

Aus dem Pathologischen Institut der LMU München  
Direktor: Prof. Dr. med. T. Kirchner

**Morphologische Untersuchungen zur formalen  
Pathogenese der Sialadenose menschlicher  
Speicheldrüsen**

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der  
Zahnheilkunde an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von  
Christian Rath  
Tübingen

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. St. Ihrler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Berghaus  
Priv. Doz. Dr. M. Stöckelhuber

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Stephan Ihrler

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 07. 2007

Meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis .....	X
1 Einleitung und Zielsetzung .....	1
1.1 <i>Allgemeine morphologische Grundlagen zur Pathologie der Speicheldrüsen ...</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Klinische und morphologische Grundlagen der Sialadenose .....</i>	<i>8</i>
1.3 <i>Bisherige Hypothese zur formalpathologischen Entstehung der Sialadenose..</i>	<i>12</i>
1.4 <i>Fragestellungen und Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung .....</i>	<i>14</i>
2 Methoden .....	17
2.1 <i>Fixierung und Einbettung der Gewebeproben .....</i>	<i>17</i>
2.2 <i>Immunhistologie .....</i>	<i>17</i>
2.2.1 <i>Grundlagen der Immunhistologie.....</i>	<i>17</i>
2.2.2 <i>Verwendete Antikörper.....</i>	<i>23</i>
2.2.3 <i>Technik der immunhistologischen Doppelfärbung .....</i>	<i>28</i>
2.3 <i>Methodik der histomorphologischen Befunderhebung .....</i>	<i>29</i>
2.4 <i>Morphometrische Messungen.....</i>	<i>31</i>
2.4.1 <i>Flächen der Azini .....</i>	<i>31</i>

	Seite
2.4.2	Quantitative beziehungsweise qualitative Analyse der Myoepithelzellen . 32
2.4.3	Erfassung der Zellproliferation in Azinuszellen und Myoepithelzellen..... 35
2.4.4	Quantifizierung der Zellapoptose..... 35
2.4.5	Sonstige morphologische Datenerhebungen..... 36
2.5	<i>Statistische Auswertung</i> ..... 37
3	Material: Patientenkollektive..... 37
3.1	<i>Kontrollkollektiv von Normalspeicheldrüsen</i> ..... 37
3.2	<i>Kollektiv von Speicheldrüsen mit Sialadenose</i> ..... 38
4	Ergebnisse..... 40
4.1	<i>Ergebnisse der Normaldrüsen</i> ..... 40
4.2	<i>Morphometrische Analyse der Sialadenosefälle</i> ..... 42
4.3	<i>Vergleich der untersuchten morphologischen Parameter in Normalspeicheldrüsen und Speicheldrüsen mit Sialadenose</i> ..... 46
4.4	<i>Korrelation morphologischer und klinischer Befunde</i> ..... 52
5	Diskussion..... 55
6	Synoptische Zusammenfassung ..... 65
	Literaturverzeichnis ..... 68
	Danksagung ..... 76
	Lebenslauf ..... 77

# Abkürzungsverzeichnis

µm	Micrometer
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin complex Methode (Elite)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CK	Intermediärfilament vom Cytokeratin-Typ
cm	Zentimeter
CV	Variationskoeffizient (coefficient of variation)
DC	Direct current
Dpi	Dot per Inch
Gl.	Glandula
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IH	Immunhistologie
Kap.	Kapitel
kDa	Kilo Dalton
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin
max.	Maximal
MB	Megabyte
Mhz	Megahertz
min.	Minute
mM	millimolar

MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
MW	Mikrowelle
n.s.	nicht signifikant
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
pH	Potentia hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration; Säureeinheit)
pp	page
RT	Raumtemperatur
s/w	schwarz-weiß
S100	S100-Protein-Färbung
SA	Standardabweichung
SPSS	Statistical Package for the Social Science (Statistik Software)
Tab.	Tabelle
TRIS-(Puffer)	Trishydroxymethylaminomethan
TRS6	Target retrieval solution PH 6
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organisation
Win	Windows

# Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Die Speicheldrüsen des Menschen.....	1
Abb. 2: Histologie einer serösen Speicheldrüse .....	2
Abb. 3: Funktionelle Anatomie der menschlichen Speicheldrüse.....	4
Abb. 4: Vereinfachtes Konzept der postulierten Sekretionsmechanismen in Speicheldrüsen .....	5
Abb. 5: Die Korbgeflechtartige, netzartige Struktur der Myoepithelzellen in verschiedenen Techniken beziehungsweise Darstellungen .....	6
Abb. 6: Befunde zur Sialadenose.....	9
Abb. 7: Granuläre Form der Sialadenose mit vermehrten und vergrößerten Sekretgranula .....	12
Abb. 8: Bisherige Hypothese zur Entstehung der Sialadenose .....	14
Abb. 9: Vergleich von Normaldrüse und Sialadenosedrüse in $\alpha$ -Aktin-Reaktion....	15
Abb. 10: Morphometrische Flächenbestimmung an einem Azinus mit Sialadenose (CK7).....	31
Abb. 11: Vorversuche zur Problematik der morphologischen Messung verschiedener immunhistologischer Nachweisverfahren von Myoepithelzellen am Beispiel von Schnitten aus Normaldrüsen.....	34
Abb. 12: S100 Reaktion in Normaldrüsen und Sialadenosedrüsen.....	36
Abb. 13: Übersicht und Detailansicht von Normaldrüse und Sialadenosedrüse.....	48
Abb. 14: Morphometrische Messung der Größenzunahme der Drüsenazini im Vergleich von Normaldrüse zu Sialadenosedrüse.....	49

Abb. 15:	Signifikanter Verlust von Myoepithelzellen bei gleichzeitig höchstsignifikantem Verlust der Myofilamente der Myoepithelzellen .....	50
Abb. 16:	Vergleich der Zellproliferation von Azinuszellen in Normaldrüsen (A) und Sialadenosedrüsen (B) in immunhistologischer Doppelfärbung CK14/Ki67 .....	51
Abb. 17:	Korrelation der Flächen der Drüsenazini mit dem Gehalt der Azini an Myofilamenten im Vergleich der Einzelwerte der Sialadenosedrüsen (blau) zu den Normaldrüsen (Kontrolle, rot) .....	52
Abb. 18:	Vergleich von Normaldrüse (A) und Sialadenosedrüse (B,C) in der $\alpha$ -Aktin-Darstellung und im rasterelektronenmikroskopischen Schnitt.....	58
Abb. 19:	Experimentelle Gangunterbindung (linkes Diagramm) führt zu reaktivem Anstieg der Proliferation der Myoepithelzellen (rechts, immunhistologische Doppelfärbung) .....	60
Abb. 20:	Erweiterte Hypothese zur formalen Pathogenese der Sialadenose .....	62

# Tabellenverzeichnis

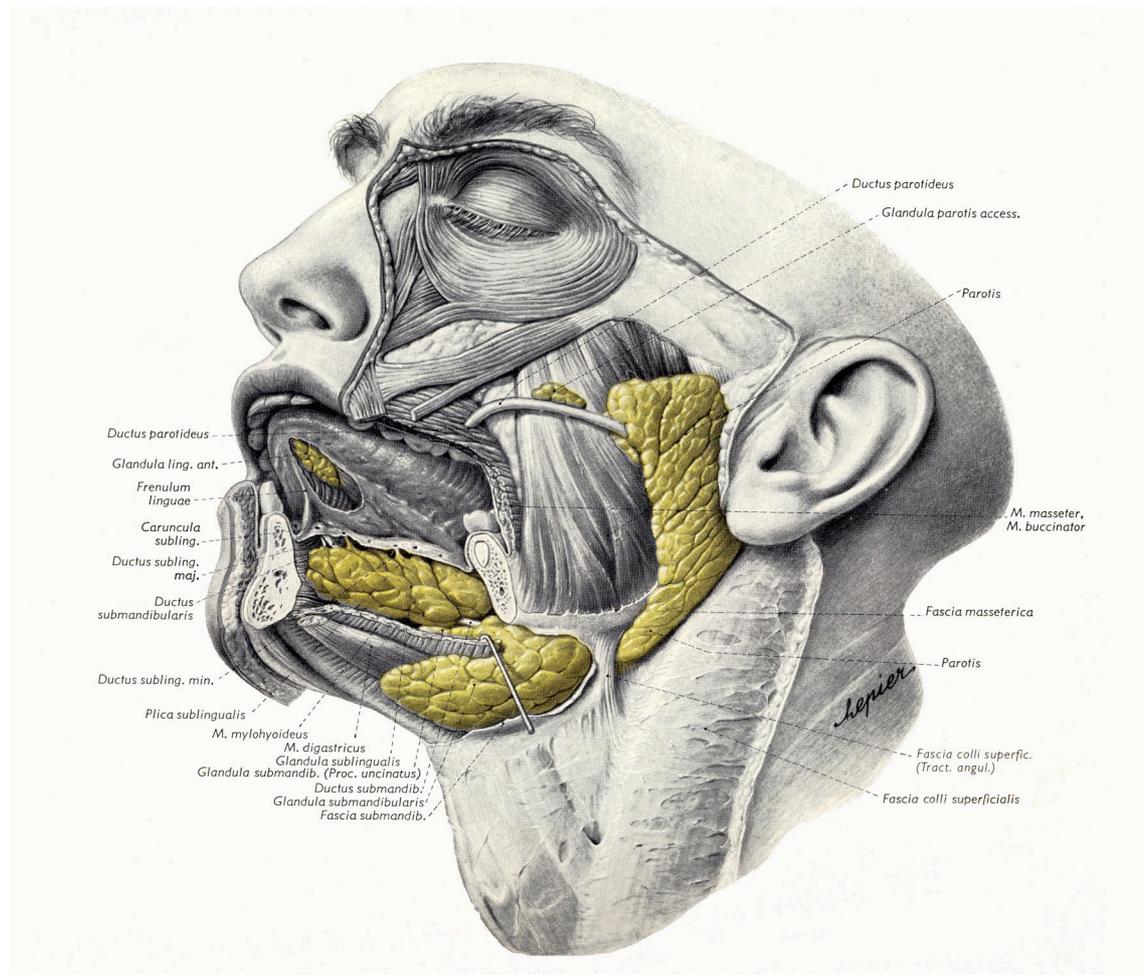
	Seite
Tab. 1: Erkrankungen beziehungsweise Einflußfaktoren die mit dem Entstehen einer Sialadenose assoziiert werden .....	10
Tab. 2: Wichtige CK-Subtypen.....	25
Tab. 3: Tabellarische Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie .....	28
Tab. 4: Methodische Details der verwendeten immunhistologischen Doppelfärbung.....	29
Tab. 5: Mikroskop: Axioplan 2 imaging Pol, Zeiss .....	30
Tab. 6: Kamera: AxioCam HRc, Zeiss.....	30
Tab. 7: Klinische Daten der Sialadenosepatienten.....	39
Tab. 8: Ergebnisse der Normaldrüsen* .....	40
Tab. 9: Morphometrische Analyse der Sialadenosefälle.....	43
Tab. 10: Vergleich Normaldrüsen (Kontrolle) und Sialadenosen .....	47

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Allgemeine morphologische Grundlagen zur Pathologie der Speicheldrüsen

Die menschlichen Speicheldrüsen gliedern sich in die großen bilateralen Kopfspeicheldrüsen (Gl. parotis, submandibularis, sublingualis und lacrimalis) sowie zahlreiche kleine Mundspeicheldrüsen (Abb. 1).

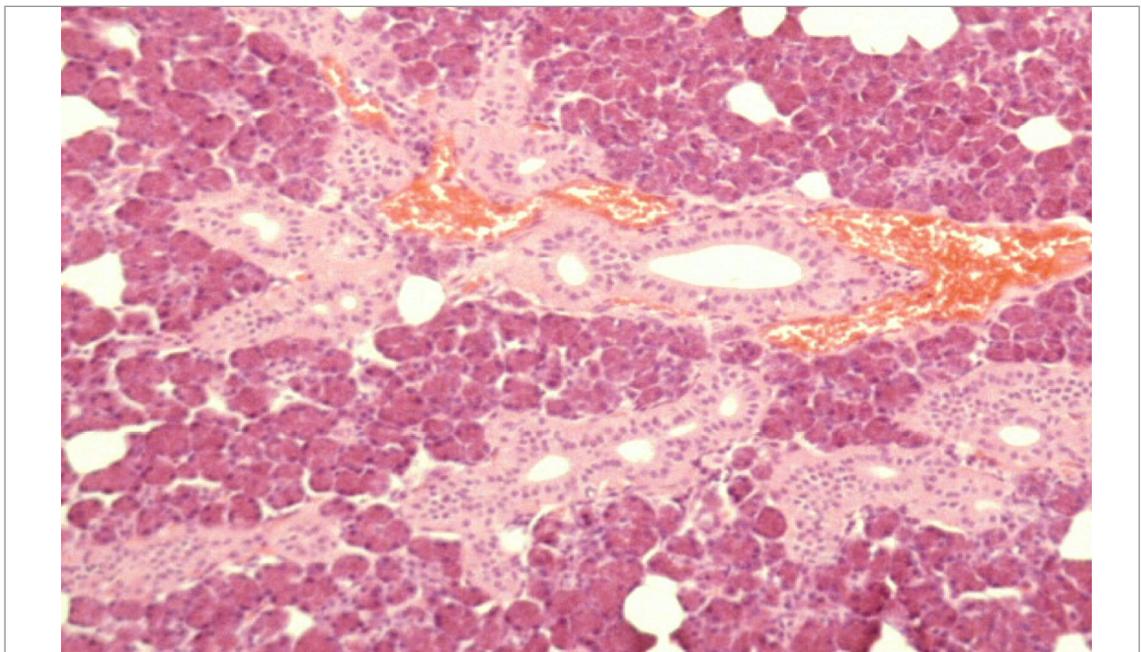
Abb. 1: Die Speicheldrüsen des Menschen



Index: Die Speicheldrüsen des Menschen (gelb dargestellt), aus: Pernkopf, Anatomieatlas (1987, H. Ferner).

Der kontinuierlich nachgebildete Speichelfilm an den Schleimhäuten des Kopf-Hals-Bereichs dient unter anderem einer mechanischen und immunologischen Schutzfunktion. Zur Unterstützung der Kau- und Schluckfunktion kann eine temporär gesteigerte Speichelfreisetzung insbesondere aus Glandula parotis und Glandula submandibularis über eine offenbar synergistisch parasymphatisch und sympatisch vermittelte erhöhte azinäre Speichelproduktion induziert werden (*Garret 1998*). Neben den Drüsen mit ausschließlichem oder ganz überwiegendem Gehalt an serösen Azinuszellen Gl. Parotis und lacrimalis (siehe Abb. 2) gibt es Drüsen mit überwiegendem Gehalt an mukösen Azinuszellen (Gl. sublingualis) und gemischtem Gehalt an serösen und mukösen Azinuszellen (Gl. submandibularis und kleine Speicheldrüsen).

Abb. 2: Histologie einer serösen Speicheldrüse



Index: Seröse Drüsenzini dunkelrot, Gangstrukturen hellrot, Gl. Parotis, HE-Färbung, Vergrößerung. 10x10.

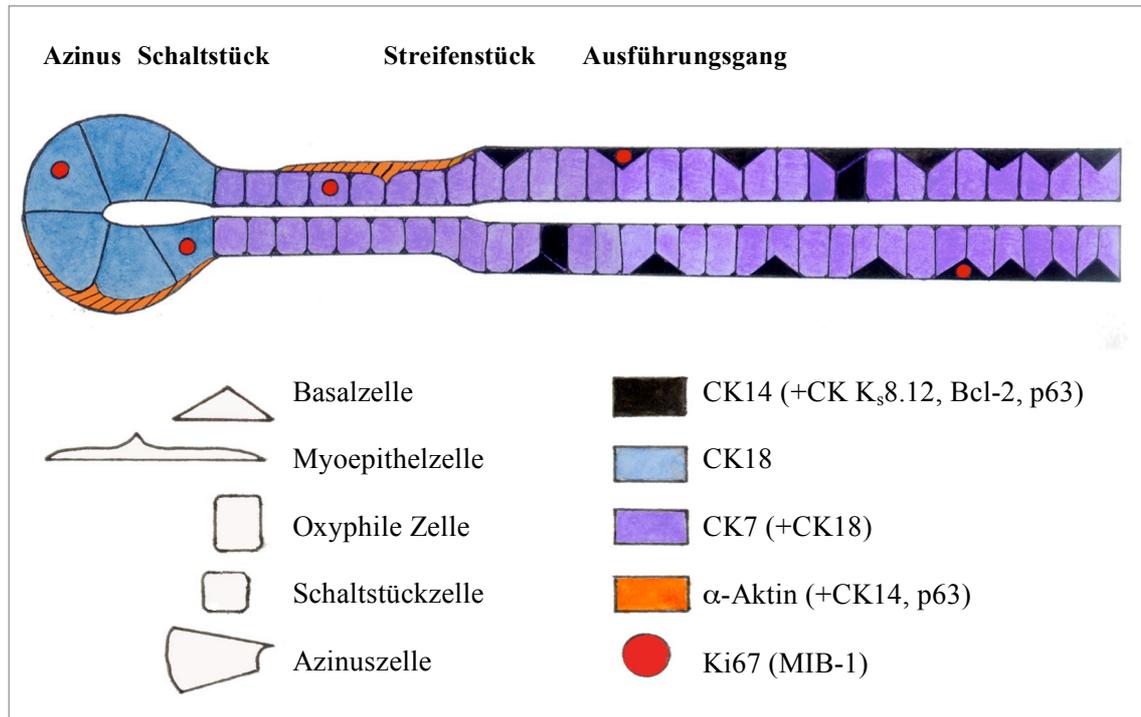
Bei nur geringen Unterschieden zwischen verschiedenen Typen humaner Speicheldrüsen sowie zwischen Speicheldrüsen des Menschen und

verschiedener Tierspezies (wichtig in der vergleichenden Interpretation von tierexperimentellen Untersuchungen) gliedert sich der normale Speichelgang in vier unterschiedlich zusammengesetzte Abschnitte:

Der periphere Abschnitt entspricht dem Azinus, bestehend aus luminalen, speichelbildenden Azinuszellen und abluminalen, kontraktile Myoepithelzellen. Es folgt das kurze Schaltstück mit luminalen Schaltstückepithelien und abluminalen Myoepithelzellen. Der Gang setzt sich fort in die innerhalb der Läppchen gelegenen Streifenstücke und die außerhalb der Läppchen lokalisierten Ausführungsgänge. Beide Gangabschnitte dienen neben dem Speicheltransport der weiteren Modifikation des Primärspeichels hinsichtlich Elektrolyt- und Flüssigkeitsmenge und werden dominiert von hochprismatischen oxyphilen (weil mitochondrienreichen) Duktalzellen (siehe auch Abb. 3) (Seifert *et al.* 1984, Geiger *et al.* 1987, Martinez-Madrigal *et al.* 1989, Ihrler *et al.* 2004b).

Die Innervation der großen Speicheldrüsen (am Beispiel der Glandula Parotis) gestaltet sich rein anatomisch wie folgt: Die präganglionären parasymphatischen Fasern der Parotis kommen vom Nukleus salivatorius inferior der Medulla oblongata und verlaufen im Plexus tympanicus und Nervus petrosus zum Ganglion oticum. Die sympathischen und parasymphatischen postganglionären Fasern ziehen über den Nervus auriculotemporalis zur Parotis und die postganglionären sympathischen Fasern ziehen vom Ganglion cervicale superius zur Drüse (Seifert 1984a, Chilla 1981b).

Abb. 3: Funktionelle Anatomie der menschlichen Speicheldrüse

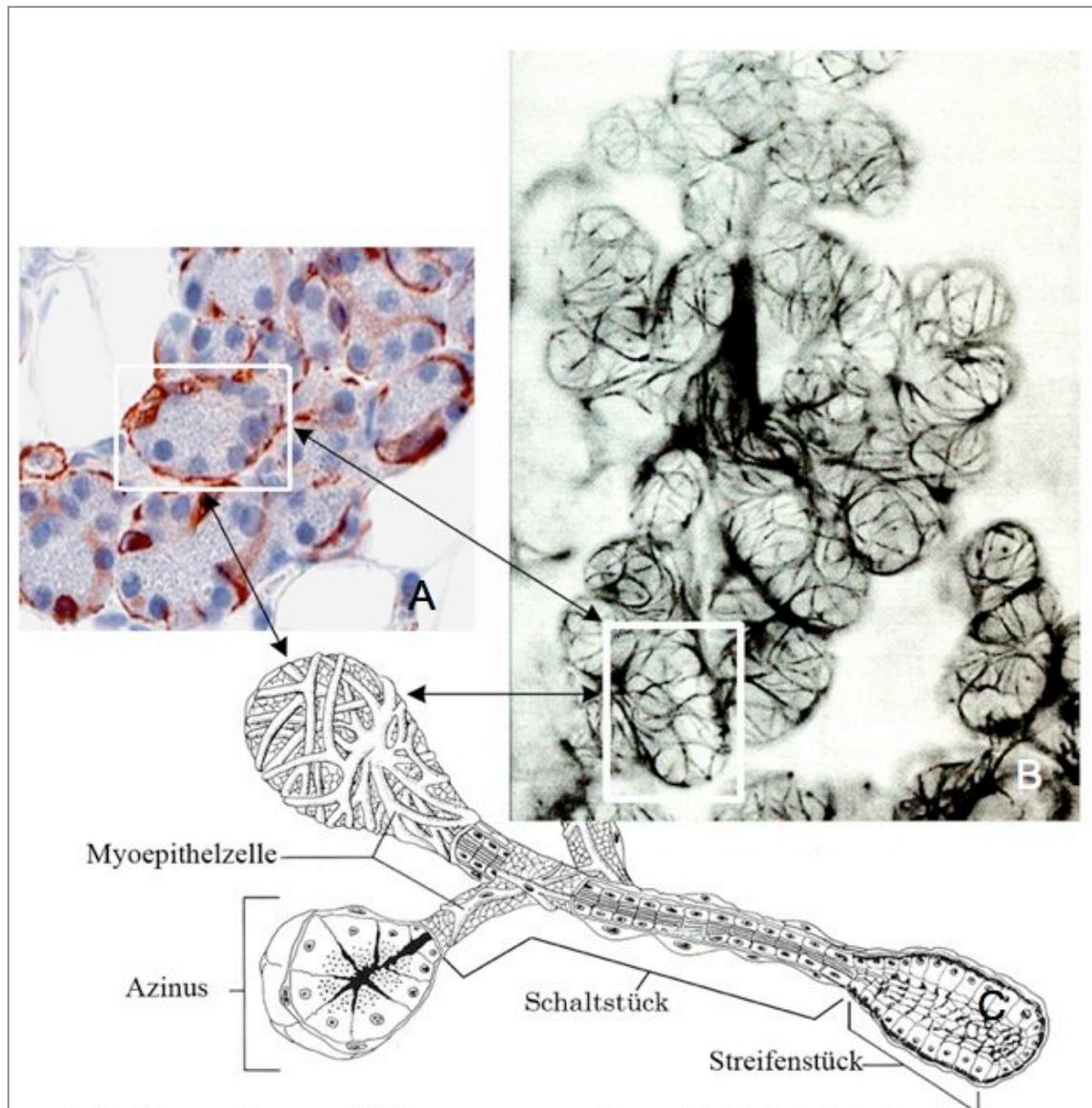


Index: Ihrler et al. 2004b.

