

**Qualitative Untersuchung des Einflusses einer
multimodalen Therapie auf die kapilläre
Mikromorphologie**

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

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Franca Stockebrand
geboren am 19.05.1984 in Detmold

Meinen Eltern

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Stefan Schultze-Mosgau, Jena
2. PD. Dr. med. Dr. med. dent. Michael Thorwarth, Jena
3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gunther O. Hofmann, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.12.2010

Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung	6
1.	Einleitung	9
2.	Ziel der Arbeit	14
3.	Material und Methoden	15
3. 1	Patientenkollektiv	15
3. 2	Probenentnahme und Aufbewahrung	16
3. 3	Fixierung, Dehydrierung, Einbettung	17
3. 4	Ausbettung	18
3. 5	Gewebeschnitte	18
3. 6	Immunhistochemische Färbung	19
3. 6. 1	ABC-Methode	19
3. 6. 2	Immunhistochemische Färbung	20
3. 6. 3	Histochemische Hematoxylin-Färbung	22
3. 7.	Analyseverfahren	23
3. 7. 1	Kapillaranalyse	23
3. 7. 2	Statistische Tests	24
4.	Ergebnisse	25
4. 1	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Analyse	26
4. 1. 1	Kapillaranzahl	26
4. 1. 2	Gesamtflächeninhalt der Kapillaren	28

4. 1. 3	Prozentualer Flächenanteil der Kapillaren am Gesichtsfeld	30
4. 2	Dosis der Bestrahlung	32
4. 2. 1	Kapillaranzahl und Bestrahlungsdosis	32
4. 2. 2	Gesamtflächeninhalt der Kapillaren und Bestrahlungsdosis	33
4. 2. 3	Prozentualer Flächenanteil der Kapillaren am Gesichtsfeld und Bestrahlungsdosis	34
4. 3	Intervalllänge zwischen Bestrahlung und Operation	36
4. 3. 1	Kapillaranzahl und Intervalllänge zwischen Bestrahlung u. Operation	36
4. 3. 2	Gesamtflächeninhalt der Kapillaren und Intervalllänge zwischen Bestrahlung und Operation	37
4. 3. 3	Prozentualer Flächenanteil der Kapillaren am Gesichtsfeld u. Intervalllänge zwischen Bestrahlung und Operation	38
5.	Diskussion	40
6.	Schlussfolgerung	45
7.	Literaturverzeichnis	46
	Lebenslauf	58
	Danksagung	59
	Ehrenwörtliche Erklärung	60

I. Zusammenfassung

Im Rahmen der multimodalen Behandlung von Tumorpatienten ist das Ziel einer adjuvanten oder neoadjuvanten strahlentherapeutischen Behandlung die Destruktion maligner Zellen unter größtmöglicher Schonung umgebender Strukturen. Zum Erreichen der erforderlichen Letaldosis ist häufig allerdings eine Bestrahlungsintensität erforderlich, die auch das benachbarte gesunde Gewebe schädigt. Hieraus resultiert eine Zerstörung der mikrovaskulären Strukturen mit resultierender Minderperfusion der betroffenen Gewebeanteile. Als Folge steigt das Risiko lokaler Ischämien, Wundheilungsstörungen und eines fibrotischen Gewebeumbaus. Spezifische Nebenwirkungen im Mund,- Kiefer,- und Gesichtsbereich mit gleichzeitiger deutlicher Reduktion der Lebensqualität sind Xerostomie (chronische Mundtrockenheit), Geschmacksstörungen, Hyperpigmentierungen sowie Fibrosen der Haut.

Das Ziel des vorliegenden Dissertationsprojektes war eine Quantifizierung des Effektes einer solchen strahlentherapeutischen Behandlung auf die kapilläre Mikromorphologie in humanem Gewebe im Vergleich zu einer nicht bestrahlten Patienten-Kontrollgruppe.

Die Stichprobe umfasste insgesamt 30 Patienten (24 männliche und 6 weibliche) im Alter zwischen 45 und 84 Jahren (Mittelwert: 60 Jahre). Alle Patienten hatten als Erstdiagnose ein Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle. Nach Abschluss des Tumorstagings wurde bei 17 Patienten eine ablativ Tumorresektion mit primärer, mikrovaskulärer Transplantation durchgeführt. Eine rein sekundäre Rekonstruktion erfolgte bei den Patienten (n=13), bei denen bereits eine ablativ Tumorresektion und primäre, mikrovaskuläre Transplantation durchgeführt wurde. 15 Patienten wiesen ein bestrahltes Transplantatlager und/ oder Transplantat auf. Die restlichen 15 Patienten waren nicht strahlentherapeutisch behandelt worden und dienten als Kontrollgruppe. Je Patient wurde jeweils eine circa 1cm³ große Hautprobe von überschüssigen Transplantatlageranteilen und Transplantatanteilen gewonnen. Das geschah

entweder in der ersten ablativen Operation oder in der zweiten Operation, einer sekundären Rekonstruktion des Tumordefektes. Die gewonnenen Proben wurden histologisch und immunhistochemisch gefärbt (CD-31 Antikörper) und einer Analyse zugeführt. Untersuchte Zielparameter waren die Kapillaranzahl, der Kapillarflächeninhalt und der Kapillarflächeninhalt im Verhältnis zu einem definierten Gesamtgesichtsfeld. Weitere Auswertungen der genannten Parameter wurden im Verhältnis zur Bestrahlungsdosis und der kapillären Veränderungen in der Zeit seit Ende der Bestrahlung bis zur nachfolgenden Operation durchgeführt. Durch Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests zum interindividuellen Vergleich und Verwendung des Wilcoxon-Rangsummentests zum intraindividuellen Vergleich wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Gewebeproben vorlagen. Kapillaranzahl, Kapillarflächeninhalt und prozentualer Flächenanteil der Kapillaren am Gesamtgesichtsfeld waren in bestrahlten Transplantatlagern gegenüber nicht bestrahlten Transplantatlagern signifikant verringert ($p < 0,05$). Bei allen anderen inter- und intraindividuellen Testungen, nämlich dem Vergleich zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Transplantaten, zwischen bestrahlten Transplantaten und nicht bestrahlten Transplantatlagern und zwischen nicht bestrahlten Transplantaten und Transplantatlagern, ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem bestrahlten Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe feststellen ($p > 0,05$). Jedoch war der prozentuale Flächenanteil der Kapillaren im bestrahlten Transplantat gegenüber dem bestrahlten Transplantatlager signifikant vergrößert. Außerdem waren in den Mittelwerten Trends erkennbar, die eine reduzierte Kapillaranzahl in bestrahlten gegenüber nicht bestrahlten Transplantaten, einen verringerten Kapillarflächeninhalt sowie prozentualen Flächenanteil der Kapillaren in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis in Transplantatlagern andeuteten. In Abhängigkeit der Intervalllänge zwischen Bestrahlung und Operation waren Mittelwerttrends zu einer reduzierten Kapillaranzahl, einem reduzierten Gesamtflächeninhalt und vermindertem prozentualem Flächenanteil der Kapillaren in bestrahlten Transplantatlagern gegenüber nicht bestrahlten Transplantatlagern erkennbar. Das untersuchte Patientenkollektiv, bei dem ≥ 27

Monate zwischen dem Ende einer Bestrahlung und der darauf folgenden Operation vergangen waren, zeigte eine höhere Reduktion der untersuchten kapillären Strukturen gegenüber der Vergleichsgruppe (Zeitintervall zwischen Ende der Bestrahlung und OP <27 Monate). Zudem verminderte sich bei steigender Bestrahlungsdosis der Gesamtflächeninhalt und der prozentuale Flächenanteil der Kapillaren am Gesamtgesichtsfeld.

1. Einleitung

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist ein maligner Tumor, der lokal destruierend wächst und bevorzugt in die lokoregionalen, also submentalen und submandibulären Lymphknoten des Halses metastasiert (*Ehrenfeld et al. 2002, Klingerman et al. 1994, Lепенies et al. 2004*). Nach Angaben des Deutschen epidemiologischen Krebsregisters betragen die Inzidenzraten (alterskorrigiert, pro 100.000, pro Jahr) für Malignome der Lippen, Zunge und der Mundhöhle (ICD-10-GM; C00-C06) im Saarland im Jahr 2006 für Männer 84 und Frauen 29 Fälle. Das Durchschnittsalter liegt bei 70 Jahren. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (*Breuninger et al. 2008*). *Eckardt (2003)* beschrieb eine Häufigkeitszunahme maligner Tumoren in der Mund-, Kiefer- und Gesichtsregion, wobei die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle mit über 90% die häufigsten malignen Neubildungen sind. Nach vielen Jahren der Abnahme ist die Inzidenz und/ oder Mortalität für Karzinome der Mundhöhle und des Oropharynx in den letzten 2-3 Jahrzehnten in vielen industriellen Ländern, insbesondere in Süd- und Osteuropa (*La Vecchia et al. 1992*), angestiegen. Diese ansteigenden Inzidenzraten werden dem steigenden Tabak- und Alkoholkonsum zugeschrieben. (*Johnson et al. 1996, Jovanovic et al. 1993, La Vecchia et al. 1997, Moreno-López et al. 2000, Reichart 2001, Reichart et al. 2000*). Schon *Wynder et al.* beschrieben 1965 diesen kausalen Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und Kopf-Hals-Karzinomen. Die Prävalenz von Tabakkonsum innerhalb der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen beträgt ungefähr 80- 90 % (*Eckardt 2003, Schottenfeld 1992, Spitz 1994*). Ebenso wird der Einfluss einer chronischen Infektion mit dem Herpes-Simplex- Virus und dem humanen Papillomavirus (*Eckardt 2003, Franceschi et al. 1996*) diskutiert.

Die Mortalität für Malignome der Lippen, Zunge und der Mundhöhle (ICD-10-GM; C00-C06) lag im Saarland, Deutschland im Jahr 2006 bei Männern bei

26% und Frauen bei 31%.

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle besitzt eine ausgeprägte Tendenz zur frühen lymphogenen Metastasierung (*Bischof et al. 2006, DiNardo 1998, Lепенies et al. 2004, McGuirt et al. 1995*). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt dann bei 25-50% (*Breuninger et al. 2008*).

Die Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle erfordert ein interdisziplinäres Behandlungskonzept. Sie besteht aus der chirurgischen, radiologischen, chemotherapeutischen oder kombiniert chirurgisch-radiologischen Behandlung (*Eckardt 2003, Breuninger et al. 2005*). Die chirurgische Therapie richtet sich nach der Ausbreitung und nach dem histologischen Typ des Tumors und ist entweder kurativ oder palliativ intendiert. Die vollständige chirurgische Exzision mit topografisch zugeordneter histopathologischer Kontrolle der Schnittländer (3D-Histologie) stellt die Therapie der ersten Wahl dar. Bei einer Invasion des Tumorgewebes in tiefe extradermale Strukturen wie Knorpel, Skelettmuskel oder Knochen (T4, TNM-Klassifikation), folgen der dadurch erfordernten Resektion anatomisch wichtiger Strukturen rekonstruktive Maßnahmen (*Aitasalo et al. 1997, Evans et al. 1994, Jose et al. 1991, Schliephake et al. 1996*), die immer häufiger zu funktionell und ästhetisch exzellenten Resultaten führen (*Aitasalo et al. 1997*). Ist aus anatomischen oder medizinischen Gründen eine Tumorresektion nicht möglich, so ist eine Strahlentherapie, eventuell in Kombination mit Chemo-/Immuntherapie, anzustreben (*Bischof et al. 2006, Breuninger et al. 2005*). Bei der Chemotherapie sind dann vor allem die Medikamente 5-Fluoruracil, Vincristin, Cisplatin oder Carboplatin in Mono- oder Kombinationstherapie geeignet (*Ehrenfeld et al. 2002*).

Wie bereits beschrieben, kann im Rahmen der multimodalen Therapieprotokolle vor oder nach chirurgischer Interaktion eine Radatio erfolgen. Im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte kann die Radatio prä- oder postoperativ durchgeführt werden (*Bischof et al. 2006, Wiltfang et al. 2003*). Die Höhe der für eine Tumorvernichtung notwendigen Dosis ist dabei von der Größe des

Tumors, dem histologischen Typ und der Sauerstoffversorgung der Tumorzellen abhängig (*Bischof et al. 2006, Eckardt 2003*).

Die Indikation zur präoperativen Strahlentherapie kann bei lokal fortgeschrittenen Tumoren gegeben sein, deren komplette operative Entfernung fraglich ist, oder wenn aufgrund der topographisch- anatomischen Lage des Tumors eine Operation nur unter erheblichen funktionellen und/ oder ästhetischen Folgen für den Patienten durchzuführen wäre (*Bischof et al. 2006, Eckardt 2003, Lohr und Wenz 2007*). Eine postoperative Strahlentherapie ist zur Minderung der lokoregionären Tumorrezidivrate indiziert, wenn mikro- oder makroskopische (R1-/ R2-Resektion) Tumorreste im Bereich des Primärtumors oder der regionären Lymphknotenstationen vorliegen. Sie ist außerdem notwendig, wenn eine knappe R0-Resektion des Tumors oder eine Rezidiv-Situation vorliegt. Bei einer primären Bestrahlung wird eine Dosis von 65-70 Gy für den Tumor und befallene Lymphknoten empfohlen. Bei einer postoperativen Bestrahlung sollte eine Dosis von 54-60 Gy für befallene Areale nach kompletter Tumorresektion (R0) und >60 Gy für Risikoareale angewendet werden (z.B. extrakapsuläre Ausbreitung) (*Bischof et al. 2006*). Nachteil einer Strahlenbehandlung ist die Belastung des umliegenden Normalgewebes (*Baker und Krochak 1989, Dimitrievich et al. 1979, Fajardo und Berthrong 1988, Fajardo et al. 2001, Reinhold und Fajardo 1990, Schultze-Mosgau et al. 2002a, Schultze-Mosgau et al. 2002b*). Die Strahlentoleranz des umliegenden Gewebes ist daher der limitierende Faktor bei Auswahl der Höhe der Strahlendosis. Die Veränderungen im Bereich der benachbarten Organe resultiert in akuten (bis 90 Tage nach Therapie) und chronischen Nebenwirkungen (ab dem 91.Tag nach Therapie) (*Seegenschmiedt et al. 2000*). Während akute Nebenwirkungen (z.B. Erythem, Übelkeit, Erbrechen) vorübergehend auftreten, sind im Langzeitverlauf vor allem die chronischen Schäden von Bedeutung. Im Mund,- Kiefer,- und Gesichtsbereich sind dies vor allem Xerostomie (chronische Mundtrockenheit), Geschmacksstörungen, Hyperpigmentierungen, Fibrosen der Haut, mit gleichzeitiger deutlicher Reduktion der Lebensqualität (*de Graeff et al. 1999, Epstein 2001, Wiltfang et al. 2003*). Eine Infektion des strahlengeschädigten Knochens (z.B. durch

ortsständige Keime der Mundhöhle) kann zu einer infizierten Osteoradionekrose führen, die konservative (z.B. Antibiotikagabe) häufig jedoch chirurgische Behandlungsmaßnahmen erfordert (*AWMF-Leitlinien-Register*). Aus diesem Grund gehört neben der möglichst optimierten Strahleneinwirkung am Tumor auch die Minimierung von Akut- und Spätschäden zu den wichtigen Parametern einer radioonkologischen Therapieplanung (*Eckardt 2003, Görgün und Ermis 1989*).

