

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

## Der bestrahlte Hals - klinische und molekulare Grundlagen

Dr. med. Steffen Christian Alexander Koerdt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Zahnheilkunde  
genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1) apl. Prof. Dr. Dr. M. R. Kesting  
2) Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff

Die Dissertation wurde am 27.08.2015 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 03.02.2016 angenommen.

### **Publikation von Teilergebnissen der Dissertation:**

Rohleder, N. H., Flensberg, S., Bauer, F., Wagenpfeil, S., Wales, C. J., Koerdt, S., Wolff, K. D., Holzle, F., Steiner, T., & Kesting, M. R. (2014). Can tissue spectrophotometry and laser Doppler flowmetry help to identify patients at risk for wound healing disorders after neck dissection? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 117(3), 302-311.

Rohleder, N. H. (2015). Wundheilungsstörungen in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie: Erkenntnisse zur molekularbiologischen Grundlagen, chirurgischen Therapieoptionen und Prädiktionsmöglichkeiten. *Habilitationsschrift Technische Universität München*, im Druck.

## Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
$\alpha$ -PK	Alpha-1-Prokollagen
AMP	Antimikrobielle Peptide
AU	Arbitrary Units
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid
Ct	Cycle Threshold
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ERND	Erweitert Radikale Neck Dissection
EtOH	Ethanol
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hBD	humane Beta-Defensine
HDP	Host Defence Peptide
HE	Hämatoxylin-Eosin
HKG	Housekeeping Gen
HPF	High Power Field
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HRR	Homologous Recombination Repair
ICD	Immunocompromised districts
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
M	Mol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

MRND	Modifiziert Radikale Neck Dissection
MRT	Magnetresonanztomographie
mW	Milliwatt
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
NaOH	Natriumhydroxid
NHEJ	Non Homologous End Joining
Nm	Nanometer
O2C	Oxygen-to-see Messsystem
OPG	Orthopantomogramm
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonucleic Acid
RND	Radikale Neck Dissection
ROC	Receiver Operating Characteristic
RSTL	Relaxed Skin Tension Lines
SIF	Strahleninduzierte Fibrose
SIN	Squamöse intraepitheliale Neoplasien
SND	Selektive Neck Dissection
ST	Strahlentherapie
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TGF-β-1	Transforming-Growth-Factor-Beta-1
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
vWF	von-Willebrand-Faktor
W	Watt
WHO	World Health Organisation
WHS	Wundheilungsstörung

Abkürzungsverzeichnis.....	II
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Grundlagen.....	8
1.2 Das Mundhöhlenkarzinom.....	9
1.2.1 Epidemiologie.....	10
1.2.2 Ätiologie.....	11
1.2.3 Diagnostik.....	12
1.2.4 Therapie.....	14
1.2.4.1 Operative Therapie.....	14
1.2.4.1.1 Halslymphknotenausräumung (Neck dissection).....	15
1.2.4.1.2 Defektdeckung.....	20
1.2.4.2 Strahlentherapie.....	21
1.2.4.3 Radiochemotherapie.....	23
1.3 Radiotherapie.....	24
1.3.1 Strahlenbiologische Grundlagen.....	24
1.3.2 Strahlenbedingte Begleiterscheinungen.....	27
1.4 Evaluation der Strahlenfolgen auf das Gewebe.....	28
1.4.1 Perfusion und Oxygenierung.....	29
1.4.2 Antimikrobielle Peptide (AMP).....	29
1.4.3 Strahleninduzierte Fibrose (SIF).....	30
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	31
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>33</b>

2.1	Material.....	33
2.1.1	Geräte.....	33
2.1.2	Verbrauchsmittel.....	34
2.2	Methodik.....	36
2.2.1	Patientenkollektiv.....	36
2.2.2	präoperative Messung der Gewebeoxygenierung und –perfusion.....	37
2.2.2.1	Messprinzipien und Gerätetechnik.....	37
2.2.3	Gewinnung der Gewebeproben.....	40
2.2.4	Histologie.....	40
2.2.5	Immunhistochemie.....	41
2.2.5.1	Fixierung, Einbettung und histologischer Schnitt.....	42
2.2.5.2	Immunhistochemische Färbungen.....	42
2.2.5.3	Auswertung.....	44
2.2.6	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR).....	44
2.2.6.1	Herstellung von Standards.....	44
2.2.6.2	Gelelektrophorese.....	46
2.2.6.3	RNA-Isolierung.....	48
2.2.6.4	Reverse Transkription.....	50
2.2.6.5	qRT-PCR.....	51
2.2.7	Statistische Auswertung.....	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
3.1	Patientendaten.....	53
3.2	O <sub>2</sub> C-Messungen.....	55
3.3	Histologie.....	59
3.3.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	59

3.3.1.1 Dicke der Epidermis.....	60
3.3.2 Masson Trichrome Färbung.....	61
3.3.3 Van Gieson Elastica Färbung.....	62
<b>3.4 Immunhistochemie.....</b>	<b>63</b>
3.4.1 humanes- $\beta$ -Defensin-1 (hBD-1).....	63
3.4.2 humanes- $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2).....	63
3.4.3 humanes- $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3).....	63
3.4.4 Psoriasin.....	65
3.4.5 von-Willebrand-Faktor (vWF).....	67
<b>3.5 RT-PCR.....</b>	<b>68</b>
3.5.1 angeborenes Immunsystem.....	68
3.5.1.1 humanes- $\beta$ -Defensin-1 (hBD-1) .....	68
3.5.1.2 humanes- $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) .....	68
3.5.1.3 humanes- $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3) .....	71
3.5.1.4 Psoriasin .....	72
3.5.2 Fibrose.....	72
3.5.2.1 von-Willebrand-Faktor (vWF) .....	72
3.5.2.2 Tumor-Growth-Factor- $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ -1).....	74
3.5.2.3 $\alpha$ .Prokollagen ( $\alpha$ -PK) .....	74
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1 Gewebepfusion und -oxygenierung.....	76
4.2 Antimikrobielle Peptide (AMP).....	79
4.3 Strahleninduzierte Fibrose (SIF).....	82
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>85</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>

<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>XI</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>XII</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen

Die zervikale Lymphadenektomie (Neck Dissection) hat sich seit ihrer Einführung im Jahre 1888 von Jawdyski und durch Weiterentwicklungen unter anderem von Crile Anfang des 20. Jahrhunderts als Behandlungsstandard in der operativen Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen etabliert [Crile, 1906, Ferlito et al., 2007]. Die lokale chirurgische Therapie der Lymphabflusswege ist ebenso integraler Bestandteil der onkologisch-operativen Therapie geworden wie die Tumorsektion mit entsprechendem Sicherheitsabstand. Darüberhinaus zählen die Chemotherapie und die Strahlentherapie zu den Säulen der Tumorthherapie, die alleine oder in Kombination mit der Chirurgie individuell für jeden Patienten sowie für die entsprechende Tumorentität ausgewählt, adaptiert und angewandt werden. Zu den bekannten Strahlenfolgen zählen vor allem durch den Einfluss auf die extra-zellulären Matrix kurz- und längerfristige strahlenbedingte Nebenwirkungen wie Mukositis und Xerostomie [Mueller et al., 2010, Tribius et al., 2013]. Des Weiteren konnte eine reduzierte Wundheilung mit gehäuften Auftreten von Wundheilungsstörungen und Nahtdehiszenzen in Untersuchungen im Bereich der Bauchwand nachgewiesen werden [Wang et al., 2006]. Auch wenn im klinischen Alltag Patienten mit zervikalen Wundheilungsstörungen nach stattgehabter Bestrahlung vorstellig werden (Abbildung 1.1), ist die Entstehung von Wundheilungsstörungen im Bereich des Zugangs der Neck Dissection bei bestrahlten Patienten im Kopf-Hals-Bereich noch nicht vollständig geklärt.

Die vorliegende Arbeit soll versuchen, den Risikofaktor Bestrahlung für die Entwicklung von Wundheilungsstörungen näher zu untersuchen. Zum einen soll mit der präoperativen Messung von Gewebepfusion und -oxygenierung ein klinisches Instrument zur Risikoevaluation näher untersucht werden. Darüberhinaus soll versucht werden, anhand von intraoperativ gewonnen Gewebeproben die histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Veränderungen in bestrahltem zervikalen Gewebe zu

beschreiben und ggf. auch hier Ansatzpunkte für weitere wissenschaftliche aber auch diagnostische oder therapeutische Untersuchungen herauszuarbeiten.



**Abbildung 1.1 Zervikale Wundheilungsstörung nach selektiver Neck Dissection.**

## **1.2 Das Mundhöhlenkarzinom**

Im untersuchten Patientenkollektiv der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München stellt das Mundhöhlenkarzinom die mit großem Abstand am häufigsten zu Grunde liegende Tumorerkrankung, welche eine zervikale Lymphadenektomie notwendig macht, dar. Im Folgenden soll auf diese Entität im Hinblick auf Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik und Therapie, vor allem im Bezug auf die Strahlentherapie näher eingegangen werden.

### 1.2.1 Epidemiologie

Nach Schätzungen des Robert Koch-Institutes erkrankten im Jahr 2014 in Deutschland etwa 13.800 Menschen an Krebserkrankungen der Mundhöhle [Kaatsch et al., 2013]. Die Inzidenz und Mortalität der Patienten mit Mundhöhlenkarzinom variieren je nach Kultur und geographischer Region [Sankaranarayanan et al., 1998]. Männer sind deutlich häufiger und bei einem mittleren Erkrankungsalter von 61 Jahren, auch früher betroffen als Frauen (65 Jahre). Generell stellen Krebserkrankungen der Mundhöhle eine äußerst heterogene Gruppe von Neoplasien dar. Neben Plattenepithelkarzinomen kommen zu etwas mehr als 5 Prozent Adenokarzinome, beispielsweise der Speicheldrüsen, vor. Weltweit wurden im Jahr 2000 rund 300.000 primäre Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle neu erfasst [Kademani, 2007]. Damit stellt diese Tumorentität mit 4,8 Prozent aller Krebserkrankungen die vierthäufigste Tumorneuerkrankung in Deutschland dar [Hausamen, 2000]. Grundsätzlich ist die Inzidenz maligner Erkrankungen des Mund- und Rachenraumes und deren krankheitsbedingte Mortalität nach Angaben des Robert Koch-Institutes im zeitlichen Verlauf annähernd unverändert [Kaatsch et al., 2013]. Tabelle 1.1 fasst die wichtigsten epidemiologischen Daten zur Tumorerkrankungen der Mundhöhle für Deutschland zusammen.

Topographisch wird die Mundhöhle in unterschiedliche anatomische Bezirke entsprechend der International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) der WHO unterteilt: Mundschleimhaut der Ober- und Unterlippe (C 00.3, 4), Wangenschleimhaut (C 06.0), Retromolarregion (C 06.2), Sulcus buccomandibularis und –maxillaris (C 06.2); oberer Alveolarfortsatz und Gingiva (C 03.0); unterer Alveolarfortsatz und Gingiva (C 03.1); Hartgaumen (C 05.0); Zunge mit Zungenrücken und –rand vor den Papillae vallatae (C 02.0, 1) und Zungenunterseite (C 02.0); Mundboden (C 04.0) [Wittekind et al., 2005].

Die verschiedenen topographischen Lokalisationen gehen ebenfalls mit unterschiedlichen Prognosen einher.

**Tabelle 1.1 Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C00-C14 [nach [Kaatsch et al., 2013]].**

	2009		2010		Prognose für 2014	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	9.480	3.480	9.340	3.490	9.900	3.900
rohe Erkrankungsrate <sup>1</sup>	23,6	8,3	23,3	8,4	24,9	9,5
stand. Erkrankungsrate <sup>1,2</sup>	18,8	5,9	18,2	5,9	18,3	6,4
mittleres Erkrankungsalter <sup>3</sup>	61	64	61	65		
Sterbefälle	3.813	1.169	3.816	1.206		
rohe Sterberate	9,5	2,8	9,5	2,9		
stand. Sterberate <sup>1,2</sup>	7,4	1,8	7,2	1,8		
5-Jahres-Prävalenz	27.800	11.300	27.900	11.500		
absolute 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) <sup>4</sup>			44 (40-46)	55 (49-66)		
relative 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) <sup>4</sup>			48 (44-50)	61 (55-72)		

<sup>1</sup> je 100.000 Personen

<sup>2</sup> altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung

<sup>3</sup> Median

<sup>4</sup> in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

### 1.2.2 Ätiologie

Grundsätzlich scheint der exogen bedingte Einfluss von Karzinogenen auf die Mukosazellen und ihre DNA für mehr als zwei Drittel der Tumorerkrankungen im Bereich der Mundhöhle verantwortlich zu sein [Kademani, 2007, Sankaranarayanan et al., 1998]. Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von malignen Neoplasien der Mundhöhle gelten hier vor allem chronischer Tabak- und Alkoholabusus. Beide gehen mit einem bis zu sechsfach erhöhten Risiko für die Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen einher. Die Kombination beider Risikofaktoren erhöht das Erkrankungsrisiko um den Faktor 30 [Altieri et al., 2002, Corrao et al., 2000, Talamini et al., 2002]. Darüberhinaus stellen Kautabak sowie eine einseitige Ernährung beispielsweise durch den übermäßigen Konsum von Fleisch oder gebratenen Speisen weitere Risikofaktoren für die Entstehung von Karzinomen im Bereich der Mundhöhle dar [Bosetti et al., 2002, Critchley et al., 2003, Levi et al., 2000, Oreggia et al., 2001]. Weißliche Mundschleimhautveränderungen, die nicht einer anderen Ursache zugeordnet werden können, werden als Leukoplakie bezeichnet. Einzelne leukoplakie Läsionen können in ein Karzinom transferieren [Axell, 2001, van der Waal et al., 2011]. Präkanzeröse Läsionen des Mundhöhlenkarzinoms werden nach der WHO-Klassifikation der Kopf-Hals-

Karzinome aus dem Jahr 2005 zusammengefasst als squamöse intraepitheliale Neoplasien (SIN) bezeichnet. Entsprechend der histologischen Dysplasiegrade wird eine niedriggradige, mäßiggradige und eine hochgradige SIN unterschieden, welche alle mit unterschiedlichen Risiken für die Entwicklung eines Karzinoms vergesellschaftet sind [Macfarlane et al., 1992]. Die Bedeutung einer Infektion mit dem humanen Papilloma-Virus (HPV 16) konnte zudem als Risikofaktor für das Mundhöhlenkarzinom identifiziert werden [Cruz et al., 2002, Dahlstrom et al., 2003, Herrero et al., 2003].

Ergänzend dazu ist eine Vielzahl von Genen für die Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen verantwortlich. Hierzu zählen beispielsweise Tumorsuppressoren wie Tp53 und p16, Wachstumsfaktoren und Zytokine wie der Epidermal Growth Factor (EGF) [Koontongkaew et al., 2000, Kropveld et al., 1999, Reimers et al., 2007, Schoelch et al., 1999]. Grundsätzlich ist die endogene Karzinogenese bislang noch nur unzureichend wissenschaftlich erforscht, als dass eine Modifikation oder Beeinflussung der Signalwege möglich wäre.

### 1.2.3 Diagnostik

Verdächtig für eine maligne Neoplasie der Mundhöhle ist grundsätzlich jede Veränderung der Mundschleimhaut, die mit einem Gewebeüberschuss und/oder Gewebedefekt, Farbveränderungen oder Verhärtungen der Schleimhaut einhergeht [Wolff et al., 2012]. Basisdiagnostisch steht die eingehende klinische Untersuchung, vor allem in Hinblick auf etwaige Symptome wie Zahnlockerungen, zervikale Lymphknotenschwellungen, Einschränkungen der Mundöffnung oder Schwierigkeiten beim Schlucken oder Kauen, im Vordergrund. Diese sollte auch durch den niedergelassenen Allgemeinmediziner und den behandelnden Hauszahnarzt sorgfältig und regelmäßig durchgeführt werden. Auf Grund der frühen Metastasierung in lokoregionäre Lymphknoten wird bei einer positiven Noxenanamnese ebenfalls

eine hals-, nasen-, ohrenärztliche Spiegeluntersuchung oder endoskopische Evaluation möglicher synchroner Zweitkarzinome in der aktuellen S3-Leitlinie für das Mundhöhlenkarzinom empfohlen [Chow et al., 2009, Kesting et al., 2009a, Kesting et al., 2009b, Kramer et al., 2004].

Allgemeinsymptome wie Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Abgeschlagenheit oder Fieber sollten ebenfalls umgehend eine weiterführende Diagnostik zur Folge haben. Ebenso wie die in Tabelle 1.2 genannten klinischen Symptome, bei deren Progression oder Persistenz in einem Zeitraum von über zwei Wochen die Vorstellung bei einem Spezialisten dringend empfohlen wird [Hollows et al., 2000, Jones et al., 2002, Pitiphat et al., 2002].

**Tabelle 1.2 Klinische Symptome des Mundhöhlenkarzinoms [nach [Pitiphat et al., 2002, Wolff et al., 2012]].**

Leukoplakie / Erythroplakie	Schwierigkeiten beim Sprechen
Schleimhautdefekt / Ulzeration	Verminderte Zungenbeweglichkeit
Schwellungen in der Mundhöhle	Taubheitsgefühl
Unklare Zahnlockerungen	Unklare Blutungen
Persistierendes Fremdkörpergefühl	Schwellungen zervikal
Schmerzen	Foetor ex ore
Schluckstörungen	Veränderungen der Okklusion

Als obligater Bestandteil des Tumorstaging wird die bioptische Sicherung des Befundes und die histopathologische Charakterisierung betrachtet. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Prognose und der aus dem Staging resultierenden Therapieempfehlung entscheidend [Fortin et al., 2001, Spiro et al., 1999, Weijers et al., 2002]. Im Rahmen der bildgebenden Diagnostik sollte zum Primärstaging eine Computertomographie (CT) oder eine Magnetresonanztomographie (MRT), eine konventionelle Röntgenuntersuchung des Thorax oder ein Thorax-CT durchgeführt werden. Vor allem auch mit Blick auf die Ausbreitungsdiagnostik im Bezug auf die Halslymphknoten. Des Weiteren gehört ein Orthopantomogramm (OPG) zur zahnärztlichen Basisdiagnostik [Leslie et al., 1999, Vidiri et al., 2010, Vidiri et al., 2007, Wolff et al., 2012].

#### 1.2.4 Therapie

In der kurativen und palliativen Therapie primärer Mundhöhlenkarzinome stehen grundsätzlich neben der chirurgischen Therapie die weiteren Säulen der onkologischen Therapie, Chemotherapie und Bestrahlung und eine Kombination der Methoden zur Verfügung. Generell sollte ein individuelles Konzept für den Patienten, angepasst an Lage und Größe des Primärtumors, den Allgemeinzustand des Patienten, zu erwartende Morbiditäten sowie den zu erwartenden Ansatz der Therapie nach ausführlicher Aufklärung und Beratung über mögliche Behandlungsfolgen, Risiken und Alternativen entwickelt werden. Hierzu sind vor allem interdisziplinäre Tumorkonferenzen mit Kollegen aus unterschiedlichen involvierten Fachdisziplinen (Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Strahlentherapie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Onkologie, Pathologie, Radiologie) von zunehmender Bedeutung.

##### 1.2.4.1 Operative Therapie

Als Goldstandard gilt in der multimodalen Therapie des Mundhöhlenkarzinoms zunächst die operative Tumorsektion mit ausreichendem Sicherheitsabstand. Das Ziel der chirurgischen Tumorthherapie ist die vollständige Entfernung des Tumors einschließlich etwaiger Lymphknotenmetastasen. In der evidenzbasierten Evaluation der unterschiedlichen Therapieregime ist eine eindeutige wissenschaftlich fundierte Empfehlung nicht abzuleiten, so dass auch die aktuelle S3-Leitlinie zum Mundhöhlenkarzinom empfiehlt, die Frage der definitiven Lokalthherapie individuell zu beantworten [Wolff et al., 2012]. Eine primäre Defektdeckung sollte bei resektablen Befunden einzeitig angestrebt werden [Wolff et al., 2012].

Die operative Tumorentfernung kann abhängig von Größe, Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors, der Infiltrationstiefe, der Infiltration von Nachbarstrukturen prinzipiell transoral, transfazial oder transzervikal erfolgen, wobei die chirurgischen Zugangswege häufig kombiniert werden. Wichtig ist die En-bloc-Resektion des Tumors mit einem Sicherheitsabstand von mindestens

10-15 mm in alle drei Ebenen des Raumes [Haddad et al., 2008]. Als tumorfreier Resektatrand (R0) wird ein Abstand von mindestens fünf mm zwischen Tumor und mit Tusche markiertem Schnitttrand am formalinfixierten, geschnittenen und HE-gefärbtem Präparat definiert [Rogers et al., 2009]. Der definitive histologische Status der Resektatränder hat prognostisch eine überragende Bedeutung [Kovacs, 2004, Loree et al., 1990, Parsons et al., 1997]. Gelingt bei einer R1-Situation die Nachresektion mit tumorfreien Absetzungsrändern, kann so nachweislich die Prognose und lokale Tumorkontrolle verbessert werden [Bailey et al., 2001].

**Tabelle 1.3 Metastasierungsfrequenz von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich [aus [Werner, 2002]].**

Primärtumorlokalisation	Okkulte Metastasierung (%)	Metastasierungsrate (%)	Bilaterale Metastasierung (%)
Unterlippe	3-10	7-37	10-25
Gingiva	17-22	18-52	9-15
Bukkoalveolarkomplex	7-25	9-43	7-13
Mundboden	10-31	30-65	8-12
Zunge (oraler Anteil)	20-36	34-75	10-15
Zungengrund	22-38	50-85	20-50
Retromolare Region	10-30	32-45	6-12
Weicher Gaumen	22-30	30-68	20-32

#### 1.2.4.1.1 Halslymphknotenausräumung (Neck dissection)

Integraler Bestandteil in der chirurgischen Therapie des Mundhöhlenkarzinoms ist die Entfernung der Halslymphknoten. Abhängig von der präoperativen Ausbreitungsdiagnostik können die lokoregionären Lymphknotenstationen als klinisch unauffällig, suspekt oder hoch verdächtig auf das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen kategorisiert werden. Allerdings konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass selbst in einem klinischen N0-Hals, der palpatorisch, sonografisch und mit Hilfe von anderen bildgebenden Verfahren keinen Anhalt für eine zervikale Metastasierung zeigt, histologisch in etwa 20-30 Prozent trotzdem Lymphknotenmetastasen nachzuweisen waren [Crean et al., 2003, McGuirt et al., 1995, Smith et al., 2004].

Die Lokalisation des Primärtumors und seine Infiltrationstiefe sind Prädiktoren für das Auftreten okkulten Metastasen (siehe Tabelle 1.3). Bei der kurativ

intendierten Form der Neck Dissection werden alle präoperativ auffälligen Lymphknoten einschließlich weiterer Lymphknotengruppen entfernt. Dies kann sowohl abhängig vom Staging als auch von der Lokalisation des Primärtumors ein- oder beidseitig durchgeführt werden.

**Tabelle 1.4 Anatomische Grenzen der Level und Sublevel am Hals [nach [Hausamen et al., 2012]].**

<b>Grenzen</b>				
	Kranial	Kaudal	Anterior (medial)	Posterior (lateral)
Ia	Unterkiefersymphyse	Zungenbeinkörper	Vorderer Bauch des kontralateralen M. digastricus	Vorderer Bauch des ipsilateralen M. digastricus
Ib	Unterkieferkörper	Hinterer Bauch des M. digastricus	Vorderer Bauch des M. digastricus	M. stylohyoideus
IIa	Schädelbasis	Horizontale Ebene durch Unterrand des Os hyoideum	M. stylohyoideus	Vertikale Ebene definiert durch N. accessorius
IIb	Schädelbasis	Horizontale Ebene durch Unterrand des Os hyoideum	Vertikale Ebene definiert durch N. accessorius	Hinterrand des M. sternocleidomastoideus
III	Horizontale Ebene durch Unterrand des Os hyoideum	Horizontale Ebene durch Unterrand der Cartilago cricoidea	Lateraler Rand des M. sternohyoideus	Hinterrand des M. sternocleidomastoideus bzw. Plexus cervicalis
IV	Horizontale Ebene durch Unterrand der Cartilago cricoidea	Clavicula	Lateraler Rand des M. sternohyoideus	Hinterrand des M. sternocleidomastoideus bzw. Plexus cervicalis
Va	Spitzer Winkel zwischen M. sternocleidomastoideus und M. trapezius	Horizontale Ebene durch Unterrand der Cartilago cricoidea	Hinterrand des M. sternocleidomastoideus bzw. Plexus cervicalis	Vorderrand des M. trapezius
Vb	Horizontale Ebene durch Unterrand der Cartilago cricoidea	Clavicula	Hinterrand des M. sternocleidomastoideus bzw. Plexus cervicalis	Vorderrand des M. trapezius
VI	Os hyoideum	Sternum	A. carotis communis	A. carotis communis

Eine Indikation zur Ausräumung der kontralateralen Halsweichteile besteht bei präoperativem klinischen Verdacht auf eine Metastasierung, bei mittellinienüberschreitenden Tumoren und bei bekanntem hohem Risiko für eine kontralaterale Metastasierung (z.B. Zungenkörper, retromolare Region, Supraglottis, Uvula und andere Mittellinientumoren) [Bootz et al., 2008]. Die Neck Dissection erfolgt regelhaft simultan mit der Entfernung des Primärtumors. 2002 wurde vom Committee for Neck Dissection Classification der American Head and Neck Society eine gängige Klassifikation der Halslymphknoteneinteilung veröffentlicht. Diese Klassifikation nach Robbins unterscheidet sechs verschiedene Lymphknotenlevel am Hals [Robbins et al.,

2002]. Tabelle 1.4 definiert die anatomischen Grenzen der Level und Sublevel.

Tabelle 1.5 Nomenklatur der Halslymphknotenausräumungen [nach [Robbins et al., 2002]

<b>Klassifikation</b>	<b>Charakteristika</b>
Radikale Neck Dissection (RND)	Basisverfahren der Halsweichgewebsausräumung der Hauptlevel I-V mit Entfernung wichtiger nichtlymphatischer Strukturen (M. sternocleidomastoideus, V. jugularis interna, N. accessorius)
Modifiziert radikale Neck Dissection (MRND)	Entfernung der Hauptlevel I-V mit Erhalt einer oder mehrerer der wichtigen nicht lymphatischen Strukturen (M. sternocleidomastoideus, V. jugularis interna, N. accessorius)
Selektive Neck Dissection (SND)	Entfernung der Gewebe von mindestens 2, aber <5 Halslevel. Der Umfang wird durch die Benennung der Level und Sublevel gekennzeichnet.
Erweitert radikale Neck Dissection (ERND)	Radikale Neck Dissection und zusätzliche Entfernung von Lymphknotengruppen (z.B. parotideale Lymphknoten) oder Strukturen (z.B. Glandula parotis, N. hypoglossus, A. carotis externa, äußere Haut), die bei der RND nicht erfasst werden.

Abhängig von der Intention unterscheidet man in der Nomenklatur eine elektive Neck Dissection, wenn im präoperativen Staging kein Anhalt für eine lymphogene Metastasierung vorliegt von einer kurativen Neck Dissection, wenn bereits Hinweise für Lymphknotenmetastasen vorliegen.

Des Weiteren werden je nach Ausmaß der Resektion verschiedene Modifikationen der Neck Dissection unterschieden (Tabelle 1.5) [Robbins et al., 2002]. Die selektive Neck Dissection (SND) der Level I-III gilt beim klinisch unauffälligen Hals als Goldstandard [Dias et al., 2001, Ho et al., 1992, McGuirt et al., 1995, Wolfensberger et al., 2001]. Hier ist neben der Entfernung

möglicher okkulten Mikrometastasen auch das operative Staging das Ziel der Intervention. Eine histologisch gesicherte Lymphknotenmetastase hat grundlegenden Einfluss auf die Entscheidung, ob eine adjuvante Bestrahlung oder Radiochemotherapie der Operation angeschlossen wird. Demnach hat die Neck Dissection beim klinischen N0-Hals auch eine diagnostische und nicht nur eine rein therapeutische Funktion. Die Level I-III der betroffenen Halsseite werden im Konzept der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München anschließend intra operationem durch die Kollegen der Pathologie als Schnellschnitt-Präparate untersucht. Zeigen sich hier in den untersuchten Präparaten Lymphknotenmetastasen, so wird die Halslymphknotenausräumung noch in der selben Operation auf die Level IV und V der ipsilateralen und die Level I-III der kontralateralen Seite ausgeweitet [Iype et al., 2008, Liaw et al., 2006].

