275-93.
- Rumessen, J. J., H. B. Mikkelsen & L. Thuneberg (1992) Ultrastructure of interstitial cells of Cajal associated with deep muscular plexus of human small intestine. *Gastroenterology*, 102, 56-68.
- Rumessen, J. J., S. Peters & L. Thuneberg (1993) Light- and electron microscopical studies of interstitial cells of Cajal and muscle cells at the submucosal border of human colon. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 68, 481-95.
- Rumessen, J. J. & L. Thuneberg (1991) Interstitial cells of Cajal in human small intestine. Ultrastructural identification and organization between the main smooth muscle layers. *Gastroenterology*, 100, 1417-31.
- Sacher, P. & U. Stauffer (1981) Langzeitresultate bei Patienten mit Atresien und Stenosen des Dünndarmes distal des Ligaments von Treitz und des Colons. *Z Kinderchir*, 32, 230.

-
- Safra, M. J., G. P. Oakley & J. D. Erickson (1976) Descriptive epidemiology of small-bowel atresia in metropolitan Atlanta. *Teratology*, 14, 143-9.
- Santulli, T. & W. Blanc (1961) Congenital atresia of the intestine: pathogenesis and treatment. *Annals of surgery*, 154, 939-48.
- Schafer, K. H., A. Hansgen & P. Mestres (1999) Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *The Anatomical record*, 256, 20-8.
- Schärli, A. F. (1992) [Intestinal neuronal dysplasia]. *Cirugía pediátrica : organo oficial de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica*, 5, 64-5.
- Schemann, M. & M. Neunlist (2004) The human enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 16 Suppl 1, 55-9.
- Schoenberg, R. A. & D. Kluth (2002) Experimental small bowel obstruction in chick embryos: Effects on the developing enteric nervous system. *Journal of pediatric surgery*, 37, 735-40.
- Schweinitz D. & Ure B. (2009) *Kinderchirurgie*.
- Seashore, J. H., F. S. Collins, R. I. Markowitz & M. R. Seashore (1987) Familial apple peel jejunal atresia: surgical, genetic, and radiographic aspects. *Pediatrics*, 80, 540-4.
- Smith, M., L. Smith, W. Wells, E. Shapira, M. Hendrickson & P. Moynihan (1991) Concurrent jejunal atresia with "apple peel" deformity in premature twins. *Pediatric Surgery International*, 6, 425-8.
- Smith, V. V. (1993) Intestinal neuronal density in childhood: a baseline for the objective assessment of hypo- and hyperganglionosis. *Pediatric pathology / affiliated with the International Paediatric Pathology Association*, 13, 225-37.
- Spaethe, A. (1984) Eine Modifikation der Silbermethode nach Richardson für die Axonfärbung in Paraffinschnitten. *Verh Anat Ges*, 78, 101-2.
- Spriggs, N. (1912) Congenital intestinal occlusion. *Guy. Hosp. Rep.*, 66, 143-218.
- Stach, W. (1980) The Neuronal Organization of the Plexus Myentericus (Auerbach) in the Small Intestine of the Pig .1. Type-I-Neurons *Zeitschrift Fur Mikroskopisch-Anatomische Forschung*, 94, 833-49

-
- Stollman, T. H., I. de Blaauw, M. H. Wijnen, F. H. van der Staak, P. N. Rieu, J. M. Draaisma & R. M. Wijnen (2009) Decreased mortality but increased morbidity in neonates with jejunoileal atresia; a study of 114 cases over a 34-year period. *Journal of pediatric surgery*, 44, 217-221.
- Strauss, N. (2001) Fetale Chirurgie. *Zeitschr. F. Gyn. U. Geburtsh.*, 19, 14-22
- Tandler, J. (1900) Zur Entwicklungsgeschichte des menschlichen Duodenum in frühen Embryonalstadien. *Gegenbauers morphol. Jahrb.*, 187-205.
- Théremin, E. (1877) Über Kongenitale Occlusion des Dünndarms. *Deutsch. Z. Chir.*, 8, 34-71.
- Thomas, C. G. & J. M. Carter (1974) Small intestinal atresia: the critical role of a functioning anastomosis. *Annals of surgery*, 179, 663-670.
- Thomsen, L., T. L. Robinson, J. C. Lee, L. A. Farraway, M. J. Hughes, D. W. Andrews & J. D. Huizinga (1998) Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nature medicine*, 4, 848-51.
- Thuneberg, L. (1982) Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, 71, 1-130.
- Tibboel, D., J. C. Molenaar & C. J. Van Nie (1979) New perspectives in fetal surgery: the chicken embryo. *Journal of pediatric surgery*, 14, 438-40.
- Tibboel, D., C. J. van Nie & J. C. Molenaar (1980) The effects of temporary general hypoxia and local ischemia on the development of the intestines: an experimental study. *Journal of pediatric surgery*, 15, 57-62.
- Ure, B. M., A. M. Holschneider & W. Meier-Ruge (1994) Neuronal intestinal malformations: a retro- and prospective study on 203 patients. *European journal of pediatric surgery : official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery ... [et al] = Zeitschrift für Kinderchirurgie*, 4, 279-86.
- Ure, B. M., A. M. Holschneider, D. Schulten & W. Meier-Ruge (1997) Clinical impact of intestinal neuronal malformations: a prospective study in 141 patients. *Pediatric surgery international*, 12, 377-82.
- Vanderwinden, J.-M. & J. r. J. Rumessen (1999) Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease. *Microscopy Research and Technique*, 47, 344-60.
- Walker, K., N. Badawi, C. H. Hamid, A. Vora, R. Halliday, C. Taylor, E. Shi, G. T. Roy, E. Simpson & A. J. Holland (2008) A population-based study of the