Aus physiologischer beziehungsweise pathophysiologischer Sicht ist die Innervation der großen Kopfspeicheldrüsen äußerst komplex und bis heute nur sehr eingeschränkt aufgeklärt. Als falsch anzunehmen ist die frühere Hypothese, die von einer ausschließlich parasympathisch stimulierenden und einer ausschließlich sympathisch dämpfenden Wirkung auf die Speichelproduktion und Speichelsekretion ausgeht. Man nimmt heute an, dass es sich bei der Innervation der Speicheldrüsen vielmehr um eine äußerst komplexe, noch schlecht verstandene Koinnervation sympathischer und parasympathischer Einflüsse handelt (*Chilla 1981b, Seifert 1984a; vgl. Abb. 4*).



Abb. 5: Die Korbgeflechtartige, netzartige Struktur der Myoepithelzellen in verschiedenen Techniken beziehungsweise Darstellungen



Index: A: CK14-Darstellung am Schnittpräparat, Vergr. 40x10, Schnittdicke ca. 2 µm;  
 B: α-Aktin-Darstellung in Immunfluoreszenz Technik (nach Murakami et al. 1991);  
 C: Dreidimensionale zeichnerische Rekonstruktion (nach Williams et al. 1980).

Im Vergleich zu anderen Organsystemen kommt Krankheiten der menschlichen Speicheldrüsen, trotz des oft hohen Leidensdrucks der Patienten, aufgrund ihrer insgesamt relativ geringen Morbidität und sehr geringen Mortalität, nur eine nachgeordnete medizinische Bedeutung zu. So umfassen gutartige und bösartige Tumoren menschlicher Speicheldrüsen zusammengerechnet nur etwa 0,3 % aller

menschlichen Neoplasien, entsprechend etwa 4-6 % aller Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, wobei gutartige Neoplasien überwiegen (*Seifert et al.* 1991).

Der Ausfall einer einzelnen großen Kopfspeicheldrüse, z.B. durch chirurgische Entfernung oder entzündlich ausgelöste Atrophie, bleibt hinsichtlich einer ausreichenden Speichelbildung bei der anatomischen Vielzahl an Drüsen funktionell ohne wesentliche Bedeutung. Ein hochgradiger Funktionsverlust der Speicheldrüsen, klinisch charakterisiert durch ein sog. „Sicca-Syndrom“ der Schleimhäute, wie es sich klassischerweise bei schweren Verläufen der Autoimmunerkrankung Morbus Sjögren manifestiert, ist charakterisiert durch erhebliche Sekundärfolgen wie Dysphagie, Heiserkeit, Karies, Parodontitis oder Keratitis mit erheblich eingeschränkter Lebensqualität.

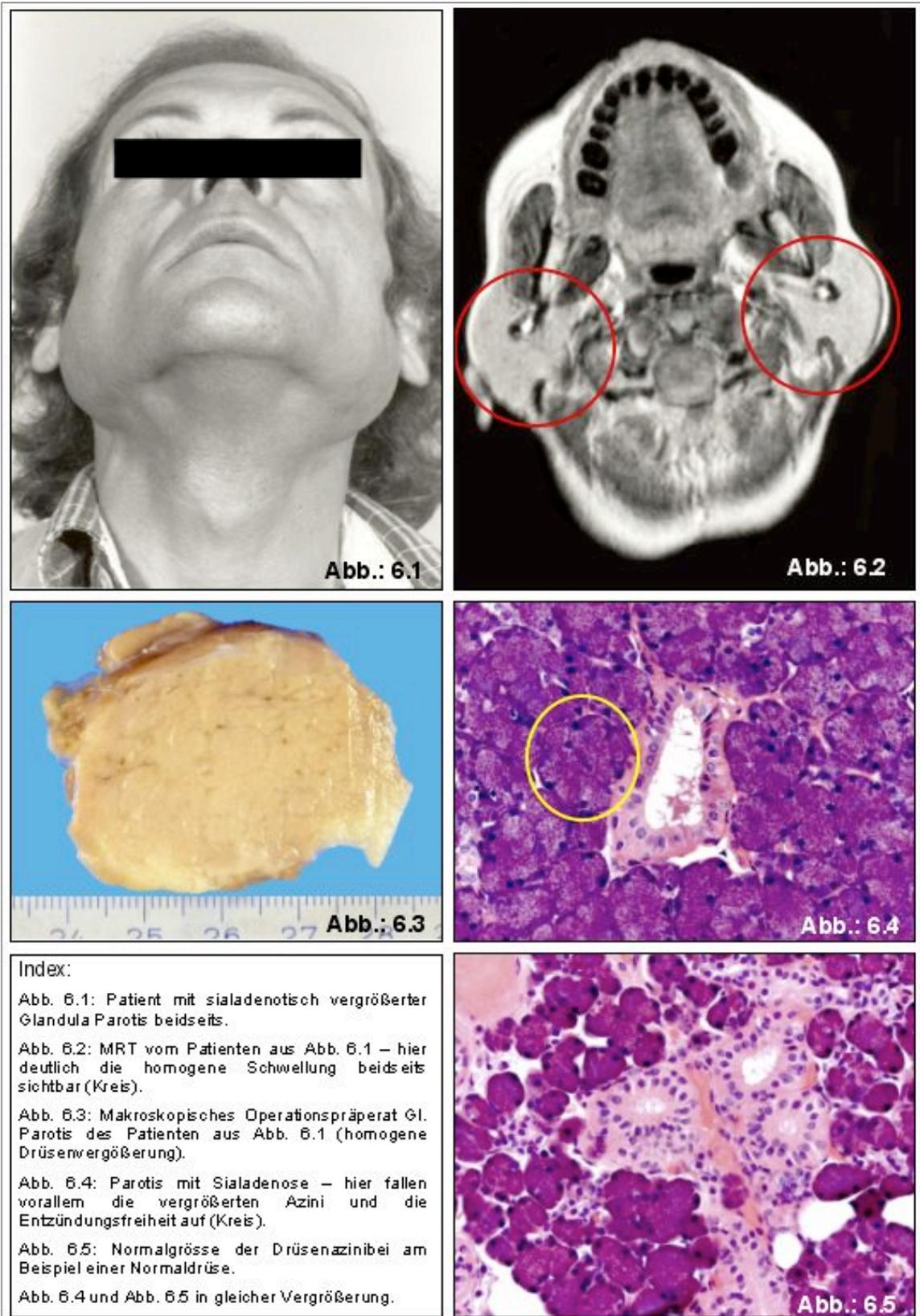
Entsprechend schwere und generalisierte Sialadenitisformen werden nur bei wenigen Menschen manifest. Eine im höheren Lebensalter in bis zu 25% der Fälle zu beobachtende Funktionseinschränkung mit verminderter Speichelsekretion wird dagegen meist als ein „physiologischer“ Alterungsprozess aufgefasst, welchem kein wesentlicher therapiebedürftiger Krankheitswert beigemessen wird (*Seifert et al.* 1984). In diesem Zusammenhang stellt die Sialadenose der Speicheldrüse eine relativ seltene und histomorphologisch wenig untersuchte Parenchymerkrankung der Speicheldrüsen dar.

## 1.2 Klinische und morphologische Grundlagen der Sialadenose

Nach Durchsicht der internationalen wissenschaftlichen Literatur wurde offenbar erstmals 1933 ein damals noch nicht genau definiertes Krankheitsbild einer doppelseitigen, schmerzlosen, Diabetes mellitus-assoziierten Schwellung der Parotis von *John Henry* beschrieben. Er ordnete diesen Fall in das sogenannte „Mikulicz-Syndrom“ (bilaterale Speicheldrüsenschwellung unklarer Genese) ein.

1959 prägte *Rauch* für diese Erkrankung den Begriff der Sialadenose in histomorphologischer Abgrenzung zu verschiedenen Formen entzündlicher Speicheldrüsenveränderungen (Sialadenitis). Nach *Seifert* (1964) wird die Sialadenose bis heute folgendermaßen definiert: Die Sialadenose ist „eine nicht-entzündliche, parenchymatöse Speicheldrüsenerkrankung, die auf Stoffwechsel- und Sekretionsstörungen des Drüsenparenchyms beruht und meist mit einer rezidivierenden, schmerzlosen doppelseitigen Speicheldrüsenschwellung, besonders der Parotis, einhergeht“ (vgl. WHO Definition 1991). Der chronische Verlauf der Sialadenose kann sich über viele Jahre erstrecken. Verläufe von über 20 Jahren sind keine Seltenheit. Das äußerliche Erscheinungsbild ist von eindrucksvoll („hamsterartig“) geschwollen Parotisdrüsen geprägt (vgl. Abb. 6). Charakteristisch tritt die Schwellung beidseitig auf, wobei die Patienten meist nur über ein Spannungsgefühl, selten über wesentliche Schmerzen berichten. Oft tritt eine milde Xerostomie (Mundtrockenheit) auf, die im Verhältnis zur schweren Sicca-Symptomatik beim Sjögren-Syndrom meist deutlich geringer ist. Über eine Mitbeteiligung anderer Speicheldrüsen wurde nur sehr selten berichtet (*Baumann et al.* 1985).

Abb. 6: Befunde zur Sialadenose



**Index:**  
 Abb. 6.1: Patient mit sialadenotisch vergrößerter Glandula Parotis beidseits.  
 Abb. 6.2: MRT vom Patienten aus Abb. 6.1 – hier deutlich die homogene Schwellung beidseits sichtbar (Kreis).  
 Abb. 6.3: Makroskopisches Operationspräparat Gl. Parotis des Patienten aus Abb. 6.1 (homogene Drüsenvergrößerung).  
 Abb. 6.4: Parotis mit Sialadenose – hier fallen vor allem die vergrößerten Azini und die Entzündungsfreiheit auf (Kreis).  
 Abb. 6.5: Normalgröße der Drüsenazini bei am Beispiel einer Normaldrüse.  
 Abb. 6.4 und Abb. 6.5 in gleicher Vergrößerung.

Tab. 1: Erkrankungen beziehungsweise Einflußfaktoren die mit dem Entstehen einer Sialadenose assoziiert werden

1. Schwere endokrine und metabolische Funktionsstörungen:	des Pankreas (Diabetes Mellitus Typ I+II) der Schilddrüse (Hyper- / Hypothyreose) der Leber (v.a. alkohol-bedingte Leberzirrhose) der Nebennierenrinde Mangelernährung (Vitamin-, Proteinmangel) Essstörungen (Bulimie, Anorexie)
2. Medikamentös bedingt:	Sympathikomimetika / Parasympathikomimetika Sympathikolytika / Parasympathikolytika Antihypertensiva Trizyklische Antidepressiva Antikonvulsiva
3. Im Tierexperiment:	Nicotin-Überfütterung Hochdosierte Katecholamingabe

Index: Abelson et al. 1976, Chilla et al. 1981, Donath et al. 1973, Loria et al. 1989, Maier et al. 1991, Mehler et al. 1993, Reißner et al. 1991, Vavrina et al. 1994, Willershausen et al. 1990.

Wie in Tabelle 1 zusammengefasst gelten als häufigste Ursachen, die zu einer Sialadenose führen schwere endokrine (funktionelle) Störungen wie Diabetes mellitus sowie schwere metabolische Funktionsstörungen, am häufigsten schwere, chronische Ess-Störungen (Anorexia nervosa und Bulimie) sowie daneben medikamentöse Nebenwirkungen. Im Zusammenhang mit Medikamenten treten Sialadenosen hauptsächlich auf bei Sympathikolytika, Sympathikomimetika, Parasympathikolytika, Parasympathikomimetika, Antihypertensiva und trizyklischen Antidepressiva, also bei Medikamenten, die auf verschiedene Weise mit dem vegetativen Nervensystem interagieren.

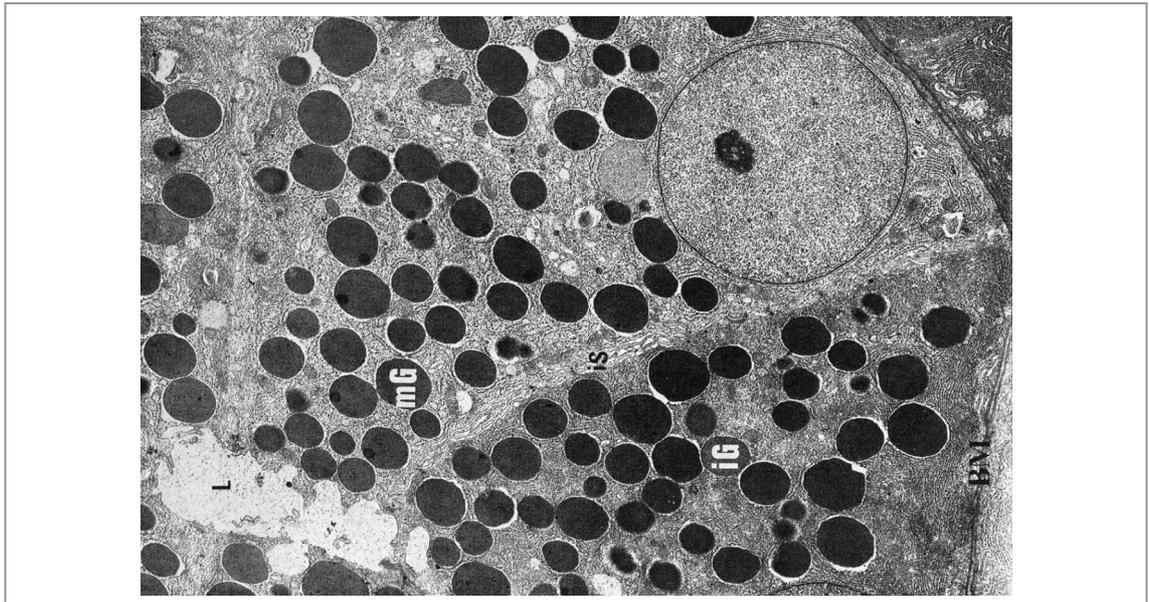
Das gehäufte gleichzeitige Auftreten der oben genannten Grunderkrankungen und Medikationen mit einer peripheren Polyneuropathie und die bemerkenswert häufige Gleichzeitigkeit von Sialadenosen und den oben genannten Grunderkrankungen und

Medikationen einerseits und einer peripheren Polyneuropathie andererseits führte zu der Hypothese, dass eine periphere Polyneuropathie in Folge der genannten Grunderkrankung für die Entstehung der Sialadenose eine wichtige pathogenetische Bedeutung haben könnte (*Donath et al. 1975*; siehe auch Kap. 1.3).

Das pathohistologische Erscheinungsbild der Sialadenose ist geprägt von einer völlig entzündungsfreien, deutlichen, generalisierten Vergrößerung aller Azinuszellen und damit einer generalisierten Vergrößerung der Drüsenazini. Bei einem durchschnittlichem Durchmesser der Drüsenazini bei der Sialadenose von 70-100 $\mu\text{m}$  (*Seifert et al. 1984*) und einem durchschnittlichen Durchmesser der Drüsenazini bei Normaldrüsen von 30-40 $\mu\text{m}$  sind die Drüsenazini bei der Sialadenose um das bis zu Dreifache vergrößert (siehe Kapitel 2.3 Methodik der morphometrischen Datenerhebung).

Nach *Seifert (1984)* sind Azinuskörper über 65 $\mu\text{m}$  als sicheres histologisches Kriterium für das Vorliegen einer Sialadenose zu werten. Durch die geschwollenen Drüsenazini wird das Gangsystem komprimiert. Dieses Phänomen stellt sich auch deutlich bei einer bei der Sialadenose durchgeführten Sialographie dar: hier erscheint das klassische „Bild des entlaubten Baumes“, da das Kontrastmittel in die eingeeengten, peripheren Speicheldrüsengänge nur stark vermindert oder nicht vordringen kann. Grundlage der Azinusvergrößerung ist eine Vermehrung und Vergrößerung der intrazytoplasmatischen Sekretgranula (*Donath et al. 1975, Chilla et al. 1991*; vgl. Abb. 7). *Seifert (1984)* teilt die Sialadenose nach ultrastrukturellen Untersuchungen in drei granula-abhängige Subtypen ein (1. granuläre Form, 2. wabige Form, 3. gemischte Form). Eine Relevanz dieser Typeneinteilung hinsichtlich der Diagnostik, der Pathogenese oder der Klinik der Sialadenose konnte jedoch nicht abgeleitet werden.

Abb. 7: Granuläre Form der Sialadenose mit vermehrten und vergrößerten Sekretgranula



Index: Donath 1975.

### 1.3 Bisherige Hypothese zur formalpathologischen Entstehung der Sialadenose

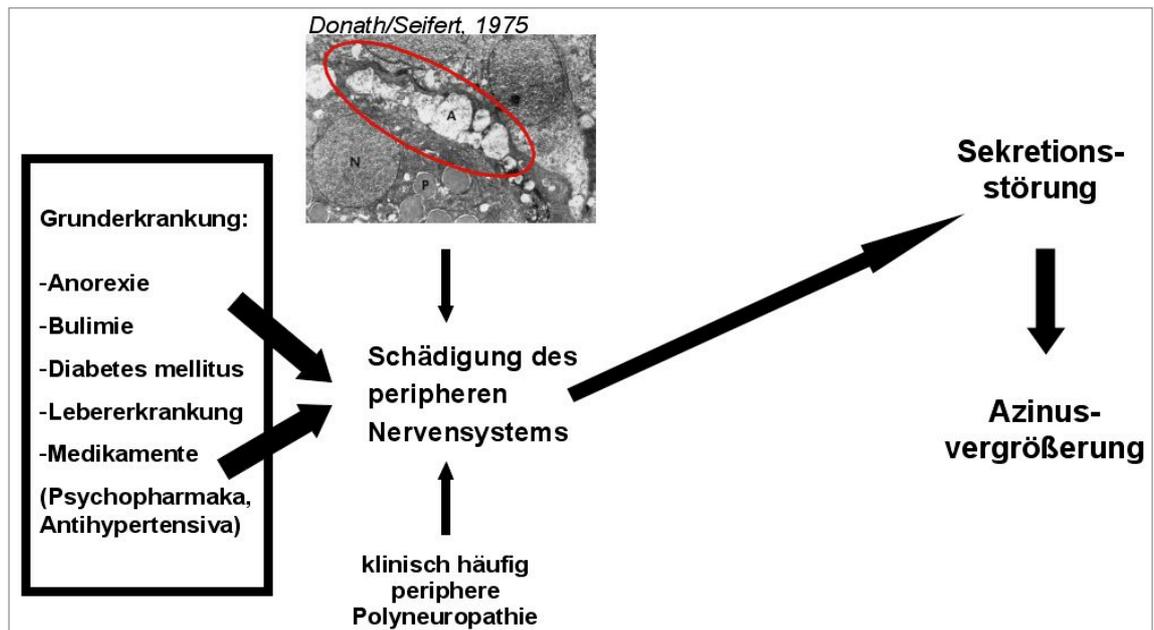
Die bei Sialadenosepatienten gehäuft nachweisbaren unterschiedlichen Grunderkrankungen, beziehungsweise äußeren Einflussfaktoren und Medikationen, manifestieren sich in dem klinisch und histomorphologisch uniformen Krankheitsmuster der Sialadenose (*Abelson et al. 1976, Chilla et al. 1981, Donath et al. 1973, Loria et al. 1989, Maier et al. 1991, Mehler et al 1993, Reißner et al. 1991, Vavrina et al. 1994, Willershausen et al. 1990*). Bemerkenswert ist der gleichzeitige häufige klinische Nachweis einer peripheren Polyneuropathie bei Sialadenosepatienten (*Donath et al. 1975, Garrett et al. 1999, Seifert et al 1971b, 1975*). *Seifert* formulierte daraus die bis heute wichtigste und dominierende Hypothese, nach der eine periphere Polyneuropathie, entstanden auf dem Boden dieser Grunderkrankungen beziehungsweise auf dem Boden dieser äußeren Einflüsse, ein formalpathologischer Faktor bei der Entstehung der

Sialadenose sein könnte. Als wichtiges Argument hierfür fand *Seifert* in ultrastrukturellen Untersuchungen degenerative Veränderungen des peripheren Nervensystems und der Myoepithelzellen in menschlichen Sialadenosedrüsen (*Seifert et al* 1975).

*Donath* formulierte die Hypothese, dass eine Schädigung beziehungsweise ein Verlust von peripheren Nervenfasern zu einer Hemmung der Proteinsynthese führen könnte, welche wiederum zu einem Stau der Sekretgranula und in dessen Folge zu einer generalisierten Schwellung der Azinuszellen beziehungsweise der gesamten Speicheldrüse führen könnte. Als Ursache für die intrazytoplasmatische Akkumulation von Sekretgranula postulierte er eine Verlängerung der Lagerungsphase der Sekretgranula, die durch ein Sistieren der Proteinsynthese ausgelöst sein könnte (vgl. Abb. 8).

Die bislang vorliegenden histomorphologischen Befunde zur Sialadenose beruhen im Wesentlichen auf konventionellen histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Seit dem Zeitraum von 1973 bis 1981 mit den wichtigen Arbeiten aus der Hamburger Forschungsgruppe um *Donath* und *Seifert* gab es bis heute nur wenig histologische und generell keine immunhistologischen Untersuchungen und insbesondere keine wesentlichen neuen Aspekte aus pathomorphologischer Sicht zur Pathogenese der Sialadenose.

