

**Aus der Klinik- und Poliklinik  
für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. J. Helms**

# **Charakterisierung des T-Zellinfiltrates in der Cholesteatomperimatrix**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Thomas Dabrowski**

**aus Haan**

**Würzburg, August 2004**

**Referent: Prof. Dr. med. F. Hoppe**  
**Koreferent: Prof. Dr. med. A. Marx**  
**Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 25. Februar 2005**

**Der Promovend ist Zahnarzt**

Für meine Mutter



# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Das Cholesteatom	1
1.1.1. Klassifizierung und Klinik	1
1.1.2. Historischer Überblick	2
1.2. Das Immunsystem	4
1.2.1. Unspezifische und spezifische Immunität	5
1.2.2. Zwei Strategien	5
1.2.3. Herkunft immunkompetenter Zellen	6
1.2.4. Funktion der Lymphozyten	6
1.2.4.1. Stimulation der T-Lymphozyten mit Makrophagenaktivierung	7
1.3. Fragestellung dieser Studie	8
<b>Material und Methode</b>	<b>9</b>
2.1. Untersuchungsmaterial	9
2.2. Postoperative Lagerung des Gewebes	9
2.3. Vorbereitung	10
2.4. Bearbeitung des Gewebes	10
2.5. Färbevorgang	11
2.5.1. Verwendete Färbemethode	11
2.5.2. Verwendete Antikörper	11
2.5.3. Austitrierung der Antikörper	12
2.5.4. Verwendete Pufferlösungen	13
2.5.5. Verfahrenstechnik der Immunperoxidase-Färbung	13
2.6. Verwendete Instrumente	16
2.7. Verfahren zur Erfassung der Patientendaten	16
2.7.1. Patientendaten	18
<b>Ergebnisse</b>	<b>19</b>
3.1. Gruppe der klinisch aggressiven Cholesteatome	19
3.2. Gruppe der klinisch mäßig aggressiven Cholesteatome	22
3.3. Gruppe der klinisch wenig aggressiven Cholesteatome	24
3.4. Gruppe der Vergleichsgewebe	27
3.4.1. Entzündliches Trommelfellgewebe	27
3.4.2. Gehörgangshaut	28

3.5. Abbildungen	30
3.6. Auswertung der tabellarischen Darstellung und Zusammenfassung der Ergebnisse	33
<b>Diskussion</b>	<b>38</b>
4.1. Die Pathogenese des Cholesteatoms	38
4.1.1. Die Cholesteatombildung im Vergleich mit der Wundheilung	39
4.2. Die Interaktion von Epithel und Stroma	39
4.2.1. Die Rolle der T- und B- Lymphozyten sowie Langerhanszellen	42
4.3. Immunhistochemische Identifizierung Cholesteatom-assoziiierter T-Zellpopulationen	44
4.4. Cholesteatom und Parodontitis– eine vergleichende Darstellung zweier Krankheiten	45
4.4.1. Parodontitis – Ätiologie, Klinik und Therapie	45
4.4.2. Cholesteatom und Parodontitis – der Vergleich	46
<b>Zusammenfassung</b>	<b>48</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>50</b>

# Einleitung

## 1.1. Das Cholesteatom

Cholesteatom (Synonym: chronische Knocheneiterung des Mittelohres, chronische Perlgeschwulst, chronische epitympanale Mittelohrentzündung)

Die Genese des Cholesteatoms wird auch heute noch kontrovers diskutiert. Eine der wichtigsten Theorien vermutet seine Entstehung durch Einwachsen von ortsfremdem Epithel aus dem Gehörgang in den Bereich der Schleimhäute des Mittelohres und der benachbarten pneumatischen Zellen. Es zählt zur Gruppe der chronischen Mittelohrentzündungen mit randständiger Trommelfellperforation und Knochendestruktion. „Das Cholesteatom ist ein aus Granulations- und Bindegewebe bestehender, histologisch durch zwiebelschalenartig aneinander gelagertes verhorntes Plattenepithel gekennzeichneter benigner Tumor.“ [Zitat: PSCHYREMBEL, S.278]

Pathohistologisch lassen sich im Cholesteatom im Wesentlichen zwei Schichten unterscheiden. Die **Matrix** ist die oberflächlich gelegene Epithelschicht mit verhornenden Plattenepithelzellen. Sie gleicht dem Trommelfellepithel und dem Gehörgangsepithel, jedoch ohne dessen Anhangsgebilde [LIM, 1982]. Die **Perimatrix** ist das darunter liegende Bindegewebe, das die Nährbasis für das Epithel darstellt. Sie variiert in ihrer Ausdehnung und Dicke je nach Entzündungszustand. Die Basalmembran, die Matrix und Perimatrix trennt, kann bei starker Entzündung unterbrochen sein [STEINBACH et al., 1988]

### 1.1.1. Klassifizierung und Klinik

Klinisch wird von den meisten Autoren das Cholesteatom wie folgt eingeteilt:

1. Primäres oder genuines Cholesteatom aus versprengten Keimepithel (selten)

2. Sekundäre Cholesteatome:
  - a. die von der Pars flaccida des Trommelfells ausgehende epitympanale oder Attikcholesteatome und
  - b. die von der Pars tensa des Trommelfells ausgehenden Tensa-cholesteatome
3. Rezidivcholesteatome nach Operationen
4. iatrogene Cholesteatome ,z.B. als Transplantationscholesteatom nach Legen einer Paukendrainage
5. Traumatische Cholesteatome

Klinisch wird das Cholesteatom durch Hörminderung oder vollständigen Hörverlust des betreffenden Ohres durch vorherige Zerstörung der Gehörknöchelchen gekennzeichnet. Die Zerstörung vor allem des langen Amboßschenkel führt zu erheblicher Schalleitungsschwerhörigkeit. Durch Arrosion der Bogengänge werden Schwindel und Gleichgewichtsstörungen hervorgerufen. Weiterhin finden sich die Symptome Schmerz, Druckgefühl und ein fötider (fast immer eitrig) Ohrfluss am betreffenden Ohr. Komplikationsgefahr infolge des Cholesteatomdruckes und begleitender Entzündung stellen der Einbruch in den Fazialiskanal, der Durchbruch in den Sinus sigmoideus und auch endokranielle Komplikationen wie Meningitis, Schläfenlappenabszess und Kleinhirnabszess dar.

### **1.1.2. Historischer Überblick**

Erstmals berichtete 1828 der französische Anatom JEAN CRUEVEILHIER über eine durch Keimversprengung entstandene Geschwulst, die er im Gehirn einer etwa 18-jährig verstorbenen jungen Frau vorfand. Er bezeichnete diese Geschwulst als „Tumeur perlee“, die „ganz den metallischen Glanz von mattem Silber oder einer Perle des reinsten Wassers war und mit einer Menge von Buckeln bedeckt war“ [VIRCHOW, S. 24]. Die Bezeichnung „Cholesteatom“ geht auf den Pathologen Johannes Müller zurück, der 1838 eine „perlmutterglän-

zend geschichtet Fettgeschwulst“ beschrieb [VIRCHOW, S. 373], die er zur Natur der gutartigen Geschwülste zählte. Er untersuchte mikroskopisch das Zellgewebe und konnte eine Ansammlung von Cholesterinkristallen unterhalb der glänzenden Oberfläche beschreiben. Dabei unterschied er den größeren Teil der Fälle als „Cholesteatoma cysticum“ von dem auf Geschwürsflächen vorkommenden Dypuytren [VIRCHOW, S. 374].

Erste Ansätze einer systematischen Erforschung der Anatomie und Pathologie des Felsenbeins verdanken wir TOYNBEE, der um die Mitte des vergangenen Jahrhunderts seine Untersuchungen an 1600 Felsenbeinen publizierte [Plester, 1985]. 1850 beschrieb TOYNBEE einen Tumor im äußeren Gehörgang, der außen perlweiß und glänzend, innen mit Epidermisschuppen gefüllt war [TOYNBEE, 1850]. Durch seine Beobachtung wurde angenommen, dass durch den Druck der Geschwulst eine Absorption der Knochenteile eintreten könne, da vom äußeren Gehörgang ausgehend der Tumor die hintere Gehörgangswand arrondiert hatte und ins Mastoid eingebrochen war. TOYNBEE bezeichnete ihn als „sebaceous tumor“.

1855 unternahm Virchow den Versuch, den von CRUVEILHIER bezeichneten Begriff „tumeur perlee“ in Perlgeschwulst umzuwandeln: „Am besten ist es zu dem ursprünglichen Namen der Perlgeschwulst zurückzukehren und von dieser eine einfache und zusammengesetzte Form zu unterscheiden“.

Mit diesem Begriff konnte er sich allerdings nicht durchsetzen. Er definierte in seiner Arbeit die Perlgeschwulst als eine epidermoidale Neubildung und unterschied dabei eine durch embryonale Keimversprengung entstandenes „primäres Cholesteatom „von einem aus einem Trommelfeldefekt hervorgegangenen sekundären Cholesteatom“.

Weitere Vertreter der Keimversprengungstheorie waren MICULICZ (1876) und BOSTROEM (1897).

Einen anderen Erklärungsansatz von Cholesteatomen hingegen formulierte erstmals 1862 GRUBER, dass eine Epithelumwandlung durch entzündliche Reizung zur Entstehung von Cholesteatomen führen könne.

Ein dritter Erklärungsversuch zur Entstehung des Mittelohr- Cholesteatoms wurde von HABERMANN (1892) begründet und von BEZOLD (1890) vertieft. [BEZOLD, 1890] Es handelt sich dabei um die noch von vielen Autoren als gültig angesehene Immigrationstheorie die besagt, dass Plattenepithel - angeregt durch eine chronische Otitis media - über eine im Trommelfell in die Paukenhöhle einwächst, und ein daraus folgender Unterdruck in der Pauke – mit daraus entstehender Retraktion der Pars flaccida - , fördern die Epidermiswanderung.

Für die Pathogenese des Cholesteatom spielt bis heute die Immigrationstheorie die größte Rolle, auch wenn unterschiedliche Theorien in Bezug auf die Umständen, unter den das Plattenepithel in die Paukenhöhle einwächst, gefunden wurden.

Als wohl bekanntestes Beispiel eines Cholesteatom-Patienten gilt wohl der letzte deutsche KAISER WILHELM (1859-1941) zu nennen, der durch viele Krankheitserscheinungen beeinträchtigt, 19-jährig an dieser erkrankte. Hätte 1886 die Krankheit mit immer wiederkehrenden Komplikationen einen letalen Ausgang genommen, wären 1886-1888 drei Hohenzollern-Generationen von der politischen Weltbühne verschwunden. [LEITHAUSER, 2000]

## **1.2. Das Immunsystem**

Das Immunsystem ist ein funktionelles System zur Erhaltung des Körpers durch Abwehr körperfremder Substanzen und Elimination anormaler Körperzellen, um den durch sie verursachten Schaden möglichst klein zu halten. Es schützt den Organismus vor Viren, Bakterien, fremden Molekülen und Tumorzellen. Dabei ist eine (bezüglich des Erregers) unspezifische, angeborene (oder nicht-adaptive) und eine spezifische, erworbene Immunität zu differenzieren. Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden ist, dass eine erworbene Immunantwort sehr spezifisch auf ein bestimmtes Pathogen reagiert. [Roitt et al., S.2].

### 1.2.1. Unspezifische und spezifische Immunität

Bei der **unspezifischen Immunität** sind eine humorale und eine zelluläre Komponente zu unterscheiden. Zur *humoralen Immunität* zählen Akut-Phase-Proteine (Komplementsystem, C-reaktives Protein, Serumamyloid-A, Fibrinogen), Lysozym und Interferon. [NORDBRUCH ET AL., S.41] Für die *zelluläre Immunantwort* sind hauptsächlich Leukozyten verantwortlich, von denen es mehrere verschiedene Typen gibt. Eine wichtige Gruppe von Leukozyten sind die Phagozyten (Fresszellen), wozu die Monozyten, Makrophagen und neutophilen polymorphkernigen Granulozyten gehören. [ROITT et al., S.2].

Die **spezifische Immunität** wird ebenfalls in zwei Komponenten unterteilt, wobei den *humoralen* Bereich Antikörper darstellen, die von B-Lymphozyten produziert wurden. [NORDBRUCH ET AL., S.41] Antikörper sind Serumproteine, die als Antwort auf den Kontakt mit einem Antigen gebildet werden und spezifisch mit dem Antigen reagieren, um Immunkomplexe zu bilden. Sie haben die Aufgabe, diese eindringende Substanz aus dem Körper zu eliminieren. Hinsichtlich ihrer Größe, Gewicht, Struktur, Funktion und anderer Kriterien werden sie in fünf Klassen unterteilt. Dabei handelt es sich um IgA (Immunglobulin A), IgD, IgE, IgG und IgM. Bei immunhistochemischen Färbungen werden vorwiegend Antikörper vom Typ IgG eingesetzt [BOURNE, S.7].

Die *zelluläre* Komponente kennzeichnen hingegen T-Lymphozyten, die wie die B-Lymphozyten ursprünglich aus dem Knochenmark stammen. T- und B-Lymphozyten gehören wie die Phagozyten zu den Leukozyten.

### 1.2.2. Zwei Strategien

Die **unspezifischen** Abwehrsysteme sind befähigt, ohne vorangegangenen Kontakt, Fremdkörper unschädlich zu machen.

Die **spezifischen** Abwehrsysteme hingegen gewinnen ihre Wirksamkeit erst durch die Auseinandersetzung mit dem Fremdkörper, daher spricht man in diesem Fall von erworbener Immunität.

