

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Kommissarischer Leiter: PD Dr. med. Marc B. Bloching)



**Zur Histologie von Normalgewebsreaktionen im Kopf-Hals-Bereich
nach experimenteller, fraktionierter, externer Bestrahlung
unter besonderer Berücksichtigung der Cytokeratin- und
Basalmembranproteinexpression**

Habilitation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. habil.

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. Sylva Bartel-Friedrich
geboren am 21.02.1960 in Lüchow

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. A. Berghaus
2. Prof. Dr. med. J. Dunst
3. Prof. Dr. med. T. Löning

urn:nbn:de:gbv:3-000008690

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008690>]

Datum der Verteidigung: 29. März 2005

Datum der Beschlussfassung: 05. Juli 2005

Referat und bibliographische Angaben

Einführung: Die Strahlentherapie (RT) wird zur Therapie v. a. fortgeschrittener bösartiger Tumoren (TM) des oberen Aerodigestivtraktes häufig eingesetzt. Trotz moderner RT-Technik kommt es dabei zur Mitbelastung von nicht tumorbefallenen Normalgeweben. Diese können neben Frühreaktionen Spätreaktionen aufweisen, die zu Funktionsstörungen und morphologisch zu Integrationsstörungen (Gewebeumbau) mit Parenchymhypoplasie, Fibrose, reaktiven Zellinfiltraten und Reparaturvorgängen führen können. Es war das Ziel dieser Studie, nach einem humantherapeutisch relevanten RT-Protokoll radiogene Spätreaktionsmuster mit Berücksichtigung der integritätsgewährleistenden Cytokeratine (CK) und Basalmembranen (BM) im Gewebe histologisch näher zu charakterisieren. **Methoden:** Bei insgesamt 120 Wistar-Ratten wurden in 2 Studien die großen Speicheldrüsen (SD) und Laryngotrachealgewebe in Abhängigkeit von der Dosis (2 Gy/Tag bis zu einer Gesamtdosis von 20, 40 oder 60 Gy), der Latenz der Radiatio (LR, weniger als 4 Monate bis 1 Jahr) und vom Alter (3 Monate bis 2 Jahre) histologisch und immunhistologisch auf die Expression der CK/IF-Proteine (CK 5/6, 8, 13, 13-15/16, 17/19, 18, Vimentin) und der BM bzw. BM-assoziierten Proteinstrukturen (Laminin, Fibronectin, Kollagen III und IV) sowie von Kollagen I und des proliferationsassoziierten Markers MIB-5 untersucht und ausgewertet. Während der Experimente auftretende TM wurden in die Studie einbezogen. **Ergebnisse:** Im SD-Gewebe fanden sich positiv dosiskorrelierte, jedoch nicht LR- oder altersabhängige Gewebeerkrankungen, die bei der höchsten Dosis (60 Gy) überwiegend einem Stadium 2 nach Seifert entsprachen. Auch vermehrte, zelltypershaltene CK-Expressionen und vermehrte/verbreiterte, z. T. Konglomerate bildende BM-Reaktivitäten waren nach 60 Gy-Exposition am deutlichsten ausgeprägt. Die Proliferationsrate war insbesondere 6 Monate nach abgeschlossener RT erhöht. Im Laryngotrachealbereich waren latenzunabhängige, gering bis moderat ausgeprägte morphologische Veränderungen (Lymphgefäßektasien, Ödeme, Blutgefäßdilatationen, interstitielle Zellinfiltrate, Fibrosen, supraglottische pseudopapilläre Formationen, Drüsenhypoplasie) nachweisbar, die unterschiedliche Beziehungen zur Dosis aufwiesen. Die CK- und BM-Expression war insgesamt nur gering bis mäßig verändert, zeigte jedoch ausgesprochen heterogene Reaktionsmuster. Die intrakraniellen TM entsprachen überwiegend hormonproduzierenden Hypophysenadenomen. Die extrakraniellen malignen TM bei bestrahlten Tieren waren hinsichtlich der Histologie (Karzinome) und Ursprungsorte (Milchleiste, SD, Maxilla) ungewöhnlich. Die benignen TM entsprachen Fibromen/ Fibroadenomen im Sinne von Spontantumoren. **Schlussfolgerungen:** Das humantherapeutisch relevante RT-Protokoll ist geeignet, einen Maximalschaden im SD-Gewebe zu vermeiden. Die weitgehende Latenzunabhängigkeit weist auf eine dauerhafte Strahlenreaktion hin. Laryngotrachealgewebe sind als relativ strahlenresistent zu bezeichnen. Die CK/IF-Protein- und BM-Expressionsmusteränderungen können wenigstens teilweise zur Erklärung morphologischer (z. B. den häufigen Ödemen) und funktioneller (z. B. Stimmstörungen) Befunde beitragen. Nicht nur Sarkome, sondern auch Karzinome und hormonbildende Hypophysenadenome sollten im Follow-up von Kopf-Hals-bestrahlten Patienten beachtet werden.

Bartel-Friedrich, Sylva: Zur Histologie von Normalgewebsreaktionen im Kopf-Hals-Bereich nach experimenteller, fraktionierter, externer Bestrahlung unter besonderer Berücksichtigung der Cytokeratin- und Basalmembranproteinexpression. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., Seiten, Erscheinungsjahr 2005

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	1
1. 1	Einführung	1
1. 2	Allgemeine histologische Anatomie des Bindegewebes	4
1. 3	Strahlenbiologische Mechanismen von Normalgewebsreaktionen und allgemeine Histologie der Strahlenreaktionen	5
1. 4	Charakterisierung der Zielstrukturen	6
1. 4. 1	Cytokeratine (CK) bzw. Intermediärfilamentproteine (IF-Proteine)	6
1. 4. 2	Basalmembranen (BM) und basalmembranassoziierte Matrix	9
1. 4. 3	CK und BM / BM-assoziierte Substanzen im Gewebeverband	13
1. 5.	Organe und Gewebe	13
1. 6	Tumoren	24
2	Zielstellung	26
3	Material und Methoden	26
3. 1	Behandlungsgruppen	30
3. 2	Organe und Gewebe	36
3. 3	Kontrollen	39
3. 4	Statistische Auswertung	39
4	Ergebnisse	40
4. 1	Speicheldrüsen (1. Versuchsserie)	40
4. 2	Ergebnisse (Hauptversuche)	44
4. 2. 1	Speicheldrüsen	47
4. 2. 2	Extrakranielle Tumoren	59
4. 2. 3	Intrakranielle Tumoren (Hypophysenadenome)	61
4. 2. 4	Larynx und Trachea	62
5	Diskussion	74
5. 1	Speicheldrüsen	74
5. 2	Proliferationsmarker im Bereich der Speicheldrüsen	84
5. 3	Extrakranielle Tumoren	88
5. 4	Intrakranielle Tumoren (Hypophysenadenome)	94
5. 5	Larynx und Trachea	96
5. 5. 1	Klinik und allgemeine Histomorphologie	96
5. 5. 2	Extrazelluläre Matrix (ECM) und BM	102
5. 5. 2. 1	Allgemeine Histologie, Pathohistologie, inkl. Immunhistologie	102
5. 5. 2. 1. 1	Trachea	102
5. 5. 2. 1. 2	Larynx	103
5. 5. 2. 2	Radiogene Veränderungen der ECM / BM	106

5. 5. 3	CK bzw. IF-Proteine	112
5. 5. 3. 1	Allgemeine Immunhistologie und Pathoimmunhistologie	112
5. 5. 3. 2	Radiogene Reaktionen (inkl. Effekte weiterer Noxen) der CK / IF-Proteine	115
6	Zusammenfassung	118
7	Literaturverzeichnis	122
8	Thesen	144
9	Lebenslauf	149
10	Danksagung	150
11	Anhang	

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb. = Abbildung

ACC = Adenoid-zystisches Karzinom

AD = Adventitia der Blutgefäße

AZ = Azinuszellen/Azini

BM = Basalmembran

CK = Cytokeratin(e)

ECM = Extrazelluläre Matrix(proteine)

GE = Gängepithelien

GSL = Glandula sublingualis

GSM = Glandula submandibularis

IF-Proteine = Intermediärfilamentproteine

PE = Plattenepithel

PECA = Plattenepithelkarzinom

PR = Proliferationsrate

RT = Radiatio (Strahlenbehandlung)

SD = Speicheldrüsen

SL = Stimmlippen(region)

SCH = Schaltstücke / Schaltstückzellen

SEN = Subendothelial

ST = Sekretorische Tubuli / Tubuluszellen

STR = Streifenstücke / Streifenstückzellen

Tab. = Tabelle

TM = Tumore(n)

TGF- β 1 = Transforming Growth Factor beta 1

TME = Tunica media der Blutgefäße

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die bösartigen Tumoren (TM) des oberen Aerodigestivtraktes machen in Europa und den USA bei Männern etwa 5%, bei Frauen etwa 1-2% der malignen TM aus (Sack 1996). Bei Männern im Alter unter 50 Jahren waren 1998 Karzinome der Mundhöhle und des Rachens mit 7.2% aller Malignome sogar die zweithäufigsten malignen TM-Entitäten (www.rki.de/CHRON/KREBS) nach dem Hodenkrebs. Die Mehrzahl der TM des Kopf-/Halsbereiches sind Plattenepithelkarzinome (Rudert 1992, Sack 1996, Chen & Myers 2000).

Steigende Inzidenz- und Mortalitätsraten, zunehmende Erkrankungen mittlerer Jahrgänge und häufig erst späte Diagnosestellungen in bereits fortgeschrittenen TM-Stadien (Bloching 2001, Boyle et al. 1995) bedingen einen multimodalen Therapieansatz. Eine der Therapiesäulen ist die auf den TM und sein Ausbreitungsgebiet ausgerichtete Anwendung ionisierender Strahlen. Die Strahlentherapie (RT) wird entweder als Monotherapie angewandt, alternativ in kurativer (z. B. zur Therapie kleinerer T1- und T2-Larynxkarzinome: Hayakawa et al. 1996, Medini et al. 1998, Tombolini et al. 1995, Wang et al. 1997) oder palliativer Intention, oder in Kombination mit der Chirurgie und/oder Chemotherapie (Bootz 2000, Morgan 1997, Nguyen et al. 1985, Robbins 2000, Sack 1996, Sun et al. 1999, Tart et al. 1994, Wang et al. 1985, Wendt 1981). Als zusätzliche Verfahren sind die interstitielle Brachytherapie und die lokale Hyperthermie zu nennen (Bootz 2000, Chang et al. 2000, Friedrich et al. 1995, Grabenbauer et al. 2001, Ohtsubo et al. 2001, Rudoltz et al. 1999).

Für die kurativ intendierte Behandlung bösartiger epithelialer TM wird die RT überwiegend als Adjuvans der ablativen Chirurgie angewandt, insbesondere dann, wenn chirurgisch keine R₀-Resektion erzielt werden konnte, wenn große TM (pT₄) oder viele und / oder große Lymphknotenmetastasen (pN_{2,3}) vorlagen, wenn eine Lymphknotenkapselruptur oder eine Lymphangiosis carcinomatosa nachweisbar waren (Sack 1996, Bootz 2000).

Aufgrund der engen anatomischen Nähe und wechselseitigen Beziehung wichtiger Strukturen der Kopf-Hals-Region ist trotz Anwendung moderner RT-Techniken (u. a. exakte computertomografisch- und rechnergestützte Planung des Planungszielvolumens, Integration von Dosisgradienten i. B. bestrahlter Normalgewebsvolumina) und z. B. Entwicklung modifizierter konformaler und intensitätsmodulierter RT-Verfahren (Amos et al. 1992, Chao 2002, Eisbruch et al. 1996, 1998-2001, Vandieren et al. 2000) die Mitbelastung von gesunden Normalgeweben unvermeidlich (Doerr & Trott 2000, Herrmann & Baumann 1997). Diese Normalgewebe können wie der TM auf die Strahlenexposition mit Zeichen der „Entzündung“, des Zelluntergangs und der Reparation sowohl im Parenchym als auch im Stroma reagieren.

Kennzeichnend für viele therapeutischer RT ausgesetzte Normalgewebe sind die insbesondere für Spätfolgen charakteristische, häufig progrediente Strahlenreaktion mit Parenchymhypoplasie und unvollständiger Reparation und die Funktionsminderung, subsummiert unter den Begriff „Strahlenfolge“ (früher: „Strahlenschaden“). In dem morphologischen Bild des nur teilweise restaurierten und oftmals

irregulär angeordneten Parenchyms sticht neben Zellveränderungen die Zunahme bindegewebiger Bestandteile hervor. Dies gilt nach Fajardo (1982) und Seifert (1996) im Bereich der Kopf-Halsregion insbesondere für die Nase, den Nasopharynx, den Larynx, die Speicheldrüsen und die bedeckende Haut. Diese auch als „Strahlenfibrose“ bezeichnete Umbildung gilt als dosisabhängig, oft progredient und zumeist irreversibel (Dörr & Trott 2000, Herrmann & Baumann 1997, Seifert 1996).

Untersucht man kleinere Biopsien humaner Gewebe nach therapeutischer RT, so können Schwierigkeiten in der Interpretation der Ursachen von Zell-, Gewebe- oder Organveränderungen bestehen, die sich zum Bild einer „Fibrose“ fügen, insbesondere hinsichtlich der Strahlenexposition als Ursache. Einerseits sind altersabhängige Veränderungen zu berücksichtigen, daneben Entzündungsreaktionen und Nekrosequenzen eventuell unmittelbar angrenzender TM zu differenzieren, und andererseits Vorerkrankungen des untersuchten Gewebes nicht immer bekannt (Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Daumas-Duport et al. 1984, Dyess et al. 1987). Des Weiteren ist bedeutend, ob das Organ Ziel der RT war oder nur am Rand des Strahlenfelds lag (Seifert 1996). Die Latenzphase nach RT ist ebenfalls ein wichtiger Parameter für die Beurteilung der Regenerationsmöglichkeiten und die zeitliche Einordnung von Früh- und Spätreaktionen. Ebenso können Operationen und deren Folgen entscheidenden Einfluss auf Wundheilungsstörungen und Fibrosen im Strahlengebiet haben (Ichimura et al. 1997, Niewald et al. 1995, Parsons 1994, Fajardo 1982). Daneben wurden von Baumann (1995) und Zimmermann et al. (2000a & b) weitere endogene (Ataxia teleangiectatica, Diabetes mellitus, Hyperthyreose, Hämoglobinstatus, Hautpigmentierung, Haarfarbe, Hypertonie, Arteriosklerose, Adipositas, Hypercholesterinämie, Mikro- und Makroangiopathie, Kollagenosen, Sklerodermie, Autoimmunerkrankungen, Immunsuppression, genetische Prädisposition, Infektionen) und exogene (Rauchen, Alkohol, Chemotherapie, Ernährung und Diät, Hygiene, mechanische Belastungen) Modulationsfaktoren der klinischen Strahlenreaktion im Sinne reduzierter Toleranzdosen beschrieben, die ebenfalls Spätfolgen wie eine Fibrose begünstigen können. Darüberhinaus spielen Mediatorsubstanzen wie Zytokine, z. B. „Transforming Growth Factor- β “ (TGF- β) eine wesentliche Rolle bei der Fibroseentwicklung (Rodemann et al. 1995). Andererseits ist die individuelle Strahlenreaktion nach RT sehr variabel und trotz Modellrechnungen zur Nebenwirkungswahrscheinlichkeit kaum qualitativ und quantitativ absolut sicher bestimmbar (Seegenschmiedt & Zimmermann 2000, Zimmermann et al. 2000a). Dies gilt für die frühen und chronischen Strahlenreaktionen, wobei jedoch die Einschätzung von Spätfolgen von besonderer klinischer Relevanz ist.

Die Vielzahl von Faktoren (Dosis, Zeit, Volumen, Fraktionierung, Organstruktur, Alter, Komorbidität, Allgemeinzustand, endogene/exogene Faktoren, Vor-/Nachbehandlungen, TM-Rezidive), die Einfluss auf Spätreaktionen haben können, sind in einem humanen Studiendesign kaum bis nicht zu prüfen. Viele experimentelle Ansätze fokussieren daher auf die Analyse von Struktur-, Morphologie- und/oder Funktionsschäden oder veränderte Mediatorsubstanzen im Tiermodell oder an Zellkulturen (Übersichten bei Fajardo 1982, Rodemann et al. 1995, Seifert 1996; Epperly et al. 1999, Vujaskovic et al. 2001, Zhao et al. 2000). Allerdings bietet der Gewebezusammenhang die Voraussetzungen und den besonde-

ren Vorteil, die histologischen Strahlenreaktionen und möglichen Reparationsvorgänge des Organs im Strahlengebiet zu untersuchen.

Mit der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, im Tierexperiment mit modernen Methoden an einigen Geweben und Organen der Kopf-Halsregion die Strahlenwirkungen nach einem humantherapeutisch relevanten RT-Protokoll genauer zu charakterisieren. Es war damit nicht der Anspruch verknüpft, die Strahlenfolgen der Kopf-Hals-Region umfassend zu bearbeiten. Vielmehr wurde versucht, anhand eines standardisierten RT-Modells an das jeweilige Gewebe angepasste, histologische Untersuchungsmethoden anzuwenden, um die verschiedenen Strahlenfolgen morphologisch und immunhistologisch im Gewebeverband darzulegen.

Die Untersuchung gliedert sich in die Darstellung vor allem der Spätfolgen der großen Kopfspeicheldrüsen, des Larynx und der Trachea sowie der Hypophyse, auf die wir uns wegen ihrer klinischen Relevanz besonders konzentrierten.

Da bisherige Untersuchungsergebnisse gezeigt haben, dass die Folgen der RT allgemein-klinische (z. B. Malnutrition, Wesensveränderungen) und allgemein-morphologische Alterationen (z. B. Gefäß- und Nervenveränderungen) sowie organspezifische histologische Veränderungen beinhalten können (Scherer et al. 1991, Scherer & Sack 1996, Seifert 1996, Dörr et al. 2000), wird zunächst für die analysierten Gewebe ein jeweils organbezogener Überblick der derzeitigen Kenntnisse gegeben – nachdem zuvor strahlenbiologische Reaktionsmechanismen und allgemein-histologische Strahlenreaktionsmuster sowie die Zielstrukturen der verwendeten Antikörper (AK) in ihrem funktionellen Zusammenhang erläutert wurden.

Einzelzellen und extrazelluläre Matrix (ECM) betreffende Strahlenreaktionen begründeten dabei unser Interesse, Cytokeratine (CK) bzw. Intermediärfilamentproteine (IF-Proteine) und Basalmembranen (BM) sowie BM-assoziierte Strukturproteine mit einzubeziehen, da CK als epitheliale Differenzierungsmarker und BM- und BM-assoziierte Substanzen als spezialisierte Strukturen der ECM wesentliche Rollen nicht nur bei der Funktion der Einzelzelle, sondern auch bei der Aufrechterhaltung und Strukturierung des Gewebeverbandes spielen (Nerlich 1995, Moll 1993), und eben Einzelzellen wie auch Gewebeverbände strahlenreaktiv verändert bzw. umstrukturiert sein können – zumal bekannt ist, dass sich CK / IF-Protein- und BM-Expressionen unter dem Einfluss anderer chronischer Noxen (z. B. bei chronischen Entzündungen, Stoffwechselstörungen, Bleomycinexposition, Gangligatur bei Drüsen, Metaplasieprozessen) oder insbesondere bei TM und deren Vorstufen verändern können (Moll 1993, Nerlich 1995, Gröne et al. 1987, Riede et al. 1995, Zaia et al. 1997, Woodcock-Mitchell et al. 1986 & 1989, Ihrler et al. 2002).

Im Zusammenhang mit einer RT („radiogen“, „strahlenassoziiert“) wurde daneben über das Auftreten sog. „radiogener Zweit-TM“ mit für die Region z. T. ungewöhnlichen Merkmalen (Geschlecht, Alter, Lokalisation, Histologie) berichtet (Übersicht bei Burkhardt 1999). Es sollten daher im Rahmen unserer experimentellen RT auftretende TM miterfasst und feingeweblich ausgewertet werden.

Hieraus ergeben sich abschließend die Fragestellungen dieser Arbeit.

1.2 Allgemeine histologische Anatomie des Bindegewebes

Das Bindegewebe im engeren Sinne (ohne davon abgeleitete Fett-, Knorpel- und Knochengewebe) besteht aus Zellen (Fibroblasten und Fettzellen; Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophile Granulozyten, Mastzellen) und aus wechselnden Mengen extrazellulärer Substanzen. Diese extrazelluläre Matrix (ECM) enthält eine Grundsubstanz mit „Gewebsflüssigkeit“ (fast strukturloses Material) und Fasern (mehr geformte Elemente aus kollagenen, retikulären und elastischen Fasern). In der Grundsubstanz finden sich neben Wasser, Salzen, niedermolekularen Substanzen und kleinen Proteinmengen vor allem Proteoglykane (frühere Bezeichnung: Mukopolysaccharide).

Abb. 1 stellt die Grundbestandteile des Bindegewebes schematisch dar.

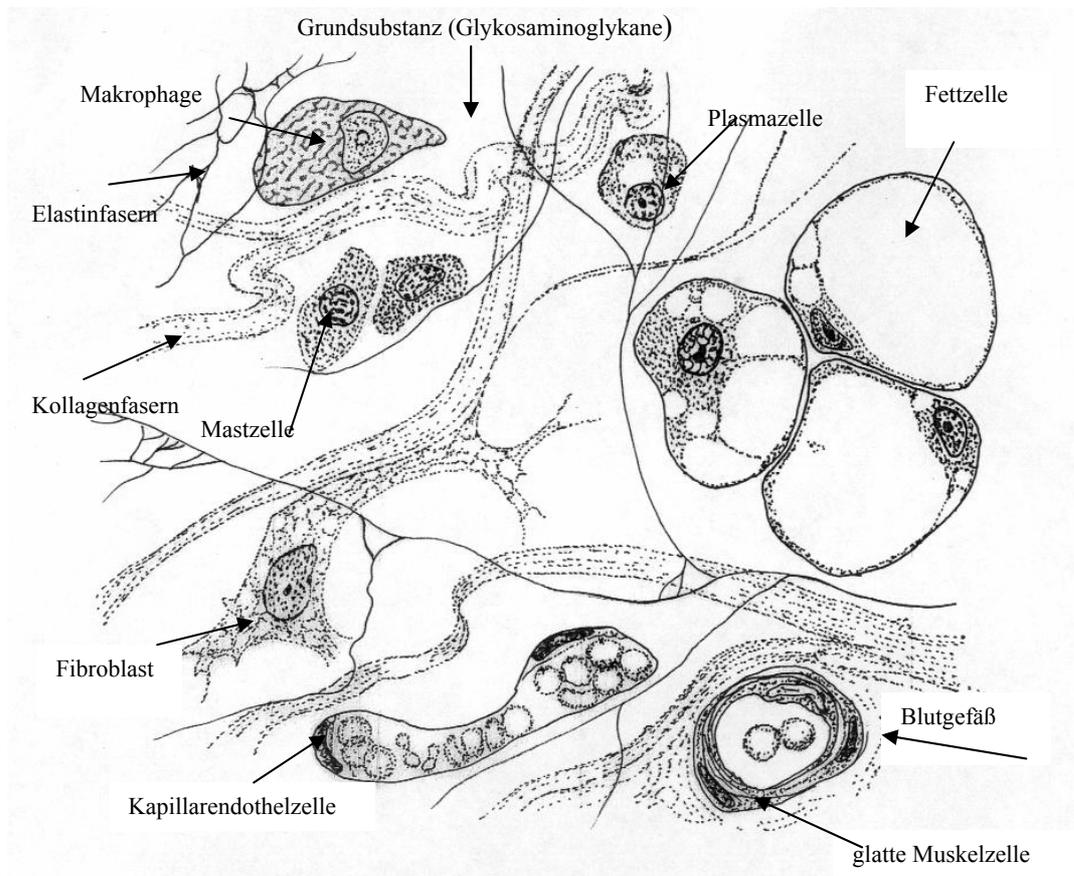


Abb. 1: Schematische Darstellung der Grundbestandteile des Bindegewebes: Zellen, Fasern und Grundsubstanz (nach Ham & Geneser 1990). Die Unterteilung der Bindegewebsformen (lockeres, straffes, retikuläres Gewebe, Gallert- und Fettgewebe) erfolgt nach ihren relativen Anteilen an interzellulärer Substanz (v. a. dem relativen Fasergehalt) und verschiedenen Zellarten. Die Funktionen (mechanische Verstärkung, Transportvorgänge, Wegweiser- und Differenzierungsfunktionen bei Zellen) der verschiedenen Bindegewebsarten beruhen vor allem auf ihren ECM-Komponenten.

Die Tabellen geben einen Überblick und die nähere Charakterisierung der wichtigsten Grundsubstanzen (**Tab. 1 und 3 im Anhang**) und Fasern (**Tab. 2 im Anhang**) der ECM.

1.3 Strahlenbiologische Mechanismen von Normalgewebsreaktionen und allgemeine Histologie der Strahlenreaktionen

Strahlenbiologisch werden radiogene Normalgewebsreaktionen durch Parenchym- und Stromazellstörungen, Veränderungen der Interzellulärsubstanz und Gefäßstörungen erklärt (Dörr & Trott 2000, Herrmann & Baumann 1997). Die zellulären Störungen betreffen v. a. den Zellkern bzw. die DNA. Es kommt zu DNA-Veränderungen in Form von Mutationen, Genaktivierungen und einer Zellzyklusverlängerung mit nachfolgenden Chromosomenschäden, die bei einer der nächsten Mitosen zum Zelltod führen können. Dies entspricht einem Verlust der reproduktiven Integrität (= Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit) durch einen Mitosetod (Herrmann & Baumann 1997). Als weitere Mechanismen sind die akzelerierte terminale Differenzierung (Rodemann 2001) und der Interphasetod zu nennen. Ersteres ist v. a. für Fibroblasten bedeutsam. Letzteres ist v. a. nach Erkenntnissen zu Apoptosemechanismen mit einzubeziehen (Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Farber 1994, Herrmann & Baumann 1997, Kerr et al. 1994, Okunieff et al. 1999, Seifert 1996, Stephens et al. 1986a-c & 1991) und wurde u. a. für Lymphozyten, Speicheldrüsen- und Anteile intestinaler Kryptenzellen beobachtet.

Histologisch werden nach älterer Terminologie (Gössner 1972) 3 Arten von Strahlenreaktionen unterschieden: • Strahlendystrophie (Degeneration, Nekrose) • Dysplasie • Neoplasie.

Nach neuerer morphologischer und zellbiologischer Begriffsbildung ist der Zellfunktionsverlust (= Zelltod) durch nekrotische und apoptotische Auflösung definiert, während strahlenbiologisch die o. g. mehr funktionelle Zelltoddefinition (Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit = Mitosetod) eine sehr wichtige Rolle spielt (Herrmann & Baumann 1997, Nagler 2002).

Histologische Veränderungen durch Bestrahlungen manifestieren sich einerseits an Einzelzellen sowohl im Parenchym als auch im Stroma, andererseits im interstitiellen Stroma und im Blutgefäß-, Lymphgefäß- sowie im Nervensystem. Einzelzellveränderungen betreffen den Kern (Kariolyse, Chromatinverplumpungen, mehrstrahlige oder verplumpte Kernteilungsfiguren mit isolierten oder untereinander dünn verbunden Chromatinbröckeln, Vakuolen) und das Zytoplasma (Schwellung, Strukturverlust durch Zellorganellenauflösung, Zytolyse) sowie Epithelmetaplasien, Epithelhyperplasien, eine vermehrte Verhornungsneigung und Bindegewebszellatypien. In Geweben können Gefäßveränderungen (Gefäßzunahmen, vermehrte Thrombenbildung, hyaline Degenerationen, myointimale Proliferationen, Stenosen bis hin zu Obstruktionen der Arterien, z. T. der Venen- und Lymphgefäße, Lymphgefäßektasien), reaktive „entzündliche“ Infiltrate, interstitielle Veränderungen in Form von Ödemen, Fibrosen, Sklerosen sowie Gewebenekrosen (Übersichten bei Fajardo 1982, Scherer et al. 1991 sowie Rubin 1995; Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Deitmer 1986, Dietz et al. 1998, Ewald 1996, Nishioka et al. 2001, O'Brien 1996, Seifert 1996, Ward et al. 1975) auftreten.

Nach allgemeiner Auffassung (Übersicht bei Fajardo 1982; Fajardo & Berthrong 1978, Herrmann & Baumann 1997, Scherer & Sack 1996) wird der Ablauf folgendermaßen beschrieben: initial bildet sich ein interstitielles Ödem, gefolgt von einem sich zunehmend verdichtenden, interstitiellen fibrinösen Exsudat sowie Vermehrung und Einsprossung von Kollagenfasern und Teilersatz des Exsudates durch

Kollagenfasern. Dies wird begleitet von zunächst vermehrt auftretenden (Herrmann & Baumann 1997) oder morphologisch veränderten atypischen Fibroblasten (Fajardo 1982), späterhin reduzierten Bindegewebs- und Parenchymzellen sowie Gefäßveränderungen in Form von Dilatationen, Stenosen, Permeabilitätszunahmen sowie vermehrter Fragilität (Fajardo & Berthrong 1988).

Insbesondere zur Fibrose wurden Entstehungsmechanismen näher untersucht (Burger et al. 1998, Hakenjos et al. 2000, Herskind et al. 1998, Rodemann & Bamberg 1995). Der zelluläre Mechanismus der radiogenen Fibrose wurde in einem multizellulären Prozess gesehen, der verschiedene interzelluläre Mediatorwege berücksichtigt. Da nach experimentellen Daten (u. a. Fine et al. 1990, Fine & Goldstein 1991, Ritzenthaler et al. 1991) gezeigt werden konnte, dass „Transforming Growth Factor-beta 1“ (TGF- β 1) bei Fibroblasten oder auch glatten Muskelzellen (Coutts et al. 2001) die Kollagenbildung vermittelt, kam diesem Faktor auch bei der strahleninduzierten Bindegewebsvermehrung Bedeutung zu. TGF- β 1 wird hier als der Hauptkandidat angesehen, welcher die akzelerierte terminale Differenzierung von Progenitor-Fibroblasten in postmitotische funktionale Fibrozyten positiv beeinflusst, was letztlich im fibrotischen Phänotyp (Fibrose) dieses Zellsystems zum Ausdruck kommt (Burger et al. 1998, Hakenjos et al. 2000, Rodemann & Bamberg 1995). Weiterhin wird TGF- β 1 in vitro eine Rolle bei der strahleninduzierten Apoptose (Hino et al. 2002) sowie Produktion von BM-Komponenten (CIV) zugeschrieben (Azuma et al. 1996a). Daneben kann TGF- β 1 über die Induktion von Proteina-seaktivitäten Zystenbildungen im Hautgewebe von Nacktmäusen hervorrufen (Azuma et al. 1996b). Für die eigenen Fragestellungen war v. a. interessant, dass bei verschiedenen Fibrosemodellen neben Kollagenanhäufungen und Proteaseveränderungen auch auf die vermehrte Bildung von BM- und BM-assoziierten Strukturen hingewiesen wurde (Übersicht bei Rodemann et al. 1995).

Auftreten und Ausprägung von Strahlenreaktionen hängen mit verschiedenen Faktoren wie z. B. der proliferativen Gewebsstruktur, der Gesamtdosis, der Dosis pro Fraktion, dem Zeitintervall zwischen den Fraktionen, der gesamten Behandlungszeit, der Zeit-Dosis-Beziehung, dem Volumeneffekt und der Toleranzdosis zusammen (Burman et al. 1991, Deore et al. 1991, Fu et al. 1982 & 1995, Herrmann & Baumann 1997, Kaanders et al. 1992, Loeffler 1974, Parsons 1994, Scherer & Sack 1996), wobei für die Ausprägung vornehmlich Dosisabhängigkeiten und Volumeneffekte beschrieben wurden (Fajardo 1982, Herrmann & Baumann 1997, Parsons 1994, Scherer & Sack 1996, Seifert 1996).

Weiterhin werden die Gewebsreaktionen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auftretens betrachtet (Dörr & Trott 2000, Herrmann & Baumann 1997). **Frühe** Normalgewebsreaktionen treten während oder kurz nach der RT auf, sind nach Beendigung der RT in der Regel reversibel (Ausnahme: „Consequential Late Effect“ = narbige Ausheilung einer besonders schweren Akutreaktion) und umspannen den Zeitraum bis zu Tag 90 nach RT-Beginn. **Späte** Normalgewebsreaktionen werden Monate bis viele Jahre nach dem Ende der RT beobachtet. Sie gelten als nicht reversibel und oft progredient.

1.4 Charakterisierung der Zielstrukturen

1.4.1 Cytokeratine (CK)

Neben den morphologischen Kennzeichen epithelialer Grunddifferenzierung [Begrenzung von äußeren und inneren Oberflächen, Ausbildung eines kontinuierlichen Zellverbandes, spezialisierte Zellhaften in Form von Maculae adhaerentes (Zonula occludens und Desmosomen), intrazytoplasmatische Tonofilamente, Zellpolarität, Ausbildung einer BM] werden mittels biochemischer, histochemischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Techniken auch Bio/Makromoleküle bzw. deren antigene Determinanten als epitheliale Differenzierungsmarker genutzt.

Dabei handelt es sich einerseits um generelle („breite“) Epithelmarker (z. B. das epitheliale Membran-Antigen oder Desmosomenbestandteile, insbesondere Desmoplakine) und andererseits um selektive Epithelmarker in Form von spezifischen Sekretionsprodukten und Zellmembranantigenen (z. B. Karzinoembryonales Antigen, CA 19-9, CA 125). Darüber hinaus existiert ein biochemisch definiertes System von Strukturproteinen, die sowohl als generelle als auch selektive Epithelmarker geeignet erscheinen. Diese Strukturproteine sind die zum Zytoskelett gehörenden CK, die Proteinbestandteile der Intermediärfilamente der Epithelzellen darstellen.

Das Zytoskelett umfasst neben plasmamembranassoziierten Strukturen (plaquehaltige Zellhaften: Desmosomen, Hemidesmosomen, Zonula adhaerens), den Spectrinen und dem zellkernassoziierten Kernlamina-Komplex (Karyoskelett) insbesondere 4 zytoplasmatische Filamentsysteme:

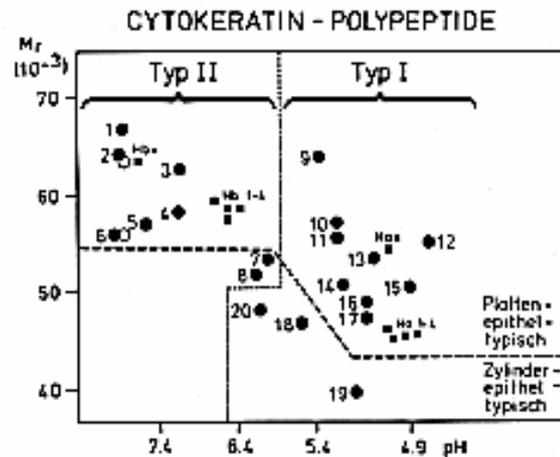
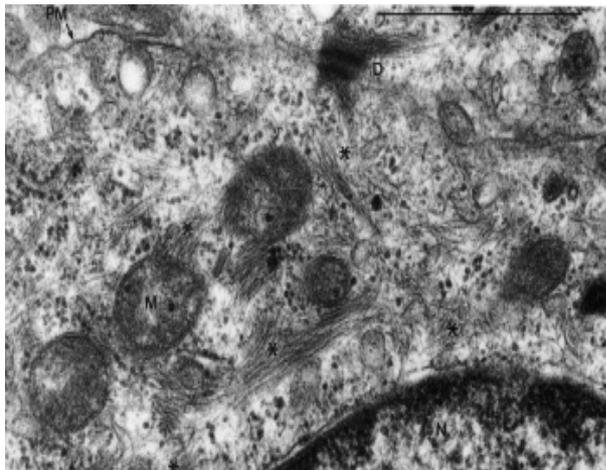
1. Die aus Aktin aufgebauten **Mikrofilamente** (Durchmesser 5-7nm) in Muskelzellen und Nichtmuskelzellen mit kontraktile und stützenden Funktionen.
2. Die **Myosinfilamente** (Durchmesser 15 nm) in Muskelzellen.
3. Die **Mikrotubuli** (Durchmesser 22-25 nm), die intrazellulären Transportprozessen dienen und die Mitosespindel aufbauen.
4. **Intermediärfilamente** [(IF); Durchmesser 7-11 nm], die Interaktionen sowohl mit dem Lamin B (Zellkernlaminabestandteil) als auch mit Desmosomen eingehen können.

IF-Proteine werden in 7 Klassen eingeteilt, die jeweils zelltypspezifisch, also in enger Beziehung zum zellulären Differenzierungsprogramm exprimiert werden. Die Feinstrukturierung und charakteristische Merkmale der 7 IF-Klassen wurden **im Anhang** dargelegt. Hieraus ergibt sich, dass die IF ein differenzierungsabhängiges Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen zeigen (Altmannsberger 1988, Espinoza & Azar 1982, Franke et al. 1981 & 1982, Moll 1986-88 & 1993, Nagle et al. 1985).

Die humanen CK wurden in einer numerischen Nomenklatur (CK 1-20) weiter subklassifiziert und repräsentieren den „Katalog der menschlichen CK“ (Moll et al. 1982). Diese das intrazelluläre Stützgerüst von Epithelien ausbildenden CK spielen eine wichtige Rolle für die mechanische Stabilität nicht nur der Einzelzelle, sondern auch des epithelialen Gewebeverbandes (Moll 1993).

Elektronenmikroskopisch (**Abb. 2a**) entsprechen die CK Tonofilamenten (*), die als teils gebündelte, teils locker-irregulär verteilte IF des CK-Typs vorliegen und an Desmosomen verankert sind. Nach den gelelektrophoretischen Koordinaten der Polypeptide wurde sie in **Abb. 2b** schematisch dargestellt. Aufgrund der Entwicklung von monoklonalen AK (ohne Kreuzreaktion mit anderen CK) war es möglich, die immunmorphologische Lokalisation und Analyse auf Einzelzellebene vorzunehmen und auch Zellen im epithelialen Gewebeband zu differenzieren (Huszar et al. 1986, Moll 1993).

Abb. 2a und b: Elektronenmikroskopische CK- sowie schematische Darstellung des „Katalogs der menschlichen Cytokeratine“ (nach Moll 1993)



Die für die eigenen Untersuchungen wesentlichen Gewebe (Speicheldrüse, Laryngo-Trachealbereich) weisen dabei folgende typische Expressionsmuster auf:

In den **humanen Speicheldrüsen** (SD) werden in den Azini typischerweise CK 7 und 18 exprimiert (etwas schwächer auch CK 8), im Gangsystem zeigen sich in luminalen Zellen positive Reaktionen für die CK 7, 8, 18 und 19 sowie CK 13 (schwächer und heterogener auch CK 1, 3, 4, 6, 10, 11, 14, 16, 17), wobei die Basalzellen eine Expression von CK 4-6 und CK 13-17 sowie CK 19 (schwächer und heterogener auch von CK 7, 8 und 18) zeigen. In Myoepithelien wird neben den CK 4-7 und CK 13-17 sowie CK 19 (schwächer und heterogener auch CK 8, 18) auch Vimentin koexprimiert, wobei Vimentin auch in den miterfassten stromalen Fibroblasten, lymphoiden Zellen, Lipozyten und Gefäßen (v. a. Endothelien) reagiert (Born et al. 1987, Caselitz et al. 1986a-c, Dardick et al. 1988b, Geiger et al. 1987, Ihrler et al. 2002, Leoncini et al. 1988, Moll 1993, Otto et al. 1988, Su et al. 1993, Seifert 1996). Für die SD von Tieren wurden v. a. Expressionen im Gangsystem, weniger im Bereich der Azini, angegeben, wobei Färbeintensität und Lokalisation innerhalb der verschiedenen SD und zwischen verschiedenen Tierspezies variierten (Mori 1991). Speziell für **Rattengewebe** wurden Reaktivitäten mit den AK RGE53 (CK 18), K8.13 (CK 1, 5-7, 8, 10, 11, 18), K8.60 (CK 10, 11), RPN1160 (CK 18), RPN1164 (CK 8) und RPN1166 (CK 8) in sekretorischen Tubuli, Schaltstücken und Streifenstücken (Mori 1991) sowie mit dem AK RPN1162 (CK 7) im luminalen Bereich der sekretorischen Drüsenepithelien (Gustafsson et al. 1998) gefunden. Der AK RGE53 (CK 18) reagierte mit Schaltstücken und den Lateralgrenzen von sekretorischen Tubuli, nicht jedoch in Streifenstücken. Der ebenso CK 18 ererkennende AK RPN1160 war darüber hinaus auch im Bereich der luminalen Seite von sekretorischen Tubuli positiv. Daneben zeigten sekretorische Tubuli leicht bis moderate CK 10/11-Expressionen (AK K8.60). Die AK RPN1164 (CK 8) und RPN1166 (CK 8) waren insbesondere in Schaltstücken deutlich immunreaktiv, während Streifenstücke meist leicht und die lateralen Zellgrenzen bei sekretorischen Tubuli teilweise leicht gefärbt wurden. Spezifische Reaktionen in Myoepithelien und Ausführungsgangepithelien fehlten bzw. wurden mit den verwendeten AK nicht beschrieben (**Tab. 4 im Anhang**).

Für den **Laryngo-Trachealbereich**, der bei den eigenen Präparaten auch angrenzende Pharynx- und Ösophagusanteile miterfasste, waren einerseits Plattenepithelien vom Mukosatyp, andererseits Zylinderepithelien und submukös gelegene Drüsenepithelien zu berücksichtigen. Letztere ließen ein zu Speicheldrüsen ähnliches Expressionsmuster erwarten.

Bei den **Plattenepithelien vom Mukosatyp** [Epithel i. B. der Stimmlippen (SL), des Pharynx, des Ösophagus] sind als typisch die nachgenannten Expressionen zu bezeichnen. Als Basis-CK werden in den Basalzellen CK 5 und 14 exprimiert, daneben aber auch CK 19 und CK 8 und 18. Die suprabasalen Schichten zeigen eine Expression von CK 4 und CK 13 (Reifungs-CK-Paar), ferner auch die „hyperproliferativen“ CK 6 und 16. Als Besonderheit gilt im SL-Epithel die über die Basalzellexpression hinausgehende CK 18 und CK 19-Expression (Lobeck et al. 1988). Bei den **Zylinderepithelien** (Anteile des Larynxepithels, mehrreihiges Flimmerepithel der Trachea) sind üblicherweise folgende Muster zu erwarten: die Basalzellen exprimieren die plattenepitheltypischen CK 5, 14, 15 sowie 19, wobei noch CK 17 hinzutritt, wohingegen die zylindrischen, luminalen Zellen überwiegend die für einfache Epithelien charakteristischen CK 7, 8, 18 und 19 sowie heterogen auch CK 4 und CK 13 exprimieren. Vimentin wird im respiratorischen Epithel normalerweise in einzelnen Zylinderepithelien, besonders am basalen Pol, koexprimiert und ist regelhaft bei mesenchymalen Zellen des angrenzenden Trachealgewebes bei Bindegewebszellen (z. B. Fibroblasten, Perichondriumzellen), Fettzellen, Muskelzellen, Knorpel- und Knochenzellen und Endothelien nachweisbar. **Übergangsepithelien** zeigen wechselnde Muster, die je nach Differenzierungsgrad mehr in Richtung von plattenepithelähnlichen, oder mehr in die Richtung von zylinderepithelähnlichen Expressionen weisen (Stoisek et al. 1991).

Für die **Rattenspezies** wurden ähnliche, z. T. ergänzende, z. T. heterogene Expressionsmuster angegeben (Schlage et al. 1998, Kasper et al. 1993, Evans et al. 1993). **Tab. 5 im Anhang** fasst die Expressionsmuster zusammen. Die daher nicht zwanglos anzunehmenden Kreuzreaktivitäten der AK bei der Ratte implizierten die Überprüfung der AK-Spezifität (dargestellt bei Material & Methoden).

Nach RT (Somosy et al. 1995: in vitro nach geringen Dosen von 0.5 Gy und 1 Gy, Gustafsson et al. 1998: in vivo nach Oligofraktionierung bis 30 Gy bzw. 45 Gy) können folgende Befunde auftreten:

- zu Klumpen geformte Aktinfilamente
- Verlust von Zellkontakten
- verminderte Desmosomen
- zerstörte IF-Filamente mit CK-Aggregationen
- abnormale Desmosomen mit fehlenden Tonofilamenten
- fehlende perinukleäre Filamente
- schmale, irregulär geformte, mit amorphem Material assoziierte Filamentstränge
- verstärkte Expressionen

1. 4. 2 Basalmembranen (BM) und BM-assoziierte Matrix

BM sind spezialisierte Strukturen der extrazellulären Matrix (ECM) und kommen ubiquitär im Organismus vor. Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen leisten sie einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität. Die wichtigsten Funktionen der BM und der mit ihr assoziierten angrenzenden ECM liegen in einer mechanischen Stabilisierung von Gewebsstrukturen (besonders Kollagen IV und VII), in einer Kompartimentierung des Gewebes und damit in einer Kontrolle des Stoffaustausches zwischen den verschiedenen Kompartimenten (Filterfunktion; besonders HPSG) so-

wie einer Verankerung der angrenzenden Zellen (besonders Laminin), wodurch Zellpolarisation und Zelldifferenzierungszustand wie auch die Kontrolle über migratorische Zellbewegungen und die Zellproliferation gewährleistet werden. Weiterhin können in der BM spezifische Boten- und Wachstumsfaktoren gespeichert oder Rezeptoren lokalisiert sein (Gospodarowicz et al. 1979, Nerlich 1995, Nomizu et al. 2000).

Je nach Lokalisation (und Funktion) begrenzen BM die Zellen nur an der Seite, die dem Stroma zugewandt ist (Epithelien und Endothelien), sie können jedoch auch die Zellen vollständig einhüllen, was z. B. für mesenchymale Zellen wie Muskel- und Fettzellen oder periphere Nervenzellen (Schwann-Zellen, Perineuralzellen) typisch ist. Knochenmatrix und Knorpel besitzen keine genuine BM. Die Zusammensetzung kann dabei in den verschiedenen Geweben nicht unerheblich variieren (Übersicht bei Nerlich 1995). In **Tab. 6** wurden die wesentlichen Komponenten der BM dargestellt.

Tab. 6: Wesentliche Komponenten der BM (Ekblom et al. 1984, Kucharz 1992, Lloyd 1979, Madri et al. 1980, Martin & Timpl 1987, Nerlich 1995, Nomizu et al. 2000, Rohde et al. 1979, Stechschulte et al. 1997, Szarfman et al. 1982, Timpl 1989, Timpl & Dziadek 1986, Timpl et al. 1979, Wetzels et al. 1991)

Spezifische, ubiquitär vorkommende BM-Komponenten		
<ul style="list-style-type: none"> • Kollagen IV ($\alpha 1/2$) • (klassisches) Laminin (Laminin-1) • Nidogen/Entaktin 		<ul style="list-style-type: none"> • Heparansulfatproteoglykan (HPSG, Perlekan) • Chondroitinsulfatproteoglykan (CSPG) • BM-90
Spezifische, selektiv vorkommende BM-Komponenten		
<ul style="list-style-type: none"> • Kollagen VII • Laminin-2 (Merosin) • Laminin-3 (S-Laminin) 		<ul style="list-style-type: none"> • Laminin-5 (Kalinin) • Kollagen IV ($\alpha 3/4/5/6$) • Kollagen XVII
BM-assoziierte, interstitielle Bindegewebsproteine		
<ul style="list-style-type: none"> • Fibronektin 	<ul style="list-style-type: none"> • Kollagen V 	<ul style="list-style-type: none"> • BM-40/SPARC/Osteonektin

Im Gewebeschnitt kann die Grenzziehung zwischen BM und Plasmamembran der Zelle relativ scharf vorgenommen werden, wohingegen die BM von dem an sie angrenzenden Stroma nur unscharf abgegrenzt werden kann. Hier geht die eigentliche und aus spezifischen Strukturkomponenten aufgebaute BM in das Geflechtwerk der Strukturproteine und Proteoglykane des bindegewebigen Stromas über.

Wegen ihrer nur sehr geringen Breitenausdehnung lässt sich die BM in der normalen Lichtmikroskopie nicht immer gut darstellen (z. B. als homogenisiertes Band in der PAS-Färbung), so dass aus elektronenmikroskopischen Befunden die Einteilung in eine Lamina basalis (Basallamina), die etwa 20 / 50 bis 100 nm dick ist, und eine Lamina fibroreticularis vorgenommen wurde. Die Lamina fibroreticularis stellt dabei die Übergangszone zum bindegewebigen Stroma dar (in der Lichtmikroskopie als Pars fibroretikularis der BM bezeichnet). Die Lamina basalis wird weiterhin in eine Lamina lucida (= rara), die etwa 30 nm dick ist und unmittelbar auf die Zellmembran folgt, und eine elektronendichte Lamina densa unterteilt. Gelegentlich spricht man auch von einer die Lamina densa begrenzenden Lamina rara interna (= lucida) und externa (Übergangsschicht zur Lamina fibroreticularis). In der Gesamtdicke können BM je nach Organ, Lokalisation und Alter zwischen 30 und 300 nm variieren. Bei den Epithelien des Haut- bzw. Schleimhautgewebes folgt die Basallamina dem Verlauf der basalen Zellmembranen der untersten Epithelschicht und ist mit den Epithelien durch Halbdesmosomen verbunden.

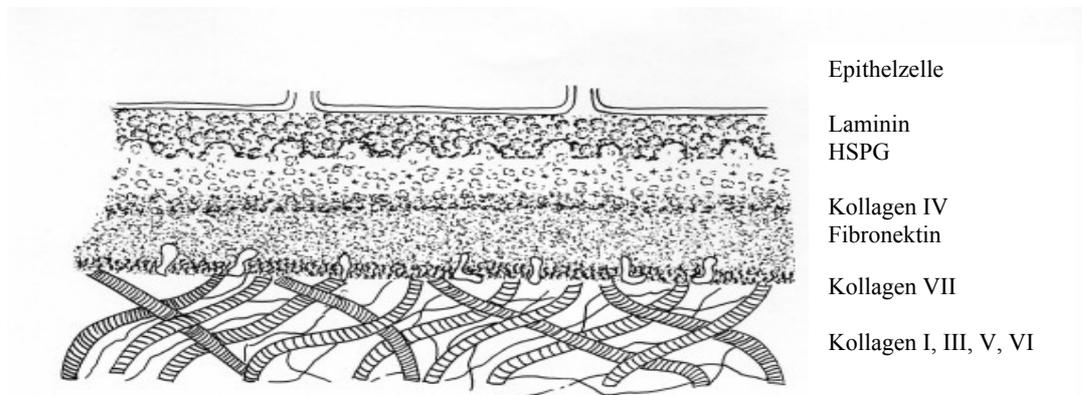
Bei den Strukturen im Bereich der BM werden kollagene Bestandteile (Kollagen IV, III, VII, V und VI) von den nicht kollagenen Bestandteilen in Form von Glykoproteinen (Laminin, Fibronectin, Entaktin/Nidogen) und Proteoglykanen (HPSG, Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat) unterschieden.

Als spezifische Bestandteile gelten insbesondere Laminin, Kollagen IV und HPSG. Als BM-assoziiert gelten v. a. das Kollagen V und das Glykoprotein Fibronectin. Fibronectin findet sich bevorzugt in der Lamina fibroreticularis und stellt die Verbindung zum umgebenden Stroma her.

Weiterhin enthält die ins Stroma übergehende Pars fibroreticularis BM-nahe das aus dünnen Mikro-fibrillen (30 nm im Durchmesser) bestehende, lockere Netze bildende Kollagen III, das Kollagen V sowie das mikrofibrilläre Kollagen VI, die in die proteoglykanhaltige Grundsubstanz eingebettet sind, während die typischerweise dickeren Fibrillen des Kollagen I erst in den tieferen Stromaabschnitten zu lokalisieren sind. Kollagen VII ist in Form von Verankerungsfibrillen (in Interaktion mit Verankerungsplatten von anderen Verankerungsfibrillen und Kollagen IV sowie stabilisiert und durchflochten von Fibrillen bzw. Bündeln der Kollagene I, III, V bzw. VI) insbesondere in der Verknüpfungszone (Pars fibroreticularis) am Übergang zum angrenzenden Stroma nachweisbar. Die wichtigsten Komponenten wurden **im Anhang** näher charakterisiert.

Aufgrund ultraimmunhistochemischer und biochemischer Befunde wurde ein Modell kreiert, das physikochemische Eigenschaften und ultrastrukturelle Aspekte der BM-Bildung berücksichtigt (**Abb. 3**).

Abb. 3: Modellvorstellung zum Aufbau der BM unter Berücksichtigung des Verteilungsmusters ihrer verschiedenen Komponenten (nach Nerlich 1995)



Für die Submandibular- (Kamada et al. 1996, Kadoya et al. 1997) und Parotisdrüse (Gustafsson et al. 1998) sowie Tracheal- (Laurie et al. 1983) bzw. SL-Gewebe (Ding & Gray 2001) der Rattenspezies wurden die BM- und BM-assoziierten Komponenten Laminin, CIV, HPSG bzw. kleine Proteoglykane und Fibronectin bzw. Genexpressionen der Kollagentypen I, III-VIII, XV, XVII und XVIII angegeben. In den **SD** wurde Fibronectin in Form zarter Fäden („delicate strands“) zwischen den Azini exprimiert, das interlobuläre Interstitium wurde etwas stärker und ausgedehnter gefärbt. Laminin konnte um Azini als sehr deutliche einheitliche Fluoreszenzschicht („very distinct uniform fluorescent layer“) nachgewiesen werden, während Streifenstücke und Gangepithelien von einer dünneren Membran mit geringerer Färbeintensität und geringerer Einheitlichkeit begrenzt wurden (Gustafsson et al. 1998). HPSG wurde sowohl im Bereich der BM als auch im daran angrenzenden Interstitium sowie in

Streifenstücken und Gangepithelien exprimiert, nicht jedoch in den Azini, während Dermatansulfatproteoglykan nur im bindegewebigen Stroma um Streifenstücke und Gangepithelien nachweisbar war (Kamada et al. 1996). Kadoya et al. (1997) illustrierten ein ultrastrukturelles Modell der azinären BM, welches aus einer dreidimensionalen Netzwerkschicht (CIV), dünnen Filamenten (Laminin) und dicken Fäden (kleine Proteoglykane) in Assoziation mit (interstitiellen) Kollagenfasern bestand. Im **Trachealgewebe** fanden Laurie et al. (1983) eine starke Lamininexpression, während Kollagen IV und HPSG moderat und Fibronectin nur sehr leicht exprimiert wurden (**Tab. 7 im Anhang**).

BM-Veränderungen (diffuse Zunahme, BM-Breitenabnahme, herdförmige Ausdünnungen, Lamellierungen) wurden bei verschiedenen Erkrankungen (z. B. letale Epidermiolysis bullosa, Alport-Syndrom, Diabetes mellitus, Amyloidose, Glomerulonephritis, Goodpasture-Syndrom, bullöses Pemphigoid, Dermatitis herpetiformis) beobachtet, spielen aber auch als Trennstrukturen eine Rolle, die bei der Migration im Rahmen einer Entzündung oder der Tumorinvasion passiert werden müssen bzw. als Leitschiene dienen (Barth et al. 2002, D'Ardenne 1989, Martinez-Hernandez & Amenta 1983, Nerlich 1995, Remberger & Nerlich 1995, Riede et al. 1995, Rinaldi et al. 2001, Stenback et al. 1999, Zantut-Wittmann et al. 1999).

Schon länger ist bekannt, dass v. a. bei den Kollagenen physikalische (→„Kochen führt zur Leimbildung“) und chemische (→„Essigsäure führt zur Verquellung“, →„Kalilauge führt zur Auflösung“) Agentien die innere Molekülstruktur verändern können (vornehmlich durch Denaturierung infolge Aufbrechung der Disulfidbrücken). Speziell nach RT wiesen ultrastrukturelle Befunde (Sholley et al. 1974) auf Fragmente und BM-Reste hin, die allerdings untersuchungstechnisch nur sehr kleine Gewebeabschnitte erfassen können, immunhistologische Befunde (Gustafsson et al. 1998) ergaben BM-Umstrukturierungen und konglomeratähnliche interstitielle Ablagerungen. Aufgrund weiterer Arbeiten zu radiogenen Veränderungen, die verschiedene in vivo-/in vitro-Modelle verwandten und die ECM- bzw. BM-Substanzen unterschiedlich berücksichtigten, ergab sich die folgende Übersicht.

Übersicht zu radiogenen Veränderungen der BM und BM-assoziierten Strukturen (Alexakis et al. 2001, Costes et al. 2000, Debbage et al. 2000, Delongas et al. 1987, Ehrhardt et al. 1996, El-Nabouh et al. 1989, Fatemi et al. 1985, Followill & Travis 1995, Fournier et al. 2001, Gu et al. 1998, Havemann et al. 1996, Johnston et al. 1995, Kobayashi 1988, Kraft et al. 1996, Kruse et al. 2001, Li et al. 2000, Martin et al. 1992, Miller et al. 1988, Molteni et al. 2000, Riecki et al. 2000, Robbins et al. 1991 & 2001, Rubin et al. 1995, Schneider et al. 1997, Song et al. 1998b, Wang et al. 1996, Wang & Robbins 1996, Ward et al. 1983, Wegrowski et al. 1992, Zhao et al. 2000)

Veränderungen der Gesamtmorphologie+Funktion	Vermehrungen verschiedener Bestandteile
<ul style="list-style-type: none"> • Verdickte BM-Zone • BM-Duplikationen bis vielschichtige BM • BM-Fragmentierung / BM-Reste • BM-Umstrukturierung • Ablösungen von Epithelien / Endothelien • Veränderte passive Filtereigenschaften • Veränderte Kollagenstruktur (Kollagen III, daneben auch Kollagen I) 	<ul style="list-style-type: none"> • Vermehrte und verbreiterte Expressionen (Fibronectin, Laminin, Kollagen III, IV, auch Kollagen I) • Interstitielle, konglomeratähnliche BM-Ablagerungen (Laminin) • Vermehrte Biosynthese (Kollagen III, IV, HPSG, auch Kollagen I) • Vermehrte Genexpression / Genproduktlevel (Kollagen III, IV, Fibronectin, daneben auch Kollagen I) • Vermehrter HPSG-Gehalt
Fehlen von Veränderungen	
<ul style="list-style-type: none"> • Unveränderter Kollagengehalt (Kollagen III, IV, daneben auch Kollagen I) • Gering veränderte oder unveränderte Genproduktlevel (Fibronectin) 	

Partielle Minderungen und variable Muster	Verminderungen und Abbau von Bestandteilen
<ul style="list-style-type: none"> • Diskontinuität / zerstörte Integrität / fokale Unterbrechungen im Wechsel mit Verdickungen der BM (Laminin) • Fluktuierende Expressionen (Kollagen III, IV, auch Kollagen I) • Irregulär verteilte Proteoglykane 	<ul style="list-style-type: none"> • Verminderte Transkription, Biosynthese und Sekretion (Kollagene) • Verminderte Expressionen (Laminin, Fibronektin) • Kollagenabbau (Kollagen III, IV, auch Kollagen I)

1. 4. 3 CK und BM / BM-assoziierte Substanzen im Gewebeverband

Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Moll 1993) strahlen einige Tonofilamente (die den immunhistologisch darstellbaren CK entsprechen) in die Region der Hemidesmosomen/Desmosomen ein und tragen vermutlich zu einer konstanten Anheftungsfestigkeit bei (Evans et al.1993). Von der BM-Seite her werden über hemidesmosomale Anbindungen („Bindungsassoziation“) und Laminin (Integrin)-Rezeptoren der Zellmembran Interaktionsmöglichkeiten angenommen (Hees & Sinowatz 2000, Riede & Schäfer 1995, Nerlich 1995). Neben gegenseitiger Beeinflussung (Kuropakus et al. 1992) kann daher vermutet werden, dass CK und BM auch über gemeinsame „Schnittstellen“ einen Beitrag zur Gewebeintegrität leisten (Knöbber 1994, Merker 1994, Wang et al. 1992).

1. 5. Organe und Gewebe

Speicheldrüsen (SD) Neben ablativer Chirurgie und Chemotherapie hat die RT in der Behandlung von Kopf-Hals-Malignomen (insbesondere der Karzinome) einen festen Stellenwert. Moderne radio-onkologische Therapieschemata erlauben zwar eine präzise Begrenzung des Strahlenfeldes auf das zu behandelnde Zielvolumen (Übersicht bei Scherer & Sack 1996), dennoch liegen die SD bei den meisten TM-Lokalisationen des Kopf-Hals-Gebietes wegen der engen anatomischen Nähe zum Primärtumor oder zum Halslymphabflussgebiet im Strahlenfeld und werden durch die RT beeinträchtigt. Die Strahlenreaktion hängt ab von der Strahlendosis, der Fraktionierung, dem funktionellen Status des SD-Gewebes, der Latenzperiode zwischen Strahlenexposition und Untersuchung sowie der Lokalisation der Drüse(n) im Strahlenfeld (Dreyer et al. 1989, Übersicht bei Seifert 1996, Seifert et al. 1984).

Die Folgen der verminderten SD-Funktion beinhalten eine reduzierte Speichelsekretionsrate mit temporärer oder bleibender Xerostomie sowie Geschmacks-, Sprech- und Schluckstörungen und ein erhöhtes Kariesrisiko. Vielfach ist mit diesen oralen Symptomen eine Einschränkung der Lebensqualität verbunden (Epstein et al. 2001). Dosisabhängig wurden die klinischen Merkmale in ein akutes Stadium (etwa 20 bis 30 Gy) und Dauerschäden (50 bis 60 Gy und darüber) unterteilt (Seifert 1996, **Tab. 8 im Anhang**). Auch die morphologischen Veränderungen der SD wurden in Abhängigkeit von der Strahlendosis und der Zeitdauer nach der Strahleneinwirkung klassifiziert und in Stadien eingeteilt (Dreyer et al. 1989, Seifert 1996, **Tab. 9 im Anhang**).

Diese Befunde zu morphologischen strahleninduzierten Veränderungen der SD beruhen auf Untersuchungen, die oft auch funktionelle Veränderungen mit einschlossen, und wurden sowohl in humanen Geweben als auch tierexperimentell gut dokumentiert und auch in neueren Arbeiten bestätigt (Abok et

al. 1984, Ahlner et al. 1993, Busuttill 1977, Chomette et al. 1981, Dreyer et al. 1989, El Mofty & Kahn 1981, Espinal et al. 1983, Fajardo & Berthrong 1981, Harwood et al. 1973, Nagler 1998 & 2002, O'Connell et al. 1999, Sagowski et al. 2003, Saitoh et al. 1992, Seifert 1996, Vissink et al. 1991a & b, 1990a & b), wobei histologische, histochemische, immunzytochemische und elektronenmikroskopische Techniken genutzt wurden.

Hingegen sind radiogene Veränderungen, speziell von BM und BM-assoziierten Strukturen im Bereich der SD weniger bekannt (Chomette et al. 1981, Gustafsson et al. 1998, Sholley et al. 1974). Mehr Interesse galt dem normalen Verteilungsmuster in den SD und Veränderungen bei SD-Tumoren (u. a. Caselitz et al. 1988, Übersicht bei Seifert 1996, Skalova & Leivo 1992a & b, Strassburger et al. 1998) oder es fanden strahleninduzierte EMP- und BM-Alterationen, inklusive assoziierter Substanzen, in anderen Geweben und/oder in-vitro-Modellen Beachtung (u. a. Übersichten bei Barcellos-Hoff 1998 und Herskind et al. 1998; Dalmau et al. 1999, Ehrhardt et al. 1996, Rodemann et al. 1995, Rose et al. 1999, Ruifrok & McBride 1999, Wang et al. 1999).

Die das morphologische Bild der radiogenen SD-Reaktion, das Zellveränderungen [vorwiegend Reaktionen der speichelproduzierenden serösen bzw. serös-mukoiden Azinuszellen, weniger i. B. der sekretorischen Tubuli (O'Connell et al. 1999, Zeilstra et al. 2000), über apoptotische und/oder nekrotische Zelluntergänge (Guchelaar et al. 1997, Seifert 1996) unter vermutlicher Einbeziehung weiterer Mechanismen wie DNA-Schäden, Genveränderungen, Effekte sekundärer Metaboliten und Reproduktionsstörungen an Progenitorzellen (Furuno et al. 1974, Fox 1998, Herrmann & Baumann 1997, Nagler 2002)], eine zunehmende Parenchymatrophie und eine zunehmende interstielle Fibrose beinhaltet, kennzeichnende, nicht unerhebliche Umgestaltung der normalen Gewebearchitektur begründete dabei unser Interesse, das Verhalten der BM und BM-assoziiertes Substanzen, die normalerweise zur Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionalen Gewebeintegrität beitragen, zu untersuchen.

Weiterhin waren CK/IF-Proteine für die eigenen Fragestellungen von Interesse, da auch sie über die Stabilitätsgewährleistung von Einzelzellen und des epithelialen Gewebeverbandes zur Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität beitragen, zumal immunhistologische Gewebeuntersuchungen vergleichsweise selten dem Nachweis radiogener CK/IF-Proteinveränderungen i. B. der SD galten (Gustafsson et al. 1998). Untersuchungen zur CK/IF-Proteinexpression fokussierten vielmehr v. a. auf gutartige und maligne Neoplasien (Übersicht bei Seifert 1996), daneben wurde auch auf Veränderungen z. B. bei der glandulären Morphogenese (Gustafsson et al. 1988a, Marshak et al. 1987, Martins et al. 2002) oder nach Speichelgangobliteration (Hashimoto et al. 1991) eingegangen.

Die nicht nur infolge maligner Transformationen auftretenden (Übersicht bei Moll 1993), sondern auch bei nicht-radiogenen, chronischen Zellschäden beobachteten Veränderungen der CK/IF-Proteinexpression, die mit qualitativen und quantitativen Zugewinnen und Minderungen der CK-Muster und der Vimentin-Expression verbunden sein können (Gröne et al. 1987, Moll 1993, Moll et al. 1991), unterstützten zudem unser Interesse, auch die CK/IF-Proteine mit einzubeziehen.

Da die Befunde der ersten Versuchsserie darauf hinwiesen, dass bestimmte EMP (Laminin, CIII, Fibronectin, CIV) und CK (CK 8, 13, 13/15/16, 17/19) nach 60 Gy-Strahlenexposition, insbesondere im Zeitfenster bis 6 Monate nach Abschluss der RT, stärker exprimiert werden, diente die Fortführung dem Ziel, mögliche dosisabhängige Expressionsmusteränderungen der CK, einschließlich einer möglichen Koexpression mit Vimentin, aufzuzeigen. Weiterhin wurde eine längere Latenzperiode berücksichtigt, um chronische Strahlenreaktionen im Langzeitverlauf zu erfassen (6 und 12 Monate).

Das Azinus-Gang-System der SD besitzt eine komplexe zelluläre Struktur. Das kann dazu beitragen, dass nicht nur z. B. bei der formalen Pathogenese verschiedenster Metaplasieprozesse (insbesondere hinsichtlich Lokalisation und Zelltyp) Untersuchungsbedarf vorlag (Ihrler et al. 2002), sondern auch bei den strahlenbiologischen, den Zell- und Gewebeeränderungen zugrunde liegenden Mechanismen auf Einzelzellebene mehrere Konzepte verfolgt wurden (Übersicht bei Nagler 2002). Neben Zell- und Zellorganellenveränderungen (Funktionseinschränkung, Nekrose, Apoptosemechanismen, Membranschäden via Lipidperoxidation, Schwermetallionen-medierte Zelluntergänge ausgehend von den Sekretgranula) wurden DNA-Schäden genannt, die verstärkt durch die Einwirkungen stark redoxaktiver Metallionen (vor allem Eisen und Kupfer) einen verzögerten, reproduktiven Zelltod hervorrufen können (Abok et al. 1984, Furuno et al. 1974, Nagler 2002, Seifert 1996, Vissink et al. 1992, Zeilstra et al. 2000). Dieser Mitosetod wurde als wesentlich für die radiogenen SD-Spätreaktion erachtet (Nagler 2002). Diese für die SD als besonders evident betrachteten Reproduktions- bzw. Proliferationsstörungen begründeten daher unser Interesse, die Proliferationsrate anhand der Ki-67-Expression mit einzubeziehen.

Laryngo-Trachealbereich (Allgemeine Klinik und Histologie) Radiogene Normalgewebsreaktionen im Laryngo-Trachealbereich können sich als Mukositis mit Schleimhauthyperämie und -ödem, möglicher Epitheldesquamation sowie Ulzeration (Frühreaktion) und als (gefürchtete) Spätreaktionen in Form von Schleimhaut- und Drüsenatrophien, begleitet von Teleangiektasien, chronischen interstitiellen Fibrosen und Ödemen, Weichgewebs- und Stützgewebsstenosen, Perichondritiden, Chondro- und/oder Osteonekrosen manifestieren (Alexander 1963, August et al. 1996, Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Dietz et al. 1998, Fajardo 1982, Herrmann & Baumann 1997, Hunter & Scher 2003, Kapur 1968, Keene et al. 1982, Kutzner et al. 1978, O'Brien 1996, Parsons 1994). Die flimmertragenden respiratorischen Epithelien galten früher als etwas strahlenempfindlicher (Alexander 1963), nach heutiger Ansicht als etwas strahlenresistenter im Vergleich zu unverhornenden Plattenepithelien (Herrmann & Baumann 1997) oder zu peripheren Lungenepithelien und Fibroblasten (Bao et al. 1997). Wie in anderen Geweben können begleitend - und nach allgemeiner Auffassung (Riede & Schäfer 1995, Herrmann & Baumann 1997) für die Spätreaktionen neben den Parenchymschäden von zentraler Bedeutung - Blutgefäß- und Lymphgefäßveränderungen (Gefäßzunahme, Dilatationen, Thrombenbildungen, Stenosen, Obstruktionen, myointimale Proliferation, hyaline Gefäßwanddegenerationen) auftreten, die die vaskuläre und lymphatische Kompetenz zusammen mit einer erhöhten Gefäßpermeabilität und -fragilität reduzieren (Alexander 1963, Herrmann & Baumann 1997, Narayan &

Cliff 1982, O'Brien 1996, Werner 2002) bzw. blockieren können (Dietz et al. 1998, Ewald 1996, Murphy 1959, Ward et al. 1975). Radiogene Rupturen größerer Halsgefäße (Roscher et al. 1966) gelten heutzutage jedoch als sehr selten.

Andererseits gelten Larynx und Trachea mit ihrem ruhenden Knorpelgerüst als weitgehend strahlenresistent, zumindest unterhalb von 70 Gy Gesamtdosis (Herrmann & Baumann 1997) bzw. als gut strahlentolerabel (Lusinci et al. 1990) oder zumindest als deutlich strahlentoleranter als allgemein angenommen (Wang & McIntyre 1993), insbesondere dann, wenn die Knorpel-, Schleimhaut- und Hautintegrität nicht beeinträchtigt ist (Ward et al. 1975, Parsons 1994).

Laryngo-Trachealbereich (Klinik) Im Kehlkopf dominieren klinisch unterschiedlich ausgeprägte Larynxödeme und -stenosen mit Atmungsbehinderungen (die ggf. eine Tracheostomie indizieren), Stimmstörungen hinsichtlich Stimmqualität und -leistung sowie Dysphagien, die unter Umständen in Kombination mit einer Aspiration oder Aspirationspneumonie eine Sondenernährung erfordern (Bahadur et al. 1985, Böhme 1997, Budach 1998, Calcaterra et al. 1972, Dagli et al. 1997, Dejaeger & Goethals 1995, Dietz et al. 1998, Fajardo 1982, Finizia et al. 1998 & 1999, Foote et al. 1992, Fu et al. 1982, Gaze et al. 1991, Harrison et al. 1990, Hoyt et al. 1992, Ichimura et al. 1997, Laccourreye et al. 2000, Lazarus et al. 1996, Logemann et al. 1997, Mazon & Grimard 1997, O'Brien 1996, Rezvani et al. 1991, Rudat et al. 1999, Silvain et al. 1993, Spriano et al. 2000, Taylor et al. 1992, Tombolini et al. 1995, van der Voet et al. 1998, Ward et al. 1975, Wiernek et al. 1990). Dabei sind nach August et al. (1996) in Folge einer therapeutischen Hals-RT neben der Xerostomie (68%; Warde et al. 2000: eine der Hauptnebenwirkungen nach RT von Kopf-Hals-TM) und häufigen Grad I-Hautspätreaktionen (57%) auch Hypothyreosen (14.3%; Donnelly et al. 1995: 45%), Karotisgefäßgeräusche (14.3%) und häufig wenigstens geringe Halsbewegungseinschränkungen sowie Tubendysfunktionen und Mittelohrergüsse (Maier et al. 1994), labyrinthäre und cochleäre Läsionen (Singh & Slevin 1991, Symonds et al. 1992) oder kombinierte Schwerhörigkeitsformen (Namyslowski et al. 1996) mit einzubeziehen.

Klinisch vergleichsweise seltener wurden bei zunehmender Anwendung moderner RT-Techniken massive Halsfibrosen mit Bewegungseinschränkungen, Stimmlippennekrosen bis hin zum Stimmlippenverlust und rein fibrotisch bedingte Stimmlippenlähmungen (Aanesen et al. 1988: 13.7%) sowie Chondro- und Osteoradionekrosen (ca. 1%) beobachtet, was auch in einer allgemeinen Inzidenzabnahme schwerer Larynxreaktionen insbesondere der Chondro(osteo)radionekrosen innerhalb der letzten 30 Jahre von 5-12% auf ca. 1% zum Ausdruck kam (Bousson et al. 1995, Fitzgerald & Koch 1999, Hunter & Scher 2003). Andererseits kommt (insbesondere bei bestrahlten T3-Glottiskarzinomen) Stimmlippenfixationen oder Refixationen mit Ödem als Hinweis auf ein höheres Rezidivrisiko (Flood & Brightwell 1984, Jordan & Piotrowski 1994) oder auch der posttherapeutischen Wiederbeweglichkeit als Hinweis auf die höhere Wahrscheinlichkeit einer lokalen Tumorkontrolle (Aanesen et al. 1988, Henk 1986, O'Brien 1996, Parsons et al. 1992) klinische Bedeutung zu. Weiterhin ist das Auftreten sog. radiogener TM zu beachten (Boivin et al. 1995, Burkhardt 1999, Glaubinger et al. 1991).

Bei den Ödemen bestand weitgehend Konsens über den Beginn des Auftretens, in der Regel ab ca. 3 Monate bis zu 1 Jahr nach RT-Ende, wobei jedoch die Ödeme auch unter oder unmittelbar nach der Therapie beginnen können und bis oder über 3 Monate hinaus persistieren können (Fu et al. 1982, O'Brien 1996, Stewart et al. 1974, Wiernek et al. 1990). Auch hinsichtlich des Schweregrades von Larynxödemen bestand eine allgemein anzunehmende positive Dosis-Wirkungs (Ausprägungs)-Beziehung (Budach 1998, Burman et al. 1991, Dietz et al. 1998). Hingegen wurden zur Inzidenz (z. B. 7-17% bzw. 15.3%: van der Voet et al. 1998; bis 58.8%: Dietz et al. 1998) und Persistenz (rückbildungsfähig vs. persistierend) von Larynxödemen in Abhängigkeit von verschiedenen RT-Schemata, kombinierten Radiochemotherapien und/oder ggf. zusätzlichen chirurgischen Maßnahmen verschiedene Daten dargelegt (Budach 1998, Burman et al. 1991, Dietz et al. 1998, Ichimura et al. 1997, Rangakumar & Shanta 1978, van der Voet et al. 1998; **Tab. 10 im Anhang**).

Mit der Larynxödembeurteilung ist die Frage nach einem sich anbahnenden Rezidiv meist unmittelbar verknüpft, wobei auch hier die Daten bezüglich der Rezidivraten (22%-96% bzw. 0%-71%) nicht unerheblich variierten. Einige Daten wurden diesbezüglich auszugsweise in **Tab. 11** und in **Tab. 12 im Anhang** (nach O'Brien 1996) zusammengestellt.

Nach Budach (1998) kann davon ausgegangen werden, dass Larynxödeme mit einer Inzidenz von ca. 50% auftreten und dass sie überwiegend rückbildungsfähig sind. Bezüglich der Rezidivraten muss nach der Übersicht von O'Brien (1996) damit gerechnet werden, dass bei ca. 50% (bei nicht unerheblicher Spannbreite zwischen 0% und 71%) der Patienten mit einem Ödem ein Rezidiv vorliegt.

Andere Studien wiederum haben beim Vergleich verschiedener RT-Schemata untereinander oder zur chirurgischen Therapie weniger auf Strahlenreaktionen fokussiert (u. a. McGuirt & Ray 1999, Robbins et al. 1996) oder das Fehlen bemerkenswerter Komplikationen bzw. relevanter Spätfolgen betont (Antognoni et al. 1990, Medini et al. 1996).

Im **Trachealbereich** dominieren nach klinischen Gesichtspunkten ähnliche Folgen (Tracheitis, Schleimretention, Atmungsbehinderungen) einer externen RT, wie sie für die Schleimhäute von Pharynx und Larynx und die Larynxknorpel mitgeteilt wurden. Einzelfallmitteilungen wiesen auf eine Säbelscheidentrachea (Kano et al. 1996) oder Fistelbildungen zu den großen herznahen Gefäßen (Dickman et al. 1989) hin.

Bei tracheainkludierender RT sind v. a. Strahlenreaktionen des Lungengewebes (Strahlenpneumonie mit Husten, Fieber, Ateminsuffizienz sowie die Lungenfibrose mit chronischer respiratorischer Insuffizienz, Dyspnoe, Zyanose) klinisch bedeutsam und z. T. dosislimitierend, wenn einzzeitig mit hoher Dosis im Rahmen einer Ganzkörper- oder Halbkörpertherapie oder große Lungenvolumina behandelt wurden (Herrmann & Baumann 1997).

Nach kombinierten strahlentherapeutischen Verfahren (externe RT und endobronchiale Brachytherapie) wurden v. a. Hämoptysen (7.4%) und Bronchitiden (8.7%) beobachtet (Hennequin et al. 1998).

Laryngo-Trachealbereich (Histologie) Im **Larynx** gingen histologische Daten zu Strahlenfolgen zumeist auf Biopsiepräparate nach RT oder vorbestrahlte Kehlkopfpräparate zurück. Murphy

(1959) berichtete u. a. aufgrund von Autopsiepräparaten über Perichondritiden, Chondritiden, Ödeme und Nekrosen. Ward et al. (1975) fanden bei 43 Patienten mit moderatem bis schwerem persistierendem Ödem nach RT unterschiedlich ausgedehnter T₁-T₄-Glottis- und Supraglottiskarzinome korrelierend mit früheren Berichten (Calcaterra et al. 1972, Goldman 1966, Goodrich & Lenz 1948, Kagan et al. 1974, Manara 1968) PE-Verhornungen, PE-Metaplasien des respiratorischen Flimmerepithels, vermehrte, z. T. thrombosierte Gefäße, z. T. hyaline Gefäßwanddegenerationen, Endothelproliferationen, subepitheliale Leukozyteninfiltrationen, zystische, flüssigkeitsgefüllte, vermutlich Lymphangiectasien entsprechende Hohlräume, Perichondriumverdickungen und -fibrosen, Chondrozytenverluste, Auftreten abnormaler Riesenzellen und Knorpelnekrosen. Fajardo (1982) referierte in seiner Übersicht unter Bezugnahme auf Literatur- (Alexander 1963, Keene et al. 1982) und eigene Daten ebenfalls über häufig auftretende Ödeme, unterschiedlich ausgeprägte Kollagenanhäufungen, Fibrinablagerungen, Gefäßteleangiectasien mit prominenten Endothelien, offene Ulzerationen und Nekrosen begleitende entzündliche Infiltrate (vor allem Leukozyten, aber auch Lymphozyten und eosinophile Granulozyten), myointimale Proliferationen der Arterien mit Gefäßstenosen (hingegen fehlende Phlebosklerose), unterschiedlich verteilte und different ausgeprägte Drüsenatrophien, Zellatypien, pseudoepitheliomatöse Hyperplasien und Zelldysplasien der auskleidenden Schleimhäute und insgesamt selten auftretende Karotisrupturen (v. a. nach radiochirurgischer Kombinationstherapie) sowie Perichondritiden und unterschiedlich ausgeprägte (Foki neben größeren Läsionen), unterschiedlich lokalisierte (bei den hyalinen Knorpelgeweben v. a. Aryknorpel, aber auch im Epiglottisbereich) und unterschiedlich imponierende (aseptische und offen purulente) Knorpel- und Osteonekrosen. Deitmer (1986) gab bei bestrahlten Laryngektomiepräparaten einerseits vollständig erhaltene, andererseits nur noch fokal nachweisbare Flimmerepithelinseln oder nur aus PE-Metaplasien bestehende Epithellagen an. Hörmann & Donath (1986) wiesen darauf hin, dass nach RT eine direkte Larynxinvasion der TM-Zellen auffällig war und die Abräumung der destruierten Areale durch Mikrophagen unter Bildung von Knochen- und Knorpel-sequestern stattfand. Diese histologischen Bilder wurde im wesentlichen auch in neuerer Literatur beschrieben (z. B. Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Herrmann & Baumann 1997, Jordan & Piotrowski 1994, Parsons 1994, Scherer & Sack 1996, Scherer et al. 1991). Der Pathomechanismus der Ödementstehung wurde in einem reduzierten bis hin zu einem blockierten vaskulären und lymphatischen Fluss gesehen, dem später bedingt durch hyaline Gefäßwanddegenerationen und Endothelproliferationen Teilobstruktionen der laryngealen Venen und wenigstens fokale Obliterationen und Einengungen des feinen, weit differenzierten Lymphabflusssystemes folgen. Ein erhöhter Kapillardruck kann dann bei reduzierter Lymphdrainage in Kombination mit einer erhöhten Gefäßwandpermeabilität zu einem Anstieg an interstitieller Flüssigkeit führen. Knorpelnekrosen wurden durch Perichondriumverdickungen und -fibrosen mit dadurch bedingter reduzierter nutritiver Knorpelversorgung erklärt, wobei zusätzliche Faktoren, wie vermehrte Infektbereitschaft (bedingt durch das Ödem und/oder Minderdurchblutung), allgemein reduzierte Blutzufuhr (z. B. Arteriosklerose) und Integritätsstörungen (Tumorinvasion, vorhergehende chirurgische Intervention) mit einbezogen wurden (u. a. Burkhardt & Meyer-

Breiting 1999, Dietz et al. 1998, Ewald 1996, Herrmann & Baumann 1997, Hörmann & Donath 1986, Parsons 1994, Riede & Schäfer 1995, Scherer et al. 1991, Werner 2002).