Abb. 8: Bisherige Hypothese zur Entstehung der Sialadenose

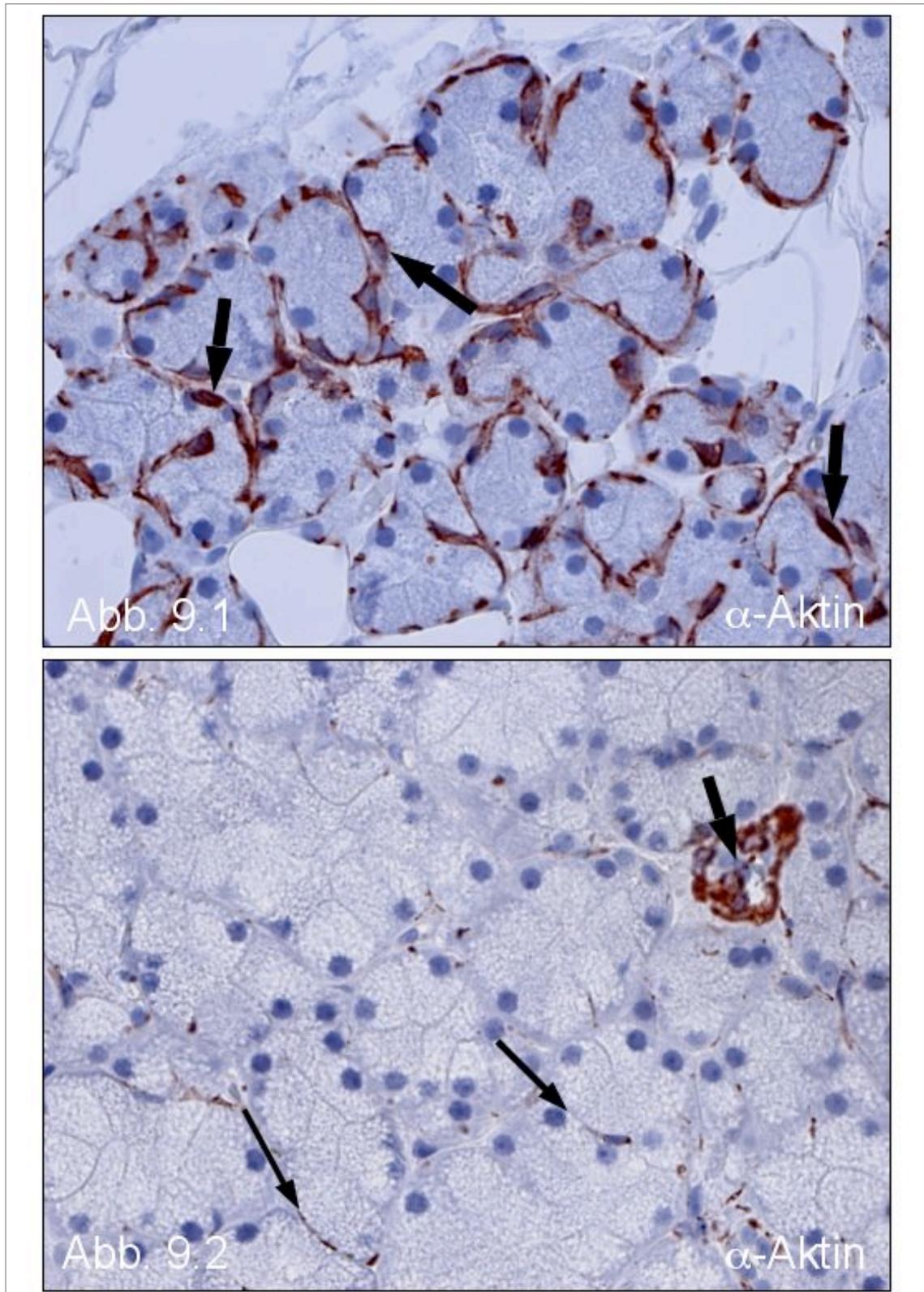


Index: Elektronenmikroskopisches Bild aus Donath und Seifert 1975 zeigt ein Axon (A, von den Autoren) eines peripheren Nerven mit eingelagerten Lipidvakuolen (roter Kreis), was als Zeichen einer Schädigung interpretiert wird.

## 1.4 Fragestellungen und Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung

Im Rahmen umfangreicher früherer Untersuchungen zur Anatomie von gesunden Speicheldrüsen und zur pathologischen Anatomie von reaktiv entzündlich beziehungsweise neoplastisch veränderten menschlichen Speicheldrüsen (Ihrler *et al.* 1999, 2000, 2004a, 2004b), war in kasuistischen Beobachtungen von immunhistologisch untersuchten Sialadenosefällen ein bemerkenswert verringerter Gehalt an  $\alpha$ -Aktin-positiven Myofilamenten beziehungsweise ein möglicher genereller Verlust von Myoepithelzellen im Vergleich zu Normaldrüsen aufgefallen. Dies deutete auf interessante Parallelen zu früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Donath und Seifert (Donath, Seifert *et al.* 1975) hin, bei denen degenerative Veränderungen nicht nur in peripheren Nervenfasern, sondern auch in Myoepithelzellen bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen beschrieben worden waren.

**Abb. 9:** Vergleich von Normaldrüse und Sialadenosedrüse in  $\alpha$ -Aktin-Reaktion



Index: **Abb. 9.1:** Normaldrüse,  $\alpha$ -Aktin-Reaktion, die Myoepithelzellen stellen sich braun dar (Pfeile);

**Abb. 9.2:** Sialadenose,  $\alpha$ -Aktin-Reaktion, die Myoepithelzellen sind stark vermindert (dünne Pfeile), beachte die vergrößerten Azini, interne Kontrolle: Arteriole, braun, (dicker Pfeil);

Abb. 9.1 und 9.2 jeweils in gleicher Vergrößerung von 40x10.

Vor dem Hintergrund der in Kapitel 1.3 genannten dominierenden Hypothese zur formalpathologischen Entstehung der Sialadenose und andererseits der funktionellen Bedeutung der Myoepithelzellen für die Speicheldrüsen versprach die eigene kasuistische Beobachtung einer Alteration von Myoepithelzellen in Sialadenosen einen möglichen wichtigen Ansatz hinsichtlich neuer Erkenntnisse zur formalen Pathogenese der Sialadenose. Sie waren Anlass zu umfangreichen morphometrischen Untersuchungen von sialadenotischen Speicheldrüsen im Vergleich zu Normalspeicheldrüsen. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals für die Entität der Sialadenose geeignete immunhistologische Reaktionen einschließlich immunhistologischer Doppelfärbungen identifiziert und herangezogen, basierend auf der hohen Aussagekraft früherer immunhistologischer Untersuchungen bei der Aufklärung der formalen Entwicklung verschiedenster reaktiver und neoplastischer Speicheldrüsenerkrankungen (*Ihrler et al.* 1999, 2000, 2002, 2004a, 2004b).

## **2 Methoden**

### **2.1 Fixierung und Einbettung der Gewebeproben**

Alle Untersuchungen wurden an humanen Gewebeproben durchgeführt, die diagnostischen Biopsien beziehungsweise therapeutischen Gewebresektaten entstammten. Routinemäßig erfolgte sofort nach der Entnahme der Gewebeprobe die Fixierung in gepuffertem 4-10%igem Formaldehyd (Formalin) für 24 bis 48 Stunden und anschließend eine Einbettung in Paraffin (Paraplast, Vogel, Giessen, Deutschland) sowie im Folgenden die Anfertigung von Routineschnitten für die histologische Diagnostik (insbesondere Hämatoxylin-Eosin-Färbung und PAS-Reaktion). Für die vorliegenden Untersuchungen wurden von den archivierten Paraffinblöcken nachträglich 2µm dicke Gewebsschnitte mit Hilfe von Schlittenmikrotomen und Einmal-Stahlklingen angefertigt und auf sialinierte Objektträger (SuperFrost/Plus, Mentzel) aufgezogen. Zugunsten einer maximalen Standardisierung der Methodik hinsichtlich einer möglichst einheitlichen Schnittdicke und maximaler Qualität wurden alle Schnitte in Serienschnitten von einer einzigen medizinisch-technischen Assistentin aufgearbeitet. Frischmaterial beziehungsweise Gefriermaterial von Operationspräparaten lag in keinem der Sialadenosefälle vor.

### **2.2 Immunhistologie**

#### **2.2.1 Grundlagen der Immunhistologie**

##### Allgemeines Prinzip

Antigen tragende Strukturen, in erster Linie Proteine, können in der Immunhistologie am histologischen Gewebsschnitt unter Verwendung von Antikörper-Farbkomplexen exakt topographisch dargestellt werden. Die verwendeten Antikörper werden durch

Immunsation von Tierspezies gegen humane Zielantigene gewonnen, wobei zwischen monoklonalen (gegen ein einzelnes Epitop) und polyklonalen (gegen mehrere Epitope gerichtete) Antikörper zu unterscheiden ist (Übersicht bei *Belling et al.* 1999). Mit Hilfe klonaler antigenspezifischer B-Zelllinien, welche mit Myelomzelllinien zu Hybridomen verschmolzen werden, können monoklonale Antikörper unter Kulturbedingungen hergestellt werden. Dagegen stammen polyklonale Antikörper (mit Hilfe von Aufreinigung) direkt von der gegen das Zielantigen immunisierten Tierspezies.

Diese Antikörper können im vorbehandelten Gewebsschnitt gegen das hierzu spezifische humane Zielantigen binden. Der Antikörper kann zur Detektion direkt mit einem Farb- oder Enzymkomplex gekoppelt werden (direkte Methode) oder er wird (indirekt), mit gegen den Primäantikörper gerichteten konjugierten Sekundäantikörpern, sichtbar gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene, im Weiteren beschriebene indirekte immunhistologische Detektionssysteme eingesetzt.

#### Vorbehandlung und Antigendemaskierung

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden die 2 µm dicken Schnitte auf sialinisierte Objektträger aufgezogen, in Xylol entparaffiniert (2x15 min) und anschließend rehydriert (Ethanol 100% 2x5 min; Ethanol 96% 2x5 min; Ethanol 70% 2x5 min; Aqua dest. 3x5 min). Viele Gewebsantigene werden durch die vorausgegangene Formalinfixierung in ihrer sterischen Konformation verändert. Die für eine optimale Antigenerkennung erforderliche Antigendemaskierung erfolgte durch Inkubation mit unterschiedlichen Vorbehandlungen (TRS6 oder Citrat; Details siehe Tabelle 2.2) in Mikrowellengeräten (Panasonic NN-4241, Japan). Dabei wurden die Schnitte in Abhängigkeit vom gesuchten Antigen beziehungsweise verwendeten

Antikörper in mikrowellenfesten Plastikkuvetten (TPX, Brand, Deutschland) bei 750 Watt für 15 beziehungsweise 30 min. gekocht. Die dabei verdampfte Flüssigkeit wurde jeweils ersetzt. Nach Abkühlung (20 min Raumtemperatur) wurden die Schnitte in TRIS-Puffer (50mM) gewaschen (2x5 min). In Abhängigkeit von dem verwendeten Primärantikörper wurde die Untersuchung mit einer der folgenden detailliert besprochenen Techniken fortgeführt.

#### Avidin-Biotin Methode

Im ersten Schritt wird ein Primär-Antikörper gegen das gesuchte Antigen aufgetragen. Darauf folgt ein gegen den ersten Antikörper gerichteter biotinylierter, polyklonaler Zweit-Antikörper, gewonnen aus einer anderen Tierspezies als der Primär-Antikörper. Der dritte Schritt ergibt sich aus einem peroxidase-konjugierten Streptavidin-Komplex, bei dem das Streptavidin mit dem Biotin des Sekundär-Antikörpers eine Verbindung herstellt. Es kamen entweder der VECTASTAIN®ELITE ABC KIT (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Ca, USA) oder der UNIVERSAL DAKO®LSAB KIT (DAKO Cytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) zur Verwendung.

Im Detail erfolgten nach Vorbehandlung und Antigendemaskierung folgende Schritte: Die endogene Gewebsexidase wurde mit 7,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert (10 min) und die Schnitte danach in TRIS-Puffer gewaschen (2x5 min). Als weiterer Blockierungsschritt folgte im VECTASTAIN®System ein Blocking Reagens vom Tier des Brückenantikörpers (20 min, Raumtemperatur), im DAKO®L-System eine LSAB-Blockierungslösung (synthetischer Proteinblocker, 10 min, Raumtemperatur), anschließend die Inkubation mit dem jeweiligen Primär-Antikörper (jeweils 60 min, Raumtemperatur). Nach Waschen in TRIS-Brij-Puffer (2x5 min) wurde der biotinilierte Sekundär-Brücken-Antikörper appliziert (30 min), erneut gewaschen und entweder mit

Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (VECTASTAIN®System) oder mit Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (DAKO®L-System) inkubiert (30 min). Nach Waschen in TRIS-Brij-Puffer (2x5 min) erfolgte die Detektion mit Inkubation (etwa 10 min) mit einem geeigneten Chromogen, z.B. 3-Amino-9-Ethylcarbazol – AEC (Bio Genex, San Ramon, California, USA) oder 3,3'-diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid – DAB (DAKO). Nach Spülung in fließendem Wasser (10 min) folgte eine Gegenfärbung mit Hematoxylin Gill's Formula (Vector H 3401; 10 bis 30 Sekunden) und die Eindeckelung mit Kaiser's Glyceringelatine.

#### Alkalische Phosphatase – Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Methode

Der Nachweiskomplex besteht aus Anti-Maus-Immunglobulinen vom Kaninchen, monoklonalen Antikörpern gegen alkalische Phosphatase aus Kälberdarm sowie aus alkalischer Kälberdarmphosphatase. Es kam ein hochempfindliches und standardisiertes Nachweissystem (APAAP System, DAKO®) zur Anwendung. Nach Vorbehandlung und Antigendemaskierung wie beschrieben wurden die Schnitte in TRIS-Puffer (50 mM) gewaschen (2x5 min) und mit dem Primär-Antikörper inkubiert (jeweils 60 min, Raumtemperatur). Anschließend wurde in TRIS-Brij-Puffer gewaschen (2x5 min), mit APAAP-Maus-IgG (1:25, DAKO®, 30 min) inkubiert, in TRIS-Brij-Puffer gewaschen (2x5 min), mit APAAP-Komplex (1:50, DAKO®) inkubiert und nochmals gewaschen. Eine weitere Inkubation mit APAAP-Maus-IgG (10 min) und mit APAAP-Komplex (10 min) mit anschließenden Waschungen wurde je nach verwendetem Antikörper einmal durchgeführt oder nochmals wiederholt. Die Detektion erfolgte durch FAST RED (Sigma, St. Louis, USA; 10 min).

### Kontrollverfahren bei Immunhistologie

Bei allen Färbungen wurden zur Sicherstellung der Spezifität der immunhistologischen Reaktionen Kontrollen mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde in einem Versuch der Primär-Antikörper jeweils durch Isotyp-Immunglobuline von Maus oder Kaninchen ersetzt (Isotypkontrolle) und zusätzlich wurde in einem anderen Versuch der Primär-Antikörper durch Antikörperverdünnungsmedium ersetzt (Systemkontrolle). Nur wenn bei diesen Isotyp- und System-Kontrollen keine unspezifische immunhistologische Färbereaktion nachweisbar war, wurde der entsprechende immunhistologische Färbedurchgang gewertet.

Externe Positivkontrollen mit bekannter spezifischer Färbereaktion und Negativkontrollen mit bekannter negativer Reaktion wurden bei jeder Austestung eines Antikörpers mitgeführt. Häufig zusätzlich in den Schnitten verfügbare interne positive und negative Kontrollen in ortsständigem Epithel oder Stroma wurden grundsätzlich auch als interner Standard für die Auswertung der jeweiligen immunhistologischen Reaktionen mitberücksichtigt. Zur weiteren Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden alle Färbungen in Serien mit der gleichen standardisierten Methodik durchgeführt.

In Kenntnis der hohen endogenen Biotin-Konzentration insbesondere in oxyphilen Zellen von Streifenstück und Ausführungsgang, in niedrigerer Konzentration auch in Schaltstückepithelien der Speicheldrüsen, wurde zur Vermeidung einer falsch-positiven Reaktion ein Avidin-Biotin-Blockierungssystem (DAKO, Biotin Blocking System, X0590) bei allen auf ABC- beziehungsweise LSAB-Techniken beruhenden Nachweissystemen eingesetzt.

### Auswertung der immunhistologischen Ergebnisse

Der Schwerpunkt der Untersuchung lag bei der morphometrischen Erfassung verschiedener Aspekte der Myoepithelzellen mittels verschiedener zytoplasmatischer und nukleärer Marker (siehe ausführliche Diskussion in Kapitel 2.2.3 und 2.4.2). Die Bestimmung des Proliferationsindex erfolgte über eine prozentuale Auszählung positiver Reaktionen des nukleären, proliferations-assoziierten Markers Ki67 an jeweils 1000 Kernen eines zu untersuchenden Zelltyps (Azinuszelle und Myoepithelzelle), jeweils identifiziert durch zytologische Kriterien, topographische Lokalisation und eine geeignete immunhistologische Doppelfärbung (CK 14/Ki 67).

Aufgrund des sehr niedrigen basalen Zellumsatzes in menschlichen Speicheldrüsen und der allgemein schnellen phagozytotischen Abräumung von Apoptosekörperchen erwies sich die Zahl von immunhistologisch detektierbaren Apoptosen (ermittelt mit der M30-Reaktion) in normalen Speicheldrüsen als äußerst niedrig (siehe Diskussion in Kapitel 2.2.2). In Vortestungen an Sialadenosefällen zeigte sich dadurch eine prozentuale Erfassung der Apoptoseindizes analog der Zählung bei Ki67 als nicht praktikabel. Es erfolgte stattdessen eine Erfassung von durch M30 identifizierten Apoptosen durch kumulative Addition aller Apoptosen in 20 Gesichtsfeldern bei starker Vergrößerung (Gesichtsfeld 20; Objektiv 20x).

## 2.2.2 Verwendete Antikörper

Steckbriefartige Charakterisierung wichtiger verwendeter Antikörper

### Intermediärfilamente vom Zytokeratin (CK)-Typ

Die Intermediärfilamente vom Zytokeratin (CK)-Typ repräsentieren neben anderen Intermediärfilament-Typen (u.a. Desmin, Vimentin, Neurofilament) den wichtigsten Bestandteil des Zytoskeletts der Epithelzellen. Sie bilden mit einem dreidimensional durchflochtenen und im Bereich der Kern- und Zytoplasmamembran konzentrierten Netzwerk die wichtigste Komponente der zytoplasmatischen und damit zellulären Stabilität. Die CK-Gruppe ist eine komplexe Proteinfamilie von etwa 20 verschiedenen CK-Subtypen. Grundlage einer Klassifikation und Nummerierung (CK 1-20) nach *Moll et al.* (1982/1993) ist einerseits eine Einteilung in eine saure (Klasse I) und eine neutral-basische Gruppe (Klasse II) und andererseits eine Unterscheidung nach dem Molekulargewicht (zwischen 40 und 68 kDa). In den Filamenten sind die CK-Polypeptide immer paarweise in einem Heterodimer aus einem Klasse I- und Klasse II-CK angeordnet.

Die Mehrzahl der CK-Subtypen ist in verschiedenen Epithelzelltypen nachweisbar, umgekehrt exprimieren die überwiegende Mehrzahl der Epithelzelltypen mehrere CK-Subtypen (zwischen 2 und 10). Eine absolute diagnostische Spezifität für einen bestimmten Zelltyp liegt somit praktisch nie vor. Ein diagnostischer Nutzen ist in den meisten Situationen nur durch charakteristische Kombinationen mehrerer CK-Subtypen zu erzielen.

Bei komplexen Organ- beziehungsweise Drüsenstrukturen mit anatomischer Zusammensetzung aus mehreren verschiedenen Zelltypen, zum Teil auch topographisch

in verschiedenen Gangabschnitten angeordnet (siehe Speicheldrüsen) kann sich insofern ein scheinbar buntes Muster einer CK-Expression ergeben, weil die einzelnen beteiligten Zelltypen jeweils unterschiedliche, mehr oder weniger charakteristische CK-Muster aufweisen. Immunhistologische Reaktionen gegen die CK-Subtypen stellen im Modell der Speicheldrüsen die wichtigste Methode zur sicheren Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen dar. In der vorliegenden Untersuchung wurde CK14 zur Identifizierung der Myoepithelzellen und CK7 zur sicheren Abgrenzung CK7-negativer Azinuszellen von CK7-positiven Gangepithelien (Schaltstücke und Streifenstücke) verwendet.

Die folgende Tabelle 2 stellt in stark verkürzter und vereinfachter Form wichtige CK-Subtypen mit entsprechender typischer Expression in verschiedenen Zell- bzw. Epitheltypen gegenüber (in allgemeiner Hinsicht sowie speziell in Speicheldrüsen).

Tab. 2: Wichtige CK-Subtypen

	Klasse I	Klasse II	Zell- bzw. Epitheltyp allgemein	Korrespondierende(r) Zelltyp(en) in normalen Speicheldrüsen
Drüsenepithel	18	8	Generell Parenchym- bzw. Drüsenepithelien	Azinuszelle, Schaltstückzelle, Oxyphile Zelle
	19	<b>7</b>	Duktale (nicht azinäre) Drüsenepithelien	Schaltstückzelle, Oxyphile Zelle
	20	-	Gastrointestinales Epithel	-
Basalzellen	<b>14</b>	5	Basalzellen, Suprabasalzellen mehrreihiger Epithelien, Myoepithelzellen	Basalzelle, Myoepithelzelle
Suprabasalzellen mehrschichtiger Epithelien	12	3	Cornealepithel	-
	13	4	Plattenepithelschleimhaut (suprabasal)	-
	10/11	1	Epidermis (suprabasal)	-
	16/17	6	Hyperproliferative Epidermis (suprabasal)	-

Index: **Fettdruck** bezeichnet die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten CK-Subtypen.

### p63

p63 wurde erst kürzlich als weiteres wichtiges Mitglied der p53-Familie identifiziert. Einzelne Isoformen (z.B. TAp63) können p53-Zielgene transaktivieren und so zur Apoptoseinduktion beitragen. Andere, in Normalgeweben dominierende Isoformen (vor allem  $\Delta$ Np63) inhibieren diese transaktivierenden Funktionen sowohl in p63 als auch in p53 in einer dominant-negativen Form. p63 (in der Isoform  $\Delta$ Np63) spielt eine Schlüsselrolle in der Regulierung von epithelialen Differenzierungsprogrammen, offensichtlich ohne dabei Einfluss auf das Ausmaß der Zellproliferation zu nehmen (Yang et al. 1999).

In menschlichem adultem Gewebe zeigt p63 eine hochspezifische und insofern diagnostisch verwertbare Gewebsverteilung mit nukleärem Nachweis ausschließlich in der basalen Zellschicht (Basalzellen) von zwei- und mehrreihigen Epithelien mit rascher Herunterregulierung in differenzierten suprabasalen Zellschichten. Zusätzlich zum Nachweis in Basal-/Reservezellen mehrreihiger Epithelien wurde kürzlich auch eine konstante Expression in Myoepithelzellen der Brustdrüse (*Barbareschi et al.* 2001) und der Speicheldrüse nachgewiesen. Letztere Reaktion wurde in der vorliegenden Untersuchung als zusätzliche, nukleär basierte Nachweismethode von Myoepithelzellen herangezogen.

#### Ki67 (MIB-1)

Es handelt sich um ein zellzyklus-assoziiertes, kernständiges Protein von 345 beziehungsweise 395 Kilo Dalton mit bis heute unbekannter Funktion. Das Ki67-Antigen ist exklusiv in allen Stadien des Zellzyklus nukleär nachweisbar, beginnend in der späten Phase von G<sub>1</sub>, mit ansteigender Expressionsstärke in der S- und G<sub>2</sub>-Phase und einem Maximum während der Mitose und anschließendem raschem Abfall (*Gerdes et al.* 1984). In zahlreichen Studien wurde eine gute Korrelation zwischen der quantitativen Ki67-Expression und anderen verwendeten Methoden des quantitativen Proliferationsnachweises (z.B. PCNA/proliferating cell nuclear antigen; AgNOR-Proteine) nachgewiesen.

Für viele menschliche Tumore wurde eine positive Korrelation hoher Ki67-Indizes sowohl mit dem histologischen Malignitätsgrad als auch in prognostischer Hinsicht mit dem klinischen Verlauf.

Zusätzlich kann das Ki67-Antigen bei Fragen der Gewebsregeneration und der Zelldifferenzierung herangezogen werden zur Ermittlung und Quantifizierung der in

bestimmten Geweben für die Zellproliferation zur Verfügung stehenden Zellpopulationen. Durch die hohe Stabilität des Ki67-Produkts stellt die Ki67-Immunhistologie mit der zusätzlichen Möglichkeit der Durchführung von immunhistologischen Doppelfärbungen einen herausragenden Vorteil gegenüber anderen Methoden der Proliferationsanalyse dar (siehe folgendes Kapitel 2.2.3; *Ihrler et al.* 2004a, 2004b).

### M30

Eine Caspase-vermittelte Fragmentierung von zytoplasmatischen Intermediärfilamenten (Zytokeratinen) stellt einen frühen Vorgang beim physiologischen Zelltod (Apoptose) von Epithelzellen dar. Dabei stellt die Detektion einer spezifischen, Caspase-induzierten Schnittstelle im CK18-Filament als Neo-Antigen (bezeichnet als L1-2) die Grundlage dar für eine immunhistologische Anwendung des monoklonalen M30-Antikörpers (*Caulin et al.* 1997). Aufgrund dieser Voraussetzung bleibt der Apoptosenachweis mit M30 auf Epithelzelltypen mit Expression von CK18 beschränkt.

Ein wichtiger Vorteil der M30-Technik liegt in der Anwendbarkeit an paraffineingebettetem Material mit guter Gewebserhaltung (*Leers et al.* 1999) und insofern guter Zuordenbarkeit der nachgewiesenen Apoptosen zu den in Frage kommenden Zelltypen des Speichelgangs. Zusätzliche zytologische Apoptosekriterien (speziell Kernkondensation und Kernfragmentation) wurden zur Absicherung der M30-Reaktion grundsätzlich mit herangezogen. Ein geringer Nachteil ist die fehlende Nachweisbarkeit für Apoptosen in den CK18-negativen Basalzellen und Myoepithelzellen der Speicheldrüsen.

Tab. 3: Tabellarische Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie

Antigen	Mab Klon	Bezugsquelle	Vorbehandlung	Antikörperverdünnung	Detektions-System
CK14	MCA890	Serotec	30' TRS6 MW	1:600	ABC-(E)
CK7	K <sub>s</sub> 7.18	Progen	15' Citrat MW	1:80	Picture Mouse
$\alpha$ -Aktin	Asm-1	Roche Diagn	30' TRS6 MW	1:500	SAB
S-100	polyklonal	DAKO	-	1:400	LSAB
M30 Cytod	M30	Roche Diagn	15' Citrat MW	1:80	Picture Mouse
p63	BC4A4	Biocarta	30' TRS6 MW	1:120	LSAB
Ki67	MIB-1	Dianova	30' TRS6 MW	1:50	APAAP

Index: Nach Ihrler 2004b.

### 2.2.3 Technik der immunhistologischen Doppelfärbung

Zur exakten quantitativen Analyse einer Koexpression von verschiedenen immunhistologischen Zellmarkern beziehungsweise zur genauen Zuordnung einer bestimmten Reaktion zu verschiedenen Zelltypen wurden in früheren Untersuchungen (Ihrler *et al.* 1999, 2000, 2004a, 2004b) verschiedene immunhistologische Doppelmarkierungen etabliert. Hierzu waren umfangreiche Vortestungen erforderlich, um die jeweiligen Detektionsmethoden und Farbsysteme sowie eine für beide Reaktionen optimale Vorbehandlung aufeinander abzustimmen.

Speziell erwiesen sich für eine genaue Ermittlung der Proliferationsindizes in normalen, sowie reaktiv-metaplastisch beziehungsweise neoplastisch veränderten Speicheldrüsen

Doppelfärbungen einerseits gegen Ki67 und andererseits gegen verschiedene Antikörper als optimal. In der vorliegenden Untersuchung erwies sich die immunhistologische Doppelfärbung CK14-Ki67 als beste Reaktion zur sicheren Zuordnung einer Zellproliferation zu Azinuszellen beziehungsweise zu Myoepithelzellen. Aus technischen Gründen war eine Doppelfärbung unter Beteiligung des Apoptosemarkers M30 nicht realisierbar.

Tab. 4: Methodische Details der verwendeten immunhistologischen Doppelfärbung

Doppelfärbung	Vorbehandlung	1. AK Verdünnung / System / Farbe	2. AK Verdünnung / System / Farbe
CK14 + Ki67	30' TRS6 MW	1:900/ABC-E/DAB+	1:50/APAAP/Fast Red

Index: Nach Ihrler 2004b.

## 2.3 Methodik der histomorphologischen Befunderhebung

Die zu untersuchenden Schnitte wurden mikroskopiert und die relevanten Bereiche unter dem Mikroskop fokussiert. Darauf folgend wurde die Präparatstelle mit einer Digitalkamera (AxioCam HRc, Zeiss) mit einer Auflösung von 1388x1040dpi (entspricht 1,44MB) fotografiert. Im Anschluß an dieses Aufnahmeverfahren folgte die interaktive Messung der einzelnen Parameter mittels zugehöriger Software (Axiovision Rel. 4.2, Zeiss). Die so gewonnenen Daten wurden anschließend in Microsoft Office Excel und SPSS ausgewertet.

### Technische Voraussetzungen

Die histomorphologische Befunderhebung erfolgte mit einem Axioplan 2 imaging – Mikroskop (Zeiss), einer adaptierten Digitalkamera (AxioCam HRc) und einem an beide

Geräte angeschlossenen Personal Computer, welcher mit der zugehörigen Software (Axiovision Rel 4.2) ausgestattet war (siehe auch Tab. 5 und 6).

Tab. 5: Mikroskop: Axioplan 2 imaging Pol, Zeiss

Stativ	Tubus	Reflektorrevolver	Objektivrevolver	Polarisatoren	Analysatoren
Durchlicht	Binokulartubus mit Fotoausgang	8 fach, manuell	6-fach Pol mit Einzelzentrierung	+	Analysator-modul

Index: Angaben Fa. Zeiss, Jena.

Tab. 6: Kamera: AxioCam HRc, Zeiss

Basisauflösung	1388 x 1040 = 1,4 Mega Pixel <sup>1)</sup>		
Pixel-Größe	6,45 µm x 6,45 µm		
Spektrale Empfindlichkeit	300.....1000 nm (s/w Sensor)		
Wählbare Auflösungen (s/w & RGB)	Horizontal		Vertikal
	694	x	520
	1388	x	1040 <sup>1)</sup>
	2776	x	2080
	4164	x	3120
Auslesen von Bild-Teilbereichen	Wahlfreie Definition von interessierenden Teilbereichen auf dem Sensor		
Digitalisierung	12 Bit / 18 Mhz Pixeltakt		
Bereich der Belichtungszeit	1ms bis mehrere Minuten		
Kühlung	Einstufige Peltier-Kühlung		
Max. Dateigröße pro Bild	Ca. 75 MB bei 4164 x 3120		
Betriebssysteme	Win 95/98, ME, Win NT 4.0, Win 2000, Win XP		
Größe / Gewicht	ca. 11cm x 8cm x 6,5cm / 0,5 kg (Kamerakopf)		
Netzteil	Standard, 12 V DC, 1 A, 220 V/110 V		

Index: <sup>1)</sup>Einzelbelichtung: Farbaufnahmen mit interpolierter Farbqualität, geringere Auflösung in den Farbkanälen. Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurde diese Auflösung für die Morphometrie verwendet. Angaben Fa. Zeiss, Jena.

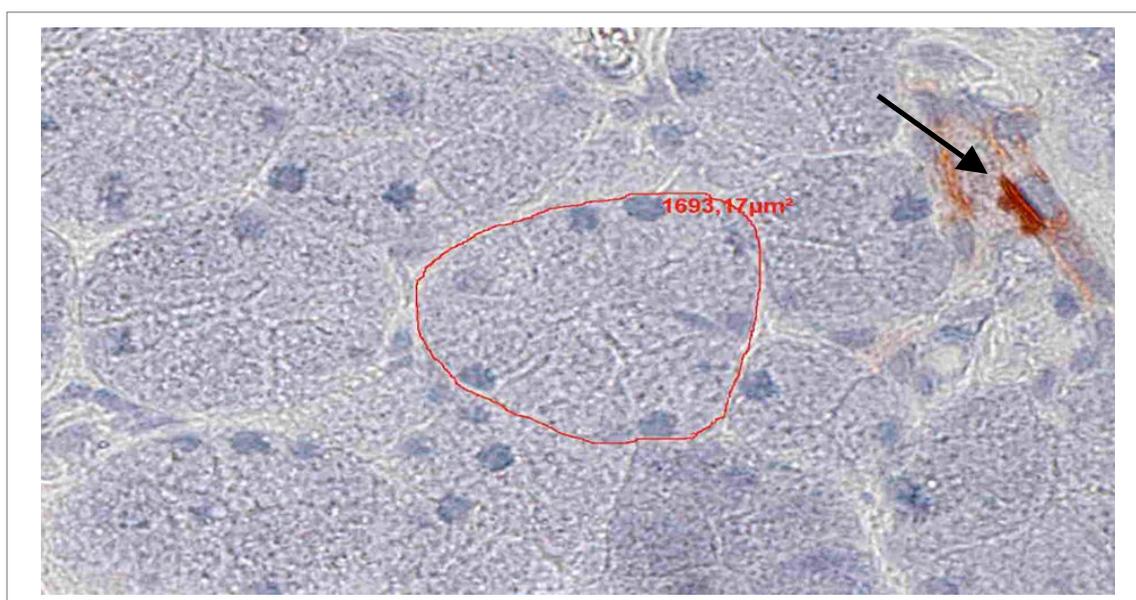
## 2.4 Morphometrische Messungen

### 2.4.1 Flächen der Azini

Vor der Entwicklung moderner morphometrischer Messverfahren wurden früher die durchschnittlichen Durchmesser der Drüsenazini bestimmt. Mit dieser Methode gab *Seifert* Durchmesser zwischen 40 und 70 $\mu\text{m}$  (bis max. 100 $\mu\text{m}$ ) als charakteristisch für die vergrößerten Drüsenazini bei der Sialadenose an.

Zur Vergleichbarkeit mit früheren Studien haben wir in Vorversuchen die Durchmesser von Sialadenosefällen bestimmt und fanden als Bestätigung der Diagnose für die Durchmesser der vergrößerten Drüsenazini vergleichbare Werte (Mittelwert: 79,9 $\mu\text{m}$ ) zu früheren Untersuchungen (*Seifert et al.* 1991). Die moderne Software für morphometrische Messungen in der Pathologie erlaubt heute eine wesentlich sensitivere und genauere Erfassung von morphometrischen Kriterien, hier zum Beispiel der Fläche von Azini (siehe auch Abb. 10).

Abb. 10: Morphometrische Flächenbestimmung an einem Azinus mit Sialadenose (CK7)



Index: Foto mit HRe Digitalkamera, Vermessung mit AxioVision Rel. 4.2-Software (Vergrößerung: 400fach); die CK7-Färbung dient bei der Azinusbestimmung dem sicheren Ausschluss von CK7-positiven Gangstrukturen (Pfeil).

## 2.4.2 Quantitative beziehungsweise qualitative Analyse der Myoepithelzellen

Die bestmögliche Erfassung der Quantität und Qualität der Myoepithelzellen stellte eine zentrale Frage bei der vorliegenden Untersuchung dar, wofür eine Reihe immunhistologischer Marker zur Verfügung steht (Moll *et al.* 1993). In Vorversuchen wurden folgende drei immunhistologische Marker zur Erfassung der Myoepithelzellen als am besten geeignet identifiziert: p63, Cytokeratin 14, und  $\alpha$ -Aktin.

### p63

Problematisch bei der Erfassung von Myoepithelzellen mittels p63 ist, dass nur der Kern der Myoepithelzelle markiert wird. Der Kern der Myoepithelzelle (4-6 $\mu$ m Durchmesser) ist jedoch im Verhältnis zur Gesamtzelle, welche mit ihren zytoplasmatischen Ausläufern den gesamten Azinus umfasst (Durchmesser 30-40 $\mu$ m bei Normaldrüsen und 50-100 $\mu$ m bei Sialadenosen) sehr klein. Bei der vorliegenden Schnittdicke des Präparats ( $\sim$  2 $\mu$ m) wird der Kern der Myoepithelzelle somit sehr häufig nicht erfasst und folglich bei alleiniger Erfassung des Kerns die Quantität von Myoepithelzellen pro Azinuseinheit statistisch deutlich unterschätzt (siehe Abb. 11).

### CK 14

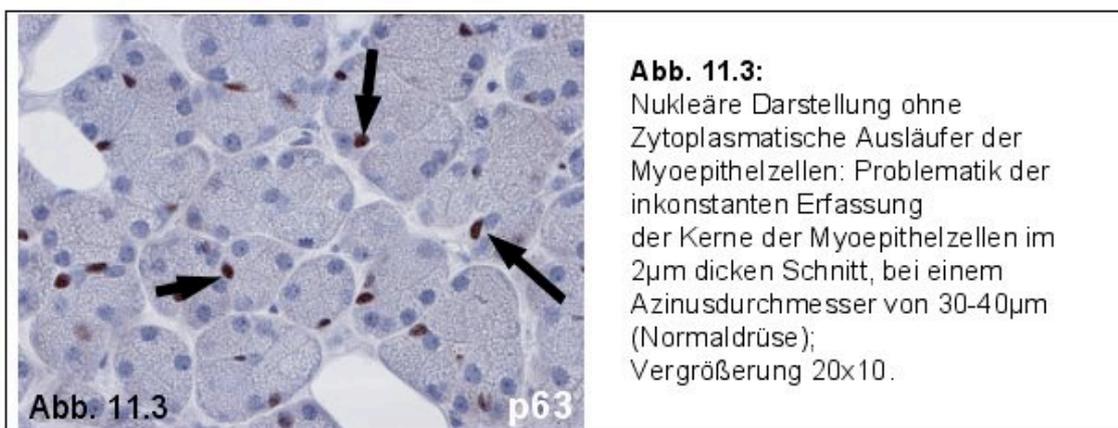
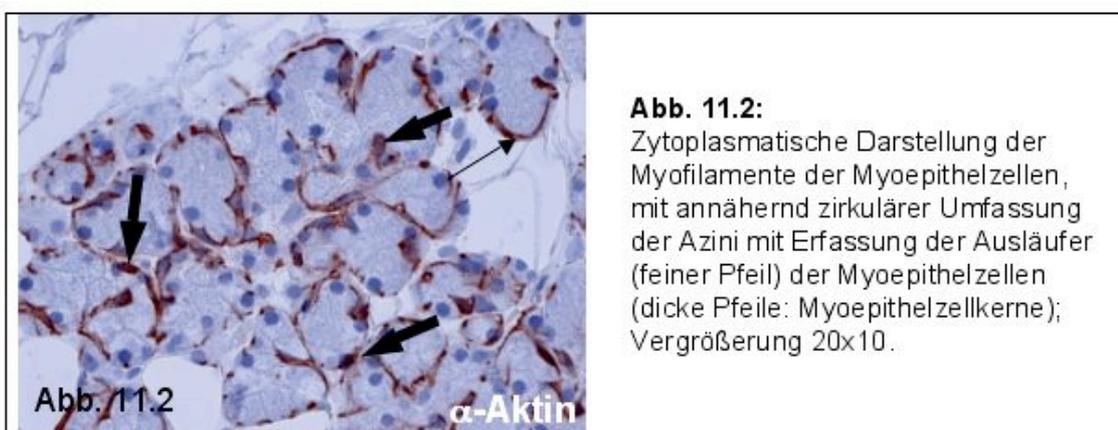
Mit dem Marker Cytokeratin 14 wird im Gegensatz zur p63 - Färbung nicht der Kern, sondern die gesamte zytoplasmatische Ausdehnung der korbgeflechtartigen Myoepithelzelle dargestellt. Bei einer Schnittdicke von 2 $\mu$ m und einem Durchmesser der Azinuszelle von 30-40 $\mu$ m (bei Normaldrüsen) ist unter der Annahme, dass die Myoepithelzelle den Azinus annähernd zirkulär, korbgeflechtartig umgibt (siehe Abb. 5) eine Erfassungswahrscheinlichkeit von annähernd 100 % anzunehmen. Mit der zur Erfassung der Myoepithelzellen besser geeigneten CK14-Methode war es somit

möglich, im Vergleich zur nukleären Messung von p63 das Vorhandensein der gesamten zytoplasmatischen Zellausläufer wesentlich sensitiver zu erfassen (Abb. 11).

### $\alpha$ -Aktin

$\alpha$ -Aktin wird in der Literatur (*Ihrler et al.* 2000, *Moll et al.* 1993) als klassischer Marker für den Nachweis von Myoepithelzellen angeführt. Im Gegensatz zur intermediärfilamentären Darstellung von CK14 färbt  $\alpha$ -Aktin die kontraktile Myofilamente (Aktinfilamente) der Myoepithelzellen. Anlass zur vorliegenden Untersuchung in Sialadenosefällen gaben kasuistische Beobachtungen, in denen eine starke Verminderung von  $\alpha$ -Aktin-positiven Fasern aufgefallen waren. Insofern lag es nahe zu überprüfen, ob bei sialadenotisch veränderten menschlichen Speicheldrüsen im Gegensatz zu Normaldrüsen nur eine Verminderung von  $\alpha$ -Aktin-positiven Myofilamenten ohne Verlust von Myoepithelzellen oder ein genereller Verlust von Myoepithelzellen vorliegt, am besten zu beurteilen im direkten Vergleich von  $\alpha$ -Aktin- zu CK14-Färbungen. Trotz der offensichtlichen technischen Einschränkung durch die alleinige Kerndarstellung wurde die p63-Reaktion zum Vergleich mit ausgewertet.

Abb. 11: Vorversuche zur Problematik der morphologischen Messung verschiedener immunhistologischer Nachweisverfahren von Myoepithelzellen am Beispiel von Schnitten aus Normaldrüsen



Index: Eigene Darstellung.

Die Datenerhebung für den Nachweis des Aktinfilamentverlusts gestaltete sich wie folgt: Die komplett im Schnitt erfassten Azini wurden einzeln in ihrem Umfang umfahren und automatisch vermessen. Im Anschluss wurden die am Azinus direkt anliegenden nachweisbaren Abschnitte von Myoepithelfilamenten jeweils einzeln

erfasst und addiert. Es wurde ein Quotient gebildet aus dem Verhältnis der addierten myofilamentären Teilstücke zum Gesamtumfang des Azinus. Dieser Quotient wurde pro Patientenfall (Normaldrüsen und Sialadenosen) jeweils an 50 Azini ermittelt mit Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung.

### **2.4.3 Erfassung der Zellproliferation in Azinuszellen und Myoepithelzellen**

Eine möglichst exakte Erfassung der Zellproliferation in Azinuszellen und Myoepithelzellen wurde durch die immunhistologische Doppelfärbung CK14/Ki67 ermöglicht. Die Bestimmung der Proliferationsindizes in den Sialadenosefällen erfolgte über eine Auszählung positiver nukleärer Reaktionen des proliferations-assoziierten Markers Ki67 einerseits an 1000 Kernen CK14-negativer Azinuszellen und andererseits an 1000 Kernen CK14-positiver Myoepithelzellen. Die durchschnittlichen Proliferationsindizes von Azinuszellen und Myoepithelzellen in Normaldrüsen wurden früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe (*Ihrler et al.* 2004a) entnommen.

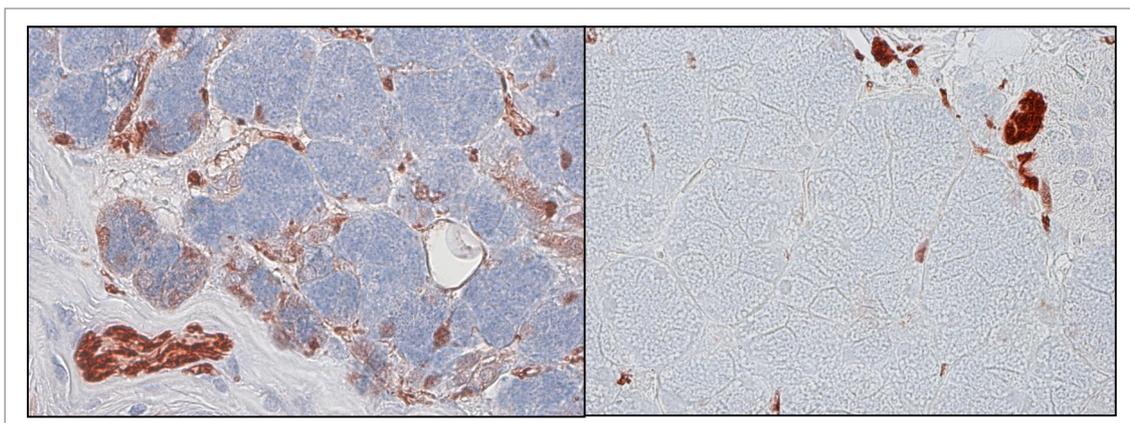
### **2.4.4 Quantifizierung der Zellapoptose**

Aufgrund der außerordentlichen Seltenheit von Apoptosen in normalen und sialadenotisch veränderten Speicheldrüsen (gemäß Voruntersuchungen) erfolgte eine Erfassung von durch M30 identifizierten Apoptosen in den Sialadenosedrüsen durch kumulative Auszählung in 50 Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung. Die Werte für Apoptosen in Normaldrüsen wurden früheren Untersuchungen (*Ihrler et al.* 2002) entnommen. Die Bestimmung der Zellapoptose in Myoepithelzellen mittels M30-Technik war aus technischen Gründen nicht möglich (siehe Kap. 2.2.2).

### 2.4.5 Sonstige morphologische Datenerhebungen

Auf der Basis von früheren ultrastrukturellen Befunden mit Hinweisen auf degenerative Veränderungen in Nervenfasern (*Seifert et al. 1975*) stellte sich die Frage, inwieweit eine qualitative und quantitative Erfassung von peripheren Nervenfasern am ausschließlich verfügbaren paraffin-eingebetteten Material möglich ist. Nach Lage der Literatur und eigenen Vortestungen erwies sich die S100-Reaktion mit Darstellung der Schwannschen Hüllzellen von Nervenfasern als am besten geeignete Methode. Erschwerend für die Analyse in Speicheldrüsen ist jedoch die parallele Expression von S100 in Azinuszellen, Schaltstückepithelien und Myoepithelzellen (siehe auch Abb. 12). Es wurde versucht eine Quantifizierung von peripheren S100 gefärbten Nervenstrukturen durchzuführen. Als standardisierte Bezugsgröße wurde die Fläche von 10 Azini im Verband festgelegt. Da Sialadenosen im Langzeitverlauf zu einer lipomatösen Atrophie führen sollen, wurde das Ausmaß einer Drüsenverfettung semiquantitativ in 10%-Schritten bestimmt.

Abb. 12: S100 Reaktion in Normaldrüsen und Sialadenosedrüsen



Index: S100 Reaktion (rottbraun) an einer Normaldrüse (linkes Bild - parallele Expression von nervalen Strukturen, Azinuszellen, Schaltstückepithelien und Myoepithelzellen machen eine Quantifizierung nervaler Strukturen unmöglich) und an einer Sialadenosedrüse (rechtes Bild). Beachtlich ist jedoch die eindrucksmäßige Verminderung von S100.