Beide Strategien laufen nebeneinander und miteinander ab, und bewirken so eine effektive Immunantwort. Je nach Erkrankung kann bei der spezifischen Immunität entweder die humorale oder zelluläre Abwehr in den Vordergrund treten. [NORDBRUCH ET AL., S.41]

### **1.2.3. Herkunft immunkompetenter Zellen**

Alle Zellen der Immunabwehr stammen von Knochenmarkstammzellen ab. Neben der myeloiden Reihe, aus der sich Granulozyten und Monozyten entwickeln, existiert noch die sogenannte lymphoide Reihe, aus der sich B- und T-Lymphozyten und die natürlichen Killerzellen entwickeln.

Eine Differenzierung in reife, thymusabhängige T-Zellen oder antiköpersynthetisierende B-Zellen erfolgt innerhalb der primär lymphatischen Organe. Bei Säugetieren reifen T-Zellen im Thymus, die B-Zellen in der fetalen Leber sowie im Knochenmark. Vögel besitzen ein spezielles Organ für die Bildung von B-Lymphozyten, die Bursa Fabricii. [Roitt et al., S.2] Es entstehen bei den T- und B-Lymphozyten sowohl Effektorzellen (z.B. Helfer-, Suppressor- oder Killerzellen; Plasmazellen) als auch langlebige Gedächtniszellen.

Sekundär lymphatische Organe sind Milz, Lymphknoten, kapselfreies lymphatisches Gewebe wie die Peyer'schen Plaques des Ileums, die Appendix und die Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenrings. In diesen Organen findet der Kontakt zwischen reifen Lymphozyten und Fremdartigen statt.

Das wesentliche Bauelement aller sekundär lymphatischen Organe ist der Lymphfollikel, in dem freie Immunzellen eingelagert sind. Solange noch kein Antigenkontakt stattgefunden hat, haben Lymphfollikel eine homogene Struktur und werden als Primärfollikel bezeichnet. Unter Antigeneinfluß wandeln sie sich in Sekundärfollikel um. [Oethinger, S.219]

### **1.2.4. Funktion der Lymphozyten**

Beide Lymphozytenarten können einzelne Pathogene spezifisch erkennen. Die B-Zellen bekämpfen extrazelluläre Pathogene und ihre Produkte, indem sie

Antikörper freisetzen. Die T-Lymphozyten haben ein breiteres Aktivitätsspektrum. Sie helfen zum Teil Phagozyten, die, von ihnen aufgenommenen Pathogene zu zerstören. Andere interagieren mit B-Zellen und helfen diesen, sich zu teilen, zu differenzieren und Antikörper zu produzieren. Eine dritte Gruppe erkennt Zellen, die von Viren befallen sind, und zerstören diese. [Roitt et al., S.2]

#### **1.2.4.1. Stimulation der T-Lymphozyten mit Makrophagenaktivierung**

Die T-Lymphozyten können ihr Antigen nur erkennen, wenn es an antigenpräsentierenden Zellen auf MHC-Proteinen gebunden ist. [NORDBRUCH ET AL., S.56] Nachdem der Makrophage das Antigen phagozytiert und in seinem Inneren in kleine Peptidstücke zerlegt, werden diese auf die MHC-kodierten Proteine geladen. Das Peptid, das ein Epitop des Antigens repräsentiert, wird im weiteren Verlauf auf der Oberfläche des Makrophagen auf dem MHC-Protein präsentiert. Der T-Lymphozyt kann nun mit einem spezifischen Rezeptor (T-Zellen-Antigenrezeptor) das Antigen erkennen, und wird durch Bindung des Rezeptors an den peptidtragenden MHC aktiviert. Je nach Lymphozyten-Typ kommt es im Anschluss zur Ausschüttung von Interleukinen (T-Helfer-Zellen), Zytolyse (Zytotoxische T-Lymphozyten) oder Suppression einer Immunreaktion (Suppressor-T-Lymphozyten). [OETHINGER, S.238-9]

In der Nachbarschaft des T-Zell-Rezeptors finden sich verschiedene Moleküle auf der Zellmembran. [OETHINGER, S.241] Die Lymphozyten exprimieren viele verschiedene dieser „Marker“ auf ihrer Oberfläche, die zur Unterscheidung von Zellpopulationen dienen, und die durch spezifische monoklonale Antikörper identifiziert werden können. Dazu steht eine systematische Nomenklatur zur Verfügung, das CD-System (cluster of differentiation), in welchen die Zelloberflächenmarker fortlaufend als CD1, CD2 etc. nummeriert werden. Dabei binden bestimmte Cluster von monoklonalen Antikörpern ganz spezifisch einen Zellmarker [ROITT et al., S.14]. CD-3 ist z.B. ein Molekül, das sich auf jedem reifen T-Lymphozyten findet. CD-4 ist ein Molekül, das die T-Lymphozyten vom Helfertyp charakterisiert und CD-8 findet sich auf T-Lymphozyten vom zytotoxischen Typ [OETHINGER, S.241].

### **1.3. Fragestellung dieser Studie**

Sinn dieser Studie ist es, durch immunologische Färbemethoden eine quantitative und qualitative Bestimmung immunkompetenter Zellen im histologischen Präparat der Cholesteatomperimatrix durchzuführen. Hierbei sollen Aussagen über den Grad der Entzündung, die Art der entzündlichen Reaktion sowie die Interaktion der am entzündlichen Prozess beteiligten Zellen ermöglicht werden.

Ziel dieser Erkenntnis könnte es sein, aufgrund des Wissens um diese Zusammenhänge die Therapie gezielter auf die, mit dem Cholesteatom vergesellschafteten Entzündung abzustimmen.

# Material und Methode

## 2.1. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial diente Gewebe von 28 Cholesteatomen, die operativ entnommen und je nach histologischem Befund in solche mit oder ohne Entzündungszeichen unterteilt wurden. Die Präparate wurden in einer Zeitspanne von 1995 bis 2001 exidiert. Als Vergleichsgewebe dienten Präparate der Gehörgangshaut und des Trommelfells.

	<b>Anzahl der Cholesteatome</b>
<b>Sehr aggressive Cholesteatome</b>	12
<b>Mäßig aggressive Cholesteatome</b>	8
<b>wenig aggressive Cholesteatome</b>	8

Tabelle 1: Anzahl der Cholesteatome

## 2.2. Postoperative Lagerung des Gewebes

Postoperativ wurden kleine Behälter aus Kunststoff mit den Proben beschickt und mit Tissue-Tek der Firma SAKURA aufgefüllt. Hierbei handelt es sich um ein spezielles Einbettmittel für histologische Präparate (Zusammensetzung: Polyvinyl Alkohol (<11%), Carbowachs (<5%), nichtreaktive Inhaltstoffe (<85%)). Durch anschließende Gefrierung in flüssigem Stickstoff wurde das Gewebe fixiert.

Die gesammelten Gewebeproben wurden bis zur weiteren Untersuchung in einem Tiefkühlschrank bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **2.3. Vorbereitung**

Bevor die Gewebeproben bearbeitet werden konnten, mussten Objektträger der Größe 76x26 mit einer Lösung vorbehandelt werden, um ein späteres Ablösen der Präparate von der Glasoberfläche während des Färbeporganges zu vermeiden.

Bei der verwendeten Lösung handelte es sich um das Poly-L-Lysin, die in einer dünnen Schicht mit Hilfe eines Pinsels aufgetragen wurde. Zur Herstellung dieser Lösung wurden 25 mg Poly-L-Lysin (Sigma Chemicals; P 1274) in 250 ml destillierten Wasser gelöst und anschließend in 1 ml Triton (Sigma Chemicals) eingerührt. Die Lagerung fand in einem Tiefkühlschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  statt.

## **2.4. Bearbeitung des Gewebes**

Die tiefgefrorenen Cholesteatom-Präparate wurden zur Aufbereitung dem Tiefkühlschrank entnommen und in gekühlten Zustand in einem Kryostaten (Kryostat 2800 Frigocut-E, Firma REICHERT UND JUNG, CAMBRIDGE INSTRUMENTS) mit Hilfe eines Rotations-Mikrotommessers in  $4\ \mu\text{m}$  dünne Scheiben bei  $-24\ ^{\circ}\text{C}$  geschnitten.

Pro Objektträger wurden jeweils zwei Präparate-Schnitte übertragen, die danach ca. 2 Stunden an der Luft getrocknet wurden. Anschließend wurden sie zur weiteren Aufbewahrung bei  $-80\ ^{\circ}\text{C}$  im Tiefkühlschrank gelagert, bis sie für den folgenden Färbeporgang aus diesem wieder entnommen wurden.

## 2.5. Färbevorgang

### 2.5.1. Verwendete Färbemethode

Die indirekte Immunperoxidasefärbung ermöglichte die Darstellung zellulärer Antigene durch das Enzym Peroxidase zusammen mit einem spezifischen Antikörper.

Bei dieser Methode kommt es zu einer Bindung des Antigens im Präparat an einen konjugierten Antikörper. Um diese Anlagerung zu lokalisieren, wird ein Peroxidase-konjugierter Antikörper benötigt, der sich an den ersten Antikörper bindet (Handbuch der Immunperoxidase).

### 2.5.2. Verwendete Antikörper

Um gegen eine einzelne Antigen determinante gerichteten spezifischen Antikörper zu besitzen, wurden für die Zell-Charakterisierung monoklonale Antikörper der Maus oder Ziege verwendet. Die Austitrierung der für die Färbung optimalen Verdünnung erfolgt auf Tonsillengewebe.

Firmenname	Verdünnung	Spezifität	Zielzellen
Dako <b>CD 25</b>	1:100	CD 25	Findet sich vor allem in aktivierten <b>T-Zellen</b> , ferner in B-Zellen (bei geringerer Dichte), und Monozyten. Bindet an IL-2-Rezeptor ( $\beta$ ).
Dako <b>CD28</b>	1:100	CD 28	Findet sich bei <b>T-Zellen</b> (95% der CD 4 Helferzellen, 50% der CD 8 Suppressorzellen) und bei aktivierte B-Zellen.
Dianova <b>CD 40</b>	1:40	CD 40	Periphere <b>B-Lymphozyten</b> , jedoch nicht in ausdifferenzierten Plasma-Zellen. (Das Antigen findet sich auf einigen Epithelzellen, Carcinomen und lymphoiden dendritischen Zellen.
Dianova <b>CD 40 Ligand</b>	1:20	CD 40 Ligand	Aktivierte <b>T-Zellen</b> .
Dako <b>CD 69</b>	1:50	CD 69	Aktivierte T- und <b>B-Zellen</b> , vorhanden auch in Natural Killer-Zellen und Makrophagen.

Tabelle 2: Primärantikörper (**Maus**)

Firmenname	Verdünnung	Spezifität	Zielzellen
Santa Cruz <b>B7-1</b>	1:50	B7-1	<b>T-Zellen</b> und aktivierte B-Zellen, außerdem CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein-4)
Santa Cruz <b>B7-2</b>	1:25	B7-2	<b>T-Zellen</b> und aktivierte B-Zellen, außerdem CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein-4)

Tabelle 3: Primärantikörper (**Ziege**)

### **Sekundärantikörper (Maus):**

Peroxidase-konjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin vom Kaninchen der Firma DAKO (Code no. P 0161).

Zusammensetzung: 700  $\mu$ l PBS, 300  $\mu$ l AB-Serum, 20  $\mu$ l DAKO P161

### **Sekundärantikörper (Ziege):**

Peroxidase-konjugiertes Anti-Ziege-Immunglobulin vom Kaninchen der Firma DAKO (Code no. P 0449).

Verdünnung: 350  $\mu$ l PBS, 150  $\mu$ l AB-Serum, 10  $\mu$ l DAKO P 449.

### **Tertiärantikörper:**

Meerrettich-Peroxidase\_konjugiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin von der Ziege der Firma DAKO (Code no. Medac L42007).

Verdünnung: 700  $\mu$ l PBS, 300  $\mu$ l AB-Serum, 20  $\mu$ l Medac L 42007.

## **2.5.3. Austitrierung der Antikörper**

Die Austitrierung der optimalen Antikörper-Verdünnung für den Primärantikörper erfolgte mit PBS auf Tonsillengewebe mit Konzentrationen von 1:20, 1:25, 1:40, 1:50, 1:100 und 1:200 (optimale Antikörper-Verdünnungen sind in der Tabelle 4 hervorgehoben).

<b>DAKO CD 25</b>	1:20	1:40	1:25	1:50	<b>1:100</b>	1:200
<b>DAKO CD 28</b>	1:20	1:40	1:25	1:50	<b>1:100</b>	1:200
<b>Dianova CD 40</b>	1:20	<b>1:40</b>	1:25	1:50	1:100	1:200
<b>Dianova CD 40 lig.</b>	<b>1:20</b>	1:40	1:25	1:50	1:100	1:200
<b>DAKO CD 69</b>	1:20	1:40	1:25	<b>1:50</b>	1:100	1:200
<b>Santa Cruz B7-1</b>	1:20	1:40	1:25	<b>1:50</b>	1:100	1:200
<b>Santa Cruz B7-2</b>	1:20	1:4	<b>1:25</b>	1:50	1:100	1:200

Tabelle 4: Austitrierte Konzentrationen

#### 2.5.4. Verwendete Pufferlösungen

- NaCL-Tris Puffer pH 7,4
- NaCL-Tris Puffer pH 7,6

Für diese Lösungen wurden 9,0 l Aqua dest. und 81,0g NaCL sowie separat 2,0 l Aqua dest. und 12,0g Tris(hydroxymethylaminomethan) angesetzt. Die Tris-Lösung wird mit 1n HCL auf pH 7,6 eingestellt. Davon werden 1000 ml zur weiteren Verwendung beiseite getan. Der Rest wird mit 1n HCL auf einen pH von 7,4 eingestellt.