In der operationstechnischen Durchführung der Neck Dissection erfolgt die Entfernung der Halslymphknoten in der Regel vor der Tumorsektion. Regelmäßig wird bei der zu erwartenden Schwellung der Halsweichteile eine temporäre Tracheotomie zur Atemwegssicherung an den Beginn des Eingriffs gestellt. Für den chirurgischen Zugang zum Hals stehen verschiedene Schnittführungen zur Verfügung. Bei der Schnittführung geben die Relaxed Skin Tension Lines (RSTL), bestehende Hautfalten und Narben Modifikationen der dargestellten Zugangswege vor. Für die SND der Level I-III verläuft die Schnittführung prinzipiell bogenförmig vom Mastoid aus in einer Halsfalte etwa zwei Querfinger kaudal des Unterkieferrandes, um den R. marginalis mandibulae des N. facialis sicher zu schonen, nach anterior bis zur Unterkiefersymphyse und zeigt nach medial hin leicht an. Bei einer geplanten beidseitigen SND können die Schnittführungen in der Mitte zusammenlaufen. Dies ermöglicht darüberhinaus die Darstellung des Unterkieferkorpus und den Durchzug von Mundboden- und Zungenweichgewebe im Sinne der pull-through-Technik [Hausamen et al., 2012]. Werden weitere Lymphknotenlevel entfernt bzw. soll eine Radikale Neck Dissection (RND) oder Modifiziert

Radikale Neck Dissection (MRND) erfolgen, ist die Erweiterung der Schnitfführung im Sinne der Modifikation nach MacFee [Macfee, 1960] möglich. Modifikationen nach Crile [Crile, 1906] und Martin [Martin et al., 1951] werden vor allem im Hinblick auf eine geplante adjuvante Strahlentherapie als kritisch beurteilt [Hausamen et al., 2012]. Für die RND wird weiterhin die Hockeyschläger-Schnitfführung empfohlen. In unserer Klinik wird die Schnitfführung der SND nach latero-kaudal hin im Sinne einer modifizierten Schobinger-Schnitfführung erweitert, wenn die Ausräumung der Level IV und V indiziert sind. Hier ist vor allem darauf zu achten, den Winkel zwischen horizontaler und vertikaler Schnitfführung größer als 90° zu wählen, um eine ausreichende Perfusion des Haut-Platysma-Lappens zu gewährleisten [Kesting, 2014].

Operationstechnische Komplikationen der Neck Dissection beinhalten Schädigungen des R. marginalis n. facialis mit daraus resultierenden Schwächen des M. depressor anguli oris und des M. depressor labii inferioris. Klinisch fallen bei den betroffenen Patienten Asymmetrien im Bereich der Mundwinkel auf. Durch die Verwendung des intraoperativen Nervmonitorings und der Schnitfführung etwa zwei Querfinger kaudal des Unterkieferrandes kann der Nerv sicher geschont werden. Im Durchschnitt verläuft der R. marginalis n. facialis etwa 1,25 cm unterhalb des kaudalen Unterkieferrandes. In einigen Fällen verläuft er aber auch bis zu vier cm kaudal des Unterkieferrandes [Nason et al., 2007]. Des Weiteren kann es zu iatrogenen Läsionen des N. hypoglossus mit resultierender Atrophie der Zungenmuskulatur und Sprach- und Schluckschwierigkeiten kommen. Eine Schädigung des N. lingualis geht mit dem Verlust von Geschmack und Gefühl im Bereich der vorderen zwei Drittel der Zunge einher. Wird der N. accessorius im Rahmen der Halslymphknotenausräumung geschädigt, kann der betroffene Patient den Arm nicht über die Horizontale hinaus anheben (klinisches Zeichen der „dropping shoulder“). Seltener Komplikationen sind Luftembolien nach iatrogenen Verletzung der V. jugularis interna oder ein Pneumothorax bei tiefer

supraklavikulärer Dissektion. Diese Komplikationen können jedoch in den meisten Fällen durch eine sorgfältige subtile Präparationstechnik vermieden werden. Bei Ausräumung der Level IV und V der linken Halsseite kann es darüberhinaus zum Auftreten einer Chylusfistel kommen. Ursächlich ist die Verletzung des Ductus thoracicus beim Eintritt in den linken Venenwinkel. In der Folge kommt es zu ausgeprägten Elektrolyt- und Proteinverlusten mit einem Volumenverlust von bis zu 4-5 l pro Tag. Auch die Entwicklung eines Chylothorax kann die Folge sein. Daher wird die operative Unterbindung des Ductus thoracicus bei bemerkter intraoperativer Verletzung desselbigen empfohlen. In der Literatur ist diese Komplikation mit einer Inzidenz von 1-2,5 Prozent angegeben [Gregor, 2000]. Häufigere Komplikationen der Neck Dissection sind Wundheilungsstörungen, wie Infektionen oder Nahtdehiszenzen, vor allem bei vorgeschädigter Haut beispielsweise nach stattgehabter Bestrahlung.

#### 1.2.4.1.2 Defektdeckung

Durch die Tumoresektion mit entsprechendem Sicherheitsabstand entstehen intra- und oder extraorale Defekte, die rekonstruktive Maßnahmen notwendig machen. Im Vordergrund steht die Wiederherstellung bzw. der Erhalt von Funktionen wie Kauen, Sprechen und Schlucken ebenso wie das ästhetische Gesamtbild. Abhängig von der Größe des zu deckenden Defektes, seiner Gewebemorphologie, topographischen Lage und Invasion von Nachbargewebe stehen zur Rekonstruktion unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Kleine Defekte können ggf. direkt primär verschlossen werden oder heilen per secundam. Bei größeren Defekten kommen lokale Lappenplastiken zum Einsatz. Die autogene Gewebetransplantation umfasst sowohl die freie Haut- und Schleimhauttransplantation als auch mikrochirurgisch-reanastomosierte Transplantate. Darüberhinaus finden auch gestielte Regional- und Fernlappenplastiken Anwendung in der Rekonstruktion von Defekten der Kopf-Hals-Region. Als Goldstandard gilt heute die sofortige

Weichgewebsrekonstruktion mit mikrovaskulärem Gewebetransfer [Chiarini et al., 2002, Hayden et al., 1999, Makitie et al., 2003]. In der Literatur werden vollständige Transplantatverluste in weniger als 1 Prozent der Fälle, partielle Nekrosen in 3 Prozent und eine perioperative Mortalität von 1,3 Prozent beschrieben [Suh et al., 2004].

#### 1.2.4.2 Strahlentherapie

Die Bestrahlung ist grundsätzlich als primäre Strahlentherapie bei fortgeschrittenen Tumoren zur lokalen Tumorkontrolle indiziert, dies allerdings meistens in Kombination mit einer Chemotherapie (siehe Kapitel 1.2.4.3). Je nach Lokalisation können Photonen- oder Elektronenstrahlen und interstitielle Techniken alleine oder in Kombination angewendet werden [Rosenthal et al., 2004]. Es wird empfohlen, die Gesamtbehandlungszeit wegen der Gefahr der Repopulierung möglichst kurz zu halten. In diesem Zusammenhang scheinen neuere Untersuchungen zu hyperfraktioniert-akzelerierten Radiochemotherapie eine bessere lokale Kontrolle zu versprechen [Budach et al., 2005, Pignon et al., 2000, Staar et al., 2001, Wendt et al., 1998]. Die strengere Indikationsstellung zur adjuvanten Radiotherapie aufgrund der postoperativen Tumorformel (pTNM), die sich auf histopathologische Befunde stützt, ermöglicht eine individuell exaktere Risikoanpassung der Therapie. Als Indikationen gelten die lokale R1- und R2-Situation, wenn eine Nachresektion nicht möglich ist oder wenn der Sicherheitsabstand zu gering ist, der Nachweis von zervikalen Lymphknotenmetastasen ( $\geq$ pN1) und fakultativ pN0 mit Lymphgefäßinvasion am Primärtumor. Grundsätzlich erfolgt die Applikation ionisierender Strahlen entweder von extern (perkutane Strahlentherapie) oder nach Implantation spezieller Katheter im Nachladeverfahren (Afterloading), die direkt in den Tumor eingebracht werden. Bei der konventionellen Fraktionierung wird die Gesamtdosis auf tägliche Einzeldosen von etwa 1,8 – 2 Gy fünfmal pro Woche verteilt. Bei der Hypofraktionierung werden sehr viel höhere Einzeldosen verabreicht. Dies

geschieht vor allem mit einer palliativen Intention. Dem gegenüber steht das Konzept der Hyperfraktionierung. Hier wird häufiger mit geringeren Einzeldosen bestrahlt. Dadurch kann eine höhere wöchentliche Gesamtdosis verabreicht werden und insgesamt eine Verkürzung der Gesamtbehandlungszeit realisiert werden. Tabellen 1.6 und 1.7 geben eine Übersicht über die grundsätzlichen Dosiskonzepte in der primären und postoperativen Bestrahlung von Mundhöhlenkarzinomen.

**Tabelle 1.6 Grundsätzliche Dosiskonzepte für Einzeldosen von 1,8-2 Gy in der primären Bestrahlung [nach [Thönnessen et al., 2012]].**

<b>Gesamtdosis</b>	<b>Strahlenfeld</b>
50-54 Gy	Lymphabflusswege, bildgebend kein Hinweis auf Befall
65-70 Gy	Tumor und befallene Lymphknoten
72-80 Gy	Große Tumoren, <u>kleinvolumige Aufsättigung</u>

Eine eindeutige Aussage zum Vergleich zwischen perkutaner Radiotherapie und implantierbarer Bestrahlungsquelle (Brachytherapie) ist anhand der Studienlage nicht zu treffen [Wolff et al., 2012]. Beschrieben sind Fallserien, die für initiale Tumorstadien (T1, T2) eine lokale Tumorkontrolle nach einem Beobachtungszeitraum von fünf Jahren von 65-97 Prozent und bei fortgeschrittenen Tumoren von 49-70 Prozent beschreiben [Hareyama et al., 1993, Lefebvre et al., 1994, Pernot et al., 1995, Pernot et al., 1994]. Als optimale effektive Tumordosis werden 65 Gy angegeben [Mazeron et al., 1990].

**Tabelle 1.7 Grundsätzliche Dosiskonzepte für Einzeldosen von 1,8-2 Gy in der postoperativen Bestrahlung [nach [Thönnessen et al., 2012]].**

<b>Gesamtdosis</b>	<b>Strahlenfeld</b>
50-54 Gy	Lymphabflusswege, bildgebend kein Hinweis auf Befall
60 Gy	Befallene Areale nach kompletter Resektion
>60 Gy	Risikoareale, z.B. <u>extrakapsuläre Ausbreitung</u> oder Rest

### 1.2.4.3 Radiochemotherapie

Eine alleinige Chemotherapie ist beim primären Mundhöhlenkarzinom laut den aktuellen S3-Leitlinien nicht indiziert [Wolff et al., 2012]. Eine Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie konnte in mehreren Untersuchungen einen klaren Überlebensvorteil nachweisen. Im Vergleich zur alleinigen Radiatio betrug dieser 17 Prozent. Noch deutlicher zeigte sich dieser Effekt bei Patienten in der Altersgruppe unter 60 Jahren (22-24%) im Vergleich zu den 60-70-Jährigen (12%) [Bernier et al., 2004, Pignon et al., 2000]. Die chemotherapeutische Behandlung kann neoadjuvant oder adjuvant nach erfolgter Bestrahlung oder Operation erfolgen. Wird die Chemotherapie neoadjuvant mit Cisplatin und 5-Fluoruracil (5-FU) appliziert, so zeigte sich eine statistisch signifikante Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate um 5 Prozent bei Patienten mit nicht-metastasierten Kopf-Hals-Karzinomen [Pignon et al., 2000]. Die Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie konnte im Vergleich zur alleinigen Radiatio eine Verbesserung des 5-Jahres-Gesamtüberlebens von 8 Prozent sowie eine verbesserte lokale Tumorkontrolle von ebenfalls 8 Prozent erreichen [Pignon et al., 2000].

Nichtsdestotrotz werden die Nebenwirkungen der Strahlentherapie bei einer Kombination mit Chemotherapeutika potenziert. Es kommt vor allem neben vermehrten nachteiligen Auswirkungen auf das blutbildende System zur Verstärkung der Mukositis sowie zu vermehrten Folgeerkrankungen wie beispielsweise Zahnschäden [Calais et al., 1999, El-Sayed et al., 1996, Fountzilas et al., 2004, Henk et al., 2003]. Daher wird gefordert, die Radiochemotherapie an Zentren durchzuführen, die auf die Diagnostik und Therapie strahlenbedingter Begleiterkrankungen spezialisiert sind [Wolff et al., 2012]. Keine Indikation für eine Radiochemotherapie besteht bei Initialstadien oder kleinen Mundhöhlenkarzinomen. Patienten mit fortgeschrittenen operablen Tumoren profitieren von einer adjuvanten Kombinationstherapie aus Bestrahlung und Chemotherapie [Levendag et al., 1996, Rodgers et al., 1993]. Als Indikationen werden *in-sano* Resektionsränder von unter 5mm sowie

extrakapsuläres Tumorwachstum angesehen [Bernier, 2007]. In diesen Fällen verbessert sich das Gesamtüberleben nach drei Jahren signifikant [Huang et al., 1992]. Darüberhinaus wird das Risiko für ein Tumorrezidiv im Bereich der Lymphwege deutlich minimiert [Bartelink et al., 1983, Jesse et al., 1977, Lundahl et al., 1998].

### **1.3 Radiotherapie**

#### 1.3.1 Strahlenbiologische Grundlagen

Die Grundlage für das Verständnis der Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Zelle war die Erkenntnis des Zellzyklus, den alle Zellen im Zuge ihrer Vermehrung durchlaufen. Howard und Pelc definierten in den 1950er Jahren folgende Phasen des ubiquitären Zellzyklus: G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>-, S, G<sub>2</sub>-, und M-Phase [Howard et al., 1951]. In der G<sub>1</sub>-Phase findet die Produktion verschiedener Enzyme vor der DNA-Synthese in der folgenden S-Phase statt. Nach der Verdoppelung des Genoms werden in der G<sub>2</sub>-Phase RNA und Enzyme für die bevorstehende Mitose (M-Phase) hergestellt. Hier findet dann die eigentliche Zellteilung statt. Eukaryonte Zellen können auch in einem teilungsinaktiven Ruhestadium (G<sub>0</sub>-Phase) verweilen, um von dort aus jederzeit in den Proliferationszyklus zurück zu kehren.

Die Wirkung von ionisierenden Strahlen auf die Zelle findet auf DNA-Ebene statt. Die strahlentoxischen Wirkungen auf Enzyme und Proteine können durch ein intaktes Genom und einen intakten Proteinsyntheseapparat kompensiert werden. Die durch die Strahlung entstehenden freien Radikale reagieren vor allem in der M-, G<sub>2</sub>-, und frühen S-Phase mit Bestandteilen der Zellen und führen zu folgenden Schädigungen an der DNA [Streffer, 1996]:

- Die Polynukleotidketten der DNA können unterbrochen werden. Dies kann an einem Strang (Einzelstrangbruch) oder auch an beiden Strängen (Doppelstrangbruch) geschehen.

- Es kann zu Veränderungen oder Elimination von Nukleinsäurebasen, seltener auch zu Veränderungen der Desoxyribose kommen. Hieraus können Konformationsänderungen der DNA resultieren.
- Es können Vernetzungen der DNA innerhalb einer Einzelkette, zwischen zwei Einzelketten oder zwischen DNA und Proteinen stattfinden.

Die Zelle ist in der Lage an definierten Punkten (sog. Checkpoints) des Zellzyklus die Replikationsmechanismen anzuhalten: G<sub>1</sub>-Phase-Block, G<sub>2</sub>-Phase-Block, S-Phase-Block. Nach Arrest des Zellzyklus kann die Zelle zum einen Reparaturmechanismen in Gang setzen oder zum anderen bei infauster Prognose die Apoptose einleiten [Bernhard et al., 1999, Iliakis, 1997, Maity et al., 1994].

Die Zelle hält unterschiedliche Reparaturmechanismen vor, um abhängig vom eingetretenen Schaden reagieren zu können. Bei Einzelstrangbrüchen oder Veränderungen der DNA-Bestandteile (Basen oder Desoxyribose) ist die Zelle in der Lage, die defekte Stelle durch Exzision zu entfernen und die Lücke entsprechend des Komplementärstranges wieder aufzufüllen [Christmann et al., 2003]. Wesentlich komplexer sind die Reparaturvorgänge bei Doppelstrangbrüchen. Hier stehen der Zelle prinzipiell zwei unterschiedliche Mechanismen zur Verfügung. Neben der Nicht-Homologen Endverknüpfung (Non Homologous End Joining; NHEJ) kann die Zelle versuchen via Homologer Rekombinationsreparatur (Homologous Recombination Repair; HRR) den entstandenen Schaden zu beheben [Jeggo, 1998, Thompson et al., 2002]. Beim NHEJ werden die beiden freien Strangenden enzymatisch miteinander verknüpft und die fehlerhaften Nukleotide entfernt. Dies geschieht nach einem Zufallsprinzip und die DNA enthält folglich im Bereich des Doppelstrangbruchs eine fehlerhafte Sequenz. Bei der HRR hingegen wird der Bereich des Doppelstrangbruchs durch Ablesen der fehlenden Sequenz von einer homologen Stelle im Genom wieder aufgefüllt. Die DNA wird demnach fehlerlos wieder hergestellt. Eukaryote Lebewesen verfügen über beiden Formen der

DNA-Reparatur. Für strahleninduzierte Doppelstrangbrüche wird jedoch vor allem die NHEJ eingesetzt. Die Rolle der HRR als Reparaturmechanismus bei biologischer Strahlentoxizität ist noch nicht abschließend geklärt [Iliakis et al., 2003].

Sind die Reparaturmechanismen nicht erfolgreich bzw. überschreiten die Schäden an der DNA ein gewisses Maß, kommt es zum Zelltod. Grundsätzlich lassen sich der Interphasetod der Zelle, sprich die Apoptose vor dem Eintritt in die nächste Mitose, der reproduktive Zelltod, bei dem erst nach der ersten bis spätestens fünften Mitose nach Strahlenwirkung die Apoptose induziert wird und die Nekrose unterscheiden. Bei der Nekrose geht die Zelle auf Grund einer sehr starken Schädigung der Zellstrukturen mit einer Entzündungsreaktion zugrunde. Apoptose, der programmierte Zelltod, bei dem die Zelle unter Aktivierung spezieller Proteasen (Caspasen) in kleine apoptotische Vesikel zerfällt, welche von Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) phagozytiert werden, kann prinzipiell auf zwei unterschiedlichen Wegen induziert werden. Zum einen verfügen Zellen über spezielle Apoptose-Rezeptoren, über die von außen das Signal zur Einleitung des programmierten Zelltodes vermittelt werden kann (extrinsischer Weg, ligandenvermittelte Apoptose: TNF- $\alpha$  am p55-TNF- $\alpha$ -Rezeptor, CD95-L am CD95/Fas/Apo1-Rezeptor und TRAIL am Death Receptor DR4 oder DR5). Zum anderen haben Zellen die Fähigkeit, ohne Stimulus von außen den eigenen Zelltod einzuleiten (intrinsischer, mitochondrialer Weg). Es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung eine erhöhte Expression von Zelltodrezeptoren und -liganden verursacht, die Apoptoseeinleitung nach Bestrahlung jedoch hauptsächlich über den intrinsischen Weg vermittelt wird [Lawen, 2003]. Hier scheinen vor allem p53, Bax und Cytochrom C eine entscheidende Rolle zu spielen [Belka et al., 2004, Lawen, 2003, Ryan et al., 2001]. Weitere wichtige Faktoren, die einen Einfluss auf die strahleninduzierte Apoptose zu haben scheinen, sind die Sauerstoffversorgung sowie der pH-Wert des Gewebes. Bei Azidose und Hypoxie spricht das Tumorgewebe weniger gut auf eine Strahlentherapie an

[Baumann et al., 2003].

Grundsätzlich sind die molekularen Mechanismen, die zum klinischen Erfolg einer Strahlentherapie führen, sicherlich noch nicht vollständig geklärt und auch nur schwer ermittelbar. In vielen Fällen lässt sich aber eine starke Apoptoseinduktion von Tumorzellen durch Bestrahlung *in-vitro* auf eine hohe Strahlensensibilität *in-vivo* übertragen [Belka et al., 2003].

### 1.3.2 Strahlenbedingte Begleiterscheinungen

Nebenwirkungen einer Strahlentherapie entstehen durch unvermeidbare Mitbestrahlung gesunden Gewebes. Grundsätzlich werden akute von chronischen strahlenbedingten Nebenwirkungen unterschieden.

Die wichtigste akute Strahlenfolge bei einer Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich ist die Mukositis, eine entzündliche und schmerzhafte Schädigung des Schleimhautepithels und der Submukosa [Cox et al., 1995]. Mit steigender Strahlendosis nimmt auch der Schweregrad der Mukositis zu, so dass die Nahrungsaufnahme in fortgeschrittenen Stadien deutlich eingeschränkt sein kann. Hier kann häufig bereits vor Beginn einer Strahlentherapie das Legen einer perkutanen endoskopischen Gastrostomie-Sonde (PEG-Sonde) sinnvoll sein. Neben dem Schleimhautepithel kann auch die äußere Haut im Sinne einer Radiodermatitis vom akuten Strahlenschaden betroffen sein. Zu den Spätschäden einer Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich zählt die sog. Strahlenkaries. Hier sind eingehende zahnärztliche Untersuchungen, Fokussanierungen vor einer geplanten Radiation und das Anfertigen einer Fluoridierungs- bzw. Distanzschiene empfohlen [Denis et al., 2003, Epstein et al., 1998]. Des Weiteren sind die Patienten von einer ausgeprägten Mundtrockenheit (Xerostomie) betroffen, insbesondere wenn die großen Kopfspeicheldrüsen im Bestrahlungsfeld liegen. Die Xerostomie führt zu weiteren funktionellen Einschränkungen wie Sprach- und Schluckstörungen. Eine schwerwiegende Spätfolge einer Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich

stellt die Osteoradionekrose dar. Bei der infizierten Form dieser strahlenbedingten Knochenentzündung, die etwa bei 5 Prozent aller bestrahlten Patienten auftritt, kann der Teilverlust des Unterkiefers die Folge sein. Nachvollziehbar ist das Risiko für die Entstehung einer Osteoradionekrose deutlich erhöht, wenn es zu einer Tumorarrosion am Unterkiefer gekommen ist und dieser demnach im direkten Strahlenfeld liegt [Crean et al., 2003, Tong et al., 1999, Turner et al., 1996]. Die chirurgische Therapie einer infizierten Osteoradionekrose ist sehr komplex und oft nur durch einen mikrochirurgischen Knochentransfer adäquat zu lösen [Wolff et al., 2012].

Der Zusammenhang zwischen postoperativen Wundheilungsstörungen (WHS) und einer stattgehabten Bestrahlung konnte in Untersuchungen für topographische Regionen wie die Bauchwand bereits nachgewiesen werden [Wang et al., 2006]. Patienten, die nach einer Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich eine operative Intervention in vorbestrahlten Gewebe benötigen, sei es durch ein lokales Rezidiv oder erst im Verlauf aufgetretene Lymphknotenmetastasen, stellen ein Kollektiv mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von zervikalen Wundheilungsstörungen dar. Untersuchungen von Pellini und Mitarbeitern konnten die präoperative Radiochemotherapie sowie die Art der durchgeführten Halslymphknotenausräumung als prädiktive Faktoren für das Entstehen von Wundheilungsstörungen nach Neck Dissection herausarbeiten [Pellini et al., 2013]

#### **1.4 Evaluation der Strahlenfolgen auf das Gewebe**

Ionisierende Strahlung führt auf zellbiologischer Ebene zu Endothelschädigungen und infolgedessen zu Gewebischämien und -atrophien [Hopewell et al., 1993]. Die Entwicklung einer Gewebsfibrose in vorbestrahltem Gewebe lässt sich durch die durch Hypoxie induzierte, vermehrte Expression von profibrotischen Zytokinen und einer vermehrten Kollagenbildung *in-vitro*

erklären [Falanga et al., 2002, Westbury et al., 2007].

#### 1.4.1 Perfusion und Oxygenierung

Die Messung der Gewebeoxygenierung in bestrahlter Haut ist bereits in mehreren Studien mit Hilfe von transkutanen Sauerstoff-Mikroelektroden erfolgt und erfolgreich klinisch und wissenschaftlich etabliert. Eine Verminderung der Sauerstoffkonzentration in bestrahltem Gewebe konnte hier nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz sind die Ergebnisse uneinheitlich [Rudolph et al., 1994, Thorn et al., 1997, Westbury et al., 2007]. Die Möglichkeit, mittels eines non-invasiven Messverfahrens unter der simultanen Anwendung zweier Messtechniken, der Laser-Doppler-Spektroskopie und der Gewebespektrometrie, Messwerte zur Hämoglobinoxygenierung, zur relativen Hämoglobinkonzentration, zum tiefenselektiven Blutfluss (Flow) sowie zur tiefenselektiven Blutflussgeschwindigkeit (Velocity) zu generieren, ist bereits in vorhergehenden Studien genutzt und auf ihre Genauigkeit, Reliabilität und klinische Anwendbarkeit geprüft worden [Holzle et al., 2006].

#### 1.4.2 Antimikrobielle Peptide (AMP)

Im Rahmen von Wundheilungsstörungen ist die Rolle von antimikrobiellen Peptiden bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen gewesen [Kesting et al., 2012, Kesting et al., 2010]. Das angeborene Immunsystem und hier vor allem die host defence Peptide (HDP), auch als antimikrobielle Peptide (AMP) bezeichnet, scheinen in der mikrobiellen Abwehr von bakteriellen, viralen und fungiziden Infektionen eine wichtige Rolle zu spielen [Braff et al., 2005, Kaus et al., 2008, Schitteck et al., 2008]. Die besondere Bedeutung einer Untergruppe der AMP, der humanen  $\beta$ -Defensine (hBD), im Rahmen der Wundheilung ist bereits in mehreren Studien untersucht worden [Steinstraesser et al., 2008]. HBD sind in der Lage, die Permeabilität der Zellwände ihrer Zielzellen zu

verändern, und somit bei epidermalen Verletzungen die mikrobielle Infektion zu unterdrücken oder zumindest deren Fortschreiten zu verlangsamen [Gallo et al., 1998, Lehrer et al., 1989]. Die unterschiedlichen Subtypen der hBD zeigen ebenfalls verschiedene Angriffspunkte im Rahmen von Hautinfektionen. HBD-1 (*DEFB1*) wird von den Keratinozyten, unterschiedlichen Hautanhangsdrüsen und CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gebildet und richtet sich in der antimikrobiellen Wirkung vor allem gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien. HBD-2 (*DEFB4A*) zeigt neben der Aktivität gegen Bakterien (Gram-positiv und Gram-negativ) auch eine Wirkung gegen fungizide Infektionen. HBD-2 wird ebenfalls von Keratinozyten, Hautanhangsdrüsen und CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gebildet. Bei gleichem Wirkspektrum wird hBD-3 (*DEFB103A*) von Keratinozyten, Monozyten und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gebildet [Harder et al., 1997, Kaus et al., 2008, Steinstraesser et al., 2008, Stoeckelhuber et al., 2006]. Neben den beschriebenen hBD zeigt eine Reihe von Untersuchungen die Bedeutung eines weiteren Peptides für die antimikrobielle Wirkung von AMP in Infektionen der Haut. Psoriasin (*S100A7*) wird ebenfalls in Keratinozyten gebildet und zeigt Aktivität gegen Gram-negative und -positive Bakterien [Fulton et al., 1997, Kaus et al., 2008, Steinstraesser et al., 2008]. Psoriasin wurde erstmals bei Patienten mit Schuppenflechte beschrieben und zeigt einen ähnlichen Wirkmechanismus wie die hBD, indem es Permeabilitätsveränderungen an der bakteriellen Zellmembran hervorruft und eine Chemotaxis von Leukozyten auslösen kann [Madsen et al., 1991, Michalek et al., 2009, Wolf et al., 2008].

#### 1.4.3 Strahleninduzierte Fibrose (SIF)

Der Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Gefäßarchitektur zeigte in Studien von Schultze-Mosgau et al. eine Abhängigkeit im Bezug auf die biologische Strahlendosis [Schultze-Mosgau et al., 2000, Schultze-Mosgau et al., 2002a]. Es konnten keine strukturellen Veränderungen bei Dosen in Höhe von 40 bis 50 Gy nachgewiesen werden. Ab biologischen Strahlendosen von 60

bis 70 Gy zeigten sich Dehiszenzen in der Gefäßintima, Hyalinose sowie eine generelle Verminderung der Media in den untersuchten Arterien [Schultze-Mosgau et al., 2002a, Schultze-Mosgau et al., 2002b]. Darüberhinaus hat die reduzierte Vaskularisation ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf das Bindegewebe. Eine perikapilläre Fibrose im Bereich des Transplantatlagers bei mikrochirurgischen Transplantaten, eine unregelmäßige Verteilung der Kapillaren sowie eine generelle Verminderung der Kapillaren konnte in tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden [Schultze-Mosgau et al., 2002b].

Ionisierende Strahlen steigern die reaktive Expression bestimmter Zytokine wie beispielsweise des Transforming-Growth-Factor- $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ -1). TGF- $\beta$ -1 spielt eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Stimulation oder auch Inhibition von Fibroblasten und der Angiogenese [Fajardo et al., 1996, Randall et al., 1995, Vegesna et al., 1995]. Andere Studien konnten nachweisen, dass eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$ -1 zu einer signifikant gesteigerten Gewebsfibrose führt [Border et al., 1994]. Nichtsdestotrotz scheint die Forschungslage widersprüchlich zu sein. *In-vitro* Studien konnten eine Inhibition der Endothelzellmigration und -proliferation nachweisen, während *in-vivo* Untersuchungen eine Stimulation der Angiogenese zeigen konnten [Baird et al., 1986]. Erhöhte Expressionmuster von TGF- $\beta$ -1 wurden in bestrahlter humaner und porciner Haut nachgewiesen [Martin et al., 2000, Martin et al., 1993].

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit versucht, auf Grundlage von klinischen Daten, Messungen der Gewebepfusion und -oxygenierung, sowie durch die Analyse spezifischer Markerproteine in histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Verfahren Aussagen über den Einfluss einer präoperativen Bestrahlung auf die zervikale Haut zu treffen. Hierbei soll neben der Gewebsfibrose auch die Rolle der antimikrobiellen Peptide in diesem

Zusammenhang näher untersucht werden. Darüberhinaus soll anhand der Datenlage sowie der Ergebnisse der klinischen Diagnostik und Labormethodik Erkenntnisse über das Auftreten postoperativer Wundheilungsstörungen und dem Zusammenhang zu einer präoperativen Strahlentherapie gewonnen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

BioPhotometer plus (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)

Cooling Plate mod. PF 100 (*Bio Optica, Mailand, Italien*)

Disposable scalpel standard (*Feather Safety Razer Co., Osaka, Japan*)

Einbettautomat TES-1 (*Wendt GmbH & Co. KG, Georgsmarienhütte, Deutschland*)

Embedding Unit – Pro Optica Paraffin dispenser – type DP 500 (*Bio Optica, Mailand, Italien*)

Embedding Unit – Pro Optica Thermal unit – type UT200L (*Bio Optica, Mailand, Italien*)

Eppendorf MiniSpin<sup>®</sup> plus (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)

Eppendorf Reference<sup>®</sup> Pipetten 0,5-10 µl (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)

Eppendorf Reference<sup>®</sup> Pipetten 10-100 µl (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)

Eppendorf Reference<sup>®</sup> Pipetten 100-1000 µl (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)

Inkubationskammer (*Weckert Labortechnik, Kitzingen, Deutschland*)

Fischer FI3100 Elektronische Halbmikro-, Analysen und Präzisionswaage (*Willi Fischer oHG, Frankfurt, Deutschland*)

Heidolph MR 3001 Magnetrührer (*Heidolph, Schwabach, Deutschland*)

inoLab<sup>®</sup> pH 720 Labor-pH-Meter (*Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland*)

LightCycler<sup>®</sup> 1.0 Real-time Detection System Micra D-9 (*Roche, Mannheim, Deutschland*)

Mikrotom pfm Rotary 3002 (*pfm Produkte für die Medizin AG, Köln, Deutschland*)

Mikrowelle Intellowave (*LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen, Deutschland*)

Milli-Q Water Purification System (*Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland*)

Nikon Eclipse 80i Mikroskop (*Nikon, Düsseldorf, Deutschland*)

Paraffin-Streckbad GFL-1052 (*GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland*)

Sartorius Extend Elektronische Analysen-, Präzisions- und Edelmetallwaage (*Sartorius, Göttingen, Deutschland*)

SenTix<sup>®</sup> 41 pH Elektrode (*Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland*)

Sub-Cell<sup>®</sup> GT Agarose Gel Electrophoresis (*Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland*)

ThermoStat plus (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)

### 2.1.2 Verbrauchsmittel

1kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*)

2-200µl Pipettenspitzen (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)

2-Mercaptoethanol (*Roth, Karlsruhe, Deutschland*)

3,3-Diaminobenzidin tetrahydrochlorid Tabletten; DAB Tablette (*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*)

50-1000µl Pipettenspitzen (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)

Agarose (*Eurobio, Les Ulis, Frankreich*)

bovine Serum Albumin; BSA (*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*)

Bromphenolblau (*AppliChem, Darmstadt, Deutschland*)

Citronensäuremonohydrat; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)

Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)

DNaseI Lösung (*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*)

DPX Mountant for histology (*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*)

Einbettkassetten (*Sanowa Laborprodukte, Leimen, Deutschland*)

Eppendorf Reaktionsgefäß 3810X (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*)

Essigsäure 100% (*Merck, Darmstadt, Deutschland*) .

Ethanol; EtOH (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)

Ethylendiamintetraacetat; EDTA (*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*)

Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7% (*Fischar, Saarbrücken, Deutschland*)

Gelstar (*Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland*)

Glycerin ROTIPURAN® (*Roth, Karlsruhe, Deutschland*)

LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I reaction mix (*Roche, Mannheim, Deutschland*)

Mayer hematoxylin (*Bio Optica, Mailand, Italien*)

Natriumchlorid; NaCl (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)

Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)

Natriumhydroxid; NaOH (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)

Normal Goat Serum (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*)

P 10 UVpette Pipettenspitzen (*Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland*)

Proteinase K (*Dako Deutschland, Hamburg, Deutschland*)

QIAquick Nucleotide Removal Kit (*Qiagen, Hilden, Deutschland*)

RNase free dnase set (*Qiagen, Hilden, Deutschland*)

RNeasy® Protect Mini Kit (*Qiagen, Hilden, Deutschland*)

Salzsäure; Chlorwasserstoffsäure; HCL 37% (*Roth, Karlsruhe, Deutschland*)

Streptavidin (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*)

Superfrost® Plus Objektträger (*Menzel, Braunschweig, Deutschland*)

SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR (*Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*)

Tissue Embedding Medium (Paraplast® Regular) (*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*)

Trinatriumcitratdihydrat;  $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$  (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)

Tris-hydroxymethyl-aminomethan; TRIS (*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*)

Vectastain® ABC Kit (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*)

Wasserstoffperoxid 30%;  $H_2O_2$  (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)

Xylenblau (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)

Xylol (*Aug. Hedinger, Stuttgart, Deutschland*)

## **2.2 Methodik**

### **2.2.1 Patientenkollektiv**

Insgesamt wurden 91 Patienten in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten wurden im Zeitraum vom 01.01.2012 bis zum 31.12.2012 an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität einer operativen Therapie der Halslymphknoten unterzogen. Darüberhinaus erfolgte abhängig von der Grunderkrankung die Tumorsektion, primäre oder sekundäre Rekonstruktion mit freien Transplantaten, gestielten Nah- oder Fernlappen oder mikrochirurgischem Gewebettransfer.

Die klinische Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt (Nr. 263309) und entspricht in Aufbau und Durchführung den Regularien der Deklaration von Helsinki. Alle Patienten wurden nach sorgfältigem Screening ausführlich schriftlich und

mündlich über ihre Teilnahme an der Studie aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde sowohl vom aufklärenden Arzt wie auch vom Patienten unterschrieben und dem Patienten in Kopie ausgehändigt. Am Abend vor der geplanten Operation wurden alle rekrutierten Patienten klinisch untersucht und allgemeine Daten zu Vorerkrankungen, stattgehabter Strahlentherapie und Voroperationen erhoben. Noch am selben Abend erfolgte die Messung der Sauerstoffsättigung und Mikroperfusion mit Hilfe eines tragbaren Messsystems (O2C; Lea Medizintechnik, Gießen, Deutschland; siehe Kapitel 2.2.2). Im Verlauf des stationären Aufenthaltes sowie anhand der Aktenlage wurden potentiell auftretende Wundheilungsstörungen über einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen dokumentiert und für die statistische Auswertung dichotomisiert (Auftreten irgendeiner Form von Wundheilungsstörungen vs. keine Wundheilungsstörung). Grundsätzlich wurden die Patientendaten anonymisiert gespeichert und konnten lediglich vom Verfasser selbst sowie von anderen autorisierten Prüfarzten eingesehen werden.

## 2.2.2 Präoperative Messung der Gewebeoxygenierung und -perfusion

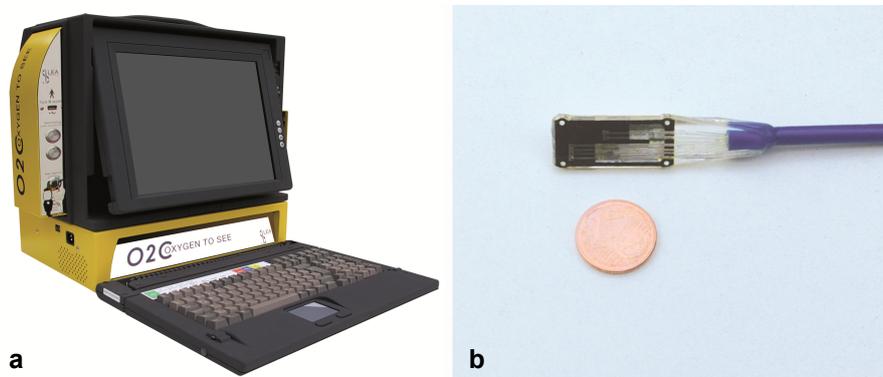
Sämtliche Messungen wurden mit dem tragbaren Messsystem O2C (oxygen to see) der Firma LEA Medizintechnik (*Gießen, Deutschland*) durchgeführt (siehe Abbildung 2.1).

### 2.2.2.1 Messprinzipien und Gerätetechnik

Dieses optische Diagnosegerät dient der transkutanen Messung der Gewebeoxygenierung sowie der Gewebepерfusion in bestimmten definierten Tiefen. Hierbei wird die Laser-Doppler Spektroskopie mit der Gewebespektrometrie kombiniert [Rau, 2005].

Das Prinzip der Laser-Doppler Spektroskopie bedient sich der Doppler-Technik, wobei Licht, welches an bewegten korpuskulären Strukturen, wie beispielsweise

Erythrozyten reflektiert wird, einer Frequenzverschiebung unterliegt, welche mit der Erythrozytenbewegung in einem linearen Zusammenhang steht. Als Lichtquelle wird ein Diodenlaser der Schutzklasse 3B verwendet, dessen maximale Leistung 30 mW nicht überschreitet. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes beträgt 820 nm. Die Glasfasersonde ist zum einen in der Lage die Messstelle mit Laserlicht zu beleuchten, zum anderen kann sie das vom Gewebe reflektierte Laserlicht entsprechend reflektieren.



**Abbildung 2.1 O2C-Gerät der Firma LEA Medizintechnik GmbH (Gießen, Deutschland)**  
a. Tragbares Monitoring-System; b. Detaildarstellung der verwendeten Lasersonde

Zur Analyse des reflektierten Lichtes wird die heterodyne Lichtschwebungstechnik angewandt. Bei dieser Methode wird reflektiertes Licht, nichtfrequenzverschobenes Licht mit dem reflektierten, frequenzverschobenen Licht überlagert und die entstehenden Schwebungsfrequenzen werden analysiert. Die errechnete Frequenzverschiebung wird vom O2C-Messsystem ausgewertet und als Parameter Blutflussgeschwindigkeit (velocity) dargestellt. Neben der reinen Erythrozytenbewegung wird das reflektierte Licht außerdem noch durch die Anzahl der Erythrozyten beeinflusst. Mit steigender Anzahl von Erythrozyten nimmt auch die Intensität des reflektierten Lichtes zu. Diese Intensität wird zusammen mit der Blutflussgeschwindigkeit als Parameter Blutfluss (flow) verrechnet und vom O2C-Messsystem entsprechend ausgewertet. Durch eine spezielle geometrische Anordnung der Dioden ist es möglich, die Parameter

„flow“ und „velocity“ tiefenselektiv in einer Tiefe von 2 mm sowie in einer Tiefe von 8 mm anzugeben.

Neben der Laser-Doppler Spektroskopie verwendet das O2C-Messsystem noch das Prinzip der Gewebespektrometrie, um Daten zur Hämoglobinoxygenierung und die relative Hämoglobinkonzentration zu ermittelt. Mit Hilfe der Glasfasersonde wird zum einen das zu untersuchende Gewebe beleuchtet und zum anderen das reflektierte Licht in einem Spektrum von 500-630 nm detektiert. Die Fasern der Sonde zur Beleuchtung und zur Photodetektion mit einem Durchmesser von 400 µm sind in einem Abstand von 2 mm angeordnet. Durch Variation des Abstandes ist eine Änderung der Messtiefe möglich. Somit beträgt die Messtiefe der O2C-Sonde 2-4 mm, wobei leichte Abweichungen durch Strukturunterschiede des Gewebes möglich sind. Grundlage des Verfahrens der Gewebespektrometrie ist die Emission einer Weißlichtquelle (Halogenlampe 21 W), deren Licht zu unterschiedlichen Teilen reflektiert, gestreut oder absorbiert wird. Die Absorptionseigenschaften des Hämoglobins stehen in engem Zusammenhang mit seiner Oxygenierung. Der nicht absorbierte Teil des Lichts wird durch Hämoglobin spektral verändert und diese veränderten Spektren werden in der Messsonde registriert und mit den bekannten Spektren von voll oxygeniertem Hämoglobin (Absorptionsmaxima von 542 und 577 nm) und desoxygeniertem Hämoglobin (Absorptionsmaximum von 556 nm) verglichen. Der auf diese Weise ermittelte Wert gibt die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins in den Kapillaren, Arteriolen und Venolen an. Die relative Hämoglobinkonzentration stellt ein Maß für die Gesamtblutmenge im beleuchteten Gewebevolumen dar und erfasst alle Erythrozyten, unabhängig davon, ob sie sich in Bewegung befinden oder nicht. Um bei der Messung etwaige Einflussfaktoren auf die generierten Werte zu minimieren, sollten die folgenden Aspekte unbedingt Beachtung finden:

- Bewegungen des Patienten oder des Untersuchers bei der Messung sollten unbedingt vermieden werden, um eine Dislokation der Messsonde zu vermeiden.

- Durch eine kurzfristige Fixation der Messsonde an der äußeren Haut mit Hilfe eines Klebestreifens können zum einen Bewegungsartefakte minimiert werden, zum anderen kann auf diese Weise ein konstant gleicher Druck auf die Sonde im Bereich der Messstelle sicher gestellt werden.
- Der Einfluss äußerer Lichtquellen sollte durch Abschirmung der Messstelle reduziert werden.

Die Messstelle zervikal wurde am Vorabend der Operation entsprechend markiert. Aus dem Bereich der Markierung wurde dann intraoperativ die Gewebeprobe gewonnen, um die histologischen und molekularbiologischen Daten mit den klinischen Auswertungen korrelieren zu können.

### 2.2.3 Gewinnung der Gewebeproben

Alle eingeschlossenen Patienten wurden einer selektiven Neck Dissection unterzogen. Diese wurde unter standardisierten Bedingungen ausgeführt. Im Rahmen des operativen Zugangs erfolgte die Entnahme einer Gewebeprobe im Bereich der Markierung. Die Gewebeproben wurden in Formalin und entsprechend in einem Lagermedium (Allprotect Tissue Reagent; *Qiagen, Venlo, Niederlande*) für die molekulare Diagnostik unter sterilen Kautelen gewonnen, dokumentiert und zur weiteren Verarbeitung eingebettet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.4 Histologie

Alle histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Färbungen, Untersuchungen und Analysen erfolgten im Labor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Klinikums rechts der Isar

der Technischen Universität München.

Nach Einbettung der Formalin-fixierten Präparate in Paraffin wurden die Proben etwa 4 µm dick geschnitten. Es wurden konventionell histologische Färbungen zur Darstellung unterschiedlicher Gewebestrukturen durchgeführt. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Färbungen.

**Tabelle 2.1** Verwendete histologische Färbungen

Färbung	Gefärbtes Gewebe
<b>Hämatoxylin-Eosin (HE)</b>	<i>Blau:</i> Zellkerne, raues endoplasmatisches Retikulum <i>Rot:</i> Zellplasmaproteine, Mitochondrien, glattes endoplasmatische Retikulum, Kollagen, Keratin
<b>Masson-Trichrome (MT)</b>	<i>Blau:</i> Kollagen <i>Rot:</i> Keratin, Muskelfasern <i>Braun-schwarz:</i> Zellkerne
<b>Van Gieson Elastica (EvG)</b>	<i>Rot:</i> kollagene Fasern <i>Braun:</i> elastische Fasern

Alle gefärbten Gewebeschnitte wurden anschließend mit Hilfe des Lichtmikroskopes (AxioCam HRC; Zeiss, Jena, Deutschland) qualitativ ausgewertet.

In den HE-Schnitten wurde die Dicke der Epidermis an zehn unterschiedlichen Hauptgesichtsfeldern (HPF, high-power field) gemessen und die Ergebnisse zwischen den Patientengruppen verglichen.

### 2.2.5 Immunhistochemie

Zur Charakterisierung der Expression verschiedener Marker der Fibrose und Angiogenese sowie des angeborenen Immunsystems wurden neben den konventionellen histologischen Färbungen noch immunhistochemische Verfahren angewandt.

### 2.2.5.1 Fixierung, Einbettung und histologischer Schnitt

Die in Formalin gelagerten Gewebeproben (siehe Kapitel 2.2.3) wurden anschließend mit Hilfe des Einbettautomaten (TES-1; *Wendt, Georgsmarienhütte, Deutschland*) in Paraffin (Tissue Embedding Medium Paraplast<sup>®</sup> Regular; *Sigma-Aldrich, München, Deutschland*) eingebettet. Das automatisierte Einbettprogramm durchläuft in Zyklen von jeweils vier Stunden zunächst eine aufsteigende Alkoholreihe (EtOH; *Merck, Darmstadt, Deutschland*) und die Behandlung mit Xylol (Xylol; *Hedinger Stuttgart, Deutschland*). Die entwässerten Proben wurden nun entsprechend der gewünschten Schnittrichtung in Einbettkassetten (*Sanowa, Leimen, Deutschland*) positioniert und anschließend mit Paraffin eingebettet.

Die Paraffinblöcke wurden nun auf Schichtdicken von 4 µm geschnitten (pfm Rotary 3002; *pfm, Köln, Deutschland*) und auf gläserne Objektträger aufgezogen (Superfrost<sup>®</sup> Plus; *Menzel, Braunschweig, Deutschland*) und für eine Nacht im Wärmeschrank (Heraeus Function Line; *Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland*) bei 48°C getrocknet.

### 2.2.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Das Entparaffinieren erfolgte für zehn Minuten in Xylol gefolgt von jeweils fünf Minuten in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%, 50%). Danach wurden die Schnitte in Aqua dest. oder Tris gepufferter Salzlösung (0,05 mol, pH=7,6) gespült. Anschließend erfolgte die Behandlung in Citratpuffer (pH 6,0) für 3x5 Minuten bei 600 Watt in der Mikrowelle (*LG Electronics Deutschland, Rating, Deutschland*). Um die endogene Peroxidase zu hemmen und falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden die Proben für 20 Minuten in 200ml Methanol und 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> belassen.

Tabelle 2.2 Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Sekundär-Antikörper
<b>hBD-1</b>	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:100	Anti-rabbit Vector Lab., USA
<b>hBD-2</b>	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:100	Anti-rabbit Vector Lab., USA
<b>hBD-3</b>	Novus Biologicals, USA	1:100	Anti-rabbit Vector Lab., USA
<b>Psoriasin</b>	Imgenex, USA	1:50	Anti-rabbit Vector Lab., USA
<b>vWF</b>	DakoCytomation, Dänke mark	1:200	Anti-rabbit Vector Lab., USA

Die Schnitte wurden mit H<sub>2</sub>O gespült, in PBS-Puffer gelegt, abgetupft und in einer Inkubationskammer (*Weckert Labortechnik, Kitzingen, Deutschland*) für 60 Min. mit Normal Goat Serum (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*) geblockt. Hierzu wurden 30µl Goat Serum mit 1 ml PBS-Puffer vermischt. Durch den Vorgang des Blockens soll die Bildung unspezifischer Bindungen der Primärantikörper vermindert werden, indem stark geladene Kollagene und Bindegewebsbestandteile blockiert werden. Anschließend wurden das Goat Serum verworfen und die Primärantikörper aufgetragen (siehe Tabelle 2.2). Die Negativkontrollen wurden lediglich mit PBS behandelt. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte 60 Min. bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C. Nach entsprechender Inkubation wurden die Schnitte langsam auf Raumtemperatur gebracht, die Primärantikörperlösung entfernt und dreimal für fünf Min. mit PBS-Puffer gewaschen. Nun wurden die entsprechenden Sekundärantikörper aufgebracht (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*). Die Inkubationszeit betrug jeweils 60 Min. Anschließend wurden die Sekundärantikörperlösung verworfen und die Schnitte erneut dreimal fünf Min. in PBS-Puffer gespült. Anschließend wurde die Avidin-Peroxidase-Lösung (*Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA*) aus jeweils 10 µl Avidin und biotinylierte Meeretichperoxidase mit 1 ml PBS-Puffer hergestellt und für 45 Min. auf die Schnitte aufgetragen. Im Anschluss erfolgte eine

erneute dreimalige Spülung für jeweils fünf Min. mit PBS-Puffer. Die Schnitte wurden mit Peroxidase konjugiertem Streptavidin (*Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA*) 45 Min inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mittels Diaminobenzidin (DAB). 500µl DAB-Lösung wurden mit 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt und anschließend bis zum Eintritt der Färbung auf die Schnitte appliziert. Die DAB-Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O abgespült und die Schnitte anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe und abschließend mit Xylol dehydriert und gedeckelt (DPX Mountant for histology, *Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland*).

#### 2.2.5.3 Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte qualitativ-deskriptiv. Die Färbungen auf von-Willebrand-Faktor (vWF) wurden darüberhinaus noch quantitativ ausgewertet. In insgesamt 10 HPF wurden bei einer definierten Vergrößerung und konstanten Einstellungen des Mikroskopes die Anzahl an sicher positiv gefärbten Gefäßen numerisch ausgezählt und in den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen miteinander verglichen.

#### 2.2.6 Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (Polymerase-Chain Reaction, qRT-PCR)

##### 2.2.6.1 Herstellung von Standards

Zur relativen Quantifizierung der Ergebnisse der qRT-PCR wird eine interne Kontrolle benötigt. Dies kann beispielsweise ein Gen-Transkript sein, dessen Signal verwendet wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten Ribonukleinsäure (ribonucleic acid, RNA) auszugleichen. Als Haushaltsgen (housekeeping gen, HKG) wurde in dieser Studie Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Durch den Mengenvergleich zwischen

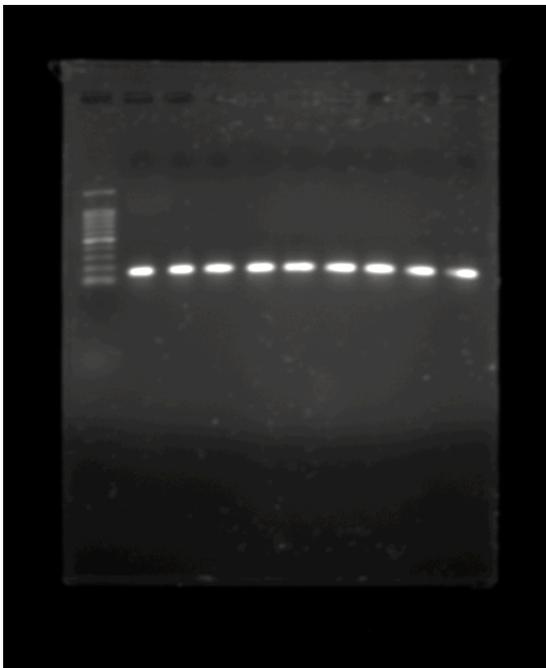
HKG und Expression wird die qRT-PCR normiert. Im Weiteren lässt sich durch die lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem Ct-Wert (Cycle Threshold, Schwellenwert-Zyklus), der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, die relative Quantifizierung anhand einer Standard-Kurve berechnen. Ist die Ausgangsmenge bekannt, kann somit eine Standard-Kurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den Ct konstruiert werden. Nach anschließender Normierung durch Division der errechneten Kopienzahl des Targetgens durch die Kopienzahl des HKG kann somit die unterschiedliche Expression des untersuchten Gens in verschiedenen Studiengruppen quantifiziert werden.

Hierzu wurden für das HKG GAPDH sowie für alle verwendeten Primer Standard-Verdünnungsreihen hergestellt. Die Proben wurden im ersten Schritt mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit (*Qiagen, Hilden Deutschland*), des RNase-free DNase Kit (*Dako, Hamburg, Deutschland*), Proteinkinase K (*Dako, Hamburg, Deutschland*) sowie SuperScript<sup>™</sup> First Strand Systems für RT-PCR (*Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*) gemäß Herstellerangaben behandelt. Die Konzentration der DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt und Standardkurven aus den Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:100.000 hergestellt.

### 2.2.6.2 Gelelektrophorese

Um die Spezifität der verwendeten Primer zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Abbildung 2.2 zeigt dies exemplarisch für  $\alpha$ -Prokollagen. Tabelle 2.3 fasst die in dieser Studie verwendeten Primer zusammen.

Für die Herstellung des Agarosegels wurde ein 50x Tris-Acetat Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE-Puffer) mit einem pH von 8,0 verwendet. Hierfür wurden zunächst 14,6 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA;



*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*) abgewogen und in 60 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Zur Einstellung des gewünschten pH-Wertes von 8,0 wurde entsprechend Natriumhydroxid (NaOH; *Merck, Darmstadt, Deutschland*) hinzugefügt und der pH mit dem inoLab<sup>®</sup> pH 720 Labor-pH-Meter (*Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland*) gemessen. Anschließend wurden 1000 ml H<sub>2</sub>O zur Einstellung der gewünschten Molarität von 0,5M hinzugegeben.

**Abbildung 2.2 Agarose Gelelektrophorese für  $\alpha$ -I-Prokollagen**

Tabelle 2.3 Übersicht der verwendeten Primer für die qRT-PCR

A=Adenin; C=Cytosin; G=Guanin; T=Thymin

Gen	GenBank® Accession no.	Sequenz 5´nach 3
Humanes Prokollagen alpha 1 (α-PK)	NC_000077.6	<i>Vorwärts</i> CTCGAGGTGGACACCACCT
		<i>Rückwärts</i> CAGCTGGATGGCCACATCGG
Tumor growth factor beta 1 (TGF-β-1)	NC_010448.3	<i>Vorwärts</i> TGGCGATACCTCAGCAACC
		<i>Rückwärts</i> CTCGTGGATCCACTTCCAG
humaner von Willebrand Factor (vWF)	NM_000552	<i>Vorwärts</i> GTGACGTGTAATGGGAGACT
		<i>Rückwärts</i> GTCATTGGCTCCGTTCTCAT
Humanes Beta Defensin-1 (hBD-1, DEFB1)	NM_005218.3	<i>Vorwärts</i> TTGTCTGAGATGGCCTCAGGTGGTAAC
		<i>Rückwärts</i> ATACTTCAAAGCAATTTTCCTTTAT
Humanes Beta Defensin-2 (hBD-2, DEFB4A)	NM_004942.2	<i>Vorwärts</i> CCAGCCATCAGCCATGAGGGT
		<i>Rückwärts</i> GGAGCCCTTTCTGAATCCGCA
Humanes Beta Defensin-3 (hBD-3, DEFB103A)	NM_018661.3	<i>Vorwärts</i> CTGTTTTTGGTGCTGTTCC
		<i>Rückwärts</i> CTTTCTTCGGCAGCATTTTC
Psoriasis (S100A7)	NM_002963.3	<i>Vorwärts</i> TGCTGACGATGATGAAGGAG
		<i>Rückwärts</i> ATGTCTCCAGCAAGGACAG
GAPDH	NG_007073.2	<i>Vorwärts</i> GAGTCAACGGATTTGGTCGT
		<i>Rückwärts</i> TTGATTTTGGAGGGATCTCG

242g 2M Tris-hydroxymethyl-aminomethan (TRIS; *Sigma-Aldrich, München, Deutschland*) wurden mit 57,1 ml Essigsäure (*Merck, Darmstadt, Deutschland*), 100 ml 0,5M EDTA pH 8,0 und 100 ml H<sub>2</sub>O zu einem 50x TAE-Puffer gemischt. 1ml 50x TAE-Puffer wurden anschließend mit 49 ml H<sub>2</sub>O gemischt. In dieser Lösung wurde 0,5 g Agarose (*Eurobio, Les Ulis, Frankreich*) durch Erhitzen in der Mikrowelle (*LG Electronics, Ratingen, Deutschland*) gelöst und 5 µl Gelstar (*Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland*) hinzugefügt. Das Gel wurde anschließend blasenfrei in die entsprechende Schale des Sub-Cell<sup>®</sup> GT Agarose Gel Electrophoresis System (*Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland*) gegossen und zur Aushärtung gebracht. Das vollständig ausgehärtete Gel wurde mit 1x TAE Puffer bedeckt. Es wurde ein Gelladepuffer hergestellt: 0,25% Bromphenolblau (*AppliChem, Darmstadt, Deutschland*), 0,25% Xylenblau (*Merck, Darmstadt, Deutschland*) und 30% Glycerin Rotipuran<sup>®</sup> (*Roth, Karlsruhe, Deutschland*). Anschließend wurden 10 µl der Probe mit 2 µl des wie oben beschrieben zuvor hergestellten Gelladepuffers gemischt. Als DNA-Marker wurden 5 µl 1kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*) verwendet. Proben und Marker wurden nun in die entsprechenden Slots auf das Gel geladen. Die Gelelektrophorese wurde bei 110V für 60 Min. durchgeführt.

#### 2.2.6.3 RNA-Isolierung

Die in Allprotect<sup>®</sup> (Allprotect Tissue Reagent; *Qiagen, Venlo, Niederlande*) bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden zunächst aufgetaut und zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Zur Isolation der RNA wurde das RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit (*Qiagen, Hilden, Deutschland*) gemäß Herstellerangaben verwendet. Von jeder Probe wurden 10 mg abgewogen und zur weiteren Verwendung zunächst mit einem sterilen Skalpell (*Feather Safety Razer, Osaka, Japan*) manuell zerkleinert. Anschließend erfolgte die weitere Zerkleinerung mittel Mörsers und Pistill mit Hilfe von flüssigem Stickstoff (*Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland*) bis zur pulverigen Konsistenz

der Probe. Der Probe wurde nun 300 µl RLT-Puffer aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit zugesetzt. Vor dem ersten Gebrauch wurden zu je 1ml des RLT-Puffers 10µl 2-Mercaptoethanol (*Roth, Karlsruhe, Deutschland*) hinzugegeben. Abschließend erfolgte die Probenhomogenisierung in einem Rotor Stator System Miccra D-9 (*ART Prozess- und Labortechnik, Mülheim, Deutschland*). Zwischen den einzelnen Homogenisationsschritten wurden die Proben immer wieder auf Eis gelagert, um eine zu starke Überhitzung und Denaturierung zu vermeiden. Dem Homogenisat wurden 590 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl Proteinkinase K (*Dako, Hamburg, Deutschland*) hinzugefügt und vorsichtig durchmischt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Wärmeblock ThermoStat plus bei 55°C für 10 Min. und dann die Zentrifugation für 3 Min. bei 12,5 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit dem 0,5-fachen Volumen mit Ethanol (EtOH; *Merck, Darmstadt, Deutschland*) vermischt. Hiervon wurden nun wiederum 700 µl in ein 2ml collection Tube (aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect Mini Kit) auf die RNeasy<sup>®</sup> mini spin column (aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect mini Kit) überführt und für 15 Sek. bei 10 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, der restliche Teil der Probe ebenfalls zentrifugiert und das Eluat wiederum verworfen. Nun wurden 350 µl RW1 Puffer aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect mini Kit auf die aus dem RNeasy<sup>®</sup> mini spin collum pipettiert und anschließend für 15 Sek. bei 10 rpm zentrifugiert. Das entstandene Eluat wurde ebenfalls verworfen. Nach Mischen von 10 µl DNase-I Lösung (*Sigma-Aldrich, München, Deutschland*) mit 70 µl RDD Puffer aus dem RNase-free DNase Kit (*Dako, Hamburg, Deutschland*) erfolgte das Mischen durch leichtes Schwenken des Eppendorf Tubes. Die Lösung wurde auf die RNeasy<sup>®</sup> Silica-Gel Membran pipettiert und bei 25°C für 15 Min. inkubiert. Anschließend wurden 350 µl RW-1 Puffer hinzugegeben und bei 10 rpm für 15 Sek. zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Membran in ein neues Eppendorf Tube überführt. Anschließend wurden erneut 500 µl RPE-Puffer aus dem RNeasy<sup>®</sup> Protect mini Kit, nach Auffüllen mit 100% EtOh gemäß Herstellerangaben vor der ersten Verwendung, hinzupipettiert, das Tube bei 10 rpm für 15 Sek. zentrifugiert und

das Eluat verworfen. Nun wurden erneut 500 µl RPE-Puffer hinzugegeben, 15 Sek. bei 10 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Das Tube wurde nun bei 14,5 rpm für 120 Sek. zentrifugiert und anschließend die Membran in ein neues Eppendorf Tube überführt. 30 µl RNase freies Wasser (aus dem RNeasy® Protect mini Kit) wurden auf die Membran pipettiert und für 60 Sek. bei 14,5 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde anschließend wiederum auf die Membran pipettiert und der Vorgang wiederholt. Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgte nun mit Hilfe der Photometrie (260 nm). Hierzu wurden 49 µl RNase freies Wasser mit 1 µl RNA vermischt. Die RNA wurden nun in entsprechend gekennzeichneten Tubes bei -20°C gelagert.

#### 2.2.6.4 Reverse Transkription

Mit Hilfe des SuperScript™ First Strand System für RT-PCR (*Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*) kann die gewonnene RNA nun in cDNA (complementary deoxyribunucleic acid) umgeschrieben werden. Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration der gewonnen RNA kann nun die benötigte Menge für 1 µg RNA errechnet werden. Die RNA/Primer Lösung wurde nach Herstellerangaben vermischt (Tabelle 2.4).

**Tabelle 2.4 RNA/Primer Mischungsverhältnisse**

Komponente	Probe	No RT Kontrolle	RNA Kontrolle
RNA (1µg)	X µl	X µl	-
Control RNA	-	-	1 µl
10mM dNTP Mix	1 µl	1 µl	1 µl
Random Hexamers	1 µl	1-5 µl	1-5 µl
DEPC-treated water	Auffüllen bis 10 µl	Auffüllen bis 10 µl	Auffüllen bis 10 µl

1 µg RNA jeder Probe wurde mit 1 µl 10mM Deoxyribonucleotide triphosphat (dNTP-Mix) und den Primern „1 µl random Hexamers“ [50 ng/µl] gemischt und mit Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser (DEPC-treated water; alle Komponenten aus dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR) auf 10 µl aufgefüllt. Die Proben wurden anschließend bei 65°C für 5 Min.

inkubiert und 60 Min. auf Eis gekühlt. Für jeden Ansatz wurden nun 2 µl 10xRT Puffer, 4 µl 25 mM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), 2 µl 0,1M 1,4-Dithiothreitol (DTT) und 1 µl RNaseOUT™ (alle aus dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR) zu einer Reaktionsmischung pipettiert. Dies wurde dem RNA/Primer-Gemisch hinzugefügt und für 120 Sek. bei 25°C inkubiert. Dann wurde jedem Reaktionsgefäß 1 µl SuperScript II RT (aus dem SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR) beigemischt und zuerst 10 Min. bei 25°C inkubiert, danach 50 Min. bei 42°C und weitere 15 Min. bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis heruntergekühlt und bei -20°C gelagert.

#### 2.2.6.5 qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde mit einem LightCycler® 1.0 Real-time Detection System (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Für das Targetgen sowie das HKG wurde jeweils ein Reaction-Mix mit den entsprechenden Primern hergestellt. Hierzu wurden 2 µl LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Deutschland), jeweils 1 µl Forward und Reverse Primer (0,5mM), sowie 1,6 µl MgCl<sub>2</sub> und 12,4 µl RNase freies Wasser zu einem Gesamtvolumen von 18 µl vermischt. In jede Glaskapillare wurden 18 µl des Reaction-Mixes sowie 2 µl der asservierten cDNA pipettiert.

**Tabelle 2.5 Algorithmus der qRT-PCR**

Schritt	Vorgang	Zeit (Sek.)	Temperatur (°C)	Temperatur Wiederholung (°C/Sek.)	Zyklen (n)
1	Enzymaktivierung	600	95	20	1
2	Denaturierung	15	94	20	40
	Annealing	10	60	20	
	Amplifikation	10	72	20	
3	Schmelzkurvenanalyse	15	65	20	1
4	Abkühlungsphase	30	40	20	1

Für die Negativkontrollen wurden anstelle der cDNA 2 µl H<sub>2</sub>O in die Glaskapillaren pipettiert und diese sicher mit den entsprechenden Stopfen verschlossen. Anschließend wurden die Kapillaren kurz anzentrifugiert und in

das Karussell des LightCyclers fixiert und die qRT-PCR gemäß dem in Tabelle 2.5 dargestellten Algorithmus gestartet. Nach der Amplifikation wurden Schmelzkurven (95°C für 0 Sek. bei einer ramp speed von 20°C/s, 65°C für 15 Sek. bei einer ramp speed von 20°C/s, 95°C für 0 Sek. bei einer ramp speed von 0,1°C/s, gefolgt von einer Abkühlungsphase bei 40°C für 30 Sek. bei einer ramp speed von 20°C/s) aufgezeichnet, um die Homogenität der cDNA Fragmente zu kontrollieren. Die Fluoreszenz wurde am Ende jeder Annealing Phase gemessen und die gemessenen Zykluswerte mit einer Referenzkurve verglichen. Das HKG GAPDH wurde bei jeder Probe zur Normierung mitbestimmt. Darüberhinaus wurden jeweils zwei cDNA-Standards einer zuvor hergestellten Verdünnungsreihe ebenfalls mitbestimmt. Die relative Quantifizierung erfolgte somit mit Hilfe der Standardkurven. Eine Negativkontrolle zur Detektion möglicher Verunreinigungen wurde als weitere Probe mitbestimmt. Es wurde eine Dreifachbestimmung der Proben durchgeführt.

### 2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS (IBM SPSS Version 22.0; IBM, Armonk, USA). Für die deskriptive Statistik wurden Maxima, Minima, Median, Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) berechnet. Tests zur statistischen Signifikanz wurden durchgeführt und sind entsprechend ausgewiesen. Alle  $p$ -Werte sind zweizeitig. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=0,05$  festgelegt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientendaten

Die Ergebnisse der klinischen Daten sind in Tabellen 3.1 sowie 3.2 zusammengefasst und nach dem Auftreten von postoperativen Wundheilungsstörungen und einer präoperativen Strahlentherapie unterteilt. Hinsichtlich der Parameter Alter, Geschlecht, Nikotin- oder Alkoholabusus, Strahlentherapie oder Wundheilungsstörung zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Eine multivariate Analyse ist in Tabelle 3.3 gezeigt, wobei potentielle Risikofaktoren für die Entwicklung postoperativer Wundheilungsstörungen untersucht werden. Hierbei stellt die Bestrahlung einen signifikanten Risikofaktor mit einer Erhöhung des relativen Risikos auf das etwa 3-fache dar ( $p=0.035$ ).

**Tabelle 3.1 Vergleich klinischer Daten zwischen Patienten mit und ohne präoperativer Strahlentherapie [Rohleder, 2015, Rohleder et al., 2014]**

	Alle Patienten n (%)	Keine Bestrahlung n (%)	Bestrahlung n (%)
<b>Anzahl</b>	91 (100)	67 (73,6)	24 (26,4)
<b>Alter in Jahren<sup>a</sup></b>			
Mittelwert	59,9	60,6	57,8
Median	60	61	58,5
Spanne <sup>a</sup>	20-86	20-86	29-86
<b>Geschlecht<sup>b</sup></b>			
Männlich	61 (67,0)	46 (75,4)	15 (24,6)
Weiblich	30 (33,0)	21 (70,0)	9 (30,0)
<b>Alkoholabusus<sup>b</sup></b>	41 (45,1)	32 (78,0)	9 (22,0)
<b>Nikotinabusus<sup>b</sup></b>	54 (59,3)	40 (74,1)	14 (25,9)
<b>Postoperative Wundheilungsstörung<sup>b</sup></b>	25 (27,5)	15 (60,0)	10 (40,0)

<sup>a</sup> Mann-Whitney *U* Test; <sup>b</sup> Fischer Exact Test

**Tabelle 3.2 Vergleich klinischer Daten zwischen Patienten mit und ohne postoperativen zervikalen Wundheilungsstörungen [Rohleder, 2015, Rohleder et al., 2014].**

	Alle Patienten n (%)	keine Wundheilungsstörung n (%)	Wundheilungsstörung n (%)
<b>Anzahl</b>	91 (100)	67 (72,5)	25 (27,5)
<b>Alter in Jahren<sup>a</sup></b>			
Mittelwert	59,9	59,4	60,9
Median	60	60	60
Spanne	20-86	20-86	43-86
<b>Geschlecht<sup>b</sup></b>			
Männlich	61 (67,0)	41 (67,2)	20 (32,8)
Weiblich	30 (33,0)	25 (83,3)	5 (16,7)
<b>Alkoholabusus<sup>b</sup></b>	41 (45,1)	27 (65,9)	14 (34,1)
<b>Nikotinabusus<sup>b</sup></b>	54 (59,3)	36 (66,7)	18 (33,3)
<b>Strahlentherapie<sup>b</sup></b>	24 (26,4)	14 (58,3)	10 (41,7)

<sup>a</sup> Mann-Whitney *U* Test; <sup>b</sup> Fischer Exact Test

**Tabelle 3.3 Multivariate Analyse von Faktoren im Bezug auf die Entwicklung einer postoperativen zervikalen Wundheilungsstörung (WHS).**

Faktor	Patienten n (%)	WHS n (%)	Odds Ratio (95% KI)	<i>p</i> -Wert
Alter (Jahre)				
≥ 70	21 (26,9)	7 (33,3)	1,536	0,445
< 70	57 (73,1)	14 (66,7)	(0,517-4,565)	
Nikotin				
Ja	36 (46,2)	11 (52,4)	1,408	0,509
Nein	42 (53,8)	10 (47,6)	(0,516-3,841)	
Alkohol				
Ja	49 (62,8)	15 (71,4)	1,691	0,346
Nein	29 (37,2)	6 (28,6)	(0,572-5,003)	
Strahlentherapie				
Ja	20 (25,6)	9 (45,0)	3,136	0,035 *
Nein	58 (74,4)	11 (55,0)	(1,059-9,292)	

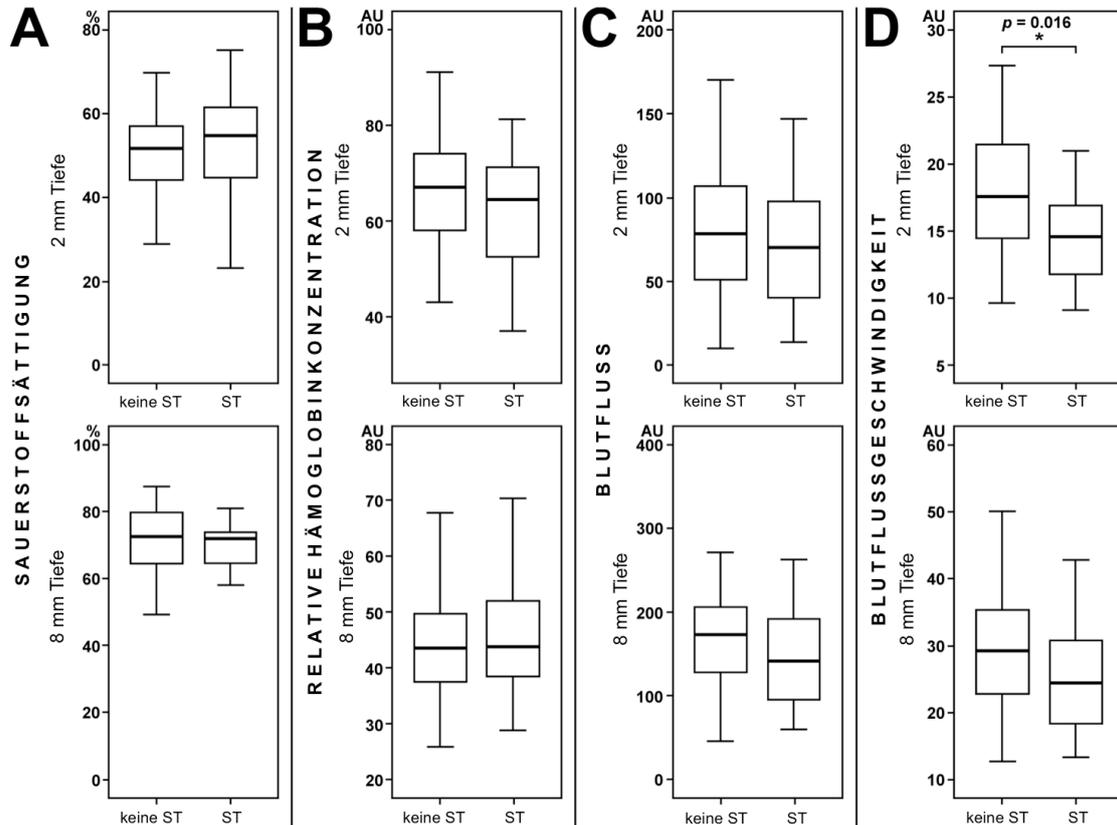
WHS: Wundheilungsstörung; KI: Konfidenz-Intervall

Zahlen in Klammer sind Prozentangaben, außer anders gekennzeichnet

\* statistisch signifikant bei  $\alpha=0,05$

### 3.2 O<sub>2</sub>C-Messungen

Die Ergebnisse der präoperativen O<sub>2</sub>C-Messungen sind in Abbildungen 3.1 und 3.2 sowie in den Tabellen 3.4 und 3.5 veranschaulicht.



**Abbildung 3.1** Box-plot Diagramm der Ergebnisse der O<sub>2</sub>C-Messungen, zur Veranschaulichung des Vergleichs unterschiedlicher Parameter gemessen mittels simultaner Gewebespektrometrie sowie Laser-Doppler Spektroskopie in zervikaler Haut in Patienten mit und ohne Strahlentherapie (ST) in der Anamnese. Säulen stellen die Parameter Sauerstoffsättigung in Prozent (A), relative Hämoglobinkonzentration in Arbitrary Units (AU) (B), Blutfluss in AU (C) und Blutflussgeschwindigkeit in AU (D) dar. Die obere Reihe zeigt die Messergebnisse in einer Eindringtiefe von 2 mm, in der unteren Reihe sind die Messergebnisse in einer Messtiefe von 8 mm dargestellt. Die Linie innerhalb der Box stellt den Median, die obere Abgrenzung die 75%-Perzentile, die untere Abgrenzung die 25%-Perzentile dar. Der Messbereich ist als vertikale Linie dargestellt, Extremwerte sind nicht berücksichtigt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich im Bezug auf die Blutflussgeschwindigkeit in 2 mm Eindringtiefe: 17,57 AU bei Patienten ohne ST vs. 14,77 AU bei Patienten mit einer präoperativen ST in der Anamnese ( $p=0,016$ ). Alle anderen untersuchten Parameter zeigten im Bezug auf eine

stattgehabte Strahlentherapie keine statistisch signifikanten Unterschiede [Rohleder, 2015, Rohleder et al., 2014].

Tabelle 3.4 Vergleich unterschiedlicher Parameter gemessen mittels simultaner Gewebespektrometrie sowie Laser-Doppler Spektroskopie in zervikaler Haut in Patienten mit und ohne Strahlentherapie (ST) in der Anamnese.

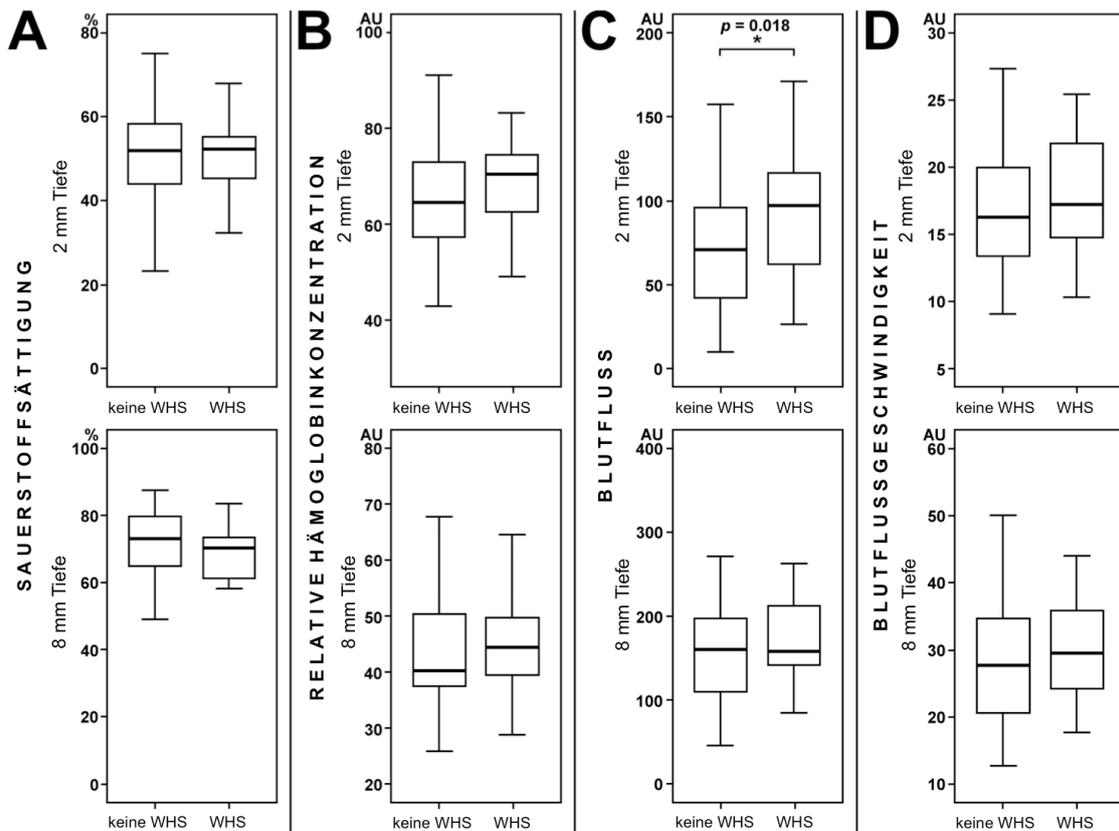
Parameter	keine ST (Median; Bereich)	ST (Median; Bereich)	<i>p</i>
<b>Sauerstoffsättigung (%)</b>			
2mm Messtiefe	51,7; 28,95-69,81	54,92; 8,51-75,14	0,307
8mm Messtiefe	72,49; 19,41-87,53	72,48; 9,76-564,94	0,488
<b>Relative Hämoglobinkonzentration (AU)</b>			
2mm Messtiefe	67,08; 43,01-91,05	64,46; 37,01-81,26	0,234
8mm Messtiefe	43,49; 25,80-67,71	43,77; 28,77-70,31	0,505
<b>Blutfluss (AU)</b>			
2mm Messtiefe	78,33; 9,79-170,34	71,49; 13,59-446,58	0,608
8mm Messtiefe	173,36; 45,92-365,19	141,51; 59,65-262,95	0,062
<b>Blutflussgeschwindigkeit (AU)</b>			
2mm Messtiefe	17,57; 9,63-27,35	14,77; 9,09-50,17	0,016*
8mm Messtiefe	29,23; 12,70-50,02	24,85; 13,35-76,14	0,156

ST: Strahlentherapie; AU: Arbitrary Units

Tabelle 3.5 Vergleich unterschiedlicher Parameter gemessen mittels simultaner Gewebespektrometrie sowie Laser-Doppler Spektroskopie in zervikaler Haut in Patienten mit und ohne postoperativen Wundheilungsstörungen (WHS).

Parameter	keine WHS (Median; Bereich)	WHS (Median; Bereich)	<i>p</i>
<b>Sauerstoffsättigung (%)</b>			
2mm Messtiefe	51,89; 8,51-75,14	52,21; 23,32-68,06	0,588
8mm Messtiefe	73,08; 33,37-87,53	70,54; 9,76-564,94	0,126
<b>Relative Hämoglobinkonzentration (AU)</b>			
2mm Messtiefe	64,64; 43,01-91,05	70,52; 37,01-83,28	0,174
8mm Messtiefe	40,34; 25,80-67,71	44,54; 28,77-70,31	0,284
<b>Blutfluss (AU)</b>			
2mm Messtiefe	70,41; 9,79-196,59	97,62; 26,29-446,58	0,018*
8mm Messtiefe	161,19; 45,92-365,19	157,74; 84,99-262,95	0,255
<b>Blutflussgeschwindigkeit (AU)</b>			
2mm Messtiefe	16,28; 9,09-27,35	17,35; 10,37-50,17	0,139
8mm Messtiefe	27,71; 12,70-50,02	31,41; 17,73-76,14	0,197

WHS: Wundheilungsstörung; AU: Arbitrary Units



**Abbildung 3.2** Box-plot Diagramm zur Veranschaulichung der Ergebnisse des Vergleichs unterschiedlicher Parameter gemessen mittels simultaner Gewebespektrometrie sowie Laser-Doppler Spektroskopie in zervikaler Haut in Patienten mit und ohne postoperativen zervikalen Wundheilungsstörungen (WHS). Säulen stellen die Parameter Sauerstoffsättigung in Prozent (A), relative Hämoglobinkonzentration in Arbitrary Units (AU) (B), Blutfluss in AU (C) und Blutflussgeschwindigkeit in AU (D) dar. Die obere Reihe zeigt die Messergebnisse in einer Eindringtiefe von 2 mm, in der unteren Reihe sind die Messergebnisse in einer Messtiefe von 8 mm dargestellt. Die Linie innerhalb der Box stellt den Median, die obere Abgrenzung die 75%-Perzentile, die untere Abgrenzung die 25%-Perzentile dar. Der Messbereich ist als vertikale Linie dargestellt, Extremwerte sind nicht berücksichtigt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich im Bezug auf den Blutfluss in 2mm Eindringtiefe: Median von 70,41 AU bei Patienten ohne WHS vs. 97,62 AU bei Patienten mit einer postoperativen WHS ( $p=0,018$ ). Alle anderen untersuchten Parameter zeigten im Bezug auf eine postoperative WHS keine statistisch signifikanten Unterschiede [Rohleder, 2015, Rohleder et al., 2014].

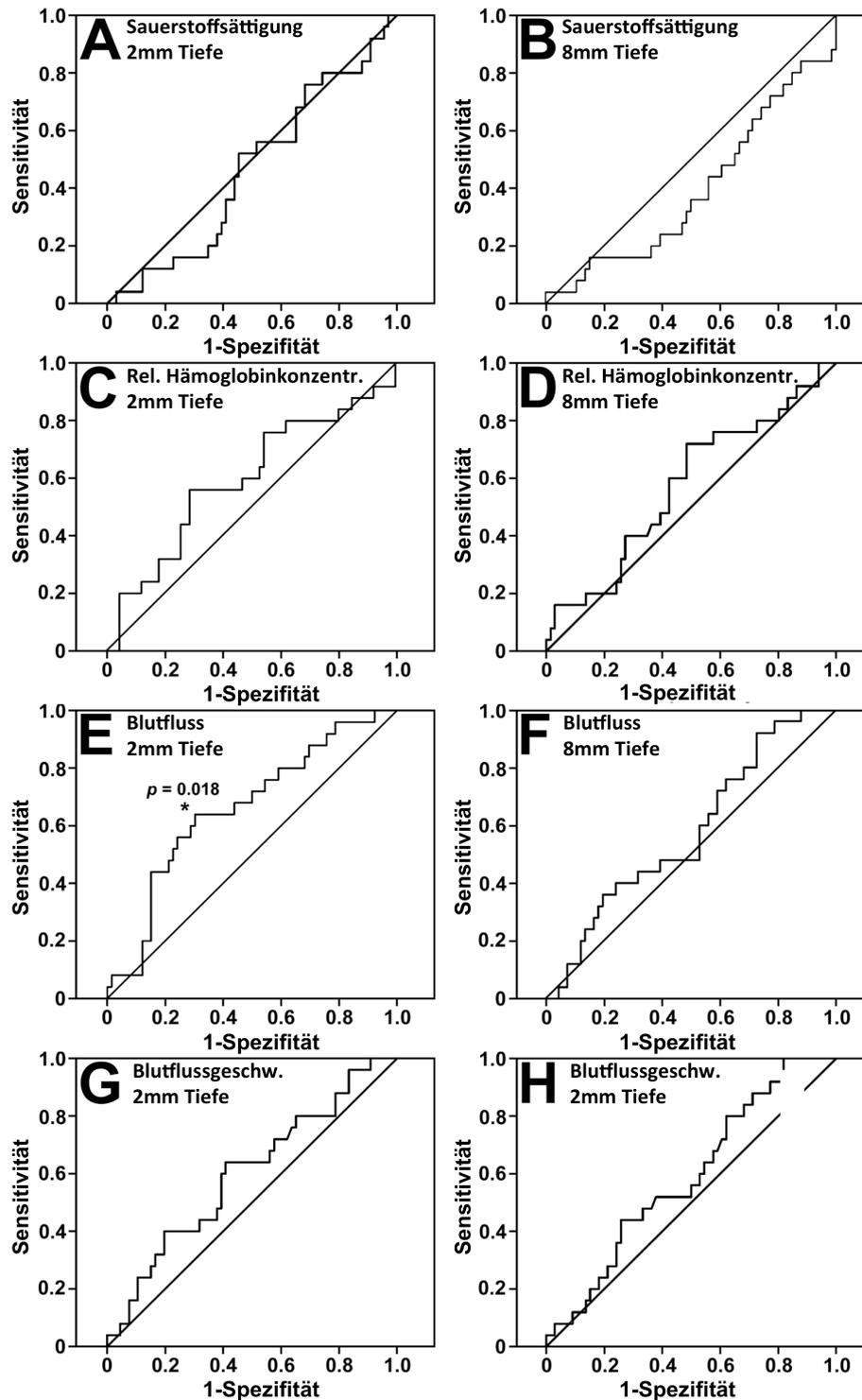


Abbildung 3.3 A bis H, Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurven Analyse von Parametern hinsichtlich des prädiktiven Wertes im Bezug auf die Entwicklung einer Wundheilungsstörung (WHS). ROC-Kurven stellen die Sensitivität (richtig-positive der positiven) dem Wert der 1-Sensibilität (falsch-positiven der positiven) zu

unterschiedlichen definierten Punkten gegenüber. Darüberhinaus wurden die Flächen unter der Kurve im Hinblick auf die Qualität eines untersuchten Parameters berechnet. Der Parameter „Blutfuss in 2 mm Tiefe“ wurde demnach als prädiktiver Parameter für das Entstehen von postoperativen WHS identifiziert ( $p=0,018$ ) [Rohleder, 2015, Rohleder et al., 2014].

Tabelle 3.6 Ergebnisse der Receiver Operating Characteristic (ROC) Kurven Analyse von Parametern hinsichtlich des prädiktiven Wertes im Bezug auf die Entwicklung einer Wundheilungsstörung (WHS) ermittelt durch Gewebespektrometrie und Laser-Doppler-Flowmetrie [Rohleder, 2015, Rohleder et al., 2014].

Parameter	Fläche unter der Kurve	Mean error	Konfidenzintervall niedrig	Konfidenzintervall hoch	<i>p</i>
Sauerstoffsättigung					
2mm Messtiefe	0,463	0,066	0,334	0,592	0,588
8mm Messtiefe	0,396	0,067	0,264	0,527	0,126
Rel. Hämoglobinkonzentration					
2mm Messtiefe	0,593	0,070	0,455	0,730	0,174
8mm Messtiefe	0,573	0,068	0,440	0,706	0,284
Blutfluss					
2mm Messtiefe	0,661	0,063	0,536	0,785	0,018*
8mm Messtiefe	0,578	0,065	0,450	0,705	0,255
Blutflussgeschwindigkeit					
2mm Messtiefe	0,601	0,067	0,470	0,731	0,139
8mm Messtiefe	0,588	0,064	0,463	0,713	0,197

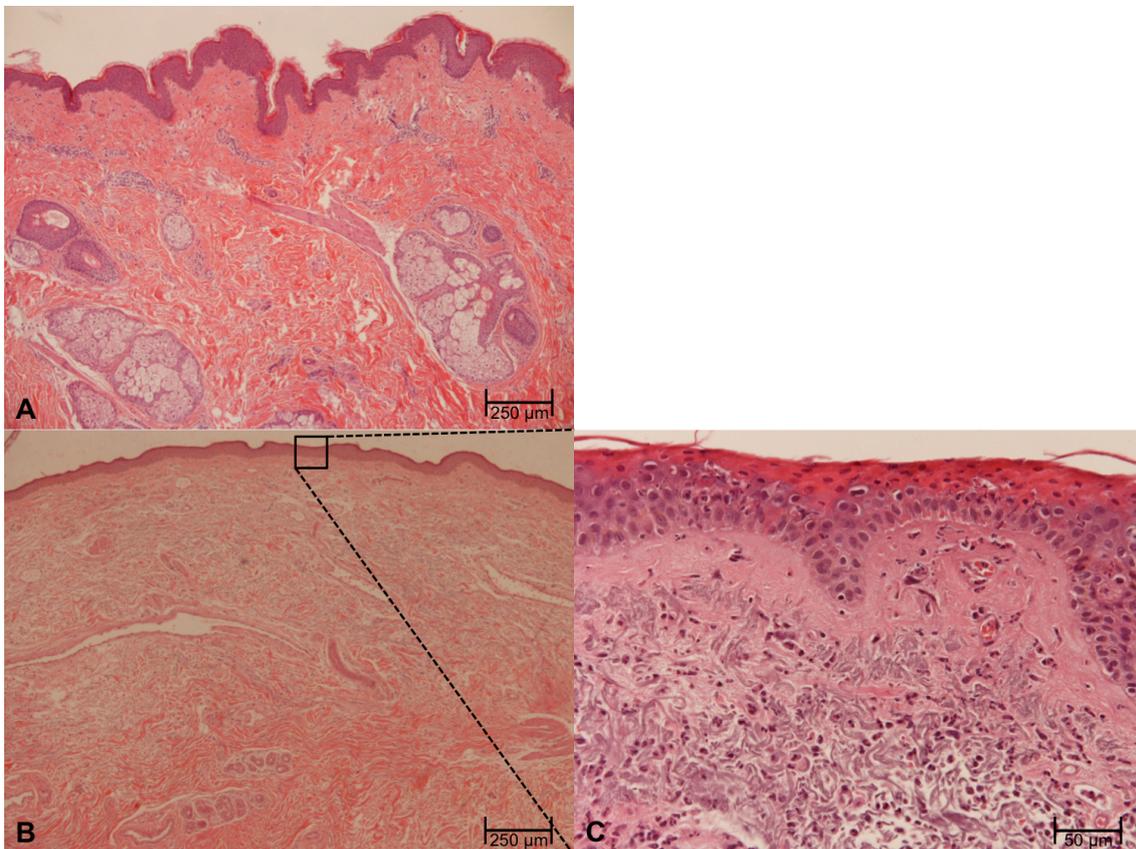
### 3.3 Histologie

Die histologischen Färbungen wurden zum einen qualitativ auf die Unterschiede zwischen bestrahltem und nicht-bestrahltem Gewebe hin untersucht. Zum anderen wurde die Dicke der Epidermis an insgesamt zehn Gesichtsfeldern (high power fields, HPF) gemessen und zwischen den beiden Studiengruppen verglichen (3.3.1.1).

#### 3.3.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Abbildung 3.4 zeigt die HE-Färbung in bestrahltem Gewebe (Abb. 3.4 A),

unbestrahltem Gewebe (Abb. 3.4 B) sowie eine Ausschnittsvergrößerung der Epidermis (Abb. 3.4 C)



**Abbildung 3.4. HE-Färbung. In nicht vorbestrahltem Gewebe (A) zeigten sich im Bereich der Epidermis Talgdrüsen, ekkrine Schweißdrüsen, Haare sowie kollagene und elastische Fasern. In präoperativ bestrahltem Gewebe (B, C) fand sich eine Atrophie der Epidermis mit einer teilweisen Ratifizierung von Schweiß- und Talgdrüsen. Keine intakten Haarfollikel waren erkennbar. In einer Ausschnittsvergrößerung des vorbestrahlten Präparates (C) zeigte sich eine Hypereosinophilie in den oberen Schichten der Epidermis sowie Entzündungszellen im Bereich der Dermis. In diesem Bildausschnitt nicht dargestellt war die Hyperpigmentierung der Epidermis und zahlreiche Melanophagen in der Dermis.**

### 3.3.1.1 Dicke der Epidermis

In der Messung der Dicke der Epidermis zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ( $98,6 \pm 20,3 \mu\text{m}$  vs.  $63,8 \pm 12,8 \mu\text{m}$ ;  $p=0,000$ ; Abb. 3.5)

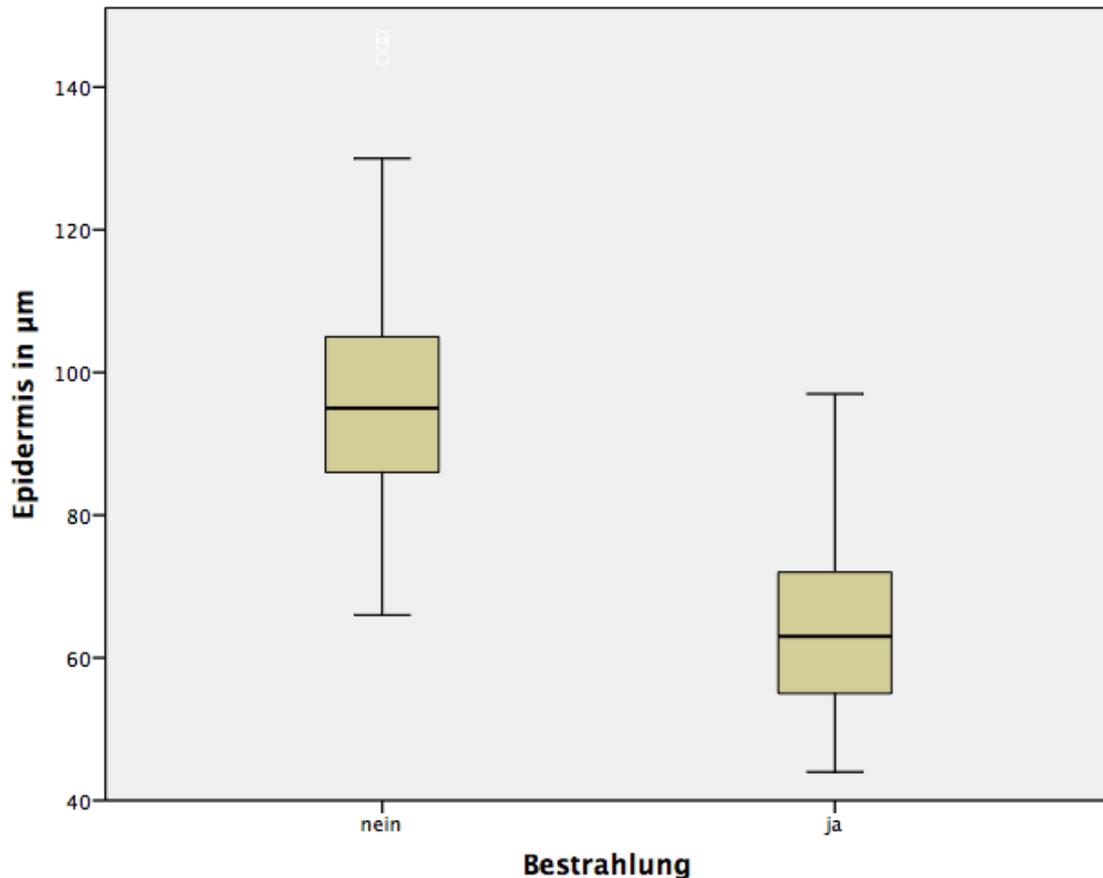


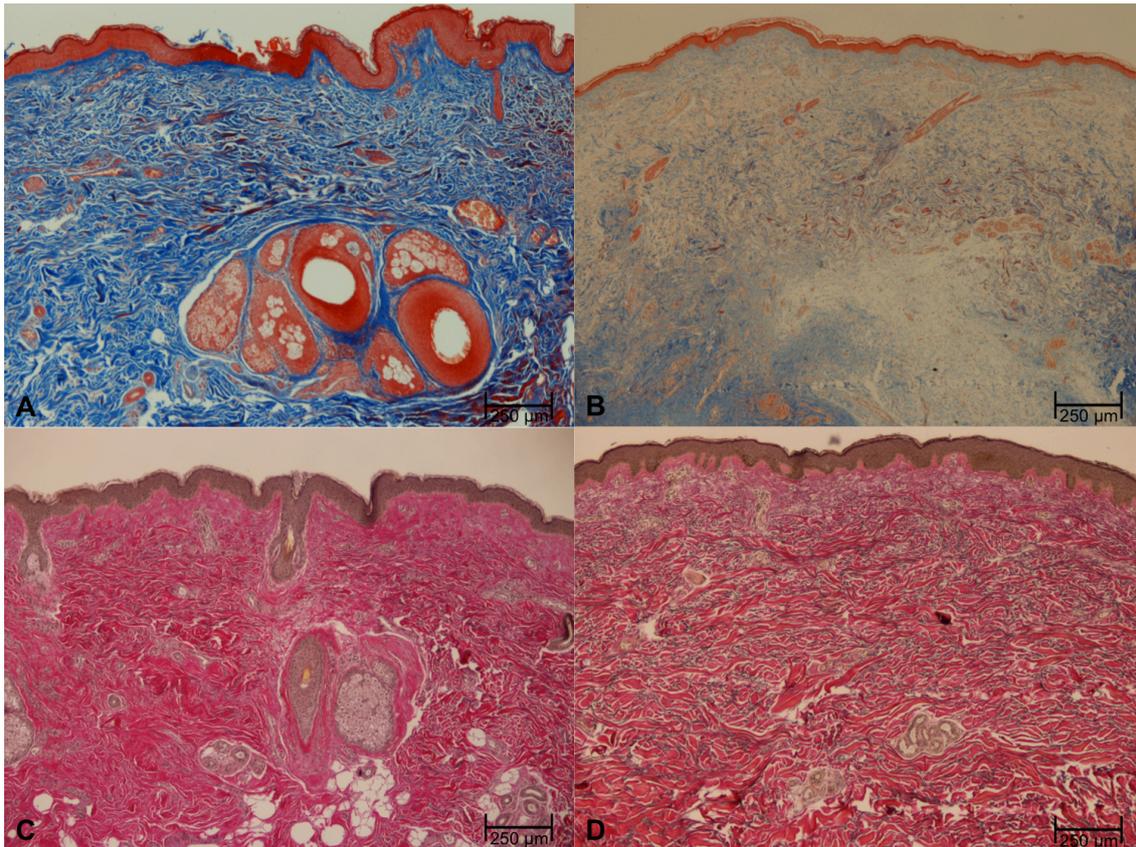
Abbildung 3.5 Box-plot Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Dicke der Epidermis in bestrahltem und nicht-bestrahltem Gewebe gemessen in zehn unterschiedlichen Gesichtsfeldern (high power fields, HPF). Die Linie innerhalb der Box stellt den Median, die obere Abgrenzung die 75%-Perzentile, die untere Abgrenzung die 25%-Perzentile dar. Der Messbereich ist als vertikale Linie dargestellt, Extremwerte sind nicht berücksichtigt. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch signifikant ( $98,6 \pm 20,3 \mu\text{m}$  vs.  $63,8 \pm 12,8 \mu\text{m}$ ;  $p=0,000$ ).

### 3.3.2 Masson Trichrome Färbung

Abbildung 3.6 A und 3.6 B zeigen bestrahlte und nicht bestrahlte Gewebepräparate nach Färbung mit Masson Trichrome zur Darstellung von kollagenen Fasern.

### 3.3.3 Van Gieson Elastica Färbung

Abbildung 3.6 C und 3.6 D zeigen bestrahlte und nicht bestrahlte Gewebepräparate nach Färbung mit van Gieson Elastica zur Darstellung von kollagenen und bindegewebigen Fasern.



**Abbildung 3.6 Histologische Färbungen mit Masson Trichrome in nicht-bestrahltem (A) und bestrahltem Gewebe (B). Kollagene Fasern sind hier in Kutis und Subkutis blau dargestellt. In dem präoperativ bestrahlten Gewebe zeigten sich Spalten zwischen den kollagenen Fasersträngen im Sinne einer Ödembildung. Die van Gieson Elastica Färbung im nicht-bestrahltem (C) und bestrahltem Gewebe (D) zeigte bei stattgehabter Strahlentherapie histologisch eine Vermehrung des Bindegewebes sowie eine Zunahme der kollagenen und elastischen Fasern.**

### 3.4 Immunhistochemie

#### 3.4.1 humanes- $\beta$ -Defensin-1 (hBD-1)

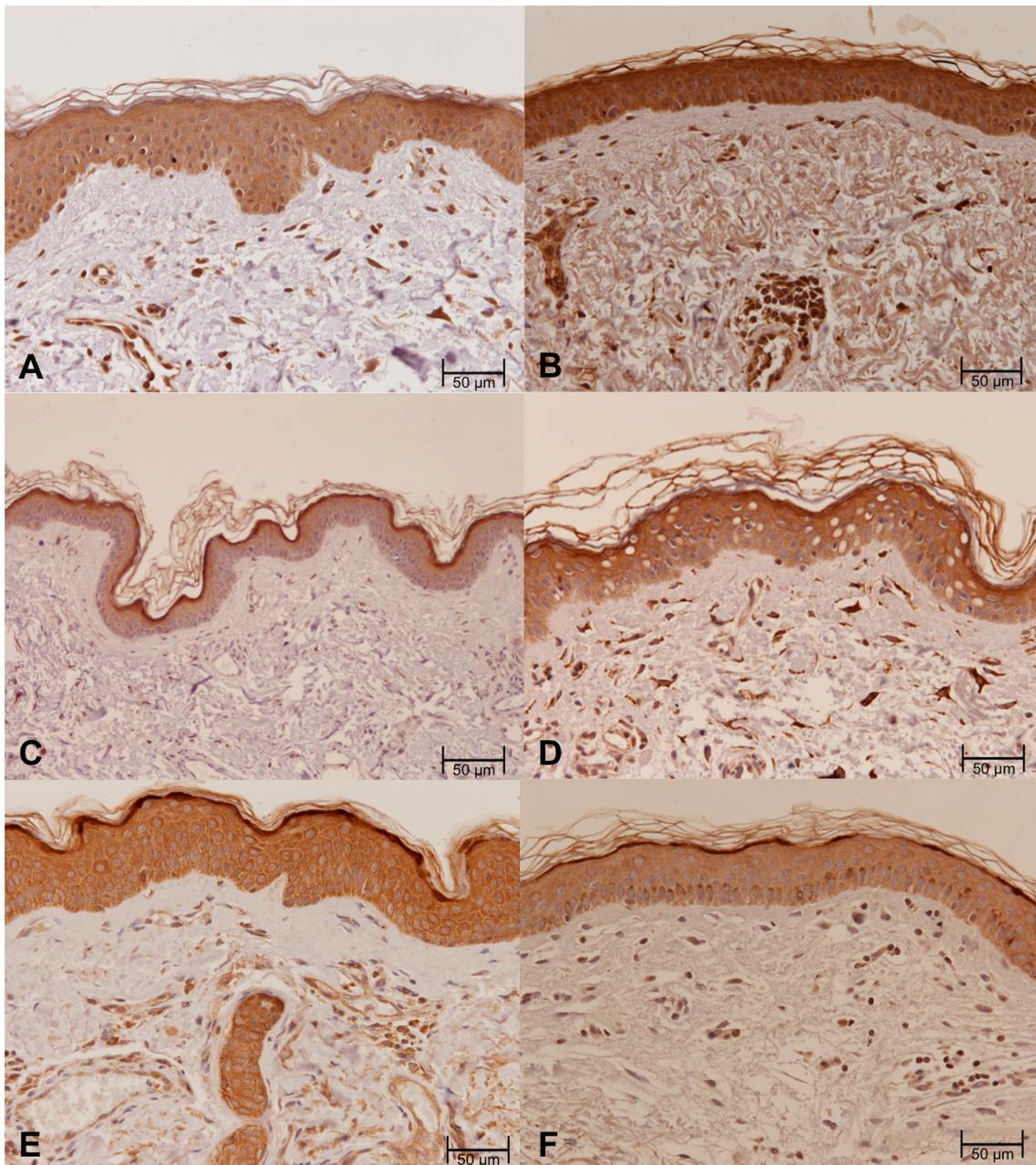
In den immunhistochemischen Färbungen gegen hBD-1 zeigte sich eine mittelstarke bis starke Färbung im *stratum basale* und im *stratum spinosum*. Im *stratum granulosum* und im *stratum corneum* zeigte sich eine starke Färbung. Dies war in beiden Studiengruppen erkennbar (Abbildung 3.7 A+B).

#### 3.4.2 humanes- $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2)

Färbungen gegen hBD-2 zeigten sich insgesamt uneinheitlich. Das *stratum granulosum* und das *stratum corneum* waren sowohl bei bestrahltem wie auch bei unbestrahltem Gewebe stark gefärbt. *Stratum basale* und *stratum spinosum* exprimierten wenig, mittelstark sowie in einigen Präparaten stark hBD-2. Hier zeigte sich die Tendenz zu einer stärkeren Anfärbung in vorbestrahltem Gewebe (Abbildung 3.7 C+D).

#### 3.4.3 humanes- $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3)

Die immunhistochemischen Färbungen gegen hBD-3 zeigten sich insgesamt ebenfalls uneinheitlich ohne einer deutlichen Mehrexpression in einer der untersuchten Schichten in den Studiengruppen im Hinblick auf eine präoperativ stattgefundenene Strahlentherapie (Abbildung 3.7 E+F).



**Abbildung 3.7** Immunhistochemische Färbungen gegen humanes- $\beta$ -Defensin-1 (hBD-1) in nicht-bestrahlter (A) und bestrahlter Haut (B); humanes- $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) in nicht-bestrahlter (C) und bestrahlter Haut (D); humanes- $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3) in nicht-bestrahlter (E) und bestrahlter Haut (F)

### 3.4.4 Psoriasisin

Die Färbungen gegen Psoriasisin zeigten eine Variabilität ohne deutliche Unterschiede zwischen bestrahltem und nicht-bestrahltem Gewebe. Abbildung 3.9 zeigt die unterschiedlichen Expressionen in verschiedenen Gewebeproben bei Färbungen gegen Psoriasisin.

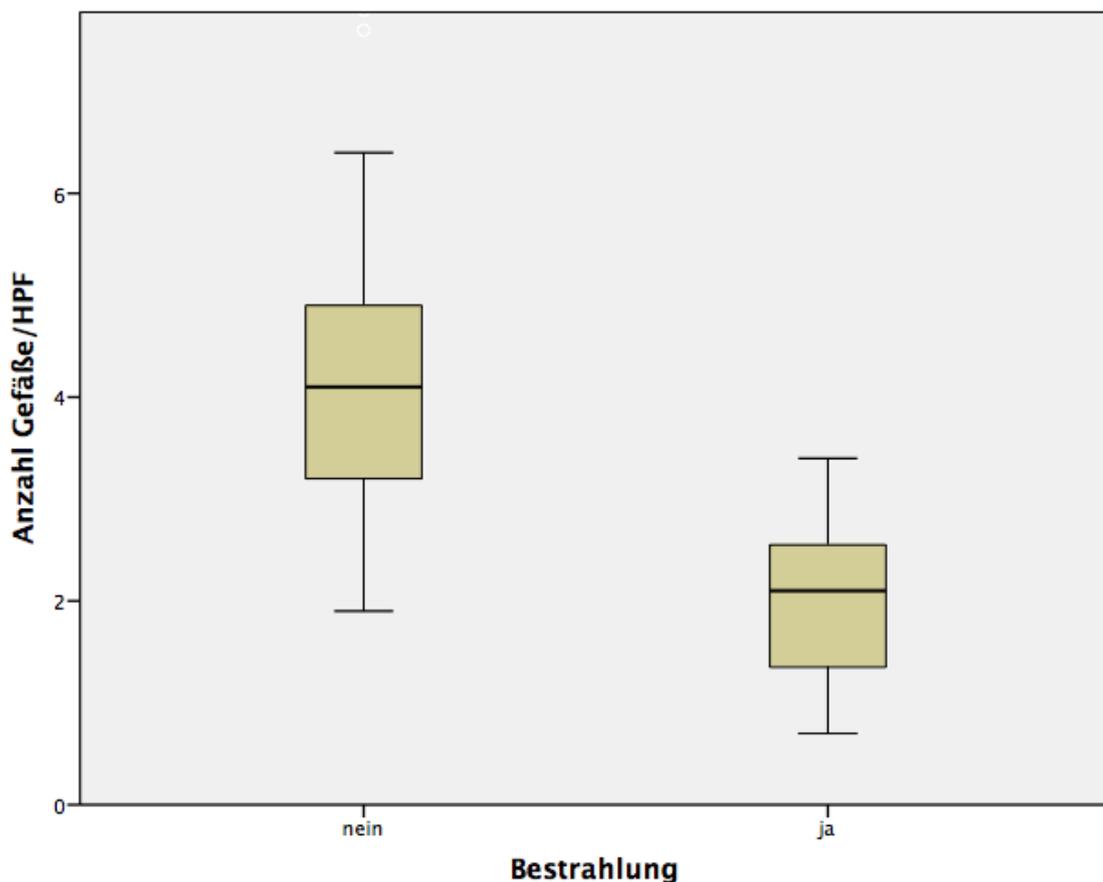
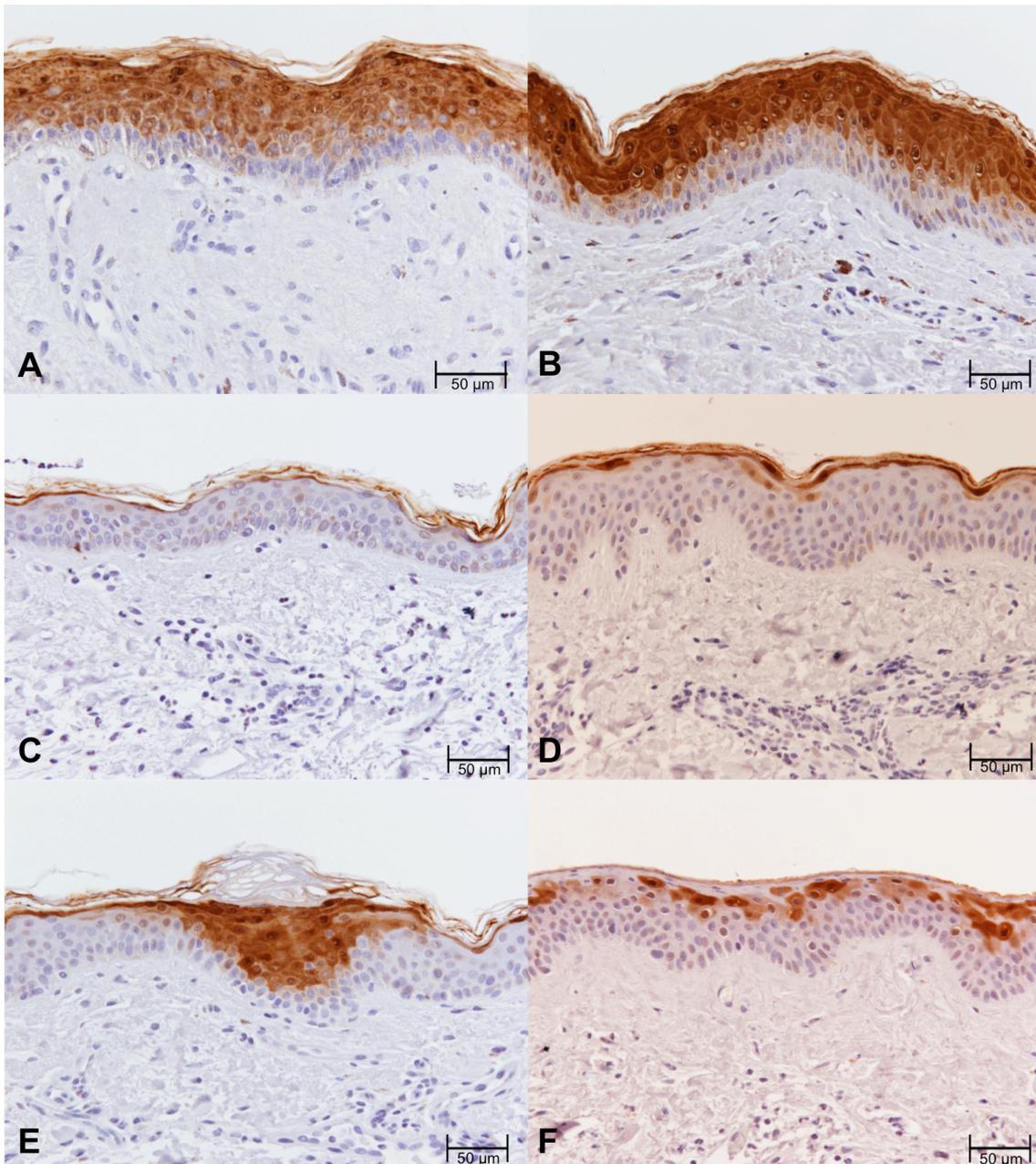


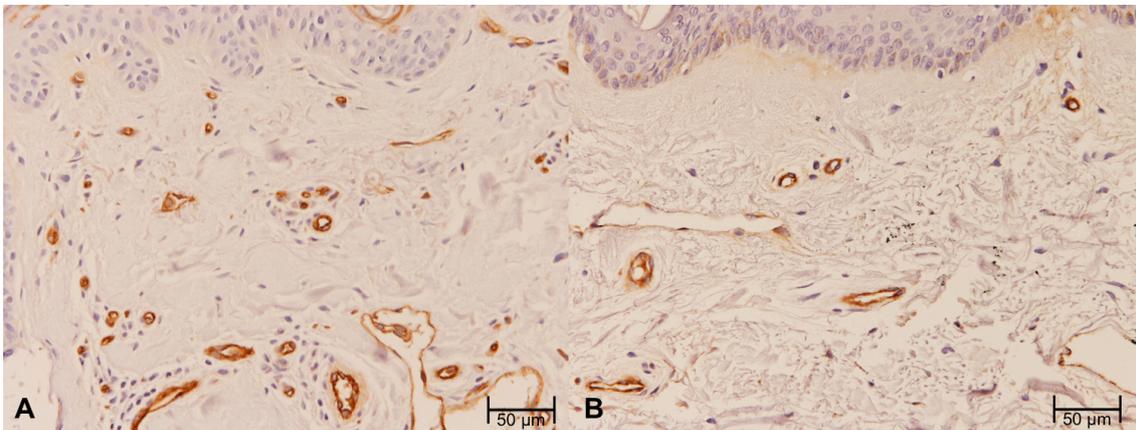
Abbildung 3.8 Box-plot Diagramm zur Darstellung der durchschnittlichen Anzahl an positiv gefärbten Blutgefäßen in bestrahltem und nicht-bestrahltem Gewebe gemessen in 10 unterschiedlichen Gesichtsfeldern (high power fields, HPF) nach immunhistochemischen Färbungen gegen von-Willebrand-Faktor (vWF). Die Linie innerhalb der Box stellt den Median, die obere Abgrenzung die 75%-Perzentile, die untere Abgrenzung die 25%-Perzentile dar. Der Messbereich ist als vertikale Linie dargestellt, Extremwerte sind nicht berücksichtigt. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch signifikant ( $4.4 \pm 1.6$  vs.  $2.0 \pm 0.7$ ;  $p=0,000$ ).



**Abbildung 3.9** Immunhistochemische Färbungen gegen Psoriasin in nicht-bestrahlter Haut (A, C, E) und bestrahlter Haut (B, D, F). Es zeigen sich variable Expressionsmuster mit einer starken Färbung der *strata spinosa, granulosa, cornea* und *basale* (A, B); Färbungen lediglich der *strata cornea* und *granulosa* sowie der ungefärbten *strata basale* und *spinosa* (C, D); sowie lediglich vereinzelt angefärbten Zellen im *stratum spinosum* (E, F).

### 3.4.5 von-Willebrand-Faktor (vWF)

Die immunhistochemischen Färbungen gegen von-Willebrand-Faktor (vWF) wurden bezüglich der angefärbten Gefäße pro untersuchtem Gesichtsfeld (high power field, HPF) untersucht. Der Mittelwert der positiv angefärbten Gefäße im Bezug auf die zehn untersuchten HPFs ist graphisch in Abbildung 3.8 dargestellt. Hier zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede ( $4.4 \pm 1.6$  vs.  $2.0 \pm 0.7$ ;  $p=0,000$ ). Abbildung 3.10 zeigt die entsprechenden immunhistochemischen Präparate der Studiengruppen.



**Abbildung 3.10 Immunhistochemische Färbungen gegen von-Willebrand-Faktor (vWF). Es zeigt sich eine positive Färbung der Endothelzellen und des Intima/Media-Bereiches der Blutgefäße.**

### 3.5 RT-PCR

Die Ergebnisse der RT-PCR sind in Kapitel 3.5.1 und 3.5.2 anhand der Kategorien „angeborenes Immunsystem“ und „Fibrose“ dargestellt.

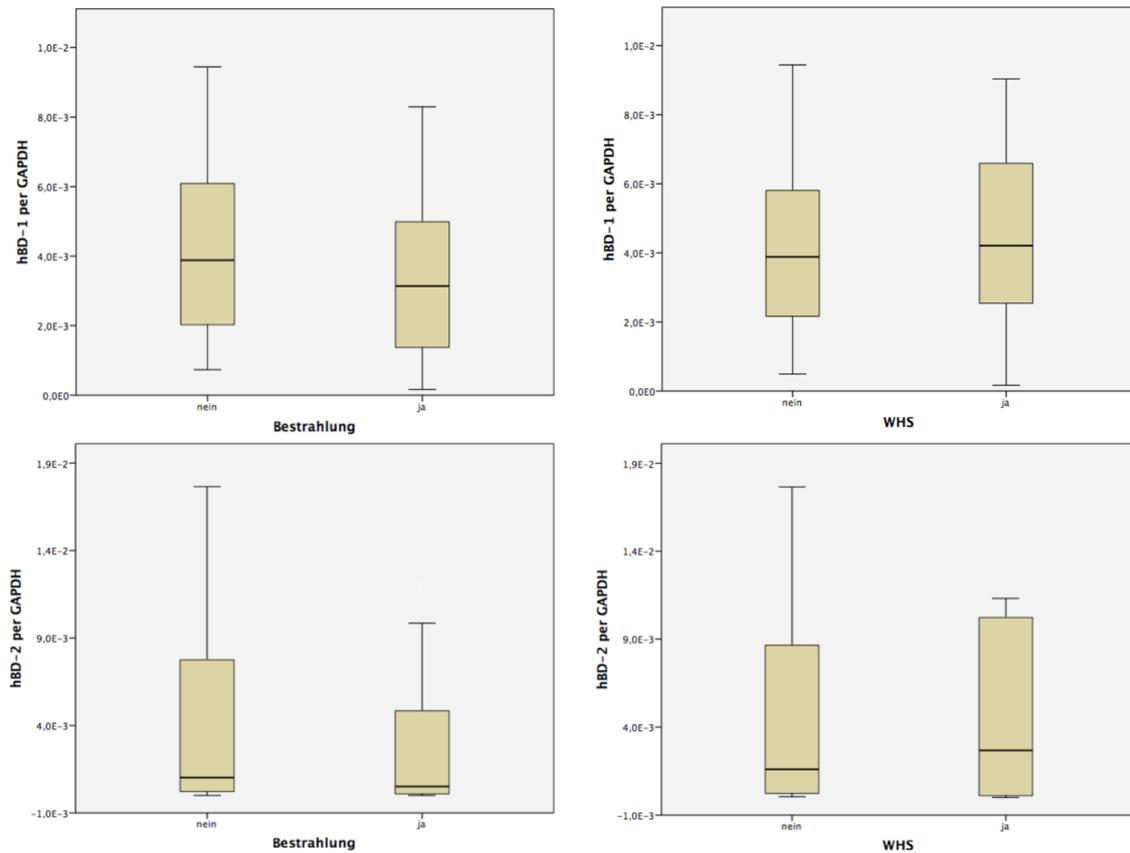
#### 3.5.1 Angeborenes Immunsystem

##### 3.5.1.1 humanes- $\beta$ -Defensin-1 (hBD-1)

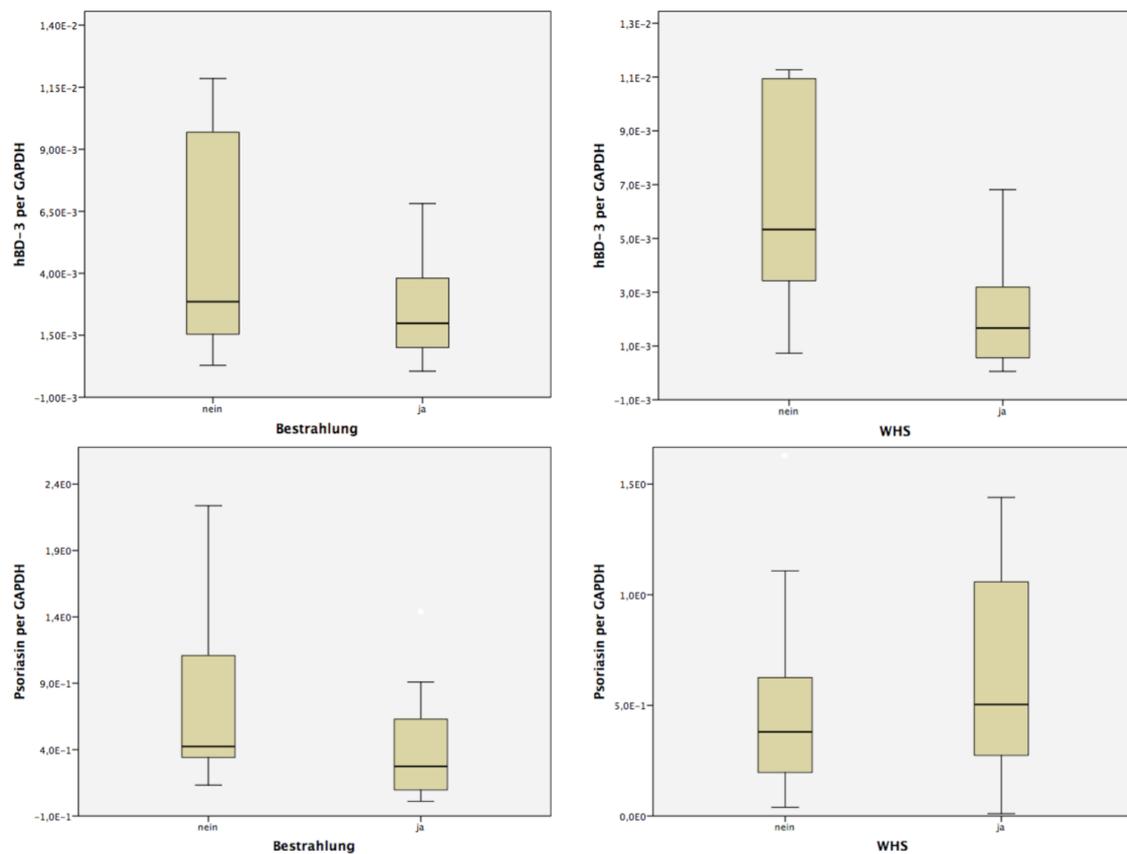
Insgesamt zeigte sich eine erhöhte Expression von hBD-1 in nicht vorbestrahltem Gewebe im Vergleich zu präoperativ bestrahlter Haut ohne dass das Signifikanzniveau erreicht wurde ( $p=0,237$ ). Die Ergebnisse sind in Tabellen 3.7 und 3.8 sowie in Abbildung 3.11 veranschaulicht. Im Vergleich der Expression zwischen Patienten mit und ohne dem Auftreten von postoperativen Wundheilungsstörungen im Bereich des operativen zervikalen Zugangsweges zeigte sich eine Mehrexpression bei Patienten ohne Wundheilungsstörung ohne statistische Signifikanz ( $p=0,176$ ).

##### 3.5.1.2 humanes- $\beta$ -Defensin 2 (hBD-2)

Die Expression von hBD-2 zeigte sich in der RT-PCR Analyse in der Gruppe mit dem Auftreten postoperativen Wundheilungsstörungen vermindert ( $p=0.116$ ) sowie bei Patienten mit einer präoperativen Strahlentherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p=0.489$ ). Das Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  wurde in der statistischen Auswertung nicht erreicht. Die Ergebnisse sind in Tabellen 3.7 und 3.8 sowie in Abbildung 3.11 veranschaulicht.



**Abbildung 3.11** Ergebnisse der RT-PCR Expressionsanalyse der Gene für humanes- $\beta$ -Defensin-1 (hBD-1), humanes- $\beta$ -Defensin-2 (hBD-2) hinsichtlich der Gruppen bestrahlte vs. unbestrahlte Patienten und Patienten mit und ohne Auftreten postoperativer Wundheilungsstörungen (WHS). Die Linie innerhalb der Box stellt den Median, die obere Abgrenzung die 75%-Perzentile, die untere Abgrenzung die 25%-Perzentile dar. Der Messbereich ist als vertikale Linie dargestellt, Extremwerte sind nicht berücksichtigt. Alle untersuchten Parameter zeigten im Bezug auf eine postoperative WHS oder stattgehabte Strahlentherapie keine statistisch signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 3.12** Ergebnisse der RT-PCR Expressionsanalyse der Gene für humanes- $\beta$ -Defensin-3 (hBD-3) und Psoriasisin hinsichtlich der Gruppen bestrahlte vs. unbestrahlte Patienten und Patienten mit und ohne Auftreten postoperativer Wundheilungsstörungen (WHS) Die Linie innerhalb der Box stellt den Median, die obere Abgrenzung die 75%-Perzentile, die untere Abgrenzung die 25%-Perzentile dar. Der Messbereich ist als vertikale Linie dargestellt, Extremwerte sind nicht berücksichtigt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich im Bezug auf die Expression von Psoriasisin im Vergleich der Gruppe mit und ohne präoperativer Strahlentherapie ( $2,7 \times 10^{-1}$  vs.  $4,2 \times 10^{-1}$ ;  $p=0,013$ ) sowie im Bezug auf die Expression von hBD-3 bei Patienten mit einer postoperativen WHS ( $1,6 \times 10^{-2}$  vs.  $1,4 \times 10^{-1}$ ;  $p=0,008$ ). Alle anderen untersuchten Parameter zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

**Tabelle 3.7 Ergebnisse der RT-PCR Expressionsanalyse bei Patienten mit und ohne präoperativer Strahlentherapie (ST).**

Gen	n (%)		Median		p-Wert <sup>a</sup>
	ST	Keine ST	ST	Keine ST	
hbD-1	18 (38,3)	29 (61,7)	$3,1 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$	0,237
hbD-2	18 (29,5)	43 (70,5)	$5,1 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$	0,489
hbD-3	17 (37,7)	28 (62,3)	$2,0 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-3}$	0,261
Psoriasin	17 (38,6)	27 (61,4)	$2,7 \times 10^{-1}$	$4,2 \times 10^{-1}$	0,013
vWF	9 (20,5)	35 (79,5)	$4,3 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-1}$	0,005
$\alpha$ -PK	18 (36,7)	31 (63,3)	$9,1 \times 10^{-1}$	$2,1 \times 10^1$	0,002
TGF- $\beta$ 1	18 (38,3)	29 (61,7)	$2,3 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	0,012

<sup>a</sup>Mann-Whitney U test

**Tabelle 3.8 Ergebnisse der RT-PCR Expressionsanalyse bei Patienten mit und ohne Auftreten von postoperativen Wundheilungsstörungen (WHS).**

Gen	n (%)		Median		p-Wert <sup>a</sup>
	WHS	Keine WHS	WHS	Keine WHS	
hbD-1	15 (37,5)	25 (62,5)	$4,8 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-3}$	0,176
hbD-2	14 (37,8)	23 (62,2)	$6,0 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-1}$	0,116
hbD-3	12 (40,0)	18 (60,0)	$1,6 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-1}$	0,008
Psoriasin	14 (36,8)	24 (63,2)	$1,3 \times 10^{-1}$	$9,0 \times 10^{-2}$	0,676
vWF	10 (35,7)	18 (64,3)	$7,8 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-1}$	0,080
$\alpha$ -PK	15 (40,5)	22 (59,5)	$7,4 \times 10^{-1}$	$2,5 \times 10^{-1}$	0,067
TGF- $\beta$ 1	15 (40,5)	22 (59,5)	$1,2 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$	0,245

<sup>a</sup>Mann-Whitney U test

### 3.5.1.3 humanes- $\beta$ -Defensin 3 (hBD-3)

Die Expression von hBD-3 bei vorbestrahlten Patienten zeigte in der RT-PCR Expressionsanalyse eine geringere Ausprägung im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe ohne statistisch signifikante Unterschiede ( $p=0.261$ ). Eine statistisch Signifikanz der hBD-3 Expression konnte jedoch bei Patienten mit postoperativen Wundheilungsstörungen nachgewiesen werden ( $p=0.008$ ).

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 3.12. Die deskriptive statistische Auswertung ist in Tabellen 3.7 und 3.8 zusammengefasst.

#### 3.5.1.4 Psoriasis

Psoriasis als weiterer Marker des angeborenen Immunsystems zeigte in der Expressionsanalyse beim Vergleich der präoperativ bestrahlten Patienten zu nicht bestrahlten Patienten eine signifikante Verminderung in zuvor bestrahltem Gewebe ( $p=0,013$ ). Die Expression von Psoriasis bei Gewebe, das im weiteren postoperativen Verlauf Wundheilungsstörungen entwickelte im Vergleich zur Kontrollgruppe, zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,676$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 sowie den Tabellen 3.7 und 3.8 ausführlicher dargestellt.

#### 3.5.2 Fibrose

##### 3.5.2.1 von-Willebrand-Faktor (vWF)

Der vWF als Gefäßmarker im Rahmen der auftretenden strahlenbedingten Gewebsfibrose zeigte eine statistisch signifikante Verminderung in bestrahltem Gewebe im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe ( $p=0,005$ ). Die Expression von vWF in Gewebe von Patienten mit und ohne Wundheilungsstörungen zeigte eine annähernd signifikante Verminderung in Gewebe mit postoperativen Wundheilungsstörungen ( $p=0,080$ ). Abbildung 3.13 sowie Tabellen 3.7 und 3.8 fassen die Ergebnisse zusammen.

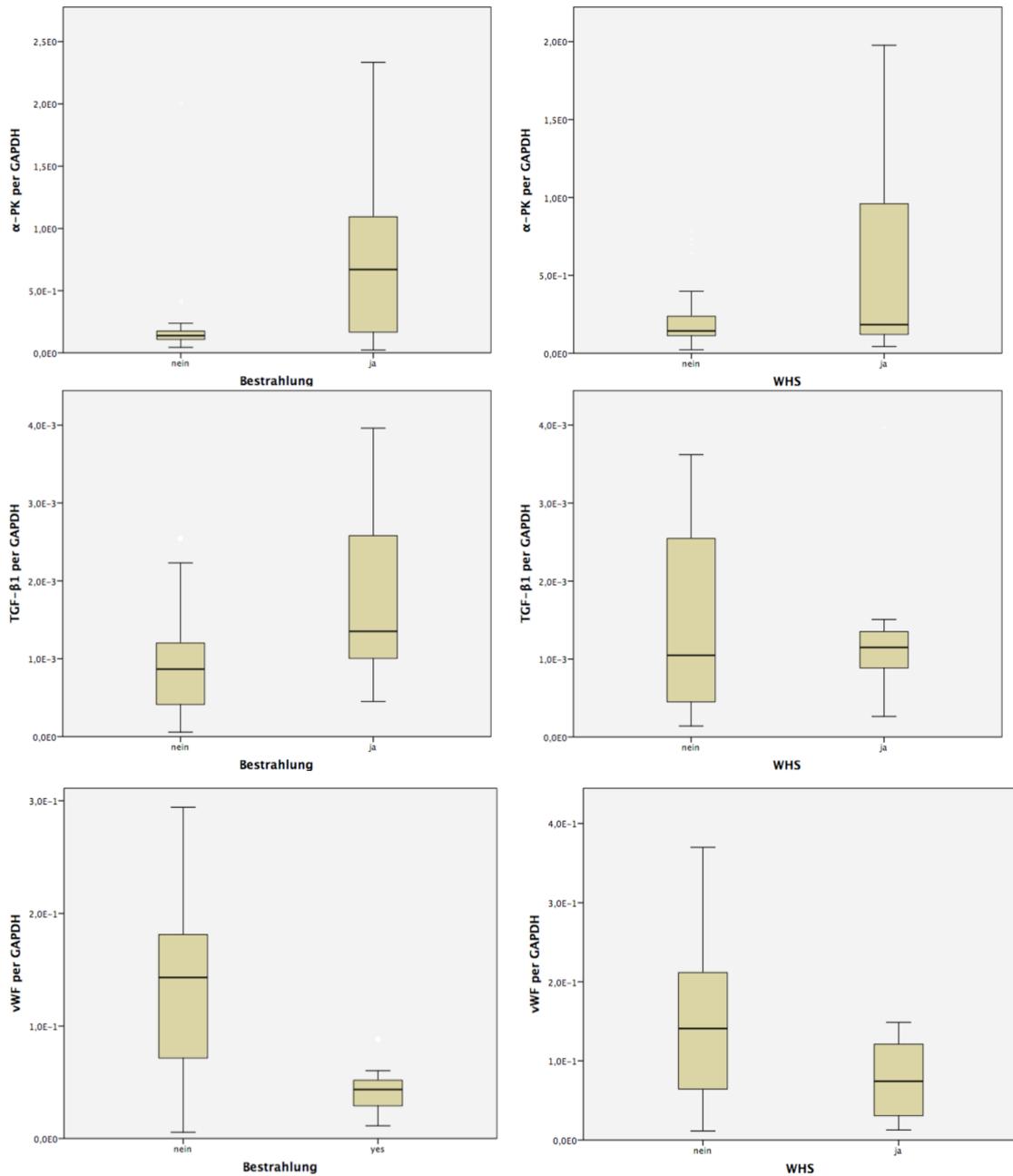


Abbildung 3.13 Ergebnisse der RT-PCR Expressionsanalyse der Gene für  $\alpha$ -Prokollagen ( $\alpha$ -PK), Tumor-Growth-Factor- $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ -1) und von-Willebrand-Faktor (vWF) hinsichtlich der Gruppen bestrahlte vs. unbestrahlte Patienten und Patienten mit und ohne Auftreten postoperativer Wundheilungsstörungen (WHS). Die Linie innerhalb der Box stellt den Median, die obere Abgrenzung die 75%-Perzentile, die untere Abgrenzung die 25%-Perzentile dar. Der Messbereich ist als vertikale Linie dargestellt, Extremwerte sind nicht berücksichtigt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich im Bezug

auf die Expression der Marker im Vergleich der Gruppe mit und ohne präoperativer Strahlentherapie (vWF:  $4,3 \times 10^{-2}$  vs.  $1,5 \times 10^{-1}$ ,  $p=0,005$ ;  $\alpha$ -PK:  $9,1 \times 10^{-1}$  vs.  $2,1 \times 10^{-1}$ ,  $p=0,002$ ; TGF- $\beta$ -1:  $2,3 \times 10^{-1}$  vs.  $1,1 \times 10^{-3}$ ,  $p=0,012$ ). Alle übrigen untersuchten Parameter zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Vergleichs postoperativer WHS.

### 3.5.2.2 Tumor-Growth-Factor- $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ -1)

TGF- $\beta$ -1 zeigte in der RT-PCR Expressionsanalyse eine statistisch signifikant vermehrte Expression in vorbestrahltem Gewebe im Vergleich zu nicht bestrahlten Patienten ( $p=0,012$ ). Keine signifikanten Unterschiede konnten beim Vergleich von Wundheilungsstörungen zu unkomplizierten postoperativen Verläufen nachgewiesen werden ( $p=0,245$ ). Eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse bieten Abbildung 3.13 und die Tabellen 3.7 und 3.8.

### 3.5.2.3 $\alpha$ -Prokollagen ( $\alpha$ -PK)

Eine signifikant vermehrte Expression von  $\alpha$ -PK konnte durch die RT-PCR Expressionsanalyse in vorbestrahltem Gewebe nachgewiesen werden ( $p=0,002$ ). Keine Unterschiede hinsichtlich der Expression von  $\alpha$ -PK zeigten sich im Vergleich von Gewebe mit und ohne dem Auftreten von postoperativen Wundheilungsstörungen, wobei die vermehrte Expression in Geweben mit Wundheilungsstörungen zumindest statistisch annähernd signifikante Unterschiede aufwies ( $p=0,067$ ). Abbildung 3.13 und Tabellen 3.7 und 3.8 veranschaulichen die Ergebnisse.

## 4 Diskussion

Positive und negative biologische Folgen ionisierender Strahlen auf das menschliche Gewebe sind seit der Nutzung der Röntgenstrahlen bekannt. Erstmalige Erwähnung finden nachteilige biologische Auswirkungen der Strahlung und protektive Maßnahmen 1904 in einer Abhandlung des Zahnarztes William H. Rollins [Kathren, 1964]. Es werden akute Strahlenfolgen wie beispielsweise Übelkeit, Erythem oder Ödeme von langfristigen Folgen einer Radiotherapie wie Gewebsfibrose, Xerostomie, Osteoradionekrose der Kiefer und das gesteigerte Risiko strahlenbedingte Zweitkarzinome im weiteren zeitlichen Verlauf zu entwickeln, unterschieden, obwohl die Strahlentherapie als solche als schmerzfrei empfunden wird [Lara et al., 1996, Li et al., 2011, Thorn et al., 2000].

Die adjuvante wie auch neoadjuvante Bestrahlung stellt neben der Radiochemotherapie und der operativen Tumorsektion eine der Leitliniengerechten Therapieoptionen in der interdisziplinären Behandlung des Mundhöhlenkarzinoms dar. Neben der radikalen Entfernung des Primarius mit entsprechendem Sicherheitsabstand hat sich die zervikale Lymphadenektomie als chirurgische Standardtherapie etabliert. Vor allem bei Patienten nach einer stattgehabten Radiotherapie sind zervikale Wundheilungsstörungen auch als Folge einer länger zurück liegenden Strahlentherapie regelmäßige Komplikation des operativen Eingriffs. Dies geht ebenfalls mit einem negativen Effekt auf den Behandlungserfolg und die Patienten Compliance einher [Dormand et al., 2005]. Grundsätzlich scheint eine suffiziente Sauerstoffversorgung auf zellulärer Ebene sowie eine adäquate mikrovaskuläre Zirkulation und Perfusion entscheidend für das Entstehen von Wundheilungsstörungen. Darüberhinaus stellen körpereigene Abwehrsysteme, wie der Komplex der antimikrobiellen Peptide, Mechanismen der Infektabwehr dar, deren Bedeutung in diesem Zusammenhang noch nicht vollständig geklärt scheint. Mit einer Verminderung der Perfusion und Vaskularisation auf zellulärer Ebene geht ätiologisch ebenfalls eine strahleninduzierte Fibrose einher.

Die hier vorliegende Arbeit versucht, durch die Korrelation klinischer Daten von Patienten nach stattgehabter Radiotherapie und einer entsprechenden Vergleichsgruppe mit Daten aus Messungen der Gewebepfusion und Gewebeoxygenierung, sowie aus der Analyse spezifischer Markerproteine in histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Verfahren Aussagen über den Einfluss einer lokalen Minderperfusion, einer strahleninduzierten Fibrose und der Bedeutung antimikrobieller Peptide besonders auch im Hinblick auf eine postoperative Wundheilungsstörung zu treffen.

#### 4.1 Gewebepfusion und –oxygenierung

Die Messung der zervikalen Gewebepfusion und –oxygenierung nach Radiotherapie erfolgte mit Hilfe eines non-invasiven, simultanen Echtzeit-Verfahrens zur Laser-Doppler Spektroskopie und der Gewebespektrometrie. Es wurden hiermit Messwerte in unterschiedlichen Eindringtiefen (2 und 8 mm) generiert, um oberflächliche kutane Gewebeschichten vom Subkutangewebe unterscheiden zu können. Die Ergebnisse zeigten einen geringer signifikanten Einfluss präoperativer Strahlentherapie auf die Messgrößen Sauerstoffsättigung, relative Hämoglobinkonzentration und Blutfluss in 2 und 8 mm Eindringtiefe. Der Parameter Blutflussgeschwindigkeit (Messtiefe 2 mm) zeigte in der statistischen Analyse eine signifikante Verminderung in vorbestrahltem Gewebe. Im Vergleich von Patienten mit und ohne Auftreten von postoperativen Wundheilungsstörungen konnten in der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Univariate und multivariate Analysen konnten jedoch den Parameter Blutfluss als prädiktives Item für eine Wundheilungsstörung nach Neck dissection charakterisieren (siehe Kap. 3.2). Hier zeigten sich signifikant höhere Werte bei Patienten mit einer postoperativen Wundheilungsstörung. Die übrigen Parameter wie Sauerstoffsättigung, relative Hämoglobinkonzentration und Blutflussgeschwindigkeit zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede im

Hinblick auf die Entwicklung einer Wundheilungsstörung [Rohleder et al., 2014]. Dies ist auf den ersten Blick überraschend, da eine suffiziente Gewebepfusion am ehesten mit protektiven Kapazitäten hinsichtlich einer Wunddehiszenz verknüpft erscheint. Eine reduzierte Sauerstoffsättigung und eine verminderte Gewebepfusion stellen langläufige Risikofaktoren für eine Wundheilungsstörung dar. Grundsätzlich zeigt eine Recherche der verfügbaren Literatur jedoch auch, dass für Untersuchungen zu postoperativen Wundheilungsstörungen vor allem Gewebe anderer Körperregionen, wie beispielsweise bei venösen Ulzera der unteren Extremität, zur histologischen und molekularbiologischen Analyse verwendet wurde. Die Datenlage zu Oxygenierung und Perfusion bei zervikalen Wunden hingegen ist spärlich [Wipke-Tevis et al., 2001]. Wie lässt sich folglich die Tatsache erklären, dass Patienten mit einer signifikant gesteigerten Blutflussrate mehr zervikale Wundheilungsstörungen entwickeln? Zum einen wird durch die kontrollierte Gefäßdissektion bei der Präparation am Hals eine Vielzahl an Gefäßen unterbunden. Somit sinkt die Perfusion und suffiziente Versorgung postoperativ entsprechend ab. Gewebe, welches bereits präoperativ stark vaskularisiert war, ist demnach ggf. anfälliger für eine reduzierte postoperative Perfusion und neigt ebenfalls leichter zur Entwicklung postoperativer Wunddehiszenzen und Wundheilungsstörungen. Darüberhinaus erscheint es auch stringent, dass Gewebe mit einer dichten Vaskularisation im Rahmen kleiner postoperativer Nachblutungen somit leichter zur Bildung von Hämatomen neigt, welche sich im Verlauf infizieren und als Grundlage für die Entwicklung einer Wundheilungsstörungen angesehen werden können. Grundsätzlich sind die Ergebnisse der präoperativen Messung von Gewebepfusion und Gewebeoxygenierung zunächst überraschend und können sicherlich die Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen bilden. Ein konkreter Grenzwert des Blutflusses, ab dem signifikant mehr Wundheilungsstörung zu erwarten sind, konnte wegen der breiten Streuung der Ergebnisse nicht definiert werden. Es scheint jedoch als wäre ein fiktiver Wert von 100 Arbitrary Units (AU) als

Anhalt geeignet. Patienten mit präoperativen Werten von  $\geq 100$  AU sollten in einem klinischen Setting entsprechend über die erhöhte Gefahr einer postoperativen Wundheilungsstörung aufgeklärt werden. Operationstechnisch stehen dem Chirurgen ebenfalls zusätzliche Möglichkeiten wie akribische Blutstillung unter Zuhilfenahme des bipolaren Stroms, gewissenhafte Ligatur größerer Gefäße, Vermeidung fortlaufender Nahttechniken, strenger subkutaner Wundverschluss und postoperative Handlungsanweisung wie eine entsprechende Lagerung des Kopfes zur Verfügung, um das Risiko für eine postoperative Wunddehiszenz weitestgehend zu minimieren.

