
**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-
Gesichtschirurgie**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr.h.c. U. Joos

**Die Vaskularisation humanen Narbengewebes intra- und
extraoralen Ursprungs-
eine histologische Studie**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

vorgelegt von Knapp, Alexandra
aus Darmstadt
2006

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dr. J. Kleinheinz

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. U. Stratmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Januar 2006

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr.h.c. U. Joos

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. J. Kleinheinz

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. U. Stratmann

Zusammenfassung

Knapp, Alexandra

Die Vaskularisation humanen Narbengewebes intra- und extraoralen Ursprungs - eine histologische Studie.

Diese Studie untersucht die Vaskularisation von intra- und extraoralem Narbengewebe humanen Ursprungs. Neben der Deskription der Morphologie der einzelnen Gewebearten anhand von Semidünnschnitten erfolgte die Darstellung der Gefäße innerhalb der Gewebeproben mittels immunhistochemischer Methoden. Weiterhin wurde das Verteilungsmuster der Gefäße deskriptiv ermittelt. Die Ergebnisse der Statistik bezüglich der Gefäßdichte korrelieren mit den Erkenntnissen der Fachliteratur. Demnach zeigt sich die Vaskularisation der Mundschleimhaut gegenüber der äußeren Haut deutlich erhöht. Diese stellte sich sowohl bei den intraoralen Narbenpräparaten als auch bei den entsprechenden Referenzproben im Durchschnitt deutlich größer dar, als innerhalb der extraoralen Präparate. Eine ausgeprägte Narbenbildung war im Vergleich zu den extraoralen Präparaten histologisch nicht klar erkennbar. Übereinstimmend mit der Fachliteratur präsentierte sich auch das Verteilungsmuster der Gefäße.

Wundheilung; Narbenbildung; Mundschleimhaut; Haut; Histologie; Immunhistochemie; Angiogenese

Die Genehmigungen durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der WWU Münster für die Durchführung der o.g. Studie erfolgten am 15.11.97 und 05.11.01 (Reg.Nr.: 11XKlei1).

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Januar 2006



für

Mama, Papa

&

Tommi



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Liste der verwendeten Abkürzungen	
1 Einleitung	9
1.1 Einführung in die Thematik	9
1.2 Prinzipien der Wundheilung	11
2 Aufgabenstellung	21
3 Material und Methode	22
3.1 Probengewinnung	22
3.2 Analysemethoden	23
3.2.1 Lichtmikroskopie	23
3.2.1.1 Paraffineinbettung	23
3.2.1.2 Einbettung in Glycidether	25
3.2.1.3 Schnitthanfertigung	26
3.2.2 Immunhistologie	27
3.2.3 Färbemethoden	29
3.2.4 Auswertung	30
3.2.4.1 Semidünnschnitte	30
3.2.4.2 Immunhistologisch aufbereitete Präparate	31

	Seite
4	Ergebnisse 34
4.1	Beschreibung des Probenumfangs34
4.2	Darstellung und Deskription der Morphologie der Semidünnschnitte38
4.3	Darstellung und Deskription der immunhistologisch behandelten Präparate.....42
4.4	Statistische Analyse.....49
4.4.1	Tabellen zur Stichproben-Deskription..... 49
4.4.2	Tabellen und Grafiken zur Hypothesen-Testung..... 51
5	Diskussion..... 57
6	Zusammenfassung..... 68
7	Literaturverzeichnis 70
8	Danksagung..... 80
9	Lebenslauf..... 81
	Anhang I
	Abbildungsverzeichnis..... IV
	Bildverzeichnis..... V
	Verzeichnis der Tabellen VI
	Genehmigung der Ethik-Kommission VII
	Genehmigung vom 15.11.97VIII
	Genehmigung vom 05.11.01 IV

Liste der verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Beschreibung
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
CSA	catalyzed signal amplification system
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
ECM	Extrazelluläre Matrixproteine
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
et al.	und andere
FGF- β	fibroblast growth factor β
GE	Glycid- Ether
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich- Peroxidase)
IGF	insulin- like growth factor
Il- 1	Interleukin 1
IQR	Interquartilabstände
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
PBS	phosphat buffered saline (Phosphatpuffer)
PC	Personalcomputer

Abkürzung	Beschreibung
PDGF	platelet derived growth factor
Prop.	Propylen
µm	Mikrometer
RT	Raumtemperatur
SPSS	<u>S</u> uperior <u>P</u> erforming <u>S</u> oftware <u>S</u> ystem
Tab.	Tabelle
TGF- α	transforming growth factor α
TNF- α	tumor necrosis factor α
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
vWF	von Willebrand Faktor

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Der Prozess der Wundheilung wird seit langer Zeit intensiv erforscht. Neben den bereits bekannten, fundamentalen Erkenntnissen bleiben jedoch immer noch viele Fragen offen. Insbesondere im Bereich der Molekularbiologie, die z.B. auch die hormonelle Steuerung dieses sehr komplexen Prozesses durch Wachstumsfaktoren einschließt, gilt es noch viele Phänomene zu klären. Ein zentrales Element der Wundheilung stellt die Angiogenese dar, die neben ihrer herausragenden Bedeutung im Rahmen der Wundheilung auch bei der Embryonalentwicklung, dem Tumorwachstum und anderen pathologischen Veränderungen eine wesentliche Rolle spielt. Der Begriff „Angiogenese“ ist definiert als Neubildung von Blutgefäßen aus bereits existierenden Gefäßen der Umgebung [Folkman und Shing 1992, Cockerill et al. 1995, Risau 1997]. Sie ist die direkte Antwort auf lokale Anforderungen und stellt ein komplexes Phänomen dar.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt des Wundheilungsprozesses ist die Ausbildung von Reparations- bzw. Narbengewebe, deren Ausbildung den Abschluss des Wundheilungsprozesses darstellt.

Hierbei handelt es sich um einen physiologischen Vorgang mit dem Ziel des Wundverschlusses bzw. der Reparation des Gewebes. Eine restitutio ad integrum ist jedoch lediglich im Falle von bestimmten Gewebearten, wie z.B. Epithelien, Blut-, Knochen-, und Bindegewebszellen oder zur Embryonalzeit möglich [Schumann 2000]. Zu den Epithelgeweben zählt die Epidermis der Haut, ein klassisches Proliferations-/ bzw. „Wechselgewebe“ [Thomas et al.1995], deren vollständige Regeneration jedoch nur möglich ist, wenn die Basalmembran erhalten geblieben ist. Diese enthält die „unsterblichen“ Stammzellen (Basalzellen), von denen die Zellneubildung ausgeht. Bei Basalmembranen handelt es sich um ubiquitäre, extrazelluläre Matrixstrukturen, die unterschiedliche Gewebe trennen. Im Falle der Haut handelt es sich um die dermoepidermale Junktionszone [Moll 2003], deren Aufgabe u.a. in der Kontrolle des Austauschs von Molekülen zwischen Zellen und Geweben besteht und der damit auch

eine wichtige Rolle bei Wundheilungsprozessen zukommt.

Je nach Größe des Defekts wird zur Herstellung mehr oder weniger Ersatz-, also Bindegewebe, benötigt. Die Tatsache, dass es sich bei dem Ersatzgewebe immer um Bindegewebe handelt, hängt zum einen mit der ausgeprägten Regenerationsfähigkeit und zum anderen mit der Struktur dieser Gewebeart zusammen. Erstere wird durch die sehr hohe Syntheseaktivität der Fibroblasten aufgrund ihres ausgeprägten rauen endoplasmatischen Retikulums und des Golgi- Apparates ermöglicht [Moll 2002]. Die Struktur, also die vorwiegend kollagenen Fasern vom Typ I und II [Schumann 2000], bewirken eine relativ hohe Stabilität bzw. Reißfestigkeit des Defektverschlusses, wenn auch nach etwa einem Jahr der unterschiedlichen Reifungsphasen nie mehr als 80% der ursprünglichen Reißfestigkeit erreicht werden [Kanzler 1986].

Weiterhin beeinflussen viele verschiedene Faktoren den Wundheilungsprozess im Allgemeinen und die Narbenbildung im Besonderen [Joos et al. 1994, Schumann 2000, Rockwell 1989, Thomas et al. 1994]. Eine besondere Problematik beinhaltet auch die Ausbildung pathologischer Formen, wie zum Beispiel hypertrophe Narben oder Keloide.

1.2 Prinzipien der Wundheilung

Die Wundheilung umfasst einen kaskadenartigen Ablauf komplexer physiologischer Vorgänge, die entweder die Regeneration ad integrum oder aber die Reparatur, also die Ausbildung einer Narbe, zur Folge hat.

Für beide Formen der Heilung ist entscheidend, in welchem Maße der Organismus, speziell das Immunsystem, die Fähigkeit besitzt, diesen komplexen Prozess zu steuern und zu regulieren. Liegt eine Störung des Immunsystems vor, z.B. bedingt durch Infektionskrankheiten der unterschiedlichsten Art, Malnutrition, Alkohol-und/ oder Nikotinabusus, Immunsuppression aufgrund medikamentöser Therapie etc., kann es zu Wundheilungsstörungen in Form chronischer, nicht heilender Wunden oder aber zur Ausbildung hypertropher Narben bis hin zu Keloiden kommen.

Klinisch werden im Wesentlichen zwei Formen der Wundheilung unterschieden [Schumann 2000]:

- I) Sanatio per primam intentionem
- II) Sanatio per secundam intentionem

Ad I.) Bei dieser Form der Wundheilung liegt kein oder lediglich ein sehr geringer Gewebsdefekt vor, sodass nur eine sehr geringe Menge an Zwischen- (Ersatz) Gewebe gebildet werden muss und die Wundränder nahezu spaltfrei einander angenähert werden können. Der epitheliale Verschluss dieser Wunde ist nach ca. 6- 8 Tagen abgeschlossen und die bindegewebige Narbe ist aufgrund des fehlenden Defekts nur gering ausgebildet [Schumann 2000, Thomas 1995]. Diese Form des Wundverschlusses wird in der Chirurgie angestrebt.

Ad II.) Diese Form der Wundheilung verläuft klinisch (nicht biologisch) völlig anders. Hierbei handelt es sich um den Verschluss von Defektwunden mit klaffenden Wundrändern, deren Epithelisierung und das Auffüllen des Gewebsdefektes mittels bindegewebigen Ersatzmaterials wesentlich mehr Zeit in Anspruch nimmt. Über die Dauer können jedoch keine genauen Angaben gemacht werden, da diese von der Größe des Defekts und vielen weiteren Faktoren abhängt. Eine besondere Problematik besteht in diesem Zusammenhang bei der Heilung von großflächigen Wunden, wie z.B. Brandwunden, in deren Folge sich häufig Extremformen von Narben, wie z.B. Keloide entwickeln.

Eine vollständige Regeneration, also eine restitutio ad integrum, ist nur bei bestimmten Geweben und speziellen Voraussetzungen möglich.

Der prinzipielle Ablauf bei allen drei Formen der Heilung folgt jedoch immer den im Folgenden beschriebenen Phasen:

- Entzündungsphase
- Proliferationsphase
- Reifung

[Thomas 1995, Schumann 2000, Hunt 1990, Kanzler 1986].

Die komplexen physiologischen Vorgänge während der drei Phasen sollen im Folgenden dargestellt werden:

ad 1.) Entzündungsphase

Die Verletzung von Geweben und Gefäßen führt zur Freilegung subendothelialer Strukturen und demzufolge Exponierung gegenüber Blut und Bindegewebskomponenten.

Dies stellt einen adäquaten Reiz für die Auslösung der so genannten Gerinnungskaskade dar. Diese umfasst prinzipiell ein intrinsisches und ein extrinsisches System. Ersteres beinhaltet, neben der Kontraktion der verletzten Gefäße, ausgelöst durch verschiedene

Prostaglandine und Hormone [Petrides 2003], auch die Anheftung von Blutplättchen an freiliegendes Kollagen, aktiviert durch diverse Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, FGF- β), ADP und Tromboxan. Diese induzieren die bekannten Kardinalsymptome der Entzündung Rubor, Calor, Dolor, Tumor und Functio laesa. Weiterhin initiiert das intrinsische System die Bindung von vWF an „verklebte“ Plättchen. Der Aktivierung von Prothrombin und Fibrinogen folgt die Aktivierung von Faktor VII, welcher seinerseits u.a. das Komplementsystem aktiviert. Die Plättchenaggregation aktiviert die Gerinnungskaskade auch über das extrinsische System, indem Faktor VII an den Plättchenthrombus bindet und später mit Faktor V und X interagiert.

Weiterhin erfolgt während der Entzündungsphase die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Phagozytose von Bakterien, Freisetzung lysosomaler Enzyme zur Beseitigung von Gewebstrümmern). Der nachfolgenden Vasodilatation schließt sich die Akkumulation von Monozyten und Fibroblasten an. Makrophagen, im Gegensatz zu Leukozyten für eine ordnungsgemäße Wundheilung erwünscht [Schumann 2000], herrschen ab dem 5. Tag nach Verletzung vor. Sie sezernieren eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die für die Angiogenese und Fibroblastenproliferation von Bedeutung sind [Schumann 2000, Hunt 1990, Hammar 1993]. Das Ergebnis dieser Vorgänge, der Fibrin- Plättchen- Thrombus, bildet die Matrix für die zweite Phase der Wundheilung, die Proliferation.

Zusammenfassend gilt die These, dass die Entzündungsphase das verletzte Gewebe auf die nachfolgenden Phasen der Wundheilung vorbereitet, indem es den Blutverlust eindämmt, Bakterien und Gewebstrümmer entfernt, um dann die Ansammlung von Vorläufern und Zelltypen, die für die zweite Phase der Heilung wichtig sind, zu fördern. Sollte sich jedoch die Entzündungsphase – aus den unterschiedlichsten Gründen – nicht normal zurückbilden, resultiert eine chronische, nicht heilende Wunde [McCormick et al. 1993].

ad 2.) Proliferationsphase

Während der Proliferationsphase proliferieren zelluläre Elemente, um das verletzte bzw. fehlende Gewebe zu ersetzen.

Auch hierbei handelt es sich um einen komplexen Prozess, der die Interaktion vieler verschiedener Zelltypen notwendig macht [Kanzler 1986].

Die Präsenz von Granulationsgewebe markiert den Beginn der 2. Phase der Wundheilung.

Bei Granulationsgewebe handelt es sich um eine dichte Mischung aus Makrophagen, Fibroblasten und neuen Blutgefäßen in einer Matrix aus Kollagen, Fibronectin und Hyaluronsäure. Die Namensgebung erfolgte aufgrund des granulationsartigen Aussehens unter dem Lichtmikroskop [Thomas 1995, McCormick et al.].

Diese Phase ist entscheidend für die Angiogenese, die jedoch bereits in der Entzündungsphase durch die Freisetzung angiogener Faktoren eingeleitet wird [Schumann 2000, Kanzler 1986].

Neue Kapillaren beginnen etwa drei Tage nach Verletzung zu wachsen.

An dieser Stelle soll zunächst auf die Histologie der Gefäße eingegangen werden. Nach Junqueira [1996] besitzen Kapillare ein zylindrisches Lumen, wobei der mittlere Durchmesser 7- 9 μm beträgt. Die Endothelzellen, denen hier in Bezug auf die immunhistochemische Darstellung der Gefäße eine entscheidende Bedeutung zukommt, sind sehr flach (0.1 μm - 1 μm) und kleiden das Lumen der Kapillare aus. Dabei kommen auf einen Querschnitt in der Regel zwei oder drei Endothelzellen gleichzeitig. Ihre Aufgabe ist der Stoffwechsel und der Gasaustausch. Größere Gefäße, die Arterien und Venen, besitzen im Prinzip alle den gleichen Wandbau. Arteriolen sind den Kapillaren vorgeschaltet. Sie besitzen ein enges Lumen (im Durchschnitt $< 0,5 \text{ mm}$) und eine Tunica intima fehlt. Neben einer subendothelialen Schicht weisen sie eine Membrana elastica interna auf. Die Media besteht aus 1- 5 zirkulär angeordneten Schichten glatter Muskelzellen und die Adventitia ist nur schwach entwickelt. Den Arteriolen kommt unter funktionellen Gesichtspunkten eine große physiologische

Bedeutung zu, da sie als sogenannte „Widerstandsgefäße“ fungieren. Bei den Venolen handelt es sich um postkapilläre Gefäßstrecken, die bis zu einem Durchmesser von 50 μm den gleichen wie die Kapillare aufweisen. Daher nehmen auch sie am Austausch von Stoffwechselprodukten zwischen Gewebe und Blut teil, sowie gegebenenfalls auch an entzündlichen Prozessen. Die nachfolgenden Abschnitte der Venulen haben im Durchschnitt einen Durchmesser von 0,2- 1mm und besitzen eine sehr dünne Wand. Die Media enthält jedoch vereinzelt bereits glatte Muskelzellen. Die dickste Schicht bildet die Adventitia, die aus kollagenfaserreichem Bindegewebe besteht.

Phagozytierende Makrophagen führen fortgeschrittene Äste von Kapillaren und Fibroblasten durch die verwundete Stelle; wenn die Enden der Kapillaräste sich treffen, werden „Schleifen“ aus Gefäßen gebildet. Werden diese durchblutet, expandieren sie zu Arteriolen und Venolen, fließt kein Blut, gehen sie zugrunde.

Zahlreiche Mediatoren stimulieren die Kapillarsprossung: Hunt [1990] und Knighton et.al. [1981] postulieren die Theorie, dass eine geringe Sauerstoffspannung über der Wunde als selbst limitierender Faktor für diese wirkt. Geringe Sauerstoffspannung und hohe Lactatwerte – vom anaeroben Stoffwechsel im Zentrum der Wunde – bewirken die Synthese und Freisetzung verschiedener angiogener Wachstumsfaktoren durch Makrophagen, wie z.B. TGF- β und bFGF. Andere angiogene Faktoren, die den Blutplättchen entstammen, sind z.B. PDGF und FGF- β . Diese agieren indirekt, indem sie Makrophagen an die verletzte Stelle „locken“ (Chemotaxis).

Die epitheliale Regeneration beginnt innerhalb von 24 Stunden nach Verletzung.

Epithelien besitzen enge Zellkontakte und eine Basalmembran, welche die Epidermis an der Dermis mithilfe von Hemidesmosomen und verankernden Kollagen- Typ VIII-Filamenten befestigt. Außerdem ist sie die „Quelle“ der Regeneration der Epidermis durch die permanente Bereitstellung von „Tochterzellen“. Das keratinisierte, schuppige Epithel der Epidermis schützt den Organismus vor bakterieller, viraler oder anderer. Invasion und beugt Flüssigkeitsverlusten vor [Moll 2003].

Demnach bedeutet Regeneration Austausch der zerstörten Dermis, der Basalmembran, sowie der Epidermis.

Die Grundlagen der epidermalen Regeneration [Junqueira et al. 1996, Moll 2003]:

Migrierende epitheliale Zellen, z.B. vom Rande des Defekts oder von verbliebenen Haaren, Schweißdrüsen und anderen Hautstrukturen elongieren, verlieren ihre hemidesmosomalen Verbindungen und beginnen, unterhalb des Oberflächenkoagulum zu wandern. Währenddessen „räumen“ diese Neo- Keratinozyten zelluläre „Trümmer“ fort, setzen Kollagenase und EGF frei und synthetisieren neue Bestandteile für die Basalmembran.

Die epithelialen Zellen bewegen sich nach Art des „Bockspringens“ fort. Bei Kontakt mit anderen Zellen verwandeln sie sich wieder in ihre Ausgangsform und erhalten ihre hemidesmosomalen Haftproteine zurück.

Die führende Theorie besagt, dass der Verlust der Kontakthemmung die epitheliale Migration stimuliert [Mc Cormick et al 1993]. Ebenfalls eine Rolle in der Wanderung und Teilung der Basalzellen spielen EGF, Interleukin- 1 und PDGF, sezerniert von Makrophagen und Plättchen.

Die Regeneration der subepithelialen Strukturen, also der Dermis, läuft wie folgt ab:

Fibroblasten stellen die zelluläre Komponente des Bindegewebes dar und sind normalerweise sparsam in diesem verteilt. Einmal stimuliert, wandern sie entlang des Fibringerinnsels, um zu proliferieren und Kollagen, Elastin und Proteoglykane zu produzieren.

Diese Fibroplasie beginnt ab dem 2. Tag nach Verletzung [Kanzler et al. 1986]. Die Migration und Proliferation der Fibroblasten in die Wunde hinein wird von mehreren Wachstumsfaktoren kontrolliert.

Normalerweise befinden sich die Fibroblasten in der G 0-Phase des Zellzyklus [Thomas 1995], nach Exposition zu PDGF, α FGF und Calcium gelangen sie jedoch in die G 1-Phase. Erst nach Exposition zu einer zweiten „Garde“ von Wachstumsfaktoren (IGF- 1, EGF u.a.) beginnen sie zu proliferieren und dann zu synthetisieren. Einmal stimuliert, sekretieren sie auch IFN- β , einen potenten Selbst- Inhibitor der DNA- Synthese der

Fibroblasten, um die Feedback- Schleife von Stimulierung und Hemmung zu komplettieren [Mc Cormick 1993].

Es sind 17 Arten von Kollagen bekannt [Moll 2003] und alle weisen ähnliche strukturelle Eigenschaften auf. Die Hydroxylierung von Prolin und Lysin, die von Faktoren wie Sauerstoffangebot, Vitamin C (Hydroxylierung der AS Prolin und Lysin), Kupfer, Zink und Eisen abhängt, gibt dem Kollagenmolekül seine helixartige Gestalt. Anschließend entsteht die bekannte „3-fach- Kette“, das Tropokollagen [Deutzmann 2003, Kanzler et al. 1986].

Unterschiedliche Klassen von Ketten, aus denen das Tropokollagen zusammengesetzt ist, bestimmen die strukturellen Merkmale eines jeden Kollagentyps [Junqueira 1996]. Die Tropokollagen- Einheiten werden anschließend von den Fibroblasten in die extrazelluläre Matrix sezerniert und aggregieren zu Filamenten, Fibrillen und Faserbündeln. Die neu sezernierten Kollagenbündel dienen als Gerüst, um die strukturelle Integrität der neu geformten Blutgefäße aufrecht zu halten und um der sich entwickelnden Narbe Festigkeit zu geben [Hunt 1990]. Typ III- Kollagen wird zuerst synthetisiert, es wird jedoch bald durch Typ I- Kollagen, das primäre Kollagen der Haut, ersetzt [Kanzler et al. 1986, Junqueira et al 1996].

Fibroblasten sezernieren außerdem Grundsubstanz, und zwar zunächst Fibronectin. Dabei handelt es sich um eine gelartige Substanz, die eine wichtige Rolle für die Zell-Migration, Differenzierung und Proliferation spielt. Ein weiterer Bestandteil der Grundsubstanz sind Glycosaminoglykane. Diese besitzen eine Proteinhülle und werden deshalb Proteoglykane genannt Sie geben der Wunde strukturelle Integrität und regulieren die Fibrillogenese, indem die Kollagen- Polymerisation und Fibroblasten-Zellteilung sowie infolgedessen auch die Gewebsresilienz und die Reißfestigkeit der sich entwickelnden Narbe erhöht wird [Junqueira et al.1996].

Um die totale Oberfläche einer Wunde zu reduzieren, unterliegen Wunden einer zentripetalen Kontraktion. In diesem Zusammenhang muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass dieses normale Stadium des Wundheilungsprozesses nicht gleichzusetzen ist mit der Kontraktion, die sich in einem bereits verheilten Gewebe ereignet, mit dem

Resultat einer fixierten, starren Narbe. Erstere Variante der Wundkontraktion geschieht nur in noch nicht komplett epithelisierten Wunden, wohingegen die Narbenkontraktion lediglich in einem epithelial geschlossenen Defekt zu beobachten ist. Die erstgenannte Form der Wundkontraktion soll, wie neuere Studien vermuten lassen, von einer komplexen Interaktion zwischen Fibroblasten und umgebender kollagener Matrix gesteuert werden. Somit könnte die Bindegewebsmatrix selbst die primär kontrollierende Kraft sein [McCormick et al 1993, Tonnesen 2004]. Die Kontraktion der Wunde beginnt ca. eine Woche nach der Verwundung und schreitet mit einer Rate von 0,6 – 0,7 mm/ Tag voran [Kanzler et al.1986].

ad 3.) Reifungsphase

Im Folgenden soll nun auf die dritte und letzte Phase der Wundheilung, die Phase der Maturation und Neugestaltung, eingegangen werden. Dieser kommt im Zusammenhang mit der Narbenbildung, insbesondere des äußeren Erscheinungsbildes der Narbe, eine größere Bedeutung zu.

Die Hauptmasse an Kollagen wird zwei bis drei Wochen nach Verwundung erreicht [Kanzler et al. 1986], wobei es sich zu Beginn im Randbereich der Wunde befindet. Innerhalb einer Woche steigt die Kollagenaseaktivität an und signalisiert den Beginn der Umgestaltung. Die Kollagenresorption ist gewebspezifisch und durch Kollagenasen, hier insbesondere die Gewebekollagenase, strikt geregelt. Diese benötigt Calcium, um zu funktionieren und kann durch Chelatbildner wie EDTA gehemmt werden. Gebildet wird sie von verschiedenen Zellen und lokalisiert ist sie in den oberflächlichen Schichten der Dermispapillen. In diesem Zusammenhang wichtig ist die Erkenntnis, dass nur Gewebe, die epitheliale Zellen enthalten, kollagenolytische Aktivität entfalten [Kanzler et al. 1986]. Gewebe, die reich an epithelialen und Entzündungszellen sind, zeigen die größte Syntheseaktivität von Kollagenase. Ferner existieren noch andere Typen von Kollagenase, wie z.B. die bakterielle (gebildet von Clostridium), sowie lysosomale Proteasen. Bevor die Kollagenasen ihre Aktivität entfalten können, müssen jedoch einige „Hilfsenzyme“, wie z.B. Hyaluronidase und

andere Proteasen, die Fibrillen exponieren, d.h., sie von anderen, nicht kollagenen Substanzen befreien (z.B. von Protein- Polysaccharid- Komplexen, die mit Kollagen im Bindegewebe assoziiert sind). Während der kommenden Monate werden die initialen Kollagenfasern abgewertet und in einer geordneten Anordnung neu synthetisiert. Zusätzlich nimmt der Wasser- und hydrophilisierte Glycosaminoglycananteil ab und erlaubt dem Kollagen, effektive Querverbindungen einzugehen. Diese erhöhen die Spannungs- und Reißfestigkeit der Wunde. Die maximale Reißfestigkeit wird ca. sechzig Tage nach der Verwundung erreicht; dort bleibt sie dann auf einem Plateauwert von etwa 80 % der ursprünglichen Hautfestigkeit [Kanzler et al. 1986, Schumann 2000].

Die Phase der Reifung präsentiert demnach ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Lyse von altem und der Synthese von neuem Kollagen, die eine kontinuierliche Verdichtung der Fasern mit einschließt. Dabei erfolgt außerdem eine Neuorientierung der Kollagenfasern in Spannungsrichtung, meist parallel zur Hautoberfläche [Schumann 2000]. Hier liegt auch ein Hauptunterschied (histologisch) im Vergleich zu hypertrophen Narben und Keloiden, innerhalb derer der Organisationsgrad der Kollagenfasern in Richtung der Keloide immer mehr abnimmt. Auch bezüglich der Gefäßversorgung existieren deutliche Unterschiede im Vergleich zu „normalem“ Narbengewebe. Das Endergebnis der Maturationsphase unter nicht- pathologischen Bedingungen ist eine relativ avaskuläre Narbe anstelle des kutanen Defekts [Kanzler et al. 1986, Schumann 2000].

Intraorale Heilung

Intraorale Heilung folgt derselben Sequenz von Entzündung, Proliferation und Umgestaltung wie in anderen Regionen des Organismus. Dennoch gibt es einige Besonderheiten, die im Folgenden erläutert werden sollen. Auch die Regenerationsfähigkeit der oralen Mukosa liegt bekanntermaßen um ein Vielfaches höher, als in anderen Regionen des Körpers. Allgemein zählt die Mund- Kiefer- Gesichts- Region aufgrund ihrer guten Durchblutung zu den Körperregionen mit überdurchschnittlich guter Heilungstendenz [Schumann 2000].

Zunächst zu einigen anatomischen bzw. histologischen Besonderheiten: Im Gegensatz zur Haut ist die Mundschleimhaut parakeratinisiert, d.h. die Zellkerne bleiben im Stratum corneum, im Gegensatz zur Orthokeratose, erhalten und besitzt nur dünne, submuköse Schichten [Moll 2003, McCormick et al. 1993, Schumann 2000, Müller et al. 2001].

Die Schleimhaut der Wange, Lippen und des Mundbodens sowie der vorderen Zunge haben feine Bindegewebpapillen und ausgedehnte Plexus von elastischen Fasern [Junqueira et al 1996]. Diese erhöhte Elastizität erlaubt eine maximale Wundkontraktion und dementsprechend eine kleinere Wunde, die schnell verheilt und minimal vernarbt.

Die Mukosa der mastikatorischen Gingiva (sog. „attached gingiva“) und des harten Gaumens hat eine dichte papilläre Struktur, fest verbunden mit dem darunter liegenden Bindegewebe, dem Periost und dem Knochen. Wunden innerhalb dieser Gewebe zeigen nur minimale Kontraktion und heilen nach sekundärer Intention, wie z.B. Wunden nach Zahnextraktionen [Schumann 2000].

Wunden in dentoalveolären Strukturen heilen, indem zusätzlich parodontale Fasern in die Narbe einstrahlen [Müller et al. 2001]. Diese hartnäckige Verbindung schafft z.B. bei der Heilung von Lippen- Kiefer- Gaumenspalten Probleme [Schumann 2000]. Aus diesem Grunde wird untersucht, wie diese Wundkontraktion und ausgeprägte Narbenbildung minimiert werden kann, z.B. mittels Membrantechnik [Hammar et al. 1993].

Auch spezielle Wachstumsfaktoren spielen bei der intraoralen Heilung eine Rolle. So z.B. EGF, der in der Glandula parotis synthetisiert und mit dem Speichel sezerniert wird. Versuche an Tieren ergaben, dass EGF die Wundheilung erhöht, indem die Bildung von Granulationsgewebe und Kollagen gefördert wird. Der Mechanismus ist unbekannt, aber EGF scheint die Rekrutierung von Zellen zu begünstigen [McCormick et al. 1993]. EGF interagiert ebenfalls mit anderen Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β , die bekannt sind, die Angiogenese, Fibroplasie und Wundkontraktion zu fördern [Hammar et al. 1993].

2 Aufgabenstellung

Im Zusammenhang mit den bisher dargestellten Grundlagen der Wundheilung basierend auf dem derzeitigen Stand der Forschung laut einschlägiger Fachliteratur ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Deskriptive Darstellung der histologischen Struktur humaner Haut- und Schleimhautpräparate (orale Mukosa) im Vergleich. Bei den Gewebeschnitten handelte es sich sowohl um gesundes Gewebe als auch um Narben.
2. Quantitative morphometrische Bestimmung der Gefäßanzahl und- dichte innerhalb der histologischen Präparate der 4 Gewebegruppen mittels immunhistochemischer, lichtmikroskopischer, digitaler und statistischer Methoden.
3. Vergleichende, deskriptive Darstellung des Verteilungsmusters der dargestellten Gefäße innerhalb der o.g. histologischen Präparate.

3 Material und Methode

3.1 Probengewinnung

Hierzu wurden im Rahmen Mund- Kiefer- Gesichtschirurgischer Operationen Gewebeproben entnommen. Ein positives Votum der Ethik- Kommission war zuvor eingeholt worden (siehe Anhang Seite VII). Neben den pathologischen, also dem Narbengewebe, wurden auch Referenzproben in Form gesunder Haut bzw. Schleimhaut entnommen. Diese stammten aus dem gesunden Randgebiet von Probebiopsien anderer Patienten.

Das extraorale Narbengewebe wurde ausschließlich im Rahmen von Korrekturen alter Narben entnommen.

Das intraorale Narbengewebe wurde in allen Fällen im Zuge der Metallentfernung nach vorausgegangener Verplattung, z.B. nach unfallbedingten Traumata oder Dysgnathieoperationen, gewonnen.

Die Parameter Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Blutwerte, Vor- bzw. Grunderkrankungen und Alkohol- oder Nikotinabusus waren kein einschränkendes Kriterium. Lediglich die aktuelle Diagnose, die zu der Operation geführt hatte, bei der die Proben entnommen worden waren, sowie frühere Operationen wurden berücksichtigt, soweit sie mit der Entwicklung der interessierenden Narbe im Zusammenhang standen. Anhand letztgenannter Daten ließ sich, bis auf eine Ausnahme, das Alter der intraoralen Narbe bestimmen. Das Alter der extraoralen Narben konnte nicht mehr nachvollzogen werden, da es sich bei den Operationen ausschließlich um Korrekturen alter Narben handelte.

3.2 Analysemethoden

3.2.1 Lichtmikroskopie

Nach der operativen Entnahme des Narbengewebes wurde dieses sogleich in einem geeigneten Fixiermedium konserviert. Im Falle der Gewebe, die für die Glycidether-Einbettung bestimmt waren, wurde eine 3%ige- Glutaraldehyd- Lösung verwendet. Das Narbengewebe, welches die Paraffineinbettung durchlaufen sollte, wurde mittels 4%iger Paraformaldehyd- Lösung fixiert. Anschließend durchliefen beide Gewebearten die jeweils spezifischen Einbettungsreihen, die im Folgenden beschrieben sind.

Beide Einbettungsformen eignen sich für die lichtmikroskopische Darstellung, wobei in diesem Falle die Glycidether- Präparate der Herstellung von Semidünnschnitten dienen mit anschließender Übersichtsaufnahme und die Paraffinpräparate der immunhistochemischen Gefäßdarstellung.

3.2.1.1 Paraffineinbettung

Die Einbettung der Gewebeproben erfolgte gerichtet. Dabei zeigte das subepitheliale Bindegewebe im Paraffinblock nach unten und der Hauptanteil des Narbengewebes mit dem Epithel nach oben.

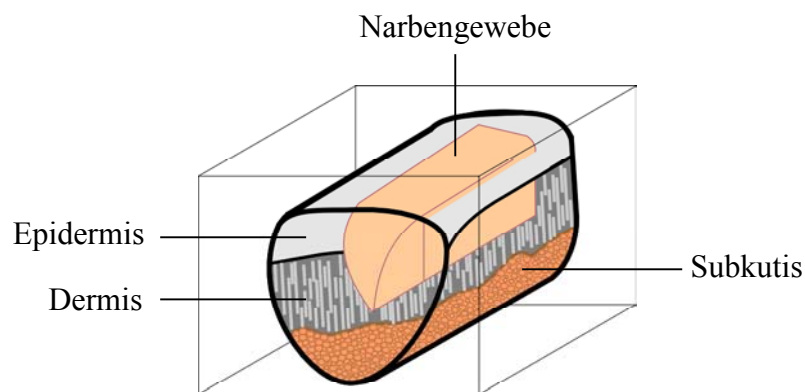


Abb. 1 Paraffineinbettung

Die Gewebeproben wurden zunächst 24 h lang gewässert, anschließend erfolgte ihre Bearbeitung nach dem folgenden standardisierten Protokoll:

- Fixierung der Proben für 24 h bei RT in 4% Paraformaldehyd
- Dreimaliges Spülen über 30 Minuten mit 0,1 m PBS (ph 7,4)
- Dehydratation mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %- 70 %- 90 % - 96 %) in 24 h Abständen
- Abschluss mit 100 % Isopropylalkohol
- Verdrängung von Restalkohol und eventuellen Wasserrückständen durch Einlagerung für 24h- 72 h in Zedernholzöl und anschließender Einlagerung für 24 h in einem Zedernholzöl/ Paraffingemisch (Verhältnis 1:1)
- Einbettung in Iso-Paraffin (für 24 h bei 60 °C)
- Einbettung in reines Paraffin (Paraffin I- IV > mit ansteigendem Reinheitsgrad für insgesamt 36 h bei 60 °C)
- Ausgießen in eine Blockform und Abkühlung bei RT
- Zurechtschneiden der Paraffinblöcke

3.2.1.2 Einbettung in Glycidether

Die Ausrichtung der Präparate für die Einbettung in Glycidether erfolgte in der gleichen Art und Weise, wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

Für die Anfertigung der Semidünnschnitte wurden die Gewebeproben dem nachfolgenden standardisierten Protokoll entsprechend vorbereitet:

- nach Entnahme Fixierung für 24 h bei RT in 3 % Glutaraldehyd
- 3 x 30 Minuten Spülung in 0,1 m PBS (ph 7,4)
- Inkubation für 1h in Osmiumsäure (1% Osmiumsäure in 0,1 m PBS ph 7,4) > Abzug!
- 3 x 30 Minuten Spülung in 0,1 m PBS (ph 7,2)
- 0,5 % Glutardialdehyd in 0,1 m PBS
- 2 x 30 Minuten Spülung in 0,1 m PBS
- Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %- 70 %- 80 %- 95%- 100 %) für jeweils 3 x 30 Minuten
- Verdrängung von Restalkohol und eventuellen Wasserrückständen durch Lagerung für 2h in Propylenoxid
- 12 h bei 4 °C in einem Gemisch (1:1) aus Glycidether und Propylenoxid (100 %) für jeweils 3 x 30 Minuten
- Inkubation in reinem Glycidether zunächst für 24 h bei 21 °C, nach einem Wechsel nochmals für 6 h bei 21 °C
- Polymerisation in der Einbettform für 24 h bei 60 °C
- Antrimmen der Präparate in den polymerisierten Glycidether-Blöckchen

3.2.1.3 Schnittanfertigung

Die Schnittebene wurde bei beiden Einbettungsformen so gewählt, dass das Narbengewebe mit dem angrenzenden Bindegewebe parallel zur Schnittebene stand, sodass jeder Schnitt im oberen Anteil Epithel, anschließend Narbengewebe und im unteren Anteil subepitheliales Bindegewebe aufwies.

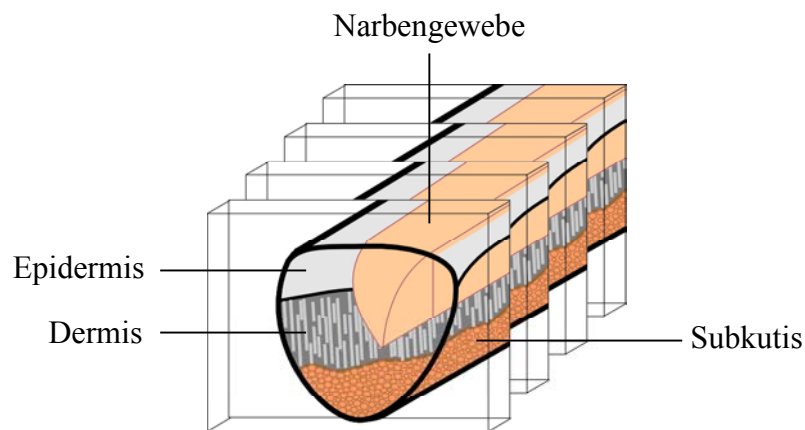


Abb. 2 Schnittanfertigung der Paraffinschnitte

Anfertigung der Paraffinschnitte

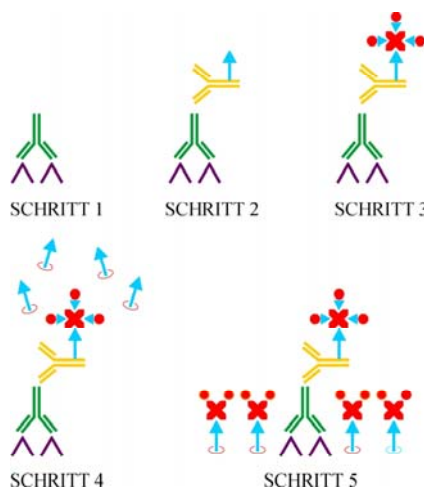
Die Anfertigung der Paraffinschnitte erfolgte mit einem Rotationsmikrotom in einer Stärke von 8μ bis 10μ . Die Schnittdicke der gesunden oralen Mukosapräparate betrug 12μ , da diese aufgrund ihrer sehr lockeren Struktur bei den erstgenannten Stärken leicht zerrissen. Anschließend wurden sie in einem Wasserbad gestreckt. Es folgte das Aufziehen der Gewebeschnitte auf Objektträgern mit einer Spezialbeschichtung für die Immunhistologie. Dabei handelte es sich um ein Eiweiß- Glycerin- Gemisch. Es wurden jeweils 8 Schnitte pro Präparat angefertigt, die auf einen Objektträger gezogen wurden. Davon dienten 6 Schnitte der Immunhistologie und jeweils 2 als negative Gegenprobe. Schließlich wurden sie mittels einer Wärmeplatte auf dem Objektträger fixiert. Mit Deckgläsern versehen wurden sie jedoch erst nach Durchführung der Immunhistochemie.