## **2.5 Statistische Auswertung**

Nach der Datenerhebung wurden sämtliche Werte mit Hilfe des Kolmogorof-Smirnov-Tests auf Normalverteilung untersucht. Die Werte beider unabhängiger Gruppen (Normaldrüsengruppe und Sialadenosegruppe) erwiesen sich als normalverteilt. Für die verschiedenen, jeweils separat untersuchten Parameter wurde überprüft, ob sich die unterschiedlichen Merkmalsausprägungen in den einzelnen Gruppen als statistisch signifikant darstellten. Diese Überprüfung wurde mittels T-Test durchgeführt. Folgende p-Werte wurden als Signifikanzniveaus gewählt:  $p < 0,05$  entspricht signifikant,  $p < 0,005$  entspricht hochsignifikant,  $p < 0,001$  entspricht höchstsignifikant.

Vorgreifend möchten wir an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Dieter Hölzel und Herrn Dr. Christoph Weiler herzlich für die Unterstützung und Beratung bei der Bearbeitung und statistischen Auswertung der Daten bedanken.

## **3 Material: Patientenkollektive**

### **3.1 Kontrollkollektiv von Normalspeicheldrüsen**

Reguläres Speicheldrüsengewebe wurde gewonnen von 11 Operationspräparaten der Gl. parotis, primär reseziert wegen kleiner gutartiger Tumoren (pleomorphe Adenome oder Whartin-Tumore). Es wurden in die Untersuchung nur Fälle mit anatomisch regelhaftem Drüsenparenchym ohne relevante Entzündung oder Fibrose einbezogen, lediglich eine geringe interstitielle Lipomatose wurde akzeptiert. Der Altersdurchschnitt der operierten Patienten (5 Frauen, 6 Männer) lag bei 47,5 Jahren ( $\pm 8,2$  Jahre SA).

### **3.2 Kollektiv von Speicheldrüsen mit Sialadenose**

Mittels Archivrecherche im Pathologischen Institut der Ludwig Maximilians Universität München wurden alle verfügbaren Sialadenosefälle von 1995 bis 2003 rekrutiert. Zusammengefasst haben wir ein Kollektiv von vier Frauen und sechs Männern mit einem Durchschnittsalter von 44,9 Jahren (+/- 8,2 Jahre SA) zum Zeitpunkt der Biopsie beziehungsweise der Resektion. Die Biopsate beziehungsweise Resektate mit der Diagnose stammten ausschließlich aus der Glandula Parotis.

Tab. 7: Klinische Daten der Sialadenosepatienten

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10*
Geschlecht (m/w)	w	m	m	m	w	m	m	m	w	w
Alter (in Jahren)	47	52	52	54	39	43	50	47	28 <sup>1)</sup>	37 <sup>1)</sup>
Subjektive Dauer der Schwellung	3 J.	1 M.	2)	1 J.	2 J.	1.M	7 J..	12 J.	4 J.	1+7 J.
Grunderkrankung / Risikofaktoren	PPNP	2)	AIDS	2)	2)	2)	AA	AA	B	A, B
Schwellung beidseits/ einseitig	bds.	bds.	eins.	eins.	bds.	eins.	eins.	bds.	bds.	bds.
Maximale Größe des Resektats	1	2,5	1	7	1	1	2	7,5	5+5	5+5
Schmerzhaftigkeit <sup>2)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Sicca-Symptomatik der Schleimhäute <sup>2)</sup>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-

Index: S1-10: Sialadenosefälle, \* : Sialadenosefall mit Verlaufsbiopsie, w: weiblicher Patient, m: männlicher Patient, J.: Jahre, M: Monate, bds.: beidseitig, eins.: einseitig, PPNP: periphere Polyneuropathie, AIDS: Acquired immune deficiency syndrome, AA: Alkoholabusus, B: Bulimie, A: Anorexie, <sup>1)</sup>: Alter bei der ersten Resektion, <sup>2)</sup>: aufgrund der möglicherweise ungenügenden Erhebung der klinischen Befunde kann hier eine ungenügende Erfassung nicht ausgeschlossen werden (siehe Text).

Die klinischen Daten der Patienten wurden retrospektiv aus den Patientenakten erhoben. Dabei zeigte sich, dass bei einem Teil der Patienten beziehungsweise einem Teil der erfassten Parameter die Datenlage offenbar nicht vollständig ist. Es ist nicht auszuschließen, dass zu den Fragen der Beidseitigkeit der Schwellung sowie zum Vorliegen von Schmerz und Sicca-Symptomatik die Aktenlage unvollständig ist und diese Parameter nicht vollständig erfasst sind. Dies beinhaltet vermutlich auch eine ungenügende Erfassung der zu Grunde liegenden Grunderkrankungen (beziehungsweise Auswirkungen von Medikationen), da nur bei sechs von zehn Patienten in den Patientenakten Grunderkrankungen erkennbar sind. Die erheblich unterschiedlichen

Größen der Operationspräparate beruhen darauf, dass bei einem Teil der Patienten zum Beispiel aus kosmetischen Gründen die Glandula Parotis subtotal entfernt wurde, in einem anderen Teil jedoch nur kleine Probeexzisionen zur histologischen Diagnosesicherung erfolgten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Normaldrüsen

Tab. 8: Ergebnisse der Normaldrüsen\*

	K1	K2	K3	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11	Mittelw (SA)
Durchschnittliche Flächen der Azini (in $\mu\text{m}^2$ )	<b>860,3</b> (+/- 181,4)	<b>874,6</b> (+/- 222,5)	<b>875,4</b> (+/- 162,5)	<b>978,7</b> (+/- 242,0)	<b>1104,7</b> (+/- 258,9)	<b>1034,7</b> (+/- 216,9)	<b>1214,0</b> (+/- 297,0)	<b>1282,1</b> (+/- 300,7)	<b>956,6</b> (+/- 188,2)	<b>948,5</b> (+/- 231,2)	<b>1017,5</b> (+/- 139,2)
Anteil der Azini mit Myoepithel- zellen in % (CK 14)	<b>96,4</b>	<b>97,0</b>	<b>99,2</b>	<b>98,6</b>	<b>97,4</b>	<b>99,2</b>	<b>83,2</b>	<b>99,6</b>	<b>95,6</b>	<b>98,8</b>	<b>93,8</b> (+/- 10,0%)
Anteil der Azini mit p63 - positiven Myoepithel- zellen in %	<b>48,8</b>	<b>47,4</b>	<b>52,5</b>	<b>51,0</b>	<b>78,2</b>	<b>51,2</b>	<b>47,6</b>	<b>58,8</b>	<b>43,4</b>	<b>49,2</b>	<b>52,1</b> (+/- 9,6%)
$\alpha$ -Aktin- positive Myofilamente in <b>prozentualer</b> Relation zum Azinusgesamt- umfang	<b>51,5</b> (+/- 14,0)	<b>52,5</b> (+/- 13,6)	<b>50,1</b> (+/- 14,6)	<b>56,1</b> (+/- 17,6)	<b>39,4</b> (+/- 14,4)	<b>45,2</b> (+/- 14,7)	<b>46,8</b> (+/- 13,7)	<b>41,9</b> (+/- 16,4)	<b>53,8</b> (+/- 13,0)	<b>43,1</b> (+/- 10,9)	<b>47,2</b> (+/- 5,9)

Index: K1 – K11:

K = Kontrollfall

Mittelw. = Mittelwert

SA = Standardabweichung

CK 14 =Cytokeratin 14;

\*Daten zur Zellproliferation von Azinus – und Myoepithelzellen entsprechend früherer Untersuchungen (Ihrler et. al. 2004a).

Für die Azini der Normaldrüsen (K1 bis K11) ergab sich eine durchschnittliche Fläche von  $1017,5\mu\text{m}^2$  (Standardabweichung:  $\pm 139,2\mu\text{m}^2$ , vgl. Tab. 8). Der Anteil der Azini mit Myoepithelzellen (zytoplasmatische Reaktion mit CK14) im Verhältnis zur Gesamtanzahl der bei Normaldrüsen gezählten Azini betrug 93,8% (Standardabweichung:  $\pm 10\%$ , vgl. Tab. 8). Bei der nukleären Reaktion gegen p63 waren nur in 51,1% aller Azini Kerne von Myoepithelzellen nachweisbar. Dieser niedrige Wert in der p63-Methode resultiert aus der deutlich niedrigeren Erfassung von Myoepithelzellen pro Azinus bei p63 (zellkern-assoziiert). Die CK14-Reaktion hingegen erfasst die Myoepithelzellen wesentlich sensitiver, da sie das Zytoplasma und folglich die gesamte Myoepithelzelle mit ihren Ausläufern erfasst.

Es ist daher davon auszugehen, dass der tatsächliche Gehalt an Myoepithelzellen pro Azinus mit der CK14-Reaktion sehr gut, mit der p63-Reaktion jedoch ungenügend erfasst wird. In dem statistischen Vergleich in Kapitel 4.3 wurden daher nur die Ergebnisse der CK14-Reaktion eingebracht.

Als Mittelwert der Länge von  $\alpha$ -Aktin-positiven Myofilamenten der Myoepithelzellen in Relation zum Gesamtumfang des Azinus ergab sich in den Normaldrüsen 47,2% (Standardabweichung:  $\pm 5,9\%$ , vgl. Tab. 8). Die Werte für die Proliferation von Azinuszellen und von Myoepithelzellen in Normaldrüsen wurden aus früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Ihrler *et al.* 2004a) entnommen: Azinuszellen 2%, Myoepithelzellen 0,2%.

Bei einer semiquantitativen Erfassung in 10%-Schritten ergab sich für das Ausmaß der Drüsenverfettung bei den Normaldrüsen ein Mittelwert von 30% (Min.: 10%, Max.: 80%). Die Verfettung der Sialadenosedrüsen war im Mittel 20% und somit im Vergleich zu den Normaldrüsen gering niedriger. Eine eindeutige Quantifizierung S100-positiver

peripherer Nervenstrukturen stellte sich auf Grund der in Kap. 2.4.5 beschriebenen methodischen Probleme als nicht praktikabel dar (siehe auch Abb. 12).

## **4.2 Morphometrische Analyse der Sialadenosefälle**

Für die durchschnittliche Fläche der Azini ergab sich bei den Sialadenosepatienten ein Wert von  $1991,49 \mu\text{m}^2$  (Standardabweichung  $\pm 384,1 \mu\text{m}^2$ , vgl. Tab. 9). Im Vergleich zur wesentlich geringeren durchschnittlichen Fläche der Normaldrüsen entspricht dies der charakteristischen, diagnoseweisenden Azinusvergrößerung bei Sialadenose.

Tab. 9: Morphometrische Analyse der Sialadenosefälle

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9a	S9b	S10a	S10b	Mw. (SA)
Durchschnittl. Flächen der Azini (in $\mu\text{m}$ )	2048,3 (+/- 448,6)	1602,5 (+/- 320,7)	1526,5 (+/- 337,3)	2374,7 (+/- 535,0)	1684,8 (+/- 343,3)	1678,4 (+/- 340,1)	1828,4 (+/- 407,8)	2742,0 (+/- 531,7)	2176,7 (+/- 432,0)	1678,4 (+/- 551,3)	2393,3 (+/- 579,3)	2163,9 (+/- 668,2)	1991,5 (+/- 384,1)
Anteil der Azini mit Myoepithelzellen in % (CK 14)	87,1	88,8	83,2	72,6	76,6	63,6	88,0	37,2	82,0	85,2	85,2	78,4	77,2 (+/- 14,6)
Anteil der Azini mit p63-positiven Myoepithelzellen in %	1)	22,3	21,6	10,4	22,4	21,4	14,4	19,2	14,4	15,4	19,1	20,8	17,8 (+/- 4)
$\alpha$ -Aktin- positive Myofila- mente in <b>prozentualer</b> Relation zum Azinusge- samtumfang	2,8 (+/- 4,6)	8,6 (+/- 4,0)	8,7 (+/- 7,2)	13,4 (+/- 10,4)	7,0 (+/- 5,7)	6,5 (+/- 4,7)	6,5 (+/- 6,2)	0,9 (+/- 2,3)	7,9 (+/- 7,1)	4,9 (+/- 4,7)	10,1 (+/- 6,8)	8,3 (+/- 5,4)	7,2 (+/- 3,2)
Proliferation der Azinuszellen in %	1)	0,1	0,1	0,5	0,4	2,7	4,0	0,1	0,0	0,3	0,2	0,0	0,8 (+/- 1,3)
Proliferation der Myoepithelzellen in %	1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 (+/- 0)

Index: S 1-10b = Sialadenose-Patientenfälle (a: Resektat 1, b: Resektat 2, jeweils vom gleichen Patienten von unterschiedlichen Seiten mit zeitlichem Abstand)

Mw. = Mittelwert

SA = Standardabweichung

CK 14 = Cytokeratin 14

1) = verfügbare Schnitte nur für einen Teil der Untersuchungen ausreichend.

Der prozentuale Anteil der mittels der CK14-Reaktion darstellbaren Azini mit Myoepithelzellen im Verhältnis zur Gesamtanzahl der Azini betrug bei den Sialadenosefällen im Mittel 77,2% (Standardabweichung: +/- 14,6%, vgl. Tab. 9). Dabei wurden bei eindeutig spezifischer Reaktion auch sehr kurze Myoepithelzellanteile (zytoplasmatische Ausläufer) als positiv bewertet (vgl. Abb. 9).

In der nukleären p63-Darstellung waren im Mittel nur in 17,8% aller Azini Myoepithelzellen nachweisbar (Standardabweichung: +/- 4%, vgl. Tab. 9). Aufgrund der in Abb. 11 und in Kap. 4.1 ausführlich dargestellten Problematik einer ungenügenden Erfassung der Myoepithelzellen durch die auf p63 basierte Kerndarstellung wird im Folgenden in Kap 4.3 auf einen statistischen Vergleich der p63-Reaktion verzichtet.

Die mittels  $\alpha$ -Aktin-Reaktion darstellbaren Myofilamente der Myoepithelzellen umfassten in Relation zum Gesamtumfang der Azini in den Sialadenosedrüsen nur 7,2% (Standardabweichung: 3,2%, vgl. Tab. 9). Zusätzlich erwiesen sich die  $\alpha$ -Aktin-positiven Myofilamente in Sialadenosedrüsen qualitativ grundsätzlich als wesentlich dünner im Vergleich zu den Myofilamenten in Normaldrüsen (vgl. Abb. 9 und Abb. 11). Der Versuch eines direkten quantitativen Vergleichs der Faserdicke mittels morphometrischer Messungen erwies sich als nicht praktikabel.

Der Mittelwert für die Proliferation von Azinuszellen in Sialadenosedrüsen war 0,8% (Standardabweichung: +/- 1,3%, siehe Tab. 9). Zwei Patientenfälle (S6, S7) fielen durch überdurchschnittlich hohe Proliferation der Azinuszellen auf (2,7% beziehungsweise 4,0%). Diese überdurchschnittlich hohen Proliferationswerte ließen sich durch Vergleich mit den übrigen morphologischen Werten beziehungsweise den klinischen Befunden nicht abschließend interpretieren. Für die Proliferation von Myoepithelzellen in

Sialadenosedrüsen ergab sich ein Wert von 0%, wobei anzumerken ist, dass nur bei einem Patientenfall (S7) eine einzige proliferierende Myoepithelzelle nachweisbar war und bei allen anderen Fällen keine einzige proliferierende Myoepithelzelle nachweisbar war.

Die kumulative Auszählung der Sialadenosedrüsen ergab bei parallel laufenden positiven internen Kontrollen bei keinem einzigen der Sialadenosefälle eine M30-positive Apoptosemarkierung.

Die S100-Reaktion zeigte in der Mehrzahl der Sialadenosedrüsen neben einer verminderten Reaktion in Azinus- und Schaltstückzellen eine fragliche, eindrucksmäßig verminderte Darstellung von peripheren Nervenfasern (Abb. 12). Wie mehrfach diskutiert (vgl. Kap. 4.1) war eine sichere quantitative Erfassung und Vergleich von mittels S100-Reaktion dargestellten peripheren Nervenfasern aus methodischen Gründen nicht möglich, da eine sichere Unterscheidung kleiner peripherer Nervenfasern von anderen S100-positiven Strukturen wie zum Beispiel Myoepithelzellen nicht möglich war.

Bei semiquantitativer Erfassung der Drüsenverfettung ergab sich bei den Sialadenosedrüsen ein Mittelwert von ca. 20% (Min.: 10%, Max.: 70%).

### **4.3 Vergleich der untersuchten morphologischen Parameter in Normalspeicheldrüsen und Speicheldrüsen mit Sialadenose**

Die Flächenzunahme der Sialadenosedrüsen im Vergleich zu Normaldrüsen (Kontrolle) ist mit 93,1% hoch (statistisch höchstsignifikant) und liegt damit im Bereich früherer Untersuchungen (*Seifert et al.* 1984). Der prozentuale Anteil der Azini mit CK14-markierten Myoepithelzellen an allen Azini nimmt bei sialadenotisch veränderten Speicheldrüsen nur gering ab (-17,7%, dennoch hochsignifikant). Demgegenüber ist die Abnahme  $\alpha$ -Aktin-positiver Myofilamente in Relation zum Azinusgesamtumfang auffällig stark (-84,7%, statistisch höchstsignifikant), wobei zusätzlich eine auffällige qualitative Ausdünnung der Myofilamente zu berücksichtigen ist (vgl. Abb. 9).

Tab. 10: Vergleich Normaldrüsen (Kontrolle) und Sialadenosen

Messung / Gruppe		Mittelwert (Standardabweichung)	Prozentuale Zunahme/ Abnahme	Statistische Signifikanz
Durchschnittliche Flächen der Azini (in $\mu\text{m}^2$ )	Kontrolle	<b>1017,5</b> (+/- 139,2)	<b>Hohe Zunahme:</b> <b>+ 93,1%</b>	höchstsignifikant ( $p < 0,001$ )
	Sialadenose	<b>1991,5</b> (+/- 384,1)		
Prozentualer Anteil der Azini mit Myoepithel- Zellen in % (CK 14)	Kontrolle	<b>93,8%</b> (+/- 10,0%)	<b>Geringe Abnahme:</b> <b>- 17,7%</b>	hochsignifikant ( $p = 0,005$ )
	Sialadenose	<b>77,2%</b> (+/- 14,6%)		
$\alpha$ -Aktin-positive Myofilamente in prozentualer Relation zum Azinus- gesamtumfang	Kontrolle	<b>47,2%</b> (+/- 5,9%)	<b>Hohe Abnahme:</b> <b>- 84,7%</b>	höchstsignifikant ( $p < 0,001$ )
	Sialadenose	<b>7,2%</b> (+/- 3,2%)		
Proliferation der Azinuszellen in %	Kontrolle	<b>2,0%</b> (+/- 0,9%)	<b>Hohe Abnahme:</b> <b>- 65,0%</b>	signifikant ( $p = 0,02$ )
	Sialadenose	<b>0,8%</b> (+/- 1,3%)		
Proliferation der Myoepithelzellen in %	Kontrolle	<b>0,2%</b> (+/- 0,1%)	<b>Abnahme<sup>1)</sup></b>	1)
	Sialadenose	<b>0%<sup>1)</sup></b>		

Index: <sup>1)</sup>hier kein statistischer Vergleich möglich, da die Proliferation der Myoepithelzellen bei Sialadenose = 0%.

Vergleicht man die Proliferation der Azinuszellen beider Gruppen, so ist die Proliferation bei den Sialadenosedrüsen deutlich niedriger (-65%, statistisch signifikant). Die Proliferation der Myoepithelzellen ist in den Normaldrüsen mit nur 0,2% bereits sehr gering und nimmt bei den Sialadenosedrüsen noch ab beziehungsweise ist generell nicht nachweisbar (0%).

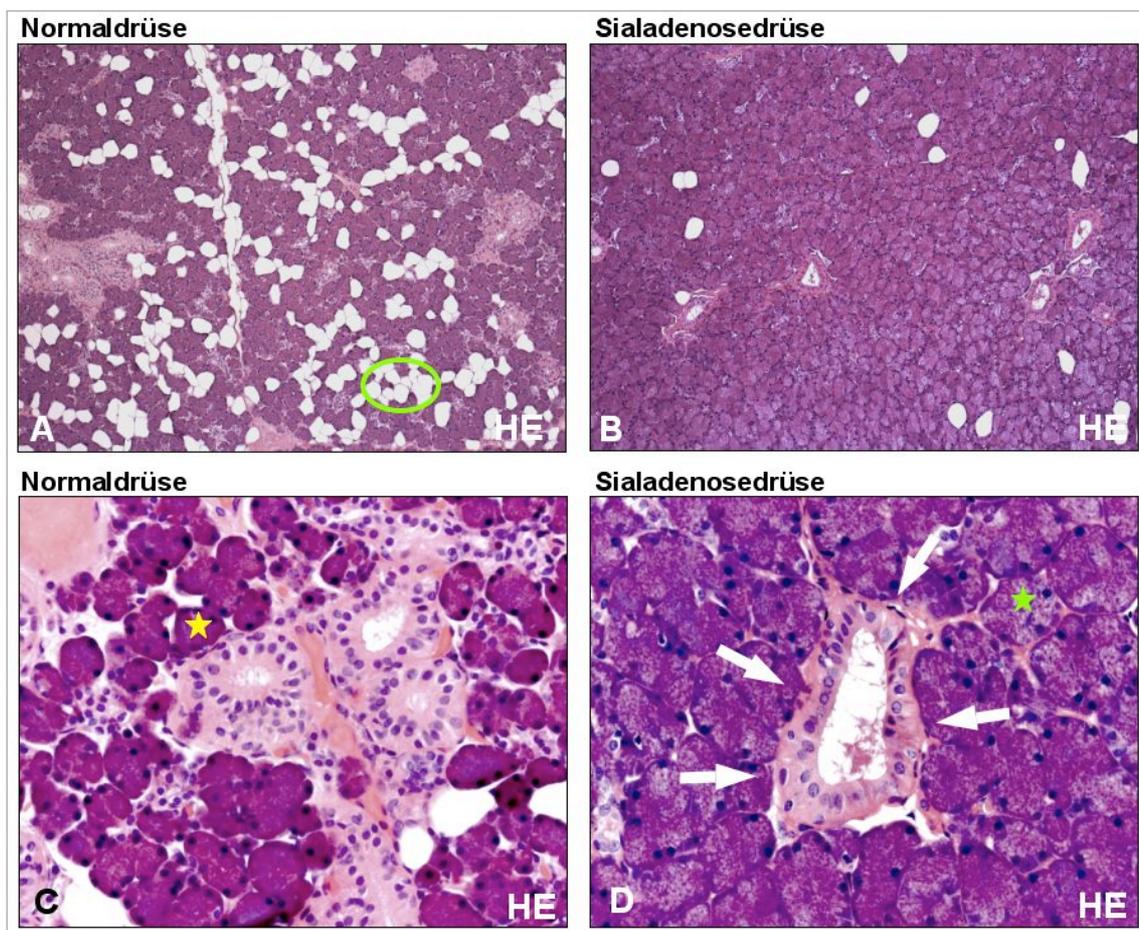
Vergleicht man die untersuchten Gruppen hinsichtlich der M30 Markierung, so fällt auf, dass sowohl in den Normaldrüsen als auch in den Sialadenosedrüsen keine Apoptosen markiert wurden. Dies ist bemerkenswert, da trotz der Schädigung der Drüse (Sialadenose) keine Steigerung der Apoptose messbar war.