Die Verwendung des O2C-Messsystems zur Evaluation von Gewebepерfusion und Gewebeoxygenierung ist bereits in einer Vielzahl an chirurgischen Studien auch im Kopf-Hals-Bereich etabliert worden [Holzle et al., 2006, Rohleder et al., 2014]. Dennoch erscheint gerade im Zusammenhang mit einer stattgehabten Bestrahlung vor allem die Gewebekondition hinsichtlich einer Lichttransmission entscheidend. Dieses Messprinzip könnte durch die strahleninduzierte Fibrose beeinflusst werden, in dem der Lichtsensor auf Grund der reduzierte Lichttransmissionskapazität des vorbestrahlten Gewebes nicht eindeutig vergleichbare Ergebnisse liefern kann [Rajan et al., 2008]. Nichtsdestotrotz liegt ein deutlicher Vorteil dieser Messmethode sicherlich in der einfachen Verfügbarkeit. Das O2C-Messsystem ist portabel und kann sowohl direkt postoperativ wie auch im weiteren stationären Verlauf als einfaches System „bed-side“ verwendet werden. Zudem ist die Messung nicht sehr zeitaufwändig, wenig Untersucher-abhängig und nicht-invasiv oder schmerzhaft. Die Methode ist wissenschaftlich und klinisch in einer großen Reihe von Studien bestens etabliert und ist in der Lage, durch die simultane, nicht-invasive Laser-Doppler Spektroskopie und Gewebespektrometrie zuverlässige Aussagen zur kapillären Perfusion und Sauerstoffsättigung zu treffen [Holzle et al., 2006].

## 4.2 Antimikrobielle Peptide (AMP)

Antimikrobielle Peptide (AMP) und im Speziellen die humanen  $\beta$ -Defensine (hBD) spielen als wichtiger Baustein des angeborenen Immunsystems in der Abwehr von bakteriellen, viralen und fungiziden Infektionen eine wichtige Rolle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Expression von AMP erstmalig nicht nur in gesunder Haut, sondern ebenfalls in bestrahltem Gewebe untersucht [Braff et al., 2005, Steinstraesser et al., 2009]. Expressionsanalysen der Gene für hBD-1 (*DEFB1*), hBD-2 (*DEFB4A*), hBD-3 (*DEFB103A*) und Psoriasin (*S100A7*) wurden durchgeführt. Die Untersuchungsgruppen wurden entsprechend des Alters gematched, da in vorhergehenden Untersuchungen eine Altersabhängigkeit hinsichtlich der Expression von AMP gezeigt werden konnte [Loeffelbein et al., 2011]. Es konnte erstmals im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen werden, dass alle untersuchten AMP ebenfalls in bestrahlter Haut exprimiert werden. Die Lokalisationen der AMP in den unterschiedlichen epidermalen Schichten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Gewebe. In der RT-PCR Expressionsanalyse zeigten sich signifikant verminderte Expressionsmuster von AMP in bestrahltem Gewebe, als somit erstmalig untersuchte Nebenwirkung einer Radiotherapie (siehe Kap. 3.3, 3.4 und 3.5). Die Ergebnisse hinsichtlich der Expression von hBD-1 in äußerer Haut sind kongruent mit Berichten aus der Literatur [Fulton et al., 1997]. Vorhergehende Untersuchungen konnten keinen Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von hBD-1 und dem Auftreten von Infektionen nachweisen. Es wird daher angenommen, dass hBD-1 konsekutiv und nicht auf einen inflammatorischen Reiz hin exprimiert wird [Kesting et al., 2012, Kesting et al., 2010, Zhao et al., 1996]. Dennoch sind auch Berichte über eine Hochregulation von hBD-1 nach bakteriellen Stimuli veröffentlicht [Sorensen et al., 2005]. Die vorliegende Arbeit konnte die verminderte Expression von hBD-1 in bestrahlter Haut nachweisen. Damit einhergehen könnte ebenfalls eine erhöhte Anfälligkeit für mikrobielle Infektionen in vorbestrahltem Gewebe.

In der Expressionsanalyse von hBD-2 konnte eine verminderte Expression in bestrahlter Haut nachgewiesen werden. In der Literatur ist eine Hochregulation von hBD-2 nach Infektionen mit bakteriellen Pathogenen in Zellkulturexperimenten beschrieben worden [Liu et al., 2002]. HBD-2 wirkt hierbei chemotaktisch auf Effektorzellen des adaptiven Immunsystems und scheint für die langfristigen Immunantworten verantwortlich zu sein [Kesting et al., 2010, Yang et al., 1999]. Die verminderte Expression von hBD-2 in bestrahltem Gewebe könnte somit ebenfalls eine geringere Stimulation des adaptiven Immunsystems und damit klinisch eine höhere Anzahl an Wundheilungsstörungen zur Folge haben.

Analog hierzu lässt sich die verminderte Expression von hBD-3 in bestrahlter Haut in der vorliegenden Untersuchung interpretieren. HBD-3 zeigt ein breites antimikrobielles Spektrum. Demnach lässt sich die verminderte Expression in bestrahltem Gewebe sowie die damit einhergehende Reduktion der antimikrobiellen Potenz und das klinische Auftreten von Wundheilungsstörungen stringent korrelieren.

Die Expression von Psoriasin war in den untersuchten Gewebeproben bestrahlter Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Psoriasin wurde erstmalig in Läsionen von Patienten, die an einer *Psoriasis vulgaris* litten, beschrieben [Lee et al., 2007, Madsen et al., 1991]. Erstaunlicherweise zeigten diese Patienten keinerlei Hinweise auf erhöhte kutane Infektionen an den entsprechenden Prädilektionsstellen, wie man es auf Grund des Verlustes der Hautintegrität vielleicht erwarten würde [Henseler et al., 1995]. Hier scheint eine Hypothese die Hochregulation von Psoriasin und das damit verbundene antimikrobielle Potential zu sein. Demnach erscheint eine Verminderung der Psoriasin Expression in bestrahltem Gewebe als einer der Gründe für die Entwicklung von postoperativen Wundheilungsstörungen kongruent.

Die immunhistochemischen Färbungen aller untersuchten AMP zeigten eine Zunahme der Färbeintensität vom *stratum basale* hin zum *stratum granulosum*.

AMP bilden somit in der äußeren epithelialen Schicht die Grenze zur Umgebung und sind demnach in der Lage, ihr antimikrobielles Potential entsprechend umsetzen zu können. Diese Ergebnisse sind vergleichbar zu Berichten aus der Literatur [Kesting et al., 2012, Kesting et al., 2010].

Die Tatsache, dass die vorliegende Arbeit eine signifikant verminderte Expression von Psoriasin in bestrahltem Gewebe gegenüber nicht bestrahltem Gewebe nachweisen konnte, deutet auf verminderte lokale Abwehrmechanismen der Haut als äußere Barriere hin. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass AMP nicht nur von lokalen Zellen wie z.B. Keratinozyten, sondern auch von mobilen Zellen des Immunsystems wie beispielsweise T-Zellen produziert wird, von Interesse. Die lokale zervikale Radiotherapie lässt nicht vermuten, dass die AMP-Expression in anderen Körperregionen ebenfalls durch die stattgehabte Bestrahlung beeinflusst wurde. Demnach wären die verminderte lokale zervikale AMP-Expression, teilweise ausgelöst als Nebenwirkung der Strahlentherapie, zumindest partiell durch die Immigration von AMP-produzierenden Zellen des Immunsystems kompensiert. Von Ruocco et al. wurden kürzlich immunkompromitierte Distrikte (immunocompromised districts; ICD) als Regionen der immunologischen Dysregulation bei sonst immunkompetenten Patienten beschrieben. Ionisierende Strahlung wird in diesem Zusammenhang als Auslöser eines ICD gewertet [Ruocco, 2014, Ruocco et al., 2014]. Die Ergebnisse dieser Studie lassen den Schluss zu, dass durch Strahlung bedingte ICD durch mobile AMP produzierenden Zellen des Immunsystems im Sinne eines Sicherheitsnetzes kompensiert werden können. Darüberhinaus sind aber auch besondere Konstellationen denkbar, bei denen vorbestrahlte Patienten zusätzlich einen Mangel an mobilen AMP produzierenden Zellen (z.B. im Rahmen einer Neutropenie) aufweisen und somit eine höhere Vulnerabilität gegenüber kutanen Infektionen. In einer solchen Konstellation ist die Entstehung von klinischen ICD ebenfalls erklärbar.

In weiterführenden Studien ist die Applikation von synthetischen AMP als neue

alternative, antimikrobielle Agenzien bereits erfolgreich untersucht worden [Gilmore et al., 2009]. In ersten klinischen Studien ist eine höhere antimikrobielle Potenz synthetischer AMP im Vergleich zu herkömmlichen Antibiotika nachgewiesen worden [Giacometti et al., 2004, Lipsky et al., 2008]. Nichtsdestotrotz sind auch Nachteile wie hohe Produktionskosten, eine schnelle Degeneration der synthetischen AMP sowie Zytotoxizität auf Grund eines schmalen therapeutischen Korridors beschrieben worden [Vaara, 2009]. Vor allem die beschriebene Zytotoxizität scheint in diesem Zusammenhang wichtig. Bei Patienten mit klinisch apparenten ICD, wie beispielsweise bestrahlte Patienten mit einer zusätzlichen Neutropenie, ist demnach eine exakte Dosisdefinition unabdingbar, um mögliche Nebenwirkungen sicher einschätzen und potentielle Folgen abwägen zu können. Darüberhinaus besteht auch die Möglichkeit einer topischen Applikation von AMP-Derivaten, z.B. mit Kollagen-Carriermembranen. Dies ist von Gopinath et al. bereits im murinen Tiermodell zur Behandlung infizierter Wunden beschrieben worden [Gopinath et al., 2005].

#### 4.3 Strahleninduzierte Fibrose (SIF)

Die strahleninduzierte Fibrose (SIF) und folglich eine Dysfunktion der Mikrozirkulation sind bekannte Nebenwirkungen ionisierender Strahlung im Rahmen einer therapeutischen Radiotherapie [Schmitt et al., 2003]. Die SIF beschränkt sich nicht auf das Auftreten an der äußeren Haut, sondern betrifft alle Gewebe und Organe im Strahlenfeld und kann klinisch somit ebenfalls durch eine inadäquate Ventilation, ein vermindertes Herz-Zeit-Volumen oder, wie in dieser Studie diskutiert, durch eine verzögerte Wundheilung in Erscheinung treten [Devalia et al., 2008, Ghafoori et al., 2008]. Vorhergehende Untersuchungen konnten den Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen wie TGF- $\beta$ -1 im Rahmen der Pathogenese der SIF nachweisen [Devalia et al., 2008]. Eine gesteigerte Kollagenbildung und Veränderung der extrazellulären Matrix spielen bewiesenermaßen die Hauptrolle bei der Entstehung einer

Fibrose. TGF- $\beta$ -1 fördert in diesem Zusammenhang die lokale Fibrose und supprimiert die Angiogenese im Rahmen der Wundheilung [Devalia et al., 2008]. Im Zusammenhang mit einer reduzierten Wundheilung nach stattgehabter Strahlentherapie spielt somit neben der SIF auch die beeinträchtigte Neovaskularisation eine entscheidende Rolle [Gieringer et al., 2011]. Diese zwei Parameter beeinflussen sich sicherlich wechselseitig. Klinisch steht vor allem die verlängerte Morbidität auf Grund von Wunddehiszenzen, Wundinfektionen, Scheitern von freien oder lokalen rekonstruktiven Maßnahmen, Hautnekrosen oder Fistelbildungen im Vordergrund. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie hinsichtlich der Evaluation von TGF- $\beta$ -1 als essentielles Zytokin in der Pathogenese der SIF,  $\alpha$ -Prokollagen ( $\alpha$ -PK) als Marker struktureller Veränderung in der Mikroarchitektur der Haut und dem von-Willebrand-Faktor (vWF) als Parameter des vaskulärer Remodellings, zeigten sowohl auf Ebene der Genexpression wie auch immunhistologisch signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen. In der Expressionsanalyse von TGF- $\beta$ -1 zeigte sich eine signifikant vermehrte Expression in vorbestrahltem Gewebe, bei Patienten mit Wundheilungsstörungen zeigte sich ebenfalls eine vermehrte Expression. Diese Ergebnisse sind kongruent mit Berichten anderer Studiengruppen [Devalia et al., 2008, Schultze-Mosgau et al., 2006]. So konnte Schultze-Mosgau et al. den Zusammenhang zwischen TGF- $\beta$ -1 und dem Auftreten einer SIF *in-vitro* sowie im murinen Tiermodell nachweisen [Schultze-Mosgau et al., 2006]. Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen somit in logischer Schlussfolgerung. Therapeutisch konnten bereits anti-TGF- $\beta$ -1 Antikörper zur Verbesserung der Wundheilung nach freien Transplantaten sowie zur Reduktion profibrotischer Proteine wie  $\alpha$ -PK experimentell eingesetzt werden [Schultze-Mosgau et al., 2006].

Eine signifikant erhöhte Expression von  $\alpha$ -PK konnte in bestrahltem Gewebe nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse stehen ebenfalls in Einklang mit der Literatur. Die Hochregulation von  $\alpha$ -PK spielt in der Pathogenese der SIF eine

entscheidende Rolle [Illsley et al., 2000, Sassi et al., 2001]. Hinsichtlich der gesteigerten Expression von  $\alpha$ -PK bei Patienten mit postoperativen Wundheilungsstörungen ist eine vermehrte Synthese von Kollagen im Zusammenhang mit lokalen inflammatorischen Reaktionen beschrieben [Hatamochi et al., 1992].

Expressionsanalysen des vWF zeigte eine signifikant vermehrte Expression in der Kontrollgruppe im Vergleich zu vorbestrahlten Patienten und im Vergleich zu Patienten mit einer postoperativen Wundheilungsstörung im weiteren Verlauf. Diese Ergebnisse unterstreichen die herausragende Bedeutung von Neovaskularisationsprozessen in vorbestrahltem Gewebe. Auch die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen gegen vWF und die histologische Evaluation der Dicke der Epidermis unterstreichen die in der molekularbiologischen Analyse erhobenen Befunde. Eine suffiziente Gewebepерfusion und Versorgung mit Sauerstoff ist speziell in vorbestrahltem Gewebe mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung postoperativer Wundheilungsstörungen entscheidend. Darüberhinaus stehen natürlich weitere histopathologische strahleninduzierte Veränderungen in engem Zusammenhang mit einer reduzierten Perfusion [Gieringer et al., 2011]. Grundsätzlich konnte die Bedeutung von Zytokinen in der histopathologischen Ätiologie der SIF durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstrichen werden. Die therapeutische Anwendung bestimmter Antikörper wäre sicherlich in weiterführenden Studien zu untersuchen. Darüberhinaus unterstreichen die Ergebnisse die Notwendigkeit der sorgfältigen auch operationstechnisch-chirurgischen akkuraten Therapie von vorbestrahlten Patienten, speziell bei komplexen Rekonstruktionen im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, um eine gewissenhafte onkologische Rehabilitation zu gewährleisten.

## 5 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von Strahlentherapie auf das zervikale Gewebe, vor allem im Hinblick auf eine stattgehabte Lymphadenektomie (Neck Dissection). Diese stellt den Goldstandard in der multimodularen onkologischen Therapie der Halslymphknoten des Mundhöhlenkarzinoms dar. Ein besonderes Augenmerk sollte in diesem Zusammenhang auf das Auftreten postoperativer Wundheilungsstörungen nach einer adjuvanten Strahlentherapie gelegt werden. Die Ergebnisse der präoperativen transkutanen Messung von Gewebeoxygenierung und -perfusion konnten den Parameter Blutflussgeschwindigkeit (Messtiefe 2mm) als Prädiktor für das Auftreten von postoperativen Wundheilungsstörungen identifizieren. Hier ergeben sich sicherlich in weiterführenden klinischen Studien, Möglichkeiten der präoperativen Identifikation von gefährdeten Patienten. In der immunhistochemischen und molekularbiologischen Analyse von zervikalen Gewebeproben aus dem Bereich der Neck Dissection im Bezug auf die antimikrobiellen Peptide hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin konnte erstmals ein vermindertes Expressionsmuster in vorbestrahltem Gewebe nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die Bedeutung des angeborenen Immunsystems für die Wundheilung, speziell bei Patienten nach einer stattgehabten Radiotherapie und erlaubt die Evaluation von Applikationsmöglichkeiten synthetischer Peptide in nachfolgenden Untersuchungen. Auch die experimentellen Untersuchungen zur strahleninduzierten Fibrose mit den Markerproteinen TGF- $\beta$ -1,  $\alpha$ -Prokollagen und von-Willebrand-Faktor, konnten die Bedeutung der Fibrose, speziell im Hinblick auf die operationstechnisch-chirurgische Therapie und die Korrelation zu postoperativen Wundheilungsstörungen herausarbeiten. Hier ergeben sich Ansatzpunkte zur chirurgischen Prävention und präoperativen Identifikation von Risikopatienten in weiteren Studien.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Altieri, A., Bosetti, C., Talamini, R., Gallus, S., Franceschi, S., Levi, F., Dal Maso, L., Negri, E., La Vecchia, C. Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer. *British journal of cancer*. 87 (2002) 1227-1229
2. Axell, T. Hypersensitivity of the oral mucosa: clinics and pathology. *Acta odontologica Scandinavica*. 59 (2001) 315-319
3. Bailey, J.S., Blanchaert, R.H., Jr., Ord, R.A. Management of oral squamous cell carcinoma treated with inadequate excisional biopsy. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 59 (2001) 1007-1010; discussion 1011
4. Baird, A., Durkin, T. Inhibition of endothelial cell proliferation by type beta-transforming growth factor: interactions with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochemical and biophysical research communications*. 138 (1986) 476-482
5. Bartelink, H., Breur, K., Hart, G., Annyas, B., van Slooten, E., Snow, G. The value of postoperative radiotherapy as an adjuvant to radical neck dissection. *Cancer*. 52 (1983) 1008-1013
6. Baumann, M., Molls, M. "Radioonkologie Grundlagen" Zuckschwerdt Verlag, München, 2003
7. Belka, C., Abend, M. Mechanismen und Formen des Zelltodes. In: "Radioonkologie Grundlagen", Bamberg, M., Molls, M., Sack, H. (Hrsg.) Zuckschwerdt Verlag, München, 2003, 208-219
8. Belka, C., Jendrossek, V., Pruschy, M., Vink, S., Verheij, M., Budach, W. Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status

and outlook. International journal of radiation oncology, biology, physics. 58 (2004) 542-554

9. Bernhard, E.J., McKenna, W.G., Muschel, R.J. Radiosensitivity and the cell cycle. The cancer journal from Scientific American. 5 (1999) 194-204

10. Bernier, J. [Adjuvant treatment of head and neck cancers: advances and challenges]. Bulletin du cancer. 94 (2007) 823-827

11. Bernier, J., Dometge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefebvre, J.L., Greiner, R.H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., Cognetti, F., Bourhis, J., Kirkpatrick, A., van Glabbeke, M., European Organization for, R., Treatment of Cancer, T. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. The New England journal of medicine. 350 (2004) 1945-1952

12. Bootz, F., Howaldt, H.P., Mergenthaler, H.G., Wendt, T. Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes. In: "Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien", Garbe, C. (Hrsg.) Deutsche Krebsgesellschaft e.V. W. Zuckschwerdt, München Wien New York, 2008

13. Border, W.A., Noble, N.A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. The New England journal of medicine. 331 (1994) 1286-1292

14. Bosetti, C., Talamini, R., Levi, F., Negri, E., Franceschi, S., Airoldi, L., La Vecchia, C. Fried foods: a risk factor for laryngeal cancer? British journal of cancer. 87 (2002) 1230-1233

15. Braff, M.H., Bardan, A., Nizet, V., Gallo, R.L. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. The Journal of investigative dermatology. 125 (2005) 9-13

16. Budach, V., Stuschke, M., Budach, W., Baumann, M., Geismar, D., Grabenbauer, G., Lammert, I., Jahnke, K., Stueben, G., Herrmann, T.,

Bamberg, M., Wust, P., Hinkelbein, W., Wernecke, K.D. Hyperfractionated accelerated chemoradiation with concurrent fluorouracil-mitomycin is more effective than dose-escalated hyperfractionated accelerated radiation therapy alone in locally advanced head and neck cancer: final results of the radiotherapy cooperative clinical trials group of the German Cancer Society 95-06 Prospective Randomized Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23 (2005) 1125-1135

17. Calais, G., Alfonsi, M., Bardet, E., Sire, C., Germain, T., Bergerot, P., Rhein, B., Tortochaux, J., Oudinot, P., Bertrand, P. Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 91 (1999) 2081-2086

18. Chiarini, L., De Santis, G., Bedogni, A., Nocini, P.F. Lining the mouth floor with prelaminate fascio-mucosal free flaps: clinical experience. *Microsurgery*. 22 (2002) 177-186

19. Chow, T.L., Lee, D.T., Choi, C.Y., Chan, T.T., Lam, S.H. Prediction of simultaneous esophageal lesions in head and neck squamous cell carcinoma: a multivariate analysis. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 135 (2009) 882-885

20. Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 193 (2003) 3-34

21. Corrao, G., Bagnardi, V., Vittadini, G., Favilli, S. Capture-recapture methods to size alcohol related problems in a population. *Journal of epidemiology and community health*. 54 (2000) 603-610

22. Cox, J.D., Stetz, J., Pajak, T.F. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and

Treatment of Cancer (EORTC). International journal of radiation oncology, biology, physics. 31 (1995) 1341-1346

23. Crean, S.J., Hoffman, A., Potts, J., Fardy, M.J. Reduction of occult metastatic disease by extension of the supraomohyoid neck dissection to include level IV. Head & neck. 25 (2003) 758-762

24. Crile, G. III. On the Technique of Operations upon the Head and Neck. Annals of surgery. 44 (1906) 842-850

25. Critchley, J.A., Unal, B. Health effects associated with smokeless tobacco: a systematic review. Thorax. 58 (2003) 435-443

26. Cruz, G.D., Le Geros, R.Z., Ostroff, J.S., Hay, J.L., Kenigsberg, H., Franklin, D.M. Oral cancer knowledge, risk factors and characteristics of subjects in a large oral cancer screening program. Journal of the American Dental Association. 133 (2002) 1064-1071; quiz 1094

27. Dahlstrom, K.R., Adler-Storthz, K., Etzel, C.J., Liu, Z., Dillon, L., El-Naggar, A.K., Spitz, M.R., Schiller, J.T., Wei, Q., Sturgis, E.M. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 9 (2003) 2620-2626

28. Denis, F., Garaud, P., Bardet, E., Alfonsi, M., Sire, C., Germain, T., Bergerot, P., Rhein, B., Tortochaux, J., Oudinot, P., Calais, G. Late toxicity results of the GORTEC 94-01 randomized trial comparing radiotherapy with concomitant radiochemotherapy for advanced-stage oropharynx carcinoma: comparison of LENT/SOMA, RTOG/EORTC, and NCI-CTC scoring systems. International journal of radiation oncology, biology, physics. 55 (2003) 93-98

29. Devalia, H.L., Mansfield, L. Radiotherapy and wound healing. International wound journal. 5 (2008) 40-44

30. Dias, F.L., Kligerman, J., Matos de Sa, G., Arcuri, R.A., Freitas, E.Q., Farias, T., Matos, F., Lima, R.A. Elective neck dissection versus observation in stage I squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 125 (2001) 23-29
31. Dormand, E.L., Banwell, P.E., Goodacre, T.E. Radiotherapy and wound healing. *International wound journal*. 2 (2005) 112-127
32. El-Sayed, S., Nelson, N. Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region. A meta-analysis of prospective and randomized trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 14 (1996) 838-847
33. Epstein, J.B., Lunn, R., Le, N., Stevenson-Moore, P. Periodontal attachment loss in patients after head and neck radiation therapy. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 86 (1998) 673-677
34. Fajardo, L.F., Prionas, S.D., Kwan, H.H., Kowalski, J., Allison, A.C. Transforming growth factor beta1 induces angiogenesis in vivo with a threshold pattern. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 74 (1996) 600-608
35. Falanga, V., Zhou, L., Yufit, T. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. *Journal of cellular physiology*. 191 (2002) 42-50
36. Ferlito, A., Johnson, J.T., Rinaldo, A., Pratt, L.W., Fagan, J.J., Weir, N., Suarez, C., Folz, B.J., Bien, S., Towpik, E., Leemans, C.R., Bradley, P.J., Kowalski, L.P., Herranz, J., Gavilan, J., Olofsson, J. European surgeons were the first to perform neck dissection. *The Laryngoscope*. 117 (2007) 797-802

37. Fortin, A., Couture, C., Doucet, R., Albert, M., Allard, J., Tetu, B. Does histologic grade have a role in the management of head and neck cancers? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 19 (2001) 4107-4116
38. Fountzilas, G., Ciuleanu, E., Dafni, U., Plataniotis, G., Kalogera-Fountzila, A., Samantas, E., Athanassiou, E., Tzitzikas, J., Ciuleanu, T., Nikolaou, A., Pantelakos, P., Zaraboukas, T., Zamboglou, N., Daniilidis, J., Ghilezan, N. Concomitant radiochemotherapy vs radiotherapy alone in patients with head and neck cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group Phase III Study. *Medical oncology*. 21 (2004) 95-107
39. Fulton, C., Anderson, G.M., Zasloff, M., Bull, R., Quinn, A.G. Expression of natural peptide antibiotics in human skin. *Lancet*. 350 (1997) 1750-1751
40. Gallo, R.L., Huttner, K.M. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. *The Journal of investigative dermatology*. 111 (1998) 739-743
41. Ghafoori, P., Marks, L.B., Vujaskovic, Z., Kelsey, C.R. Radiation-induced lung injury. Assessment, management, and prevention. *Oncology*. 22 (2008) 37-47; discussion 52-33
42. Giacometti, A., Ghiselli, R., Cirioni, O., Mocchegiani, F., D'Amato, G., Orlando, F., Sisti, V., Kamysz, W., Silvestri, C., Naldoski, P., Lukasiak, J., Saba, V., Scalise, G. Therapeutic efficacy of the magainin analogue MSI-78 in different intra-abdominal sepsis rat models. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 54 (2004) 654-660
43. Gieringer, M., Gosepath, J., Naim, R. Radiotherapy and wound healing: principles, management and prospects (review). *Oncology reports*. 26 (2011) 299-307

44. Gilmore, K., Chen, P., Leung, K.P. Anti-microbial peptides for plaque control and beyond. *Journal of the California Dental Association*. 37 (2009) 779-788
45. Gopinath, D., Kumar, M.S., Selvaraj, D., Jayakumar, R. Pexiganan-incorporated collagen matrices for infected wound-healing processes in rat. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 73 (2005) 320-331
46. Gregor, R.T. Management of chyle fistulization in association with neck dissection. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 122 (2000) 434-439
47. Haddad, R.I., Shin, D.M. Recent advances in head and neck cancer. *The New England journal of medicine*. 359 (2008) 1143-1154
48. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schroder, J.M. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*. 387 (1997) 861
49. Hareyama, M., Nishio, M., Saito, A., Kagami, Y., Asano, K., Oouchi, A., Narimatsu, N., Somekawa, Y., Sanbe, S., Morita, K. Results of cesium needle interstitial implantation for carcinoma of the oral tongue. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 25 (1993) 29-34
50. Hatamochi, A., Ono, M., Arakawa, M., Takeda, K., Ueki, H. Analysis of collagen gene expression by cultured fibroblasts in morphea. *The British journal of dermatology*. 126 (1992) 216-221
51. Hausamen, J.E. [Tumor surgery]. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG*. 4 Suppl 1 (2000) S142-154
52. Hausamen, J.E., Machtens, E., Reuther, J., Eufinger, H., Kübler, A., Schliephake, H. "Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Operationslehre und -atlas" Springer, Berlin, 2012

53. Hayden, R.E., Deschler, D.G. Lateral thigh free flap for head and neck reconstruction. *The Laryngoscope*. 109 (1999) 1490-1494
54. Henk, J.M., Bishop, K., Shepherd, S.F. Treatment of head and neck cancer with CHART and nimorazole: phase II study. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 66 (2003) 65-70
55. Henseler, T., Christophers, E. Disease concomitance in psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 32 (1995) 982-986
56. Herrero, R., Castellsague, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B., Pintos, J., Fernandez, L., Idris, A., Sanchez, M.J., Nieto, A., Talamini, R., Tavani, A., Bosch, F.X., Reidel, U., Snijders, P.J., Meijer, C.J., Viscidi, R., Munoz, N., Franceschi, S., Group, I.M.O.C.S. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute*. 95 (2003) 1772-1783
57. Ho, C.M., Lam, K.H., Wei, W.I., Lau, W.F. Treatment of neck nodes in oral cancer. *Surgical oncology*. 1 (1992) 73-78
58. Hollows, P., McAndrew, P.G., Perini, M.G. Delays in the referral and treatment of oral squamous cell carcinoma. *British dental journal*. 188 (2000) 262-265
59. Holzle, F., Loeffelbein, D.J., Nolte, D., Wolff, K.D. Free flap monitoring using simultaneous non-invasive laser Doppler flowmetry and tissue spectrophotometry. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 34 (2006) 25-33
60. Hopewell, J.W., Calvo, W., Jaenke, R., Reinhold, H.S., Robbins, M.E., Whitehouse, E.M. Microvasculature and radiation damage. *Recent results in*

cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer. 130 (1993) 1-16

61. Howard, A., Pelc, S.R. Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. Nature. 167 (1951) 599-600

62. Huang, D.T., Johnson, C.R., Schmidt-Ullrich, R., Grimes, M. Postoperative radiotherapy in head and neck carcinoma with extracapsular lymph node extension and/or positive resection margins: a comparative study. International journal of radiation oncology, biology, physics. 23 (1992) 737-742

63. Iliakis, G. Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. Seminars in oncology. 24 (1997) 602-615

64. Iliakis, G., Tamulevicius, P. DNA-Reparatur und Checkpoint-Aktivierung. In: "Radioonkologie Grundlagen", Bamberg, M., Molls, M., Sack, H. (Hrsg.) Zuckschwerdt Verlag, München, 2003, 191-207

65. Illsley, M.C., Peacock, J.H., McAnulty, R.J., Yarnold, J.R. Increased collagen production in fibroblasts cultured from irradiated skin and effect of TGF beta(1)- clinical study. British journal of cancer. 83 (2000) 650-654

66. Iype, E.M., Sebastian, P., Mathew, A., Balagopal, P.G., Varghese, B.T., Thomas, S. The role of selective neck dissection (I-III) in the treatment of node negative (N0) neck in oral cancer. Oral oncology. 44 (2008) 1134-1138

67. Jeggo, P.A. DNA breakage and repair. Advances in genetics. 38 (1998) 185-218

68. Jesse, R.H., Fletcher, G.H. Treatment of the neck in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer. 39 (1977) 868-872

69. Jones, T.M., Hargrove, O., Lancaster, J., Fenton, J., Shenoy, A., Roland, N.J. Waiting times during the management of head and neck tumours. *The Journal of laryngology and otology*. 116 (2002) 275-279
70. Kaatsch, P., C., S., Hentschel, S., Katalinic, A., Luttmann, S., Stegmaier, C. "Krebs in Deutschland 2009/2010", Berlin, 2013
71. Kademani, D. Oral cancer. *Mayo Clinic proceedings*. 82 (2007) 878-887
72. Kathren, R.L. William H. Rollins (1852-1929): X-Ray Protection Pioneer. *Journal of the history of medicine and allied sciences*. 19 (1964) 287-294
73. Kaus, A., Jacobsen, F., Sorkin, M., Rittig, A., Voss, B., Daigeler, A., Sudhoff, H., Steinau, H.U., Steinstraesser, L. Host defence peptides in human burns. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 34 (2008) 32-40
74. Kesting, M.R. "Oral Cancer Surgery: A Visual Guide" Thieme, New York, 2014
75. Kesting, M.R., Mueller, C., Wagenpfeil, S., Stoeckelhuber, M., Steiner, T., Bauer, F., Teichmann, J., Baumann, C.M., Barthel, L.C., Satanovskij, R.M., Mucke, T., Schulte, M., Schutz, K., Wolff, K.D., Rohleder, N.H. Quantitative comparison of the expression of antimicrobial peptides in the oral mucosa and extraoral skin. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 50 (2012) 447-453
76. Kesting, M.R., Robitzky, L., Al-Benna, S., Steinstraesser, L., Baurecht, H., Wolff, K.D., Holzle, F., Nieberler, M., Mucke, T., Loeffelbein, D.J. Bronchoscopy screening in primary oral squamous cell carcinoma: a 10-year experience. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 47 (2009a) 279-283

77. Kesting, M.R., Schurr, C., Robitzky, L., Steinstraesser, L., Nieberler, M., Baurecht, H., Wolff, K.D., Loeffelbein, D.J., Mucke, T. Results of esophagogastroduodenoscopy in patients with oral squamous cell carcinoma--value of endoscopic screening: 10-year experience. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 67 (2009b) 1649-1655
78. Kesting, M.R., Stoeckelhuber, M., Holzle, F., Mucke, T., Neumann, K., Woermann, K., Jacobsen, F., Steinstraesser, L., Wolff, K.D., Loeffelbein, D.J., Rohleder, N.H. Expression of antimicrobial peptides in cutaneous infections after skin surgery. *The British journal of dermatology*. 163 (2010) 121-127
79. Koontongkaew, S., Chareonkitkajorn, L., Chanvitan, A., Leelakriangsak, M., Amornphimoltham, P. Alterations of p53, pRb, cyclin D(1) and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral oncology*. 36 (2000) 334-339
80. Kovacs, A.F. Relevance of positive margins in case of adjuvant therapy of oral cancer. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 33 (2004) 447-453
81. Kramer, F.J., Janssen, M., Eckardt, A. Second primary tumours in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical oral investigations*. 8 (2004) 56-62
82. Kropveld, A., Rozemuller, E.H., Leppers, F.G., Scheidel, K.C., de Weger, R.A., Koole, R., Hordijk, G.J., Slootweg, P.J., Tilanus, M.G. Sequencing analysis of RNA and DNA of exons 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of head and neck squamous cell cancers. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 79 (1999) 347-353

83. Lara, P.C., Russell, N.S., Smolders, I.J., Bartelink, H., Begg, A.C., Coco-Martin, J.M. Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production. *International journal of radiation biology*. 70 (1996) 683-692
84. Lawen, A. Apoptosis-an introduction. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 25 (2003) 888-896
85. Lee, K.C., Eckert, R.L. S100A7 (Psoriasin)--mechanism of antibacterial action in wounds. *The Journal of investigative dermatology*. 127 (2007) 945-957
86. Lefebvre, J.L., Coche-Dequeant, B., Buisset, E., Mirabel, X., Van, J.T., Prevost, B. Management of early oral cavity cancer. Experience of Centre Oscar Lambret. *European journal of cancer. Part B, Oral oncology*. 30B (1994) 216-220
87. Lehrer, R.I., Barton, A., Daher, K.A., Harwig, S.S., Ganz, T., Selsted, M.E. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *The Journal of clinical investigation*. 84 (1989) 553-561
88. Leslie, A., Fyfe, E., Guest, P., Goddard, P., Kabala, J.E. Staging of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a comparison of MRI and CT in T- and N-staging. *Journal of computer assisted tomography*. 23 (1999) 43-49
89. Levendag, P.C., Nowak, P.J., van der Sangen, M.J., Jansen, P.P., Eijkenboom, W.M., Planting, A.S., Meeuwis, C.A., van Putten, W.L. Local tumor control in radiation therapy of cancers in the head and neck. *American journal of clinical oncology*. 19 (1996) 469-477
90. Levi, F., Pasche, C., Lucchini, F., Chatenoud, L., Jacobs, D.R., Jr., La Vecchia, C. Refined and whole grain cereals and the risk of oral, oesophageal and laryngeal cancer. *European journal of clinical nutrition*. 54 (2000) 487-489

91. Li, C.Y., Chen, X.H., Tao, X.A., Xia, J., Cheng, B. The development and inflammatory features of radiotherapy-induced glossitis in rats. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 16 (2011) e348-353
92. Liaw, G.A., Yen, C.Y., Chiang, W.F., Lee, C.H., Yang, C., Chiou, C.T., Liu, S.Y. Outcome of treatment with total main tumor resection and supraomohyoid neck dissection in oral squamous cell carcinoma. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 105 (2006) 971-977
93. Lipsky, B.A., Holroyd, K.J., Zasloff, M. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 47 (2008) 1537-1545
94. Liu, A.Y., Destoumieux, D., Wong, A.V., Park, C.H., Valore, E.V., Liu, L., Ganz, T. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *The Journal of investigative dermatology*. 118 (2002) 275-281
95. Loeffelbein, D.J., Steinstraesser, L., Rohleder, N.H., Hasler, R.J., Jacobsen, F., Schulte, M., Schnorrenberg, J., Holzle, F., Wolff, K.D., Kesting, M.R. Expression of host defence peptides in the lip vermilion mucosa during early infancy. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 40 (2011) 598-603
96. Loree, T.R., Strong, E.W. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *American journal of surgery*. 160 (1990) 410-414
97. Lundahl, R.E., Foote, R.L., Bonner, J.A., Suman, V.J., Lewis, J.E., Kasperbauer, J.L., McCaffrey, T.V., Olsen, K.D. Combined neck dissection and postoperative radiation therapy in the management of the high-risk neck: a

matched-pair analysis. International journal of radiation oncology, biology, physics. 40 (1998) 529-534

98. Macfarlane, G.J., Boyle, P., Scully, C. Oral cancer in Scotland: changing incidence and mortality. Bmj. 305 (1992) 1121-1123

99. Macfee, W.F. Transverse incisions for neck dissection. Annals of surgery. 151 (1960) 279-284

100. Madsen, P., Rasmussen, H.H., Leffers, H., Honore, B., Dejgaard, K., Olsen, E., Kiil, J., Walbum, E., Andersen, A.H., Basse, B., et al. Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin. The Journal of investigative dermatology. 97 (1991) 701-712

101. Maity, A., McKenna, W.G., Muschel, R.J. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 31 (1994) 1-13

102. Makitie, A.A., Beasley, N.J., Neligan, P.C., Lipa, J., Gullane, P.J., Gilbert, R.W. Head and neck reconstruction with anterolateral thigh flap. Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 129 (2003) 547-555

103. Martin, H., Del Valle, B., Ehrlich, H., Cahan, W.G. Neck dissection. Cancer. 4 (1951) 441-499

104. Martin, M., Lefaix, J., Delanian, S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? International journal of radiation oncology, biology, physics. 47 (2000) 277-290

105. Martin, M., Lefaix, J.L., Pinton, P., Crechet, F., Daburon, F. Temporal modulation of TGF-beta 1 and beta-actin gene expression in pig skin and muscular fibrosis after ionizing radiation. *Radiation research*. 134 (1993) 63-70
106. Mazon, J.J., Crook, J.M., Benck, V., Marinello, G., Martin, M., Raynal, M., Haddad, E., Peynegre, R., Le Bourgeois, J.P., Walop, W., et al. Iridium 192 implantation of T1 and T2 carcinomas of the mobile tongue. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 19 (1990) 1369-1376
107. McGuirt, W.F., Jr., Johnson, J.T., Myers, E.N., Rothfield, R., Wagner, R. Floor of mouth carcinoma. The management of the clinically negative neck. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 121 (1995) 278-282
108. Michalek, M., Gelhaus, C., Hecht, O., Podschun, R., Schroder, J.M., Leippe, M., Grotzinger, J. The human antimicrobial protein psoriasin acts by permeabilization of bacterial membranes. *Developmental and comparative immunology*. 33 (2009) 740-746
109. Mueller, C.K., Thorwarth, M., Schultze-Mosgau, S. Late changes in cutaneous gene expression patterns after adjuvant treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC) by radiation therapy. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 109 (2010) 694-699
110. Nason, R.W., Binahmed, A., Torchia, M.G., Thliversis, J. Clinical observations of the anatomy and function of the marginal mandibular nerve. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 36 (2007) 712-715
111. Oreggia, F., De Stefani, E., Boffetta, P., Brennan, P., Deneo-Pellegrini, H., Ronco, A.L. Meat, fat and risk of laryngeal cancer: a case-control study in Uruguay. *Oral oncology*. 37 (2001) 141-145
112. Parsons, J.T., Mendenhall, W.M., Stringer, S.P., Cassisi, N.J., Million, R.R. An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation

for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 39 (1997) 137-148

113. Pellini, R., Mercante, G., Marchese, C., Terenzi, V., Sperduti, I., Manciocco, V., Ruscito, P., Cristalli, G., Marchesi, P., Pichi, B., Spriano, G. Predictive factors for postoperative wound complications after neck dissection. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*. 33 (2013) 16-22

114. Pernot, M., Hoffstetter, S., Peiffert, D., Luporsi, E., Marchal, C., Kozminski, P., Dartois, D., Bey, P. Epidermoid carcinomas of the floor of mouth treated by exclusive irradiation: statistical study of a series of 207 cases. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 35 (1995) 177-185

115. Pernot, M., Malissard, L., Hoffstetter, S., Luporsi, E., Peiffert, D., Aletti, P., Kozminski, P., Bey, P. The study of tumoral, radiobiological, and general health factors that influence results and complications in a series of 448 oral tongue carcinomas treated exclusively by irradiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 29 (1994) 673-679

116. Pignon, J.P., Bourhis, J., Domenge, C., Designe, L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. *Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer*. *Lancet*. 355 (2000) 949-955

117. Pitiphat, W., Diehl, S.R., Laskaris, G., Cartsos, V., Douglass, C.W., Zavras, A.I. Factors associated with delay in the diagnosis of oral cancer. *Journal of dental research*. 81 (2002) 192-197

118. Rajan, V., Varghese, B., Van Leeuwen, T.G., Steenbergen, W. Influence of tissue optical properties on laser Doppler perfusion imaging, accounting for

photon penetration depth and the laser speckle phenomenon. *Journal of biomedical optics*. 13 (2008) 024001

119. Randall, K., Coggle, J.E. Expression of transforming growth factor-beta 1 in mouse skin during the acute phase of radiation damage. *International journal of radiation biology*. 68 (1995) 301-309

120. Rau, A. 2005. *Tiefenselektives, simultanes und noninvasives Monitoring der Oxygenation und Perfusion von mikrochirurgischen Radialis- und Fibulatransplantaten, Dissertationsschrift*. Ruhr-Universität Bochum.

121. Reimers, N., Kasper, H.U., Weissenborn, S.J., Stutzer, H., Preuss, S.F., Hoffmann, T.K., Speel, E.J., Dienes, H.P., Pfister, H.J., Guntinas-Lichius, O., Klusmann, J.P. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 120 (2007) 1731-1738

122. Robbins, K.T., Clayman, G., Levine, P.A., Medina, J., Sessions, R., Shaha, A., Som, P., Wolf, G.T., American, H., Neck, S., American Academy of, O.-H., Neck, S. Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 128 (2002) 751-758

123. Rodgers, L.W., Jr., Stringer, S.P., Mendenhall, W.M., Parsons, J.T., Cassisi, N.J., Million, R.R. Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head & neck*. 15 (1993) 16-19

124. Rogers, S.N., Brown, J.S., Woolgar, J.A., Lowe, D., Magennis, P., Shaw, R.J., Sutton, D., Errington, D., Vaughan, D. Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral oncology*. 45 (2009) 201-211

125. Rohleder, N.H. 2015. *Wundheilungsstörungen in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie: Erkenntnisse zur molekularbiologischen Grundlagen, chirurgischen Therapieoptionen und Prädiktionsmöglichkeiten.*, Technische Universität München, im Druck.
126. Rohleder, N.H., Flensberg, S., Bauer, F., Wagenpfeil, S., Wales, C.J., Koerdt, S., Wolff, K.D., Holzle, F., Steiner, T., Kesting, M.R. Can tissue spectrophotometry and laser Doppler flowmetry help to identify patients at risk for wound healing disorders after neck dissection? *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology.* 117 (2014) 302-311
127. Rosenthal, D.I., Ang, K.K. Altered radiation therapy fractionation, chemoradiation, and patient selection for the treatment of head and neck squamous carcinoma. *Seminars in radiation oncology.* 14 (2004) 153-166
128. Rudolph, R., Tripuraneni, P., Koziol, J.A., McKean-Matthews, M., Frutos, A. Normal transcutaneous oxygen pressure in skin after radiation therapy for cancer. *Cancer.* 74 (1994) 3063-3070
129. Ruocco, V. The immunocompromised district: How the pieces of the puzzle gradually fell into place. *Clinics in dermatology.* 32 (2014) 549-552
130. Ruocco, V., Ruocco, E., Piccolo, V., Brunetti, G., Guerrera, L.P., Wolf, R. The immunocompromised district in dermatology: A unifying pathogenic view of the regional immune dysregulation. *Clinics in dermatology.* 32 (2014) 569-576
131. Ryan, K.M., Phillips, A.C., Vousden, K.H. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current opinion in cell biology.* 13 (2001) 332-337
132. Sankaranarayanan, R., Masuyer, E., Swaminathan, R., Ferlay, J., Whelan, S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer research.* 18 (1998) 4779-4786

133. Sassi, M., Jukkola, A., Riekkilä, R., Hoyhtya, M., Risteli, L., Oikarinen, A., Risteli, J. Type I collagen turnover and cross-linking are increased in irradiated skin of breast cancer patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 58 (2001) 317-323
134. Schitteck, B., Paulmann, M., Senyurek, I., Steffen, H. The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infectious disorders drug targets*. 8 (2008) 135-143
135. Schmitt, P., Kotas, M., Tobermann, A., Haase, A., Flentje, M. Quantitative tissue perfusion measurements in head and neck carcinoma patients before and during radiation therapy with a non-invasive MR imaging spin-labeling technique. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 67 (2003) 27-34
136. Schoelch, M.L., Regezi, J.A., Dekker, N.P., Ng, I.O., McMillan, A., Ziober, B.L., Le, Q.T., Silverman, S., Fu, K.K. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 35 (1999) 333-342
137. Schultze-Mosgau, S., Erbe, M., Keilholz, L., Radespiel-Troger, M., Wiltfang, J., Minge, N., Neukam, F.W. Histomorphometric analysis of irradiated recipient vessels and transplant vessels of free flaps in patients undergoing reconstruction after ablative surgery. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 29 (2000) 112-118
138. Schultze-Mosgau, S., Grabenbauer, G.G., Radespiel-Troger, M., Wiltfang, J., Ries, J., Neukam, F.W., Rodel, F. 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 (2002a) 42-51
139. Schultze-Mosgau, S., Kopp, J., Thorwarth, M., Rodel, F., Melnychenko, I., Grabenbauer, G.G., Amann, K., Wehrhan, F. Plasminogen activator inhibitor-I-

related regulation of procollagen I (alpha1 and alpha2) by antitransforming growth factor-beta1 treatment during radiation-impaired wound healing. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 64 (2006) 280-288

140. Schultze-Mosgau, S., Rodel, F., Radespiel-Troger, M., Worl, J., Grabenbauer, G.G., Neukam, F.W. Vascularization of the area between free grafts and irradiated graft beds in the neck in rats. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 40 (2002b) 37-44

141. Smith, G.I., O'Brien, C.J., Clark, J., Shannon, K.F., Clifford, A.R., McNeil, E.B., Gao, K. Management of the neck in patients with T1 and T2 cancer in the mouth. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 42 (2004) 494-500

142. Sorensen, O.E., Thapa, D.R., Rosenthal, A., Liu, L., Roberts, A.A., Ganz, T. Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *Journal of immunology*. 174 (2005) 4870-4879

143. Spiro, R.H., Guillaumondegui, O., Jr., Paulino, A.F., Huvos, A.G. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head & neck*. 21 (1999) 408-413

144. Staar, S., Rudat, V., Stuetzer, H., Dietz, A., Volling, P., Schroeder, M., Flentje, M., Eckel, H.E., Mueller, R.P. Intensified hyperfractionated accelerated radiotherapy limits the additional benefit of simultaneous chemotherapy--results of a multicentric randomized German trial in advanced head-and-neck cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 50 (2001) 1161-1171

145. Steinstraesser, L., Koehler, T., Jacobsen, F., Daigeler, A., Goertz, O., Langer, S., Kesting, M., Steinau, H., Eriksson, E., Hirsch, T. Host defense peptides in wound healing. *Molecular medicine*. 14 (2008) 528-537

146. Steinstraesser, L., Kraneburg, U.M., Hirsch, T., Kesting, M., Steinau, H.U., Jacobsen, F., Al-Benna, S. Host defense peptides as effector molecules of the innate immune response: a sledgehammer for drug resistance? *International journal of molecular sciences*. 10 (2009) 3951-3970
147. Stoeckelhuber, M., Matthias, C., Andratschke, M., Stoeckelhuber, B.M., Koehler, C., Herzmann, S., Sulz, A., Welsch, U. Human ceruminous gland: ultrastructure and histochemical analysis of antimicrobial and cytoskeletal components. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 288 (2006) 877-884
148. Streffer, C. Biologische Grundlagen der Strahlentherapie. In: "Strahlentherapie: Radiologische Onkologie", Scherer, E., Sack, H. (Hrsg.) Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1996, 109-153
149. Suh, J.D., Sercarz, J.A., Abemayor, E., Calcaterra, T.C., Rawnsley, J.D., Alam, D., Blackwell, K.E. Analysis of outcome and complications in 400 cases of microvascular head and neck reconstruction. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 130 (2004) 962-966
150. Talamini, R., Bosetti, C., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Levi, F., Bidoli, E., Negri, E., Pasche, C., Vaccarella, S., Barzan, L., Franceschi, S. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer causes & control : CCC*. 13 (2002) 957-964
151. Thompson, L.H., Schild, D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutation research*. 509 (2002) 49-78
152. Thönnessen, D., Hof, H., Krempien, M., Münter, W., Bischof, K., Herfarth, K., Schulz-Ertner, D., Fleckenstein, K. Kopf-Hals-Tumoren. In: "Strahlentherapie", Wannemacher, M., Wenz, F., Debus, J. (Hrsg.) Springer, Berlin Heidelberg, 2012, 431-517

153. Thorn, J.J., Hansen, H.S., Specht, L., Bastholt, L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 58 (2000) 1088-1093; discussion 1093-1085
154. Thorn, J.J., Kallehave, F., Westergaard, P., Hansen, E.H., Gottrup, F. The effect of hyperbaric oxygen on irradiated oral tissues: transmucosal oxygen tension measurements. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 55 (1997) 1103-1107
155. Tong, A.C., Leung, A.C., Cheng, J.C., Sham, J. Incidence of complicated healing and osteoradionecrosis following tooth extraction in patients receiving radiotherapy for treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Australian dental journal*. 44 (1999) 187-194
156. Tribius, S., Sommer, J., Prosch, C., Bajrovic, A., Muenscher, A., Blessmann, M., Kruell, A., Petersen, C., Todorovic, M., Tennstedt, P. Xerostomia after radiotherapy. What matters--mean total dose or dose to each parotid gland? *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]*. 189 (2013) 216-222
157. Turner, S.L., Slevin, N.J., Gupta, N.K., Swindell, R. Radical external beam radiotherapy for 333 squamous carcinomas of the oral cavity--evaluation of late morbidity and a watch policy for the clinically negative neck. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 41 (1996) 21-29
158. Vaara, M. New approaches in peptide antibiotics. *Current opinion in pharmacology*. 9 (2009) 571-576

159. van der Waal, I., Scully, C. Oral cancer: comprehending the condition, causes, controversies, control and consequences. 6. Co-morbidities. Dental update. 38 (2011) 283-284
160. Vegesna, V., McBride, W.H., Taylor, J.M., Withers, H.R. The effect of interleukin-1 beta or transforming growth factor-beta on radiation-impaired murine skin wound healing. The Journal of surgical research. 59 (1995) 699-704
161. Vidiri, A., Guerrisi, A., Pellini, R., Manciocco, V., Covello, R., Mattioni, O., Guerrisi, I., Di Giovanni, S., Spriano, G., Crecco, M. Multi-detector row computed tomography (MDCT) and magnetic resonance imaging (MRI) in the evaluation of the mandibular invasion by squamous cell carcinomas (SCC) of the oral cavity. Correlation with pathological data. Journal of experimental & clinical cancer research : CR. 29 (2010) 73
162. Vidiri, A., Ruscito, P., Pichi, B., Pellini, R., Covello, R., Sperduti, I., Di Giovanni, S., Spriano, G., Crecco, M. Oral cavity and base of the tongue tumors. Correlation between clinical, MRI and pathological staging of primary tumor. Journal of experimental & clinical cancer research : CR. 26 (2007) 575-582
163. Wang, J., Boerma, M., Fu, Q., Hauer-Jensen, M. Radiation responses in skin and connective tissues: effect on wound healing and surgical outcome. Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery. 10 (2006) 502-506
164. Weijers, M., Snow, G.B., Bezemer, P.D., van der Wal, J.E., van der Waal, I. The clinical relevance of epithelial dysplasia in the surgical margins of tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma: an analysis of 37 patients. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 31 (2002) 11-15

165. Wendt, T.G., Grabenbauer, G.G., Rodel, C.M., Thiel, H.J., Aydin, H., Rohloff, R., Wustrow, T.P., Iro, H., Popella, C., Schalhorn, A. Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer: a randomized multicenter study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 16 (1998) 1318-1324
166. Werner, J.A. Richtung und Ausmaß der lymphogenen Metastasierung. In: "Lymphknotenerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich. Onkologie und Differentialdiagnose", Werner, J.A. (Hrsg.) Springer, Heidelberg, 2002, 171-181
167. Westbury, C.B., Pearson, A., Nerurkar, A., Reis-Filho, J.S., Steele, D., Peckitt, C., Sharp, G., Yarnold, J.R. Hypoxia can be detected in irradiated normal human tissue: a study using the hypoxic marker pimonidazole hydrochloride. *The British journal of radiology*. 80 (2007) 934-938
168. Wipke-Tevis, D.D., Stotts, N.A., Williams, D.A., Froelicher, E.S., Hunt, T.K. Tissue oxygenation, perfusion, and position in patients with venous leg ulcers. *Nursing research*. 50 (2001) 24-32
169. Wittekind, C., Klimpfinger, M., Sobin, L. "TNM-Atlas" Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, 2005
170. Wolf, R., Howard, O.M., Dong, H.F., Voscopoulos, C., Boeshans, K., Winston, J., Divi, R., Gunsior, M., Goldsmith, P., Ahvazi, B., Chavakis, T., Oppenheim, J.J., Yuspa, S.H. Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15. *Journal of immunology*. 181 (2008) 1499-1506
171. Wolfensberger, M., Zbaeren, P., Dulguerov, P., Muller, W., Arnoux, A., Schmid, S. Surgical treatment of early oral carcinoma-results of a prospective controlled multicenter study. *Head & neck*. 23 (2001) 525-530

172. Wolff, K.D., Bootz, F., Beck, J., Bikowski, K., Böhme, P., Budach, W., Burkhardt, A., Danker, H., Eberhardt, W., Engers, K., Fietkau, R., Frerich, B., Gauler, T., Germann, G., Gittler-Hebestreit, N., Grötz, K., Horch, R., Ihrler, S., Keilholz, U., Lell, M., Lübke, A., Mantey, W., Nusser-Müller-Busch, R., Pistner, H., Paradies, K., Reichert, T., Reinert, S., Schliephake, H., Schmitter, M., Singer, S., Westhofen, M., Wirz, S., Wittlinger, M. "S3 Leitlinie Mundhöhlenkarzinom" AWMW, Berlin, 2012

173. Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J.M., Wang, J.M., Howard, O.M., Oppenheim, J.J. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 286 (1999) 525-528

174. Zhao, C., Wang, I., Lehrer, R.I. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS letters*. 396 (1996) 319-322

## 7 **Abbildungsverzeichnis**

1.1	Zervikale Wundheilungsstörung nach selektiver Neck Dissection.....	9
2.1	O2C-Gerät der Firma LEA Medizintechnik GmbH.....	38
2.2	Agarose Gelelektrophorese für $\alpha$ -I-Prokollagen.....	46
3.1	Box-plot Diagramm der Ergebnisse der O2C-Messungen I.....	55
3.2	Box-plot Diagramm der Ergebnisse der O2C-Messungen II.....	57
3.3	ROC-Kurven Analyse.....	58
3.4	HE-Färbung.....	60
3.5	Box-plot Diagramm zur Darstellung der Dicke der Epidermis.....	61
3.6	Masson Trichrom Färbung.....	62
3.7	Immunhistochemische Färbungen I.....	64
3.8	Box-plot Diagramm zur Darstellung der Anzahl an Blutgefäßen.....	65
3.9	Immunhistochemische Färbungen II.....	66
3.10	Immunhistochemische Färbungen III.....	67
3.11	Box-plot der RT-PCR Expressionsanalyse I.....	69
3.12	Box-plot der RT-PCR Expressionsanalyse II.....	70
3.13	Box-plot der RT-PCR Expressionsanalyse III.....	73

**8 Tabellenverzeichnis**

1.1	Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland.....	11
1.2	Klinische Symptome des Mundhöhlenkarzinoms.....	13
1.3	Metastasierungsfrequenz von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich.....	15
1.4	Anatomische Grenzen der Level und Sublevel am Hals.....	16
1.5	Nomenklatur der Halslymphknotenausräumungen.....	17
1.6	Grundsätzliche Dosiskonzepte für Einzeldosen von 1,8-2 Gy in der primären Bestrahlung.....	22
1.7	Grundsätzliche Dosiskonzepte für Einzeldosen von 1,8-2 Gy in der postoperativen Bestrahlung.....	23
2.1	Verwendete histologische Färbungen.....	41
2.2	Übersicht der verwendeten Antikörper.....	43
2.3	Übersicht der verwendeten Primer für die qRT-PCR.....	47
2.4	RNA/Primer Mischungsverhältnisse.....	50
2.5	Algorithmus der qRT-PCR.....	51
3.1	Vergleich klinischer Daten I.....	53
3.2	Vergleich klinischer Daten II.....	54
3.3	Multivariate Analyse.....	54
3.4	Gewebespektroskopie und Laser-Doppler Spektroskopie in Patienten mit und ohne Strahlentherapie.....	56

3.5	Gewebespektroskopie und Laser-Doppler Spektroskopie in Patienten mit und ohne Wundheilungsstörungen.....	56
3.6	Ergebnisse der ROC Kurven Analyse.....	59
3.7	Ergebnisse der RT-PCR Expressionsanalyse I.....	71
3.8	Ergebnisse der RT-PCR Expressionsanalyse II.....	71