Einzelberichte griffen v. a. die insgesamt seltenen Larynxnekrosen (Sprinzl et al. 1999: Krikoidnekrose nach Laserarytaenoidektomie und vorheriger Strahlentherapie, Miyaguchi et al. 1997: Larynxnekrose nach kombinierter Radiochemotherapie) auf.

Andererseits fanden Gaze et al. (1991) an Nerven und Muskeln keine charakteristischen, radiogenen Veränderungen im Sinne neuraler oder muskulärer Degenerationen in Laryngektomiepräparaten.

Für den **Trachealbereich**, der als Struktur zwischen Larynx und Bronchialsystem oft im Rahmen therapeutischer Hals- und Thorax-RT mit einbezogen ist, sind ähnliche, wenn auch im Vergleich zu Larynx, Pharynx und Bronchien etwas geringer ausgeprägte histologische Befunde angegeben worden (Schleimhautatrophie, PE-Metaplasien, Fibrosen, Knorpel- und Gefäßalterationen), wobei jedoch die histologischen Veränderungen des angrenzenden Lungengewebes wie Lungenfibrose, Alveolitis und Gefäßstenosen in der Regel ausgeprägter sind (Fajardo 1982, Herrmann & Baumann 1997, Scherer & Sack 1996). Kano et al. (1996) fanden i. B. einer strahleninduzierten Säbelscheidentrachea umschriebene Knorpeldestruktionen mit entzündlicher Infiltration (vorwiegend T-Lymphozyten und aktivierte Makrophagen) und Kollagenfaserersatz. Nach u. a. intraoperativer RT des oberen Mediastinums mit 20 oder 25 Gy Einzeldosen (neben Ösophagektomie und Lymphknotenausräumung und anschließender externer RT) standen nach Arimoto et al. (1993) v. a. späte, positiv dosisabhängige, mehr als 1 Jahr anhaltende Trachealläsionen im Vordergrund. Bei Fistelbildungen zwischen Trachea und Truncus brachiocephalicus nach kombinierter Radiochemotherapie und schwieriger Intubation wurden tracheale Ulzerationen beobachtet (Dickman et al. 1989). Auch Fajardo (1982) stellte den Fall einer zumindest durch RT begünstigten, tracheo-ösophagealen Fistel mit Ausdehnung zur Aorta dar.

Im angrenzenden Pharynx und Ösophagus sind nach therapeutischer Hals-RT Spätreaktionen wie bindegewebige Stenosen, Schleimhautatrophien, Ulzerationen und interstitielle Fibrosen zu erwarten (Herrmann & Baumann 1997, Murofushi et al. 1990, Silvain et al. 1993).

Experimentelle Daten Im Rattenlarynx fanden sich 10 Tage nach Oligofraktionierung (6 bzw. 8 Gy/F bis zu einer Gesamtdosis von 30 bzw. 40 Gy) vermehrte Neuropeptidexpressionen (besonders Substanz-P und Enkephalin) i. B. der subglottischen Drüsen und der postganglionären, parasympatischen Ganglienzellen (Lidegran et al. 1995a) und Immunreaktivitätssteigerungen von Bombesin (ein Neuromodulator-Peptid) bei lokalen Ganglienzellen und Nervenfasern um die submukösen Drüsen i. B. der Subglottis (Lidegran et al. 1995b) bei ansonsten unveränderter Histomorphologie. Bei Hunden zeigten sich nach Brachytherapie der Stimmlippen im Nachbeobachtungszeitraum bis 12 Monate insgesamt leichte und meist reversible histologische Veränderungen (Zöllner et al. 1988). Diese reichten von einer perivaskulären Infektion (nach einem Monat) bis zu einem inhibierten Fibrinabbau um die "Seeds", fokalen Dyschylien aufgrund erweiterter Drüsengänge, fokalen PE-Dysplasien, kapillären Endothelzellschwellungen, Muskelatrophien um die "Seeds" und Blutgefäßsteangiektasien

(nach 3 Monaten). Nach 6 und 12 Monaten verblieben Muskelatrophien, Teleangiektasien und ein in-
zwischen verbesserter Fibrinabbau.

Neben Funktionsstörungen i. B. der Trachea, z. B. der Zilienaktivität/Zilienschlagfrequenz (Baldetorp & Hakanson 1977, Baldetorp & Baldetorp 1985, Karpenko & Ivanowski 1992) wurden neben Funktionsbeeinträchtigungen auch histologische Veränderungen in Form von zu- und abnehmenden Becherzellen, einer submukösen Drüsenhypoplasie, perivaskulären und intimalen sowie interstitiellen Fibrosen, Ziliendestruktionen, fokalen Zilien- und Zellverlusten, Zellmembranschäden und Ödemen beobachtet (Albertson 1985, Albertson et al. 1984 & 1983, Man et al. 1987, Powers et al. 1987). Daneben wurde im Tiermodell, v. a. aber in vitro, über das vermehrte Auftreten von epithelialen Proliferationsherden, Präneoplasien und Mikrokernen berichtet (Bao et al. 1997, Brooks et al. 1997, Terzaghi-Howe 1989a,b & 1990, Thomasson et al. 1990). Hingegen waren bei Hunden, die nach intraoperativer RT mit 20, 30 oder 40 Gy des rechten Lungenoberlappens und des Mediastinums bis zu 1 Jahr nachbeobachtet wurden, neben anderen Befunden (Lungenfibrose, Herzmuskelnekrosen und -fibrosen, perineurale Phrenikusfibrose) nur minimale Tracheaveränderungen, minimale Ösophagusreaktionen (Ösophagitis) und geringe radiogene Veränderungen der großen Gefäße auffällig (Barnes et al. 1987). Auch Gilette et al. (1992) fanden bei Hunden 2 Jahre nach fraktionierter RT (2, 3 oder 4 Gy /F bis zu Gesamtdosen von 24 - 68 Gy) des Mediastinums neben Lungenverdichtungen, Pleurafibrosen, Perikardergüssen und entzündlichen Perikardkonstriktionen keine dosisbezogenen relevanten Tracheal- oder Ösophagusläsionen. Albertsson et al. (1986) bzw. Hakanson et al. (1991) beschrieben anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen nach kombinierter Chemoradiotherapie (fraktionierte Tracheal-RT von 2 Gy/F bis zu Gesamtdosen von 2, 6, 10, 16 oder 20 Gy) bei bis 10 Tage nach RT untersuchten Kaninchen zwar stufenweise zunehmende Trachealläsionen (Blasenbildungen im Zilienbereich, aufgetriebene, geschwollene Zilienenden, gekrümmte und abgebrochene Zilien, Zilienverluste, mikrovilliähnliche Ersatzstrukturen, Flimmerepithelverluste, Zellreste, partielle Exfoliationen von becherzellähnlichen Zellstrukturen), welche jedoch mehr dem zytotoxischen Effekt des Chemotherapeutikums zugeschrieben wurden, da bestrahlte und nicht bestrahlte Tracheaareale ähnliche Veränderungen aufwiesen und sich keine radiogen verstärkten Reaktionsmuster zeigten. Dass sich die maximale Reaktionsausprägung bei der 10 Gy-Dosisgruppe fand (nicht jedoch bei den höheren Dosen von 16 oder 20 Gy) und sich im Gegensatz dazu bei allein chemotherapierten Tiere dosisabhängig im Zeitverlauf zunehmend ausgeprägtere Trachealläsionen zeigten, wurde auf eine strahleninduzierte, beschleunigte Epithelproliferation mit nachfolgend verbesserter Regeneration zurückgeführt. Auch die im Strahlenfeld liegende angrenzende Ösophagusschleimhaut zeigte eine akzelerierte Epithelproliferation (Albertsson et al. 1992).

Reichlich liegen auch klinische und v. a. experimentelle Studien zu radiogenen Lungenveränderungen vor. Hier wurden neben den Einzelzellveränderungen im Stroma und im Parenchym (z. B. Mastzellvermehrungen/-strukturen): Dubrovskaja et al. 1991, Fibroblastenvermehrungen: Ts'ao et al. 1997, gesteigerte Makrophagenaktivität: Vujaskovic et al. 2001, Schäden der Kapillarendothelien,

Typ-II-Pneumozyten und Lungenmakrophagen: Hermann & Baumann 1997, bronchioloalveoläre Hyperplasie: Pauluhn et al. 2001) vorwiegend auf Kollagenveränderungen der interstitiellen Kollagene I und III fokussiert, wobei aber auch weitere Mediatoren, z. B. die TGF- β -Familie (Vujaskovic et al. 2001) oder der Plättchenwachstumsfaktor, der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-I und der Tumornekrosefaktor α (Thornton et al. 1996) mit einbezogen wurden. Dabei fanden sich vor allem vermehrte Kollagenablagerungen (u. a. Miller et al. 1988, Molteni et al. 2000, Pauluhn et al. 2001, Penny et al. 1982, Rubin et al. 1995, Vujaskovic et al. 2001) oder Kollagenratioveränderungen (Murray & Parkins 1987, Song et al. 1998b), wobei für andere Gewebe auch parallele Kollagenabbauvorgänge bzw. mehr relative Kollagenvermehrungen durch einen zunehmenden Bindegewebszellverlust (Niere: Meistrich et al. 1984, Gastrointestinaltrakt: Ito et al. 1986, Martin et al. 1992) oder ein verändertes Verhältnis zu den nichtkollagenen Proteinen (Haut: Nguyen et al. 1991) mitgeteilt wurden.

Vorwiegend galten bei diesen für unterschiedliche Zeitabschnitte der Spätphase angegebene Kollagenveränderungen Dosis-, Fraktionierungs- und Latenzabhängigkeiten, wobei allerdings die Nachbeobachtungszeiten (2-16 Monate), applizierten Gesamtdosen (meist als Einzeldosis: 5-30 Gy), Fraktionierungsschemata (10x 3 Gy, 3x 1 Gy/Tag bis 30 Gy, 2x 8.5 Gy, 5x 2 Gy, 5x 10 Gy) nicht unerheblich variierten. Im Tiermodell wurden zudem häufig hohe Einzeldosen verwendet (z. B. Vujaskovic et al. 2001: 28 Gy, Ts'ao et al. 1997: 30 Gy, Molteni et al. 2000: 20 bzw. 30 Gy, Pauluhn et al. 2001: 20 Gy) oder Oligofraktionierungen mit mehr oder weniger hohen Fraktionsdosen (z. B. Karvonen et al. 1987: 2x 8,5 Gy, Thresiamma et al. 1996: 5x 2 bis 5x 10 Gy, Giri et al. 1985: 10x 3 Gy bzw. 3x 1 Gy/Tag für 10 Tage) verwendet, die im humantherapeutischen Anwendungsbereich weniger relevant sind.

Extrazelluläre Matrix / Basalmembranen und Cytokeratine **ECM/BM** Zunehmend
fanden in der Lunge auch Veränderungen der BM und BM-assoziierten Proteine nach RT Beachtung, überwiegend im Sinne vermehrter und fluktuierender Kollagen IV-Expressionen (Johnston et al. 1995, Miller et al. 1988, Rubin et al. 1995, Ward et al. 1983) und/oder im Sinne verstärkt nachweisbarer Fibronectinexpressionen (Johnston et al. 1995, Kolb et al. 1999). Zu vermehrten/verdickten BM-Expressionen nach RT liegen auch Daten aus anderen Geweben vor (z. B. Muskelgewebe: Wegrowski et al. 1986 & 1992, Lefaix et al. 1992, Gefäßsystem: Schneider et al. 1997, Kobayashi 1988, Niere: Robbins et al. 1991 & 2001, Darm: Berghem & Johanson 1983, Fatemi et al. 1985, Nebenhoden: De-longeas et al. 1987, Brustdrüse: Ehrhart et al. 1996, Speicheldrüse: Gustafsson et al. 1998). Ebenso sind bei Verwendung anderer Noxenmodelle (z. B. UV-Exposition, Gangligatur) BM-Alterationen im Sinne von vermehrter Laminin-Proteinsynthese, BM-Verdickungen, BM-Anhäufungen und BM-Duplikationen mitgeteilt wurden (Richardson et al. 1998). Andererseits fanden sich aber auch vermehrte Expressionen und vermehrt proteolytische Aktivitäten verschiedener BM-abbauender Matrixmetalloproteinasen (Chouinard et al. 2001, Herrmann et al. 1996).

Bei den radiogenen BM-Veränderungen in den verschiedenen Geweben, die die BM-Bestandteile unterschiedlich mit einbezogen und nach verschiedenen Dosen und Fraktionsschemata beobachtet wurden, wurden sowohl frühere als auch spätere Veränderungen nach Beendigung der RT sowie Auffäl-

ligkeiten bei Verwendung verschiedener Strahlenquellen mitgeteilt, wobei der Schwerionen-RT besondere Bedeutung zukam (Ehrhart et al. 1996, Costes et al. 2000). Neben vermehrten/verdickten BM-Expressionen, die vorwiegend in späteren Zeitabschnitten auftraten, waren für die Frühphase nach RT für einige Gewebe und Zelllinien nahezu unveränderte oder reduzierte Immunreaktivitäten der BM und BM-assoziierten Proteine/Proteoglykane nachweisbar (z. B. Wundbettbereiche von Hauttransplantaten: Wang et al. 1996, Mamma: Ehrhart et al. 1996, Haut: Costes et al. 2000, Lunge: Penney & Rosenkranz 1984), wobei auch auf radiogene Diskontinuitäten (Ehrhart et al. 1996), Fragmentierungen (Ward et al. 1983), Irregularitäten (Delongea et al. 1987) oder Separationen der BM vom darüber liegenden Endothel (Hashimura et al. 1989) hingewiesen wurde. Es ergab sich daher auch für diese spezialisierte Struktur der ECM der Hinweis auf dosis-, latenzzeit- und strahlenquellenabhängige Veränderungen, die jedoch ähnlich wie bei den interstitiellen Kollagenen nach einem humantherapeutischen Protokoll noch zu prüfen waren, zumal wenig über radiogene Alterationen der BM oder BM-assoziiierter Strukturen speziell im Laryngo-Trachealbereich bekannt ist.

Untersuchungen zur ECM im Bereich der Trachea, die die einzelnen BM-Bestandteile unterschiedlich mit einbezogen, lieferten Erkenntnisse über die anatomische Organisationsstruktur der subepithelialen, trachealen BM-Proteine (Evans et al. 2000, Inoue & Leblond 1988, Inoue 1994, Laurie et al. 1983), die Organo- bzw. Histogenese (Tournier et al. 1992a) mit besonderer Beachtung der trachealen Drüsenentwicklung (Jacquot et al. 1994, Lallemand et al. 1993, Lim et al. 1995, Tournier et al. 1994, Tournier et al. 1992b). Daneben spielen verschiedene ECM-Komponenten in Bezug zur Morphologie, zum Differenzierungs- und Wachstumsverhalten von respiratorischen Epithelien eine Rolle (Baeza-Squiban et al. 1994, Davenport & Nettlesheim 1996a & b, Wang et al. 1999). Als besondere Funktion der ECM/BM wurde eine deutliche Antioxidationsfähigkeit beschrieben (Cohn et al. 1994). Bei Krankheitsprozessen waren v. a. Funktionen und Veränderungen der ECM/BM bei der Wundheilung (Boland et al. 1996, Erjefalt et al. 1994, Hicks 1999, Horiba & Fukuda 1994, Kanno & Fukuda 1994, Walner et al. 2000), beim Asthma bronchiale (Chetty et al. 1995, Chu et al. 1998, Panettieri et al. 1998, Pare et al. 1997, Shiels et al. 1996 & 1999), bei der zystischen Fibrose (Hill et al. 1997) oder Allergiemodellen (Ma & Stephens 1997) von Interesse.

Auch im Larynx wurde vornehmlich über die Struktur der ECM (Ding & Gray 2001, Hallen et al. 1996, Melo et al. 2003, Paulsen & Tillmann 1997) und Veränderungen bei degenerativen Prozessen (Paulsen & Tillmann 1999) und chronischen Laryngitis, Reinke-Ödemen und benignen und malignen TM berichtet (Courey et al. 1996, Hagedorn et al. 1994, Knöbber 1994, Nerlich 1995, Nerlich et al. 1994 & 1998).

CK Die im Respirationstrakt nicht nur nach RT im Fokus stehende Lungenfibrose gab dazu Anlass, Fibrosemechanismen näher zu untersuchen. Hierzu konnte in histologischen und immunhistochemischen Studien zu zellulären und extrazellulären Veränderungen bei der Lungenfibrose, die neben der RT v. a. Bleomycin-induzierte Fibrosen ursächlich berücksichtigten, gezeigt werden, dass auch nicht-epitheliale Zellen im Interstitium wie Lymphozyten, Granulozyten, Mastzellen, Fibroblasten

(einschließlich deren durch TGF- β stimulierbare Kollagenproduktion in vitro: Fine & Goldstein 1991, Fine et al. 1990, Ritzenthaler et al. 1991), Mesothelien, Endothelien, Alveolar- und Interstitium-Makrophagen (Adamson et al. 1994, Adamson & Bowden 1983, Crouch 1990, Komatsu et al. 1989, Kuhn et al. 1989, Nettelblatt et al. 1989 & 1991, Yi-Qing et al. 1995) und kontraktile Elemente in Myofibroblasten (Leslie et al. 1992, Skalli et al. 1989) sowie die Interaktion zwischen Alveolarepithelien und Fibroblasten bzw. Kollagen (Adamson et al. 1990) eine Rolle spielen. Da zudem gezeigt werden konnte, dass CK bei den morphologischen Veränderungen während der Lungenentwicklung und bei kultivierten Typ II-Pneumozyten miteinbezogen sind (Funkhouser et al. 1987, Funkhouser & Peterson 1989, Mitchell et al. 1991, Woodcock-Mitchell et al. 1989 & 1990) wurden neben morphologischen Veränderungen (u. a. Adamson et al. 1988 & 1990) zunehmend auch CK/IF-Proteinalterationen epithelialer (und teilweise nicht-epithelialer) Zellen bei pathologischen Umbauprozessen bzw. chronischen Schädigungsmustern (Fine et al. 1991, Mitchell et al. 1991, Schlage et al. 1998b, Woodcock-Mitchell et al. 1984 & 1986 & 1989) und nach RT (Kasper et al. 1993) untersucht. Es zeigten sich hier verstärkte CK 18-Expressionen (Woodcock-Mitchell et al. 1986 & 1989). Nach Tabakrauchexposition können im Tracheobronchialsystem neben CK-Expressionsvermehrungen auch -verminderungen auftreten (Schlage et al. 1998b).

Außerhalb der Lunge waren z. B. in Tubulusepithelien der Niere nach chronischer Nierenschädigung IF-Proteinexpressionsveränderungen v. a. im Sinne einer vermehrten Koexpression von CK mit Vimentin auffällig (Gröne et al. 1987). CK-Veränderungen können auch – zumindest in anderen Geweben wie Blase, Speicheldrüsen, Ureter, Niere, Uterus, Konjunktiva – einer durch Vitamin A-Deprivation induzierten PE-Metaplasie vorausgehen und/oder sie begleiten (Gijbels et al. 1992).

Radiogene Veränderungen der CK/IF-Proteinexpressionsprofile speziell im Laryngo-Trachealbereich sind weniger bekannt. Für die Lunge konnten Kasper et al. (1993) bei Ratten in bis 6 Monate nach RT (20 Gy Einzeldosis) nachuntersuchten Normalgeweben (Bronchialsystem und Alveolen) radiogene, zeitabhängige Veränderungen der CK-Expressionsmuster und Zellmorphologie darstellen. Die Autoren beschrieben Veränderungen in Form von ausgeprägt heterogenen Expressionsmustern, Expressionsvermehrungen, Neoexpressionen und bemerkenswerten Koexpressionen von Vimentin und CK, welche die anatomischen Regionen und verschiedenen Zelltypen im Zeitverlauf nach RT unterschiedlich betrafen. Österreicher et al. (2001) fanden bei Wistar-Ratten nach Ganzthorax-RT (2x 15 Gy innerhalb einer Woche) neben verdickten Alveolarsepten Typ II-Pneumozyten-Dezimierungen, was mit einer verminderten CK 18-Immunreaktivität einherging (und durch Pentoxyphyllin nicht beeinflussbar war).

Durch die bei Karzinomen beschriebenen CK/IF-Proteinexpressionsveränderungen (Übersicht bei Moll 1993; Lobeck et al. 1986 & 1988, Meister & Goertchen 1994, van der Velden 1997), insbesondere aber durch die bei Larynxkarzinomen berichteten histologischen Veränderungen nach RT, die sich in Form von Kern- und Zytoplasmaveränderungen und auch in bestimmten Mustern am Gesamtumor darstellten (Übersichten bei Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Meyer-Breiting & Burkhardt 1988),

und durch die nach kombinierter Hyperthermie/RT von TM in den oberen Atemwegen neben Leukozyten- und Makrophageninfiltrationen beschriebenen TM-Zellveränderungen (Zelldystrophie, Störungen intrazellulärer Membransysteme und der Zellorganellen, assoziiert mit dem Rearrangement von membranbindenden Proteinen, Proteolipiden und Nukleotidkomplexen, Pinchuk et al. 1989) ergaben sich zusammen mit in vitro-Befunden nach RT (Somosy et al. 1995) Anhaltspunkte für mögliche auch die CK/IF-Proteine betreffende Alterationen im Gewebeverband. Demgegenüber fanden sich jedoch keine vergleichbaren CK- und Vimentinmuster mit Primärtumor versus Metastase oder mit dem Zustand nach RT (unveröffentlichte Daten, zitiert nach Moll 1993).

1. 6. Tumoren

Extrakranielle TM Da Laborratten sowohl spontan als auch in Folge verschiedener Noxen leicht TM entwickeln, gelten sie schon seit langem als Standardmodell, um onkogene Effekte verschiedener Substanzen zu prüfen (Altman & Goodman 1979, Peckham 1980). Strahleneffekte können dabei in Abhängigkeit vom Bestrahlungsfeld, der Dosis und der Rattenart differieren. So gelten Wistar-Ratten als strahlensensibler als Sprague-Dawley-Ratten (Peckham 1980). Die bedeckende Haut, einschließlich der subkutanen Gewebeschichten, und vor allem Mesenchymgewebe wurden bei Ratten als bevorzugte Ursprungsgewebe von malignen strahlenassoziierten TM angegeben (Baker et al. 1988, Barnes et al. 1990, Knowles 1981, Ootsuyama & Tanooka 1988 & 1991, Reinhold 1965, Sminia et al. 1991 & 1990 & 1993, Suit et al. 1978, Urano et al. 1989 & 1979). Die TM entsprechen somit vorwiegend Sarkomen, wohingegen selten über Karzinome als dominierender TM-Typ berichtet wurde (Epstein 1972, Sminia et al. 1993). Insbesondere adenoid-zystische Karzinome (ACC) und unterschiedliche Typen von Adenokarzinomen der Kopf-Hals-Region unter besonderer Berücksichtigung der großen SD wurden bei Ratten sehr selten gefunden.

Im Gegensatz zu humanen Geweben (Holm 1990, Kaldor 1990, Übersicht bei Seifert 1996, Taghian et al. 1991) oder zu Ratten-TM anderer Lokalisation, die in Folge verschiedener Karzinogene (z. B. DMBA-induzierte Brustdrüsentumoren: Tsubara et al. 1988) auftraten, wurden spezielle Differenzierungsformen, insbesondere anhand der CK-Muster, von ACC und Adenokarzinomen der Kopf-Hals-Region bei der Rattenspezies nach einer Strahlenexposition bisher nicht beschrieben.

In humanen Geweben wurden insbesondere beim ACC Expressions- und Strukturveränderungen der BM beschrieben (Caselitz et al. 1986a & 1988, Nerlich et al. 1994, Skalova & Leivo 1992a & b). Es fanden sich einerseits intakte, andererseits aber auch fokal unterbrochene oder sogar stark verbreiterte BM-Expressionen um Tumorzellkomplexe. Dabei zeigten sich bei den drei verschiedenen Subtypen des ACC zunehmend geringere BM-Ablagerungen um die Tumorzellverbände mit geringerer struktureller Differenzierung, indem im tubulären Subtyp viel BM-Material, im kribriformen Typ nur eine dünne BM an der Stromagrenze und um Zellformationen des basaloiden Typs nur noch eine geringe, fragmentarische BM nachweisbar waren. Daneben wurden in Zellkulturen von ACC die Einzelheiten des Ablaufs der BM-Synthese näher analysiert (Cheng et al. 1995). Durch die extrazelluläre Ablage-

rung von BM- und weiteren ECM-Substanzen durch die Tumorzellen wird die charakteristische Ausbildung von Pseudozysten bewirkt (Seifert 1996).

Bei der Rattenspezies liegen zu ECM Veränderungen, insbesondere speziellen BM-Alterationen in von den SD ausgehenden Karzinomen wenig Erkenntnisse vor. Es war zusätzlich interessant, BM-Muster im TM mit denjenigen in strahlenreaktiven Gewebearealen zu vergleichen.

Unsere Untersuchungen zielten darauf, die histologischen und immunhistologischen Kenntnisse über verschiedene seltene Karzinome bei der Rattenspezies zu erweitern und eine TM-Entwicklung im Rahmen einer RT mitzuerfassen. Strahlenassoziierte TM sind auch beim Menschen zu beachten. Dies kann ungünstige Auswirkungen auf die Überlebenszeit nach initial kurativer Tumorthherapie haben und unter Umständen zum Spätversagen einer RT bei fortgeschrittenen malignen Kopf-Hals-TM (Holm 1990, Kaldor 1990, Sminia et al. 1993) beitragen.

Hypophysenadenome Ratten entwickeln sehr häufig Tumoren der Hypophyse. In der Mehrzahl handelt es sich dabei um Adenome. Andere Tumore sind sehr selten (Altman & Goodman 1979, Eiben & Bomhard 1999, Fajardo 1982, Fitzgerald et al. 1971, Furth et al. 1959, Griepentrog 1964, Griesbach 1967, Ito 1976, Ito et al. 1972, Lloyd 1990, Maekawa & Odashima 1975, Prejean et al. 1973, Swaen & Becker 1968, Wolfe et al. 1938). Offenbar steigt die Häufigkeit dieser Tumore proportional mit dem Lebensalter (Altman & Goodman 1979, van Dyke et al. 1959). Daneben ist eine allgemeine Inzidenzzunahme besonders in jüngerer Zeit beobachtet worden (Eiben & Bomhard 1999). Weibliche Ratten haben eine höhere Rate von Hypophysenadenomen als männliche Tiere (Altman & Goodman 1979, Eiben & Bomhard 1999).

In der früheren Literatur wurden die Hypophysenadenome des Menschen hinsichtlich ihrer zytoplasmatischen Färbbarkeit [chromophil (basophil oder azidophil) und chromphob] unterschieden. Diese Zuordnung wurde auch für Hypophysenadenome der Ratte verwendet (Griesbach 1967). Diese Klassifizierung kann auch heute noch angewandt werden, wenn mit der Färbereaktion keine funktionelle Bedeutung für die Hormonbildung der Hypophyse verbunden wird (Furth et al. 1959, Saeger 2000: persönliche Mitteilung). Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden zum Nachweis von Hormonen haben sich die Kenntnisse über Hypophysentumore sehr erweitert, da dadurch die Identifizierung einzelner Hormone im Zytoplasma ermöglicht wurde (Saeger 1981 & 1997).

Die RT der Kopf-Halsregion schließt die Schädelbasis häufig ein. Diese RT kann unter therapeutischen Bedingungen im Wachstumsalter zu komplexen Wachstums- und Funktionsstörungen führen oder bei Erwachsenen zur Entwicklung von Hypophysenadenomen beitragen. Hinsichtlich der Entwicklung von strahlenassoziierten Hypophysenadenomen wurden experimentelle Untersuchungen ganz überwiegend an Ratten durchgeführt (Lloyd 1990). Allerdings waren die TM entweder nach Applikation einer einzigen oder wenigen, sehr hohen Strahlendosen aufgetreten. Diese Dosierungen haben für die Protokolle therapeutischer RT beim Menschen kaum Korrelate. Während unserer Untersuchungen wurden routinemäßig Hirnsektionen durchgeführt, um mögliche zerebrale Strahlenreaktionen zu erfassen. Hierbei wurden Hypophysenadenome entdeckt und in die Auswertung miteinbezogen.

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist eine differenzierte Beurteilung der unter den Begriffen „Strahlenfolge“/„Strahlenreaktion“ bzw. „Strahlenfibrose“ subsumierten chronischen Gewebeveränderungen bestimmter Organstrukturen der Kopf-Halsregion nach externer fraktionierter RT in einer Applikationstechnik und -dosis, die der humantherapeutischen Anwendung entspricht. In Anbetracht der Relevanz für den Kopf-Halsbereich konzentrierten wir uns dabei auf die großen Kopfspeicheldrüsen, den Larynx und die Trachea sowie die Hypophyse, wobei angrenzende Regionen wie Pharynx und Ösophagus in der Regel miteinbezogen wurden.

Neben der als wesentlich angesehenen Einflussgröße Gesamtdosis (im Rahmen eines konventionell fraktionierten RT-Protokolls) waren als weitere Beeinflussungsfaktoren Alter und Latenz der RT zu evaluieren, um mögliche Veränderungen im Zeitverlauf zu erfassen. Parallel waren als mehr klinische Parameter das Körpergewicht der Tiere sowie das Gewicht der SD zu dokumentieren.

Die phänotypische Charakterisierung soll mit etablierten morphologischen und immunhistologischen Methoden, die im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie insbesondere die Darstellung und Beurteilung auch größerer Gewebeabschnitte erlauben, erreicht werden. Da die RT zu Parenchym- und Gewebeamstrukturierungen führen kann, waren anhand der Histomorphologie Einzelzell- und Gewebeamgestaltungen zu charakterisieren. Die immunhistologischen Nachweismethoden zielten auf spezielle radiogen modifizierbare Gewebebestandteile wie das Kollagen I. Ein besonderes Interesse galt dabei den CK und BM bzw. BM-assoziierten Strukturproteinen, welche aufgrund ihrer morphologischen Verflechtungen zur Einzelzell-, aber auch zur Gewebeintegrität beitragen. Bei strahleninduzierter Integritätsreduktion (Gewebeumbau) sollte daher geprüft werden, inwieweit und mit welchen Mustern radiogene CK- und BM-Alterationen auftreten und ob sich aus dem pathohistologischen Bild erklärende Hinweise auf die Ursache funktionell-klinischer Befunde ergeben. Um mögliche radiogene Proliferationsstörungen darzulegen, die strahlenbiologisch als wesentliche Grundlage für Gewebereaktionen angesehen werden, wurde in den SD der Proliferationsindex anhand der Ki-67-Expression geprüft. Des Weiteren sollte auf während der Experimente auftretende TM geachtet werden und anhand der Entitäten, der TM-Wachstumsmuster und -Lokalisationen ein Beitrag zur Pathohistologie von TM bei Labortieren im Zusammenhang mit einer RT geleistet werden. Bei den Hypophysenadenomen zielten wir vorrangig auf die Untersuchung der Hormonbildung.

3 Material und Methoden

Spezies Es wurden für diese Arbeit die Tiere eines etablierten RT-Modells (Friedrich 2000) ausgewählt, die eine externe RT erhielten. Es handelte sich um weibliche Wistar-Ratten (Charles River, WIGA, Ausgangsgewicht 250 bis 350 g). Die Tiere wurden mit Wasser und Trockenfutter ad libitum versorgt. Die artgerechte Unterbringung und Versorgung der Tiere wurde freundlicherweise vonseiten der Mitarbeiter der Abteilung für Versuchstierhaltung (Leiter: Dr. med. vet. Dimigen) im Universitäts-Krankenhaus Eppendorf übernommen. Bei den Tierexperimenten wurden alle Bestimmungen

des Tierschutzes nach dem Gesetz des Landes berücksichtigt und die "Principles of Laboratory Animal Care" eingehalten. Die Untersuchungen wurden durch die Ethik-Kommission der Universität Hamburg wiederholt genehmigt (Genehmigungs-Nrn. 3/94-3/96).

Arbeitsplatz und Instrumente Für die Präparation und Explantation der Organe standen ein Operationsmikroskop Typ 384 000 der Fa. Wild, Heerbrugg, Schweiz (ausgerüstet mit Objektiven für 8-, 16- und 32-fache Vergrößerung) sowie ein Lupenstirnreif (Lactona[®] USA, 4-fache Vergrößerung) zur Verfügung. Es wurde vorwiegend bei 8- und 4-facher Vergrößerung gearbeitet. Die Instrumente (Skalpelle, Nadelhalter, anatomische und chirurgische Pinzetten, Scheren, Haken) der Fa. Storz, Tuttlingen, Deutschland und sonstigen Materialien (Tupfer, Fäden) für die Eingriffe wurden in spezies- und organangepasster Größe verwendet. Die Auswertung und Fotodokumentation der Schnittpräparate erfolgte mit einem Durchlichtmikroskop Typ Axiophot der Fa. Zeiss, Jena, Deutschland (ausgerüstet mit 2,5-, 5-, 10-, 20-, 40- und 100-fachen Vergrößerungsobjektiven, 10-fach Okularen sowie Zoomfunktion) und der mitinstallierten Fotodokumentationseinheit (JVC 3-CCD Color Video Kamera KY-F55 mit Steuereinheit). Belichtet wurde auf Kodak Ektachrom 64 T (Kodak Ltd., England, Kunstlichtfilm) mit einer Einstellung der Filmempfindlichkeit der Kamera von 25 bzw. 65 ASA. Dieser Arbeitsplatz wurde freundlicherweise vom Institut für Pathologie der MLU Halle-Wittenberg (Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. HJ. Holzhausen) zur Verfügung gestellt.

Bestrahlung Die technischen Vorgaben (Bestrahlungsfeld, Narkose) für eine monofraktionierte, perkutane, halbseitige Hals- und Schädelbasis-RT gingen auf Angaben Hellners (1991) zurück, die aus der Zusammenarbeit mit der Abteilung für Biophysik und Strahlenbiologie (Direktor: Prof. Dr. Jung) stammen. Sie wurden für die eigenen Untersuchungen leicht modifiziert. Eine halbseitige Hals- und Schädelbasis-RT ermöglicht aufgrund der bilateralen Anlage der SD eine intraindividuelle Kontrolle der Strahlenreaktion (Franzen et al. 1993).

Bestrahlungsgeräte und Bestrahlungseinrichtung Die RT wurde zunächst (Vorversuche) mit einer Seifert-Anlage (Bauartenkennzeichen SH 57/85 RÖ, Typ Isovolt 320/13, Röhre Typ MB 350/1, Röhrenspannung max. 320 kV, Röhrenstrom max. 13 mA) der Fa. Seifert & Co., Ahrensburg, durchgeführt (Arbeitswerte: 200 kV, 20 mA). Es wurde ein Strahlenfilter (Tubus 30/2x4 (Fa. Philips, Holland, Typ 37631700, Nr. G 42 84 00), 0,5 mm Cu-Filter) mit einer Öffnung von 17 x 33 mm² benutzt. Die RT wurde dosisgesteuert mittels Dosimeter appliziert. Die Wirksamkeit der Strahlenabschirmung durch eine Bleiplatte (2 mm) wurde getestet, indem Leerbestrahlungen mit dem Dosimeter unter der Bleiplatte an drei verschiedenen Messpunkten fünfmal durchgeführt wurden. Hierbei gab es keinen Ausschlag des Dosimeters, so dass von einer Strahlenabsorption durch die Bleiplatte ausgegangen werden konnte. Während der laufenden RT wurden die narkotisierten Tiere durch eine Videokamera überwacht. Die Einzeldosis betrug 2 Gy. Als durch den Bestrahlungstubus begrenztes Bestrahlungsfeld wurde die linke Halsseite ausgewählt. Das Bestrahlungsfeld grenzte kranial an den Unterkiefer (Kieferwinkel und distale Anteile des Corpus mandibulae lagen im Strahlenfeld) und erfasste kaudal das Schlüsselbein und die linke Thoraxapertur. Medial wurde als Begrenzungslinie die Mediansagitta-

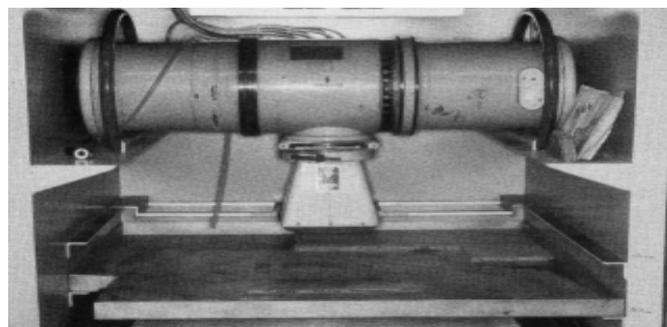
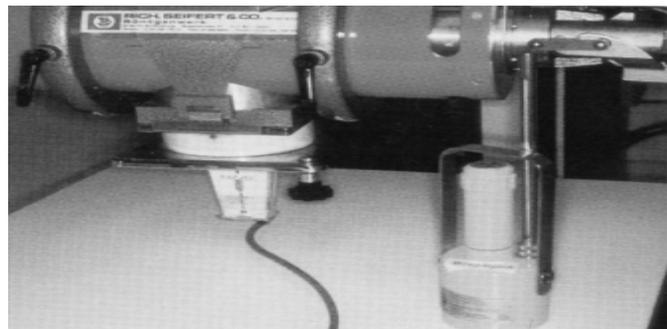
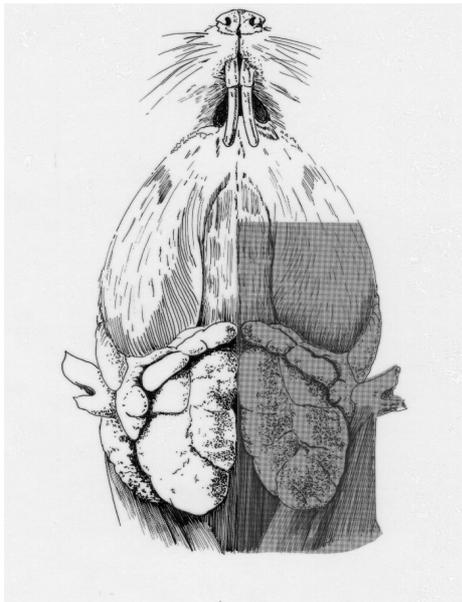
le ausgewählt. Diese ließ sich leicht an den Fallrichtungen des Fells identifizieren. Der Strahlentubus wurde stets so eingerichtet, dass die Organe der Mittellinie des Halses insgesamt im Strahlenfeld lagen (Beck-Bornholdt, Hamburg, pers. Mitteilung). Somit lagen neben den linksseitigen Halsweichteilen und dem äußeren Ohr auch der Pharynx, der Larynx, der Ösophagus, die Schilddrüse und weitgehend die Halswirbelsäule (HWS) und Schädelbasis einschließlich der Hypophyse im Strahlenfeld. Das linke Auge lag stets außerhalb des Strahlenfeldes. Da eine Streustrahlung auf die rechte Halsseite nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden die paarigen SD gegen die gleichaltriger Ratten ohne Behandlung geprüft. Vor dem Beginn der täglichen RT-Serie wurde das Dosimeter geeicht. Die Eichung wurde an der Kontrollvorrichtung Typ 23261 der Physikalisch-Technischen Werkstatt Dr. Pychlau GmbH vorgenommen, die einen Prüfstrahler enthält (Isotop ^{90}Sr , Aktivität 33 MBq, Nr. CE392, Hersteller: Amersham Buchler, Braunschweig). Die Arbeitsplätze am Bestrahlungsgerät des Inst. für Biophysik und Strahlenbiologie der Univ. Hamburg wurden für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Später (Hauptversuche) wurde mit einer Siemens-Bestrahlungseinrichtung (Röntgentherapieöhre) gearbeitet (Type TH300/TA 300f, Serien-Nr.: Gehäuse 431741, Röhre 935756, Gesamtfilterung 0,1 mm Cu, Strahler und Blende 2 mm Al, Blendenfilter 0,5 mm Cu, Blendenmaße: 30 cm x 15 cm x 10 cm, Röhre komplett abgeschirmt in einer verschließbaren Seifert-Bleikammer, Bedienungspult: Stabilipan, Bestrahlungsleistung 16 mA, 200 kV, Fokus-Haut-Abstand: 29 cm, Dosimeter PTW-SN4, Physikalisch-Technische Werkstätten Dr. Pychlau, Freiburg, ebenfalls: Kontrollvorrichtung Typ 23261 (Prüfstrahler) Ionisationskammer 3253, Halter 0008). Die Geräte sind auf den **Abb. 4** und **5** zu sehen.

Es wurde die linke Hals- und Schädelbasisseite (**Abb. 6**) einmal täglich (monofraktioniert) mit 2 Gv bestrahlt.

Abb. 4 und 5: Bestrahlungsgeräte (Röntgentherapieöhren), oben: Fa. Seifert, unten: Fa. Siemens

Abb. 6: Schematische Darstellung des Strahlenfeldes



Narkose für die Bestrahlung Für die reproduzierbare RT der ausgewählten linken Halsseite war eine Betäubung der Tiere notwendig. Die fraktionierte RT erfolgte in bis zu 30 Einzelapplikationen zu

je ca. 80 Sekunden. Um die Tiere für diese kurze Zeit bei täglicher RT zu immobilisieren, wurde zur Betäubung auf die lang wirkende Applikation von Rompun[®]/Ketanest[®] mit zu erwartender Morbidität (Fried 1985) sehr zügig verzichtet und statt dessen eine Kurzzeitnarkose mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (Forene[®]) gewählt. Die Tiere wurden in einen für diese Anwendung umgebauten, abgedichteten handelsüblichen Stapelkasten gesetzt, in den Sauerstoff über einen Halothanverdampfer geleitet wurde. Der Sauerstoff-Flow betrug 2-4 l/min. Ein zweiter Abzugsschlauch führte das Luft-Gas-Gemisch direkt an den Luftabzug des Narkoseraumes. Die Isoflurankonzentration im Betäubungskasten wurde mit dem Vapor-Überwachungsgerät der Fa. Draeger bestimmt. Die Betäubung reichte für die einzelne RT voll aus, so dass diese bei Außenluft durchgeführt werden konnte. Das benutzte Anästhesieverfahren war bereits erfolgreich für die präoperative RT von Ratten v. a. für mikrovaskuläre Eingriffe angewendet worden (Hellner 1991, Friedrich 2000).

Explantation und Fixierung Die Ratten wurden zur Perfusionsfixierung mit Rompun[®]/Ketanest[®] anästhesiert und danach zusätzlich mit supravitalen Mengen an Nembutal[®] (0,5 ml) narkotisiert. Nach Überprüfung der ausreichenden Narkosetiefe durch Fehlen adäquater Schmerzreize wurden die Tiere auf dem Rücken gelagert. Nach einem Hautschnitt von submental bis umbilical wurde das Fell zur Seite präpariert. Dann wurden die Jugularvenen (Vv. jug. ext.) oberhalb der Klavikula freipräpariert, um nach Eröffnung der Gefäße den Abfluss des Blutes zu erleichtern. Nach Thorakotomie wurde der linke Ventrikel mit einer Braunüle perforiert. Die Vv. jug. ext. wurden eröffnet. Die Braunüle[®] wurde mit dem Infusionsbesteck konnektiert und das Gefäßsystem darauf für 90 s mit Ringer-Lösung [Raumtemperatur (RT)] bei einer Wassersäule von 108 cm perfundiert. Danach wurde die Perfusionsfixierung sofort weitergeführt, indem 4 %iges, gepuffertes Formalin (RT) für weitere 20 min über denselben intrakardialen Anschluss unter denselben Druckverhältnissen eingeleitet wurde. Nach Perfusionsfixierung wurden die der vorderen oberen Halsmuskulatur ventrolateral aufliegenden Drüsenpakete [bestehend aus der gut bohnen großen Glandula (sub)mandibularis (GSM) und der am oberen lateralen Pol davon gelegenen bis etwa linsengroßen Glandula sublingualis major, teilweise unter Mitnahme der laterokranial davon neben dem Gehörgang gelegenen, knapp linsengroßen Glandula parotis) beidseits und die Laryngotrachealregion unter Wegnahme der ventralen Hals- bzw. prälaryngotrachealen Muskulatur sorgfältig und schonend freipräpariert. Die Drüsengänge wurden drüsennah abgesetzt und das Drüsenpaket in toto entfernt. Das Laryngotrachealpräparat wurde weiter nach dorsal in Richtung Wirbelsäule entwickelt, wobei die der oberen Trachea anliegende Schilddrüse und die lateral der Trachea anliegenden Rekurrensnerven und der dorsal anliegende Ösophagus sehr schonend präpariert wurden, um entnahmetechnische Artefakte zu vermeiden. Oberhalb des Hyoids und Tracheabifurkation wurde das Präparat unter Mitnahme von Pharynxanteilen, Ösophagus und Schilddrüse mit dem Skalpell und einer kleinen Schere abgesetzt.

Weiterhin wurden im Rahmen der Vorversuche (s. auch unten) Zungen-, Darm-, Nieren- und Lebergewebe, teilweise auch Lungen- und Milz- und Hautgewebe explantiert. Bei den Hauptversuchen erfolgten zusätzlich routinemäßig Hirnsektionen. Die sofort entnommenen Präparate wurden in derglei-

chen Perfusionslösung (4 %iges, gepuffertes Formalin) asserviert. Für alle Perfusionsfixierungen konnten die vorgenannten Bedingungen eingehalten werden, um Fixationsartefakte zu vermeiden.

3.1 Behandlungsgruppen

Vorversuche Zur Austestung der AK-Spezifität der verwendeten anti-humanen AK und zur Einschätzung des allgemeinen Reaktionsprofils im Rattengewebe sowie zur Bestimmung der optimalen Verdünnung und Beurteilung der Reaktionsmuster, insbesondere im SD-Gewebe, waren Vorversuche notwendig. Bereits hier sollten auch die Einflussgrößen Alter und Latenz der RT hinsichtlich ihrer Effekte miteinbezogen werden.

Tab. 13: Altersverteilung, Gruppenzugehörigkeit und Nachbeobachtungszeit (n = 59)

	Einteilung	n
Altersgruppen	3 - 6 Monate (Mittelwert: 4 Monate, 10 Tage)	26
	1 - 1½ Jahre (Mittelwert: 1 Jahr, 2 Monate)	24
	2 Jahre	9
Behandlungsgruppen	keine RT	25
	RT, außerhalb des Strahlenfeldes	15
	RT, innerhalb des Strahlenfeldes	19
Latenzgruppen = Zeitraum zwischen RT-Ende und Nachuntersuchung = Nachbeobachtungszeit	weniger als 4 Monate	13
	4 - 6 Monate	13
	mehr als 6 Monate	8

Die Untersuchungen erfolgten bei insgesamt 59 Tieren (ein Tier musste bei der Auswertung wegen fortgeschrittener Autolyse ausgeschlossen werden). Die RT der linksseitigen Kopf-Halsregion folgte dem o. g. humantherapeutischen Protokoll im Sinne einer fraktionierten Bestrahlung (2 Gy/Tag; 5 Tage/Woche) bis zu einer Gesamtdosis von 60 Gy. Die Tiere unterschieden sich hinsichtlich des Alters (3 Monate bis 2 Jahre) und wurden eingeteilt in eine bestrahlte (n = 19) und eine nicht bestrahlte Gruppe (n = 25). Als zusätzliche Kontrolle diente die nicht im Strahlenfeld liegende Gegenseite bestrahlter Tiere (n = 15). Zum entsprechenden Zeitpunkt [weniger als (<) 4 Monate (M), 4 bis 6 M, mehr als (>) 6 M nach Beendigung der RT] wurden die GSM in o. g. Weise entnommen, perfusionsfixiert und in Paraffin eingebettet. Die Verteilung ergibt **Tab. 13**.

Histologie Von allen in Paraffin eingebetteten Drüsenpräparaten der GSM wurden 3-4 µm dünne Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Als im Vergleich mehrerer Produkte günstigste Eindeckelungsmaterialien erwiesen sich Biomedica's Crystal/Mount[®], Forest City, CA, USA und Entellan[®], MERCK, Darmstadt, Deutschland.

Drüsenmorphologie und Klassifikation der Strahlenfolgen Das GSM-Gewebe zeigte einen läppchenartigen Aufbau aus Drüsenazini, Speichelgangsystem und Drüseninterstitium. Die von Seifert (1960) als „mukoid“ (positive PAS-Färbung; schwache Anfärbung durch Astra- und Alcianblau; schwache Metachromasie bei Toluidinblau), im angloamerikanischen Raum mehr als „spezielle seröse Zellen“ („special serous cells“) bezeichneten **Drüsenazini** wiesen basal gelegene große Zellkerne, ein

mehr basophiles Zytoplasma und je nach Funktionszustand unterschiedlich reichliche intrazytoplasmatische Sekretgranula auf. Das **Speichelgangsystem** gliederte sich in die intralobulären Schaltstücke (relativ kurz und schmal, luminal ausgekleidet mit einer einreihigen mehr kubischen Epithelschicht), Streifenstücke (häufig länglich und stärker verästelt verlaufende Gänge, ausgekleidet mit bürstensaumtragenden und basal parallel ausgerichtete Zytoplasmastreifungen aufweisenden Zylinderepithelien) und die zwischen Schaltstücken und Streifenstücken eingeschalteten, in humanen Geweben nicht vorkommenden sekretorischen Tubuli (stärker gewundene, verzweigte, tubuläre Gangsegmente, ausgekleidet mit kubisch bis zylindrischen reichlich Granula-besitzenden, eosinophilen Epithelien) sowie die interlobulären Ausführungsgänge (längeres verzweigtes Gangsystem, je nach Ganggröße ausgekleidet mit mehrreihig bis mehrschichtigen, zylindrisch bis kubischen Gangepithelien). Im Gangsystem fanden sich daneben Basalzellen. An der Außenseite der Azini wie auch des Gangsystems (bevorzugt sichtbar um Schaltstücke und Streifenstücke) waren körbchenartige Myoepithelzellen angeordnet. Im **Drüseninterstitium** zeigten sich neben sehr schmalen intralobulären und etwas breiteren interlobulären Bindegewebsfasern dichte, besonders um die Azini sichtbare Kapillarnetze, die entlang der Gangstrukturen in die größeren Gefäßkaliber übergingen. Außerdem fanden sich reichlich Nervenfasern (Bloom et al. 1976 & 1977) und locker eingestreute lymphoide Zellen. Anhand dieser Histoarchitektur wurden die HE-gefärbten Präparate ausgewertet. Für die Beurteilung der Strahlenreaktion an HE-Präparaten verwendeten wir dabei die Klassifikation nach Seifert (1996) und Dreyer et al. (1989) in leicht modifizierter Form, welche aus **Tab. 14 im Anhang** hervorgeht.

Immunhistologie In formalinfixierten Geweben ist mit geeigneten AK die Identifizierung von zellulären und extrazellulären Antigenen möglich. Für die Untersuchungen der Vorversuchsserien wurden verschiedene AK gegen CK bzw. IF-Proteine und gegen BM- bzw. Bindegewebsproteine sowie weitere Substanzen (Tenascin, Glattmuskelaktin, S-100) ausgewählt. In der **Tab. 15 im Anhang** sind die AK-Spezifikationen aufgeführt.

Diese AK wurden zur Charakterisierung der normalen GSM und der GSM-Reaktionen nach RT benutzt, nachdem zuvor die immunhistologischen Reaktionsbedingungen (s. a. Methoden) getestet worden waren. Trotz der positiven Vortestungen und der Modifikationen hinsichtlich des Detektionssystems (s. a. AK-Spezifität und allgemeines Reaktionsprofil) blieben allerdings die Reaktivitäten einiger AK, insbesondere bezüglich der Proteine Tenascin, Glattmuskelaktin und S-100 im Rattengewebe der GSM zum Teil so inhomogen, inkonstant und wechselweise unspezifisch, dass sie in die Auswertung nicht mit einbezogen werden konnten. Diese AK wurden in der **Tab. 15 im Anhang** grau unterlegt.

Methoden Hierzu wurde in gepuffertem Formalin (4%) fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet. Alle paraffin-eingebetteten Gewebe waren nach Perfusionsfixierung mit Formalin explantiert worden. Die Schnitte wurden auf silanisierte [mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) beschichtete] Objektträgern aufgebracht und nach Angaben der Hersteller inkubiert. Es waren Versuchsreihen nötig, um die Eignung der AK zur Identifizierung der Zielantigene in Rattengeweben zu

sichern und die optimalen Verdünnungen und Inkubationszeiten der AK und günstigsten Detektionssysteme auszutesten.

Nach Überprüfung der Antigen-Detektion durch die AK in verschiedenen Geweben wurden die GSM-Gewebe mit den AK nochmals unter Variation der Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper inkubiert und ausgewertet. Als günstige Detektionssysteme erwiesen sich die Alkalische-anti-Alkalische-Phosphatase-(APAAP)-Technik und zunehmend die zeit- und primärantikörpersparende verfeinerte Dreistufen-Avidin-Biotinkomplex-Methode (ABC) unter Verwendung von LSAB[®]2 („labelled Streptavidin Biotin“) Kits (Alkalische Phosphatase, Code-Nr. K0610 oder K0676, DAKO, Hamburg) mit wenigen Modifikationen (hintergrundreduzierendes AK-Verdünnungsmedium, DAKO, Code Nr. S3022). Als Chromogen diente entweder Neufuchsin 1% (MERCK) oder „Fast Red Substrat“ (DAKO, Code-Nr. K0699 oder Nr. K0597). Dabei reagiert in Ausnutzung der starken Affinität von Avidin zu Biotin ein biotinylierter Sekundär-AK mit mehreren alkalische Phosphatase konjugierten Streptavidin-Molekülen. In **Abb. 7 im Anhang** wird die Reaktionsweise schematisch dargestellt. Um durch das Fixans maskierte Antigene besser für die AK zu exponieren (Kirkpatrick & D'Ardenne 1984, Maiorano et al. 1994, Reibel & Dabelsteen 1986) wurden vor einigen AK-Inkubationen die Präparate mit Protease Typ XXIV (SIGMA, Nr. P-8038) angedaut.

Die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Meyers Hämalaun (MERCK, Nr. OB 043983). Zur Eindeckelung erwies sich Gelatine (Glycergel[™] Eindeckmedium, DAKO, Code-Nr. C0563) als günstig. Als „interne“ positive Kontrollen dienten einerseits die Reaktionen im Bereich der miterfassten Gefäße und andererseits parallel inkubierte Gewebeschnitte, die mit ausreichender Sicherheit das untersuchte Antigen aufwiesen. Hierzu eigneten sich vor allem Zungen-, Dünndarm- und Tracheobronchialgewebe. Dadurch sollten falsch negative Befunde ausgeschlossen werden. Als Negativkontrollen wurden Präparate mitgeführt, die bei Einhaltung identischer FärbeprozEDUREN statt mit Primär-AK alternativ mit Pufferlösung beschichtet wurden. Hierdurch sollten falsch positive Reaktionen ausgeschlossen werden.

Diese Testreihen zur Optimierung der Immunreaktionen konnten freundlicherweise im immunhistochemischen Labor der MKG-Chirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Leiter: Prof. Dr. Dr. R. E. Friedrich) durchgeführt werden.

AK-Spezifität und allgemeines Reaktionsprofil sowie Auswertungskriterien Hierzu wurden parallel zur SD Zungen-, Dünndarm-, Nieren- und Lebergewebe, für besondere Fragestellungen auch Lungen-, Pankreas-, Milz- und Hautgewebe (n = 10) in Serienschnitten aufgearbeitet, immunhistologisch analysiert und ausgewertet. Die Reaktionen werteten wir nach qualitativen (positiv – negativ) sowie nach semiquantitativen Gesichtspunkten anhand von visuellen Skalen aus.

Dabei waren bei den BM- bzw. ECM-Komponenten einschließlich Tenascin die Immunreaktionen **um** bzw. **an** einzelne(n) Zelltypen und im angrenzenden Interstitium zu beurteilen. Bei den CK bzw. IF-Proteinen sowie den weiteren Proteinstrukturen (S-100 / Tenascin / GMA) war auf Reaktionen **in** den Zellen zu achten. Zur Vermeidung von unübersichtlichen Skalensubkomplexen wurden die Kriterien

für die Hauptgruppen angeglichen und es wurde auf gesonderte Skalen für Färbeintensität und Verteilung verzichtet. **Tab. 16** listet die Auswertungskriterien für die verschiedenen Zielstrukturen auf.

Tab. 16: Beurteilungskriterien der immunhistologischen Färbereaktion

Skalen		Bewertung	
		CK bzw. IF-Proteine (inkl. S-100 / Tenascin / GMA)	BM- bzw. ECM-Komponenten (inkl. Tenascin)
1	-	Negativ	negativ
2	(+)	sehr zarte, hauchartige Reaktion in einzelnen oder mehreren Zellen	hauchzarte Reaktion um einzelne oder mehrere Zellen oder im Interstitium
3	+	leichte, geringe Reaktion in mehreren oder vielen Zellen	zarte, dünne, kontinuierliche, leichte Reaktion um mehrere oder viele Zellen oder im Interstitium
4	++	moderate, mittelgradige, schon deutliche Reaktion in vielen Zellen	mäßige bis mittelgradige, deutlich linienförmige Reaktion um viele Zellen oder im Interstitium
5	+++	stark ausgeprägte, deutliche bis sehr deutliche Reaktion bei allen Zellen	starke bis sehr starke, balkenartige oder mehr flächenhafte Reaktion um alle Zellen oder im Interstitium

Die **Tab. 17 im Anhang** zum Reaktionsprofil im Rattengewebe gibt neben den positiven und negativen Reaktionen in den Geweben in Klammern dahinter den entsprechenden Skalenwert an.

Drüsenauswertung In den tabellarischen Darstellungen der semiquantitativen Bewertungen zur Beschreibung der immunhistochemischen Färbereaktionen (besonders für die GSM) wurden überwiegend die numerischen Skalen genutzt. Bei eindeutigen, konstanten Reaktionsmustern ohne wesentliche Inkohärenz wurden dadurch Färbeintensität und Verteilungsmuster in einer Bewertung zusammengefasst. Waren variable Antigennachweise zu beschreiben, wurden die Befunde mit Trennstrichen verbunden und aneinandergereiht. Konnte dabei eine dominierende Reaktion (zu 50 % oder mehr) festgestellt werden, wurde diese mit Fettdruck hervorgehoben. Waren im Einzelfall Besonderheiten zu bemerken, wurden Zusatzzeichen wie Doppelschrägstriche (//) oder Sterne (*) gesetzt und in der Legende erklärt. Die GSM-Reaktionsauswertungen erfolgten durch eine Multivarianzanalyse mittels generalisierter linearer Modelle (siehe auch Abschnitt 3.6: Statistik).

Bei der Beschreibung der qualitativen, pathohistologischen Befunde der GSM anhand der HE-Histologie wurde in der tabellarischen Darstellung (**Tab. 32 im Anhang**) für die entsprechende Tierzahl das Stadium nach der Klassifikation nach Seifert (1996) angegeben, welches die Präparate am besten kennzeichnete.

Hauptversuche Die Untersuchungen umfassten die histologischen und immunhistologischen Auswertungen der GSM und des Laryngo-Trachealbereiches nach RT bezüglich der CK bzw. IF-Proteine und der BM- bzw. BM-assoziierten Komponenten. Zusätzlich wurden im SD-Gewebe (GSM und Glandula sublingualis) der Proliferationsindex bestimmt. Zur Prüfung von Dosiswirkungen in einem humantherapeutisch relevanten RT-Protokoll wurden hierzu Dosisgruppen gebildet. Weiterhin waren zur Beurteilung persistierender Normalgewebsreaktionen nach RT längere Zeit- und Altersfenster mit einzubeziehen. Während der Beobachtungszeit auftretende TM gingen ebenfalls in die Auswertung

mit ein, wobei in den Hypophysenadenomen neben der Histologie und dem Proliferationsstatus der immunhistochemische Nachweis der Hormonbildung im Vordergrund stand. Die allgemeine Strahlenreaktion wurde anhand der Verläufe der Körper- und Drüsegewichte dokumentiert.

Tiergruppen der Hauptversuche Die RT der linksseitigen Kopf-Halsregion erfolgte nach dem o. g. humantherapeutischen RT-Protokoll Sinne einer fraktionierten Bestrahlung (2 Gy/Tag; 5 Tage/Woche) bis zu einer Gesamtdosis von 20 Gy, 40 Gy oder 60 Gy bei insgesamt 60 Tieren. Jeweils 10 Tiere einer RT-Gruppe wurden entweder nach 6 Monaten oder 12 Monaten explantiert und damit auch einer Altersgruppe zugeordnet. Zusätzlich wurden routinemäßig Hirnsektionen durchgeführt. Als Kontrollen dienten primär 5 Tiere, die über den gesamten Untersuchungszeitraum mitgeführt wurden. Aus einem Nebenversuch wurden die Kontrollen um weitere 5 Tiere ergänzt, die unbehandelt nach 6 Monaten untersucht wurden. Die Übersicht veranschaulicht **Tab. 18**.

Tab. 18: Übersicht der einseitig im Kopf-Halsbereich monofraktioniert (2 Gy/d) perkutan bestrahlten Wistar-Ratten (n = 60) sowie Kontrollen

Radiatiogruppen	20 Gy	40 Gy	60 Gy	Keine RT
Latenz- und Altersgruppen				
Explantation nach 6 Monaten	10	10	10	5
Alter: 1 Jahr				
Explantation nach 12 Monaten	10	10	10	5
Alter: 1 ½ Jahre				

Histologie und Immunhistologie Einbettung und Färbung entsprachen im Prinzip dem Vorgehen wie bei den Vorversuchen. Auf Besonderheiten wird im Abschnitt Organe und Gewebe eingegangen. Die aus den Vorversuchstestungen als geeignet eingestuften AK wurden verwendet. Zusätzlich konnten geeignete AK bzw. geeignete Techniken für die Zielantigene CK 5/6, CK 18 und Vimentin und Kollagen I hinzugefügt werden. Bei den dazu notwendigen Parallelinkubationen fielen für den AK E3 mehr „duktale Muster“ (Moll 1993) auf, die für das Zielantigen CK 19 im Rattengewebe sprachen (Prof. Holzhausen: persönliche Mitteilung). Um das „Abschwimmen“ der Schnittpräparate weitgehend zu minimieren, wurden entweder handelsübliche Mattrandobjektträger mit Poly-L-Lysine beschichtet bzw. wie bei den Vorversuchen silanisiert (mit APES beschichtet) oder vorgefertigte Adhäsions-Objektträger (Histobond[®], MARIENFELD, Deutschland) verwendet. Zum Nachweis der Immunreaktion diente die o. g. Dreistufen-Avidin-Biotin-Komplex-(ABC-) Methode. Neben der Verwendung des leicht modifizierten LSAB[®]2 Kits (Alkalische Phosphatase, Chromogen: Neufuchsin oder „Fast Red Substrat“) erwies sich ebenso das „Vectastain[®] Elite[®] ABC Kit“ (VECTOR, Burlingame, CA, USA, No. 6100) mit Peroxidase-Konjugaten als günstig. Hier verbindet sich Avidin DH mit biotinylierten Meerrettich-Peroxidase H-Reagentien zu einem Komplex. Diese dreidimensionale Komplexanordnung interagiert mit den biotinylierten Sekundär-AK (Brücken-AK), die zu den jeweiligen Primär-AK passend ausgesucht wurden. Als Chromogen wurde hier DAB (3,3'-Diaminobenzidin; SIGMA, Nr. 99H1154) eingesetzt. Weiterhin wurden zur Antigendemaskierung die Vorbehandlungen mit Protease

(P) um die Mikrowellenbehandlung (MW), die Andauung mit Trypsin [(T), SIGMA, No. T-7409] und die Verwendung kommerziell erhältlicher Lösungen [„Target Retrieval Solution“ (TRS), DAKO, Code-Nr. S1700] ergänzt. **Tab. 19 im Anhang** listet die Arbeitsschritte im einzelnen auf. In **Tab. 20 im Anhang** wurden die verwendeten AK mit den entsprechenden Verdünnungen und gewebespezifischen zur Immunhistologie notwendigen Vorbehandlungen zusammengefasst dargestellt. Auf zusätzliche Besonderheiten wird im Abschnitt Organe und Gewebe eingegangen.

Auswertung In den tabellarischen Darstellungen der semiquantitativen Bewertungen (semiquantitative Tabellen) zur Beschreibung der Färbereaktionen wurden die gleichen Skalen, die bei den Vorversuchen beschrieben wurden, genutzt. Bei eindeutigen, konstanten Reaktionsmustern ohne wesentliche Inkohärenz wurden dadurch Färbeintensität und Verteilungsmuster in einer Bewertung zusammengefasst. Waren innerhalb der intraindividuellen Serienschnitte und / oder interindividuell variable Antigennachweise zu beschreiben, wurde zunächst intraindividuell bei Normalverteilung ein Mittelwert notiert und bei asymmetrischer Verteilung der dominierende Befund gewählt. Im anschließenden interindividuellen Vergleich wurde analog verfahren, wobei jedoch die Häufigkeitsverteilung stärker zu berücksichtigen war. Diese Reaktionsmuster erhielten in den zusammenfassenden Tabellen Zusatzzeichen. Bei etwa gleicher Häufigkeit wurden Trennzeichen („-“) verwendet, bei geringerer Häufigkeit (in der Regel weniger als 40 % der Präparate) wurde zusätzlich um die weniger häufigen Reaktionen eine einfache Klammer („()“), bei noch geringerer Häufigkeit (in der Regel weniger als 20 % der Präparate) eine doppelte Klammer („(()“)“ gesetzt. Hierbei drückte der geklammerte kleinere Wert aus, dass dieser und ggf. darunterliegende Werte, und der geklammerte größere Wert aus, dass dieser und ggf. darüberliegende Werte weniger häufig vertreten waren. Umgekehrt bedeutete eine fehlende Klammer um den geringeren Skalenwert, dass dieser in Kombination mit ggf. darunterliegenden Werten, und um den höheren Wert, dass dieser in Kombination mit ggf. darüberliegenden Werten bei der Auswertung insgesamt vorherrschend war. Diese Beurteilung beschrieb bei Inkohärenzen das zu 50 % und mehr (meist zu 60 % oder mehr) beobachtete Reaktionsmuster.

Tab. 21: Beurteilungskriterien der histologischen Befunde

Markierung	Bewertung
-	negativ bzw. nicht vorhandener Befund
((+))	sporadischer Befund
(+)	sehr geringer Befund bei einzelnen oder mehreren Präparaten
+	geringer Befund bei mehreren oder vielen Präparaten
++	deutlicher, mittelgradiger Befund bei vielen Präparaten
+++	stark ausgeprägter Befund bei allen Präparaten
__(unterstrichen)	dominierender Befund innerhalb der Dosisgruppen
*	einzelne Präparate oder Präparatabschnitte mit z. T. stark ausgeprägtem Befund

Bei der Beschreibung qualitativer, pathohistologischer Befunde (qualitative Befundtabellen) anhand der HE-Histologie wurden in den tabellarischen Darstellungen überwiegend die Kreuzmarkierungen

(+) oder Stadienangaben (für die GSM, **Tab. 14**) bevorzugt (**Tab. 21**). Zusätzliche Klammern bezogen sich auf die Ausprägung und Häufigkeit der Befunde. Übergangsbefunde oder etwa gleichhäufige Befunde wurden durch Trennstriche gekennzeichnet. Waren vorherrschende Ausprägungen oder Häufigkeiten zu beschreiben, erfolgte eine Auflistung mit schrägen (/) Trennstrichen, wobei der dominierende Befund unterstrichen wurde. Besonderheiten im Einzelfall wurden auch hier mit Sonderzeichen (z. B. *) versehen und in der Legende erklärt.

Makroskopischer Gesamtaspekt und Körpergewicht

Die Tiere wurden in der gesamten Untersuchungszeit nachkontrolliert. Insbesondere während der RT-Serien erfolgten tägliche Inspektionen hinsichtlich des Trink-, Fress- und Bewegungsverhaltens und der Kreislauf- und Atmungssituation. Äußerlich wurde auf Integumentauffälligkeiten (z. B. Fellverluste, Bisswunden, Nekrosen, Tumore) sowie innerlich vor allem auf Mundhöhlenveränderungen (z. B. Zahnschäden, Bissanomalien, Infektionen, Tumore) geachtet. Das Körpergewicht (KG) der Tiere wurde einerseits als Ausgangs- und End-KG (vor Explantation), andererseits als Gewichtsverlauf mit täglichem Wiegen während der jeweiligen RT-Serie notiert. Teilweise wurden Zwischengewichte [Zeitintervall zum Ausgangs-KG: 2 Wochen (W), 4 W, 6 W, 10 W, 12 W, 16 W, 6 Monate (M), 7 M, 9M, 10 M, 11 M] dokumentiert.

3.2 Organe und Gewebe

Speicheldrüsen

Von den 60 bestrahlten Tieren wurden die Drüsenpakete von 8 Tieren für elektronenmikroskopische Untersuchungen asserviert. Ein Tier konnte wegen fortgeschrittener Autolyse nicht ausgewertet werden. In **Tab. 22** werden die Tier- und Behandlungsgruppen veranschaulicht.

Tab. 22: Darstellung der verschiedenen Tier- und Behandlungsgruppen unter Berücksichtigung der Lokalisation im Strahlenfeld (n = 61)

Gruppen	Lokalisation	Linksseitige GSM (innerhalb des RT-Feldes)	Rechtsseitige GSM (außerhalb des RT-Feldes)	n
Alter	1 Jahr	28	28	28
	1 ½ Jahre	33	33	33
Bestrahlung (Unterteilung nach Gesamtdosis)	Nein	10	10	10
	20 Gray	15	15	15
	40 Gray	18	18	18
	60 Gray	18	18	18
Latenz der RT (Zeitraum zwischen RT-Ende und Explantation)	6 Monate	23	23	23
	12 Monate	28	28	28

Untersuchungen

Die Drüsengewichte wurden unmittelbar nach der Explantation seitengetrent notiert und ausgewertet. Die histologische Befundung der HE-Präparate folgte der Klassifikation nach Seifert (1996, **Tab. 14 im Anhang**). Immunhistologisch wurden die Marker CK 5/6, CK 13, CK 17/19, CK 13/15/16, CK 18, Vimentin, Laminin, Fibronectin und Kollagentypen I, III und IV untersucht. Zusätzlich erfolgte die Anwendung des Proliferationsmarkers MIB-5 mit einem monoklonalen AK, welcher in dieser Spezies das nukleäre, zellproliferationsassoziierte Antigen Ki-67 nachweist.

Tab. 23 listet die Tiergruppen auf, die als Interaktionsvariablen aus der Kombination von Strahlendosis und Latenz der RT gebildet wurden.

Tab. 23: Darstellung der Anzahl der Tiere in den verschiedenen Tiergruppen in Bezug zur Lokalisation und zur Drüsenart bei der MIB-5-Auswertung.

Lokalisation / Drüsenart Tiergruppen (n = Tiere)	GSM links (n = ausgewertete SD)	GSM rechts (n = ausgewertete SD)	GSL links (n = ausgewertete SD)	GSL rechts (n = ausgewertete SD)
Kontrollen (10)	5	5	5	5
20 Gy/6-M-Latenz (6)	6	6	5	5
40 Gy/6-M-Latenz (9)	6	6	6	6
60 Gy/6-M-Latenz (8)	8	8	7	7
20 Gy/12-M-Latenz (9)	9	9	4	4
40 Gy/12-M-Latenz (9)	10*	10*	7	7
60 Gy/12-M-Latenz (10)	10	10	10	10
Gesamt (61)	54	54	44	44

* = zusätzliche kleinere akzessorische Drüsenanlage bei einem Tier

Es wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert (Eissa & Shoman 1995, Ito et al. 1998, Melin 1990) und wurde speziell für paraffineingebettetes Rattengewebe entwickelt (Produktinformation der Fa. DIANOVA, Hamburg, Deutschland). MIB-5 zeigt auf proliferierenden Zellen eine starke Kernfärbung. Dies konnte für die GSM (n = 54) und teilweise die Gl. sublingualis [(GSL), n = 44] ausgeführt werden. Die immunhistologische Prozedur wurde **im Anhang** detailliert beschrieben. Zur Auswertung wurden 1000 Zellen mäanderförmig lichtmikroskopisch mit 40-facher Objektivvergrößerung ausgezählt. Die Anzahl der positiven Zellen wurde als Proliferationsindex in Prozent (%) angegeben.

Larynx und Trachea Bei den 61 Tieren (bestrahlte Tiere, n = 51; Kontrollen, n = 10) ergaben sich aufgrund der Vorauswertungen nur geringe bis keine Effekte hinsichtlich der Latenz der RT oder des Alters. Es erschien daher zur Beurteilung von möglichen persistierenden Langzeitfolgen zweckmäßig, sich bei der Feinauswertung auf die am längsten nachbeobachteten Tiere zu konzentrieren. Daher beziehen sich die Befunde vornehmlich auf die Tiere (n = 33), die in Abhängigkeit von der Strahlendosis bei einem mittleren Alter von 1 ½ Jahren und einer mittleren Latenzphase von 12 Monaten ausgewertet wurden (**Tab. 24**).

Tab. 24: Tieranzahl (n = 33; Alter: 1 ½ Jahre, Latenzphase: 12 Monate) in Bezug zur Strahlendosis (Feinauswertung)

Behandlungsgruppen	Kontrollen	20 Gray	40 Gray	60 Gray
Anzahl				
N	5	9	9	10

Untersuchungen Um die Präparate schnitttechnisch verarbeiten zu können, war zuvor eine Entkalkung erforderlich. Dazu wurden die entnommenen Laryngotrachealpräparate en bloc in mit neutralem EDTA (Äthylendinitrilotetraacetat) gefüllte Plastepreparatekontainer eingelegt und teilweise gerüttelt. Als Rüttler stand zunächst ein Eigenfabrikat, späterhin ein IKA-VIBRAX-VXR-Rüttler (Typ

VX8, JANKE & KUNKEL, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) zur Verfügung. Die Dauer der Entkalkungsphase variierte und lag zwischen 2 Tagen und maximal 6 Wochen, wobei zwischenzeitlich die Gewebebeschaffenheit bezüglich der Schnittfestigkeit bzw. -weichheit engmaschig mittels vorsichtiger Pinzettenpalpation überprüft wurde. In der Regel konnten die Präparate nach etwa 10 bis 16 Tagen gut geschnitten werden.

Als Schnittebenen wurden einerseits die quere Ebene im Bereich der Trachea und andererseits die vertikale (koronare) Ebene im Bereich des Larynx gewählt. Hierzu wurde die Trachea (unter Belassung von 1 bis 2 Trachealspangen am Larynxpräparat) abgetrennt und das nun entstandene Larynxpräparat in etwa der Mittellinie von kranial nach kaudal durchtrennt. Alle 3 Präparate wurden in toto in Paraffin eingebettet und in Schnittserien von etwa 4-5 µm Schnittdicke (beim Larynx von der medialen Schnittkante aus) aufgearbeitet. Die Wahl der Schnittebenen ging auf die Angaben von Schlage et al. (1998), Lewis & Prentice (1980) und Brandenburg et al. (1986) zurück. Sie wurden jedoch für die eigenen Untersuchungen etwas modifiziert, um mittels der vertikalen Larynxschnitte einen Überblick über die 3 (anatomischen) horizontalen Larynxebenen zu gewinnen.

Während für die klinische Dokumentation von radiogenen Späteffekten am Larynxnormalgewebe zunehmend die LENT (Late Effects Normal Tissue) / SOMA (subjektive, objektive Kriterien, Management, Analyseverfahren)-Klassifikation mit 4 Schweregraden und den Einzelkriterien Schmerzen, Stimmfunktion, Atmung, Ödem, Schleimhautintegrität (inkl. Atrophie, Teleangiektasie, Ulkus, Chondritis, Nekrose) sowie den entsprechenden Analyseverfahren (Laryngoskopie, CT, MRT) empfohlen und etabliert wurde (Dörr et al. 2000, Pavy et al. 1995, Rubin et al. 1995, Seegenschmiedt 1998), sind Klassifikationen auf histologischer Basis bisher nicht systematisiert. Die histomorphologische Auswertung der HE-Präparate konzentrierte sich daher auf die qualitative Befundbeschreibung und die Häufigkeit der pathohistologischen Befunde. Als Orientierung dienten hierzu die literaturgemäßen Angaben strahleninduzierter Auffälligkeiten, die allerdings überwiegend für humane Laryngo-trachealgewebe beschrieben wurden (u. a. Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Dietz et al. 1998, Fajardo 1982). Geachtet wurde insbesondere auf Epithelveränderungen, Alterationen des Stütz-, Binde- und Muskelgewebes sowie auf Gefäß- und Nervenveränderungen und zelluläre Infiltrate im Bereich des Kehlkopfes, der Trachea, des Ösophagus, der Schilddrüse und mitangeschnittener Pharynxanteile. Immunhistologisch wurden die Marker CK 13, CK 17/19, CK 13/15/16, CK 18, Vimentin, Laminin, Fibronectin, Kollagen III und Kollagen IV untersucht. Die Auswertung erfolgte für jeden einzelnen Marker differenziert nach der Lokalisation im Gewebe gemäß **Tab. 16**.

Extrakranielle Tumoren Die im Rahmen der Bestrahlungsexperimente beobachteten TM (n = 23) wurden hinsichtlich der Ursprungsgewebe entweder einer Lokalisation innerhalb des Strahlenfeldes (ISF) oder außerhalb der linksseitigen Kopf-Hals-Region (ASF) zugeordnet. **Tab. 25 im Anhang** listet die TM bezüglich RT, Latenz der RT, Tialter und Lokalisation auf, die bei der Auswertung berücksichtigt wurden. Die TM wurden analog zu humanen TM anhand der HE-Präparate klassifiziert. Zur näheren Charakterisierung wurden immunhistologisch die Marker CK 5/6, CK 7, CK8/18, CK

17/19, CK 13/15/16, die Kollagentypen III und IV sowie teilweise die Vimentinexpression und der Proliferationsmarker Ki-67 (AK: MIB-5) untersucht. Die Befunde wurden vornehmlich deskriptiv ausgewertet und bei den einzelnen Tumorentitäten für den jeweiligen Marker beschrieben.