Anfertigung der Semidünnschnitte

Die Anfertigung der Semidünnschnitte erfolgte mittels eines Ultramikrotoms. Die Stärke der einzelnen Schnitte betrug 1,5- 2 μm . Es wurden pro Objektträger 6 Schnitte angefertigt und auf einen herkömmlichen Objektträger gebracht, auf den zuvor mittels einer Pipette an den Stellen, an denen die Schnitte platziert werden sollten, jeweils ein Wassertropfen aufgebracht worden war, um die teilweise aufgerollten, sehr dünnen Schnitte zu strecken. Anschließend wurden die Schnitte mittels einer Wärmeplatte auf dem Objektträger fixiert.

3.2.2 Immunhistologie

An den Paraffinschnitten wurde immunhistologisch der spezifische Nachweis und die Darstellung von Endothelien geführt, wofür der monoklonale Antikörper von Willebrand Faktor den Literaturhinweisen entsprechend verwendet wurde [Horak et al. 1992]. Die Gefäßdarstellung erfolgte mit einem auf der Streptavidin- Biotin- Methode basierenden Catalyzed Signal Amplification System mit Peroxidase als Enzym und DAB- Wasserstoffperoxid als Chromogen- Substrat.



Bei der **CSA**-Methode folgt dem Primärantikörper (Schritt 1) ein biotinylierter Sekundärantikörper (Schritt 2), der Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex (Schritt 3), das Amplifikationsreagenz (Schritt 4) und ein Streptavidin-Enzym-Konjugat (Schritt 5).

Abb. 3 CSA-Methode (siehe Anhang Seite III / Abb. 13)

Protokoll für den von Willebrand Faktor

- Entparaffinieren der Schnitte mit Xylol für 2 x 10 Minuten
- Rehydratation über eine absteigende Alkoholreihe (100 % - 96 % - 70 %) für jeweils 10 Minuten
- Vorbehandlung der Gewebeschnitte in der Mikrowelle zwecks Antigendemaskierung mit 0,1m Citratpuffer pH 6
- Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation für 15 Minuten bei RT in 3% Wasserstoffperoxid
- Spülen mit CSA-Puffer
- Inkubation mit dem Primärantikörper vWF für 15 Minuten bei RT (die optimale gewebsspezifische Verdünnung wurde im Vorfeld ausgetestet und betrug 1:500)
- Zugabe des HRP-Puffer und anschließende Inkubation über Nacht bei 4°C
- Spülen mit CSA-Puffer
- 15 Minuten Inkubation mit dem Link-Antikörper (standardmäßige Verdünnung 1:100) bei RT
- Spülen mit CSA-Puffer
- Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Komplex für 15 Minuten bei RT
- Spülen mit CSA-Puffer
- 15 Minuten Inkubation mit dem Amplification Reagenz (Verstärkungsreagenz)
- Spülen mit Puffer
- Inkubation für 15 Minuten mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat bei RT
- Spülen mit CSA-Puffer
- 57 Minuten Inkubation mit der Substrat-Chromogenlösung (DAB)

- Spülen mit Aqua dest.
- Inkubation für 23 Sekunden mit Hämatoxylin (Anfärbung der Zellkerne)
- Spülen mit Aqua dest.
- Dehydratation über eine aufsteigende Alkoholreihe (50 % - 70 % - 96 % - 100 %)
- 5 - 10 Minuten Xylol zum Alkoholentzug
- Eindecken der Gewebeschnitte mit DePeset (Eindeckmedium auf Epoxidharzbasis)

Die Qualitätskontrolle erfolgte bei allen Gewebeschnitten über eine negative Gewebeprobe, bei der unspezifische Anfärbungen ausgeschlossen wurden.

3.2.3 Färbemethoden

Gegenfärbung der immunhistologisch aufbereiteten Präparate mit Hämatoxylin-Kernfärbung

Die färberische Darstellung der Zellkerne mit Hämatoxylin ist Bestandteil der immunhistologischen Aufbereitung der Präparate (vgl. 2.2.2 Immunhistologie) und dient der Hervorhebung der Zellkerne im Vergleich zur spezifischen Gefäßdarstellung durch die Immunfärbung. Das Ergebnis der immunhistologischen Anfärbung der Gefäße mittels des vWF wird damit deutlicher hervorgehoben.

Färbung der Semi- Dünnschnitte mit Toluidinblau

Nach Fixierung der Semidünnschnitte auf den Objektträgern wurden diese mit Toluidinblau jeweils zwei Minuten lang gefärbt. Hierbei handelt es sich um einen stark basischen Farbstoff (pH 9,5- 11), welcher eine Anfärbung aller basophiler und osmiophiler Strukturen bewirkt. Die Darstellung ähnelt der elektronenmikroskopischen Darstellung, wobei die blauen Anteile den elektronendichten Anteilen entsprechen. Die überschüssige Farbe wurde mit Aqua dest. vorsichtig abgespült. Die Fixierung der Deckgläser erfolgte mit Epoxidharz und anschließender erneuter Polymerisation bei 60°C für 24 h.

3.2.4 Auswertung

3.2.4.1 Semidünnschnitte

Die photographische Dokumentation dieser Präparate erfolgte mittels eines Photomikroskops in 6,3facher Vergrößerung.

Anschließend wurden die Bilder mittels eines Diascanners und einem Personalcomputer digitalisiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Adobe Photoshop Software.

Die Auswertung der Semidünnschnitte erfolgte deskriptiv nach morphologischen Gesichtspunkten.

3.2.4.2 Immunhistologisch aufbereitete Präparate

Die photographische Dokumentation der immunhistologisch behandelten Präparate erfolgte mittels eines Photomikroskops bei 63facher Vergrößerung [6,3 (Objektiv) x 10 (Okular)].

Um eine Erfassung des gesamten Präparates zu ermöglichen, erfolgte die photographische Dokumentation ausgehend vom Epithel in Richtung der tieferen Bindegewebsschichten und zurück, jedoch in mehreren Einzelaufnahmen. So entstanden praktisch „Schichtaufnahmen“ der einzelnen Präparate, wobei „Überlappungen“ einzelner Anteile der Präparate im Grenzbereich zur nächsten Aufnahme weitestgehend vermieden wurden. Hierzu wurden charakteristische Strukturen in diesen Bereichen der Präparate zur Orientierung herangezogen. Dadurch wurde ein weitgehend „nahtloser“ Übergang der einzelnen Bilder erreicht.

Die Auswertung erfolgte

- 1.) rein quantitativ über eine morphometrische Analyse der Gefäßdichte pro ausgemessener Gesamtfläche eines jeden Präparates in μm^2 und anschließender statistischer Analyse
- 2.) deskriptiv :
 - a) über eine Beschreibung des Verteilungsmusters der Gefäße innerhalb der unterschiedlichen Präparategruppen
 - b) Darstellung des Verteilungsmusters der Gefäße innerhalb der intraoralen Narbenpräparate unterschiedlichen Alters im Vergleich
 - c) Deskription der histologischen Strukturen der Präparate aller 4 Präparategruppen soweit identifizierbar

ad 1. Erläuterung der Methoden der statistischen Auswertung

Zu Beginn der statistischen Analyse wurde eine Prüfung auf Normalverteilung durchgeführt, um die Vermutung, dass es aufgrund der relativ geringen Datenmenge zu deutlichen Abweichungen von dieser kommen würde, statistisch zu belegen. Der Test auf Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov- Smirnov- Test (K- S- Test) mit und ohne Lilliefors- Korrektur realisiert. Demnach zeigten sich bei allen erhobenen Gewebeparametern sowie dem Alter der Narben hoch signifikante Abweichungen von der theoretischen Gauß- Verteilung. Aus diesem Grunde gelangten neben dem Kruskal- Wallis- Verfahren auch bei sämtlichen anderen Testungen ausschließlich non-parametrische Verfahren zum Einsatz. Diese sind geeignet und validiert bei nicht normal verteilten Daten, bei Stichproben unterschiedlichen Umfangs sowie auch bei kleinen Stichprobengrößen.

Sämtliche Berechnungen wurden unter Zugriff auf das Statistikprogramm- System SPSS, Version V. 12.0 dt., auf einem servergestützten Arbeitsplatz- PC mit Intel- Pentium- Prozessor der neuesten Generation unter Windows durchgeführt und statistisch validiert.

Um Unterschiede der Geschlechterverteilung zwischen den verschiedenen Präparaten auf Signifikanz zu prüfen, wurde der Chi- Quadrat- Test durchgeführt. Die entsprechende Prüfung auf Altersdifferenzen erfolgte mit dem Kruskal- Wallis- Test (H- Test).

Der Mann- Whitney- Test (U- Test) wurde mit dem Ziel eingesetzt, den Einfluss der geschlechtlichen Herkunft der Präparate auf die Gewebe- Parameter, insbesondere auf die Anzahl der Gefäße pro μm^2 , zu prüfen. Ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Parametern „Alter der intraoralen Narbe in Monaten“ und der Anzahl der Gefäße pro μm^2 besteht, wurde mittels Berechnung der Spearman- Korrelation (Rangkorrelation Rho) erfasst.

Schließlich erfolgte die Überprüfung der zentralen Forschungshypothese, also die Prüfung des Effektes der diversen Präparate/ Präparategruppen auf die Anzahl der Gefäße pro μm^2 . Dazu wurde wieder der Mann- Whitney- Test (U- Test) herangezogen,

z.B. in Form des Kontrastes zwischen intraoraler Narbe und gesunder Schleimhaut, intraoraler und extraoraler Narbe, sowie des weiteren als Kontrast zwischen extraoraler Narbe und gesunder Haut.

Zur deskriptiven Darstellung der Ergebnisse wird in der Hauptsache auf die Berechnung von Medianen und Interquartilabständen (IQR= Streuungsmaße) zurückgegriffen; ergänzend werden arithmetische Mittelwerte nebst Standardabweichungen der Vollständigkeit halber mit angegeben. Bei Nominaldaten werden absolute und relative Häufigkeitsverteilungen und gegebenenfalls Kreuztabellen verwendet. Graphische Darstellungen bedienen sich der Form von Balken- bzw. Säulen- und Kreisdiagrammen, sowie Box- Plots. Letztere enthalten als Hauptinformation den Median und die Streuung der Gewebe- Parameter.

Alle weiteren Parameter und Ergebnisse wurden lediglich deskriptiv abgehandelt.

Die Auswertung der histologischen Bilder, und zwar sowohl der Semidünnschnitte als auch der immunhistologisch behandelten Präparate, erfolgte mit Hilfe der Image Tool Software.

Nach vorausgegangener Kalibrierung des Systems, bei der der Vergrößerungsfaktor, welcher der Photodokumentation zugrunde lag, berücksichtigt werden musste, erfolgte die Ausmessung einer definierten Fläche (Angabe in μm^2). Anschließend konnte die Anzahl der Gefäße pro ausgemessener Fläche per „Mausklick“ auf das jeweils zu zählende Gefäß ermittelt werden. Zuvor mussten die Kriterien bestimmt werden, welche festlegten, bei welchen der gefärbten Strukturen es sich eindeutig um Gefäße handelte. Zahlenmäßig erfasst wurden nur solche Strukturen, die **1.** ein eindeutig identifizierbares Lumen aufwiesen und **2.** immunhistochemisch, in diesem Falle **braun**, gefärbt waren.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Probenumfangs

Es wurden insgesamt 30 Gewebeproben ausgewertet, die sich wie folgt aufteilen:

Es lagen 12 gesunde Schleimhautpräparate vor, 8 intraorale Narben, 1 gesundes Hautpräparat und 9 extraorale Narben. Davon entstammten 15 Gewebeproben weiblichen und 14 männlichen Probanden; bei einem Präparat konnte die Geschlechtszugehörigkeit nicht nachvollzogen werden.

Zur Übersicht und als Grundlage aller weiteren Analysen erfolgt eine Darstellung der Gesamtheit aller Werte mit Hilfe der folgenden Tabelle (Tab. 1):

**Statistiken der Gewebe-Parameter
bei den Präparaten und in der Total-Stichprobe**

Präparat	Parameter	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Interquar- tilabstand	N
intraorale Narbe	Hautfläche (μm^2)	2873181,3	1573746,0	2831891,8	3014599,8	40
	Anzahl der Gefäße	92,900	48,393	84,500	68,750	40
	Gefäße pro μm^2 (* 1000)	,041	,029	,032	,022	40
	Narbenalter (Monate)	7,703	3,045	7,000	5,000	37
extraorale Narbe	Hautfläche (μm^2)	2089040,6	1527789,1	1349168,4	2473450,1	88
	Anzahl der Gefäße	49,943	41,655	39,000	35,500	88
	Gefäße pro μm^2 (* 1000)	,027	,016	,023	,017	88
	Narbenalter (Monate)	5,000	,000	5,000	,000	8
gesunde Schleimhaut	Hautfläche (μm^2)	3414930,0	1394450,2	3426989,0	2245574,2	112
	Anzahl der Gefäße	29,848	21,721	27,500	30,500	112
	Gefäße pro μm^2 (* 1000)	,021	,113	,009	,010	112
	Narbenalter (Monate)	0
gesunde Haut	Hautfläche (μm^2)	3192687,8	7096761,9	1131774,2	789775,7	12
	Anzahl der Gefäße	17,083	9,050	16,000	10,750	12
	Gefäße pro μm^2 (* 1000)	,016	,013	,015	,019	12
	Narbenalter (Monate)	0
Total- Stichprobe	Hautfläche (μm^2)	2855346,2	2147572,0	2680004,4	3004577,5	252
	Anzahl der Gefäße	46,266	41,107	37,000	39,500	252
	Gefäße pro μm^2 (* 1000)	,026	,077	,017	,020	252
	Narbenalter (Monate)	7,222	2,946	7,000	4,500	45

Tab. 1 Statistiken der Gewebe-Parameter (Präparate / Total-Stichprobe)

Die Angabe „N“ in der Tabelle gibt jeweils die Anzahl aller ausgewerteter histologischer Präparate pro Gewebegruppe an, also nicht die Anzahl der Gewebeproben. Demnach ergibt sich eine Gesamtanzahl aller gültigen, der Statistik zu Grunde liegenden Fälle, von 252. Bei allen folgende Tabellen wird jedoch von einer Gesamtanzahl von 247 gültigen Fällen ausgegangen, abzüglich der 5 Präparate (1 Gewebeprobe), deren Geschlechtszugehörigkeit nicht nachvollzogen werden konnte.

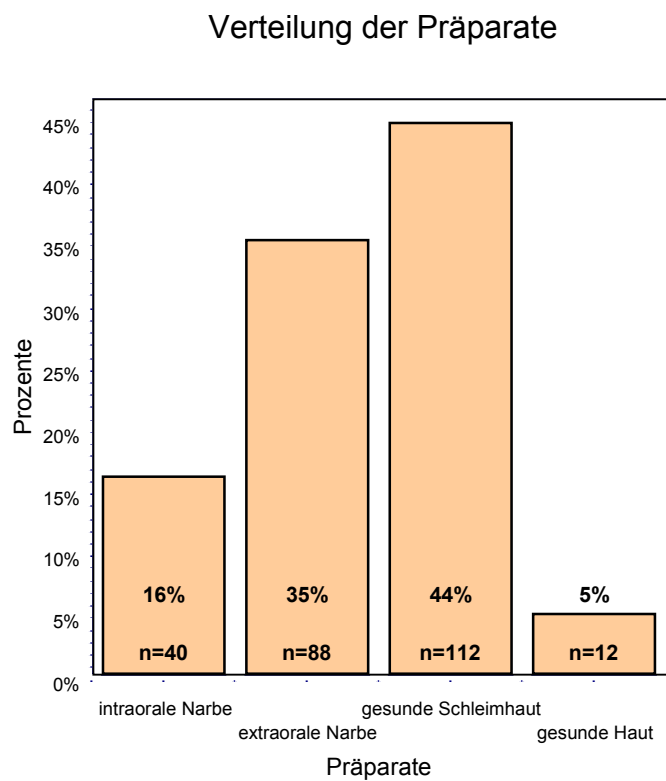


Abb. 4 Verteilung der Präparate

Das Balkendiagramm veranschaulicht die Anzahl der vier verschiedenen Gewebegruppen und zeigt sowohl die prozentualen als auch die absoluten Anteile an der Gesamtheit aller histologischer Präparate, hier ausgehend von der Zahl 252.

Verteilung der Geschlechts-
zugehörigkeit der Präparate

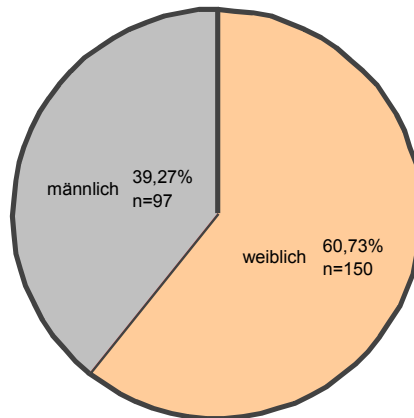


Abb. 5 Verteilung der Geschlechtszugehörigkeit der Präparate

Das Kreisdiagramm zeigt die Geschlechterverteilung innerhalb der Gesamtheit aller Präparate in Prozent und als absolute Zahlen, ausgehend von einer Gesamtanzahl von 247.

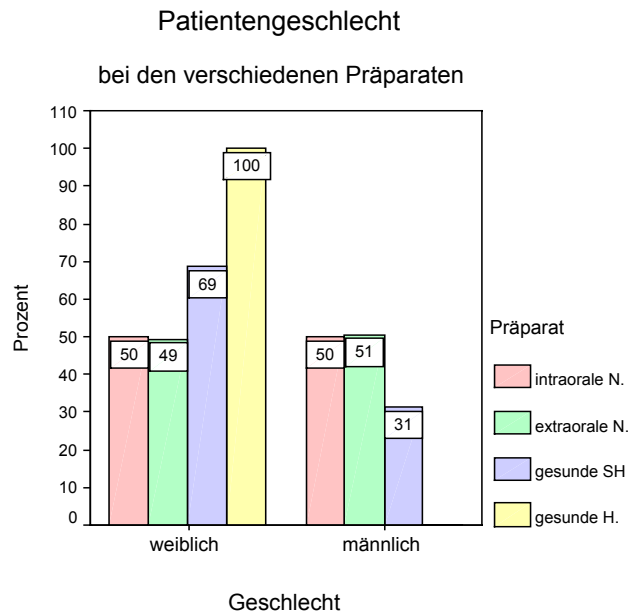


Abb. 6 Patientengeschlecht bei den verschiedenen Präparaten

Das Balkendiagramm (Abb. 6) zeigt den prozentualen Anteil aller Präparategruppen in Bezug auf deren Geschlechtszugehörigkeit. Es wird deutlich, dass die Verteilung der Präparate auf die Geschlechter bei den besonders interessierenden Präparaten, nämlich den intra- und extraoralen Narben, sehr gleichmäßig ausfällt; sie liegt demnach etwa bei jeweils 50 %. Diese Verteilung ermöglicht einen guten Vergleich der Präparategruppen untereinander.

Bei den beiden anderen Präparategruppen (gesunde Haut/ gesunde Schleimhaut) liegt das Verhältnis bei ca. 70% zu 30% (gesunde Schleimhaut) bzw. 100% weiblichen Ursprungs (Haut).

4.2 Darstellung und Deskription der Morphologie der Semidünnschnitte

Die Auswertung der Übersichtsaufnahmen erfolgte rein deskriptiv nach morphologischen Gesichtspunkten. Die Darstellung und Deskription ausgewählter Aufnahmen wird nachfolgend behandelt

Bild 1: Semidünnschnitt eines typischen Vertreters aus der Gruppe der Präparate der äußeren Haut (Färbung: Toluidinblau, Vergrößerung: 6,3-fach)

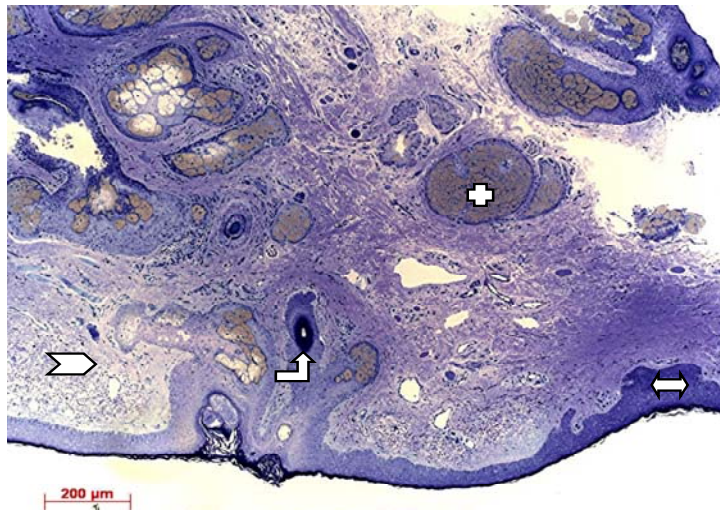


Bild 1 Semidünnschnitt (Präparat der äußeren Haut)

Die Übersichtsaufnahme eines Hautpräparats weist alle typischen histologischen Merkmale der äußeren Haut auf. Ausgehend vom mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel (↔) schließt sich das Bindegewebe der Dermis an (Σ). Diese enthält außerdem Talgdrüsen (⊕) und Haare im Querschnitt (↑) sowie einige größere Gefäße. Im Anschluss daran befindet sich das lockere Bindegewebe der Subcutis, innerhalb dessen ebenfalls einige Gefäße zu erkennen sind.

Bild 2: Semidünnschnitt eines Schleimhautpräparats (intraoral).
(Färbung: Toluidinblau, Vergrößerung: 6,3-fach)

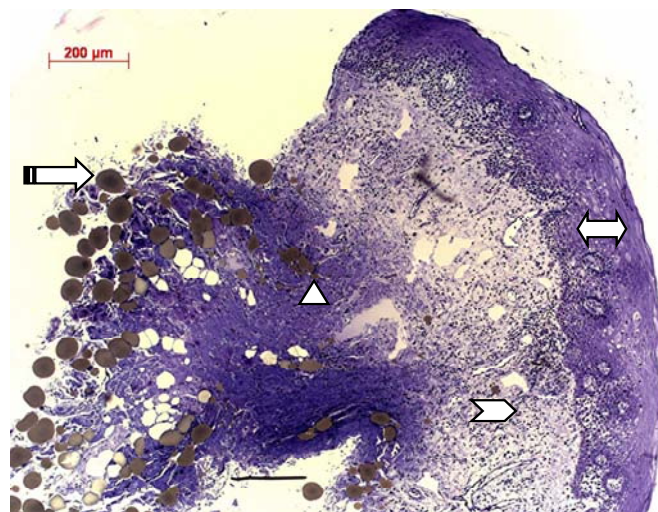


Bild 2 Semidünnschnitt (Schleimhautpräparat)

Die Übersichtsaufnahme eines intraoralen Schleimhautpräparats enthält ebenfalls die für diese Gewebeart typischen histologischen Strukturen. Charakteristisch und hier gut zu erkennen ist das mehrschichtig- unverhornte Plattenepithel (⇔). Daran schließt sich das im Vergleich zur äußeren Haut wesentlich lockerere Bindegewebe der Dermis (→) an, innerhalb dessen sich in diesem Fall keine weiteren histologischen Strukturen differenzieren lassen. Die Subcutis (△) enthält neben lockerem Bindegewebe auch leere Fettvakuolen (⇨).

Bild 3: Semidünnschnitt eines typischen Vertreters aus der Gruppe der Hautnarbenpräparate (Färbung: Toluidinblau, Vergrößerung: 6,3-fach)

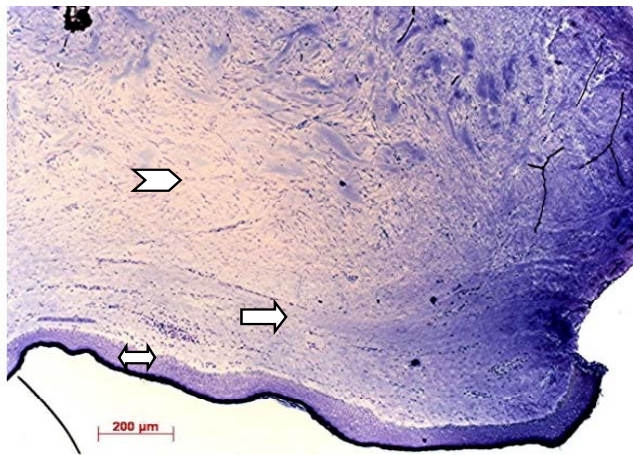


Bild 3 Semidünnschnitt (Hautnarbenpräparat)

Diese Übersichtsaufnahme eines Narbenpräparates der äußeren Haut zeigt ein besonderes Merkmal aller Präparate dieser Gewebegruppe, nämlich die sehr kompakte äußere Form, bedingt durch den hohen Anteil sehr dichten Bindegewebes in Dermis (\supset) und Subcutis. Dieses verläuft in den epidermisnahen Schichten typischerweise parallel zu dieser (\rightleftharpoons). Auch das mehrschichtig- verhornte Plattenepithel ($\leftarrow\rightleftharpoons$) ist gut zu erkennen.

Bild 4: Semidünnschnitt eines typischen Vertreters aus der Gruppe der intraoralen Narbenpräparate (Färbung: Toluidinblau, Vergrößerung:6,3-fach)

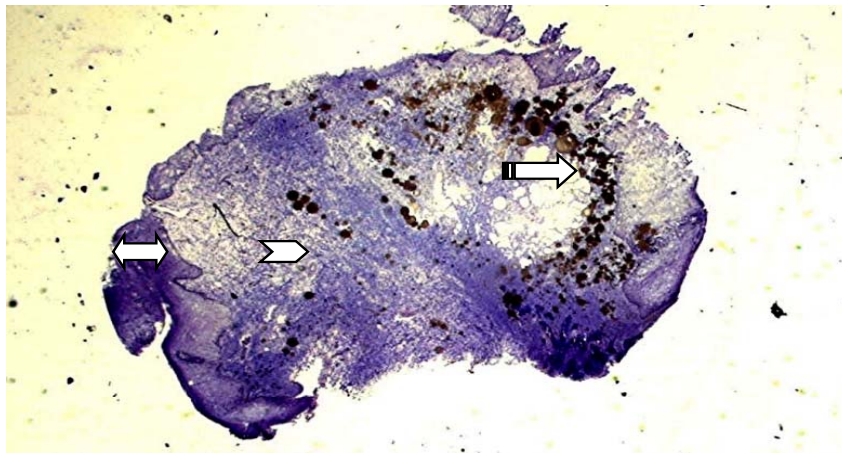


Bild 4 Semidünnschnitt (intraorales Narbenpräparat)

Die abgebildete Übersichtsaufnahme eines typischen Vertreters aus der Gruppe der intraoralen Narbenpräparate weist ebenfalls die Merkmale eines Schleimhautpräparats auf. Diese sind das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel (\Leftrightarrow), das lockere Bindegewebe der Dermis (Σ) und der Subcutis, das hier ebenfalls leere Fettvakuolen (\sqsupset) enthält. Im Falle der Dermis präsentiert sich das Bindegewebe doch etwas dichter als bei den gesunden Schleimhautpräparaten (vgl. Bild 2), was auf die Narbenbildung zurückzuführen ist.

4.3 Darstellung und Deskription der immunhistologisch behandelten Präparate

Die stärkere Vergrößerung der immunhistochemisch gefärbten Präparate ermöglicht neben der Gefäßdarstellung auch eine detailliertere Darstellung der histologischen Strukturen im Vergleich zu den Übersichtsaufnahmen der Semi- Dünnschnitte.

Bild 5: Aufnahme eines typischen gesunden Hautpräparates (Immunfärbung [vWF], Vergrößerung: 63-fach)

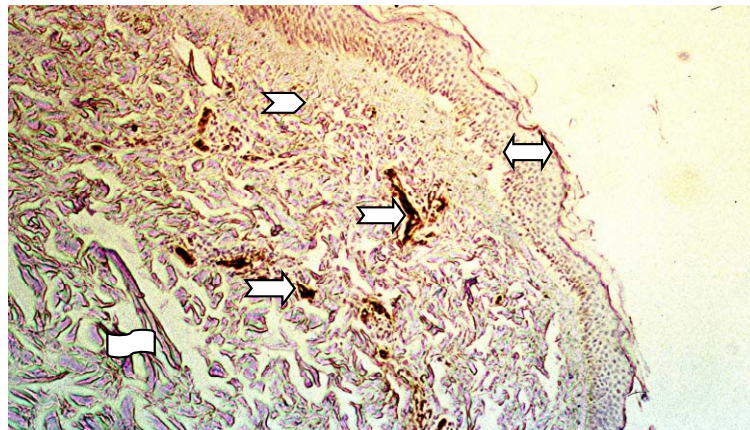


Bild 5 Aufnahme eines typischen gesunden Hautpräparates

Die vorliegende Aufnahme eines gesunden Hautpräparats weist neben dem mehrschichtig- verhornten Plattenepithel (\leftrightarrow), kennzeichnend für ein extraorales Präparat, eine an das Epithel angrenzende Bindegewebsschicht (\succ) auf. Diese enthält die Hauptmasse der braun gefärbten Gefäße (\Rightarrow), deren Durchmesser, ein Maß für die Vaskularisation eines Gewebes, sehr gering ausfallen (vgl. Bild 7 und Bild 8). Im Anschluss daran ist in diesem Präparat zusätzlich Muskulatur (\square), hier ebenfalls stark aufgelockert, zu erkennen.

Bild 6: Aufnahme einer typischen Hautnarbe
(Immunfärbung [vWF], Vergrößerung: 63-fach)

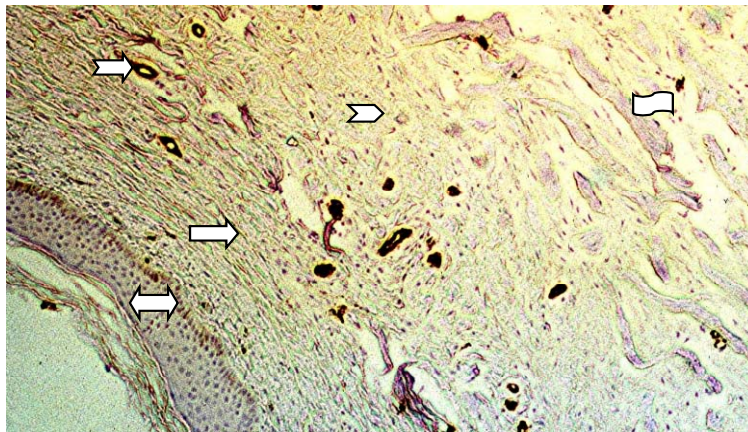


Bild 6 Aufnahme einer typischen Hautnarbe

Diese photographische Darstellung der Histologie eines Narbenpräparates der äußeren Haut veranschaulicht besonders deutlich die ausgeprägte Hornschicht des mehrschichtigen Plattenepithels (\Leftrightarrow) sowie die daran angrenzende Bindegewebsschicht mit den parallel zur Epidermis ausgerichteten Fasern (\Leftrightarrow), ein typisches Merkmal kutaner Narben. Diese sehr dicht erscheinende Bindegewebsschicht präsentiert sich im Vergleich zu der daran anschließenden, eher lockeren Bindegewebsschicht ($\Sigma\rangle$), relativ gefäßarm, zumal sich die Lumina der dargestellten Gefäße ($\Sigma\rangle$) auch in diesem Falle wesentlich kleiner präsentieren, als bei den intraoralen Präparaten (vergl. Bild 6, Bild 8 und Bild 9). Weiterhin enthält auch dieses Präparat Muskulatur (\sqcap).

Bild 7: Aufnahme eines typischen gesunden Schleimhautpräparates (Immunfärbung [vWF], Vergrößerung: 63-fach)

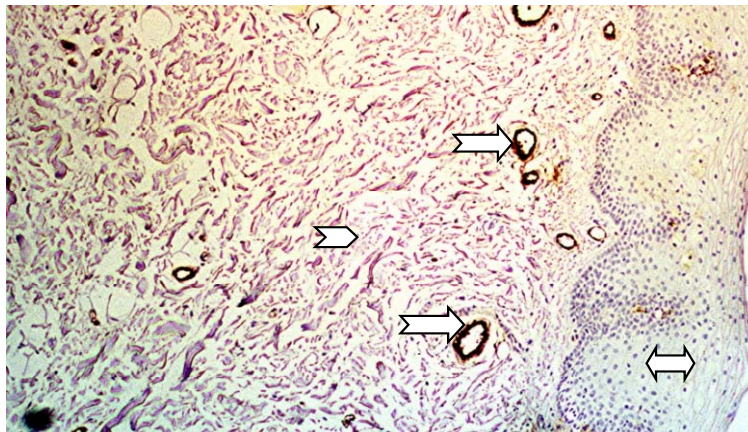


Bild 7 Aufnahme eines typischen gesunden Schleimhautpräparates

Kennzeichnend für das Vorliegen eines intraoralen Präparats ist auch hier das mehrschichtig- unverhornte Plattenepithel (\Leftrightarrow), wobei die Parakeratinisierung, d.h. das Vorhandensein von Zellkernen bis in die obersten Zellagen der Epidermis, hier gut zu erkennen ist. Auch die sehr lockere Struktur der angrenzenden Bindegewebsschichten (Σ) stellt ein typisches Merkmal der intraoralen Mukosa dar, in welchem die hier mittels der Immunfärbung deutlich dargestellten Gefäße (\Rightarrow) gleichmäßig verteilt sind. Besonders hervorzuheben ist die im Vergleich zu den extraoralen Narbenpräparaten deutlich stärkere Vaskularisation (vgl. Bild 6), bedingt durch den größeren Gefäßdurchmesser.

Bild 8: Aufnahme einer typischen Schleimhautnarbe, 12 Monate alt (Immunfärbung [vWF], Vergrößerung: 63-fach)

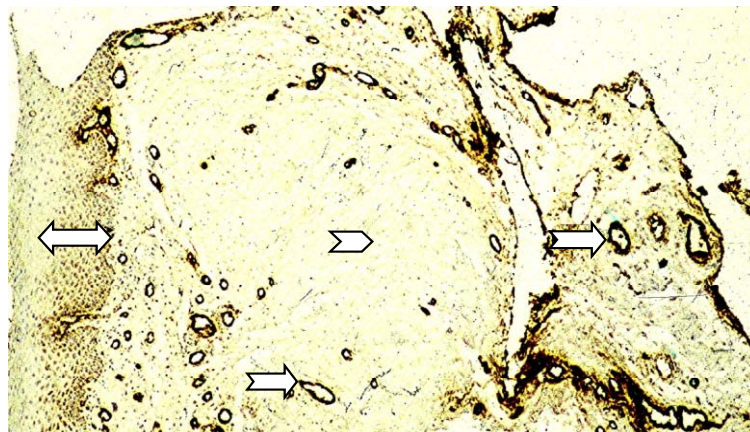


Bild 8 Aufnahme einer typischen Schleimhautnarbe

Auch in diesem Falle weist die Aufnahme die typischen Merkmale eines intraoralen Präparats auf. Deutlich präsentiert sich das mehrschichtig- unverhornte Plattenepithel (⇔) mit der Parakeratose (vgl. Bild 7). Das angrenzende Bindegewebe (⇒) erscheint im Vergleich zu den extraoralen Narbenpräparaten locker (vgl. Bild 6), “ungeordnet“ und stark vaskularisiert (⇒); letzteres bedingt durch die relativ hohe Anzahl an Gefäßen und deren deutlich erkennbaren Lumina, also einem relativ großen Gefäßdurchmesser. Auffallend ist jedoch der vergleichsweise gefäßarme Bindegewebsanteil im zentralen Anteil des Bildes (⇒), der in jedem intraoralen Narbenpräparat zu finden und – je nach Alter der Narbe – unterschiedlich stark ausgeprägt ist (vgl. auch Bild 9; Bild 10 und Bild 11).

Bild 9: Intraorale Narbe, 3,5 Monate alt
(Immunfärbung[vWF], Vergrößerung: 63-fach)

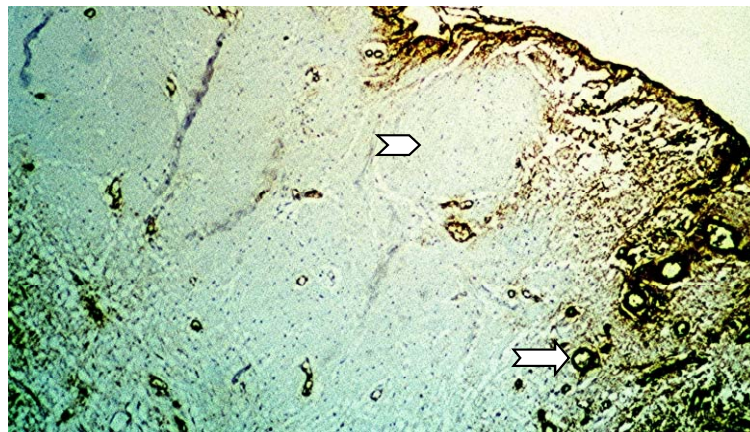


Bild 9 Intraorale Narbe, 3,5 Monate alt

Innerhalb des vorliegenden Präparates befindet sich die größte Anzahl an Gefäßen im vergleichsweise lockeren Bindegewebe im Randbereich. Im zentralen Anteil des Bildes, das die Hauptmasse an dichtem Bindegewebe enthält (Σ), befindet sich eine wesentlich geringere Anzahl an Gefäßen (Σ), die zudem ein im Durchschnitt kleineres Lumen aufweisen. Die Vaskularisierung erscheint also in diesem Bereich geringer.

Bild 10: Intraorale Narbe, 5 Monate alt
(Immunfärbung [vWF], Vergrößerung: 63-fach)

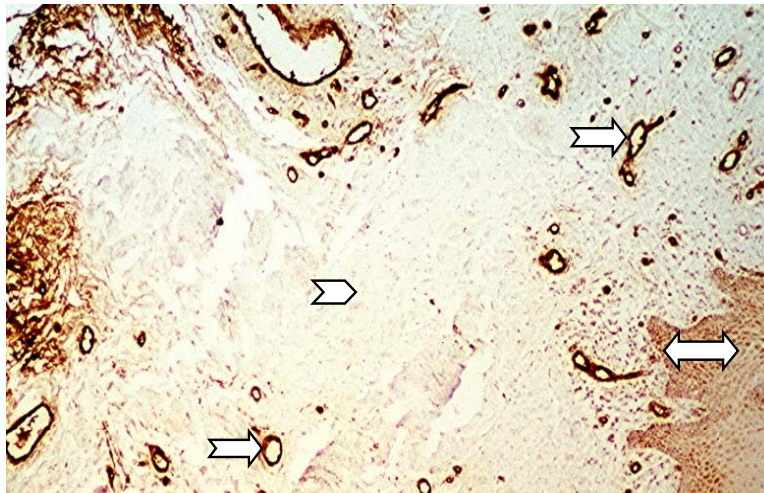


Bild 10 Intraorale Narbe, 5 Monate alt

Auch in diesem Falle befindet sich die Hauptmasse der Gefäße (⇔) im Randbereich des zentralen, dichteren Bindegewebsanteils (Σ), der sich dem Epithel (⇔) unmittelbar anschließt. Das zentrale Bindegewebe enthält im Vergleich zu dem des 3,5 Monate alten Präparates weniger Gefäße, wobei die Vaskularisierung der Randbereiche vergleichbar erscheint.

Bild 11: Intraorale Narbe, 10 Monate alt
(Immunfärbung [vWF], Vergrößerung: 63-fach)

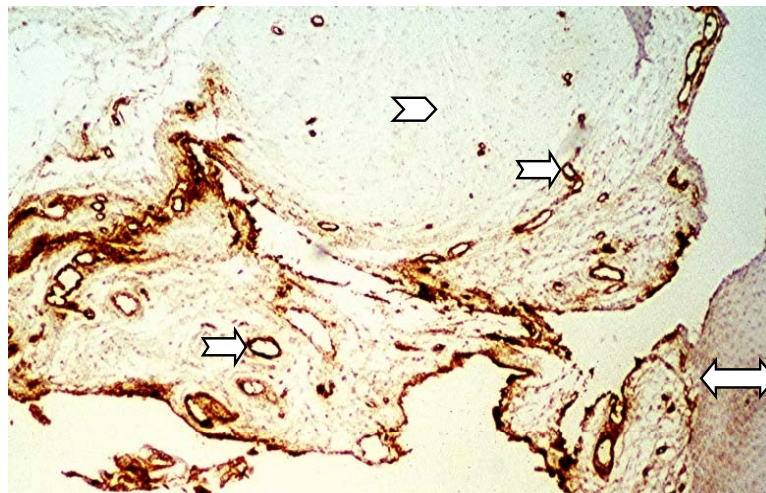


Bild 11 Intraorale Narbe, 10 Monate alt

Auch innerhalb dieser Aufnahme kann ein zentraler, gefäßarmer Bindegewebsanteil ausgemacht werden (⇨), der jedoch kleiner erscheint, als bei den beiden vorherigen, jüngeren Narbenpräparaten. Die Hauptmasse an Gefäßen (⇔) befindet sich ebenfalls im lockeren Bindegewebe des Randbereichs, wo auch die Gefäße mit dem größten Durchmesser zu finden sind (⇨⇨). Das Epithel (⇔⇨) befindet sich hier am rechten Bildrand.

Die deskriptive Darstellung eines 12 Monate alten intraoralen Narbenpräparates erfolgte bereits im Rahmen der allgemeinen vergleichenden Deskription der unterschiedlichen Präparategruppen (vgl. Bild 8).

4.4 Statistische Analyse

Zu Beginn der statistischen Auswertung bezüglich der Gefäßdichte innerhalb der bekannten vier Präparategruppen im Vergleich wurden die Daten auf Normalverteilung getestet, obwohl die geringe Datenmenge schon eine erhebliche Abweichung von dieser erwarten ließ. – Diese Vermutung wurde mittels der beiden durchgeführten Tests bestätigt (siehe Tab. 2 und Tab. 3).

Außerdem wurde überprüft, ob zwischen dem Alter der intraoralen Narben und Anzahl der Gefäße pro μm^2 ein Zusammenhang besteht.

Ferner fand eine Überprüfung des Einflusses der Geschlechtszugehörigkeit auf die Gefäßdichte pro μm^2 bei allen ausgewerteten Präparaten statt.

Während schon der Kolmogorov- Smirnov- Test eine signifikante Abweichung der Daten von der Gaußschen Normalverteilung errechnete (Tab. 3), so wurde diese Tatsache nach der Signifikanzkorrektur nach Lilliefors (Tab. 2) noch einmal bestätigt.

4.4.1 Tabellen zur Stichproben-Deskription

Tests auf Normalverteilung

Parameter	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Narbenalter (Monate)	,219	45	,000	,882	45	,000
Hautfläche (μm^2)	,113	252	,000	,692	252	,000
Anzahl der Gefäße	,174	252	,000	,835	252	,000
Gefäße pro μm^2 (* 1000)	,368	252	,000	,166	252	,000
Patientenalter (Jahre)	,161	156	,000	,921	156	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tab. 2 Tests auf Normalverteilung

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung

Statistik		Narbenalter (Monate)	Hautfläche (μm^2)	Anzahl Gefäße	Gefäße pro μm^2 (* 1000)	Patienten- alter (Jahre)
N		45	252	252	252	156
Parameter der Normalverteilung	Mittelwert	7,2222	2855346,2	46,27	,02596	31,6667
	Stand.-abw.	2,94564	2147572,0	41,107	,077216	14,01708
Extremste Differenzen	Absolut	,219	,113	,174	,368	,161
	Positiv	,219	,105	,174	,325	,161
	Negativ	-,125	-,113	-,130	-,368	-,125
Kolmogorov-Smirnov-Z		1,470	1,799	2,757	5,848	2,007
Signifikanz		,027	,003	,000	,000	,001

Tab. 3 Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung

4.4.2 Tabellen und Grafiken zur Hypothesen-Testung

Die graphischen Darstellungen in Form von Box- Plots (Abb. 7; Abb. 8, Abb. 9 u. Abb. 10) veranschaulichen die Mediane und Streuungen der Gefäße pro μm^2 im Vergleich der Präparate- Gruppen untereinander.

Abb. 7: Diese Graphik zeigt die Mediane und Streuungen der Gefäße / μm^2 bei den 4 verschiedenen Präparatgruppen im direkten Vergleich.

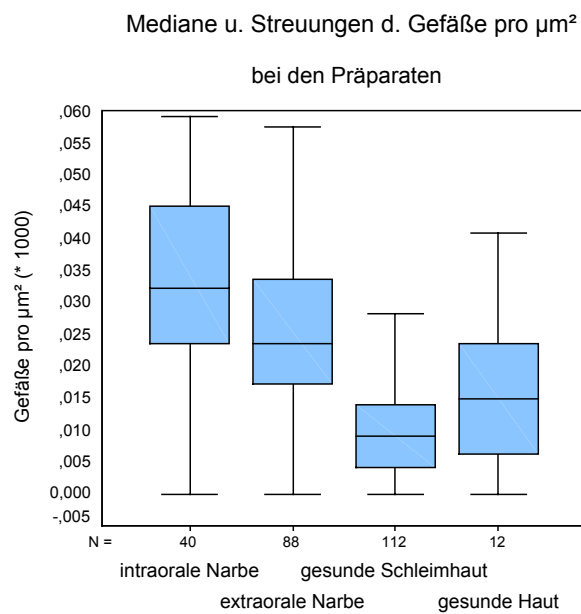


Abb. 7 Mediane u. Streuungen d. Gefäße bei den Präparaten

Abb. 8 veranschaulicht die Mediandifferenzen sowie die Streuungen zwischen der Anzahl der Gefäße pro μm^2 im Vergleich der Präparategruppen intraorale Narbe und gesunde Schleimhaut. Die Differenz wird in diesem Fall sehr deutlich, da beide Mediane relativ weit (über .020) auseinander liegen, und es zu keiner Überlappung der „Streuungs- Boxen“ kommt. Sehr auffällig ist auch, dass die Streuung der Gefäßanzahl bei der Gruppe der intraoralen Narben sehr groß ist (von ca. .025 bis .045). – Bei der Gruppe der gesunden Schleimhautpräparate erweist sie sich im Vergleich dazu recht klein und gleichmäßig um den Median herum verteilt (.005 bis .015).

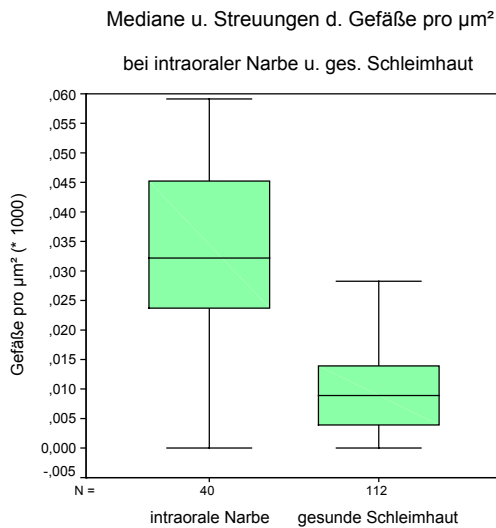


Abb. 8 Mediane u. Streuungen d. Gefäße bei intraoraler Narbe u. ges. Schleimhaut

**Mann-Whitney-U-Test
auf Unterschied zwischen
intraoraler Narbe und ges. Schleimhaut
bei der Anzahl der Gefäße pro μm^2**

Statistik	Gefäße pro μm^2 (* 1000)
Mann-Whitney-U	347,000
Z	-7,924
Signifikanz	,000

Tab. 4 Mann-Whitney-U-Test (Intraorale Narben / ges. Schleimhaut)

Dass die Gruppe der intraoralen Präparate eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßen pro μm^2 enthielt als die der gesunden Schleimhautpräparate, verdeutlicht der U- Test (Tab. 4).

Abb. 9: Die Graphik zeigt die Mediane und Streuungen der Gefäße / μm^2 für die Gruppe der extraoralen Narben und der der gesunden Hautpräparate. In diesem Fall fällt die Differenz zwischen den beiden Medianen geringer aus als im ersten Beispiel beschrieben (s. Abb. 8), sie liegt bei etwa .015. – Der Median der Gruppe „extraorale Narbe“ liegt höher, nämlich bei ca. .025. – Die Streuungen der Anzahl der Gefäße bei den verschiedenen Präparaten einer Gruppe erweist sich in beiden Fällen als recht groß, sie liegt bei ca. .015. Auch verdeutlicht die Graphik die Überlappung der beiden „Streuungs-Boxen“ von etwa .005.

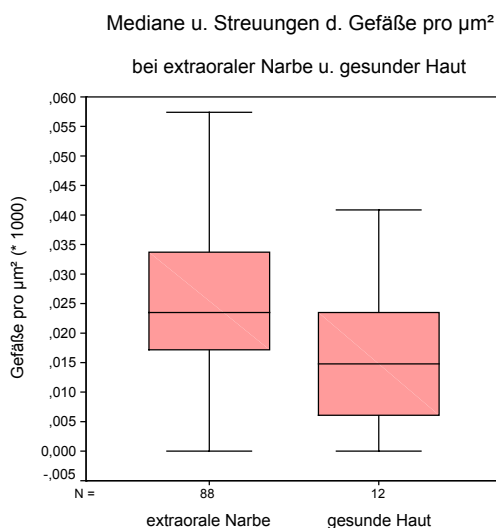


Abb. 9 Mediane u. Streuungen d. Gefäße bei extraoraler Narbe u. gesunder Haut

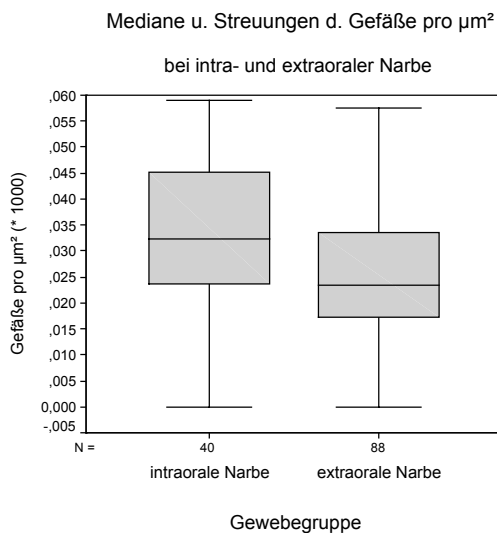
**Mann-Whitney-U-Test
auf Unterschied zwischen
extraoraler Narbe und gesunder Haut
bei der Anzahl der Gefäße pro μm^2**

Statistik	Gefäße pro μm^2 (* 1000)
Mann-Whitney-U	310,500
Z	-2,307
Signifikanz	,021

Tab. 5 Mann-Whitney-U-Test (Extraorale Narben / gesunde Haut)

Wie der U- Test zeigt (Tab. 5), enthalten die extraoralen Narbenpräparate eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßen pro μm^2 als die gesunden Hautpräparate.

Abb. 10: Die letzte der „Box- Plot“- Graphiken vergleicht die Mediane und Streuungen der Gefäße / μm^2 der Präparate- Gruppen „intraorale Narbe“ und „extraorale Narbe“. Besonders deutlich stellt sich in diesem Falle die Überlappung der beiden „Streuungs –Boxen“ dar, sie liegt bei etwa .010. Auch die Differenz zwischen den Medianen beträgt ca. .010, wobei der Median der Gruppe „intraorale Narbe“ höher liegt, nämlich zwischen .030 und .035. – Weiterhin geht aus der Graphik hervor, dass die Streuung der Gefäßanzahl bei der Gruppe der „intraoralen Narben“ größer ist, als bei der Vergleichsgruppe (ca. .020 im Vergl. zu ca. .015).



**Mann-Whitney-U-Test
auf Unterschied zwischen
intra- und extraoraler Narbe
bei der Anzahl der Gefäße pro μm^2**

Statistik	Gefäße pro μm^2 (* 1000)
Mann-Whitney-U	1165,500
Z	-3,056
Signifikanz	,002

**Tab. 6 Mann-Whitney-U-Test
(Intra- und extraorale Narbe)**

**Abb. 10 Mediane u. Streuungen d.
Gefäße bei intra- und
extraoraler Narbe**

Dass die Mediandifferenzen bezüglich der Anzahl der Gefäße pro μm^2 zwischen der Gruppe der intra- und extraoralen Narbenpräparate hochsignifikant sind, geht wiederum aus dem Ergebnis des U- Tests (Tab. 6) hervor. Demnach enthalten die intraoralen Narbenpräparate eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßen pro μm^2 als die extraoralen.

Nach den Grafiken und Tabellen zur Hypothesentestung folgt nun die Überprüfung der Frage, ob das Alter der intraoralen Narben einen Einfluss auf die Anzahl der Gefäße pro μm^2 hat. Verglichen wurden die Präparate aus der Gruppe der intraoralen Narbenpräparate untereinander.

Abb. 11: Das Diagramm veranschaulicht den Zusammenhang zwischen dem Alter der Narbe und der Anzahl der Gefäße pro μm^2 für die Gruppe der „intraoralen Narben“. Ausserdem zeigt es die Streuung der Gefäßanzahl innerhalb eines jeden Präparates (schwarze Punkte).- Die nach rechts oben ansteigende rote Gerade verdeutlicht den linearen Zusammenhang zwischen den o.g. Parametern, d.h., mit zunehmendem Alter der Narbe nimmt die Anzahl der Gefäße pro μm^2 zu.

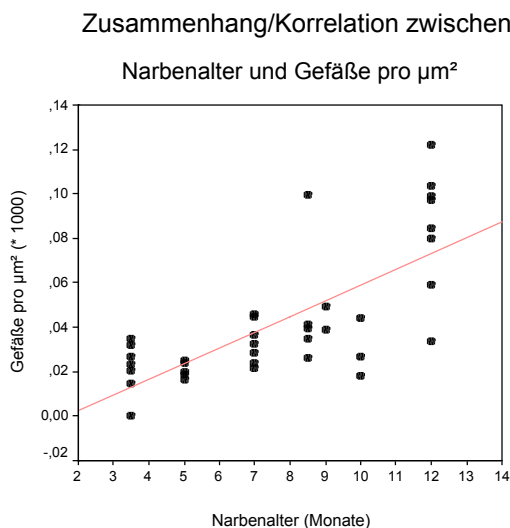


Abb. 11 Zusammenhang / Korrelation (Narbenalter / Gefäße)

**Spearman-Korrelation (Rho)
zwischen Narbenalter u. Anzahl der Gefäße pro μm^2
bei intraoralen Narben**

Parameter	Statistik	Gefäße pro μm^2 (* 1000)
Narbenalter (Monate)	Korrelation	,708
	Signifikanz	,000
	N	37

**Tab. 7 Spearman-Korrelation (Rho)
(Narbenalter u. Anzahl der
Gefäße pro μm^2
bei intraoralen Narben)**

Tab. 7 veranschaulicht, dass die Korrelation zwischen dem Alter der intraoralen Narben und der Anzahl der Gefäße pro μm^2 hochsignifikant war ($p < .001$). Demnach steigt die Anzahl der Gefäße pro μm^2 mit zunehmendem Alter der Narbe signifikant an; in diesem Falle linear, wie Abb. 9 zeigt.

Abschließend erfolgt die Überprüfung des Einflusses des Geschlechts auf die Gefäßdichte pro μm^2 innerhalb der Präparate aller Gruppen.

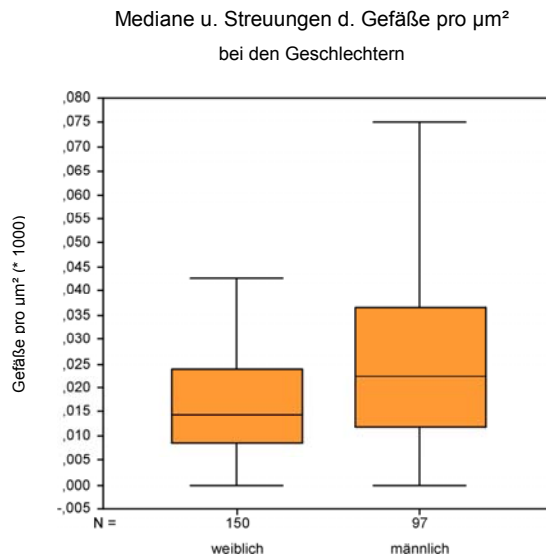


Abb. 12 Mediane u. Streuungen d. Gefäße bei den Geschlechtern

**Mann-Whitney-U-Test
auf unterschiedliche Anzahl
der Gefäße pro μm^2
zwischen den Geschlechtern**

Statistik	Gefäße pro μm^2 (* 1000)
Mann-Whitney-U	5229,000
Z	-3,732
Signifikanz	,000

Tab. 8 Mann-Whitney-U-Test (unterschiedliche Anzahl d. Gefäße zwischen den Geschlechtern)

Der U- Test (Tab. 8) prüft wiederum die Mediandifferenzen auf Signifikanz. Das Ergebnis zeigt, dass der Unterschied in der Anzahl der Gefäße pro μm^2 zwischen den Geschlechtern signifikant ist. Demnach liegt der Medianwert der Gefäße pro μm^2 bei den Präparaten männlichen Ursprungs signifikant höher, als bei den weiblichen.

5 Diskussion

In der Fachliteratur gilt übereinstimmend die These, dass die Angiogenese, also die Gefäßneubildung, und in deren Folge die Vaskularisierung eines Gewebes entscheidend dessen Regenerationsfähigkeit beeinflussen. Der Kopf-/ Halsregion kommt in diesem Zusammenhang aufgrund ihrer überdurchschnittlich guten Durchblutung eine besondere Rolle zu. Ebenso gilt als allgemein anerkannt, dass Schleimhäute im Allgemeinen und die Mundschleimhaut im Besonderen eine besondere Fähigkeit zur Regeneration besitzen. Der Erforschung der Ursachen dieses Phänomens gilt schon seit langem das wissenschaftliche Interesse, wobei das Hauptaugenmerk auf der Beeinflussung der Wundheilung im Allgemeinen und der Angiogenese im Speziellen durch Wachstumsfaktoren gerichtet ist. Ebenfalls von Interesse ist jedoch das Verteilungsmuster der neu gebildeten Gefäße, insbesondere im Grenzbereich zur entstandenen Narbe. Um Besonderheiten und Unterschiede des oralen Mukosa- Gewebes darzustellen, muss dieses mit gesunder Haut/ Schleimhaut bzw. extraoralem Hautnarbengewebe verglichen werden, wie in dieser Arbeit geschehen.

Die Untersuchung von Narbengewebe, insbesondere von solchem der Mundschleimhaut, wirft jedoch verschiedene Probleme auf. Zunächst einmal steht Narbengewebe, vor allem solches der oralen Mukosa, nur in begrenzten Mengen zur Verfügung und ist nicht an exakt definierten und somit reproduzierbaren Stellen lokalisiert. Letzteres wäre für eine Auswertung der histologischen Bilder anhand von so genannten „hot spots“ [Brun et al.2001, Kleinheinz et al. 2001] jedoch wichtig. Es müsste demnach an exakt definierten Stellen im Präparat lokalisiert sein, und zwar in Gewebeabschnitten, die in jedem der untersuchten Präparate eindeutig identifizierbar und von anderen Arealen des Gewebes eindeutig abgrenzbar sind. Diese Voraussetzungen waren jedoch bei den untersuchten Präparaten dieser Studie nicht erfüllt. Eine exakte Abgrenzung des Narbengewebes war unter lichtmikroskopischen Bedingungen nicht möglich, insbesondere die Narbenbildung der Mundschleimhaut erwies sich als sehr gering [McCormick et al 1993]. Aus diesem Grunde erfolgte die Ermittlung der Gefäßdichte im Verhältnis zur Gesamtfläche des jeweiligen Präparats. Die Erfassung des

Verteilungsmusters der immunhistologisch dargestellten Gefäße erfolgte aus den oben genannten Gründen rein deskriptiv. Weiterhin erschwert die Tatsache, dass in der Literatur bisher nur sehr wenige Studien zur intraoralen Wundheilung bzw. der Untersuchung von Narbengewebe der Schleimhaut veröffentlicht wurden, die Interpretation der Ergebnisse. Die Erforschung der Mechanismen intraoraler Heilung ist zwar seit vielen Jahren von zentralem Interesse, aber die meisten Studien befassen sich mit dem Einfluss der verschiedenen Wachstumsfaktoren auf die intraorale Wundheilung oder der Tumorgenese innerhalb der Mundhöhle [Brun et al. 2001, Carlile et al. 2001, Iamaroon et al. 2003, Jin et al. 1995]. Die histologische Untersuchung von Narbengewebe bezieht sich meist auf die äußere Haut [Beer et al. 1998]. Letztere Autoren untersuchten die Vaskularisierung von „normalem“, hypertrophem und periokulärem Narbengewebe, sowie von Keloiden der äußeren Haut immunhistologisch. - Die Deskription intraoraler Narbenbildung erfolgt meist anhand der klinisch sichtbaren Ausprägung [Lauer et al. 2001, Oueis et al. 2000]. Dennoch gibt die Literatur einige Hinweise, die eine Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten unterstützen.

So existieren inzwischen eine Reihe von Studien, die sich mit der Untersuchung humanen Gewebes befassen. Die Gemeinsamkeit dieser ist u.a., dass sie typischerweise auf einer sehr geringen Anzahl an Proben basieren [Beer et al. 1988, Brun et al. 2001, Caproni et al. 2003, Iamaroon et al. 2003, Jin et al. 1995, Tipoe et al. 1996 etc.]. Aus diesem Grunde kommen bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse ausschließlich non-parametrische Verfahren zum Einsatz, wie auch in dieser Arbeit. Dieser Umstand ermöglicht einen guten Vergleich der Ergebnisse untereinander.

Die histologisch erkennbaren Differenzen zwischen den intraoralen Narbenpräparaten unterschiedlichen Alters (von 3,5 bis 12 Monaten) waren gering, aber dennoch ersichtlich. So nahm z.B. die Anzahl der Gefäße innerhalb des Narbengewebes im engeren Sinne leicht ab, während die Dichte des Bindegewebes zunahm. Die Gesamtanzahl der Gefäße innerhalb der intraoralen Narbenpräparate war jedoch im Vergleich zu den vier anderen Präparategruppen deutlich erhöht. Die Streuung der Anzahl der Gefäße pro μm^2 war zwar recht hoch (insgesamt von ,00 bis ,12 Gefäße /

μm^2), aber im Mittel lag sie höher als die Mediane der Vergleichsgruppen. Dieses Ergebnis deutet auf eine hohe Angiogenität der oralen Mukosa über den Wundheilungsprozess im engeren Sinne hinaus hin.

Die Autoren Jin et al. [1995] und Tipoe et al. [1996] postulieren, dass jede Art von Verletzung der intraoralen Schleimhaut zu einem signifikanten Anstieg der Angiogenese und in der Folge zu einem Anstieg der Vaskularisation führt. Letztere berücksichtigt auch eine Zunahme der Gefäßlumina.

Diese allgemeine Hypothese war jedoch nur ein Ergebnis der letztgenannten Studie. Das Hauptinteresse galt der Untersuchung von oralem Mukosagewebe unterschiedlichen Dysplasiegrades [Jin et al. 1995, Li et al. 1997, Maclusky et al. 2000, Pazouki et al. 1997, Tipoe et al. 1996]. Demnach steigen die angiogenetische Aktivität und die Zellproliferation mit zunehmender Differenzierung der epithelialen Zellen an, bzw. ist die Angiogenese eine der Voraussetzungen für die Genese von Tumoren. Studien dieser Art lassen sich zwar nicht direkt mit der vorliegenden Untersuchung vergleichen, aber die Tatsache, dass die angiogenetische Aktivität der Mundschleimhaut mit der Zellproliferationsrate korreliert, unterstützt die Ergebnisse dieser Studie. Der entscheidende Unterschied liegt jedoch in der grundsätzlich verschiedenen Genese. Bei Narbengewebe handelt es sich um Ersatzgewebe zum Verschluss eines Gewebsdefektes, welches infolge eines physiologischen Wundheilungsprozesses entstanden ist. Bei Tumorgewebe bzw. der unterschiedlichen Vorstufen, handelt es sich dagegen um entartete Zellen, die das Ergebnis eines pathologischen Prozesses darstellen.

Die Interpretation und Bewertung der statistischen Ergebnisse dieser Arbeit muss im Zusammenhang mit den deskriptiven Auswertungen der histologischen Bilder vorgenommen werden. Nur eine Kombination dieser beiden Parameter ermöglicht die korrekte Einordnung der statistischen Daten in das „Gesamtergebnis“ der vorliegenden Studie. Lediglich die Beziehung „Anzahl der Gefäße pro μm^2 im Vergleich der Geschlechter“ kann für sich interpretiert werden. Da die Geschlechtszugehörigkeit der Präparate zufällig war, könnte auch die Beziehung zur Anzahl der Gefäße pro μm^2 ein zufälliges Ergebnis sein, insbesondere bei Betrachtung der „Streuungsboxen“ für beide Geschlechter. Diese überschneiden sich in weiten Bereichen, sodass die Differenz

zwischen den Medianwerten relativiert wird. Auch die Fachliteratur liefert diesbezüglich keine Hinweise, sodass das signifikante Ergebnis zurückhaltend beurteilt werden muss.

Die Notwendigkeit, die Parameter „statistische Analyse“ mit der „deskriptiven Histologie“ zu kombinieren, wird besonders deutlich bei der Interpretation des Diagramms „Narbenalter in Korrelation mit der Anzahl der Gefäße pro μm^2 “. Die zentrale Aussage dieser graphischen Darstellung wäre- unter rein statistischen Gesichtspunkten- „Mit zunehmendem Alter der intraoralen Narbe nimmt die Anzahl an Gefäßen pro Fläche kontinuierlich zu“. Diese Hypothese widerspräche jedoch allen Studien, die sich mit dem Reifungsprozess des Narbengewebes befassen.

Übereinstimmend gilt die These, dass es sich genau umgekehrt verhält; die Vaskularisierung des Narbengewebes im engeren Sinne also mit zunehmendem Reifungsgrad abnimmt. Wenn man nun aber die histologischen Bilder der intraoralen Narbenpräparate bezüglich der Lokalisation der Gefäße innerhalb der einzelnen Präparate betrachtet, relativiert sich das primäre Ergebnis der statistischen Analyse. Es fällt nämlich auf, dass diese in einer charakteristischen Art und Weise innerhalb des Präparates verteilt sind. So befindet sich der überwiegende Anteil der Gefäße im relativ lockeren Bindegewebe rund um das dichte Bindegewebe- hierbei handelt es sich vermutlich um das Narbengewebe im engeren Sinne- herum. Dabei handelt es sich um einen, hier meist relativ zentral gelegenen Gewebsabschnitt, der überwiegend aus dichtem Bindegewebe besteht. Die Faserdichte erscheint hier ausgeprägter als in den angrenzenden Gewebsabschnitten (typisch für Narbengewebe) und die Gefäßdichte dementsprechend deutlich geringer. Einige Bereiche der Narbe erscheinen sogar avaskulär, was jedoch auch mit der relativ geringen Vergrößerung zusammenhängen kann, da sehr kleine Kapillare nicht zu erkennen sind. Dieses charakteristische Verteilungsmuster der Gefäße bzw. die Faserdichte des Bindegewebes im Vergleich zu den gesunden Schleimhautpräparaten war in allen intraoralen Narbenpräparaten zu erkennen, wenn auch mehr oder weniger ausgeprägt. Der im Vergleich zu den intraoralen Narbenpräparaten sehr niedrige Medianwert der Gefäßanzahl pro μm^2 für die gesunden Schleimhautpräparate könnte zum einen mit der sehr lockeren und häufig

zerrissenen Struktur dieser Präparate zusammenhängen, weil dadurch wahrscheinlich Gefäße zerstört wurden, zum anderen aber auch mit der relativ geringen Vergrößerung. In jedem Fall unterstützt dieses Ergebnis jedoch die Hypothese, dass die angiogenetische Aktivität der oralen Mukosa nach Verletzung deutlich zunimmt und auch während des Reifungsprozesses erhöht bleibt [Jin et al. 1995, Tipoe et.al. 1996, Brown et. al. 2002].

Aber auch andere Aspekte wurden untersucht, wie die Beeinflussung der Wundheilung durch ein feuchtes Milieu, die Auswirkungen der Dauer der Entzündungsphase intraoraler versus extraoraler Wunden auf die Heilung und die Rolle der Fibroblasten. Weiterhin existieren sehr viele Veröffentlichungen, die zumeist eine Übersicht über alle Aspekte der Wundheilung im Allgemeinen bieten, aber nicht auf die speziellen intraoralen Verhältnisse eingehen

Eine der Arbeiten soll ausführlicher dargestellt werden, da sie sich mit den Vorteilen eines feuchten Milieus im Rahmen der Wundheilung befasst. Ein Umstand, der ja auch auf intraorale Verhältnisse zutrifft. Field et al. [1994] postulieren, dass die Aufrechterhaltung eines feuchten Milieus den Wundheilungsprozess erleichtert. Die vorteilhaften Effekte eines feuchten versus eines trockenen Milieus seien 1. die Prävention einer Gewebsdehydratation und des damit verbundenen Zelltodes, 2. eine beschleunigte Angiogenese, 3. ein vermehrter Zusammenfall nekrotischen Gewebes und Fibrin, z.B. perikapillärer Fibrin- „Ummantelungen“ und 4. die Potenzierung der Interaktion von Wachstumsfaktoren mit ihren Zielzellen. Weiterhin behaupten die Autoren, dass Meinungen, die sagen, eine feuchte Umgebung der Wunde fördere das Infektionsrisiko, unbegründet seien

Die positiven Auswirkungen des Speichels auf diesen Prozess beschreiben mehrere Autoren. So untersuchten beispielsweise Kagami et al. [2000] die Rolle des bFGF auf den intraoralen Wundheilungsprozess. Es handelte sich um ein Tiermodell (Ratte) und der bFGF entstammte dem Speichel der Glandula submandibularis, die bei Nagetieren, aber auch beim Menschen, als Reservoir für die Wachstumsfaktoren EGF, bFGF, Insulin und IGF gilt, wenn diese Tatsache auch beim Menschen noch nicht vollständig geklärt ist. Untersucht wurde zum einen die mitogene Aktivität (Steigerung der

Zellproliferationsrate) innerhalb von Speicheldrüsen- Zellkulturen bei unterschiedlichen Konzentrationen von bFGF, die bei einer Konzentration von mindestens 100 ng/ ml gesteigert war. Zum anderen wurde die Hypothese überprüft, dass bFGF die Heilung bzw. Reparation von Geweben beschleunigt. Untersuchungsgut war atrophisches Drüsengewebe von der Ratte und auch diese Untersuchung erbrachte ein positives Ergebnis. Schlussendlich erfolgte die Überprüfung der Beschleunigung der Heilungsvorgänge von Schleimhautdefekten und auch diese endete mit einem positiven Ergebnis: Die Re- Epithelisierungsrate nach 3, 5 und 7 Tagen war in der Gruppe der „bFGF- behandelten“ Gewebe signifikant erhöht gegenüber der nicht behandelten Gruppe. – Ishizaki et al. [2000] dagegen identifizierten und analysierten Faktoren die die Konzentration von bFGF im Speichel gesunder, menschlicher Individuen beeinflussen. Zu Beginn der Untersuchung wurde die Hypothese formuliert, dass bFGF, zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren, in Wundheilungsprozesse involviert sei. Es folgte der Vorschlag, bFGF trage zu reparativen Prozessen in Schleimhäuten bei. Die Identifizierung des bFGF erfolgte mittels ELISA und anschließender Spektrophotometrie. Ein Ergebnis war, dass bFGF in allen Speichelproben entdeckt wurde. Weiterhin gab es im Alter von 22- 49 Jahren keine altersabhängigen Varianten, keine Unterschiede des bFGF- Gehalts der Speichelproben zwischen Männern und Frauen sowie zwischen Europäern und Asiaten. Allerdings enthielt der Speichel von Rauchern signifikant mehr bFGF, als der von Nichtrauchern.

McCormick et al. [1993] heben die bedeutende Rolle der Wachstumsfaktoren im Allgemeinen und die der mit dem Speichel sekretierten im Besonderen auf die intraorale Heilung hervor. Insbesondere EGF, der u.a. in der Glandula parotis synthetisiert wird, soll positive Effekte auf die Bildung von Proliferationsgewebe und Kollagen haben. So führte beispielsweise die Zugabe von EGF zu intraoralen Wunden bei parotid-ektomierten Ratten zu einem Anstieg der Reparationsleistung des verletzten Gewebes. Auch die Re- Epithelisierung wurde beschleunigt. Der Mechanismus von EGF sei noch nicht bekannt, aber er scheine die Rekrutierung von Zellen zu erhöhen. Außerdem interagiere EGF mit anderen Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF und TGF- β , die dafür bekannt sind, die Angiogenese, die Fibroplasie sowie die Wundkontraktion zu fördern.

Auch andere Autoren räumen dem EGF eine Sonderstellung im Rahmen der Wundheilung und hier insbesondere bei der Angiogenese ein [Kleinheinz et al. 2001]. Eine andere Studie [Cornelini et al. 2003] untersucht Proben keratinisierter Gingiva im Randbereich gut eingeeilter und fehlgeschlagener dentaler Implantate bezüglich der TGF- β -1-Expression und der Gefäßdichte. Letzteres erweist sich wiederum als besonders interessant im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Außerdem wurden die Epithel- und Stromazellen morphometrisch bestimmt. Die Kernaussage dieser Untersuchung war, dass TGF- β -1 einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren in der Regulation des Infiltrats und der Gewebsreparation sein könnte. Auch diese Studie basiert auf einer geringen Anzahl an Proben (n= 20), da es sich um humanes Gewebe handelt. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied in der TGF- β -1-Expression in a) dem Epithel rund um die Implantate und b) in den Gefäßen innerhalb der Weichgewebe rund um die Implantate zwischen beiden Gewebegruppen. Die Expression war demnach in den Geweben rund um die fehlgeschlagenen Implantate erhöht. Keine statistische Signifikanz der TGF- β -1-Expression konnte in den Stromazellen beobachtet werden. Fazit der Studie ist, dass TGF- β -1 einer der wichtigsten Faktoren bei der Regulation des Infiltrats und der Gewebsreparation sein könnte, indem er unter anderem Fibroblasten und Endothelzellen stimuliert. Die Gefäßdichte war interessanterweise bei allen Gewebeproben gleich. Demnach scheinen entzündliche Prozesse keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl neu gebildeter Gefäße zu haben.

Andere Studien vergleichen unterschiedliche Aspekte der Wundheilung zwischen oraler Mukosa und Haut; ein Vergleich, der wiederum im Zusammenhang mit dieser Arbeit von besonderem Interesse ist. Den oben bereits erwähnten Fibroblasten gilt die Aufmerksamkeit der im Folgenden beschriebenen Studie, die die Unterschiede im „Verhalten“ oraler versus dermalen Fibroblasten untersucht. Zu Beginn formulieren Lee et al. [1999] die allgemeine Hypothese, dass es allgemein anerkannt sei, dass orale Mukosa schneller und unter Ausbildung einer geringeren Narbe verheilt als Haut. Letzteres korreliert wiederum mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Weiterhin stellen sie fest, dass Fibroblasten der Mundschleimhaut im Vergleich zu dermalen Fibroblasten

deutliche Unterschiede in ihrem Verhalten zeigen, die eine Ursache für die unterschiedlichen Heilungsprozesse in beiden Geweben zu sein scheinen. Ferner weisen sie darauf hin, dass hypertrophe Narben und Keloide in der Mundhöhle sehr selten vorkommen. Die Ergebnisse der Studie (Zellkultur von Fibroblasten oraler Mukosa und Haut) waren, dass die Fibroblasten der Mundschleimhaut geringfügig mehr proliferierten, als die kutanen. Außerdem waren Unterschiede in der basalen Kollagensyntheserate zwischen beiden Fibroblasten- Typen nicht feststellbar, jedoch produzierten die oralen Fibroblasten bei Stimulation durch TGF- β - 1 mehr Kollagen. Diese Aussage spricht für die stärkere Stimulierbarkeit oraler Fibroblasten durch Wachstumsfaktoren und damit für eine bessere Wundheilung.

Nukumi et al. untersuchten in der von ihnen durchgeführten Studie aus dem Jahre 2004 die Unterschiede in der Expression des bFGF während der Wundheilung von oraler Mukosa und Haut. Die Kernaussage dieser Untersuchung lautet zum einen, dass Mundschleimhaut schneller heilt als Haut [vgl. Beer et al. 1998 etc.] und zum anderen, dass die Menge und der Effekt von bFGF maßgeblich zu den Unterschieden in der Geschwindigkeit des Wundheilungsprozesses beider Gewebe beiträgt. Bei der Studie handelt es sich um ein Tiermodell (Ratte, in vivo). Es wurden jeweils auf dem Rücken und innerhalb der bukkalen Mukosa Wunden gesetzt, die ausgemessen und photographiert wurden. Die histologische Studie von Proben des Granulationsgewebes (HE- Färbung) und immunhistochemischer Darstellung der bFGF- positiven Zellen ergab, dass die Anzahl dieser bei den intraoralen Präparaten am 5. Tag nach Verwundung am größten war, während dies bei den dermalen Präparaten erst am 7. Tag nach Verwundung der Fall war. Die gleiche Zeit wurde jeweils für die Re-Epithelisierung benötigt. Regenerierte Haut konnte dagegen bereits einen Tag post Verwundung bei den Schleimhautpräparaten und erst 2 Tage später, also am 3. Tag post Verwundung, bei den Präparaten der äußeren Haut beobachtet werden. Außerdem kontrahierten die oralen Wunden signifikant schneller als die extraoralen.

Die unterschiedlichen Entzündungsantworten in oralen Mukosa- und Hautwunden waren Untersuchungsgegenstand der im Folgenden erwähnten Studie [Szpaderska et al. 2003]. Die Kernaussage dieser ist, dass die geringer ausgeprägte Entzündungsphase

intraoralen Wunden eines der Schlüsselmerkmale für die privilegierte intraorale Wundheilung sei. Hierbei handelt es sich um eine in-vivo-Studie, bei der das inflammatorische Zellinfiltrat und die Zytokinproduktion in Wunden gleicher Größe von oraler Mukosa und Haut verglichen wurde. Die Ergebnisse waren erstens signifikant erniedrigte Level von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und der T-Zell-Infiltration, die in oralen versus Hautwunden gefunden wurden. Zweitens zeigte die PCR-Analyse der inflammatorischen Zytokinproduktion, dass intraorale Wunden deutlich weniger Interleukin 6 enthielten, als dermale Wunden. Ebenso war das profibrotische Zytokin FGF- β -1 in geringerer Menge in der Mundschleimhaut vorhanden als in der Haut.

Diese zuletzt vorgestellte Studie soll das Schwerpunktthema intraorale Wundheilung zunächst abschließend behandeln.

Im Folgenden steht der Wundheilungsprozess der äußeren Haut im Vordergrund, der, wie viele Untersuchungen zeigen, schon seit vielen Jahren ein zentrales Anliegen des Forschungsinteresses darstellt.

Zuvor sollen jedoch die Graphiken und Tabellen bezüglich des Vergleichs zwischen extra- versus intraoralen Narbenpräparaten sowie von gesunder Haut und extraoralem Narbengewebe nochmals in Erinnerung gebracht werden. Die Aussage dieser Grafik muss etwas zurückhaltender interpretiert werden, da lediglich eine geringe Anzahl an gesunden Hautpräparaten vorlag. Da diese jedoch mit dem histologischen Aufbau der Haut, wie er in den einschlägigen Lehrbüchern bereits hinreichend beschrieben wurde, übereinstimmen, können sie dennoch als Referenzproben herangezogen werden.

Demnach lag der Medianwert für die Anzahl der Gefäße pro μm^2 bei den extraoralen Narben höher als bei den gesunden Referenzproben. Dieses Ergebnis überrascht zunächst, aber auch in diesem Falle muss die Verteilung der Gefäße innerhalb der Präparate in die Interpretation mit einbezogen werden. Demnach präsentiert sich die extraorale Narbe im engeren Sinne (parallel zur Hautoberfläche ausgerichtete Bindegewebsfasern), soweit sie innerhalb der einzelnen Schnitte identifiziert werden konnte, als nahezu avaskulär [Tonnesen et al 2000]. Der Hauptanteil der Gefäße

befindet sich auch in diesem Falle in den Gewebeabschnitten im Anschluss an das Narbengewebe, also innerhalb der Dermis und der Submukosa. Aber auch die beiden letztgenannten Gewebeschichten enthalten eine höhere Anzahl an Gefäßen, als dieselben der gesunden Haut. Demnach scheint auch in diesem Falle die angiogenetische Aktivität der Haut noch über den Reifungsprozess der Narbe hinaus gesteigert zu sein, wenn auch in geringerem Maße, als bei den Mukosanarben ersichtlich. Bei diesen lag der Medianwert für die Anzahl der Gefäße pro μm^2 noch höher, wenn die Differenz zum Median für die extraoralen Narbenpräparate jedoch geringer ausfiel, als erwartet.

Mit diesen nicht erwarteten Ergebnissen korreliert jedoch eine Studie aus dem Jahre 2002, mittels derer Brown et al. die lang andauernde Persistenz der Gefäßdichte und der Fibroblasten in Narbengewebe nach Brust- Operationen beweisen. Untersucht wurden Proben des Narbengewebes und gesunder Referenzproben, welche vor der Operation gewonnen wurden, von 45 Probanden (Referenzproben n= 24). Die sichtbare Ausbildung einer Narbe erfolgte mit einer Streuung von 2 bis 52 Wochen, wobei die Gefäßdichte im Mittel nach 17 Wochen am höchsten gewesen war. Weiterhin sei sie aber auch innerhalb des reifen Narbengewebes (> 52 Wochen) im Vergleich zu den Referenzproben erhöht geblieben. Die Gefäßdarstellung erfolgte auch in diesem Falle mittels immunhistochemischer Färbemethoden.

Die Themen Wundheilung und die weitere Erforschung der Angiogenese sind von großem wissenschaftlichem Interesse. Der Neubildung von Blutgefäßen kommt eine entscheidende Rolle innerhalb unterschiedlichster physio- und pathophysiologischer Vorgänge zu. Somit trägt die detaillierte Erforschung ihrer funktionellen Mechanismen, insbesondere auf molekularbiologischer Ebene, entscheidend dazu bei, physiologische Prozesse während der Angiogenese möglicherweise zu fördern bzw. zu unterstützen und pathologische, wie z.B. Wundheilungsstörungen der unterschiedlichsten Art, Tumorwachstum etc., entweder günstig zu beeinflussen oder zu unterbinden.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit befasst sich nun in erster Linie mit dem „Ergebnis“ der dermalen bzw. intraoralen Wundheilung. Das heißt, die primären funktionellen Mechanismen des Wundheilungsprozesses waren zum Zeitpunkt der

Untersuchung bereits abgeschlossen, sodass der Schwerpunkt des Interesses der Studie auf der Anzahl der Gefäße pro Fläche innerhalb der verschiedenen Präparatgruppen lag.

Die statistisch signifikanten Ergebnisse bezüglich der Anzahl der neu gebildeten Gefäße insbesondere im Vergleich gesunder oraler Mukosa und Narbengewebe der Mundschleimhaut zeigen, dass eine Untersuchung von Narbengewebe, vor allem solches der oralen Mukosa, sinnvoll ist. Auch die Tatsache, dass der Wundheilungsprozess der Schleimhaut mit einer sehr viel geringeren Narbenbildung einhergeht, als der der äußeren Haut, könnte zum Zwecke der Beeinflussung der Narbenbildung im günstigen Sinne, also mit dem Ziel einer möglichst gering ausgebildeten Narbe, interessante Hinweise geben. Der Schwerpunkt in der Erforschung der intraoralen Wundheilungsvorgänge liegt, wie viele Studien zeigen, auf der Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Wachstumsfaktoren auf diesen Prozess. Dabei steht die Angiogenese als zentrales Element im Mittelpunkt des Interesses. Ebenfalls im Zentrum der Forschung steht die Entwicklung maligner Tumore der Mundhöhle.

Die Ausbildung einer bindegewebigen Narbe als Ergebnis eines physiologischen Wundheilungsprozesses ist jedoch weiterhin von Bedeutung, insbesondere für alle chirurgischen Disziplinen. So stellt z.B. die Entwicklung hypertropher Narben sowohl ein funktionelles als auch ein ästhetisches Problem dar. Ersteres kommt beispielsweise bei der chirurgischen Behandlung von Spaltpatienten zum Tragen, da Narbenzüge das Gesichtswachstum ungünstig beeinflussen können [Joos et al.1994, Wijdeveld et al. 1991]. Die negativen Auswirkungen auf die Ästhetik sind vor allem nach Ausbildung hypertropher Narben und Keloide von Bedeutung.

All diese Aspekte zeigen, dass die Erforschung der Entwicklung von Narben sowohl der äußeren Haut als auch der oralen Mukosa auch in Zukunft von Bedeutung sein werden.

6 Zusammenfassung

Die Prinzipien der Wundheilung der äußeren Haut werden seit langer Zeit erforscht und sind bekannt. Auch der Narbenbildung infolge eines physiologischen Prozesses zum Verschluss einer Wunde gilt seit langer Zeit das wissenschaftliche Interesse.

Insbesondere für die chirurgischen Disziplinen sind die Folgen der Narbenbildung mitunter von großer Bedeutung. Dabei wurde bisher jedoch schwerpunktmäßig die Narbenbildung der äußeren Haut und anderer Gewebe untersucht. Die intraorale Narbenbildung fand dagegen weniger Berücksichtigung.

Diese Studie untersucht die Vaskularisation von intraoralem und extraoralem Narbengewebe humanen Ursprungs. Neben der Deskription der morphologischen Besonderheiten der einzelnen Gewebearten anhand von Semidünnschnitten erfolgte die Darstellung der Gefäße innerhalb der Gewebeproben mittels immunhistochemischer Methoden. Weiterhin wurde das Verteilungsmuster der Gefäße deskriptiv ermittelt.

Die signifikanten Ergebnisse der Statistik bezüglich der Gefäßdichte korrelieren mit den Erkenntnissen der Fachliteratur. Demnach zeigt sich die Vaskularisation der Mundschleimhaut gegenüber der äußeren Haut deutlich erhöht. Die Vaskularisation schließt neben der Gefäßanzahl pro Fläche auch den Gefäßdurchmesser mit ein, der sich sowohl bei den intraoralen Narbenpräparaten als auch bei den entsprechenden Referenzproben im Durchschnitt deutlich größer darstellte, als innerhalb der extraoralen Präparate. Auch das Erscheinungsbild entsprach den Erwartungen, da eine ausgeprägte Narbenbildung im Vergleich zu den extraoralen Präparaten histologisch nicht so deutlich zu erkennen war.-

Ebenso in Übereinstimmung mit der Fachliteratur präsentierte sich das Verteilungsmuster der Gefäße. Dieses war dergestalt, dass sich die Hauptmasse der Blutgefäße im lockeren Bindegewebe an der Grenze zum Narbengewebe im engeren Sinne befand, wobei dieses Ergebnis bei der Auswertung der intraoralen Präparate aufgrund der sehr geringen Narbenbildung weniger deutlich ausfiel.'

Aufgrund ihrer Bedeutung für die Medizin und Zahnmedizin werden sowohl der Prozess der Wundheilung im Allgemeinen als auch der Angiogenese und der Narbenbildung im Besonderen auch in Zukunft von großem Interesse für die wissenschaftliche Forschung sein.

7 Literaturverzeichnis

1. Arbiser JL (1996) Angiogenesis and the skin: a primer.
J Am Acad Dermatol Mar;34(3):486-497
2. Ashcroft GS, Hora MA, Ferguson MW (1997) Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model. *J Invest Dermatol 108(4):430-437*
3. Bategay EJ (1995) Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases and therapeutic prospects. *J Mol Med 73(7):333-346*
4. Beer TW, Baldwin HC, Goddard JR, Gallagher PJ, Wright DH (1998) Angiogenesis in pathological and surgical scars. *Hum- Pathol 29(11):1273-1278*
5. Bennett NT, Schultz GS (1993) Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg Jul;166(1):74-81*
6. Boenisch T (2003) Antikörper. In: Boenisch, T (Hrsg) Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. *Dako Cytomation Corp., Carpinteria, Ca, USA u. Dako Cytomation Hamburg, 3. Aufl. S 5-13*
7. Boenisch T (2003) Färbemethoden- Detektionssysteme. In: Boenisch T (Hrsg) Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. *Dako Cytomation Corp. Carpinteria, Ca., USA u. Dako Cytomation Hamburg, 3. Aufl. S 34-42*
8. Brown NJ, Smyth EA, Cross SS, Reed MW (2002) Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds.
Wound Repair Regen Jul-Aug;10(4):245-251
9. Brun E, Zatterstrom U, Kjellen E, Wahlberg P, Willen R, Brun A, Perfekt R, Tennvall J (2001) Prognostic value of histopathological response to radiotherapy and microvessel density in oral squamous cell carcinoma.
Acta Oncol 40(4):491-496

10. Caproni M, Calzolari A, Salvatore E, Giomi B, Volpi W, D'Agata A, Fabbri P (2003) Cytokine profile and supposed contribution to scarring in cicatricial pemphigoid. *J Oral Pathol Med Jan*;32(1):34-40
11. Carlile J, Harada K, Baillie R, Mackluskey M, Chisholm DM, Ogden GR, Schor SL, Schor AM (2001) Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Sep* 30(8):449-457
12. Certosimo FJ, Nicoll BK, Nelson RR, Wolfgang M (1998) Wound healing and repair: a review of the art and science. *Gen Dent Jul - Aug*;46(4):362-369
13. Cheung LK, Samman N, Tidemann H (1997) Temporalis myofacial flap in maxillofacial reconstruction: clinical and histological studies of the oral healing process. *Br J Oral Maxillofac Surg Dec*;35(6):406-412
14. Cockerill G, Gamble J, Vodas M (1995) Angiogenesis: Models and modulators. *Int Rev Cytol* 159:113-160
15. Cornelini R, Rubini C, Fioroni M, Favero GA, Strocchi R, Piatelli A (2003) Transforming growth factor- beta 1 expression in the peri- implant soft tissues of healthy and failing dental implants. *J Periodontol Apr*;74(4):446-450
16. Cornelissen AM, Von den Hoff JW, Maltha JC, Kuijpers- Jagtmann A (2002) Effects of locally injected interferon- beta on palatal mucoperiosteal wound healing. *J Oral Pathol Med Oct*;31(9):518-525
17. Deppe H, Horch HH, Kolk A (2004) Microstructured dental implants and palatal mucosal grafts in cleft patients: a retrospective analysis. *J Craniomaxillofac Surg Aug*;32(4):211-215
18. Deutzmann R, Bruckner- Tudermann R, Bruckner P (2003) Das Blut In: Löffler, G, Petrides PE(Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie. *Springer, Berlin Heidelberg New York, 7. Aufl. S 1016-1027*

19. Felice C, Latini G, Parrini S, Bianciardi G, Toti P, Kopotic RJ (2004) Oral mucosal microvascular abnormalities: An early mark of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res Oct 6 [Epub ahead of print]*
20. Field LM, Juhasz I (1998) Lip reconstruction by intralabial excision and supravermilion flap and scar advancement. *Dermatol Surg Aug;24(8):936-939*
21. Field FK, Kerstein MD (1994) Overview of wound healing in a moist environment. *Am J Surg Jan;167(1A):2S-6S*
22. Folkman J, Shing Y (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem 267:10931-1934*
23. Frank JM, Kaneko S, Joels C, Tobin GR, Banis JC, Barker JH (1994) Microcirculation research, angiogenesis and microsurgery. *Microsurgery. 15(6):399-404*
24. Gaspar L, Toth J (1991) Comparative study on wound healing in the oral cavity following experimental surgery using a scalpel, electrocauterization and CO₂ laser beam. *Fogorv Sz No;84(11):339-343*
25. Hammar H (1993) Wound healing. *Int J Dermatol 32(1):6-11*
26. Hlatky L, Hahnfeld P, Tsionou C, Coleman CN (1996) Vascular endothelial growth factor: environmental controls and effects in angiogenesis. *Br J Cancer Suppl 27:151-156*
27. Horak E, Leek R, Klenk N, Lejeune S, Smith K, Stewart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris A (1992) Angiogenesis, assessed by platelet/ endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer *Lancet 340:1120-1124*
28. Howdieshell TR (1998) Normoxic wound fluid contains high levels of vascular endothelial growth factor. *Ann Surg Nov;228(5):707-715*
29. Hunt T (1990) Basic principles of wound healing. *J Traum 30(12):122-128*

30. Iamaroon A, Pongsiriwet S, Jittidecharaks S, Patanaporn K, Prapayasatok S, Wanachantararak S (2003) Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med Apr*;32(4):195-199
31. Ishizaki H, Westermark A, van Setten G, Pyykko I (2000) Basic fibroblast growth factor (bFGF) in saliva- physiological and clinical implications. *Acta Otolaryngol Suppl 543*:193-195
32. Janeway CA (2002) Immunhistochemie. In: Immunologie. In: Janeway CA, Travers P, Valport M, Slomchik M (Hrsg) *Spektrum Lehrbuch. Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin, 5. Aufl. S 675-676*
33. Jin Y, Tipoe GL, White FH, Yang L (1995) A quantitative investigation of immunocytochemically stained vessels in normal, benign, premalignant and malignant human cheek epithelium. *Virchows Arch 427(2)*:145-151
34. Joos U, Weingart D, Schulte E (1994) Einfluss der muskulären Rekonstruktion auf die Narbenbildung- eine tierexperimentelle Studie. *Dtsch Zahnärztl Z 49(12)*:1018-1020
35. Junqueira LC (1996) Histologie. In: Schiebler HT (Hrsg) *Histologie. Springer, Berlin Heidelberg, 4.Aufl. S 14ff, S 30, S 142-144, S 151-152, S 155-159, S 163-171, S 412-416, S 420-423*
36. Kanzler MH, Gorsulowsky DC, Swanson NA (1986) Basic Mechanisms in the healing cutaneous wound. *J Dermatol Surg Oncol 12:(11)*:1156-1163
37. Kagami H, Hiramatsu H, Hishida S, Okazaki Y, Horie K, Oda Y (2000) Salivary growth factors in health and disease. *Adv Dent Res. Dec*;14:99-102
38. Kim T, Ishikawa H, Chu S, Handa A, Iida J, Yoshida S (2002) Constriction of the maxillary dental arch by mucoperiosteal denudation of the palate. *Cleft Palate Craniofac J Jul*;39(4):425-431
39. Kirsner RS (1993) The wound healing process. *Dermatol Clin Oct*;11(4):629-640

40. Kleinheinz J (2001) Die Beeinflussung der Angiogenese durch vascular endothelial growth factor im Verlauf der Knochenregeneration des Unterkiefers. *Habilitationsschrift, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Westfälische Wilhelms Universität Münster S 17, S 45, S 51*
41. Knighton DR, Silver IA, Hunt TK (1981) Regulation of wound healing angiogenesis: effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery 90:262*
42. Komarcevic A, Pejakov L, Komarcevic M (2000) New views on the physiology of wound healing. *Med Pregl Sep-Oct;53(9-10):479-483*
43. Kon K, Fujiwara T (1994) Transformation of fibroblasts into endothelial cells during angiogenesis. *Cell Tissue Res Dec;278(3):625-628*
44. Lalani T, Bhol K, Khan IU, Ahmed AR (1998) The scarring processes in mucosal tissues after immune injury. *Semin Arthritis Rheum Jun;27(6):371-381*
45. Lalla RV, Goralnick SJ, Tanzer ML, Kreutzer DL (2001) Fibrin induces Il- 8 expression from human oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol Apr;37(3):234-242*
46. Lauer G, Schimming R, Frankenschmidt A (2001) Intraoral wound closure with tissue- engineerd mucosa: new perspectives for urethra reconstruction with buccal mucosa grafts. *Plast Reconstr Surg Jan;107(1):25-33*
47. Lee HG, Eun HC (1999) Differences between fibroblasts cultured from oral mucosa and normal skin: implication to wound healing. *J Dermatol Sci Nov;21(3):176-182*
48. Lees VC, Fan TP, West DC (1995) A freeze- injured skin graft model for the quantitative study of basic fibroblast growth factor and other promoters of angiogenesis in wound healing. *Br J Plast Surg Jul; 47(5):349-350*

49. Li L, Wen Y, Mao Z (1997) A quantitative study of microvascular density and proliferative ratio in buccal mucosa squamous cell carcinoma. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi Jul*;32(4):227-229
50. Lopez de Blanc S, Gendelmann H, Itoiz ME, Lanfranchi H (1996) Study of vascular pattern in oral lichen planus. *Acta Odontol Latinoam* 9(1):27-36
51. Lu SL, Reh D, Li AG, Woods J, Corless CL, Kulesz- Martin M, Wang XJ (2004) Overexpression of transforming growth factor beta 1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis and epithelial hyperproliferation. *Cancer Res Jul* 1;64(13):4405-4410
52. McKluskey M, Chandrachud LM, Pazouki S, Green M, Chisholm DM, Ogden GR, Schor SL, Schor AM (2000) Apoptosis, proliferation and angiogenesis in oral tissues: Possible relevance to tumour progression. *J Pathol Aug*;191(4):368-375
53. Mc Cormick, S (1993) Wound Healing. *Selected Readings in Oral And Maxillofacial Surgery* 3(7):1-20
54. Mechine A (1999) Wound healing and hyperbaric oxygen: experimental study of the angiogenesis phase in the rat. *Ann Chir* 53(4):307-313
55. Meller AT, Rumjanek VM, Sansone C, Allodi S (2002) Oral mucosa alterations induced by cyclosporine in mice: morphological features. *J Periodontal Res Dec*;37(6):412-415
56. Moll I (2003) Epidermis, Dermis. In: Jung EG, Moll I (Hrsg) *Dermatologie. Duale Reihe, MLP, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Aufl. S 2-12*
57. Müller HP (2001) Parodontologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1. Aufl. S 5*
58. Nooh N, Graves DT (2003) Healing is delayed in oral compared to dermal excisional wounds. *J Periodontol* 74(2):242-246

59. Nukumi K, Masuda M, Obata A, Yumoto E (2004) Differences in expression of basic fibroblast growth factor during wound healing between oral mucosa and skin. *Wound Repair Regen Jan-Feb;12(1):A7*
60. Olsen L, Sherratt JA, Maini PK, Arnold F (1997) A mathematical model for the capillary endothelial cell- extracellular matrix interactions in wound- healing angiogenesis. *IMA-J- Math-Appl-Med-Biol Dec;14(4):261-281*
61. Oueis A, Yokozeki M, Baba Y, Moriyama K, Kuroda T (2000) Preservation of rat palatal scar tissue myofibroblasts in organic culture. *J Med Dent Sci Mar;47(1):95-103*
62. Pandit AS, Feldmann DS, Caulfield J, Thompson A (1998) Stimulation of angiogenesis by FGF- 1 delivered through a modified fibrin scaffold. *Growth-Factors 15(2):113-123*
63. Pazouki S, Chisholm DM, Adi MM, Carmichael G, Farquharson M, Ogden GR, Schor SL, Schor AM (1997) The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *J Pathol Sep 183(1):39-43*
64. Petrides PE (2003) Das Bindegewebe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg) Biochemie und Pathobiochemie. *Springer, Berlin Heidelberg New York, S 753-762*
65. Pettet G, Chaplain NA, McElwain DL, Byrne HM (1996) On the role of angiogenesis in wound healing. *Proc R Soc Lon B Bio- Sci Nov;22:263(1376):1487-1493*
66. Pettet G, Byrne HM, McElwain DL, Norbury J (1996) A model of wound- healing angiogenesis in soft tissue. *Math Biosci Aug;136(1):35-63*
67. Phillips GD, Stone AM, Whitehead RA, Knighton DR (1994) Platelet derived wound healing factors (PDWHF) accelerate and augment wound healing angiogenesis in the rat. *In Vivo Mar-Apr;8(2) 167-171*

68. Polverini PJ (1995) The pathophysiology of angiogenesis.
Crit Rev Oral-Biol Med 6(3):230-247
69. Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Nalinakumari KR, Nair MK, Pillai MR (1998) Angiogenesis during tumour progression in the oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumour cell proliferation. *Oral Oncol Nov*;34(6):543-548
70. Redl P, Borbely L (1998) Extensive intraoral cicatrization treated by microsurgery. *Fogorv Sz Mar*;91(3):87-90
71. Regezi JA, Jordan RC (2001) Oral cancer in the molecular age.
J Calif Dent Assoc Aug;29(8):578-584
72. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674
73. Roodenburg JL, ten Bosch JJ, Borsboom PC (1990) Measurement of the uniaxial elasticity of oral mucosa in vivo after CO₂-laser evaporation and surgical excision.
Int J Oral Maxillofac Surg Jun;19(3):181-183
74. Rockwell WB, Cohen IK, Ehrlich HP (1989) Keloids and hypertrophic scars: A comprehensive review. *J-Plast-Rec-Surg.* 84(5):827-837
75. Roesel JF, Nanney LB (1995) Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair.
J Surg Res May; 58(5):449-459
76. Romeis B (1989) In: Böck P (Hrsg) *Mikroskopische Technik.* Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore, 17. Aufl. S 284
77. Savona C, Javerzat S, Perollet C, Bikfalvi A (1997) Angiogenesis and neoangiogenesis. *Rev Prat Dec*;15:47(20):2239-2243
78. Schimming R (2002) Tumour angiogenesis– value and significance in squamous epithelial carcinoma of the mouth cavity.
Mund Kiefer Gesichtschir Jul;6(4):217-230

79. Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R (2004) Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity- do they have a prognostic relevance?. *J Craniomaxillofac Surg Jun;32(3):176-181*
80. Schliephake H, Schierle H, Neukam FW, Bock K (1994) Experimentelle Untersuchung zur proliferativen Aktivität epithelialer Zellen im Rahmen primärer und sekundärer Wundheilungsvorgänge. *Dtsch Zahnärztl Z 49(12):1012-1014*
81. Schumann J (2000) Wundheilung. In: Schwenzer N, Ehrenfeld N (Hrsg) In: Allgemeine Chirurgie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 3. Aufl. S 9-11*
82. Selliseth NJ, Selvig KA (1995) Revascularisation of an excisional wound in gingiva and oral mucosa. A scanning electron microscopic study using corrosion casts in rats. *Scanning Microsc Jun;9(2):455-465*
83. Sephel GC, Kennedy R, Kudravi S (1996) Expression of capillary basement membrane components during sequential phases of wound healing angiogenesis. *Matrix-Biol Sep;15(4)263-279*
84. Slavin J (1995) Fibroblast Growth Factors: at the heart of angiogenesis. *Cell Biol Int May;19(5):431-444*
85. Sobiczewska E, Szmigilskie S (1997) The role of the selected cell growth factors in wound healing process. *Przegl Lek 54(9):634-638*
86. Szpaderska AM, Zuckermann JD, DiPietro LA (2003) Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res Aug;82(2):621-626*
87. Tae K, El- Naggar AK, Yoo E, Feng L, Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Shin DM (2000) Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clin Cancer Res Jul;6(7):2821-2828*
88. Tipoe GL, Jin Y, White FH (1996) The relationship between vascularity and cell proliferation in human normal and pathological lesions of the oral cheek epithelium. *Eur J Cancer B Oral Oncol Jan;32B(1):24-31*

89. Thomas C (1995) Zellersatz. In: Thomas C (Hrsg) *Allgemeine Pathologie. Schattauer, Stuttgart New York, 1. Aufl. S 148-150*
90. Thomas DW, Hopkinson KG, Harding KG, Shepherd JP (1994) The pathogenesis of hypertrophic/ keloid scarring. *Int J Maxillofac Surg Apr;23:232-236*
91. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA (2000) Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc Dec;5(1):40-46*
92. Tsai C, Hata K, Torii S, Matsuyama M, Ueda M (1995) Contraction potency of hypertrophic scar- derived fibroblasts in a connective tissue model: in vitro analysis of wound contraction. *Ann Plast Surg Dec;35(6):638-646*
93. Tsai CY, Ueda M, Hata K, Horie K, Hibino Y, Sugimura Y, Toriyama K, Torii S (1997) Clinical results of cultured epithelial cell grafting in the oral and maxillofacial region. *J Craniomaxillofac Surg Feb;25(1):4-8*
94. Villaschi S, Nicosia RF (1994) Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum- free coculture model. Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. *Lab Invest Aug;71(2):291-299*
95. Walsh LJ, L'Estrange PR, Seymour GJ (1996) High magnification in situ viewing of wound healing in oral mucosa *Aust Dent J Apr; 41(2):75-79*
96. Wijdeveld MG, Maltha JC, Gruppig EM, De Jonge J, Kuijpers-Jagtman AM (1991) A histological study of tissue response to simulated cleft palate surgery at different ages in beagle dogs. *Arch Oral Biol 36(11):837-843*

8 Danksagung

Danksagung

Ich danke Herrn OA Priv.-Doz. Dr. Dr. J. Kleinheinz für die Überlassung des Themas sowie für die freundliche, geduldige, fachkompetente und kooperative Betreuung der Studie über einen langen Zeitraum hinweg.

Weiterhin danke ich dem Team des Instituts für Anatomie der Universität Münster, insbesondere Herrn Univ.-Prof. Dr. U. Stratmann, für die kompetente Beratung bezüglich histologischer Fragestellungen. In diesem Zusammenhang möchte ich ebenfalls die beiden Medizinisch- Technischen Assistentinnen Frau Strothbaum und Frau Cebulla erwähnen, die mit ihrem Fachwissen maßgeblich die praktische Durchführung der histologischen Arbeiten unterstützt und zu einem erfolgreichen Abschluss gebracht haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meinen Eltern bedanken, die mir, neben einem ausgeprägten Interesse an der Biologie und ihren angrenzenden Fachgebieten, insbesondere der Medizin, auch die Fähigkeit vermittelt haben, ein selbst gestecktes Ziel auch unter etwas schwierigeren Bedingungen konsequent zu verfolgen; sich nicht entmutigen zu lassen und einmal Begonnenes zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen. Dabei standen sie mir, wenn erforderlich oder gewünscht, immer mit Rat und Tat zur Seite.

Anhang

Antikörper

Von Willebrand Faktor, monoklonal DAKO, Hamburg

Eindeckmaterialien

DePeX Boehringer, Ingelheim

Glycid- Ether 100 EPON Serva, Heidelberg

Deckgläser, 60 x 24 mm Langenbrink, Emmendingen

Diafilme Kodak Elite Chrom 200 Kodak, Stuttgart

Diascanner Siemens

Glutardialdehyd Merck, Ismaning

Immunhistologiedetektionssystem, CSA DAKO, Hamburg

Mikroskope

Fotomikroskop III G 41- 170 Zeiss, Oberkochen

Mikrotome

Mikrotom RM 2145 Leica GmbH, Wetzlar

Mikrotom- Einmalklingen Typ S 35 „Fein“ Leica GmbH, Wetzlar

Mikrotom- Einmalklingen Typ R- 35 „Routine“ Leica GmbH, Wetzlar

Ultramikrotom „Ultracut“ Reichert- Jung, Bensheim

Ultradiamant Plano, Wetzlar

Objektträger Superfrost Plus	Langenbrink, Emmendingen
Osmiumsäure	Techno- Med, Bielefeld
Paraformaldehyd	Merck, Ismaning
Paraffin Paraplast	Pelco Int., Redding, USA
PBS	Merck, Ismaning
Personalcomputer	Siemens, Erlangen
Probengefäße	Coulter, Krefeld

Software

ImageTool 2.0	University of Texas, San Antonio
Adobe Photoshop 5.0	Adobe, Mountain View, USA
SPSS Version V. 12.0 dt.	SPSS Inc., Chicago, USA

Sonstiges

Toluidinblau	Sigma, Deisenhofen
Wasserbad	Medax Nagel KG, Kiel
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Xylol	Merck, Ismaning
Zedernholzöl	Merck, Ismaning

Einsatz kommt. Dieses Reagenz enthält ein biotinhaltiges Substrat (*Biotinyl-Tyramid*, eine biotinylierte Phenol-Verbindung), das durch die gebundene Peroxidase katalytisch in eine reaktive und schließlich unlösliche Form überführt wird („Präzipitation“ bzw. Ablagerung von Biotin).¹³⁻¹⁵ Das abgelagerte Biotin vermittelt im folgenden Schritt die Bindung von peroxidasemarkiertem Streptavidin (*Streptavidin-HRP-Konjugat*), wodurch zusätzliche Enzymmoleküle abgelagert werden (**Abb. 12**). Sanno *et al.* berichteten, dass die Färbung von Hypophysen-Hormonen mittels CSA (*Catalyzed Signal Amplification System, Peroxidase, K1500*) etwa 100fach sensitiver ist als mit der Standard-ABC-Methode.¹⁶ Ein Vergleich der CSA- mit der LSAB-Methode ergab, dass bei CSA mit mehr als 40 verschiedenen Primärantikörpern 20- bis 200fach höhere Verdünnungen möglich waren.^{17,18} Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das CSA-System sensitiv genug war, um am formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebe viele Antigene nachzuweisen, die mit herkömmlichen Methoden nur sehr schwierig (z.B. Cyclin D1)¹⁹ oder gar nicht nachweisbar waren (Primärantikörper „nicht paraffingängig“).^{18,20} CSA kann, wie andere Nachweismethoden, auch automatisiert durchgeführt werden.²¹ In Kombination mit der hitzeinduzierten Antigen-demaskierung (siehe Kapitel *Antigen-demaskierung*) hat die CSA-Technik den Horizont der Immunhistochemie bedeutend erweitert. Es ist wichtig zu erwähnen, dass bei der Hitzebehandlung des Gewebes auch endogenes Biotin „demaskiert“ wird. Da dies zu Hintergrundfärbungen bei CSA und anderen Streptavidin-Biotin-Methoden führen kann, empfiehlt es sich, eine

Blockierung des endogenen Biotins durchzuführen. Dies geschieht sinnvollerweise *nach* der Hitzebehandlung und *vor* der Zugabe des Primärantikörpers (Biotin-Blockierungssystem, **X0590**). Mittlerweile ist eine biotinfreie, nächste Generation des CSA-Detektionssystems entwickelt worden (CSA II, **K1497**), die nicht auf der Wechselwirkung von Streptavidin-Biotin basiert und daher nicht durch endogenes Biotin beeinträchtigt wird. Ein entsprechendes System steht für den Nachweis FITC-markierter Nukleinsäure-Sonden (*in situ*-Hybridisierung) zur Verfügung (GenPoint™ Fluorescein, **K0618**).

■ ALLGEMEINES CSA-PROTOKOLL FÜR DEN GEBRAUCH MIT MONOKLONALEN MAUS-PRIMÄR-ANTIKÖRPERN

1. 5 min mit Peroxidase-Blockierungsreagenz inkubieren (optional).
2. Mit Waschpuffer* spülen und 3-5 min in ein frisches Pufferbad stellen.
3. 5 min mit Protein-Blockierungsreagenz („Protein-Block“) inkubieren, zur Reduzierung von Hintergrundfärbungen.
4. Überschüssigen Protein-Block abkippen und um den Gewebeschnitt herum vorsichtig abtupfen. NICHT SPÜLEN.
15 min mit jedem der folgenden 5 Reagenzien inkubieren; Schritt 2 jeweils anschließend durchführen (Wasch-Schritt).
5. Maus-Primärantikörper** (oder Negatives Kontrollreagenz).
6. Kaninchen Anti-Maus-Ig, biotinyliert (Brückenantikörper, *Link Antibody*).
7. Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex.
8. Amplifikationsreagenz (Biotinyl-Tyramid).
9. Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (*Streptavidin/HRP*).
10. 5 min mit Substrat-Chromogenlösung inkubieren.
11. Mit destilliertem Wasser spülen.
12. Mit Hämatoxylin gegenfärben (optional) und Eindecken.

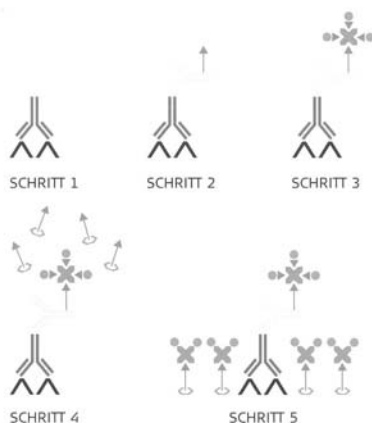


Abb. 12: Bei der CSA-Methode folgt dem Primärantikörper (Schritt 1) ein biotinylierter Sekundärantikörper (Schritt 2), der Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex (Schritt 3), das Amplifikationsreagenz (Schritt 4) und ein Streptavidin-Enzym-Konjugat (Schritt 5).

* TBST, **53306**; TBS-Waschpuffer mit Tween-20 erforderlich.

** Das *Catalyzed Signal Amplification System, Peroxidase (K1500)* funktioniert auch mit Primärantikörpern aus der Ratte. Ein biotinylierter Sekundärantikörper für den Nachweis polyklonaler Kaninchen-Primärantikörper (**K1498**) ist separat erhältlich.

Abb. 13 Auzug aus "Handbuch Immunchemische Färbemethoden" (DakoCytomation; 3. Auflage)

Abbildungsverzeichnis

(dokumentiert alle schematischen Darstellungen und Grafiken)

	Seite
Abb. 1 Paraffineinbettung	23
Abb. 2 Schnittanfertigung der Paraffinschnitte	26
Abb. 3 CSA-Methode (siehe Anhang Seite III / Abb. 13)	27
Abb. 4 Verteilung der Präparate	35
Abb. 5 Verteilung der Geschlechtszugehörigkeit der Präparate	36
Abb. 6 Patientengeschlecht bei den verschiedenen Präparaten	37
Abb. 7 Mediane u. Streuungen d. Gefäße bei den Präparaten	51
Abb. 8 Mediane u. Streuungen d. Gefäße bei intraoraler Narbe u. ges. Schleimhaut	52
Abb. 9 Mediane u. Streuungen d. Gefäße bei extraoraler Narbe u. gesunder Haut	53
Abb. 10 Mediane u. Streuungen d. Gefäße bei intra- und extraoraler Narbe	54
Abb. 11 Zusammenhang / Korrelation (Narbenalter / Gefäße)	55
Abb. 12 Mediane u. Streuungen d. Gefäße bei den Geschlechtern	56
Abb. 13 Auzug aus "Handbuch Immunchemische Färbemethoden" (DakoCytomation; 3. Auflage)	III

Bildverzeichnis

(dokumentiert alle fotografierten Darstellungen)

	Seite
Bild 1 Semidünnschnitt (Präparat der äußeren Haut).....	38
Bild 2 Semidünnschnitt (Schleimhautpräparat)	39
Bild 3 Semidünnschnitt (Hautnarbenpräparat).....	40
Bild 4 Semidünnschnitt (intraorales Narbenpräparat).....	41
Bild 5 Aufnahme eines typischen gesunden Hautpräparates	42
Bild 6 Aufnahme einer typischen Hautnarbe	43
Bild 7 Aufnahme eines typischen gesunden Schleimhautpräparates	44
Bild 8 Aufnahme einer typischen Schleimhautnarbe	45
Bild 9 Intraorale Narbe, 3,5 Monate alt.....	46
Bild 10 Intraorale Narbe, 5 Monate alt.....	47
Bild 11 Intraorale Narbe, 10 Monate alt.....	48

Verzeichnis der Tabellen

(dokumentiert alle statistischen Auswertungen)

	Seite
Tab. 1 Statistiken der Gewebe-Parameter (Präparate / Total-Stichprobe).....	34
Tab. 2 Tests auf Normalverteilung	49
Tab. 3 Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung.....	50
Tab. 4 Mann-Whitney-U-Test (Intraorale Narben / ges. Schleimhaut)	52
Tab. 5 Mann-Whitney-U-Test (Extraorale Narben / gesunde Haut)	53
Tab. 6 Mann-Whitney-U-Test (Intra- und extraorale Narbe)	54
Tab. 7 Spearman-Korrelation (Rho) (Narbenalter u. Anzahl der Gefäße pro μm^2 bei intraoralen Narben).....	55
Tab. 8 Mann-Whitney-U-Test (unterschiedliche Anzahl d. Gefäße zwischen den Geschlechtern)	56

Genehmigung der Ethik-Kommission

1. Der 1. Antrag zur Entnahme humanen Gewebes wurde am 20.10.1997 gestellt.
Die Genehmigung der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät erfolgte am 15.11.1997 auf den Namen meines Doktorvaters, OA Priv.-Doz. Dr. Dr. J. Kleinheinz. Dieser enthielt kein Aktenzeichen.
2. Ein weiterer Antrag auf Genehmigung zur Entnahme humanen Gewebes wurde am 10.08.2001 gestellt.
Die Genehmigung der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Münster **Reg.Nr.: 1IXKleil** erfolgte in einem Brief am 05.11.2001.



WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Medizinische Fakultät
- Ethikkommission -
- Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe -

Universität Münster · Medizinische Fakultät - Ethikkommission -
48129 Münster

Herrn OA Dr.med. J. Kleinheinz
Herrn Dr.rer.medic. Hans-Peter Wiesmann
Klinik u. Poliklinik f. Mund- und
Kiefer-Gesichtschirurgie
Waldeyerstraße 30

48129 Münster,

Hausadresse: 15.11.97
Waldeyerstraße 27 Prof.Toe/Vo
48149 Münster

Telefon: Vermittlung (02 51) 83 - 0
Telefax: (02 51) 83 - 5 53 39
Telefon: Durchwahl (02 51) 83 - 5 52 90

hier

Betr.: Beurteilung eines biomedizinischen Forschungsvorhabens am Menschen durch die Ethikkommission

Hier: Ihr Antrag vom 20.10.1997: "Gewebeprobenentnahmen des menschlichen Hartgewebes zur Anzüchtung und zeitweiligen Kultivierung menschlicher Knochenzellen."

Sehr geehrter Herr Doktor Kleinheinz,

Sehr geehrter Herr Doktor Wiesmann,

die Ethikkommission hat auf ihrer Sitzung am 14.11.1997 Ihren obengenannten Antrag beraten.

Die Kommission empfiehlt Ihnen, daß Einverständnis der Patienten zur Verwendung des entnommenen Gewebes für wissenschaftliche Zwecke einzuholen. Ein Muster der Einverständniserklärung liegt bei.

In der Kommission bestehen grundsätzlich weder ethische noch juristische Bedenken gegen die Durchführung Ihres Vorhabens.
Die Kommission wünscht Ihrem Forschungsvorhaben das zu erhoffende gute Gelingen und würde es begrüßen, wenn sie über die Ergebnisse der Studie von Ihnen nach deren Abschluß unterrichtet würde.

Mit freundlicher Empfehlung

Ihr sehr ergebener

Prof.Dr.med. Richard Toellner
Vorsitzender der Ethikkommission

Anlage



WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Medizinische Fakultät

- Ethikkommission -

- Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen Lippe -

Universität Münster · Medizinische Fakultät · Ethikkommission ·
D - 48129 Münster

D - 48129 Münster,

Herrn Prof.Dr.med.Dr.med.dent.Dr.h.c. Ulrich Joos
Herrn PD Dr.med.Dr.med.dent Johannes Kleinheinz
Herrn Dr.rer.med. Hans-Peter Wiesmann
Klinik u. Poliklinik f. Mund- u. Kiefer-Gesichtschirurgie
Waldeyerstr. 30

Hausadresse: 05.11.01
Waldeyerstraße 27 Prof.Hu/Rö
D - 48149 Münster

Telefon: Vermittlung (02 51) 83 - 0
Telefax: (02 51) 83 - 5 53 39
Telefon: Durchwahl (02 51) 83 - 5 52 90
e-mail: ethikkom@uni-muenster.de

Reg.Nr.: 11XKlei1 (Beim Schriftwechsel bitte stets angeben.)

Betr.: Beurteilung eines biomedizinischen Forschungsvorhabens am Menschen durch die
Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Hier: Ihr Antrag vom 10.08.2001: „Entnahme von Nabelschnurvenen zur Anzüchtung und
Kultivierung humaner Endothelzellen.“

Folgende Unterlagen haben uns vorgelegen: Der Antrag vom 10.08.2001:

Sehr geehrte Herren Kollegen,

vielen Dank für Ihr Schreiben vom 31.10.2001, mit dem Sie uns zur o.g. Studie folgende Dokumente
senden:

Die gemäß unseren Empfehlungen vom 19.09.2001 erstellte gesonderte Patientenaufklärung nebst
Einwilligungsformular.

Wir bestätigen Ihnen gerne, dass seitens der Kommission nunmehr weder ethische noch juristische
Bedenken gegen die Durchführung Ihres Forschungsvorhabens bestehen.

Mit freundlichen Grüßen

Prof.Dr.med.Dr.phil. Peter Hucklenbroich

Stellvertretender Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder: J. van de Loo (Vorsitzender), P. Hucklenbroich (Geschäftsführer und stellv. Vorsitzender),
B. Brinkmann, H. Kollhoser, H. Kresse, E. Lessing, J. Ritter, N. Senninger, L. Siep, I. Wolf