-
- outcome after small bowel atresia/stenosis in New South Wales and the Australian Capital Territory, Australia, 1992-2003. *Journal of pediatric surgery*, 43, 484-8.
- Ward, S. M., G. J. McLaren & K. M. Sanders (2006) Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *The Journal of physiology*, 573, 147-59.
- Watanabe, Y., H. Ando, T. Seo, S. Katsuno, Y. Marui & M. Horisawa (2001) Two-dimensional alterations of myenteric plexus in jejunoileal atresia. *Journal of pediatric surgery*, 36, 474-8.
- Weisschedel, E. (1953) Über angeborenen Atresien und tenosen des Dünndarmes. *Langenbecks Arch klin Chir*, 276, 764.
- Weitzman, J. J. & R. S. Vanderhoof (1966) Jejunal atresia with agenesis of the dorsal mesentery. With "Christmas tree" deformity of the small intestine. *American journal of surgery*, 111, 443-9.
- Wester, T., L. Eriksson, Y. Olsson & L. Olsen (1999) Interstitial cells of Cajal in the human fetal small bowel as shown by c-kit immunohistochemistry. *Gut*, 44, 65-71.
- Willnow, U. (1977) Morphology of small bowel in small bowel atresia and stenosis. *Zentralblatt für Chirurgie*, 102, 737-43.
- Zarella, J. T. & L. W. Martin (1976) Jejunal atresia with absent mesentery and a helical ileum. *Surgery*, 80, 550-3.

Dank

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern und Kollegen im Institut für Kinderchirurgie, im besonderen Frau Beate Roth und Birgit Appel für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Erstellung dieser Arbeit. Ferner bedanke ich mich bei Herrn Henning Fiegel für die Hilfestellung und den motivierenden Gedankenaustausch.

Ich danke sehr herzlich Frau Gabriele Rune für die Unterstützung meiner Arbeit und für die unkomplizierte und großzügige Bereitstellung des Elektronenmikroskops. Ich danke Frau Brigitte Asmus und Frau Elke Schaefer für die umfangreiche technische Unterstützung und unerschöpfliche Geduld.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium nicht möglich gewesen wäre, und bei meinem Bruder für die unermüdliche Hilfe.

Ich danke der Werner-Otto-Stiftung für die großzügige finanzielle und ideelle Unterstützung bei der Realisierung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dietrich Kluth, der wissenschaftliche Betreuer und Vordenker dieser Arbeit. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Lebenslauf

Name	Christina Oetzmann v. Sochaczweski	
Geburtsdatum	10. März 1980	
Geburtsort	Frankfurt am Main	
Grundschule	1986–1990	Wilhelm Leuschner Schule, Pfungstadt
Gymnasium	1990–1999	Gymnasium Michelstadt, Michelstadt
	Juni 1999	Abitur
Sozialarbeit	1999–2000	Medellin, Kolumbien
Beschäftigung	2000–2002	Deutsche Lufthansa AG
Studium	2002–2009	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
	2004	Physikum
	2009	Medizinisches Staatsexamen
	2009	Ärztliche Approbation
Ärztliche Beschäftigung	seit Aug. 2009	Assistenzärztin zur Weiterbildung für Kinderchirurgie; Hannover Medizinische Hochschule Hannover

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: