

**Aus dem Universitätsklinikum Münster**

**Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie**

**- Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h. c. U. Joos -**

**Immunkompetente Zellen im chronisch osteomyelitischen Kieferknochen:  
Immunhistochemische Untersuchungen mit den Antikörpern CD3, CD45 RO, CD8  
und CD68**

**INAUGURAL – DISSERTATION**

zur

Erlangung des doctor medicinae dentinum

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms – Universität Münster

vorgelegt von

Vorderwülbecke, Julia

aus Gütersloh

2008

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms – Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Kleinheinz

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. L. Figgener

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2008

**für meine Eltern**

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h. c. U. Joos-

Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Kleinheinz  
Koreferent: Univ. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. L. Figgenger

### Zusammenfassung

Immunkompetente Zellen im chronisch osteomyelitischen Kieferknochen:  
Immunhistochemische Untersuchungen mit den Antikörpern CD3, CD45 RO, CD8 und  
CD68

Julia Vorderwülbecke

Die unspezifische und spezifische zelluläre lokale Immunität wurde bei 15 an der chronischen Kieferosteomyelitis erkrankten Patienten, unter Berücksichtigung demographischer Faktoren, Lokalisation des Krankheitsbildes und möglicher Erkrankungsursache, untersucht.

Es wurden Gewebeschnitte von Knochenbiopsaten angefertigt und mittels immunhistochemischer Färbeverfahren mit den spezifischen Oberflächenmarkern CD3, CD45 RO, CD8 und CD68 behandelt, um immunkompetente Zellen (T-Zellen, Memory-T-Zellen, zytotoxische-/Suppressor-T-Zellen und Makrophagen) quantitativ nachweisen zu können. Zum Vergleich wurden Proben gesunden Knochens von 2 Körperspendern herangezogen.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 11 Männern und 4 Frauen mit einem Altersdurchschnitt bei 51 Jahren zusammen. 14 Patienten entwickelten eine Osteomyelitis in der Mandibula, lediglich 1 Patient in der Maxilla. Als mögliche Erkrankungsursachen ließen sich Z.n. Exzision (33,3%), Z.n. Trauma (6,7%) und Z.n. Tumor und Radiatio (40,0%) eruieren. Bei 20,0% der Erkrankten blieb die Ätiologie ungeklärt.

Immunkompetente Zellen konnten bei allen Patienten im osteomyelitischen Knochen immunhistochemisch mittels CD3, CD45 RO, CD8 und CD68 nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den Kontrollen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der T-Zellsubpopulationen und der Makrophagen, was auf eine Hyperreaktion des Immunsystems schließen lässt.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2008

# I INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Chronische Osteomyelitis.....	2
1.2 Pathogenese .....	6
1.3 Pathohistologie .....	8
1.4 Immunabwehr des Körpers.....	9
1.4.1 Lymphozyten .....	10
1.4.2 T-Zellen .....	11
1.4.2.1 Memory-T-Zellen .....	12
1.4.2.2 Suppressor-T-Zellen .....	12
1.4.2.3 Zytotoxische T-Zellen .....	13
1.4.3 Monozyten/Makrophagen.....	14
<b>2 ZIEL DER ARBEIT.....</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>16</b>
3.1 Patienten .....	16
3.2 Klinische und pathologische Kriterien .....	16
3.3 Gewebe .....	17
3.4 Methoden der Aufarbeitung und Auswertung .....	17
3.4.1 Probenaufbereitung für die Lichtmikroskopie.....	17
3.4.2 Immunhistochemie .....	18
3.4.2.1 Grundlagen .....	18
3.4.2.2 Charakterisierung der verwendeten Antikörper: CD3, CD45 RO, CD8 und CD68.....	20
3.4.2.3 Methode .....	22
3.4.3.4 Kontrollen.....	23
3.4.3.6 Auswertung.....	24
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>25</b>
4.1 Patientenkollektiv, klinische und pathologische Daten.....	25
4.1.1 Geschlechter- und Altersverteilung .....	25
4.1.2 Lokalisation .....	26

4.1.3 Mögliche ätiologische Faktoren .....	27
4.2 Immunhistologische Befunde .....	29
4.2.1 Kontrollen .....	29
4.2.2 Osteomyelitische Knochengewebe .....	30
4.2.2.1 CD3(+)-Zellen .....	30
4.2.2.2 CD45 RO(+)-Zellen.....	33
4.2.2.3 CD8(+)-Zellen .....	37
4.2.2.4 CD68(+)-Zellen .....	40
4.2.3 Zusammenfassende Darstellung der immunhistologischen Befunde.....	43
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>44</b>
5.1 Demographische Faktoren.....	44
5.2 Lokalisation .....	45
5.3 Mögliche ätiologische Faktoren .....	46
5.3.1 Entwicklung einer Osteomyelitis nach Zahnextraktion.....	47
5.3.2 Entwicklung einer Osteomyelitis nach Tumor und Radiatio.....	48
5.3.3 Entwicklung einer Osteomyelitis nach Trauma.....	50
5.3.4 Entwicklung einer Osteomyelitis unklarer Ätiologie .....	51
5.4 Immunkompetente Zellen.....	51
5.4.1 Kontrollen.....	52
5.4.2 Osteomyelitische Knochengewebe .....	53
5.4.2.1 CD3(+)-Zellen .....	53
5.4.2.2 CD45 RO(+)-Zellen.....	54
5.4.2.3 CD8(+)-Zellen .....	55
5.4.2.4 CD68(+)-Zellen .....	56
5.5 Zusammenfassende Beurteilung der immunhistologischen Ergebnisse.....	58
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>61</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>9 CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>75</b>
<b>II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>II</b>
<b>III ABBILDUNGS – UND GRAPHIKVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>

<b>IV TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>V GERÄTE UND REAGENZIEN FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE .....</b>	<b>V</b>

# 1 EINLEITUNG

Die Osteomyelitis wird definiert als Entzündung primär des Knochenmarks (Myelitis) [3, 22, 23, 38, 50], deren inflammatorische Prozesse sekundär auf die angrenzende Knochensubstanz, die Spongiosa und Kompakta (Ostitis) sowie das Periost (Periostitis) übergreifen kann [22, 23, 38, 50].

Einige Autoren verwenden die Begriffe Osteomyelitis und Ostitis/Osteitis als Synonyme [15, 29], was zuweilen irreführend sein kann. Andere Autoren hingegen favorisieren eine Differenzierung der Begriffsbestimmung, insbesondere im Hinblick auf die Kenntnisse der Pathogenese dieser Erkrankung sowie der Entzündung im Allgemeinen [89].

Die Diagnose und Therapie einer Osteomyelitis stellen nach wie vor eine Herausforderung in der Medizin dar. Seit der Verfügbarkeit des Penicillins (in den letzten 50 Jahren) und der hoch entwickelten medizinischen wie zahnmedizinischen Wissenschaftstechnologie, konnte zunächst die Inzidenz der Osteomyelitis, insbesondere des bimaxillären Skeletts gesenkt werden [38].

Die entzündliche Erkrankung des Knochenmarks wurde seitdem als Rarität betrachtet. Erst einige Jahre später wurde ein Anstieg der Inzidenz, speziell der subakuten und chronischen Formen der Osteomyelitis beobachtet [68].

Dennoch wird die Osteomyelitis der Kiefer auch eine chirurgisch behandelte Erkrankung bleiben [38], wohingegen von anderen Autoren eine ausschließlich antibiotische Therapie befürwortet wird [69].

Die frühzeitige und richtige Behandlung der Osteomyelitis ist von herausragender Bedeutung für die Prognose und den Verlauf der Erkrankung.

Es existiert kein einheitliches Schema für die Klassifikation der Osteomyelitis. In der Literatur werden verschiedene Klassifikationen, basierend auf dem klinischem Erscheinungsbild, den pathologisch-anatomischen und/oder den radiologischen Aspekten, der Ätiologie und der Pathogenese vorgeschlagen. Daher wird der Vergleich von Studien erschwert und die Verwendung verschiedener Klassifikationskriterien und sogar einer Vermischung dieser kann zu Verwirrung führen [7].

### 1.1 Chronische Osteomyelitis

Das Schema nach Cotta [15] (Abb. 1) wird den typischen Verlaufsformen und dem Infektionsweg einer Osteomyelitis gerecht. Im Folgenden werde ich näher auf die Einteilung der Osteomyelitis nach Cotta [15] eingehen.

Cotta [15] teilt die Osteomyelitis in spezifische Infektionen, wie durch Tbc, Typhus und Lues hervorgerufen, sowie in unspezifische Infektionen ein.

Bei der durch unspezifische Infektionen hervorgerufenen Osteomyelitis unterscheidet man zwischen akuter Osteomyelitis und chronischer Osteomyelitis.

Die akute Osteomyelitis wird in eine hämatogene Form und eine exogene Form eingeteilt. Bei der hämatogenen Form der akuten Osteomyelitis erfolgt die Infektion über den Blutweg. Die Infektion nimmt ihren Ausgang von Otitiden, Anginen, Pyodermien und anderen Streuherden. Sie dringt über die Haversschen Kanäle nach außen und greift auf das Periost über. Demgegenüber entsteht die Infektion bei der akuten exogenen Form durch äußeren Kontakt mit den Erregern durch Traumen, offene Verletzungen mit Knochenbeteiligung, Periostverletzungen oder subperiostale Hämatome, reine Weichteilverletzungen sowie durch Operationen an Knochen und Gelenken.

Unabhängig davon, ob eine akute Osteomyelitis hämatogenen oder exogenen Ursprungs ist, kann es zu einer Chronifizierung der Osteomyelitis führen (sekundär chronische Form). Die sekundär chronische Osteomyelitis stellt auch heute noch eine schwer heilbare Erkrankung dar.

Bei der primär chronischen Form der Osteomyelitis verhindert eine günstige immunbiologische Abwehrlage des Körpers die Ausbreitung der Infektion. Als Folge entstehen abgekapselte Entzündungsareale [15].

Eine akute Osteomyelitis kann über Wochen und Monate bestehen bleiben. Es entwickeln sich im Zuge des Entzündungsprozesses osteomyelitische Destruktionsherde, einhergehend mit starkem Knochenumbau und einer zunehmenden Fibrosierung des Markraumes. Die Entzündung schwelt weiter und exazerbiert in Schüben. Eine chronisch-rezidivierende Osteomyelitis ist auch heutzutage mit moderner Antibiotika-Therapie schwer zu beherrschen [3]. Ein Rezidiv kann sich auch nach

optimaler operativer und medikamentöser Therapie noch nach jahrzehntelangem freien Intervall an früherer oder anderer Lokalisation entwickeln. Es kommt zur spontanen Exazerbation [3, 50].

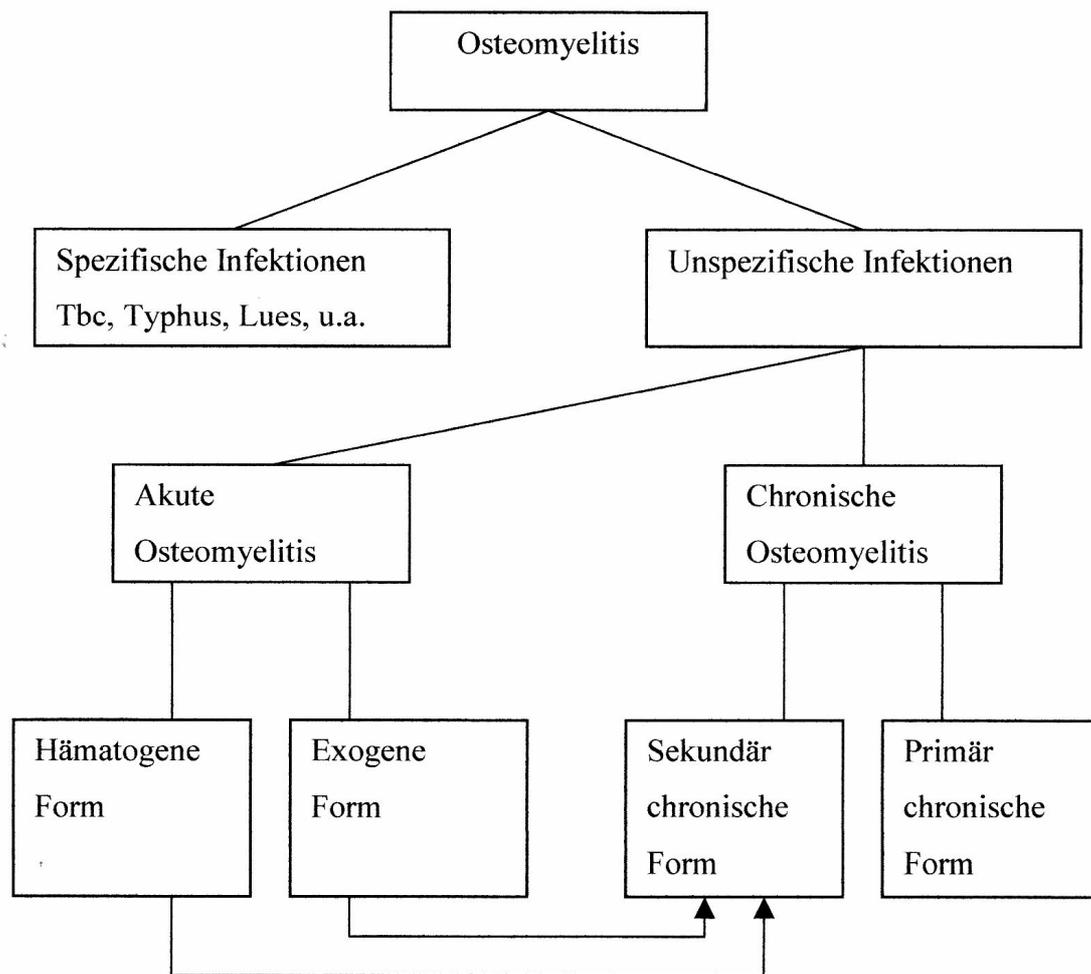
Die chronische Form der Osteomyelitis entwickelt sich als Spätzustand infolge unzureichend bekämpfter oder unbehandelter akuter hämatogener Osteomyelitiden [15, 50]. Dagegen entsteht die primär chronische Form nicht infolge exogener, fortgeleiteter Entzündungen oder chronifizierender akuter hämatogener Osteomyelitiden [43]. Bei einer primär chronischen Osteomyelitis steht der subakute klinische Verlauf im Vordergrund.

Durch eine günstige immunbiologische Abwehrlage des Körpers entstehen abgekapselte Entzündungsareale. Die Folge ist ein lokalisierter Entzündungsprozess (Osteomyelitis circumscripta) [3, 15].

Klümper [50] beschreibt die nichtgenuine, sekundäre Osteomyelitis als eine durch eine fortgeleitete benachbarte Weichteilinfektion oder durch direktes Einbringen der Erreger von außen, z.B. nach Frakturoperationen oder nach Strahlennekrosen, entstandene Erkrankung.

Für die verschiedenen Verlaufsformen einer Osteomyelitis wird nach Klümper [50] folgende Einteilung vorgeschlagen:

1. Akute oder frische Osteomyelitis
2. Subakute Osteomyelitis
3. Rezidivform oder chronische Osteomyelitis
4. Nichtgenuine, sekundäre Osteomyelitis



**Abbildung 1:** Einteilung der Osteomyelitis nach Cotta [15]

Es existiert kein allgemein akzeptiertes Klassifikationssystem für die Osteomyelitis. Die folgenden Klassifikationen der Osteomyelitis von Hudson [38] und Ehrenfeld et al. [24] sollen einen Eindruck über weitere Möglichkeiten der Einteilung geben.

Speziell die chronischen Formen der Osteomyelitis der Kiefer werden von Hudson [38] wie folgt klassifiziert:

### **Chronische Formen der Osteomyelitis**

#### A. Multifokal rekurrend

1. Entwicklungsskelett (Kinder)
2. gesteigerte osteogene Aktivität (< 25 Jahre)

#### B. Knochenentzündung Typ Garré

1. Seltene proliferative subperiostale Reaktion
2. Entwicklungsskelett (Kinder bis junge Erwachsene)

#### C. Eitrige oder Nichteitrige

1. Inadäquat behandelte Formen
2. Systemisch beeinträchtigte Formen
3. Refraktäre Formen (CRMO)

#### D. Diffus sklerosierend

1. obligat anaerobe Mikroorganismen
2. Beeinträchtigter Wirts/Pathogen- Mechanismus

Klinisch wird von Ehrenfeld et al. [24] zwischen folgenden Formen unterschieden:

1. Knochenentzündungen bei Frakturen
2. „Säuglingsosteomyelitis“
3. fortgeleitete Knochenentzündungen nach einer otitis media
4. Entzündungen des strahlengeschädigten Knochens (Osteoradionekrose)

### 1.2 Pathogenese

Meist werden Entzündungen der Kieferknochen durch mikrobielle Reize ausgelöst. Die Knocheninfektion entsteht entweder per continuitatem oder hämatogen [89].

Pathogene Mundhöhlenkeime können insbesondere über die Zähne, als lokale Eintrittspforte, da sie die integumentale Integrität der inneren Körperoberfläche als Hartsubstanzgebilde überwinden, eine Entzündung des Knochens auslösen. Dies geschieht über den Wurzelkanal avitaler Zähne oder über das Parodont stark parodontalgeschädigter Zähne [24].

Grundsätzlich besteht das Risiko der Entwicklung einer Knochenentzündung bei Verletzungen, z.B. Traumata, die zu Kieferbrüchen führen oder Weichgewebsentzündungen, die auf den Knochen übergreifen können. Offene Frakturen sind deutlich höher infektionsgefährdet als geschlossene [72]. Auch chirurgische Eingriffe bergen ein potentiell Risiko. Insbesondere operative Zahntfernungen und die Implantation enossaler Implantate sowie komplexe Eingriffe im Bereich der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie, wie Dysgnathie-Operationen und Knochentransplantationen, stellen durch die Infektionsgefahr der Wunde ein nicht zu vernachlässigendes Risiko dar [24].

In Abhängigkeit von der allgemeinen Reaktionslage des Organismus und der zellulären sowie der humoralen Abwehr des Knochens, führt eine Kontamination des Knochens mit pathogenen Keimen nicht zwangsläufig zur Entwicklung einer Knochenentzündung. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass der gesunde Knochen eine hohe Resistenz gegenüber Infektionen aufweist [62].

Die Mechanismen und Reaktionen der Infektabwehr durch den Wirtsorganismus können sowohl den Organismus vor der Erregerausbreitung schützen und der Wundheilung dienen, als auch die Ursache für immunpathologische Prozesse sein.

Nach Penetration und Inokulation des Knochens mit pathogenen Keimen bietet der Knochen bei schlechter Durchblutung und Nekrosen, Gefäßprozessen (Rauchen), angeborenen Veränderungen der Knochenstruktur, reduzierter Abwehrlage des Wirtsorganismus eine Möglichkeit zur Kolonisation und Vermehrung, so dass die Entstehung einer Osteomyelitis begünstigt wird. Entscheidend sind zudem die Pathogenität und die Virulenz der eingedrungenen Bakterien [73, 24, 75].

So ist das pathophysiologische Bild der Entzündung ein Resultat aus dem Vermögen des Wirtes, einen Infekt abzuwehren und der Virulenz des Erregers [33].

Obwohl der Nachweis von Mikroorganismen nicht immer gelingt, wird dennoch angenommen, dass die UK-Osteomyelitis bakteriellen Ursprungs ist [63].

Bei der chronischen Osteomyelitis handelt es sich vorwiegend um Staphylokokkeninfekte. Staphylokokkus aureus gilt als der die chronische Osteomyelitis am häufigsten auslösende Erreger [3, 38, 45, 70, 86]. Als weitere auslösende Bakterien konnten Anaerobier, Pseudomonas und Staphylokokkus epidermis nachgewiesen werden [51, 59, 73].

Die Bakterien exprimieren Rezeptoren, die der Anhaftung an der Knochenmatrix dienen. Staphylococcus aureus verfügt über Rezeptoren für Fibronectin, Laminin, Collagen und Knochen-Sialoglycoproteine [59].

Es wurde elektronenmikroskopisch nachgewiesen, dass die Bakterien an der Oberfläche von Biomaterialien und Implantaten, traumatisierten Knochen und Weichteilen, bedeckt von einem Biofilm (Glykokalyx), haften und wachsen [73].

Heutzutage ist noch nicht eindeutig geklärt, durch welche Mechanismen Bakterien die Zerstörung des Knochens verursachen. Nair et al. [59] beschreiben drei mögliche Varianten:

- a) Bakterien zerstören die nichtzellulären Bestandteile des Knochens direkt durch die Freisetzung von Säure und Proteasen
- b) Bakterien fördern zelluläre Prozesse, die den Knochenabbau stimulieren
- c) Bakterien inhibieren die Synthese der Knochenmatrix

Staphylococcus aureus vermag über die Fähigkeit, in Osteoblasten einzudringen und in diesen zu überleben [54]. In Tierversuchen wurde nachgewiesen, dass die Bakterien die Apoptose der Osteoblasten induzieren können [78].

Lew et al. [54] vermuten einen Zusammenhang zwischen der Überlebensfähigkeit der Bakterien in Osteoblasten und der Hartnäckigkeit von Knocheninfektionen. Die Bakterien werden teilweise intrazellulär metabolisch in so genannte „small-colony variants“ umgewandelt und entwickeln eine spezifische Resistenz gegenüber Antibiotika, was eine hohe Misserfolgsquote der Antibiotikatherapie erklären mag [54]. Neben bakteriellen Reizen, die eine Osteomyelitis auslösen können, spielen auch physikalische (Bestrahlung mit energiereichen Strahlen) und mechanische (okklusale Traumata) Reize eine gewisse Rolle. Bei der sklerosierenden Knochenentzündung, als seltene Entzündungsform, wird der Ursprung im immunologischen Formenkreis diskutiert [24].