Ursächlich für diese Langzeitfolgen ist eine strahlenbedingt ausgelöste pathologische Veränderung der Mikrovaskularisation (*Baker und Krochak 1989, Fajardo und Berthrong 1988, Fajardo et al. 2001, Reinhold und Fajardo 1990, Schultze-Mosgau et al. 2002a, Schultze-Mosgau et al. 2002b*). Grundlage der Mikrovaskularisation ist eine effiziente Neovaskularisation. *Ucuzian und Greisler (2007)* kategorisierten diesen Begriff in zwei generelle Prozesse: Vaskulogenese und Angiogenese. Vaskulogenese bezeichnet den Aufbau einer Kapillarformation durch Vorläuferzellen, die Angioblasten. Angiogenese ist nach dieser Definition die Bildung und Entstehung neuer Kapillaren aus vorher vorhandenen Gefäßen (*Choe und Lee 2007*). Der Angiogenese kommt eine zentrale Rolle in Wundheilung und Tumorstadium (*Risau 1990, Tsai et al. 2005*) zu. In einem komplexen, mehrstufigen Vorgang, werden durch Wachstumsfaktoren (zum Beispiel FGF (fibroblast growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor) und TGF α und TGF β (Transforming growth factor alpha und beta)), pro-angiogene Zytokine und Inhibitoren die Endothelzellen in ihrer Wanderung, Proliferation und Differenzierung beeinflusst, stimuliert und gesteuert (*Polverini 1995, Risau 1990, Ucuzian und Greisler 2007*). Wird durch eine Radiotherapie der Prozess der Vaskulo- und Angiogenese negativ beeinflusst, kann sich dies histologisch und klinisch widerspiegeln.

Baker und Krochak (1989) und Mao (2006) beschrieben in diesem Zusammenhang eine langfristige Manifestation von Strahlenschäden an Endothelzellen und der Basalmembran von Gefäßen. Die Ursache sahen sie in

einer progressiven Gewebszerstörung mit Entwicklung einer erhöhten Gefäßpermeabilität und Veränderung des extrazellulären Milieus. Darüber hinaus beobachteten sie eine irreguläre Proliferation der Endothelzellen, die zu Kapillaren mit unregelmäßigem Durchmesser und unregelmäßiger Ausprägung führte. *Schultze-Mosgau et al. (2002a)* stützten die Erkenntnisse von Baker und Krochak, indem sie in präoperativ bestrahltem humanem Gewebe ebenfalls eine reduzierte Kapillaranzahl, Kapillarovaskularisation sowie ein abnehmendes Verhältnis zwischen Kapillarflächeninhalt und der gesamten Gewebefläche nach einer Bestrahlung feststellten. Die klinischen Folgen einer reduzierten Kapillarovaskularisation und Neovaskularisation von Gefäßen durch eine strahlentherapeutische Behandlung sind postoperativ auftretende Wundheilungsstörungen (*Liu et al. 2005*), Fibrosierung (*Baker und Krochak 1989, Watson 1979*) und Entzündung (*Polverini 1995*). Außerdem ist die Einheilung von Hauttransplantaten in bestrahlten Transplantatlagergewebe (*Duncan et al. 1985, Krag et al. 1982, Schultze-Mosgau et al. 2000, Tan et al. 1978, Watson 1979*) beeinträchtigt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Untersuchung, inwiefern sich die bereits beschriebenen histologischen Strukturveränderungen zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Gewebe mikromorphologisch darstellen.

2. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Evaluierung des Effekts einer multimodalen Therapie auf die kapilläre Mikromorphologie in humanem Gewebe.

Die Therapie des Plattenepithelkarzinoms erfordert ein interdisziplinäres chirurgisches wie strahlentherapeutisches Behandlungskonzept. Ein zentrales Problem bei einer Radatio ist die Schädigung des gesunden Gewebes, welche sich auf zellulärer Ebene in einer Störung der Mikromorphologie (Fibrose) äußert. Um diesen Effekt der Bestrahlung zu untersuchen, werden innerhalb des Patientenkollektivs der Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Jena eine strahlentherapeutische vorbehandelte einer nicht bestrahlten Patientengruppe gegenüber gestellt. Anhand einer experimentellen Untersuchung von Kapillaranzahl, Kapillarflächeninhalt und Kapillarflächeninhalt im Verhältnis zu einem definierten Gesamtgesichtsfeld bei bestrahlten Patienten (Transplantatlager und/ oder Transplantat) im Verhältnis zu nicht bestrahlten Patienten, erfolgt eine Evaluierung der kapillären Mikromorphologie. In einem weiteren Schritt sollen innerhalb der Versuchsgruppen Untersuchungen erfolgen, um einzelne Parameter des Bestrahlungsprotokolls zu quantifizieren. Dabei handelt es sich um die Veränderungen der kapillären Mikromorphologie im Verhältnis zur Bestrahlungsdosis und der kapillären Veränderungen in der Zeit seit Ende der Bestrahlung bis zur nachfolgenden Operation.

3. Material und Methoden

3. 1 Patientenkollektiv

Bei dem untersuchten Patientenkollektiv handelte es sich um insgesamt 30 Patienten (24 männliche und 6 weibliche) der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/ Plastische Chirurgie des Universitätsklinikums Jena. Das Alter der Patienten lag zwischen 45 und 84 Jahren (Mittelwert: 60 Jahre).

Alle Patienten wiesen als Diagnose ein Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich auf (ICD-10-GM; C00-C06). Im Rahmen der chirurgischen Therapie erfolgte die Gewinnung von Probenmaterial aus verschiedenen Bereichen des OP-Situs. Bei 19 Patienten fand die Gewinnung in Verbindung mit der primären Tumorsektion und Rekonstruktion statt. Bei den restlichen 11 Patienten wurde die Probenentnahme in einer sekundären Operation durchgeführt, bei der eine Ausdünnung mikrovaskulärer Transplantate oder eine weiterführende plastische Rekonstruktion stattfand.

Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt (Reg.-Nr. 2148-10/07).

3.2 Probenentnahme und Aufbewahrung

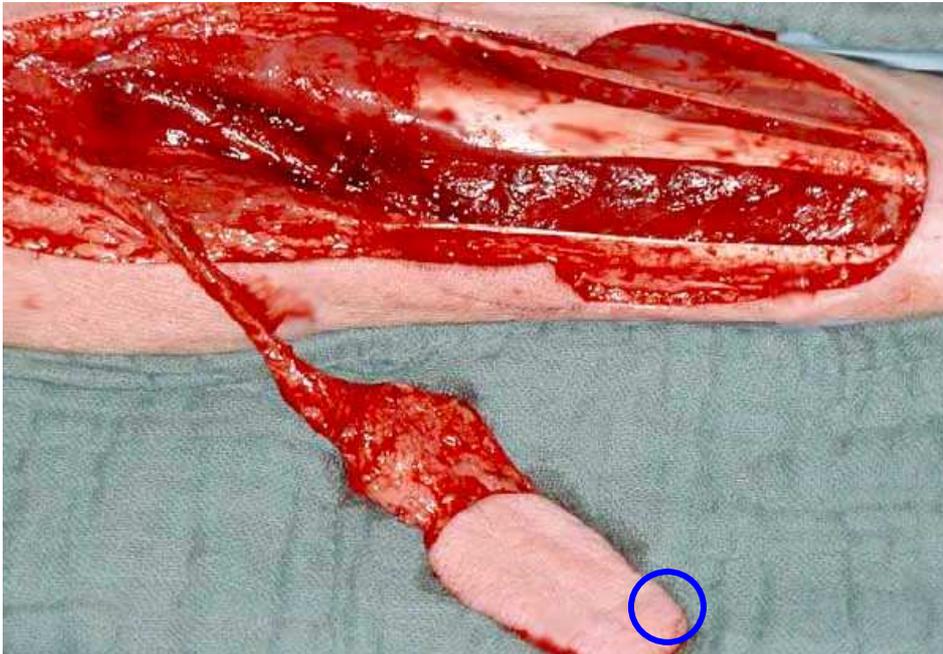


Abb. 3.1: Darstellung eines Unterarms mit freipräpariertem, gestielten Radialistransplantat und Kennzeichnung der Entnahmestelle der Hautprobe am Transplantat (blauer Kreis)

Im Rahmen primärer Rekonstruktionen wurden Hautproben von 1cm³ vom Transplantatlager und Transplantat (siehe Abb. 3.1) entnommen und umgehend in 4%-ige Formaldehydlösung (phosphatgepuffert, pH 7,4, 4°C) gegeben. Für die Probenentnahmen war kein zusätzlicher Eingriff notwendig. Um im Rahmen einer Tumorresektion eine R0-Resektion zu sichern, werden routinemäßig Proben vom Transplantatlager entnommen. Die Probengewinnung dieser Arbeit erfolgte aus diesem Material und es war somit gewährleistet, dass kein Schaden oder eine zusätzliche Belastung für den Patienten auftrat. Bei der Hebung des Transplantats und seiner Einpassung in den Defektbereich erfolgte ein Zuschnitt. Das hierbei anfallende Gewebe, welches sonst entsorgt worden wäre, wurde für die Untersuchungen des Transplantats asserviert. Bei einem zweiten, routinemäßigen operativen Eingriff (Ausdünnung des Transplantates oder plastischen Rekonstruktion) wurde

überschüssiges Transplantatgewebe ebenfalls zur Probenaufbereitung asserviert.

3.3 Fixierung, Dehydrierung, Einbettung

Die gewonnen Gewebeproben wurden für 6-24 Stunden in einer 4%-igen Formaldehydlösung (phosphatgepuffert, pH 7,4; 4 °C) fixiert. Um dem Gewebe im Anschluss die Formaldehydlösung vollständig zu entziehen, wurde dieses über Nacht in Aqua dest. gegeben. Anschließend erfolgte die schrittweise Dehydrierung des Gewebes in einer Histokinette (Leica, TP 1020, Wetzlar, Deutschland) über zwölf Stunden (Tabelle 3.1).

Die vollständige Dehydrierung ist Voraussetzung für eine Durchtränkung des Gewebes mit dem hydrophoben Einbettmedium Paraffin.

Ablauf Histokinette		
1	70% Alkohol I	60 Min
2	70% Alkohol II	60 Min
3	96% Alkohol I	60 Min
4	96% Alkohol II	60 Min
5	100% Alkohol I	60 Min
6	100% Alkohol II	60 Min
7	100% Alkohol III	60 Min
8	Xylol/ Alkohol	60 Min
9	Xylol I	60 Min
10	Xylol II	60 Min
11	Paraffin I	60 Min
12	Paraffin II	60 Min
Σ		12h

Tabelle 3.1: Ablauf der Dehydrierung und Paraffineinbettung

3.4 Ausbettung

Um aus dem dehydrierten und eingebetteten Gewebe Gewebeschnitte anfertigen zu können, war es erforderlich, einen Gewebeblock zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurde das Gewebe an einer Paraffinausgießstation (EG 1160, Leica, Wetzlar, Deutschland) in Paraffin (Histosec-Pastillen, Merck, Darmstadt, Deutschland), welches eine Temperatur von 59-60°C aufwies, ausgebettet. Nach dem Ausbetten des Gewebes wurde dieses über Nacht bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend erfolgte eine Lagerung bei -20°C im Gefrierschrank über Nacht.

3.5 Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden als Längsschnitte mit einer Schichtdicke von 3µm (Rotationsmikrotom RM 2145, Leica, Wetzlar, Deutschland) senkrecht zur Hautoberfläche angefertigt.

Die Schnitte wurden in Aqua dest. gegeben und mit einer Präparationsnadel auf einen silanisierten Objektträger (Polisine, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) gebracht und anschließend auf dem Objektträger in einem auf 50°C-60°C erwärmten Aqua dest. Bad gestreckt. Um eine gute Anhaftung des Gewebeschnittes auf dem Objektträger zu gewährleisten, musste das Aqua dest. zwischen Schnitt und Objektträger verdunsten. Aus diesem Grund erfolgte eine einstündige Lagerung der Objektträger bei 57°C im Ofen.

3.6 Immunhistochemische Färbung

3.6.1 ABC-Methode

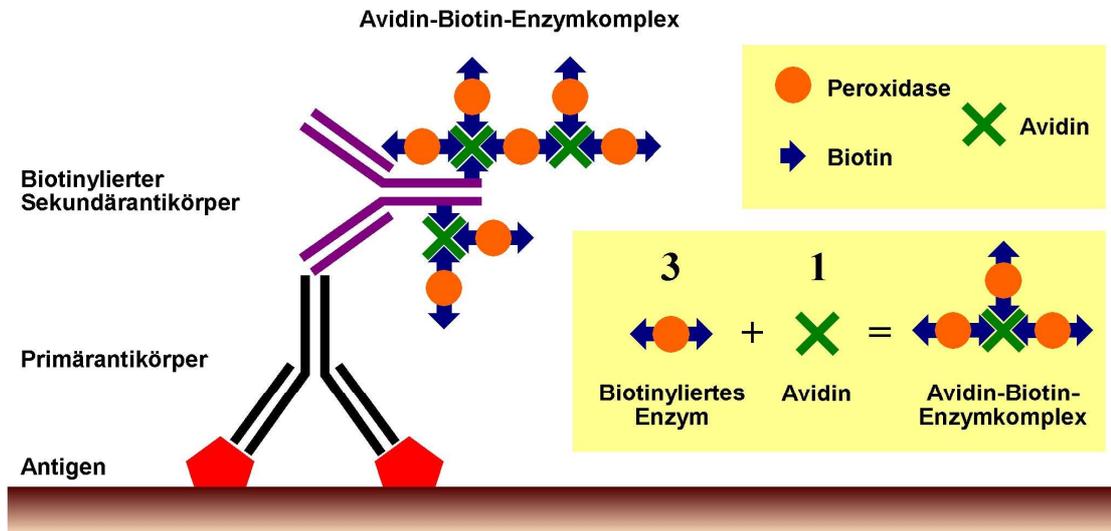


Abb. 3.2: ABC-Methode

Zur Darstellung des Kapillarendothels erfolgte der spezifische Nachweis mit Hilfe eines Antikörper-gekoppelten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (ABC-POX) (Burns et al. 1974, Hsu und Raine 1981, Hsu et al. 1981, Lloyd et al. 1985, Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Hierbei wird die Affinität von Biotin (wasserlösliches Vitamin) zu Avidin (Glykoprotein) genutzt. Nach spezifischer Bindung eines Primärantikörpers an das nachzuweisende Epitop wird ein biotinmarkierter (biotinylierter) Sekundärantikörper (Brückenantikörper) eingesetzt. Dieser bindet spezifisch an den Primärantikörper.

Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Der Komplex wird so produziert, dass ein Molekül Avidin drei Moleküle Biotin binden kann und somit auch zur Bindung der biotinmarkierten Meerrettichperoxidasemoleküle (HRP) zur Verfügung steht. Am Sekundärantikörper kommt es zu einer Komplexbildung (ABC-POX) mit Anreicherung mehrerer Meerrettichperoxidasemoleküle. In der chromogenen Nachweisreaktion wird an der durch den Sekundärantikörper festgelegten Stelle

ein Farbsubstrat durch die Meerrettichperoxidase enzymatisch umgesetzt. Die Lokalisation der Farbreaktion repräsentiert das mit dem Primärantikörper gesuchte Epitop (Antigen).

In der vorliegenden Arbeit kam das gesuchte Epitop, das CD 31 Einketten-Transmembranprotein vom Typ 1, durch die ABC-POX- Methode zur farblichen Darstellung.

3.6.2 Immunhistochemische Färbung

In Vorbereitung auf die immunhistochemische Färbung wurden die Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (Xylol 100% 2 x 10 min, Propanol 100% 2 x 1 min; und 96%, 80%, 60%, 50% je 1x 1 min, Aqua dest. 1 x 1min). Nach Lagerung in Trishydroxymethylaminomethan (Tris/TBS) (pH 7,6; 3 x 5 Minuten bei 22 °C) wurde, um falsch positive Färberesultate zu vermeiden, zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (3%, 20 min., 22 °C) verwendet.

Es erfolgte ein 3 x 5 minütiges Einbringen der Gewebeschnitte in Tris (pH 7,6). Die Antigendemaskierung der für die Primärantikörperbindung wichtigen Epitope wurde mit einem Citratpuffer (DAKO S 1699, DAKO, Glostrup, Dänemark) durchgeführt (25 min in Dampfgerar, Multigourmet, Braun, Deutschland) mit anschließender Abkühlung der Schnitte für 45 min bei 21 °C. Einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers im Gewebe beugte die Verwendung eines unspezifischen Blockiermediums Blotto (Ansatz: 0,5 g Magermilchpulver, 50 ml Tris, 50 µl Tween 20® (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Normalserum der Spezies, in welcher der Sekundärantikörper gewonnen wurde, hier Rabbitserum (Blotto und Normalserum im Verhältnis 5:1, 22 °C, 30min), vor. Die Epitopmarkierung auf dem Gewebeschnitt erfolgte während der Inkubation der Präparate mit einem monoklonalen Mouse- Anti- Human Primärantikörper (CD 31/ PECAM-1, DAKO 0823, DAKO, Glostrup, Dänemark) in einem Verhältnis 1:40 mit einem

Antikörperverdünnungsmittel (S 2022, DAKO, Glostrup , Dänemark) in einer feuchten Kammer (21 °C, 1h). (Tabelle 3.2)

Verwendeter Primärantikörper				
Target	Spezies	Antikörper	Verdünnung	Hersteller
CD31	Maus	monoklonal Maus anti- human CD 31	01:40	DAKO, Glostrup Dänemark
Verwendeter Sekundärantikörper				
Target	Spezies	Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper	Kaninchen	Rabbit anti- mouse, biotinyliert	1:100	Dako, Glostrup Dänemark

Tabelle 3.2: Verwendeter Primärantikörper und Sekundärantikörper. Es wurden für die immunhistochemische Nachweisreaktion der angegebene monoklonale Primärantikörper und Sekundärantikörper in den angegebenen Konzentrationen und Spezifitäten eingesetzt.

Anschließend wurden Überschüsse des Primärantikörpers mit dem Waschpuffer Tris entfernt (pH 7,6; 3 x 5 min, 21 °C).

Als Sekundärantikörper wurde ein polyklonaler biotinylierter Rabbit anti-mouse Antikörper (E 0464, Dako, Glostrup, Dänemark) in einer feuchten Kammer eingesetzt (30 min, 21 °C). Verdünnt wurde mit Tris (pH 7,6; 21 °C). Antikörperspezies, Antikörperspezifität und die angewandte Verdünnung sind aus Tabelle 3.2 ersichtlich.

Im Folgenden wurde, nach erneutem Einsatz des Waschpuffers Tris (pH 7,6; 3 x 5 min, 21 °C) mit dem Avidin-Biotin/Meerrettich-Peroxidasekomplex (ABC/HRP-Komplex, DAKO, Glostrup, Dänemark) inkubiert (feuchte Kammer, 30 min, 21 °C). Anschließendes Waschen erfolgte in Tris (pH 7,6; 3 x 5 min, 21 °C). Für die chromogene Nachweisreaktion wurde Diaminobezidin (DAB) benutzt (5 min, 21 °C). Im Anschluss daran erfolgte eine Kontrolle des Färberesultats unter einem Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

Nach Lagerung der Gewebeschnitte in Aqua dest. (5 min, 21 °C) wurden zur Kontrastverstärkung und verbesserten Auswertbarkeit die Zellkerne in dem Gewebe mit Hämalaun (DAKO, Glostrup, Dänemark) gegengefärbt. Nach Einbringen der Gewebeschnitte in Aqua dest. (5 min, 21 °C) und eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 60%, 80% 96%, Propanol 100%, Xylol 100%, je 1 x 1 min, 21 °C) wurden die Gewebeproben über Xylol eingedeckt.

Von jeder Gewebeprobe wurden drei gewonnene Schnitte auf einen Objektträger übertragen. Dabei diente jeweils ein Schnitt als Negativkontrolle (siehe Abb. 3.3). Dieser wurde identisch behandelt, jedoch wurde der Inkubationsschritt mit dem polyklonalen Primärantikörper durch Antikörper-Verdünnungslösung (S 2022 Dako, Glostrup, Dänemark) ersetzt.

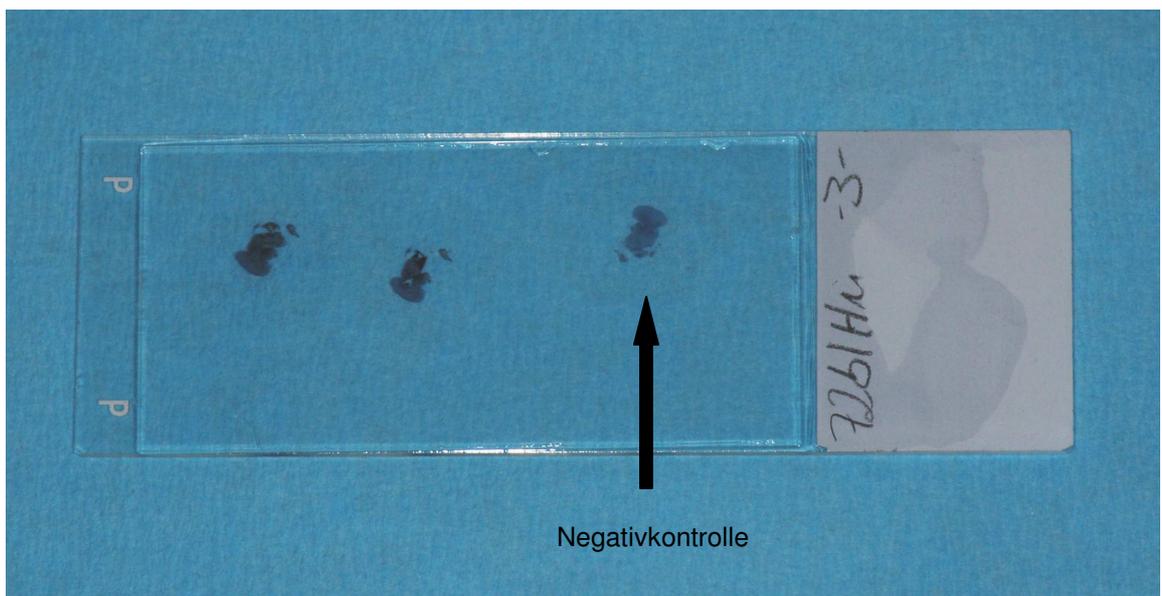


Abb. 3.3: Darstellung des Objektträgers mit Gewebeschnitten und Negativkontrolle

3.6.3 Histochemische Hematoxylin- Färbung

Ein histologisches Präparat jeder Probe wurde der konventionellen HE-Färbung unterzogen.

3.7 Analyseverfahren

3.7.1 Kapillaranalyse

Im Hellfeldmikroskop (Imager M1, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden bei 400-facher Vergrößerung Anzahl und Flächeninhalt der Kapillarlumina, welche durch den CD 31 Marker spezifisch markiert wurden bestimmt. Ebenso wurde der Flächeninhalt der Kapillarlumina im Verhältnis zum Flächeninhalt des gesamten Gesichtsfeldes (340 x 260 μm) in bestrahlten und nicht bestrahlten Transplantaten und Transplantatlagern ausgewertet.

Drei Gesichtsfelder je Gewebeschnitt wurden bei 400-facher Vergrößerung nach der Random-Sampling Methode nach Weibel (*Weibel 1979, Weibel 1989*) ausgewählt und mit einer Axio Cam digitalisiert (AxioCam MRc 5, Zeiss, Jena, Deutschland). Hierzu kam die Software Axio Vision Release 4.5 zum Einsatz. Die pro Gesichtsfeld erfassten Kapillarquerschnitte wurden durch drei unabhängige Personen ausgezählt. Aus den ermittelten Werten wurde ein Mittelwert für die jeweilige Gewebeprobe berechnet und als Wert pro Gesamtgesichtsfeld angegeben. Zur Erfassung der Flächeninhalte der Kapillaren in nicht bestrahltem Gewebe und bestrahltem Gewebe wurden die Kapillarflächen je Gesichtsfeld aus dem Verhältnis CD31-positiver Kapillarflächen zur Gesamtfläche mit dem Softwareprogramm Axio Vision Release 4.5 interaktiv in μm^2 ermittelt.

Um den prozentualen Anteil der CD31-positiven Kapillarflächen am Gesamtgesichtsfeld in μm^2 zu ermitteln, erfolgte durch Axio Vision Release 4.5 eine Umrechnung der Absolutwerte in %-Werte.

Zudem wurde bei einer mikroskopischen 100-fachen Vergrößerung eine Digitalisierung der Negativkontrolle (siehe Abb.3.3) jedes Gewebeschnittes, sowie eine Übersichtsaufnahme und eine Aufnahme der HE- Färbungen in 50-facher Vergrößerung angefertigt. Insgesamt wurden somit die Parameter Kapillaranzahl, Kapillarflächeninhalt und der prozentuale Flächenanteil der im Querschnitt dargestellten Kapillarlumina am Gesamtgesichtsfeld erfasst.

3.7.2 Statistische Tests

Die Daten wurden ohne Annahme einer Normalverteilung in Form von Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Zur Überprüfung interindividueller Unterschiede zwischen den Gruppen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Der Wilcoxon-Rangsummentest für verbundene Stichproben wurde für die intraindividuelle Überprüfung auf Unterschiede in den Gruppen angewendet. Als signifikant wurden p-Werte $\leq 0,05$ angesehen. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm SPSS V.17 für Windows XP (SPSS Inc., Chicago, USA).

4. Ergebnisse

Die 30 erfassten Patienten wurden in zwei gleich große Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (Gruppe 1) beinhaltete alle Patienten, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht bestrahlt waren (n=15). In der zweiten Gruppe befanden sich Patienten (n=15), bei denen die Gewebeproben im Rahmen einer sekundären, mikrovaskulären Rekonstruktion entnommen wurden, der im Vorfeld eine Radiotherapie vorausgegangen war. Da bei fünf dieser Patienten auch das Transplantat bereits bestrahlt war, wurden diese in einer Untergruppe (Gruppe 2b) der zweiten Gruppe zusammengefasst. In Gruppe 1 und Gruppe 2 wurden insgesamt 16 Scapulatransplantate, zwölf Radialistransplantate, ein Latissimus dorsi-Transplantat, sowie ein Fibulatransplantat in das Transplantatlager verpflanzt. Insgesamt wurden Proben von 30 Patienten untersucht. Davon wiesen acht Patienten einen Primärtumor und neun Patienten ein Tumorrezidiv auf (siehe Tabelle 4.1). Bei 13 Patienten erfolgte eine sekundäre Rekonstruktion des Tumordefektes.

	Gruppe 1 (Kontrollgruppe)	Gruppe 2a	Gruppe 2b
Patientenanzahl (n)	n=15	n=10	n=5
Radatio	Nein	Ja	Ja
Bestrahltes Areal	/	Transplantatlager	Transplantatlager und Transplantat
Mittlere Dosis in Gy	0	55 Gy	Transplantat 54 Gy
Plattenepithelkarzinom- Rezidiv	2 Patienten	4 Patienten	3 Patienten

Tabelle 4.1: Gruppenbildung und klinische Patientendaten

4.1 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Analyse

4.1.1 Kapillaranzahl

Wie in Kapitel 3.7 erläutert, wurden im Rahmen der Kapillaranalyse insgesamt drei Parameter erhoben. Die mittlere Kapillaranzahl im nicht bestrahlten Transplantatlager im Vergleich zum bestrahlten Transplantatlager ist in Abb.4.1 angegeben. Im nicht bestrahlten Transplantatlager (Abb. 4.2a) ist der Mittelwert der Kapillaranzahl (19,1 Kapillaren \pm 11) signifikant größer als im bestrahlten Transplantatlager (Abb. 4.2b) (10,1 Kapillaren \pm 4,8; $p < 0,05$). Die mittlere Kapillaranzahl im nicht bestrahlten Transplantat ist (14,5 Kapillaren \pm 6,5) nicht signifikant größer als im bestrahlten Transplantat (12,8 Kapillaren \pm 8,3; $p > 0,05$). Die mittlere Kapillaranzahl des bestrahlten Transplantatlagers (10,1 Kapillaren \pm 4,8) zeigt einen nicht signifikant kleineren Mittelwert im Vergleich zum bestrahlten Transplantat (12,8 Kapillaren \pm 8,3; $p > 0,05$). Abb. 4.1 zeigt ebenfalls das Verhältnis der mittleren Kapillaranzahl zwischen nicht bestrahltem Transplantatlager (19,1 Kapillaren \pm 11) und nicht bestrahltem Transplantat (14,5 Kapillaren \pm 6,5; $p > 0,05$). Das Verhältnis dieser Mittelwerte ist nicht signifikant unterschiedlich zueinander.

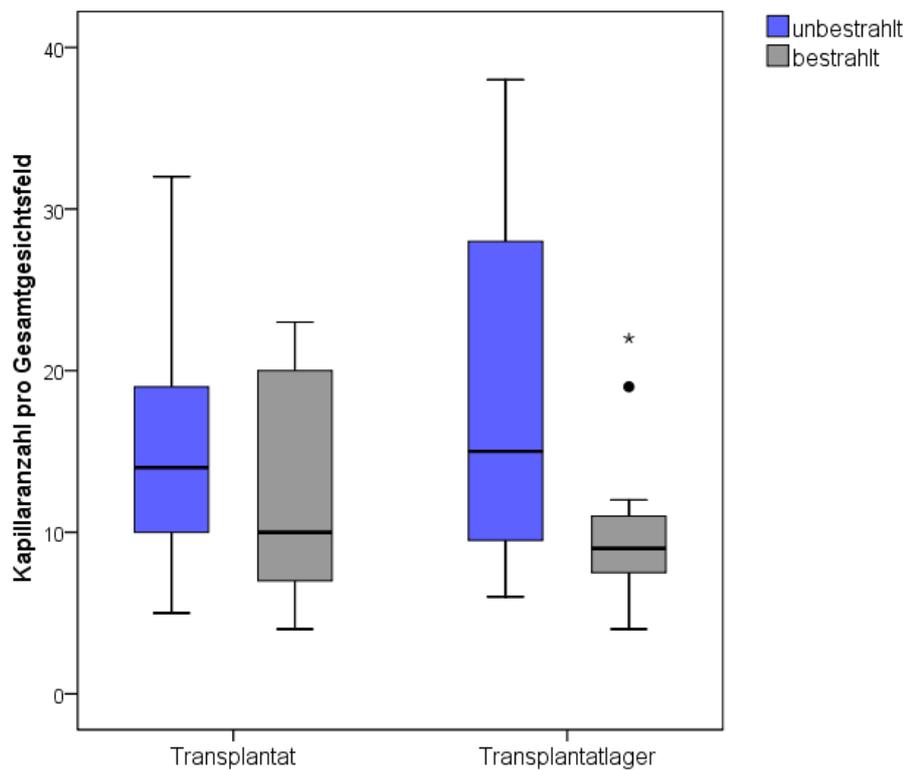


Abb. 4.1: Kapillaranzahl in Transplantaten (mittlere Bestrahlungsdosis 54 Gy) und Transplantatlägern (mittlere Bestrahlungsdosis 55 Gy); Boxplotdarstellung mit Angabe der Standardabweichung (*/*)

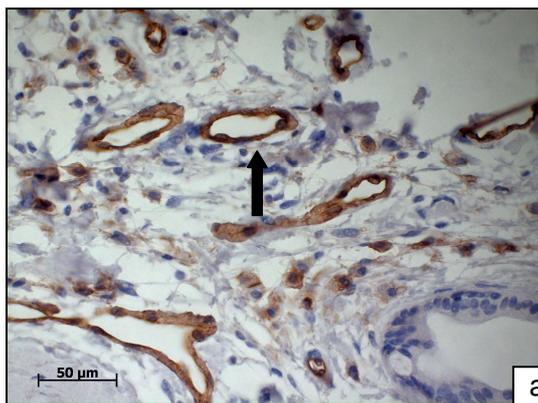


Abb. 4.2 a: Nicht bestrahltes Transplantatlager. Kapillarendothelien (braun markiert; ↑); Immunohistochemische Anfärbung des CD 31-Proteins, Vergrößerung x 40.

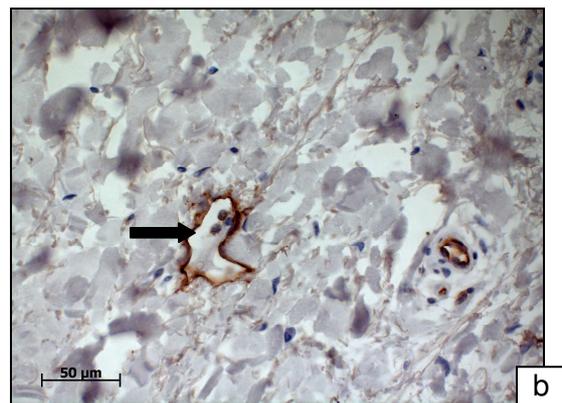


Abb. 4.2 b: Bestrahltes Transplantatlager. Kapillarendothelien (braun markiert; ↑); Immunohistochemische Anfärbung des CD 31-Proteins, Vergrößerung x 40.

4.1.2 Gesamtflächeninhalt der Kapillaren

Der mittlere Kapillarflächeninhalt im nicht bestrahlten und bestrahlten Transplantatlager ist in Abb. 4.3 angegeben. Im nicht bestrahlten Transplantatlager (Abb. 4.4a) ist der Mittelwert ($17620 \mu\text{m}^2 \pm 9815$) signifikant größer als im bestrahlten Transplantatlager (Abb. 4.4b) ($5018 \mu\text{m}^2 \pm 4344$; $p < 0,05$). Der mittlere Kapillarflächeninhalt im nicht bestrahlten Transplantat ($14145 \mu\text{m}^2 \pm 8519$) unterscheidet sich nicht signifikant vom dem bestrahlten Transplantat ($15416 \mu\text{m}^2 \pm 12056$; $p > 0,05$). Der mittlere Kapillarflächeninhalt im bestrahlten Transplantatlager ($5018 \mu\text{m}^2 \pm 4344$) weicht nicht signifikant von dem bestrahlten Transplantat ($15416 \mu\text{m}^2 \pm 12056$; $p > 0,05$) ab. Im nicht bestrahlten Transplantatlager ist der Mittelwert ($17620 \mu\text{m}^2 \pm 9815$) nicht signifikant größer als im nicht bestrahlten Transplantat ($14145 \mu\text{m}^2 \pm 8519$; $p > 0,05$).

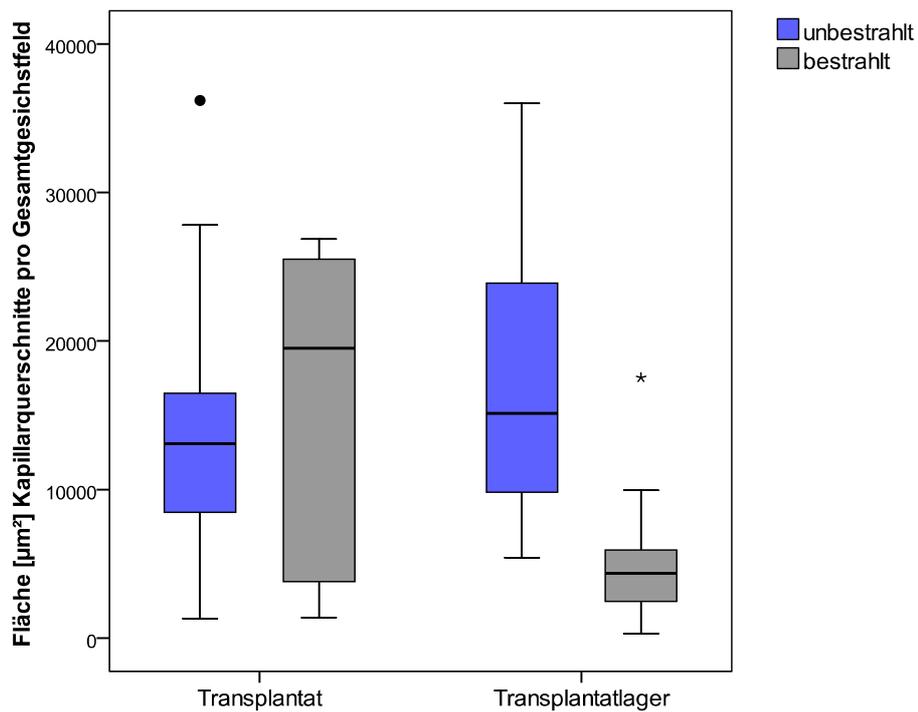


Abb. 4.3: Flächeninhalt der Kapillarquerschnitte pro Gesamtgesichtsfeld in Transplantaten (mittlere Bestrahlungsdosis 54 Gy) und Transplantatlager (mittlere Bestrahlungsdosis 55 Gy); Boxplotdarstellung mit Angabe der Standardabweichung (*/*)

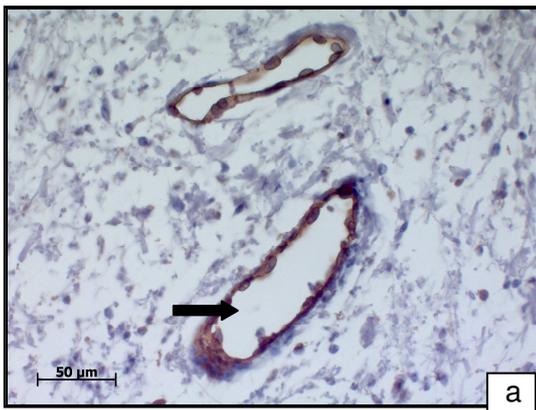


Abb. 4.4 a: Nicht bestrahltes Transplantatlager. Kapillarendothelien (braun markiert; ↑); Immunhistochemische Anfärbung des CD 31-Proteins, Vergrößerung x 40.

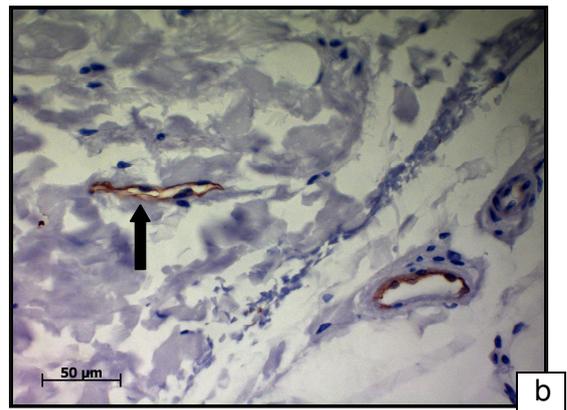


Abb. 4.4 b: Bestrahtes Transplantatlager. Kapillarendothelien (braun markiert; ↑); Immunhistochemische Anfärbung des CD 31-Proteins, Vergrößerung x 40.

4.1.3 Prozentualer Flächenanteil der Kapillaren am Gesichtsfeld

Abb. 4.5 stellt das Verhältnis des prozentualen Flächenanteils der Kapillaren am Gesichtsfeld zwischen nicht bestrahltem und bestrahltem Transplantatlager dar. Dessen Mittelwert ist im nicht bestrahlten Transplantatlager (Abb. 4.6a) ($21,1\% \pm 10,8$) signifikant größer als im des bestrahlten Transplantatlager (Abb. 4.6b) ($5,8\% \pm 5$; $p < 0,05$). Der Mittelwert im nicht bestrahlten Transplantat ($15,8\% \pm 9,8$) ist nicht signifikant anders gegenüber dem bestrahlten Transplantat ($17,7\% \pm 13,8$; $p > 0,05$). Der mittlere prozentuale Flächenanteil der Kapillaren im bestrahlten Transplantatlager ($5,8\% \pm 5$) ist signifikant kleiner gegenüber dem bestrahlten Transplantat ($17,7\% \pm 13,8$; $p < 0,05$). Das Verhältnis des mittleren prozentualen Flächenanteils der Kapillaren im nicht bestrahlten Transplantatlager ($21,1\% \pm 10,8$) zum nicht bestrahlten Transplantat ($15,8\% \pm 9,8$; $p > 0,05$) ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen den untersuchten Gruppen.

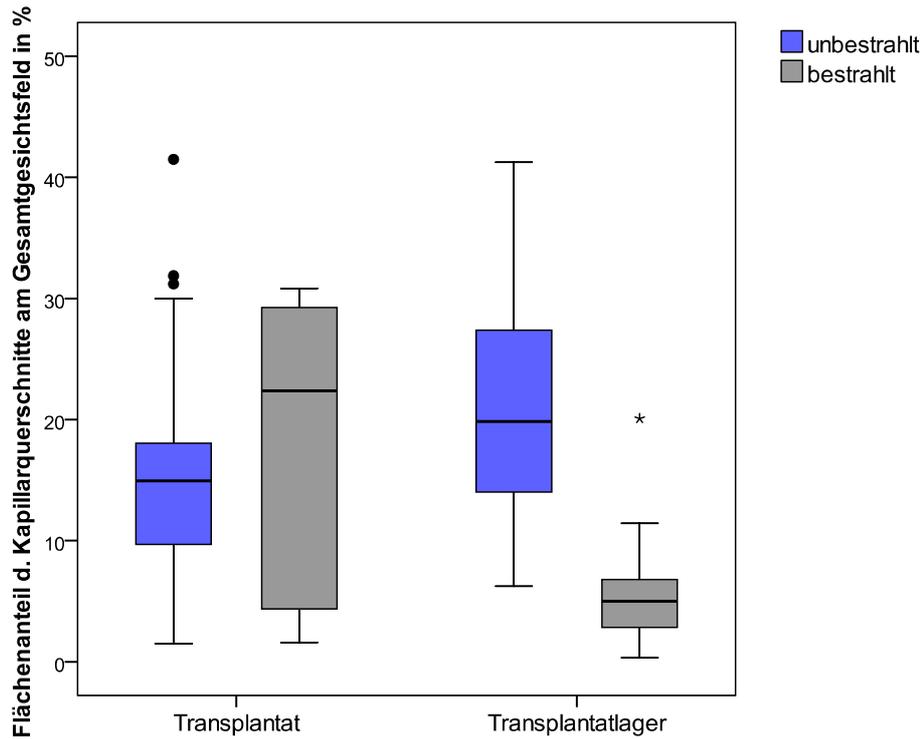


Abb. 4.5: Prozentualer Flächenanteil der Kapillaren am Gesamtgesichtsfeld in Transplantaten (mittlere Bestrahlungsdosis 54 Gy) und Transplantatlagern (mittlere Bestrahlungsdosis 55 Gy); Boxplottdarstellung mit Angabe der Standardabweichung (*/*)



Abb. 4.6 a: Nicht bestrahltes Transplantatlager. Kapillarendothelien (braun markiert; ↑); Immunhistochemische Anfärbung des CD 31-Proteins, Vergrößerung x 40.

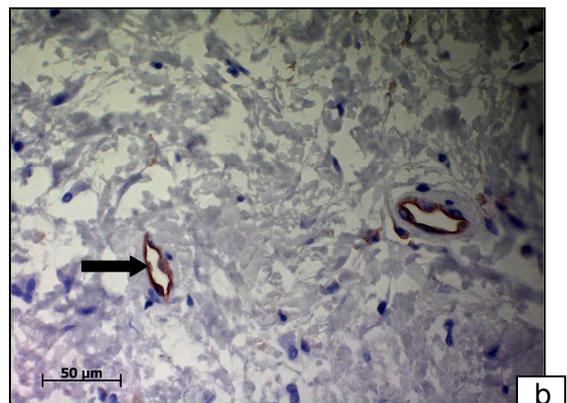


Abb. 4.6 b: Bestrahltes Transplantatlager. Kapillarendothelien (braun markiert; ↑); Immunhistochemische Anfärbung des CD 31-Proteins, Vergrößerung x 40.

4.2 Dosis der Bestrahlung

4.2.1 Kapillaranzahl und Bestrahlungsdosis

Um die Folgen der Bestrahlungshöhe abzuschätzen, wurden die 15 bestrahlten Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 (n=5) umfasste alle Patienten, die mit einer Dosis zwischen 28-50 Gy bestrahlt wurden. Gruppe 2 (n=10) umfasste alle Patienten, die mit einer Dosis zwischen 60-70,8 Gy bestrahlt wurden, siehe Tabelle 4.2.. Abb. 4.4 zeigt die mittlere Kapillaranzahl im Transplantatlager bei Gruppe 1 (10,0 Kapillaren \pm 7) im Verhältnis zur Kapillaranzahl im Transplantatlager der Gruppe 2 (10,2 Kapillaren \pm 10,2) und die nicht bestrahlte Kontrollgruppe. Zwischen den beiden bestrahlten Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied in der Kapillaranzahl ($p > 0,05$).

	Gruppe 1	Gruppe 2
Patientenanzahl (n)	n=5	n=10
Bestrahlungsdosis	28-50 Gy	60-70,8 Gy
Bestrahltes Areal	Transplantatlager	Transplantatlager

Tabelle 4.2: Gruppenbildung

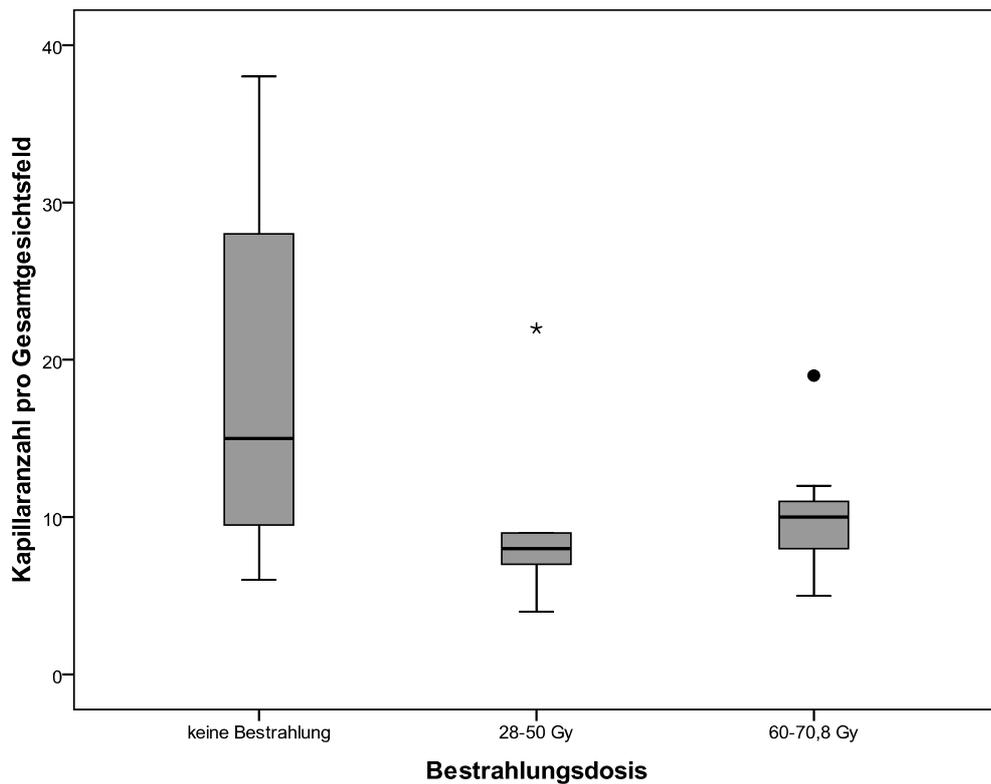


Abb. 4.4: Kapillaranzahl in Transplantatlagern; Bestrahlungsdosis der Gruppe 1 (28-50 Gy) und Gruppe 2 (60-70,8 Gy); Boxplotdarstellung mit Angabe der Standardabweichung (*/*).

4.2.2 Gesamtflächeninhalt der Kapillaren und Bestrahlungsdosis

Der Gesamtflächeninhalt der Kapillaren in Gruppe 1 (Bestrahlungsdosis 28-50 Gy) und Gruppe 2 (Bestrahlungsdosis 60-70,8 Gy) im Verhältnis zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe ist in Abb. 4.5 dargestellt. Der Mittelwert in Gruppe 1 ($6104,6\mu\text{m}^2 \pm 6910$) ist im Transplantatlager nicht signifikant unterschiedlich gegenüber dem Mittelwert in Gruppe 2 im Transplantatlager ($4474,9 \mu\text{m}^2 \pm 2673$; $p > 0,05$).

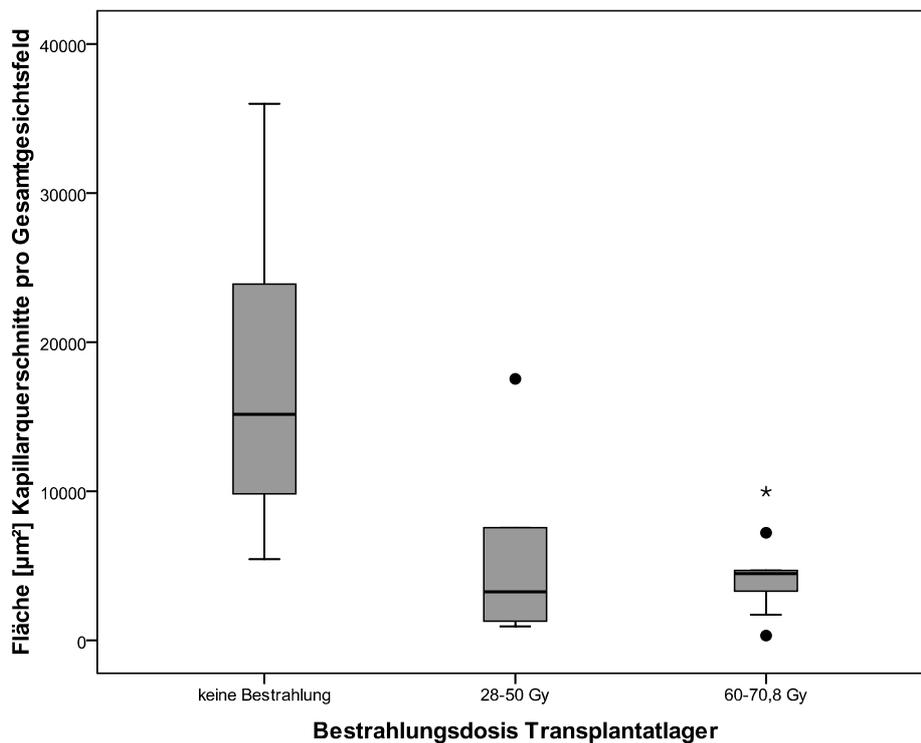


Abb. 4.5: Flächeninhalt Kapillarquerschnitte pro Gesamtgesichtsfeld in Transplantatlager; Bestrahlungsdosis der Gruppe 1 (28-50 Gy) und Gruppe 2 (60-70,8 Gy); Boxplotdarstellung mit Angabe der Standardabweichung (*./.)

4.2.3 Prozentualer Flächenanteil der Kapillaren am Gesichtsfeld und Bestrahlungsdosis

Der prozentuale Flächenanteil der Kapillaren am Gesichtsfeld in Gruppe 1 (Bestrahlungsdosis 28-50 Gy) und Gruppe 2 (Bestrahlungsdosis 60-70,8 Gy) ist in Abb. 4.6 dargestellt. Der Mittelwert in Gruppe 1 ($7\% \pm 7,9$) ist im Transplantatlager nicht signifikant unterschiedlich gegenüber dem Mittelwert in Gruppe 2 im Transplantatlager ($5,1\% \pm 3,1$; $p > 0,05$).

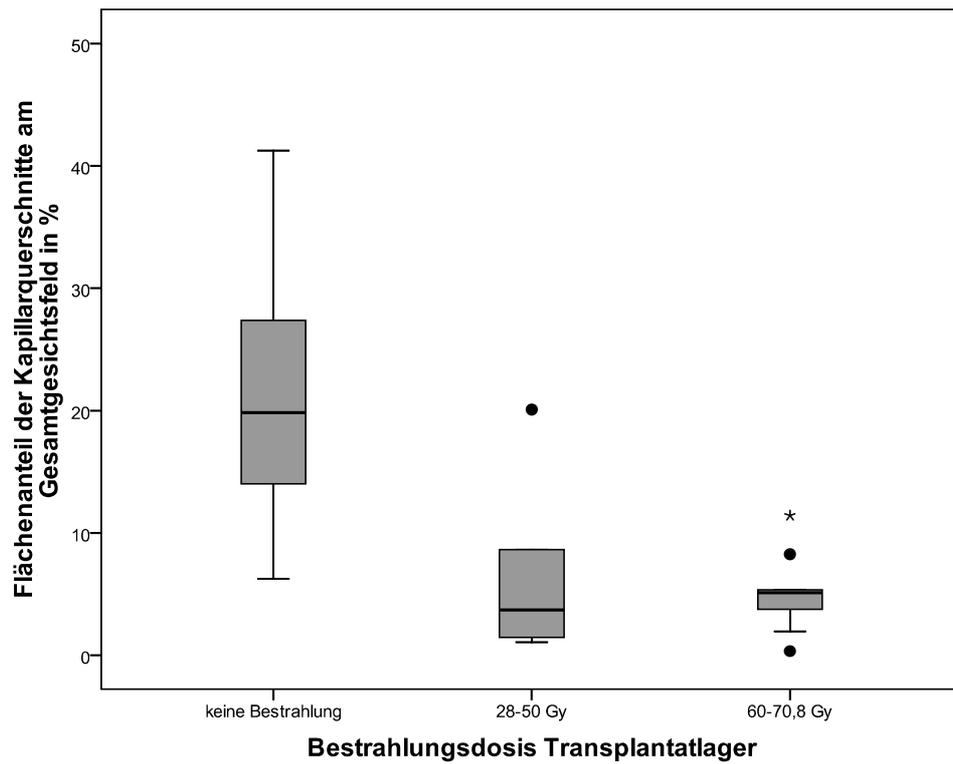


Abb. 4.6: Prozentualer Flächenanteil der Kapillaren am Gesamtgesichtsfeld in Transplantatlager Bestrahlungsdosis der Gruppe 1 (28-50 Gy) und Gruppe 2 (60-70,8 Gy); Boxplotdarstellung mit Angabe der Standardabweichung (*/*)

4.3 Intervalllänge zwischen Bestrahlung und Operation

4.3.1 Kapillaranzahl und Intervalllänge zwischen Bestrahlung und Operation

Um eine signifikante Veränderung der Kapillaranzahl im Transplantatlager in Abhängigkeit von der Länge des Zeitintervalls seit Ende der Bestrahlung bis zur Operation zu überprüfen, wurden die bestrahlten Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 (< 27 Monate) umfasste alle Patienten, bei denen weniger als 27 Monate zwischen dem Abschluss der Bestrahlung und der Operation lagen (n=9) (3-27 Monate). Gruppe 2 (≥27 Monate) umfasste alle Patienten, bei denen 27 oder mehr Monate zwischen dem Abschluss der Bestrahlung und der Operation lagen (n=6) (27-75 Monate), siehe Tabelle 4.3. Die Intervallbegrenzung in Gruppe 1 und Gruppe 2 wurde so gewählt, dass möglichst zwei gleich große, statistisch vergleichbare Gruppen resultierten. Abb. 4.7 stellt die Kapillaranzahl im Transplantatlager in Gruppe 1 (< 27 Monate) und Gruppe 2 (≥27 Monate) dar. Der Mittelwert der Kapillaranzahl in Gruppe 1 (< 27 Monate) (10,4 Kapillaren ± 5) unterscheidet sich nicht signifikant gegenüber dem Mittelwert in Gruppe 2 (≥27 Monate) (9,7 Kapillaren ± 4,9; $p>0,05$).