Intrakranielle Tumoren (Hypophysenadenome) Die bei den Hirnsektionen entdeckten Hypophysentumoren (HP-TM) wurden anhand von paraffineingebetteten, 3-4µm dünnen, HE- und PAS (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)-gefärbten Schnitten lichtmikroskopisch beurteilt. Die Hormonbildung sowie die Expression ausgewählter Marker wurde immunhistochemisch (nach o. g. ABC-Methode) bestimmt und in **Tab. 26 im Anhang** spezifiziert, wobei neben der Inkubation mit anti-humanen Seren auch Inkubationen mit rattenspezifischen Seren durchgeführt wurden. Die Untersuchung der Proliferationsrate erfolgte mit dem MIB-1-AK (Ziel-Antigen: Ki-67). Die jeweilige Hormonbildung und Markerexpression wurden für jeden Tumor einzeln ausgewertet und bezüglich der Ergebnisse deskriptiv dargestellt.

3.3 Kontrollen

Als Kontrollen dienten Gewebe- und Organpräparate von Ratten der gleichen Gewichts- und Altersklasse, die über die entsprechenden Untersuchungszeiträume mitgeführt wurden. Diese Kontrollen standen sowohl für die Vor- (n = 25) als auch für die Hauptversuche (n = 10) zur Verfügung und erhielten weder Bestrahlungen noch sonstige (vor allem mikrovaskuläre) Interventionen. Zusätzlich wurde bei jedem Tier das rechte SD-Paket explantiert und nach identischen Fixierungsmethoden aufbereitet und untersucht, um intraindividuelle Unterschiede der Drüsenstruktur zu erfassen („interne Kontrolle“). Die Kontrolle der verblindeten Auswertungen erfolgte durch zwei erfahrene Pathologen, die nach anfänglich strenger Supervision regelmäßig rekonsultiert wurden. Bei Uneindeutigkeiten bzw. Zweifelsfällen wurden die Präparate gemeinsam reevaluiert und ein Konsens erzielt. Die Auswertung der TM und insbesondere der Hypophysenadenome erfolgte analog in enger Kooperation mit zwei weiteren Pathologen, die aufgrund ihrer umfangreichen Erfahrungen besonders ausgewiesen waren.

3.4 Statistische Auswertung

Initial wurden die Tiere nach gemeinsamen Merkmalen hinsichtlich Alter, RT, Strahlendosis, Latenz der RT und Kontrollen charakterisiert und entsprechenden Gruppen zugeordnet. Um die Expression und das Verteilungsmuster der verschiedenen Marker an einzelnen Lokalisationen (Gewebestrukturen) in Abhängigkeit vom Alter, der RT, der Strahlendosis und der Latenz der RT untersuchen zu können, erfolgte eine multifaktorielle, multivariate Auswertung mittels generalisierter linearer Modelle (GLM). Diesen Mittelwertvergleichen lag zugrunde, dass bei den semiquantitativ bewerteten Expressionen ein metrisches Merkmal im Hintergrund anzunehmen war und dass ausreichend variable Befunde vorlagen. Bei den multiplen Tests wurde dabei die Adjustierung nach Bonferroni vorgenommen. In Fällen zu geringer Variabilität wurden univariate bzw. einfaktorielle Testverfahren eingesetzt. Hierzu war für

jede einzelne Lokalisation zu prüfen, ob in Abhängigkeit von der Strahlendosis, der Latenz der RT oder dem Alter Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen und im Vergleich zu Kontrollen auftreten.

Für die deskriptive Statistik wurde dabei die Häufigkeitsauszählung in Frequenzdiagrammen vorgenommen. Die Beziehung der Parameter zueinander wurde als tabellarische Beschreibung der gemeinsamen Häufigkeitsverteilung in Form von bivariaten Kontingenz-Tabellen (Kreuztabellen) dargestellt. Um bei möglichen Unterschieden (in Gruppen) zu beurteilen, inwieweit die Beziehung zweier Merkmale von der statistischen Unabhängigkeit abweicht, wurden die Kontingenz-Tabellen mit dem χ^2 -Test (Chi-Quadrat-Test) statistisch untersucht. Der Chi-Quadrat-Test überprüft damit die Unabhängigkeit zweier Variablen der Kreuztabellen und damit indirekt den statistischen Zusammenhang der beiden Merkmale. Ist die zu erwartende Häufigkeit der Kreuztabelle sehr klein, wurde zusätzlich der exakte Test nach Fisher ausgeführt. Weiterhin wurden mögliche Gruppenunterschiede und mögliche Differenzen in der zentralen Tendenz mit Hilfe des Mediantestes untersucht.

Als Signifikanzniveau wurde 5% festgelegt. Die im einzelnen errechneten p-Werte sind im Ergebnisabschnitt bei den entsprechenden Lokalisationen aufgeführt. Mit „n. s.“ (nicht signifikant) wurde ein p-Wert $\geq 0,05$ beschrieben.

Da mit Hilfe von Korrelationsuntersuchungen der Zusammenhang verschiedener Merkmale zueinander diskutiert werden kann, wurden zur Frage, welche Stärke bzw. Schwäche die ermittelten statistischen Zusammenhänge aufweisen, Korrelationstabellen erstellt. Hier wurde zumeist die Berechnung des Rang-Korrelationskoeffizient nach SPEARMAN (r_s) benutzt (SACHS 1992). Ein Korrelationskoeffizient kann dabei zwischen -1 und 1 liegen. Der Korrelationskoeffizient von 1 zeigt einen absoluten positiven Zusammenhang zweier Merkmale an. Negative Werte korrelieren gegenläufig, positive Werte gleichsinnig. Der statistische Zusammenhang ist umso stärker, je mehr der Korrelationskoeffizient von Null verschieden ist.

Zur Erfassung der Ergebnisse und Auswertung der Daten wurde das statistische Analyseprogramm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) genutzt. Die Datenauswertung erfolgte mit wesentlicher Unterstützung von Frau Dr. Lautenschläger aus dem Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Medizinische Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

4 Ergebnisse

4.1. Speicheldrüsen (Vorversuche)

Histomorphologie Gemäß der Seifert-Klassifikation (**Tab. 14**) befanden sich die bestrahlten GSM (im Strahlenfeld, $n = 19$, klassifiziert wurden 18 Tiere) überwiegend im Stadium 2 (11/18), nur ausnahmsweise im Terminalstadium (1/18). Ebenso konnten wir Übergangsstadien beobachten (Stadium 1-2: 1/18; Stadium 2-3 2/18). Ein spätes Stadium 1 fand sich bei 3 von 18 Tieren. Bei den Drüsen außerhalb des Strahlenfeldes bestrahlter Tiere ($n = 15$, klassifiziert wurden 14 Tiere) ergab sich bei 2

von 14 Tieren ein Stadium 1-2, kein Tier zeigte ein Terminalstadium. Das späte Stadium 1 fand sich bei 5 von 14 Drüsen, Normalbefunde waren bei 7 von 14 Tieren zu erheben.

In der nicht bestrahlten Gruppe (n = 25) konnten wir überwiegend Normalbefunde beobachten. Ein Tier zeigte eine fokale Fibrose, ein anderes eine mehr diffuse, moderate Bindegewebsvermehrung.

Immunhistologie (CK) Die Immunreaktivität der antihumanen CK-AK im Rattengewebe differierte z.T. von der bekannten Reaktivität im menschlichen Gewebe. Bei der Verwendung der LSAB[®]2-Kit Methode konnten wir keine bzw. untypische, unspezifische oder sehr heterogene Färbereaktionen im Rattengewebe für folgende AK beobachten: CY90, D5 16B4, 215 B8, K8.60, 35 β H11, RCK 108, V9 und Vim-13.2. Hingegen waren E3, Ks 13.1, NCL5D3 und K8.12 immunreaktiv und zeigten ein deutliches Färbemuster in verschiedenen Abschnitten des Drüsenparenchyms, u. z. im Bereich der Schaltstücke (SCH), der Streifenstücke (STR), der Gangepithelien (GE), der sekretorischen Tubuli (ST) und bei den Myoepithelien (MYO). Azinuszellen (AZ) waren bei den verwendeten AK nicht reaktiv. Es fanden sich folgende AK-abhängige Färbereaktionen (**Tab. 27 der Anlage**):

E3 (**CK17/19**) markierte bei nicht bestrahlten Tieren öfter mäßig bis z. T. stark die SCH, STR und GE mit luminaler Betonung, häufiger zart bis leicht die ST (**Abb. 8a der Anlage**). Das Alter der Tiere hatte nur geringen Einfluss auf das Färbeverhalten. Lediglich im Bereich der ST und STR korrelierte das Färbemuster gering mit dem Alter der Tiere [$p = 0.03$ und $p = 0.04$, jüngere (3 bis 6 M) vs. ältere (2 Jahre) Tiere], wobei die älteren Tiere etwas stärker reagierten. Beim Gruppenvergleich zeigte sich tendenziell eine stärkere Färbereaktion bei bestrahlten Drüsen. Jedoch war eine signifikante Zunahme auf die SCH im Vergleich von im Strahlenfeld liegenden und außerhalb des Strahlenfeldes liegenden Drüsen (rechts-links-Vergleich, $p = 0.03$) beschränkt. Ebenso zeigte sich bei den SCH im Vergleich von nicht bestrahlten und außerhalb des Strahlenfeldes liegenden Drüsen ($p = 0.03$) eine Färbereaktionsbetonung bei letzterer Gruppe. Die Latenz der Radiatio (LR) hingegen ergab deutliche Unterschiede der Färbereaktion bei den SCH, den STR und den GE [$p = 0.01$, $p = 0.01$ und $p = 0.008$, LR (< 4 Monate) vs. LR (> 4 - 6 Monate)], was in einer stärkeren Färbereaktion bei bestrahlten Drüsen, die 4 bis 6 Monate nach abgeschlossener RT untersucht wurden, zum Ausdruck kam (**Abb. 8b der Anlage**). Später nahm die Färbeintensität wieder ab [$p = 0.01$, LR (< 6 M) vs. LR (> 6 M)].

Die **CK 13** (AK: Ks13.1)-Darstellung variierte von einer hauchzarten bis zu einer öfter leichten/moderaten Immunreaktivität i. B. der SCH/STR und zeigte eine leichte Positivität an den GE bei nicht bestrahlten Tieren. Zusätzlich markierte dieser AK z. T. zart bis leicht die ST. Weniger im Alters-, vielmehr im Gruppenvergleich ergaben sich zwar tendenzielle, jedoch keine signifikanten Unterschiede außer einer stärkeren Färbereaktion der GE bei bestrahlten Drüsen ($p = 0.01$, bestrahlte vs. nicht bestrahlte Drüsen). Die Latenzphase hingegen nach abgeschlossener RT war ein die Immunreaktivität wesentlich beeinflussender Faktor [GE / SCH / STR: $p = 0.004 / 0.01 / 0.01$, LR (< 4 M) vs. LR (> 4 - 6 M)], und zwar mit einer stärkeren Reaktion bei 4-6 Monaten nach abgeschlossener RT untersuchten Drüsen. Später als 6 Monate nahm die Reaktionsstärke wieder ab [$p = 0.004$, LR (< 6 M) vs. LR (> 6 M)].

Die SCH, STR und GE nicht bestrahlter Tiere wurden nach Inkubation mit dem NCL5D3-AK (**CK 8**) leicht bis mäßig gefärbt. Inkonstant waren jedoch bei einigen Schnitten deutlich stärkere Anfärbungen der o.g. Drüsenepithelien zu verzeichnen, trotz identischer Schnittdicke und identischer Färbetechnik. Die ST waren überwiegend nicht oder nur fokal sehr zart bis leicht immunreaktiv für NCL5D3. Immunreaktionsunterschiede in Abhängigkeit von einer Strahlenbehandlung waren zwar tendenziell durchaus deutlich, jedoch insgesamt statistisch nicht signifikant. Die LR hingegen stellte sich als ein die Immunreaktivität merklich beeinflussender Faktor bei bestrahlten Drüsen dar, insbesondere bei den ST ($p = 0.002$) und GE ($p = 0.008$), mäßiger deutlich bei den STR [$p = 0.04$, LR (< 4 M) vs. LR ($> 4 - 6$ M)]. Die Intensität der Färbereaktion korrelierte positiv mit der Dauer der Latenzperiode bis zu 6 Monaten. Später als 6 Monate nach abgeschlossener RT zeigte sich auch hier eine Abnahme der Reaktivität [$p = 0.02$, LR (< 6 M) vs. LR (> 6 M)], vor allem bei den GE und STR. Lediglich bei den ST nahm die Färbeintensität auch später als 6 Monate noch zu [$p = 0.002$, LR (< 6 M) vs. LR (> 6 M)]. Das Alter der Tiere beeinflusste mäßig die Reaktion der ST im Sinne einer Zunahme bei älteren Tieren [$p = 0.02$, Alter (3 bis 6 M) vs. Alter (2 Jahre)].

Die K8.12 (**CK13/15/16**)-Immunreaktion bei nicht bestrahlten Drüsen war beschränkt auf Myoepithelzellen und die Basalzellen (BZ) im Bereich der GE. Unter einer RT waren keine weiteren dukta- len Drüsenstrukturen darstellbar. Bei einigen bestrahlten Drüsen mit einer etwas ausgeprägteren Strahlenreaktion war ein Verlust der Immunreaktion der BZ der GE bemerkenswert. Hingegen nahm die Immunreaktivität der Myoepithelzellen bei bestrahlten Tieren zu, sowohl bei den direkt exponierten Drüsen ($p = 0.0001$, nicht bestrahlte vs. bestrahlte Drüsen) als auch auf der kontralateralen, strahlengeschützten Seite ($p = 0.01$, nicht bestrahlte vs. außerhalb des Feldes liegende Drüsen). Insbesondere bei den direkt bestrahlten Drüsen kamen zum Teil vergrößerte, hypertrophe Myoepithelien zur Darstellung. Das Alter der Tiere und die unterschiedlichen Latenzperioden nach abgeschlossener RT blieben ohne wesentlichen Einfluss bei der Beobachtung der Immunreaktion von K8.12.

Extrazelluläre Matrixproteine Die Immunreaktivität der AK im Rattengewebe unterschied sich nicht wesentlich vom Reaktionsprofil bei Humangewebe (Nerlich 1995). Die AK identifizierten verschiedene Strukturen der ECM: Komponenten der BM (Laminin, CIV) und Bestandteile von BM-assozierten Strukturen (Fibronectin, CIII). Der immunhistochemische Nachweis gelang im Drüsen- gewebe um die AZ, um die SCH, um die STR, um die ST und um die GE, im Nervengewebe (vorwie- gend Schwann-Zellen), in den Blutgefäßen [subendothelial (SEN), Tunica media (TME), Adventitia (AD)], in der bindegewebigen Kapsel (KA) sowie im Bereich von Bindegewebssepten (SE; inter- und intralobuläres bindegewebiges Stroma). Die verschiedenen EMP zeigten ein unterschiedliches Färbe- reaktions- und Verteilungsmuster (**Tab. 28 der Anlage**).

Laminin als BM-Komponente war bei nicht bestrahlten Tieren um die AZ, SCH, ST, STR und um die GE sehr zart bis leicht, überwiegend gleichmäßig nachweisbar. KA-, SE und die AD waren nicht reakti- v. Das Nervengewebe wurde häufiger deutlich positiv durch Anti-Laminin gefärbt. Im Gruppenver- gleich zeigten bis auf die nach wie vor negative AD, KA und SE alle untersuchten Drüsen- und Gefäß-

strukturen der bestrahlten GSM, einschließlich des Nervengewebes, deutlich stärkere Färbereaktionen ($p = 0.0001$, bestrahlte vs. nicht bestrahlte GSM). Beim Laminin spielte im Gegensatz zu den anderen untersuchten EMP die Latenz der RT (LR) eine Rolle, und zwar beim Nachweis i. B. der AZ, der GE, des Nervengewebes, der SCH und der STR. Mit zunehmender Latenz bis zum 6. Monat nach Ende der RT kam es zunächst zu einem verstärkten Nachweis ($p = 0.001$, $LR < 4$ M vs. $LR \geq 4-6$ M); später als 6 Monate nach Beendigung der RT nahm die Reaktionsstärke wieder ab ($p = 0.001$, $LR < 6$ Monate vs. $LR > 6$ Monate), ohne jedoch der Expression in einer nicht bestrahlten Drüse zu ähneln.

Fibronektin konnte als BM-assoziierte Struktur bei nicht bestrahlten Tieren sehr zart bis leicht um die AZ, die SCH, die ST, die STR, deutlicher ausgeprägt um die GE nachgewiesen werden. KA-Gewebe wurde überwiegend leicht gefärbt, SE waren häufiger sehr zart bis leicht positiv markiert. Die Gefäßwände zeigten subendothelial und in der TME bevorzugt eine sehr zarte Reaktion. Die AD war häufiger kontinuierlich leicht positiv. MYO und Nervengewebsstrukturen waren nicht reaktiv bzw. konnten nicht sicher von der umgebenden Stromareaktion abgegrenzt werden. Der Altersvergleich und die vergleichende Analyse der LR erbrachten keine statistisch signifikant unterschiedlichen Färbereaktionen. Hingegen zeigten sich zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten GSM deutliche Unterschiede (Zunahme der Färbeintensität und -ausdehnung bei bestrahlten GSM) im Drüsengewebe, insbesondere um die AZ, SCH, ST, STR und GE ($p = 0.001/0.0001/0.003/0.001/0.001$, bestrahlte vs. nicht bestrahlte GSM), ebenso im Bereich der Gefäße (SEN/TME: $p = 0.001/0.007$, bestrahlte vs. nicht bestrahlte GSM). Auch waren KA und SE deutlich unterschiedlich reaktiv im Sinne einer Expressionssteigerung bei bestrahlten GSM ($p = 0.001/0.0001$, bestrahlte vs. nicht bestrahlte GSM). Lediglich im Bereich der AD ergab sich eine zwar tendenziell deutliche, aber statistisch nicht signifikant stärkere Anfärbung bei direkt strahlenexponierten GSM ($p = 0.05$, bestrahlte vs. nicht bestrahlte GSM).

Kollagen III (CIII) ließ sich im Drüsengewebe nicht bestrahlter Tiere sehr zart bis leicht positiv um die AZ, SCH, STR, ST, insbesondere um die GE, aber auch im Bereich der Gefäße (hier besonders subendothelial und in der TME, weniger in der AD), mäßig deutlich am Nervengewebe und zart an KA- und SE nachweisen. CIII war an MYO nicht bzw. nur unsicher darstellbar. Im Gruppenvergleich ergab sich bei CIII an den verschiedenen Strukturen des Drüsengewebes, aber auch im Bereich der Gefäße (TME, AD) ein signifikant deutlich verstärkter Nachweis bei bestrahlten GSM ($p = 0.0001$, bestrahlte vs. nicht bestrahlte GSM); das Nervengewebe und der subendotheliale Gefäßabschnitt hingegen zeigten zwar tendenzielle, aber keine statistisch signifikanten Expressionssteigerungen. Die LR blieb ohne signifikanten Effekt auf die Expression. Im Altersvergleich ergab sich nur bei den STR ein signifikant verstärkter Nachweis im höheren Lebensalter der Tiere.

Die BM-Komponente **Kollagen IV (CIV)** war im Drüsengewebe nicht bestrahlter Tiere (**Abb. 9a der Anlage**) sehr zart bis leicht positiv im Bereich der AZ, der SCH, der ST, der STR und der GE nachzuweisen, überwiegend leichtgradig im Nervengewebe. Ebenso gelang der Nachweis kontinuierlich im SEN- und TME-Abschnitt der Gefäße, jedoch nicht im Bereich der AD. Die KA, die SE bzw. die MYO zeigten keine bzw. eine unsichere Reaktivität. Das Alter spielte eine untergeordnete Rolle bei

der Interpretation der Ergebnisse. Im Gruppenvergleich ergaben sich signifikante Färbereaktionsunterschiede (verstärkter Nachweis bei bestrahlten GSM) um die AZ, die SCH, die STR und um die GE ($p = 0.03/0.01/0.03/0.02$, bestrahlte vs. nicht bestrahlte GSM). Einzelpräparate zeigten sehr deutlich akzentuierte Expressionen mit CIV-positiven Konglomeraten (**Abb. 9b der Anlage**). Die ST zeigten ebenso wie die TME und Nervenstrukturen eine tendenzielle, aber keine statistisch signifikante Immunreaktivitätssteigerung. Die LR ergab keinen signifikanten Effekt.

Bemerkenswert erscheint, dass es in bestrahlten GSM i. B. von Kapillargefäßen (v. a. Blutkapillaren) zu einer verstärkten Färbereaktion, besonders für Laminin, aber auch für CIV kam. Anti-Fibronectin produzierte im Bereich der kapillären Gefäße meist nur eine akzentuierte Reaktion, häufiger fehlte eine spezifische BM-Färbung bzw. die Fibronectinreaktion konnte nicht sicher von der des umgebenden Stromas abgegrenzt werden. Ein zu letzterem weitgehend analoger Befund demonstrierte sich beim Nachweis von CIII.

Die Anti-S100-, Anti-Tenascin- und Anti-Aktin-Immunreaktionen konnten wegen häufiger unspezifischer Reaktionsmuster nicht in die Auswertung miteinbezogen werden.

4. 2 Ergebnisse (Hauptversuche)

Körpergewicht Bei der Auswertung wurden einerseits Ausgangs- und Endgewicht (END-KG), andererseits Ausgangsgewicht (A-KG) und Körpergewicht (RT-KG) nach Abschluss der jeweiligen Bestrahlungsserie/-dosis verglichen.

Für den Gewichtsverlauf, der im Wesentlichen das tägliche Körpergewicht während der einzelnen RT-Serien berücksichtigte, standen bei den unterschiedlichen RT-Gruppen nach Abschluss der RT bis zur Endauswertung erheblich differierende Datenmengen zur Verfügung, die eine statistische Analyse nur bedingt zuließen. Wir beschränkten uns daher diesbezüglich auf eine deskriptive Beschreibung und die graphische Darstellung der Körpergewichtsverläufe (**Abb. 12-16 der Anlage**).

Hinsichtlich A-KG- und END-KG ergaben sich in Abhängigkeit von der RT signifikante Unterschiede ($p = < 0.0001$). Alle Tiere zeigten während der Beobachtungszeit eine Gewichtszunahme (A-KG vs. END-KG aller Tiere, $p = < 0.0001$) von im Mittel 282 g auf ein mittleres END-KG von 480 g, die allerdings bei bestrahlten Tieren signifikant geringer ausfiel (Kontrollen vs. bestrahlte Tiere, $p = 0.004$). So kam es bei Kontrollen von im Mittel 318 g auf ein END-KG von 568 g, wohingegen 20 Gy-exponierte Tiere von 277,50 g auf 470,94 g, 40 Gy-exponierte Tiere von 289,15 g auf 477 g und 60 Gy-exponierte Tiere von 285,30 g auf nur 408,05 g anstiegen. Nach der Bonferroni-Adjustierung war insbesondere der Unterschied zwischen 60 Gy-exponierten Tieren und Kontrollen im Sinne einer signifikant geringeren Gewichtszunahme im Langzeitverlauf auffällig (Kontrollen vs. 60 Gy, $p = 0.003$). Dieser RT-Gruppen-abhängige Verlauf, insbesondere der 60 Gy-Gruppe, kam auch in einem signifikant verschiedenen Wechselwirkungsprofil zum Ausdruck ($p = 0.02$). In **Tab. 29** und **Abb. 10 der Anlage** wurden die Ergebnisse tabellarisch und graphisch wiedergegeben.

Tab. 29: Darstellung der Körpergewichte [Gramm] in Abhängigkeit von der RT (alle Tiere).

RT-Gruppen	A-KG [g]	SF	END-KG [g]	SF
Kontrollen	318,20	6,28	568,00	44,53
20 Gy-Exposition	277,50	3,31	470,94	23,47
40 Gy-Exposition	289,15	3,14	477,00	22,26
60 Gy-Exposition	285,30	3,14	408,05	22,26

SF = Standardfehler

Weiterhin war festzustellen, dass es während der RT-Zeit (Zeitraum der RT bis zu 2, 4 oder 6 Wochen) zu einem kontinuierlichen Gewichtszuwachs kam, der sich sowohl bei der 20 Gy- ($p < 0.0001$), bei der 40 Gy- ($p < 0.0001$) als auch der 60 Gy-Expositionsgruppe ($p < 0.001$) signifikant vom Ausgangsgewicht unterschied, aber nicht wesentlich vom Gewichtszuwachs von Kontrollen differierte. Bei den mit 60 Gy-exponierten Tieren kam es zu einer tendenziell geringeren RT-KG-Zunahme gegen Ende der Bestrahlungsserie. So zeigte sich im Schnitt nach 2 Wochen eine Gewichtszunahme von 15,47 g, nach 4 Wochen von 25,92 g und nach 6 Wochen von 30,64 g. Es ist zu vermuten, dass die gefundenen Differenzen im Endgewicht auf spätere Effekte einer reduzierten Nahrungsaufnahme, z. B. durch Bissanomalien und/oder Speicheldrüsenreaktionen zurückzuführen sind.

Betrachtet man die am längsten evaluierten Tiere (1½ Jahre alte Ratten) gesondert, ergeben sich im Wesentlichen ähnliche Ergebnisse signifikant differenter mittlerer A-KG- und END-KG in Abhängigkeit von der RT ($p < 0.0001$) mit einer insgesamten Gewichtszunahme, die jedoch bei bestrahlten Tieren geringer ausfiel ($p < 0.001$, Kontrollen vs. bestrahlte Tiere). Die Gewichtsprofile zeigten zudem beim RT-Gruppen-abhängigen Vergleich deutlich differente Wechselwirkungsbeziehungen ($p = 0.002$), was auch in der Bonferroni-Adjustierung zum Ausdruck kam. So fand sich die im Mittel stärkste Gewichtszunahme nicht bei Kontrolltieren, sondern bei Tieren, die 40 Gy-Strahlenexposition ausgesetzt waren, wohingegen die 60 Gy-exponierten Tiere auch in dieser älteren Tiergruppe die geringste Gewichtszunahme zeigten. In der Bonferroni-Adjustierung resultierte eine signifikant geringere Gewichtszunahme bei 60 Gy-exponierten Tieren gegenüber Kontrollen (Kontrollen vs. 60 Gy, $p = 0.001$) und gegenüber den 40 Gy-exponierten Tieren (40 vs. 60 Gy, $p = < 0.0001$), während die 20 Gy-exponierten Tiere weniger gegenüber Kontrollen ($p = 0.08$, n. s.), sondern vielmehr gegenüber 40 Gy-exponierten Tieren (20 vs. 40 Gy, $p = 0.01$) signifikant weniger an Gewicht zunahmen. Offensichtlich wurde die RT mit 40 Gy gut toleriert bzw. führte nicht zur reduzierten Nahrungsaufnahme. Dies könnte für (partielle) Erholungseffekte im längeren Beobachtungszeitraum sprechen. Dem steht allerdings entgegen, dass die Tiere, die einer geringeren Strahlendosis ausgesetzt waren - was allgemein mehr mit möglichen Erholungseffekten assoziiert wird - diese zu Kontrollen und 40 Gy-exponierten Tieren analoge Gewichtszunahme nicht zeigten, sondern ein deutlich geringeres END-KG aufwiesen.

Insofern ergibt sich hieraus der Hinweis auf einen gewissen Alterseffekt bzw. Latenzeffekt nach abgeschlossener RT. In **Tab. 30** und **Abb. 11 der Anlage** wurden die Ergebnisse für die älteren Tiere tabellarisch und graphisch zusammengefasst.

Tab. 30: Darstellung der Körpergewichte [Gramm] in Abhängigkeit von der Radiatio (1½ Jahre alte Tiere)

RT-Gruppen	Ausgangsgewicht [g]	SF	Endgewicht [g]	SF
Kontrollen	319,20	4,41	569,00	34,86
20 Gy-Exposition	275,11	3,29	497,00	25,98
40 Gy-Exposition	296,22	3,29	596,00	25,98
60 Gy-Exposition	276,10	3,12	417,90	24,65

SF = Standardfehler

Die weiteren graphischen Darstellungen **im Anhang** zeigen den während der RT-Zeit dokumentierten allgemeinen Gewichtszuwachs bei den Tieren (**Abb. 12**) sowie das zunehmende Gewicht bei 20 Gy- (**Abb. 14a, Abb. 14 b**), 40 Gy- (**Abb. 15a, Abb. 15b**) und 60 Gy-Exposition (**Abb. 16a, Abb. 16b**), jeweils für 1 Jahr alte Tiere (**Abb. 14a, Abb. 15a, Abb. 16a**) und 1 ½ Jahre alte Tiere (**Abb. 14b, Abb. 15b, Abb. 16b**). Nur bei 60 Gy-exponierten Tieren zeigte sich gegen Ende der RT-Zeit eine tendenziell geringere Gewichtszunahme.

Speicheldrüsengewichte Nach Perfusionsfixierung und vorsichtiger beidseitiger Präparation der Speicheldrüsen zum makroskopischen Größenvergleich in situ (**Abb. 17 der Anlage**) wurden die GSM seitentrennt gewogen und dann weiter aufgearbeitet.

Die links- und rechtsseitigen GSM bei bestrahlten Tieren unterschieden sich bezüglich ihrer Gewichte im Vergleich zu Kontrollen in Abhängigkeit von der Radiatio signifikant ($p = < 0.0001$).

Die linke GSM von bestrahlten Tieren war signifikant leichter als Kontrollendrüsen ($p = < 0.0001$), wohingegen die rechtsseitigen Drüsengewichte zwar nach 20 Gy-Exposition (mittleres Gewicht 294 mg: leichte Abnahme gegenüber Kontrolldrüsen) und nach 40 Gy-Exposition (mittleres Gewicht 355 mg: leichte Zunahme gegenüber Kontrollen) etwas schwankten, jedoch insgesamt keine wesentlichen Gewichtsveränderungen (nahezu gleiches mittleres Gewicht rechtsseitiger, geschützter Drüsen bei 60 Gy-exponierten Tieren wie bei Kontrollen) auftraten.

Diese Seitendifferenz kam auch in einem signifikanten seitendifferenten Wechselwirkungsprofil zum Ausdruck ($p < 0.0001$). Die Gewichtsabnahme linksseitiger Drüsen wurde nach der Bonferroni-Adjustierung besonders deutlich beim Vergleich von Kontrolldrüsen (mittleres Gewicht: 320 mg) und Drüsen, die 60 Gy-Exposition (mittleres Gewicht: 137 mg) erhielten ($p = 0.01$, Kontrollen vs. 60 Gy) und zwischen Drüsen nach 40 Gy- (mittleres Gewicht: 205 mg) und 60 Gy- (mittleres Gewicht: 137 mg) Exposition (40 vs. 60 Gy, $p = 0.03$). Alter und Latenz zeigten keine wesentlichen Effekte bezüglich der Drüsengewichte. Die Ergebnisse wurden **Tab. 31** zusammengefasst und in **Abb. 18 der Anlage** graphisch dargestellt.

Tab. 31: Darstellung der Drüsengewichte [mg] in Abhängigkeit von der Radiatio (SF = Standardfehler)

RT-Gruppen	Linke GSM		Rechte GSM	
	Gewicht [mg]	SF	Gewicht [mg]	SF
Kontrollen	320,00	25,46	322,15	31,83
20 Gy-Exposition	244,44	13,42	294,44	16,77
0 Gy-Exposition	205,00	12,73	355,00	15,91
60 Gy-Exposition	137,50	12,73	320,00	15,91

4. 2. 1 Speicheldrüsen

Histomorphologie Die histomorphologischen Befunde wurden anhand der HE-gefärbten GSM-Schnittpräparate gemäß der mod. Seifert-Klassifikation (**Tab. 14**) vorgenommen. Die unmittelbar anliegende, durch ein schmales bindegewebiges Septum jedoch abgetrennte muzinöse Gl. sublingualis zeigte in der Regel nur geringe und meist fokale Veränderungen und ging in diese Auswertung nicht ein. Bei Kontrollen (n = 10, in Serienschnitten aufgearbeitet) und rechtsseitigen GSM (n = 51) bestrahlter Tiere waren meist Normalbefunde (siehe **Abb. im Anhang**) festzustellen. Lediglich je ein rechtsseitiges Drüsenpräparat nach 20 Gy- (1/15), 40 Gy- (1/18) und 60 Gy- (1/18) Exposition der Tiere zeigte Veränderungen, die einem späten Stadium 1 entsprachen. Bei bestrahlten GSM (n = 51) fand sich bei **20 Gy-Exposition** (n = 15) meist ein spätes Stadium 1. Es zeigten sich fokale Verluste der AZ und eine geringe periduktale Fibrose, vor allem um die Ausführungsgänge. Neben einigen Infiltratzellen (vorwiegend Lymphozyten), vorwiegend im Bereich ehemaliger AZ waren im Interstitium geringe fokale ödematöse Auflockerungen nachweisbar. Nur 1 von 15 Tieren zeigte ein Übergangsstadium 1-2. Bei **40 Gy** (n = 18) bestand meist ein Übergangsstadium 1-2. Hier dominierten z. T. deutliche, aber noch fokal betonte Azinverluste und eine mäßige Dilatation der Ausführungsgänge. Daneben fand sich eine mäßige periduktale Fibrose um die Ausführungsgänge und teilweise um die Streifenstücke. Das Interstitium zeigte neben ödematösen Auflockerungen variable Infiltrationen mit wechselnden, eher mäßigen Infiltraten, die vornehmlich aus Lymphozyten und Mastzellen bestanden. Nur 1 von 18 Tieren zeigte ein Spätstadium mit weitgehender Destruktion des Drüsenparenchyms und massiver Fibrose. Nach **60 Gy-** (n = 18) Exposition bestand ganz überwiegend ein Stadium 2. Das Drüsenparenchym zeigte eine ausgeprägtere Reduktion der AZ, wobei die verbliebenden AZ und deren Zellkern sich etwas vergrößert darstellten. Als weitere Zeichen der Azinuszellschädigung fanden sich einerseits Zellen mit scholligem Zytoplasma und Sekretstauungen, mehr jedoch im Sekretgranulagehalt verminderte Zellen. Teilweise waren intrazytoplasmatische Vakuolen entwickelt. Weiterhin waren Verluste der ST und teilweise der SCH auffällig. Bei verbliebenen ST war der Sekretgehalt häufig verringert und der Zellkern etwas vergrößert, wobei fokal auch adenomartige Proliferate zu beobachten waren. Daneben bestanden Gangdilatationen, insbesondere der Streifenstücke und Ausführungsgänge. Vereinzelt kam es zu Plattenepithelmetaplasien des Gangepithels. Das Interstitium war fibrosiert, insbesondere um die Ausführungsgänge, und insgesamt ödematös aufgelockert, auch im Bereich der interlobulären Septen waren Verbreiterungen und Auflockerungen zu bemerken. Bei Gefäßen fielen vor allem Verdickungen der AD auf, während nur fokal Gefäßeinengungen auftraten. Zelluläre interstitielle Infiltrate traten variabel auf, neben geringeren und mäßigen waren sie teilweise auch reichlicher nachzuweisen (vorwiegend Lymphozyten und Mastzellen). Bei einem von 18 Drüsenpräparaten fand sich ein Übergangsstadium 1-2, bei einem weiteren Präparat (1/18) ergab sich ein unauffälliger morphologischer Befund. Außer bei einem Drüsenpräparat mit einem Spätstadium nach einer Strahlendosis von 40 Gy waren nur sehr selten in einzelnen Serienpräparaten nach 40 Gy und 60 Gy Strahlenexposition fokal im Randbereich der Drüse nahe der Drüsenkapsel über das Stadium 2 hinausgehende

Veränderungen nachweisbar. In **Tab. 32 und Tab. 33 (im Anhang)** wurden die Befunde zusammengefasst dargestellt.

Im Vergleich zu Kontrollen und im Rechts-Links-Vergleich bestrahlter Tiere waren die Strahlenreaktionsbefunde signifikant verschieden [Vergleich zu Kontrollen ($p = 0.0001$), Rechts-Links-Vergleich ($p = 0.005$)].

Bei bestrahlten GSM war bereits nach 20 Gy-Exposition eine signifikante, zu Kontrollen verschiedene Strahlenreaktion zu beobachten ($p = 0.0001$), welche oberhalb von 20 Gy-Exposition im Sinne einer zunehmenden Strahlenreaktion noch zunahm (Kontrollen vs. 40 Gy/60Gy: $p = 0.0001/0.0001$, 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.01/0.0001$). Da sich Kontrollpräparate und rechtsseitige Drüsenpräparate bestrahlter Tiere weitgehend konstant verhielten, d.h. dosisabhängig einen Normalbefund zeigten, die bestrahlten Drüsen hingegen einen dosisabhängige, zunehmende Strahlenreaktion aufwiesen, war der Profilverlauf signifikant unterschiedlich ($p = 0.005$). Das heißt, dass sich Kontrollen bzw. rechtsseitige Drüsen im Vergleich zu linksseitigen bestrahlten Drüsen dosisabhängig im Strahlenreaktionsbefundungsverlauf („Profil“) signifikant unterschieden.

Die LR und das Alter der Tiere beeinflusste gemittelt über alle Strahlendosen die Strahlenreaktionsbefundung nicht signifikant. Es fand sich jedoch bei mit 20 und 40 Gy bestrahlten GSM mit zunehmender Latenz eine gewisse tendenzielle Abnahme der Strahlenreaktionsbefunde im Sinne einer partiellen Restitutionstendenz.

Immunhistologie (CK/IF-Proteine) CK 5/6 war bei nicht bestrahlten GSM (**Abb. 19.1 im Anhang**) zart bis leicht bei einigen Basalzellen (BZ) von GE und bei MYO nachweisbar. Weitere Parenchymstrukturen wurden nicht dargestellt. Bei einigen mit 40 (4/18) oder 60 Gy (2/18) direkt exponierten GSM-Präparaten kamen zusätzlich BZ im Bereich der STR zur Darstellung. Bei bestrahlten GSM (**Tab. 34, Abb. 19.2, im Anhang**) kam es bei GE und MYO oberhalb von 20 Gy zu einer deutlichen tendenziellen Expressionssteigerung, die allerdings nicht signifikant verschieden von Kontrollen war. Dennoch konnte durch diese Expressionssteigerungstendenz im Seitenvergleich bestrahlter Tiere eine signifikante Differenz im Bereich der GE und MYO befundet werden (Rechts-Links-Vergleich bei GE: $p = 0.002$, bei MYO: $p = 0.002$). Es zeigten jedoch auch rechtsseitige GSM geringe tendenzielle Immunreaktivitätssteigerungen, so dass im Profilverlauf mäßig ähnliche Expressionssteigerungen auftraten (Rechts-Links-Wechselwirkungsbeziehung in Abhängigkeit von der RT bei GE: $p = 0.3$, bei MYO: $p = 0.1$). Das Alter der Tiere spielte nur bei den MYO im Sinne einer leichten Expressionssteigerung bei älteren Tieren eine Rolle (Altersvergleich 1 Jahr vs. 1,5 Jahre, $p = 0.04$), ansonsten waren Alter und Latenzphasen unerheblich bei der Färbereaktionsbeurteilung.

CK 13 war bei nicht bestrahlten Tieren (**Abb. 19.3 im Anhang**) leicht bis moderat bei SCH und STR nachzuweisen und zeigte überwiegend eine leichte Positivität bei GE. ST wurden zart bis leicht markiert. Bei bestrahlten Drüsen (**Tab. 35, Abb. 19.4, im Anhang**) zeigten sich im Vergleich zu Kontrollen signifikante Expressionssteigerungen im Bereich von GE ($p = 0.002$), ST ($p = 0.002$), SCH ($p = 0.0001$) und STR ($p = 0.0001$), was im Rechts-Links-Vergleich bestrahlter Tiere bei GE ($p = 0.01$), ST

($p = 0.003$), SCH ($p = 0.004$) und STR ($p = 0.0001$) bestätigt wurde. Die verstärkte Färbereaktion nahm bei GE, ST, SCH und STR mit steigender Dosis oberhalb von 20 Gy zu und war bei 60 Gy am deutlichsten ausgeprägt. Bis 20 Gy war die Immunreaktivität uneinheitlich (verstärkte oder verminderte, auch gleichbleibende Reaktionen) und nicht signifikant verschieden von Kontrollen. Trotz seitendifferenzierter Expressionslevel bei bestrahlten Tieren ergaben sich bei GE und SCH oberhalb von 20 Gy ähnliche Profilverläufe, was auf ein dosisabhängiges ähnliches Expressionsverhalten hinwies (GE: $p = 0.06$, SCH: $p = 0.14$). Bei den GE im Bereich der rechten GSM waren jedoch einige Extremwerte auffällig. Der Medianvergleich zeigte jedoch bei den GE ein gleiches medianes Verhalten (d. h. gleichbleibende Expression) auf der rechten Seite im Gegensatz zum differentiellen (d. h. oberhalb von 20 Gy ansteigende Expression) medianen Verhalten linker GSM. Bei den ST ($p = 0.001$) und STR ($p = 0.002$) traten ebenfalls seitendifferente Profilverläufe (Auswertung der dosisabhängigen Rechts-Links-Wechselwirkungsbeziehung) auf. Das Alter der Tiere und die LR war bei der statistischen Auswertung insgesamt unerheblich. Hier ergaben sich lediglich tendenzielle Befunde. So kam es z. B. im Bereich der STR bei direkt exponierten GSM und bei rechtsseitigen, also strahlengeschützten GSM bestrahlter Tiere im Bereich der SCH mit zunehmendem Alter und zunehmender LR zu einer geringen Abnahme der Färbeintensität, wohingegen Alter und LR bei bestrahlten linksseitigen GSM im Bereich der SCH unerheblich waren.

Der AK K 8.12 (gegen CK 13/15/16) markierte bei nicht bestrahlten GSM überwiegend sehr zart die MYO und zart bis leicht BZ im Bereich der GE (**Abb. 20.1 im Anhang**). Bei GE in direkt exponierten GSM kam es zu deutlichen tendenziellen Expressionssteigerungen. Diese Steigerung war jedoch nicht signifikant verschieden von Kontrollpräparaten ($p = 0.2$). Dennoch ergab sich im Seitenvergleich bestrahlter Tiere (linke, bestrahlte GSM vs. rechte, strahlengeschützte GSM, gemittelt über alle Strahlendosen) ein signifikanter Unterschied bei der Immunreaktivität im Bereich der GE ($p = 0.03$). Dieser Unterschied war allerdings im wesentlichen durch eine Abnahme der Immunreaktivität auf der rechten Seite bei 20 Gy-Exposition bedingt. Beide Seiten zeigten zudem im Profilverlauf in Abhängigkeit von der RT ähnlich ansteigende Expressionen ($p = 0.44$). Hingegen zeigten MYO bei bestrahlten GSM signifikante Immunreaktivitätssteigerungen im Vergleich zu Kontrollen ($p = 0.003$). Ebenso waren signifikante Unterschiede im Seitenvergleich bestrahlter Tiere festzustellen ($p = 0.0001$). Die verstärkte Expression der MYO im Vergleich zu Kontrollen war insbesondere bei 40 Gy- ($p = 0.009$) und 60 Gy-Exposition ($p = 0.01$) deutlich ausgeprägt (**Tab. 36, Abb. 20.2, im Anhang**). Da sich aber auch rechtsseitig, also bei strahlengeschützten GSM bestrahlter Tiere eine geringe Expressionssteigerung in Abhängigkeit von der RT zeigte, war bei der Auswertung der dosisabhängigen Rechts-Links-Wechselwirkungsbeziehung ein ähnlicher Profilverlauf zu befinden ($p = 0.6$). Die LR und das Alter der Tiere blieben ohne signifikanten Effekt auf das Färbereaktionsverhalten. Es fanden sich lediglich bei strahlengeschützten GSM und Kontrollen geringe Reaktionssteigerungen bei älteren Tieren.

Der CK 17/19 erkennende AK E3 (gegen CK 17 in humanen Geweben, gegen CK 19 im Rattengewebe) produzierte bei nicht bestrahlten Tieren (**Abb. 21.1 im Anhang**) im Bereich der GE und SCH eine

mittelstarke Reaktion, im Bereich der STR eine leichte bis moderate Anfärbung. Immunreaktionen im Bereich der ST, der AZ und der MYO waren nicht oder nur gelegentlich fokal nachweisbar. Bei bestrahlten Tieren waren AZ etwas kontinuierlicher, wenn auch sehr zart, darstellbar und wurden daher in die Auswertung mit aufgenommen. Im Seitenvergleich bestrahlter Tiere kam es im Bereich der AZ ($p = 0.04$), der GE ($p = 0.008$), der STR ($p = 0.003$) und SCH ($p = 0.02$) zu einer verstärkten, linksseitigen Färbereaktion (**Tab. 37, Abb. 21.2, im Anhang**). Diese korrelierte im Bereich der STR ($p = 0.01$: Kontrollen vs. RT, $p = 0.008$: Kontrollen vs. 40 Gy, $p = 0.002$: Kontrollen vs. 60 Gy) und SCH ($p = 0.03$: Kontrollen vs. RT, $p = 0.04$: Kontrollen vs. 20 Gy, $p = 0.04$: Kontrollen vs. 40 Gy, $p = 0.007$: Kontrollen vs. 60 Gy) positiv mit der Dosis, indem ab 20 Gy-Exposition die Immunreaktivitätssteigerung bis zur 60 Gy-Expositionsgruppe anstieg. Bei GE von bestrahlten linksseitigen GSM war im Profilverlauf ab 20 Gy ein tendenzieller Anstieg bis 40 Gy auffällig mit am stärksten ausgeprägter Färbereaktion bei 60 Gy ($p = 0.04$: Kontrollen vs. 60 Gy). Dosisabhängig zeigten beide Seiten bestrahlter Tiere ein ähnlich ansteigendes Expressionsprofil im Bereich der AZ ($p = 0.76$), GE ($p = 0.1$), STR ($p = 0.07$) und SCH ($p = 0.12$). Dies wies bei seitendifferenzter Expressionsausprägung auf seitenähnliche Steigerungsverläufe hin. Alter und LR waren unerheblich bei der statistischen Auswertung.

Der AK KS 18.04 (gegen **CK 18**) produzierte bei nicht bestrahlten GSM eine vorwiegend hauchzarte Reaktion im Bereich der AZ und basalbetont bei ST, leichte bis mittelgradige Reaktion bei GE sowie eine leichte Reaktion bei SCH und STR (**Abb. 22.1 im Anhang**). Im Vergleich zu Kontrollen war bei bestrahlten GSM (**Tab. 38, Abb. 22.2, im Anhang**) eine verstärkte Immunreaktivität bei vielen Parenchymstrukturen festzustellen, insbesondere bei AZ ($p = 0.02$), SCH ($p = 0.04$) und STR ($p = 0.02$). Es zeigten sich auch im Seitenvergleich bestrahlter Tiere ausgeprägtere Färbereaktionen bei bestrahlten, linksseitigen GSM, besonders bei GE ($p = 0.002$), SCH ($p = 0.03$) und STR ($p = 0.01$). Bei AZ (20 vs. 60 Gy: $p = 0.001$), GE (20 vs. 60 Gy: $p = 0.04$), ST (20 vs. 60 Gy: $p = 0.03$), deutlich tendenziell auch bei SCH (20 vs. 60 Gy: $p = 0.06$) und STR (20 vs. 60 Gy: $p = 0.05$) kam es bei steigender Dosis oberhalb von 20 Gy zur verstärkten Expression, welche bei 60 Gy am deutlichsten ausgeprägt war. Die Expression nach 20 Gy-Exposition tendierte bei GE, ST, SCH und STR zu geringeren Werten im Sinne einer Immunreaktivitätsabnahme bzw. leichten Zunahme bei AZ (20 Gy vs. Kontrollen: n. s.). Der Profilverlauf der Immunreaktivität zeigte bei AZ ($p = 0.009$), GE ($p = 0.008$) und ST ($p = 0.03$) eine deutliche Seitendifferenz, indem linke GSM vermehrte Expressionen und rechte GSM im wesentlichen konstante Expressionen aufwiesen. Hingegen reagierten SCH ($p = 0.2$) und STR ($p = 0.3$) im Profilverlauf ähnlich ansteigend. Alter und LR waren unerheblich bei der Auswertung.

Im GSM-Gewebe waren **Vimentinreaktionen** bei mesenchymalen Strukturen nachweisbar. Bei unbestrahlten GSM (Abb. 23.1 im Anhang) wurden Gefäßendothelzellen (EN) überwiegend deutlich positiv, Fibroblasten und Fibrozyten überwiegend leicht bis deutlich, Kapillaren (KAP), die Mediaschicht der Gefäße (TME) und Nervengewebe meist leicht und MYO meist sehr zart gefärbt. Die Gefäßadventitia (AD) sowie die epithelialen Drüsenparenchymzellen (bis auf die MYO, die allgemein eine Doppelsexpression für CK und Vimentin zeigen) waren nicht reaktiv. Durch die z. T. geringe Varianz der

Expressionslevel wurden zusätzlich zur multivariaten Analyse für jede Lokalisation die abhängigen Variablen RT, Alter und LR einfaktoriell berechnet. Bei bestrahlten GSM kamen keine weiteren mesenchymalen Strukturen zur Darstellung.

Multivariat berechnet konnte bei bestrahlten Tieren (**Tab. 39 im Anhang**) ein allgemeiner RT-Effekt mit verstärkter Expression nachgewiesen werden (RT vs. Kontrollen, $p = 0.01$). Bei den einzelnen Lokalisationen war jedoch nur das Nervengewebe ($p = 0.005$), insbesondere interlobulär verstärkt reaktiv. Für die sonstigen mesenchymalen Strukturen ergaben sich tendenzielle Expressionssteigerungen, z. B. bei Fibroblasten ($p = 0.08$). Ebenso ließen sich im Seitenvergleich bestrahlter Tiere hinsichtlich der Expressionsausprägung und beim Seitenvergleich in Abhängigkeit von der RT-Dosis hinsichtlich der Profilverläufe keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Alter und LR zeigten ebenfalls keine signifikanten Effekte. *Ein-faktoriell, seitengetreunt ausgewertet* ergaben sich bei den EN Expressionssteigerungen bei höherem Alter (links: $p = 0.003$, rechts: $p = 0.01$), bei der 12-Monats-LR (links: $p = 0.0001$, rechts: $p = 0.02$) und mit ansteigender RT-Dosis (links: $p = 0.002$), bei den Fibrozyten/Fibroblasten Steigerungen bei der 12-Monats-LR (links: $p = 0.007$, rechts: $p = 0.01$) und bei ansteigender RT-Dosis (links: $p = 0.001$), bei den KAP Expressionssteigerungen bei der 6- und 12-Monats-LR (links: $p=0.003$, rechts: $p = 0.006$) und mit zunehmender Strahlendosis (links: $p = 0.001$) sowie rechts mit zunehmendem Alter ($p = 0.003$), bei den MYO Steigerungen bei der 6- und 12-Monats-LR (links: $p = 0.0001$, rechts: $p = 0.01$) und mit steigender RT-Dosis (**Abb. 23.2 im Anhang**, links: $p = 0.0001$, rechts: $p = 0.04$), beim Nervengewebe Steigerungen bei der 6- und 12-Monats-LR (links: $p = 0.004$, rechts: $p = 0.05$) und mit zunehmender RT-Dosis (links: $p = 0.0001$) und rechts mit zunehmendem Alter ($p = 0.01$), bei der TME Steigerungen in höherem Alter der Tiere (links: $p = 0.04$, rechts: $p = 0.04$) und bei der 6- und 12-Monats-LR (links: $p = 0.005$). Die Ergebnisse der multivariaten Analyse wurden somit teilweise bestätigt bzw. für die einzelnen Lokalisationen spezifiziert. Ein-faktoriell ergaben sich zusätzliche Latenz- und Alterseffekte, die aufgrund der Zusammenhänge von Alter und LR einerseits und LR und RT andererseits auf möglicherweise versteckte RT-Effekte hindeuten. Diese Interpretation wird auch dadurch unterstützt, dass bei der multivariaten Analyse Alters- und LR-Einflüsse nicht auftraten.

Immunhistologie (ECM/BM- und BM-assoziierte Proteine) Das interstitielle **CI** war vor allem bei breiteren SE im interlobulären und intralobulären Stroma, um größere Drüsengänge und im Bereich der KA der GSM nachweisbar. Bei unbestrahlten Tieren (**Abb. 24.1 im Anhang**) fand sich eine überwiegend gleichmäßige, leichte Reaktion um die GE, im Bereich der KA und SE und des Nervengewebes (Peri- und Epineurium). Um die STR zeigten sich sehr zarte Färbereaktionen. Hingegen war die Expression um AZ, SCH, ST und MYO nur äußerst zart, häufiger fehlte hier auch ein eindeutiger Nachweis. Die Blutgefäße waren nur im Bereich der AD leicht reaktiv; Färbungen im Bereich der Intima und TME sowie bei KAP zeigten sich nur fokal und waren nicht sicher reproduzierbar. Aufgrund der geringen Varianz der befundeten Expressionen war eine multivariate Analyse nur bedingt zulässig. Es konnten jedoch mit vorsichtiger Interpretation RT-Effekte und seitendifferente

Expressionen dokumentiert werden. Für die einzelnen Gewebekomponenten wurden ergänzend die Expressionslevel (seitengetrennt) in Abhängigkeit von der RT, der LR und vom Alter einfaktoriell mit Chi-Quadrat-Tests ausgewertet.

Multivariat berechnet kam es im Vergleich zu Kontrollen in bestrahlten GSM (**Tab. 40, Abb. 24.2, im Anhang**) bei GE ($p = 0.0001$), im Bereich der KA ($p = 0.0001$) und der SE ($p = 0.001$), des Nervengewebes ($p = 0.0001$) und der STR ($p = 0.0001$) sowie im Bereich der AD ($p = 0.0001$) zu einer stärkeren, verbreiterten Färbereaktion. Dies wurde auch im Rechts-Links-Vergleich bestrahlter Tiere mit vermehrter linksseitiger CI-Expression deutlich im Bereich der GE ($p = 0.0001$), KA ($p = 0.001$), SE ($p = 0.0001$), des Nervengewebes ($p = 0.0001$), STR ($p = 0.0001$), AD ($p = 0.0001$). Die verstärkte Expression bei bestrahlten GSM nahm mit steigender RT-Dosis ab 20 Gy zu und war bei 60 Gy am deutlichsten ausgeprägt. Das Expressionsmuster bis zu einer Dosis von 20 Gy war uneinheitlich und nicht signifikant verschieden von Kontrollen. Bei bestrahlten GSM waren auch die bei Kontrollen nur äußerst zarten Reaktionen verstärkt nachweisbar. Dies galt für AZ ($p = 0.0001$), SCH ($p = 0.0001$) und ST ($p = 0.0001$), insbesondere bei 60 Gy-exponierten Tieren, und wurde auch im Rechts-Links-Vergleich bestrahlter Tiere mit vermehrter linksseitiger CI-Reaktion bestätigt (AZ, SCH, ST: $p = 0.0001$). Auch bei bestrahlten GSM weitestgehend fehlende Reaktionsnachweise betrafen Stromareaktionen im Bereich der KAP, der Intima- und TME der Gefäße und MYO. Bei allen Strukturen mit radioabhängiger verstärkter linksseitiger CI-Expression konnten daneben seitendifferente Expressionsprofile in Abhängigkeit von der RT befundet werden (GE, KA, SE, Nervengewebe, AD, AZ, SCH, ST: $p = 0.0001$, STR: $p = 0.001$). Weder das Alter der Tiere noch die LR hatten einen statistisch signifikanten Effekt auf das Färbereaktionsverhalten.

Einfaktoriell wurden die multivariat berechneten signifikanten Ergebnisse bei den Auswertungen mittels Chi-Quadrat-Test bestätigt. Dies galt beim Vergleich von Kontrollen zu direkt strahlenexponierten linken GSM für die AD, AZ, GE, ST, STR, KA, beim Nervengewebe, SCH ($p = 0.0001$) und SE ($p = 0.003$). Keine Unterschiede fanden sich im Vergleich von Kontrollen und rechtsseitigen GSM-Strukturen bestrahlter Tiere (bis auf eine Reaktivitätsabnahme im Bereich der Septen von rechtsseitigen Drüsen).

Der Vergleich der Expressionsmuster in Abhängigkeit vom Alter (1 Jahr vs. 1 ½ Jahre) und der LR (Kontrollen vs. 6-Monats- bzw. 12-Monats-LR) ergab für einzelne GSM-Strukturen signifikante Effekte. Dies betraf die linksseitige AD (verstärkte Expression bei der 6-Monats-LR: $p = 0.03$), die linksseitigen GE (verstärkte Expression bei der 6-Monats-LR: $p = 0.009$), die linksseitigen ST (verstärkte Expression bei der 12-Monats-LR: $p = 0.04$, hier zusätzlicher Alterseffekt, verstärkte Expression bei 1 ½ Jahre alten Tieren: $p = 0.003$), die linksseitige KA (verstärkte Expression bei der 12-Monats-LR: $p = 0.04$), der linksseitigen Nervenstrukturen (verstärkte Expression bei der 6-Monats-LR: $p = 0.04$), der linksseitigen SCH (verstärkte Expression bei der 12-Monats-LR: $p = 0.04$, hier zusätzlicher Alterseffekt mit verstärkter Expression bei 1 ½ Jahre alten Tieren: $p = 0.03$), die rechtsseitigen SE (Reaktivitätsabnahme bei der 6- und 12-Monats-LR: $p = 0.01$) und linksseitige STR (verstärkte

Expression bei der 6- und 12-Monats-LR: $p = 0.01$). Latenzeffekte waren somit, einfaktoriell berechnet, häufiger zu beobachten als Alterseffekte. Da jedoch die LR im Zusammenhang mit der stattgehabten RT zu betrachten ist, weisen auch diese Latenzeffekte auf einem RT-Effekt hin. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass bei der multivariaten Analyse von Alter und LR keine signifikanten Unterschiede auftraten, hingegen die RT-Effekte sowohl einfaktoriell als auch multivariat berechnet im Sinne unterschiedlicher Färbereaktionen auftraten.

Der polyklonale AK Anti-**Laminin-1** (AL) identifizierte das gleiche aus Humangewebe bekannte Strukturprotein der BM bei der Rattenspezies. Bei nichtbestrahlten Tieren (**Abb. 25.1 im Anhang**) war Laminin sehr zart bis leicht, überwiegend gleichmäßig um AZ, SCH, ST, STR und GE nachweisbar. Nervengewebe (NG) wurde häufig deutlich positiv durch AL gefärbt. Ebenso gelang der Nachweis im Bereich miterfasster Gefäße. Zur Darstellung kamen Arterien variabler Kaliber, vielfach Gefäße des Kapillarnetzes und kleinkalibrige Venen. Die subendotheliale (SEN) BM der arteriellen und venösen Gefäße zeigte eine kontinuierliche, vollständige, meist leichte positive Reaktion. Um die glatten Muskelzellen bzw. -fasern der TME zeigte sich eine überwiegend sehr zarte, stellenweise auch leichte Positivität für AL. Die AD war nicht reaktiv. Im Bereich von KAP konnte eine zur endothelialen BM analoge, kontinuierliche Lamininreaktion nachgewiesen werden. Bei Lymphkapillaren hingegen war Laminin nur fokal und fragmentiert bzw. nicht vollständig umhüllend zu beobachten. Miterfasste größere Lymphgefäße im Bereich der bindegewebigen Septen in der Nähe von interlobulären Ausführungsgängen zeigten ein den kleinlumigen Venen ähnliches Reaktionsmuster. Die KA und SE waren nicht reaktiv. Bei bestrahlten GSM (**Tab. 41, Abb. 25.2, im Anhang**) war im Vergleich zu Kontrollen an allen Parenchymstrukturen (AZ, SCH, ST, STR, GE: $p = 0.0001$) sowie im Bereich der Gefäßwände (KAP, SEN, TME: $p = 0.0001$) und des NG ($p = 0.0001$) eine signifikant stärkere Färbereaktion nachzuweisen. Dies wurde im Rechts-Links-Vergleich bestrahlter Tiere für NG ($p = 0.04$), AZ ($p = 0.03$), SCH ($p = 0.0001$), ST ($p = 0.03$), STR ($p = 0.0001$), GE ($p = 0.0001$) und Gefäße (KAP, SEN: $p = 0.0001$, TME: $p = 0.02$) im Sinne vermehrter linksseitiger Expressionen bestätigt. Die verstärkte Expression bei bestrahlten GSM nahm mit steigender RT-Dosis ab 20 Gy zu und war bei 60 Gy-Exposition am deutlichsten ausgeprägt. Das Expressionsmuster bis zu einer RT-Dosis von 20 Gy war uneinheitlich (tendenziell verstärkte, aber auch gemäßigte Färbereaktion) und statistisch nicht signifikant verschieden von Kontrollpräparaten. Trotz seitendifferenter Expressionslevel war im Bereich des NG ($p = 0.2$), der AZ ($p = 0.3$) und der SCH ($p = 0.1$) in Abhängigkeit von der RT ein ähnliches Expressionsprofil zu befunden. Überwiegend zeigten sich jedoch seitendifferente Expressionslevel **und** unterschiedliche Expressionsprofile. Dies galt für KAP ($p = 0.02$), SEN ($p = 0.005$), TME ($p = 0.02$), ST ($p = 0.007$), STR ($p = 0.02$) und GE ($p = 0.001$). Neben diesen Hauptbefunden einer Expressionssteigerung waren stellenweise auch Unschärfen, fokale Teilverluste und irregulär geformte Laminindepots und -konglomerate nachweisbar. Das Alter der Tiere und die LR blieben statistisch unerheblich.

Fibronektin konnte bei nicht bestrahlten Tieren sehr zart bis leicht um die ST und STR, deutlicher ausgeprägt um die GE nachgewiesen werden (**Abb. 26.1 im Anhang**). Die Reaktion um die SCH fiel überwiegend sehr schwach aus, um AZ war sie wechselnd sehr zart oder auch fehlend. KA wurde leicht gefärbt, SE waren sehr zart positiv. Die Gefäßwände zeigten subendothelial eine sehr zarte bis leichte, im Bereich der TME eine sehr zarte Färbung. Im Bereich der AD gelang ein kontinuierlich leichter Nachweis. KAP waren sehr zart bis leicht positiv. MYO und Nervengewebsstrukturen (NG) waren nicht reaktiv bzw. es konnte insbesondere beim NG die gelegentlich sehr zarte Reaktion nicht sicher von der umgebenden Stromareaktion abgegrenzt werden. Im Seitenvergleich bestrahlter Tiere sowie im Vergleich zu Kontrolltieren ergaben sich bei direkt exponierten GSM stärkere und ausgedehntere Färbereaktionen (teilweise in Form von flächenhaften Kondensationen). Dies war für Expressionen um AZ ($p = 0.011$, $p = 0.02$), ST ($p = 0.004$, $p = 0.0001$), STR ($p = 0.001$, $p = 0.03$) und GE ($p = 0.0001$, $p = 0.001$), tendenziell auch um SCH ($p = 0.05$, $p = 0.06$) nachweisbar. Ebenso waren KAP ($p = 0.0001$, $p = 0.01$) und die AD ($p = 0.001$, $p = 0.0001$) sowie die KA ($p = 0.004$, $p = 0.0001$) und SE ($p = 0.0001$, $p = 0.001$) linker GSM deutlich stärker reaktiv. NG konnte häufig viel deutlicher von der umgebenden Stromareaktion abgegrenzt werden. Die verstärkte Expression bei bestrahlten GSM (**Tab. 42, Abb. 26.2, im Anhang**) nahm mit steigender Strahlendosis zu. Bereits oberhalb von 20 Gy zeigte sich ein verstärkter Nachweis im Bereich von KAP, AZ, ST und STR. Oberhalb von 40 Gy stieg die Immunreaktivität deutlicher im Bereich der GE, der AD sowie bei der KA und den SE. Die im Vergleich zur 20 Gy-Exposition deutlich vermehrte Expression nach 60 Gy-Exposition war für NG ($p = 0.003$), im Bereich der KA ($p = 0.0001$), der SE ($p = 0.001$), der KAP ($p = 0.006$), der AD ($p = 0.0001$), der AZ ($p = 0.01$), der ST ($p = 0.0001$), der GE ($p = 0.0001$) und der STR ($p = 0.0001$) nachweisbar. Eine im Vergleich zu Kontrollen vermehrte Expression bei 20 Gy exponierten GSM war nur im NG ($p = 0.0001$) und subendothelial ($p = 0.0001$) zu beobachten, wobei subendothelial mit zunehmender RT-Dosis nur noch tendenzielle Expressionssteigerungen bestanden, wohingegen im NG deutlich verstärkte Reaktionen auffielen (s. o.: $p = 0.003$). Ansonsten war das Färbereaktionsverhalten nach 20 Gy Exposition uneinheitlich mit teilweise gleichbleibender, aber auch tendenziell verstärkter oder abgeschwächter Reaktion im Vergleich zu Kontrollen. Das Expressionsprofil der TME bzw. der Schaltstücke linker GSM war durch eine tendenzielle dosisabhängige Steigerung bzw. einen recht heterogenen Verlauf gekennzeichnet. Auch bei der Fibronektin-Expression fiel auf, dass im Seitenvergleich in Abhängigkeit von der RT einerseits seitendifferente Expressionslevel, aber seitenähnliche (KA, SEN, TME, AZ, SCH: n. s.) Expressionsprofile, andererseits seitendifferente Expressionslevel **und** seitendifferente (NG, SE, KAP, AD, ST, STR, GE: $p = < 0.001$) Expressionsprofile auftraten. Das Alter der Tiere und die gewählten Nachbeobachtungszeiten blieben ohne statistisch signifikanten Effekt auf das Färbeverhalten.

Kollagen III (CIII) ließ sich in der GSM nicht bestrahlter Tiere (**Abb. 27.1 im Anhang**) sehr zart bis leicht um die AZ, SCH, ST, STR, GE, aber auch im Bereich der Gefäßwände (besonders SEN und in der TME, weniger deutlich in der AD) und leicht am NG nachweisen. Die KA und die bindegewe-

bigen SE wurden überwiegend sehr zart gefärbt. An MYO war C III nicht darstellbar. KAP reagierten überwiegend leicht positiv. Bei bestrahlten GSM (**Tab. 43, Abb. 27.2, im Anhang**) kam es im Vergleich zu Kontrollen bis auf die ähnlichen Immunreaktionen im Bereich der KA und SE an sämtlichen Parenchymstrukturen und auch im Bereich der Gefäßwände und des NG zu einem verstärkten Nachweis (teilweise mit Konglomeratbildungen) für C III (NG, SEN, TME, KAP, AD, SCH, ST, STR, GE: $p = 0.0001$, AZ: $p = 0.003$). Die Expressionssteigerung bei bestrahlten GSM zeigte eine deutliche Dosisabhängigkeit im Vergleich von 20 Gy und 60 Gy exponierten GSM. An den meisten Drüsenstrukturen war bei über 20 Gy hinausgehender Exposition eine zunehmende Immunreaktivität zu beobachten, welche bei 60 Gy-Exposition am ausgeprägtesten war. Dies war für Reaktionen im Bereich von NG, SEN, TME, AD, KAP, AZ, SCH, ST, STR und GE ($p = 0.0001$) nachweisbar. Das Expressionsmuster bei 20 Gy Exposition war nicht signifikant verschieden von Kontrollen. Hier zeigten sich tendenziell überwiegend verstärkte oder z. T. auch abgeschwächte (z. B. bei STR) Reaktionen. Die Analyse der Wechselwirkungsbeziehung beider Seiten in Abhängigkeit von der RT-Dosis ergab für nahezu alle (bis auf die ohnehin nicht vermehrt reaktiven KA- und SE-Gewebe) GSM-Strukturen unterschiedliche Expressionslevel **und** differente -profile ($p < 0.001$), was die o. g. deutliche Immunreaktivitätssteigerung bei bestrahlten linksseitigen GSM bestätigte. Die zum Teil zu beobachtende, wenn auch geringe Expressionszunahme rechtsseitiger, also strahlengeschützter GSM-Abschnitte (z. B. im Bereich von SEN, KAP, ST, STR, GE) war ebenso wie die LR oder das Alter der Tiere statistisch nicht evident.

Die BM-Komponente **Kollagen IV (CIV)** war in der GSM nicht bestrahlter Tiere (**Abb. 28.1 im Anhang**) überwiegend sehr zart im Bereich der AZ, der SCH, der ST, der STR und der GE nachzuweisen, daneben sehr zart bis leicht im NG. Ebenso gelang der Nachweis kontinuierlich leicht bis deutlich im SEN-, mäßig deutlich im TME-Abschnitt der Gefäße, jedoch nicht im Bereich der AD. Die KA, SE und MYO waren nicht reaktiv. KAP zeigten eine sehr zarte bis leichte Positivität. An den Parenchymstrukturen konnten im Vergleich zu Kontrollen signifikante Färbereaktionsunterschiede mit einem verstärkten Nachweis bei bestrahlten GSM (**Tab. 44, Abb. 28.2, im Anhang**) befundet werden. Dies galt für die Strukturen NG, KAP, SEN, TME, SCH, ST, STR und GE ($p = 0.0001$) sowie AZ ($p = 0.001$). Die Expressionssteigerung beim Vergleich von 20 Gy- und 60 Gy-exponierten GSM korrelierte positiv mit der ansteigenden RT-Dosis und war am deutlichsten bei 60 Gy-Exposition ausgeprägt. Dies war im Bereich von NG, KAP, SEN- und TME-Abschnitten der Gefäße, AZ, SCH, ST, STR und GE ($p = 0.0001$) zu beobachten. Das Expressionsmuster bei 20 Gy-Exposition ergab im Vergleich zu Kontrollen zwar tendenzielle, aber nicht signifikant verstärkte Nachweise. Ähnlich wie bei den Lamininreaktionen fanden sich neben den hauptbefundlichen Expressionssteigerungen fokal auch Unschärfen und Teilverluste der C IV-Immunreaktivität sowie irregulär geformte C IV-positive Depots und Konglomerate. Beim Seitenvergleich der Immunreaktion in Abhängigkeit von der RT-Dosis zeigten sich bei den Gefäßen (SEN, TME, KAP: $p < 0.001$) und an verschiedenen Parenchymstrukturen (AZ, SCH, ST, STR, GE: $p < 0.001$) differente Expressionslevel **und** unterschiedliche Expressi-

onsprofile, was die o. g. Expressionssteigerung bei direkt exponierten, linksseitigen GSM-Präparaten positiv unterstützte. Lediglich am NG konnte trotz differenter Expressionslevel ein mäßig ähnliches ($p = 0.06$) Expressionsprofil für C IV nachgewiesen werden, indem sowohl bei strahlengeschützten rechten GSM (20 Gy vs. 60 Gy: $p = 0.01$) als auch direkt strahlenexponierten GSM (20 Gy vs. 60 Gy: $p = 0.0001$) verstärkte Reaktionen auftraten. Alter und LR blieben ohne signifikanten Effekt auf das Färbeverhalten.

Proliferationsrate (Speicheldrüsen) Die Proliferationsrate von Azinus- und Gangzellen (PR in %) wurde seitengetreunt jeweils für die GSM und die GSL (Glandula sublingualis) bestimmt. Bei Kontrollen lag die PR der GSM links zwischen 0% und 1% (MW: $0.32\% \pm SF 1.46$), in der GSL links zwischen 0 und 0.3% (MW: $0.075\% \pm SF 0.45$), in der GSM rechts zwischen 0 und 0.6% (MW: $0.16\% \pm SF 0.53$) und in der GSL rechts bei nahezu konstant 0% ($\pm SF 0.30$). Bei bestrahlten Tieren ergaben sich in den verschiedenen Drüsen unterschiedliche Ergebnisse, wobei neben dem Einfluss der RT v. a. LR-Effekte bedeutend waren. Alterseffekte wurden nicht beobachtet.

Einflüsse der Latenz (LR-Effekte) Für beide **GSM** bestrahlter Tiere, die in Abhängigkeit von der LR ausgewertet wurden, ergaben sich LR-Effekte ($p = 0.002$). Beide GSM zeigten im Vergleich zu Kontrollen höhere PR nach der 6-Monats-LR (linke GSM: $3.510\% \pm 0.73$, n. s., rechte GSM: $1.769\% \pm 0.22$, $p = 0.04$), und einen besonders auffälligen PR-Abfall bei der 12-Monats-LR (linke GSM: $1.099\% \pm 0.62$, rechte GSM: $0.488\% \pm 0.19$) im Vergleich zur 6-Monats-LR (linke GSM: $p = 0.01$, rechte GSM: $p = 0.001$). Im Seitenvergleich der GSM aller Tiere ließen sich trotz linksseitig höherer PR (linke GSM: $1.732\% \pm 0.583$, rechte GSM: $0.758\% \pm 0.212$) im Zeitverlauf keine signifikant unterschiedlichen PR-Level ($p = 0.09$: n. s.) belegen. Zudem wiesen beide GSM ein seitenähnliches (n. s.: $p = 0.2$) PR-Profil auf. Für beide **GSL** bestrahlter Tiere ergaben sich nur gering höhere PR nach der 6-Monats-LR (linke GSL: 0.578 ± 0.21 , rechte GSL: $0.414\% \pm 0.13$) mit anschließendem Abfall bei 12 Monats-LR, was statistisch jedoch nicht relevant war ($p = 0.1$). Zudem zeigten sich im Zeitverlauf weder seitendifferente PR-Level (n. s.: $p = 0.1$) noch seitendifferente PR-Profile in Abhängigkeit von der LR ($p = 0.9$). Beim Vergleich aller 4 Drüsen zusammen gegen Kontrollen unter Berücksichtigung der Seite und in Abhängigkeit von der LR wurde der LR-Effekt als wesentlicher die PR beeinflussender Faktor für die GSM ($p = 0.001$) bestätigt (GSL: n. s.), d. h. PR-Steigerung bei 6 Monats-LR und im Zeitverlauf daran anschließender signifikanter PR-Abfall bei 12 Monats-LR in beiden GSM. Hingegen fanden sich bei allen 4 Drüsen keine Unterschiede ($p = n. s.$) beim Vergleich von Kontrollen und PR-Werten nach einer LR von 12 Monaten. Auch im zusätzlichen Seitenvergleich der linken Drüsen (GSM + GSL zusammen) zu den rechten Drüsen (GSM+GSL rechts zusammen) waren keine LR-abhängigen Seitendifferenzen feststellbar ($p = 0.3$, n. s.).

Einflüsse der RT (RT-Effekte) Beim Vergleich aller 4 Drüsen gegenüber Kontrollen in Abhängigkeit von der RT konnte ein globaler signifikanter RT-Effekt im Sinne gesteigerter PR bei bestrahlten Tieren (linke GSM: $2.172\% \pm 3.588$, rechte GSM: $0.982\% \pm 1.355$, linke GSL: $0.359\% \pm 0.909$, rechte

GSL: $0.239\% \pm 0.624$) festgestellt werden ($p < 0.007$), welcher aber nicht seitenspezifisch war ($p = 0.215$). Beide Seiten bestrahlter Tiere zeigten also ähnlich gesteigerte PR-Level, zudem auch ein seitenähnliches PR-Profil ($p = 0.9$). Auch bei der Aufteilung bestrahlter Tiere in GSM einerseits und GSL andererseits war im Vergleich aller 4 Drüsen zu Kontrollen keine signifikante Seitendifferenz (GSM: $p = 0.101$, GSL: $p = 0.548$) zu belegen. Hier war nur eine Tendenz zu höheren PR bei direkt exponierten, linksseitigen GSM ($p = 0.08$) zu erkennen.

Um diese Tendenz näher zu bewerten, wurden deshalb die GSM und die GSL jeweils seitengetrent in Abhängigkeit von der RT betrachtet. Bei den linken **GSM** verblieb eine tendenziell höhere PR im Vergleich zu rechten GSM ($p = 0.06$), die bereits nach 20 Gy-Exposition auffällig war (**Tab. 45 im Anhang**) sowie ein ähnliches PR-Profil ($p = 0.8$). Ein RT-Effekt an sich im Sinne generell höherer PR bei den GSM bestrahlter Tieren im Vergleich zu Kontrollen (n. s.: $p = 0.3$) bestand jedoch nicht. Dies erklärt sich vermutlich durch den PR-Abfall auf nahezu normale PR-Werte bei der 12-Monats-LR, da die Befunde von beiden Nachuntersuchungszeitpunkten in die RT-abhängige Auswertung mit eingehen und möglicherweise zusätzlich durch nicht unerhebliche Streubreiten, insbesondere nach 60 Gy-Exposition. Auch bei beiden **GSL** bestrahlter Tiere waren erhöhte PR erkennbar, die sich jedoch von Kontrollen nicht signifikant unterschieden (n. s.: $p = 0.5$), seitenähnliche PR-Level aufwiesen (n. s.: $p = 0.13$) und ein seitenähnliches PR-Profil zeigten (n. s.: $p = 0.7$).

Um die überraschende beidseitige PR-Erhöhung trotz nur einseitiger RT-Exposition näher zu beleuchten und um mögliche Besonderheiten einzelner Drüsen herauszuarbeiten, wurden einerseits Drüsen-einzelauswertungen in Abhängigkeit von der RT-Dosis und der LR und andererseits Bewertungen von Interaktionsvariablen vorgenommen (siehe unten).

Einzelauswertung Für die **linke GSM** konnte wiederum der LR-Effekt ($p = 0.01$) mit gegenüber Kontrollen auffällig hoher, aber nicht signifikant gesteigerter PR bei 6-Monats-LR und dem signifikanten PR-Abfall bei der 12-Monats-LR festgestellt werden. Hier fielen besonders die gegenüber der 12-Monats-LR erhöhten PR bei mit 20 Gy und 60 Gy exponierten Tieren auf. Hingegen ergab sich trotz höherer PR nach 20 Gy- und 60 Gy-Exposition keine signifikanten Unterschiede der PR beim Vergleich der verschiedenen RT-Dosisgruppen (n. s.: $p = 0.7$), was durch die LR-abhängigen unterschiedlichen PR-Level, die beim Dosisgruppenvergleich gemittelt werden, wiederum erklärlich ist. Die PR-Profile der jeweiligen LR ergaben zwar in Abhängigkeit von der RT-Dosis ein etwas heterogenes Bild, dennoch bestanden keine signifikanten Unterschiede (n. s.: $p = 0.09$). So kam es bei 6-monatiger LR nach gesteigerter PR bei mit 20 Gy exponierten Tieren zunächst bei 40 Gy-Exposition zu einem PR-Abfall, dann zur wieder erhöhten PR bei 60 Gy-Exposition. Bei einer LR von 12 Monaten war eine PR-Steigerung nach 40 Gy-Exposition auffällig und dann ein PR-Abfall nach 60 Gy-Exposition zu beobachten. In der **rechten GSM** ergab sich neben dem LR-Effekt ($p = 0.0001$) ein zusätzlicher bemerkenswerter RT-Effekt ($p = 0.002$), obwohl die PR geringere Werte als die direkt exponierte linke GSM zeigte. Bei einer LR von 6 Monaten bestand im Vergleich zu Kontrollen und zur LR von 12 Monaten eine signifikant höhere PR, insbesondere bei mit 20 Gy exponierten Tieren. Bei

40 Gy Exposition kam es zu einem deutlichen PR-Abfall, danach bei 60 Gy Exposition zu einem leichten Wiederanstieg der PR. Bei der 12-Monats-LR kam es nur zu geringen PR-Änderungen beim Vergleich zu Kontrollen und zwischen den verschiedenen RT-Dosisgruppen. Dadurch waren die PR-Profile der 6-Monats-LR und der 12-Monats-LR in Abhängigkeit von der RT signifikant verschieden ($p = 0.002$). Vor allem durch die höhere PR nach 20 Gy-Exposition bei der 6-Monats-LR wurden RT-Dosisgruppenunterschiede deutlich. So lag die PR nach 20 Gy-Exposition signifikant höher als nach 60 Gy-Exposition ($p = 0.02$) und deutlich tendenziell höher als nach 40 Gy-Exposition ($p = 0.06$). Bei der Auswertung der PR in der **GSL links** waren weder die LR (n. s.: $p = 0.1$) noch die verschiedenen RT-Dosisgruppen (n. s.: $p = 0.2$) statistisch erheblich. Auffällig war lediglich eine tendenziell gering erhöhte PR bei 60 Gy exponierten Drüsen, die 6 Monate nach abgeschlossener RT exploriert wurden. Ebenso zeigten sich ähnliche PR-Profile der 6-Monats-LR und 12-Monats-LR als Funktion der RT ($p = 0.3$, n. s.). Die **GSL rechts** zeigte tendenziell höhere PR bei Drüsen (insbesondere nach 60 Gy-Exposition), die 6 Monate nach abgeschlossener RT exploriert wurden (n. s.: $p = 0.06$). Ansonsten konnten weder RT-Effekte (n. s.: $p = 0.4$) noch differente PR-Profile der 6-Monats-LR und 12-Monats-LR als Funktion der RT (n. s.: $p = 0.4$) befundet werden.

Interaktionsvariablen Hier wurden im Sinne von Interaktionsvariablen, welche jede LR mit jeder RT-Dosisgruppe kombinierten, für die jeweilige Drüse 6 Gruppen gebildet und die PR-Werte verglichen (**Tab. 46 im Anhang**). Bei der **GSM links** ergaben sich zwischen den Gruppen deutliche tendenzielle Unterschiede (n. s.: $p = 0.05$), wobei wiederum die auffällig hohe PR nach 20 Gy-Exposition bei der 6-Monats-LR zu bemerken war. In der Bonferroni-Adjustierung konnte jedoch keine Signifikanz spezifiziert werden. Bei der **GSM rechts** hingegen ergab der Gruppenvergleich global deutliche Unterschiede ($p = 0.0001$), welche mittels Bonferroni-Adjustierung subspezifiziert werden konnten. Hier stach besonders die höhere PR bei mit 20 Gy exponierten Tieren heraus, die nach einer LR von 6 Monaten exploriert wurden. Diese PR lag signifikant höher als alle anderen Gruppenwerte (6 Monate 20 Gy vs. 6 Monate 40 Gy: $p = 0.001$, vs. 6 Monate 60 Gy: $p = 0.006$, vs. 12 Monate 20 Gy: $p = 0.0001$, vs. 12 Monate 40 Gy: $p = 0.0001$, vs. 12 Monate 60 Gy: $p = 0.0001$). Weitere Gruppenunterschiede waren nicht feststellbar. Bei **beiden GSL** waren weder globale (GSL links: $p = 0.2$, GSL rechts: $p = 0.2$, n. s.) noch subspezifische Gruppenunterschiede anhand der Bonferroni-Adjustierung nachweisbar, obschon auch hier die etwas höhere PR bei 60 Gy exponierten Drüsen, die 6 Monate nach abgeschlossener RT exploriert wurden, auffiel.

In *deskriptiver* Beschreibung der PR-Profile (**Abb. 29a im Anhang**) in Abhängigkeit von den Interaktionsvariablen kann formuliert werden, dass bei den GSM, die nach 6 Monate nach abgeschlossener RT untersucht wurden, eine erhöhte PR bei mit 20 Gy und 60 Gy (**Abb. 29b im Anhang**) bestrahlten Tieren auffiel, die im Zeitverlauf wieder abfiel, indem sich die PR bei den Tieren, die nach einer Latenz von 12 Monaten exploriert wurden, den Vergleichswerten von unbestrahlten GSM näherte. Bei den GSL war besonders die gesteigerte PR bei mit 60 Gy exponierten Tieren auffällig, die nach der 6-Monats-LR untersucht wurden.

Zusammenfassend fanden sich in den GSM höhere PR-Werte als in den GSL. Mehr in den GSM (besonders in der linken GSM nach 20 Gy-Exposition), geringer in den GSL, war die PR 6 Monate nach abgeschlossener RT höher als 12 Monate nach RT. Ein zusätzlicher Alterseffekt war nicht zu belegen.

4. 2. 2 Extrakranielle Tumoren

Tumortypverteilungsmuster und Ursprungsort Die im Rahmen der gesamten Bestrahlungsexperimente beobachteten TM (n = 23) traten einerseits „spontan“, andererseits mit unterschiedlichen Latenzen nach einer vorangegangenen RT auf. Bis auf einen TM, der nach vorheriger Exposition mit 40 Gray auftrat, entstanden die übrigen TM bei zuvor bestrahlten Tieren nach 60 Gray-Exposition. Hinsichtlich der Ursprungsgewebe konnten verschiedene Organstrukturen identifiziert (SD, Maxilla, Milchleiste) werden.

Wir fanden 9 benigne Tumoren. Hiervon entwickelte sich ein Tumor im Bereich der großen SD (GSM/Parotisdrüse) eines bestrahlten Tieres. Die anderen 8 benignen Tumore wuchsen bei nicht bestrahlten Tieren im Bereich der Milchleiste, die von der Axillar-bis in die Inguinalregion reicht. Neun maligne Tumore entstanden im Bereich der großen SD, weitere 3 maligne Neoplasien im Bereich der Milchleiste und weitere zwei im Bereich der Maxilla (**Tab. 47 im Anhang**).

Histologie Das histologische Bild der malignen Rattentumore unterschied sich von den aus humanen Geweben bekannten Strukturmustern und war schwierig zu interpretieren. Es konnten jedoch für die meisten TM Zuordnungen zu humanen TM-Entitäten wahrscheinlich gemacht werden.

Zwei adenoid-zystische Karzinome [(ACC), am ehesten einem glandulär-kribriformen Subtyp entsprechend], zwei Zystadenokarzinome, ein mikrozystisches Adenokarzinom und vier Plattenepithelkarzinome (PECA), die von den großen SD ausgingen, und ein PECA, das im Bereich der Maxilla beobachtet wurde, entwickelten sich im Strahlenfeld. Ein mikrozystisches Adenokarzinom, ein ACC und ein Adenokarzinom mit sebazöser Differenzierung ausgehend von der Milchleiste und ein PECA ausgehend vom Maxillabereich wurden bei nicht bestrahlten Tieren außerhalb der linksseitigen Kopfhalsregion gefunden. Die benignen Tumoren waren Fibrome oder Fibroadenome, zumeist begleitet von einer diffusen Fibrose und Sklerose des Milchleistengewebes. Die **Feinstruktur** wurde **im Anhang** näher beschrieben.

Immunhistologie (CK) Die CK-Verteilungsmuster wurden in **Tab. 48 im Anhang** zusammengefasst dargestellt. Bei den ACC fanden sich überwiegend moderate CK 17/19-Immunreaktivitäten (**Abb. 30 im Anhang**) in GE bzw. GE-Strukturen, wohingegen Reaktionen sonst fehlten. Mit dem AK K8.12 wurden die CK 13/15/16 intensiv in MYO gefärbt, basale Zellen von GE reagierten leicht mit diesem AK. Der CK 7-AK zeigte keine Reaktionen bei dieser Tumorentität. CK 5/6 war moderat bis stark in MYO und Basalzellen von GE nachweisbar. Der CK 8/18-Nachweis war auf basale Zellen von GE beschränkt (sehr zarte bis leichte Reaktion). In den **Zystadenokarzinomen** wurden die GE-Strukturen kräftig mit dem CK 17/19-AK gefärbt. Der AK K8.12 (gegen CK 13/15/16) reagierte leicht bis moderat bei Basalzellen von GE und bei MYO. Der CK 7-AK reagierte

schwach im Zytoplasma von GE, während CK 8/18 bei GE leicht bis moderat immunreaktiv war. MYO und Basalzellen von GE wurden deutlich positiv mit CK 5/6-AK gefärbt (moderate bis starke Färbeintensität). Das im Strahlenfeld gelegene **mikrozystische Adenokarzinom** zeigte im Bereich der GE starke Reaktionen mit dem AK E3 (gegen CK 17/19). MYO wurden intensiv mit CK 13/15/16-AK (AK K8.12) gefärbt. Andererseits reagierte dieser AK (gegen CK 13/15/16) nur schwach in GE, hier wurden nur einige basale Zellen fokal gefärbt. Die CK 7 und CK 8/18-Immunreaktionen blieben im Tumor nur schwach oder fokal nachweisbar. CK 5/6 war fokal leicht positiv in MYO und Basalzellen von GE. Das mikrozystische Adenokarzinom, das außerhalb der linken Kopf-Halsregion beobachtet wurde, zeigte positive Immunreaktionen in MYO und Basalzellen von GE in moderater bis starker Ausprägung bei Verwendung von CK 5/6-AK. CK 17/19 und CK 8/18 war in GE leicht bis moderat nachweisbar. MYO wurden mit CK 13/15/16-AK moderat bis stark gefärbt, während Basalzellen von GE-Strukturen nur fokal reagierten. Bei dem **Adenokarzinom mit sebazöser Differenzierung** zeigten die Tumorzellen sehr zarte bis leichte CK 7-Immunreaktionen. CK 20 war negativ. Die anderen AK produzierten fokale Färbereaktionen in den Tumorzellformationen. Diese Reaktionen waren im allgemeinen nur schwach ausgeprägt. Bei den **PECA** war die CK 5/6-Immunreaktivität in den Tumorzellformationen deutlich nachweisbar. Daneben ergaben sich fokale Färbereaktionen mit CK 8/18-AK. CK 17/19-AK zeigten bei einem bestrahlten Tier starke Immunreaktionen und in dem einzelnen Fall des nicht bestrahlten Tieres schwache Immunreaktionen, wohin gegen die übrigen Fälle nicht reagierten. CK 7 und CK 13/15/16-Immunreaktionen waren negativ.

Die zur Darstellung zusätzlicher Marker genutzten AK (S-100, Glattnuskelaktin, Vimentin) wurden wegen häufiger recht wechselhafter, auch unspezifischer Reaktionen nicht mitausgewertet.

Immunhistologie (Kollagene) Zur Darstellung der allgemeinen, im weiteren Sinn BM-assoziierten ECM wurden die CIII-Reaktionen, zur Darstellung der BM wurden die CIV-Reaktionen ausgewertet. Das Verteilungsmuster wurde in **Tab. 49 im Anhang** zusammengefasst dargestellt.

Bei den **ACC** war CIII im Interstitium nachweisbar, hier kam es wechselnd deutlich zu einer Färbeverdichtung um MYO und GE. Daneben reagierten im Gewebe verteilte Mastzellen deutlich mit dem CIII-AK. Um GE zeigte sich eine nur schwache und linienförmige C IV-Expression, wobei im allgemeinen BM-Strukturen um angrenzende MYO nicht vermehrt zur Darstellung gelangten. Lediglich in einigen Arealen mit vermehrt myoepithelzellähnlichen Formationen zeigten sich etwas vermehrte CIV-Immunreaktionen. In größeren Pseudozysten waren im Lumen Substanzen nachweisbar, die mit dem CIV-AK reagierten. In den **Zystadenokarzinomen** zeigte sich eine leichte bis moderate positive Reaktion nach Anti-CIII-Inkubation, die an modifizierte MYO und an GE-Strukturen angrenzte und in das Interstitium übergang. Im Gewebe verteilte Mastzellen zeigten leichte CIII-Reaktionen. Eine moderate bis starke BM-Färbereaktion, die teilweise fragmentiert erschien, wurde nach Anti-CIV-Inkubation beobachtet (**Abb. 31 im Anhang**). Zusätzlich kamen auch mehr verbreiterte kontinuierliche BM-Immunreaktionen zur Darstellung. Darüber hinaus fanden sich fokal CIV-positive BM-Konglomerate im Interstitium. Bei den **mikrozystischen Adenokarzinomen** war CIII im Interstitium

sehr zart bis leicht nachweisbar, auch hier kam es zu Färbeverdichtungen in der Umgebung von MYO und GE. CIV war bei dieser Tumorentität intensiver darstellbar, teilweise waren kontinuierliche und verbreiterte BM-Reaktionen um GE-Strukturen und MYO nachweisbar. Allerdings kam es in mehr anaplastischen Tumorregionen zu Unterbrechungen, Fragmentierungen oder Verlusten der BM. Ebenso fanden sich fokale CIV-Immunreaktivitäten im Interstitium im Sinne von CIV positiven Konglomeraten. Bei dem **Adenokarzinom mit sezäoser Differenzierung** war die Immunreaktivität für die untersuchten Kollagene sehr schwach und diskontinuierlich in der Umgebung der Tumorzellen. In einigen Fällen der Adenokarzinome traten modifizierte MYO fokal in den Vordergrund. In diesen Arealen fanden sich etwas vermehrte CIII und CIV-Expressionen. Bei den **PECA** war CIII im Interstitium sehr zart bis leicht nachweisbar. Daneben kam es jedoch unmittelbar an die Tumorzellformationen angrenzenden Stroma zu gelegentlich stärkeren, bandartigen CIII-Immunreaktivitätsverdichtungen. Ebenso wurden miterfasste, angrenzende Nervengewebsstrukturen z. T. stark gefärbt. Im Gegensatz dazu zeigten weniger differenzierte Tumoranteile Unterbrechungen, Fragmentierungen oder auch Verluste von CIII. Die CIV-Expression um Tumorzellverbände fehlte in den meisten Fällen. Lediglich fokal ließen sich einzelne Fragmente sehr zart bis leicht nachweisen. Nervengewebsstrukturen waren ebenfalls fokal positiv für CIV-AK.

4. 2. 3 Intrakranielle Tumoren (Hypophysenadenome)

Um mögliche zerebrale Strahlenschäden zu erfassen bzw. auszuschließen, wurden im Rahmen der Hauptversuche routinemäßig Hirnsektionen ausgeführt. Nach Autopsie hatten 9 Tiere (15%) ein Hypophysenadenom entwickelt. Die TM hatten zum Teil eine beträchtliche Größe erreicht und das Hirn erheblich verdrängt. Dennoch war nur ein Tier vor der Untersuchung neurologisch auffällig gewesen (Ataxie). Alle übrigen Befunde waren Zufallsbefunde während der Obduktion.

In 8 Fällen hatten die Adenome das ursprüngliche Drüsengewebe fast vollständig verdrängt. Vitale Einblutungen in den TM waren ebenfalls in 8 Fällen nachzuweisen, in 4 Fällen in erheblichem Umfang (**Abb. 32 und 33 im Anhang**). Randständiges Normalgewebe der Drüse konnte in 8 Fällen ausgewertet werden, in einem Fall zusätzlich Anteile der Neurohypophyse. Der Aufbau der TM war in 5 Fällen solide (**Abb. 34 im Anhang**). Bei den übrigen 4 TM war der Aufbau teilweise papillär, alveolär, zystisch oder kribriform (jeweils ein Fall). Die PR der TM war überraschend hoch (bis zu 40 oder 50%, **Abb. 35 im Anhang**). Die Nekroserate war in der Mehrzahl der TM gering. Nur 2 Fälle hatten eine Rate über 5%. Nach Inkubation mit anti-humanen Seren war die Hormonproduktion (GH = Gonadotropes Hormon, ACTH = Adrenokortikotropes Hormon, TSH = Thyreotropes Hormon, FSH = Follikelstimulierendes Hormon, LH = Luteinisierendes Hormon, PRL = Prolaktin) in dem residualen Normalgewebe nachweisbar. Jedoch konnten nur 2 der Adenome nach dieser Untersuchung als hormonproduzierend gelten (1x GH, 1x GH und PRL). Zusätzlich wurden die TM mit rattenspezifischen Anti-Seren inkubiert (**Abb. 36 im Anhang**). Die Befunde an den Normalgeweben der Drüse sowie den beiden immunreaktiven Adenomen wurden bestätigt. Zusätzlich zeigte sich das GH-produzierende

Adenom jetzt auch als PRL-sezernierend. Der GH- und PRL-sezernierende Tumor produzierte auch TSH. Weitere 3 TM erwiesen sich als hormonproduzierend (1x GH, 2x TSH). Die Ergebnisse fasst **Tab. 50 im Anhang** zusammen.

4. 2. 4 Larynx und Trachea

Anatomie und Histologie Die Übersichtsanatomie des knorpeligen Larynx ist in **Abb. 37a** dargestellt. Das untersuchte Knorpelgerüst bestand aus 5 Anteilen: Cartilago thyreoidea („Thyreoid“), Cartilago cricoidea („Krikoid“), Cartilagine arytaenoideae (den paarigen Aryknorpeln), der Cartilago epiglottica (Epiglottis) und dem u-förmigen Knorpel kranio-ventral der vorderen Kommissur.

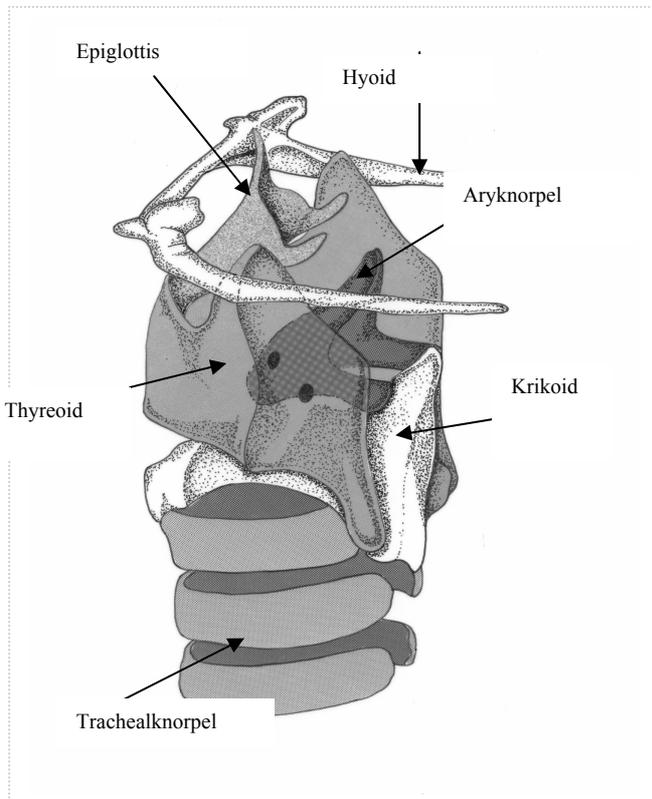
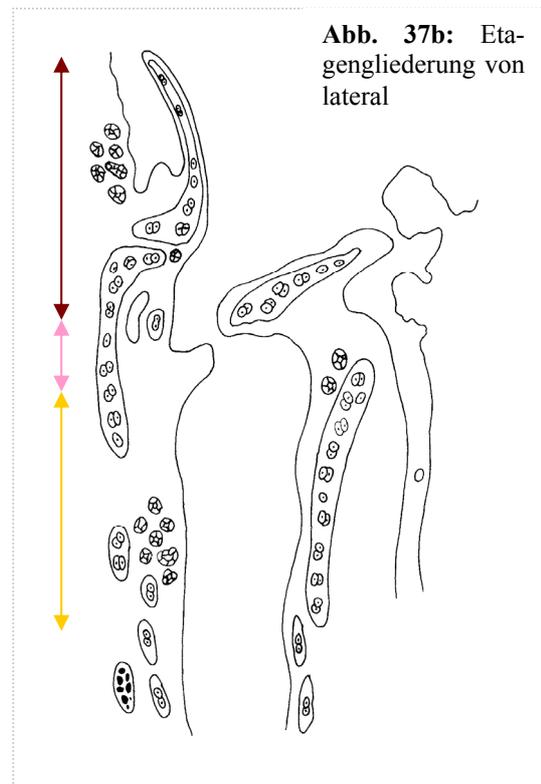


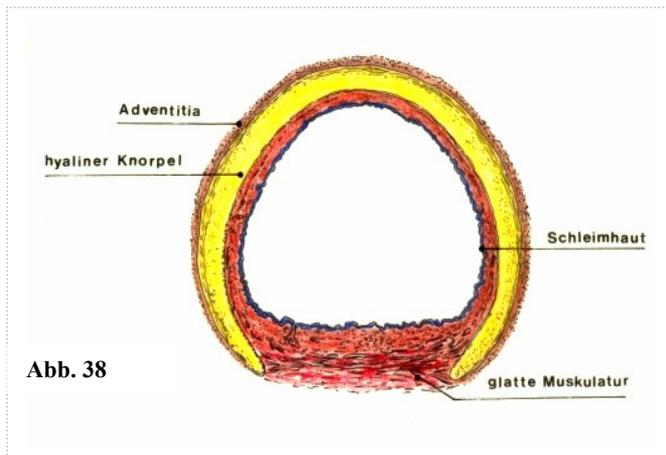
Abb. 37a: Schematische Darstellung des knorpeligen Larynxskelettes (nach Hebel & Stromberg 1986)



Die regionale Einteilung orientierte sich an der humangebräuchlichen Etagengliederung (**Abb. 37b**) Hier

wurden der Glottisbereich (**SL-Ebene**) vom **supraglottischen / epilaryngealen Bereich** (Aditus laryngis bis zur kranialen Grenze des Glottisbereiches) und vom **subglottischen Bereich** (kaudale Grenze des Glottisbereiches bis zur Unterkante des Ringknorpels) unterschieden (Lippert 1990, TNM-Klassifikation 1997). Taschenfalten fanden sich im Rattenlarynx nicht. Medial des Thyreoids und lateral der Aryknorpelgegend lag der Sinus piriformis (SIP). Kranial und dorsal des SIP waren oft weitere Pharynxanteile mit angeschnitten. Dorsale Anteile im Glottisniveau bezeichneten den Bereich zwischen den Proc. vocales und der hinteren Kommissur, ventrale Anteile den Bereich zwischen den Proc. vocales und der vorderen Kommissur. Unmittelbar vor der vorderen Kommissur fanden sich oberhalb der SL die von Lewis & Prentice (1980) beschriebenen Schleimhautaussackungen („ventral

pouch“). Hier war auch der von diesen Autoren beschriebene u-förmige schmale Knorpel wenigstens teilweise darstellbar.



Die Übersichtsanatomie der Trachea ist in **Abb. 38** dargestellt und entspricht in ihrer regionalen Einteilung humanen Verhältnissen. Der kraniale Schnitttrand schloss in der Regel die 3. und 4. Trachealspange mit ein.

Bei den **laryngealen Muskeln** konnten der M. cricoarytaenoideus posterior („Posticus“), der M. cricoarytaenoideus

lateralis („Lateralis“) und der M thyreoarytaenoideus mit seinem medialen Anteil = M. vocalis („Vocalis“) und lateralen Anteil dargestellt werden; der M. cricothyreoideus („Anticus“) und die interarytaenoidale Muskulatur waren ebenfalls darstellbar, lagen jedoch aufgrund der gewählten fronto bzw. koronaren Schnittführung mit gelegentlich etwas schrägem Anschnitt manchmal außerhalb der Schnittebene. Im **supraglottischen Niveau** wurden einerseits Fasergruppen von den Aryknorpeln bzw. vom Thyreoid zur Epiglottis (Mm. ary- bzw. thyroepiglottici), andererseits (und damit streng genommen außerhalb der Supraglottis-Region) auch extralaryngeale Muskulatur (Fasergruppen einem M. thyreohyoideus entsprechend) und/oder mitangeschnittene Pharynxmuskulatur (M. constrictor pharyngis inferior, Pars thyreopharyngea = M. thyreopharyngeus) miterfasst. Die sonstige prälaryngeale Muskulatur (Mm. sternohyoidei, sternothyreoiden, omohyoidei) war zur besseren Darstellbarkeit des Laryngo-Tracheal-Präparates bereits bei der Entnahme separiert worden und geht nicht in diese Auswertung ein. Im **subglottischen Niveau** konnten z. T. auch Faserverläufe des M. constrictor pharyngis inferior (Pars cricopharyngea = M. cricopharyngeus) an der Außenseite des Krikoids dargestellt werden. Die subtile Identifizierung der einzelnen Muskelgruppen der supra- und subglottischen Region bzw. des supra- und subglottischen Niveaus war im Einzelfall gelegentlich schwierig und gelang nicht immer vollständig.

Regelmäßig fanden sich im gesamten Präparat feine Nervenäste. Diese waren im M thyreoarytaenoideus/M. vocalis besonders fein (Endäste N. laryngeus inferior = N. recurrens). Kaudo-medial des Bodens des SIP zeigten sich auch kräftigere Nervenfasern (Äste des N. laryngeus superior). Dorso-lateral der Trachea, dorso-medial der Schilddrüse und latero-ventral des Ösophagus war der N. recurrens zusammen mit einer begleitenden Arterie (A. thyroidea inferior) und kleineren Venen gut darstellbar. Diese Nervenfasern waren überwiegend markhaltig. Daneben zeigten sich kleinere, markarme bis marklose, nicht immer gut identifizierbare Nervenzellansammlungen (ganglionäre Plexus), die v. a. dorsal der Trachealmuskulatur und in der Nähe der submukösen Drüsenepithelien lokalisiert waren (Chiang & Gabella 1986, Jones et al. 1980).

Das Interstitium bestand zumeist aus lockerem Bindegewebe, das sich in der Tiefe im Bereich der Knorpel etwas verdichtete. Im Bereich der SL konnte subepithelial eine nicht streng geschichtete Lamina propria abgegrenzt werden, die bei Humangeweben den Arealen des Reinke-Raumes und des Ligamentum vocale entsprechen dürfte. Im kranialen Randbereich der Lamina propria mit Richtung zur SL-Oberkante taten sich mitunter schmale Bindegewebsspalten auf, die diesem Reinke-Raum zugeordnet werden könnten. Lateral der Lamina propria grenzte der M thyreoarytaenoideus an.

Epithelien Im Laryngo-Trachealpräparat fanden sich verschiedene Epitheltypen. Im Glottisbereich (insbesondere i. B. der medialen SL-Kante) handelte es sich um unverhorntes, mehrschichtiges PE. Unmittelbar darüber (kranial in Richtung Supraglottis und Epilarynx) oder darunter (kaudal in Richtung Subglottis und Trachea) fand sich ein sogenanntes „Indifferenzepithel“. Dieses Indifferenzepithel hatte einerseits einen mehr kuboidalen Charakter (ein bis drei Zellreihen, kubisches bis zylindrisches Epithel mit mehr runden Zellkernen, ohne Flimmerhärchen; vorwiegend supraglottisch), andererseits einen mehr plattenepithelähnlichen, „squamoiden“ Charakter (ein bis drei Zellschichten, abgeflachtes, zum Teil auch mehr oder weniger gefaltetes Epithel mit mehr flachen Kernen, ohne Flimmerhärchen; vorwiegend subglottisch). Weiter kranial in Richtung Epilarynx ging das supraglottische kuboidale Indifferenzepithel in ventraleren Anteilen in ein respiratorisches Epithel (mehrschichtiges Flimmerepithel) und noch weiter kranial in Richtung der Epiglottisoberkante in ein unverhorntes PE über. Gelegentlich waren diese Epitheltypen auch mehr inselartig vorhanden. In dorsaleren Anteilen ging das supraglottische kuboidale Indifferenzepithel, besonders im Bereich der Aryknorpel, in ein squamoides Indifferenzepithel (mehr im Bereich der ventro-medialen und kranialen Aryknorpelanteile) oder in ein unverhorntes, mehrschichtiges PE (überwiegend im Bereich der lateralen und dorso-kaudalen Aryknorpelanteile) über. Das subglottische Indifferenzepithel (mehr squamoider Typ) ging kaudal in das respiratorische Flimmerepithel der Trachea über.

Die Schleimhaut des SIP und weiterer angeschnittener Pharynxanteile und des Ösophagus bestand aus wechselnden Anteilen nicht bis schwach verhornender (vorwiegend Pharynx) bzw. nicht bis mäßig verhornender PE (vorwiegend Ösophagus). Diese intraregionalen Differenzen wurden auch für weiter oral gelegene Epithelien der Ratte beschrieben (Reibel 1987).

Regelmäßig fanden sich submuköse, in Gruppen liegende gemischte Drüsen, die im Bereich des Pharynx und im Bereich der Supraglottis überwiegend muköser und im Bereich der Subglottis und Trachea überwiegend gemischter (serös-mukoid) Natur waren. Subglottisch und tracheal waren auch fokal seröse Drüsengruppen eingestreut. Sehr selten kamen auch im Glottisbereich einzelne Drüsenazini zur Darstellung.

Histologie der Strahlenreaktionen Bei bestrahlten Tieren kam es insgesamt zu leichten bis z. T. moderaten Veränderungen. Dabei waren die Befunde bei den einzelnen Dosisgruppen unterschiedlich häufig und unterschiedlich deutlich ausgeprägt. Bei bestrahlten Tieren zeigten sich im Vergleich zu Kontrollen überwiegend bis geringgradig ausgeprägte subepitheliale lymphozytäre Infiltrate ($p =$

0.001), subepitheliale Lymphektasien ($p = 0.0001$), subepitheliale Verquellungen und Auflockerungen im Sinne von Ödemen (p für beide = 0.0001), interstitielle Lymphozyteninfiltrate ($p = 0.03$), interstitielle Ödeme ($p = 0.0001$) und flächenhafte Fibrosezonen ($p = 0.0001$). Gering- bis mittelgradig ausgeprägte Veränderungen betrafen die subglottischen und trachealen serös-mukoiden Drüsen (p für beide = 0.0001) mit fokaler Drüsenatrophie, Dilatationen der AZ und Drüsengänge, Gangepithelmetaplasien und umgebender periglandulärer Fibrose. Dies entsprach einem Übergangsstadium S 1-2 (modif. Klassifikation nach Seifert 1996). Bis zu mittelgradig ausgeprägt waren Fibrosen und Lymphozyteninfiltrationen im Bereich der Schilddrüse ($p = 0.0001$), Blutgefäßdilatationen ($p = 0.0001$) und allgemeine Lymphektasien ($p = 0.0001$). Weiterhin fanden sich auffällige supraglottische pseudopapilläre Formationen (PPF) mit subepithelialer ödematöser Auflockerung bei bestrahlten Tieren (**Abb. 39.1 und 39.2 im Anhang**). Diese waren überwiegend gering- bis mittelgradig, in einzelnen Schnitten jedoch auch stärker ausgeprägt. Obwohl die PPF mit steigender Dosis häufiger (22% nach 20 Gy-, 33% nach 40 Gy- und 70% nach 60 Gy-Exposition) und ausgeprägter waren, ließ sich nur eine tendenzielle positive Dosiskorrelation ($p = 0.05$) belegen. Für die o. g. Befunde konnten weiterhin recht unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen nachgewiesen werden.

Ein geringerer Teil der Befunde (klassifizierte Drüsenveränderungen und allgemeine Lymphektasien) war im Vergleich zu Kontrollen bzw. zur 20 Gy-Expositionsgruppe nach 40 Gy – ($p = 0.0001$ bzw. $p = 0.0001$) und 60 Gy-Exposition ($p = 0.0001$ bzw. $p = 0.0001$) ähnlich deutlich ausgeprägt.

Häufiger fanden sich Befunde, die bereits nach 20 Gy-Exposition auftraten, oberhalb dieser Dosis noch zunahmen und insbesondere nach 40 Gy-Exposition einen peak-artigen Ausprägungslevel aufwiesen. Dies galt für subepitheliale Lymphektasien (Kontrollen vs. 20 Gy/40 Gy/60 Gy: $p = 0.0001$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.001$), interstitielle Ödeme (Kontrollen vs. 20 Gy: $p = 0.03$ /40 Gy: $p = 0.001$ /60 Gy: $p = 0.01$, 20 vs. 40 Gy: $p = 0.0001$, 40 vs. 60 Gy: $p = 0.0001$) und Blutgefäßdilatationen (Kontrollen vs. 20 Gy: $p = 0.002$ /40 Gy/60 Gy: $p = 0.0001$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.0001$).

Andere Befunde ließen sich erst oberhalb von 20 Gy-Exposition nach 40 Gy- und 60 Gy-Strahlenexposition nachweisen. Hier kam es einerseits beim Vergleich der 40 Gy- zur 60 Gy-RT-Dosisgruppe zu einem weiteren Anstieg der Nachweisbarkeit bzw. Ausprägung, andererseits zu einer mehr peak-artigen Ausprägung bei der 40 Gy-Expositionsgruppe. So waren subepitheliale Lymphozyteninfiltrate (Kontrollen vs. 40 Gy: $p = 0.01$ /60 Gy: $p = 0.02$, 20 vs. 40 Gy: $p = 0.005$ /60 Gy: $p = 0.0001$), interstitielle Fibrosen (Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.0001$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.0001$) und Bindegewebsvermehrungen um Drüsenstrukturen (Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.001$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.0001$) nach 60 Gy-Exposition am deutlichsten zu verzeichnen. Mehr peak-artige Ausprägungslevel nach 40 Gy-Exposition zeigten subepitheliale Ödeme (Kontrollen vs. 40 Gy: $p = 0.0001$ /60 Gy: $p = 0.001$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.0001$), fokale Drüsenatrophien (Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy: 0.0001, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.0001$) und Bindegewebsvermehrungen i. B. der Schilddrüse mit begleitenden Lymphozyteninfiltraten (Kontrollen vs. 40 Gy: $p = 0.01$ /60 Gy: $p = 0.04$, 20 vs. 40 Gy: $p = 0.0001$ /60 Gy: $p = 0.002$).

Durch sehr geringe Nachweise nach 20 Gy-Exposition (geringer als Kontrollen: $p = 0.04$) fielen speziell Dilatationen der submukösen Drüsen und Drüsengänge (v. a. subglottisch und im Trachealabschnitt) bei der 40 Gy- und zum Teil 60 Gy-RT-Dosisgruppe auf (20 vs. 40 Gy: $p = 0.0001/60$ Gy: $p = 0.001$). **Tab. 51 im Anhang** fasst die Befunde zusammen. Bezüglich des Alters oder der LR fanden sich keine signifikanten Effekte.

Gravierendere radiogene Veränderungen traten nicht auf. Es ergab sich kein Anhalt für ausgedehnte Epithelmetaplasien, vermehrte Epithelverhornungen oder schwere Epithelatrophien der auskleidenden Schleimhäute. Teilweise fanden sich PE-Metaplasien i. B. der Schilddrüse und der trachealen Drüsen. Daneben fehlten weitestgehend Leukozyteninfiltrate. Es zeigten sich auch keine Hinweise auf schwere interstitielle Sklerosen und Lipomatosen, schwerwiegende Ösophagusveränderungen (Atrophie, Zellinfiltrate, Fibrosen), Nervenveränderungen, Intimaproliferationen, Blutgefäßsklerosen, -stenosen oder -thromben, Lymphgefäßstenosen, schwerwiegende Perichondriumveränderungen (Sklerosen) oder Knorpelveränderungen (Entzündungen, Nekrosen) oder einen schwerwiegenden substantiellen Gewebebau.

Immunhistologie (CK /IF-Proteine) CK 13 Es waren bei unbestrahlten Tieren (**Abb. 40.1 im Anhang**) positive Reaktionen der Glottisschleimhaut (nichtverhornendes PE: suprabasal sehr zarte bis leichte Färbungen), der supra- und subglottischen Schleimhaut (Indifferenzepithel des kuboiden Typs und des squamoiden Typs: sehr zarte Reaktionen), der submukösen Drüsen (i. B. des Kehlkopfes und der Trachea: sehr zarte Reaktionen), der Schleimhaut (SH) an der Außenseite der aryepiglottischen Falte mit Übergang in die SIP-SH (nichtverhornendes PE: leichte Reaktionen), der Hypopharynx-SH (nicht bis schwach verhornendes PE i. B. des SIP: leichte bis moderate Reaktionen), der Ösophagus-SH (nicht bis moderat verhornendes PE: leichte bis moderate Reaktionen) nachweisbar. Es waren keine Färbungen bei respiratorischen-zilientragenden Epithelien oder mesenchymalen Zellen festzustellen. Bei den bei bestrahlten Tieren nachweisbaren PPF zeigten zusätzlich kuboidale Indifferenzzellen sehr zarte, dosisunabhängige Reaktionen. PE-Metaplasien i. B. der Schilddrüse waren CK 13-positiv (**Abb. 40.3 im Anhang**) Ansonsten waren bei bestrahlten Tieren keine zusätzlichen positiven Expressionen festzustellen. Die positiven Ergebnisse für kuboidale und squamoide Zellen nach Schlage et al. (1998) bzw. Transitionalzellen nach Stosiek et al. (1991) wurden somit bestätigt bzw. ergänzt bezüglich der plattenepithelialen Reaktionen. In Abhängigkeit von der RT ergaben sich im wesentlichen keine nennenswerten oder signifikanten Veränderungen des Expressionsmusters (außer bei den PPF). Lediglich in der Glottis-SH (**Tab. 52, Abb. 40.2, im Anhang**) konnte ein genereller RT-Effekt ($p = 0.01$) mit abnehmender Expression bei zunehmender Dosis aufgezeigt werden. Nach der Bonferroni-Adjustierung war v. a. die Expressionsabnahme bei der höchsten Dosis (60 Gy) im Vergleich zur mittleren 40 Gy-Dosis ($p = 0.03$) auffällig. Alter und Latenz zeigten keine signifikanten Effekte auf das Färbereaktionsverhalten.

CK 17/19 Bei Kontrollen (unbestrahlte Tiere, **Abb. 41.1 im Anhang**) zeigten sich Expressionen der supra- und subglottischen SH (respiratorisches, ziliotragendes Epithel: sehr zarte bis leichte Reaktionen, Indifferenzepithel vom kuboidalen Typ und vom squamoiden Typ: sehr zarte bis leichte Reaktionen), der submukösen Drüsengänge (i. B. des Kehlkopfes und der Trachea: leichte Reaktionen), der SH an der Innenseite der aryepiglottischen Falte (respiratorisches Epithel: sehr zarte Reaktionen), der Tracheal-SH (respiratorisches Epithel: sehr zarte Reaktionen), der Thyreozyten (sehr zarte Reaktionen) sowie z. T. der Ösophagus-SH (basalbetont, un- bis moderat verhorntes Plattenepithel: 60 % sehr zarte Reaktionen, 40 % negative Reaktionen). Zweifelhaft blieben Reaktionen der Glottis- und Hypopharynx-SH (nicht verhornendes PE: bei 40 % allenfalls sehr zarte Reaktionen), der Außenseite der aryepiglottischen Falte (nicht bis schwach verhornendes PE: bei 20 % allenfalls sehr zarte Reaktionen) und der AZ (weitgehend negativ, vereinzelt sehr zarte Reaktion). Bei bestrahlten Tieren (**Abb. 41.2 im Anhang**) fanden sich an einzelnen Lokalisationen RT-abhängige Effekte. So kam es i. B. der supraglottischen und subglottischen respiratorischen SH zu dosisabhängigen unterschiedlichen Färbereaktionen ($p = 0.009$) mit Expressionsabnahmen, die im Vergleich zu Kontrollen nach der Bonferroni-Adjustierung besonders bei mit 20 Gy exponierten ($p = 0.01$) und mit 60 Gy exponierten Tieren ($p = 0.01$) auffiel. Auch die respiratorische SH an der Innenseite der aryepiglottischen Falte und z. T. Indifferenzepithelien (**Tab. 53, Abb. 41.1-3 im Anhang**) zeigten dosisabhängige, unterschiedliche Färbungen ($p = 0.02$), wobei sich bis zu einer Exposition von 40 Gy eine Reaktivitätszunahme (n. s.) ergab. Wesentlicher war eine Expressionsabnahme beim Vergleich der Reaktionen nach 60 Gy - gegenüber denen nach 40 Gy-Exposition ($p = 0.03$). Das die PPF überziehende Indifferenzepithel zeigte dosisunabhängig sehr zarte bis leichte Reaktionen bei Einzelzellen vom kuboiden Typ. Zum Teil kam es bei Lokalisationen, die bei Kontrollen nicht eindeutige Expressionen zeigten, zu etwas sichereren Färbereaktionen. So fanden sich an der Außenseite der aryepiglottischen Falte (un- bis schwach verhorntes PE) bei 20 Gy- und insbesondere bei 40 Gy-Exposition überwiegend sehr zarte, basalbetonte Expressionen, ebenso bei der Hypopharynx- und Ösophagus-SH (un- bis mäßig verhorntes PE). Bei 60 Gy-exponierten Tieren waren jedoch meist wieder negative Färbereaktionen festzustellen. Obwohl diesbezüglich die Reaktionsbeurteilung wegen der fraglichen Spezifität bzw. inkonstanten Expression in nicht bestrahlten Geweben eingeschränkt ist, ergab sich der Hinweis, dass die RT mit geringen und mittleren Dosen ein konstanteres basalbetontes Expressionsverhalten induzieren könne. Im Bereich der respiratorischen supra- und subglottischen SH bestanden verringerte Expressionen bei älteren Tieren ($p = 0.03$). Alter und LR zeigten ansonsten keine Effekte auf die Färbemuster.

CK 18 Bei den eigenen Präparaten waren supraglottische (respiratorische und beide Indifferenzepitheltypen: überwiegend moderate Reaktionen) und subglottische Epithelien (Indifferenzepithel vom squamoiden Typ und respiratorisches Epithel: moderate bis starke Reaktion) CK 18-positiv. Daneben waren auch muköse Drüsen (supraglottisch: leichte Reaktionen), gemischte serös-mukoide Drüsen (supraglottisch: moderate bis starke Reaktionen), subglottische (**Abb. 42.1 im Anhang**) und tracheale serös-mukoide Drüsen (moderate bis starke Reaktionen), respiratorische Epithelien an der Innenseite

der aryepiglottischen Falte (moderate bis starke Reaktionen) und die Tracheal-SH (starke Reaktionen) sowie Thyreozyten (moderate bis starke Reaktionen) immunreaktiv. Die glottale SH (unverhorntes PE) zeigte keine Reaktionen. Mesenchymale Zellen waren negativ. Im Vergleich zu Kontrollen fanden sich bei bestrahlten Tieren Expressionssteigerungen (**Tab. 54, Abb. 42.2 im Anhang**) der subglottischen Drüsen ($p = 0.03$), die v. a. nach 40 Gy- und 60 Gy-Exposition auffielen. Bei bestrahlten Tieren beobachtete PE-Metaplasien i. B. der Schilddrüse (\uparrow) waren CK 18-negativ (**Abb. 42.3 im Anhang**). Ansonsten zeigten sich bei bestrahlten Tieren einerseits tendenziell vermehrte CK 18-Expressionen (supra- und subglottische respiratorische SH, supraglottische serös-mukoide Drüsen, Thyreozyten: $p \geq 0.06$, n. s.) andererseits tendenziell verminderte Färbereaktionen (Trachea-SH, tracheale submukösen Drüsen, teilweise respiratorische Epithelien an der Innenseite der aryepiglottischen Falte: $p \geq 0.05$), besonders nach 20 Gy- und 40 Gy-Exposition und bei älteren Tieren. Auch bezüglich der LR fanden sich keine signifikanten Effekte.

Vimentin Im Kehlkopf-Trachealpräparat unbestrahlter Tiere fand sich eine positive Färbereaktion bei MZ (M. vocalis, supra- und subglottische MZ, hypopharyngeale Muskelzüge: überwiegend leichte Reaktionen, tracheale und ösophageale MZ: leichte Reaktionen, TME: überwiegend sehr zarte Reaktionen) und bei Bindegewebszellen bzw. Fibroblasten (i. B. der Lamina propria: überwiegend sehr zarte bis leichte Reaktionen, i. B. der Supra- und Subglottis, des Hypopharynx, der Ösophaguswand: sehr zarte Reaktionen, i. B. der Trachea: sehr zarte bis leichte Reaktionen, i. B. der Ösophagusadventitia, i. B. der Schilddrüsenkapsel/-septen: überwiegend sehr zarte Reaktionen, i. B. der AD: überwiegend leichte Reaktionen). Locker im Gewebe verteilte Fibroblasten wurden leicht gefärbt. Nervenfasern wurden durch die positiven Reaktionen von Bindegewebszellen im Hüllgewebe in der Regel gut dargestellt (glottale, supra- und subglottische, hypopharyngeale, ösophageale Fasern: überwiegend leichte Reaktionen). Der Rekurrensnerv zeigte in mehr zentraleren Abschnitten (Endo-/Perineurium) und im Randbereich (Epineurium) überwiegend leichte, epineural betonte Reaktionen (**Abb. 43.1 im Anhang**). Knorpelzellen (Kehlkopfknorpel: sehr zarte Reaktionen, Trachealknorpel: sehr zarte bis leichte Reaktionen), Perichondriumzellen (laryngeal, tracheal: leichte Reaktionen), Fettzellen (sehr zarte bis leichte Reaktionen) sowie Endothelzellen (leichte Reaktionen) und Kapillaren (überwiegend sehr zarte Reaktionen) exprimierten ebenfalls Vimentin. Bei bestrahlten Tieren (**Tab. 55 im Anhang**) kam es im Vergleich zu Kontrollen sowohl zu Expressionsabnahmen als auch -steigerungen. Reaktivitätsabnahmen betrafen den M. vocalis ($p = 0.03$), die supraglottische und subglottischen Muskulatur ($p = 0.04$), den Epiglottisknorpel ($p = 0.01$), die Hypopharynxmuskulatur ($p = 0.02$), das tracheale Bindegewebe ($p = 0.01$), die trachealen Muskeln ($p = 0.04$), den Trachealknorpel ($p = 0.01$), das Ösophagusbindegewebe ($p = 0.01$), die Ösophagusmuskeln ($p = 0.01$) und das Fettgewebe ($p = 0.02$). Bei Kapillaren, auch i. B. der Schilddrüse ($p = 0.004$), der AD ($p = 0.01$) und i. B. des N. recurrens ($p = 0.04$) kam es zu Expressionssteigerungen (**Abb. 43.2 im Anhang**). Bezüglich der Dosisabhängigkeit dieser Expressionsveränderungen ergab sich ein heterogenes Bild.

Bei den Lokalisationen bzw. Gewebestrukturen mit insgesamt abnehmender Expression fanden sich verschiedene Profilverläufe. Einerseits kam es bereits ab 20 Gy-Exposition zur Abnahme der Färbeintensität mit weitgehender Konstanz bis 60 Gy, d. h. zwischen 20 Gy- und 60 Gy-Dosisexposition bestanden keine nennenswerten Veränderungen. Dies war z. B. im M. vocalis (Kontrollen vs. 20 Gy/40 Gy/60 Gy: $p = 0.03$, 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy, 40 Gy vs. 60 Gy: n. s.), beim trachealen Bindegewebe (Kontrollen vs. 20 Gy/40 Gy/60 Gy: $p = 0.009/0.009/0.007$, 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy, 40 Gy vs. 60 Gy: n. s.), beim Trachealknorpel (Kontrollen vs. 20 Gy/40 Gy/60 Gy: $p = 0.06$ n. s./0.06 n. s./0.01, 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy, 40 Gy vs. 60 Gy: n. s.), beim ösophagealen Bindegewebe (Kontrollen vs. 20 Gy/40 Gy/60 Gy: $p \geq 0.05$, 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy, 40 Gy vs. 60 Gy: n. s.) und beim Fettgewebe (20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy, 40 Gy vs. 60 Gy: n. s.) auffällig. Andererseits fand sich ein mäßiger Abfall der Vimentin-Färbereaktion nach 20 Gy-Exposition, danach ein gewisser Wiederanstieg der Reaktivität nach 40 Gy-, gefolgt von einem neuerlichen Expressionsabfall nach 60 Gy-Exposition. Dies betraf z. B. supra- und subglottische Muskelgruppen (Kontrollen vs. 20 Gy: $p =$ n. s. 0.06, Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy und 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy, 40 Gy vs. 60 Gy: n. s.) und die Hypopharynxmuskulatur (Kontrollen vs. 20 Gy: $p = 0.05$, Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy und 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy, 40 Gy vs. 60 Gy: n. s.). Weiterhin zeigte sich nach einem mehr deutlichen Abfall der Expression nach 20 Gy-Exposition ein kontinuierlicher Wiederanstieg nach 40 Gy, mit weiterer Zunahme nach 60 Gy-Exposition. Dies galt im Bereich trachealer Muskeln (Kontrollen vs. 20 Gy: $p = 0.02$, Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy und 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy, 40 Gy vs. 60 Gy: n. s.) und ösophagealer Muskeln (Kontrollen vs. 20 Gy: $p = 0.02$, Kontrollen vs. 40 Gy: $p = 0.06$ n. s., Kontrollen vs. 60 Gy und 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy, 40 Gy vs. 60 Gy: n. s.). Bei z. T. mit angeschnittenen Knorpelgelenken konnte eine tendenzielle Abnahme der Expressivität zwischen 40 und 60 Gy exponierten Tieren beobachtet werden ($p \geq 0.05$).

Bei den Lokalisationen bzw. Gewebeabschnitten mit insgesamt vermehrter dosisabhängiger Vimentin-Expression bestanden zumeist bereits nach 20 Gy-Exposition vermehrte Reaktionen, die auch nach den höheren RT-Dosen nachweisbar waren. Dies galt v. a. für Kapillargefäße, auch i. B. der Schilddrüse (Kontrollen vs. 20 Gy/40 Gy/60 Gy: $p = 0.0001/0.002/0.0001$, 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy, 40 Gy vs. 60 Gy: n. s.). Auch i. B. des Rekurrensnerven erfasste Vimentin-Reaktionen mit insgesamt gesteigerter Färbeintensität im Vergleich zu Kontrollen ($p = 0.03$) und i. B. der AD ($p = 0.04$) ergab sich ein ähnliches Expressionsprofil mit relativ einheitlicher höherer Expression zwischen 20 und 60 Gy. Dies konnte jedoch im Fisher-Test bzw. bei der Bonferroni-Adjustierung nicht bestätigt werden.

Anhand der ausgewiesenen p-Werte beim dosisabhängigen Gruppenvergleich zur Charakterisierung des Expressionsverlaufs wird daher deutlich, dass einerseits der generelle RT-Effekt bei den einzelnen Lokalisationen auf unterschiedlichen dosisabhängigen Veränderungen beruhte und somit spezifiziert werden konnte, andererseits signifikante mehr generelle RT-abhängige Befunde nur marginal bzw. nicht signifikant verblieben. Eine echte Vimentin-Neoexpression (Positivität von in Normalgeweben negativen Zellen) in bestrahlten Geweben war nicht zu beobachten. Alter und LR zeigten keine signifikanten Effekte.

Immunhistologie (BM und BM-assoziierte Strukturen) Laminin Das BM-Protein Laminin war im Laryngotrachealpräparat zumeist kontinuierlich nachweisbar. Bei unbestrahlten Tieren (**Abb. 44.1 im Anhang**) ließen sich Färbereaktionen subepithelial (Glottis: sehr zarte Färbung, Supra- und Subglottis, i. B. der aryepiglottischen Falte, des Sinus piriformis, der Trachea und des Ösophagus: überwiegend sehr zarte Färbung), perifollikulär i. B. der Schilddrüse (sehr zarte Färbung), um MZ bzw. -fasern (M. thyreoarytaenoideus/M. vocalis, supraglottische und subglottische Muskelgruppen, i. B. des Sinus piriformis miterfasste Muskeln, Trachea- und Ösophagusmuskeln: überwiegend sehr zarte Färbungen), im Nervengewebe (glottale, supra- und subglottische Nervenäste, i. B. des Sinus piriformis, des Ösophagus sowie beim N. recurrens: leichte Färbereaktionen), um Drüsenazini und -gänge (supra- und subglottisch sowie i. B. der Trachea: sehr zarte Färbungen), im Perichondrium (laryngeal/tracheal: leichte Färbungen), um Fettgewebszellen (überwiegend leichte Färbungen) und bei Gefäßen (Schilddrüsenkapillaren: überwiegend sehr zarte Färbungen, sonst subendothelial: überwiegend leichte Färbungen, TME: sehr zarte Färbungen, AD: negativ) nachweisen. In der Multivarianzanalyse ergaben sich keine signifikant veränderten Expressionsprofile.

Univariat konnten jedoch RT-Effekte beim Vergleich zwischen den verschiedenen Dosisgruppen und zu Kontrollen an verschiedenen Lokalisationen (anatomischen Strukturen) herausgearbeitet werden. Es kam zu gering bis moderat ausgeprägten Expressionssteigerungen, insbesondere bei 60 Gy exponierten Tieren, aber auch zu Reaktivitätsfluktuationen (**Tab. 56 im Anhang**). So fanden sich im M. vocalis zwischen den Dosisgruppen unterschiedliche Reaktionen ($p = 0.009$) mit vermehrter Lamininexpression bei 60 Gy exponierten Tieren (Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.02$), was tendenziell auch bei geringerer RT-Dosis (20 Gy vs. 60 Gy/ 40 vs. 60 Gy: $p = 0.05$, n. s.) auffiel. Im feinen glottalen Nervengewebe zeigten sich bei über 20 Gy hinausgehender Exposition Expressionssteigerungen, die nach 60 Gy-Exposition am deutlichsten waren (Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.01$, 20 vs. 60 Gy. $p = 0.003$, 40 vs. 60 Gy, $p = 0.02$). Bei supraglottischen und subglottischen Drüsen, ebenso bei pharyngeal miterfassten submukösen Drüsen sowie subepithelial i. B. der Trachea erschien die Lamininreaktion ebenfalls besonders nach 60 Gy-Exposition verstärkt ($p = 0.05$, n. s.). Etwas deutlicher fielen Expressionssteigerungen i. B. der supraglottischen und subglottischen ($p = 0.04$, Bonferroni-Adjustierung: n. s.) sowie trachealen Muskulatur ($p = 0.01$, 20 vs. 60 Gy: $p = 0.01$), wiederum besonders nach Exposition mit 60 Gy, aus. Auch bei supraglottischen (**Abb. 44.2 im Anhang**) und subglottischen Nervenästen ($p = 0.04$, jedoch Bonferroni-Adjustierung: n. s.) und bei Ösophagusnervenästen ($p = 0.01$, 20 vs. 60 Gy, $p = 0.02$) waren bei 60 Gy exponierten Tieren sowie beim Rekurrensnerven (hier bereits nach 40 Gy-Exposition, $p = 0.04$, jedoch Bonferroni-Adjustierung: n. s.) verstärkte Lamininreaktionen auffällig. Gewisse positiv dosiskorrelierte Expressionssteigerungen zeigten sich auch bei Nervenästen i. B. des Sinus piriformis (r_s : $p = 0.01$) und bei der Ösophagusmuskulatur (r_s : $p = 0.01$, Bonferroni-Adjustierung: 20 vs. 60 Gy: $p = 0.05$, n. s.). Hingegen kam es subepithelial i. B. der Supraglottis zu recht deutlichen Reaktivitätsabnahmen bei 20 Gy und 40 Gy exponierten Tieren, wohingegen nach 60

Gy Exposition auch stärkere Lamininexpressionen auffielen ($p = 0.01$). Diese Fluktuation war auch subepithelial i. B. der Subglottis zu beobachten ($p = 0.03$).

Die bei der univariaten Auswertung berücksichtigte geringe Variabilität bestimmter Dosisgruppen an einigen der genannten Organstrukturen (subepithelial, um Drüsen, um laryngeale und tracheale Muskelgewebe) trug bei der Interpretation der Dosiseffekte zu den vorsichtig gewählten Formulierungen bei, da ein globaler RT-Effekt nicht sicher zu belegen war. Alter und Latenz waren unerheblich bei der Färbereaktionsbeurteilung.

Fibronektin Fibronektin als BM-assoziiertes Protein war im an die BM angrenzenden Stroma recht schwach und nicht immer kontinuierlich nachweisbar. Bei Kontrolltieren (**Abb. 45.1 im Anhang**) zeigten sich Immunreaktionen subepithelial (Glottis, Supra- und Subglottis, Außen- und Innenseite der aryepiglottischen Falte, Sinus piriformis: sehr zarte Reaktionen, Trachea: überwiegend sehr zarte Reaktionen, Ösophagus: überwiegend sehr zarte Reaktionen mit jedoch teilweise extrem schwachen bzw. negativen Reaktionen), um MZ bzw. -fasern (laryngeale Muskeln, Trachealmuskulatur: sehr zarte Reaktionen; Ösophaguskulatur: überwiegend sehr zarte Reaktionen), im Nervengewebe (laryngeale Nervenäste, Nervenäste i. B. des Sinus piriformis und des Ösophagus: sehr zarte Reaktionen, Rekurrensnerv: überwiegend sehr zarte Färbungen, epineural betont), im interstitiellen Bindegewebe (Trachea, Ösophagus: überwiegend sehr zarte Reaktionen, Glottis, Supra- und Subglottis, Sinus piriformis, Schilddrüse: sehr zarte Färbungen, nur äußerst spärlich in der Lamina propria der SL), um Drüsenazini und -gänge (Supra- und Subglottis, im Pharynx miterfasste Drüsen: sehr zarte Färbungen, Trachea: überwiegend sehr zarte Färbungen), im Perichondrium (laryngeal/tracheal: überwiegend leichte Reaktionen), i. B. der Ösophagus-Adventitia und der Schilddrüsenkapsel (überwiegend sehr zarte Färbungen), um Fettgewebszellen (sehr zarte Färbungen) sowie bei Gefäßen (subendothelial/TME/AD/Kapillaren: überwiegend sehr zarte Färbungen). Sehr zarte intrazelluläre Reaktionen fanden sich bei Infiltratzellen. Die sehr zarten Färbungen ließen an mögliche Fehlreaktionen denken. Da aber auch bei den Untersuchungen von Laurie et al. (1983) insgesamt schwache Fibronektinreaktionen i. B. der Rattentrachea auffielen bzw. bei den Befunden von Inoue & Leblond (1988) die Pars fibroreticularis nur inkonstant mit z. T. unterbrochenen Verankerungs-, Mikro- und Kollagenfibrillen darstellbar war, werteten wir unsere Befunde in diesem Sinne dennoch als positiv bzw. inkonstant.

In der multifaktoriellen, multivariaten Analyse konnten keine signifikanten Effekte befundet werden. Univariat ließen sich jedoch RT-Effekte darstellen. Vorherrschend waren geringe bis moderate Expressionssteigerungen und –verbreiterungen, v. a. nach 40 Gy und/oder 60 Gy-Exposition und teilweise Expressionsfluktuationen, v. a. im Sinne nur sehr geringer Immunreaktionen nach 20 Gy-Exposition. Durch diese verringerte Expression zeigten sich im Dosisgruppenvergleich Expressionssteigerungen nach 40 Gy und/oder 60 Gy-Strahlenexposition gegenüber der 20 Gy-Expositionsgruppe, aber auch im Vergleich zu Kontrollen (**Tab. 57, Abb. 45.2, im Anhang**). Dies galt für die subepitheliale Region i. B. der Glottis ($p = 0.01$, Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.04/0.04$, 20 Gy vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.04/0.04$), der Supra- und Subglottis ($p = 0.005$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.03/0.02$), des Si-

nus piriformis ($p = 0.0001$, Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.02/0.01$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.005/0.002$), der Trachea ($p = 0.0001$, Kontrollen vs. 60 Gy/40 Gy: $p = 0.003/0.03$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.004/0.0001$), des Ösophagus ($p = 0.0001$, Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.003/0.002$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.006/0.004$) sowie für das lockere tracheale Bindegewebe ($p = 0.0001$, Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.04/0.01$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.002/0.0001$) und Reaktionen um tracheale Drüsen und -gänge ($p = 0.002$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.003/0.003$). Besonders nach 60 Gy Exposition (v. a. im Vergleich zur Fibronektinexpression nach 20 Gy-Exposition) fielen verstärkte Expressionen i. B. des trachealen ($p = 0.0005$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.05$ n. s. /0.007) und laryngealen Perichondriums ($p = 0.001$, 20 vs. 60 Gy: $p = 0.001$), der supra- und subglottischen Drüsen ($p = 0.001$, 20 vs. 60 Gy: $p = 0.04$), der subepithelialen Region der aryepiglottischen Falte ($p = 0.005$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.04$, 20 vs. 60 Gy: $p = 0.012$), pharyngeal miterfasster Drüsen ($p = 0.001$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.01$, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.02/0.003$), des ösophagealen Interstitiums einschließlich Adventitia ($p = 0.0001$, Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.05$ n. s./0.03, 20 vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.001/0.0001$), des perifollikulären ($p = 0.0001$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.003$, 20 vs. 60 Gy: $p = 0.0001$) und daran angrenzenden Schilddrüsenbindegewebes ($p = 0.001$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.03$, 20 vs. 60 Gy: $p = 0.001$) und der Schilddrüsenkapsel ($p = 0.001$, 20 vs. 60 Gy: $p = 0.001$) auf. Auch i. B. der Gefäßadventitia sowie bei Kapillaren ($p = 0.007$, 20 vs. 60 Gy: $p = 0.01$) und im Randbereich des Rekurrensnerven ($p = 0.008$, 20 vs. 60 Gy: $p = 0.007$) waren vor allem nach 60 Gy-Exposition verstärkte Färbereaktionen auffällig. Alters- und Latenzeffekte waren nicht nachweisbar.

CIII Das interstitielle CIII war im interstitiellen Stroma flächenhaft-kontinuierlich nachweisbar. Dabei kam es oftmals zu Immunreaktivitätsverdichtungen in der Nähe von angrenzenden BM, was einer Reaktion i. B. der Lamina fibroreticularis entsprechen dürfte. Bei unbestrahlten Tieren (**Abb. 46.1 im Anhang**) zeigten sich meist sehr zarte Reaktionen in der Submukosa mit Übergang in das angrenzende Bindegewebe, um MZ, im Nervengewebe (betont um Schwann-Zellen), um Drüsenazini und -gänge, im Perichondrium, perifollikulär i. B. der Schilddrüse, um Fettgewebszellen sowie subendothelial und in der TME von Blutgefäßen. Im subglottischen Interstitium, i. B. der Schilddrüsenkapsel sowie der Gefäßadventitia fanden sich überwiegend leichte Expressionen. Die Lamina propria im Glottisbereich zeigte teils negative (60 %), teils sehr zarte Reaktionen (40 %), insbesondere im Randbereich am Übergang zum M thyreoarytaenoideus / M. vocalis. Reaktionen im Knorpelgewebe blieben unsicher oder unspezifisch.

In der Multivarianzanalyse konnten für einige Lokalisationen signifikante RT-abhängige Effekte (bestrahlte Tiere vs. Kontrollen) befundet werden. Bei bestrahlten Tieren (**Tab. 58, Abb. 46.2 im Anhang**) kam es i. B. des trachealen ($p = 0.009$) und des laryngealen ($p = 0.01$) Perichondriums, der trachealen Drüsen ($p = 0.0001$), des trachealen Interstitiums ($p = 0.0001$), der ösophagealen Adventitia ($p = 0.01$) und im Interstitium der Schilddrüse ($p = 0.04$) im Vergleich zu Kontrollen zu signifikanten Expressionssteigerungen, die v. a. nach einer Exposition mit 60 Gy auffielen und leicht bis moderat ausgeprägt waren. Beim univariaten RT-Dosisgruppenvergleich konnten zusätzlich weitere bzw. er-

gänzende Effekte herausgearbeitet werden.

Besonders nach 60 Gy-Exposition auftretende Expressionssteigerungen waren für das laryngeale ($p = 0.006$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.004$) und tracheale Perichondrium ($p = 0.004$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.002$), die tracheale Submukosa ($p = 0.003$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.01$), die ösophagealen Adventitia ($p = 0.03$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.009$) und pharyngeal miterfasste Drüsen ($p = 0.001$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.003$, 20 vs. 60 Gy: $p = 0.0001$, 40 vs. 60 Gy: $p = 0.002$) typisch. Im Interstitium der Schilddrüse waren auch schon nach 40 Gy-Exposition vermehrte CIII-Reaktivitäten zu beobachten ($p = 0.008$, Kontrollen vs. 40 Gy/60 Gy: $p = 0.03/0.03$), hier fielen auch perifollikuläre Verdichtungen auf ($p = 0.04$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.06$ n. s.). Seltener war die CIII-Expression bereits nach 20 Gy-Exposition gesteigert. Dies betraf Immunreaktionen um tracheale Drüsen ($p = 0.0001$, Kontrollen vs. 20 Gy/40 Gy/60 Gy: $p = 0.008/0.008/0.001$) und im trachealen Interstitium ($p = 0.0001$, Kontrollen vs. 20 Gy/40 Gy/60 Gy: $p = 0.004/0.001/0.0001$). Die sonstigen evaluierten Geweberegionen zeigten zwar bei einzelnen Präparaten oder -abschnitten CIII-Reaktionsverdichtungen, insgesamt jedoch nur tendenzielle Expressionsveränderungen. So fanden sich gewisse Expressionssteigerungen mit zunehmender Dosis i. B. der Submukosa der Supra- und Subglottis ($p = 0.06$ n. s., r_s : $p = 0.02$) einschließlich der Submukosa der aryepiglottischen Falte ($p = 0.05$ n. s., r_s : $p = 0.009$), laryngealer Drüsen und im daran angrenzenden lockeren Interstitium (r_s : $p = 0.06$ n. s.), der Schilddrüsenkapsel (r_s : $p = 0.04$) sowie bei Kapillaren und beim Rekurrensnerven (Expressionsverdichtungen i. B. des Peri- und Epineuriums: $p \geq 0.06$, n. s.). Teilweise waren erst bei der höchsten Dosis (60 Gy) gewisse Steigerungen der CIII-Reaktivität auffällig, z. B. i. B. der Submukosa des Sinus piriformis und des daran angrenzenden Interstitiums sowie dort liegender Nervenäste ($p = 0.05$ n. s.). Alters- und latenzabhängige Effekte ließen sich nicht beobachten.

CIV CIV IV zeigte als BM-Bestandteil ein zu Laminin korrespondierendes Expressionsprofil. Es fanden sich bei Kontrollen (**Abb. 47.1 im Anhang**) überwiegend sehr zarte Reaktionen i. B. der subepithelialen BM, um MZ bzw. -fasern, um Drüsenazini und -gänge, um Perichondriumzellen, um Fettgewebszellen und bei Gefäßen (SEN/TME). Überwiegend leichte Reaktionen fanden sich in den feinen laryngealen, hypopharyngealen und ösophagealen Nervenästen und beim Rekurrensnerven (perineural betont) sowie bei Kapillaren. Extrem spärlich bzw. weitestgehend negativ waren Reaktionen im Bereich der Lamina propria der SL, in der Gefäßadventitia und im sonstigen Interstitium. Reaktionen um Knorpelzellen waren negativ oder unspezifisch. In der Multivarianzanalyse waren keine signifikanten Effekte zu befunden. Die univariate Auswertung wies jedoch auf RT-abhängige Beeinflussungen der Expressionsmuster hin. Diese Veränderungen waren überwiegend leichtgradig. So zeigten sich im Vergleich zu Kontrollen i. B. des *M. thyroarytaenoideus*/*M. vocalis* ($p = 0.03$) CIV-Reaktivitätsabnahmen und i. B. der Lamina propria der SL ($p = 0.0001$) Reaktivitätszunahmen. Letzteres war v. a. bedingt durch BM-Kondensationen in Assoziation zu Bindegewebszellen bzw. Infiltratzellen. Auch um Ösophagusmuskelzellen bzw. -fasern ($p = 0.01$), bei Kapillaren ($p = 0.01$) und beim

Rekurrenznerven ($p = 0.04$) war CIV bei bestrahlten Tieren vermehrt reaktiv. Weiterhin konnten im Gruppenvergleich RT-Dosis-abhängige Befunde zusätzlich bzw. ergänzend herausgearbeitet werden. Bereits nach 20 Gy-Exposition auftretende CIV-Expressionssteigerungen betrafen die Lamina propria ($p = 0.001$, Kontrollen vs. 20 Gy/40 Gy/60 Gy: $p = 0.001/0.009/0.002$). Besonders nach 40 Gy-Exposition auftretende peakartig vermehrte CIV-Immunreaktionen fielen beim trachealen Muskelgewebe ($p = 0.001$, Kontrollen vs. 40 Gy: $p = 0.007$, 20 vs. 40 Gy: $p = 0.001$, 40 vs. 60 Gy: $p = 0.001$), im trachealen Perichondrium ($p = 0.02$, 20 vs. 40 Gy: $p = 0.04$, 40 vs. 60 Gy: $p = 0.03$) und im Rekurrenznerven ($p = 0.003$, Kontrollen vs. 40 Gy: $p = 0.007$, 20 vs. 40 Gy: $p = 0.04$, 40 vs. 60 Gy: $p = 0.03$) auf. Spezifiziert bzw. ergänzt wurden somit die Reaktionen i. B. der Lamina propria und beim Rekurrenznerven. Zusätzlich konnten die stärker dosisabhängigen Reaktionen im trachealen Muskelgewebe und trachealen Perichondrium ausgewiesen werden. Hingegen spezifizierten sich i. B. des M. thyreoarytaenoideus/M. vocalis ($p = 0.05$, Kontrollen vs. 60 Gy: $p = 0.05$ n. s.) nur tendenzielle CIV-Reaktivitätsabnahmen. Ebenso waren nur deutlich tendenzielle Expressionssteigerungen (bereits nach 20 Gy-Exposition) im ösophagealen Muskelgewebe ($p = 0.05$ n. s., Kontrollen vs. 20 Gy: $p = 0.05$ n. s.) zu belegen. Deutlicher CIV-positive Reaktionen bei Kapillaren zeigten sich bei einzelnen Präparaten v. a. nach 60 Gy-Exposition ($p = 0.06$ n. s.). Der dosisabhängige Gruppenvergleich erbrachte für die sonstigen Strukturen bzw. Gewebeareale keine signifikanten Unterschiede. Dies galt für die subepitheliale und subendotheliale BM, die BM um laryngeale und tracheale Drüsen und -gänge sowie für die BM i. B. ösophagealer Nervenäste, des Fettgewebes, der perifollikulären Schilddrüsenregion, des laryngealen Perichondriums und der TME. Für einzelne Lokalisationen ergaben sich jedoch gewisse tendenzielle Veränderungen. So waren laryngeale und hypopharyngeale Nervenäste nach 60 Gy-Exposition etwas vermehrt, und supra- und subglottische sowie pharyngeal miterfasste Muskeln etwas vermindert CIV-reaktiv. Insgesamt war das CIV-Expressionsprofil dosisabhängig durch recht fluktuierende Expressionsmuster gekennzeichnet (**Tab. 59 im Anhang**). Andererseits ergaben sich im Einzelfall für bestimmte Regionen auffällig verstärkte Expressionen. Dies galt beispielsweise für die subepitheliale BM der Glottisregion mit breitbandig vermehrter CIV-Immunreaktion nach 60 Gray-Exposition (**Abb. 47.1 und Abb. 47.2 im Anhang**). Alters- und Latenzeffekte waren nicht nachweisbar.

5 Diskussion

5.1 Speicheldrüsen

Die Strahlenreaktion der SD, gekennzeichnet durch strukturelle Veränderungen und funktionelle Einbußen, ist eine gut bekannte Folge der Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich. Die klinischen und experimentellen Daten zur Radiosensitivität und zu den strahleninduzierten Pathomechanismen, die zur gesteigerten Fibrose, Atrophie und Xerostomie führen, sind noch nicht vollständig geklärt (Aalto et al. 1998, Coppes et al. 1997, Fox 1998, Nagler et al. 1996, Nagler et al. 1998c, Nagler 1998, O'Connell et al. 1999, Paardecooper et al. 1998, Taylor & Miller 1999) und teilweise (noch) unzureichend für Kon-

zepte der Radioprotektion (Fox 1998, Guchelaar et al. 1997, Lotz et al. 1990). Strahlenbiologische und molekulargenetische Ergebnisse wiesen hierzu neben direkten DNA – Schäden und Nekroseprozessen insbesondere auch auf Apoptosemechanismen (Guchelaar et al. 1997, Fox 1998, Seifert 1996) und den (wohl für viele Gewebe gegebenen) TGF- β 1-Einfluss auf die Fibrosierung hin (Übersicht bei Rodemann & Bamberg 1995, Rodemann et al. 1995). Zusätzlich waren in vitro für verschiedene TGF- β 1-assoziierte bzw. -stimulierte Gene und deren Expression Zusammenhänge mit der Apoptoseregulierung nach einem radiogenen DNA -Schaden nachweisbar (Hino et al. 2002). Auch jüngste Konzepte (Bücheler et al. 2002) der „Radioprotektion“ basieren auf dem Ersatz irreversibel „geschädigter“ Speicheldrüsen- bzw. Azinuszellen durch injizierbare Speicheldrüsenorganoide. Andere radioprotektive Konzepte verfolgten bestrahlungstechnische Aspekte (Chao 2002, Eisbruch et al. 1996 & 1998-2001, Fox 1998, Maes et al. 2002, van-Dieren et al. 2000), den medikamentösen Strahlenschutz mittels Sialogoga (z. B. Amifostin, Übersichten bei Capizzi & Oster 2000 und Santini 2001) oder chirurgische Verfahren mit SD-Transplantationen in strahlengeschützte Regionen (Jha et al. 2000, Seikaly et al. 2001). Diese verschiedenen Ansätze unterstreichen die Relevanz der SD bei radiogenen Normalgewebsreaktionen, zumal insbesondere in den SD sekundäre Malignome nach Chemotherapie und Schädelbestrahlung in der Kindheit (Prasanna et al. 1999) oder nach Radiojodtherapie wegen Schilddrüsenkarzinom zu beachten sind (Henze & Hittel 2001) und die Radiojodtherapie selbst SD-Dysfunktionen mit im Vordergrund stehender Xerostomie verursachen kann (Malpani et al. 1996, Solans et al. 2001).

Radiogene Reaktionen im Bereich der SD wurden sowohl beim Menschen als auch tierexperimentell gut dokumentiert (Laszlo et al. 2001, Übersichten bei Seifert 1996 und O’Connell 2000).

Beim Menschen sind Veränderungen der Sekretionsrate, der Speichelzusammensetzung und weiterer Speichelsekretionsparameter bekannt (Seifert 1996). Weitere Arbeiten haben auf den funktionellen Schaden fokussiert, der vor allem in der verminderten Flussrate zum Ausdruck kommt (Dahllof et al. 1997, Guchelaar et al. 1997, Dens et al. 1996, Fox 1998, Jones et al. 1992, Liem et al. 1996, Malpani et al. 1996) und nachfolgend kariogene Mikroorganismen, Xerostomie, Kau-, Sprech- und Schluckstörungen sowie orale Candidosen fördert.

Auch tierexperimentell wurden Strahlenwirkungen vielfach an funktionellen Folgen (Reduktion der Speichelflussrate, verzögert einsetzende Speichelproduktion nach Sekretionsstimulierung, Veränderungen von Sekretionsparametern wie Muzinen und weiteren Proteinen, Biss- und Kauanomalien, Nahrungsverweigerung) gemessen (Coppes et al. 1997, Funegard et al. 1991 & 1994 & 1997, Hiramatsu et al. 1994, Lin et al. 2001, Nagler et al. 1996, Nagler et al. 1998a & b, Nagler 1998, O’Connell et al. 1999, Seifert 1996, Vissink et al. 1992, 1991a & b, 1990a & b, Zeilstra et al. 2000). Oft wurden zusätzlich mit verschiedenen histologischen Methoden beurteilte Veränderungen des Drüsenaufbaues mitgeteilt (Aalto et al. 1998 & 1997, Chomette et al. 1981, Coppes et al. 2002, Forsgren et al. 1994, Nagler 2002, Nagler 1998, O’Connell et al. 1999, Paardecooper et al. 1998, Seifert 1996, Sholley et al. 1974, Stephens et al. 1986a, Stern et al. 1976, Vissink et al. 1991a, Zeilstra et al. 2000). Grundlagen

zum Strahlenschutz wurden tierexperimentell erarbeitet und an verschiedenen Modellen, z. B. Pharmaka, Gentransfer oder mittels temporärer Transplantation in nicht bestrahlte Körperregionen getestet (Delporte et al. 1997, Lotz et al. 1990, Taylor & Miller 1999, Zeilstra et al. 2000, Spiegel et al. 2000 & 2001).

In den pathohistologischen Untersuchungen im Tiermodell, die mehr histologische, enzymhistochemische und elektronenmikroskopische, aber weniger immunhistologische Techniken (v. a. Arbeiten zur Neuropeptid- und Proliferationsantigen-Expression: Forsgren et al. 1992 & 1994, Aalto et al. 1997, Ballagh et al. 1994, Hakim et al. 2002) berücksichtigten, konnte gezeigt werden, dass die zunehmende Umstrukturierung des Drüsengewebes (Azinuszelldegeneration über Nekrose- und Apoptosemechanismen, sublethale DNA-Schäden der Azinus(progenitor)zellen mit verzögertem Mitosetod, Teilverlust der sekretorischen Tubuli, Mitochondrienverringerung und -degeneration, Parenchymatrophie, Fibrose, adenomatöse Regenerate, Zerstörung der Läppchenstruktur) vor allem dosis- und zeitabhängig ist. In **Tab. 60 im Anhang** wurden die Befunde nach den Literaturdaten zusammengestellt.

Aus der Aufstellung wird deutlich, dass mittels unterschiedlicher Untersuchungstechniken die verschiedenen radiogenen Veränderungen von Drüsenstrukturen bzw. -bestandteilen, wenn auch mit etwas wechselndem Schwerpunkt (Drüsenparenchym, insbesondere Azinuszellen, Kristalloide, Zellorganellen, Sekretgranula, Enzyme, Nervenendigungen, Gefäße) differenziert betrachtet bzw. ausgewertet wurden.

Dabei ist jedoch zu bemerken, dass – auch wenn bei den radiogenen Veränderungen der ECM unter dem Begriff „Fibrose“ die Vermehrungen der interstitiellen Kollagene (vornehmlich Typ I, III und V) subsummiert werden – über die spezialisierten Strukturen der ECM – wie BM – hinsichtlich radiogener Veränderungen im Bereich der Speicheldrüsen weniger bekannt ist. So fanden sich nach 16 Gy bis 64 Gy in der Rattenparotis dosisabhängig vermehrt BM-Reste (Sholley et al. 1974) und nach 30 Gy bzw. 45 Gy Halbseiten-RT in der Rattenparotis Lamininablagerungen und vermehrte Fibronektinexpressionen (Gustafsson et al. 1998). Es konnte jedoch im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Fibroseentstehung, insbesondere der dabei bedeutsamen TGF- β 1-Rolle, in anderen Organen (z. B. Haut, Leber, Lunge, Darm) und bei anderen nicht radiogenen Fibrosemodellen (Bleomycin-induziert, Tetrachlorkohlenstoff-induziert, Ligatur des Speicheldrüsenausführungsganges) gezeigt werden, dass neben Kollagen I und III und Proteaseinhibitoren auch vermehrt Laminin, Fibronektin und Kollagen IV synthetisiert und sezerniert werden (Anscher et al. 1990, Canney & Dean 1990, Nakatsukasa et al. 1990b, Raghoebar et al. 1989, Rodemann et al. 1995, Varga et al. 1987, Wegrowski et al. 1989, Zaia et al. 1997), was zusammen dem fibrotischen Phänotyp im Gewebe entspricht. Dies war jedoch für die Speicheldrüsen – insbesondere im Vergleich zu Gustafsson et al. (1998) – noch zu prüfen, da zwar strahleninduzierte ECM- und BM-Veränderungen in humanen Geweben (Barcellos-Hoff 1998, Fajardo 1982, Herskind et al. 1998, Rose et al. 1999, Ruifrok & McBride 1999) und tierexperimentell (u. a. Cornelissen et al. 1996, Dallmau et al. 1999, Ehrhart et al. 1996, Gustafsson et al. 1998, Herskind et al. 1998, Qi et al. 1998, Sholley et al. 1974 & 1981, Vissink et al. 1992, Wang et al. 1999, Wang &

Robbins 1996) mitgeteilt wurden, jedoch zumeist ohne oder nur mit gelegentlicher Berücksichtigung der Speicheldrüsen.

Untersuchungen zu ECM-Veränderungen im SD-Gewebe (hinsichtlich verschiedener Kollagentypen, BM, BM-assoziiertes Proteine und Proteoglykane) fokussierten mehr auf andere Prozesse. Bei den interstitiellen Kollagenveränderungen waren neben Entwicklungsprozessen und Befunden zur Verteilungsarchitektur vor allem Tumore von Interesse. Weiterhin wurden Kollagenveränderungen bei Kollagenosen, Entzündungsprozessen sowie beim Sjögren-Syndrom untersucht. BM wurden unter verschiedenen Aspekten betrachtet, wobei die verschiedenen BM-Bestandteile unterschiedlich einbezogen wurden. Neben Untersuchungen zur Feinstruktur und dem Verteilungsmuster verschiedener Laminin-Isoformen wurde auf die Bedeutung der BM v. a. bei der Morphogenese und Zytodifferenzierung und bei Tumoren oder Tumorzelllinien hingewiesen, u. a. aber auch bei diabetischen Erkrankungen, beim Sjögren-Syndrom und Asthma untersucht (Literaturübersicht **im Anhang**).

Experimentell beobachteten Emmelin et al. bereits 1974 in bis zu 81 Tagen nach Gangobliteration nachbeobachteten Katzen-Parotis- und -Submandibulardrüsen bei Myoepithelien in unmittelbarer Nähe von atrophierten Azini stark verdickte BM-Strukturen, die sich sowohl als faltenförmige Aufwülbungen als auch mehr amorphe, klumpige Veränderungen darstellten. Auch Zaia et al. (1997) fanden in ihrem experimentellen Atrophie- und Fibrosemodell nach Ausführungsgangligatur einerseits verdickte und vermehrte (um kleine Gänge und Azini), andererseits verminderte (um dilatierte Gangstrukturen) Laminin-Immunreaktivitäten.

Auch zu CK-Veränderungen in den Speicheldrüsen liegen nur einzelne Studien zu strahleninduzierten Alterationen vor. So fanden Gustafsson et al. (1998) in der Rattenparotis 6 Monate nach oligofraktionierter Halbseiten-RT von 30 Gy (5x 6 Gy) und 45 Gy (5x 9 Gy) vermehrte CK 7-Immunreaktivitäten im Gangsystem und ein im Vergleich zu Kontrollen mehr diffuses intrazelluläres Färbemuster. Bei Speicheldrüsentumoren hingegen fanden sich jedoch keine veränderten CK-Expressionsmuster nach präoperativer Bestrahlung (Gustafsson 1986).

In humanen Speicheldrüsen Geweben standen neben Untersuchungen und Mitteilungen zum normalen CK-Expressionsverhalten (Dardick et al. 1987 & 1988b & 1989 & 1991, Draeger et al. 1991, Geiger et al. 1987, Gustafsson et al. 1988a, Li et al. 1996, Marshak & Leitner 1987, Norberg et al. 1992, Therkildsen et al. 1995), zum CK-Profil bei der Morphogenese (Gustafsson et al. 1988a, Martins et al. 2002, Lee et al. 1990) und bei Proliferationsprozessen sowie PE-Metaplasien (Marshak & Leitner 1987, Ihrler et al. 2002) vor allem CK-Expressionsmuster bei benignen und malignen Tumoren im Vordergrund, welche insbesondere in der Monographie zur Speicheldrüsenpathologie von Seifert (1996) tumortypspezifische Berücksichtigung fanden. Daneben wurden die CK-Muster auch in zahlreichen Einzelarbeiten im Detail bei sehr unterschiedlichen Tumorentitäten und davon abgeleiteten Tumorzellkulturen mitgeteilt, wobei die CK-Expressionsmuster der Myoepithelzellen bedeutendes Interesse fanden (Literaturübersicht **im Anhang**). Weiterhin wurde auch im Rahmen von Degenerationsprozessen verschiedenster Ursachen (Qin et al. 1994) auf verminderte bis aufgehobene CK-

Nachweise hingewiesen. Dies konnte auch bei obstruktiver Sialadenitis (Shinohara et al. 1992) beobachtet werden, indem deutlich verminderte bis aufgehobene, zum Teil auch fluktuierende CK-Immunreaktivitäten in luminalen und basalen Gangepithelien auffielen. Ebenso wurde über laserinduzierte CK-Veränderungen berichtet (Takahashi & Wakita 1994).

Experimentell wurden die CK-Expressionsmuster bei der Drüsenmorphogenese (Meerschweinchen-Submandibulardrüse: Marshak et al. 1987) untersucht, daneben in vitro oder im Tiermodell zur phänotypischen Charakterisierung von Zelltypen (Shirasuna et al. 1990, Levin & Bradley 1996) oder als Identifikations- und Lokalisationsmarker PE-Metaplasien genutzt (Dardick et al. 1985, Azuma et al. 1988). Neben Dardick et al. (1985), die bei Ratten im experimentellen Ischämiemodell nach Gefäßligatur bei sich entwickelnden PE-Metaplasien heterogene, vorwiegend jedoch abnehmende oder aufgehobene CK-Immunfärbereaktionen beobachteten, beschrieben auch Hashimoto et al. (1992) im experimentellen Atrophie- und Fibrosemodell nach Gangligatur von bis zu 21 Tagen nachbeobachteten Ratten-GSM und -sublingualisdrüsen vor allem verminderte bis aufgehobene CK-Expressionen (CK8) in dilatierten Gangstrukturen und gangähnlichen Formationen.

Aufgrund unserer Daten der ersten Versuchserie an der GSM (Bartel-Friedrich et al. 1999a-d) ergaben sich hingegen überwiegend verstärkte Reaktionen für verschiedene CK-AK (gegen CK-Nr.: 8, 13, 13/15/16, 17/19) und verschiedene EMP (Laminin, Fibronectin, Kollagen III, Kollagen IV) nach einer Gesamtdosis von 60 Gy, insbesondere im Nachbeobachtungszeitraum zwischen 4 und 6 Monaten nach Abschluss der RT.

Da neben der Lokalisation der Drüse im Strahlenfeld und dem funktionellen Status des SD-Gewebes vor allem Gesamtdosis und Fraktionierung direkten Einfluss auf radiogene SD-Reaktionen haben können (Seifert 1996), intendierten wir mit der zweiten Serie, dosisabhängige Veränderungen von CK bzw. IF-Proteinen und von EMP (unter besonderer Berücksichtigung der Kollagentypen CI und CIII sowie der spezialisierten BM-Strukturen Laminin und Kollagen IV und des BM-assoziierten Fibronectins) in einem klinisch relevanten RT-Protokoll zu untersuchen. Da trotz funktioneller Einbußen auch bei höherer Dosierung eine Teilrestitution der Drüsenleistung im Zeitverlauf beschrieben wurde (Funegard et al. 1994: 40 – 52 Gy, Verlaufskontrolle bis 18 Monate nach RT) und im allgemeinen die SD-Funktion altersabhängig nachlässt (Astor et al. 1999, Vissink et al. 1996), wurde zusätzlich nach Alter und Latenzperiode differenziert ausgewertet, auch um die Vorbefunde nachzukontrollieren. Insgesamt sollte ein Beitrag zur Phänotypisierung der Strahlenreaktion geleistet werden, der einerseits die Drüsenmorphologie erfasst und andererseits die integritätsgewährleistenden epithelialen und extrazellulären Stützelemente miteinbezieht.

Das CK- bzw. IF-Expressionsmuster in den Speicheldrüsen war insgesamt sehr homogen. Die Befunde an normalen GSM bestätigten und erweiterten Ergebnisse früherer Berichte (Bartel-Friedrich et al. 1999b & d, Born et al. 1987, Caselitz et al. 1986b, Gustafsson et al. 1998, Moll 1993, Mori 1991, Seifert 1996, Su et al. 1993) und illustrierten die zelltypspezifische Expression einzelner CK, so z. B. die auffällige Restriktion bestimmter CK der Gruppe geschichteter Epithelien (CK 5/6, CK 13/15/16) auf

basale und myoepitheliale Zellen. Nach Bestrahlung war diese Zelltypspezifität im allgemeinen erhalten. Dagegen stieg die Immunreaktivität für diese Antikörper sehr oft stark an. Insbesondere bei über 20 Gy hinausgehender Exposition zeigten direkt strahlenexponierte GSM eine gesteigerte Expression, die nach Exposition von 60 Gy am stärksten war. Diese Ergebnisse stimmen mit den wenigen früheren Beobachtungen überein und können in Verbindung mit einem möglicherweise erhöhten CK- bzw. IF-Gehalt der Zellen gesehen werden, die chronisch durch endogene oder exogene Faktoren geschädigt worden sind (Gröne et al. 1987, Moll 1993, Moll et al. 1991). Weitere Phänomene (z. B. die Proteinkonfiguration und/oder AK-Zugänglichkeit) oder die von Somosy et al. (1995) in der Zellkultur dargestellten radiogenen Filamentveränderungen (zerstörte, klumpige Aktinfilamente, CK-Aggregationen, Anhäufung von amorphem Material) können gleichfalls die Färbereaktion steigern.

Bemerkenswert erscheint, dass v. a. im früheren Zeitfenster Basalzellen von Gangepithelien in stärker alterierten GSM kaum noch Expressionen der CK 13/15/16 zeigten, wohingegen die Myoepithelien nach RT verstärkt reagierten. Hingegen fanden Hakim et al. (2002) bei Myoepithelien eine reduzierte Glattnuskelaktinexpression zusammen mit Myofilamentverlusten und vermehrten zytoplasmatischen und subplasmalemalen Verdichtungen 24 Stunden nach Einzeldosen von 7.5 Gy bzw. 15 Gy in Kaninchendrüsen und führten dies auf eine Umstrukturierung von Verankerungsmyofilamenten zurück. Diese Befunde wiesen zusammen mit vermehrt auftretenden mikropyknozytotischen Vesikeln als Zeichen für einen gesteigerten radiogenen, stressinduzierten Zellmetabolismus auf schon früh einsetzende Zellalterationen hin, die zu einer zellulären Desintegration und einer Schädigung der kontraktilen Aktivität führen können. Diese Befunde könnten miterklären, dass durch Filamentverluste einerseits verminderte und andererseits durch Verdichtungen und veränderte Filamentkonfigurationen verstärkte Expressionen möglich sind.

Zusätzlich war zu beobachten, dass einige Strukturen geschützter GSM teilweise erhöhte Expressionen aufwiesen. Wir deuten diese Veränderungen als Streustrahlungseffekt. Wesentliche Alterseffekte waren hingegen nicht zu belegen.

Die Strahlenreaktion führte nicht zu einer Expression von Vimentin in normalerweise Vimentin-negativen epithelialen Zellen der GSM. Dagegen reagierten z. B. die proximalen Tubuli der Niere sehr rasch mit einer Vimentinneoexpression auf unspezifische Noxen (Gröne et al. 1987, Moll 1993, Moll et al. 1991).

Für die von uns untersuchten EMP ergab sich ein nahezu analoger Befund. Sowohl die interstitiellen Kollagene CI und CIII als auch die BM-Komponenten Laminin und CIV sowie das BM-assoziierte Fibronectin zeigten vor allem positiv dosisabhängige Expressionssteigerungen (mit verbreiteter und/oder verstärkter Färbereaktion und Konglomeratbildungen) in direkt strahlenexponierten Drüsen, welche nach Applikation von 60 Gy am stärksten waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die sich entwickelnde radiogene Fibrose nicht auf Anhäufungen der interstitiellen Kollagene zu beschränken ist, sondern auch spezialisierte Strukturen der ECM wie BM mit einzubeziehen sind. Dabei stehen unsere Befunde einer radiogen vermehrten, interstitiellen Kollagenablagerung im Einklang mit Befunden z.

B. in der Lunge (u. a. Übersicht bei Penney et al. 1982 & Herrmann et al. 1995, Molteni et al. 2000, Pauluhn et al. 2001, Vujaskovic et al. 2001), in der Niere und Blase (u. a. Antonakopoulos et al. 1982, Cohen et al. 1996 & 2000, Robbins et al. 2001), bei Gefäßen (u. a. Marijianowski et al. 1999, Mittal et al. 1990, Ward et al. 1983), der Haut (u. a. Illsley et al. 2000, Riekkki et al. 2000, Svojtikova et al. 1983), im Darm (u. a. Allgood et al. 1996, Eriksson et al. 1983, Followill & Travis 1995, Wang et al. 2001), im Myokard (u. a. Gilette et al. 1985, Kruse et al. 2001), im Knochenmark (Kagawa et al. 1986) und in der Skelettmuskulatur (u. a. Hsu et al. 1998, Remy et al. 1991, Wegrowski et al. 1988 & 1992). Weiterhin werden unsere Ergebnisse dadurch gestützt, dass neben vermehrter Nachweisbarkeit oder Aktivität von ECM-assoziierten Substanzen (vor allem von Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen und deren Rezeptoren: Barcellos-Hoff 1998, Herskind et al. 1998, Rodemann et al. 1995, Ruifrok & McBride 1999, Wang et al. 1999, Wang & Robbins 1996) auch für BM-Strukturen (vorwiegend Laminin und Kollagen IV) und BM-assoziierte Substanzen (vorwiegend Fibronectin und HPSG) vermehrte Immunreaktivitäten, insbesondere für spätere Nachbeobachtungszeiträume (mehrere Wochen bis zu mehreren Monaten post RT) beschrieben wurden. Neben den Befunden von Gustafsson et al. (1998) in der Rattenparotis konnte dies in verschiedenen Organen bzw. Organsystemen wie z. B. in der Lunge (u. a. Johnston et al. 1995, Miller et al. 1988, Rubin et al. 1995), in der Niere (u. a. Robbins et al. 1991 & 2001), in der Brustdrüse (u. a. Ehrhart et al. 1996), bei Gefäßen (u. a. Qi et al. 1998, Rose et al. 1999, Schneider et al. 1997, Seddon et al. 1983) und im Gastrointestinaltrakt (u. a. Fatemi et al. 1985) aufgezeigt werden.

Auch bei den EMP zeigten einige Strukturen geschützter GSM teilweise veränderte Expressionsmuster, was wie bei den CK auf einen Streustrahlungseffekt hinwies. Neben dem Streustrahlungseffekt kommen allerdings noch weitere Phänomene, z. B. stressinduzierende Untersuchungsbedingungen als möglicher Beitrag zu Speicheldrüsenveränderungen in Betracht (Baker et al. 1979 & 1980).

Bereits 1982 hat Fajardo darauf hingewiesen, dass Fraktionierungsschemata und Strahlendosen bisheriger Tierversuche nicht mit humantherapeutischen Protokollen vergleichbar seien. Auch jüngere Studien (u. a. Ahlner et al. 1993, Coppes et al. 2002, Espinal et al. 1983, Hiramatsu et al. 1994, Lotz et al. 1990, Nagler et al. 1998a, Nagler 1998, O'Connell et al. 1999, Seifert 1996, Vissink et al. 1991a, b & 1990a) haben noch überwiegend größere Einzeldosen, oligofraktionierte Protokolle oder Fraktionen mit reduzierten Gesamtdosen zugrunde gelegt, die für die humantherapeutische Anwendung kaum in Frage kommen. Dabei variierte der Manifestationszeitpunkt der funktionellen und morphologischen Strahlenreaktion mit dem Studiendesign, ebenso die Befunde einer partiellen Restitution. Generell zeigten diese Studien jedoch die Dosis- und Zeitabhängigkeit der Befunde, die nach Bestrahlung der Speicheldrüsen auftreten. Obwohl einige Autoren sowohl funktionelle als auch morphologische Strahlenreaktionen beschrieben (u. a. Franzen et al. 1991, Nagler et al. 1998b, Nagler 1998, O'Connell et al. 1999, Vissink et al. 1991a) ist die Vergleichbarkeit dennoch eingeschränkt, da frühere Untersucher die Parenchymstrukturen etwas unterschiedlich miteinbezogen und z. T. auch andere Untersuchungstechniken verwendeten oder überwiegend funktionelle Veränderungen bei sehr unterschiedlichen Latenz-

perioden in den Vordergrund stellten – zumal wir ein humantherapeutisches RT-Protokoll verwendeten, anhand der pathohistologischen Einteilung der „Strahlen-Sialadenitis“ nach Seifert (1996) klassifizierten und die Expressionsmuster von CK/IF-Proteinen und EMP-Strukturen miteinbezogen, insbesondere zur Analyse von Langzeitveränderungen.

Als vorrangiger Befund in mit 60 Gy bestrahlten GSM war ein Stadium 2 festzustellen, obwohl bei dieser Dosis eher ausgeprägtere Strahlenreaktionen zu erwarten gewesen wären (Seifert 1996). Dabei entsprachen unsere Befunde hinsichtlich der histologisch beurteilten Morphologie durchaus den Literaturdaten (**Tab. 14 und Tab. 60 im Anhang**). Das weitgehende Fehlen des Stadiums 3 kann als Folge des RT-Schemas gedeutet werden. Ähnliche Befunde in teilweise von uns mitevaluierten Parotisdrüsen unterstützten diese Interpretation. Daher erschien das gewählte RT-Protokoll zur Vermeidung maximaler Strahlenreaktionen nützlich. Zusätzlich könnte die besondere Drüsenstruktur der Ratte-GSM (sekretorische Tubuli und serös-mukoide Azini) als mögliche Erklärung für das häufige Fehlen des Terminalstadiums dienen. Ein muköser Aspekt war jedoch morphologisch nicht dominierend, was einen Vergleich mit der als strahlensensibler geltenden serösen Parotisdrüse erlaubte. Insofern sprachen die ähnlichen Befunde in den koevaluierten Parotisdrüsen gegen allein von der Struktur abhängige Strahlenreaktionen. Auch Coppes et al. (2002) fanden 247 Tage nach Einzeldosis-RT mit 15 Gy keine gravierenden pathohistologischen Unterschiede zwischen der Gl. parotis und der GSM der Ratte. Die Autoren bezeichneten andererseits die GSM als strahlensensibler bezüglich der Spätwirkungen, wenn fraktionierte oder hyperfraktionierte Schemata (16x 2 Gy in 22 Tagen oder 16x 2 Gy in 8 Tagen) verwendet werden. Bildmaterial und Histologiebeschreibungen in dieser Arbeit (Coppes et al. 2002) ließen jedoch Terminalstadien der GSM-Reaktionen nicht erkennen, sodass nach Gesamtdosen von 32 Gy und nach unseren Befunden selbst nach wesentlich höherer humantherapeutisch relevanter Gesamtdosis von 60 Gy trotz der so bezeichneten höheren GSM-Strahlenempfindlichkeit Maximalausprägungen von Spätreaktionen vermeidbar erscheinen. Daneben könnte der mildere Befund erklären, dass für Spätreaktionen vermutete Pathomechanismen wie z. B. eine Strahlenvaskulopathie („obliterative Vaskulitis“) oder eine aufgepfropfte obstruktive Sialadenitis (Busuttill 1977, Fajardo & Berthrong 1981, Lotz et al. 1990, Riede & Schäfer 1995, Seifert & Geier 1971) kaum evident waren.

Hinsichtlich der recht geringen Alterationen der teilweise mitevaluierten GSL kann gefolgert werden, dass rein muköse Drüsen eine untergeordnete Rolle bei der Auswertung morphologischer Speicheldrüsenreaktionen spielen. Diese Interpretation steht im Einklang mit weiteren Literaturdaten, z. B. Lotz et al. (1990), Sagowski et al. (2003) und Seifert (1996).

Die nach 60 Gy-Exposition vorherrschende Strahlenreaktion (Stadium 2) war sowohl 6 als auch 12 Monate nach Abschluss der RT nachweisbar. In GSM mit 20 Gy-Exposition wurden überwiegend späte Stadien 1 gefunden, nach 40 Gy-RT-Dosis wurden überwiegend Übergangsstadien 1-2 beobachtet, auch bei den geringeren Strahlendosen zumeist ohne Latenz- und Altersabhängigkeiten. Hier traten nach 20 Gy- und 40 Gy-Exposition lediglich geringe Restitutionstendenzen mit zunehmender Latenzperiode auf. Die zunehmende Gewebeerkrankung bestätigte die Dosisabhängigkeit und wies bei weitge-

hend fehlender Restitutio auf die Dauerhaftigkeit der GSM-Reaktionen hin. Diese Langzeitveränderungen stimmen mit tierexperimentellen Daten nach Einzeldosis-RT von 15 Gy (Ahlner et al. 1993, Espinal et al. 1983, Nagler 1998), aber auch nach Fraktionierung (Coppes et al. 2002, Sagowski et al. 2003) und mit den von Dreyer et al. (1989) berichteten Befunden in humanen Geweben überein und galten für die histologische Beurteilung sowie das immunhistologisch bestimmte CK- und EMP-Expressionsmuster. Sowohl die erhöhten CK- als auch die vermehrten EMP-Expressionen stimmen mit den Befunden von Gustafsson et al. (1998) überein, die in Gangepithelien eine deutliche erhöhte, luminal betonte CK-Expression 6 Monate nach oligofraktionierter Halbseiten-RT in der Rattenparotis beobachteten, wobei auch deutlich vermehrte Lamininablagerungen im Bereich degenerierter Azinuszellen und eine vermehrte Fibronectin-Expression im bindegewebigen Stroma nachweisbar waren. Neben Fajardos (1982) Mitteilung von „sehr prominenten BM“ in humanen GSM-Geweben (26 Tage nach RT mit 70 Gy) zeigten sich auch in der tierexperimentellen Studie von Sholley et al. (1974) zu Strahlenfrühreaktionen (Maximum der morphologischen Befunde 2 Tage nach RT-Beginn) BM-Reste mit depotartigen Ablagerungen in Parotisdgeweben von Ratten, die Strahlendosen zwischen 16 und 64 Gy ausgesetzt waren. Im weiteren Nachbeobachtungszeitraum beschrieben die Autoren (Sholley et al. 1981) auch Membranreste und –depots in großen autophagen Vakuolen bei hoher RT-Dosis (64 Gy). Auch Vissink et al. (1992) bezogen in ihrer Studie zu Speichel- und Speichelflussveränderungen (nach Ganzkörper-RT mit 7.5 Gy, 10 Gy und 12.5 Gy) frühe radiogene Reaktionen (bis zu 3 Tagen nach RT) mehr auf mögliche Membranstrukturschäden als auf Reproduktionsschäden. Ebenso verwiesen Franzen et al. (1991) und Helman et al. (1987) in Ihren funktionell orientierten Studien zum Sekretverhalt anhand veränderter Ionentransportsysteme auf luminale, aber auch basolaterale Zellmembranen betreffende Membranstörungen hin. Diese in der Frühphase auffälligen Zellmembran- bzw. BM-Störungen können sich jedoch der immunhistologischen Darstellung entziehen, eventuell bedingt durch die Untersuchungstechnik bzw. -fokus und den mehr funktionellen Ansatz, da bei spezifischer BM-Darstellung im kurzen Nachbeobachtungsintervall bis zu 10 Tagen keine BM-Veränderungen auftraten (Gustafsson et al. 1998) – obwohl v. a. ultrastrukturell beurteilte Frühreaktionen (nach hohen Einzeldosen von 20 Gy/25 Gy/30 Gy in bis 70 Tage post RT nachbeobachteten Ratten-GSM) und hierbei insbesondere Verluste der basalen Membraneinfältelungen (bei Streifenstücken) Auswirkungen auf die unmittelbar angrenzende BM haben könnten (Chomette et al. 1981). Direkte BM-Schäden wurden jedoch von Chomette et al. (1981) nicht angegeben, vielmehr zeigten die Abbildungen in ihrer Publikation für die Frühphase lineare BM um die Drüsenzellen. Hingegen sind in der Spätphase (6 Monate post RT) Zellmembranstörungen (Lotz et al. 1990) zusammen mit veränderten BM-Reaktivitäten (Gustafsson et al. 1998) nachweisbar und auch anhand der eigenen Befunden mit vorwiegend vermehrten BM-Expressionen darstellbar, was eine gegenseitige Beeinflussung nahe legt.

Inwieweit jedoch z. B. Verluste der basalen Membraneinfältelungen (Lotz et al. 1990, Chomette et al. 1981) direkt das Expressionsverhalten der BM- und BM-assoziierten Strukturen beeinflussen, bleibt spekulativ. Wir sahen bei Azini und im Gangsystem gelegentlich Unschärfen, Irregularitäten, fokale

Teilverluste der BM und bei Streifenstücken Minderungen der basalen Streifung, vor allem aber vermehrte und verbreiterte Expressionen der BM. Ursächlich kommen Störungen der Zellmembran-BM-Haftproteine (z. B. der Integrinrezeptoren) und Zellintegritätsveränderungen in Betracht, die eine reguläre Anbindung oder Konfiguration beeinflussen können. Speziellere Ursachen könnten in der radiogenen Synthesereduktion matrixabbauender proteolytischer Enzyme oder der Induktion von Proteaseinhibitoren sowie in der strahleninduziert vermehrten (via TGF- β 1-Aktivierung) ECM-Synthese und Ablagerung gesehen werden (Araya et al. 2001, Übersicht bei Rodemann et al. 1995, Seifert et al. 1997, Wang et al. 2000, Zhao et al. 2000). Zumindest in vitro konnte gezeigt werden, dass TGF- β 1 nicht nur die Zellmorphologie und die Zellproliferation bei Gang- und Myoepithelzellkolonien beeinflusste, sondern bei den Myoepithelien auch die CIV-Produktion über einen rezeptorvermittelten Transduktionsmechanismus stimulierte (Azuma et al. 1996a). Weiterhin können, ähnlich wie bei den CK, direkt-physikalische Veränderungen der Glykoprotein- bzw. Kollagenmolekülstruktur und -konfiguration und/oder eine erhöhte AK-Zugänglichkeit miterklären, dass neben zum Teil verminderter vor allem vermehrte Immunreaktivitäten hervorgerufen werden.

Bemerkenswert erscheint, dass über Membranveränderungen hinaus dem Zeitfaktor auch eine bedeutende Rolle zur Erklärung der insgesamt zugrunde liegenden zellulären Pathomechanismen der Strahlenreaktion zugeschrieben wird – nicht zuletzt deshalb, weil eine „frühe“ therapeutische Intervention die Option der Beeinflussbarkeit beinhaltet. So sprachen wesentliche Zellverluste, insbesondere der Azinuszellen, und morphologische Apoptoszeichen im frühen Zeitfenster für Interphasezelltodmechanismen, die durch eine radiogene Lipidperoxidation schwermetallhaltener Membranen der Sekretgranula und kernnaher Strukturen zur nachfolgenden Kernauflösung und späterem Zytoplasmakondensation führen können (Abok et al. 1984, Guchelaar et al. 1997, Nagler 2002, Seifert 1996, Stephens et al. 1986a & b, Vissink et al. 1991b). Zusätzlich kann eine verkürzte Lebensdauer (Dörr & Trott 2000) frühere Zellverluste miterklären. Hingegen fanden Zeilstra et al. (2000) bis 30 Tage nach 15 Gy Einzeldosis-RT trotz erheblich eingeschränkter Speicheldrüsenfunktion keine signifikanten Zellverluste und vermuteten daher schwerwiegende Azinuszellfunktionsstörungen. Im späteren Nachbeobachtungszeitraum waren jedoch bemerkenswerte Azinuszellverluste und geringer auch der sekretorischen Tubuli mit begleitender langsam nachlassender Speicheldrüsenfunktion auffällig (Zeilstra et al. 2000), was durchaus im Einklang mit der Literatur (Stephens et al. 1986b, Seifert 1996, Ahlner et al. 1993, Espinal et al. 1983, Nagler 1998, Dreyer et al. 1989) und den eigenen Befunden (wenn auch weniger stark ausgeprägt) steht. Diese späte Drüsenatrophie sprach für Reproduktionsstörungen im Sinne mitosetodbezogener Mechanismen (Herrmann & Baumann 1997) und wies daneben darauf hin, dass bei Radioprotektionskonzepten besonders der Progenitorzellschutz zu berücksichtigen ist. Ergänzend erklärten auch Guchelaar et al. (1997) spätere Zellverluste mehr durch Nekroseprozesse. Ebenso referierte Fox (1998) in seiner Übersicht über durchaus unterschiedliche, zum Zelltod von Speicheldrüsenepithelien führende Mechanismen, die den Mitosetod, den Interphasezelltod, direkte DNS-Schäden, Effekte sekundärer Metaboliten, Progenitorzellschäden, veränderte Genexpressionen und

auch nichtapoptotische Vorgänge mit einschlossen. Die eigenen in der Spätphase nach RT erhobenen histologischen Befunde sprachen am ehesten dafür, dass mitotodbezogene und Nekroseprozesse eine Rolle spielen, da sich, wenn auch fokal betont, reaktive Zellinfiltrationen im Sinne einer zellulären Abräumreaktion fanden. Möglicherweise begleitende (persistierende) Apoptosemechanismen ließen sich morphologisch nicht sicher abgrenzen. Wesentliche Regenerationsvorgänge waren allerdings nicht zu belegen. Das spricht etwas gegen das Konzept residualer pluripotenter Zellen mit der Fähigkeit zur vollständigen funktionellen und morphologischen Restitution (Fox 1998), zumindest nach entsprechend hoher Dosis und unterstreicht zudem die Dosisabhängigkeit der histologischen Strahlenreaktionsbefunde. Inwieweit die gefundenen Veränderungen des Zytoskelettes und der verschiedenen EMP bestimmten Mechanismen spezifisch zugeordnet werden können, bleibt zu untersuchen. Hier erscheint es maßgeblich, zelltodassoziierte immunhistologische Phänomene von Auswirkungen anderer Strahleneffekte, z. B. Zytokinaktivierung, Enzym- oder Metabolitenveränderungen, DNS-Alterationen, zu differenzieren

Im Gesamtbild radiogener Gewebeveränderungen stellen die gezeigten Alterationen der integritätsgewährleistenden Stützelemente einen weiteren Baustein bei der Phänotypisierung der Strahlenreaktion dar. Aufgrund ihrer vielgestaltigen Funktionen ist zu vermuten, dass sie in den Prozess der sich entwickelnden histologischen und funktionellen Strahlenfolgen mit einzubeziehen sind.

5.2 Proliferationsmarker im Bereich der Speicheldrüsen

Normalgewebsreaktionen werden unter anderem durch Proliferationsstörungen erklärt. Hintergrund war, dass man schon früh (Bergoni & Tribondeau 1906) auf einen Zusammenhang von Proliferationsrate (PR) und Strahlenempfindlichkeit von TM aufmerksam wurde („je proliferativer desto strahlenempfindlicher, je differenzierter desto weniger strahlenempfindlich“, zitiert nach Herrmann & Baumann 1997). Heutzutage kann durch DNS-/Chromosomenveränderungen ein radiogener Mitotod miterklärt werden, weshalb auch wenig teilungsaktive Gewebe sehr strahlenempfindlich sein können (Dörr & Trott 2000, Herrmann & Baumann 1997). Weiterhin dient u. a. die proliferative Organisationsstruktur der Gewebe dem Verständnis der zellulären Pathogenese von Normalgewebsreaktionen. Michalowski (1984) differenzierte H-Typ-Gewebe mit strenger hierarchischer Ordnung (Stammzelle→sich vermehrende Transitzellen→reife, funktionsfähige, postmitotische Zellen, „rasch proliferierende Wechselgewebe“, z. B. Haut, Knochenmark) von F-Typ-Geweben mit mehr flexibler Struktur ohne eindeutige Trennung von Stamm- und Funktionszellen (Gewebe mit langsamer Zellteilung, z. B. Leber, Niere). Frühe Strahlenreaktionen betreffen in der Regel H-Typ-Gewebe, in denen durch Inaktivierung/Verminderung von Stamm- und Transitzellen Proliferationsstörungen auftreten können (Dörr & Trott 2000, Potten & Hendry 1983). Spätreaktionen werden eher F-Typ-Gewebe(arealen) zugeordnet, wobei neben Gefäß- (v. a. an Endothelien) und vornehmlich Fibroblastenalterationen die Parenchymzellhypoplasie das Substrat der klinischen Symptomatik darstellt. Auch diese Parenchymatrophie wird u. a. dem Verlust der reproduktiven Integrität zugeschrieben (Dörr & Trott 2000, Herrmann &

Baumann 1997). Für die in beiden Gewebetypen auftretenden Strahlenreaktionen werden Dosisabhängigkeiten angegeben (Dörr & Trott 2000, Herrmann & Baumann 1997). Die zeitliche Zuordnung der Strahlenreaktion zu den einzelnen Gewebetypen ist jedoch durch Ausnahmen und Überschneidungen nicht streng zu systematisieren, zumal bei Gewebestrukturkombinationen (H und F) in Organverbänden komplexe Reaktionsmuster resultieren können (Herrmann & Baumann 1997).

Die zelluläre Vielfalt im Azinus-Gang-System der Speicheldrüsen, die beim Menschen aus 5 (Azinus-, Schaltstück-, Luminal- und Basalzellen der Streifenstücke und Speichelgänge, Myoepithelien), bei der Ratten-GSM sogar aus 6 (zusätzlich: sekretorische Tubuluszellen) Zellelementen besteht, ließ daher kombinierte Reaktionsmuster denkbar erscheinen. Durch die geringe Regenerationspotenz im Ruhezustand zählt man sie jedoch zu den stabilen, aus reversibel postmitotischen Zellen aufgebauten Geweben (Seifert 1996). Hier reichen Angaben zur PR humaner Speicheldrüsen von unter 0.1 % (Seifert 1996) bis 0.2 % (Myoepithelien, luminale Streifenstück- und Gangzellen), 0.8 % (Schaltstückzellen), 2.0 % (Azinuszellen) und 3.2 % bei Basalzellen (Ihrler et al. 2002). Tierexperimentell wurden neben ähnlichen Raten für die Parotisdrüse (2.06 %) einerseits recht hohe Raten (16.5 %) in den Azinuszellen der GSM (Hakim et al. 2002), andererseits aber auch, selbst für junge Tiere, niedrige Raten von 0.5 % (van den Brenk 1969, Ang et al. 1991) gefunden.

Bei einer Lebensdauer der Azinuszellen von ca. 40-65 Tagen (Berthrong 1986, Cherry & Glucksmann 1959, Fajardo 1982) war die geringe PR auch ein Grund dafür, für das SD-Gewebe eine relative Strahlenresistenz anzunehmen (Casarett 1980, Rubin & Casarett 1968) und frühe wie späte Strahlenreaktionen mehr auf Gefäßschäden und Entzündungsreaktionen zurückzuführen (Rubin & Casarett 1968). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass SD-Gewebe unter den verschiedensten pathologischen Bedingungen (Entzündungen, Gangverschlüsse, Strahleneinwirkungen, Tumoren) erhöhte Zellteilungen analog den labilen Wechselgeweben aufweisen und praktisch alle Epithelien proliferieren können (Dardick et al. 1993a, Donath et al. 1973, Langbein et al. 1971, Seifert 1964), die somit einer Strahleneinwirkung sensibel ausgesetzt sind. Frühere Ergebnisse, die Basalzellen und Myoepithelien für das entscheidende proliferative Zellelement hielten (Mori et al. 1992, Sandler et al. 1984) wurden durch immunhistochemische (v. a. PCNA nachweisende Techniken) Befunde dahingehend ergänzt, dass auch Azinus-, Schaltstück- und Luminal- und Basalzellen der Speichelgänge zellzyklusfähig sind (Burford-Mason et al. 1993, Burgess et al. 1996, Dardick et al. 1993b). Ihrler et al. (2002) konnten in ihren immunhistochemischen Doppelfärbungsuntersuchungen zeigen, dass bei Streifenstücken und Gangepithelien Basalzellen als Reserve-/Progenitorzellen (über Transitzellen) für luminale Zellen dienen, während die Regeneration der Azinus- und Schaltstückzellen über eine Selbsterneuerung ohne weitere Zellbeteiligung stattfindet. Demzufolge wären hinsichtlich radiogener Proliferationsstörungsmuster H-Typ- und F-Typ-ähnliche SD-Gewebeanteile mit einzubeziehen. Die sehr raschen, innerhalb von 1-2 Tagen einsetzenden klinischen Symptome (Mundtrockenheit, veränderte Speichelzusammensetzung, Hyperamylasämie, Drüsenschwellung mit Druckempfindlichkeit und Schmerzen, Schluckstörung) und histopathologischen Befunde (Schwellung, Granulavariabilitäten, Kernpyknosen, Azinuszellverluste, zu-

nehmende Neutrophileninfiltrationen) konnten jedoch nicht ausreichend erklärt werden (Ang et al 1991, Dörr & Trott 2000), so dass zusätzliche Mechanismen i. S. direkter Azinuszellreaktionen vermutet wurden. Hier kamen vor allem schnell einsetzende (im Gegensatz zum langsameren Mitosetod) Apoptosemechanismen (Ang et al. 1991, El-Mofty & Kahn 1981, Herrmann & Baumann 1997, Kerr & Searle 1980, Seifert 1996, Sholley et al. 1974, Sodikoff et al. 1974, Stephens et al. 1986a-c & 1991) in Betracht, die in Kombination mit Membranschäden auch z. B. bei lysosomale Enzyme freisetzenden Sekretgranula zur Gewebealterationen beitragen. Dieses frühe Apoptoseprogramm wurde zudem neben mitosetodassoziierten Zelluntergängen und Gefäßveränderungen als eine mögliche Ursache für „konsekutive“ Spätfolgen angesehen (Ang et al. 1991, Fajardo 1982), wenn nach entsprechend hoher Dosis Azinuszellverluste durch nur sehr eingeschränkte Regenerationsvorgänge persistieren. Morphologisch sind diese konsekutiven Folgen kaum von echten Spätfolgen zu unterscheiden. Als weitere Faktoren und Mechanismen für Früh- und Spätreaktionen sind daneben entzündungsassoziierte Prozesse (Induktion und vermehrte Expression von Zytokinen und deren Rezeptoren sowie von Stickoxidsynthetasen, Zelladhäsionsmolekülen und Prostaglandinen) und molekulare Stressreaktionen (z. B. Aktivierung der Protoonkogene c-fos, c-jun, c-myc, c-Ha-ras oder TGF-kodierender Sequenzen) zu nennen (Dörr & Trott 2000, Herrmann & Baumann 1997, Hino et al. 2002).

Die neben Zellabtötungen und –funktionsveränderungen (Dörr & Trott 2000, Bodner et al. 1984, Zeilstra et al. 2000) genannten Proliferationsstörungen bei Strahlenreaktionsmechanismen ließen es daher interessant erscheinen, mögliche PR-Veränderungen mitzuerfassen, zumal hierzu nach humanrelevanten RT-Protokollen im Tiermodell und in der mituntersuchten mukösen GSL weniger bekannt ist.

Bei Anwendung des MIB 5-AK zur Detektion des Ki 67-Antigens fanden wir eine Azinuszell-betonte geringe Basis-PR von 0%-1% in den GSM und 0%-0.3% in den GSL. Das korreliert mit Daten von humanen Speicheldrüsen, die bei < 0.1 % (Seifert 1996), 0.2 % für Myoepithelien und luminale Zellen von Streifenstücken und Gangepithelien (Ihrler et al. 2002) und etwa 32 PCNA-positiven Zellen pro 100 „High-Power-Fields“ (Bassett et al. 1995) liegen. Basalzellen (3.2 %), Azinuszellen (2.0 %) und Schaltstückepithelien (0.8 %) können auch gering höhere PR aufweisen (Ihrler et al 2002). Auch tierexperimentell wurden eher geringe vor allem Azinuszellen betreffende PR im Sinne geringer bis moderater Kernmarkierungen (Actis et al. 2002: GSM von Mäusen) bzw. von 2.06 % (Hakim et al. 2002) bei Kaninchenparotisdrüsen beobachtet. Peter et al. (1994) fanden in der Ratten-GSM (12-13 Wochen alte Tiere) bei Azinuszellen eine PR von 2.1 %, bei Schaltstückzellen von 2.8 % und bei sekretorischen Tubuluszellen von 3.4 %, hingegen ergaben sich keine Markierungen bei Streifenstückzellen. Auch Ballagh et al. (1994) gaben für die Ratten-GSM geringe PR an, die von 0.3 % für Gangepithelien und 1.1 % für Streifenstücke bis zu 2.1 % für Schaltstückzellen und 2.2 % für Azinuszellen reichten. Hingegen wurden für Azinuszellen der Kaninchen-GSM bedeutend höhere PR von im Mittel 16.5 % (Hakim et al. 2002) angegeben. Die überwiegend geringen, aber doch konstant nachweisbaren Raten implizieren, dass prinzipiell alle glandulären Parenchymzellarten als mögliche Progenitorzellen für SD-Tumoren berücksichtigt werden müssen, auch in Tiermodellen.

Wir fanden PR-Veränderungen bei allen 4 Drüsen von strahlenexponierten Tieren. Die überwiegend nur geringere (statistisch nicht relevante) PR-Steigerung der GSL sprach für eine geringere Strahlenreagibilität rein muköser Drüsen (Seifert 1996, Scherer et al. 1991). PR-Steigerungen betrafen vielmehr die als strahlenreagibler angesehenen GSM nach einer Exposition mit 20 Gy (links: 15.7-fach, rechts: 20-fach) und 60 Gy (links: 12.3-fach, rechts: 7.4-fach), die 6 Monate nach abgeschlossener RT untersucht wurden. Auch Ballagh et al. (1994) fanden nach 30 Gy Einzeldosis in der Ratten-GSM bzw. Bassett et al. (1995) nach 50-60 Gy in der humanen GSM erhöhte PR, besonders in Azinuszellen (12.6- bzw. 1.6-facher Anstieg), Schaltstücken (3.4-facher Anstieg) und Streifenstücken (2.2-facher Anstieg) bzw. Gangzellen (ca. 2-facher Anstieg), hingegen nicht in Gangepithelien (Ballagh et al. 1994). PR-Steigerungen in SD-Regenerationsprozessen wurden allerdings nicht nur postradiationem, sondern auch nach anderen Schädigungsmustern (z. B. Gangligatur, chronische Entzündung) oder in der Zellkultur beschrieben. Nach Aufhebung einer Gangobliteration der Rattenparotis (Burford-Mason et al. 1993) konnten Regenerationen aller Zelltypen beobachtet werden, die besonders die Azinuszellen betraf (bis 38-fach erhöhte Zellmarkierung). In der Zellkultur fand sich ebenfalls eine regeneratorsche Potenz mit einem 16-fach (Glandula parotis) bzw. 9-fach (GSM) höheren Anteil zyklischer Zellen (Seifert 1996). In chronischen Entzündungsarealen humaner Speicheldrüsen, die u. a. auch bestrahlt waren, beschrieben auch Ihrler et al. (2002) erhöhte PR, insbesondere für luminale Schaltstückzellen (von 0.8% auf 3.1%), Myoepithelien (0.2% auf 1.7%) und Azinuszellen (von 2.0% auf 4.0%), was insgesamt auf PR-Veränderungen bei chronischen Schädigungsmustern hinweist. In Bezug zur RT-Dosis war das PR-Profil allerdings heterogen, durch Fluktuationen gekennzeichnet und zeigte keinen positiv dosiskorrelierten PR-Anstieg (insbesondere nicht in direkt strahlenexponierten linken GSM), obwohl PR-Veränderungen nach allgemeiner Auffassung dosisabhängig auftreten können, indem die überlebenden Zellen versuchen, die mit steigender Dosis eintretenden zunehmenden Zellverluste durch Proliferation auszugleichen. Möglicherweise ist das heterogene PR-Profil durch teilweise relativ große Streubreiten erklärbar oder durch geringe PR-Level (auch nach 60 Gy-Exposition) zum späteren Nachuntersuchungszeitpunkt bedingt, andererseits sahen auch Hakim et al. (2002) keine dosisabhängige PR-Änderung nach 7.5 Gy bzw. 15 Gy Einzeldosis i. B. der Kaninchenparotis und Kaninchen-GSM.

Dennoch interpretieren wir die im Vergleich zu Kontrollen auffällig hohen PR in der linken GSM nach 20 Gy- und 60 Gy-Exposition (geringer auch bei 40 Gy) und in der linken GSL (nach 60 Gy) dahingehend, dass bei dem verwendeten fraktionierten RT-Modus auch bei hoher Dosis proliferationsfähige Zellen verbleiben, die den Zellnachschub wenigstens partiell gewährleisten und zumindest Teilrestitutions initiieren könnten. Dies wird durch die histologischen Befunde unterstützt, die nach 40 Gy- und 60 Gy-Exposition zwar dauerhafte Strahlenreaktionen aufzeigten, deren Ausmaß jedoch geringer als dosismäßig erwartet ausfiel und daher mögliche, interkurrente Teilregenerationen einschließen könnte.

Wesentlich bedeutend war nach unseren Auswertungen die Latenzzeit. So fanden sich in beiden GSM,

vom PR-Level her insbesondere in der direkt strahlenexponierten linken GSM, 6 Monate nach abgeschlossener RT signifikant höhere PR (besonders nach 20 Gy- und 60 Gy-Exposition) als nach 12 Monaten, wobei nach 12 Monaten ein ähnlicher Wert wie bei Kontrolldrüsen erreicht wurde. Tendenziell ließ sich dieses Verhalten (besonders nach 60 Gy-Exposition) auch in beiden GSL beobachten. Diese Zeitabhängigkeit der PR-Veränderung bestätigt Befunde anderer Autoren. So ergab sich in der sehr frühen Phase bis 24 Stunden nach RT bei unterschiedlichen, aber schon geringen Dosen, ein PR-Abfall (Hakim et al. 2002: 7.5 Gy bzw. 15 Gy pro Drüse, Peter et al 1994: 15 Gy) bzw. eine Zellzyklusverlängerung. Dies korreliert mit Angaben zur Strahlenbiologie von Einzelzellen, bei denen schon nach 1-3 Gy ein Zellzyklusarrest (besonders bedeutend als G2-Arrest) mit verzögerter Zellteilung (Herrmann & Baumann 1997), aber auch als G1-Arrest, z. B. bei Fibroblasten (Dimitrijevic-Bussod et al. 1999) beschrieben wurde. Im weiteren Verlauf wurden nach 7 Tagen (Ballagh et al. 1994: 30 Gy Einzeldosis) bzw. 6 Monaten (Bassett et al. 1995: 50 bis 60 Gy) zunehmende PR beobachtet, während nach 12 Monaten gemäß unserer Befunde ein erneuter PR-Abfall zu verzeichnen war. Diesbezüglich konnte ein zusätzlicher Alterseffekt ausgeschlossen werden.

Spekulativ bleibt, inwieweit der späte PR-Abfall im Zusammenhang mit den kaum unterschiedlichen histologischen Befunden zwischen der 6- und 12-Monatslatenz zu sehen ist. Bemerkenswerterweise war trotz sinkender PR die allgemein angenommene Progredienz von Spätreaktionen nicht zu belegen. Möglicherweise kann diese Progredienz durch vornehmlich bis 6 Monate postradiationem einsetzende Restitutionsvorgänge soweit eingedämmt werden, dass persistierende PR-Steigerungen entbehrlich erscheinen -- zumindest dann, wenn nach entsprechend „schonenden“ RT-Protokollen eine Regenerationspotenz erhalten bleibt und sich nach dem von Ihrler et al. (2002) beschriebenen Konzept verschiedene Regenerationsprinzipien zu einer mehr komplexen Organstruktur kombinieren.

Überraschend zeigten sich in den rechten GSM neben einer Latenzabhängigkeit dosisabhängige PR-Veränderungen, die in abnehmenden Raten mit zunehmender Dosis zum Ausdruck kamen und erhöhte PR, insbesondere nach 20 Gy RT-Dosis bei der 6-Monatslatenz, aufwiesen – obwohl diese GSM nicht direkt strahlenexponiert waren. Da jedoch die PR teilweise recht deutlich unter denen der direkt exponierten linken GSM lagen und durch Reevaluation eine Seitenvertauschung ausgeschlossen werden konnte, interpretieren wir diesen Befund als möglichen Streustrahlungseffekt. Zusätzlich könnte eine mehr Organismus bezogene Strahlenwirkung i. S. einer allgemeinen Stressreaktion, die über eine molekulare Stressreaktion hinausgeht (Dörr & Trott 2000), zur Erklärung beitragen.

5.3 Extrakranielle Tumoren

Bei Labortieren können TM durch physikalische (z. B. UV-Strahlung, Röntgenstrahlung, Kernspaltung) und chemische (alkylierende Substanzen, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine und Amide) Agenzien sowie virale Karzinogene verursacht werden. Ratten zeigten Auswirkungen all dieser Agenzien und wurden das häufigste genutzte Labortier bei Karzinogenestudien (Peckham 1980). Neben induzierten TM finden sich jedoch auch spontane benigne und ma-

lignee TM bei Ratten (Altman & Goodman 1979, Burek & Hollander 1977, Crain 1958, Maekawa et al. 1983a & b, Sass et al. 1975, Sumi et al. 1976, Takizawa & Miyamoto 1976). Sowohl bei induzierten als auch spontanen TM spielen zudem Alter, Geschlecht, Ernährungszustand, endokriner Status, Immunstatus und Umgebungsfaktoren sowie weitere unbekannte angeborene und erworbene endogene Gewebeprädispositionen eine große Rolle bei der Tumorzinzidenz (Peckham 1980). Bei Ratten fand sich eine große Spannweite von spontanen und induzierten Neoplasien (Altman & Goodman 1979), wobei jedoch spontane, maligne TM bei dieser Spezies selten sind (Mackenzie & Garner 1973, Peckham 1980).

Die Untersuchungen der von uns im Verlauf gefundenen TM sollten unter Berücksichtigung der Ursprungsorte, der z. T. ungewöhnlichen histologischen Muster und Tumortypverteilung zum Kenntnisstand der Tumorpathohistologie bei Labortieren beitragen (Altman & Goodman 1979, Glucksmann & Cherry 1973, Zackheim et al. 1990). Hierzu wurden Differenzierungsantigene (CK) und BM- bzw. ECM-Komponenten mit einbezogen.

Zur Ätiologie von experimentellen SD-TM bei Ratten und Mäusen wurden chemische und virale Karzinogene und radioaktive Isotopen mitgeteilt (Seifert 1996). Weiterhin haben, insbesondere beim ACC, verschiedene Modelle (TM- und TM-Zelltransplantationen, in vitro-Studien) neue Aspekte der TM-Differenzierung und Wachstumsmuster unter normalen und pathologischen Bedingungen herausgearbeitet (Cheng et al. 1995, Ishikawa et al. 1994, Seifert 1996, Shirasuna et al. 1993, Sobue et al. 1989, Takeuchi et al. 1976). Unter den physikalisch induzierten TM bei Labortieren waren vor allem strahleninduzierte TM, besonders bei der als sehr strahlenempfindlich geltenden Wistar-Ratte (Peckham 1980), zusammen mit hyperthermieinduzierten TM (Baker et al. 1988, Sminia et al. 1990 & 1991, Urano et al. 1989) von Interesse, die im oder in unmittelbarer Nähe des Strahlenfeldes auftraten (Barnes et al. 1990, Broerse 1989, Sminia et al. 1993, Suit et al. 1978).

Vorwiegend entwickelten sich mesenchymale TM (Baker et al. 1988, Barnes et al. 1990, Knowles 1981, Ootsujama & Tanooka 1988, Reinhold 1965, Sminia et al. 1991 & 1990, Urano et al. 1979, Zackheim et al. 1990), z. B. Knochensarkome, Fibrosarkome, Rhabdomyosarkome und undifferenzierte Sarkome. Weniger wurden hingegen PECA als dominierende TM-Entitäten mitgeteilt (Epstein 1972, Sminia et al. 1993). Andere Karzinome, z. B. ACC, Adenokarzinome oder Basalzellkarzinome wurden selten beschrieben. So berichtete Epstein (1972) über ca. 90 % auftretende PECA nach geringen Strahlendosen und Sminia et al. (1993) fanden nach fraktionierter RT von 60-82 Gy vorwiegend PECA (12/23 TM = 52 %) gegenüber Sarkomen (7/23 TM = 23 %), Basalzellkarzinomen (2/23 TM = 8.6 %) und sebazösen Karzinomen (2/23 TM = 8.6 %) im Bereich der Haut und des Subkutangewebes innerhalb des Strahlenfeldes. Die Autoren berichteten allerdings nicht über eventuell begleitende spontane Tumoren. Auch Baker et al. (1988) und Ootsujama & Tanooka (1988 & 1991) sahen Haut und Subkutangewebe als häufige Ursprungsorte sekundärer TM nach fraktionierter RT, wohingegen über von den SD ausgehende strahlen- oder radioisotopenassoziierte TM weniger berichtet wurde (Espinal et al. 1984, Seifert 1996). Espinal et al. (1984) fanden bei ihren nach Radioisotopen-Applikation auf-

tretenden SD-TM vorwiegend Sarkome (50 %) gegenüber Karzinomen (35 %) und Karzino-Sarkomen (14.5 %). Auch in humanen Geweben wurde nach Radiojod-Therapie von Schilddrüsenkarzinomen auf sekundär auftretende SD-TM (z. B. Mukoepidermoidkarzinome: Henze & Hittel 2001) hingewiesen.

Nach diesen Literaturdaten waren die von uns beobachteten SD-TM ungewöhnlich. Während PECA unter den SD-TM dominierten, konnten wir zusätzlich noch ACC, mikrozystische Adenokarzinome, Zystadenokarzinome und ein sebazöses Adenokarzinom feststellen. Zudem war das Fehlen von Haut-TM auffällig (Zackheim et al. 1990), was durch eine mögliche rattenartdifferentielle Empfänglichkeit bei der Entwicklung von Haut-TM erklärt werden könnte (Peckham 1980).

Teilweise stimmen unsere Befunde mit den Literaturdaten überein. Die malignen, im Strahlenfeld wachsenden TM waren überwiegend PECA (5/10 = 50 %), 3 von 10 (30 %) waren Adenokarzinome mit unterschiedlichen Wachstumsmustern und 2 von 10 (20 %) waren ACC. Sarkome oder Karzino-sarkome fanden sich nicht. Unter Berücksichtigung der Haupttumorlokalisation oder der z. T. weiter fortgeschrittenen tumorösen SD-Destruktion konnten die im Strahlenfeld liegenden SD meist sicher als Ursprungsgewebe identifiziert werden. Dies galt auch für die PECA mit einer Ausnahme, bei der der maxilläre Primär-TM sekundär die Parotisregion infiltrierte. Diese PECA-Dominanz unterstützt humane Daten, die eine zunehmende Häufigkeit von PECA in SD nach einer RT beschrieben (Shemen et al. 1987, Spitz & Batsakis 1984). Es erscheint jedoch denkbar, dass kleine primäre Haut-TM sekundär in die SD penetrierten. Sminia et al. (1993) beschrieben jedenfalls eine 100 %-Inzidenz von Haut-TM nach RT von 60-82 Gy im Langzeitnachbeobachtungszeitraum bis zu 450 Tagen. Hingegen entwickelten sich unsere PECA nach relativ kurzer Latenzzeit (im Median nach 6 Monaten) und es fehlten makroskopisch sichtbare, tumoröse Hautläsionen.

Zu bemerken ist weiterhin, dass nur ein benigner TM im Strahlenfeld bestrahlter Tiere auftrat. Außerhalb des Strahlenfeldes bestrahlter Tiere waren weder maligne noch benigne TM festzustellen. Da spontane Ratten-TM mehrheitlich gegen Ende der Lebenszeit auftreten (Peckham 1980) und die von uns beobachteten TM bei bestrahlten Tieren vornehmlich bei jüngeren Tieren (1 Jahr oder jünger) festzustellen waren, interpretieren wir daher das Fehlen weiterer TM als Folge des jüngeren Tieralters, zumal die benignen TM zumeist bei nicht bestrahlten, älteren Tieren außerhalb der linken Kopf-Hals-Region auftraten. Diese TM waren vorwiegend Fibrome oder Fibroadenome, welche bevorzugt in der Milchleistenregion zu Tage traten. Das histologische Bild und die TM-Lokalisation (zusammen mit den wenigen malignen TM der Milchleistenregion) stehen dahingehend im Einklang mit früheren Berichten, als Brust-TM zu den häufigsten spontanen Ratten-TM zählen und ein mit dem Alter zunehmendes Vorkommen von Mamma-TM oberhalb von 18 Monaten beschrieben wurde (Altman & Goodman 1979).

Strahlenassoziierte TM bei Labortieren sowohl nach Einzeldosisapplikation (Sminia et al. 1991 & 1990, Suit et al. 1978, Urano et al. 1979, Zackheim et al. 1990) mit Latenzen von 470-520 Tagen als auch nach fraktionierter RT (Baker et al. 1988, Epstein 1972, Ootsujama & Tanooka 1988 & 1991,

Sminia et al. 1993) mit Latenzen von 330-490 Tagen auftreten. Bei beiden RT-Schemata wurden verkürzte Latenzen mit zunehmender Dosis beschrieben (Sminia et al. 1993, Suit et al. 1978, Urano et al. 1989). So gaben Sminia et al. (1993) nach 30-35 Fraktionen von 1.9-2.7 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 60-83 Gy eine mediane TM-Latenz von 381 Tagen in 60 Gy exponierten Hautarealen an, wohingegen die mediane TM-Latenz bei mit 82 Gy exponierten Tieren auf 274 Tage sank. Im Gegensatz dazu detektierten wir die TM 3-8 Monate (Median: 6 Monate = ca. 182 Tage) nach abgeschlossener RT. Rechnet man die Zeit ab RT-Beginn dazu (ca. 42 Tage), erscheinen diese Latenzen dennoch relativ kurz. Dies deutet darauf hin, dass Haut- und SD-TM mit unterschiedlichen Latenzen auftreten können und wird durch Angaben von Espinal et al. (1984) unterstützt, deren radioisotopinduzierte SD-TM nach etwa 7 Monaten auftraten. Andererseits ist einschränkend zu bemerken, dass wir keine systematische Strahlentumorinduktionsstudie durchführten, sondern die TM im Untersuchungsverlauf beobachteten. Da die TM neben den intendierten Fragestellungen die Lebensqualität der Tiere beeinflusste, wurden sie vor dem Einsetzen eines extensiven Größenwachstum relativ früh entdeckt, was die kurzen Latenzen mit erklären könnte. Die Beobachtung relativ kurzer Latenzen für kleinere TM wird zudem dadurch unterstützt, dass Sminia et al. (1993) für kleine maligne Hautläsionen (2 mm im Durchmesser) bei mit 60 Gy exponierten Ratten eine mediane Latenz von 117 Tagen angaben.

Bei den der näheren TM-Charakterisierung dienenden immunhistologischen Untersuchungen der CK- und Kollagen-Expressionsmuster fanden wir für 6 CK-AK reproduzierbare Befunde. Dies betont die Notwendigkeit von speziesspezifischen AK bei Tiermodellen, worauf auch Hamakawa et al. (1999) besonders hinwies. Sie beschrieben für die von ihnen genutzten 16 AK deutlich variierende qualitative und quantitative CK-Expressionsprofile im SD-Gewebe verschiedener Nagetiere.

Die ACC (glandulärer Subtyp) zeigten positive CK- Immunaktivitäten. Unter Berücksichtigung der ungewöhnlichen Wachstums- und Zellmuster konnte diese CK-Positivität die epitheliale Natur der TM-Zellen nachweisen. Zusätzlich sprachen das CK-Verteilungsmuster und die Expression der Basis-CK gemeinsam mit zylinderepitheltypischen CK zusammen mit dem morphologischen Bild für einen SD-TM, welcher aus Gangepithelien und Myoepithelien zusammengesetzt ist. Diese Interpretation steht im Einklang mit Befunden aus humanen Geweben (Caselitz et al. 1984 & 1986, Seifert 1996).

Bei den Zystadenokarzinomen wurden ebenfalls Immunreaktivitäten der Basis-CK und zylinderepitheltypischen CK gefunden, die zusammen mit dem TM-Sitz die Ursprungslokalisation im SD-Gewebe ermöglichten. In den papillären Projektionen waren sowohl die Gangstrukturen als auch die modifizierten Myoepithelzellen merklich positiv für die CK-Antikörper. Auch Shrestha et al. (1994a) beschrieben positive CK- und S 100-Reaktionen von TM-Zellen, welche der Expression von Myoepithelien ähnelten. Da wir jedoch mit den von uns verwendeten zusätzlichen Markern (S 100, Glattmuskulaktin) keine sicher reproduzierbaren Ergebnisse feststellen konnten, war der myoepitheliale Charakter der Zellen nicht sicher zu belegen.

Bei den mikrozystischen Adenokarzinomen wies das CK-Expressionsprofil (Basis-CK und zylinderepitheltypische Expressionen) zusammen mit dem morphologischen Bild auf gangepithel- und myoe-

pithelähnliche Zellformationen hin. Dies könnte ihre Klassifikation als polymorphzellige Low-grade-Adenokarzinome mit gewisser mikrozystischer Differenzierung unterstützen. Andererseits könnten diese Fälle den „NOS (nicht anderweitig spezifizierten) –Adenokarzinomen“ zugeordnet werden, da sie ein für polymorphzellige Low-grade-Adenokarzinome relativ ungewöhnliches, einheitliches Wachstumsmuster aufwiesen. Als Zusatzargument könnte dabei das von Seifert (1996) für Humangeewebe beschriebene, sehr variable Bild der Zelldifferenzierung bei „NOS-Adenokarzinomen“ dienen. Daher war die verlässliche Diagnose bei unseren Ratten-TM etwas erschwert.

Außer der CK 7-Expression zeigte das sebazöse Karzinom nur eine sehr schwache oder fokale CK-Färbung bei den soliden und glandulären Tumorzellformationen, obwohl in Analogie zu humanen Geweben und im Hinblick auf die Zell- und Gewebsstruktur (Salm & Wright 1975) durchaus merkliche Expressionen zu erwarten gewesen wären (Seifert 1996, Takata et al. 1989). Die schwache Reaktion ist möglicherweise durch den nicht humanen Zelltyp erklärlich und kann demzufolge einem deutlichen CK-Verlust im Rattengewebe entsprechen.

Die vorwiegend im Parotisbereich lokalisierten PECA zeigten vornehmlich Immunreaktivitäten, die typischerweise als Basis-CK-Expressionen in epithelialen Geweben vorkommen. Zusätzlich wurden teilweise CK-Expressionen beobachtet, die einen hyperproliferativen Epithelstatus anzeigen. Bei den TM-Zellformationen dominierten CK 5/6-Expressionen, daneben waren fokale CK 8/18-Immunreaktionen auffällig. Zur Frage einer möglichen Koexpression von CK und Vimentin in HNO-Tumoren (Maier et al. 1988, Wallner et al. 1990) kann aufgrund der eigenen, meist sehr heterogenen, bzw. auch unspezifischen Vimentinreaktionen in den TM nur für fokale Herde im Einzelschnitt eine Koexpression bestätigt werden. In Verbindung mit dem histomorphologischen Bild erlaubte die CK-Expression eine reliable TM-Klassifikation, wie sie z. B. von Moll (1993) beschrieben wurde. Im Gegensatz zu der bei unseren Fällen relativ häufigen TM-Entität (42.9% der 14 malignen TM; 44.4%, alle Fälle bestrahlt, der 9 malignen SD-TM) wird für humane Gewebe von deutlich geringeren Raten ausgegangen. Seifert (1996) verwies darauf, dass PECA etwa 6-13.9 % der malignen TM der großen SD ausmachen. Dies könnte möglicherweise höher anzusetzen sein, da Takata et al. (1987) innerhalb einer Gruppe von undifferenzierten Karzinomen viele wenig differenzierte PECA anhand immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Methoden nachwiesen. Die beim Menschen nach vorheriger RT der Kopf-Hals-Region beschriebene vermehrte Häufigkeit von PECA im Parotisdgewebe (Shemen et al. 1987, Spitz & Batsakis 1984) unterstützt unsere erhöhte PECA-Anzahl bei den SD-TM und weist auf eine mögliche besondere Strahlenassoziation dieser TM hin.

Zur Expression von BM- oder BM-assoziierten Proteinen in Ratten-TM liegen nur wenige Hinweise vor, was die Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse einschränkt. In humanen Geweben wurden jedoch diese EMP, gerade auch in TM gut dokumentiert (u. a. Caselitz et al. 1988 & 1986a, D'Ardenne 1989, Nerlich et al. 1994, Nerlich 1995, Seifert 1996, Skalova & Leivo 1992a, b).

In den PECA fanden sich sowohl schwach darstellbare CIV-Reaktionen als auch merkliche BM-Verluste. Dieses Muster war ebenfalls für das interstitielle CIII zu demonstrieren. Andererseits kam es

fokal zu deutlich vermehrten CIII-Expressionen, insbesondere um die TM-Zellformationen und in angrenzenden Nervenästen. Diese Befunde korrelieren mit humanen SD-TM (Caselitz et al. 1988, Skalova & Leivo 1992a, b), zumal auch Nerlich et al. (1994) fokale quantitative und qualitative BM-Verluste bei malignen Kopf-Hals-TM angaben. Ein früher CVII-Verlust (Nerlich et al. 1994) konnte wegen mangelnder AK-Spezifität bei unseren TM allerdings nicht aufgezeigt werden. Das insgesamt etwas heterogene Expressionsmuster führen wir am ehesten auf die Tierspezies und die z. T. reduzierte Tumordifferenzierung zurück.

Die extrazelluläre Matrix von ACC enthält verschiedene Strukturen wie z. B. Laminin, Fibronectin, CIV, Entaktin und HPSG (Cheng et al. 1992). Die Produktion und extrazelluläre Ablagerung dieser und anderer Substanzen (z. B. Chondroitin-6-sulfatproteoglykan) durch TM-Zellen führt zur Entwicklung von Pseudozysten (Cheng et al. 1995, Seifert 1996), die eine Dreischichtung mit außenliegenden Duplikationen von BM-Materialien, intermediär liegenden granulären mukoiden Substanzen (vermutlich Proteoglykane) und zentralgelegenen aperiodischen Kollagenfibrillen (CIV) bzw. Laminin aufweisen können (Chen 1976, Caselitz et al. 1986a, Raitz et al. 2003). Die von uns untersuchten ACC zeigten nur schwache, meist lineare BM-Expressionen außer der deutlich positiven Färbung in Pseudozysten, wohingegen Pseudozysten begrenzende BM-Duplikationen, -Augmentationen oder -Kondensationen (Caselitz et al. 1986a, Raitz et al. 2003) nicht zu Tage traten. Unter Berücksichtigung des zu einem glandulär-cribriformen Subtyp passenden Wachstumsmusters und der positiven Reaktionen in Pseudozysten, war die von Seifert (1996) beschriebene ACC-Klassifikation auch bei den Ratten-TM anwendbar. Die Beziehung von BM/BM-assoziierten Expressionsmustern und zunehmender TM-Dedifferenzierung (Caselitz et al. 1986a, Seifert 1996) blieb jedoch offen, da wir nur einen TM-Subtyp beobachteten. Insgesamt differierte unser BM-Expressionsmuster nicht wesentlich von den Liereturdaten, zumal Skalova & Leivo (1992a, b) im glandulären Subtyp anhand der Laminin- und CIV-Immunreaktionen dünne lineare BM an den Rändern der TM-Zellnester, starke lineare Färbungen um Pseudozysten und stark reagierende Materialien in den Pseudozysten beschrieben, obschon die Pseudozysten-begrenzende Expression in unseren Fällen deutlich schwächer ausfiel. Da in Humangebilden vermehrte BM-Unregelmäßigkeiten mit zunehmender TM-Entdifferenzierung verbunden sein können, könnte in der erhaltenen, linearen, wenn auch schwachen BM-Präsenz ein Zeichen geringerer Dedifferenzierung gesehen werden.

In den Adenokarzinomen fanden sich durchaus deutlichere Expressionen. Hier zeigten sich sowohl fokale Konglomerate als auch kontinuierliche, vermehrt und verbreitert reagierende BM-Muster. In den mehr anaplastischen TM-Regionen traten jedoch auch fragmentierte, unterbrochene, mehr aufgesplitterte BM-Reaktionen auf. Dies variierende, etwas heterogene Expressionsmuster steht im Einklang mit berichteten Befunden von SD-Karzinomen (Caselitz et al 1988, Skalova & Leivo 1992a, b). Das sebazöse Karzinom zeigte nur schwache Kollagenexpressionen, obwohl hier stärkere BM-Immunreaktionen zu erwarten gewesen wären. Hier könnten die Rattenart und das untypische/ungewöhnliche Wachstumsmuster Erklärungen für die schwachen Immunreaktionen bieten.

Trotz der teilweisen Übereinstimmung mit den Literaturdaten muss betont werden, dass die z. T. ungewöhnliche Zell- und Gewebemorphologie und dadurch begründete schwierige TM-Klassifikation nur einen eingeschränkten Vergleich mit Humangeweben erlaubte. Dennoch sprachen häufiger etwas verstärkte Immunreaktionen in TM-Arealen mit fokal dominierenden Myoepithelien für deren Bedeutung bezüglich der BM-Produktion (Azuma et al. 1996a, Caselitz et al. 1988, Shirasuna et al. 1990, Skalova & Leivo 1992a & b, Sobue et al. 1989, Tralongo et al. 1997), auch im Tiermodell.

Zusammenfassend ist zu betonen, dass die verschiedenen TM-Entitäten separat zu betrachten sind. Einerseits zeigten sich verbreiterte BM mit vermehrten Immunreaktionen (Adenokarzinome). Andererseits konnten schwache BM-Expressionen (PECA, ACC), BM-Verluste (PECA) und BM-Fragmente (PECA, Zystadenokarzinome, mikrozystisches Adenokarzinom) herausgearbeitet werden, insbesondere in verstärkt anaplastischen TM-Arealen. Zusätzlich wurden, vor allem in weniger differenzierten TM-Regionen, BM-Konglomerate beobachtet. Unter Berücksichtigung der ungewöhnlichen Wachstumsmuster besteht nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit mit Humangeweben. Es kann jedoch auch bei Ratten-TM in Erwägung gezogen werden, dass sich abnehmende BM-Expressionen mit einer zunehmenden strukturellen TM-Entdifferenzierung assoziieren. Die Dominanz maligner TM im Strahlenfeld betont die Bedeutung der RT bezüglich der möglichen Entwicklung sekundärer TM. Nicht nur Sarkome, sondern auch Karzinome verschiedener Ursprungsgewebe sollten in die Beobachtungen von RT-Spätfolgen einbezogen werden. Im Falle sehr aggressiver TM könnte dies unterschiedliche Therapiestrategien implizieren.

5.4 Intrakranielle Tumoren (Hypophysenadenome)

Die Rate der von uns beobachteten Hypophysenadenome (HA), die in 5 von 9 Fällen GH, TSH und PRL produzierten, betrug 15%. Diese Häufigkeit stimmt mit Angaben der älteren Literatur zu spontan auftretenden HA bei Zuchtratten überein (Griepentrog 1964, Pickering & Pickering 1984). Jüngere Studien berichten allerdings von einer deutlich höheren Inzidenz. So haben Eiben & Bomhard (1999) die Änderungen des Auftretens von Hypophysen-TM über einen Zeitraum von 20 Jahren untersucht. Hierfür standen die Daten von über 8000 Sektionen aus 70 Studien von 2 Jahre alten Wistar-Ratten (Kontrolltiere) zur Verfügung, wobei die gesamt durchschnittliche TM-Inzidenz der weiblichen Tiere am Ende des 2 jährigen Studienintervalls mit 29 % angegeben wurde (Variation 7-58 %). Haltung und Ernährung der Spezies waren im Untersuchungsintervall konstant. Die Autoren beschreiben eine signifikante Zunahme von Hypophysen-TM bei weiblichen Wistar-Ratten im 20-jährigen Beobachtungszeitraum. Ein Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme konnte ausgeschlossen werden. Im Vergleich mit Untersuchungen an anderen Stämmen (Chandra et al. 1992, Chandra & Frith 1992, Hase-man & Rao 1992, McMMartin et al. 1992) hatten jedoch weibliche Wistar-Ratten die geringste TM-Anzahl. Andererseits wurde von Walsh & Poteracki (1994) am gleichen Stamm eine höhere Inzidenz angegeben (54.9 %), was möglicherweise auf die unterschiedliche Tieranzahl und differente Tierhaltungsbedingungen zurückzuführen ist.

In unserer Untersuchung traten die Adenome früher auf, als dies für spontane HA zu erwarten gewesen wäre. Dies bestätigte frühere Berichte mit auch späterhin allgemeiner Akzeptanz, dass die Bestrahlung das Auftreten von HA beschleunige (van Dyke et al. 1959). Die nach jüngerer Literatur höher anzusetzende spontane TM-Inzidenz berücksichtigend (Eiben & Bomhard 1999) kann dies dahingehend interpretiert werden, dass die für die Entwicklung von HA empfängliche Spezies unter Bestrahlung 50 % der zu erwartenden TM teilweise bereits nach 6 bzw. überwiegend nach 10-12 Monaten entwickelt hatte. Auch ein fraktionierter RT-Modus scheint nicht geeignet, die frühe Entwicklung dieser TM zu verhindern. Allerdings sind die verglichenen Kollektive sehr unterschiedlich groß, was eine sehr vorsichtige Beurteilung impliziert. Die von Eiben & Bomhard (1999) für toxikologische Studien geäußerte Empfehlung, die Nachbeobachtungsphase, u. a. zur Vermeidung einer höheren TM-Inzidenz, auf 6 Monate zu verkürzen, kann jedoch für die Überprüfung von strahlenbiologischen Langzeitwirkungen nicht übernommen werden.

Die Induktion von HA scheint daneben dosisabhängig zu sein. So berichtete Sommers (1971) unter Berufung auf ein Gespräch mit Furth, dass hohe RT-Dosen die Anzahl von HA unter die Rate spontaner Hypophysen-TM gesenkt habe. Demnach können hohe Dosen die Teilungsfähigkeit besonders dieses Drüsengewebes derartig mindern, dass daraus bei entsprechender Indikation (Residual- oder Rezidiv-TM, Inoperabilität, medikamentös-refraktäre TM) auch eine strahlentherapeutische Option bei gutartigen HA erwächst (Bamberg et al. 1989 & 1996, Clarke et al. 1993). Die Dosisassoziation könnte zudem miterklären, dass die von uns gefundenen HA häufiger bei Ratten auftraten, die eine geringere Gesamtdosis erhalten hatten. Diese Interpretation ist jedoch nur mit Vorbehalt zulässig, da die Autopsien nach vorbestimmten Nachuntersuchungszeiträumen durchgeführt wurden und es sich zumeist um Zufallsbefunde handelte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei längerer Nachbeobachtungszeit die Rate an HA auch nach Exposition mit höheren RT-Dosen stark angestiegen wäre.

Da anhand der Immunhistologie Untersuchungen zur Hormonbildung dieser TM intendiert waren, wurden die literaturgemäßen Hinweise zur Hypophysenfunktion bzw. zur funktionellen Wirkung der TM (Bielschowsky 1954, Brauer & Rappaport 1989, Groß & Engenhardt-Cabillic 2000, Littley et al. 1989 & 1990, Saeger 1997, Tan & Kunaratnam 1966) nicht näher miteinbezogen. Nach RT kann die hypothalamische Kontrolle der PRL-Sekretion der Hypophyse unterbrochen sein. Allerdings wurden in jener Untersuchung höhere Einzeldosen bis zu 20 Gy appliziert (Guo et al. 1997).

Die PR der TM erschien ungewöhnlich hoch und sollte in Folgeuntersuchungen überprüft werden.

Für experimentelle Studien an Ratten wurde die allgemeine Sektion zur Überprüfung der Untersuchungsbedingungen empfohlen (Eiben & Bomhard 1999). Diese Empfehlung kann dahingehend ergänzt werden, dass insbesondere bei experimenteller Kopf-Hals-RT die Hirnautopsie routinemäßig erfolgen sollte. Für die Verlaufskontrolle von strahlentherapierten Patienten, deren Gehirn oder Hirnanteile im Strahlenfeld lagen, ist die laborchemische Kontrolle der Hypophysenleistung nach wie vor anzuraten.

5.5 Laryngo-Trachealbereich

5.5.1 Klinik und allgemeine Histomorphologie

Durch die externe RT vor allem fortgeschrittener Kopf-Hals-Malignome werden nahezu stets auch laryngo-pharyngeale, nicht tumorbefallene Normalgewebe mitbelastet, die neben Frühreaktionen (Mukositis) gefürchtete Spätreaktionen (Fibrose, Perichondritis, Chondro-/Osteoradionekrosen, Weichgewebs-/Stützgewebsstenosen, chronische Ödeme, Xerostomie: u. a. Dietz et al. 1995 & 1998, Herrmann & Baumann 1997, Scherer & Sack 1996, Seifert 1996) aufweisen können. Trotz sinkender Inzidenzangaben für schwere laryngeale Strahlenreaktionen von 5-12% auf etwa 1% (Hunter & Scher 2003, Fitzgerald & Koch 1999) sind im Larynxbereich besonders unterschiedlich ausgeprägte Ödeme mit möglichen Atmungsbehinderungen, Stimmstörungen sowie Dysphagien (Böhme 1997, Dietz et al. 1998, Rezvani et al. 1991, Tombolini et al. 1995) zu beachten.

Während klinische Symptome/Befunde und ein entsprechendes Management nach der LENT/SOMA-Klassifikation (1995) oder im mehr amerikanischen Schrifttum nach der CHANDLER-Klassifikation (Chandler 1979) auch heutzutage noch (Hunter & Scher 2003) dokumentiert werden, sind Einteilungen auf histologischer Basis bisher nicht systematisiert. Als typisch werden parenchymatöse und stromale Zellveränderungen, reaktive Zellinfiltrate, Gefäßalterationen und eine zunehmende Fibrose angesehen, die z. B. zu perichondralen Ernährungsstörungen und nachfolgenden Knorpelnekrosen führen kann (Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Herrmann & Baumann 1997). Andererseits gilt der Larynx mit seinem ruhenden Knorpelgerüst als weitgehend strahlenresistent (Herrmann & Baumann 1997, Wang & McIntyre 1993), da schwere bis schwerste Veränderungen, zumindest unterhalb von 70 Gy (Herrmann & Baumann 1997) bzw. 60-65 Gy (Dietz et al. 1998) nicht selten fehlen. So beobachteten letztere Autoren unterhalb dieser Dosis nur leichtere Ödeme (Grad 1+2) bei 5.8% ihres Patientenkollektivs. Mit zunehmender altersbedingter Larynxverknöcherung ist jedoch eine etwas geringere Toleranzgrenze mit einer $TD_{5/5}$ bei 60 Gy anzunehmen, insbesondere im Bereich der häufig dicht und vollständig verknöchernden Aryknorpel (O'Brien 1996, Keene et al. 1982).

Unter besonderer Berücksichtigung der im klinischen Fokus stehenden Larynxödeme (Parsons 1994: „most common sequela“), sollte daher ein Beitrag zur histologischen Charakterisierung radiogener Spätreaktionsmuster im Laryngo-Trachealbereich geleistet werden, der auch mögliche zeit- und altersabhängige Veränderungen miteinbezieht.

Während klinisch hinsichtlich des Schweregrades von Larynxödemem eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung anzunehmen ist (Budach 1998, Burman et al. 1991, Dietz et al. 1998), wird deren Inzidenz und Persistenz in Abhängigkeit von verschiedenen RT-Schemata z. T. kontrovers diskutiert, was in unterschiedlichen Inzidenz- bzw. TD-Angaben zum Ausdruck kommt. Bei konventionellen Fraktionierungen fanden sich $TD_{5/5}$ bei 50 Gy bzw. $TD_{5/5}$ bei 70 Gy (Burman et al. 1991), Gesamtinzidenzen von 15.4% bzw. 46.2% ab 70 Gy (Fu et al. 1982), 36% (Rezvani et al. 1991), 29% (Parsons 1994), 22.1% (Deore et al. 1991), 20.9% (moderate oder schwere Ödeme: Ichimura et al. 1997), 16.6% bei 68-70 Gy (Kaanders et al. 1992) und 15.3% bei 60-66 Gy (van der Voet et al. 1998). Nach kombinier-

ter Radio-Chemotherapie bzw. hyperfraktionierten RT (Übersicht bei Olmi & Fallai 1997) wurden z. B. Gesamtinzidenzen von 58.8% bei einer medianen Larynxdosis von 65-70 Gy (Dietz et al. 1998), 59% bei 72 Gy (Dinges et al. 1997) und 40% (Kaanders et al. 1992) angegeben. Fu et al. (1995) stellten zusammenfassend für verschiedene Dosisgruppen nach hyperfraktionierter RT Larynxspätreaktionen mit Gesamtinzidenzen von 20-29% (Grad 1-4) dar, welche nicht dosis-, sondern fraktionszeitintervallabhängig waren. Für Grad 3-Ödeme betragen die Raten jedoch nur 2-3% und für Grad 4-Ödeme 0-2%. Nach der verschiedenen TM-Lokalisationen, RT-Schemata und Gesamtdosen einbeziehenden Übersicht von O'Brien (1996) ist für die Frühphase (bis 3 Monate) eine Inzidenz von ca. 25% (15-28%) anzunehmen, die im Zeitverlauf jenseits von 6 Monaten deutlich sinkt (0-6%).

Obwohl Budach (1998) bei Akzeleration nicht wesentlich verstärkte Spätreaktionen, bei Hyperfraktionierung eine fast unveränderte Inzidenz und bei Akzelerierung + Hyperfraktionierung eine z. T. unveränderte Spättoxizität an Gefäßen, Knochen und Bindegeweben konkludiert, weisen speziell die Larynxödem-Raten auf eine recht deutliche Variationsbreite (15.3%-59%) hin. Bis auf die auffällig hohe Inzidenz von 100% bei 2 Gy/F und 60 Gy Gesamtdosis und auffällig niedrigen Raten von 0% bei 1,6 Gy/F und 68 Gy bzw. 0% bei 1,8 Gy/F und 63 Gy Gesamtdosis (Löffler 1974) gliedern sich in diese Spannbreite auch die für akzelerierte Protokolle angegebenen zunehmenden tagesdosis- bzw. fraktionsdosisabhängigen Ödeminzidenzen (Ward et al. 1975) ein, die von 17.2% bei 2.25 Gy/F und 60-63 Gy Gesamtdosis, 20.1% bei 2.5 Gy/F und 55-65 Gy Gesamtdosis bis 31.1% bei 3.33 Gy/F und 50-53 Gy Gesamtdosis reichten (Deore et al. 1991) oder 33% bei 1,7 Gy/F und 71-73 Gy Gesamtdosis betragen (Löffler 1974). Die Variationsbreite ist möglicherweise so zu begründen, dass nicht immer spezifische bzw. kombinierte Angaben über Art, Ausprägung und Dauer der laryngealen Spätreaktionen vorlagen (**Tab. 12a im Anhang**), zumal entsprechende Daten aus zahlreichen anderen TM-Studien zum Vergleich verschiedener RT-Schemata oder zum Vergleich der RT vs. Chirurgie nur teilweise vorhanden bzw. eingeschränkt verwertbar sind, da mehr auf Überlebens- und Rezidiv-/Residualraten, Organ- bzw. Stimmlinienhalt, Metastasierungsverhalten oder sekundäre TM fokussiert wurde (Barton et al. 1992, Croll et al. 1989, Duncan et al. 1996, Fein et al. 1993, Flentje & Wannemacher 1991, Glanz et al. 1989, Hayakawa et al. 1992, Howell-Burke et al. 1990, Kleinsasser et al. 1988, McGuirt & Ray 1999, Lesnicar et al. 1996, Lusinchi et al. 1990, Robbins et al. 1996, van Rutten et al. 1994, Wang & McIntyre 1993) oder mehr deskriptiv als nicht bemerkenswert oder nicht relevant beschrieben wurden (Medini et al. 1996, Antognoni et al. 1990). Insgesamt kann nach Budach (1998) eine Larynxödem-Inzidenz von ca. 50% angenommen werden. Demgegenüber fanden wir im Tiermodell nach konventioneller RT deutlich höhere Inzidenzen. Die in der Ausprägung nach 40 Gy-Exposition betonten subepithelialen und interstitiellen Ödeme betrafen 89 % der mit 40 Gy exponierten Tiere und 100 % der mit 60 Gy exponierten Tiere. Das Ödem war jedoch insgesamt nur geringgradig ausgeprägt und kann annäherungsweise mit dem Grad I bis II der LENT/SOMA-Tabelle verglichen werden. Die hohe Inzidenz führen wir in erster Linie auf die histologische Untersuchungstechnik zurück, welche auch geringere, der Laryngoskopie entgehende Ödeme erfasst (Fajardo 1982). Über-

wiegend geringere Schweregrade werden auch sonst in der Literatur angegeben. Fu et al. (1982) fanden überwiegend geringe bis moderate Ödeme oder sahen 25% Grad 1+2- vs. 4% Grad 3+4-Ödeme (Fu et al. 1995). Dietz et al. (1998) bzw. Dinges et al. (1997) beschrieben 29.4% Grad 1+2- vs. 14.7% Grad 3+4 bzw. 52% Grad 1+2- vs. 7% Grad 3+4-Ödeme. Auch Parsons (1994) ging von gewöhnlich gering bis mittelgradigen Ödemen aus. Eine gewisse Sonderstellung nehmen die beobachteten supraglottischen pseudopapillären Formationen ein, die flüssigkeitsgefüllten Aussackungen entsprechen, und als mögliche Vorstufe stärkerer Ödeme interpretiert werden könnten. Durch die, wenn auch nur tendenzielle positive Dosis-Wirkungs-Korrelation deutete sich daher auch für geringere Ödeme die insbesondere für schwere Larynxödeme beschriebene (Budach 1998) sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve an. Zur Ödemregredienz nach RT wird überwiegend von einer Rückbildungsfähigkeit, jedoch in unterschiedlichen Zeiträumen ausgegangen. Fajardo (1982) und Bahadur et al. (1985) gaben 6 Wochen an oder fanden bei nach 3 Monaten aufgetretenen Ödemen eine Regredienz nach Antibiose (Bahadur et al. 1985). Fu et al. (1982) beobachteten bei Tumorfreiheit innerhalb von 2 Jahren bei 66.6% zurückgebildete und bei 33.3% persistierende, bei Nicht-Tumorfreiheit meist progrediente Ödeme. Kaanders et al. (1992) gaben nach Auftreten innerhalb von 6 Monaten überwiegend rückbildungsfähige (75% regrediente vs. 25% persistierende) Ödeme an. Nach Parsons (1994) betrug die Zeitspanne 6-12 Monate. Tombolini et al. (1995) bemerkten keine persistierenden Ödeme. O'Brien (1996) gab jenseits von 6 Monaten geringere Inzidenzen (0-6%) als für die Frühphase (15-28%) an, was auf eine Rückbildungsfähigkeit hinweist. Ichimura et al. (1997) fanden innerhalb eines Jahres jeweils zu 50% persistierende und regrediente Ödeme. Nach kombinierter Radio-Chemo-Therapie wurde von Dinges et al. (1997) und Olmi & Fallai (1997) mitgeteilt, dass keine spezifischen Hinweise bzw. keine gesicherte Datenlage über ein zeitlich verändertes Verhalten vorlägen. Demgegenüber ließ sich anhand der eigenen Befunde keine eindeutige Ödemregredienz belegen, da sich die Befunde nach 6-monatiger Latenz im Vergleich zur 12-Monatslatenz nicht signifikant unterschieden, also auch noch 1 Jahr nach Beendigung der RT bestanden. In Anbetracht der variierenden Zeitspanne, in der eine Rückbildung erwartet werden darf, wäre jedoch zu einem noch späteren Untersuchungszeitpunkt eine gewisse Regredienz denkbar. Andererseits könnte man vermuten, dass bereits in den ersten 6 Monaten Rückbildung stattgefunden hat. Dafür spräche die zumeist geringere Ödemausprägung. Dem steht entgegen, dass literaturgemäß überwiegend geringere Schweregrade gefunden wurden. Die von uns gefundene Ödempersistenz wird durch Daten von Dietz et al. (1998) unterstützt, die bei einer medianen Beobachtungszeit von 250 Tagen in den meisten Fällen nahezu unveränderte Larynxödeme angaben. Auch Ichimura et al. (1997) fanden mehr als ein Jahr nach RT-Ende immerhin zu 50% chronisch persistierende Ödeme. Insgesamt sind daher auch chronische Ödeme als nicht seltene Befunde bei radiogenen Spätreaktionen zu beachten.

Als Inzidenz und Ausprägung beeinflussende Faktoren für im Laryngotrachealbereich neben den Ödemen zu beachtende Stenosen, Fibrosen, Perichondritiden, Chondro- und Osteonekrosen und Epithelveränderungen (Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Deitmer 1986, Dietz et al. 1998, Ewald 1996, Fa-

jardo 1982, Scherer et al. 1991, O'Brien 1996, Parsons 1994, Ward et al. 1975) wurden Proliferationsstrukturen, Fraktionsdosen, Fraktionszeitintervalle, Gesamtbehandlungszeiten, Zeit-Dosis-Beziehungen, Volumeneffekte und Toleranzdosen genannt (Burman et al. 1991, Deore et al. 1991, Fu et al. 1982 & 1995, Herrmann & Baumann 1997, Kaanders et al. 1992, Loeffler 1974, Parsons 1994), wobei insbesondere zur Ausprägung auf Dosisabhängigkeiten (sowohl Gesamtdosis als auch Fraktionsdosis) und Volumeneffekte abgehoben wurde (Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Ewald 1996, Fajardo 1982, Herrmann & Baumann 1997, Laccourreye et al. 2000, Maciejewski et al. 1986, Mazon & Grimard 1997, Parsons 1994, Spriano et al. 2000). Zudem können auch Sitz und Ausdehnung des Primär-TM, zusätzliche Halsoperationen (insbesondere die Neck dissection), die fortbestehende Einwirkung toxischer Agentien, z. B. Nikotin und Alkohol (Parsons 1994) sowie die zunehmende Dauer einer konfluierenden Mukositis mit einem erhöhten Spätreaktionsrisiko assoziiert sein (Denham et al. 1999, Ichimura et al. 1997). Da Einflüsse durch Primär-TM, chirurgische Maßnahmen und toxische Agentien bei unserem Modell nicht bestanden, kann die Dosisabhängigkeit anhand unserer Befunde (Zellinfiltrate, Lymphektasien, Ödeme, Fibrose, Blutgefäßdilatationen, PPF, Drüsenveränderungen) nachvollzogen werden, die jedoch durchaus heterogen ausfiel. Zur Erklärung der Heterogenität ist zu bemerken, dass sich im aus verschiedenen Geweben aufgebauten Laryngotrachealbereich Reaktionsmuster kombinieren und daher mehr komplexe Strahlenreaktionsmuster resultieren können (Herrmann & Baumann 1997). Inwieweit TGF- β 1 durch möglicherweise differente Einflüsse zur Heterogenität beiträgt, bleibt spekulativ und wurde von uns nicht untersucht. Es wurden für das unmittelbar angrenzende Lungengewebe (Übersicht bei Rodemann et al. 1995) vermehrte radiogene TGF- β 1-Immunreaktivitäten (Vujaskovic et al. 2001) bzw. -mRNA Expressionen (Epperly et al. 1999) beschrieben und auch in Rattentrachealepithelzellkulturen wurde dem TGF- β -Faktor als Vermittler der interzellulären Kommunikation besondere Bedeutung bei der radiogenen Zelltransformation zugeschrieben (Terzaghi-Howe 1990). Zur Erklärung der insgesamt geringeren Befundausprägung kann neben der konventionellen Fraktionsdosis vermutlich die Unterschreitung der mit ca. 70 Gy angegebenen TD des Larynx beitragen, wohingegen keine Hinweise zur Progredienz bzw. allgemeinen Inzidenzzunahme von Spätreaktionen zwischen 6 und 12 Monaten (Fu et al. 1995) erwachsen.

Unsere auch in der Trachealregion beobachteten histologischen Befunde (Lymphgefäßektasien, Ödeme, Blutgefäßdilatationen, interstitielle Zellinfiltrate, Bindegewebsvermehrungen, Drüsenveränderungen) werden in qualitativer Hinsicht teilweise durch tierexperimentelle, vor allem an der Trachea untersuchte Daten unterstützt, die gesamtosis- und fraktionsdosiskorrelierte zunehmende submuköse Drüsenreduktionen, perivaskuläre, intimale und interstitielle Fibrosen (Powers et al. 1987), Zilienstrukturstörungen und Membranschäden mit zytoplasmatischen Extrusionen (Albertsson et al. 1984: insbesondere 4-7 Tage nach 10 Gy Einzeldosis), dosisabhängige zunehmende Ziliendestruktionen, -abknickungen, -abbrüche, -adhäsionen und -schwellungen (Albertsson 1985: nach 2-30 Gy Einzeldosis-RT), dosiskorrelierte zunehmende Ödeme und ziliäre Blasen (Albertsson et al. 1983: bei höheren Dosen nach fraktionierter RT mit 2 Gy/F bis zu 20 Gy Gesamtdosis), fokale Zilienverluste in-

nerhalb der Trachealschleimhaut (Man et al. 1987: nach 20 Gy Einzeldosis), fokale Dyschylien aufgrund erweiterter Drüsengänge, fokale PE-Metaplasien, Endothelschwellungen, Muskelatrophien und Blutgefäßteleangiectasien (Zöllner et al. 1988) sowie Ödeme, Gefäßdilatationen und Rundzellularinfiltrate (Danielsson et al. 1971: nach 30Gy Protonen-Einzeldosis) beschrieben. Hinsichtlich der Becherzellanzahl konnten wir jedoch keine nennenswerten Veränderungen feststellen, hier ergaben sich weder Hinweise auf eine Abnahme (Powers et al. 1987) noch Zunahme (Albertsson et al. 1983 & 1984, Albertsson 1985). Zur allgemein übereinstimmend angegebenen Dosisabhängigkeit (sowohl von der Einzelfraktion als auch der Gesamtdosis mit allerdings durchaus variabel applizierten Fraktions- und Gesamtdosen) kann anhand unserer Trachealbefunde beigetragen werden, indem sich bei Anwendung des konventionell fraktionierten RT-Schemas dosisabhängige, jedoch mehr heterogene Profile für die einzelnen Befunde herausarbeiten ließen.

Demgegenüber fanden Lidegran et al. (1995a & b) nach Oligofraktionierung (6 bzw. 8 Gy/F bis zu einer Gesamtdosis von 30 bzw. 40 Gy) im Rattenlarynx eine unveränderte Histomorphologie, was möglicherweise durch den kurzen Nachbeobachtungszeitraum von 10 Tagen erklärlich ist. Auch Barnes et al. (1987) und Gilette et al. (1992) gaben nach experimenteller Thorax- und/oder Mediastinal-RT nur sehr geringe bzw. irrelevante Trachea- und Ösophagusreaktionen an, was zur Einschätzung einer relativen Strahlentoleranz von Laryngotrachealgewebe beitrug. Die insgesamt geringe (bis maximal moderate) Ausprägung unserer Befunde kann diese Auffassung unterstützen, zumal schwerwiegendere Spätreaktionen, wie z. B. Knorpel- und Knochennekrosen, ödematöse Obstruktionen, obturierende Blutgefäß- und Lymphgefäßsklerosen nicht zutage traten und auch Epithelverhornungen, -atrophien, -metaplasien und -dysplasien der auskleidenden Schleimhäute weitestgehend fehlten. Weiterhin kann sich zur Interpretation der geringeren Befundausrprägung neben der Unterschreitung der für Humangewebe mit 70 Gy angegebenen Toleranzdosis (Herrmann & Baumann 1997) die konventionelle Fraktionsdosis anbieten, da Powers et al. (1987) bei ihren histologischen Befunden an Hunden, die im Bereich der Trachea entweder mit 36 bis 74 Gy in 2-, 3- oder 4 Gy-Fraktionsdosen oder mit 36, 44 oder 72 Gy in 4 Gy-Fraktionsdosen bestrahlt und entweder 6 Monate oder 1, 3 oder 12 Monate nach RT untersucht wurden, eine signifikante Reduktion unerwünschter radiogener Spätreaktionen bei geringeren Fraktionsdosen zeigen konnten. Inwieweit die von Albertsson et al. (1986) und Hakansson et al. (1991) für die Trachea bzw. Albertsson et al. (1992a & b) für den Ösophagus beschriebene akzelerierte Epithelproliferation bestrahlter Segmente (zumindest für die höheren Gesamtdosen von maximal 20 Gy) in der Frühphase nach kombinierter Radiochemoexposition, die in einer nach 19 Tagen einsetzenden Basalzellhyperplasie zum Ausdruck kam, möglicherweise zusätzlich zur geringeren Befundausrprägung beitrug, kann nur spekulativ berücksichtigt werden, da wir die Frühphase in den von uns gewählten Zeitfenstern nicht dokumentierten. Dennoch kann die akzelerierte Epithelproliferation, die im übrigen auch bei zusätzlich zur RT applizierten radiosensibilisierenden Substanzen (z. B. Misonidazol) von Albertsson et al. (1985) verstärkt beobachtet wurde, andererseits Interpretationen humaner Daten (u. a. Budach 1998) stützen, die nach kombinierter Radiochemotherapie zwar in der Re-

gel von einer erhöhten Frühtoxizität, jedoch meist unbeeinflusst, zumindest nicht eindeutig erhöhten Spättoxizität ausgehen.

Die von uns gefundene Befundpersistenz bis 12 Monate nach abgeschlossener RT weist auf einen Zusammenhang mit chronischen radiogenen Spätreaktionen hin. Das Fehlen schwerwiegenderer Befunde bei der 6-Monats- und 12-Monats-Latenz spricht zumindest gegen eine wesentliche Befundmodifikation in der Nachbeobachtungszeit, wie es z. B. tierexperimentell von Zöllner et al. (1988) im Langzeitverlauf oder auch für geringere Dosen (10 Gy Einzeldosis) und frühe Nachbeobachtungsintervalle (bis 10 Tage post RT) von Albertsson et al. (1984) angegeben wurde. Letzteres hängt vermutlich mit der allgemein angenommenen Reversibilität von Frühreaktionen zusammen (Herrmann & Baumann 1997). Allerdings beobachteten Zöllner et al. (1988) bzw. Danielsson et al. (1971) auch noch 1 Jahr nach RT Muskelatrophien, Gefäßdilataionen, noch verminderte Gewebsregenerationsleistungen, Ödeme und Rundzellinfiltrate, was wenigstens teilweise die Dauerhaftigkeit unterstützen kann.

Es ist jedoch zu bemerken, dass trotz des vorgenommenen Vergleichs unserer Befunde mit den tierexperimentellen Daten gewisse Einschränkungen der Vergleichbarkeit vorliegen. So wurden größere Einzeldosen (Albertsson et al. 1984: 10 Gy, Albertsson 1985: 2 bis 20 Gy, Barnes et al. 1987: 20, 30 oder 40 Gy, Danielsson et al. 1971: 30 Gy, Man et al. 1987: 20 Gy) oder fraktionierte Schemata mit zum Teil höheren Fraktionsdosen bei reduzierten oder höheren Gesamtdosen (Gilette et al. 1992: 2, 3 oder 4 Gy/F bis zu Gesamtdosen von 24-68 Gy, Albertsson et al. 1983 & 1986: 2 Gy pro Fraktion bis 20 Gy Gesamtdosis; Powers et al.: 1987: 2, 3 oder 4 Gy/F bis 36-74 Gy Gesamtdosis und 4 Gy/F bis 36, 44 oder 52 Gy Gesamtdosis) appliziert und unterschiedliche Nachbeobachtungszeiten gewählt (Albertsson et al. 1984 & 1986: bis 10 Tage nach RT; Albertsson et al. 1983: 1 bis 10 Tage nach RT; Man et al. 1987: 1-2/15-16/30-34 Wochen nach RT; Powers et al. 1987: 6 und 1/3/12 Monate nach RT; Albertsson 1985: bis 10 Tage nach RT, Barnes et al. 1987: 1/3/12 Monate nach RT, Gilette et al. 1992: 2 Jahre nach RT). Außerdem wurde auf verschiedene Parenchymstrukturen fokussiert, die bei kürzerer Nachbeobachtungszeit mehr Epithelveränderungen beinhalteten, bei längerer Nachbeobachtungszeit weitere Strukturen wie z. B. submuköse Drüsen, Blutgefäße und Bindegewebe (u. a. Powers et al. 1987) mit einbezogen und was darüber hinaus mittels verschiedener Techniken untersucht wurde wie z. B. Transmissionselektronenmikroskopie [(TEM), Albertsson et al. 1984), Rasterelektronenmikroskopie (SEM), TEM und Lichtmikroskopie [(LM), Albertsson et al. 1983), SEM und LM (Man et al. 1987), SEM und TEM (Albertsson 1985) und LM (Barnes et al. 1987, Powers et al. 1987, Gilette et al. 1992). Die jedoch weitgehend übereinstimmend genannten Dosis- und z. T. Verlaufsabhängigkeiten bezüglich radiogener Reaktionsmuster ließen den Vergleich mit unseren Befunden nach konventionell fraktionierter RT mit einer bis zu einjährigen Verlaufskontrolle dennoch statthaft erscheinen.

5. 5. 2 Extrazelluläre Matrix (ECM) und Basalmembranen (BM)

5. 5. 2. 1 Allgemeine Histologie, Pathohistologie, inklusive Immunhistologie

5. 5. 2. 1. 1 Trachea

BM sind spezifische Strukturen der ECM und beeinflussen die Zellpolarität, -differenzierung, -migration und Zellproliferation und tragen somit zur Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionalen Gewebeintegrität bei (Nerlich 1995). Insbesondere an glatten Muskelzellen des Tracheobronchialsystems konnte gezeigt werden, dass neben Kollagen I auch die BM-Komponenten Laminin, Kollagen IV und das BM-assoziierte Fibronectin über den Oberflächen-ECM-Rezeptor $\alpha 5\beta 1$ -Integrin antiapoptotisch wirken und den Phänotyp der Zellen beeinflussen können (Freyer et al. 2001). Daneben können ECM/BM-Bestandteile durch H_2O_2 -konsumierende, reinigende Aktivitäten zur Reduktion von oxidativem Stress beitragen (Cohn et al. 1994). Weiterhin wurde Laminin-I eine modulierende (abmildernde) Rolle bei der radiogenen Angiogeneseinhibition zugeschrieben (Rose et al. 1999).

Während in vitro (Kaninchentrachealepithelien) z. T nur einzelne und diskontinuierlich darstellbare BM-Komponenten (Laminin, Kollagen IV) nachweisbar waren (Möller et al. 1991 & 1993), konnten Laurie et al. (1983) im Gewebeverband (Rattentrachea) in ihren immunhistologischen und biochemischen Untersuchungen die spezifischen BM-Bestandteile Laminin, Kollagen IV (CIV), Heparansulfatproteoglykan (HPSG) und Entactin sowie das BM-assoziierte Fibronectin qualitativ und quantitativ charakterisierten. Auf die feine Organisationsstruktur der aus dreidimensionalen Strängen bestehenden subepithelialen Tracheal-BM (Ratte) wiesen auch Inoue & Leblond (1988) und Inoue (1994) hin, die sich aus CIV, assoziiert mit den Glykoproteinen Laminin, Entactin, Fibronectin, und Proteoglykanen (vornehmlich HPSG) zusammensetzten. Auch Evans et al. (2000) identifizierten in der Rattentrachea fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch eine dreidimensionale Struktur speziell der Lamina reticularis der BM, welche aus den Kollagenen III, I, V, VI, Elastin / Elastin-assoziierten Mikrofibrillen und Proteoglykanen sowie weiteren Nichtstrukturproteinen bestand und frühere Arbeiten zur biochemischen Struktur der pulmonalen Bindegewebsmatrix z. B. von Sannes (1986) ergänzte, der Reaktivitäten von Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen und Sulfatester-enthaltenen komplexen Zuckern an Zelloberflächen, der Elastinkomponente von elastischen Fasern und an Kollagenfasern bei Lungengewebe von Ratten nachwies.

Die von Laurie et al. (1983) nachgewiesenen BM-Reaktivitäten ließen sich anhand der eigenen Präparate bestätigen und zeigten bis auf die nicht immer gegebene gleichmäßige Fibronectinreaktion zu meist kontinuierliche Expressionsmuster. Hinsichtlich der Färbintensität konnten wir jedoch beim Laminin recht deutlich schwächere, beim CIV deutlich schwächere und beim Fibronectin ähnliche Färbemuster beobachten. Das für die eigene Fragestellung miteinbezogene Kollagen III (CIII) zeigte flächenhaft-kontinuierliche, meist sehr zarte Reaktionen und dokumentierte daher auch im eigenen Modell die als fein, dünn und netzwerkartig beschriebene interstitielle Faserart (Ham & Geneser 1990, Melo et al. 2003).

Während Anatomie bzw. Verteilungsmuster (Bairati et al. 1996, Cohen et al. 1992 & 1993, Sasano et al. 2001) und die biologische Bedeutung, aber auch histologische Veränderungen der interstitiellen Kollagene (insbesondere der Typen I und III) im Bereich der oberen Luftwege mit Einschluss der Trachea z. B. bei Entwicklungs- und Altersprozessen (Collins 1982, Gabella 1991, Inerot & Heinegard 1983, Lallemand et al. 1995, Li et al. 1994, Sannes 1986, Schellenberg & Liggins 1987), Entzündungen (Bellon et al. 1985, McIntosh et al. 1992, Riley et al. 1988), Allergiemodellen (Ma & Stephens 1997, Coutts et al. 2001), Wundheilungsprozessen, z. B. Trachealanastomosen (Hyytinen et al. 1999, Takagi et al. 2001, Valesky et al. 1984) oder nach mechanischer Schleimhautverletzung (Morishima et al. 2001, Murakami & Fukuda 1989), mit Fibrosen einhergehenden Repairmechanismen nach Schadstoffexposition (Asbest: Arden & Adamson 1992, Bleomycin: Chen et al. 2001, Zhang et al. 1994), beim Trachealersatz (Hirai et al. 1990, Kojima et al. 2002, Moussa & French 1984, Okumura et al. 1991 & 1993 & 1994a & b, Yanagi et al. 1994) und vielfach in-vitro beim Einsatz als Trägermaterial (auch in Kombination mit verschiedenen BM-Bestandteilen) mit davon ausgehenden Differenzierungsfunktionen (Baeza-Squiban et al. 1994, Chang et al. 1985, Clark et al. 1995, Davenport & Nettesheim 1996a & b, Hicks et al. 1999, Jetten et al. 1987, Kaartinen et al. 1993, Kim 1985, Kim et al. 1987 & 1989 & 1993 & 1998, Lee et al. 1984, Liedtke 1988, McDowell et al. 1987b, Martin et al. 1991, Möller et al. 1987, Rearick & Jetten 1989, Robinson & Wu 1993, Sime et al. 1997, Tournier et al. 1990, van Scott et al. 1990, Wang et al. 1999, Wenig et al. 1987) teilweise sehr detailliert untersucht wurden, erfolgten für tracheale radiogene Alterationen weniger subtypisierende, mehr allgemeine („Bindegewebsvermehrungen“) Beschreibungen.

Auch radiogene Veränderungen der trachealen BM und BM-assoziiierter Strukturen sind weniger bekannt. Hier fanden mit etwas unterschiedlicher Berücksichtigung ihrer Komponenten mehr Entwicklungsprozesse, insbesondere der trachealen Drüsen (Jacquot et al. 1994, Lallemand et al. 1993, Lim et al. 1995, Tournier et al. 1992 & 1994), Eigenschaften als Trägermaterial z. B. mit Beeinflussung der Zellmigration, -ausbreitung, -proliferation und -differenzierung (in vitro: Boland et al. 1996, in vivo: Erjefalt et al. 1994), Wundheilungsprozesse (Erjefalt et al. 1994, Hicks 1999, Horiba & Fukuda 1994, Kanno & Fukuda 1994, Walner et al. 2000), aber auch Erkrankungen wie z. B. die zystische Fibrose (Hill et al. 1997) oder Asthma bzw. Asthmodelle (Chetty et al. 1995, Pare et al. 1997, Shiels et al. 1996 & 1999, Tschumperlin & Drazen 2001) Beachtung, wobei im Asthmodell von Tschumperlin & Drazen (2001) neben Expressionssteigerungen von Umstrukturierungsgenen eine vermehrte Kollagensynthese kokultivierter Fibroblasten besonders auffiel und von Chu et al. (1998) anhand der CIII-Färbereaktion auf eine mäßig verdickte subepitheliale „BM-Zone“ in Biopsien unterschiedlich schwer betroffener Asthma-Patienten hingewiesen wurde.

5. 5. 2. 1. 2 Larynx

Im Kehlkopf ergaben sich im Literaturspiegel durchaus ähnliche Interessensschwerpunkte wie im Trachealbereich, die neben der strukturellen Anatomie und der Bedeutung bei der Morphogenese auch

ECM-Veränderungen bei z. B. degenerativen, immunpathologischen oder neoplastischen Krankheitsprozessen miteinbezogen, während radiogene Alterationen weniger subtypisiert wurden.

Bei den interstitiellen Kollagenen (insbesondere CI und CIII) wurden Verteilungsmuster in verschiedenen Knorpelgeweben (Eyre & Muir 1975) und im Glottisniveau (Friedrich et al. 1993, Garrett et al. 2000, Gray et al. 1994, Melo et al. 2003, Nakaaki & Shin 1993, Paulsen & Tillmann 1997), Entwicklungs- und Altersprozesse (Aoyagi 1995, Cohen et al. 1992 & 1993, Engelmann & Leutert 1989, Morrison & Gore-Hickman 1986, Paulsen et al. 2000, Subotic et al. 1984) und die Eignung bzw. Eigenschaften als Stimmlippen-Augmentationsmaterial untersucht (Berghaus 1987, Courey et al. 2001, Ford et al. 1984 & 1987, Remacle & Marbaix 1988, Staskowski et al. 1998). Aber auch Veränderungen bei Krankheitsprozessen, wie den Larynx betreffende osteoarthritis-ähnliche Krikoarytaenoidgeleknkdegenerationen (Paulsen & Tillmann 1999: Kollagendemaskierungen, Proteoglykanverluste, vermehrter CVI-Nachweis), Chondrodysplasien (Greco et al. 1984), Hyalinosen (Kautzky et al. 1989) und Kollagenosen (Nishinarita et al. 1995, Tsunoda & Soda 1996, Übersicht bei Wiedemann & Matthay 1989) sowie bei Tumoren wurden erfasst. Bei Letzteren war neben der Bedeutung als Leitschiene bei der tumorösen Knorpelinfiltration (Yeager & Archer 1982, Paulsen & Tillmann 1997) und dem Verteilungsmuster in seltenen Tumoren (Fibrosarkom: Hirabayashi et al. 1989) bei Larynxkarzinomen interessant, dass CI-Expressionsmuster mit Reaktivitätsveränderungen von Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren korrelierten (Sawatsubashi et al. 1998). Bei invasiven Larynxkarzinomen wiesen Hagedorn et al. (1999) bzw. Knöbber (1994) auf eine (TGF β 1 vermittelte) verstärkte Bildung und Ablagerung der interstitiellen Kollagene III, V, VI (und Tenascin) bzw. das vermehrte subepitheliale Auftauchen feingranulären Materials und kollagenartiger Strukturen mit schwer abgrenzbarer Lamina fibroreticularis hin.

Die für Stimmlippengewebe der Ratte beschriebenen Kollagenexpressionen (CI, III-VIII, XV, XVII, XVIII: Ding & Gray 2001), insbesondere jedoch die für Humangewebe angegebene feine netzwerkartige, geschichtete Kollagenorganisationstruktur der Lamina propria (Melo et al. 2003), die daneben aber auch elastische Fasern, Proteoglykane, Glykoproteine, Mineralien und Wasser enthält (Gray 2000, Gray et al. 1993, Gray et al. 1999, Hallen et al. 1996, Sato 1998) und der im Vergleich zum CI deutlich geringere CIII-Gehalt der Stimmlippenregion (Cohen et al. 1993) ließen sich anhand der sehr zart-flächenhaften CIII-Expressionsmuster bei unseren Kontrollgeweben im Stimmlippenbereich nachvollziehen. Die nicht streng dreischichtig beobachteten Muster können einerseits durch die Untersuchungstechnik bedingt sein, die im Gegensatz zur Pikrosiriusmethode (Melo et al. 2003) die CI-Expression nicht miterfasste. Andererseits wurden für verschiedene Tierspezies im Vergleich zu humanen Geweben, aber auch im Vergleich untereinander differente Verteilungsmuster mit unterschiedlichen Kollagen- und Elastinverdichtungen (Garrett et al. 2000: Hund, Affe, Schwein) oder insgesamt einfachere, weniger deutlich geschichtete Lamina propria-Strukturen beschrieben (Ishii et al. 1999: Affe).

Reaktionen der BM und -assoziierter Strukturen wurden im Larynx einerseits zur Differenzierung von

Lymphgefäßen, Blutgefäßen und artefiziellen Gewebelücken genutzt (Werner 1995), andererseits galt ein besonderes Interesse den Expressionsmustern bei der chronischen Laryngitis, beim Reinke-Ödem und Tumoren (Antonelli et al. 1991, Carlevato et al. 1996, Cortesina et al. 1996, Courey et al. 1996, Dobros et al. 1995, Gray et al. 1995, Hagedorn et al. 1994, Köpf-Maier & Merker 1991, Knöbber 1994, Nerlich 1995, Nerlich et al. 1994 & 1998, Nicolai et al. 1990). Hier ergaben sich heterogene Befunde. Während für die chronische Laryngitis bzw. die polypoide Corditis BM-Verdickungen und durch Kollagenfaservermehrungen BM-Verdichtungen der Lamina fibroreticularis (Knöbber 1994) und vermehrte knotig-clusterhafte Fibronektinexpressionen (Courey et al. 1996), aber auch unveränderte BM- und Fibronektinfärbungen oder verringerte CIV-Reaktionen (Courey et al. 1996), für Stimmlippenknötchen BM-Verbreiterungen mit intensivierten CIV- und betont dichten Fibronektinexpressionen (Gray et al. 1995, Courey et al. 1996), für Stimmlippenpolypen intensitätsgeminderte, teilweise sogar fehlende, teilweise kaum veränderte CIV-Expressionen und z. T. clusterartige, z. T. geringe Fibronektinreaktionen (Courey et al. 1996, Gray et al. 1995), für Reinke-Ödeme z. T. kaum veränderte CIV-Reaktionen und nur geringe Fibronektinvermehrungen (Gray et al. 1995), aber auch unregelmäßige, in die Lamina fibroreticularis hinein protrudierende Verdickungen der Lamina densa, Ankerfilamentvermehrungen der Lamina fibroreticularis und fokale BM-Lücken (Knöbber 1994) beschrieben wurden, standen bei Epitheldysplasien und Epithelproliferaten noch fokal betonte BM-Unterbrechungen, bei malignen Larynx Tumoren (vorwiegend PECA) zunehmend ausgedehntere (und teilweise mit dem Differenzierungsgrad und der Prognose korrelierende) die einzelnen Komponenten HPSG, Laminin, CIV und CVII unterschiedlich betreffende qualitative und quantitative BM-Unterbrechungen/-Lücken/-Abbrüche/-Fragmentierungen/-Expressionverminderungen/-Verluste, -Duplikationen, auch in Kombination mit Lamina densa-betonten unruhigen, unregelmäßigen und ungeordneten BM-Verbreiterungen im Vordergrund (Antonelli et al. 1991, Carlevato et al. 1996, Cortesina et al. 1996, Dobros et al. 1995, Hagedorn et al. 1994, Knöbber 1994, Nerlich 1995, Nerlich et al. 1998, Nicolai et al. 1990), die häufig von verstärkten und vermehrten peritumoralen bzw. subepithelialen Fibronektinablagerungen begleitet wurden, besonders in Arealen mit verstärkten entzündlichen-zellulären Stromareaktionen. Es können jedoch bei lokal invasiven, malignen Kopf-Hals-Tumoren neben BM-Fragmentierungen und -verlusten auch stark verbreiterte BM um Tumorzellkomplexe und tropfige BM-Einschlüsse in den Zellformationen auftreten (Nerlich et al. 1994).

Die von uns beobachteten laryngealen Expressionen der BM und des BM-assoziierten Fibronektins bei Kontrollpräparaten werden qualitativ durch die Angaben von Laurie et al. (1983), Ding & Gray (2001) und Thibeault et al. (2003) gestützt, fielen jedoch hinsichtlich der Färbeintensität besonders bei den Komponenten Laminin und CIV deutlich schwächer aus. Auch die für humane Glottisgewebe beschriebene dünne, kontinuierliche subepitheliale BM (Dicke bis ca. 0.5µm) sowie das feinfibrilläre Fibronektinfärbemuster mit Reaktionsverdichtungen in der BM-nahen Zone der Lamina propria (Courey et al. 1996, Gray et al. 1995) ließ sich anhand der eigenen Präparate nachvollziehen, wobei die nicht immer kontinuierliche Fibronektinexpression durch gewisse Minderungen/Schwächen der Pars

fibroreticularis miterklärt werden könnten (Inoue & Leblond 1988).

5. 5. 2. 2 **Radiogene Veränderungen der ECM / BM**

Nach Fajardo (1982) und Herrmann & Baumann (1997) sind insbesondere im Gewebe des Magen-Darm-Kanals, der Nase/des Nasopharynx, des Larynx, des unteren Urogenitaltrakt und der Haut „stromale“ bzw. „bindegewebige“ radiogene Spätveränderungen zu beachten. Nach allgemeiner Auffassung (Übersicht bei Fajardo 1982, Fajardo & Berthrong 1978, Herrmann & Baumann 1997, Scherer & Sack 1996) kommt es nach Ödembildung und Ausbildung eines fibrinösen Exsudat zur Vermehrung und Einsprossung von Kollagenfasern und Teilersatz des Exsudates durch Kollagenfasern, was von zunächst vermehrt auftretenden (Herrmann & Baumann 1997), akzeleriert differenzierenden (Rode-mann et al. 1995) oder morphologisch veränderten atypischen Fibroblasten (Fajardo 1982), späterhin reduzierten Gewebezellen sowie Gefäßveränderungen (Dilatationen, Stenosen, Permeabilitäts- und Fragilitätszunahme) begleitet wird (Fajardo & Berthrong 1988). So wurde speziell im Larynx über histologisch nachgewiesene vermehrte Kollagenablagerungen bzw. eine progressive Fibrose vor allem in Übersichten (Fajardo 1982, Parsons 1994, O'Brien 1996) berichtet. Auch Mann et al. (1981) fanden 7 Monate nach RT u. a. fokale Kollagenvermehrungen in dem von ihnen untersuchten Laryngektomiepräparat.

Weniger für die Frühphase (Ward et al. 1988), sondern mehr für unterschiedliche Zeitabschnitte der Spätphase werden diese Befunde radiogener ECM-Alterationen durch zahlreiche Mitteilungen zu radiogenen Lungenveränderungen gestützt, die hauptsächlich Kollagenvermehrungen im Sinne einer Fibrose, insbesondere vermehrte CI- und CIII-Ablagerungen im Gewebe darstellten (Übersichten bei Herrmann et al. 1995 und Penney et al. 1982, weitere Literatur im Anhang). Dies steht zudem im Einklang mit den in der Niere und Blase (Antonakopoulos et al. 1982, Cohen et al. 1996 & 2000, Robbins et al. 2001), bei Gefäßen (Friedrich 2000, Marijjanowski et al. 1999, Mittal et al. 1990, Ward et al. 1983), in der Haut (El Nabout et al. 1989, Fournier et al. 2001, Illsley et al. 2000, Riekkki et al. 2000, Svojtikova et al. 1983), im Darm (Allgood et al. 1996, Eriksson et al. 1983, Followill & Travis 1995, Langberg et al. 1996, Reynaud & Travis 1984, Rubio & Jalnas 1996, Wang et al. 2001), im Myokard (Gilette et al. 1985, Kruse et al. 2001, Marijjanowski et al. 1999, Murray & Parkins 1988), im Knochenmark (Kagawa et al. 1986) und in der Skelettmuskulatur (Hsu et al. 1998, Lefaix et al. 1990, Remy et al. 1991, Wegrowski et al. 1988 & 1992) gefundenen radiogenen Kollagenfaservermehrungen. Interessanterweise fanden Miller et al. (1988) bis zu einem Jahr nach RT mit bis zu 14 bzw. 18 Gy zwar auch vermehrte, dosisabhängige, Kollagentyp-spezifische (CI, CIII, CIV), jedoch zusätzlich auffällig fluktuierende Expressionslevel in der Mäuselunge.

Differentialbetrachtungen galten dabei auch den Veränderungen der Kollagenratio (Verhältnis von CI zu CIII), indem einerseits Ratioanstiege, d. h. CI-Anstieg und CIII-Abfall (Martin et al. 1992, Murray & Parkins 1987, Song et al. 1998b), andererseits Ratiominderungen (CIII-Vermehrungen: Remy et al. 1991) sowie uneinheitliche zu- und abnehmende Ratioveränderungen (Gorodetsky et al. 1991, Kraft et

al. 1996) oder fehlende Veränderungen (Walklin et al. 1987) mitgeteilt wurden. In vitro (Rattennierentubulusepithelien) konnte ein Ratioanstieg im Sinne CI-betonter, dosisabhängiger mRNA-Level-Anstiege für CI und CIII gezeigt werden (Zhao et al. 2000).

Parallel können partielle Kollagenabbauvorgänge (Mäusekolon: Martin et al. 1992) vorliegen oder mehr relative Kollagenvermehrungen durch eine zunehmende Parenchymatrophie das histologische Bild kennzeichnen (Niere: Meistrich et al. 1984, Gastrointestinaltrakt: Ito et al. 1986). In vitro wurden relative Kollagenvermehrungen durch eine im Vergleich zur allgemeinen Proteinsynthese weniger gehemmte Kollagenproduktion gefunden und im Sinne radiogener Fibroblastenselektionierungsprozesse interpretiert (Nguyen et al. 1991).

Demgegenüber fehlten selbst in der Spätphase (Hauer-Jensen et al. 1986: bis 44 Wochen nach RT) Kollagenakkumulationen im Rattendünndarm bzw. signifikante Fibrosen/vermehrte Kollagenmengen (Haveman et al. 1996: bis 32 Wochen nach RT) im Lebergewebe von Ratten. Weitgehend unveränderte Kollagene konnten auch für kürzere Nachbeobachtungsphasen beobachtet werden, indem Wang & Robbins (1996) bei bis 48 Stunden nachuntersuchten Nierenmesangiumzellen zwar gesteigerte mRNA-Level für TGF- β 1, Fibronektin und Biglykan, jedoch keine gesteigerten Decorin-, CI- und CII-mRNA-Level fanden oder Biert et al. (1998) bei Kolonanastomosen von Ratten 8-12 Tage nach RT keine nennenswerten Kollagenbildungen angaben. Bei einem sehr ähnlichen Kolonanastomosenmodell beschrieben Gu et al. (1998) verringerte Transkriptions-, Synthese- und Sekretionsraten von Kollagenen.

Diese Daten weisen auf eine Heterogenität radiogener Reaktionsmuster, beurteilt anhand der Veränderungen der interstitiellen Kollagene im Gewebe, aber auch in vitro hin, wobei sich Zusammenhänge mit der applizierten Dosis, der Fraktionierung, der Nachbeobachtungszeit und dem untersuchten Gewebe ergeben.

Bei **unseren Präparaten** überwog lokalisations- und dosisabhängig eine gesteigerte und mehr verbreiterte CIII-Immunreaktivität. Dies war im Bereich des Perichondriums, der ösophagealen Adventitia und im Interstitium der Schilddrüse gut zu belegen, betraf aber auch submuköse und tiefere interstitielle Abschnitte der Trachea sowie Reaktionen um tracheale Drüsenformationen. Positiv dosiskorrelierte tendenzielle Expressionssteigerungen waren vor allem submukös im Bereich der Supra- und Subglottis und der aryepiglottischen Falte, um supra- und subglottische Drüsen und im lockeren supraglottischen Interstitium, daneben bei Kapillaren sowie beim Rekurrensnerven auffällig. Im Bereich des Sinus piriformis (submukös, im lockeren Bindegewebe, bei dort liegenden Nervenästen) waren nur bei der höchsten Dosis (60 Gy) tendenziell verstärkte Expressionen sichtbar. Sonstige Lokalisationen bei bestrahlten Tieren zeigten im wesentlichen unveränderte Reaktionen. Eindeutige qualitative oder quantitative Reaktivitätsabnahmen waren nicht nachweisbar. Einerseits spricht einiges dafür, dass durch die RT schon ab geringen Dosen (bzw. dosis- und/oder latenzabhängig) die Genexpressionslevel der ECM-kodierenden Sequenzen (Alexakis et al. 2001, Followill & Travis 1995, Johnston et al. 1995, Kruse et al. 2001, Rubin et al. 1995, Zhao et al. 2000) und Genproduktlevel (Alexakis et al. 2001,

Fournier et al. 2001, Johnston et al. 1995, Miller et al. 1988, Riecki et al. 2000) „angeschaltet“ bzw. „hochreguliert“ werden, was zu einer gesteigerten ECM-Ablagerung im Gewebe und damit verstärkt nachweisbarer Immunreaktivität führen kann. Andererseits weisen histologische, elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen darauf hin (Belkoff & Haut 1992, Cheung et al. 1990, De-Dayne & Haut 1991, Fujisato et al. 1999, Kucharz 1992, Salehpour et al. 1995, Svojtikova et al. 1983, Tzaphlidou et al. 1997), dass durch die RT die innere Struktur der Kollagene verändert sein kann, was in einer erhöhten AK-Zugänglichkeit und damit verstärkter Nachweisbarkeit resultieren könnte. Inwieweit TGF- β 1 oder weitere Mediatoren (z. B. Plättchenwachstumsfaktor, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-I, Tumornekrosefaktor α : Thornton et al. 1996, Interleukine: Buttner et al. 1997, Chemokine: Johnston et al. 1998) möglicherweise lokalisationsdifferent zur CIII-Expressionssteigerung beitragen, wurde von uns nicht untersucht. Literaturgemäß (Ehrhart et al. 1997, Herskind et al. 2000, Hill et al. 2001, Kolb et al. 1999, Rodemann et al. 1995, Rubin et al. 1995) kann für TGF- β 1 eine vermehrte proliferations- und differenzierungsstimulierende Wirkung und nachfolgend vermehrte Kollagenproduktion bei Fibroblasten über autokrine, aber auch parakrine radiogene Aktivierungsprozesse angenommen werden, zumal auch Osteoblasten nach RT TGF- β 1-Rezeptoren vermehrt exprimierten (Gal et al. 2000) bzw. Rattennierentubulusepithelien CI-betonte, mRNA-Level-Anstiege für CI und CIII in Kombination mit einem TGF- β 1-mRNA-Anstieg nach RT aufwiesen (Zhao et al. 2000). Daneben können Hyaluronfragmente die Expression von CI- und CIII-Genen induzieren (Li et al. 2000), wobei unterschiedlich charakterisierte Fibroblastensubtypen (Penney et al. 1992, Phipps et al. 1989) bzw. unterschiedliche Fibroblastenzelllinien (Lara et al. 1996) different in den den Fibrosierungs- bzw. radiogenen Fibroblastendifferenzierungsprozess involviert sein können.

Bezüglich der eher geringgradigen Befundausrprägung kann als Erklärung dienen, dass nach den Literaturdaten asymmetrische und unterschiedliche Veränderungen der CI-/CIII-Ratio, häufiger zugunsten einer stärkeren CI-Vermehrung, vorliegen können. Dies wurde insbesondere für Nachbeobachtungszeiträume von 3 Monaten bis zu 1 Jahr nach RT beschrieben. Unsere nach 6 oder 12 Monaten Nachbeobachtungszeit erhobenen Befunde können daher einer schon in der früheren Phase geringeren Ausprägung (die dann in die Spätphase hineinreicht) zugeordnet werden oder sie entsprechen nach primär eventuell stärkerer Ausprägung einem bereits stattgehabten Umstrukturierungsprozess. Auch Miller et al. (1988) fanden u. a. für CI (peakartig verstärkte Expression nach 15 und 30 Wochen mit zwischenzeitlicher Abnahme nach 20-25 Wochen Nachbeobachtungszeit) und für CIII (peakartig verstärkte Expression nach 15 und 25 Wochen mit Expressionsabnahme nach 20 und 30 Wochen Nachbeobachtungszeit) fluktuierende Expressionslevel in der Mäuselunge, was auf vermehrte Anhäufungen, aber auch Abbauvorgänge hinwies. Weiterhin kann die als relativ strahlenresistent angegebene komplexe Organstruktur des Larynx und der Trachea bzw. die Unterschreitung der Toleranzdosis die eher geringgradige Ausprägung miterklären, wobei auch die Vermeidung hoher Einzeldosen zu nennen ist, die besonders tierexperimentell bei Haut-, Muskel-, Darm- und Lungen-RT mit ausgeprägteren Fibrosen vergesellschaftet sein können.

Insgesamt resultiert aus unseren anhand der CIII-Immunreaktivität untersuchten Befunden eine leichte dosis- und gewebetypabhängige Fibrose in der Spätphase.

Die im Laryngo-Trachealbereich kaum bekannten, jedoch aus anderen Organsystemen mitgeteilten Veränderungen der BM oder BM-assoziierten Strukturen sprechen ebenfalls für eine gewisse Heterogenität radiogener Reaktionsmuster, für die sich Zusammenhänge mit der Dosis, dem Gewebe, der Strahlenquelle und besonders der Nachbeobachtungsphase ergaben.

Frühere Veränderungen erfassten den Zeitraum von Stunden bis wenige Wochen nach RT. So fanden Bernatchez et al. (1998) vor allem 7 bis 15 Tage nach RT von Hautschnitten bei vergrößerten und irregulär geformten Blutgefäße betonte Lamininfärbungen, während bei Lungengefäßen 30 Tage nach 25 Gy-Einzeldosis-RT neben Verdickungen auch Fragmentierungen der Gefäß-BM gesehen wurden (Ward et al. 1983). Die subendotheliale BM kann daneben vom Endothel separiert sein (Hashimura et al. 1989: 10 Gy-Ganzkörper-RT bei Mäusen) oder veränderte passive Filtereigenschaften aufweisen (Debbage et al. 2000: 42 Gy-Fraktionierte RT bei Mäusetumoren). Fibronektinablagerungen können bis 3 Wochen nach RT (10 Gy-Einzeldosis) im Wundbettbereich von Rattenhauttransplantaten deutlicher reduziert (Wang et al. 1996) oder 24 bzw. 48 Stunden (10 oder 20 Gy Einzeldosis-RT) im Mäuse-Dünndarm nur gering verändert sein (Berghem & Johanson 1983). In vitro kann bis 48 Stunden nach RT bei Nierenmesangiumzellen (Einzeldosen bis 20 Gy) ein Fibronektin-mRNA-Anstieg vorhanden sein (Wang & Robbins 1996), bei Nierentubulusepithelien (Einzeldosen bis 10 Gy) fehlen (Zhao et al. 2000). Bis 9 Tage nach Schwerionen-RT (0.8 Gy 600 megaV) fanden sich im Mammageewebe von Mäusen im Gegensatz zur konventionellen RT BM-Integritätsstörungen mit deutlichen Irregularitäten der Lamininexpression im Sinne von Diskontinuitäten und Verdickungen (Ehrhardt et al. 1996), was auch für Hautgewebe von Mäusen 48 bzw. 96 Stunden nach Schwerionen-RT im Sinne reduzierter Lamininimmunreaktionen, allerdings ohne begleitende CIV-Expressionsveränderung beschrieben wurde (Costes et al. 2000).

Spätere Befunde, die Zeiträume von mehreren Wochen bis zu mehreren Monaten nach RT umfassten, wiesen vor allem auf Verdickungen und Expressionsvermehrungen der BM und BM-assoziierten Strukturen hin. In fibrotisch umgewandelten Schweinemuskelgeweben (Wegrowski et al. 1992) fanden sich 7 Monate nach RT neben Kollagenanhäufungen erhöhte Fibronektin- und HPSG-Mengen mit entsprechend gesteigerter Synthese. Im Lungengewebe von Mäusen bestanden 6 Monate nach RT (5 bzw. 7.5 Gy und 12.5 Gy Einzeldosen) vermehrte CIV-Genexpression (Rubin et al. 1995) bzw. gesteigerte mRNA-Level für CIV und Fibronektin sowie für CI, CIII, TGF- β 1 und -3 (Johnston et al. 1995). Auch Miller et al. (1988) beobachteten in bis zu einem Jahr nachuntersuchten Lungengeweben von Mäusen einen CIV-Expressionsanstieg ab 30 Wochen nach RT, während die CIV-Expressionslevel in der Nachbeobachtungsphase bis 30 Wochen auffällig fluktuierten, indem peakartig verstärkte CIV-Reaktionen nach 15-20 Wochen, gefolgt von einem Expressionsabfall nach 25 Wochen, auftraten. Im Nierengewebe von Ratten (Robbins et al. 2001: 24 Wochen nach bis zu 20 Gy-Einzeldosis-RT) waren neben CIII-Vermehrungen vermehrte interstitielle Fibronektin-Färbungen nachweisbar, bei Schweinen

(Robbins et al. 1991: 9.8 Gy-Einzeldosis-RT) fielen bis 24 Wochen nach RT zunehmende BM-Verdickungen und besonders nach 12 Wochen imponierende BM-Duplikationen auf. Auch bei Gefäßen von Augen, welche 6 ½ bis 11 Monate nach RT wegen Melanom enukleiert wurden (Seddon et al. (1983) bzw. Gefäßen des Gastrointestinaltraktes von Mäusen (Fatemi et al. 1985: 1 Jahr nach 10 Gy-RT) zeigten sich u. a. BM-Verdickungen bzw. BM-Vermehrungen/-Verdickungen um Kapillaren, bei kleinen Gefäßen sowie bei Nervenendigungen, vor allem im Jejunum und Kolon, wobei in bestrahlten TM-Geweben im Mäusemodell neben Lamininexpressionsstörungen und einer perivaskuläre Fibrose auch vermehrt vielschichtige vaskuläre BM auftreten können (Kobayashi 1988). Im Nebenhoden von Ratten zeigten sich nach pränataler RT irreguläre und dickere BM im Bereich der Ductuli seminiferi-Eithelien mit irregulär verteilten Proteoglykanen (Delongas et al. 1987). Auf die im Parotisgewebe von Ratten 6 Monate nach RT auftretenden Laminin-Ablagerungen und vermehrten Fibronectin-Expressionen wurde bereits eingegangen (Gustafsson et al. 1998).

Radiogene BM-Alterationen werden durch Befunde aus anderen chronischen Noxenmodellen gestützt, indem z. B. in der Neurohypophyse nach Applikation radiosensibilisierender Substanzen und entsprechender Lichteinwirkung bei Kapillaren verdickte, verwaschene, schwer abgrenzbare („blurred“) und lokal vielschichtige BM beobachtet wurden (Frontczak-Bamiewicz 2001) oder nach Ductus-efferens-Ligatur im Bereich der tubulären Ductuli-seminiferi-Epithelien BM-Ablösungen sowie reichlich BM-Anhäufungen, BM-Duplikationen und eine vermehrte Lamininproteinsynthese sowie gesteigerte mRNA-Level für Laminin, CIV und HPSG nachgewiesen wurden (Richardson et al. 1998). Daneben können nach UV-Lichtexposition verschiedene Haut- und BM-abbauende Matrixmetalloproteinasen hinsichtlich ihrer Genexpression und proteolytischen Aktivität vermehrt auftreten (Herrmann et al. 1996) bzw. vermehrt sezerniert werden (Chouinard et al. 2001).

Bei *unseren Auswertungen* zeigten die beiden BM-Bestandteile Laminin und CIV dosisabhängig überwiegend Expressionssteigerungen nach RT, zumeist oberhalb einer Exposition mit 20 Gy. Diese waren insgesamt leicht, bis z. T. mittelgradig ausgeprägt und je nach Parenchymstruktur unterschiedlich häufig und unterschiedlich deutlich. An einzelnen Geweben waren jedoch auch verringerte Expressionen festzustellen. **Laminin** wurde insbesondere im M. vocalis, um laryngeale und ösophageale Nervenäste, im Rekurrensnerven und in der laryngealen und trachealen Muskulatur verstärkt exprimiert. Drüsen und Drüsengänge, Nervenäste i. B. des Sinus piriformis und der ösophagealen Muskeln zeigten deutlich tendenziell verstärkte Immunreaktionen. Hingegen waren subepithelial im Bereich der Supra- und Subglottis nach 20 Gy- und 40 Gy-Exposition zunächst deutliche Reaktivitätsabnahmen mit anschließender Reaktivitätszunahme nach 60 Gy-Exposition auffällig. **CIV** wurde um ösophageale und tracheale Muskelzellen, im trachealen Perichondrium und im Rekurrensnerven sowie bei Kapillaren vermehrt exprimiert. In der Lamina propria der Glottisregion kam es durch BM-Kondensationen in Assoziation zu Bindegewebs- und Infiltratzellen zu verstärkten Immunreaktionen. Tendenzuelle vermehrte CIV-Reaktionen fanden sich in laryngealen und hypopharyngealen Nervenästen. Andererseits zeigten sich Reaktivitätsabnahmen, besonders im M. vocalis und tendenziell auch um supra- und

subglottische sowie hypopharyngeale Muskelgewebe. Weniger beim Laminin, deutlicher beim CIV waren die Expressionsprofile durch auffällige dosisabhängige Fluktuationen im Sinne mehr heterogener Muster gekennzeichnet. Das BM-assoziierte **Fibronektin** zeigte dosisabhängige und oberhalb einer Exposition mit 20 Gy zunehmende Expressionssteigerungen bei verschiedenen Lokalisationen. Dies galt vor allem für die submuköse Region im Bereich der Glottis, des Sinus piriformis, der Trachea und des Ösophagus. Bedingt durch einen Abfall der Reaktivität nach 20 Gy-Exposition waren auch die submuköse Areale i. B. der Supra- und Subglottis und Regionen um tracheale Drüsen und Drüsengänge nach 40 Gy- und 60 Gy-Exposition im Vergleich zur 20 Gy-Expositionsgruppe verstärkt immunreaktiv. Andere Gewebestrukturen bzw. -lokalisationen zeigten vorwiegend erst nach 60 Gy-Exposition verstärkte bzw. mehr verbreiterte Expressionen. Dies betraf das Perichondrium, Regionen um supra- und subglottische Drüsenformationen, die submuköse Schicht der aryepiglottischen Falte, das Interstitium des Ösophagus und der Schilddrüse, Kapillaren, die Gefäßadventitia und das Interstitium im Randbereich des Rekurrensnerven. Wesentliche Alters- und Latenzeffekte ließen sich für die untersuchten Strukturen nicht belegen.

Die Reaktivitätszunahmen der BM und BM-assoziierten Proteine stehen im Einklang mit den vornehmlich in anderen Geweben beobachteten Befunden (Delongas et al. 1987, Ehrhart et al. 1996, Fatemi et al. 1985, Gustafsson et al. 1998, Kobayashi 1988, Lefaix et al. 1990, Robbins et al. 1991 & 2001, Seddon et al. 1983, Ward et al. 1983, Wegrowski et al. 1992) und werden unterstützt durch die nach anderen chronischen Schädigungsmodellen mitgeteilten BM-Alterationen, die in Form von BM-Epithel-Separationen, reichlichen fleckförmigen BM-Anhäufungen und BM-Duplikationen auftraten, was durch eine gesteigerte Lamininproteinbiosynthese und erhöhte Transkriptionslevel für Laminin, CIV und HPSG miterklärt wurde (Richardson et al. 1998). Es kann daher angenommen werden, dass die RT das „Anschalten“ BM-kodierender Gene und die entsprechende Biosynthese auch im Laryngo-Trachealbereich fördert, was in einer verstärkten Nachweisbarkeit zum Ausdruck kommt.

Hinsichtlich der Reaktivitätsabnahmen kann als Erklärung dienen, dass nach RT auch kollagenabbauende Enzyme hinsichtlich ihrer Aktivität oder hinsichtlich ihrer mRNA-Level vermehrt nachgewiesen wurden. Dieser Nachweis korrelierte mit unterschiedlich hohen Dosen und wurde z. B. für Kolongewebe (Seifert et al. 1997), Nierentubulusepithelien (Zhao et al. 2000), Bronchialepithelien (Araya et al. 2001), Fibroblasten (Sheela & Kennedy 1986) und verschiedene Tumorzellreihen (Wang et al. 2000) beschrieben. Auch die von Miller et al. (1988) mitgeteilten dosisabhängigen und die einzelnen Kollagentypen CI, CIII und CIV unterschiedlich betreffenden Expressionsfluktuationen der Mäuselunge bis 30 Wochen nach RT sprechen für neben den ECM-Ablagerungen stattfindende Abbauvorgänge. Ebenso wurden für Proteoglykane der alveolären und kapillären BM der Mäuselunge neben dosisabhängigen auch zeitabhängige fluktuierende Verminderungen bis 12 Wochen nach RT (5, 9 oder 13 Gy Einzeldosis-RT) beschrieben (Penney & Rosenkrans 1984). Mögliche unterschiedliche Reaktionsmuster der einzelnen BM-Strukturen finden Unterstützung durch die von Costes et al. (2000)

zumindest für die Frühphase nach Schwerionen-RT beobachteten reduzierten Lamininexpressionen bei unveränderter CIV-Immunreaktivität im Bereich der epidermalen BM von Mäusen.

Die nach der Literatur beschriebenen Veränderungen der BM und BM-assoziierten Strukturen, die einerseits durch fokale Unterbrechungen, Integritätsstörungen und Epithelablösungen, andererseits durch verdickte, duplizierte, vielschichtige oder nur fokal vermehrte BM-Expressionen zum Ausdruck kamen, ließen es daher gerechtfertigt erscheinen, auch für den Laryngo-Trachealbereich derartige radiogene Umgestaltungsprozesse anzunehmen. Dies ließ sich anhand der dosis- und lokalisationsabhängigen Expressionsfluktuationen und -steigerungen der BM-Proteine Laminin und CIV sowie des BM-assoziierten Fibronektins nachvollziehen. Für die insgesamt geringere Befundausprägung sind nach unserer Interpretation ähnlich wie beim interstitiellen CIII Zusammenhänge mit der komplexen, eher weniger strahlenempfindlichen Organstruktur des Laryngo-Trachealbereiches bzw. Unterschreitung der Toleranzdosis zu sehen, aber auch das fraktionierte RT-Schema mit Vermeidung hoher Einzeldosen zu berücksichtigen. Möglicherweise trägt auch hier TGF- β 1 dazu bei, Umstrukturierungsprozesse über eine vermehrte Produktion von BM-Komponenten (CIV: Azuma et al. 1996a) oder eine vermehrte Proteinaseaktivitätsinduktion (Azuma et al. 1996b) zu fördern.

Im Gegensatz zu den von Sato et al. (2002) für humane SL-Gewebe mitgeteilten Kollagenveränderungen im Alter bzw. den von Pacheco et al. (1983) berichteten Altersveränderungen bei Nagern, die eine mit dem Alter zunehmende Verdickung der glomerulären BM ohne Beeinflussung durch eine Ganzkörper-RT (Gesamtdosen bis 4.5 Gy) angaben, waren bei unseren Untersuchungen wesentliche altersabhängige Befunde nicht zu erheben. Auch Laurie et al. (1983) fanden u. a. in Rattennieren, die im Alter von 20 Tagen, 3, 10 oder 34 Monaten untersucht wurden, keine altersabhängigen Expressionsveränderungen der BM oder BM-assoziierten Strukturen, was zusätzlich durch Befunde von Ding & Gray (2001) gestützt wird, die für die CIII- und CIV-Expressionslevel von SL-Geweben keine wesentlichen Unterschiede zwischen erwachsenen (5-6 Monate) und alten (24-25 Monate) Ratten fanden.

Insgesamt ergaben sich, beurteilt anhand der Expressionen der BM-Komponenten Laminin und CIV sowie des BM-assoziierten Fibronektins leichte bis z. T. moderate, dosis- und lokalisationsabhängige, teilweise heterogene Umstrukturierungsprozesse der BM-Zone.

5. 5. 3 Cytokeratine (CK) bzw. Intermediärfilamentproteine (IF-Proteine)

5. 5. 3. 1 Allgemeine Immunhistologie und Pathoimmunhistologie

Die das intrazelluläre Stützgerüst ausbildenden CK bzw. IF-Proteine tragen zur mechanischen Stabilität nicht nur der Einzelzelle, sondern auch des Gewebeverbandes bei und zeigen ein differenzierungsabhängiges Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen (Übersicht bei Moll 1993). Letzteres gab im Bereich der Trachea dazu Anlass, CK bzw. IF-Proteine sowohl im Gewebeschnitt, aber auch in vitro als epitheliale Identifikationsmarker (Benali et al. 1991, Davidson et al. 2000, Risbud et al. 2001, Roggeband et al. 1994) bzw. Differenzierungsmarker bei sich entwickelnden Zellveränderungen, insbesondere PE-Metaplasien (Baeza-Squiban et al. 1994: substratsstrukturabhängig, Yamamoto et al.

1998: zeitabhängig), auch in verschiedenen Noxenmodellen (z. B. Vitamin-A-Deprivation: Denning et al. 1994, Gijbels et al. 1992; Benzpyrenexposition/Vitamin-A-Deprivation: Edmondson & Mossman 1991, Wolterbeck et al. 1995; TGF- β 1-Zusatz: Boland et al. 1996; oxydativer Stress: Baeza-Squiban et al. 1998 & 2000, Guilianelli et al. 1993) zu untersuchen. Weiterhin wurde nach Baumwollrauch-Exposition bei Wundheilungsprozessen besonders in trachealen Basalzellen neben morphologischen Veränderungen (Zellvergrößerung, Zellabflachung, vermehrte Hemidesmosomenanheftung zur Basallamina hin) eine deutlich reduzierte Volumendichte der CK-Filamente (Wang et al. 1992) gefunden, nach mit Raumluft vermischter Zigarettenrauch-Exposition (als Noxen-Modell für das sog. „Passivrauchen“) zeigten sich bei Wistar-Ratten vermehrte CK 15-Expressionen bei trachealen Flimmerepithelien, vermehrte CK 7-Expressionen bei basalen Bronchiolusepithelien, verminderte CK 8-Expressionen bei Bronchiepithelien ohne Flimmerbesatz (Clara-Zellen) und verminderte CK 15-Färbereaktionen bei submukösen Drüsen, wohingegen histomorphologische oder Expressionsveränderungen des Larynxepithels nicht beschrieben wurden (Schlage et al. 1998b). Experimentell wurden auch im Larynx CK-/IF-Proteinexpressionen als Identifikations-/Lokalisationsmarker (Shin et al. 1995) bzw. Differenzierungsmarker genutzt (Tsutsumi et al. 2000, Yamagushi et al. 1996).

Bei humanen Geweben standen nicht nur im Tracheobronchialtrakt, sondern auch im Larynx oder angrenzenden Pharynxregionen (Klijanienko et al. 1998, Murakami & Saito 1990, Wild et al. 1987) CK-/IF-Expressionsprofile und deren Veränderungen vor allem bei PE-Metaplasien, Präkanzerosen und malignen Tumoren im Vordergrund (Übersicht bei Moll 1993, Alujevic et al. 1998, Amin et al. 2001, Balm et al. 1996, Bardos et al. 1998, Bottoni et al. 2001, Cardesa et al. 1997, Chan et al. 1997, Horn et al. 2001, Incandela et al. 1999, Kim et al. 1998, Kruslin et al. 1998, Lobeck et al. 1986 & 1988, Meister & Goertchen 1994, Morice & Ferreiro 1998, Otto 1999, Philippi 1991, Saito 1994, Terry et al. 1986, Tsubochi et al. 2000, Van der Velden et al. 1997, Vollrath et al. 1983, Wallner et al. 1990), während spezifische radiogene CK-/IF-Expressionsveränderungen in laryngotrachealen Normalgeweben weniger bekannt sind.

Das von uns gefundene Reaktionsspektrum bestätigte im Wesentlichen die aus humanen Geweben bekannten (Moll 1993, Stosiek et al. 1991, Lobeck et al. 1986 & 1988) sowie speziell für die Rattenspezies mitgeteilten Expressionsmuster (Schlage et al. 1998a, Kasper et al. 1993, Evans et al. 1993) i. B. der oberen Luftwege.

Hier konnten insbesondere die gut dokumentierten Befunde nach Schlage et al. (1998a) für kuboidale (nichtzilientragende) und respiratorische (zilientragende) Epithelien sowie squamoide Epithelien vergleichend berücksichtigt werden. Wir wählten allerdings für kuboide und squamoide Zellen bevorzugt den Begriff Indifferenzepithel, da sich die Zelltypen nicht immer streng differenzieren ließen und nicht immer zwanglos mit den aus humanen Geweben bekannten Transitionalzellen, die einerseits respiratorisch differenzierten Transitionalzellen (3-4 reihiges zylindrisches Flimmerepithel), andererseits plattenepithelial differenzierten Transitionalzellen (mehrschichtiges Zylinderepithel ohne Flimmerbesatz, z.B. Stosiek et al. 1991) entsprechen, vergleichbar waren. Die recht schwache CK 13-Expression

in Kombination mit wenn auch nicht ausgeprägter CK 19-, jedoch kräftiger CK 18-Expression unterstützte neben dem morphologischen Bild die Zuordnung zu Indifferenzepithelien, da sich die Expressionen von der Glottis-SH (unverhorntes PE: CK 13+, CK18-, CK 19 inkonstant +) und den respiratorischen Epithelien (CK 13-, CK18+, CK 19 schwach +) unterschieden. Unsere Befunde dieser Zelltypen bezogen sich jedoch auf Reaktionen in Regionen der Supra- und Subglottis, der Trachea und des Pharynx, und nicht wie bei Schlage et al. (1998a) auf das Glottisniveau. Diese zelltypkonsistenten, aber etwas lokalisationsdifferenten Färbereaktionen könnten durch die unterschiedlichen Schnittebenen erklärlich sein, welche bei Schlage et al. (1998a) möglicherweise auch supra- und subglottische Areale miterfassten und bei unseren Präparaten streng ventrale oder dorsale Glottisabschnitte nicht immer optimal beurteilen ließ. Für die Glottisregion darf zumindest abschnittsweise unverhorntes Plattenepithel angenommen werden (Hebel & Stromberg 1986, Lewis & Prentice 1980), was auch von Schlage et al. (1998a) als zu erwartendes Epithel angegeben, in seinen evaluierten Glottispräparaten aber nicht vorgefunden wurde. Unsere CK 19-Reaktionen beim Glottisepithel waren relativ schwach und inkonstant, was die Beurteilbarkeit einschränkte, und zeigten keine RT-abhängigen Effekte. Andererseits könnten die etwas konstanteren CK 19-Expressionen unverhornter Epithelien anderer Lokalisationen dafür sprechen, dass im Glottisepithel mehr heterogene (relativ strahlenresistente) Expressionen vorliegen, wohingegen in unverhornten Epithelien der näheren Umgebung strahlenabhängige Effekte mit wenn auch nur gering vermehrter Expression (zumindest bei geringeren und mittleren Dosen) zu berücksichtigen sind. Wenn im Zuge geringerer Strahlendosen auch mehr entzündlich-reparative Vorgänge miteinbezogen werden, steht eine vermehrte CK 19-Reaktion im Einklang mit Moll (1993), der im Vergleich von normaler Wangenschleimhaut (CK 19-Expression abschnittsweise in der Basalschicht) mit entzündeter Hypopharynxschleimhaut für letztere eine viel ausgedehntere CK 19-Expression für basale und auch suprabasale Zellen angab. Auch Lobeck et al. (1988) fanden bei entzündlich-reaktiven, hyperplastischen laryngealen Flimmerepithelien neben betonter CK 13-Expression verbreiterte, ausgedehntere CK 18- und CK 19-Reaktionen an. Das CK 13-Expressionmuster entsprach weitgehend der für PE üblichen Verteilung, was durch die zumeist sehr schwache Reaktion fokal verhornender PE der angrenzenden Pharynx- und Ösophagusschleimhaut und die als typisch geltende CK-13-Expression in PE-Metaplasien, die wir vereinzelt in der Schilddrüse und bei submukösen Drüsen beobachteten, unterstützt wurde. Zelltypkonsistent, jedoch etwas lokalisationsdifferent – wie bei CK 17/19 bereits erwähnt – konnten im Larynx auch für CK 18 die von Schlage et al. (1998a) angegebenen epithelialen Reaktionen für respiratorische und Indifferenzepithelien bestätigt werden, wobei sich durchaus Korrelationen zur als besonders kräftig und ausgedehnt beschriebenen CK 18-Expression im Randzonenepithel humaner SL-Gewebe ergeben (Lobeck et al. 1988). Demgegenüber ließen sich die für humane unverhornte PE der Glottis als Besonderheit angegebenen kräftigen CK 18- Und 19-Reaktionen in basalen und suprabasalen Schichten (Lobeck et al. 1988) anhand der eigenen Präparate für CK 18 nicht, und CK 19 nicht sicher belegen. Dies könnte durch die Tierspezies bedingt sein, andererseits wird für CK 18 nicht immer von einer Expression im

glottalen Epithel ausgegangen (Burkhardt & Meyer-Breiting 1999, Saito 1994).

Auch die von Kaspar et al. (1993) für das normale, bronchiale Epithel angegebenen AK-Reaktivitäten gegenüber den CK 8, 18 und 19 (in Hauptbronchien auch fokal CK 7 Expression und CK 4 Expression bei Einzelzellen) ließen sich bei den, wenn auch an weiter kranial gelegenen respiratorischen Epithelien der Trachea und des Larynx bezüglich der CK 18- und CK 19-Reaktivitäten nachvollziehen.

5. 5. 3. 2 Radiogene Reaktionen (einschließlich Effekte weiterer Noxen) der CK bzw. IF-Proteine

Für das Lungengewebe konnte in histologischen und immunhistochemischen Studien zu zellulären und extrazellulären Veränderungen bei der Lungenfibrose, die allerdings neben der Bestrahlung auch andere Noxenmodelle (vor allem Bleomycin-induzierte Fibrosen) als Ursache berücksichtigten, verdeutlicht werden, dass zwar vornehmlich Induktion, Verteilung und Wechselwirkungen (z. B. mit Zelloberflächenrezeptoren oder Integrinrezeptoren) verschiedener ECM-Bestandteile, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hyaluronsäure, Kollagen und Kollagenfasertypen, Laminin und Fibronectin und weitere Proteoglykane zu berücksichtigen sind (u. a. Adamson et al. 1988, Anazawa et al. 1992, Crouch 1990, Hermnas et al. 1992, Kuhn et al. 1989, Li 1992, Li et al. 2000, Martinez-Hernandez & Amenta 1991, Mitchell et al. 1991, Nettelblatt et al. 1989 & 1991, Raghov et al. 1985, Raghov 1991 & 1994), jedoch auch nicht-epitheliale Zellen im Interstitium wie Lymphozyten, Granulozyten, Mastzellen, Fibroblasten (einschließlich deren durch TGF- β stimulierbare Kollagenproduktion in vitro und im Gewebe: Fine et al. 1990, Fine & Goldstein 1991, Hayashi et al. 1996, Raghov et al. 1989, Ritzenhaler et al. 1991, Übersicht bei Rodemann et al. 1995), Mesothelien, Endothelien, Alveolar- und Interstitium-Makrophagen (Adamson et al. 1994, Adamson & Bowden 1983, Crouch 1990, Komatsu et al. 1989, Kuhn et al. 1989, Nettelblatt et al. 1989 & 1991, Yi-Qing et al. 1995) und kontraktile Elemente in Myofibroblasten (Leslie et al. 1992, Skalli et al. 1989) sowie die Interaktion zwischen Alveolarepithelien und Fibroblasten bzw. Kollagenen (Adamson et al. 1990) eine Rolle spielen.

Da gezeigt werden konnte, dass CK bei den morphologischen Veränderungen während der Lungenentwicklung und bei kultivierten Typ-II-Pneumozyten miteinbezogen sind (Mitchell et al. 1991, Funkhouser et al. 1987, Funkhouser & Peterson 1989, Woodcock-Mitchell et al. 1989 & 1990), fanden in der Lunge neben morphologischen Veränderungen (u. a. Adamson et al. 1988 & 1990, Crouch 1990, Anazawa et al. 1992) zunehmend auch CK- bzw. IF-Proteinveränderungen epithelialer (und teilweise nicht-epithelialer) Zellen bei pathologischen Umbauprozessen bzw. chronischen Schädigungsmustern (Woodcock-Mitchell et al. 1986 & 1989, Fine et al. 1991, Mitchell et al. 1991) und nach Bestrahlung (Fujita et al. 2000, Kasper et al. 1993, Österreicher et al. 2001) Beachtung. So fanden sich u. a. hyperplastische, stark CK 8-, 18- und 19-exprimierende Typ-II-Pneumozyten bei eingetretener Strahlenpneumonie nach Lungen-RT (Fujita et al. 2000) bzw. verstärkte CK 18-Expressionen dieser Alveolarepithelien nach toxischer Bleomycin-Applikation (Woodcock-Mitchell et al. 1986) oder mehr allgemeinem Zelldifferenzierungsverlust (Woodcock-Mitchell et al. 1989) sowie nach Zigarettenraumluft-

exposition (Schlage et al. 1998b). Andererseits kann die CK 18-Immunreaktivität vermindert sein, wenn nach Lungen-RT (2x 15 Gy innerhalb einer Woche) neben Alveolarseptenverdickungen Typ II-Pneumozyten-Dezimierungen vorliegen (Österreicher et al. 2001). Kasper et al. (1993) konnten in bis 6 Monate nachuntersuchten, bestrahlten (20 Gy Einzeldosis) Lungengeweben von Ratten darstellen, dass sich CK-Expressionsmuster, Zellmorphologie und -verteilungsmuster bei Bronchial- und Alveolarepithelien zeitabhängig veränderten. Bereits 2 bzw. 7 Tage nach RT fand sich eine ausgeprägt heterogene Expression der CK 8, CK 18 und CK 19 und in terminalen Bronchioli kam es zur stark vermehrten CK 4- und CK 7-Expression. Die bronchialen Epithelschichten wiesen eine geringe Hyperzellularität auf. Zusätzliche CK 19-Expressionen in peribronchialen und Gefäßmuskelzellen waren nach 2 Monaten, eine bemerkenswerte Koexpression von Vimentin und CK im Bronchialepithel mit zusätzlich fokaler Neoexpression von CK 13 nach 6 Monaten auffällig.

Auch wenn zu radiogenen CK/IF-Expressionsveränderungen in laryngotrachealen Normalgeweben weniger Erkenntnisse vorliegen, ergaben sich durch die bei Larynxkarzinomen beschriebenen histologische Veränderungen nach RT, die sich in Form von morphologischen Kern- und Zytoplasmaveränderungen und auch in bestimmten Mustern am Gesamt-TM darstellten (Übersicht bei Burkardt & Meyer-Breiting 1999; Meyer-Breiting & Burkardt 1988) Anhaltspunkte für mögliche, auch CK/IF-Proteine betreffende Alterationen im Gewebeverbund, zumal in vitro (Somosy et al. 1995) und auch Befunde aus nicht radiogenen Noxenmodellen (Gijbels et al. 1992, Schlage et al. 1998b) bzw. chronischer Nierenschädigung (Gröne et al. 1987) auf CK/IF-Proteinveränderungen mit und ohne morphologische Alterationen hinwiesen. Demgegenüber ergab sich aber keine Korrelation der CK- und Vimentinmuster mit Primär-TM versus Metastase oder mit dem Zustand nach RT (unveröffentlichte Daten, zitiert nach Moll 1993).

Wir fanden eine **CK 13**-Expressionsabnahme bei zunehmender Strahlendosis im Bereich der Glottisschleimhaut. **CK 17/19** wurde in supra- und subglottischen, respiratorischen Epithelien besonders nach 20 Gy- und 60 Gy-Exposition vermindert exprimiert. Respiratorische und z. T. kuboidale Indifferenzepithelien an der Innenseite der aryepiglottischen Falte zeigten ebenfalls nach initialer Zunahme bis 40 Gy-Exposition eine CK 17/19-Reaktivitätsabnahme nach 60 Gy Strahlendosis. Für unverhornte PE an der Außenseite der aryepiglottischen Falte, im Hypopharynx und im Ösophagus ergab sich der Hinweis auf eine basal betonte CK 19-Reaktion, zumindest bei geringer und mittlerer Dosis. Strahlenabhängige **CK 18**-Reaktivitäten fanden sich sowohl zunehmend als auch abnehmend. Zunehmende Expressionen zeigten subglottische Drüsen, tendenziell zunehmende Expressionen betrafen die supra- und subglottische respiratorische Schleimhaut, supraglottische Drüsen und die Thyreozyten. Tendenzuell abnehmende Reaktionen betrafen die Trachealschleimhaut, die trachealen submukösen Drüsen und z. T. das respiratorische Epithel an der Innenseite der aryepiglottischen Falte. Diese Veränderungen waren zumeist strahlenabhängig und zeigten eine durchaus heterogene Dosisabhängigkeit. Gewisse Alterseffekte betrafen einzelne Lokalisationen. Da diese Effekte jedoch in der Regel ein gleiches Muster wie die strahlenabhängigen Veränderungen aufwiesen, ist hier ein möglicher versteckter RT-

Effekt nicht auszuschließen. Hingegen konnten wir in dem von uns untersuchten Zeitabschnitt nach der Strahlenexposition (6 Monate vs. 12 Monate) keine latenzabhängigen Veränderungen aufzeigen. Dies kontrastiert nur insofern zu den Befunden von Kasper et al. (1993), die über zeitabhängige, zu- meist ab 14 Tage nach RT auffällige, morphologische und CK-Veränderungen berichteten, als die Autoren ein Zeitfenster bis 6 Monate nach RT untersuchten, welches wir zur von uns intendierten Untersuchung von Späteffekten hier nicht berücksichtigten. Allerdings unterstützten die von Kasper et al. (1993) mitgeteilten heterogenen Expressionsmuster die eigenen Befundinterpretationen. Die von uns beobachtete Heterogenität betraf einerseits lokalisationsdifferente Strahleneffekte, was im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Strahlenreagibilität verschiedener Zelltypen und Gewebe (Herrmann & Baumann 1997), zusätzlich auch genetisch determinierten und weiteren endogenen und exogenen Faktoren (Übersicht bei Baumann 1995) gesehen werden könnte. So reagierten Drüsenformationen bezüglich der CK 18-Veränderungen „empfindlicher“ als Schleimhautepithelien und bei der CK 13-Expressionsveränderung waren nur glottale Epithelien, nicht hingegen angrenzende Pharynxepithelien betroffen. Eine echte Neoexpression von CK konnten wir allerdings nicht beobachten, wie sie Kaspar et al. (1993) als CK 13-Neoexpression im Bronchialepithel 6 Monate nach RT mitteilten.

Andererseits kam die Heterogenität in radiogenen zu- und abnehmenden Expressionsprofilen sowie dosisabhängigen, fluktuierenden Profilverläufen zum Ausdruck, wobei zu- bzw. abnehmende Expressionsmuster nicht nur durch die nach Lungen-RT (Fujita et al. 2000, Österreicher et al. 2001) bzw. nach Bleomycin-Applikation (Woodcock-Mitchell et al. 1986) mitgeteilten Reaktivitätsveränderungen bei Alveolarepithelien, sondern daneben auch durch die nach Zigarettenrauchexposition (Schlage et al. 1998b) beschriebenen trachealen CK-Alterationen im Sinne vermehrter CK 15-Expression im Flimmerepithel und verminderter CK 15-Reaktivität in submukösen Drüsenzellen (ohne begleitende morphologische Veränderungen) gestützt werden. Letzteres korreliert mit den eigenen Befunden dahingehend, dass bis auf teilweise und fokale PE-Metaplasien i. B. der Schilddrüse und moderate Veränderungen der submukösen Drüsen (Dilatation, Hypoplasie, teilweise Gangepithelmetaplasien) keine nennenswerten weiteren morphologischen Epithelveränderungen auftraten. Das Fehlen schwerer morphologischer Epithelveränderungen ließ auch einen Vergleich mit maligne transformierten Zellen nicht sinnvoll erscheinen, obwohl es dabei zu einem sehr breiten qualitativen und quantitativen CK-Zugewinn, aber auch CK-Verlust kommen kann (Übersicht bei Moll 1993).