### 1.3 Pathohistologie

Man unterscheidet zwischen einer durch bakterielle Invasion (Staphylokokken) hervorgerufene Entzündung, deren Entstehung und Voranschreiten durch zusätzliche Faktoren wie Traumata, Ischämien und Fremdkörper begünstigt wird und einer aseptischen Osteomyelitis, einer Knochenmarksentzündung ohne auslösende mikrobielle Erreger.

Das Besondere einer bakteriellen Knocheninfektion ist, dass sich die Entzündungsreaktion innerhalb der Hartschubstanz abspielt. Eine sich im Weichgewebe entwickelnde Schwellung im Rahmen der Entzündungsreaktion kann sich im Knochen nicht ausbreiten [24].

Das Immunsystem reagiert auf die Keimansiedlung mit einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Phagozyten [84].

Infolgedessen kommt es zu einer lokalen Hyperämie, zur Dilatation der Arteriolen und Kapillaren sowie einer erhöhten Gefäßpermeabilität [93].

Es resultieren ein Ödem mit Verschiebung des pH-Wertes und die Einwanderung von Leukozyten. Aufgrund der Unnachgiebigkeit der knöchernen Strukturen, der Kortikalis, die das Knochenmark vollständig umgibt, entsteht ein intramedullärer (intraossärer)

Druckanstieg [9, 24]. Die eiterbildenden Erreger breiten sich entlang der Havers- und Volkmann-Kanäle aus und führen zudem zu einem intraossären Druckanstieg [84, 93]. Infolgedessen können aufgrund pathologischer Veränderungen an den intraossären Gefäßen mit Stase, Thrombosierungen und Obliteration, Nekrosen des intraossären Weichgewebes entstehen. Da keine vitalen Osteoklasten mehr vorhanden sind und die Blutversorgung unterbrochen ist, kann der avitale Knochen nicht abgebaut werden. Zum Teil eitrig durchsetzte nekrotische Knochenanteile bleiben im Zentrum des Entzündungsherdes mit dichten Ansammlungen gelapptkerniger Leukozyten als Sequester zurück. Entzündete und nekrotische Areale können von der Peripherie durch Granulationsgewebe ausgegrenzt werden. Der Entzündungsprozess wird durch reaktive Knochenneubildung in der Grenzzone zwischen Granulationsgewebe und umgebendem vitalen Knochen eingemauert. Dies stellt sich nach einigen Wochen radiologisch als so genannte Totenlade dar [3, 24]. Gelingt es der Infektion, die Kortikalis zu durchbrechen, bilden sich Periostal- und Weichteil-Abszesse.

Eine akute Osteomyelitis zeichnet sich histologisch vorwiegend durch das Vorhandensein neutrophiler Granulozyten, gestauter oder thrombosierter Blutgefäße aus, wohingegen bei der chronischen Form nekrotische Knochensubstanz und einkernige Zellen vorzufinden sind sowie keine lebenden Osteoblasten [84].

### 1.4 Immunabwehr des Körpers

Der menschliche Körper verfügt über drei Systeme, die der Abwehr fremder, exogener Krankheitserreger sowie der Abwehr körpereigener Zellmutanten dienen.

Das unspezifische zelluläre Abwehrsystem, deren Zellen als Granulozyten, Monozyten und Makrophagen es vermögen, körperfremde Stoffe, so genannte Antigene, durch Phagozytose und intrazellulären enzymatischen Abbau zu bekämpfen. Die Faktoren des Komplementsystems und andere Proteine des unspezifischen humoralen Systems sind befähigt, Antigen-Antikörper-Komplexe zu binden, Fremdkörper zu eliminieren und andere immunkompetente Zellen zu aktivieren.

Beim spezifischen Immunsystem spielen neben den Antikörper produzierenden B-Lymphozyten die T-Lymphozyten eine wichtige Rolle.

Es findet eine chemische Reaktion zwischen Antigen und Antikörper statt, die zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen führt. Jedes Antigen erzeugt einen antigenhomologen, spezifischen Antikörper. Das Antigen wird in einer Zell-Zell-Interaktion bekämpft.

Bei akuten Entzündungen dominiert zunächst das unspezifische Immunsystem mit der Aktivität u.a. neutrophiler Granulozyten und Monozyten, insbesondere als zur Phagozytose befähigte Osteoklasten. Durch die Präsentation phagozytierter Antigene von Zellen des unspezifischen Systems werden die Zellen des spezifischen Immunsystems aktiviert, so dass sich das histologische Bild bei der chronischen Entzündung entsprechend verändert.

Dennoch erscheint es schwierig, klinisch sowie histopathologisch exakt zwischen einer akuten und einer chronischen Osteomyelitis zu differenzieren [86].

### 1.4.1 Lymphozyten

Der menschliche Körper enthält etwa  $2 \times 10^{12}$  Lymphozyten. Davon befinden sich 10% im Knochenmark, 70% in anderen lymphatischen Organen, 4% im peripheren Blut und der Rest in diversen Geweben.

Lymphozyten besitzen nicht die Fähigkeit zur Phagozytose, sondern erkennen Antigene oder mutierte körpereigene Zellen (z.B. Tumorzellen) und töten nach Antigenkontakt den Fremdkörper ab oder sezernieren hormonähnliche „Nachrichtenproteine“, so genannte Zytokine. Diese interagieren mit hochspezifischen Zellrezeptoren und induzieren zellspezifische oder allgemeinere Effekte. Dazu gehören die Freisetzung von Mediatoren, die Exprimierung von Differenzierungsmolekülen sowie die Regulation der Exprimierung bestimmter Zelloberflächenmoleküle. Auf diesem Wege kommunizieren die Lymphozyten humoral untereinander und auch mit anderen Zelltypen.

Man unterscheidet zwei Hauptgruppen: T-Lymphozyten und B-Lymphozyten.

B-Lymphozyten verfügen über an ihre Zellmembran gebundene Immunglobuline (zumeist IgM- und IgD- Monomere) als spezifische Rezeptoren für Antigene. Nach dem Erstkontakt (Sensibilisierung) mit einem Antigen wandelt sich ein Teil der B-Lymphozyten in Plasmazellen um, die antigenspezifische Antikörper sezernieren, oder in Gedächtniszellen, die sich nach Sekundärkontakt wiederum zu Plasmazellen differenzieren. Die Aktivierung der B-Lymphozyten erfolgt durch bestimmte Zytokine, die sowohl von T-Helferzellen als auch von Makrophagen sezerniert werden [53, 87].

B-Lymphozyten (B=bone-marrow) reifen beim Erwachsenen im Knochenmark, wo sie sich teilen und differenzieren.

T-Lymphozyten (T=Thymus) reifen im Thymus, nachdem deren Vorläufer aus dem Knochenmark ausgewandert und über das Blut in den Thymus gelangt sind. Die als Prolymphozyten eingetretenen Zellen differenzieren sich im Thymus zu immunkompetenten T-Lymphozyten und werden u.a. mit charakteristischen Oberflächenmolekülen ausgestattet.

### 1.4.2 T-Zellen

T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den T-Zell-Rezeptor (TCR), einen Antigenrezeptor, der eine große Vielfalt an Antigen erkennt und bindet.

Der T-Zell-Rezeptor ist immer mit CD3 assoziiert, einem Komplex aus mehreren Polypeptiden. Nach erfolgter Antigenbindung an den TCR bewirkt CD3 die zur z.B. Abtötung der Zielzelle erforderliche Signaltransduktion [1].

T-Zellen können körperfremde Antigene nur durch die Bindung dieser an auf der Oberfläche körpereigener kernhaltiger Zellen vorhandenen antigenen Strukturen aus Proteinen, den so genannten Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), binden [1].

Die Subpopulationen der Lymphozyten werden nach ihren antigenen Eigenschaften und nach der Detektierbarkeit mit monoklonalen Antikörpern in CD-Klassen (Cluster of Differentiation) eingeteilt. Mit Hilfe immunhistochemischer Färbemethoden können immunkompetente Zellen nach ihrem Differenzierungsstadium und ihrem Aktivierungszustand unterschieden und quantifiziert werden.

Der Begriff Cluster of Differentiation bezeichnet Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen. Die CD-Moleküle sind meist membrangebundene Glykoproteine.

Nach antigener Stimulation vermehren sich die T-Zellen und differenzieren sich entweder zu T-Effektor- oder zu Memory-T-Zellen (T-Gedächtniszellen).

### 1.4.2.1 Memory-T-Zellen

Eine Unterteilungsmöglichkeit der T-Lymphozyten beruht auf der Exprimierung von CD45-Isoformen.

Diese Moleküle können als Marker für funktionelle Unterschiede der einzelnen Subpopulationen dienen.

Naive (noch nicht stimulierte) T-Zellen exprimieren CD45 RA und ändern nach Antigen-Exposition ihren Zell-Phänotyp, der durch die Expression von CD45 RO gekennzeichnet ist.

CD45 RO charakterisiert die Memory-T-Zellen. Diese besitzen die Fähigkeit nach Antigen-Reexposition eine qualitativ und quantitativ adäquate Immunantwort zu bilden (Sekundärantwort).

Die Differenzierung zu Memory-T-Zellen wird zudem sowohl durch unterschiedliche Zytokine, als auch über kostimulierende Moleküle transduzierte Signale beeinflusst.

Sie besitzen die Fähigkeit, auch in entzündetes Gewebe auszuwandern.

Es wird vermutet, dass Memory-T-Zellen vorzugsweise in das Gewebe zurückwandern, in dem sie erstmals aktiviert wurden.

### 1.4.2.2 Suppressor-T-Zellen

Die Suppressor-T-Zellen gehören zur Gruppe der Effektorzellen.

Der Begriff „Supressor-T-Zelle“ wird in der aktuellen Literatur durch das Synonym „regulatorische T-Zelle“ ersetzt [35].

Mit der Immunantwort soll vom Organismus eine quantitativ wie qualitativ optimale Abwehrleistung erreicht werden.

Die Mikroorganismen sollen erfolgreich eliminiert, die natürliche Tendenz zur Autoimmunität soll kontrolliert und die Bereitstellung von Effektorzellen soll quantitativ und qualitativ optimiert werden.

Die Suppressor-T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche das CD8-Molekül, welches Antigene, gekoppelt an MHC der Klasse I auf Zielzellen mit dem TCR erkennt.

CD8-Zellen sezernieren Zytokine und stimulieren Makrophagen zum intrazellulären Abtöten phagozytierter Partikel.

Es wird ein suppressiver Effekt auf die Aktivierung naiver T-Zellen vermutet [35].

### 1.4.2.3 Zytotoxische T-Zellen

Die Mehrheit der zytotoxischen T-Zellen trägt auf ihrer Oberfläche ebenfalls das CD8-Molekül und ist somit in ihrer Funktion auf MHC-Klasse I-exprimierende Zielzellen beschränkt.

Praktisch jede Körperzelle exprimiert MHC-Klasse I-Moleküle und kann somit durch zytotoxische T-Lymphozyten erkannt werden.

Wie bei den Suppressor-T-Zellen handelt es sich um eine Subpopulation der Effektor-T-Zellen.

Die Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten erfolgt durch deren Interaktion mit T-Helferzellen und der antigentragenden Zielzelle.

Sie spielen u.a. eine Rolle bei der Bekämpfung intrazellulärer Viren und Bakterien.

Bei der Aktivierung werden Granula gebildet, die Enzyme und Perforine enthalten. Perforine besitzen lytische Aktivität. Es wird durch die Insertion in die Zielmembran und der damit verbundener Veränderung der Membranpermeabilität und somit der intrazellulären osmotischen Verhältnisse, die Lyse der Zielzelle induziert, der so genannte „lethal hit“ [52].

### 1.4.3 Monozyten/Makrophagen

Die Makrophagen gehören zusammen mit den polymorphkernigen Granulozyten (PMNs) zu den ersten Zellen des unspezifischen Immunsystems, denen Antigene begegnen.

Sie existieren in allen Geweben des Körpers, werden im Knochenmark gebildet und zirkulieren als Makrophagenvorläuferzellen, so genannte Monozyten, im Blut. Sie verlassen die Blutbahn durch Transmigration und wandern in lymphatisches und nicht-lymphatisches, entzündlich verändertes Gewebe, wo sie unter dem Einfluss des jeweiligen Mikromilieus verschiedene Phänotypen und Funktionen annehmen [35, 52]. So werden sie im Knochen Osteoklasten genannt [52].

Durch intrazelluläre Hydrolasen und oxidierende Stoffwechselprodukte verfügen sie über die Fähigkeit, Antigene, Zellfragmente sowie körpereigene Zellen zu phagozytieren und abzubauen.

Makrophagen wirken regulierend, indem sie proinflammatorische Mediatoren synthetisieren und freisetzen, sowie den Gewebsabbau und -umbau über die Freisetzung von Enzymen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflussen.

Daneben präsentieren sie Antigene an ihrer Oberfläche, um so T-Lymphozyten zur Immunantwort zu stimulieren und sind somit auch Teil der spezifischen Immunabwehr. Sie tragen auf ihrer Oberfläche das CD68-Molekül.

## **2 ZIEL DER ARBEIT**

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die quantitative Analyse von T-Zellen, T-Zell-Subpopulationen und Makrophagen als Zellen der zellvermittelten Immunität im osteomyelitischen Knochengewebe anhand von Knochenbiopsien unter Verwendung monoklonaler Antikörper.

Die Verwendung spezifischer Oberflächenmarker ermöglicht eine Identifikation und quantitative Analyse immunkompetenter Zellen.

Die durchgeführte Bestimmung der lokalen Immunität im osteomyelitischen Gewebe lässt direkte Schlüsse auf die Verteilung immunkompetenter Zellen am Ort der Osteomyelitis zu.

Im Gegensatz zur Bestimmung der systemischen Immunität gewährt eine direkte Analyse immunkompetenter Zellen am Ort der Entzündung einen exakteren Einblick in die Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus.

Das Vorhandensein körpereigener Abwehrzellen ist von großer Bedeutung für den Krankheitsverlauf bei der Osteomyelitis. Die quantitative Analyse soll zu einem besseren Verständnis der lokalen Interaktion zwischen immunkompetenten Zellen im osteomyelitischen Knochen beitragen.

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Patienten**

Paraffineingebettete Kieferknochenbiopate von an einer Osteomyelitis des Kiefers erkrankten Patienten, die im Zeitraum von 2 Jahren (1999–2001) in der Klinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie Münster operativ behandelt worden waren, bildeten die Grundlage dieser Arbeit.

Das Patientenkollektiv umfasste 15 Patienten bzw. 21 Knochengewebebeurteilungen.

Es wurden ausschließlich Proben in die Auswertung einbezogen, für die eine eindeutige pathohistologische Beurteilung vorlag.

Weitere Daten zur Charakterisierung des Patientengutes wurden aus den zugehörigen Patientenakten entnommen.

Als Kontrollgruppe dienten Kieferknochenproben von 2 Körperspendern des anatomischen Instituts, bei denen eine Osteomyelitis histologisch ausgeschlossen werden konnte.

### **3.2 Klinische und pathologische Kriterien**

Die Akten der Patienten wurden retrospektiv analysiert, mit besonderer Betonung auf demographische Daten (Geschlecht, Alter), Lokalisation des Krankheitsbildes (Mandibula/Maxilla- Beteiligung), mögliche Erkrankungsursache, sowie das Vorliegen zusätzlicher systemischer Erkrankungen.

Die Diagnosestellung erfolgte auf der Basis der Krankengeschichte, der klinischen Symptomatik sowie der pathohistologischen Untersuchung von Knochenbiopsien, Dekortikationsproben oder beidem.

### 3.3 Gewebe

Bei den Kieferknochenbiopтатаen handelte es sich um Knochengewebeteile, die im Rahmen eines operativen Eingriffes in Form von Dekortikationen, Probeexzisionen oder UK-Teilresektionen bei an einer Osteomyelitis des Kiefers erkrankten Patienten entnommen worden waren. Unmittelbar nach Entnahme wurden diese in 4%-igem, gepufferten Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet.

### 3.4 Methoden der Aufarbeitung und Auswertung

#### 3.4.1 Probenaufbereitung für die Lichtmikroskopie

Nach Entnahme der Kieferknochentrepante erfolgte die Aufbereitung der Proben für die Lichtmikroskopie nach standardisiertem Schema:

Zunächst wurden die Proben in 4%-igem gepuffertem (0,1 m PBS, pH 7,4) Paraformaldehyd 24–48 Stunden fixiert. Nach 24-stündiger Auswaschung des Fixiermittels mit PBS (0,1 m, pH 7,4) erfolgte die schonende Entkalkung der Proben bei 37°C in 20 %-iger EDTA-Lösung mit 0,2%-igem Paraformaldehyd für eine Dauer von 2–9 Monaten. Die entstandenen wasserlöslichen komplexen Bindungen des Calciums an das EDTA (Chelate) wurden durch anschließendes Auswaschen für 24 Stunden mit 0,1 m PBS (pH 7,4) beseitigt.

Anschließend folgte die Dehydration mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 96%, 100%). Zur Verdrängung des Restalkohols wurden die Proben 24–72 Stunden in Zedernholzöl gelagert. Nach der darauf folgenden 24-stündigen Lagerung des Knochengewebes in einem Zedernholzöl-Paraffin-Gemisch bei 48°C sowie der 24-stündigen Infiltration von reinem Paraffin bei 58°C, erfolgte die Infiltration mit einem Paraffin-DMSO-Gemisch bei 58°C für einen Zeitraum von 3x 24 Stunden. Die von Paraffin durchtränkten Gewebestücke wurden dann in Kassettenformen eingebettet zu

Paraffinblöcken verarbeitet. 8–10µm dicke Schnitte der Paraffinblöcke, hergestellt an einem Rotationsmikrotom, wurden auf Eiweiß –Glycerin beschichtete Objektträger aufgezogen und bis zum Färben in einem 37°C warmen Brutschrank zum Trocknen und zur besseren Haftung aufbewahrt.

### 3.4.2 Immunhistochemie

#### 3.4.2.1 Grundlagen

Mit der Immunperoxidase-Färbemethode wird ein Gewebsantigen durch ein System spezifischer Antikörperlösungen lokalisiert.

Immunperoxidase-Verfahren bieten die Möglichkeit, Zellkomponenten bei einer Vielzahl von Präparaten, einschließlich Paraffinschnitten, Kryostatschnitten, Ausstrichen, Abklatschpräparaten und Zytozentrifugenpräparationen sichtbar zu machen. Der Darstellung zellulärer Antigene dienen verschiedene Immunperoxidase-Färbemethoden, von denen die Avidin-Biotin-Methode in modifizierter Form hier Anwendung gefunden hat und deren Grundprinzipien kurz beschrieben werden sollen [10].

Die Avidin-Biotin-Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, das Vitamin Biotin physikalisch zu binden.

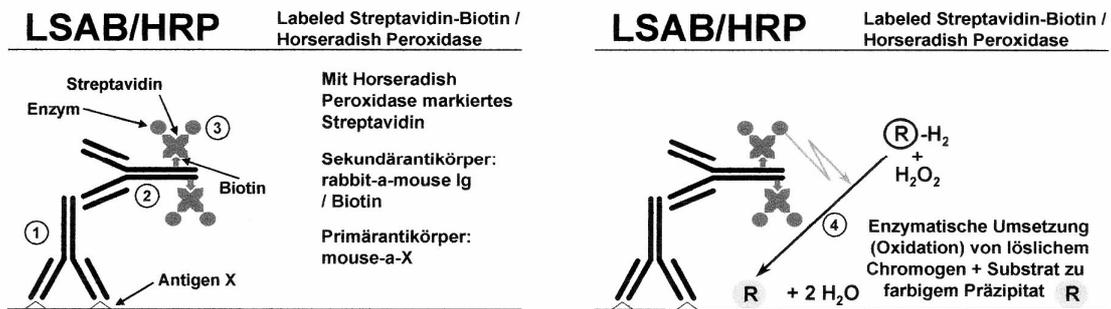
Bei der LSAB-Methode, als spezielle Technik der Avidin-Biotin-Methode, wird die starke Affinität von Streptavidin für Biotin ausgenutzt und bedeutet eine Sensitivitätssteigerung im Vergleich zu anderen Immunperoxidase-Färbemethoden.

Das L.V. DAKO LSAB® + Kit, HRP nutzt eine verbesserte Avidin-Biotin-Technik, bei der ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper mit verschiedenen Peroxidase konjugierten Streptavidinmolekülen reagiert (Abb. 2).

Bei dieser Methode werden 3 Reagenzien benötigt:

1. Primärantikörper, der spezifisch gegen das Antigen gerichtet ist
2. Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper binden kann und mit Biotin konjugiert ist
3. enzymmarkiertes Streptavidin (LSAB), das mit dem biotinylierten Ende des Sekundärantikörpers reagiert

Chromogene bilden mit Peroxidase ein Farbprodukt, das an der Stelle des zu lokalisierenden Antigens präzipitiert. Das gesuchte Antigen wird so mit einem geeigneten Chromogen (DAB) sichtbar gemacht [10] (Abb. 2).



**Abbildung 2:** Enzym-vermittelte Darstellung von Antigen mittels der Avidin-Biotin-Methode nach Kappeler [47]

### 3.4.2.2 Charakterisierung der verwendeten Antikörper: CD3, CD45 RO, CD8 und CD68

#### **CD3**

DAKO Rabbit Anti-Human T Cell, CD3 ist ein polyklonaler Antikörper bestehend aus mindestens 4 Polypeptidketten.

CD3 ist ein hochspezifischer Marker für T-Zellen, der durch menschliche T-Zellen im Thymus, im peripheren lymphatischen Gewebe und im Blut exprimiert wird.

Das mit CD3 determinierte Antigen ist zunächst in frühen Thymozyten zytoplasmatisch nachzuweisen und erscheint später bei Zellreifung auf der T-Zell-Oberfläche. Außerdem kommt es bei der großen Mehrheit neoplastischer Zellen vor.

CD3 gilt als wesentlicher Marker für die erste Bewertung chronischer lymphoproliferativer Störungen [18].

#### **CD45 RO**

DAKO Mouse Anti-Human T Cell, CD45RO, UCHL1 ist ein monoklonaler Antikörper und gehört zur Familie der Oberflächen-Glykoproteine.

Anti-CD45RO, UCHL1 markiert die Mehrheit der Thymozyten, in den beiden CD4- und CD8-Untergruppen eine Subpopulation ruhender T-Zellen und reife aktivierte T-Zellen [20].

Es wird angenommen, dass CD45 RO bevorzugt auf Memory T-Zellen exprimiert wird. Myelomonozytische Zellen wie Granulozyten und Monozyten werden ebenfalls von diesem Antikörper markiert, während die meisten B-Zellen CD45 RO-negativ sind.

Da der Antikörper funktionelle Unterschiede humaner Helper-Inducer-T-Zellen erkennt, ist er bei immunologischen Untersuchungen bezüglich der T-Zell-Aktivierung von besonderem Interesse [17].

### **CD8**

Monoclonal Mouse Anti-Human CD8, Clone C/144B färbt zytotoxische/Suppressor-T-Zellen immunhistochemisch in Kryostat-Schnitten sowie in formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben. Der Antikörper ist nützlich für die Identifikation dieser Zellen sowie ihrer neoplastischen Gegenspieler [19].

### **CD68**

Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Clone PG-M1 färbt Makrophagen in den verschiedensten menschlichen Geweben, eingeschlossen Makrophagen im Knochenmark.

CD68 gilt im Vergleich mit verschiedenen anderen Antikörpern als der spezifischste Marker für Makrophagen [16].

### 3.4.2.3 Methode

Die Darstellung der immunkompetenten Zellen unter Verwendung der Antikörper CD3, CD45 RO, CD8 und CD68 erfolgte mittels der LSAB-Methode unter Verwendung des Universal Dakocytomation LSAB® + Kit, Peroxidase (LSAB + Kit, HRP).

#### Darstellung von CD3:

- Entparaffinierung der Proben für 2 x 10 Min. mit Xylol
- Rehydrierung mit einer von 100% auf 70% absteigenden Alkoholreihe für je 1 x 10 Min.
- Auswaschen mit Aqua dest.
- Irreversible Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität durch 5-minütige Inkubation mit 3%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei RT
- Spülen im Tris-Puffer (0,05 M, pH 7,6)
- Enzymatischer Verdau mit Pronase (1:200, 0,05%) durch 12 Min. Inkubation bei RT und 6 Min. Mikrowellenbehandlung
- Spülen im Tris-Puffer
- 30 Min. Inkubation bei RT mit Primärantikörper (1:200, CD3) mit Hintergrundreduzierendem Puffer
- Spülen im Tris-Puffer
- 30 Min. Inkubation bei RT mit Link-Antibody, der an seinem Fc-Anteil biotinyliert ist
- Spülen im Tris-Puffer
- 30 Min. Inkubation bei RT mit Streptavidin-Peroxidase
- Spülen im Tris-Puffer
- Sichtbarmachung des Antigens durch Inkubation mit DAB-Substrat-Chromogen-Lösung für 5 Min. bei RT
- Spülen im Tris-Puffer
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin
- Fließend wässern

- Dehydrierung in aufsteigender Alkohol-Reihe
- Eindeckung in DePeX

Das Vorgehen bei der Darstellung von **CD68** entsprach dem Vorgehen bei der CD3-Darstellung. Der Antikörper fand in der Verdünnung 1:100 Anwendung.

Bei der Darstellung von **CD45 RO** und **CD8** erfolgte die Renaturierung der durch die Fixierung veränderten Proteine durch Mikrowellenbehandlung (7 Min., 500 Watt) mit einem Citrat-Puffer (10mM, pH 6,0) anstelle des enzymatischen Verdaus mit Pronase. Als Primärantikörper fanden CD45 RO (1:75) und CD8 (1:25) mit Hintergrundreduzierendem Puffer Anwendung.

### 3.4.3.4 Kontrollen

Eine Kontrolle der Reagenzien sowie der Arbeitstechnik wurde zur Bestätigung immunhistochemischer Färberesultate durchgeführt.

Als Positivkontrollen für den Antikörper-Nachweis dienten die Proben als Schnitte primär lymphatischer Organe (Knochenmark) mit klinisch und pathohistologisch gesicherter Diagnose (Entzündungsreaktion) selbst. Als Ersatzkontrollen dienten Leerpräparate (zusätzliche Schnitte der Gewebeproben), die anstelle des Primärantikörpers mit Non-Immuserum bearbeitet worden waren. Als Negativkontrollen wurden Knochengewebsproben-Schnitte von Kontrollpersonen, bei denen keine Osteomyelitis bekannt war, herangezogen. Diese wurden nach dem gleichen Verfahren wie die Patientenproben behandelt.

### 3.4.3.6 Auswertung

Die quantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate erfolgte mit Hilfe eines computerassistierten Bildanalyse-Systems (LUCIA NET; Version 1.16.2), das mit einer im Lichtmikroskop integrierten Digitalkamera Bildausschnitte eines Präparates aufnehmen kann. Es wurden im Mittel 30 digitale Fotos pro Präparat erstellt, die mit Hilfe eines manuellen Zählprogrammes (UTHSCSA Image Tool; Version 4.02) hinsichtlich der CD3(+)-, CD45 RO(+)-, CD8(+)- und CD68(+)-gefärbten Zellen im Verhältnis zur Anzahl der Gesamtzellen im Knochenmark ausgewertet wurden.

Bei Präparaten, bei denen aufgrund der Größe des auszuwertenden Schnittes die Erstellung von 30 digitalen Fotos nicht möglich war, wurde die größtmögliche Fotoanzahl der Auswertung zugrunde gelegt.

Die quantitative Analyse erfolgte bei 250-facher Vergrößerung am Mikroskop (25x Objektiv; 10x Okular). Es wurde jeweils die Anzahl der markierten Zellen und die Anzahl der Gesamtzellen pro Gesichtsfeld ermittelt. Dabei wurden sowohl die positiv gefärbten Zellen, als auch die unmarkierten Zellen pro Probe, sowie der Proben der Kontrollgruppe so oft ausgezählt, bis 3 mal ein Zählergebnis mit einer statistischen Signifikanzgrenze von  $\alpha \leq 5\%$  erzielt war. Von der ermittelten Gesamtzellzahl und der Anzahl positiv gefärbter Zellen sämtlicher Präparate wurde der arithmetische Mittelwert gebildet. Der Anteil positiver Zellen wurde prozentual dargestellt. Der Quotient aus der Anzahl der markierten Zellen und der Gesamtzahl der Zellen ist ein Maß für die relative Häufigkeit der betreffenden Zellsubpopulation im osteomyelitischen Gewebe bzw. im Gewebe der Kontrollpersonen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Excel 2003.

## 4 ERGEBNISSE

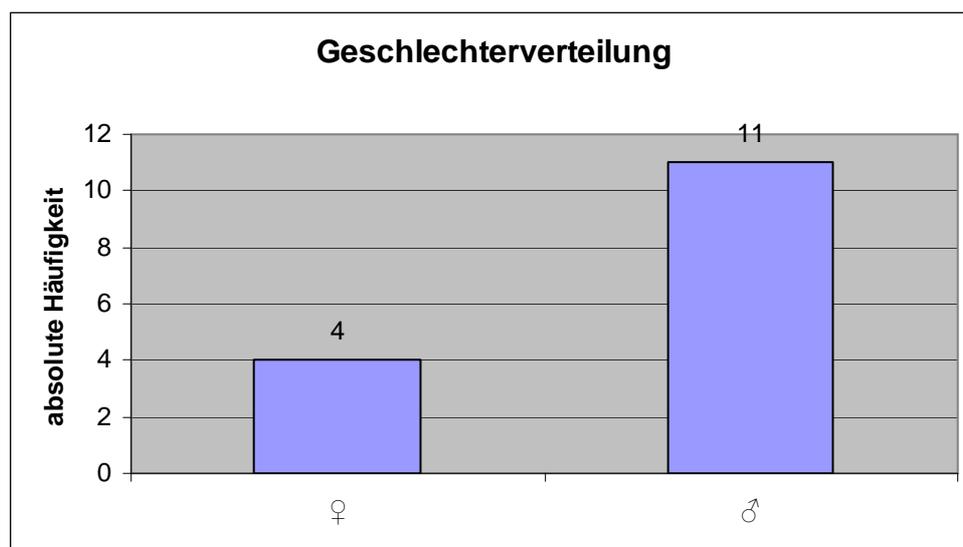
### 4.1 Patientenkollektiv, klinische und pathologische Daten

#### 4.1.1 Geschlechter- und Altersverteilung

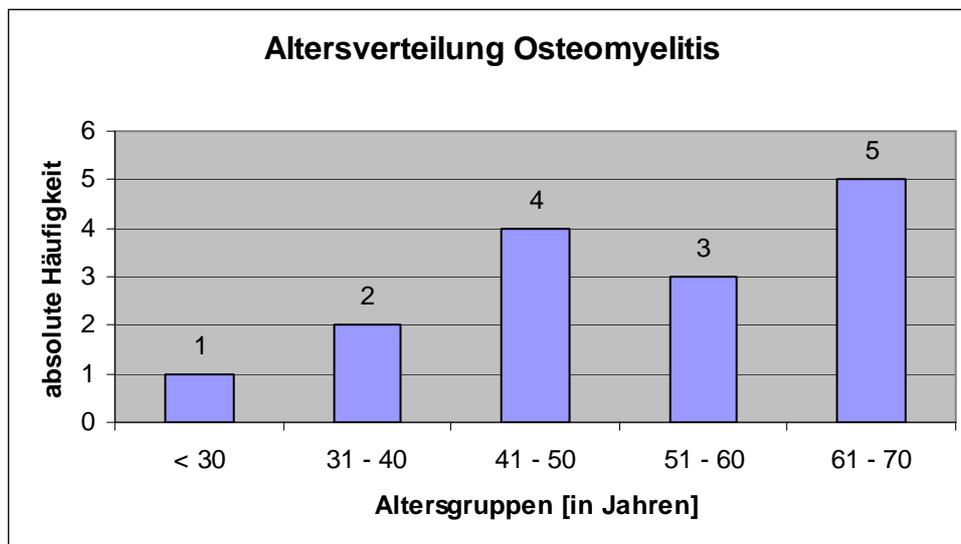
Graph. 1 zeigt die Geschlechterverteilung der an der Kieferosteomyelitis erkrankten 15 Patienten. Männer waren deutlich häufiger betroffen als Frauen, das Geschlechterverhältnis war 1: 2,75 (4 Frauen und 11 Männer).

Graph. 2 zeigt die Altersverteilung der an der Kieferosteomyelitis erkrankten 15 Patienten. Es war eine breite Streuung des Manifestationsalters der Erkrankung zu beobachten. Die Manifestation der Osteomyelitis im Kieferknochen zeigte sich bei 20-67-jährigen Patienten (Altersdurchschnitt: 51 Jahre) und es konnte nur ein Fall mit bilateraler Beteiligung der Mandibula beobachtet werden.

Die Manifestation der Erkrankung an der Kieferosteomyelitis zeigte 2 Spitzen der Inzidenz bei 41-50-jährigen Patienten sowie bei 61-70-jährigen Patienten.



**Graphik 1:** Häufigkeitsverteilung des Geschlechts der Patient/innen bei Probenentnahme

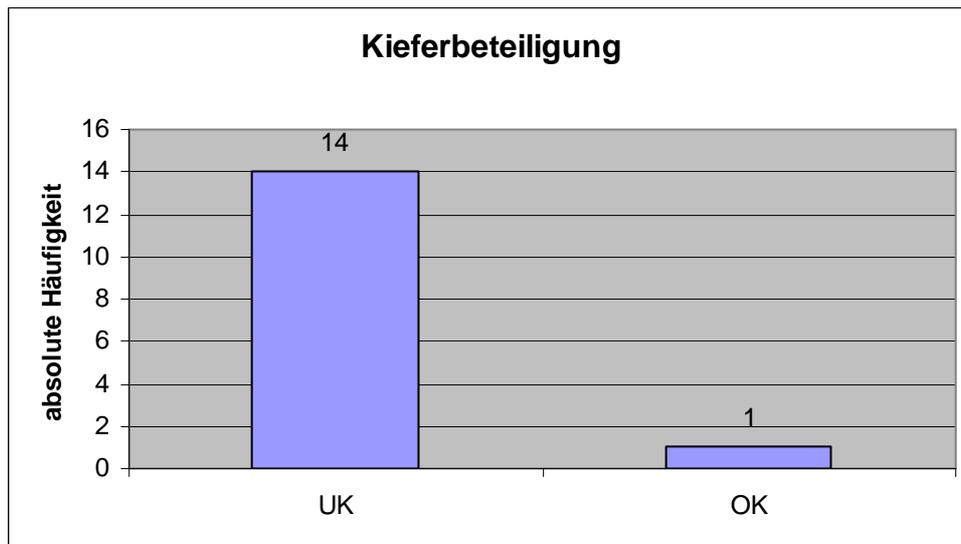


**Graphik 2:** Altersverteilung der Patient/innen bei Probenentnahme

### 4.1.2 Lokalisation

Bei der Lokalisation der humanen Kieferosteomyelitis wurde nach Beteiligung der Maxilla und der Mandibula sowie unilateraler und bilateraler Manifestation unterschieden. Mit einer Beteiligung der Mandibula von 93,3% (n=14) war diese bei weitem häufiger involviert als die Maxilla mit 6,7% (n=1)(Graph. 3).

Sowohl in der Mandibula als auch in der Maxilla etablierte sich die Erkrankung in erster Linie unilateral (n=14). Lediglich bei einer 20-jährigen Patientin war die Mandibula bilateral betroffen.



**Graphik 3:** Häufigkeitsverteilung der Lokalisation bei der Kiefer-OM

### 4.1.3 Mögliche ätiologische Faktoren

Die retrospektive Analyse der Patientenakten ergab 3 verschiedene mögliche Ursachen für die Erkrankung an der humanen Kieferosteomyelitis.

Graph. 4 zeigt die 3 möglichen ätiologischen Faktoren, die berücksichtigt wurden.

Diese beinhalten:

- Zustand nach Extraktion
- Zustand nach Trauma
- Zustand nach Tumor-OP und Radiatio
- Unbekannte Ursache

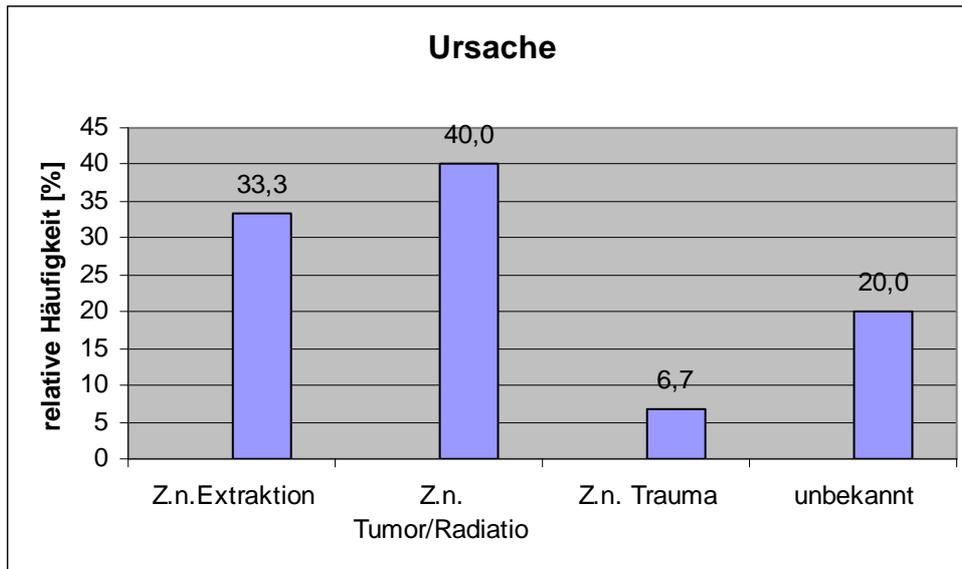
Das Patientenkollektiv wurde entsprechend der möglichen Erkrankungsursache an der humanen Kieferosteomyelitis in die folgenden 4 Gruppen eingeteilt (Graph. 4):

**Gruppe 1:** Eine Gruppe von 5 (33,3%) an einer Osteomyelitis des Kiefers erkrankten Patienten nach Zahnextraktion. 3 dieser Patienten waren männlich, 2 dieser Patienten waren weiblich. Der arithmetische Mittelwert betrug 46,6 Jahre (36-59).

**Gruppe 2:** Eine Gruppe von 6 (40,0%) an einer Osteomyelitis des Kiefers erkrankten Patienten nach Tumorresektion und anschließender Radiatio. Patienten, die dieser Gruppe zuzuordnen sind, waren ausschließlich männlich. Der Altersdurchschnitt lag bei 63,2 Jahren (54-67). In einem Fall war zudem anamnestisch die Erkrankung an Diabetes mellitus bekannt. Bei 2 dieser Patienten wurde pathohistologisch unterstützt zudem die Diagnose einer Osteoradionekrose gestellt.

**Gruppe 3:** Eine (6,7%) an einer Osteomyelitis des Kiefers erkrankte Patientin entwickelte eine Osteomyelitis nach Trauma. Die Patientin war zum Zeitpunkt der Probenentnahme 20 Jahre alt und zeigte als einzige Patientin des gesamten Patientenkollektivs eine bilaterale Manifestation der Osteomyelitis in der Mandibula.

**Gruppe 4:** Eine Gruppe von 3 (20,0%) an einer Osteomyelitis des Kiefers erkrankten Patienten, deren Krankheitsbild der Osteomyelitis anamnestisch idiopathischer Ätiologie war. Diese Gruppe umfasste 2 männliche und eine weibliche Person mit einem Altersdurchschnitt bei 44,3 Jahren (41-48).



**Graphik 4:** Häufigkeitsverteilung der vermutlichen Ursache der Kiefer-OM

## 4.2 Immunhistologische Befunde

### 4.2.1 Kontrollen

Die Kontrollgruppe setzte sich aus zwei Körperspendern zusammen aus deren Kieferknochen Proben entnommen worden waren. Bei keiner dieser Personen war eine osteomyelitische Erkrankung bekannt.

Das arithmetische Mittel der absoluten Häufigkeit **CD3(+)-Zellen** betrug  $38,5 \pm 32,5$  Zellen/Proben bei einer Gesamtzellzahl von  $1003,0 \pm 40,0$  Zellen/Proben. Dies entspricht einer relativen Häufigkeit von  $3,8\% \pm 3,1\%$  im gesunden Knochengewebe (Tab.1). Der Median lag bei 3,7% mit Extremwerten zwischen minimal 0,6% und maximal 6,8%.

Im Mittel waren  $177,4 \pm 168,4$  Zellen von  $1324,2 \pm 340,5$  Zellen/Proben **CD45 RO(+)**. Dies entspricht einer relativen Häufigkeit von  $13,4\% \pm 9,9\%$ . Der Median betrug 10,8%, die Extremwerte lagen bei minimal 0,9% und maximal 20,8%.

Die absolute Häufigkeit **CD8(+)-Zellen** betrug im Mittel  $0,5 \pm 0,5$  Zellen/Proben bei im Mittel  $874,0 \pm 533,3$  Gesamtzellen/Proben.

Die Analyse CD8(+)-Zellen ergab eine relative Häufigkeit von  $0,1\% \pm 0,1\%$  mit einem Median bei 0,1% und Extremwerten von 0% und 0,3%.

Der arithmetische Mittelwert für **CD68(+)-Zellen** betrug  $1,5 \pm 0,5$  Zellen/Proben bei im Mittel  $688,2 \pm 578,2$  Gesamtzellen/Proben im gesunden Knochengewebe. Dies entspricht einer relativen Häufigkeit von  $0,2\% \pm 0,4\%$ .

Der Median lag bei 0,5% mit Extremwerten zwischen minimal 0,2% und 0,9%.

### 4.2.2 Osteomyelitisches Knochengewebe

#### 4.2.2.1 CD3(+)-Zellen

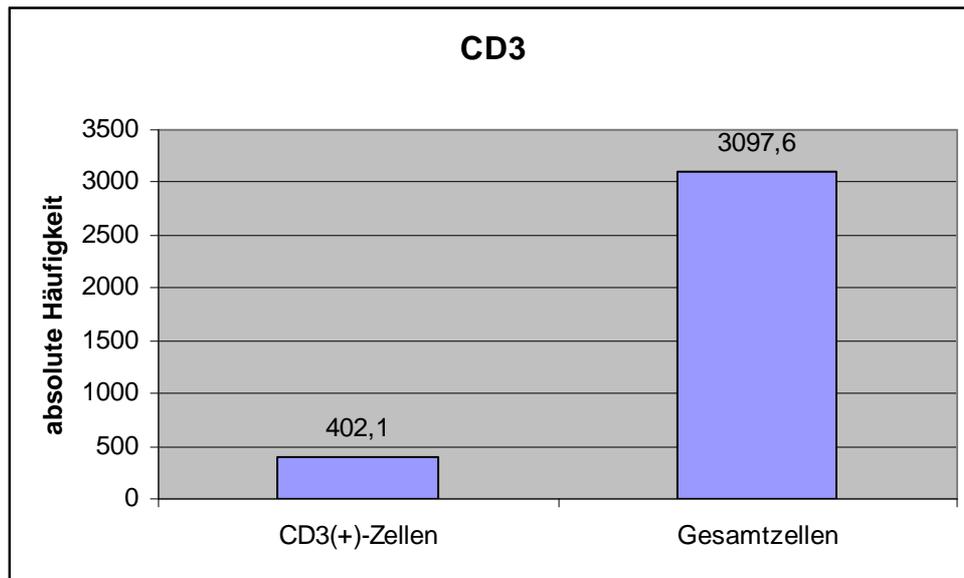
CD3(+)-Zellen konnten immunhistochemisch bei allen an der Kieferosteomyelitis erkrankten Patienten nachgewiesen werden.

Graph. 5 veranschaulicht das Verhältnis der arithmetischen Mittelwerte der absoluten Häufigkeit der CD3(+)-Zellen zur Gesamtzellzahl in den immunhistologisch ausgewerteten OM-Präparaten.

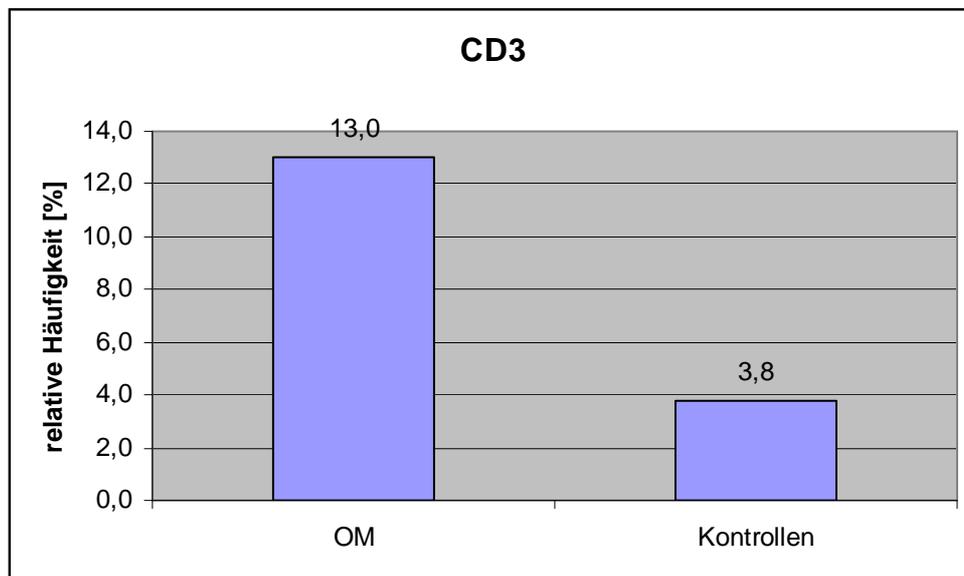
Im Mittel waren  $402,1 \pm 379,7$  Zellen von insgesamt  $3097,6 \pm 2599,5$  Zellen/Proben CD3-positiv. Das entspricht einer relativen Häufigkeit von  $13,0\% \pm 5,8\%$  (Tab. 1).

Der Median lag bei 12,2% mit Extremwerten zwischen minimal 3,2% und maximal 19,2% und war etwa 3x so hoch wie im gesunden Knochenmark.

Graph. 6 zeigt den Vergleich der relativen Häufigkeiten CD3(+)-Zellen im osteomyelitischen Knochengewebe mit dem Knochengewebe der Kontrollen. Im osteomyelitischen Gewebe war mit 13,0% eine deutlich höhere relative Expression zu beobachten als im gesunden Gewebe (3,8%) (Tab. 1).



**Graphik 5:** Darstellung des arithmetischen Mittels der absoluten Häufigkeit CD3(+)-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl



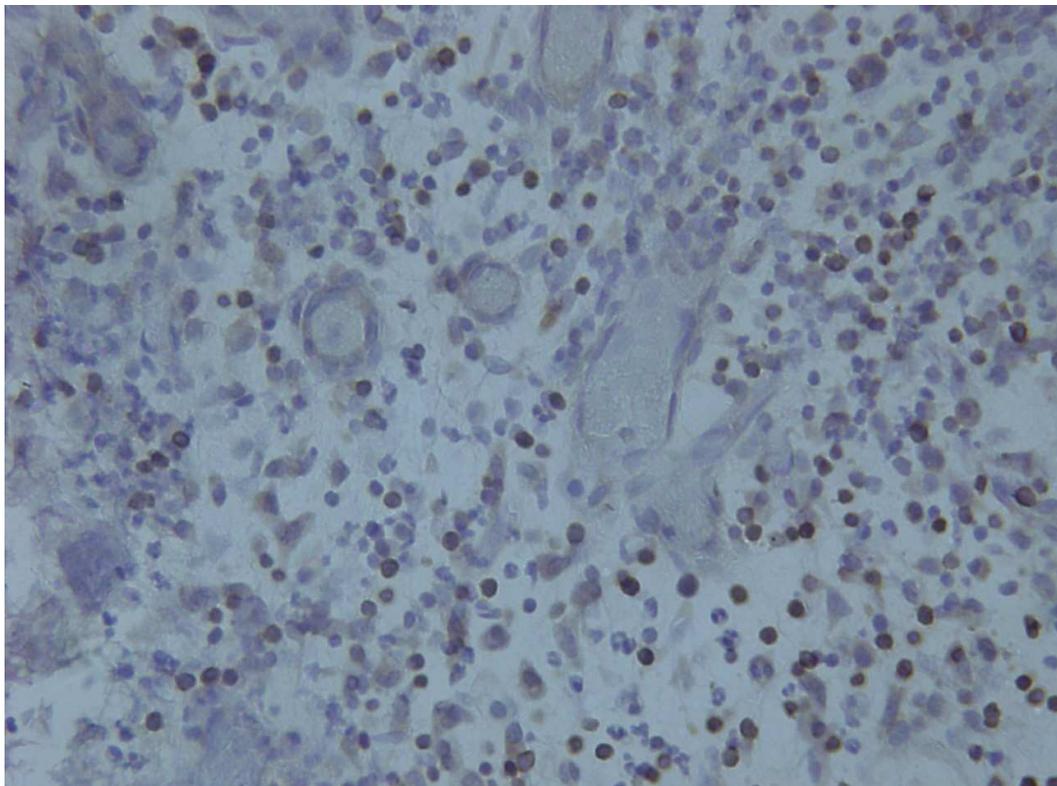
**Graphik 6:** Darstellung der relativen Häufigkeit der CD3-Expression im osteomyelitischen Gewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe

CD3	absolute Häufigkeit		relative Häufigkeit
	[in pos. Zellen/Probe]	[in Gesamtzellen/Probe]	[in % markierte Zellen]
OM	402,1	3097,6	13,0
	379,7	2599,5	5,8
Kontrollen	38,5	1003,0	3,8
	32,5	40,0	3,1

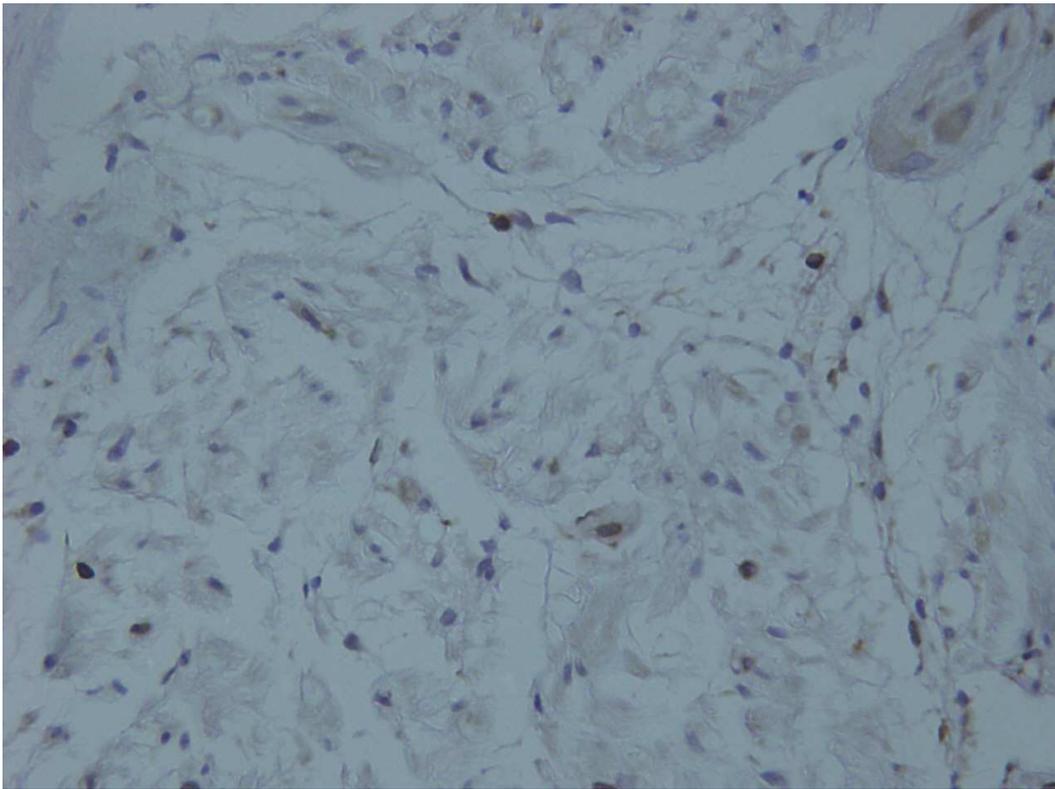
**Tabelle 1:** Arithmetische Mittel der absoluten Häufigkeit und relative Häufigkeit CD3(+)-Zellen (oberer Wert) mit Standardabweichung (unterer Wert)

Abb. 3 zeigt eine deutliche Infiltration des osteomyelitischen Gewebes mit immunhistochemisch dargestellten T-Zellen, wohingegen in Abb. 4 nur vereinzelt locker verstreute T-Zellen zu beobachten sind.

Bei von dem Antikörper markierten Zellen ist die Färbung auf das Zytoplasma und/oder die Zellmembran beschränkt.



**Abbildung 3:** CD3(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung



**Abbildung 4:** CD3(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung

#### 4.2.2.2 CD45 RO(+)-Zellen

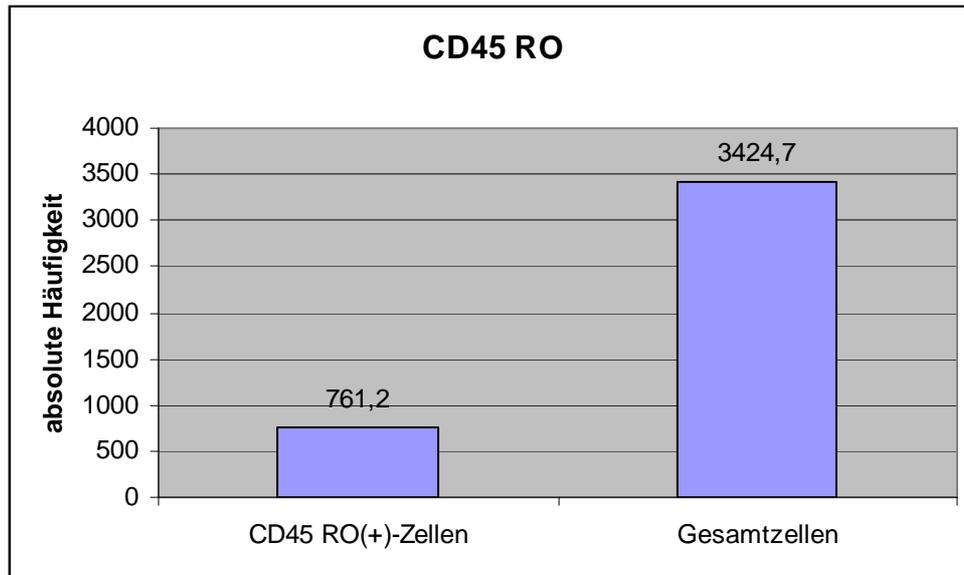
Bei der Auswertung der mit dem monoklonalen Antikörper CD45 RO behandelten Paraffinschnitte konnte bei allen erkrankten Personen eine Ablagerung des Reaktionsproduktes nachgewiesen werden.

In Graph. 7 ist die Auswertung das arithmetische Mittel absoluten Häufigkeit CD3(+)-Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl dargestellt.

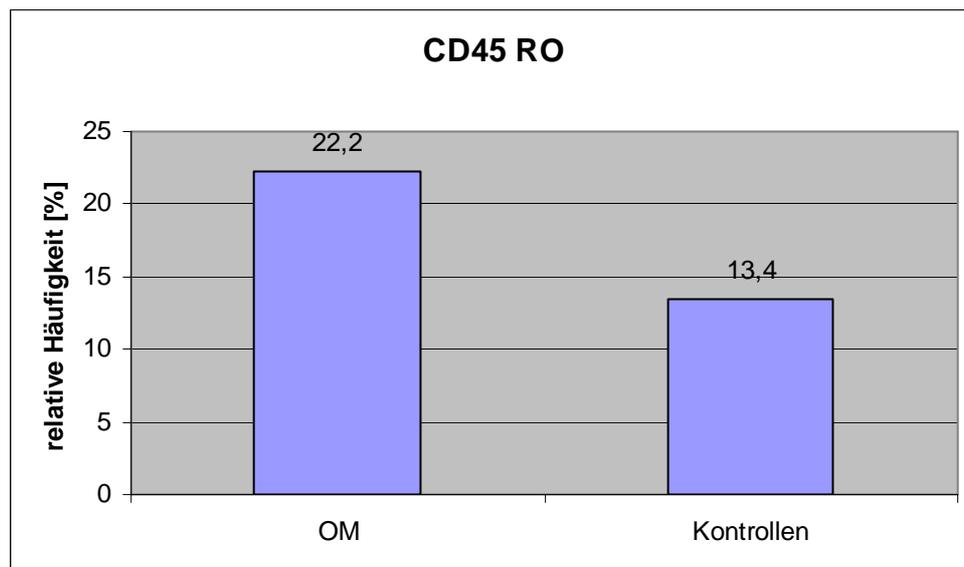
Die CD45 RO(+)-Zellen sind mit im Mittel  $761,2 \pm 535,2$  Zellen/Proben bei einer Gesamtzellzahl von  $3424,7 \pm 2086,4$  Zellen/Proben repräsentiert. Das entspricht einer relativen Häufigkeit von  $22,2\% \pm 6,1\%$  (Graph. 8, Tab. 2).

Der Median der CD45 RO-Expression lag bei 21,3% mit einem Minimum bei 9,0%. Das Maximum wurde bei einer Patientin mit bilateraler Mandibulabeteiligung mit einer relativen Häufigkeit der CD45 RO-Expression von 34,8% erreicht.

Graph. 8 zeigt den Vergleich der relativen Häufigkeiten CD45 RO(+)-Zellen im osteomyelitischen Knochengewebe mit dem Knochengewebe der Kontrollen. Im osteomyelitischen Gewebe war mit  $22,2\% \pm 6,1\%$  eine deutlich höhere Expression zu beobachten als im gesunden Gewebe ( $13,4\% \pm 9,9\%$ ) (Graph. 8, Tab. 2).



**Graphik 7:** Darstellung der arithmetischen Mittel der absoluten Häufigkeit CD45 RO(+)-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl



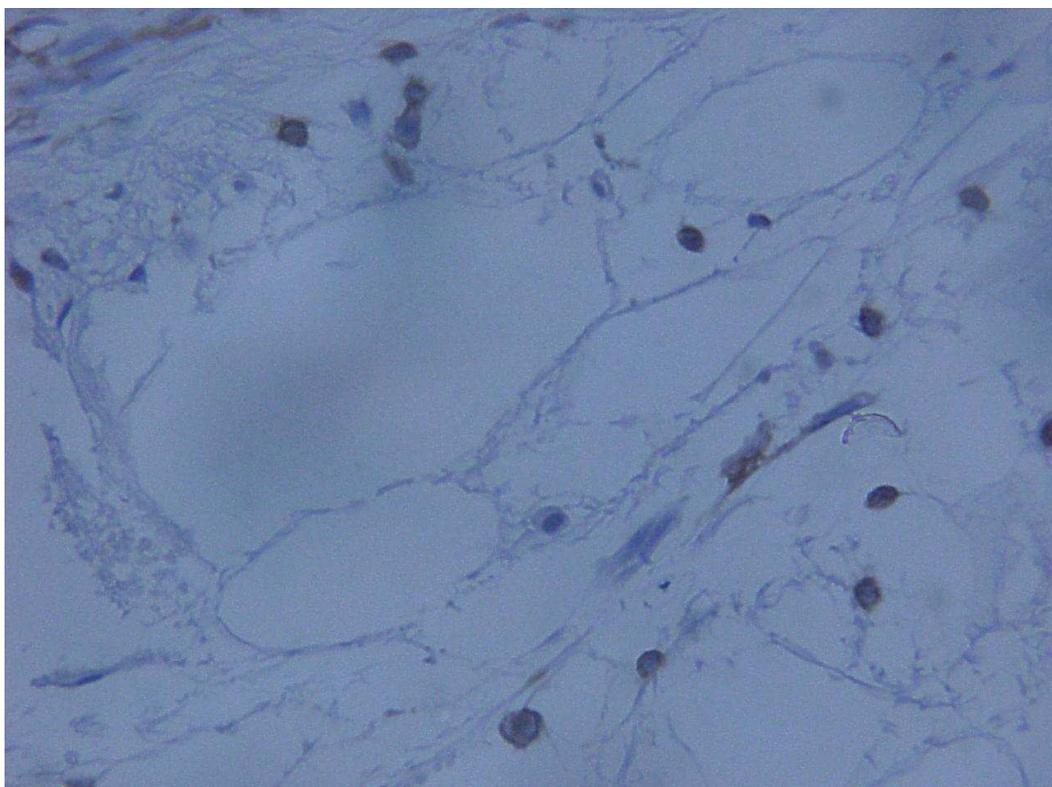
**Graphik 8:** Darstellung der relativen Häufigkeit der CD45 RO-Expression im osteomyelitischen Gewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe

CD45 RO	absolute Häufigkeit		relative Häufigkeit
	[in pos. Zellen/Probe]	[in Gesamtzellen/Probe]	[in % markierte Zellen]
OM	761,2	3424,7	22,2
	535,2	2086,4	6,1
Kontrollen	177,4	1324,2	13,4
	168,4	340,5	9,9

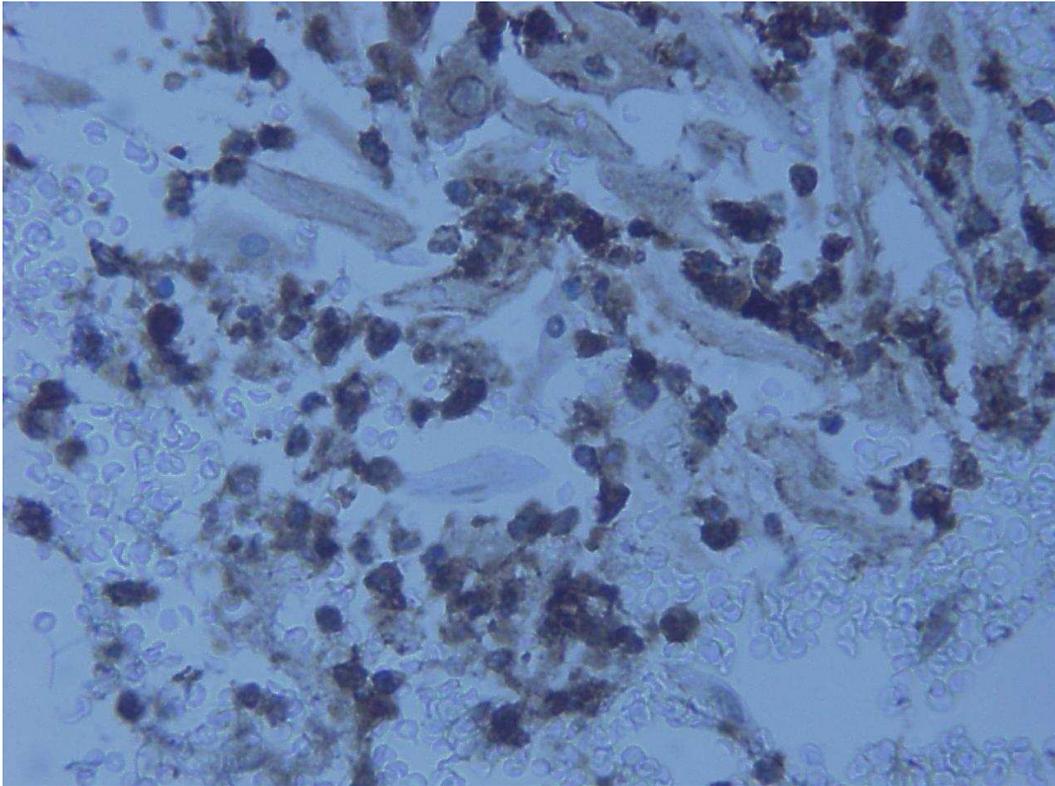
**Tabelle 2:** Arithmetische Mittel der absoluten Häufigkeit und relative Häufigkeit CD45 RO(+)-Zellen (oberer Wert) mit Standardabweichung (unterer Wert)

In Abb. 5 sind wenige locker verstreute angefärbte Memory-T-Zellen im Präparat zu erkennen. Abb. 6 hingegen zeigt ein fokales Infiltrat stark positiv gefärbter CD45 RO-Zellen im chronisch osteomyelitischen Gewebe.

Spezifisch durch den Antikörper CD45 RO markierte Zellen zeigen generell eine auf die Zellmembran beschränkte Färbung.



**Abbildung 5:** CD45 RO(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung



**Abbildung 6:** CD45 RO(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung

### 4.2.2.3 CD8(+)-Zellen

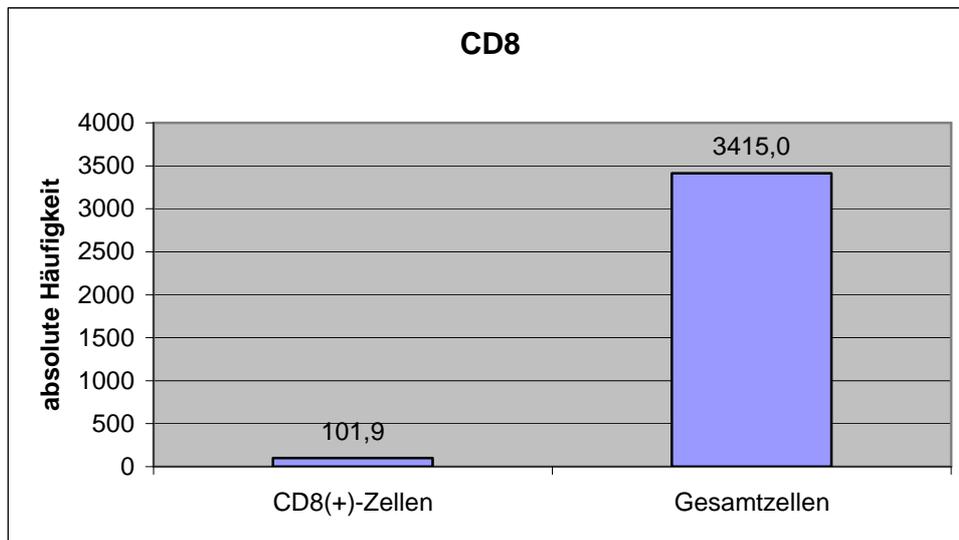
CD8(+)-Zellen konnten bei 14 der 15 Patienten nachgewiesen werden.

Die Auswertung ergab eine relative Expressions-Häufigkeit von 3,0% mit einer Standardabweichung von  $\pm 2,1\%$ .

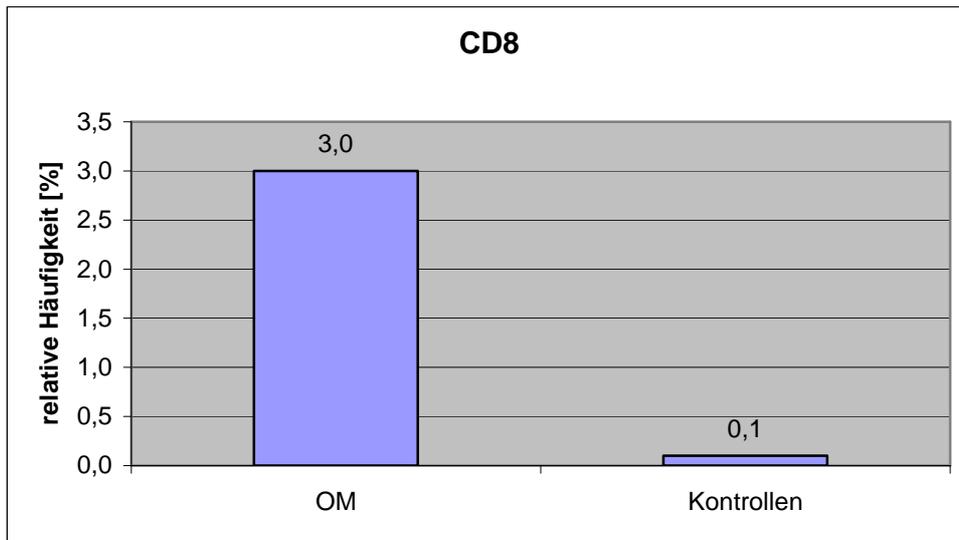
Der Median betrug 2,6% mit Extremwerten zwischen minimal 0% und maximal 6,5%.

In Graph. 9 ist die Auswertung der CD8-positiven Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl veranschaulicht. Im Mittel  $101,9 \pm 106,3$  Zellen ( $3,0\% \pm 2,1\%$ ) von im Mittel  $3415,0 \pm 2164,5$  Zellen/Proben exprimierten den Marker CD8 (Graph. 9, Tab. 3).

Die Auswertung der Proben des gesunden Gewebes ergab mit  $0,1\% \pm 0,1\%$  eine deutlich geringere relative Expressionshäufigkeit des Markers CD8 (Graph. 10, Tab. 3).



**Graphik 9:** Darstellung der arithmetischen Mittel der absoluten Häufigkeit CD8(+)-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl



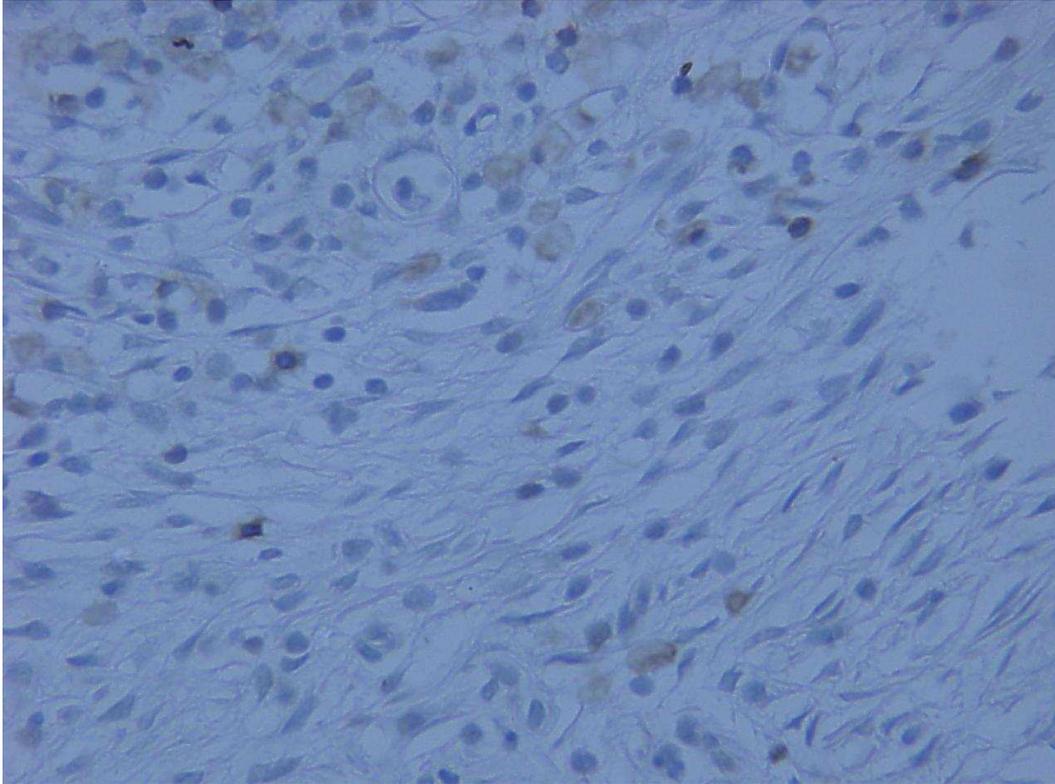
**Graphik 10:** Darstellung der relativen Häufigkeit der CD8-Expression im osteomyelitischen Gewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe

CD8	absolute Häufigkeit		relative Häufigkeit
	[in pos. Zellen/Probe]	[in Gesamtzellen/Probe]	[in % markierte Zellen]
OM	101,9	3415,0	3,0
	106,3	2164,5	2,1
Kontrollen	0,5	874,0	0,1
	0,5	533,3	0,1

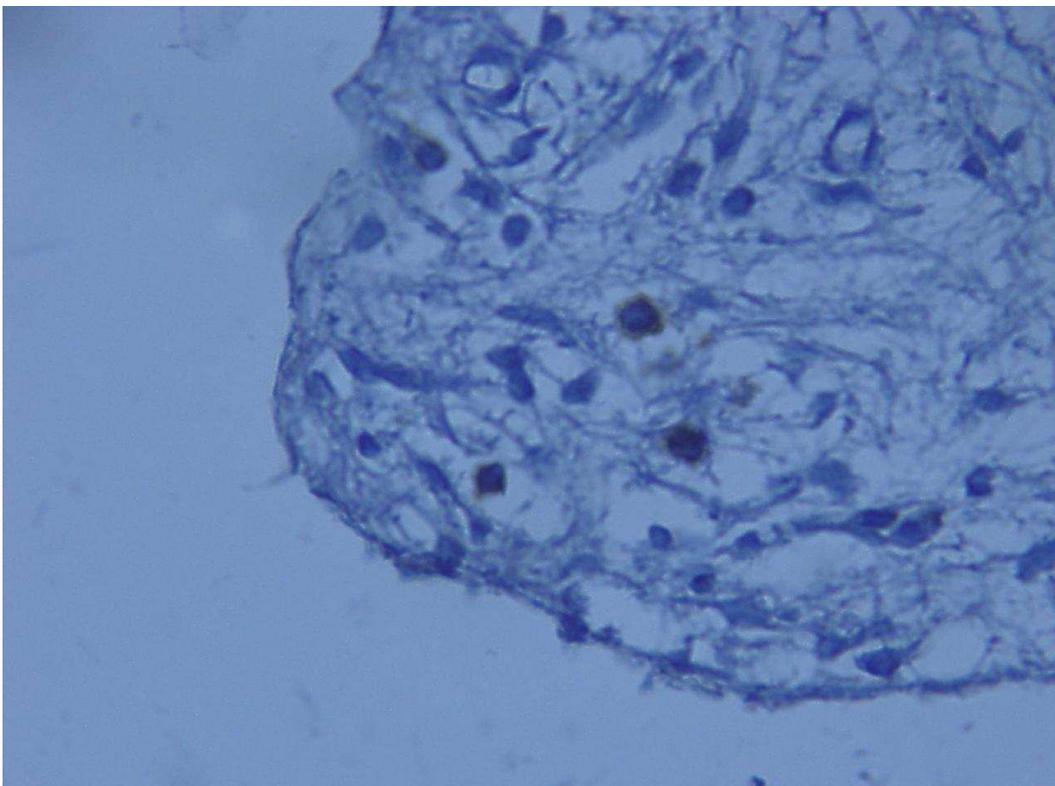
**Tabelle 3:** Arithmetische Mittel der absoluten Häufigkeit und relative Häufigkeit CD8(+)- Zellen (oberer Wert) mit Standardabweichung (unterer Wert)

Abb. 7 zeigt vereinzelt stark positiv angefärbte zytotoxische/Suppressor-T-Zellen im Präparat, was den geringen Anteil CD8(+)-Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl im osteomyelitischen Knochengewebe widerspiegelt (Graph. 9).

Durch den Antikörper markierte Zellen zeigen eine auf die Oberflächenmembran beschränkte Färbung, die bei 400-facher Vergrößerung einer markierten Zelle gut zu erkennen ist (Abb. 8).



**Abbildung 7:** CD8(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung



**Abbildung 8:** CD8(+)-Zellen, 400-fache Vergrößerung

### 4.2.2.4 CD68(+)-Zellen

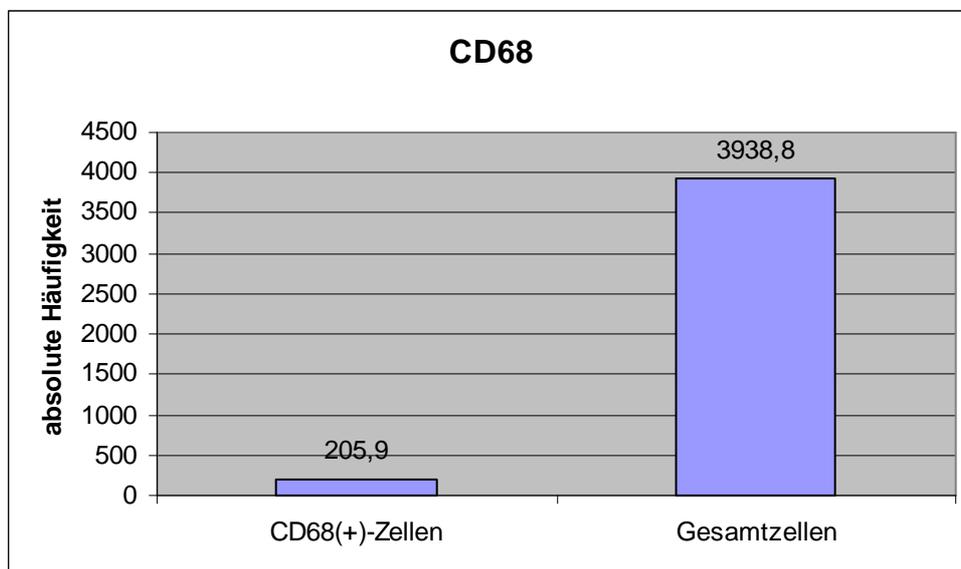
CD68(+)-Zellen konnten bei 14 von 15 der an der Kieferosteomyelitis erkrankten Personen in Gewebeschnitten nachgewiesen werden.

Die relative Häufigkeit der CD68-Expression betrug  $5,2\% \pm 3,4\%$  (Tab. 4).

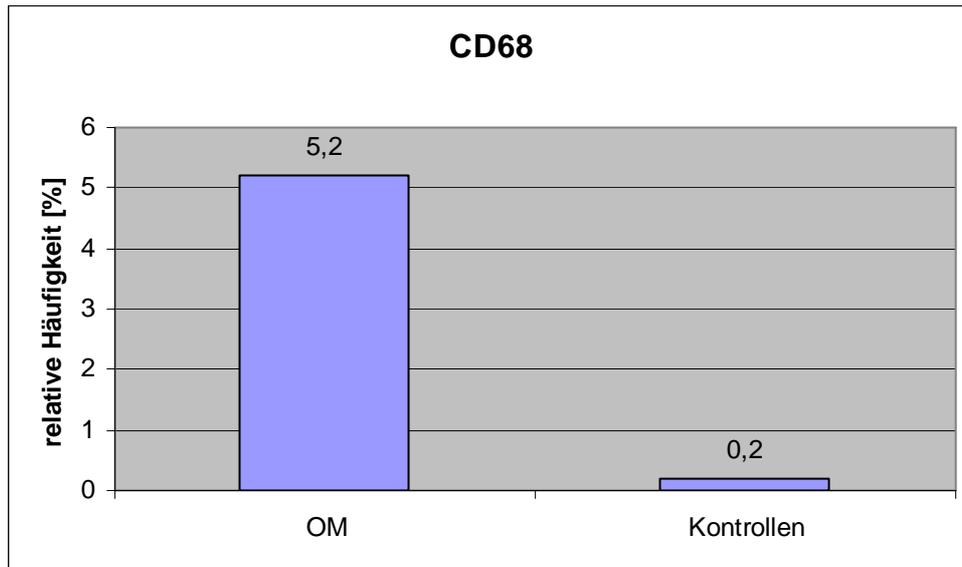
Der Median lag bei 4,6% mit einem Minimum bei 0% und einem Maximum bei 13,3%.

Bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde der Mittelwert CD68(+)-Zellen dem arithmetischen Mittel der Gesamtzellzahl/Proben gegenübergestellt. Von im Mittel  $3938,8 \pm 2405,8$  Zellen/Proben waren  $205,9 \pm 140,5$  Zellen CD68-positiv (Tab. 4, Graph. 11).

Die Ergebnisse der Auswertung der Kontrollpräparate wurden diesen in Graph. 12 gegenübergestellt. Im Vergleich zum osteomyelitischen Knochengewebe ergab die Auswertung der Kontrollen mit einem relativen Anteil von  $0,2\% \pm 0,4\%$  CD68(+)-Zellen/Proben eine signifikant geringere Expressionshäufigkeit (Graph.12, Tab. 4).



**Graphik 11:** Darstellung der arithmetischen Mittel der absoluten Häufigkeit CD68(+)-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl



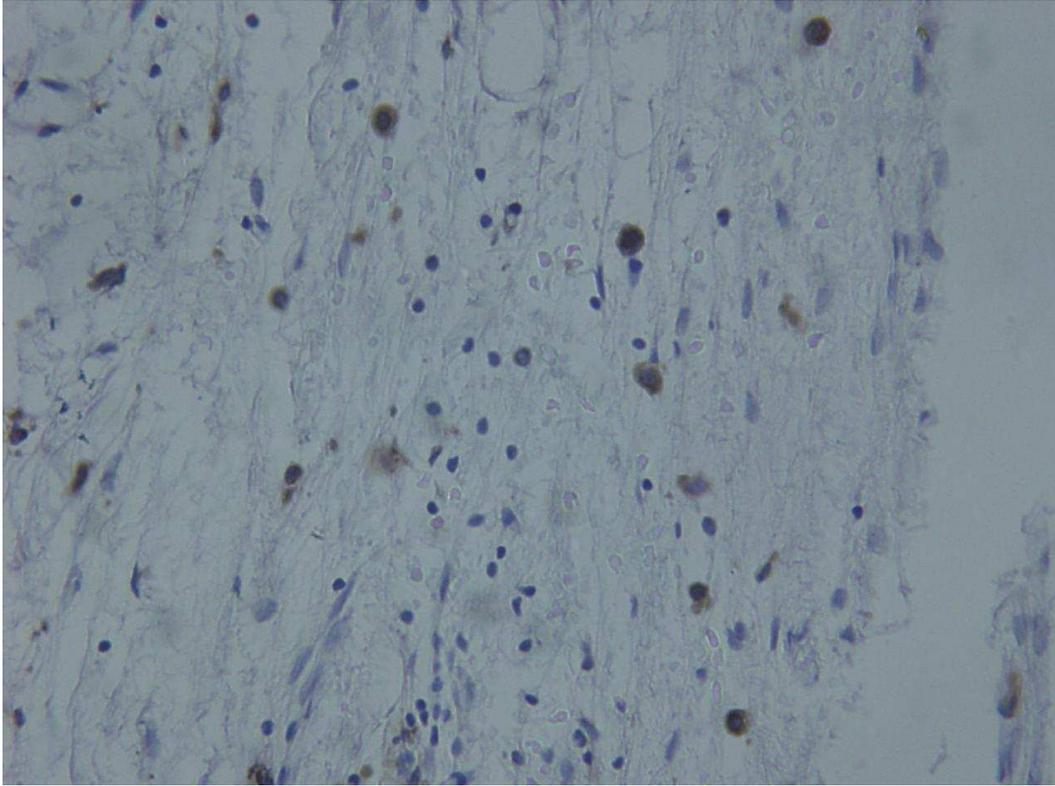
**Graphik 12:** Darstellung der relativen Häufigkeit der CD68-Expression im osteomyelitischen Gewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe

CD68	absolute Häufigkeit		relative Häufigkeit
	[in pos. Zellen/Probe]	[in Gesamtzellen/Probe]	[in % markierte Zellen]
OM	205,9	3938,8	5,2
	140,5	2405,8	3,4
Kontrollen	1,5	688,2	0,2
	0,5	578,2	0,4

**Tabelle 4:** Arithmetische Mittel der absoluten Häufigkeit und relative Häufigkeit CD68(+)-Zellen (oberer Wert) mit Standardabweichung (unterer Wert)

Der Antikörper CD68 zeigt ein starkes Färbeverhalten in formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben.

Abb. 9 zeigt eine CD68-Expression im osteomyelitischen Knochengewebe. Vereinzelt Zellen sind stark positiv gefärbt.



**Abbildung 9:** CD68(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung

### 4.2.3 Zusammenfassende Darstellung der immunhistologischen Befunde

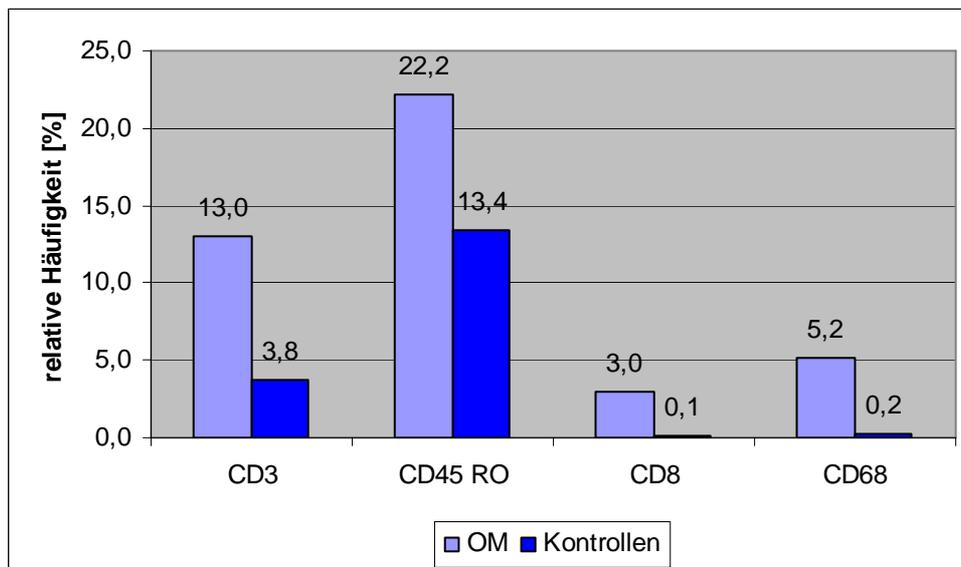
Alle verwendeten Antikörper konnten bei den an der Kieferosteomyelitis erkrankten Patienten immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Der höchste prozentuale Anteil positiver Zellen an der Gesamtzellzahl wurde bei der Auswertung der Proben unter Verwendung des Antikörpers CD45 RO mit 22,2% erreicht, gefolgt von CD3(+)-Zellen mit einer relativen Häufigkeit von 13,0%.

Eine geringere relative Expressionshäufigkeit zeigte sich bei der Auswertung der CD8-behandelten Proben mit 3,0% und mit 5,2% unter Verwendung des Antikörpers CD68.

Im Vergleich mit den Ergebnissen der Gewebeproben der Kontrollgruppe zeigte sich eine deutlich höhere relative Expressionshäufigkeit aller verwendeten Antikörper im osteomyelitischen Knochengewebe.

Bei der Auswertung der osteomyelitischen Proben im Vergleich mit der Kontrollgruppe ergaben sich folgende Ergebnisse (Graph.13).



**Graphik 13:** Veränderung der Zellsubpopulationen und absolute Differenzen der relativen Häufigkeiten im osteomyelitischen Gewebe und dem gesunden Gewebe

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Demographische Faktoren

In der vorliegenden Darstellung der retrospektiven Analyse demographischer Faktoren von 15 Patienten mit einer chronischen Osteomyelitis des Kiefers war eine breite Streuung des Manifestationsalters der Erkrankung zu beobachten.

Bei der Mehrzahl aller betroffenen Patienten, deren Daten in die Analyse einbezogen worden waren, handelte es sich um Patienten in der 4.–7. Lebensdekade, mit Ausnahme einer 20-jährigen Patientin. Nahezu 2/3 der erkrankten Patienten waren männlich und durchschnittlich 54,6 Jahre alt.

Die Manifestation der Kieferosteomyelitis zeigt auch in der Literatur eine hohe Variabilität bezüglich der Altersverteilung. Die dokumentierten Fälle streuen zwischen 3 Monaten und 83 Jahren [2, 30], wobei meist Daten Erwachsener veröffentlicht wurden [26].

„Die Osteomyelitis der cranialen Knochen ist sehr selten und kann typischerweise in der 2. Lebensdekade beobachtet werden“ [39]. Speziell die chronisch rekurrende multifokale Osteomyelitis mit Mandibulabeteiligung manifestiert sich hauptsächlich im Kindes- und Jugendalter [85]. Einige Autoren berichteten von Fällen, in denen das jüngste Kind 4 Jahre und das älteste Kind 13 Jahre alt war [37, 64, 65].

Adekeye et al. [2] unterschieden bezüglich des Durchschnittsalters der erkrankten Personen zwischen Maxilla (Mittel: 10 Jahre) und Mandibula (Mittel: 25,5 Jahre).

Dahingegen wurden in Studien anderer Autoren deutlich höhere Altersdurchschnittswerte dokumentiert, die von 42,5 – 62 Jahre reichten [12, 30, 79, 83].

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigt sich in der Literatur ebenfalls eine hohe Variabilität bezüglich der Geschlechterverteilung.

Wannfors et al. [83] berichteten von Fällen chronischer Osteomyelitis der Kiefer, bei denen Männer wie Frauen gleichermaßen repräsentiert waren, wohingegen

Untersuchungen von Heggie et al. [31] ausschließlich Daten weiblicher Patientinnen zugrunde lagen.

Van Merkesteyn et al. [79] präsentierten in ihrer Studie über die diffus sklerosierende Osteomyelitis der Mandibula ebenfalls Daten von gleichwertiger Geschlechterverteilung.

Andere Autoren hingegen berichteten bei der Erkrankung an der chronisch rekurrierenden Osteomyelitis der Mandibula (CRMO) von einer Dominanz des weiblichen Geschlechts (2:1) [85, 92]. Auch in der Studie von Huber et al. [37] waren annähernd 5 mal so viele Frauen wie Männer betroffen, wohingegen in der Studie von Harris [30] doppelt so viele Männer wie Frauen an der chronischen mandibulären Osteomyelitis erkrankt waren.

### 5.2 Lokalisation

In der vorliegenden retrospektiven Analyse wurde bei der Manifestation der chronischen Osteomyelitis zwischen Mandibula- und Maxillabeteiligung unterschieden.

In 93,3% der Fälle handelte es sich um eine osteomyelitische Läsion der Mandibula.

In der Literatur gilt die Mandibula als der bei weitem am häufigsten betroffene Knochen in der maxillofacialen Region [26, 40, 91].

Die Osteomyelitis der Maxilla ist sehr selten [2], was zweifelsfrei auf den dünnen kortikalen Knochen und die exzellente kollaterale Blutversorgung zurückzuführen sein dürfte [44, 2].

Adekeye et al. [2] berichteten in ihrer Arbeit über eine Studie von Bradley (1975), der im Zuge seiner Studien von Carotis-Angiogrammen zu dem Ergebnis kam, dass die Maxilla im Gegensatz zur Mandibula über ein gutes vaskuläres Netzwerk verfügt, wohingegen die inferiore Arterie der Mandibula bei über 40-Jährigen häufig verstopft ist.

Neben anderen lokalen Faktoren wie Mundhöhlenkrebs, akute ulzerative Gingivitis und odontogenen Infektionen, ist es begründbar anzunehmen, dass ein zusätzlicher

Rückgang der Blutversorgung der Maxilla und möglicherweise der Mandibula, als möglicher Faktor bezüglich der Prävalenz einer Osteomyelitis gesehen werden kann [2]. Die OK-Osteomyelitis kommt gesondert bei Erwachsenen, typischerweise in der 2. Lebensdekade, in Betracht und betrifft meistens Neugeborene zwischen 0 und 9 Monaten [39].

Nach Kaufmann [49] kommen die seltenen OK-Osteomyelitiden fast nur bei Kindern vor, wohingegen Adekeye et al. [2] in ihrer Studie über Daten von 35 Patienten (24,82%) im Alter zwischen 3 Monaten und 45 Jahren mit maxillärer Osteomyelitis verfügten.

In mehr als 2/3 der Analyse zugrunde liegenden Fällen war der Kiefer rechtsseitig und in 93,3% der Fälle unilateral betroffen. Lediglich eine Patientin zeigte eine bilaterale Beteiligung der Mandibula.

Die Variabilität der Seitenbeteiligung erlaubt keine Rückschlüsse bezüglich der Prävalenz der Lokalisation. Auch in der Literatur ist bezüglich der Lokalisation rechts- bzw. linksseitig eine variable Verteilung zu beobachten. So zeigen die Untersuchungsergebnisse von Wannfors et al. [83] eine nahezu gleiche quantitative unilaterale rechts- bzw. linksseitige Beteiligung des Kiefers und einen geringe Anteil bilateral involvierter Kiefer (16%).

In der Darstellung von van Merkesteyn et al. [79] ist die Mandibula in 40,7% der Fälle rechtsseitig betroffen, wobei die bilaterale Beteiligung der Mandibula mit 33,3% als verhältnismässig häufig erscheint.

### 5.3 Mögliche ätiologische Faktoren

Es sind wahrscheinlich zahlreiche Faktoren für die Pathogenese einer Osteomyelitis verantwortlich [69].

Im Rahmen der Aktenanalyse konnten 3 mögliche ätiologische Faktoren, die im individuellen Fall zu einer Prädisposition der Entwicklung einer Osteomyelitis geführt haben mögen, in Betracht gezogen werden.

In absteigender Prävalenz beinhalten diese Z.n. Tumor und Radiatio (40,0%), Z.n. Zahnextraktion (33,3%) und Z.n. Trauma (6,7%). In 20,0% der Fälle ließen sich nach Aktenanalyse keine Rückschlüsse auf mögliche ätiologische Faktoren ziehen.

### 5.3.1 Entwicklung einer Osteomyelitis nach Zahnextraktion

33,3% der betroffenen Patienten mit einem Altersmedian bei 45 Jahren entwickelten eine Kieferosteomyelitis nach vorausgegangener Zahnextraktion (Gruppe 1).

In der Literatur wird die Zahnextraktion als einer der prädisponierenden lokalen Umstände, die zur Entwicklung einer Osteomyelitis führen, angesehen [2, 26, 49, 83]. Als mögliche Ursache wird eine bakterielle Kontamination des Wundgebietes während der Zahnextraktion oder eine hämatogene Aussaat durch den Extraktionsvorgang angenommen [49]. Dabei gibt es Fallberichte über das Auftreten der Erkrankung nach Extraktion asymptomatischer [80] sowie beherdeter Zähne [49].

Insbesondere bei radiierten Patienten spielen Heilungsvorgänge eine wichtige Rolle.

Bagan et al. [6] und Marx [58] dokumentierten einen hohen Prozentsatz (70,0-77,7%) radiierter Patienten, die eine Osteonekrose nach Zahnextraktionen entwickelten.

Die Infektion des Knochens mag durch dessen Exposition der oralen mikrobiellen Flora hervorgerufen werden, so dass der Knochen durch die Entstehung eines sauren, entzündlichen Milieus außerstande ist zu heilen [5,6].

Kaufmann et al. [49] und Wächter et al. [80] diskutierten im Zusammenhang mit einer Kondylusosteomyelitis nach Zahnextraktion die Lokalanästhesie als zusätzlichen ursächlichen Faktor, bzw. eine lokalisierte Osteomyelitis nach Mandibularisanästhesie. Es ist im Einzelfall sicherlich schwierig zu eruieren, ob der Extraktionsvorgang bzw. die durch die Extraktion verursachte Kontamination des Wundgebietes, eine durch Lokalanästhesie verursachte Keiminokulation oder eine Kombination dieser Faktoren vorliegt [49].

### 5.3.2 Entwicklung einer Osteomyelitis nach Tumor und Radiatio

Der Gruppe 2 zugehörige Personen sind ausschließlich Männer höheren Alters (Median 65 Jahre).

Ursprünglich wurden Knocheninfektionen post radiationem als Untergruppe der Osteomyelitis klassifiziert, die sich lediglich durch das Auftreten nach Radiatio unterschieden [12].

Heute ist die Osteoradionekrose (ORN) beweisgültig als strahlen-induzierte avaskuläre Knochennekrose identifiziert und sollte daher nicht als Form der Osteomyelitis angesehen werden [26].

Derzeitige Untersuchungen zeigen, dass sich die Pathophysiologie der Osteomyelitis nach Radiatio bedeutend von der Osteomyelitis anderer Ursache unterscheidet.

Die mandibuläre Osteoradionekrose scheint in erster Linie ein Problem aufgrund von Hypozellularität und Hypovaskularisation zu sein. Dieser Prozess führt zu reduzierten Gewebereparaturmechanismen, so dass etwaige lokale Traumata oder Wunden inadäquat heilen [12] und so die tatsächliche Infektion bei einer ORN in der zusätzlichen Besiedlung gefährdeten Knochens bei einer nicht heilenden Wunde begründet ist [58].

Bünger [11] berichtete über eine ORN des Unterkiefers bei Patienten mit strahlentherapeutisch sowie chirurgisch-radiologisch behandelten Plattenepithelkarzinomen (PEC) der Mundhöhle und des Oropharynx. Als prädisponierenden Faktor für die Entwicklung einer Strahlenosteomyelitis im Unterkiefer sieht der Autor die hohe Strahlenbelastung des Knochens aufgrund seiner oberflächlichen Lage unter einer dünnen Weichteildecke sowie eine höhere Strahlenabsorption aufgrund der dichten Kompaktastruktur.

Durch eine latente Schädigung mit weitestgehendem Vitalitätsverlust des Knochens infolge der Einwirkung ionisierender Strahlen kann bei zusätzlicher bakterieller Infektion eine Osteoradionekrose entstehen [11].

Calhoun et al. [12] unterschieden bezüglich der Ätiologie traumatisch, odontogen, postoperativ und post radiationem, wobei letzteres als die bei weitem am häufigsten vermutete Ursache (46,7%) in Erwägung gezogen wurde. Die Autoren beobachteten bei

radiierten Patienten einen höheren Alterdurchschnitt sowie eine signifikante Häufung von Zigaretten- und Alkoholabusus.

Laut Widmark et al. [88] gehören ebenfalls ein hohes Alter, eine hohe Bestrahlungsdosis, eine Überfraktionierung und die Kombination von Tumorchirurgie, Chemotherapie und Zahnextraktion zu den Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoradionekrose.

Erst kürzlich wurde entdeckt, dass die Kiefernekrose mit Krebs-Chemotherapie assoziiert werden kann [58]. Badros et al. [5] beschrieben Fälle nach intravenöser Biphosphonattherapie und vermuten die Unterbrechung der intraossären Zirkulation und eine Hemmung der Osteoklasten-Aktivität als Ko-Faktoren, die bei invasiven dentalen Prozeduren mit Entwicklung eines sauren, entzündlichen Milieus die Manifestation einer lokalisierten Osteomyelitis begünstigen.

Nach Marx 2003 [58] ist die Behandlung mit Biphosphonaten direkt für die Osteonekrose verantwortlich.

Aktuelle Untersuchungen belegen, dass in Deutschland pro Woche drei Fälle registriert werden, die unter Biphosphonattherapie eine ossäre Kiefernekrose entwickelten. Es scheint, als seien zumeist weibliche Patientinnen mit einem Mammakarzinom betroffen, bei denen sich ein bis zwei Jahre nach erstmaliger intravenöser Biphosphonattherapie insbesondere im Zusammenhang mit einer Zahnextraktion eine Kiefernekrose manifestierte [67].

Einer der Patienten nach Tumor und Radiatio litt zudem an Diabetes mellitus, was in der Literatur als zusätzlich prädisponierender systemischer Risikofaktor für die Entwicklung einer Knocheninfektion gesehen wird.

Zahlreiche Autoren heben Diabetes mellitus als endokrine Funktionsstörung und systemischen Faktor hervor, der die Immunabwehr, die Metabolisierung und die lokale Vaskularisation beeinträchtigt [7, 12, 38, 82].

Nach Calhoun et al. [12] werden neben Diabetes mellitus auch Hypertension und Atherosklerose als medizinische Ko-Faktoren mit Osteomyelitis assoziiert.

Während andere Autoren über den Zusammenhang weiterer systemischer prädisponierender Faktoren wie Mangelernährung, Malaria, Sichelzellanämie, akut

ausbrechendes Fieber und Masern [2], sowie Osteopetrose [44], SC- und S-Thalassämie [82], renales oder hepatisches Versagen, Diabetes mellitus, chronische Hypoxie, Immunsuppression, maligne Tumore, Altersextreme, Autoimmunerkrankung, Tabak- und Alkoholabusus [38] mit der Entwicklung einer Knocheninfektion berichteten, erschien das in diese Arbeit einbezogene Patientenkollektiv vorwiegend in einem guten allgemeinen Gesundheitszustand. Es wurden keine prädisponierenden Faktoren gefunden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund mangelhafter Dokumentation der Anamnese in den Krankenakten, nicht doch bei einigen Patienten prädisponierende Faktoren vorlagen.

### 5.3.3 Entwicklung einer Osteomyelitis nach Trauma

Eine weitere Patientin des untersuchten Patientenkollektivs entwickelte eine Osteomyelitis nach Trauma (Gruppe 3).

Die Patientin stürzte im Alter von 7 Jahren mit dem Fahrrad. Bedauerlicherweise sind die Unfallfolgen insbesondere im Hinblick auf eine Traumatisierung des Kiefers nicht genauer dokumentiert. Es wird über rezidivierende Schmerzen und Schwellungen über einen Zeitraum von 13 Jahren berichtet. So kann nur angenommen werden, dass ein Zusammenhang mit dem Fahrradsturz und der Diagnose der mandibulären Kieferosteomyelitis im Alter von 20 Jahren besteht.

Es ist fraglich, ob ein Trauma ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Osteomyelitis oder, ob eine Traumapredisposition eine Komplikation des bereits infizierten und somit beeinträchtigten Knochens ist.

Das Risiko der Osteomyelitis ist bei direkter Inokulation in Form eines penetrierenden Traumas mit Entwicklung einer offenen oder zusammengesetzten Fraktur beträchtlich. Sogar wenn ein Trauma zu einfachen, geschlossenen Frakturen führt, gilt die offene Reposition durch einen chirurgischen Eingriff als signifikanter Risikofaktor [82].

### 5.3.4 Entwicklung einer Osteomyelitis unklarer Ätiologie

20,0% der erfassten Patienten entwickelten eine Osteomyelitis unklarer Ätiologie (Gruppe 4).

Die Ätiologie und Pathogenese der chronischen Osteomyelitis der Kiefer sind nicht vollständig geklärt [83].

In weiteren frühen Untersuchungen wurden einige Fälle dokumentiert, die aufgrund unzulänglicher Informationen in den Unterlagen (15,6% [2]) oder ohne jeglichen Hinweis auf einen schlechten Gesundheitszustand und prädisponierende Faktoren [7, 26, 83] eine Osteomyelitis entwickelten.

Zebedin et al. [92] diskutierten in ihrer Studie im Zusammenhang mit der chronisch rekurrenden multifokalen Osteomyelitis (CRMO) des Unterkiefers Erreger niedriger Virulenz bei abgeschwächtem Organismus, Autoimmunprozesse sowie eine genetische Prädisposition als pathogene Mechanismen, die in der Ätiologie von Bedeutung sein könnten.

Auch Ylikontiola et al. [90] vermuten, dass bei der chronisch sklerosierenden Osteomyelitis (CDSO) der Mandibula hereditäre Faktoren eine signifikante Rolle spielen und Heggie et al. [31] wiederum halten eine hyperaktive Immunantwort bei der juvenilen multifokalen Osteomyelitis für einen wahrscheinlichen ätiologischen Faktor.

## 5.4 Immunkompetente Zellen

Es gibt überraschend wenige Studien über die Immunantwort bei der Osteomyelitis [8]. Bei einem Großteil der verfügbaren Studien über die chronische Osteomyelitis wurde die systemische Immunität untersucht. Somit sind Studien, die über die lokale Immunität bei der chronischen Osteomyelitis Aufschluss geben besonders selten.

Die Gesamtpopulation der Lymphozyten im gesunden Knochenmark wird in der Literatur mit einer auffallend hohen Schwankungsbreite beschrieben. Der relative Anteil in den paraffineingebetteten Knochenmarksschnitten variiert zwischen 1-5% bis zu 30% [36, 76].

Dies mag durch eine veränderte antigene Reaktion während der Formalinfixierung aufgrund von Kreuzreaktionen von Proteinen [56] oder durch eine Beeinflussung der immunhistochemischen Färbeintensität durch die Dekalzifizierungs-Prozedur, bedingt sein [56, 76].

Außerdem spielt die Technik der Probengewinnung eine bedeutende Rolle. So sind Marksaspirate häufig mit peripherem Blut kontaminiert, so dass für T-Zellen im Knochenmarksaspirat mit 46% deutlich höhere Werte als bei Biopsien (23%) dokumentiert wurden [14].

### 5.4.1 Kontrollen

Bei den Kontrollfällen (n=2) konnten CD3(+)-, CD8(+)- und CD68(+)-Zellen vereinzelt immunhistochemisch nachgewiesen werden. Lediglich in einem Fall waren fokale lymphoide Infiltrate CD45 RO(+)-Zellen nachweisbar.

Der relative Anteil **CD3(+)**-Zellen an der Gesamtzellzahl betrug  $3,8\% \pm 3,1\%$ . Diese Werte entsprechen etwa den Ergebnissen von Loyson et al. [56], die die relative Häufigkeit mit 5-10% in ihrer Studie dokumentierten.

Chetty et al. [13] hingegen gaben in ihrer Studie mit 10-15% bis zu 20% deutlich höhere Werte für CD3(+)-Zellen an.

Für **CD45 RO(+)**-Lymphozyten wurde in unseren Untersuchungen ein relativer Anteil von  $13,4\% \pm 9,9\%$  ermittelt.

Dieser Wert entspricht in etwa den Ergebnissen anderer Autoren. So berichteten Loyson et al. [56] von 5-10% und Neidhart et al. [60] von  $11\% \pm 2\%$  CD45 RO(+)-Lymphozyten im gesunden Knochenmark. Shin et al. [76] hingegen dokumentierten mit 40-90% einen deutlich höheren Anteil CD45 RO(+)-Zellen.

Die große Schwankungsbreite der Untersuchungsergebnisse unterstützt die Annahme geringerer Spezifität des Antikörpers für die Evaluation lymphozytärer Infiltrate im Knochenmark [75].

Die Untersuchung mit dem Antikörper **CD8** ergab im Knochenmark der gesunden Kontrollen einen relativen Anteil von 0,1% +/-0,1%.

Loyson et al. [56] dokumentierten ebenfalls geringfügige CD8(+)-Zellen im gesunden Knochenmark von 0,5-1%, wohingegen Hilbe et al. [34] einen höheren Anteil von 3,2% fanden.

Für **CD68(+)**-Zellen wurde ein relativer Anteil von 0,2%  $\pm$  0,4% in den Proben der Kontrollgruppe ermittelt.

Die Werte unserer Untersuchungen unterscheiden sich deutlich von den Ergebnissen anderer Autoren. Josten et al. [42] ermittelten in der gesunden Spongiosa eine relative Häufigkeit von 4,26%.

Shin et al. [76] beschrieben in ihrer Studie eine positive Reaktion von durchschnittlich 39% lymphoider und myelo-monocytischer Populationen im gesunden Knochenmark.

Die in unserer Studie geringen Werte für CD68(+)-Zellen lassen Fehler bei der Dekalzifizierung oder der Formalinfixierung vermuten.

### 5.4.2 Osteomyelitische Knochengewebe

#### 5.4.2.1 CD3(+)-Zellen

In der vorliegenden Studie wurden mit Hilfe des für T-Zellen hochspezifischen Markers CD3 immunkompetente T-Zellen immunhistochemisch im Knochenmark nachgewiesen.

Im Vergleich mit den Proben von Gesunden zeigte sich bei den an einer Osteomyelitis Erkrankten mit 13,0% eine deutlich höhere CD3-Expression als bei den Gesunden mit 3,8%.

Auch Asensi-Alvarez et al. [4] studierten verschiedene Aspekte sowohl zellulärer als auch humoraler Immunität bei 19 Patienten mit einer chronischen Osteomyelitis und berichteten ebenfalls über signifikant höhere Werte für CD3(+)-Lymphozyten bei Erkrankten im Vergleich mit gesunden Kontrollen.

Wagner et al. [81] untersuchten lokal immunkompetente Zellen bei implantat-assoziiertes posttraumatisches Osteomyelitis und wiesen neben hauptsächlich PMNs auch CD3(+)-T-Lymphozyten als 2. größte Zellpopulation im betroffenen Knochen nach, wobei das Stadium der Immunantwort bzw. das Ausmaß der T-Zell-Aktivierung aufgrund mangelhafter Reproduzierbarkeit des Infektionszeitpunktes nicht eindeutig angegeben werden konnte. Somit ist nicht auszuschließen, dass es sich sowohl um akute als auch chronische Osteomyelitiden handelte [81].

Eine vergleichbare immunhistochemische Studie wurde von Girschick et. al. [28] an Knochenproben von an der CRMO Erkrankten durchgeführt. Sie wiesen Lymphozyten, Plasmazellen, neutrophilen Granulozyten und Histiozyten als typische Infiltrate nach und dokumentierten u.a. eine Dominanz von CD3(+)-, CD45 RO(+)- und CD8(+)-T-Zellen sowie CD68(+)-Makrophagen.

Auch Josten et al. [42] führten in ähnlicher Weise eine quantitative immunhistologische Analyse osteomyelitischen Knochengewebes durch und wiesen auf die Notwendigkeit einer Differenzierung zwischen der systemischen Immunität und der lokalen zellvermittelten Immunität am Ort der Entzündung hin, da die systemische Immunität lediglich eine indirekte Beurteilung der lokalen Verteilung immunkompetenter Zellen zulässt [25, 42]. Im Gegensatz zu unserer Studie beobachteten sie jedoch eine signifikante Reduktion des Anteils der Gesamt-T-Zellen von 11,34% im gesunden Gewebe auf 4,37% im erkrankten Knochengewebe und schlussfolgerten insgesamt eine lokale Depression der zellmedierten Immunität.

Andere Autoren führten in vitro-Untersuchungen durch und nehmen an, dass die Hemmung der T-Zellproliferation mit der Existenz endotoxin-stimulierter T-Suppressorzellen zusammenhängt [27, 61].

### 5.4.2.2 CD45 RO(+)-Zellen

Der relative Anteil von T-Memory-Zellen im Knochenmark der an der chronischen Osteomyelitis erkrankten Patienten war mit 22,2% gegenüber den Kontrollen (13,4%) deutlich erhöht.

Das Ergebnis ist vergleichbar mit einer Studie von Neidhart et al. [60], die den Aktivierungsstatus von T-Lymphozyten im peripheren Blut sowie im Knochenmark bei 27 Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen untersuchten. Sie beobachteten einen erhöhten Anteil aktivierter Memory-T-Zellen ( $21\% \pm 3\%$ ) im peripheren Blut der chronisch Erkrankten mit einer Anämie unbekannter Ätiologie im Vergleich mit Gesunden ( $11\% \pm 2\%$ ). In ihren Untersuchungen mit CD45 RO als Differenzierungsmarker und CD69 als Aktivierungsmarker wiesen sie im Knochenmark mehr aktivierte T-Zell-Phänotypen als ihre Pendants im peripheren Blut nach. Dies unterstützt die Annahme anderer Autoren [42], dass die Bestimmung der systemischen Immunität nur indirekte Schlüsse auf die Verteilung immunkompetenter Zellen am Ort der chronischen Entzündung zulässt.

Neben Neidhart et al. [60] wiesen auch Girschick et al. [28] u.a. eine Dominanz der CD45 RO(+)-Zellen im osteomyelitischen Knochengewebe nach.

### 5.4.2.3 CD8(+)-Zellen

Das Suppressor-Zellsystem sorgt für eine negative Rückkopplung im System und verhindert eine Endlos-Stimulation [71].

Der relative Anteil der zytotoxischen/Suppressor-T-Zellpopulation betrug 3,0% bei den an der chronischen Osteomyelitis Erkrankten und war im Gegensatz zu dem verschwindend geringen Anteil von 0,1% im Knochenmark der Kontrollen signifikant erhöht.

Diese Ergebnisse lassen auf eine Gegenregulation des Organismus schließen, die immunkompetente Lymphozyten hemmt und somit eine überschießende Immunreaktion am Ort der Entzündung verhindern soll.

Janossy et al. [41] beschrieben bei Untersuchungen zu T-Zell-Subpopulationen im menschlichen Knochenmark einen hohen Anteil zytotoxischer/Suppressor-T-Zellen gegenüber T-Helferzellen. Es wird vermutet, dass die T-Lymphozyten die Immunreaktion im Knochenmark als normale Bewohner überwachen [41].

Auch Wagner et al. [81] wiesen in ihrer Studie zur implantat-assoziierten posttraumatischen Osteomyelitis einen deutlich höheren relativen Anteil CD8(+)-Zellen im Vergleich mit T-Zellen im Blut nach und diskutierten lokal erzeugte Zytokine als mögliche Mediatoren für die Infiltration. Es wird postuliert, dass die Infektion und nicht die entzündliche Reaktion an sich die Aktivierung von T-Effektorzellen bewirken. Die Autoren beobachteten bei Erkrankten CD8(+)-Zellen als die in größter Anzahl vorkommenden T-Zellen, was sie annehmen ließ, dass es sich um CD8(+)-Zell-Clone infolge bakterieller Infektionen handelt und einer vorzugsweisen Infiltration des infizierten Knochens [81].

### 5.4.2.4 CD68(+)-Zellen

Der immunhistochemische Nachweis von CD68(+) - Zellen im osteomyelitischen Knochenmark ergab einen relativen Anteil von 5,2%, wohingegen der relative Anteil des mit Makrophagen assoziierten Markers im Knochengewebe von gesunden Kontrollpersonen mit 0,2% deutlich geringer ausfiel.

Hierholzer et al. [32] berichteten über eine Untersuchung der Phagozytoseaktivität bei Patienten mit akuter und chronischer posttraumatischer Osteomyelitis. Sie beobachteten eine deutliche Funktionseinschränkung phagozytischer Zellen bei der chronischen Osteomyelitis und vermuten einen durch phagozytoseinhibierende Faktoren ausgelösten Defekt, der beim Übergang von der akuten in die chronische Entzündung erworben wird.

Diese Beobachtungen sind vergleichbar mit Untersuchungen von Peters et al. [66], die in ihrer Studie ebenfalls von einer deutlichen Reduktion von Makrophagen-Subtypen bei etwa der Hälfte der an chronischer Osteomyelitis leidenden Patienten feststellten. Laut Peters et al. ist die Abwesenheit anti-inflammatorischer Makrophagen ein möglicher Faktor, der für die Persistenz der chronischen Osteomyelitis verantwortlich ist [66].

Auch Kataoka et al. [48] führten immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten osteomyelitischen Granulationsgewebes durch und erforschten die

Anwesenheit von CD68(+)-Zellen. Sie fanden osteoklasten-ähnliche MNCs (multinuclear cells) in der Umgebung von Sequestern, von denen die meisten CD68 exprimierten, wohingegen nur 10% der mononukleären Zellen CD68-positiv waren.

Dahingegen wiesen Josten et al. [42] in ihrer Studie einen signifikanten Anstieg der Makrophagen von 4,26% auf 15,08% im osteomyelitischen Knochengewebe nach. Es wird angenommen, dass die durch die Sequestrierung und Gewebseinschmelzungen entstehenden antigenwirksamen Partikel zu einer Stimulation des Phagozytosesystems und zu einer Kapazitätsausschöpfung der antigenpräsentierenden Zellen führt.

### 5.5 Zusammenfassende Beurteilung der immunhistologischen Ergebnisse

Die quantitative Auswertung der Knochenproben der an chronischer Osteomyelitis erkrankten Patienten im Vergleich mit Knochengewebeproben von Kontrollpersonen ergab in unseren Untersuchungen für alle verwendeten Marker eine deutlich erhöhte Expression im osteomyelitischen Knochengewebe.

T-Zellen, insbesondere T-Memory-Zellen, aber auch zytotoxische/Suppressor-T-Zellen, als T-Effektorzellsubpopulation, konnten als Vertreter des spezifischen zellulären Immunsystems im Vergleich mit gesunden Kontrollen mit einem deutlich höheren relativen Anteil in den Proben der Erkrankten nachgewiesen werden.

Ebenso konnten Makrophagen als Repräsentanten des zellulären unspezifischen Immunsystems quantitativ in den osteomyelitischen Knochenproben nachgewiesen werden. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang eine Reduktion der Makrophagen-Aktivität favorisiert [32, 48, 66], wohingegen in unseren Untersuchungen der relative Anteil der CD68(+)-Zellen mit 5,2% geringer erschien, als der relative Anteil der T-Zellpopulationen, jedoch deutlich über dem Anteil der Makrophagen in den Kontrollen lag. Da in der Literatur von deutlich höheren Werten für die Anzahl der Makrophagen im gesunden Knochenmark berichtet wird [76], kann insgesamt doch von einer Reduktion des Makrophagenanteils im osteomyelitischen Knochengewebe gesprochen werden. Diese Beobachtung deutet auf eine Repression des Makrophagenanteils aufgrund einer Funktionseinschränkung der phagozytierenden Zellen hin, die beim Übergang vom akuten ins chronische Stadium erworben wird [32]. Davies [21] hebt die Interaktionen der Makrophagen mit Zellen des Immunsystems hervor, einhergehend mit der Generierung von Mediatoren, die, wie vermutet wird, die Auflösung entzündlicher Läsionen unterstützen.

Das Literaturstudium erlaubte keine eindeutigen Schlüsse bezüglich der Aktivität des Immunsystems bei der chronischen Osteomyelitis.

Eine repräsentative Studie für eine hohe Variabilität ist eine Studie von Lob et al. [55]. Die Autoren dokumentierten sowohl eine hypoaktive als auch eine hyperaktive Immunantwort bei jeweils 50% der Fälle. Auch Seifert [74] untersuchte die Aktivität des Immunsystems bei der chronischen Osteomyelitis anderer Knochen als der

Mandibula. Er berichtete sowohl von Fällen mit einer gesteigerten humoralen Immunantwort, einer erhöhten zellulären Immunantwort, von einer abgeschwächten Immunantwort, als auch von einer normalen Immunantwort [74].

Bei Patienten mit einer hyperaktiven Immunantwort wurden die schwersten Verläufe der Erkrankung verzeichnet [70].

In unserer Studie war der relative Anteil der T-Effektorzellen im Vergleich mit den Kontrollen erhöht, dennoch dominierten Memory-T-Zellen mit einem relativen Anteil von 22,2% und der Anteil CD3(+)-Zellen mit 13,0% das pathohistologische Bild.

Diese Ergebnisse lassen eine gesteigerte und somit eine möglicherweise fehlgeleitete Immunantwort vermuten.

Die normalerweise eine Entzündung induzierenden Mediatoren werden durch Aktivator-Inhibitor-Systeme kontrolliert. Die Zellen und deren freigesetzte Mediatoren können neben dem Antigen auch das umgebende Gewebe schädigen, was besonders ausgeprägt ist, wenn die Effektormechanismen inadäquat aktiviert sind [52].

Im Rahmen einer chronischen Infektion wird eine Dysregulation dieses Systems, was zu einer Aufrechterhaltung der Entzündung führen könnte, in Betracht gezogen [52].

Auch andere Autoren schlussfolgerten in diesem Zusammenhang, dass bei der Osteomyelitis eine Abnormität bezüglich der Immunantwort vorliegt, die unzureichend verstanden ist [8, 57, 74, 77].

Nach Seifert [74] kann es durch das Freiwerden von Knochen im Rahmen der Entzündungsreaktion zu einer Autoimmunreaktion durch Antikörper-Bildung gegen körpereigenes Material kommen. Diese Annahme könnte eine Eskalation der immunpathologischen Mechanismen erklären.

Der Autor erwägt infolge seiner Forschungsergebnisse bezüglich einer gesteigerten humoralen wie zellulären Immunantwort bei der chronischen posttraumatischen Osteomyelitis eine Immundepression als Therapiekonzept. Er zieht eine aktive Desensibilisierung und eine passive Immunsuppression in Betracht.

Um die Interaktion zwischen den immunkompetenten Zellen bei der chronischen Osteomyelitis noch genauer zu verifizieren, wäre eine Quantifizierung von T-Helferzellen sinnvoll.

T-Helferzellen erkennen Antigene, die an antigenpräsentierende Zellen gebunden sind und werden somit aktiviert. Sie sezernieren Zytokine (Interleukin-2) und stimulieren T-Zellen zur Proliferation, B-Zellen und Makrophagen. Sie haben daher eine Schlüsselfunktion und verknüpfen die humoralen und spezifischen Abwehrmechanismen.

Um langwierige chronische Verläufe einer Kieferosteomyelitis zu vermeiden und eine Ausheilung der Entzündungsreaktion zu erzielen, sind die Diagnose der Erkrankung und das Verständnis der pathogenetischen Mechanismen von herausragender Bedeutung, um adäquat therapieren zu können. Maßnahmen zur Steigerung der Infektabwehr bei zu erwartender Infektion des Knochens oder z.B. eine Immunisierung, eine frühzeitige Antibiose und eine rechtzeitige chirurgische Intervention zu Beginn der Erkrankung, sind wünschenswerte Maßnahmen, einen circulus virtuosus zu verhindern.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die unspezifische und spezifische zelluläre lokale Immunität wurde bei 15 an der chronischen Kieferosteomyelitis erkrankten Patienten, unter Berücksichtigung demographischer Faktoren, Lokalisation des Krankheitsbildes und möglicher Erkrankungsursache, untersucht.

Es wurden Gewebeschnitte von Knochenbiopsaten angefertigt und mittels immunhistochemischer Färbeverfahren mit den spezifischen Oberflächenmarkern CD3, CD45 RO, CD8 und CD68 behandelt, um immunkompetente Zellen (T-Zellen, Memory-T-Zellen, zytotoxische-/Suppressor-T-Zellen und Makrophagen) quantitativ nachweisen zu können. Zum Vergleich wurden Proben gesunden Knochens von 3 Körperspendern herangezogen.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 11 Männern und 4 Frauen mit einem Altersdurchschnitt bei 51 Jahren zusammen. 14 Patienten entwickelten eine Osteomyelitis in der Mandibula, lediglich 1 Patient in der Maxilla. Als mögliche Erkrankungsursachen ließen sich Z.n. Extraktion (33,3%), Z.n. Trauma (6,7%) und Z.n. Tumor und Radiatio (40,0%) eruieren. Bei 20,0% der Erkrankten blieb die Ätiologie ungeklärt.

Immunkompetente Zellen konnten bei allen Patienten im osteomyelitischen Knochen immunhistochemisch mittels CD3, CD45 RO, CD8 und CD68 nachgewiesen werden.

Im Vergleich mit den Kontrollen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der T-Zellsubpopulationen und der Makrophagen, was auf eine Hyperreaktion des Immunsystems schließen lässt.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- [01] **Abdolvahab-Emminger, H** , Benz, C ; Diez, C ; Erens, O ; Hagemann, P ; Hanusch, B ; Höper, D ; Kia, T ; Lechner, B ; Ludwig, R ; Prvulovic, D ; Schaps, K-P ; Seibert-Alves, F ; Wertmann, A ; Wolff, A ; Ziemann, E :  
Biochemie:Immunsystem und zelluläre Immunität. In: Abdolvahab-Emminger, H (Hrsg.) : Physikum exakt : das gesamte Prüfungswissen in einem Band . 2. korrigierte Auflage . Stuttgart ; New York : Thieme , 1998 , 904-927
- [02] **Adekeye, EO**, Cornah, J : Osteomyelitis of the jaws: a review of 141 cases. *Br J Oral Maxillofac Surg.* (1985), 23(1), 24-35
- [03] **Adler, C-P** : Knochenkrankheiten : Diagnostik makroskop., histolog. und radiolog. Strukturveränderungen des Skeletts . Stuttgart ; New York : Thieme , 1983 , 101-127
- [04] **Asensi Alvarez, V**, Carton Sanchez, JA, Maradona Hidalgo, JA, Lopez-Larrea, C, Arribas Castrillo, JM : Immunological changes in chronic osteomyelitis. *An Med Interna* (1992), 9(11), 526-30
- [05] **Badros, A**, Weikel, D, Salama, A, Goloubeva, O, Schneider, A, Rapoport, A, Fenton, R, Gahres, N, Sausville, E, Ord, R, Meiller, T : Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *J Clin Oncol* (2006), 24(6), 945-52
- [06] **Bagan, JV**, Murillo, J, Jimenez, Y, Poveda, R, Milian MA, Sanchis JM, Silvestre, FJ, Scully C : Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. *J Oral Pathol Med* (2005), 34(2), 120-3

- [07] **Baltensperger, M**, Gratz, K, Bruder, E, Lebeda, R, Makek, M, Eyrich, G : Is primary chronic osteomyelitis a uniform disease? Proposal of a classification based on a retrospective analysis of patients treated in the past 30 years. *J Craniomaxillofac Surg* (2004), 32(1), 43-50
- [08] **Bansal, VP**, Mittal, PK, Ashokraj; G : Humoral immune responses in osteomyelitis. *Int Orthop* (1992), 16(3), 297-301
- [09] **Bartkowski, SB**, Zapala, J, Heczko, P, Szuta, M : Actinomycotic osteomyelitis of the mandible: review of 15 cases. *J Craniomaxillofac Surg* (1998), 26, 63-67
- [10] **Bourne, JA** : Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden . 4. Auflage . Hamburg : DAKO Diagnostika GmbH , 05/00
- [11] **Bünger, B** : Radiation-induced osteomyelitis of the mandible. *Laryngorhinootologie* (1990), 69(6), 316-9
- [12] **Calhoun KH**, Shapiro, RD, Stiernberg CM, Calhoun JH, Mader JT : Osteomyelitis of the mandible. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (1988), 114(10), 1157-62
- [13] **Chetty, R**, Echezarreta, G, Combley, M, Gatter, K : Immunhistochemistry in apparently normal bone marrow trephine specimens from patients with nodal follicular lymphoma. *J Clin Pathol* (1995), 48(11), 1035-8
- [14] **Clark, P**, Normansell, DE, Innes, DJ, Hess, CE : Lymphocyte subsets in normal bone marrow. *Blood* (1986), 67(6), 1600-6
- [15] **Cotta, H** : Orthopädie : Ein kurzgefaßtes Lehrbuch / Hinz, P ; Puhl, W . 4.Auflage. Stuttgart ; New York : Thieme , 1984 ,112-147

- [16] **DAKO A/S** : Specification Sheet. Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, Macrophage, Clone PG-M1, Code No. M0876, Lot 030. Edition 15.03.00 . Glostrup/Denmark
- [17] **DAKO A/S** : Specification Sheet. Monoclonal Mouse Anti-Human T Cell, CD45 RO, Clone UCHL1, Code No. M0742, Lot 078. Edition 21.07.98 . Glostrup/Denmark
- [18] **DakoCytomation Denmark A/S** : Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3, Code A0452. Edition 11.05.04. URL:  
[http://www.dakocytomation.de/prod\\_downloadpackageinsert.pdf?objectid=104438003](http://www.dakocytomation.de/prod_downloadpackageinsert.pdf?objectid=104438003)  
Letzter Zugriff am 06.04.2005.
- [19] **DakoCytomation Denmark A/S** : Monoclonal Mouse Anti Human CD8, Clone C8/144B, Code M7103. Edition 17.12.02. URL:  
[http://www.dakogmbh.de/prod\\_downloadpackageinsert.pdf?objectid=104424001](http://www.dakogmbh.de/prod_downloadpackageinsert.pdf?objectid=104424001)  
Letzter Zugriff am 24.08.2007
- [20] **DakoCytomation Denmark A/S** : Monoclonal Mouse Anti-Human CD45 RO, Clone UCHL1, Code M0742. Edition 20.01.03. URL:  
[http://www.dakocytomation.de/prod\\_downloadpackageinsert.pdf?objectid=102420001](http://www.dakocytomation.de/prod_downloadpackageinsert.pdf?objectid=102420001)  
Letzter Zugriff am 06.04.2005.
- [21] **Davies, P** : Essential role of macrophages in chronic inflammatory processes.  
*Schweiz Med Wochenschr* (1976), 106(40), 1351-4
- [22] **Deutsche Gesellschaft für Kinderchirurgie** : Leitlinie Osteomyelitis . *AWMF-Leitlinienregister* Nr. 006/079, 2002
- [23] **Diedrich, O, Kraft, CN, Sasse J, Zhou, H, Lüring C** : Die primär subakute hämatogene Osteomyelitis im Kindesalter. *Der Unfallchirurg* (2002), 105, 651-655

- [24] **Ehrenfeld, M**, Winter, W : Entzündungen des Knochens. In: Schwenzer, N, Ehrenfeld, M ( Hrsg. ): Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde . Bd.1 . : Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung . 3. Auflage . Stuttgart ; New York : Thieme , 2000 (Allgemeine Chirurgie) , 193-214
- [25] **Eibl, M**, Passl, R : Immunology and bacteriology of post-traumatic bone infections. *Hefte Unfallheilkd* (1982), 157, 48-79
- [26] **Eyrich, GK**, Baltensperger, MM, Bruder, E, Graetz, KW : Primary chronic osteomyelitis in childhood and adolescence: a retrospective analysis of 11 cases and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* (2003), 61(5), 561-73
- [27] **Faist, E**, Kupper, TS, Baker, CC, Chaudry, IH, Dwyer, J, Baue, AE : Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation. *Arch Surg* (1986), 121(9), 1000-5
- [28] **Girschick, HJ**, Huppertz, HI, Harmsen, D, Krauspe, R, Muller-Hermelink, HK, Papadopoulos, T : Chronic recurrent multifocal osteomyelitis in children: diagnostic value of histopathology and microbial testing. *Hum Pathol* (1999), 30(1), 59-65
- [29] **Gocke C**, Gocke, P, Kröger, K, Thelen, MH, Müller, RD, Langer, R, Rudofsky, G Osteitisdiagnostik in einem angiologischen Patientengut, Vergleich von röntgen- und nuklearmedizinischen Studien. *Röfo* (1998), 169(1), 58-62
- [30] **Harris, LF** : Chronic mandibular osteomyelitis. *South Med J* (1986), 79(6), 696-7
- [31] **Heggie, AA**, Shand, JM, Aldred, MJ, Talacko, AA : Juvenile mandibular chronic osteomyelitis: a distinct clinical entity. *Int J Oral Maxillofac Surg* (2003), 32(5), 459-68