- DAB-Lösung

Es werden hierfür 10 ml NaCL-Tris-Lösung. Mit einem pH von 7,6 sowie 6 mg DAB (3,3 Diaminobenzidintetrahydrochloridsäure) mit 5µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) direkt vor dem Auftragen auf das Gewebe gemischt.

#### 2.5.5. Verfahrenstechnik der Immunperoxidase-Färbung

1. Entnahme der mit Gewebe bestückten Objektträger aus dem Tiefkühlschrank.
2. Trocknung des Gewebes bei Raumtemperatur.

3. Objektträger 10 Min. in ein mit Aceton gefülltes Bad legen.
4. Objektträger 3-5 Min. in ein Pufferbad legen.
5. Objektträger aus dem Pufferbad entfernen und überschüssige Flüssigkeit vorsichtig um das Gewebe herum wegtupfen.
6. Antikörper mit einer 100er Pipette auf die flach gelagerten Objektträger auftragen. Der Antikörper muss dabei das ganze Gewebe benetzen. 30 Min. lichtgeschützt inkubieren.
7. Kontroll-Gewebe nicht mit Antikörper, sondern ausschließlich mit PBS-Puffer behandeln. Ebenfalls 30 Min. lichtgeschützt inkubieren.
8. Nach 30 Min. Primärantikörper mit NaCl-Tris Puffer (pH 7,4) aus der Flasche vorsichtig abspülen und anschließend dreimaliges Waschen mit demselben Puffer zur Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit vom Objektträger (jeweils 3 Min).
9. Objektträger aus dem Pufferbad entfernen und überschüssige Flüssigkeit vorsichtig um das Gewebe herum wegtupfen.
10. Antikörper auf die flach gelagerten Objektträger auftragen. Der Antikörper muss dabei wieder das ganze Gewebe benetzen. 30 Min. lichtgeschützt inkubieren.
11. Kontrollgewebe mit 2. Antikörper benetzen. Ebenfalls 30 Min. lichtgeschützt inkubieren.
12. Nach 30 Min. Sekundärantikörper mit NaCl-Tris Puffer ( pH 7.4 ) aus der Flasche vorsichtig abspülen und anschließend dreimaliges Waschen mit demselben Puffer zur Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit vom Objektträger für jeweils 3 Min.
13. Objektträger aus dem Bad entfernen und überschüssige Flüssigkeit vorsichtig um das Gewebe herumtupfen.

14. Antikörper auf die flach gelagerten Objektträger auftragen. Der Antikörper muss dabei wieder das ganze Gewebe benetzen. 30 Min. lichtgeschützt inkubieren.
15. Kontrollgewebe mit 3. Antikörper benetzen. Ebenfalls 30 Min lichtgeschützt inkubieren.
16. Nach 30 Min. Tertiärantikörper mit NaCL-Tris Puffer ( pH 7,4 ) aus der Flasche vorsichtig abspülen und anschließend zweimaliges Waschen mit demselben Puffer für jeweils 3 Min. Dritte Waschung mit NaCL-Tris Puffer (pH 7,6) für ebenfalls 3 Min.
17. Objektträger aus dem Pufferbad entfernen und überschüssige Flüssigkeit vorsichtig um das Gewebe herum wegtupfen.
18. Applikation des flach gelagerten Gewebes mit DAB-Lösung. Für 15 Min. lichtgeschützt inkubieren. Zusammensetzung: 10 ml NaCl-Tris Puffer ( pH 7,6 ), 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 6 mg Diaminobenzidine.
19. Abkippen und spezielle Entsorgung der DAB-Lösung. Anschließend einmaliges Waschen mit NaCL-Tris Puffer ( pH 7,4 ) für 5 Min.
20. Kurze Waschung des Gewebes mit destilliertem Wasser.
21. Mit Mayers Hämalaun (Merk Diagnostika) 5 Min. gegenfärben (für Kernanfärbung).
22. Abkippen des Hämalauns und Reinigen des Gewebes für 15 Min. unter fließendem Wasser.
23. Kurze Waschung des Gewebes mit destilliertem Wasser.
24. Objektträger aus dem destillierten Wasser entfernen und überschüssige Flüssigkeit vorsichtig um das Gewebe herum wegtupfen.
25. Aufbringen der Deckgläser mit auf 40 °C erwärmter Kaisers Glyceringelatine und anschließende Trocknung.

## **2.6. Verwendete Instrumente**

Zur Auswertung der Cholesteatomschnitte standen folgende Instrumente zur Verfügung.

1. Mikroskop der Firma LEITZ, Wetzlar (Typ: Laborlux S ); verschiedene Objektive (2,5x; 6,3x;10x; 40x)
2. Sony-Videokamera, mit der die Cholesteatomschnitte vom Mikroskop zu einem herkömmlichen PC übertragen wurden (Kameratyp: DXC-930P, 3CCD Color). Software: GRAB 4 PCI (Firma Phytex Messtechnik), Digitale Bildbearbeitung: Correl Photo Paint 8
3. Farbdrucker der Firma Hewlett Packart (HP 2000 C)

## **2.7. Verfahren zur Erfassung der Patientendaten**

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch. Die Intensität wurde semiquantitativ von zwei Beobachtern vorgenommen:

Insgesamt standen Präparate von 28 verschiedenen Patienten zur Verfügung. Aus jeweils einem Gewebe entstanden mehrere Präparatescheiben, die mit sieben verschiedenen Antikörpern beschickt wurden.

Für die optische Orientierung, wurde mit Hilfe von Computer und Farbdrucker die mikroskopierte Ansicht eines jeweiligen Präparates auf Photopapier (DinA 4) verbracht. Diese Aufnahme stellte (aus Übersichtsgründen) immer das Präparat in der HE-Färbung dar.

Beim Mikroskopieren wurde zunächst die Lage aller durch Antikörper färbbar gemachten Zellen ermittelt und farblich auf das Photopapier (HE-Färbung) übertragen. (Jeder Antikörper erhielt dabei eine nur für ihn bestimmte Farbe.)

CD 40 orange, CD 40 Ligand rot, CD25 grün etc.). Um die Darstellung zu präzisieren und die Zellen quantitativ zu erfassen, geschah dies in Form einer relativen Quantifizierung (siehe auch Abb. 1).

+	1-4 positive Zellen
++	5-10 positive Zellen
+++	> 11 positive Zellen

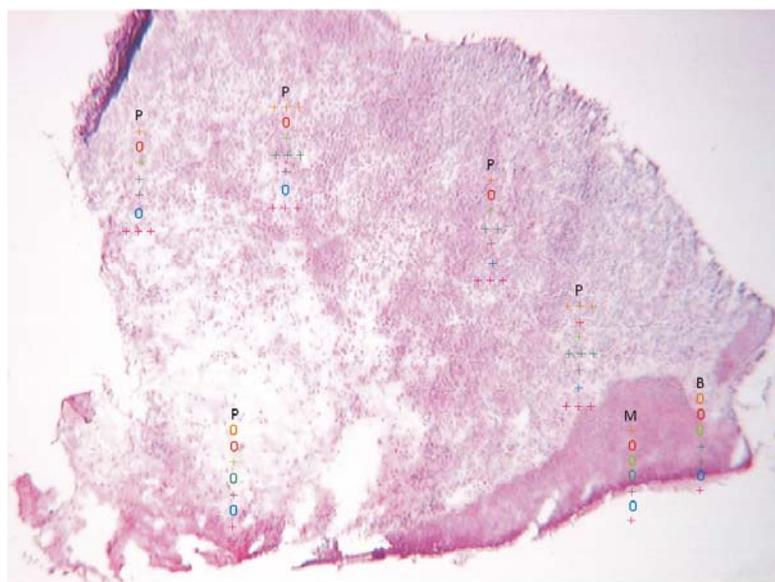
Tabelle 5: Zellquantifizierung

Die Stärke der Anfärbung wurde auf vergleichbare Weise dokumentiert.

+	schwache Anfärbung
++	mäßige Anfärbung
+++	starke Anfärbung

Tabelle 6: Anfärbedokumentation

Diese Form der Auswertung wurde gewählt, um eine sehr genaue Übersicht über das zu mikroskopierende Präparat zu gewährleisten und um die Anzahl der verschiedenen Antikörper gut miteinander vergleichen zu können.



P=Perimatrix  
B=Basalmembran  
M=Matrix

CD 40  
CD 40 Ligand  
CD 25  
CD 28  
CD 69  
B 7-1  
B 7-2

**Abb. 1: Übersichtsaufnahme zur quantitativen Darstellung der Zellverteilung. Präparat 252; HE-Färbung; Vergrößerung 6,3 x**

### 2.7.1. Patientendaten

Das Verhältnis männlicher zu weiblicher Patienten lag bei 1,8:1.

Das Alter der Patienten lag zwischen 6 und 74 Jahren.

Das mittlere Alter aller Patienten lag bei 39 Jahren.

Das mittlere Alter aller männlichen Patienten lag bei 42 Jahren.

Das mittlere Alter aller weiblichen Patienten lag bei 33 Jahren

Alter	Anzahl	Männlich	weiblich
0-15	6	3	3
16-30	2	1	1
31-45	8	6	2
46-60	9	5	4
61-80	3	3	0
Gesamt	28	18	10

Tabelle 7: Patientendaten

# Ergebnisse

Die Präparate wurden nach klinischen Gesichtspunkten in die Untergruppen aggressiv, mäßig und wenig aggressiv untergliedert. Beschrieben wurden die Ergebnisse in Bezug auf Färbung, Lagebeziehung (zu Perimatrix (P), Basalmembran (B) und Matrix (M)) und Anzahl der markierten Zellen.

Die Resultate wurden in Form einer großen Exceltabelle angelegt (siehe: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse: Tabelle 39/ 40).

## 3.1. Gruppe der klinisch aggressiven Cholesteatome

Insgesamt wurden 12 Präparate untersucht. Davon hatten acht Verhornungen schwachen bis mäßigen Grades.

In drei Fällen zeigte sich ein papilläres Tiefenwachstum im Bereich der Matrix.

Alle positiv markierten Zellen hatten ein rundes bis kubisches Erscheinungsbild.

In Fällen von Clusterbildung fand diese ausschließlich in der Perimatrix statt.

### CD 25 positive Zellen

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ sehr starke Anfärbungen</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ meist vereinzelte Zellen</li><li>▪ in einem Fall clusterförmige Anhäufung</li></ul>

Tabelle 8: CD 25

### CD 28 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mäßig bis starke Anfärbung</li></ul>
40Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen, kleinere Zellansammlungen und auch clusterförmige Anhäufungen</li></ul>

Tabelle 9: CD 28

### CD 40 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ sehr starke Anfärbung von CD 40 (in 5 Präparaten)</li><li>▪ mäßig bis stark (Rest)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vor allem in der Perimatrix</li><li>▪ Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen.</li><li>▪ in einem Präparat im Bereich der Perimatrix kleinere Zellanhäufungen und clusterförmige Anhäufungen</li></ul>

Tabelle 10: CD 40

### CD 40 Ligand positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ schwache bis mäßige starke Anfärbung</li><li>▪ keinerlei Anfärbung (in 9 Präparaten)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vor allem Perimatrix, dabei keine engere Beziehung zur Basalmembran</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen</li></ul>

Tabelle 11: CD 40 Ligand

### CD 69 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mäßig bis starke Anfärbung</li><li>▪ keine Anfärbung (1 Präparat)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<p>Das Auftreten von Zellanhäufungen war sehr unterschiedlich.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ in 6 Fällen fanden sich vereinzelte Zellen</li><li>▪ in 2 Fällen vereinzelte bis kleinere Zellgruppierungen</li><li>▪ in 3 Fällen follikelartige Anhäufungen in der Perimatrix.</li></ul>

Tabelle 12: CD 69

### B7-1 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ sehr schwach (in 2 Präparaten)</li><li>▪ keinerlei Anfärbung (10 Präparaten)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen</li></ul>

Tabelle 13: B7-1

### B7-2 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ schwache bis mäßig Anfärbung (in 4 Präparaten)</li><li>▪ keinerlei Anfärbung (in 8 Präparaten)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelt Zellen (in 3 Präparaten)</li><li>▪ vereinzelte Zellen, kleinere Gruppierungen und clustertartige Anhäufungen (in 1 Präparat)</li></ul>

Tabelle 14: B7-2

## 3.2. Gruppe der klinisch mäßig aggressiven Cholesteatome

Insgesamt wurden 8 Präparate untersucht. Davon hatten zwei Verhornungen schwachen Grades.

Ein papilläres Tiefenwachstum konnte in keinem einzigen Präparat entdeckt werden.

Alle positiv markierten Zellen zeigten ein rundes bis kubisches Erscheinungsbild.

In Fällen von Clusterbildung fand diese ausschließlich in der Perimatrix statt.

### CD 25 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ mäßig bis starke Anfärbung.</li> </ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Perimatrix</li> <li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li> <li>▪ Matrix</li> </ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ vereinzelte Zellen (in 5 Präparaten)</li> <li>▪ follikelartige Anhäufung (1 Präparat)</li> </ul>

Tabelle 15: CD 25

### CD 28 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ mittlere bis starke Anfärbung</li> </ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Perimatrix</li> <li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li> <li>▪ Matrix</li> <li>▪ In 2 Fälle wurden Zellen nur im Bereich der Perimatrix beobachtet.</li> </ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ vereinzelte und kleinere Gruppierungen positiver Zellen (in 4 Präparate)</li> <li>▪ follikelartige Ansammlungen (in 3 Präparaten)</li> </ul>

Tabelle 16: CD 26

### CD 40 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ starke Anfärbung</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelt positive Zellen</li><li>▪ clusterartige Ansammlungen (2 Präparate)</li></ul>

Tabelle 17: CD 40

### CD 40 Ligand positive Zellen

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ schwache bis mittlere (7 Präparate)</li><li>▪ keine Anfärbung (1 Präparat)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Basalmembran</li><li>▪ Matrix (1 Präparat)</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen</li></ul>

Tabelle 18: CD 40 Ligand

### CD 69 positive Zellen

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mittlere bis starke Anfärbung</li><li>▪ keine Anfärbung (in einem Präparat)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li><li>▪ nur in der Perimatrix (1 Präparat)</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen, kleinere Gruppierungen und clusterartige Anhäufungen</li></ul>

Tabelle 19: CD 69

### B7-1 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ schwache Anfärbung (3 Präparate)</li><li>▪ keinerlei Anfärbung (5 Präparaten)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ in der Perimatrix nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen</li></ul>

Tabelle 20: B7-1

### **B7-2 positive Zellen:**

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ schwache Anfärbung</li><li>▪ keinerlei Anfärbung (3 Präparate)</li><li>▪ Die Ausfällung war generell schwächer als bei der Anfärbung mit B7-1.</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen</li><li>▪ kleinere Gruppen (in 2 Präparaten)</li></ul>

Tabelle 21: B7-2

## **3.3. Gruppe der klinisch wenig aggressiven Cholesteatome**

Insgesamt wurden acht Präparate untersucht. Davon hatten sechs Verhornungen mäßigen bis starken Grades.

In keinem der 8 Fälle konnte im Bereich der Matrix ein papilläres Tiefenwachstum festgestellt werden.

Alle positiv markierten Zellen hatten ein rundes bis kubisches Erscheinungsbild.

In Fällen von Clusterbildung fand diese ausschließlich in der Perimatrix statt.

**CD 25 positive Zellen:**

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mäßig bis starke Anfärbung</li><li>▪ keinerlei Anfärbung (1 Präparat)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li><li>▪ In 2 Präparaten wurden positive Zellen nur im Bereich der Perimatrix ermittelt</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelt</li><li>▪ clusterartige Vorkommen (1 Präparat)</li></ul>

Tabelle 22: CD 25

**CD 28 positive Zellen:**

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mittlere bis starke Anfärbung</li><li>▪ keinerlei Anfärbung (3 Präparate)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix (4 Präparate)</li><li>▪ Matrix (1 Präparat)</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelt</li><li>▪ clusterartige Ansammlung (1 Präparat)</li></ul>

Tabelle 23: CD 28

**CD 40 positive Zellen:**

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mittlere Anfärbung</li><li>▪ keine Färbung (1 Präparat)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen</li><li>▪ vereinzelte Zellen, kleinere Gruppierungen und cluste- rartige Anhäufungen (1 Präparat)</li></ul>

Tabelle 24: CD 40

### CD 40 Ligand positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ schwache bis mittlere Anfärbung</li><li>▪ keine Färbung (4 Präparate)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrixabschnitte, die nicht nahe der Basalmembran gelegen waren</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelter Zellen</li></ul>

Tabelle 25: CD 40 Ligand

### CD 69 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mittlere bis starke Anfärbung</li><li>▪ keine Färbung (4 Präparate)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen</li></ul>

Tabelle 26: CD 69

### B7-1 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ schwache Anfärbung (3 Präparate)</li><li>▪ keine Färbung (5 Präparate)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelt Zellen (2 Präparate)</li><li>▪ clusterartige Ansammlungen (1 Präparat)</li></ul>

Tabelle 27: B7-1

### B7-2 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mittlere Anfärbung</li><li>▪ keine Färbung (2 Präparate)</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Vereinzelte Zellen</li></ul>

Tabelle 28: B7-2

## 3.4. Gruppe der Vergleichsgewebe

Insgesamt wurden zwei Präparate untersucht. Es handelte sich hierbei um ein Präparat mit entzündetem Trommelfellgewebe und um eines mit nichtentzündeter Gehörgangshaut.

### 3.4.1. Entzündliches Trommelfellgewebe

#### CD 25 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ starke Anfärbung</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelt Zellen</li></ul>

Tabelle 29: CD 25

#### CD 28 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ starke Anfärbung</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen, kleinere Gruppierungen und clusterartige Anhäufungen</li></ul>

Tabelle 30: CD 28

#### CD 40 positive Zellen:

Färbung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ mittlere bis starke Anfärbung</li></ul>
Lagebeziehung:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Perimatrix</li><li>▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran</li><li>▪ Matrix</li></ul>
Anzahl:	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ vereinzelte Zellen</li><li>▪ clusterartige Anhäufungen</li></ul>

Tabelle 31: CD 40

### CD 40 Ligand positive Zellen:

Färbung:	▪ schwache Anfärbung
Lagebeziehung:	▪ Perimatrix
Anzahl:	▪ vereinzelter Zellen

Tabelle 32: CD 40 Ligand

### CD 69 positive Zellen:

Färbung:	▪ starke Anfärbung
Lagebeziehung:	▪ Perimatrix ▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran ▪ Matrix
Anzahl:	▪ vereinzelte Zellen, kleinere Gruppierungen und clustereartige Anhäufungen

Tabelle 33: CD 69

## 3.4.2. Gehörgangshaut

### CD 25 positive Zellen:

Färbung:	▪ mäßig Anfärbung
Lagebeziehung:	▪ Perimatrix ▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran ▪ Matrix
Anzahl:	▪ vereinzelt

Tabelle 34: CD 25

### CD 28 positive Zellen:

Färbung:	▪ schwache Anfärbung
Lagebeziehung:	▪ Perimatrix ▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran
Anzahl:	▪ vereinzelt

Tabelle 35: CD 28

**CD 40 positive Zellen:**

Färbung:	▪ mäßig Anfärbung
Lagebeziehung:	▪ Perimatrix ▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran ▪ Matrix
Anzahl:	▪ vereinzelte Zellen

Tabelle 36: CD 40

**CD 40 Ligand positive Zellen:**

Färbung:	▪ schwache Anfärbung
Lagebeziehung:	▪ Perimatrix ▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran
Anzahl:	▪ vereinzelt

Tabelle 37: CD 40 Ligand

**CD 69 positive Zellen:**

Färbung:	▪ mittlere Anfärbung
Lagebeziehung:	▪ Perimatrix ▪ Perimatrixabschnitte nahe der Basalmembran ▪ Matrix
Anzahl:	▪ vereinzelte Zellen

Tabelle 38: CD 69

### 3.5. Abbildungen

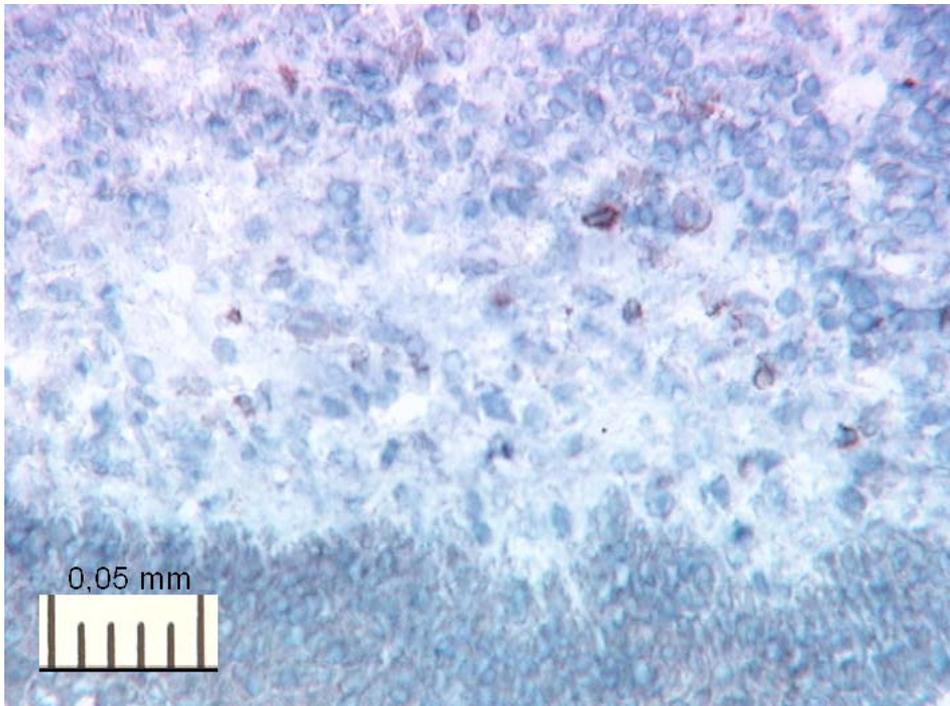


Abb.2: Präparat 252; Immunperoxidasefärbung; CD 25; Vergrößerung 40 x.

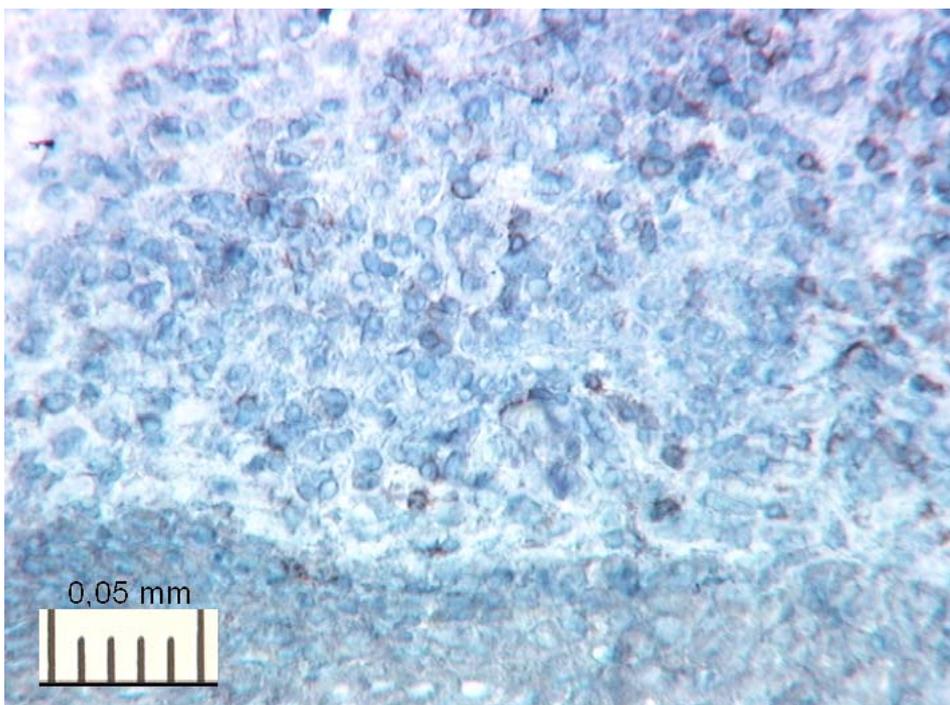
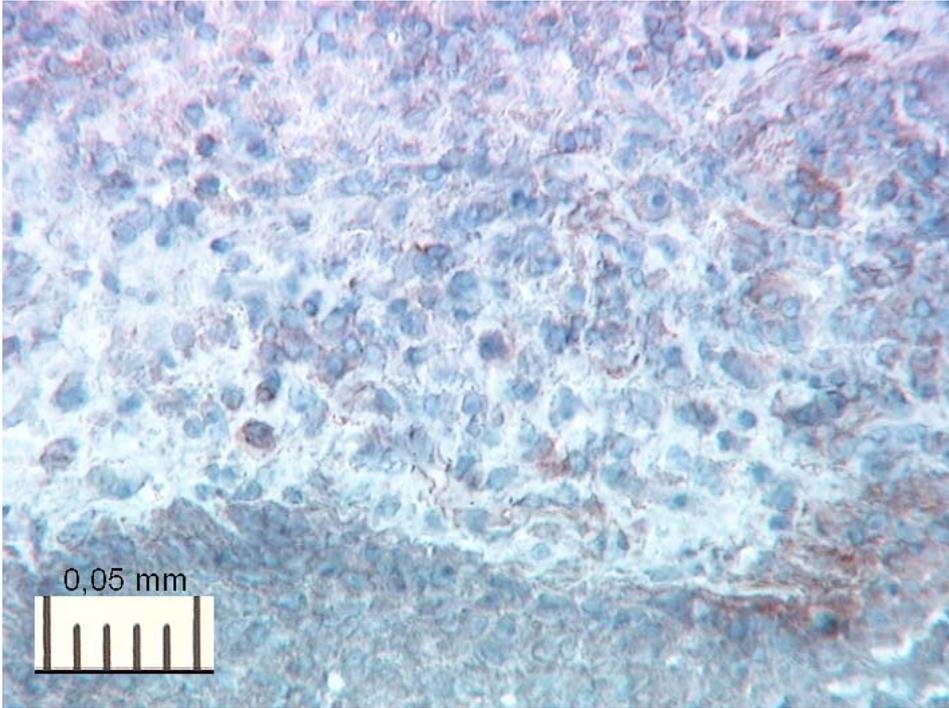
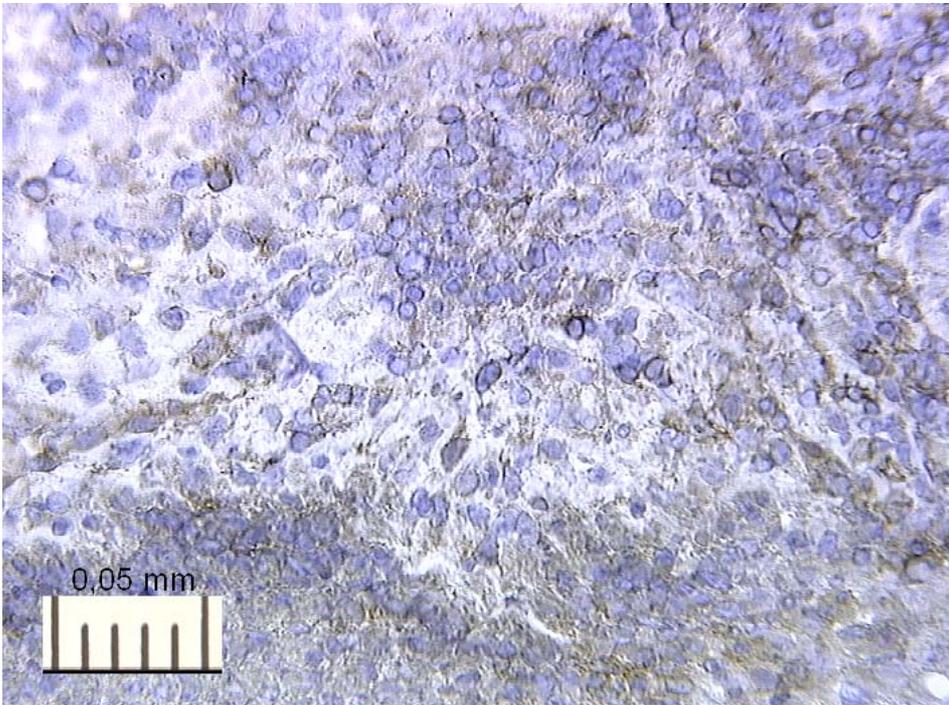


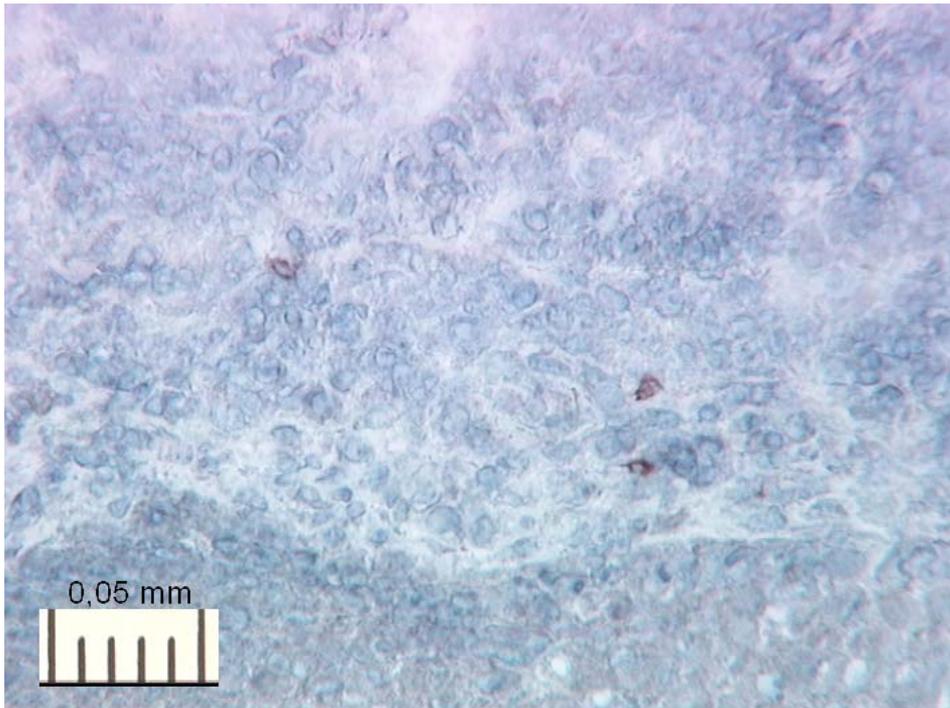
Abb. 3: Präparat 252; Immunperoxidasefärbung; CD 28; Vergrößerung 40 x.



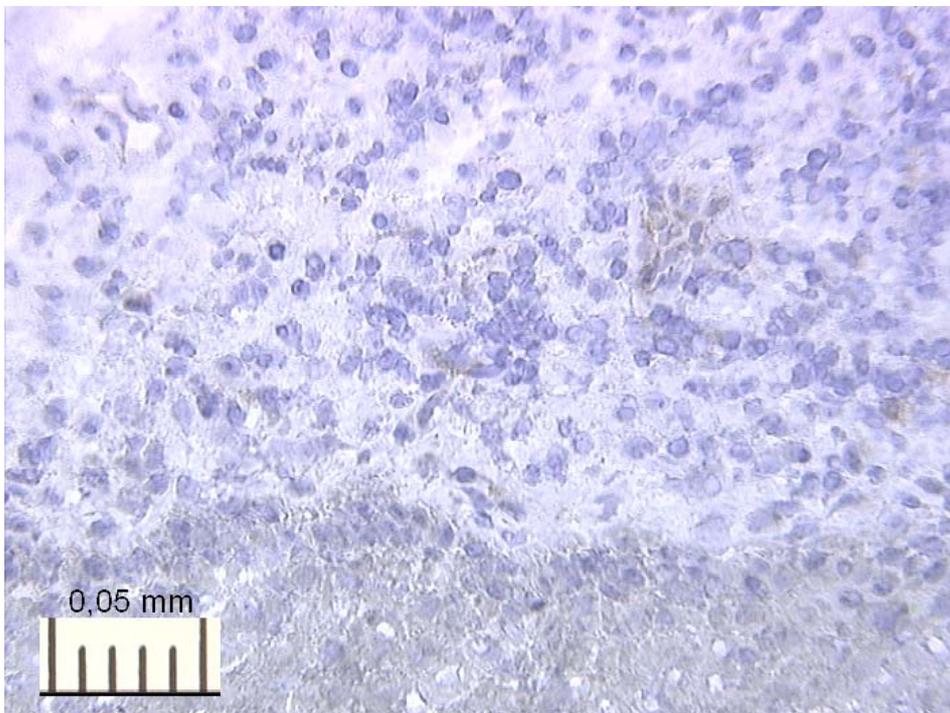
**Abb. 4: Präparat 252; Immunperoxidasefärbung; CD 40; Vergrößerung 40 x.**



**Abb. 5: Präparat 252; Immunperoxidasefärbung; CD 40 Ligand; Vergrößerung 40 x.**



**Abb.: 6 Präparat 252; Immunperoxidasefärbung; CD 69; Vergrößerung 40 x.**



**Abb.: 7 Präparat 252; Immunperoxidasefärbung; B 7-1; Vergrößerung 40 x.**

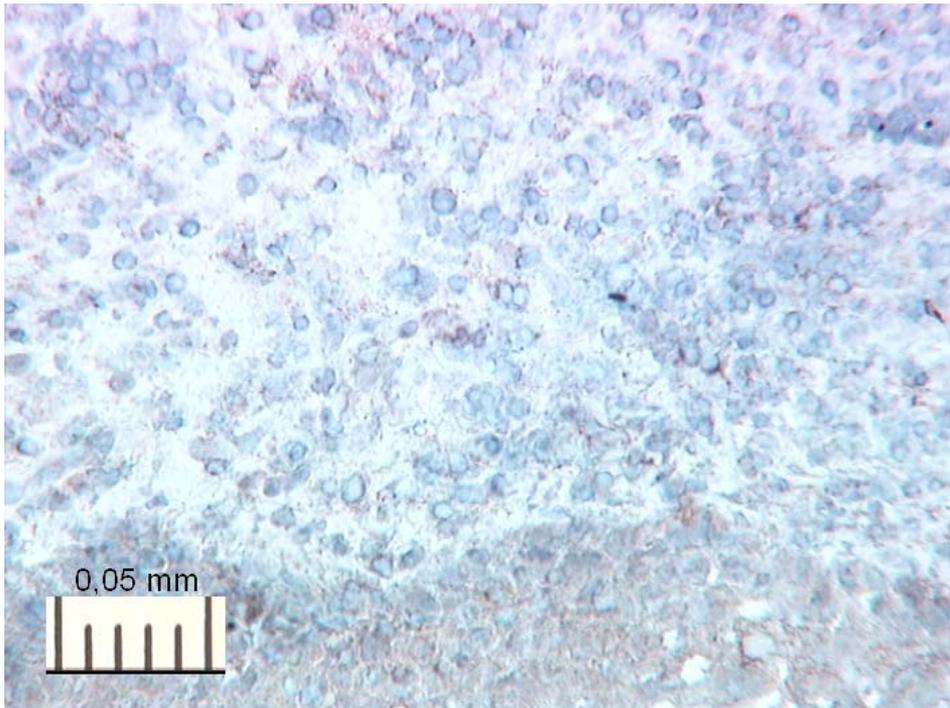


Abb. 8: Präparat 252; Immunperoxidasefärbung; B 7-2; Vergrößerung 40 x.

### 3.6. Auswertung der tabellarischen Darstellung und Zusammenfassung der Ergebnisse

Der tabellarische Überblick (Tabellen 29 und 30) bietet die Möglichkeit, die Präparate in Bezug auf Anfärbung, Lage und Quantität der markierten Zellen bzw. Zellmarker direkt zu vergleichen.

In Fällen von **Clusterbildung** fand diese ausschließlich **in der Perimatrix** statt.

#### **CD 25**

Die Färbung war überwiegend mäßig bis stark. Dabei wiesen wenig, mäßig und stark aggressive Cholesteatome vergleichbare Farbintensitäten auf. In allen Schichten fanden sich gleichermaßen Zellen, wobei diese fast durchweg vereinzelt auftraten (siehe Abb. 2).

## CD28

Die Färbung war überwiegend mäßig bis stark. In allen Schichten fanden sich gleichermaßen Zellen, wobei diese vereinzelt, in Gruppen allem und auch clusterförmig auftraten. Bei wenig aggressiven Cholesteatomen gab es eine Tendenz zum vereinzeltten Auftreten der Zellen (siehe Abb. 3).

## CD40

Die Färbung war überwiegend mäßig, wobei in stark aggressiven Cholesteatomen die Färbung stärker war. In allen Schichten fanden sich gleichermaßen Zellen, wobei diese vereinzelt, in Gruppen und auch clusterförmig auftraten. Clusterförmiges Auftreten fand sich vor allem bei stark aggressiven Cholesteatomen (siehe Abb. 4).

## CD 40 Ligand

Die Färbung war überwiegend schwach bis mäßig. Die Zellen fanden sich nicht in allen Schichten, sondern vorwiegend in der **Perimatrix**. Vereinzelt Zellen dominierten hier das Bild (siehe Abb. 5).

## CD 69

Die Färbung war überwiegend mäßig bis stark. In allen Schichten fanden sich gleichermaßen Zellen, wobei diese vereinzelt, in Gruppen und auch clusterförmig auftraten. **Die Anzahl der markierten Zellen wuchs dabei in Abhängigkeit von der Aggressivität der Cholesteatome.** So ergab sich bei wenig aggressiven Cholesteatomen eine Tendenz zum vereinzeltten Zellen, bei stark aggressiven hingegen eine Tendenz zu clusterförmigem Auftreten der Zellen (siehe Abb. 6).

## B 7-1

Die Anfärbung fiel insgesamt sehr unregelmäßig und schwach aus. Die Ergebnisse sind somit nur bedingt aussagekräftig. Die Zellen fanden sich in allen Schichten, jedoch vorwiegend in der Perimatrix. Vorwiegend fand sich ein vereinzelttes Auftreten der Zellen (siehe Abb. 7).

## **B 7-2**

Die Färbung war überwiegend schwach bis mäßig. Auch hier wurden nicht alle Präparate angefärbt. In allen Schichten fanden sich gleichermaßen Zellen, wobei diese vereinzelt, in Gruppen und auch clusterförmig auftraten. Vorwiegend fand sich ein vereinzelttes Auftreten der Zellen (siehe Abb. 8).

Präparat		CD 25									CD 28									CD 40									CD 40 Ligand								
Nr.	Klinisch	Färbung			Lage			Anzahl			Färbung			Lage			Anzahl			Färbung			Lage			Anzahl											
		s	m	st	P	B	M	1-4	5-10	>11	s	m	st	P	B	M	1-4	5-10	>11	s	m	st	P	B	M	1-4	5-10	>11									
158 B	stark	+	+		P	B	M	+			+		P	B	M	+			+	+		P	B	M	+			+									
175 B	stark			+	P	B	M	+	+	+		+	P	B	M	+	+	+		+		P	B	M	+	+	+										
189 A	stark			+	P	B	M	+			+		P	B	M	+			+	+		P	B	M	+			+									
217	stark			+	P	B	M	+	+		+		P	B	M	+	+	+		+		P	B	M	+			+									
226	stark			+	P	B	M	+	+		+		P	B	M	+			+	+		P	B	M	+			+									
244 A	stark			+	P	B	M	+			+		P	B	M	+			+	+		P	B	M	+			+									
246	stark	+	+		P	B		+					P	B								P	B														
	stark			+	P	B		+			+	+	P	B	M	+	+	+		+		P	B		+	+		+									
253	stark			+	P	B		+			+	+	P	B	M	+	+	+																			
	stark			+	P	B	M	+			+	+	P	B	M	+	+	+		+																	
	stark										+		P	B	M	+																					
	stark	+	+		P	B	M	+			+	+		B		+	+	+		+	+	P	B	M	+			+									
185	mäßig			+	P	B	M	+			+	+	P	B	M	+	+					P	B		+			+									
199	mäßig			+	P	B	M	+				+	P	B	M	+	+	+		+		P	B		+			+									
239 A	mäßig										+		P	B	M	+	+																				
	mäßig			+	P	B	M	+			+		P	B	M	+	+			+		P	B		+			+									
254	mäßig										+	+	P	B		+	+			+		P	B		+			+									
259	mäßig			+	P	B	M	+				+	P	B	M	+	+	+		+		P	B	M	+			+									
261	mäßig	+			P	B	M	+		+	+		P	B		+		+		+		P	B		+			+									
296	mäßig			+	P	B	M	+			+	+	P	B	M	+	+	+		+		P	B	M	+			+									
202	wenig			+	P	B		+											+	+		P	B														
	wenig			+	P	B	M	+																													
	wenig	+	+		P	B	M			+	+	+	P	B		+		+		+		P	B		+			+									
241	wenig												P	B	M	+				+		P	B	M	+			+									
256	wenig	+	+		P			+			+		B		+				+		+	P	B	M	+			+									
298	wenig			+	P	B	M	+				+	P	B	M	+			+		+	P	B	M	+			+									
313	wenig			+	P	B	M	+				+	P	B	M	+			+		+	P	B		+			+									
332 A	wenig	+	+		P	B	M	+			+		P	B		+	+		+		+	P	B		+			+									
	Trommelfell			+	P	B	M	+				+	P	B		+	+	+		+		P	B		+			+									
296 H	Gehörgangshaut	+			P	B	M	+			+		P	B		+			+		+	P	B		+			+									

Tabelle 39: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse Teil 1

Präparat	Klinisch	CD 69							B7-1							B7-2												
		Färbung			Lage			Anzahl	Färbung			Lage			Anzahl	Färbung			Lage			Anzahl						
Nr.	Aggressivität	s	m	st	P	B	M	1-4	5-10	>11	s	m	st	P	B	M	1-4	5-10	>11	s	m	st	P	B	M	1-4	5-10	>11
158 B	stark	+			P	B	M	+																				
175 B	stark	+	+		P	B	M	+	+	+																		
189 A	stark																											
217	stark	+			P	B	M	+												+			P				+	
226	stark	+	+		P	B	M	+																				
244 A	stark	+	+		P	B	M	+												+			P	B	M		+	
246	stark	+	+		P	B	M	+		+																	+	
252 A	stark	+			P	B	M	+												+	+		P	B	M	+	+	+
253	stark	+	+		P	B	M	+	+	+																		
301	stark	+	+		P	B	M	+	+		+			P	B	M	+			+			P	B	M	+	+	
308	stark	+			P	B	M	+																				
314	stark	+	+		P	B	M	+	+		+			P			+											
185	mäßig		+		P	B	M	+	+											+			P	B	M	+		
199	mäßig	+	+		P			+	+																			
239 A	mäßig																											
240 A	mäßig	+	+		P	B	M	+	+		+			P			+			+			P	B	M	+		
254	mäßig	+	+		P	B	M	+																				
259	mäßig	+	+		P	B	M	+												+	+		P	B	M	+	+	
261	mäßig		+		P	B	M	+		+	+			P	B		+			+			P	B	M	+	+	
296	mäßig	+			P	B	M	+			+			P	B	M	+			+	+		P	B	M	+		
202	wenig	+			P	B	M	+																				
219	wenig																			+			P	B	M	+		
235	wenig										+			P						+			P	B	M	+		
241	wenig	+	+		P	B	M	+												+			P	B	M	+		
256	wenig	+			P	B	M	+			+			P			+			+			P	B	M	+		
298	wenig		+		P	B	M	+												+			P	B	M	+	+	
313	wenig	+	+		P	B	M	+			+			P	B		+			+	+		P	B	M	+		
302	Trommelfell		+		P	B	M	+	+	+																		
296 H	Gehörgangshaut	+			P	B	M	+																				

Tabelle 40: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse Teil 2

# Diskussion

## 4.1. Die Pathogenese des Cholesteatoms

Das Epithel des Trommelfells oder des angrenzenden Gehörgangs wird für die Entwicklung eines erworbenen Cholesteatoms verantwortlich gemacht. Das Plattenepithel wird im Rahmen einer chronisch-produktiven, rezidivierenden Entzündung der Schleimhaut im Bereich der Paukenhöhle zur Proliferation angeregt. Dies geschieht, sobald es - wie bei der Wundheilung – an Granulationsgewebe grenzt. Bildet sich diese Epithelneubildung am Trommelfell, so kommt es zu einer umschriebenen Einschmelzung der Basalmembran. Die Matrixzellen dieser Membran wuchern nun, anders als im Normalfall, in Form von Zapfen in die Paukenhöhle hinein.

Die Plattenepithelzellen wiederum bilden nun massenhaft Hornschüppchen (am falschen Ort). Diese stellen einen Fremdkörperreiz dar, mit der Folge, dass knöcherne und epitheliale Mittelohrstrukturen destruiert durch Bindegewebe ersetzt werden. [SCHWARZ, 1985]

Demgegenüber wird die Pathogenese des genuinen Cholesteatoms auch heute noch kontrovers diskutiert.

Das menschliche Mittelohr ist während der ersten vier Monate der Fetalzeit noch vollständig mit Mesenchym ausgekleidet. Dieses embryonale Bindegewebe wird bei der Pneumatisation des Mittelohres abgebaut, wobei aber an einigen Prädilektionsstellen myxomatöse Gewebsreste (auch Gallertgewebe oder Myxomgewebe genannt) bis zum Ende des ersten Lebensjahres bestehen bleiben. In Ausnahmefällen können diese auch noch wesentlich länger persistieren. (So ist ein Fall eines 50-jährigen Mannes bekannt der – bei Abwesenheit eines Cholesteatoms – noch Reste embryonalen Gewebes zeigte.) [Rauchfuss, 1985]. Die Bedeutung einer gestörten Tubenfunktion für die Persistenz der myxomatösen Reste und die Bedeutung der myxomatösen Reste für die Pathogenese des Cholesteatoms werden diskutiert [Rauchfuss, 1985]. Nach Schwarz [SCHWARZ, 1931, 1966, 1984] kommen bei 43% der Neugebo-

renen myxomatöse Reste vor. Diese sind bei Mittelohrentzündungen besonders anfällig, wobei ihre Rückbildung gestört wird.

#### **4.1.1. Die Cholesteatombildung im Vergleich mit der Wundheilung**

Bei der Cholesteatombildung kommt es zu Prozessen, die vor allem mit der Wundheilung vergleichbar sind:

- Erhöhte Expression von Proteasen
- Hyperproliferation und erhöhte Mobilität der Epithelzellen
- Cytokine und Wachstumsfaktoren
- Infiltration des Granulationsgewebes mit T-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen

Die Proliferation, bzw. Motilität der Epithelzellen bei der Cholesteatomgenese kann durch eine immunologische Reaktion ausgelöst werden. Trommelfellläsionen bewirken hierbei eine Retraktion bzw. Immigration von Epithelzellen. Alternativ kann aber auch eine entzündliche Reaktion der Mittelohrschleimhaut die Ursache für diese Proliferation darstellen. Letztlich führen aber beide Wege zu einer Ablagerung von Debris. Diese ist meist mit einer bakteriellen Besiedlung und einer damit einhergehenden immunologischen Infiltration verbunden. [SCHMIDT, 2001]

## **4.2. Die Interaktion von Epithel und Stroma**

Für die Gewebeerstörung wie z.B. die Knochendestruktion wird einerseits eine epitheliale Reaktion (Gewebedruck durch die Raumforderung der Infiltration) verantwortlich gemacht, andererseits aber auch eine massive Entzündungsreaktion (Stimulation der Osteoklasten durch Entzündungsmediatoren sowie Freisetzung gewebeabbauender Enzyme). Beide Pathomechanismen werden heute beim Cholesteatom diskutiert. So könnte das Plattenepithel der

Matrix zur Knochendestruktion beitragen, oder die Entzündungsreaktion in der Perimatrix löst eine Osteolyse aus.

Die Frage nach dem Mechanismus und Faktoren, die dem **hyperproliferativen Verhalten** des Cholesteatomepithels zugrunde liegen, sind bis heute noch nicht ausreichend erklärt. Diverse Studien konnten jedoch ein modifiziertes **Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsverhalten der Keratinozyten** in der Cholesteatommatrix belegen. Es wurden bei der mukösen und chronischen Otitis eine verstärkte Fibroblastenpopulation in der Perimatrix gefunden [MILEWSKI, 1998]. MILEWSKI stellte die Hypothese auf, dass weniger die Epithelzellen als vielmehr **Perimatrixfibroblasten** in Verbindung mit Wundheilungsvorgängen für die Entwicklung des Cholesteatoms verantwortlich seien. Diese Annahme, wird auch durch die Ausführungen von JACOB et al. gestützt, der keine Korrelation zwischen Osseodestruktion des Cholesteatom und der proliferativen Aktivität der Matrix fand. Die gesteigerte Proliferation der Cholesteatommatrix wird hier als Ausdruck einer Entzündungsreaktion gewertet. Sie ist somit als eine Reaktion auf einen äußeren Proliferationsstimulus zu werten und am wahrscheinlichsten durch eine entzündungsbedingte Mediatornfreisetzung der Perimatrix verursacht [BUJIA, 1996, 1993, HOPPE 1995, JACOB, 2001, 1996].

Das „aggressive“ Verhalten der Cholesteatommatrix scheint durch Freisetzung von **Zytokinen** und **Wachstumsfaktoren** aus Zellen des entzündlichen Infiltrats bestimmt zu werden [AHN, 1990, DE MARIA, 1988, FUJIOKA, 1994, PALVA, 1990, SUDHOFF, 1994]. Rynnel-Dagöö und Van Cawenberge fanden bei der Otitis media unregelmäßige Vorkommen der Interleukine IL-4, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-3, IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-8 und schrieben diesen sowohl einen konstitutive als auch einen induktive Funktion zu [OGRA, 1997].

Wachstumshormone und Zytokine spielen somit eine gewichtige Rolle im Rahmen der zellulären Interaktion, vor allem bei der Differenzierung und Regulation des Zellwachstums. Diese werden von fast allen menschlichen Zellen je nach Bedarf gebildet. Überexpressionen sind sowohl bei benignen hyperproliferativen Erkrankungen (z.B. Psoriasis) [NANNEY, 1986] sowie bei einer Vielzahl von malignen Erkrankungen beschrieben worden [COWLEY, 1986,

SUDHOFF, 1994]. Das Zytokin Interleukin 1 (IL-1) z.B. kann von fast allen Zellentypen wie B- und T-Zellen, Makrophagen, Keratinozyten und Endothelzellen synthetisiert werden. Induziert wird diese Produktion durch Entzündungsprozesse, Antigene, Toxine und Verletzungen, so wie man es jedenfalls zum Teil auch im Cholesteatom vorfindet.

Immer noch wird diskutiert, ob die Aktivierung der Zytokine und Wachstumsfaktoren im Cholesteatomgewebe als Ursache der Cholesteatomproliferation anzusehen ist oder als Folge der auslösenden Entzündung angesehen werden muss was somit nur mittelbar das destruierende Wachstum erklären würde (s.o.) [SUDHOFF, 1997]

In der Perimatrix finden sich ausgeprägte entzündliche Infiltrate mit **Histiozyten, Lymphozyten, lymphfollikulären Reaktionszentren, mehrkernige Riesenzellen, Makrophagen** und **Granulozyten**.

Negri et al. konnten dokumentieren, das hier *vor allem T-Zellen und Makrophagen* anzutreffen sind.

Durch Aktivierungsmarker HLA-DR und IL-2 konnte gezeigt werden, dass sich ein Großteil des Zellinfiltrats in einem immunologisch aktivierten Zustand befindet. Die große Anzahl aktivierter phagozytierender Makrophagen scheint für den Immunprozess im Cholesteatom von besonderer Bedeutung zu sein [NEGRI, 1992]. Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass vielkernige Osteoklasten im Bereich der Knochenresorptionszone gegenüber histiozytären Zellen deutlich in den Hintergrund treten. Histiozyten gehören zum Monozyten-Makrophagensystem [GANTZ, 1987, NEGRI, 1992, THOMAS, 1974]. Sie besitzen Phagozytose-Fähigkeit, sind zytotoxisch und tumorizid. Außerdem haben sie die Fähigkeit der Antigenpräsentation. Damit stehen sie in direkter Interaktion mit dem zellulären Abwehrsystem. Durch die Synthese und Sekretion verschiedenster Faktoren können sie z.B. das Komplementsystem oder den Prostaglandinstoffwechsel beeinflussen und so auch indirekt auf das zelluläre Abwehrsystem Einfluss nehmen.

### 4.2.1. Die Rolle der T- und B- Lymphozyten sowie Langerhanszellen

Infekte die zu einer chronischen Otitis media führen, werden vor allem durch Pathogene wie Viren, Protozoen und intrazellulären Bakterien verursacht.

T-Lymphozyten haben eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der B-Lymphozyten, speziell der Antikörperbildung. Sie finden sich in aktivierter Form vor allem in subepidermalen Schichten des Cholesteatoms [Schilling, 1991].

Immunreaktionen werden durch Zellen initiiert, die im Verband mit Major Histocompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II Produkte bilden, die an Wiedererkennungsstrukturen auf T-Lymphozyten binden. **Langerhanszellen** emittieren diese MHC Klasse II Antigene [KLARESKOG, 1977]. Nach Phagozytose des Antigens, Zerlegung des selbigen in Peptidstückchen (Prozessierung) präsentieren diese Zellen das Antigen durch Ausstülpung der peptidbeladenen MHC auf der Zelloberfläche. Die Langerhanszellen haben somit eine Antigenpräsentierende Rolle. Sie sind verantwortlich für die Anwesenheit von aktivierten Zellen im Stroma des Cholesteatoms und die damit einhergehende Entwicklung dieser Krankheit [SCHILLING, 1991, VELDMANN, 1987]. Gropper beschrieb in seiner Dissertationsschrift ein zahlreiches und geordnetes Vorkommen von Langerhanszellen mit Ausbildung von Zellclustern in Epithelausstülpungen sowie straßenzug-ähnliche Formationen, die sich zwischen der basalen und superfiziellen Zellschicht der Matrix erstrecken. Das gehäufte Vorhandensein von CD14 positiven, teils dendritischen Zellen in Matrix und Perimatrix, die in räumlicher Zuordnung zu den Langerhanszellen standen, wurde als eine verstärkte Aktivierung dieser Zellen in stark entzündlichen Cholesteatomen gewertet. [Gropper, 1997]

Funktionsstörungen bei der zellulären Immunität werden durch defekte **T-Lymphozyten** verursacht und wirken sich somit indirekt auch auf die humorale Immunantwort aus. Beim Vergleich von chronischer Otitis mit und ohne Cholesteatom in Bezug auf CD4+ Helferzellen und CD8+ Suppressorzellen, fanden Ligezinski et al. [LIGEZINSKI] in beiden Fällen eine Reduktion der CD4+ Zellaktivität im Vergleich zum gesunden Gewebe. Außerdem war beim Cholesteatom

die CD8+ Zellaktivität verringert. Die Autoren dieser Studie schlussfolgern, dass T-Lymphozyten eine wichtige Rolle in der protektiven Immunität und in der Pathogenese haben, jedoch in Abhängigkeit vom Zelltyp. So werden die CD8+ T-Lymphozyten vor allem für die Pathogenese verantwortlich gemacht, die CD4+ T-Lymphozyten dagegen für die protektive Wirkung.

Die gesunde Mittelohr-Mucosa hat keine organisierten Lymphfollikel. Sie beinhaltet wenige beständige Lymphozyten [TAKAHASHI, 1989]. Während einer Otitis media bewirkt vor allem das allgemeine Abwehrsystem eine Aktivierung einer lokalen Immunantwort. Die residenten Lymphozyten spielen dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Studien mit <sup>51</sup>Cr- markierten Lymphozyten belegen, dass einige Tage nach einem bakteriellen Entzündungsreiz die Anzahl der Lymphozyten wesentlich höher ist, als dies durch bloße Vermehrung der residenten Lymphozyten möglich wäre [RYAN, 1990]. Lymphozyten zirkulieren kontinuierlich durch den ganzen Körper. Hierbei scheint es, dass die Lymphozyten zu bestimmten Organen zurückkehrten, entweder zum Ort ihrer Entstehung oder einem anderen Gewebe. Es konnte so z.B. gezeigt werden, dass Lymphozyten, die ihren Ursprung im Darm hatten ihren Weg zurück zur Lamina propria des Darmes fanden, jedoch auch im Gewebe der laktierenden Mamma wieder zu finden waren [SADÉ, 1983]. Dies wiederum führte zu der Annahme eines umfassenden mukosalen Abwehrsystems, welches auf der Zirkulation von IgA-determinierten Lymphozyten basiert. [SCHILLING, 1996]

In erster Linie sind die von **B-Lymphozyten** emittierten Antikörper für diese Reaktion verantwortlich. Die verantwortlichen B-Lymphozyten werden initial im organisierten MALT (Mucosae-associated lymphoid tissue) – dies beinhaltet Tonsillen und Adenoide – stimuliert. Von dort migrieren Memory B- und T-Lymphozyten zur Schleimhautmucosa um durch Adhäsion von Molekülen auf mikrovaskulären Endothelzellen in spezifischer Weise determiniert zu werden. Die so vorbereiteten B-Zellen differenzieren in der Lamina propria zu Immunglobulin-produzierenden Blasten und Plasmazellen. Es werden vor allem IgA-Antikörper gebildet, die die Immunantwort auf der Mukosaoberfläche bestimmen. Die durch Diffusion hinzukommenden IgG-Antikörper können diesen Vorgang unterstützen. Ist die mukosale Antigenvernichtung einmal nicht erfolgreich, hat die vorentzündliche Eigenschaft der IgG-Antikörper eine große

Bedeutung. Aktivierte CD4+ T-Helferzellen forcieren durch das Emittieren von Zytokinen die Entzündungsreaktion. Die Gefäßbildung und Entzündungszellen wie die eosinophilen Granulozyten werden angeregt. Diese Entwicklung wird auch als „pathotrophische Potentierung“ der lokalen Abwehr bezeichnet [OGRA, 1997] und wird verglichen mit einer allergischen Spätreaktion.

### **4.3. Immunhistochemische Identifizierung Cholesteatom-assoziiierter T-Zellpopulationen**

Die Auswertung der Ergebnisse fand auf zwei unterschiedliche Weisen statt. Hierbei hatte der detailliert beschreibende Weg den Vorteil der genaueren Erfassung aller Besonderheiten. Der tabellarische Überblick (Tabellen 39 und 40) dagegen bot den Vorzug der besseren Vergleichbarkeit in Bezug auf Anfärbung, Lage und Quantität der markierten Zellen bzw. Zellmarker.

Wenn es zu einer Clusterbildung kam, fand diese ausschließlich in der Perimatrix statt. Die allgemeine Tendenz, einer Zellhäufung im Bereich der Perimatrix fand ihre signifikante Bestätigung bei den Präparaten mit CD 40 Ligand und B7-1 Zielzellen.

[CD 40 Ligand : aktivierte T-Zellen;  
B7-1 : T-Zellen (95% der CD 4 Helferzellen, 50% der CD 8 Suppressorzellen), CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein-4), Triggern von costimulierenden Signalen für eine Optimierung der T-Zell-Aktivierung]

Ein weiteres Resultat dieser Studie ist dahingehend zu interpretieren, dass aktivierte T-Zellen in Abhängigkeit von der klinischen Aggressivität des Cholesteatoms vermehrt auftreten. Beim Vergleich von schwach aggressiven Cholesteatomen mit mäßig und stark aggressiven Cholesteatomen konnten entsprechende Ergebnisse bei den Präparaten mit CD 69 Zielzellen, tendenziell auch bei den Präparaten mit CD 25 Zielzellen gefunden werden.

[CD 69 : aktivierte T- Zellen, Natural Killer-Cells und Makrophagen;  
CD 25 : aktivierten T-Zellen.]

Dies trifft auch zum Teil für die Clusterbildung zu.

Diese Ergebnisse stützen die These, dass sich die Entzündungsreaktion vorwiegend in der Perimatrix abspielt, und somit die osseodestruktive Reaktion am wahrscheinlichsten durch eine entzündungsbedingte Mediatorenfreisetzung in der Perimatrix ausgelöst wird [Jacob, 2001].

## **4.4. Cholesteatom und Parodontitis – eine vergleichende Darstellung zweier Krankheiten**

Die Parodontitis und das Cholesteatom sind zwei unterschiedliche Krankheiten, die jedoch manche Gemeinsamkeiten aufweisen. Vorweg zu nehmen ist, dass die sich die Parodontologie weniger mit den zellulären und humoralen Strategien der Parodontitis beschäftigt als mit bakteriologischen Gesichtspunkten. Eine direkte Gegenüberstellung ist deshalb erschwert. Dennoch lohnt sich ein Vergleich.

### **4.4.1. Parodontitis – Ätiologie, Klinik und Therapie**

Die Parodontitis ist eine durch bakterielle Beläge verursachte Erkrankung des Zahnhalteapparates. Sie entwickelt sich in der Regel aus der Gingivitis. Die Menge und Virulenz der Mikroorganismen auf der einen Seite, Resistenzfaktoren des Wirtes (Immunstatus, Heredität) auf der anderen sind ausschlaggebend für die Progression der parodontalen Destruktion. Gebräuchlich ist heute eine Unterscheidung nach pathobiologisch-dynamischen Gesichtspunkten:

- Adulte Parodontitis
- Rapid Progressive Parodontitis
- Lokalisierte juvenile Parodontitis
- Praepuberale Parodontitis

Klinisch wird des Weiteren noch eine therapieresistente Form unterschieden. Hiervon abgegrenzt werden systemische Erkrankungen, bei denen Parodontitis als Begleiterscheinung auftritt.

Hauptsymptome der Parodontitis sind Attachmentverlust und Taschenbildung (zwischen Zahn und Saumepithel der Gingiva). Das im Rahmen der Entzündung gebildete Taschenepithel zeichnet sich durch unregelmäßige, zum Bindegewebe hin verzapfte Epithelleisten aus. Zur Taschenseite hin über den Bindegewebspapillen findet sich oft sehr dünnes, teils ulzeriertes Epithel. Es findet eine Transmigration von Entzündungszellen durch das Taschenepithel statt. Zum Bindegewebe hin ist der Basalmembrankomplex teilweise defekt.

Therapeutisch stehen heute neben einer professionalisierten Mundhygiene die mechanische Elimination aller bakteriellen Beläge, eine lokale antibakterielle sowie eine antibiotische Therapie zur Verfügung. Die Forschung beschäftigt sich aktuell mit einer Veränderung der intraoralen Bakterienkultur, um die Plaquebesiedelung und damit die Pathogenität der Plaque positiv zu beeinflussen. [RATEITSCHAK, 2002]

#### **4.4.2. Cholesteatom und Parodontitis – der Vergleich**

Betrachtet man die Ätiologie, so fällt auf, dass ähnlich dem Cholesteatom auch bei der Parodontitis eine bakterielle Genese in Frage kommt. Diese ist von besonderer Bedeutung, will man die pathohistologischen Zusammenhänge bei der Cholesteatomgenese differenziert bewerten.

So findet sich in beiden Geweben ein zelluläres und humorales Infiltrat, das in qualitativer und quantitativer Ausprägung dem Cholesteatom entgegengestellt werden sollte. In beiden Fällen münden die geweblichen Veränderungen in die Ausbildung eines Granulationsgewebes. Bei der Parodontitis gibt es außerdem akute und chronische Verlaufsformen, die unterschiedlichen Einfluss auf das Taschenepithel – einer morphologischen Besonderheit der Parodontitis - und die Ausbildung des Basalmembrankomplexes haben dürften. Beim Cholesteatom bildet sich dagegen ein Cholesteatomsack. Desweiteren findet bei beiden Erkrankungen eine Knochendestruktion.

Zusammenfassend gilt für die Parodontitis, dass eine bakteriell induzierte Entzündung zu einer Taschenbildung mit ortsfremdem Epithel und Knochendestruktion führt, beim Cholesteatom hingegen wird ortsfremdes Epithel von nicht-bakteriellen Peptiden erkannt; die so induzierte Entzündung führt unter Sackbildung zu einer Knochendestruktion.

<b>Cholesteatom</b>	<b>Parodontitis</b>
Knochendestruktion	
Ortsfremdes Epithel	
Immunologische Reaktion	
Granulationsgewebe	
Sackbildung	Taschenbildung

Tabelle 41: Gemeinsamkeiten von Cholesteatom und Parodontitis

# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Gefrierschnitte von 28 Cholesteatomen mit unterschiedlichen Entzündungsgraden immunhistochemisch untersucht.

Die Ergebnisse zeigten eine allgemeine Tendenz zu Zellhäufungen im Bereich der Perimatrix. Dies fand eine signifikante Entsprechung bei den Präparaten mit CD 40 Ligand und B7-1 Zielzellen.

[CD 40 Ligand : aktivierte T-Zellen;  
B7-1 : T-Zellen (95% der CD 4 Helferzellen, 50% der CD 8 Suppressorzellen), CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein-4), Triggern von costimulierenden Signalen für eine Optimierung der T-Zell-Aktivierung]

Wenn es zu einer Clusterbildung kam, fand diese ausschließlich im Bereich der Perimatrix statt.

Diese Ergebnisse stützen die These, dass sich die Entzündungsreaktion vorwiegend in der Perimatrix abspielt. Frühere Studien konnten belegen, dass sich dort auch Langerhanszellen clusterförmig ansammeln, so dass von einer das Entzündungsvorgehen dominierenden Interaktion beider Zellarten ausgegangen werden muss. Dies bestätigt außerdem die Theorie von Jacob et al., dass die osseodestruktive Reaktion am wahrscheinlichsten durch eine entzündungsbedingte Mediatorenfreisetzung in der Perimatrix ausgelöst wird.

Ein weiteres Resultat dieser Studie ist dahingehend zu interpretieren, dass aktivierte T-Zellen in Abhängigkeit von der klinischen Aggressivität des Cholesteatoms vermehrt auftreten. Beim Vergleich von schwach aggressiven Cholesteatomen mit mäßig und stark aggressiven Cholesteatomen konnten entsprechende Ergebnisse bei den Präparaten mit CD 69 Zielzellen, tendenziell auch bei den Präparaten mit CD 25 Zielzellen gefunden werden.

[CD 69 : aktivierte T- Zellen, Natural Killer-Cells und Makrophagen;  
CD 25 : aktivierten T-Zellen.]