Hinsichtlich der S100-Reaktion ergab sich bei den Sialadenosedrüsen gegenüber den Normaldrüsen eine eindrucksmässige Verminderung der mittels S100 markierten

Strukturen. Eine Quantifizierung war jedoch aus methodischen Gründen (wie mehrfach diskutiert) nicht möglich (vgl. Kap. 2.4.5).

Betrachtet man die Normaldrüsen und die Sialadenosedrüsen hinsichtlich des Grades der Verfettung, so ergibt sich bei den Sialadenosedrüsen eine geringgradig niedrigere Verfettung (vgl. Kap. 4.2).

Abb. 13: Übersicht und Detailansicht von Normaldrüse und Sialadenosedrüse



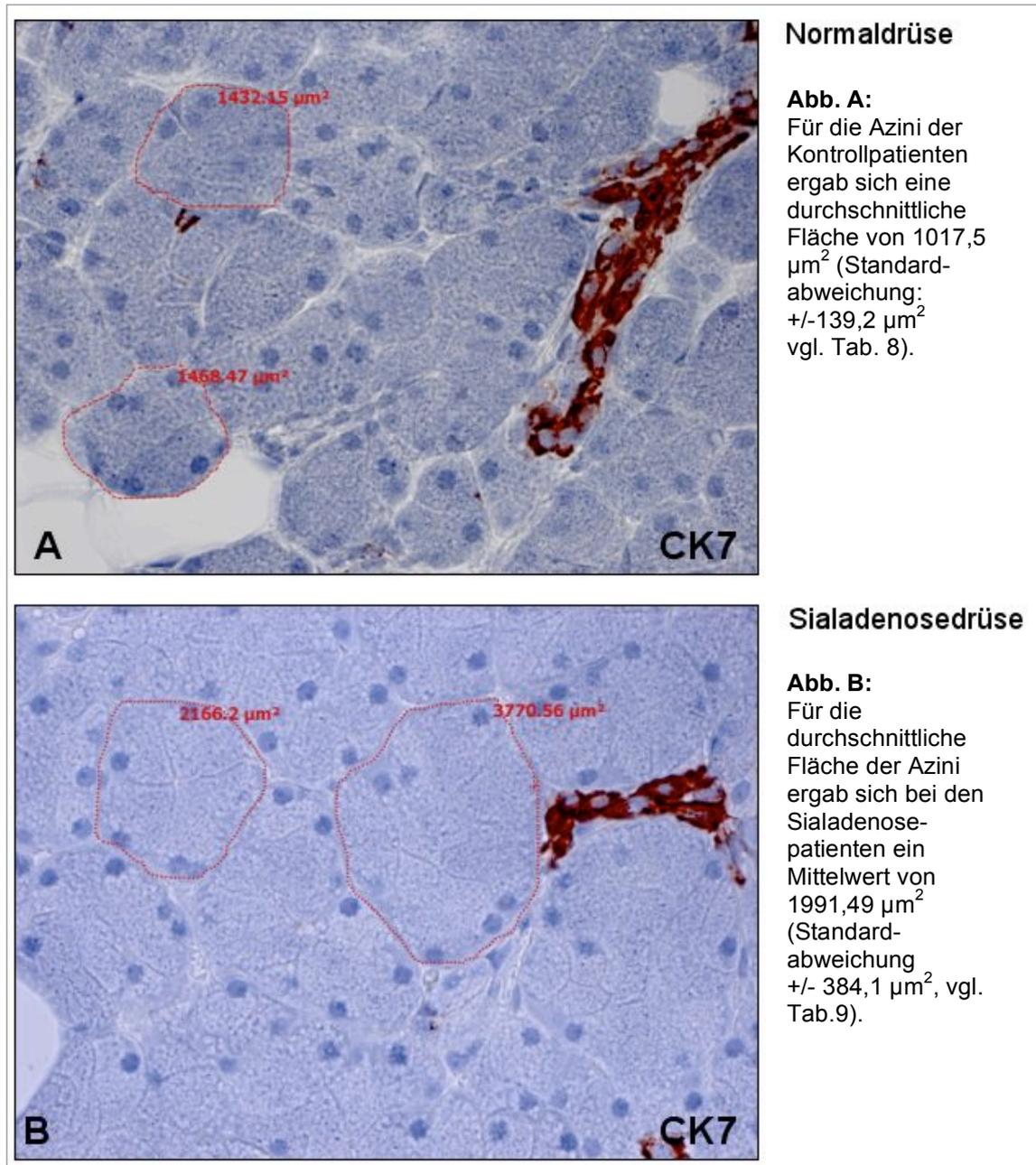
**Index:** **A:** Übersicht über eine Normaldrüse (Gl. Parotis) mit geringer Verfettung (Fett: zum Beispiel im grünen Kreis), HE-Färbung, Vergrößerung: 10 x 10.

**B:** Übersicht über eine sialadenotisch veränderte Gl. Parotis mit diskreter Verfettung (vgl. Kap. 4.2), HE-Färbung, Vergrößerung: 10 x 10.

**C:** Detailansicht einer Normaldrüse mit normal großen Azini (gelber Stern), HE-Färbung, Vergrößerung 20x10.

**D:** Detailansicht einer Sialadenosedrüse (Gl. Parotis) in gleicher Vergrößerung wie Abb.C mit im Vergleich zur Normaldrüse stark vergrößerten Azini (grüner Stern). Beachtenswert ist die eindrucksmässige Komprimierung der Speicheldrüsengänge (weisse Pfeile).

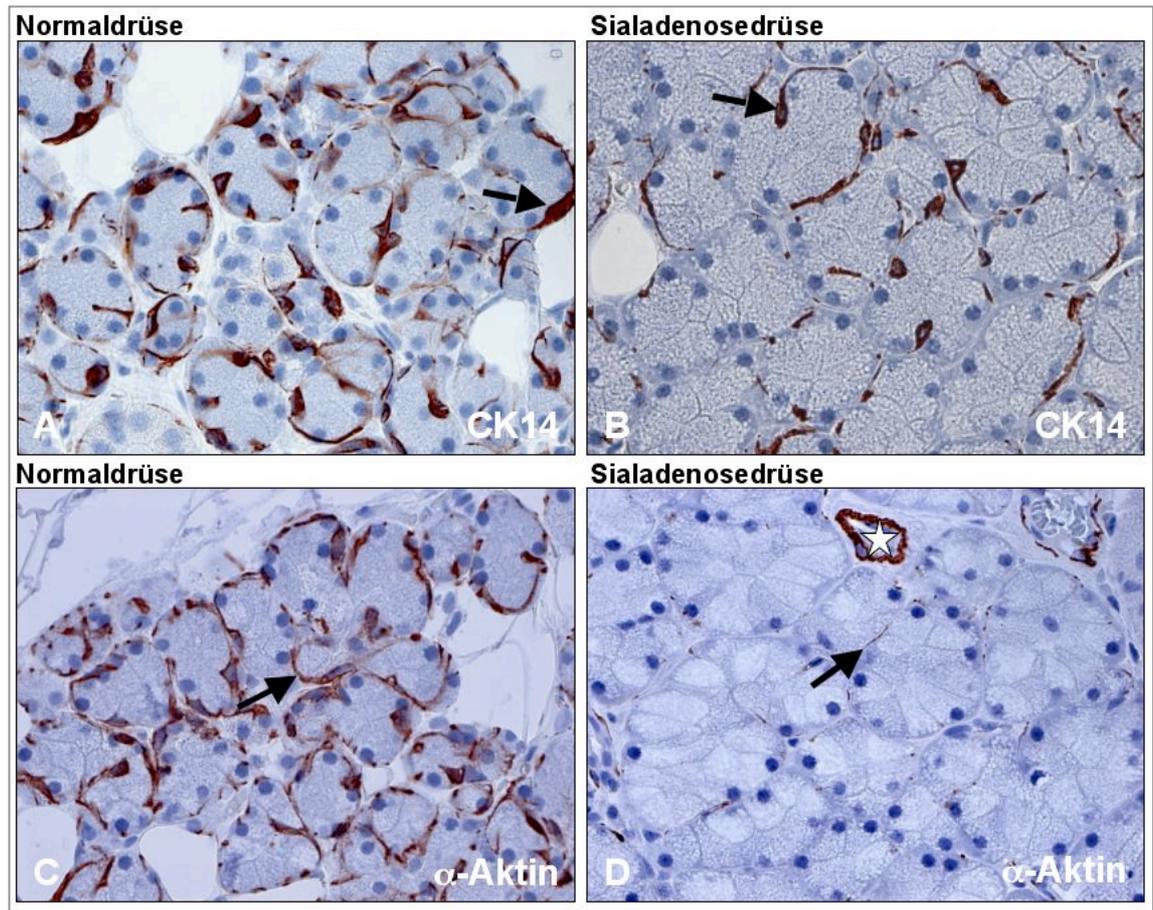
Abb. 14: Morphometrische Messung der Größenzunahme der Drüsenazini im Vergleich von Normaldrüse zu Sialadenosedrüse



Index: Beachte die eindrucksvolle, hochsignifikante Flächenzunahme der Drüsenazini der Sialadenosedrüse (B) im Vergleich zur Normaldrüse (A) bei gleicher Vergrößerung im Lichtmikroskop.

Abb. A und B jeweils in CK7 Färbung zur selektiven Erfassung CK7-negativer Azini, Vergrößerung 40 x10.

Abb. 15: Signifikanter Verlust von Myoepithelzellen bei gleichzeitig höchstsignifikantem Verlust der Myofilamente der Myoepithelzellen

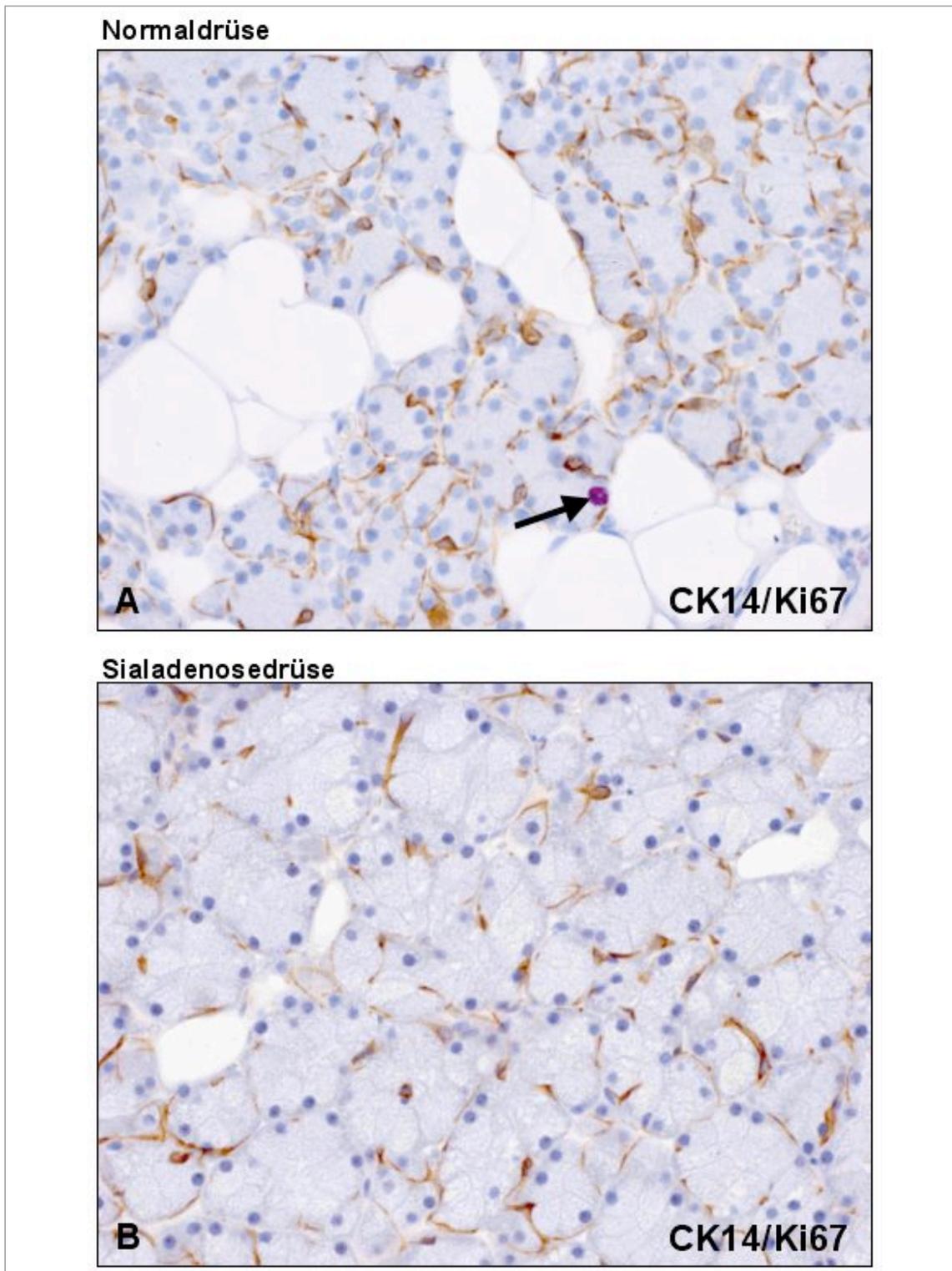


Index: **A+B:** Deutlich sichtbar der signifikante Verlust von Myoepithelzellen (Pfeil) bei der Sialadenosedrüse (B) im Vergleich zur Normaldrüse (A); CK14 Färbung.

**C+D:** Eindrucksvoller, höchstsignifikanter Verlust der Myofilamente (Pfeil) der Myoepithelzellen der Sialadenosedrüse (D) im Vergleich zur Normaldrüse (C);  $\alpha$ -Aktin-Färbung.

Abbildungen A-D jeweils in gleicher Vergrößerung von 40x10; D: interne Kontrolle: Arteriole (Stern).

Abb. 16: Vergleich der Zellproliferation von Azinuszellen in Normaldrüsen (A) und Sialadenosedrüsen (B) in immunhistologischer Doppelfärbung CK14/Ki67

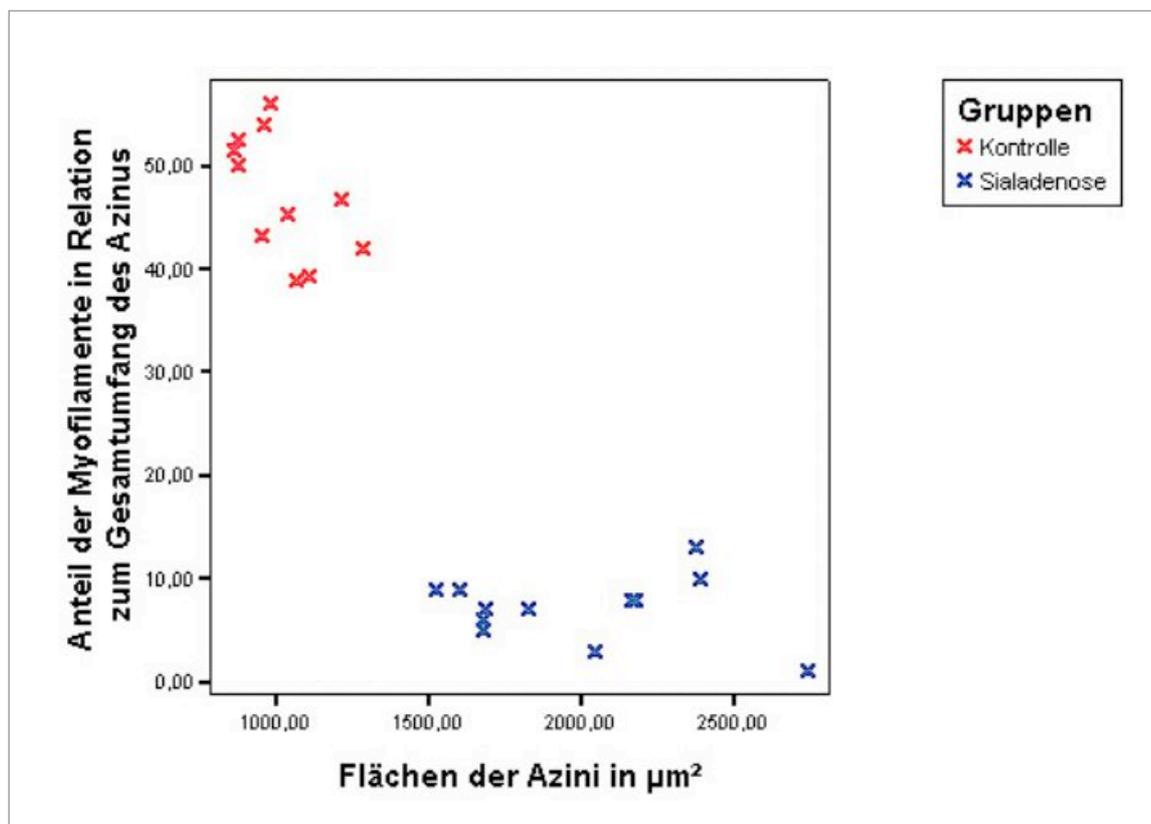


Index: **A+B:** Im Vergleich zur Normaldrüse (A, Pfeil) in Sialadenosedrüsen stark verminderter Nachweis von Proliferation in Azinuszellen (B).  
 Der Mittelwert für die Proliferation der Azinuszellen in Sialadenosedrüsen war 0,8% (Abb. B - keine Proliferation sichtbar, der Wert für die Proliferation der Azini in Normaldrüsen (2,0%, Abb. A) wurde früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Ihrler et al. 2002) entnommen.

#### 4.4 Korrelation morphologischer und klinischer Befunde

Die bisher dargestellten Korrelationen betrafen jeweils einen Vergleich der beiden Gesamtpopulationen. Bei einer vergleichenden Korrelation der Einzelfälle hinsichtlich Fläche der Drüsenazini einerseits und dem relativen Gehalt an  $\alpha$ -Aktin-positiven Myofilamenten (Abb. 18) ergeben sich folgende weitere Beobachtungen:

Abb. 17: Korrelation der Flächen der Drüsenazini mit dem Gehalt der Azini an Myofilamenten im Vergleich der Einzelwerte der Sialadenosedrüsen (blau) zu den Normaldrüsen (Kontrolle, rot)



Index: Eigene Darstellung.

##### Erstens

Während die Normaldrüsen hinsichtlich der Flächen der Drüsenazini und dem Gehalt der Azini an  $\alpha$ -Aktin-positiven Myofilamenten in ihrer Verteilung relativ homogen sind ergeben sich erwartungsgemäß in den Sialadenosedrüsen größere Unterschiede insbesondere hinsichtlich der Azinusflächen.

### Zweitens

Ein enger Zusammenhang zwischen einer Verminderung an Myoepithelfilamenten der Myoepithelzellen und einer starken Zunahme der Azinusfläche bei Sialadenose erscheint auch optisch plausibel, wenngleich dies allein keinen Rückschluss auf die Ursache dieses Zusammenhangs zulässt.

### Drittens

Auffällig ist die große Lückenbildung der beiden Kollektive bezüglich der verglichenen Parameter. Aus biologischer Sicht ist für beide Parameter ein Kontinuum zu erwarten. Es werden vermutlich Frühstadien von Sialadenosen, in denen eine Schwellung der Glandula Parotis nur indiskret ist, aufgrund eines fehlenden Leidensdruckes beziehungsweise fehlender Indikation nicht biopsiert oder operiert und waren somit auch nicht Teil unseres Patientenkollektivs.

Aufgrund der unzureichenden Aktenlage hinsichtlich Grunderkrankung, Schwellungsdauer, Schmerzhaftigkeit und anderen Daten (vgl. Tab. 7) konnte die Erfassung der wichtigen klinischen Daten nur ungenügend sein. Dies lässt einen Vergleich zwischen der Morphologie und den entsprechenden klinischen Daten nur sehr eingeschränkt zu. Unter dieser Einschränkung sind jedoch die Korrelationen von Klinik und Morphologie folgender Sialadenosefälle beachtenswert:

Sialadenosefall 8 (S8, vgl. Tab. 7), das größte Resektat des Kollektivs, hat den längsten Verlauf über zwölf Jahre und zeigt histomorphologisch sowohl die größten Flächen der Azini als auch den kleinsten Anteil an Azini mit Myoepithelzellen (vgl. Tab. 9).

Die Sialadenosefälle 9 und 10 (S9a/S9b, S10a/S10b, vgl. Tab. 7 und Tab. 9) zeigen klinisch beide Schmerzhaftigkeit, wobei Sialadenosefall 9 (S9), zusätzlich eine Sicca-Symptomatik aufweist (vgl. Tab. 7). Bei diesen Fällen bemerkenswert ist die

Dokumentation im Verlauf, die histomorphologisch einerseits mit einer Abnahme der Myofilamente der Myoepithelzellen der Azini (S9a,b und S10a,b, vgl. Tab. 9) und andererseits mit einer Verminderung des Anteils an Azini mit Myoepithelzellen (S10a, S10b, vgl. Tab. 9) korreliert.

## 5 Diskussion

Die seltene Erkrankung der Sialadenose des Menschen ist durch eine meist symmetrische Vergrößerung der Ohrspeicheldrüse, ausgelöst durch eine generalisierte, entzündungsfreie Schwellung der Drüsenzini, charakterisiert. Bislang ist zur formalen Entstehung dieser Azinusschwellung nur wenig bekannt. Die bis heute dominierende Hypothese von *Donath* und *Seifert* (*Donath* und *Seifert* 1975) postuliert als mögliche Ursache der Azinusschwellung, dass schwere metabolische oder hormonelle Grunderkrankungen zu einer Schädigung des peripheren Nervensystems im Sinne einer sogenannten peripheren Polyneuropathie führen, mit einer daraus resultierenden Sekretionsstörung der Speichelgranula und einer konsekutiven generalisierten Schwellung der Azinuszellen.

Es ist allgemein bekannt, dass eine chronische Funktionsstörung des peripheren Nervensystems, zum Beispiel im Sinne einer peripheren Polyneuropathie, in Abhängigkeit von Dauer und Ausprägung in verschiedenen Organen zu einer Funktionsbeeinträchtigung, teilweise sogar zur Atrophie glatter Muskelzellen führen kann, wie zum Beispiel bei der gastrointestinalen Myopathie bei Diabetes mellitus. Auf der Basis der eigenen kasuistischen Beobachtung eines offenbar verminderten Nachweises von Myoepithelzellen, beziehungsweise deren Myofilamenten in menschlichen Sialadenosen, war es in gleicher Weise denkbar, dass eine auf dem Boden der verschiedenen, metabolischen oder hormonell bedingten Grunderkrankungen entstandene periphere Polyneuropathie eine Innervationsstörung und in der Folge eine Funktionsstörung beziehungsweise Atrophie der Myoepithelzellen in der sialadenotischen Speicheldrüse bewirken könnte. Seit den wegweisenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen von *Donath* und *Seifert* (*Donath* und

*Seifert 1975*) wurden in den letzten 30 Jahren keine wesentlichen neuen Erkenntnisse auf der Basis histologischer Untersuchungen zur formalen Pathogenese der Sialadenose gewonnen. Insbesondere sind immunhistologische Untersuchungen zur Sialadenose in der Literatur nicht dokumentiert.