	Gruppe 1	Gruppe 2
Patientenanzahl (n)	n=9	n=6
Intervalllänge zw. Radation und OP	<27 Monate (3-27 Monate)	≥27 Monate (27-75 Monate)
Bestrahltes Areal	Transplantatlager	Transplantatlager

Tabelle 4.3: Gruppenbildung

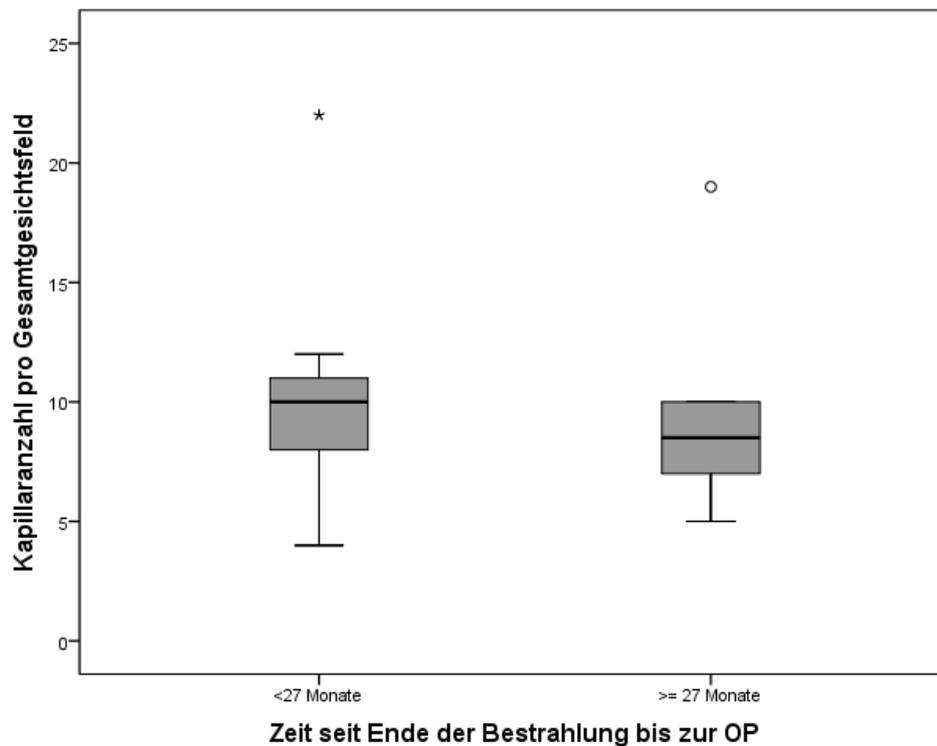


Abb. 4.7: Kapillaranzahl in Transplantatlagern; Zeitintervall zwischen Bestrahlung und OP; Gruppe (<27 Monate) und Gruppe 2 (≥27 Monate); Boxplotdarstellung mit Angabe der Standardabweichung (* / °)

4.3.2 Gesamtflächeninhalt der Kapillaren und Intervalllänge zwischen Bestrahlung und Operation

Das Verhältnis zwischen dem Gesamtflächeninhalt der Kapillaren in Gruppe 1 (<27 Monate) und Gruppe 2 (≥27 Monate) im Transplantatlager wird in Abb. 4.8 dargestellt. Der Mittelwert in Gruppe 1 (<27 Monate) ($5738 \mu\text{m}^2 \pm 5074$) ist nicht signifikant unterschiedlich gegenüber dem Mittelwert in Gruppe 2 (≥27 Monate) ($3938 \mu\text{m}^2 \pm 3052$; $p > 0,05$).

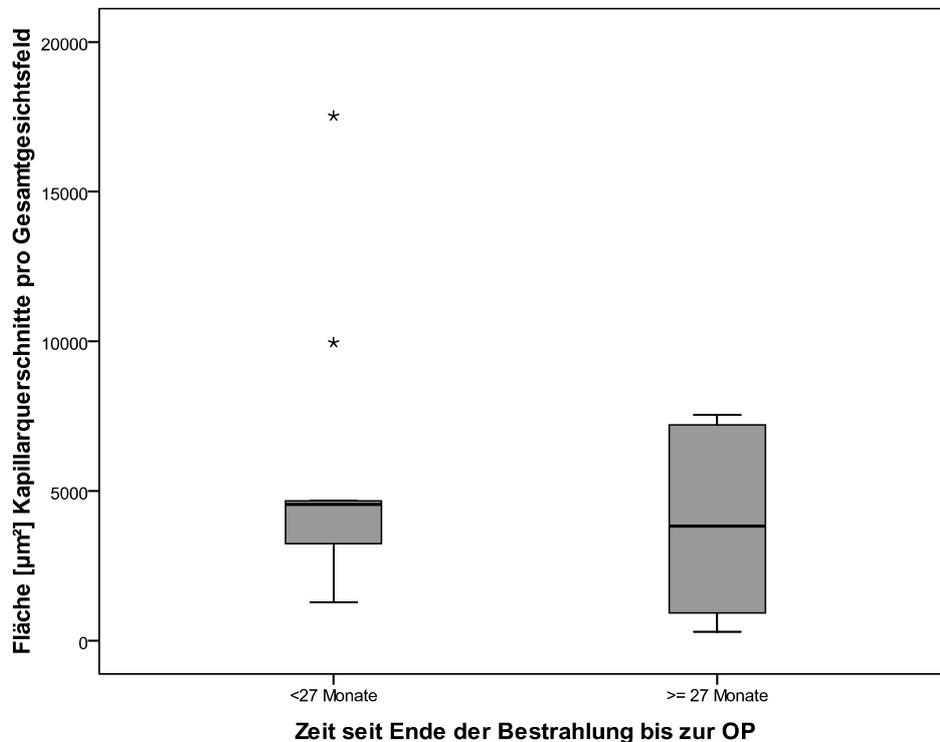


Abb. 4.8: Flächeninhalt Kapillarquerschnitte pro Gesamtgesichtsfeld in Transplantatlagern; Zeitintervall zwischen Bestrahlung und OP; Gruppe 1 (<27 Monate) und Gruppe 2 (≥27 Monate); Boxplotdarstellung mit Angabe der Standardabweichung (*)

4.3.3 Prozentualer Flächenanteil der Kapillaren am Gesichtsfeld und Intervalllänge zwischen Bestrahlung und Operation

Das Verhältnis zwischen dem prozentualen Flächenanteil der Kapillaren am Gesichtsfeld in Gruppe 1 (< 27 Monate) und Gruppe 2 (≥27 Monate) im Transplantatlager wird in Abb. 4.9 dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen dem Mittelwert in Gruppe 1 (< 27 Monate) (6,6% ± 5,8) gegenüber dem Mittelwert in Gruppe 2 (≥27 Monate) (4,5% ± 3,5; $p > 0,05$).

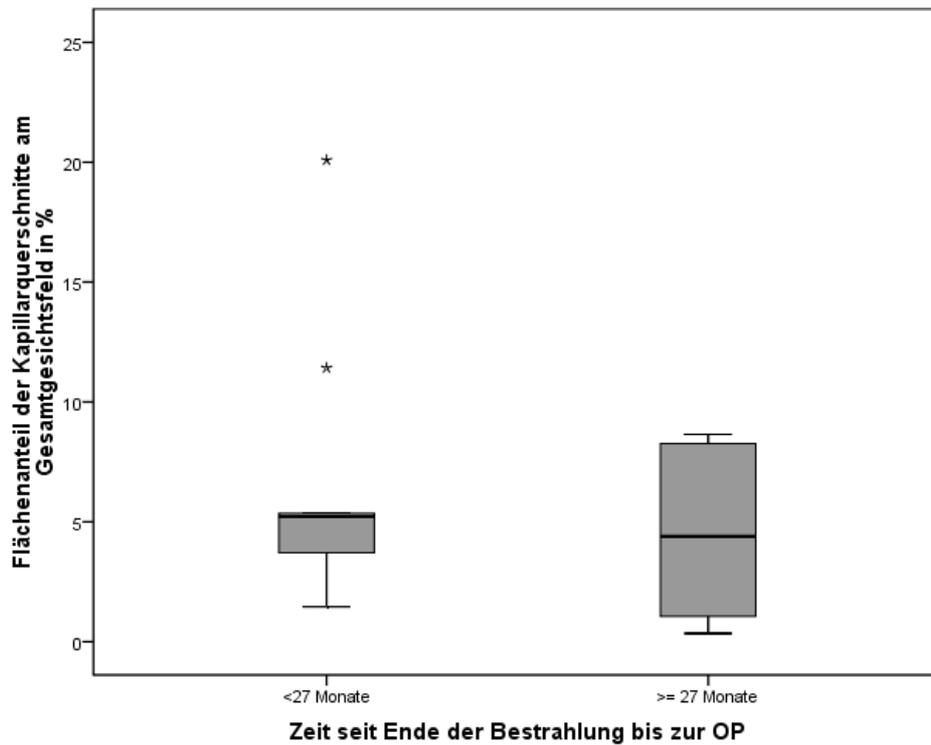


Abb. 4.9: Prozentualer Flächenanteil der Kapillaren am Gesamtgesichtsfeld in Transplantatlagern; Zeitintervall zwischen Bestrahlung und OP; Gruppe 1 (<27 Monate) und Gruppe 2 (≥27 Monate); Boxplotdarstellung mit Angabe der Standardabweichung (*)

5. Diskussion

Das Ziel dieses Dissertationsprojektes war die Untersuchung des Einflusses einer multimodalen Therapie auf die Mikromorphologie in humanem Gewebe. In einer explorativen Studie wurden Kapillaranzahl, Kapillarflächeninhalt und prozentualer Flächenanteil der Kapillaren im Verhältnis zu einem definierten Gesamtgesichtsfeld sowie das Verhältnis von Kapillaranzahl zu Kapillarflächeninhalt in bestrahlten und nicht bestrahlten Geweben verglichen. Die Bewertung der kapillären Mikromorphologie gilt als gängige Methode zur Bewertung von Strahlenfolgen (*Schultze-Mosgau et al. 2002a, Schultze-Mosgau et al. 2002c*). Außerdem wurde untersucht, welchen Einfluss die Dosis einer Bestrahlung und das Zeitintervall nach Ende einer Bestrahlung bis zur anschließenden Operation auf oben genannte Parameter nehmen, so wie von anderen Autoren bereits beschrieben (*Schultze-Mosgau et al. 2002a, Mao 2006*). Bei dem untersuchten Gewebe handelte es sich um Hautproben bestrahlter und nicht bestrahlter Transplantate und Transplantatlager. Bei den Transplantaten handelte es sich um Scapula-, Radialis- und Latissimus-dorsi-Transplantate. Das Transplantatlager wird durch das Gewebe der Mundhöhle gebildet und entsteht durch den tumorresektionsbedingten Defekt.

Die Bewertung des Transplantatlagergewebes zeigte, dass bei bestrahlten Patienten eine signifikant verminderte Kapillaranzahl, ein verminderter Kapillarflächeninhalt und verminderter prozentualer Flächenanteil gegenüber den Patienten vorlag, die kein bestrahltes Transplantatlager aufwiesen. Eine signifikante Reduktion der Kapillaranzahl (*Narayan und Cliff 1982*) und des Kapillarlumens in bestrahlten Transplantatlagern gegenüber nicht bestrahlten Transplantatlagern sowie eine Abnahme des prozentualen Flächenanteils der Kapillaren am Gesamtgesichtsfeld konnten in anderen Studien ebenfalls nachgewiesen werden (*Roth et al. 1999, Schultze-Mosgau et al. 2000, Schultze-Mosgau et al. 2002 a, b*). Darüber hinaus wiesen tierexperimentelle Studien mit Ratten eine verminderte Blutversorgung und verminderte

Kapillaranzahl in bestrahltem Gewebe (*Jahnsen et al. 1998*) auf. Die Ursachen für diese Ergebnisse sind in den bereits einleitend beschriebenen postradiogen einsetzenden Veränderungen der geweblichen Mikrovaskularisation zu sehen. Bereits nach 24 Stunden beginnt ein progressiver Verlust kapillärer Endothelzellen mit daraus folgender Zerstörung der Gefäßintegrität (*Mao 2006*). Bei Zerstörung und/oder Verkleinerung des Kapillarlumens sinkt die Fließgeschwindigkeit des Blutes (*Narayan und Cliff 1982*), wodurch eine Minderperfusion des umliegenden Gewebes resultiert (*Boyer und Conger 1972, Roth et al. 1999*). Dies kann eine Aktivierung von Myofibroblasten und eine daraus resultierende sekundäre, perivaskuläre Fibrose mit überschießender Bildung von interstitiellem Bindegewebe und Vernarbung verursachen (*Watson 1979, Kiener et al. 1991*). Klinische Bedeutung haben die aus dieser Arbeit hervorgehenden Ergebnisse in Zusammenhang mit der Einheilung von Transplantaten in präoperativ, strahlentherapeutisch behandelte Transplantatlager (*Krag et al. 1982, Schultze-Mosgau et al. 2002c*). Dies spielt bei Patienten mit Karzinomen im Mund-Kiefer- und Gesichtsbereich eine bedeutende Rolle. Durch multimodale Protokolle im Rahmen der Primärtherapie oder Behandlung von Rezidiven ist in der klinischen Praxis häufig die Verpflanzung von Gewebe in vorbestrahlte Areale erforderlich. In tierexperimentellen Studien (Ratte) zeigte sich, dass der Vaskularisationsstatus des Transplantatlagers den limitierenden Faktor für die auf kapillarer Ebene statt findende Einheilung des Transplantats darstellt (*Duncan et al. 1983, Schultze-Mosgau et al. 2002c*). Bei der Untersuchung von bestrahlten und nicht bestrahlten Transplantaten zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den untersuchten Parametern. Allerdings konnte bezüglich Kapillaranzahl, Flächeninhalt und prozentualem Flächenanteil der Kapillaren ein Trend der Mittelwerte beobachtet werden. Es zeigte sich eine verminderte Kapillaranzahl und ein leicht vergrößerter Flächeninhalt und prozentualer Flächenanteil der Kapillaren in den bestrahlten Transplantaten gegenüber den nicht bestrahlten Transplantaten. Diese Ergebnisse korrelieren mit Beobachtungen einer Studie über die Radiosensitivität von vaskularisiertem Gewebe, bei der eine Verschiebung zu größeren Kapillardurchmessern nach

Bestrahlung festgestellt wurde (*Dimitrievich et al. 1984*). Andere Untersuchungen zeigten einen Anstieg der Kapillaranzahl nach Bestrahlungstherapie durch Aktivierung von Wachstumsfaktoren (*Riekki et al. 2001*). Im Gegensatz dazu steht die bereits einleitend beschriebene progressive Gewebszerstörung mit Entwicklung irregulärer Endothelzellen und unregelmäßig ausgeprägten kapillären Strukturen nach einer Bestrahlung (*Baker und Krochak 1989, Mao 2006*). Eine weitere Ursache für die Aktivierung der Angiogenese wurde in den Kapillarwandschäden vermutet, die durch die direkte Bestrahlung ausgelöst wurden (*Riekki et al. 2001*). Im Widerspruch dazu steht hingegen die Beobachtung eines durch Radatio zum Stillstand gebrachten Zellzyklus (*Liu et al. 2005*) und dosisabhängigen, intrazellulären DNA-Brüchen mit Verlust der endothelialen Zellintegrität (*Mao 2006*). Fehlende signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Transplantaten können in der vorliegenden Arbeit durch die geringe Fallzahl von nur fünf Patienten in der Gruppe der bestrahlten Transplantate gegenüber einer Gruppengröße von n=25 auf Seite der nicht bestrahlten Transplantate liegen. Weiterhin wurde der Einfluss der Bestrahlungsdosis im Hinblick auf die kapilläre Mikromorphologie ausgewertet. Zwischen der mit 28-50Gy bestrahlten Gruppe 1 und der mit 60-71Gy bestrahlten Gruppe 2 konnten in allen untersuchten Parametern keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Während die Kapillaranzahl in beiden Gruppen im Mittelwert etwa gleich waren, zeigte sich ein Trend zu reduzierten Kapillarflächeninhalten und verminderten Flächenanteilen der Kapillaren am Gesamtgesichtsfeld bei höheren Bestrahlungsdosen. Diese Resultate sind konsistent zu Ergebnissen von *Schultze-Mosgau et al.*, das im bestrahlten Transplantatlager eine kontinuierlich abnehmende Vaskularisation in Abhängigkeit der totalen Dosis nachwiesen wurde. (*Schultze- Mosgau et al. 2002 a*). Weitere Forschungsarbeiten zeigten einen proportionalen Zusammenhang zwischen der totalen Dosis und der abnehmenden Kapillaranzahl sowie eine Zerstörung der vaskulären Integrität im Gewebe. (*Cunningham et al.1979, Dimitrievich et al. 1984 Baker und Krochak 1989, , Mao 2006*). Es konnte gezeigt werden, dass durch eine verlangsamte Erythrozytenperformanz (*Roth et al. 1999*) bei steigender Bestrahlungsdosis die

Sauerstoffversorgung im Gewebe verringert wird (*Dimitrievich et al. 1984, Jahnsen et al. 1998*). Die eigenen explorativen Resultate im Zusammenhang zwischen der Dosis und der Beeinträchtigung der kapillären Strukturen sind im Hinblick auf die geringe Fallzahl in Gruppe 1 (n=5) allerdings nicht aussagefähig.

Eine signifikante Veränderung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter in Abhängigkeit von der Länge des Zeitintervalls seit Ende der Bestrahlung bis zur Operation konnte zwischen den beiden Gruppen (< 27 Monate) versus (\geq 27 Monate) nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich bei allen untersuchten Parametern ein eindeutiger Trend. Alle Mittelwerte in Gruppe 2 waren gegenüber den Mittelwerten in Gruppe 1 geringer. Ergebnisse anderer Autoren, die eine signifikante Abnahme der Kapillaranzahl, Vaskularisation, Kapillarproliferation und Zunahme von irregulären Vaskularisationsmustern und Wundheilungsstörungen durch Minderperfusion des Gewebes in Abhängigkeit der Zeit nach Beendigung einer Radiotherapie beschrieben, belegen diesen Trend (*Calvo et al. 1987, Hirst et al. 1980, Hopewell et al. 1993, Rubin und Casarett 1968, Schultze-Mosgau et al. 2002 a, Sumi et al. 1984*). Im Hinblick auf die Einheilung von mikrovaskulären Transplantaten in zuvor bestrahlte Transplantatlager ist von Bedeutung, dass der Vaskularisationsstatus des Transplantatlagers (z.B. der Mundboden) den limitierenden Faktor für die Einheilung darstellt (*Schultze-Mosgau et al. 2002c*). Da in Abhängigkeit der Zeit nach einer Bestrahlung keine Verbesserung der kapillären Vaskularisation und außerdem eine zunehmende Fibrosierung, also vermehrte Bildung interstitiellen Bindegewebes mit anschließender Vernarbung zu erwarten ist, wurde empfohlen, vier bis sechs Wochen nach Abschluss einer Bestrahlungstherapie eine primäre Rekonstruktion durchzuführen (*Kiener et al. 1991, Schultze-Mosgau et al. 2002a*). Im Vergleich zwischen nicht bestrahlten Transplantatlager und Transplantaten waren Flächeninhalt und Flächenanteil der Kapillaren am Gesamtgesichtsfeld im Transplantatlager signifikant größer als im Transplantat. Die Kapillaranzahl war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden nicht strahlentherapeutisch behandelten Geweben. Der zuvor im Gewebe vorhandene Tumor könnte eine mögliche Ursache für

erweiterte beziehungsweise vergrößerte Kapillaren im Transplantatlager gewesen sein. Da Tumorgewebe erhöhte metabolische Ansprüche stellt, stimulieren die Tumorzellen eine pathologische Neovaskularisation (*Papetti und Herman 2002*). Die Ergebnisse aus den intraindividuellen Tests zwischen bestrahlten Transplantatlager und nicht bestrahlten Transplantaten bestätigten die Ergebnisse aus den interindividuellen Vergleichen zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Geweben. Im bestrahlten Transplantatlager war die Kapillaranzahl kleiner als im nicht bestrahlten Transplantat. Der kapilläre Flächeninhalt sowie der Flächenanteil der Kapillaren am Gesamtgesichtsfeld waren signifikant verkleinert gegenüber dem nicht bestrahlten Transplantat. Die möglichen Ursachen für eine durch Bestrahlung hervorgerufene eingeschränkte mikrovaskuläre Integrität wurden bereits im Abschnitt der interindividuellen Tests diskutiert, zeigt zudem jedoch eine unabhängig vom Gewebe auftretende Strahlenschädigung (*Aitasalo et al. 1997, Baker und Krochak 1989, Guelinckx et al. 1984, Jose et al. 1991, Narayan und Cliff 1982, Roth et al. 1999, Song et al. 1983*).

Bei den Tests auf Unterschiede zwischen bestrahlten Transplantatlager und bestrahlten Transplantaten, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Dieser Befund lässt vermuten, dass die Strahlenempfindlichkeit innerhalb eines Patienten in anatomisch benachbarten Regionen mit ähnlicher Gewebestruktur nicht signifikant voneinander divergiert.

6. Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit veranschaulicht den Einfluss einer multimodalen Therapie auf die kapilläre Mikromorphologie in humanem Gewebe. Im interindividuellen Vergleich konnte gezeigt werden, dass signifikante Rückgänge der Kapillaranzahl, der Kapillarflächeninhalte und der prozentualen Kapillarflächenanteile im Verhältnis zu einem definierten Gesamtgesichtsfeld in bestrahlten Transplantatlagern vorliegen. Die nicht signifikanten Ergebnisse im Vergleich zwischen nicht bestrahlten und bestrahlten Transplantaten sind hinsichtlich ihrer Aussage aufgrund einer kleinen Gruppengröße auf Seite der bestrahlten Transplantate (n=5) gegenüber den nicht bestrahlten Transplantaten (n=25) nicht vollständig zu bewerten. Jedoch wiesen die quantitativ ausgewerteten Kapillarstrukturen in bestrahlten Transplantatgeweben in ihren Mittelwerten Trends auf, die mit Ergebnissen anderer Studien korrelieren. Dies gilt ebenfalls für die nicht signifikanten Befunde zwischen den jeweils untersuchten Parametern und der Zeitspanne zwischen Beendigung einer Strahlentherapie und der darauf folgenden Operation. Es konnten lediglich Trends der Mittelwerte festgestellt werden, welche jedoch mit den Resultaten und Schlussfolgerungen anderer Studien hinsichtlich dem Einfluss und der Auswirkung einer Bestrahlung auf Gewebe einhergehen.

7. Literaturverzeichnis

- Aitasalo K, Relander M, Virolainen E. 1997. Microvascular free tissue transfers after preoperative irradiation in head and neck reconstructions. *Acta Otolaryngol Suppl*, 529:247-250.
- Baker DG, Krochak RJ. 1989. The response of the microvascular system to radiation: a review. *Cancer Invest*, 7 (3):287-294.
- Bischof M, Münter MW, Krempien R. Mundhöhle, 382-405 In: Wannemacher M, Debus J, Wenz F. (Hrsg.): *Strahlentherapie*. Springer Verlag, Heidelberg (2006)
- Blot WJ, Devesa SS, McLaughlin JK, Fraumeni JF, Jr. 1994. Oral and pharyngeal cancers. *Cancer Surv*, 19-20:23-42.
- Boyer NH, Conger AD. 1972. Low-dose x-radiation damage to capillaries of mouse small intestine. A correlated histologic and microangiographic study. *Invest Radiol*, 7 (5):418-426.
- Breuninger H, Sebastian G, Kortmann RD, Wolff KD, Bootz F, Garbe C. Deutsche Leitlinie: Plattenepithelkarzinom der Haut, der Lippen und der Augenlider. In: Garbe C (Hrsg.) *Interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York S. 12 - 22 (2005)

- Breuninger H, Bootz F, Hauschild A, Kortmann R-D, Wolff K, Stockfleth E, Szeimies M, Rompel R, Garbe C. 2008. Short German Guidelines: Squamous cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges*, 6 Suppl 1: S5-8
- Burns J, Hambridge M, Taylor CR. 1974. Intracellular immunoglobulins. A comparative study on three standard tissue processing methods using horseradish peroxidase and fluorochrome conjugates. *J Clin Pathol*, 27 (7):548-557.
- Calvo W, Hopewell JW, Reinhold HS, van den Berg AP, Yeung TK. 1987. Dose-dependent and time-dependent changes in the choroid plexus of the irradiated rat brain. *Br J Radiol*, 60 (719):1109-1117.
- Choe YS, Lee KH. 2007. Targeted in vivo imaging of angiogenesis: present status and perspectives. *Curr Pharm Des*, 13 (1):17-31.
- Cunningham BL, Shons AR. 1979. Free flap transfers in rats using an irradiated recipient site. *Br J Plast Surg*, 32 (2):137-140.
- De Graeff A, de Leeuw JR, Ros WJ, Hordijk GJ, Blijham GH, Winnubst JA. 1999. A prospective study on quality of life of patients with cancer of the oral cavity or oropharynx treated with surgery with or without radiotherapy. *Oral Oncol*, 35 (1):27-32.
- De Wilde R, Boeckx W, Van Der Schueren E, Guelinckx P, Gruwez J. 1983. A scanning electron microscopic study of microvascular anastomoses on irradiated vessels: short-term effect of irradiation. *Microsurgery*, 4 (3):193-200.