Allgemein wurde außerdem auf das hyperproliferative Verhalten des Cholesteatomepithels, mit seinen Permatrixfibroblasten und den vorwiegend in der Matrix vorkommenden Keratinozyten eingegangen, wobei das „aggressive“ Verhalten der Cholesteatommatrix vorwiegend durch Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus Zellen des entzündlichen Infiltrats bestimmt zu werden scheint. In der Perimatrix finden sich ausgeprägte entzündliche Infiltrate, bei der die clusterförmig vorkommenden Langerhanszellen die Rolle der Antigenpräsentation übernehmen. T- und B-Lymphozyten stammen vorwiegend aus dem organisierten MALT (Mucosae-associated lymphoid tissue) und migrieren im Rahmen des entzündlichen Prozesses in die Cholesteatomschleimhaut. Während eine Hauptaufgabe der B-Lymphozyten in der Produktion von IgA-Antikörpern besteht, forcieren T-Helferzellen durch Emittieren von Zytokinen die Entzündungsreaktion.

Einen Ansatz, die noch offenen Fragen zur Äthiologie und Pathohistologie zu klären, stellt der Vergleich von Cholesteatom und Parodontitis dar. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch einen entzündlichen Vorgang mit bakterieller Beteiligung, immunologischer Reaktion und Knochendestruktion aus. Spätere Studien mögen diese Zusammenhänge für sich nutzbar machen.

# Literaturverzeichnis

**Ahn JM, Huang CC, Cho HT:**

Localization of interleukin-1 in human squamous carcinomas of the head and neck.  
Laryngoscope. 1993 May;103(5):529-32

**Bezold F:**

Cholesteatom, Perforation der Membrana flaccida Shrapnelli und Tubenverschluss, eine ätiologische Studie.  
Zschr f Ohrenheilkunde. 1890; 5-28

**Bernstein JM, Tomasi TB Jr, Ogra P:**

The immunochemistry of middle ear effusions.  
Arch Otolaryngol. 1974 May;99(5):320-6.

**Bourne JA:**

Handbuch der Immunperoxidase Färbemethoden.  
Immunochchemistry Laboratory DAKO Coporation

**Bujia J, Holly A, Antoli-Candela F, Tapia MG, Kastenbauer E:**

Immunobiological peculiarities of cholesteatoma in children: quantification of epithelial proliferation by MIB1.  
Laryngoscope. 1996 Jul;106(7):865-8

**Bujia J, Holly A, Kim C, Schilling V, Kastenbauer E:**

New aspects on the pathogenesis of cholesteatoma: the possible role of immune cell-induced keratinocyte hyperproliferation  
Laryngorhinootologie. 1993 Jun;72(6):279-83

**Bujia J, Sudhoff H, Holly A, Hildmann H, Kastenbauer E:**

Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in middle ear cholesteatoma  
Eur Arch Otorhinolaryngol. 1996;253(1-2):21-4

**Cowley GP, Smith JA, Gusterson BA:**

Increased EGF receptors on human squamous carcinoma cell lines.  
Br J Cancer. 1986 Feb;53(2):223-9

**DeMaria TF, Yamaguchi T, Lim DJ:**

Quantitative cytologic and histologic changes in the middle ear after the injection of nontypable *Hemophilus influenzae* endotoxin.  
Am J Otolaryngol. 1989 Jul-Aug;10(4):261-6.

**Fujioka O, Huang CC:**

Platelet-derived growth factor in middle ear cholesteatoma.  
Eur Arch Otorhinolaryngol. 1994;251(4):199-204.

**Gantz BJ, Hart MJ:**

Immunology of acquired aural cholesteatoma.  
In Bernstein J, Ogra P (eds).

**Gropper G:**

Charakterisierung antigenpräsentierender Zellen im Cholesteatom des Mittelohres. Dissertationsschrift, Bayerische Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg. 1997 Nov: 34-40

**Hoppe F:**

Untersuchungen zum Proliferationsverhalten von Cholesteatomen HNO. 1995 Dec;43(12):710-5

**Jacob R, Welkoborsky HJ, Mann W:**

Untersuchungen der Epithel-Stroma-Interaktion beim Cholesteatom des Mittelohres  
Laryngorhinootologie. 2001 Jan;80(1):11-7.

**Kahonen K, Palva T, Bergroth V, Konttinen YT, Reitamo S:**

Immunohistochemical identification of inflammatory cells in secretory and chronic otitis media and cholesteatoma using monoclonal antibodies.  
Acta Otolaryngol. 1984 May-Jun;97(5-6):431-6.

**Klareskog L, Tjernlund U, Forsum U, Peterson PA:**

Epidermal Langerhans cells express Ia antigens.  
Nature. 1977 Jul 21;268(5617):248-50.

**Leithauser D:**

Das Ohrenleiden Kaiser Wilhelms II.: Ein Spiegelbild der Otologie um die Jahrhundertwende.

Laryngorhinootologie. 2000 Nov; 79(11): 659-61.

**Lim DJ:**

Epithelial invasion, contact guidance and contact inhibition.

in Sade, J.: Cholesteatom and Mastoid Surgery. Kugler, Amsterdam (1982) 141-52

**Mayot D, Bene MC, Faure GC, Wayoff M, Perrin C:**

Immunohistologic analysis of the cholesteatoma matrix in children

Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 1991 Sep;22(2):115-24.

**McDermott MR, Bienenstock J:**

Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues.

J Immunol. 1979 May;122(5):1892-8.

**Milewski C:**

Die Rolle der Perimatrixfibroblasten bei der Entstehung des erworbenen Mittelohrcholesteatoms

HNO. 1998 May;46(5):494-501. Review

**Nanney LB, Stoscheck CM, Magid M, King LE Jr:**

Altered [125I]epidermal growth factor binding and receptor distribution in psoriasis.

J Invest Dermatol. 1986 Mar;86(3):260-5.

**Negri B, Schilling V, Bujia J, Kastenbauer E:**

Immunohistochemische Identifizierung Cholestatom-assoziiierter Makrophagen-Populationen

Laryngo-Rhino-Otol. 71 (1992) 168-173

**Negri B, Schilling V, Bujia J, Schulz P, Kastenbauer E:**

Immunotype findings in macrophages in aural cholesteatomas.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 1992;249(2):87-90.

**Nordbruch T, Müller-Hartwich R:**

Parodontologie Skript. Zahnklinik Nord, Humboldt-Universität zu Berlin.  
1998

**Oethinger M:**

Mikrobiologie und Immunologie. 9. Auflage. Gustav Fischer Verlag.  
1997

**Ogra PL:**

Summary: recent developments in the immunology of otitis media.  
Ann N Y Acad Sci. 1997 Dec 29;830:158-65.

**Palva T, Taskinen E:**

Inflammatory cells in chronic middle ear disease. Value of lymphocyte  
subset determination in ear surgery.  
Acta Otolaryngol. 1990 Jan-Feb;109(1-2):124-9

**Plester D:**

Die „alte Radikale“ Geschichte und Entwicklung der Chirurgie des War-  
zenfortsatzes.  
Laryngol Rhinol Otol (Stuttg). 1985;64.

**Pschyrembel W:**

Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 255. Auflage, Walter de Gruyter  
(Berlin-New York).1986

**Rateitschak KH, Wolf HF, Rateitschak EM:**

Farbatlanten der Zahnmedizin, Bd.1, Parodontologie,  
Thieme, Stuttgart. 2002: 73-110

**Rauchfuss A:**

Die myxomatösen Reste im menschlichen Mittelohr. Histologische Un-  
tersuchungen ihrer Rückbildung und Mikrotopographie  
Laryngol Rhinol Otol (Stuttg). 1985 Aug;64(8):441-5.

**Roitt IM, Brostoff J, Male DK:**

Kurzes Lehrbuch der Immunologie.  
3. Auflage, Georg Thieme Verlag, 1995

**Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Weisz-Carrington P, Lamm ME:**

Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland.  
J Exp Med. 1977 Nov 1;146(5):1311-22.

**Ryan AF, Sharp PA, Harris JP:**

Lymphocyte circulation to the middle ear.  
Acta Otolaryngol. 1990 Mar-Apr;109(3-4):278-87.

**Sadé J, Babiacki A, Pinkus G:**

The metaplastic and congenital origin of cholesteatoma.  
Acta Otolaryngol 96. 1983: 119-129

**Schilling V, Bujia J, Negri B, Schulz P, Kastenbauer E:**

Immunologically activated cells in aural cholesteatoma  
Am J Otolaryngol. 1991 Sep-Oct;12(5):249-53.

**Schilling V, Lang S, Rasp G, Mack B, Nerlich A:**

Overexpression of tenascin in cholesteatoma and external auditory meatal skin compared to retroauricular epidermis  
Acta Otolaryngol (Stockh) 116. 1996: 741-746

**Schmidt M:**

Induction of matrix metalloproteinases in keratinocytes by cholesteatoma debris and granulation tissue extracts. 3rd international Symposium on Cholesteatoma Research, Bochum, 2001 Nov

**Schwarz M:**

Das individuelle Verhalten der Schleimhautpropria im Mittelohr in ihrer Entwicklung und ihrem Gewebsaufbau.  
Zschr. Hals-,Nase,Ohrenheilk. 29 (1931) 98

**Schwarz M:**

Das Cholesteatom im Gehörgang und im Mittelohr  
Thieme, Stuttgart 1966

**Schwarz M:**

Development of cholesteatoma in the middle ear ab statu nascendi  
HNO. 1985 Apr;33(4):180-2

**Schwarz M:**

Die genetischen Faktoren des Mittelohrcholesteatoms  
HNO 32 (1984) 59

**Steinbach E, Pusalkar A, Heumann H:**

Cholesteatoma –pathology and treatment  
Advanc. Oto-Rhino-Laryngol. 39 (1988) f

**Sudhoff H, Borkowski G, Bujia J, Hildmann H, Fisseler-Eckhoff A:**

Immunohistochemische Untersuchungen von Mittelohrschleimhautresten  
im Cholesteatom  
HNO. 1997 Aug;45(8):630-5.

**Sudhoff H, Bujia J, Holly A, Kim C, Fisseler-Eckhoff A:**

Functional characterization of middle ear mucosa residues in cholestea-  
toma samples.  
Am J Otol. 1994 Mar;15(2):217-21.

**Takahashi M, Peppard J, Harris JP:**

Immunohistochemical study of murine middle ear and Eustachian tube.  
Acta Otolaryngol. 1989 Jan-Feb;107(1-2):97-103.

**Themsen J, Jorgensen MB, Bretlau P, Kristensen HK:**

Bone resorption in chronic otitis media. A histological and ultrastructural  
study. II. Cholesteatoma.  
J Laryngol Otol. 1974 Oct;88(10):983-92.

**Toynbee J:**

Molluscum contagiosum.  
Lond med Gaz. 1850 Nov.

**van Dijk CM, Visser CE, Veldman JE:**

Spatial distribution of Langerhans' cells and T-lymphocyte subpopula-  
tions in human tympanic membrane and aural cholesteatoma.  
Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1986;52(2):143-52.

**van Dijk CM, Visser CE, Veldman JE:**

Spatial distribution of Langerhans' cells and T-lymphocyte subpopula-  
tions in human tympanic membrane and aural cholesteatoma.  
Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1986;52(2):143-52.

**Veldman JE, Keuning FJ, Lennert K, vd Meer JB, Feltkamp-Vroom TM:**

Interdigitating cells. A guiding cell line in T-cell reactivity.  
Adv Exp Med Biol. 1982;149:407-14.

**Veldman JE, McCabe BF(eds) Veldman JE, van Dijk CM, Visser CE, et al.:**

Aural cholesteatoma and immunity.  
in Veldman JE, McCabe BF (eds): Oto-Immunology. Amsterdam, The Netherlands, Kugler Publications, 1987, pp 69-79

**Veldman JE, Visser CE, Schuurman HJ, de Groot JC, Huizing EH:**

Immunobiology of Langerhans' cells migrating into aural cholesteatomas.  
Otolaryngol Head Neck Surg. 1984 Feb;92(1):1-6.

**Veldman JE:**

Immunology of cholesteatoma.  
Am J Otol. 1985 Jan;6(1):22-5.

**Virchow R:**

Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin, Berlin, Verlag Georg Reimer, 1855

# Danksagungen

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Florian Hoppe möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die freundliche und kompetente Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Jan Helms danke ich Möglichkeit, an seiner Klinik promovieren und meine Versuche in seinem Institut durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. A. Marx, Leiter des Pathologischen Institutes der Universität Würzburg danke ich für die Durchführung des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Petra Grünsfelder sowie Frau Petra Joa, die mir sowohl in immunhistochemischen, mikroskopiertechnischen, EDV-technischen als auch fototechnischen Fragen ganz hervorragend geholfen haben.

Frau Erika Herkersdorf gilt ebenso mein Dank für die Benutzung und Anleitung des Kryostaten der Augenklinik der Universität Würzburg.

In ganz besonderer Weise möchte ich auch meinen Eltern und meinem Bruder danken, die mir mit viel Geduld und wertvollen Anregungen stets eine große Hilfe waren.



# Lebenslauf

Thomas Dabrowski

Münsterstr. 62a

46397 Bocholt

## Persönliche Daten

---

Geb.: 29.08.1970 in Haan

Eltern: Christa Dabrowski, geb. Krause, Chemotechnikerin und Hausfrau  
Ralf Dabrowski, Ingenieur

Bruder: Martin Dabrowski, Arzt und Zahnarzt

## Schulbildung

---

1977 - 1981 Besuch der Grundschule „Zur Verlach“ in Hilden

1981 - 1990 Besuch des Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasiums in Hilden.

1990 Abitur

## Berufsausbildung

---

1991 – 1994 Ausbildung zum Zahntechniker in Hilden

1994 Gesellenprüfung

## Hochschulbildung

---

1994 Immatrikulation an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
für das Studium der Zahnmedizin

1995 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

1998 Zahnärztliche Vorprüfung

2000 Zahnmedizinisches Staatsexamen

Seit Juni 2001 Tätigkeit als Zahnarzt.