Auch das IF-Protein Vimentin zeigte RT-abhängige heterogene Expressionsmuster mit zu- und abnehmender Expression bei verschiedenen Lokalisationen sowie dosisabhängige, unterschiedliche Profilverläufe. Allerdings konnten wir keine Koexpression mit CK im untersuchten Epithel feststellen, was von Kasper et al. (1993) für Bronchialepithelien 6 Monate nach RT oder auch für chronisch geschädigte Nierenepithelien (Gröne et al. 1987) berichtet wurde.

Als mögliche Erklärung für die auch im Gewebe zu befundenden radiogenen CK/IF-Veränderungen können die in vitro erhobenen, schon ab geringen Dosen von 0.5 und 1 Gy auffälligen Befunde einer IF-Proteinzerstörung und CK-Aggregationsbildung dienen. Zusätzlich gingen diese Veränderungen

mit der Bildung schmaler, irregulär geformter, mit amorphem Material assoziierter Filamentstränge einher (Somosy et al. 1995). Je nach Zerstörungs- bzw. Umstrukturierungsprozess könnte damit eine verstärkte als auch verminderte Immunreaktivität verbunden sein, indem über veränderte CK/IF-Proteinkonfigurationen, -mengen und/oder AK Zugänglichkeiten auch veränderte Expressionsmuster hervorgerufen werden. Inwieweit diese Prozesse genvermittelt ablaufen, wurde von uns nicht untersucht und bleibt daher spekulativ. In Analogie zur ECM-Umgestaltung könnte zumindest angenommen werden, dass veränderte Genexpressionen und-produktlevel zum heterogenen Expressionsprofil beitragen.

Neben dem Fehlen schwerer morphologischer Alterationen kann auch das Fehlen massiverer CK-/IF-Proteinveränderungen (Neo- und Koexpressionen, Totalverluste) im Zusammenhang mit der komplexen laryngotrachealen Organstruktur, der Unterschreitung der Toleranzdosis und besonders dem RT-Protokolls mit konventioneller Fraktionsdosis gesehen werden, da sonst berichtete ausgedehntere und ausgeprägtere CK/IF-Proteinveränderungen nach höheren meist als Einzeldosis applizierten Dosen auftraten (Kasper et al. 1993: 20 Gy Einzeldosis, Österreicher et al. 2001: 2 x 15 Gy), was ein mögliches größeres Reaktionspotential implizieren kann (Herrmann & Baumann 1997) und auch für allgemeine, histologisch untersuchte radiogene Veränderungen ausgedehntere und schwerwiegendere Befunde nach höheren Einzeldosen und / oder höheren Gesamtdosen angegeben wurden (z. B. Adamson & Bowden 1983, Albertsson 1985, Albertsson et al. 1984, Barnes et al. 1987, Giri et al. 1985, Man et al. 1987, Powers et al. 1987, Shapiro et al. 1982).

Insgesamt ergaben sich für den Laryngotrachealbereich, beurteilt anhand der CK/IF-Proteinimmunreaktionen, lokalisations- und dosisabhängige heterogene Expressionsprofile im Sinne zu- und abnehmender Expressionen sowie dosisabhängiger Expressionsfluktuationen.

6 Zusammenfassung

Zunehmende Inzidenz- und Mortalitätsraten, zunehmende Erkrankungen mittlerer Jahrgänge und häufiger erst späte Diagnosestellung in bereits fortgeschrittenen Tumorstadien bedingen bei der Therapie von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes einen multimodalen Therapieansatz. Einer dieser Säulen ist die Strahlentherapie. Wegen der engen anatomischen Nähe und wechselseitigen Beziehung wichtiger Organstrukturen der Kopf-Halsregion ist trotz moderner Bestrahlungstechniken die Mitbelastung von nicht tumorbefallenen Normalgeweben unvermeidbar. Diese Mitbelastung kommt in zellulären und strukturellen Gewebeveränderungen zum Ausdruck. Mit der vorliegenden Arbeit wurde das Ziel verfolgt, an einigen wichtigen Organen der Kopf-Halsregion diese Normalgewebsreaktionen auf der phänotypischen Ebene näher zu charakterisieren. Das gewählte humantherapeutisch relevante RT-Protokoll und moderne immunhistologische Techniken sollten dazu beitragen, radiogene Strukturreaktionsmuster zu erkennen, die eine Zuordnung zu Funktionsstörungen erlauben und die es möglicherweise erleichtern, in bei Verdacht auf TM-Rezidiv ausgeführten oftmals kleinen Biopsien TM-Gewebe von einer begleitenden postradiogenen Gewebealteration zu unterscheiden. Das Untersu-

chungsprogramm musste daher sowohl die zell- und gewebetypisierende „Normalhistologie“ als auch die immunhistologische Charakterisierung von Zielantigenen, die für die Zell- und Gewebeintegrität eine wesentliche Rolle spielen, umfassen. Zusätzlich sollte ein mögliches radiogenes mutagenes/kanzerogenes Potential miterfasst werden.

In 2 Studienserien wurden die großen Kopfspeicheldrüsen, Laryngotrachealgewebe mit angrenzenden Pharynxanteilen, Hypophysentumoren und extrakranielle Tumoren bei insgesamt 120 Wistar-Ratten feingeweblich untersucht. Die Strahlenapplikation erfolgte nach einem konventionell fraktionierten humantherapeutisch relevanten Protokoll mit einer Einzeldosis von 2 Gy pro Tag bis zu einer Gesamtdosis von 20, 40 oder 60 Gy, um die Dosisabhängigkeit zu prüfen. Um den Einfluss weiterer Faktoren beurteilen zu können, wurde differenziert nach verschiedenen Altersklassen (3 Monate bis 2 Jahre) und verschiedenen Nachbeobachtungszeiten (weniger als 4 Monate bis zu 1 Jahr) ausgewertet. Zur Klassifikation der Strahlenreaktion im SD-Gewebe anhand der HE-Histologie wurde die für Humanewebe gebräuchliche Stadieneinteilung nach Seifert (1996) in leicht modifizierter Form genutzt, um Vergleichsbeurteilungen vorzunehmen. Da den bisher 20 bekannten CK bzw. IF-Proteinen und extrazellulären Matrixproteinen, unter besonderer Berücksichtigung von BM-Strukturen, wesentliche Einzelzell- und Gewebeintegritäts-beeinflussende Funktionen zugeschrieben werden, erfolgte mit zumeist monoklonalen Antikörpern (AK) die Darstellung dieser Zielstrukturen im Gewebe. Zum Einsatz kamen die AK gegen CK 5/6, 8, 13, 13/15/16, 17/19, 18 und Vimentin sowie gegen Laminin, Fibronectin, Kollagen III, Kollagen I und Kollagen IV. Ein gesteigertes bzw. ungeordnetes, für das Gewebe nicht typisches Proliferationsverhalten als Zeichen einer radiogenen Reaktion der Drüsenparenchymzellen wurde mit dem monoklonalen MIB-5-AK gegen Ki-67, welches einem nukleären, zellproliferationsassoziierten Antigen entspricht, untersucht. Die zufällig entdeckten Hypophysentumoren sowie die extrakraniellen TM-Bildungen wurden ebenfalls in das histologische Untersuchungsprogramm einbezogen, wobei an ersteren vor allem die auch klinisch bedeutsame Hormonproduktion interessierte und bei letzteren nicht nur eine Aussage zur Tumorentität, sondern auch zur Strahlenassoziation intendiert wurde. Um auch dem makroskopischen Gesamtaspekt, welcher mit der RT-Wirkung auf den gesamten Organismus zusammenhängt, Rechnung zu tragen, wurde neben dem SD-Gewicht das Körpergewicht der Tiere im Zeitverlauf ausgewertet.

Im SD-Gewebe konnte eine eindeutige, positiv korrelierte Dosisabhängigkeit der Normalgewebsreaktionen anhand der HE-Präparate nachgewiesen werden, wohingegen die histologischen Befunde (auch nach der geringeren 20 Gy- und mittleren 40 Gy-Exposition) zumeist nicht alters- oder latenzabhängig waren. Das für die höchste Dosisgruppe charakteristische Stadium 2 kann somit als Beleg dafür gewertet werden, dass mit dem gewählten RT-Protokoll eine Maximalreaktion vermieden werden kann. Andererseits weist jedoch die fehlende Veränderung im Zeitverlauf auf die Dauerhaftigkeit der Veränderungen hin. Deutlich und positiv dosisabhängig gesteigert war die Expression der CK bzw. IF-Proteine und der ECM- bzw. BM-Strukturen, wobei die zelltypspezifische Expression der CK erhalten blieb. Diese Befunde weisen auf die radiogene Alteration dieser Proteinstrukturen hin und können ü-

ber eine mangelnde Integritätsgewährleistung zur Erklärung von radiogenen Parenchymstrukturveränderungen beitragen. Die ebenfalls erhöhte Expression des Markers MIB-5 im Sinne einer Proliferationsstörung, insbesondere 6 Monate nach abgeschlossener RT, unterstützt das Konzept der u. a. durch Proliferationsstörungen erklärten Normalgewebsreaktionen, weist aber auch auf die mögliche kanzerogene Potenz dieser Zellen mit ungeordneter Proliferation hin.

Im Laryngotrachealbereich waren insgesamt gering bis moderat ausgeprägte, morphologische Befunde im Sinne von Lymphgefäßektasien, Ödemen, Blutgefäßdilataationen, interstitiellen Zellinfiltraten, Fibrosen, supraglottischen pseudopapillären Formationen und Drüsenveränderungen nachweisbar, die jedoch bis 12 Monate nach RT persistierten. Auch die CK/IF- und EMP-Expressionsmuster waren in eher geringem bis mäßigen Ausmaß verändert, wobei jedoch eine nicht unerhebliche Heterogenität der Expressionsmuster auffiel. Das spricht unter Berücksichtigung der komplexen Organstruktur des Laryngo-Trachealbereiches in Kombination mit der Toleranzdosisunterschreitung für eine relative Strahlenresistenz dieser Kopf-Halsregion. Andererseits weist die Persistenz darauf hin, dass die, wenn auch geringeren Veränderungen der Morphologie und Expressionsmuster zu den regelmäßig auftretenden Bildern radiogener Spätreaktionen gehören.

Die von uns beobachteten extrakraniellen, malignen Tumoren waren hinsichtlich der Histologie (Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome) und Ursprungsorte (Speicheldrüsen, Maxilla, Milchleiste) ungewöhnlich. Die immunhistologisch untersuchten CK-Muster konnten dabei vielfach die Auswertung unterstützen. Die BM-Expressionen in den Tumoren waren uneinheitlich (verminderte oder vermehrte Expressionen, BM-Verluste, BM-Fragmente). Die gutartigen extrakraniellen Tumoren und wenigen bösartigen Milchleistentumoren waren den bei Laborratten, insbesondere im höheren Alter häufig auftretenden Spontanumoren der Brust- bzw. Milchleistenregion zuzuordnen. Unsere Befunde weisen darauf hin, dass nicht nur Sarkome, sondern auch relativ früh auftretende Karzinome verschiedener Ursprungsgewebe in die Beobachtungen von radiogenen Spätreaktionen mit einzubeziehen sind.

Fünf unserer 9 zufällig entdeckten Hypophysenadenome waren endokrin aktiv und produzierten Hormone. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, auch bei unauffälliger klinischer Symptomatik, eine laborchemische Kontrolle der Hypophysenleistung bei Patienten, deren Hirn oder Hirnanteile im Strahlenfeld liegen, anzuraten.

Im Sinne der Fragestellung kann formuliert werden, dass die radiogenen Spätreaktionsmuster im Bereich der SD von begleitenden Tumorrezidiven leichter unterschieden werden können, wenn eine vermehrte, vor allem zelltypspezifische CK bzw. IF-Expression und gesteigerte bzw. verbreiterte ECM-, insbesondere BM-Immunreaktivitäten vorliegen. BM-Irregularitäten im Sinne von Fragmentierungen, Verlusten und schwachen Expressionen sowie zellatypische CK-Expressionen können hingegen auf eine mögliche maligne Transformation hinweisen. Da jedoch auch heterogene Expressionsmuster, nicht nur bei den untersuchten Tumoren, beobachtet wurden, ist eine Differenzierung nur im enger Zusammenschau mit dem morphologischen Bild zulässig. Neben den histologischen Befunden sowohl i. B. der Speicheldrüsen als auch i. B. der Laryngotrachealregion können vermutlich auch die Verän-

derungen der integritätsgewährleistenden CK und EMP zur Erklärung klinisch-funktioneller Störungen (z. B. Xerostomie, Ödeme, Stimmveränderungen) beitragen. Das Auftreten auch nicht sarkomatöser Tumoren und hormonproduzierender Hypophysenadenome sollte im Follow-up von strahlentherapierten Tumorpatienten beachtet werden. Da die erhöhte Proliferationsrate auf ein mögliches kanzerogenes Potential hinweist, sollten auch bei der RT miterfasste Normalgewebe in die Routinenachkontrollen von Tumorpatienten nach wie vor einbezogen werden.

1. Aalto Y, Forsgren S, Franzen L, Hendriksson R (1998) Is radiation-induced degranulation of mast cells in salivary glands induced by substance P?. *Oral Oncol* 34: 332-339
2. Aalto Y, Kjorell U, Hendriksson R, Franzen L, Forsgren S (1997) Bombesin-like peptide is present in duct cells in salivary glands: studies on normal and irradiated animals. *Neuropeptides* 31: 167-173
3. Aanesen JP, Winther FO, Tausjo J (1988) Treatment of T3 laryngeal carcinoma. Clinical evaluation after 50 Gy, is it of any value? *Acta Otolaryngol Suppl* 449: 141-144
4. Abok K, Brunk U, Jung B, Ericsson J (1984) Morphologic and histochemical studies of the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat mandibular gland. *Virchows Arch (Cell pathol)* 45: 434-460
5. Actis AB, Lampe PD, Eynard AR (2002) Cellular basis and clinical implications of biological markers in salivary tissues : their topological distribution in murine submandibular gland. *Oral Oncol* 38: 441-449
6. Adamson IY, Bakowska J, Bowden DH (1994) Mesothelial cell proliferation: a non-specific response to lung injury associated with fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10 (3): 253-258
7. Adamson IY, Bowden DH (1983) Endothelial injury and repair in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 112 (2): 224-230
8. Adamson IY, Hedgecock C, Bowden DH (1990) Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. *Am J Pathol* 137 (2): 385-392
9. Adamson IY, King GM, Bowden DH (1988) Collagen breakdown during acute lung injury. *Thorax* 43 (7): 562-568
10. Ahlner BH, Hagelquist E, Lind MG, Ruden BI (1993) Irradiation of rabbit submandibular glands. Histology and morphometry after 15 Gray. *Acta Otolaryngol* 113: 210-219
11. Albertsson M (1985) Dose-response studies of single dose ionizing radiation on the ciliated epithelium of the trachea of the rabbit. A physiologic and ultrastructural investigation. *Acta Radiol Oncol* 24 (5): 433-443
12. Albertsson M, Baldetorp B, Hakansson CH, von Mecklenburg C (1984) The effects of 10 Gy single-dose irradiation on the ciliated epithelium measured during and one-to-ten days following irradiation. A comparative physiological and morphological study. *Scan Electron Microsc* 2: 813-124
13. Albertsson M, Cwikiel M, Hakansson CH, Palmegren M (1992) Response of the esophageal epithelium to concomitant cis-dichlorodiammineplatinum (II) and radiation treatment. An electron microscopic study in rabbits. *Scanning Microsc* 6 (4): 1023-1034
14. Albertsson M, Hakansson CH, Mercke C (1986) Ciliated cells of the trachea of the rabbit, treated with cis-diamminedichloroplatinum (II) alone, or in combination with ionizing radiation. *Scan Electron Microsc* 3: 1109-1119
15. Albertsson M, Hakansson CH, von Mecklenburg C (1983) Scanning electronmicroscopy and recording of the physiological activity of tracheal ciliated cells treated by fractionated irradiation. *Scan Electron Microsc* 4: 2019-2026
16. Albertsson M, Mercke C, Hakansson CH, von Mecklenburg C (1985) Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy of the ciliated cells of the trachea of the rabbit treated with misonidazole alone and in combination with ionizing radiation. *Radiother Oncol* 3 (1): 47-60
17. Alexakis C, Guettoufi A, Mestries P, Strup C, Mathe D, Barbaud C, Barritault D, Caruelle JP, Kern P (2001) Heparan mimetic regulates collagen expression and TGF-beta 1 distribution in gamma-irradiated human intestinal smooth muscle cells. *FASEB J* 15 (9): 1546-1554
18. Alexander FW (1963) Micropathology of radiation reaction in the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 72: 831-841
19. Allgood JW, Langberg CW, Sung CC, Hauer-Jensen M (1996) Timing of concomitant boost irradiation affects incidence and severity of intestinal complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34 (2): 381-387
20. Altman NH and Goodman DG (1979) Neoplastic Diseases. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weissbroth SH (eds.): The laboratory rat. Vol I. Biology and Diseases. Academic Press, New York, 348-349
21. Altmannsberger M (1988) Intermediärfilamentproteine als Marker in der Tumordiagnostik. Fischer Verlag, Stuttgart
22. Alujevic A, Juric G, Separovic R, Kruslin B (1998) Unusual features of metastatic atypical carcinoid of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 255 (6): 318-321
23. Amin HH, Petruzzelli GJ, Husain AN, Nickoloff BJ (2001) Primary malignant melanoma of the larynx. *Arch Pathol Lab Med* 125 (2): 271-273
24. Amos EH, Edwards T, Lowrey GC, McCabe M (1992) A technique for postoperative irradiation of carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Med Dosim* 17 (2): 65-67
25. Anazawa Y, Isawa T, Teshima T, Miki M, Motoiya M (1992) Pulmonary epithelial permeability in rats with bleomycin-induced pneumonitis. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 30 (7): 1222-1228
26. Ang KK, Stephens LC, Schultheiss TE (1991) Oral cavity and salivary glands. In: Radiopathology of organs and tissues (Scherer E, Streffer C, Trott KR, Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
27. Anscher MS, Crocker IR, Jirtle RL (1990) Transforming growth factor-beta 1 expression in irradiation liver. *Radiat Res* 122: 77-85
28. Antognoni P, Bossi A, Molteni M, Richetti A, Tordiglione M (1990) Exclusive radiotherapy of locally advanced carcinoma of the larynx. Analysis of the caseload of Varese (1979-1986). *Radiol Med Torino* 80 (6): 898-902
29. Antonakopoulos GN, Hicks RM, Hamilton E, Berry RJ (1982) Early and late morphological changes (including carcinoma of the urothelium) induced by irradiation of the rat urinary bladder. *Br J cancer* 46: 403-416
30. Antonelli AR, Nicolai P, Cappiello J, Peretti G, Molinari-Tosatti MP, Rosa D, Grigolato PG, Favret M, Maroccolo D (1991) Basement membrane components in normal dysplastic, neoplastic laryngeal tissue and metastatic lymph nodes. *Acta Otolaryngol* 111 (2): 437-443
31. Aoyagi S (1995) A morphological study of the human ventricular fold: age-related changes and sex differences. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 98 (4): 627-641
32. Araya J, Maruyama M, Sassa K, Fujita T, Hayashi R, Matsui S, Kashii T, Yamashita N, Sugiyama E, Kobayashi M (2001) Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 production in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280 (1): 30-38
33. Arden MG, Adamson IY (1992) Collagen synthesis and degradation during the development of asbestos-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 18 (1): 9-20
34. Arimoto T, Takamura A, Tomita M, Suzuki K, Hosokawa M, Kaneko Y (1993) Intraoperative radiotherapy for esophageal carcinoma-significance of IORT dose for the incidence of fatal tracheal complication. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 27 (5): 1063-1067
35. Astor FC, Hanft KL, Ciocon JO (1999) Xerostomia: a prevalent condition in the elderly. *Ear Nose Throat J* 78(7): 476-479
36. August M, Wang J, Pante D, Wang CC (1996) Complications associated with therapeutic neck radiation. *J Oral Maxillofac Surg* 54 (12): 1409-1416

37. Azuma M, Kawamata H, Kasai Y, Nagamine S, Yoshida H, Yanagawa T, Sato M (1988) Effects of retinoic acid on morphological features and biological markers of a neoplastic human salivary intercalated duct cell line in culture. *Cancer Res* 48(24 Pt 1): 7219-7225
38. Azuma M, Tamatani T, Fukui K, Yuki T, Motegi K, Sato M (1996a) Different signalling pathways involved in transforming growth factor-beta 1-induced morphological change and type IV collagen synthesis in simian virus-40-immortalized normal human salivary gland duct and myoepithelial cell clones. *Arch Oral Biol* 41(5): 413-424
39. Azuma M, Tamatani T, Yuki T, Motegi K, Hoque MO, Yoshida H, Sato M (1996b) Increased matrix metalloproteinase-2 activity induced by TGF-beta 1 in duct cells of human salivary gland is associated with the development of cyst formation in vivo. *J Oral Pathol Med* 25(9): 467-473
40. Baeza-Squiban A, Boisvieux-Ulrich E, Elcher L, Marano (1998) Defense and repair mechanisms in the airway epithelium exposed to oxidative stress: effects of analogues of retinoic acid. *Toxicol Lett* 96/97: 245-251
41. Baeza-Squiban A, Boisvieux-Ulrich E, Guilianelli C, Houcine O, Geraud G, Guennou C, Marano F (1994) Extracellular matrix-dependent differentiation of rabbit tracheal epithelial cells in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30a (1): 56-67
42. Baeza-Squiban A, Delcher L, Kukreti R, Joly AC, Guennou C, Houcine O, Marano F (2000) Responses of the rabbit tracheal epithelium in vitro to H(2)O(2)-induced oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 14 (2): 159-167
43. Bahadur S, Amatya RC, Kacker SK (1985) The enigma of post-radiation oedema and residual or recurrent carcinoma of the larynx and pyriform fossa. *J Laryngol Otol* 99: 763-765
44. Bairati A, Comazzi M, Gioria M (1996) A comparative study of perichondrial tissue in mammalian cartilages. *Tissue Cell* 28 (4): 455-468
45. Baker DG, Constable WC, Sager H, Kaiser DL (1988) The effect of hyperthermia on radiation induced carcinogenesis. *Radiat. Res.* 115: 448-460
46. Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH (eds) (1979) *The Laboratory Rat. Vol I. Biology and Diseases.* Academic Press, New York
47. Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH (eds) (1980) *The Laboratory Rat. Vol II. Research Applications.* Academic Press, New York
48. Baldetorp B, Baldetorp L (1985) Effect of repeat irradiation on the tracheal ciliary cell activity. *Acta Radiol Oncol* 24 (4): 369-373
49. Baldetorp L, Hakansson CH (1977) Response of ciliated cells during irradiation at different dose rates. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 16 (4): 378-384
50. Ballagh RH, Kudryk KG, Lampe HB, Moriarty B, Mackay A, Burford-Mason AP, Dardick I (1994) The pathobiology of salivary glands. III. PCNA-localization of cycling cells in induced in rat submandibular gland by low-dose-x-radiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 77: 27-35
51. Balm AJ, Hageman PC, Doornewaard MH van, Groeneveld EM, Ivanyi D (1996) Cytokeratin 18 expression in squamous cell carcinoma of the head end neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 253 (4-5): 227-233
52. Bamberg M, Hess CF, Kortmann RD (1996) Zentralnervensystem. In: *Strahlentherapie. Radiologische Onkologie* (Scherer E, Sack H, Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 763-808
53. Bamberg M, Rauhut F, Budach V, Stuschke M (1989) Die Radiotherapie von Hypophysentumoren. *Akt Neurol* 16: 61-64
54. Bao S, Harwood PW, Wood BH, Chrisler WB, Groch KM, Brooks AL (1997) Comparative clastogenic sensitivity of respiratory tract cells to gamma rays. *Radiat Res* 148 (1): 90-97
55. Barcellos-Hoff MH (1998) How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues. *Radiat Res* 150 (5): 109-120
56. Bardos H, Juhasz A, Repassy G, Adany R (1998) Fibrin deposition in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Thromb Haemost* 80: 767-772, 1998
57. Barnes M, Duray P, DeLuca MS, Anderson W, Sindelar W, Kinsella T (1990) Tumor induction following intraoperative radiotherapy: Late results of the National Cancer Institute canine trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19: 651 – 660
58. Barnes M, Pass H, De Luca A, Tochner Z, Potter D, Terrill R, Sindelar WF, Kinsella TJ (1987) Response of the mediastinal and thoracic viscera of the dog to intraoperative radiation therapy (IORT). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13 (3): 371-378
59. Bartel-Friedrich S, Friedrich RE, Lautenschläger C, Holzhausen HJ, Moll R (2000) Dose – response relationships on the expression profile of cytokeratins and vimentin in rat submandibular glands following fractionated irradiation. *Anticancer Research* 20: 4917-4926
60. Bartel-Friedrich S, Friedrich RE, Lautenschläger C, Moll R (1999a) Immunohistochemischer Nachweis von extrazellulären Matrixproteinen in der bestrahlten Unterkieferspeicheldrüse der Ratte. *Laryngo-Rhino-Otol* 78: 500-507
61. Bartel-Friedrich S, Friedrich RE, Moll R, C. Lautenschläger (1999d) Cytokeratin profiles in the irradiated mandibular gland in rats. *Anticancer Res* 19: 2405-2410
62. Bartel-Friedrich S, Friedrich RE, Moll R, Lautenschläger C (1999b) Immunohistochemischer Nachweis von Zytokeratinen in der bestrahlten Unterkieferspeicheldrüse der Wistar-Ratte. *Laryngo-Rhino-Otol* 78: 326-331
63. Bartel-Friedrich S, Friedrich RE, Moll R, Lautenschläger C (1999c) Immunohistochemical detection of extracellular matrix proteins in the irradiated rat mandibular gland. *Anticancer Res* 19: 2779-2784
64. Barth TF, Rinaldi N, Brüderlein S, Mechtersheimer G, Strater J, Altevoigt P, Möller P (2002) Mesothelial cells in suspension expose an enriched integrin repertoire capable of capturing soluble fibronectin and laminin. *Cell Commun Adhes* 9: 1-14
65. Barton MB, Keane TJ, Gadalla T, Maki E (1992) The effect of treatment time and treatment interruption on tumour control following radical radiotherapy of laryngeal cancer. *Radiother Oncol* 23 (3): 137-143
66. Bassett RE, Dardick I, Burford-Mason AP, MacKay A, Burgess K, Gullane PJ (1995) Postirradiated submandibular gland: a potential model to study salivary gland radioprotection and tumorigenesis. *J Otolaryngol* 24: 184-190
67. Baumann M (1995) Impact of endogenous and exogenous factors on radiation sequelae. In: *Late sequelae in oncology* (Dunst J und Sauer R, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3-12
68. Belkoff SM, Haut RC (1992) Microstructurally based model analysis of gamma-irradiated tendon allografts. *J Orthop Res* 10: 461-464
69. Bellon G, Moreau M, Cam YJ, Randoux A, Caulet T, Borel JP, Legros M, Longuebray A (1985) Modifications of collagens in the course of inflammatory tracheal stenoses. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 94 (4/1): 403-408
70. Benali R, Dupuit F, Chevillard M, Jacquot J, Haye B, Puchelle E (1991) Modulations of the epithelial phenotype and functional activity of cultured bovine tracheal gland cells: dependence on the culture medium and passage number. *Biol Cell* 73 (1): 49-56
71. Berghaus A (1987) Verfahren zur Unterfütterung von Stimmlippen. *HNO* 35: 227-233
72. Berghem LE, Johanson KJ (1983) Effect of 137Cs gamma radiation on the fibronectin content in basement membrane of mouse small intestine. *Acta Radiol Oncol* 22 (5): 389-393
73. Bernatchez SF, Parks PJ, Grussing DM, Matalas SL, Nelson GS (1998) Histological characterization of a delayed wound healing model in pig. *Wound Repair Regen* 6 (3): 223-233
74. Berthrong M (1986) Pathological changes secondary to radiation. *World J Surg* 10: 155-170
75. Bielschowsky F (1954) Functional acidophilic tumors of the pituitary of the rat. *Br J Cancer* 8:154-160

76. Biert J, Seifert WF, Verhofstad AA, Wobbes T, de Man BM, Hoogenhout J, Hendriks T (1998) A semiquantitative histological analysis of repair of anastomoses in the rat colon after combined preoperative irradiation and local hyperthermia. *Radiat Res* 149 (4): 372-377
77. Bloching (2001) Abschätzung des relativen Tumorerkrankungsrisikos im oberen Aerodigestivtrakt durch kanzerogenitätsassoziierte Biomarker. Habilitationsschrift, Univ. Halle
78. Bloom GD, Carlsoo B, Gustafsson H (1976) An electron microscopic study on the autonomic innervation of the rabbit parotid gland. *Experientia* 32(9): 1190-1191
79. Bloom GD, Carlsoo B, Gustafsson H (1977) Intra-acinar nerve terminals in four rodent parotid glands. *Acta Anat (Basel)* 97(3): 291-299
80. Bodner L, Kuyatt BL, Hand AR, Baum BJ (1984) Rat parotid cell function in vitro following x-irradiation in vivo. *Radiat Res* 97: 386-395
81. Böhme G (1997) Stimmfunktion nach Röntgentherapie. In: Sprach-, Sprech-, Stimm- und Schluckstörungen, Band 1: Klinik (Böhme G, Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, 191
82. Boivin JF, Hutchison GB, Zauber AG, Bernstein L, Davis FG, Michel RP, Zanke B, Tan CT, Fuller LM, Mauch P et al. (1995) Incidence of second cancers in patients treated for Hodgkin's disease (see comments). *J Natl Cancer Inst* 87 (10): 732-741
83. Boland S, Boisveux-Ulrich E, Houcine O, Baeza-Squiban A, Pouchelet M, Schoevaert D, Marano F (1996) TGF beta 1 promotes actin cytoskeleton reorganization and migratory phenotype in epithelial tracheal cells in primary culture. *J Cell Sci* 109: 2207-2219
84. Bootz F (2000) Onkologie des Kopf-Hals-Bereiches. Konsensusbericht. *HNO Informationen* 4: 241-357
85. Born IA, Schwachheimer K, Maier H, Otto HF (1987) Cytokeratin expression in normal salivary glands and in cystadenolymphomas demonstrated by monoclonal antibodies against selective cytokeratin polypeptides. *Virchows Arch A* 411: 583-589
86. Bottoni U, Innocenzi D, Mannoaranparampil TJ, Richetta A, Del Giudice M, Calvieri S (2001) Inflammatory cutaneous metastasis from laryngeal carcinoma. *Eur J Dermatol* 11 (2): 124-126
87. Bousson V, Marsot-Dupuch K, Lashiver X, Tubiana JM (1995) Post-radiation necrosis of the cricoid cartilage: an uncommon case. *J Radiol* 76 (8): 517-520
88. Boyle P, Macfarlane GJ, Blot WJ, Ciesia F, Lefebvre JL, Azul AM, Devries N, Scully C (1995) European School of Oncology advisory report to the European Commission for the Europe Against Cancer Programm – oral carcinogenesis in Europe. *Euro J Cancer B Oral Oncol* 31B: 75-85
89. Brandenburg JH, Condon KG, Frank TW (1986) Coronal sections of larynges from radiation-therapy failures: a clinical-pathologic study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 95 (2): 213-218
90. Brauer R, Rappaport R (1989) Endocrine complications caused by cranial irradiation. *Ann Pediatr Paris* 36 (7): 419-424
91. Broerse JJ (1989) Influence of physical factors on radiation carcinogenesis in experimental animals. In: Low dose radiation: Biological bases of risk assessment (Baverstock KF & Stather JW, Eds.), Taylor & Francis, London, New York, Philadelphia, 181-194
92. Brooks AL, Bao S, Harwood PW, Wood BH, Chrisler WB, Khan MA, Gies RA, Cross FT (1997) Induction of micronuclei in respiratory tract following radon inhalation. *Int J Radiat Biol* 72 (5): 485-495
93. Brooks AL, Khan MA, Jostes RF, Cross FT (1993) Metaphase chromosome aberrations as markers of radiation exposure and dose. *J Toxicol Environ Health* 40 (2-3): 277-288
94. Bücheler M, Wirz C, Schutz A, Bootz F (2002) Tissue engineering of human salivary gland organoids. *Acta Otolaryngol* 122: 541-545
95. Budach W (1998) Neue Erkenntnisse über Spätfolgen der Radio-Chemotherapie. *HNO* 46: 708-711
96. Burek JD, Hollander CF (1977) Incidence patterns of spontaneous tumors in BN/BI rats. *J Natl Cancer Inst* 58: 99-105
97. Burford-Mason AP, Cummins MM, Brown DH, MacKay AJ, Dardick I (1993) Immunohistochemical analysis of the proliferative capacity of duct and acinar cells during ligation-induced atrophy and subsequent regeneration of rat parotid gland. *J Oral Pathol Med* 22: 440-446
98. Burger A, Löffler H, Bamberg M, Rodemann HP (1998) Molecular and cellular basis of radiation fibrosis. *Int J Radiat Biol* 73(4): 401-408
99. Burgess KI, Dardick I, Cummings MM, Burford-Mason AP, Bassett R, Brown DH (1996) Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 82: 674-680
100. Burkhardt A (1999) Sogenannte radiogene Tumoren. In: *HNO-Pathologie* (Seifert G, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 931-939
101. Burkhardt A, Meyer-Breiting E (1999) In: *HNO-Pathologie* (Seifert G, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 605-610, 702-710, 881-893
102. Burman C, Kutcher GJ, Emami B, Goitein M (1991) Fitting of normal tissue tolerance data to an analytic function. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21: 123-135
103. Bussttil A (1977) Irradiation - induced changes in human salivary glands. *Clin Otolaryngol* 2: 199-206
104. Buttner C, Skupin A, Reimann T, Rieber EP, Unteregger G, Geyer P, Frank KH (1997) Local production of interleukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of interleukin-4. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17 (3): 315-325
105. Calcaterra TC, Stern F, Ward PH (1972) Dilemma of delayed radiation injury of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 81: 501-507
106. Canney PA, Dean S (1990) Transforming growth factor-beta: a promoter of late connective tissue injury following radiotherapy? *Br J Radiol* 63: 620-623
107. Capizzi RL, Oster W (2000) Chemoprotective and radioprotective effects of amifostine: an update of clinical trials. *Int J Hematol* 72(4): 425-435
108. Cardesa A, Nadal A, Jares P, Malloffe C, Fernandez PL, Campo E, Traserra J (1997) Hyperplastic lesions of the larynx. Experience of the Barcelona group. *Acta Otolaryngol* 527: 43-46
109. Carlevato MT, Trusolino L, Serini G, Valente G, Orlandi F, Angeli A, Cortesina G, Marchisio PC (1996) Differential integrin expression in thyroid and laryngeal carcinomas. *Anticancer Res* 16 (4): 2379-2384
110. Casarett GW (1980) Major digestive and endocrine glands. In: *Radiation histopathology*. CRC, Boca Raton
111. Caselitz J, Becker J, Seifert G, Weber K, Osborn M (1984) Coexpression of keratin and vimentin filaments in adenoid-cystic carcinomas of the salivary glands. *Virch. Arch. A Pathol. Anat.* 403: 337-344
112. Caselitz J, Osborn M, Hamper K, Wustrow J, Rauchfuss A, Weber K (1986c) Pleomorphic adenomas, adenoid cystic carcinomas and adenolymphomas of salivary glands analysed by a monoclonal antibody against myoepithelial/basal cells. An immunohistochemical study. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 409(6): 805-816
113. Caselitz J, Schmitt P, Seifert G, Wustrow J, Schuppan D (1988) Basal membrane associated substances in human salivary glands and salivary gland tumours. *Pathol Res Pract* 183(4): 386-394

114. Caselitz J, Schulze I, Seifert G (1986a) Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: An immunohistochemical study. *J Oral Pathol* 15: 308–318
115. Caselitz J, Walther B, Wustrow J, Seifert G, Weber K, Osborn M (1986b) A monoclonal antibody that detects myoepithelial cells in exocrine glands, basal cells in other epithelia and basal and suprabasal cells in certain hyperplastic tissues. *Virch Arch A Pathol Anat* 409: 725–738
116. Chan JK, Suster S, Wenig BM, Tsang WY, Chan JB, Lau AL (1997) Cytokeratin 20 immunoreactivity distinguishes Merkel cell (primary cutaneous neuroendocrine) carcinomas and salivary gland small cell carcinomas from small cell carcinomas of various sites. *Am J Surg Pathol* 21 (2): 226-234
117. Chandler J (1979) Radiation fibrosis and necrosis of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 98: 509-514
118. Chandra M, Frith CF (1992) Spontaneous neoplasms in aged control Fischer 344 rats. *Cancer Lett* 62: 49-56
119. Chandra M, Riley MG, Johnson DE (1992) Spontaneous neoplasms in aged Sprague-Dawley rats. *Arch Toxicol* 66: 496-502
120. Chang LY, Wu R, Nettesheim P (1985) Morphological changes in rat tracheal cells during the adaptive and early growth phase in primary cell culture. *J Cell Sci* 74: 283-301
121. Chang P, Sapozink MD, Günberg SM, Jozsef G, Rice DM, Formenti SC, Streeter OE Jr (2000) Unresectable primary and recurrent head and neck tumors: effect of hyperthermia and carboplatin-preliminary experience. *Radiology* 214: 688-692
122. Chao KS (2002) Protection of salivary function by intensity-modulated radiation therapy in patients with head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol (Suppl 1)*: 20-25
123. Chen AY und Myers JN (2000) Cancer of the oral cavity. *Curr Probl Surg* 37: 635-731
124. Chen ES, Greenlee BM, Wills-Karp M, Moller DR (2001) Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon-gamma-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24 (5): 545-555
125. Chen SY (1976) Adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. Histchemical and electron microscopic studies of cystlike spaces. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 42: 606-619
126. Cheng J, Irie T, Munakata R, Kimura S, Nakamura H, He RG, Lui AR, Saku T (1995) Biosynthesis of basement membrane molecules by salivary adenoid cystic carcinoma cells: an immunofluorescence and confocal microscopic study. *Virch Arch* 426(6): 577-586
127. Cheng J, Saku T, Okabe H, Furthmayr H (1992) Basement membranes in adenoid-cystic carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* 69: 2631–2640
128. Cherry CP, Glucksmann A (1959) Injury and repair following irradiation of salivary glands in male rats. *Br J Radiol* 32: 596-608
129. Chetty A, Davis P, Infeld M (1995) Effect of elastase on the directional migration of lung fibroblasts within a three-dimensional collagen matrix. *Exp Lung Res* 21: 889-99
130. Cheung DT, Perelman N, Tong D, Nimni ME (1990) The effect of gamma-irradiation on collagen molecules, isolated alpha-chains, and cross-linked native fibers. *J Biomed Mater Res* 24: 581-589
131. Chiang CH, Gabella G (1986) Quantitative study of the ganglion neurons of the mouse trachea. *Cell Tissue Res* 246 (2): 243-252
132. Chomette G, Auriol M, Vaillant J, Bertrand J, Chenal C (1981) Effects of irradiation on the submandibular gland of the rat. An enzyme histochemical and ultra structural study. *Virch Arch A Pathol Anat* 391: 291-299
133. Chouinard N, Therrien JP, Mitchell DL, Robert M, Drouin R, Rouabhia M (2001) Repeated exposures of human skin equivalent to low doses of ultraviolet-B radiation lead to changes in cellular functions and accumulation of cyclobutane pyrimidine dimers. *Biochem-Cell-Biol* 79(4): 507-515
134. Chu HW, Halliday JL, Martin RJ, Leung DY, Szefer SJ, Wezel SE (1998) Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1936-1944
135. Clark AB, Randall SH, Nettesheim P, Gray TE, Bagnell B, Ostrowski LE (1995) Regulation of ciliated cell differentiation in cultures of rat epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 329-338
136. Clarke SD, Woo SY, Butler EB, (1993) Treatment of secretory pituitary adenoma with radiation therapy. *Radiology* 188: 759-763
137. Cohen EP, Bonsib SA, Whitehouse E, Hopewell JW, Robbins ME (2000) Mediators and mechanisms of radiation nephropathy. *Proc Soc Exp Biol Med* 223 (2): 218-225
138. Cohen EP, Molteni A, Hill P, Fish BL, Ward WF, Moulder JE, Carone FA (1996) Captopril preserves function and ultrastructure in experimental radiation nephropathy. *Lab Invest* 75 (3): 349-360
139. Cohen SR, Cheung DT, Nimni ME, Mahnovski V, Lian G, Perelman N, Carranza AP (1992) Collagen in the developing larynx. Preliminary study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101 (4): 328-332
140. Cohen SR, Perelman N, Mahnovski V, Nimni ME, Cheung DT (1993) Whole organ evaluation of collagen in the developing human larynx and adjoining anatomic structures (hyoid and trachea). *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102 (9): 655-659
141. Cohn LA, Kinnula VL, Adler KB (1994) Antioxidant properties of guinea pig tracheal epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 266: L397-404, 1994
142. Collins JF (1982) Collagen accumulation in the major structures of the rabbit lung during postnatal development. *Exp Lung Res* 4 (1): 29-36
143. Coppes RP, Vissink A, Konings AW (2002) Comparison of radiosensitivity of rat parotid and submandibular glands after different radiation schedules. *Radiother Oncol* 63(3): 321-328
144. Coppes RP, Zeilstra LJ, Vissink A, Konings AW (1997) Sialogogue-related radioprotection of salivary gland function: the degranulation concept revisited. *Radiat Res* 148: 240-247
145. Cornelissen M, Thierens H, De Ridder L (1996) Effects of ionizing radiation on cartilage: emphasis on effects on the extracellular matrix. *Scanning Microsc* 10 (3): 833-840
146. Cortesina G, Bussi M, Carlevato MT, Ferro S, Panizzut B, Cavalot AL, Gervasio CF, Marchisio PC (1996) Significance of adhesion molecules as biological prognostic factor in locally advanced laryngeal squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol* 116 (2): 350-352
147. Costes S, Streuli CH, Barcellos-Hoff MH (2000) Quantitative image analysis of laminin immunoreactivity in skin basement membrane irradiated with 1 GeV/nucleon iron particles. *Radiat Res* 154 (4): 389-397
148. Courey MS (2001) Homologous collagen substances for vocal fold augmentation. *Laryngoscope* 111 (5): 747-758
149. Courey MS, Shohet JA, Scott MA, Ossoff RH (1996) Immunohistochemical characterization of benign laryngeal lesions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 105 (7): 525-531
150. Coutts A, Chen G, Stephens N, Hirst S, Douglas D, Eichholtz T, Khalil N (2001) Release of biologically active TGF-beta from airway smooth muscle cells induces autocrine synthesis of collagen. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280 (5): 999-1008
151. Crain RC (1958) Spontaneous tumors in the Rochester strain of the Wistar rat. *Am J Pathol* 34: 311-323
152. Croll GA, Gerritsen GJ, Tiwari RM, Snow GB (1989) Primary radiotherapy with surgery in reserve for advanced laryngeal carcinoma. Results and complications. *Eur J Surg Oncol* 15 (4): 350-356
153. Crouch E (1990) Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 259 (4): 159-184
154. Dagli AS, Mahieu HF, Festen JM (1997) Quantitative analysis of voice quality in early glottic laryngeal carcinomas treated with radiotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254: 78-80

155. Dahllof G, Bagesund M, Remberger M, Ringden O (1997) Risk factors for salivary dysfunction in children 1 year after bone marrow transplantation. *Oral Oncol* 33: 327-331
156. Dalmau SR, Freitas CS, Savino W (1999) Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. *Blood* 93 (3): 974-990
157. Danielsson M, Engfeldt B, Larsson B, Naeslund C, Naeslund J (1971) Effects of therapeutic proton doses on healthy organs in the neck, chest and upper abdomen of the rabbit. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 10: 215-224
158. D'Ardenne AJ (1989) Use of basement membrane marker in tumor diagnosis. *J. Clin Pathol* 42: 449-457
159. D'Ardenne AJ, Burns J, Sykes BC, Bennett MK (1983) Fibronectin and type III collagen in epithelial neoplasms of gastrointestinal tract and salivary gland. *J Clin Pathol* 36(7): 756-63
160. Dardick I, Cavell S, Boivin M, Hoppe D, Parks WR, Stinson J, Yamada S, Burns BF (1989) Salivary gland myoepithelioma variants. Histological, ultrastructural, and immunocytological features. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 416(1): 25-42
161. Dardick I, Cummins M, Burford-Mason AP, MacKay AJ (1993a) Proliferation in regenerating rat parotid: relevance to theories of tumor induction. *Lab Invest* 68: 80A/ 458
162. Dardick I, Dardick AM, MacKay AJ, Pastolero GC, Gullane PJ, Burford-Mason AP (1993b) Pathobiology of salivary glands. IV. Histogenetic concepts and cycling cells in human parotid and submandibular glands cultured in floating collagen gels. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 76: 307-318
163. Dardick I, Jeans MT, Sinnott NM, Wittkuhn JF, Kahn HJ, Bauml R (1985) Salivary gland components involved in the formation of squamous metaplasia. *Am J Pathol* 119(1): 33-43
164. Dardick I, Parks WR, Little J, Brown DL (1988b) Characterization of cytoskeletal proteins in basal cells of human parotid salivary gland ducts. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 412(6): 525-532
165. Dardick I, Rippstein P, Skimming L, Boivin M, Parks WR, Dairkee SH (1987) Immunohistochemistry and ultrastructure of myoepithelium and modified myoepithelium of the ducts of human major salivary glands: histogenetic implications for salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 64(6): 703-715
166. Dardick I, Stratis M, Parks WR, DeNardi FG, Kahn HJ (1991) S-100 protein antibodies do not label normal salivary gland myoepithelium. Histogenetic implications for salivary gland tumors. *Am J Pathol* 138(3): 619-628
167. Dumas-Duport C, Blond S, Vedrenne CI, Szikla G (1984) Radiolesion versus recurrence: bioptic data in 39 gliomas after interstitial, or combined interstitial and external radiation treatment. *Acta Neurochirurgica Suppl.* 33: 291-299
168. Davenport EA, Nettesheim P (1996a) Regulation of mucociliary differentiation of rat tracheal epithelial cells by type I collagen gel substratum. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14 (1): 19-26
169. Davenport EA, Nettesheim P (1996b) Type I collagen gel modulates extracellular matrix synthesis and deposition by tracheal epithelial cells. *Exp Cell Res* 223: 155-62
170. Davidson DJ, Kilanowski FM, Randell SH, Sheppard DN, Dorin JR (2000) A primary culture model of differentiated murine tracheal epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279 (4): 766-778
171. De Deyne P, Haut RC (1991) Some effects of gamma irradiation on patellar tendon allografts. *Connect Tissue Res* 27 (1): 51-62
172. Debbage PL, Seidl S, Kreczy A, Hutzler P, Pavelka M, Lukas P (2000) Vascular permeability and hyperpermeability in a murine adenocarcinoma after fractionated radiotherapy: an ultrastructural tracer study. *Histochem Cell Biol* 114 (4): 259-275
173. Deitmer T (1986) Der Einfluß der Strahlentherapie auf die Funktion des Flimmerepithels im Kehlkopf. *Laryngol Rhinol Otol* 65: 513-515
174. Dejaeger E, Goethals P (1995) Deglutition disorder as a late sequel of radiotherapy for a pharyngeal tumor. *Am J Gastroenterol* 90: 493-495
175. Delongas JL, Leheup BP, Gelly JL, Grignon G (1987) Ultrastructural study of epithelial cells and basement membrane. Differentiation of the rat epididymis after prenatal irradiation. *Biol Cell* 59 (2): 153-160
176. Delporte C, O'Connell BC, He X, Lancaster HE, O'Connell AC, Agre B, Baum BJ (1997) Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 c-DNA to irradiated rat salivary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3268-3273
177. Denham JW, Peters LJ, Johansen J, Poulsen M, Lamb DS, Hindley A, O'Brien PC, Spry NA, Penniment M, Krawitz H, Williamson S, Bear J, Tripcony L (1999) Do acute mucosal reactions lead to consequential late reactions in patients with head and neck cancer? *Radiother Oncol* 52 (2): 157-164
178. Denning MF, Verma AK (1994) The mechanism of the inhibition of squamous differentiation of rat tracheal 2C5 cells by retinoic acid. *Carcinogenesis* 15 (3): 503-507
179. Dens F, Boogaerts M, Boute P, Declercq D, Demuyneck H, Vinckier F, Belgium B (1996) Caries-related salivary microorganisms and salivary flow rate in bone marrow recipients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 81: 38-43
180. Deore SM, Supe SJ, Sharma V, Dinshaw KA (1991) Importance of dose per fraction and estimation of an alpha/beta value for the late complications of the vocal cord. *Strahlenther Oncol* 167: 608-611
181. Dickman PS, Nussbaum E, Finkelstein JZ (1989) Arteriotracheal fistula in patients treated for lymphoma. *Pediatr Pathol* 9 (3): 329-336
182. Dietz A, Nollert J, Maier H, Rudat V, Flentje M (1995) Zur Problematik der radiogenen bzw. chemotherapieinduzierten Mukositis der Mund- und Rachen Schleimhaut am Beispiel der akzelerierten Radiochemotherapie mit Carboplatin bei Patienten mit inoperablen Plattenepithelkarzinomen des Kopf/Halsbereiches. *HNO* 43: 403-413
183. Dietz A, Rudert V, Nollert J, Helbig M, Vanselow B (1998) Das chronische Larynxödem als Spätreaktion nach Radio-Chemotherapie. *HNO* 46: 731-738
184. Dimitrijevic-Bussod M, Balzaretto-Maggi VS, Gadbois DM (1999) Extracellular matrix and radiation G1 cell cycle arrest in human fibroblasts. *Cancer Res* 59 (19): 4843-4847
185. Ding H, Gray SD (2001) Senescent expression of genes coding collagens, collagen-degrading metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in rat vocal folds: comparison with skin and lungs. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56: 145-152
186. Dinges S, Budach V, Stuschke M, Budach W, Boehmer D, Schrader M, Jahnke K, Sack H (1997) Chemo-radiotherapy for locally advanced head and neck cancer—long term results of a phase II trial. *Eur J Cancer* 33: 1152-1155
187. Dobros W, Farmer ER, Price JC (1995) The assessment of basement membrane in cancer of the floor of the mouth and larynx. *Otolaryngol Pol* 49 (4): 298-306
188. Donath K, Hirsch-Hoffmann HU, Seifert G (1973) Zur Pathogenese der Parotisatrophie nach experimenteller Gangunterbindung. Ultrastrukturelle Befunde am Drüsenparenchym der Rattenparotis. *Virchows Arch A Pathol Anat* 359: 31-48
189. Donnelly MJ, O'Meara N, O'Dwyer TP (1995) Thyroid dysfunction following combined therapy for laryngeal carcinoma. *Clin Otolaryngol* 20 (3): 254-257
190. Dörr W, Trott KR (2000) Strahlenbiologie der Normalgewebe. In: Nebenwirkungen in der Radioonkologie (Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Hrsg.), Urban & Vogel Verlag, München, 9-23
191. Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH (2000) Nebenwirkungen in der Radioonkologie. Urban und Vogel Verlag, München

192. Draeger A, Nathrath WB, Lane EB, Sundstrom BE, Stigbrand TI (1991) Cytokeratins, smooth muscle actin and vimentin in human normal salivary gland and pleomorphic adenomas. *Immunohistochemical studies with particular reference to myoepithelial and basal cells*. *APMIS* 99(5): 405-415
193. Dreyer JO, Sakuma Y, Seifert G (1989) Die Strahlen-Sialadenitis. *Stadieneinteilung und Immunhistologie*. *Pathologie* 10: 165-170
194. Dubrovskaja VF (1991) Dynamics of structural parameters of mast cells and accumulation of collagen fibers during radiation-induced pneumosclerosis in rats. *Radiobiologia* 31: 485-490
195. Duncan W, MacDougall RH, Kerr GR, Downing D (1996) Adverse effect of treatment gaps in the outcome of radiotherapy for laryngeal cancer. *Radiother Oncol* 41 (3): 203-207
196. Dyess CL, Carter D, Kirchner JA, Baron RE (1987) A morphometric comparison of the changes in the laryngeal skeleton associated with invasion by tumor and by external-beam radiation. *Cancer* 59 (6): 1117-1122
197. Edmondson SW, Mossman BT (1991) Alterations in keratin expression in hamster tracheal epithelial cells exposed to benzo(a)pyrene. *Carcinogenesis* 12: 679-684
198. Ehrhart EJ, Gillette EL, Barcellos-Hoff MH (1996) Immunohistochemical evidence of rapid extracellular matrix remodeling after iron-particle irradiation of mouse mammary gland. *Radiat Res* 145 (2): 157-164
199. Ehrhart EJ, Segarini P, Tsang ML, Carroll AG, Barcellos-Hoff MH (1997) Latent transforming growth factor beta 1 activation in situ: quantitative and functional evidence after low-dose gamma-irradiation. *FASEB J* 11(12): 991-1002
200. Eiben R, Bomhard EM (1999) Trends in mortality, body weights and tumor incidences of Wistar rats over 20 years. *Exp Toxic Pathol* 51: 523-536
201. Eifel PJ, Sampson CM, Tucker SL (1990) Radiation fractionation sensitivity of epiphyseal cartilage in a weanling rat model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19 (3): 661-664
202. Eisbruch A, Dawson LA, Kim HM, Bradford CR, Terrell JE, Chepeha DB, Teknos TN, Anzai Y, Marsh LH, Martel MK, Ten-Haken RK, Wolf GT, Ship JA (1999) Conformal and intensity modulated irradiation of head and neck cancer: the potential for improved target irradiation, salivary gland function, and quality of life. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 53(3): 271-275
203. Eisbruch A, Kim HM, Terrell JE, Dawson LA, Ship JA (2001) Xerostomia and its predictors following parotid-sparing irradiation of head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50(3): 695-704
204. Eisbruch A, Marsh HL, Martel MK, Ship JA, Ten-Haken R, Pu AT, Fraass BA, Lichter AS (1998) Comprehensive irradiation of head and neck cancer using conformal multisegmental fields: Assessment of target coverage and noninvolved tissue sparing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 41: 559-568
205. Eisbruch A, Ship JA, Martel MK, Ten-Haken R, Marsch LH, Wolf GT, Esclamado RM, Bradford CR, Terrell JE, Gebarski SS, Lichter AS (1996) Parotid gland sparing in patients undergoing bilateral head and neck irradiation: techniques and early results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36: 469-480
206. Eisbruch A, Ten-Haken RK, Kim HM, Marsh LH, Ship JA (2000) Dose, volume, and function relationships in parotid salivary glands following conformal and intensity-modulated irradiation of head and neck cancer. *Int J Oncol Biol Phys* 47: 1458-1460
207. Eissa S, Shoman S (1998) *Handbook of tumor markers*. Chapman & Hall, London
208. Ekblom P, Miettinen M, Rapola J, Foidart JM (1984) Demonstration of laminin, a basement membrane glycoprotein, in routinely processed formalin-fixed human tissue. *Histochemistry* 75: 301-307
209. El Mofty S, Kahn A (1981) Early membrane injury in lethally irradiated salivary gland cells. *Int J Radiat Biol* 39: 55-62
210. El-Nabout R, Martin M, Remy J, Kern P, Robert L, Lafuma C (1989) Collagen synthesis and deposition in cultured fibroblasts from subcutaneous radiation-induced fibrosis. Modification as a function of cell aging. *Matrix* 9: 411-420
211. Emmelin N, Garret JR, Ohlin P (1974) Secretory activity and the myoepithelial cells of salivary glands after duct ligation in cats. *Arch Oral Biol* 19: 275-283
212. Engelmann G, Leutert G (1989) Zu Altersveränderungen der Cartilago arytaenoidea. *Z Mikrosk Anat Forsch* 103: 597-619
213. Epperly MW, Bray JA, Krager S, Berry LM, Gooding W, Engelhardt JF, Zwacka R, Travis EL, Greenberger JS (1999) Intratracheal injection of adenovirus containing the the human MnSOD transgene protects athymic nude mice from irradiation-induced organizing alveolitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43: 169-181
214. Epstein JB, Robertson M, Emerton S, Phillips N, Stevenson-Moore P (2001) Quality of life and oral function in patients treated with radiation therapy for head and neck cancer. *Head Neck* 23(5): 389-398
215. Epstein JH (1972) Examination of the carcinogenic and cocarcinogenic effects of Grenz radiation. *Cancer Res.* 32: 2625-2629
216. Eriksson B, Johnson L, Lundqvist PG (1983) Ultrastructural aspects of capillary function in irradiated bowel. An experimental study in the cat. *Scand J Gastroenterol* 15 (4): 473-480
217. Erjefält JS, Erjefält I, Sundler F, Persson CG (1994) Microcirculation-derived factors in airway epithelial repair in vivo. *Microvasc Res* 48: 161-78, 1994
218. Espinal EG, Rey BM, Cabrini CRL (1983) Radiation effects on submandibular gland of the rat. A stereological and ultrastructural study. *Strahlentherapie* 159: 290-295
219. Espinal EG, Ubios AM, Cabrini CR (1984) Salivary gland tumors induced by ³²P. *J. Oral. Pathol.* 13: 686-691
220. Espinoza CG, Azar HA (1982) Immunohistochemical localization of keratin-type proteins in epithelial neoplasms. Correlation with electron microscopic findings. *Am J Clin Pathol* 78: 500-507
221. Evans MJ, Cox RA, Zhu Q, Burke AS, Moller PC (1993) Organization of cytokeratin intermediate filaments in basal cells of growing rat trachea. *Tissue Cell* 25 (2): 159-164
222. Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Toskala E, Luck EC, Sannes PL, Plopper CG (2000) Three-dimensional organisation of the lamina reticularis in the rat tracheal basement membrane zone. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 393-397
223. Ewald H (1996) *Strahlentherapie bei HNO-Tumoren und Lymphödemrisiko*. *Z Lymphol* 20: 21-26
224. Eyre DR, Muir H (1975) The distribution of different molecular species of collagen in fibrous, elastic and hyaline cartilages of the pig. *Biochem J* 151: 595-602
225. Fajardo LF (1982) *Pathology of irradiation injury*. In: *Masson Monographs in Diagnostic Pathology* (Vol. 6), Masson Publishing Inc., New York (distributed by Year Book Medical Publishers, Chicago)
226. Fajardo LF, Berthrong M (1978) Radiation injury in surgical pathology. Part I. *Am J Surg Pathol* 2: 159-199
227. Fajardo LF, Berthrong M (1981) Radiation injury in surgical pathology. Part III. Salivary glands, pancreas and skin. *Am J Surg Pathol* 5: 279-296
228. Fajardo LF, Berthrong M (1988) Vascular lesions following radiation. *Pathol Ann* 23: 297-330
229. Farber E (1994) Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol* 7: 605-609
230. Fatemi SH, Antosh M, Cullan GM, Sharp JG (1985) Late ultrastructural effects of heavy ions and gamma irradiation in the gastrointestinal tract of the mouse. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 48 (4): 325-340
231. Fein DA, Mendenhall WM, Parsons JT, Million RR (1993) T1 – T2 squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiotherapy: a multivariate analysis of variables potentially influencing local control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 25 (4): 605-611

232. Fine A, Goldstein RH (1991) Mechanisms of transforming growth factor-beta-induced collagen formation by human lung fibroblasts. *Chest* 99 (3): 84
233. Fine A, Goldstein RH, Snider GL (1991) Animal models of pulmonary fibrosis. In: *The lung* (Crystal RG, West JB, Eds.), Raven Press, New York, 2047-2057
234. Fine A, Poliks CF, Smith BD, Goldstein RH (1990) The accumulation of type I collagen mRNAs in human embryonic lung fibroblasts stimulated by transforming growth factor-beta. *Connect Tissue Res* 24 (3-4): 237-247
235. Finizia C, Dotevall H, Lundstrom E, Lindstrom J (1999) Acoustic and perceptual evaluation of voice and speech quality: a study of patients with laryngeal cancer treated with laryngectomy vs irradiation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125 (2): 157-163
236. Finizia C, Hammerlid E, Westin T, Lindstrom J (1998) Quality of life and voice in patients with laryngeal carcinoma: a post-treatment comparison of laryngectomy (salvage surgery versus radiotherapy). *Laryngoscope* 108 (10): 1566-1573
237. Fitzgerald JE, Schardein JL, Kaump DH (1971) Several uncommon pituitary tumors in the rat. *Lab Anim Sci* 21: 581-584
238. Fitzgerald PJ, Koch RJ (1999) Delayed radionecrosis of the larynx. *Am J Otolaryngol* 20: 245-249
239. Flentje M, Wannenmacher M (1991) Radiotherapy of laryngeal cancer. *Radiologe* 31 (7): 332-338
240. Flood LM, Brightwell AP (1984) Clinical assessment of the irradiated larynx. Salvage laryngectomy in the absence of histological confirmation of residual or recurrent carcinoma. *J Laryngol Otol* 98: 493-498
241. Followill DS, Travis EL (1995) Differential expression of collagen types I and III in consequential and primary fibrosis in irradiated mouse colon. *Radiat Res* 144 (3): 318-328
242. Foote RL, Olsen KD, Kunselman SJ, Schaid DJ, Buskirk SJ, Grado GL, Earle JD (1992) Early-stage squamous cell carcinoma of the glottic larynx managed with radiation therapy. *Mayo Clin Proc* 67: 629-636
243. Ford CN, Gilchrist KW, Bartell TE (1987) Persistence of injectable collagen in the human larynx: a histopathologic study. *Laryngoscope* 97: 724-727
244. Ford CN, Martin DW, Warner TF (1984) Injectable collagen in laryngeal rehabilitation. *Laryngoscope* 94: 513-518
245. Forsgren S, Franzen L, Funegard U, Gustafsson H, Henriksson R (1992) Bilateral irradiation of head and neck induces an enhanced expression of substance P in the parasympathetic innervation of the submandibular gland. *Neuroscience* 46(1): 233-240
246. Forsgren S, Franzen L, Liang Y, Gustafsson H, Hendriksson R (1994) Effects of irradiation on neuropeptide expression in rat salivary gland and spinal cord. *Histochem J.* 26: 630-640
247. Fournier C, Scholz M, Weyrather WK, Rodemann HP, Kraft G (2001) Changes of fibrosis-related parameters after high- and low-LET irradiation of fibroblasts. *Int J Radiat Biol* 77 (6): 713-722
248. Fox PC (1998) Acquired salivary dysfunction. *Drugs and radiation.* *Ann NY Acad Sci* 842: 132-137
249. Franke WW, Schiller DL, Moll R, Winter S, Schmid E, Engelbrecht E, Denk H, Krepler B, Platzer B (1981) Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J Mol Biol* 153: 933-959
250. Franke WW, Schmid E, Schiller DL, Winter S, Jarasch ED, Moll R, Denk H, Jackson BW, Illmensee K (1982) Differentiation patterns of expression of proteins of intermediate sized filaments in tissues and cultured cells. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 46: 431-435
251. Franzen L, Funegard U, Sundstrom S, Gustafsson H, Danielsson A, Henriksson R (1991) Fractionated irradiation and early changes in salivary glands. Different effects on potassium efflux, exocytotic amylase release and gland morphology. *Lab Invest* 64(2): 279-283
252. Franzén L, Gustafsson H, Sundström S, Karlsson M, Littbrand B, Henriksson R (1993) Fractionated irradiation and late changes in rat parotid gland: effects on the number of acinar cells, potassium efflux, and amylase secretion. *Int J Radiat Biol* 64: 93-101
253. Freyer AM, Johnson SR, Hall IP (2001) Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25 (5): 569-576
254. Fried MP (1985) The effects of radiation therapy in microvascular anastomoses. *Laryngoscope* 37 (Suppl): 1-31
255. Friedrich G, Kainz J, Freidl W (1993) Zur funktionalen Struktur der menschlichen Stimmlippe. *Laryngorhinootologie* 72 (5): 215-224
256. Friedrich RE (2000) Experimentelle mikrovaskuläre Anastomosen an vorgeschädigten Arterien. Quintessenz Verlag, Berlin
257. Friedrich RE, Krüll A, Hellner D, Schwarz R, Heyer D, Plambeck K, Schmelzle R (1995) Interstitial High-Dose-Rate (HDR) Brachytherapy with iridium-192 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Cranio Max Fac Surg* 23: 238-242
258. Frontczak-Baniewicz M (2001) Focal ischemia in the cerebral cortex has an effect on the neurohypophysis. I. Ultrastructural changes in capillary vessels of the neurohypophysis after focal ischemia of the cerebral cortex. *Neuroendocrinol Lett* 22 (2): 81-86
259. Fu KK, Pajak TF, Marcial VA, Ortít HG, Rozman M, Asbell SO, Coia LR, Vora NL, Byhardt R, Rubin P (1995) Late effects of hyperfractionated radiotherapy for advanced head and neck cancer: long-term follow-up results of RTOG 83-13. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32: 577-588
260. Fu KK, Woodhouse RJ, Quivey JM, Phillips TL, Dedo HH (1982) The significance of laryngeal edema following radiotherapy of carcinoma of the vocal cord. *Cancer* 49: 655-658
261. Fujisato T, Tomihata K, Tabata Y, Iwamoto Y, Burczak K, Ikada Y (1999) Cross-linking of amniotic membranes. *J Biomater Sci Polym Ed* 10: 1171-1181
262. Fujita J, Bando S, Ohtsuki Y, Dobashi N, Hiroi M, Takeuchi T, Fukunaga Y, Miyaue H, Onishi S, Ispida T, Takahara J (2000) The role of anti-epithelial cell antibodies in the pathogenesis of bilateral radiation pneumonitis caused by unilateral thoracic irradiation. *Respir Med* 94 (9): 875-880
263. Funegard U, Franzen L, Erikson T, Hendrikson R (1994) Parotid saliva composition during and after irradiation of head and neck cancer. *Oral Oncol Eur J Cancer* 30 B: 230-233
264. Funegard U, Johansson I, Franzen L, Ericson T (1991) Acute radiation effects on saliva composition in rats with different vitamin A levels in serum. *Acta Oncol* 30: 975-980
265. Funegard U, Johansson I, Franzen L, Ericson T, Nystrom H, Hendriksson R (1997) Rat salivary gland function after fractionated irradiation. *Acta Oncol* 36: 191-198
266. Funkhouser JD, Cheshire LB, Ferrara RB, Peterson RD (1987) Monoclonal antibody identification of a type II alveolar epithelial cell antigen and expression of the antigen during lung development. *Dev Biol* 119 (1): 190-198
267. Funkhouser JD, Peterson RD (1989) Immunotargeting: a contemporary approach to the study of lung development. *Am J Physiol* 257 (6): 311-317
268. Furth S, Haran-Ghera N, Curtis HJ, Buffett RF (1959) Studies on the pathogenesis of neoplasms by ionizing radiation. I. Pituitary tumors. *Cancer Res* 19: 550-556
269. Furuno I, Lwasaki T, Matsudaira H (1974) Effects of X-irradiation on cell proliferation and DNA synthesis induced by administration of isoproterenol in salivary glands of the mouse. *Radiat Res* 5: 434-441
270. Gabella G (1991) Ultrastructure of the tracheal muscle in developing, adult and ageing guinea-pigs. *Anat Embryol (Berl)* 183 (1): 71-79

271. Gal TJ, Munoz-Antonia T, Muro-Cacho CA, Klotch DW (2000) Radiation effects on osteoblasts in vitro: a potential role in osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126 (9): 1124-1128
272. Garrett CG, Coleman JR, Reinisch L (2000) Comparative histology and vibration of the vocal folds: implications for experimental in microlaryngeal surgery. *Laryngoscope* 110: 814-824
273. Gaze MN, Wilson JA, Gilmour HM, MacDougall RH, Maran AG (1991) The effect of laryngeal irradiation on pharyngoesophageal motility. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21 (5): 1315-1320
274. Geiger S, Geiger B, Leitner O, Marshak G (1987) Cytokeratin polypeptides expression in different epithelial elements of human salivary glands. *Virchows Arch A* 410: 403-414
275. Gijbels MJ, van der Ham F, van Bennekum AM, Hendriks HF, Roholl PJ (1992) Alterations in cytokeratin expression precede histological changes in epithelia of vitamin A-deficient rats. *Cell Tissue Res* 268 (1): 197-203
276. Gillette EL, McChesney SL, Hoopes PJ (1985) Isoeffect curves for radiation-induced cardiomyopathy in the dog. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11 (12): 2091-2097
277. Gillette SM, Gillette EL, Shida T, Boon J, Miller CW, Powers BE (1992) Late radiation response of canine mediastinal tissues. *Radiother Oncol* 23 (1): 41-52
278. Giri PG, Kimler BF, Giri UP, Cox GG, Reddy EK (1985) Comparison of single, fractionated and hyperfractionated irradiation on the development of normal tissue damage in rat lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11 (3): 527-534
279. Glanz H, Kimmich T, Eichhorn T, Kleinsasser O (1989) Results of treatment of 584 laryngeal cancers at the Ear-Nose-Throat clinic of Marburg University. *HNO* 37 (1): 1-10
280. Glaubinger DL, Casler JD, Garrett WL, You HS, Lillis-Hearne PK (1991) Chondrosarcoma of the larynx after radiation treatment for vocal cord cancer. *Cancer* 68 (8): 1828-1831
281. Glücksmann A, Cherry CP (1973) Tumors of the salivary glands. *In: Pathology of tumors in laboratory animals (Turusov VS, Hrsg.) IARC Sci. Publ. No. 5, Vol. 1, Part 1, Lyon, 75-86*
282. Goldman JL (1966) Histopathology of laryngeal and radical neck specimens in a combined radiation and surgery program for advanced carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Ann Otol* 75: 313-321
283. Goodrich WA, Lenz M (1948) Laryngeal chondronecrosis following roentgen therapy. *Am J Roentgen* 60: 22-28
284. Gorodetsky R, McBride WH, Withers HR, Miller GG (1991) Effect of fibroblast implants on wound healing of irradiated skin: assay of wound strength and quantitative immunohistology of collagen. *Radiat Res* 125: 181-186
285. Gospodarowicz D, Vlodavsky I, Grennburg G, Johnson LK (1979) Cellular shape is determined by the extracellular matrix and is responsible for the control of cellular growth and function. *In: Hormones and Cell Culture (Sato GH & Ross R, Hrsg.), Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation* 6, 561-592
286. Gössner W (1972) Grundlagen und allgemeine pathologische Anatomie der Strahlenschäden. *Verh Dtsch Gesell Pathol* 16: 168-187
287. Grabenbauer GG, Rodel C, Brunner T, Schulze-Mosgau S, Strnad V, Müller RG, Iro H, Sauer R (2001) Interstitial brachytherapy with Ir-192 low-dose-rate in the treatment of primary and recurrent cancer of the oral cavity and oropharynx. Review of 318 patients treated between 1985 and 1997. *Strahlenther Onkol* 177: 338-344
288. Gray SD, Titze IR, Alipour F, Hammond TH (2000) Biomechanical and histologic observations of vocal fold fibrous proteins. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109: 77-85
289. Gray SD (2000) Cellular physiology of the vocal folds. *Otolaryngol Clin North Am* 33: 679-698
290. Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond TH (1999) Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope* 109: 845-854
291. Gray SD, Hirano M, Sato K (1993) Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. *In: Vocal Fold Physiology: Frontiers of Basic Science (Titze IR, ed.), Singular Publishing Group, San Diego, 1-34*
292. Gray SD, Hammond E, Hanson DF (1995) Benign pathologic responses of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104 (1): 13-18
293. Gray SD, Pignatari SS, Harding P (1994) Morphologic ultrastructure of anchoring fibers in normal vocal fold basement membrane zone. *J Voice* 8 (1) 48-52
294. Greco MA, Alvarez SP, Genieser NB, Becker MH (1984) Dyssegmental dwarfism: a histologic study of osseous and nonosseous cartilage. *Hum Pathol* 15: 490-493
295. Griepentrog F (1964) Spontane Hypophysentumoren als häufiger Befund bei weißen Laboratoriumsratten. *Beitr Pathol Anat Allg Pathol* 130: 40-50
296. Griesbach WE (1967) Basophil adenomata in the pituitary glands of 2-year old male Long-Evans rats. *Cancer Res* 27: 1813-1818
297. Gröne HJ, Weber K, Gröne E, Helmchen U, Osborn M (1987) Coexpression of keratin and vimentin in damaged and regenerating tubular epithelia of the kidney. *Am J Pathol* 129: 1-8
298. Groß MW, Engenhardt-Cabillic R (2000) Nebenwirkungen bei radiochirurgischen Eingriffen im ZNS. *In: Nebenwirkungen in der Radioonkologie (Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Hrsg.), Urban und Vogel Verlag, München, 251-261*
299. Gu Q, Wang D, Cui C, Gao Y, Xia G, Cui X (1998) Effects of radiation on wound healing. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 17 (2): 117-123
300. Guchelaar HJ, Vermes A, Meerwaldt JH (1997) Radiation-induced xerostomia: Pathophysiology, clinical course and supportive treatment. *Support Care Cancer* 5: 281-288
301. Guilianelli C, Baeza-Squiban A, Boisvieux-Ulrich E, Houcine O, Zalma R, Guennou C, Pezerat H, Marano F (1993) Effect of mineral particles containing iron on primary cultures of rabbit tracheal epithelial cells: possible implication of oxidative stress. *Environ Health Perspect* 101 (5): 436-442
302. Guo YP, Hendry JH, Morris ID, Davis JR, Beardwell CG (1997) Cell proliferation and death in the irradiated pituitary gland and its modification by growth stimulants. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38: 175-181
303. Gustafsson H, Aalto Y, Franzen L, Thornell LE, Hendriksson R (1998) Effects of fractionated irradiation on the cytoskeleton and basal lamina in parotid glands – an immunohistochemical study. *Acta Oncol* 37: 33-40
304. Gustafsson H, Carlsoo B, Kjorell U, Thornell LE (1986) Immunohistochemical and ultrastructural observations on adenoid cystic carcinoma of salivary glands. With special reference to intermediate filaments and proteoglycan particles. *Acta Otolaryngol* 102(1-2): 152-160
305. Gustafsson H, Kjorell U, Eriksson A, Virtanen I, Thornell LE (1988a) Distribution of intermediate filament proteins in developing and adult salivary glands in man. *Anat Embryol (Berl)* 178(3): 243-251
306. Hagedorn H, Sauer U, Schleicher E, Nerlich A (1999) Expression of TGF-beta 1 protein and mRNA and the effect on the tissue remodeling in laryngeal carcinomas. *Anticancer Res* 19 (5): 4265-4272
307. Hagedorn H, Schreiner M, Wiest I, Nerlich A (1994) Immunohistochemische Analyse der Basalmembran - Expression beim Plattenepithelkarzinom des Larynx. *Laryngo-Rhino-Otol* 73: 637-641
308. Hakansson CH, Albertsson M, Palmegren M, Ranstam J (1991) The response of the tracheal epithelium to concomitant cis-diamminedichloroplatinum (II) and radiation. An electron microscopic study in rabbits. *Scanning Microsc* 5 (2): 573-583

309. Hakenjos L, Bamberg M, Rodemann HP (2000) TGF-beta1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. *Int J Radiat Biol* 76(4): 503-509
310. Hakim SG, Kosmehl H, Lauer I, Nadrowitz R, Wedel T, Sieg P (2002) The role of myoepithelial cells in the short-term radiogenic impairment of salivary glands. An immunohistochemical, ultrastructural and scintigraphic study. *Anticancer Res* 22: 4121-4128
311. Hallen L, Johansson C, Laurent C, Dahlqvist A (1996) Hyaluronan localization in the rabbit larynx. *Anat Rec* 246: 441-445
312. Ham AW (1990) In: *Histologie von F. Geneser* (Dt. Bearbeitung von W. Schwerdtfeger), Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 151
313. Hamakawa H, Sumida T, Bao Y, Tanioka H, Sogawa K, Yamada T (1999) Species specificity of cytokeratin polypeptide expression in the submandibular gland. *Cell Mol Biol Noisy-le-grand*. 45: 265-276
314. Hammond TH, Gray SD, Butler JE (2000) Age- and gender-related collagen distribution in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109: 913-920
315. Harrison LB, Solomon B, Miller S, Fass DE, Armstrong J, Sessions RB (1990) Prospective computer-assisted voice analysis for patients with early stage glottic cancer: a preliminary report of the functional result of laryngeal irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19 (1): 123-127
316. Harwood T, Staley CH, Yokoo H (1973) Histopathology of irradiated and obstructed submandibular salivary glands. *Arch Pathol* 96: 189-191
317. Haseman JK, Rao GN (1992) Effects of corn oil, time-related changes, and inter-laboratory variability on tumor occurrence in control Fischer (F344/N) rats. *Toxicol Pathol* 20: 52-60
318. Hashimoto J, Yamada K, Ogata K, Takai Y, Mori M (1992) Immunoreaction of keratin, actin, S-100 protein and rat-EGF in duct-ligated rat salivary glands. *J Oral Pathol Med* 21: 214-220
319. Hashimura T, Kono M, Imajo Y (1989) Experimental studies on mechanisms and prevention of radiation pneumonitis. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 49: 335-343
320. Hauer-Jensen M, Sauer T, Sletten K, Reitan JB, Nygaard K (1986) Value of hydroxyproline measurements in the assessment of late radiation enteropathy. *Acta Radiol Oncol* 25 (2): 137-142
321. Haveman J, James J, Geerdink A (1996) Collagen content in rat liver after experimentally induced cholestasis followed by choledochojejunostomy and X-irradiation. *Liver* 16 (3): 195-200
322. Hayakawa K, Mitsunashi N, Akimoto T, Maebayashi K, Ishikawa H, Hayakawa K, Sakurai H, Takahashi T, Kamei T, Niibe H (1996) The effect of overall treatment time of radiatio therapy on local control of T1-stage squamous cell carcinoma of the glottis. *Laryngoscope* 106: 1545-1547
323. Hayakawa K, Mitsunashi N, Tamaki Y, Takahashi M, Honjo J, Kamei T, Koyama I, Niibe H (1992) Radiation therapy for stage I and II laryngeal cancer using 10 MV X-rays or cobalt-60 gamma-rays. *Radiat Med* 10 (5): 199-205
324. Hayashi S, Yoshida M, Sakuma-Mochizuki J (1996) Effects of in vivo instillation of genes coding for cytokines on pulmonary fibrosis. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 34: 190-194
325. Hebel R, Stromberg MW (1986) *Anatomy and embryology of the laboratory rat*. BioMed Verlag, Wörthsee
326. Hees H, Sinowatz F (2000) In: *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie* (Hees H, Sinowatz F, Hrsg.), Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
327. Hellner D (1991) *Die mikrochirurgische Gefäßanastomose im bestrahlten Gebiet. Eine tierexperimentelle und klinische Studie*. Habilitationsschrift, Univ. Hamburg
328. Helman J, Turner RJ, Fox PC, Baum BJ (1987) 99m Tc-Pertechnetate uptake in parotid acinar cells by the Na⁺/K⁺/Cl⁻ Co-transport system. *Clin Invest* 79: 1310-1313
329. Henk JM (1986) Cancer of the head and neck. In: *Radiotherapy in Clinical Practice* (Hope-Stone HF, ed.), Butterworths, London, 93-123
330. Hennequin C, Tredaniel J, Chevret S, Durdux C, Dray M, Manoux D, Perret M, Bonnaud G, Homasson JP, Chotin G, Hirsch A, Maylin C (1998) Predictive factors for late toxicity after endobronchial brachytherapy: a multivariate analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42 (1): 21-27
331. Henze M, Hittl JP (2001) Mukoepidermoid-Karzinom der Speicheldrüsen nach hochdosierter Radioiodtherapie. *Laryngorhinootologie* 80(5): 253-256
332. Hernnas J, Nettelbladt O, Bjermer L, Sarnstrand B, Malmstrom A, Hallgren R (1992) Alveolar accumulation of fibronectin and hyaluronan precedes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Eur Respir J* 5 (4): 404-410
333. Herrmann G, Wlaschek M, Bolsen K, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter-Kochanek K (1996) Photosensitization of uroporphyrin augments the ultraviolet A-induced synthesis of matrix metalloproteinases in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 107: 398-403
334. Herrmann T, Alheit HD, Jochem I, Lesche A, Tolle D, Flach M (1987) Hyperfractionated radiotherapy of early vocal cord cancer-adverse radiogenic reactions. *Radiobiol Radiother Berl* 28 (3): 297-307
335. Herrmann T, Baumann M (1997) Strahlenwirkung auf Normalgewebe. In: *Klinische Strahlenbiologie* (Herrmann Th & Baumann M., Hrsg.), Gustav Fischer Verlag Jena, 80-109
336. Herrmann T, Schorch J, Molls M (1995) Radiation Pneumopathy. Experimental and clinical data. In: *Late sequelae in oncology* (Dunst J und Sauer R, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 135-140
337. Herskind C, Bamberg M, Rodemann HP (1998) The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 174 (3): 12-15
338. Herskind C, Johansen J, Bentzen SM, Overgaard M, Overgaard J, Bamberg M, Rodemann HP (2000) Fibroblast differentiation in subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Acta Oncol* 39 (3): 383-388
339. Hicks W jr., Sigurdson L, Gabalski E, Hard R, Hall L 3rd, Gardella J, Powers C, Kumar N, Lwebuga-Mukasa J (1999) Does cartilage down-regulate growth factor expression in tracheal epithelium? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125 (11): 1239-1243
340. Hicks WL jr (1999) Increased expression of keratinocyte growth factor represents a stereotypic response to tracheal luminal insult independent of injury mechanism. *Laryngoscope* 109 (10): 1552-1559
341. Hill RP, Rodemann HP, Hendry JH, Roberts SA, Anscher MS (2001) Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic. *Int-J-Radiat Oncol Biol Phys* 49(2): 353-365
342. Hill WG, Harper GS, Rozaklis T, Boucher RC, Hopwood JJ (1997) Organ-specific over-sulfation of glycosaminoglycans and altered extracellular matrix in a mouse model of cystic fibrosis. *Biochem Mol Med* 62 (1): 113-122
343. Hino S, Kawamata H, Omotehara F, Uchida D, Miwa Y, Begum NM, Yoshida H, Sato M, Fujimori T (2002) Cytoplasmic TSC-22 (transforming growth factor-beta-stimulated clone-22) markedly enhances the radiation sensitivity of salivary gland cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 292(4): 957-963
344. Hirabayashi H, Ohgaki H, Uno K, Kosshi K, Hinohara T (1989) Fibrosarcoma of the neck in an adult female. *Auris Nasus Larynx* 16: 51-58
345. Hirai K, Shimizu Y, Hino T (1990) Epithelial regeneration in collagen-coated and uncoated patch grafts implanted into dog tracheas. *J Exp Pathol* 71 (1): 51-62