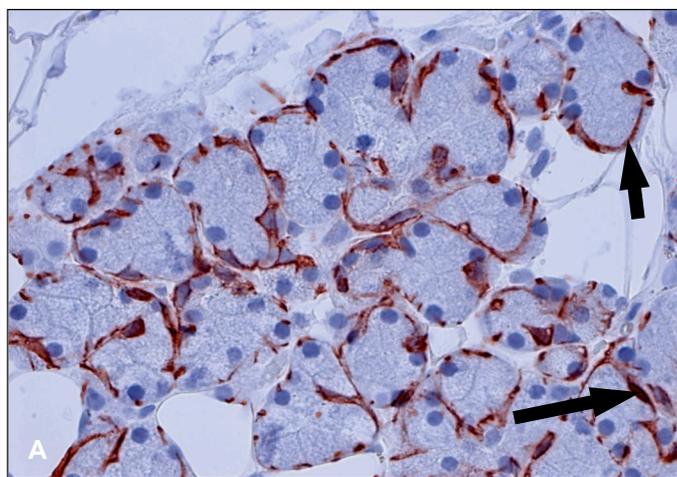
Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen führten wir auf der Basis früherer immunhistologischer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an normalen sowie entzündlich und neoplastisch veränderten Speicheldrüsen (*Ihrler et al. 1999, 2000, 2004a, 2004b*) vergleichende morphologische Messungen an Sialadenosedrüsen und Normaldrüsen durch. Als wichtigstes neues Ergebnis unserer Untersuchungen zeigte sich in den Sialadenosedrüsen, parallel zur bekannten hochsignifikanten Vergrößerung der Drüsenazini, ein höchstsignifikant verminderter Nachweis von zusätzlich noch verschmächtigten  $\alpha$ -Aktin-positiven Myofilamenten bei einem gleichzeitig statistisch zwar signifikanten, jedoch prozentual nur geringen Verlust an Myoepithelzellen. Dabei ergibt sich beim direkten Vergleich der verschiedenen Sialadenosefälle untereinander (vgl. Tab. 10) eine tendenzielle positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Azinusvergrößerung und dem Ausmaß des Verlustes an  $\alpha$ -Aktin-positiven Myofilamenten. Allerdings kann aus diesen Befunden allein noch kein sicherer Rückschluss auf die mögliche Bedeutung oder Ursache dieses auffälligen Zusammenhangs gezogen werden.

Unsere neuen immunhistologischen Daten zeigen im Hinblick auf eine mögliche Funktionsstörung der Myoepithelzellen bei der Sialadenose eine Korrelation zu früheren elektronenmikroskopischen Befunden von *Donath und Seifert (Donath und Seifert 1975)*, die in ultrastrukturellen Untersuchungen an menschlichem Sialadenose-Gefriermaterial degenerative Veränderungen nicht nur an peripheren Nerven, sondern

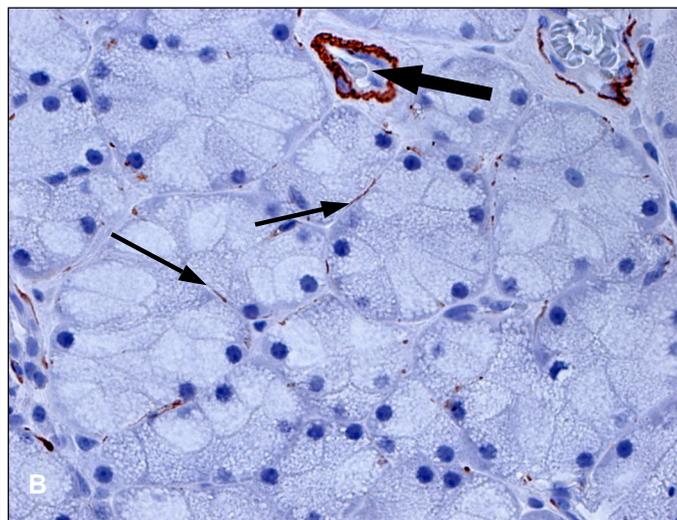
auch an Myoepithelzellen nachweisen konnten (siehe Abb. 14). Unsere Auswertung der S100-Reaktion am Paraffin-eingebetteten Drüsenmaterial ergab zumindest Hinweise auf einen verminderten Nachweis peripherer Nervenfasern in Sialadenosedrüsen im Vergleich zu Normaldrüsen, obgleich sich ein exakter morphometrischer Vergleich aus methodischen Gründen als nicht realisierbar erwies (vgl. Abb. 12).

*Donath* und *Seifert* haben die von ihnen beobachteten Veränderungen an Myoepithelzellen als unspezifisch beziehungsweise sekundär erachtet und nicht als wichtigen pathogenetischen Schritt in ihr postuliertes Konzept der Entstehung der Sialadenose integriert. Auch in der nachfolgenden Literatur sind diese ultrastrukturellen Beobachtungen an Myoepithelzellen als möglicher kausalpathogenetischer Faktor der Sialadenoseentstehung nicht weiterverfolgt worden (*Batsakis* 1988, *Chilla* 1981, *Mehler* und *Wallace* 1993, *Pape et al.* 1995, *Vavrina* 1994).

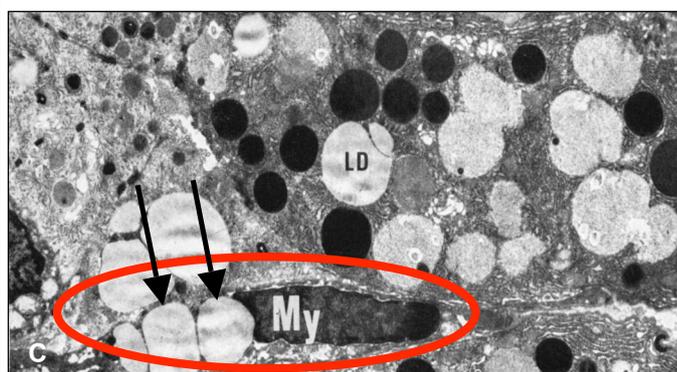
Abb. 18: Vergleich von Normaldrüse (A) und Sialadenosedrüse (B,C) in der  $\alpha$ -Aktin-Darstellung und im rasterelektronenmikroskopischen Schnitt



**Abb. A:**  
Normaldrüse mit Darstellung  
regelmäßiger  
 $\alpha$ -Aktin-positiver Myofilamente  
(kurzer Pfeil) der  
Myoepithelzellen (langer Pfeil).



**Abb. B:**  
Sialadenose:  
 $\alpha$ -Aktin-Reaktion mit starker  
quantitativer Verminderung  
und zusätzlicher qualitativer  
Ausdünnung von  
Myofilamenten der  
Myoepithelzellen (dünne  
Pfeile), Arteriole dient als  
interne Positiv-Kontrolle  
(dicker Pfeil).



**Abb. C:**  
Sialadenose:  
Elektronenmikroskopische  
Darstellung entnommen aus  
*Donath und Seifert 1975*:  
Myoepithelzelle (My,  
beschriftet von den Autoren),  
rot eingekreist mit  
eingelagerten Lipidvakuolen  
(Pfeile) interpretiert als  
Zeichen einer ausgeprägten  
degenerativen Schädigung.

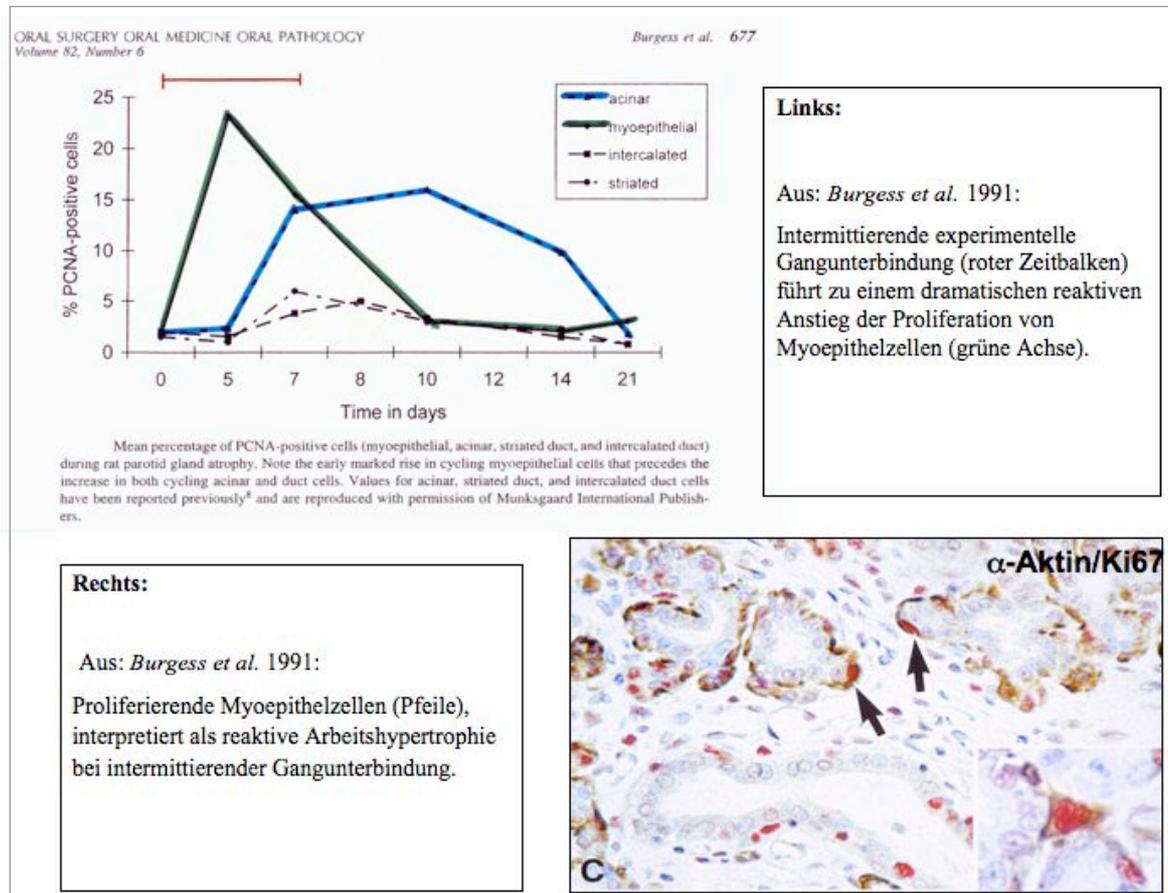
Index: A+B: eigene Darstellung;

C: aus Donath und Seifert 1975.

Im Gegensatz zu anderen Drüsen (z.B. der Brustdrüse) wird die Funktion der kontraktiven Myoepithelzellen in Speicheldrüsen nur in geringerem Maße darin gesehen, präformierten Speichel bei entsprechender vegetativer Reaktionslage durch aktive Muskelkontraktion aus der Drüse freizusetzen, da hierfür in den Speicheldrüsen nur ein sehr geringes Speichelreservoir vorliegt. Vielmehr wird den Myoepithelzellen in ihrer Gesamtheit eine wichtige dynamische Stütz- und Stabilisierungsfunktion für die azinäre Funktionseinheit und damit für die gesamte Drüse zugeschrieben (*Garrett 1999*). Damit stellt sich die Frage, inwiefern diese neuen Befunde, einer möglichen pathogenetischen Bedeutung von Myoepithelzellen mit der bisher dominierenden Hypothese zur formalen Entstehung der Sialadenose vereinbar sind, beziehungsweise inwieweit sie neue Aspekte zu einem verbesserten pathogenetischen Verständnis bieten.

Unsere Befunde erlauben prinzipiell zwei gegensätzliche Interpretationen: Einerseits könnte eine sialadenotische Azinusvergrößerung sekundäre Folge einer primären funktionellen Insuffizienz der Myoepithelzellen sein. Alternativ könnte jedoch eine primäre Azinusvergrößerung (unklarer Ursache) eine sekundäre Schädigung oder Atrophie von Myoepithelzellen, beziehungsweise deren kontraktiver Filamente verursachen. Zu der letztgenannten Hypothese gibt es wichtige Analogien aus der Speicheldrüsenforschung. In eigenen früheren Untersuchungen an chronischen Sialadenitiden (*Ihrler et al. 2004a*) sowie in tierexperimentellen Untersuchungen mit intermittierender Gangunterbindung (*Harrison et al. 2000, Burgess et al. 1991*), wurde eine massiv gesteigerte Proliferation mit quantitativer Vermehrung von Myoepithelzellen nachgewiesen, zum Teil mit Hinweisen auf eine glattmuskuläre Hypertrophie. Dies wird in diesem Zusammenhang übereinstimmend als eine reaktive Arbeitshypertrophie als Antwort auf eine Abflussstörung mit intraduktaler Druckerhöhung bei Gangunterbindung angesehen (vgl. Abb. 19).

Abb. 19: Experimentelle Gangunterbindung (linkes Diagramm) führt zu reaktivem Anstieg der Proliferation der Myoepithelzellen (rechts, immunhistologische Doppelfärbung)



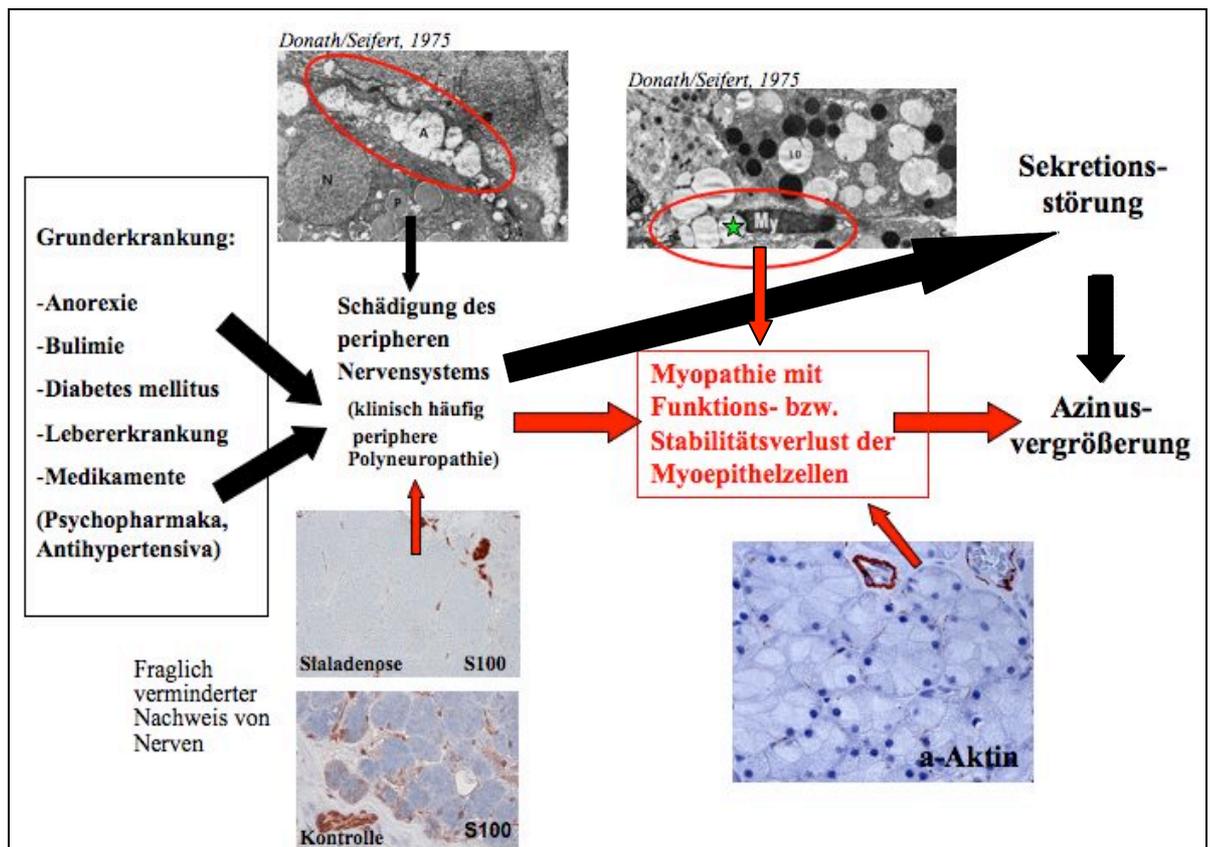
Index: Burgess et al. 1991.

Auffällig ist, dass im Gegensatz dazu bei sialadenotisch veränderten Speicheldrüsen die Myoepithelzellen erstens quantitativ gering vermindert sind, zweitens bei hochgradigem Myofilamentverlust offenbar hinsichtlich Kontraktilität und damit Stabilität funktionell hochgradig insuffizient sind und drittens im Vergleich zur Normaldrüse eine deutlich verminderte Zellproliferation zeigen. Dieser klare Gegensatz zwischen ausgeprägter reaktiver Funktionssteigerung der Myoepithelzellen, zum Beispiel bei Speichelabflussstörung einerseits (vgl. Abb. 19) und der von uns nachgewiesenen drastischen Funktionsverminderung beziehungsweise Atrophie von Myoepithelzellen bei Sialadenosen andererseits, spricht klar gegen die zweitgenannte hypothetische Möglichkeit, dass die Myoepithelzellschädigung bei Sialadenose nur eine sekundäre Folge einer primären Azinusschwellung (unklarer Ursache) sein könnte. Alle Befunde

sprechen dafür, dass eine schwere, chronische Funktions- beziehungsweise Innervationsstörung des peripheren Nervensystems auf der Basis der bekannten Grunderkrankungen zu einer schweren Funktionsstörung beziehungsweise langfristig zur Atrophie der Myoepithelzellen führt. Basierend auf den oben genannten Überlegungen ist anzunehmen, dass ein postulierter chronischer Funktionsverlust der Myoepithelzellen einen Stabilitätsverlust des einzelnen Azinus, und somit der gesamten Speicheldrüse bedingt.

Damit stellt sich die Frage, ob ein chronischer Funktionsverlust der Myoepithelzellen allein für die Entstehung einer sialadenotischen Azinusschwellung ausreichend sein kann. Es ist durchaus wahrscheinlich, jedoch mit den vorliegenden Befunden nicht zu beweisen, dass eine zusätzliche Sekretionsstörung der Azinuszelle im Zusammenhang mit der genannten Innervationsstörung einen weiteren entscheidenden Faktor für die sialadenotische Azinuszellvergrößerung darstellt. Dafür spricht insbesondere die Annahme, dass Sialadenosedrüsen einen deutlich erhöhten interstitiellen Druck aufweisen, wofür die bei einem Teil der Patienten auftretende Schmerzhaftigkeit der Drüenschwellung spricht. Bei alleiniger Funktionsstörung der Myoepithelzellen ohne zusätzliche Sekretionsstörung wäre eine Druckerhöhung in der Drüse nicht zu erwarten. Da es sich bei der transmembranalen Freisetzung der Speichelgranula um einen aktiven, von Myoepithelzellen unabhängigen Exozytoseprozess handelt und andererseits bei der Sialadenose ein erhöhter interstitieller Druck vorliegt, ist anzunehmen, dass die intrazytoplasmatische Akkumulation der Speichelgranula auf eine zusätzliche verminderte beziehungsweise gestörte Freisetzung der Speichelgranula zurückzuführen ist.

Abb. 20: Erweiterte Hypothese zur formalen Pathogenese der Sialadenose



Index: Schwarze Schrift und Pfeile: bisherige Hypothese zur formalen Pathogenese der Sialadenose;  
Rote Schrift und Symbole: erweiterte Hypothese zur formalen Pathogenese der Sialadenose, vgl. Abb. 8.

Die Zusammenfassung aller histomorphologischen und klinischen Befunde spricht dafür, dass die sialadenotische Azinuszellschwellung mit starker Akkumulation von intrazytoplasmatischen Speichelgranula aus der Kombination einer Sekretionsstörung der azinären Granula und einem gleichzeitigen schweren Stabilitätsverlust des Azinus durch den Funktionsverlust der Myoepithelzellen resultiert. Das bedeutet, dass eine azinäre Sekretionsstörung erst ab einem wesentlichen Funktionsverlust der Myoepithelzellen zu einer Azinuszellvergrößerung und damit zu einer sialadenotischen Drüsenschwellung führen kann.

Es gibt bislang keine Erklärung für die erstaunliche Beobachtung, dass die menschliche Sialadenose mit sehr wenigen Ausnahmen nur die Ohrspeicheldrüsen betrifft (*Baumann et al.* 1985, *Mignogna et al.* 2004). Unsere Befunde könnten dahingehend eine mögliche

Erklärung liefern: Ein schwerer Funktionsverlust der Myoepithelzellen spielt in den reflektorisch, und damit intermittierend sezernierenden Ohrspeicheldrüsen für die Speichelfreisetzung eine wichtigere Rolle als in den übrigen Kopfspeicheldrüsen, die im Gegensatz dazu für eine kontinuierliche, basale Sekretion verantwortlich sind.

Morphologische und klinische Argumente sprechen dafür, dass es sich bei der menschlichen Sialadenose um einen langfristigen und langsam progredienten Prozess handelt. So zeigen in unseren Untersuchungen die Patienten mit der längsten klinischen Anamnese hinsichtlich einer Sialadenose sowie die Patienten, die eine Schmerzhaftigkeit der sialadenotischen Schwellung angeben, generell deutlich überdurchschnittliche morphometrische Befunde bezüglich Azinuszellvergrößerung und Verlust von Myofilamenten der Myoepithelzellen (vgl. Tab. 7 und Tab. 9).

Zwei weitere auffällige, bislang ungeklärte klinische Befunde bei Sialadenose könnten durch diesen postulierten pathogenetischen Verlauf erklärt werden: erstens ist nur in Frühstadien der Bulimie ein intermittierendes An- und Anschwellen der Parotiden bei Bulimie-Attacken zu beobachten (eigene unveröffentlichte Beobachtung) und zweitens ist ebenfalls nur in Frühstadien der Sialadenose ein Erfolg einer Pilocarpin-Therapie zu beobachten (mit Verringerung der Drüsenschwellung). Die Tatsache, dass diese beiden klinischen Phänomene nur in Frühstadien zu beobachten sind, unterstützt die Überlegung, dass es sich bei der menschlichen Sialadenose vermutlich um einen langfristigen, langsam progredienten Prozess handelt. Vermutlich dominiert in frühen Stadien der funktionelle Aspekt mit nur geringen morphologischen Veränderungen und noch partieller funktioneller Rückbildungsfähigkeit bei Eliminierung der Grunderkrankung, während Spätstadien durch das hier beschriebene Vollbild morphologischer Veränderungen mit manifester Myofilamentatrophie und

dementsprechend weitestgehend fehlender funktioneller Rückbildungsfähigkeit gekennzeichnet sind.