- [32] **Hierholzer, S**, Hierholzer, G : Investigations of phagocytic activity in patients with posttraumatic osteomyelitis (author's transl). *Unfallheilkunde* (1979), 82(5), 192-199
- [33] **Hierholzer, S**, Hierholzer, G : Nonspecific and specific host defense mechanisms in chronic post-traumatic bone infections. *Unfallchirurg* (1985), 88(6), 255-62
- [34] **Hilbe, W**, Eisterer, W, Schmid, C, Starz, I, Silly, H, Duba, C, Ludescher, C, Thaler, J : Bone marrow lymphocyte subsets in myelodysplastic syndromes. *J Clin Pathol* (1994), 47(6), 505-7
- [35] **Holländer, Georg A.** : Immunologie / Barthlott, T., Keller, M.P., Krenger, W., Piali, L. . 1. Aufl. . München : Elsevier , 2006, 82-133
- [36] **Horny, HP**, Engst, U, Walz, RS, Kaiserling, E : In situ immunophenotyping of lymphocytes in human bone marrow: an immunohistochemical study. *Br J Haematol* (1989), 71(3), 313-21
- [37] **Huber, AM**, Lam PY, Duffy, CM, Yeung, RS, Ditchfield, M, Laxer, D, Cole, WG, Kerr Graham, H, Allen RC, Laxer, RM : Chronic recurrent multifocal osteomyelitis: clinical outcomes after more than five years of follow-up. *J Pediatr* (2002), 141(2), 198-203
- [38] **Hudson, JW** : Osteomyelitis of the jaws: a 50-year perspective. *J Oral Maxillofac Surg* (1993), 51(12), 1294-301
- [39] **Indrizzi, E**, Terenzi V, Renzi, G, Bonamini, M, Bartolazzi, A, Fini, G : The rare condition of maxillary osteomyelitis. *J Craniofac Surg* (2005), 16(5), 861-4
- [40] **Jacobsson, S**, Hollender, L : Treatment and prognosis of diffuse sclerosino osteomyelitis (DSO) of the mandibole. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* (1980), 49(1), 7-14

- [41] **Janossy, G**, Tidman, N, Papageorgiou, ES, Kung, PC, Goldstein, G : Distribution of T lymphocyte subsets in the human bone marrow and thymus: an analysis with monoclonal antibodies. *J Immunol* (1981), 126(4), 1608-13
- [42] **Josten, C**, Muhr, G, Griga, T : Quantitative immunohistological analysis of cell-mediated immunity in osteomyelitic bone tissue. *Unfallchirurg* (1990), 93(9), 426-30
- [43] **Jundt, G**, Jani, L : Primäre chronische Osteomyelitis. *Der Orthopäde* (1997), 26, 889-893
- [44] **Junquera, L**, Rodriguez-Recio, C, Villarreal, P, Garcia-Consuegra, L : Autosomal dominant osteopetrosis and maxillomandibular osteomyelitis. *Am J Otolaryngol* (2005), 26(4), 275-8
- [45] **Just, H-M** : Bakteriologie der Knocheninfektion. In: Schultheis, K-H, Rehm, KE, Ecke, E : Chirurgische Infektionen von Knochen, Gelenken und Weichteilen . Berlin ; New York : de Gruyter, 1991 , S. 9-14
- [46] **Kamran, D**, Muller, W, Peter, HH, Rieger, CL : Clinical and immunologic findings in BCG osteomyelitis. Clinical and immunologic findings in BCG osteomyelitis. *Monatsschr Kinderheilkd* (1982), 130(12), 899-904
- [47] **Kappeler, A** : Handout zur Blockveranstaltung 'Immunhistochemie', Pathologie-Block WS 2005/06. URL:  
[http://www.pathology.unibe.ch/Lehre/downloads/hdout\\_ihc\\_akappeler.PDF](http://www.pathology.unibe.ch/Lehre/downloads/hdout_ihc_akappeler.PDF) .  
Letzter Zugriff am 19.08.2007.
- [48] **Kataoka, M**, Torisu, T, Tsumura, H, Hirayama, T, Fujikawa, Y : Role of multinuclear cells in granulation tissue in osteomyelitis: immunohistochemistry in 66 patients. *Acta Orthop Scand* (2000), 71(4), 414-8

- [49] **Kaufmann, MG**, Obwegeser, JA, Eyrich, GK, Gratz, KW : Solitary abscessing osteomyelitis of the mandibular condyle. A rarity. *Mund Kiefer Gesichtschir* (2005), 9(4), 251-6
- [50] **Klümper, A** : Osteologie und Sporttraumatologie . Bd. 3 . Knochenerkrankungen . Freiburg : Verlag Johannes Krause , 2. Aufl. , 1994 , 102-133
- [51] **Köndell, PA**, Granström, M, Heimdahl, A, Möllby, R, Nord, CE : Experimental mandibular *Staphylococcus aureus* osteomyelitis; antibody response and treatment with dicloxacillin. *Int J Oral Maxillofac Surg* (1986), 15(5), 620-8
- [52] **Kramer, MD** : Immunologie und Immunpathologie . Stuttgart : Ferdinand Enke Verlag , 1997, 61-78
- [53] **Leonhardt, H** : Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen . Band 3 . 8. Auflage . Stuttgart ; New York : Thieme , 1990, 168-178
- [54] **Lew, DP**, Waldvogel, FA : Current Concepts: Osteomyelitis. *N Engl J Med* (1997), 336(14), 999-1007
- [55] **Lob, G**, Ring, J, Seifert, J, Probst, J, Brendel, W : Proceedings: Immunologic reactions in patients with chronic post-traumatic Osteomyelitis. *MMW Munch Med Wochenschr* (1975), 117(19), 417
- [56] **Loyson, SA**, Rademakers, LHPM, Joling, P, Vroom, TM, Van den Tweel, JG : Immunohistochemical analysis of decalcified paraffin-embedded human bone marrow biopsies with emphasis on MHC class I and CD34 expression. *Histopathology* (1997), 31(5), 412-9
- [57] **Malmström, M**, Fyhrquist, F, Kosunen, TU, Tasanen, A : Immunological features of patients with chronic sclerosing osteomyelitis of the mandible. *Int J Oral Surg* (1983), 12(1), 6-13

- [58] **Marx, RE** : Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* (2003), 61(9), 1115-7
- [59] **Nair, SP**, Meghji, S, Wilson, M, Reddi, K, White, P, Henderson, B : Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun* (1996), 64(7), 2371-80
- [60] **Neidhart, M**, Brühlmann, P, Gay, S., Michel, BA : Activation of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in bone marrow associated with reduced erythropoiesis in patients with chronic inflammation and anaemia. *Schweiz Med Wochenschr* (1998), 128(42), 1618-23
- [61] **Ninnemann, JL**, Stockland, AE, Condie, JT : Induction of prostaglandin synthesis-dependent suppressor cells with endotoxin: occurrence in patients with thermal injuries. *J Clin Immunol* (1983), 3(2), 142-50
- [62] **Norden, CW** : Lessons learned from animal models of Osteomyelitis. *Rev Infect Dis* (1988), 10, 103-110
- [63] **Nordin, U**, Wannfors, K, Colque-Navarro, P, Möllby, R, Heimdahl, A : Antibody response in patients with osteomyelitis of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (1995), 79(4), 429-35
- [64] **Otsuka, K**, Hamakawa, H, Kayahara, H, Tanioka, H : Chronic recurrent multifocal osteomyelitis involving the mandible in a 4-year-old girl: a case report and a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. (1999), 57(8), 1013-6
- [65] **Paim, LB**, Liphaut, BL, Rocha, AC, Castellanos, AL, Silva, CA : Chronic recurrent multifocal osteomyelitis of the mandible: report of three cases. *J Pediatr (Rio J)* (2003), 79(5), 467-70

- [66] **Peters, KM**, Koberg, K, Rosendahl, T, Schmutzler, W, Zwadlo-Klarwasser, G :  
Alteration in the pattern of macrophage subtypes in chronic osteomyelitis  
compared with acute joint infection. *Int Orthop* (1995), 19(3), 162-6
- [67] **Rabel, A** : Die Kieferhöhle und die Osteoporose. *Zahnärztliche Mitteilungen*  
(2007), 15, 46-48
- [68] **Rangne, A**, Ruud, A : Osteomyelitis of the jaws. *Int J Oral Surg* (1978), 7(6), 523-  
527
- [69] **Reck, SF**, Fielding, AF, Hess, DS : Osteomyelitis of the coronoid process  
secondary to chronic mandibular third molar pericoronitis. *J Oral Maxillofac  
Surg* (1991), 49(1), 89-90
- [70] **Ring, VJ**, Seifert, J, Probst, J, Brendel, W : Chronic posttraumatic Osteomyelitis.  
3. Immunopathological aspects. *Fortschr Med* (1976), 94(4), 211-4
- [71] **Schiebler, TH**, Schmidt, W, Zilles, K : Allgemeine Anatomie des Abwehrsystems.  
In: Anatomie . 8. Auflage . Berlin ; Heidelberg ; New York : Springer-Verlag ,  
1999 , 171-186
- [72] **Schultheis, K-H**, Ecke, E : Osteomyelitis - Ätiologie, Diagnostik, Therapie. In:  
Schultheis, K-H, Rehm, KE, Ecke, E : Chirurgische Infektionen von Knochen,  
Gelenken und Weichteilen . Berlin ; New York : de Gruyter, 1991 , 15-28
- [73] **Schwameis, E**, Abdolvahab, F, Wurnig, C : Osteomyelitis. Clinical aspects,  
diagnosis and therapy. *Radiologe* (1996), 36, 823-833
- [74] **Seifert, J** : Chronic post-traumatic osteomyelitis and its treatment. *Fortschr Med*  
(1977), 95(21), 1376-80

- [75] **Seligson, D**, Klemm, K : Adult posttraumatic osteomyelitis of the tibial diaphysis of the tibial shaft. *Clin Orthop Relat Res* (1999), 360, 30-6
- [76] **Shin, SS**, Sheibani, K, Kezirian, J, Nademanee, A, Forman, SJ, Lee, SK, Winberg, CD : Immunoarchitecture of Normal Human Bone Marrow: A Study of Frozen and Fixed Tissue Sections. *Hum Pathol* (1992), 23(6), 686-94
- [77] **Sistermann, R**, Mollenhoff, G, Walz, M, Josten, C, Muhr, G : A cellular quantitative immune deficiency in chronic post-traumatic osteomyelitis. *Unfallchirurg* (1992), 95(5), 254-8
- [78] **Tucker, KA**, Reilly, SS, Leslie, CS, Hudson, MC : Intracellular Staphylococcus aureus induces apoptosis in mouse osteoblasts. *FEMS Microbiology Letters* (2000), 86(2), 151-156
- [79] **van Merkesteyn, JP**, Groot, RH, Bras, J, McCarroll, RS, Bakker, DJ : Diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible: a new concept of its etiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* (1990), 70(4), 414-9
- [80] **Wächter, R**, Otten, J-E, Buitrago-Téllez, C, Schilli, W : Unterkieferosteomyelitis nach Mandibularisanästhesie. *Mund Kiefer GesichtsChir* (1998), 2, 39-41
- [81] **Wagner, C**, Heck, D, Lautenschläger, K, Iking-Konert, C, Heppert, V, Wentzensen, A, Hansch, GM : T lymphocytes in implant-associated posttraumatic osteomyelitis: Identification of cytotoxic T effector cells at the site of infection. *Shock* (2006), 25(3), 241-6
- [82] **Wald ER** : Risk factors for osteomyelitis. *Am J Med* (1985), 78(6B), 206-12
- [83] **Wannfors, K**, Hammarstrom, L : Infectious foci in chronic osteomyelitis of the jaws. *Int J Oral Surg* (1985), 14(6), 493-503

- [84] **Weihe, S** : Die chronisch rekurrende multifokale Osteomyelitis (CRMO) im Erwachsenenalter als seltene differentialdiagnostische Form einer Osteomyelitis mit Mandibulabeteiligung, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (2005)
- [85] **Weihe, S**, Eufinger, H, Terhaar, O, König, M, Machtens, E : Mandibular involvement in chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO) in adulthood. *Mund Kiefer Gesichtschir* (2000), 4(3), 187-92
- [86] **Weinstein, AJ** : Osteomyelitis: microbiologic, clinical, and therapeutic considerations. *Prim care* (1981), 8(4), 557-69
- [87] **Weiss, CH**, Jelkmann, W : Funktionen des Blutes. In: Schmidt, RF ; Thews, G (Hrsg.) : Physiologie des Menschen . 27. Auflage . Berlin ; Heidelberg : Springer Verlag , 1997 , 411-447
- [88] **Widmark, G**, Sagne, S, Heikel, P : Osteoradionecrosis of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* (1989), 18(5), 302-6
- [89] **Wünsch, PH**, Woltmann A : Knocheninfektion . pathologische Abläufe . In: Schultheis, K-H, Rehm, KE, Ecke, E : Chirurgische Infektionen von Knochen, Gelenken und Weichteilen . Berlin ; New York : de Gruyter, 1991 ,1-7
- [90] **Ylikontiola, L**, Altonen, M, Uhari, M, Tiilikainen, A, Oikarinen, K : Chronic sclerosing osteomyelitis of the mandible in monozygotic twins. *Int J Oral Maxillofac Surg* (1994), 23(6Pt1), 359-62
- [91] **Yoshiura, K**, Takahashi, H, Fujita, S, Okabe, H, Yamada, N : Radiological and Histological Study of Osteomyelitis of the Jaws : Correlation between Radiographik and Histological Patterns. *Oral Radiol* (1990), 6(2), 97-108
- [92] **Zebedin, D**, Fötter, R, Reittner, P, Preidler, KW, Mache, C, Szolar, DH : Chronic recurrent multifocal osteomyelitis of the lower jaw. *Rofa* (1998), 169(5), 551-4

- [93] **Zieger, B**, Elser, H, Tröger J : Osteomyelitis im Wachstumsalter. Bildgebende Diagnostik. *Der Orthopäde* (1997), 26(10), 820-9

## **8 DANKSAGUNG**

Ich danke Herrn Prof. J. Kleinheinz sehr herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und seine Unterstützung während der Erstellung dieser Dissertation.

Ein großer Dank an Frau K. Cebulla (MTA), Institut für Anatomie, die mir bei den immunhistochemischen Untersuchungen jederzeit sehr hilfreich zur Seite stand.

Mein Dank gilt Frau B. Strothbaum (MTA), Institut für Anatomie, durch deren sorgfältige Dokumentation der immunhistochemischen Färbeverfahren das Verständnis der Methodik erheblich erleichtert wurde.

Dankeschön meinem Bruder Gregor für seine Unterstützung bei der Formatierung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, durch deren Förderung und Unterstützung der erfolgreiche Abschluss des Studiums und der Promotion erst möglich war.

## **9 CURRICULUM VITAE**

---

## II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADO-Typ I/II	autosomal dominante Formen der Osteopetrose
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CDSO	Chronisch diffus sklerosierende multifokale Osteomyelitis
CRMO	Chronisch rekurrende multifokale Osteomyelitis
DAB	3, 3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
EDTA	Ethylen Diamin Tetra Acetat
et al.	et alerte
Graph.	Graphik
HRP	Horseradish Peroxidase
IgM	Immunglobulin M; Antikörperklasse
IgD	Immunglobulin D; Antikörperklasse
LSAB	labelled streptavidin-biotin technique; „markierte Streptavidin- Biotintechnik“
M	molar
m	molar
mM	millimolar
MHC	Major Histocompatibility Complex
n	Stichprobenumfang
No.	Nummer
Nr.	Nummer
OK	Oberkiefer
OM	Osteomyelitis
ORN	Osteoradionekrose

## Abkürzungsverzeichnis

---

PBS	Phosphate Buffered Saline; „Phosphat gepufferte Kochsalzlösung“
PMN	Polymorphonuclear leukocytes; Granulozyten
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
Tbc	Tuberkulose
TCR	T-cell-receptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UK	Unterkiefer
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

### III ABBILDUNGS – UND GRAPHIKVERZEICHNIS

Abbildung 1: Einteilung der Osteomyelitis nach Cotta.....	4
Abbildung 2: Enzym-vermittelte Darstellung von Antigen mittels der Avidin-Biotin- Methode nach Kappeler.....	19
Abbildung 3: CD3(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung.....	32
Abbildung 4: CD3(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung.....	33
Abbildung 5: CD45 RO(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung.....	35
Abbildung 6: CD45 RO(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung.....	36
Abbildung 7: CD8(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung.....	39
Abbildung 8: CD8(+)-Zellen, 400-fache Vergrößerung.....	39
Abbildung 9: CD68(+)-Zellen, 250-fache Vergrößerung .....	42
Graphik 1: Häufigkeitsverteilung des Geschlechts der Patient/innen bei Probenentnahme .....	25
Graphik 2: Altersverteilung der Patient/innen bei Probenentnahme .....	26
Graphik 3: Häufigkeitsverteilung der Lokalisation bei der Kiefer-OM .....	27
Graphik 4: Häufigkeitsverteilung der vermutlichen Ursache der Kiefer-OM.....	29
Graphik 5: Darstellung des arithmetischen Mittels der absoluten Häufigkeit CD3(+)- Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl .....	31
Graphik 6: Darstellung der relativen Häufigkeit der CD3-Expression im osteomyelitischen Gewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe .....	31
Graphik 7: Darstellung der arithmetischen Mittel der absoluten Häufigkeit CD45 RO(+)-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl .....	34
Graphik 8: Darstellung der relativen Häufigkeit der CD45 RO-Expression im osteomyelitischen Gewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe .....	34
Graphik 9: Darstellung der arithmetischen Mittel der absoluten Häufigkeit CD8(+)- Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl .....	37
Graphik 10: Darstellung der relativen Häufigkeit der CD8-Expression im osteomyelitischen Gewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe .....	38

Graphik 11: Darstellung der arithmetischen Mittel der absoluten Häufigkeit CD68(+)-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl .....	40
Graphik 12: Darstellung der relativen Häufigkeit der CD68-Expression im osteomyelitischen Gewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe .....	41
Graphik 13: Veränderung der Zellsubpopulationen und absolute Differenzen der relativen Häufigkeiten im osteomyelitischen Gewebe und dem gesunden Gewebe .....	43

## **IV TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Arithmetische Mittel der absoluten Häufigkeit und relative Häufigkeit CD3(+)-Zellen (oberer Wert) mit Standardabweichung (unterer Wert) .....	32
Tabelle 2: Arithmetische Mittel der absoluten Häufigkeit und relative Häufigkeit CD45 RO(+)-Zellen (oberer Wert) mit Standardabweichung (unterer Wert) .....	35
Tabelle 3: Arithmetische Mittel der absoluten Häufigkeit und relative Häufigkeit CD8(+)- Zellen (oberer Wert) mit Standardabweichung (unterer Wert) .....	38
Tabelle 4: Arithmetische Mittel der absoluten Häufigkeit und relative Häufigkeit CD68(+)-Zellen (oberer Wert) mit Standardabweichung (unterer Wert) .....	41

## V GERÄTE UND REAGENZIEN FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE

### Primärantikörper

Polyclonal Rabbit, Anti-Human CD3, Code-Nr. A 0452	DAKO, Hamburg
Monoclonal Mouse, Anti-Human CD45 RO, Clone UCHL1, Code-Nr. M 0742	DAKO, Hamburg
Monoclonal Mouse, Anti.Human CD8, Clone C8/144B, Code-Nr. M 7103	DAKO, Hamburg
Monoclonal Mouse, Anti-Human CD68, Macrophage, Clone PG-M1, Code-Nr. M 0876	DAKO, Hamburg

### Immunhistochemisches Färbeverfahren

Universal DakoCytomation LSAB® + Kit, Peroxidase (LSAB+Kit, HRP), Code K0679	DakoCorporation, Carpinteria, USA
---	--------------------------------------

### Software

UTHSCSA Image Tool Version 4.02	University of Texas, San Antonio
LUCIA NET 1.16.2	

### Reagenzien

Paraformaldehyd	..	Merck, Darmstadt
Paraffin1, 2, 3, 4 (DMSO)		Sherwood-Medical, St. Louis, USA
PBS-Puffer nach Sørensen		Merck, Darmstadt
EDTA		Serva, Heidelberg
Alkohol 100%, 96%, 90%, 70%, 50%		Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Aqua dest.		Zentralapotheke der Uniklinik Münster
Zedernholzöl		Merck, Ismaning
Hämatoxylin nach Meyer		Merck, Darmstadt
Tris-Puffer: Dako® PBS, Code-Nr. 3024		DAKO, Hamburg
Pronase: Dako Code-Nr. S 2013		DAKO, Hamburg
Hintergrundreduzierender Puffer, ChemMate™ Antibody Diluent, Dako Code-Nr. S 2022		DAKO, Hamburg
DAB-Substrat-Chromogenlösung, Dako Code-Nr. K 3468		DAKO, Hamburg

DePeX, Kat.Nr. 18243

SERVA, Heidelberg

### **Geräte**

Trockenschrank US/UL-Typ

Memmert,  
Schwabach

Wasserbad

Walter F. C.  
Ebel, Hamburg

Rotationsmikrotom

Reichert und Jung,  
Heidelberg

Lichtmikroskop

Zeiss, Jena

Digitalkamera

Sony Corporation,  
Tokio, Japan

### **Sonstiges**

Objektträger; Superfrost

DAKO, Hamburg

Deckgläser Typ 38116, 24x60

Menzel,  
Braunschweig

Probengefäße; Glasküvetten

Waldech