- Dimitrievich GS, Fischer-Dzoga K, Griem ML. 1984. Radiosensitivity of vascular tissue. I. Differential radiosensitivity of capillaries: a quantitative in vivo study. *Radiat Res*, 99 (3):511-535.
- Dimitrievich GS, Fischer-Dzoga K, Lee RM, Griem ML. 1979. In vivo measurement of microvasculature: a method for repeated and reproducible quantitation during long-term experiments. *Microvasc Res*, 18 (1):18-32.
- DiNardo LJ. 1998. Lymphatics of the submandibular space: an anatomic, clinical, and pathologic study with applications to floor-of-mouth carcinoma. *Laryngoscope*, 108 (2):206-214.
- Duncan MJ, Manktelow RT, Zuker RM, Rosen IB. 1985. Mandibular reconstruction in the radiated patient: the role of osteocutaneous free tissue transfers. *Plast Reconstr Surg*, 76 (6):829-840.
- Eckardt A. Tumorthérapie bei Mundhöhlenkarzinomen, 447-480 In: Hausamen JE, Becker J, Neukam FW, Reichart PA, Schliephake H, Schmelzeisen R (Hrsg.): *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Chirurgie Band III. Quintessenz, Berlin (2003)*
- Ehrenfeld M, Prein J, Jundt G, Waldhart E. Tumoren im Mund- Kiefer- Gesichtsbereich, 99-182 In: Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg.): *Spezielle Chirurgie, Band 2. 3. Aufl. Thieme, Stuttgart (2002)*
- Epstein JB, Robertson M, Emerton S, Phillips N, Stevenson-Moore P. 2001. Quality of life and oral function in patients treated with radiation therapy for head and neck cancer. *Head Neck*, 23 (5):389-398.

- Evans GR, Schusterman MA, Kroll SS, Miller MJ, Reece GP, Robb GL, Ainslie N. 1994. The radial forearm free flap for head and neck reconstruction: a review. *Am J Surg*, 168 (5):446-450.
- Fajardo LF, Berthrong M. 1988. Vascular lesions following radiation. *Pathol Annu*, 23 Pt 1:297-330.
- Fajardo LF, Berthrong M, Anderson RE. Alimentary tract, Oral cavity and Pharynx, 209-213 In: Fajardo LF, Berthrong M, Anderson RE (Hrsg.): *Radiation Pathology*. Oxford University Press US (2001)
- Franceschi S, Munoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM. 1996. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5 (7):567-575.
- Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. 2003. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*, 300 (5622):1155-1159.
- Görgün B, Ermis MI. 1989. Plastic surgery treatment of radiation induced injuries and tumors. *Eur J Plast Surg*, 12:198-200.
- Guelinckx PJ, Boeckx WD, Fossion E, Gruwez JA. 1984. Scanning electron microscopy of irradiated recipient blood vessels in head and neck free flaps. *Plast Reconstr Surg*, 74 (2):217-226.

- Hirst DG, Denekamp J, Hobson B. 1980. Proliferation studies of the endothelial and smooth muscle cells of the mouse mesentery after irradiation. *Cell Tissue Kinet*, 13 (1):91-104.
- Hopewell JW, Calvo W, Jaenke R, Reinhold HS, Robbins ME, Whitehouse EM. 1993. Microvasculature and radiation damage. *Recent Results Cancer Res*, 130:1-16.
- Hsu SM, Raine L. 1981. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 29 (11):1349-1353.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*, 75 (6):816-821.
- Jahson S, Christofferson RH, Gerdin B. 1998. Reduced mucosal perianastomotic capillary density in rat small intestine with chronic radiation damage. *Radiat Res*, 150 (5):542-548.
- Johnson NW, Warnakulasuriy S, Tavassoli M. 1996. Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk matters for head and neck, especially oral, cancer and precancer. *Eur J Cancer Prev*, 5 (1):5-17.
- Jose B, Banis J, Flynn M, Lindberg R, Spanos WJ, Jr., Paris K, Rohm J. 1991. Irradiation and free tissue transfer in head and neck cancer. *Head Neck*, 13 (3):213-216.

- Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I. 1993. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 22 (10):459-462.
- Kiener JL, Hoffman WY, Mathes SJ. 1991. Influence of radiotherapy on microvascular reconstruction in the head and neck region. *Am J Surg*, 162 (4):404-407.
- Kligerman J, Lima RA, Soares JR, Prado L, Dias FL, Freitas EQ, Olivatto LO. 1994. Supraomohyoid neck dissection in the treatment of T1/T2 squamous cell carcinoma of oral cavity. *Am J Surg*, 168 (5):391-394.
- Krag C, De Rose G, Lyczakowski T, Freeman CR, Shapiro SH. 1982. Free flaps and irradiated recipient vessels: an experimental study in rabbits. *Br J Plast Surg*, 35 (3):328-336.
- La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, Maisonneuve P, Levi F. 1992. Trends of cancer mortality in Europe, 1955-1989: I, Digestive sites. *Eur J Cancer*, 28 (1):132-235.
- La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. 1997. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol*, 33 (5):302-312.
- Lepenies J, Bühling, Witt K. Verdauung, 242-243 In: Bühling KJ, Lepenies J, Witt K (Hrsg.): *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie*. 3. Aufl. Urban& Fischer, München (2004)

- Liu X, Liu JZ, Zhang E, Li P, Zhou P, Cheng TM, Zhou YG. 2005. Impaired wound healing after local soft x-ray irradiation in rat skin: time course study of pathology, proliferation, cell cycle, and apoptosis. *J Trauma*, 59 (3):682-690.
- Lloyd RV, Schmidt K, Blaivas L, McCoy JP, Wilson BS. 1985. A rapid immunostaining method utilizing preformed antibody-avidin-biotin-peroxidase complexes. *Am J Clin Pathol*, 83 (5):636-639.
- Lohr F, Wenz F. Basaliom und Plattenepithelkarzinom, 262-263 In: Lohr F, Wenz F (Hrsg.): *Strahlentherapie kompakt*. 2. Aufl. Urban & Fischer, München (2007)
- Mao XW. 2006. A quantitative study of the effects of ionizing radiation on endothelial cells and capillary-like network formation. *Technol Cancer Res Treat*, 5 (2):127-134.
- McGuirt WF, Jr., Johnson JT, Myers EN, Rothfield R, Wagner R. 1995. Floor of mouth carcinoma. The management of the clinically negative neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 121 (3):278-282.
- Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzalez-Hernandez MJ, Dominguez-Rojas V. 2000. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol*, 36 (2):170-174.

- Narayan K, Cliff WJ. 1982. Morphology of irradiated microvasculature: a combined in vivo and electron-microscopic study. *Am J Pathol*, 106 (1):47-62.
- Noll S, Schaub-Kuhnen S. Nachweismethoden, ABC-Methode, 17-18 In Höfler H, Müller KM (Hrsg.): *Praxis der Immunhistochemie*. Urban& Fischer, München (2000)
- Papetti M, Herman IM. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282 (5):C947-970.
- Piesold J-M, Al-Nawas B, Grötz KA. 2008. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Mund,- Kiefer,- und Gesichtschirurgie. Infizierte Osteoradionekrose . AWMF-Leitlinien-Register, Nr. 007/046.
- Polverini PJ. 1995. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 6 (3):230-247.
- Reichart PA. 2001. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin Oral Investig*, 5 (4):207-213.
- Reichart PA, Kirchheim A, Lochte KH. 2000. Tobacco and oral health. Questionnaire about knowledge, practices, and opinions among dentists in Berlin. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 4 (1):45-49.
- Reinhold HS, Calvo W, Hopewell JW, van der Berg AP. 1990. Development of blood vessel-related radiation damage in the fimbria of the central nervous system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 18 (1):37-42.

- Riekkki R, Jukkola A, Oikarinen A, Kallioinen M. 2001. Radiation therapy induces tenascin expression and angiogenesis in human skin. *Acta Derm Venereol*, 81 (5):329-333.
- Risau W. 1990. Angiogenic growth factors. *Prog Growth Factor Res*, 2 (1):71-79.
- Roth NM, Sontag MR, Kiani MF. 1999. Early effects of ionizing radiation on the microvascular networks in normal tissue. *Radiat Res*, 151 (3):270-277.
- Roth SL, Döker K, Hartmann A, Muskalla K, Lammering G, Kreischner H, Fritzeimer LU, Künzel A. Brachytherapie, 124-125 In: Adamietz A, Knecht R, Laubert A, Schilcher RB. (Hrsg.): *Maligne Rezidive im Kopf-Hals-Bereich*. Schattauer Verlag, Stuttgart (2003)
- Rubin P, Casarett GW. 1968. Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. *Cancer*, 22 (4):767-778.
- Schliephake H, Schmelzeisen R, Neukam FW. 1996. The free revascularized rectus abdominis myocutaneous flap for the repair of tumour related defects in the head and neck area. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 34 (1):18-22.
- Schottenfeld D. 1992. The etiology and prevention of aerodigestive tract cancers. *Adv Exp Med Biol*, 320:1-19.
- Schultze-Mosgau S, Rodel F, Keilholz L, Grabenbauer GG, Wiltfang J, Radespiel-Troger M, Sauer R, Neukam FW. 2000. Vascularization of free

myocutaneous gracilis flaps in replacement transplantation after preoperative radiotherapy. An experimental study. *Strahlenther Onkol*, 176 (11):498-505.

Schultze-Mosgau S, Grabenbauer GG, Radespiel-Troger M, Wiltfang J, Ries J, Neukam FW, Rodel F. 2002a. Vascularization in the transition area between free grafted soft tissues and pre-irradiated graft bed tissues following preoperative radiotherapy in the head and neck region. *Head Neck*, 24 (1):42-51.

Schultze-Mosgau S, Grabenbauer GG, Wehrhan F, Radespiel-Troger M, Wiltfang J, Sauer R, Rodel F. 2002b. Histomorphological structural changes of head and neck blood vessels after pre- or postoperative radiotherapy. *Strahlenther Onkol*, 178 (6):299-306.

Schultze-Mosgau S, Rodel F, Radespiel-Troger M, Worl J, Grabenbauer GG, Neukam FW. 2002c. Vascularization of the area between free grafts and irradiated graft beds in the neck in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 40 (1):37-44.

Seegenschmiedt MH, Höffken K, Junginger T, Sauer H 2000. Lent-Soma Kriterien; Interdisziplinäre Bewertung von langfristigen Therapieerfolgen in der Onkologie. *Dt Ärztebl* 97 (37): A 2395-2401

Song CW, Kim JH, Rhee JG, Levitt SH. 1983. Effect of X irradiation and hyperthermia on vascular function in skin and muscle. *Radiat Res*, 94 (2):404-415.

- Spitz MR. 1994. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol*, 21 (3):281-288.
- Sumi Y, Ueda M, Oka T, Torii S. 1984. Effects of irradiation of skin flaps. *J Oral Maxillofac Surg*, 42 (7):447-452.
- Tan E, O'Brien BM, Brennen M. 1978. Free flap transfer in rabbits using irradiated recipient vessels. *Br J Plast Surg*, 31 (2):121-123.
- Tsai JH, Makonnen S, Feldman M, Sehgal CM, Maity A, Lee WM. 2005. Ionizing radiation inhibits tumor neovascularization by inducing ineffective angiogenesis. *Cancer Biol Ther*, 4 (12):1395-1400.
- Ucuzian AA, Greisler HP. 2007. In vitro models of angiogenesis. *World J Surg*, 31 (4):654-663.
- Watson JS. 1979. Experimental microvascular anastomoses in radiated vessels: a study of the patency rate and the histopathology of healing. *Plast Reconstr Surg*, 63 (4):525-533.
- Weibel ER. Random and systematic sampling, 82-85 In: Academic Press Inc. (Hrsg.): *Stereological Methods, Practical Methods for Biological Morphometry*, Volume 1. Academic Press, London (1979)
- Weibel ER. 1989. Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods. *J Microsc*, 155 (Pt 3):393-403.

Wiltfang J, Grabenbauer G, Bloch-Birkholz A, Leher A, Neukam FW, Kessler P. 2003. Evaluation of quality of life of patients with oral squamous cell carcinoma. Comparison of two treatment protocols in a prospective study-first results. *Strahlenther Onkol*, 179 (10):682-689.

Wynder EL, Bross IJ, Day E. 1956. A study of environmental factors in cancer of the larynx. *Cancer*, 9 (1):86-110.

Lebenslauf

Stockebrand, Franca

Geboren am 19.05.1984 in Detmold

Schulbesuche:

1990 Einschulung in die Elbrachtschule Schloß-Holte

1991 Umschulung in die Grundschule Heiden

1994 Besuch des Christian-Dietrich-Grabbe-Gymnasiums Detmold

2003 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Studium:

10.2003- 03.2006 Vorklinisches Zahnmedizinstudium an der Friedrich Schiller-Universität Jena

03.2006 Ablegung der zahnärztlichen Vorprüfung

04.2006- 12.2008 Klinisches Zahnmedizinstudium an der Friedrich Schiller-Universität Jena

12.2008 Staatsexamen Zahnmedizin und Approbation als Zahnärztin

Beruflicher Werdegang:

Seit 04.2009 Assistenz Zahnärztin an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Abteilung für Zahnärztliche Prothetik und Biomedizinische Werkstoffkunde

Jena, den 1. Mai 2010

Danksagung

Danken möchte ich allen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich

- meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau für die freundliche Überlassung des Themas und die Betreuung der Promotion;
- Herrn PD Dr. Dr. M. Thorwarth für die stets konstruktive, geduldige und fachliche Begleitung, sowie die tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit;
- Frau Nora Moll für die engagierte Einweisung in die Immunhistochemie und das labortechnische Arbeiten und ihre Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit
- dem gesamten OP-Team der Klinik und Poliklinik für Mund,- Kiefer,- und Gesichtschirurgie/ Plastische Chirurgie der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die kontinuierliche Unterstützung bei der Probengewinnung.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Dr. S. Schultze-Mosgau

PD Dr. Dr. M. Thorwarth,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 1. Mai 2010

(Unterschrift des Verfassers)