Diese klinischen Aspekte der Sialadenose weisen auf eine möglicherweise partielle Rückbildungsfähigkeit von Sialadenosedrüsen in Frühstadien hin und bieten vor dem Hintergrund der neu gewonnenen morphologischen Befunde zur formalen Pathogenese der Sialadenose einen interessanten Ansatz für weitere Untersuchungen. Auf dieser Grundlage sind derzeit klinische Projekte zur frühzeitigen Diagnose und Therapie der Sialadenose von unserer Arbeitsgruppe geplant.

## 6 Synoptische Zusammenfassung

Die Sialadenose menschlicher Speicheldrüsen ist eine seltene Erkrankung, die mit beidseitiger entzündungsfreier Speicheldrüsenschwellung der Glandula Parotis einhergeht. Die Frage nach der pathogenetischen Entstehung der Sialadenose ist noch weitgehend unklar. Eine dominierende Hypothese zur Entstehung der Sialadenose stammt aus den 70er Jahren von *Donath* und *Seifert*. Analog zu anderen Erkrankungen, die mit einer Schädigung des peripheren Nervensystems im Sinne einer sogenannten peripheren Polyneuropathie einhergehen, wie beispielsweise die kardiale Myopathie bei Diabetes mellitus (*Horvath et al.* 2006), scheint es auch bei der Sialadenose auf der Grundlage der bekannten Grunderkrankung (Bulimie, Diabetes u.a.) zu einer sogenannten peripheren Polyneuropathie zu kommen (*Donath* und *Seifert* 1975). Diese Autoren postulierten, dass eine Schädigung des peripheren Nervensystems zu einer Innervationsstörung der Parotis mit verminderter Freisetzung von Sekretgranula und damit zu einer intrazytoplasmatischen Akkumulation der Granula mit Vergrößerung der Azini und damit der gesamten Drüse führt.

In kasuistischen Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe war in sialadenotisch veränderten Speicheldrüsen ein verminderter Nachweis von mittels  $\alpha$ -Aktin darstellbaren Myofilamenten in Myoepithelzellen aufgefallen. Auf Basis dieser Beobachtung führten wir eine vergleichende immunhistologische und morphometrische Untersuchung an Sialadenosedrüsen und Kontrolldrüsen, insbesondere fokussiert auf die Rolle der Myoepithelzellen, durch.

In unseren Untersuchungen fanden wir parallel zu der die Sialadenose definierenden charakteristischen Vergrößerung der Drüsenazini einen geringen, jedoch signifikanten Verlust von Myoepithelzellen und vor allem einen hochgradigen, höchstsignifikanten

Verlust der Myofilamente der Myoepithelzellen. Nun war denkbar, dass dieser höchstsignifikante Verlust an Myofilamenten einen Funktionsverlust der Myoepithelzellen und in Folge dessen einen Stabilitätsverlust der Drüsenzini und nachfolgend der gesamten Drüse bedingt. Es stellte sich die Frage ob ein primärer Myoepithelzellschaden Ursache der sialadenotischen Azinusschwellung ist oder umgekehrt eine sialadenotische Azinusschwellung Ursache für einen sekundären Myoepithelzellschaden sein kann.

In Untersuchungen mit tierexperimentellen Gangunterbindungen wurde eine stark vermehrte Proliferation der Myoepithelzellen nachgewiesen. Diese Befunde wurden als reaktive Proliferation im Sinne einer Hypertrophie der Myoepithelzellen bei Erhöhung des Innendrucks angesehen. Im Gegensatz dazu konnten wir bei unseren Untersuchungen eine stark verminderte Proliferation der Myoepithelzellen nachweisen. Infolgedessen ist anzunehmen, dass der Myoepithelzellschaden und mehr noch der höchstsignifikante Verlust der Myofilamente der Myoepithelzellen primär zu einem Funktionsverlust der Myofilamente und damit zu einem Stabilitätsverlust des Azinus und infolgedessen zu einer Vergrößerung der gesamten Speicheldrüse führt. Auch *Donath* und *Seifert* beschrieben 1975 degenerative Veränderungen von Myoepithelzellen in sialadenotisch veränderten menschlichen Speicheldrüsen an rasterelektronenmikroskopischen Befunden, integrierten diese Beobachtungen jedoch nicht in die Hypothese der Pathogenese der Sialadenose.

Die von *Donath* und *Seifert* postulierte Hypothese zur Pathogenese der Sialadenose (Nervenschädigung mit anschließender Sekretionsstörung der Drüsenzini), wird nun durch unsere Befunde (Myoepithelzellverlust mit höchstsignifikanter Myofilamentatrophie) um einen wichtigen Schritt erweitert: So scheint der zusätzliche

Faktor des Stabilitäts- beziehungsweise des Funktionsverlustes der Myoepithelzellen in Verbindung mit der zusätzlichen Sekretionsstörung der Granula zu einer Azinusschwellung und damit zur Schwellung der gesamten Drüse, bis hin zur charakteristischen klinischen Veränderung der Sialadenose zu führen.

Es handelt sich bei der menschlichen Sialadenose um einen langfristigen, langsam progredienten Prozess. Mehrere klinische und morphologische Befunde deuten darauf hin, dass in frühen Stadien der Sialadenose der funktionelle Aspekt mit noch geringen morphologischen Veränderungen und noch partieller funktioneller Rückbildungsfähigkeit dominiert, während Spätstadien von Sialadenosen durch das Vollbild morphologischer Veränderungen mit Myofilamentatrophie und dementsprechend weitestgehend fehlender funktioneller Rückbildungsfähigkeit gekennzeichnet sind. Diese klinischen Aspekte einer partiellen Rückbildungsfähigkeit von Sialadenosedrüsen in Frühstadien sollten, vor dem Hintergrund unserer neu gewonnen morphologischen Befunde zur formalen Pathogenese der Sialadenose, in Zukunft intensiver untersucht werden, da sie wichtige Ansätze für eine verbesserte Therapie der Sialadenose bieten.

## Literaturverzeichnis

- Abelson DC  
Mandel ID  
Karmiöl  
(1976) Salivary studies in alcoholic cirrosis. Oral Surg., Vol. 41, Number 2: 188-191.
- Arold R  
Schätzle W  
(1973) Die "Experimentelle Sialadenose" und ihre Beeinflussung durch  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker. Arch. Klin exp. Ohr., Nas., und Kehlk. Heilk. 203, 274-288.
- Barbareschi M  
Pecciarini L  
Cangi MG  
Macri MG  
Rizzo A  
Viale G  
Dogliosi C  
(2001) p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. Am J Surg Pathol 25: 1054-1060.
- Batsakis JG  
(1988) Sialadenosis. Ann Otol Rhinol Laryngol: 94-95.
- Baumann H  
Meyer P  
Winter K  
Lorenz G  
(1985) Sialochemische und morphologische Untersuchungen der Glandula submandibularis des Diabetikers – ein Beitrag zur diabetischen Sialadenose. Laryng. Rhinol. Otol. 64 : 542-546.
- Belling O  
Ottesen K  
Meyer W  
Feller AC  
Merz H  
(1999) Vergleichende Analyse verschiedener immunohistochemischer Standardverfahren. Pathologie 20: 242-250.
- Brown DC  
Gatter KC  
(1990) Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. Histopathology 17: 489-503.
- Burgess KL  
Dardick I  
Cummings MM  
Burford-Mason AP  
Bassett R  
Brown DH  
(1996) Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat parotid gland. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 82: 674-680.
- Burgess KL  
Dardick I  
(1998) Cell population changes during atrophy and regeneration of rat parotid gland. Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 85: 699-706.
- Caulin C  
Salvesen GS  
Oshima RG  
(1997) Caspase Cleavage of Keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. J. Cell Biol. 138: 1379-1393.

- Chaudry AP  
Cutler LS  
Schmutz JA  
Yamane GM  
Sunderraj M  
Pierri LK  
(1985) Development of the hamster submandibular gland. I. The acinar-intercalated duct complex. *J. Submicrosc. Cytol.* 17: 555-567.
- Chilla R  
(1981) Sialadenosis of the Salivary Glands of the Head – Studies on the Pathophysiology of Parotid Secretion. *Adv. Oto-Rhino-Laryng.*, vol. 26, pp. 1-38.
- Chilla R  
Opaitz M  
Arglebe C  
(1978) Flußrate, Amylase- und Proteingehalt des Parotis-Speichels bei Sialadenose. *Laryng. Rhinol.* 57: 274-279.
- Chilla R  
Witzemann V  
Opaitz M  
Arglebe C  
(1981) Possible Involvement of Parotid Beta - adrenergic Receptors in the Etiology of Sialadenosis. *Arch Otorhinolaryngol* 230: 113-120.
- Chisholm DM  
Adi MM  
Ervine IM  
Ogden GR  
(1995) Cell deletion by apoptosis during Regression of rat parotid sialadenosis. *Virchows Arch*, 427(2): 181-186.
- Coleman H  
Altini M  
Nayler S  
Richards A  
(1998) Sialadenosis a presenting sign in bulimia. *Head Neck* 20: 758-762.
- Dardick I  
Rippstein P  
Skimming L  
Boivin M  
Parks WR  
Dairkee SH  
(1987) Immunohistochemistry and ultrastructure of myoepithelium and modified Myoepithelium of the ducts of human major salivary glands: Histogenetic Implications for salivary gland tumors. *Oral Surg Med Oral Pathol* 64: 703-15.
- Donath K  
Hirsch-Hoffmann HU  
Seifert G  
(1973) Pathogenesis of parotid gland atrophy after experimental ligation of the duct. Ultrastructural alterations of the glandular parenchyma of the parotid glands of the rat. *Virchows Arch [A]* 359: 31-48.
- Donath K  
Seifert G  
(1973) Parotis-Sialadenose nach Langzeittherapie mit Antihypertensiva (Guanacline). *Virchows Arch. Abt A Path. Anat.* 360: 33-44.
- Donath K  
Seifert G  
(1973) Sympathicusveränderungen in der Parotis bei Guanacline-Therapie. *Virchows Arch. Abt A Path. Anat.* 360: 195-207.

- Donath K  
Seifert G (1975) Ultrastructural Studies of the Parotid Glands in Sialadenosis. *Virchows Arch. Abt A Path. Anat. and Histol* 365: 119-135.
- Donath K  
Spillner M  
Seifert G (1974) The Influence of the Autonomic Nervous System on the Ultrastructure of the Parotid Acinar Cells. *Virchows Arch. Abt A Path. Anat. and Histol* 365: 15-33.
- Draeger A  
Nathrath WBJ  
Lane EB  
Sundström BE  
Stigbrand TI (1991) Cytokeratins, smooth muscle actin and vimentin in human normal salivary gland and pleomorphic adenomas. *APMIS* 99: 405-415.
- Ferner H (1987) *Pernkopf Anatomieatlas*.
- Garrett JR (1998) Myoepithelial activity in salivary glands. In: Gerrett JR, Ekström J, Anderson LC: *Glandular mechanisms of salivary secretion*. Vol. 10, *Frontiers of Oral Pathology*. Karger, Basel. pp132-152.
- Garrett JR (1999) Nerves in the Main Salivary Glands. In: Garrett JR, Ekström J, Anderson LC: *Neural Mechanisms of Salivary Gland Secretion*. Vol. 11, *Frontiers Of Oral Pathology*. Karger, Basel. pp 1-26.
- Garrett JR (1999) Effects of Autonoimic Denervations on Parenchymal Structure and Nerves in Salivary Glands. In: Garrett JR, Ekström J, Anderson LC: *Neural Mechanisms of Salivary Gland Secretion*. Vol. 11, *Frontiers Of Oral Pathology*. Karger, Basel. pp 131-149.
- Gerdes J  
Lemke H  
Baisch H  
Wacker HH  
Schwab U  
Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation - associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal Of Immunology* Vol. 133: 1710-15.
- Grevers G  
Ihrler S  
Dresel S  
Vogl T (1992) Zum diagnostischen Stellenwert der Magnetresonanztomographie bei Morbus Sjögren. *Laryngo-Rhino-Otol.*10: 519-524.
- Günter WL (1977) Über das Vorkommen der Sialadenose im Obduktionsmaterial. *Dissertationsarbeit aus dem Pathologischen Institut der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. G. Seifert)*.

- Harrison JD  
Fouad HMA  
Garrett JR (2000) The effects of ductal obstruction on the acinar cell of the parotid of cat. Arch. Oral Biol. 45: 945-949.
- Harrison JD  
Fouad HMA  
Garrett JR (2001) Variation in the response to ductal obstruction of feline submandibular and sublingual salivary glands and the importance of the innervation. J Oral Pathol Med 30: 29-34.
- Harrison JD  
Garrett JR (1976b) Histological effects of ductal ligation of salivary glands of the cat. J Path 118: 245-254.
- Hemenway WG  
Allen GW (1959) Chronic enlargement of the parotid gland: Hypertrophy and fatty infiltration. Laryngoscope: 1508-1523.
- Henry JJ (1933) Mikulicz's disease and diabetes. Jour. A.M.A., Vol. 101, 3: 184-87.
- Hiatt JL  
Sauk JJ (1991) Embryology and Anatomie of the Salivary Glands. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR: Surgical Pathology of the Salivary Glands. Vol. 25 Major problems in pathology. Saunders, Philadelphia. pp 2-9.
- Holtkamp K  
Herpertz-Dahlmann B (2005) Anorexia und Bulimia im Kindes und Jugendalter. Dt. Ärzteblatt, Jg.102, Heft 1-2: 38-45.
- Ihrler S (2004b) Vergleichende Untersuchungen zur zellulären Proliferation, Differenzierung und Apoptose in regulären sowie reaktiv-metaplastisch und neoplastisch veränderten menschlichen Speicheldrüsen. Habilitationsschrift an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Ihrler S  
Blasenbren-Vogt S  
Sendelhofert A  
Rössle M  
Harrison JD  
Löhrs U (2004a) Regeneration in chronic sialadenitis: an analysis of proliferation and apoptosis based on double immunohistochemical labelling. Virchows Archiv 444: 356-361.
- Ihrler S  
Zietz C  
Sendelhofert A  
Menauer F  
Blasenbren-Vogt S  
Löhrs U (2000) Zur Differentialdiagnose lymphoepithelialer Speicheldrüsenläsionen. Mit besonderen Berücksichtigung der charakteristischen Speichelgangveränderungen. Der Pathologe 21: 424-432.

- Ihrler S  
Zietz C  
Sendelhofert A  
Riederer A  
Löhrs U  
(1999) Lymphoepithelial duct lesions in Sjögren-type sialadenitis. *Virchows Arch* 434: 315-323.
- Ihrler S  
Zietz C  
Sendelhofert A  
Lang S  
Blasenbren-Vogt S  
Löhrs U  
2002) A morphogenetic concept of salivary duct regeneration and metaplasia. *Virchows Arch* 440: 519-526.
- Leers MPG  
Kölgen W  
Björklund V  
Bergman T  
Tribbick G  
Persson B  
Björklund P  
Ramaekers FCS  
Björklund B  
Nap M  
Jörnvall H  
Schutte B  
(1999) Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Pathol.* 187: 567-572.
- Loria RC  
Wedner HJ  
(1989) Facial swelling secondary to inhaled bronchodilator abuse: Catecholamine-induced sialadenosis. *Annals of Allergie* Vol.62: 289-293.
- Maier H  
Born IA  
Adler D  
(1986) Eingeschränkte Funktion der großen Kopf speicheldrüsen. *Laryng. Rhinol. Otol.* 65: 195-200.
- Maier H  
Mall G  
Born IA  
(1991) Sialadenose der Glandula parotis nach chronischem Nicotinkonsum. *Laryng. Rhinol. Otol.* 70: 191-195.
- Maier H  
Seitz HK  
Mayer B  
Adler D  
Mall G  
Born IA  
(1990) Lipomatöse Atrophie der Glandula parotis bei chronischem Alkoholkonsum. *Laryng. Rhinol. Otol.* 69: 600-04.
- Majno G  
Joris I  
(1995) Apoptosis, Oncosis and necrosis. An Overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146: 3-15.

- Markitziu A  
Lustmann J  
Uzieli B  
Krausz Y  
Chisin R  
(1993) Salivary and lacrimal Gland involvement in a patient who had undergone a thyroidectomy and was treated with radioiodine for thyroid cancer. *Oral Surg: Oral Med. Oral Pathol.* 75: 318-22.
- Mayerhausen W  
Vogt HJ  
Fichter MM  
Stahl S  
(1990) Dermatologische Aspekte bei Anorexia und Bulimia nervosa. *Hautarzt* 41: 476-484.
- Mehler PS  
Wallace JA  
1993) Sialadenosis in Bulimia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119: 787-788.
- Mignogna MD  
Fedele S  
Rosso LL  
(2004) Anorexia/bulimia-related sialadenosis of Palatal minor salivary glands. *J Oral Pathol Med* 33: 441-2.
- Miguel MCC  
Andrade ESS  
Taga R  
Pinto LP  
Souza LB  
(2002) Hyperplasia of Myoepithelial cells expressing calponin during atrophy of the rat parotid gland Induced by duct ligation. *The Histochemical Journal* 34: 499-506.
- Moll R  
(1988) Differenzierungsprogramme des Epithels und ihre Änderungen. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 72: 102-114.
- Moll R  
(1993) Cytokeratin-Expressionsmuster maligner epithelialer Tumoren und ihrer Ursprungsepithelien, in: *Cytokeratine als Differenzierungsmarker*, Moll R; Gustav Fischer, pp 41-121.
- Moll R  
Franke WW  
Geiger B  
Krepler R  
(1982) The Catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24.
- Pape SA  
MacLeod RI  
McLean NR  
Soames JV  
(1995) Sialadenosis of the salivary Glands. *British Journal of Plastic Surgery* 48: 419-422.
- Reichel G  
(1987) Vegetative Symptome bei diabetischen Polyneuropathien *Fortschr. Neurol. Psychiat.* 55: 107-129.
- Reißner C  
Maier H  
(1991) Sialadenose durch Valoprat-Dauermedikation. *Laryngo-Rhino-Otol.* 70: 384-386.

- Riad M  
Barton JR  
Wilson JA  
Freeman CPL  
Maran AGD  
(1991) Parotid Salivary Secretory Pattern in Bulimia Nervosa. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 111: 392-95.
- Satoh Y  
Oomori Y  
Ishikawa K  
Ono K  
(1994) Configuration of myoepithelial cells. In various exocrine glands of guinea pigs. *Anat Embryol* 189: 227-236.
- Scott J  
Liu P  
Smith PM  
(1999) Morphological and Functional Characteristics of Acinar Atrophy and Recovery in Duct-ligated Parotid Gland of the Rat. *J Dent Res* 78(11): 1711-1719.
- Seifert G  
(1971a) Die Pathologie der Speicheldrüsen im Rahmen der Kollagenkrankheiten. *HNO* 19: 193-200.
- Seifert G  
(1971b) Klinische Pathologie der Sialadenitis und Sialadenose. *HNO Band 19, Heft 1*: 1-8.
- Seifert G  
(1975) Die Sialadenose der Parotis. *Dtsch. Med. Wschr.* 100: 1545-1548.
- Seifert G  
(1984) Entzündungen (Sialadenitis). In: Seifert G, Miehle A, Haubrich J, Chilla R (eds) *Speicheldrüsenkrankheiten, Pathologie – Klinik – Therapie – Fazialchirurgie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, pp 117-173.
- Seifert G  
(1996) Sialadenitis. In: Seifert G, Doerr W (eds) *Oralpathologie – Pathologie der Speicheldrüsen. (Spezielle pathologische Anatomie, Band 1/I), 2<sup>nd</sup> ed.*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 168-300.
- Seifert G  
(1997) Speicheldrüsen und Organismus – Wechselwirkungen und Mitreaktionen. *Laryngo-Rhino-Otol.* 76: 387-393.
- Seifert G  
Sobin LH  
(1991) Histological typing of salivary gland tumours. World Health Organization. *International histological classification of tumours, 2<sup>nd</sup> ed.*, pp34. Springer-Verlag, Berlin.

- Takahashi S  
Nakamura S  
Shinzato K  
Domon T  
Yamamoto Y  
Wakita M
- (2001) Apoptosis and Proliferation of Myoepithelial Cells in Atrophic Rat Submandibular Glands. *J Histochem Cytochem* 49: 1557-1563.
- Vavrina J  
Müller W  
Gebbers JO
- (1994) Enlargement of salivary glands in bulimia. *The Journal of Laryngology and Otology* 108: 516-518.
- WHO
- Classification of Tumors, Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours 2005.
- Willershausen B  
Philip E  
Pirke KM  
Fichte M
- (1990) Orale Komplikationen bei Patienten mit Anorexia nervosa und Bulimia nervosa. *Zahn-Mund-Kieferheilkd.* 78: 293-299.
- Wilmes E  
Landthaler M
- (1986) Nebenwirkungen von Medikamenten auf Speicheldrüsen und Mundschleimhaut. *Laryng. Rhinol. Otol* 65: 470-476.
- Yang A  
Schweitzer R  
Sun D  
Kaghad M  
Walker N  
Bronson RT  
Tabin C  
Sharpe A  
Caput D  
Crum C  
McKeon F
- (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398: 714-723.

## **Danksagung**

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. Stephan Ihrler für die Möglichkeit an diesem Projekt mitzuarbeiten sowie für die herausragende, kompetente und engagierte Betreuung bedanken.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Dieter Hölzel und Herrn Dr. Christoph Weiler für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danken.

Frau Andrea Sendelhofert gilt für die Herstellung der hervorragenden Schnittpräparate- unter anderem in hochkomplexen Doppelfärbungen- für die zeichnerische Gestaltung sowie für die kompetente Beratung bei allen immunhistologisch-technischen Fragen besonderen Dank.

Frau Monika Attmannspacher möchte ich sehr herzlich für die Bildbearbeitung danken.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung und meinen Geschwistern für den moralischen Unterhalt danken.

## Lebenslauf

Name:	Christian Rath	
Geburtsdatum:	09.07.1978	
Geburtsort:	Tübingen	
Eltern:	Elisabeth Rath, geb. 12.10.1953, Lehrerin Friedrich Rath, geb. 02.02.1948, gest. 27.06.1996, Sonderschulkonrektor	
Geschwister:	Markus Rath, geb. 26.07.1980, Student (Kunstgeschichte) Hannes Rath, geb. 14.02.1982, Student (Lehramt) Annegret Rath, geb. 26.05.1984, Studentin (Germanistik)	
Ausbildung:	1985 - 1989	Grundschule Rosenschule Trossingen
	1989 - 1998	Gymnasium Trossingen
	1998	Abitur
	1998 - 1999	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Ausbildung zum Rettungssanitäter
	1999 – 2001	Berufsausbildung zum Rettungsassistent
	Seit 2001	Zahnmedizinstudium an der Ludwig-Maximilians- Universität
	2003	Physikum
	01.08.2005	Beginn des Staatsexamens Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	31.01.2006	Beendigung des Staatsexamens Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	17.02.2006	Approbation als Zahnarzt
	13.03.2006	Anstellung als Zahnarzt an der Klinik für Präventivzahnmedizin, Parodontologie und Kariologie der Universität Zürich, Schweiz