346. Hiramatsu Y, Nagler RM, Fox PC, Baum BJ (1994) Rat salivary gland blood flow and blood-to-tissue partition coefficients following X-radiation. *Arch Oral Biol* 39: 77-80
347. Holm LE (1990) Cancer occurring after radiotherapy and chemotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19: 1303-1308
348. Horiba K, Fukuda Y (1994) Synchronous appearance of fibronectin, integrin alpha 5 beta 1, vinculin and actin in epithelial cells and fibroblasts during rat tracheal wound healing. *Virchows Arch* 425: 425-434
349. Hörmann K, Donath K (1986) Mechanisms of tumor invasion in the laryngeal structure. A study of undecalcified thin sections. *Laryngol Rhinol Otol Stuttg* 65 (5): 297-302
350. Horn KD, Fowler JC, Carrau R, Barnes EL, Rao UN (2001) Cytokeratin immunophenotyping of an unusual cervical vertebral chordoma with extensive chondroid foci and perilaryngeal recurrence: a case report with review of the literature. *Am J Otolaryngol* 22 (6): 428-434
351. Howell-Burke D, Peters LJ, Goepfert H, Oswald MH (1990) T2 glottic cancer. Recurrence, salvage, and survival after definitive radiotherapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116 (7): 830-835
352. Hoyt, DJ, Lettinga JW, Leopold KA, Fisher SR (1992) The effect of head and neck radiation therapy on voice quality. *Laryngoscope* 102: 477-480
353. Hsiao CH, Cheng CJ, Yeh KL (1997) Immunohistochemical and ultrastructural study of malignant plasmacytoid myoepithelioma of the maxillary sinus. *J Formos Med Assoc* 96(3): 209-212
354. Hsu HY, Chai CY, Lee MS (1998) Radiation-induced muscle damage in rats after fractionated high-dose irradiation. *Radiat Res* 149 (5): 482-486
355. Hunter SE, Scher RL (2003) Clinical implications of radionecrosis to the head and neck surgeon. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 11: 103-106
356. Huszar M, Gigi-Leitner O, Moll R, Franke WW, Geiger B (1986) Monoclonal antibodies to various acidic (type I) cytokeratins of stratified epithelia. Selective markers for stratification and squamous cell carcinomas. *Differentiation* 31: 141
357. Hyytiäinen T, Paaononen T, Inkinen K, Ahonen J, Mattila S (1999) Airway anastomotic healing in the rat tracheal autograft. *Eur Surg Res* 31: 155-161
358. Ichimura K, Sugawara M, Nibu K, Takasago E, Hasezawa K (1997) The significance of arytenoid edema following radiotherapy of laryngeal carcinoma with respect to residual and recurrent tumour. *Auris Nasus Larynx* 24: 391-397
359. Irlher S, Zietz C, Sendelhofert A, Lang S, Blasenbren-Vogt S, Löhns U (2002) A morphogenetic concept of salivary duct regeneration and metaplasia. *Virchows Arch* 440: 519-526
360. Illsley MC, Peacock JH, Mc Anulty RJ, Yarnold JR (2000) Increased collagen production in fibroblasts cultured from irradiated skin and effect of TGF beta(1)- Clinical study. *Br J Cancer* 83 (5): 650-654
361. Incandela S, Aragona F, Di Marco G (1999) The adenocarcinoma of the larynx: in aim of a clinic case. Histologic, immunohistochemistry and electron microscope studies. *Rev Laryngol Otol Rhinol* 120 (1): 35-38
362. Inerot S, Heinegard D (1983) Bovine tracheal cartilage proteoglycans. Variations in structure and composition with age. *Coll Relat Res* 3 (3): 245-262
363. Inoue S (1994) Basic structure of basement membranes is a fine network of "cords" irregular anastomosing strands. *Microsc Res Tech* 28 (1): 29-47
364. Inoue S, Leblond CP (1988) Three-dimensional network of cords: the main component of basement membranes. *Am J Anat* 181: 341-358
365. Ishii K, Yamashita K, Akita M (1999) Fibrous structure of connective tissue in the vocal fold of the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Okajimas Folia Anat Jpn* 76: 107-115
366. Ishii K, Zhai WG, Akita M, Hirose H (1996) Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol* 116: 778-782
367. Ishikawa T, Munekane R, Maeda K, Tanaka K (1994) Cultured adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Congress: Int Ass of Oral Pathologists, Abstractband*, 4
368. Ito A (1976) Animal model: pituitary tumors in rats - human disease: pituitary tumors. *Am J Pathol* 83: 423-426
369. Ito A, Moy P, Kaunitz H, Kortwright K, Clarke S, Furth J, Meites J (1972) Incidence and character of the spontaneous tumors in strain CR and W/Fu male rats. *J Natl Cancer Inst* 49: 701-711
370. Ito H, Meistrich ML, Barkley HT, Thames HD, Milas L (1986) Protection of acute and late radiation damage of the gastrointestinal tract by WR-2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12 (2): 211-219
371. Ito T, Mitui H, Udaka N, Hayashi H, Okudela K, Kanisawa M, Kitamura H (1998) Ki-67 (MIB-5) immunostaining of mouse lung tumors induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Histochem Cell Biol* 110: 589-593
372. Jacquot J, Spilmont C, Burlet H, Fuchey C, Buisson AC, Tournier JM, Gaillard D, Puchelle E (1994) Glandular-like morphogenesis and secretory activity of human tracheal gland cells in a three-dimensional collagen gel matrix. *J Cell Physiol* 161: 407-18, 1994
373. Jetten AM, Brody AR, Deas MA, Hook GE, Rearick JI, Thacher SM (1987) Retinoic acid and substratum regulate the differentiation of rabbit tracheal epithelial cells into squamous and secretory phenotype. Morphological and biochemical characterization. *Lab Invest* 56 (6): 654-664
374. Jha N, Seikaly H, McGaw T, Coulter L (2000) Submandibular salivary gland transfer prevents radiation-induced xerostomia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46: 7-11
375. Johnston CJ, Piedboeuf B, Baggs R, Rubin P, Finkelstein JN (1995) Differences in correlation of mRNA gene expression in mice sensitive and resistant to radiation-induced pulmonary fibrosis. *Radiat Res* 142 (2): 197-203
376. Johnston CJ, Wright TW, Rubin P, Finkelstein JN (1998) Alterations in the expression of chemokine mRNA levels in fibrosis-resistant and -sensitive mice after thoracic irradiation. *Exp Lung Res* 24 (3): 321-337
377. Jones LR, Toth BB, Keene HJ (1992) Effects of total body irradiation on salivary gland function and caries-associated oral microflora in bone marrow transplant patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73: 670-676
378. Jones TR, Kannan MS, Daniel EE (1980) Ultrastructural study of guinea pig tracheal smooth muscle and its innervation. *Can J Physiol Pharmacol* 58 (8): 974-983
379. Jordan J, Piotrowski S (1994) Clinical indications for laryngectomy in the patients with carcinoma of the larynx after failed radiotherapy. *Otolaryngol Pol* 48 (3): 266-274
380. Kaanders JH, van Daal WA, Hoogenraad WJ, van der Kogel AJ (1992) Accelerated fractionation radiotherapy for laryngeal cancer, acute, and late toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 24: 497-503
381. Kaartinen L, Nettesheim P, Adler KB, Randell SH (1993) Rat tracheal epithelial cell differentiation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29 a (6): 481-492
382. Kadoya Y, Katsumata O, Yamashina S (1997) Substructures of the acinar basement membrane of rat submandibular gland as shown by alcian blue staining and cryo-fixation followed by freeze-substitution. *J Electron Microsc (Tokyo)* 46 (5): 405-412
383. Kagan AR, Calcaterra T, Ward P, Chan P (1974) Significance of edema of the endolarynx following curative irradiation for carcinoma. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 120: 169-72

384. Kagawa K, Hayashi K, Awai M (1986) Participation of bone marrow stromal cells in hemopoietic recovery of rats irradiated and then parabiosed with a non-irradiated litter mate. *Acta Pathol Jpn* 36 (7): 999-1010
385. Kaldor J (1990) Second cancer following chemotherapy and radiotherapy. *Acta Oncol.* 29: 647-655
386. Kamada A, Tamura I, Okazaki J, Marsukawa F, Sakaki T (1996) Characteristics and localization of rat submandibular gland proteoglycans. *Archs oral Biol* 41: 951-958
387. Kanno S, Fukuda Y (1994) Fibronectin and tenascin in rat tracheal wound healing and their relation to cell proliferation. *Pathol Int* 44: 96-106, 1994
388. Kano Y, Sakurai H, Shidara J, Toida S, Yasuda H (1996) Histopathological and immunohistochemical studies of acquired tracheobronchomalacia: an autopsy case report. *J Otorhinolaryngol Relat Spec* 58 (5): 288-294
389. Kapur TR (1968) Late post radiation changes in the larynx, pharynx, oesophagus and the trachea. *J Laryngol Otol* 82 (5): 447-457
390. Karpenko AA, Ivanovskii IA (1992) The ciliated epithelium of the rat trachea is sensitive to gamma-irradiation in very low doses. *Radiobiologia* 32 (5): 701-705
391. Karvonen RL, Fernandez-Madrid F, Maughan RL, Palmer KC, Fernandez-Madrid I (1987) An animal model of pulmonary radiation fibrosis with biochemical, physiologic, immunologic, and morphologic observations. *Radiat Res* 111 (1): 68-80
392. Kasper M, Rudolf T, Haase M, Schuh D, Müller M (1993) Changes in cytokeratin, vimentin and desmoplakin distribution during the repair of irradiation-induced lung injury in adult rats. *Virchows Arch B Cell Pathol* 64: 271-279
393. Kautzky M, Schenk P, Bigenzahn W, Rappersberger K, Konrad K (1989) Hyalinoses cutis et mucosae im Hals-Nasen-Ohren-Bereich. *Laryngorhinootologie* 68: 602-606
394. Keene M, Harwood AR, Bryce DP, van Nostrand AW (1982) Histopathological study of radionecrosis in laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 92 (2): 173-180
395. Kerr JF, Searle J (1980) Apoptosis: its nature and kinetic role. In: *Radiation biology in cancer research* (Meyn RE, Withers HR, Hrsg.), Raven-Press, New York
396. Kerr JF, Winterord CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-2026
397. Kim JY, Cho KJ, Lee SS, Khang SK, Shim YS (1998) Clinicopathologic study of basaloid squamous carcinoma of the upper aerodigestive tract. *J Korean Med Sci* 13: 269-274
398. Kim KC (1985) Possible requirement of collagen gel substratum for production of mucin-like glycoproteins by primary rabbit tracheal epithelial cells in culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 21 (11): 617-621
399. Kim KC, Opaskar-Hincman H, Bhaskar KR (1989) Secretions from primary hamster tracheal surface epithelial cells in culture: mucin-like glycoproteins, proteoglycans, and lipids. *Exp Lung Res* 15 (2): 299-314
400. Kim KC, Zheng QX, Brody JS (1993) Effect of floating a gel matrix on mucin release in cultured airway epithelial cells. *J Cell Physiol* 156 (3): 480-486
401. Kirkpatrick P, D'Ardenne AJ (1984) Effects of fixation and enzymatic digestion on the immunohistochemical demonstration of laminin and fibronectin in paraffin embedded tissue. *J Clin Pathol* 37: 639
402. Klijanienko J, Micheau C, Carlu C, Caillaud JM (1989) Significance of keratin 13 and 6 expression in normal, dysplastic and malignant squamous epithelium of pyriform fossa. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 416 (2): 121-124
403. Knöbber D (1994) Die Basalmembran bei Erkrankungen der Stimmlippen: Elektronenmikroskopische und immunmorphologische Befunde. *Laryngo-Rhino-Otol* 73: 642-646
404. Knowles JF (1981) Radiation-induced bone tumors in the guinea pig. *Int. J. Radiat. Biol.* 40: 553-555
405. Kobayashi M (1988) The irradiation effects on the cytoskeletons of C3H/He mouse mammary tumor cells and vascular basement membrane in relation to vascular invasion: a model of intraoperative radiotherapy. *Tohoku J Exp Med* 154 (1): 71-89
406. Kojima K, Bonassar LJ, Roy AK, Vacanti CA, Cortiella J (2002) Autologous tissue-engineered trachea with sheep nasal chondrocytes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123: 1177-1184
407. Kolb M, Willner J, Koberlein E, Hoffmann U, Kirschner J, Flentje M, Schmidt M (1999) Autocrine activation of fibroblasts following irradiation. *Pneumologie* 53: 296-301, 1999
408. Komatsu T, Yamamoto M, Shimokata K, Nagura H (1989) Phenotypic characterization of alveolar capillary endothelial cells, alveolar epithelial cells and alveolar macrophages in patients with pulmonary fibrosis, with special reference to MHC class II antigens. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 415 (1): 79-90
409. Köpf-Maier P, Merker HJ (1991) Development of basal lamina in xenografted human carcinomas: an ultrastructural immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 266: 563-578
410. Kraft M, Oussoren Y, Stewart FA, Dorr W, Schultz-Hector S (1996) Radiation-induced changes in transforming growth factor beta and collagen expression in the murine bladder wall and its correlation with bladder function. *Radiat Res* 146 (6): 619-627
411. Kruse JJ, Zurcher C, Strootman EG, Bart CI, Schlagwein N, Leer JW, Wondergem J (2001) Structural changes in the auricles of the rat heart after local ionizing irradiation. *Radiother Oncol* 58 (3): 303-311
412. Kruslin B, Tomasovic C, Cupic H, Belicza M (1998) Basaloid squamous cell carcinoma of the larynx: report of two cases. *Croat Med J* 39 (4): 450-452
413. Kucharz EJ (1992) *The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
414. Kuhn C 3rd, Boldt J, King TE jr., Crouch E, Vartio T, Mc Donald JA (1989) An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 140 (6): 1693-1703
415. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC (1992) The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol* 150 (2): 243-255
416. Kutzner J, Heinrich HG, Draf W (1978) Osteoradionekrose bei Kobalt-60-Therapie im Kopf-Hals-Bereich. *HNO* 26: 253-257
417. Laccouraye O, Hans S, Borzog-Grayeli A, Maulard-Durdux C, Brasnu D, Housset M (2000) Complications of postoperative radiation therapy after partial laryngectomy in supraglottic cancer: a long-term evaluation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 122 (5): 752-757
418. Lallemand AV, Ruocco SM, Gaillard DA (1993) Expression and immunohistochemical localisation of laminin and type IV collagen in developing human fetal tracheal glands. *Int J Dev Biol* 37: 491-495
419. Lallemand AV, Ruocco SM, Joly PM, Gaillard DA (1995) In vivo localization of the insulin-like growth factors I and II (IGF I and IGF II) gene expression during human lung development. *Int J Dev Biol* 39: 529-537
420. Langbein H, Rauch S, Seifert G (1971) Histochemische und autoradiographische Speicheldrüsenveränderungen nach partieller Speicheldrüsenresektion. *Z Laryngol Rhinol* 50: 672-685
421. Langberg CW, Sauer T, Reitan JB, Hauer-Jensen M (1996) Relationship between intestinal fibrosis and histopathologic and morphometric changes in consequential and late radiation enteropathy. *Acta Oncol* 35 (1): 81-87
422. Lara PC, Russell NS, Smolders IJ, Bartelink H, Begg AC, Coco-Martin JM (1996) Radiation-induced differentiation of human skin fibroblasts: relationship with cell survival and collagen production. *Int J Radiat Biol* 70 (6): 683-692
423. Laszlo A, Rosset A, Hermann F, Ozsahin A, Zouhair A, Mirimanoff RO (2001) T.i.d. accelerated radiotherapy alone or alternating with chemotherapy in patients with a locally advanced ORL cancer: analysis of late toxicity. *Cancer Radiother* 5(2): 130-137

424. Laurie GW, Leblond CP, Martin GR (1983) Light microscopic immunolocalisation of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin in the basement membrane of a variety of rat organs. *Am J Anat* 167: 71-82
425. Lazarus CL, Logemann JA, Pauloski BR, Colangelo LA, Kahrlas PJ, Mittal BB, Pierce M (1996) Swallowing disorders in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and adjuvant chemotherapy. *Laryngoscope* 106 (9): 1157-1166
426. Lee SK, Lim CY, Chi JG, Yamada K, Kunikata M, Hashimura K, Mori M (1990) Prenatal development of human major salivary glands and immunohistochemical detection of keratins using monoclonal antibodies *Acta Histochem* 89: 213-235
427. Lee TC, Wu R, Brody AR, Barrett JC, Nettesheim P (1984) Growth and differentiation of hamster tracheal epithelial cells in culture. *Exp Lung Res* 6 (1): 27-45
428. Lefaix JL, Daburon F, Martin M Remy J (1990) Gamma irradiation and delayed effects: muscular fibrosis. *Pathol Biol (Paris)* 38 (6): 617-625
429. Leoncini P, Cintorino M, Vindigni C (1988) Distribution of cytoskeletal and contractile proteins in normal and tumour bearing salivary and lacrimal glands. *Virchows Arch A Pathol Anat* 412: 329-337
430. Leslie KO, Mitchell J, Low R (1992) Lung myofibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* 22 (2): 92-98
431. Lesnicar H, Smid L, Zakotnik B (1996) Early glottic cancer: the influence of primary treatment on voice preservation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36 (5): 1025-1032
432. Levin RJ, Bradley MK (1996) Neuroectodermal antigens persist in benign and malignant salivary gland tumor cultures. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122(5): 551-558
433. Lewis DJ, Prentice DE (1980) The ultrastructure of rat laryngeal epithelia. *J Anat* 130: 617-632
434. Li BY (1992) The effect of glycosaminoglycans in the pulmonary interstitial fibrosis development. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 15 (4): 204-206, 253-254
435. Li C, Okamoto Y, Ohmura H, Ogawa K, Shrestha P, Mori M (1996) Expression of cytokeratins in Warthin's tumour (adenolymphoma) of parotid glands: specific detection of individual cytokeratin types by monoclonal antibodies. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32B(5): 352-358
436. Li S, Duan H, Nagata T (1994) Age-related alterations of proteoglycan in mouse tracheal cartilage matrix: an electron histochemical analysis with the cationic dye of polyethyleneimine. *Cell Mol Biol* 40 (2): 129-135
437. Li Y, Rahmanian M, Widstrom C, Lepperdinger G, Frost GI, Heldin P (2000) Irradiation-induced expression of hyaluronan (HA) synthase 2 and hyaluronidase 2 genes in rat lung tissue accompanies active turnover of HA and induction of types I and III collagen gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23 (3): 411-418
438. Lidegran M, Domeij S, Dahlqvist A, Henriksson R, Franzen L, Gustafsson H, Forsgren S (1995) Irradiation influences the expression of substance P and enkephalin in the rat larynx. *Cell Tissue Res* 279 (1): 55-63
439. Lidegran M, Kjorell U, Henriksson R, Forsgren S (1995) Bombesin-like immunoreactivity in the rat larynx: increase in response to irradiation. *Regul Pept* 55 (3): 321-330
440. Liedtke CM (1988) Differentiated properties of rabbit tracheal epithelial cells in primary culture. *Am J Physiol* 255 (6/1): 760-770
441. Liem IH, Olmos RH, Balm AJ, Keus RB, van-Tinteren H, Takes RP, Muller SH, Bruce AM, Hoefnagel CA, Hilgers FJ (1996) Evidence for early and persistent impairment of salivary gland excretion after irradiation of head and neck tumors. *Eur J Nucl Med* 23: 1485-1490
442. Lim M, Elfman F, Dohrman A, Cunha G, Basbaum C (1995) Upregulation of the 72-kDa type IV collagenase in epithelial and stromal cells during rat tracheal gland morphogenesis. *Dev Biol* 171 (2): 521-530
443. Lin AL, Johnson DA, Wu Y, Wong G, Ebersole JL, Yeh CK (2001) Measuring short-term gamma-irradiation effects on mouse salivary gland function using a new saliva collection device. *Arch Oral Biol* 46(11): 1085-1089
444. Lippert H (1990) In: *Lehrbuch Anatomie* (Lippert H, Hrsg.), Urban & Schwarzenberg-Verlag, München, Wien, Baltimore
445. Little MD, Shalet SM, Beardwell CG (1990) Radiation and hypothalamic-pituitary function. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 4:147-175
446. Little MD, Shalet SM, Beardwell CG, Robinson EL, Sutton ML (1989) Radiation-induced hypopituitarism is dose-dependent. *Clin Endocrinol (Oxford)* 31: 363-373
447. Lloyd DC, Edwards AA, Leonard A, Deknudt GL, Verschaeve L, Natarajan AT, Darroudi F, Obe G, Palitti F, Tanzarella C (1992) Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low doses of X-rays. *Int J Radiat Biol* 61: 335-343
448. Lloyd C (1979) Fibronectin: a function at the junction. *Nature* 279: 473-474
449. Lloyd RV (1990) Tumours of the pituitary gland. In: *Pathology of Tumours in Laboratory Animals* (Turusov V & Mohr U, Hrsg.), Vol. 1, Tumours of the Rat. Lyon: IARC Scientific Publications, 499-537
450. Lobeck H, Haase U, Pfannkuch F, Mischke D, Wild G (1986) Expressionsmuster definierter Zytokeratine in Normalepithel, Hyperplasien und Karzinomen der Schleimhaut des oberen Verdauungstraktes (eine immunhistochemische Untersuchung). *Verh Dtsch Ges Path* 70: 238-242
451. Lobeck H, Hollandt J, Mischke D, Wild G (1988) Die Heterogenität der Zytokeratine epithelialer Zellen sowie ihre Beziehung zur Zelldifferenzierung (am Beispiel des Larynxepithels). *Verh Dtsch Ges Pathol* 72: 229-232
452. Loeffler RK (1974) Influence of fractionation on acute and late reactions in vocal cord carcinoma. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 121: 748-753
453. Logemann JA, Pauloski BR, Rademaker AW, Colangelo LA (1997) Super-supraglottic swallow in irradiated head and neck cancer patients. *Head Neck* 19 (6): 535-540
454. Lotz S, Caselitz J, Tschakert H, Rehpening W, Seifert G (1990) Radioprotection of minipig salivary glands by orcioprenaline-carbachol. An ultrastructural semiquantitative light microscopic study. *Virchows Arch A Pathol Anat* 417: 119-128
455. Lusinchi A, Bourhis J, Wibault P, Le-Ridant AM, Eschwege F (1990) Radiation therapy for head and neck cancers in the elderly. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 18 (4): 819-823
456. Ma X, Stephens NL (1997) The cytoskeleton and the extracellular matrix in sensitized canine tracheal smooth muscle. *Respir Physiol* 110: 57-66
457. Maciejewski B, Taylor JM, Withers HR (1986) Alpha/beta value and the importance of size of dose per fraction for late complications in the supraglottic larynx. *Radiother Oncol* 7 (4): 323-326
458. MacKenzie WF, Gamer FM (1973) Comparison of neoplasms in six sources of rats. *J Natl Cancer Inst* 50: 1243-1257
459. Madri JA, Roll FJ, Furthmayr H, Foidart JM (1980) Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in the basement membranes of the murine kidney. *J Cell Biol* 86: 682-687
460. Maekawa A, Kurokawa Y, Takahashi M, Kokubo T, Ogui T, Onodera H, Tanigawa H, Ohno Y, Furukawa F, Hayashi Y (1983b) Spontaneous tumors in F-344/DuCrj rats. *Gann* 74: 365-372
461. Maekawa A, Odashima S (1975) Spontaneous tumors in aCl/N rats. *J Natl Cancer Inst* 55: 1437-1445
462. Maekawa A, Onodera H, Tanigawa H, Furuta K, Horiuchi S, Hayashi Y (1983a) Neoplastic and non-neoplastic lesions in aging Slc:Wistar rats. *J Toxicol Sci* 8: 279-290

463. Maes A, Weltens C, Flamen P, Lambin P, Bogaerts R, Liu X, Baetens J, Hermans R, Van-den-Bogaert W (2002) Preservation of parotid function with uncomplicated conformal radiotherapy. *Radiother Oncol* 63(2): 203-211
464. Maier H, Weidauer H, Altmannsberger M (1988) Koexpression von Vimentin und Keratin bei Kopf- und Halstumoren. *Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir* 12: 244-247
465. Maier W, Beck C, Hinkelbein W, Richter B (1994) Effects of therapy of laryngeal and hypopharyngeal cancers on Eustachian tube function. *Laryngorhinootologie* 73: 164-168
466. Maiorano E, Marzullo A, D'Elia M, Serio G (1994) Efficacy of different proteolytic treatments for the immunohistochemical stain of cytokeratins. *Boll Soc Ital Biol Sper* 70 (4): 111-118
467. Malpani BL, Samuel AM, Ray S (1996) Quantification of salivary gland function in thyroid cancer patients treated with radioiodine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35: 535-540
468. Man SF, Logus JW, Mok K, Yamamoto H, Ahmed IH, Man GC, Hulbert WC (1987) Effects of irradiation on canine tracheal epithelium: a physiological and morphological correlate. *Exp Lung Res* 12 (3): 223-238
469. Manara M (1968) Histological changes of the human larynx irradiated with various technical therapeutic methods. *Arch Ital Otol* 79: 596-635
470. Mann W, Beck C, Freudenberg N, Leupe M (1981) Der Bestrahlungseffekt auf die Lymphkapillaren des Kehlkopfes. *HNO* 29 (11): 381-387
471. Marijjanowski MM, Crocker IR, Styles T, Forestner DM, Waksman R, Cipolla GD, King SB, Robinson KA (1999) Fibrocellular tissue responses to endovascular and external beam irradiation in the porcine model of restenosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44 (3): 633-641
472. Marshak G, Leitner O (1987) Cytokeratin polypeptides in normal and metaplastic human salivary gland epithelia. *J Oral Pathol* 16(9): 442-449
473. Marshak G, Leitner O, Geiger B (1987) Cytokeratin polypeptide expression during the histogenesis of guinea pig submandibular salivary gland. *Development* 100(4): 699-711
474. Martin GR, Timpl R (1987) Laminin and other basement membrane components. *Ann Rev Cell Biol*: 57-85
475. Martin SG, Stratford MR, Watfa RR, Miller GG, Murray JC (1992) Collagen metabolism in the murine colon following X irradiation. *Radiat Res* 130 (1): 38-47
476. Martin WR, Brown C, Zhang YJ, Wu R (1991) Growth and differentiation of primary tracheal epithelial cells in culture: regulation by extracellular calcium. *J Cell Physiol* 147 (1): 138-148
477. Martinez-Hernandez A, Amenta P (1983) The basement membrane in pathology. *Lab Invest* 48: 656-677
478. Martinez-Hernandez A, Amenta PS (1991) Immunohistochemistry of the pulmonary extracellular matrix. In: *Models of lung disease, microscopy and structural methods* (Gil J, Hrsg.), Marcel Dekker, New York, Basel, 101-145
479. Martins MD, Araujo VC, Raitz R, Araujo NS (2002) Expression of cytoskeletal proteins in developing human minor salivary glands. *Eur J Oral Sci* 110: 316-321
480. Mazon JJ, Grimard L (1997) Late effects of ionizing radiations on head and neck region tissues. *Cancer Radiother* 1 (6): 692-705
481. McDowell EM, Ben T, Coleman B, Chang S, Newkirk C, De Luca LM (1987a) Effects of retinoic acid on the growth and morphology of hamster tracheal epithelial cells in primary culture. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 54 (1): 38-51
482. McDowell EM, Ben T, Newkirk C, Chang S, De Luca LM (1987b) Differentiation of tracheal mucociliary epithelium in primary cell culture recapitulates normal fetal development and regeneration following injury in hamsters. *Am J Pathol* 129 (3): 511-522
483. McGuirt WF, Ray M (1999) Second laryngeal cancers in previously treated larynges. *Laryngoscope* 109 (9): 1406-1408
484. McIntosh JC, Simecka JW, Ross SE, Davis JK, Miller EJ, Cassell GH (1992) Infection-induced airways fibrosis in two rat strains with differential susceptibility. *Infect Immun* 60 (7): 2936-2942
485. McMartin DN, Sahota, PS, Gunson DE (1992) Neoplasms and related proliferative lesions in control Sprague-Dawley rats from carcinogenicity studies. Historical data and diagnostic considerations. *Toxicol Pathol* 20: 212-225
486. Medini E, Medini A, Gapany M, Levitt SH (1996) Radiation therapy in early carcinoma of the glottic larynx T1N0M0. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36: 1211-1213
487. Medini E, Medini I, Lee CK, Gapany M, Levitt SH (1998) The role of radiotherapy in the management of carcinoma in situ of the glottic larynx. *Am - J - Clin - Oncol*. 21 (3): 298-301
488. Meister EF, Goertchen R (1994) Immunhistochemische Untersuchungen zum Antikorperrmuster (Tumormarker) am Larynx. *Laryngorhinootologie* 73: 647-650
489. Meistrich ML, Williams MV, Soranson J, Fowler JF, Denekamp J (1984) Increased collagen and fluid content of mouse kidneys at 9 months after single or fractionated X irradiation. *Radiat Res* 99 (1): 185-201
490. Melo ECM, Lemos M, Filho JAX, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH (2003) Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope* 113: 2187-2191
491. Merker HJ (1994) Morphology of the basement membrane. *Microsc Res Techn* 28: 95-124
492. Meyer-Breiting E (1981) Zur Histopathologie bestrahlter und nicht bestrahlter Kehlkopfkarcinome. *Habilitationschrift*, Frankfurt
493. Meyer-Breiting E, Burkhardt A (1988) In: *Tumours of the larynx. Histopathology and clinical inferences* (Meyer-Breiting E, Burkhardt A, Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
494. Michalowski A (1984) A critical appraisal of clonogenic survival assays in the evaluation of radiation damage to normal tissues. *Radiother Oncol* 1: 241-246
495. Miller GG, Kenning JM, Dawson DT (1988) Radiation-induced changes in collagen isotypes I, III, and IV in the lung of LAF1 mouse: effects of time, dose, and WR-2721. *Radiat Res* 115 (3): 515-532
496. Mills EE (1979) Early glottic carcinoma: Factors affecting radiation failure, results of treatment and sequelae. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5: 811-817
497. Mintz DR, Gullane PJ, Thomson PH, Ruby RR (1981) Perichondritis of the larynx following radiation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 89: 550-554
498. Mitchell JJ, Woodcock-Mitchell J, Leslie K, Rannels DE, Low RB (1991) Cytoskeletal and contractile protein distribution in lung development and injury. *Chest* 99 (3): 18-20
499. Mittal BB, Pelzer H, Tsao CS, Ward WF, Johnson P, Friedman C, Sisson GA, Kies M (1990) Intraoperative radiation of canine carotid artery, internal jugular vein, and vagus nerve. Therapeutic applications in the management of advanced head and neck cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116 (12): 1425-1430
500. Miyaguchi M, Takashima H, Takeshi K (1997) Laryngeal necrosis after combined chemotherapy and radiation therapy. *J Laryngol Otol* 111: 763-765
501. Moll R (1986) Epitheliale Tumormarker. *Verh Dtsch Ges Path* 70: 28-50
502. Moll R (1987) Epithelial Tumor Markers: Cytokeratins and Tissue Polypeptide Antigen (TPA). *Curr Top Pathol* 77: 71-101
503. Moll R (1988) Differenzierungsprogramme des Epithels und ihre Änderungen. *Verh Dtsch Ges Path* 72: 102-114

504. Moll R (1993) Cytokeratine als Differenzierungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren. Veröffentlichungen aus der Pathologie, Bd. 142, Fischer Verlag, Stuttgart
505. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger R, Krepler R (1982) The catalogue of human cytokeratins. Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24
506. Moll R, Hage C, Thoenes W (1991) Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. *Lab Invest* 65: 74-86
507. Möller PC, Bergmann JS, Evans MJ, Weaver BW, Given RL, Blankenship TN (1991) Immunocytochemical localization of laminin in hamster tracheal epithelial cell cultures. *Tissue Cell* 23 (4): 427-435
508. Möller PC, Henson LC, Rogers B, Evans MJ (1993) Type IV collagen localization in hamster tracheal epithelial cell cultures. *Acta Histochem* 94 (1): 73-80
509. Möller, PC, Partridge LR, Cox R, Pellegrini V, Ritchie DG (1987) An in vitro system for the study of tracheal epithelial cells. *Tissue Cell* 19 (6): 783-791
510. Molteni A, Moulder JE, Cohen EF, Ward WF, Fish BL, Taylor JM, Wolfe LF, Brizio-Molteni L, Veno P (2000) Control of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II type 1 receptor blocker. *Int J Radiat Biol* 76 (4): 523-532
511. Morgan DA (1997) Radiotherapy in head and neck cancer. *J Laryngol Otol* 111: 1005-1007
512. Mori M (1991) Histochemistry of the Salivary Glands. CRC Press, Boca Raton
513. Mori M, Takai Y, Sumitomo K (1992) Salivary gland tumors: a possible origin of modified myoepithelial cells is ductal basal cells. *Cancer J* 5: 316-320
514. Morice WG, Ferreiro JA (1998) Distinction of basaloid squamous cell carcinoma from adenoid cystic and small cell undifferentiated carcinoma by immunohistochemistry. *Hum Pathol* 29 (6): 609-612
515. Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi Y, Sakamoto T, Ishii Y, Goto Y, Masuyama K, Zhang MJ, Hirano K, Mochizuki M, Ohtsuka M, Sekizawa K (2001) Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24 (1): 1-11
516. Morrison MD, Gore-Hickman P (1986) Voice disorders in the elderly. *J Otolaryngol* 15: 231-234
517. Moussa SA, French DA (1985) Microsurgical reconstruction of the trachea in rats (an experimental study). *J Laryngol Otol* 99 (1): 61-71
518. Murakami H, Fukuda Y (1989) Ultrastructural and immunohistochemical studies of regenerating epithelium-stroma junctions of rat tracheal epithelium after mechanical injury. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 27 (8): 946-953
519. Murakami Y, Saito Y (1990) Immunohistochemical interpretation of early epithelial disorders of pyriform sinus. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99 (10): 782-788
520. Murofushi T, Funai H, Ohta Y, Takubo M, Tajima B (1990) A case of hypopharyngeal stenosis caused by late radiation injuries – reconstruction of the hypopharynx with myomucosal tongue flap. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 93 (7): 1041-1045
521. Murphy WG (1959) Radiation therapy. Saunders, Philadelphia
522. Murray JC, Parkins CS (1987) Collagen metabolism in mouse lung after X irradiation. *Radiat Res* 111 (3): 498-510
523. Murray JC, Parkins CS (1988) Collagen synthesis in CBA mouse heart after total thoracic irradiation. *Radiother Oncol* 13 (2): 137-143
524. Nagle RB, Moll R, Weidauer H, Nemetschek H, Franke WW (1985) Different patterns of cytokeratin expression in the normal epithelia of the upper respiratory tract. *Differentiation* 30: 130-140
525. Nagler RM (1998) Short- and long-term functional versus morphometrical salivary effects of irradiation in a rodent model. *Anticancer Res* 18: 315-320
526. Nagler RM (2002) The enigmatic mechanism of irradiation-induced damage to the major salivary glands. *Oral Dis* 8(3): 141-146
527. Nagler RM, Baum BJ, Fox PC (1996) A 2 week pair-fed study of early X-irradiation effects on rat major salivary gland function. *Arch Oral Biol* 41: 713-717
528. Nagler RM, Baum BJ, Miller G, Fox PC (1998a) Long-term salivary effects of single-dose head and neck irradiation in the rat. *Arch Oral Biol* 43: 297-303
529. Nagler RM, Laufer D, Nagler A (1998b) Parotid gland dysfunction in a murine model of acute graft versus host disease. *Head Neck* 20: 58-62
530. Nagler RM, Marmary Y, Golan E, Chevion M (1998c) Novel protection strategy against X-ray-induced damage to salivary glands. *Radiat Res* 149: 271-276
531. Nakaaki K, Shin T (1993) A three-dimensional reconstructive study of the layer structure of the human vocal cord. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250 (3): 190-192
532. Nakatsukasa H, Everts RP, Hsia CC, Thorgeirsson SS (1990a) Transforming growth factor-beta 1 and type I procollagen transcripts during regeneration and early fibrosis of rat liver. *Lab Invest* 63 (2): 171-180
533. Nakatsukasa H, Nagy P, Everts RP, Hsia CC, Marsden E, Thorgeirsson SS (1990b) Cellular distribution of transforming growth factor-beta 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* 85 (6): 1833-1843
534. Namyslowski G, Misiolek M, Kubik P, Trybalska G, Anczykowska M (1996) The influence of the Co-60 therapy on the hearing in laryngeal cancers. *Otolaryngol Pol* 50 (3): 286-290
535. Narayan K, Cliff, WJ (1982) Morphology of irradiated microvasculature: a combined in vivo and electron-microscopic study. *Am J Pathol* 106 (1): 47-62
536. Nerlich A (1995) Morphologie von Basalmembran- und -assoziierten Matrixproteinen in normalem und pathologischem Gewebe. Veröffentlichungen aus der Pathologie, Bd.144, Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York
537. Nerlich A, Schreiner M, Hagedorn H, Wiest I, Schleicher E (1994) Bedeutung der Basalmembran für das Wachstum von Tumoren - Immunhistochemische Aspekte unter besonderer Berücksichtigung von Tumoren des Kopf/Halsbereiches. *Laryngo-Rhino-Otol* 73: 631-636
538. Nerlich AG, Lebeau A, Hagedorn HG, Sauer U, Schleicher ED (1998) Morphological aspects of altered basement membrane metabolism in invasive carcinomas of the breast and the larynx. *Anticancer Res* 18 (5): 3515-3520
539. Nettelbladt O, Bergh J, Schenholm M, Tengblad A, Hallgren R (1989) Accumulation of hyaluronic acid in the alveolar interstitial tissue in bleomycin-induced alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 139 (3): 759-762
540. Nettelbladt O, Scheynius A, Bergh J, Tengblad A, Hallgren R (1991) Alveolar accumulation of hyaluronan and alveolar cellular response in bleomycin-induced alveolitis. *Eur Respir J* 4 (4): 407-414
541. Nguyen TD, Cornillet-Stoupy J, Gillery P, Maquart FX (1991) Effects of gamma irradiation on dermal equivalents in vitro. *Experientia* 47: 725-728
542. Nguyen TD, Demange L, Froissart D, Panis X, Loirette M (1985) Rapid hyperfractionated radiotherapy. Clinical results in 178 advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer* 56: 16-19

543. Nicolai P, Cappiello J, Peretti G, Antonelli AR, Parolini S, Rosa D, Favret M, Maroccolo D, Molinari-Tosatti MP (1990) Distribution of laminin, type IV collagen and fibronectin in normal, dysplastic and neoplastic laryngeal tissue. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 10 (2): 139-149
544. Niewald M, Berberich W, Schlichting C, Engel M, Koch A, Schnabel K (1995) Skin and mucosal damage after radiotherapy for head and neck tumors. In: *Late sequelae in oncology* (Dunst J und Sauer R, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 105-110
545. Nishinarita M, Ohta S, Uesato M, Oka Y, Kamoshida T, Takahashi A (1995) Undifferentiated connective tissue syndromes (UCTS) accompanied by laryngeal involvement and autoimmune hepatitis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 18 (5): 559-565
546. Nishioka H, Ito H, Haraoka J, Hirano A (2001) Histological changes in the hypofunctional pituitary gland following conventional radiotherapy for adenoma. *Histopathology* 38 (6): 561-566
547. Nomizu M, Kuratomi Y, Ponce ML, Song SY, Miyoshi K, Otaka A, Powell SK, Hoffman MP, Kleinman HK, Yamada Y (2000) Cell adhesive sequences in mouse laminin beta1 chain. *Arch Biochem Biophys* 378(2): 311-320
548. Norberg L, Dardick I, Leung R, Burford-Mason AP, Rippstein P (1992) Immunogold localization of actin and cytokeratin filaments in myoepithelium of human parotid salivary gland. *Ultrastruct Pathol* 16(5): 555-568
549. Norberg LE, Lundquist PG (1988) An ultrastructural study of salivary gland radiosensitivity after alpha-adrenergic stimulation. *Auris Nasus Larynx* 15 (1): 1-17
550. O'Brien PC (1996) Tumour recurrence or treatment sequelae following radiotherapy for larynx cancer. *J Surg Oncol* 63 (2): 130-135
551. O'Connell AC, Redman RS, Evans RL, Ambudkar IS (1999) Radiation-induced progressive decrease in fluid secretion in rat submandibular glands is related to decreased acinar volume and not impaired calcium signaling. *Radiat Res* 151: 150-158
552. O'Connell AC (2000) Natural history and prevention of radiation injury. *Adv Dent Res* 14: 57-61
553. Ohtsubo T, Igawa H, Saito T, Matsumoto H, Park H, Song CW, Kano E, Saito H (2001) Enhancement of cell killing by induction of apoptosis with mild hyperthermia at 42° C and cisplatin. *Radiat Res* 156: 103-109
554. Okumura N, Teramachi M, Takimoto Y, Nakamura T, Ikada Y, Shimizu Y (1994) Experimental reconstruction of the intrathoracic trachea using a new prosthesis made from collagen grafted mesh. *ASAIO* 40 (3): 834-839
555. Okunieff P, Barrett AJ, Phang SE, Li A, Constine LS, Williams JP, Rubin P, Wang X, Wu T, Chen Y, Ding I (1999) Circulating-basic fibroblast growth factor declines during Cy/TBI bone marrowtransplantation. *Bone Marrow Transplant* 23: 1117-1121
556. Olmi P, Fallai C (1997) Nonstandard fractionation schedules in radiation therapy of head and neck cancer: a review. *Tumori* 83: 633-642
557. Ootsuyama A, Tanooka H (1988) One hundred percent tumor induction in mouse skin after repeated β irradiation in limited dose range. *Radiat. Res.* 155: 188-194
558. Ootsuyama A, Tanooka H (1991) Threshold-like dose of local β - irradiation repeated throughout the life span of mice for induction of skin and bone tumors. *Radiat. Res.* 125: 98-101
559. Österreicher J, Mokry J, Navratil L, Knizek J, Vavrova J, Skopek J, Macela A (2001) The alveolar septal thickness and type II pneumocytes number in irradiated lungs, time expression and the effect of pentoxifylline. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 44 (1): 15-19
560. Otto HF (1999) Basaloide Plattenepithelkarzinome. In: *HNO-Pathologie* (Seifert G, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 200-203
561. Otto HF, Born IA, Schweweheimer K (1988) Immunhistologische Charakterisierung maligner Speicheldrüsentumoren. In: *Speicheldrüsenkrankungen. Aktuelle Diagnostik und Therapie* (Weidauer H & Maier H, Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 53-67
562. Paardecooper GM, Cammelli S, Zeilstra LJ, Coppes RP, Konings AW (1998) Radiation-induced apoptosis in relation to acute impairment of rat salivary gland function. *Int J Radiat Biol* 73: 641-648
563. Pacheco IP, Segreto C, Iwabuchi L (1983) The thickness of the glomerular basement membrane in irradiated and unirradiated Wistar rats and C-57 BL mice of different age groups. *Exp Aging Res* 9 (4): 221-224
564. Panettieri RA, Tan EM, Ciocca V, Luttmann MA, Leonard TB, Hay DW (1998) Effects of LTD4 on human airway muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction in vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 453-61, 1998
565. Pare PD, Roberts CR, Bai TR, Wiggs BJ (1997) The functional consequences of airway remodeling in asthma. *Monaldi Arch Chest Dis* 52 (5): 589-596
566. Parsons JT (1994) The effect of radiation on normal tissues of the head and neck. In: *Management of head and neck cancer: a multidisciplinary approach*. Second edition (Million RR and Cassisi NJ, ed.), J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 245-289
567. Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP (1992) Radiotherapy alone for moderately advanced laryngeal cancer (T2-T3). *Semin Radiat Oncol* 2: 158-162
568. Paulsen F, Kimpel M, Lockemann U, Tillmann B (2000) Effects of ageing on the insertion zones of the human vocal fold. *J Anat* 196 (1): 41-54
569. Paulsen F, Tillmann B (1997) Functional and clinical anatomy of the posterior insertion of the human vocal ligament. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254 (9-10): 442-448
570. Paulsen F, Tillmann B (1999) Osteoarthritis in cricoarytenoid joint. *Osteoarthritis Cartilage* 7 (6): 505-514
571. Pauluhn J, Baumann M, Hirth-Dietrich C, Rosenbruch M (2001) Rat model of lung fibrosis: comparison of functional, biochemical, and histopathological changes 4 month after single irradiation of the right hemithorax. *Toxicology* 161 (3): 153-163
572. Pavy JJ, Denekamp J, Letschert J, Littbrand B, Mornex F, Bernier J, Gonzales-Gonzales D, Horiot JC, Bolla M, Bartelink H (1995) EORTC Late Effects Working Group. Late Effects toxicity scoring: the SOMA scale. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 1043-1047
573. Peckham JC (1980) *Experimental Oncology*. In: *The laboratory rat* (Baker HJ, Lindsey JR, Weissbroth SH, Hrsg.), Vol II. Research Applications. Academic Press, New York
574. Penney DP, Keng PC, Dardak S, Phipps RP (1992) Morphologic and functional characteristic of subpopulations of murine lung fibroblasts grown in vitro. *Anat Rec* 232 (3): 432-443
575. Penney DP, Rosenkrans WA (1984) Cell-cell matrix interactions in induced lung injury. I. The effects of X-irradiation on basal laminar proteoglycans. *Radiat Res* 99 (2): 410-419
576. Penney DP, Siemann DW, Rubin P, Shapiro DL, Finkelstein J, Cooper RA (1982) Morphologic changes reflecting early and late effects of irradiation of the distal lung of the mouse: a review. *Scan Electron Microsc (Pt1)*: 413-425
577. Peter B, Van Waarde MA, Vissink A, s-Gravenmade EJ, Konings AW (1994) Radiation-induced cell proliferation in the parotid and submandibular glands of the rat. *Radiat Res* 140: 257-265
578. Philippi UM (1991) Immunohistochemischer Nachweis von Zytokeratin-Polypeptiden der Schleimhaut des oberen Aero-Digestivum. *Med. Diss., Freie Universität Berlin*

579. Phipps RP, Penney DP, Keng P, Quill H, Paxhia A, Derdak S, Felch ME (1989) Characterization of two major populations of lung fibroblasts: distinguishing morphology and discordant display of Thy 1 and class II MHC. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1: 65-74
580. Pickering CE, Pickering RG (1984) The effect of repeated reproduction on the incidence of pituitary tumors in Wistar rats. *Lab Anim* 18: 371-378
581. Pinchuk VG, Karas AF, Bykov VL, Martyniuk LA, Rozenfeld LG (1989) Morphohistochemical and electron microscopic characteristics of malignant tumors of the upper respiratory tract after combined local hyperthermia and radiotherapy. *Vopr Onkol* 35 (7): 830-837
582. Potten CS, Hendry JH (1983) In: Cytotoxic insults to tissues: Effects on cell lineages (Potten CS, Hendry JH, Hrsg.), Churchill-Livingstone-Verlag, Edinburgh
583. Powers BE, Mc Chesney SL, Gillette EL (1987) Late radiation response of the canine trachea with change in dose per fraction. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13 (11): 1673-1680
584. Prasannan L, Pu A, Hoff P, Weatherly R, Castle V (1999) Parotid carcinoma as a second malignancy after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 21(6): 535-538
585. Prejean JD, Peckham JC, Cvasey AE, Griswold DP, Weisburger EK, Weisburger JH (1973) Spontaneous tumors in Sprague-Dawley rats and Swiss mice. *Cancer Res* 33: 2768-2773
586. Qi F, Sugihara T, Yamamoto Y, Abe K (1998) Arterial changes following single-dose irradiation. *J Reconstr Microsurg* 14 (3): 153-159
587. Qin C, Pan Y, Hashimoto J, Takai Y, Yamada T, Mori M (1994) Destructive processes of salivary gland parenchyma and development of epimyoeplithelial islands assessed by immunohistochemistry. *Arch Anat Cytol Pathol* 42(1): 16-25
588. Raghov B, Irish P, Kang AH (1989) Coordinate regulation of transforming growth factor beta gene expression and cell proliferation in hamster lungs undergoing bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 84 (6): 1836-1842
589. Raghov R (1991) Role of transforming growth factor-beta in repair and fibrosis. *Chest* 99: S61-S65
590. Raghov R (1994) The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J* 8: 823-831
591. Raghov R, Lurie S, Seyer JM, Kang AH (1985) Profiles of steady state levels of messenger RNAs coding for type I procollagen, elastin, and fibronectin in hamster lungs undergoing bleomycin-induced interstitial pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 76: 1733-1739
592. Raitz R, Martins MD, Araujo VC (2003) A study of the extracellular matrix in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 32: 290-296
593. Rangakumar G, Shanta V (1978) Larynx cancer: a therapeutic policy at the Madras Cancer Institute. *J Surg Oncol* 10: 183-189
594. Rearick JJ, Jetten AM (1989) Effect of substratum and retinoids upon the mucosecretory differentiation of airway epithelial cells in vitro. *Environ Health Perspect* 80: 229-237
595. Reibel J (1987) Local variations in the staining patterns of keratin antigens and blood group antigens in normal rodent oral epithelia. *Cell Tissue Res* 248: 345-350
596. Reibel J, Dabelsteen E (1986) Staining patterns of rodent squamous epithelia by monoclonal anti-keratin antibodies. *Scand J Dent Res* 94: 38-46
597. Reinhold HS (1965) A cell dispersion technique for use in quantitative transplantation studies with solid tumors. *Eur. J. Cancer* 1: 67-71
598. Remacle M, Marbaix E (1988) Collagen implants in the human larynx. Pathological examinations of two cases. *Arch Otorhinolaryngol* 245: 203-209
599. Remberger K, Nerlich A (1985) Diagnostischer Wert der Darstellung von Basalmembranproteinen in benignen und malignen Mammaveränderungen. *Verh Dtsch Ges Pathol* 69: 123-130
600. Remy J, Wegrowski J, Crechet F, Martin M, Daburon F (1991) Long-term overproduction of collagen in radiation-induced fibrosis. *Radiat Res* 125 (1): 14-19
601. Reynaud A, Travis EL (1984) Late effects of irradiation in mouse jejunum. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 46 (2): 125-134
602. Rezvani M, Alcock CJ, Fowler JF, Haybittle JL, Hopewell JW, Wiernik G (1991) Normal tissue reactions in the British Institute of Radiology Study of 3 fractions per week versus 5 fractions per week in the treatment of carcinoma of the laryngo-pharynx by radiotherapy. *Br J Radiol* 64: 1122-1133
603. Richardson LL, Kleinman HK, Dym M (1998) Altered basement membrane synthesis in the testis after tissue injury. *J Androl* 19 (2): 145-155
604. Riede UN, Schäfer HE (1995) Störungen der Reizbeantwortung. In: Allgemeine und spezielle Pathologie (Riede UN, Schäfer HE, Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 128-167
605. Riede UN, Schäfer HE, Rohrbach R, Müller HJ (1995) Störungen der zellulären und extrazellulären Organisation. In: Allgemeine und spezielle Pathologie (Riede UN, Schäfer HE, Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 7-76
606. Riekkki R, Jukkola A, Sassi ML, Hoyhtya M, Kallioinen M, Risteli J, Oikarinen A (2000) Modulation of skin collagen metabolism by irradiation: collagen synthesis is increased in irradiated human skin. *Br J Dermatol* 142 (5): 874-880
607. Riley DJ, Berg RA, Soltys RA, Kerr JS, Guss HNO, Curran SF, Laskin DL (1988) Neutrophil response following intratracheal instillation of collagen peptides into rat lungs. *Exp Lung Res* 14 (4): 549-563
608. Rinaldi N, Willhauck M, Weis D, Brado B, Kern P, Lukoschek M, Schwarz-Eywill M, Barth TF (2001) Loss of collagen type IV in rheumatoid synovia and cytokine effect on the collagen type-IV gene expression in fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis. *Virchows Arch* 439: 675-682
609. Risbud M, Endres M, Ringe J, Bhonde R, Sittinger M (2001) Biocompatible hydrogel supports the growth of respiratory epithelial cells: possibilities in tracheal tissue engineering. *56 (1): 120-127*
610. Ritzenthaler JD, Goldstein RH, Fine A, Lichtler A, Rowe DW, Smith BD (1991) Transforming-growth-factor-beta activation elements in the distal promoter regions of the rat alpha 1 type I collagen gene. *Biochem J* 280 (1): 157-162
611. Robbins KT (2000) Indications for selective neck dissection: when, how, and why. *Oncology (Huntingt)* 14(10): 1455-1469
612. Robbins KT, Fontanesi J, Wong FS, Vicario D, Seagren S, Kumar P, Weisman R, Pellitteri P, Thomas JR, Flick P, Palmer R, Weir A 3rd, Kerber C, Murry T, Ferguson R, Los G, Orloff L, Howell SB (1996) A novel organ preservation protocol for advanced carcinoma of the larynx and pharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122 (8): 853-857
613. Robbins ME, O'Malley Y, Zhao W, Davis CS, Bonsib SM (2001) The role of the tubulointerstitium in radiation-induced renal fibrosis. *Radiat Res* 155 (3): 481-489
614. Robbins ME, Wooldridge MJ, Jaenke RS, Whitehouse E, Golding SJ, Rezvani M, Hopewell JW (1991) A morphological study of radiation nephropathy in the pig. *Radiat Res* 126 (3): 317-327
615. Robinson CB, Wu R (1993) Mucin synthesis and secretion by cultured tracheal cells: effects of collagen gel substratum thickness. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29 a (6): 469-477
616. Rodemann HP, Bamberg M (1995) Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 35(2): 83-90

617. Rodemann HP, Binder A, Bamberg M (1995) Radiation-induced fibrosis: experimental studies. In: Late sequelae in oncology (Dunst J und Sauer R, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 93-97
618. Rodemann HP (2001) Strahlenbiologische Grundlagen. Forum DKG 16: 32-35
619. Roggeband R, Van den Berg PT, Van der Wulp CJ, Baan RA (1994) Detection of DNA adducts in basal and non-basal cells of the hamster trachea exposed to benzo(a)pyrene in organ culture. *J Histochem Cytochem* 42 (11): 1427-1434
620. Rohde H, Wick G, Timpl R (1979) Immunochemical characterization of the basement membrane glycoprotein laminin. *Eur J Biochem* 102: 195-201
621. Roscher A, Steele BC, Woodward JS (1966) Carotid artery rupture after radiation injury to the larynx. *Arch Otolaryngol* 83: 472-476
622. Rose RW, Grant DS, O'Hara MD, Williamson SK (1999) The role of laminin-1 in the modulation of radiation damage in endothelial cells and differentiation. *Radiat Res* 152 (1): 14-28
623. Rubin P (1995) In: Late effect of normal tissues consensus conference (Rubin P, Hrsg.), *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 1035-1364
624. Rubin P, Casarett GW (1968) Major digestive glands: salivary gland, liver, biliary tree, and pancreas. In: *Clinical radiation pathology, Vol I* (Rubin P, Casarett GW, Hrsg.), WB Saunders, Philadelphia
625. Rubin P, Constine LS, Fajardo LF, Phillips TL, Wasserman TH (1995) RTOG Late Effects Working Group. Overview. Late Effects of Normal Tissues (LENT) scoring system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 1041-1042
626. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, Mc Donald S, Finkelstein JN (1995) A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33 (1): 99-109
627. Rubio CA, Jalnas M (1996) Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. *Dig Dis Sci* 41 (2): 392-401
628. Rudat V, Dietz A, Nollert J, Conradt C, Weber KJ, Flentje M, Wannemacher M (1999) Acute and late toxicity, tumour control and intrinsic radiosensitivity of primary fibroblasts in vitro of patients with advanced head and neck cancer after concomitant boost radiochemotherapy. *Radiother Oncol* 53 (3): 233-245
629. Rudert H (1992) Maligne Tumoren der Lippen, der Mundhöhle und des Oropharynx. In: *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis* (Naumann HH, Helms J, Heberhold C, Kastenbauer E, Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart, 648-667
630. Rudoltz MS, Perkins RS, Luthmann RW, Fracke TD, Green Tm, Moye L, Wludyka P, Choi YK, Ackerman SN (1999) High-dose-rate brachytherapy for primary carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Laryngoscope* 109: 1967-1973
631. Ruifrok AC, Mc Bride WH (1999) Growth factors: biological and clinical aspects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43 (4): 877-881
632. Sack H (1996) Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches - Allgemeine Grundlagen. In: *Strahlentherapie* (Scherer E & Sack H, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 315-327
633. Sack H, Thesen N (1998) *In: Bestrahlungsplanung*. Stuttgart, Thieme Verlag, 74-121
634. Saeger W (1981) Hypophyse. In: *Spezielle pathologische Anatomie* (Doerr W & Seifert G, Hrsg.), Bd. 14/I, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1-165
635. Saeger W (1997) Hypophyse. In: *Pathologie* (Remmele W, Hrsg.). Bd. 4, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 553-578
636. Sagowski C, Wenzel S, Riehle I, Tesche S, Jenicke L, Zywiets F, Röser K, Metternich F (2003) Histomorphologische und sialozintigraphische Befunde zur Radiosialadenitis unter fraktionierter Bestrahlung der Kopf-Hals-Region von Ratten. Ein Modell zur Evaluierung potenziell radioprotektiver Substanzen. *HNO*, online publiziert: 09.07.2003 (10.1007/s00106-003-0855-5)
637. Saito Y (1994) Immunohistological investigation of squamous metaplasia and expression of cytokeratin subclasses in laryngeal epithelia. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 97 (7): 1200-1206
638. Saitoh K, Toyooka M, Fujita K, Hashimoto J, Kunikata M, Mori M (1992) Neuron - specific enolase reduction in irradiated salivary glands of the rat - an immunohistochemical study. *Acta Histochem* 93: 277-281
639. Salehpour A, Butler DL, Proch FS, Schwartz HE, Feder SM, Doxey CM, Ratcliffe A (1995) Dose-dependent response of gamma irradiation on mechanical properties and related biochemical composition of goat bone-patellar tendon-bone allografts. *J Orthop Res* 13 (6): 898-906
640. Salm R, Wright GE (1975) Sebaceous carcinoma (Talgdrüsen-Karzinome). *Beitr Pathol* 155: 221-236
641. Sannes PL (1986) Cytochemical visualization of anions in collagenous and elastic fiber-associated connective tissue matrix in neonatal and adult rat lungs using iron-containing stains. *Histochemistry* 84 (1): 49-56
642. Santini V (2001) Amifostine: chemotherapeutic and radiotherapeutic protective effects. *Expert Opin Pharmacother* 2(3): 479-489
643. Sasano Y, Takahashi I, Zhu JX, Ohtani H, Mizoguchi I, Kagayama M (2001) Gene and protein expressions of type I collagen are regulated tissue-specifically in rat hyaline cartilages in vivo. *Eur J Morphol* 39 (3): 149-154
644. Sass B, Rabstein LS, Madison R, Nims RM, Peters RL, Kelloff GJ (1975) Incidence of spontaneous neoplasms in FG344 rats throughout the natural life-span. *J Natl Cancer Inst* 54: 1449-1456
645. Sato K, Hirano M, Nakashima T (2002) Age-related changes of collagenous fibers in the human vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 111: 15-20
646. Sato K (1998) Reticular fibers in the vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 107: 1023-1028
647. Sawatsubashi M, Mizokami H, Tokunaga O, Shin T (1998) Expression of MMP-1, TIMP-1, and type I collagen in laryngeal carcinoma. *Mod Pathol* 11 (9): 878-885
648. Schellenberg JC, Liggins GC (1987) Elastin and collagen in the fetal sheep lung. I. Ontogenesis. *Pediatr Res* 22: 335-338
649. Scherer E, Sack H (1996) *In: Strahlentherapie* (Scherer E & Sack H, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 315-400
650. Scherer E, Streffer C, Trott KR (1991) *In: Radiopathology of organs and tissues* (Scherer E, Streffer C, Trott KR, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
651. Schlage WK, Bulles H, Friedrichs D, Kuhn M, Teredesai A (1998a) Cytokeratin expression patterns in the rat respiratory tract as markers of epithelial differentiation in inhalation toxicology. I. Determination of normal cytokeratin patterns in nose, larynx, trachea, and lung. *Toxicol Pathol* 26 (3): 324-343
652. Schlage WK, Bulles H, Friedrichs D, Kuhn M, Teredesai A, Terpstra PM (1998b) Cytokeratin expression patterns in the rat respiratory tract as markers of epithelial differentiation in inhalation toxicology. II. Changes in cytokeratin expression patterns following 8-day exposure to room-aged cigarette sidestream smoke. *Toxicol Pathol* 26: 344-360
653. Schneider BF, Eberhard DA, Steiner LE (1997) Histopathology of arteriovenous malformations after gamma knife radiosurgery. *J Neurosurg* 87 (3): 352-357
654. Schultz CJ, Campbell BH, Freije JE, Brook BJ, McAuliffe TL (1995) Risk factors which predict persistent cancer in the abnormal larynx following definitive irradiation. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31b (5): 310-314
655. Seddon JM, Gragoudas ES, Albert DM (1983) Ciliary body and choroidal melanomas treated by proton beam irradiation. *Histopathologic study of eyes*. *Arch Ophthalmol* 101 (9) 1402-1408
656. Seegenschmiedt MH (1998) *In: Nebenwirkungen in der Onkologie*. Internationale Systematik und Dokumentation (Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

657. Seegenschmiedt MH und Zimmermann JS (2000) Dokumentation von Nebenwirkungen. In: Nebenwirkungen in der Radioonkologie (Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Hrsg.), Urban und Vogel Verlag, München, 45-72
658. Seifert G (1960) Über Spontanveränderungen der großen Kopfspeicheldrüsen bei Laboratoriumstieren. *Beitr Pathol Anat* 123: 299-332
659. Seifert G (1964) Die Sekretionsstörungen (Dyschylrien) der großen Kopfspeicheldrüse. *Ergebn Allg Pathol Anat* 44: 103-188
660. Seifert G (1996) *In: Oralpathologie I. Pathologie der Speicheldrüsen* (Doerr W & Seifert G, Hrsg.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
661. Seifert G, Geier W (1971) Zur Pathologie der Strahlensialadenitis. *Z Laryngol Rhinol* 50: 376-388
662. Seifert G, Mielke A, Haubrich J, Chilla R (1984) Speicheldrüsenkrankheiten. *In: Pathologie-Klinik-Therapie-Fazialischirurgie*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York
663. Seifert WF, Wobbes T, Hoogenhout J, de Man BM, Hendriks T (1997) Intra-operative irradiation prolongs the presence of matrix metalloproteinase activity in large bowel anastomoses of the rat. *Radiat Res* 147 (3): 354-361
664. Seikaly H, Jha N, McGaw T, Coulter L, Liu R, Oldring D (2001) Submandibular gland transfer: a new method of preventing radiation-induced xerostomia. *Laryngoscope* 111(2): 347-52
665. Sendler A, Caselitz J, Seifert G, Schmiegelow P (1984) Reaction pattern of xenografted human salivary glands in nude mice. An immunohistological and autoradiographical study. *Virchows Arch A Pathol Anat* 403: 1-13
666. Shapiro DL, Finkelstein JN, Penney DP, Siemann DW, Rubin P (1982) Sequential effects of irradiation on the pulmonary surfactant system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8 (5): 897-882
667. Sheela S, Kennedy AR (1986) Radiation-induced anchorage-independent growth and collagenase production in diploid human fibroblasts. *Carcinogenesis* 7 (2): 201-205
668. Shemen LJ, Huvos AG, Spiro RH (1987) Squamous cell carcinoma of the salivary gland origin. *Head Neck Surg* 9: 235 – 240
669. Shiels IA, Bowler SD, Taylor SM (1996) Homologous serum increases fibronectin expression and cell adhesion in airway smooth muscle cells. *Inflammation* 20: 373-387
670. Shiels IA, Bowler SD, Taylor SM (1999) The effects of salbutamol, beclomethasone, and dexamethasone on fibronectin expression by cultured airway smooth muscle cells. *Inflammation* 23: 321-331
671. Shin T, Nahm I, Maeyama T, Miyazaki J, Matsuo H, Yu Y (1995) Morphologic study of the large taste buds in the cat. *Laryngoscope* 105 (12): 1315-1321
672. Shinohara M, Oka M, Yamada K, Hashimura K, Yuba K, Mori M (1992) Immunohistochemical and electronmicroscopic studies of obstructive lesions in submandibular glands. *J Oral Pathol Med* 21: 370-375
673. Shirasuna K, Saka M, Hayashido H, Yoshioka H, Sugiura T, Matsuya T (1993) Extracellular matrix production and degradation by adenoid cystic carcinoma cells: participation of plasminogen activator and its inhibitor in matrix degradation. *Cancer Res* 53: 147-152
674. Shirasuna K, Watatani K, Furusawa H, Saka M, Morioka S, Yoshioka H, Matsuya T (1990) Biological characterization of pseudocyst-forming cell lines from human adenoid cystic carcinomas of minor salivary gland origin. *Cancer Res* 50(13): 4139-4145
675. Sholley MM, Pratt NE, Sodicoff M (1981) Cytoplasmic crystalloids in irradiated rat parotid glands. *J Oral Pathol* 10: 192-202
676. Sholley MM, Sodicoff M, Pratt NE (1974) Early radiation injury in the rat parotid gland. Reaction of acinar cells and vascular endothelium. *Lab Invest* 31: 340-354
677. Shrestha P, Namba M, Yang L, Liu B, Oosumi H, Mori M (1994a) Papillary cystadenocarcinoma of salivary glands: An immunohistochemical study. *Inter. J. Oncol.* 4: 587-597
678. Silvain C, Barrioz T, Besson I, Babin P, Fontanel JP, Daban A, Matuchansky C, Beauchant M (1993) Treatment and long-term outcome of chronic radiation esophagitis after radiation therapy for head and neck tumors. A report of 13 cases. *Dig Dis Sci* 38 (5): 927-931
679. Sime A, Mc Kellar Q; Nolan A (1997) Method for the growth of equine airway epithelial cells in culture. *Res Vet Sci* 62 (1): 30-33
680. Singh IP, Slevin NJ (1991) Late audiovestibular consequences of radical radiotherapy to the parotid. *Clinical Oncology* 3 (4): 217-219
681. Skalli O, Schurch W, Seemayer T, Lagace R, Montandon D, Pittet B, Gabbiani G (1989) Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 60 (2): 275-285
682. Skalova A, Leivo I (1992a) Basement membrane proteins in salivary gland tumours. Distribution of type IV collagen and laminin. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 420 (5): 425-431
683. Skalova A, Leivo I (1992b) Extracellular collagenous spherules in salivary gland tumours. Immunohistochemical analysis of laminin and various types of collagen. *Arch Pathol Lab Med* 116(6): 649-653
684. Sminia P, Carl UM, Omniczynski M, Jansen W, Meisner K, Beck-Bornholdt HP (1993) Long-term observation of the rat skin after fractionated local X-irradiation: Development of secondary tumors. *Radiat Res.* 136: 222-228
685. Sminia P, Havemann J, Jansen W., Hendricks JJ, van Dijk JD (1991) Hyperthermia promotes the incidence of tumors following x-irradiation of the rat cervical cord region. *Int. J. Radiat. Biol.* 60: 833-845
686. Sminia P, Jansen W, Haveman J, van Dijk JD (1990) Incidence of tumors in the cervical region of the rat after treatment with radiation and hyperthermia. *Int. J. Radiat. Biol.* 57: 425-436
687. Sobue M, Takeuchi J, Niwa M, Yasui C, Nakagaki S, Nagasaka T, Fukatsu T, Saga S, Nakashima N (1989) Establishment of a cell line producing basement membrane components from an adenoid cystic carcinoma of the human salivary gland. *Virch Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 57(3): 203-208
688. Sodicoff M, Pratt NE, Sholley MM (1974) Ultrastructural radiation injury of rat parotid gland: a histopathologic dose-response study. *Radiat Res* 58: 196-208
689. Solans R, Bosch JA, Galofre P, Porta F, Rosello J, Selva-O'Callagan A, Vilardell M (2001) Salivary and lacrimal gland dysfunction (sicca syndrome) after radioiodine therapy. *J Nucl Med* 42(5): 738-743
690. Sommers SC (1971) Effects of ionizing radiation upon endocrine glands. In: Berdjis CC (Hrsg.). *Pathology of Irradiation*. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 408-446
691. Somosy Z, Sass M, Bogner G, Kovacs J, Koteles GJ (1995) X-irradiation-induced disorganization of cytoskeletal filaments and cell contacts in HT29 cells. *Scanning Microsc* 9 (3): 763-772
692. Song L, Wang D, Cui X, Shi Z, Yang H (1998b) Kinetic alterations of angiotensin-II and nitric oxide in radiation pulmonary fibrosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 17: 141-150
693. Spiegel JH, Deschler DG, Cheney ML (2001) Microvascular transplantation and replantation of the rabbit submandibular gland. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127(8): 991-996
694. Spiegel JH, Zhang F, Levin DE, Singer MI, Buncke HJ (2000) Microvascular transplantation of the rat submandibular gland. *Plast Reconstr Surg* 106(6): 1326-1335
695. Spitz MR, Batsakis JG (1984) Major salivary gland carcinoma: Descriptive epidemiology and survival of 498 patients. *Arch. Otolaryngol.* 110: 45-48

696. Spriano G, Antognoni P, Sanguineti G, Sormani M, Richetti A, Ameli F, Piantanida R, Luraghi R, Magli A, Corvo R, Tordiglione M, Vitale V (2000) Laryngeal long-term morbidity after supraglottic laryngectomy and postoperative radiation therapy. *Am J Otolaryngol* 21 (1): 14-21
697. Sprinzl GM, Eckel HE, Ernst S, Motamedi K (1999) Cricoid cartilage necrosis after arytenoidectomy in a previously irradiated larynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 1154-1157
698. Staskowski PA, Ford CN, Inagi K (1998) The histologic fate of autologous collagen injected into the canine vocal fold. *Otolaryngol Head Neck Surg* 118 (2): 187-190
699. Stechschulte DJ jr., Wu JJ, Eyre DR (1997) Fibronectin lacking the ED-B domain is a major structural component of tracheal cartilage. *J Biol Chem* 272 (8): 4783-4786
700. Stenback F, Makinen MJ, Jussila T, Kauppila S, Risteli J, Talve L, Risteli L (1999) The extracellular matrix in skin tumor development – a morphological study. *J Cutan Pathol* 26 (7): 327-338
701. Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, King GK, Brock WA, Peters LJ (1986c) Target cell and mode of radiation injury in rhesus salivary glands. *Radiother Oncol* 7(2): 165-174
702. Stephens LC, King GK, Peters LJ, Ang KK, Schultheiss TE, Jardine JH (1986a) Acute and late radiation injury in rhesus monkey parotid glands. Evidence of interphase cell death. *Am J Pathol* 124(3): 469-478
703. Stephens LC, King GK, Peters LJ, Ang KK, Schultheiss TE, Jardine JH (1986b) Unique radiosensitivity of serous cells in rhesus monkey submandibular glands. *Am J Pathol* 124(3): 479-487
704. Stephens LC, Schultheiss TE, Price RE, Ang KK, Peters LJ (1991) Radiation apoptosis of serous acinar cells of salivary and lacrimal glands. *Cancer* 67(6): 1539-1543
705. Stern MH, Turner JE, Jett LS, Mincer H, McGinnis JP (1976) Electron microscopic changes in rat parotid and submandibular glands subsequent to total body irradiation with fast neutrons. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 42: 620-630
706. Stevens G, Castle G, O'Brien CJ (1994) Treatment of early carcinoma of the vocal cords by radiotherapy. *Aust Radiol* 38: 119-122
707. Stewart JG, Brown JR, Palmer MK, Cooper A (1974) The management of glottic carcinoma by primary irradiation with surgery in reserve. *Laryngoscope* 84: 1477-1484
708. Stosiek P, Kasper M, Karsten U (1991) Das Zytoskelettprofil bei der Metaplasie des respiratorischen Epithels. *Verh Dtsch Ges Path* 75: 300
709. Strassburger S, Berndt A, Hyckel P, Katenkamp D, Kosmehl H (1998) Differential expression of laminin chains in the human major salivary gland. *Histochem J* 30: 81-88
710. Su L, Morgan PR, Harrison DL, Waseem A, Lane EB (1993) Expression of keratin mRNAs and proteins in normal salivary epithelia and pleomorphic adenomas. *Am J Pathol* 171: 173-181
711. Subotic R, Vecerina S, Krajina Z, Hirano M, Kurita S (1984) Histological structure of vocal fold lamina propria in foetal larynx. *Acta Otolaryngol* 97: 403-406
712. Suit HD, Sedlacek R, Fagundes L, Goitein M, Rothman KJ (1978) Time distributions of recurrences of immunogenic and non immunogenic tumors following local irradiation. *Radiat. Res.* 73: 251-266
713. Sumi N, Stavrou D, Froberg H, Jockmann G (1976) The incidence of spontaneous tumors of the central nervous system of Wistar rats. *Arch Toxicol* 35: 1-13
714. Sun EC, Curtis R, Melbye M, Goedert JJ (1999) Salivary gland cancer in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(12): 1095-1100
715. Svojtikova E, Deyl Z, Macek K, Adam M (1983) Are the changes in collagen caused by chronic X-irradiation similar to aging? *Physiol Bohemoslov* 32 (5): 449-459
716. Swaen GJ, Becker AE (1968) Granular-cell myoblastoma of the pituitary gland in an old rat. A case report. *Lab Anim* 2: 41-43
717. Symonds RP, Evans RA, Liu KC, Azhar T (1992) Late audio-vestibular consequences of radical radiotherapy to the parotid. *Clinical Oncology* 4 (3): 203-204
718. Szarfman A, Hassell JR, Rohrbach DH, Stanley JR, Martin GR (1982) Components of basement membranes: their properties, functions, and alterations in disease states. *New Trends in Basement Membrane Research*, Raven Press, New York
719. Taghian A, de Vathaire F, Terrier P, Le M, Auquier A, Mouriessie h, Grimaud E, Sarrazin D, Tubiana M (1991) Long-term risk of sarcoma following radiation treatment for breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21 (2): 361-367
720. Takagi M, Akiba T, Yamazaki Y, Nariai K, Iwaki T (2001) The wound-healing effect of fibrin glue for tracheal anastomosis in experimental pulmonary surgery. *Surg Today* 31: 845-847
721. Takata T, Caselitz J, Seifert G (1987) Undifferentiated tumors of the salivary glands. Immunohistochemical investigation and differential diagnosis of 22 cases. *Pathol. Res. Pract.* 182: 161-168
722. Takata T, Ogawa I, Nikai H (1989) Sebaceous carcinoma of the parotid gland. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Virch. Arch. A Pathol. Anat.* 414: 459-464
723. Takeuchi J, Sobue M, Katoh Y, Esaki T, Yoshida M, Miura K (1976) Morphologic and biologic characteristics of adenoid cystic carcinoma cells of the salivary gland. *Cancer* 38: 2349-2356
724. Takizawa S, Miyamoto M (1976) Observations on spontaneous tumors in Wistar furth strain rats. *Hiroshima J Med Sci* 25: 89-98
725. Tan BC, Kunaratnam N (1966) Hypopituitary dwarfism following radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Clin Radiol* 17: 302-304
726. Tart RP, Mukherji SK, Lee WR, Mancuso AA (1994) Value of laryngeal cartilage sclerosis as a predictor of outcome in patients with stage T3 glottic cancer treated with radiation therapy. *Radiology* 192 (2): 567-570
727. Taylor JM, Mendenhall WM, Lavey RS (1992) Dose, time, and fraction size issues for late effects in head and neck cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22 (1): 3-11
728. Taylor SE, Miller EG (1999) Preemptive pharmacologic intervention in radiation-induced salivary dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med* 221 (1): 14-26
729. Terry RM, Gray C, Bird CC (1986) Aberrant expression of low molecular weight cytokeratins in primary and secondary squamous carcinoma of the head and neck. *J Laryngol Otol* 100: 1283-1287
730. Terry RM, Gray C, Jackson P, Bird CC (1986) Expression of low molecular weight cytokeratins in the neoplastic vocal cord. *J Laryngol Otol* 100: 1279-1282
731. Terzaghi-Howe M (1989a) Induction of preneoplastic alterations by X-rays and neutrons in exposed rat tracheas and isolated tracheal epithelial cells. *Radiat Res* 120 (2): 352-363
732. Terzaghi-Howe M (1989b) Inhibitor production by normal rat tracheal epithelial cells influences the frequency of spontaneous and X-ray-induced enhanced growth variants. *Carcinogenesis* 10 (6): 967-971
733. Terzaghi-Howe M (1990) Interactions between cell populations influence expression of the transformed phenotype in irradiated rat tracheal epithelial cells. *Radiat Res* 121 (3): 242-247

734. Therkildsen MH, Mandel U, Christensen M, Dabelsteen E (1995) Thomsen-Friedenreich (T) antigen as marker of myoepithelial and basal cells in the parotid gland, pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas. An immunohistological comparison between T and sialosyl-T antigens, alpha-smooth muscle actin and cytokeratin 14. *APMIS* 103(7-8): 558-567
735. Thibeault SL, Bless DM, Gray SD (2003) Interstitial protein alterations in rabbit vocal fold with scar. *J Voice* 17: 377-383
736. Thomassen DG, Seiler FA, Shyr LJ, Griffith WC (1990) Alpha-particles induce preneoplastic transformation of rat tracheal epithelial cells in culture. *Int J Radiat Biol* 57 (2): 395-405
737. Thornton SC, Walsh BJ, Bennett S, Robbins JM, Foulcher E, Morgan GW, Penny R, Breit SN (1996) Both in vitro and in vivo irradiation are associated with induction of macrophage-derived fibroblast growth factors. *Clin Exp Immunol* 103 (1): 67-73
738. Thresiamma KC, George J, Kuttan R (1996) Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced toxicity. *Indian J Exp Biol* 34 (9): 845-847
739. Timpl R (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 180: 487-502
740. Timpl R, Dziadek M (1986) Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int Rev Exp Pathol* 29: 1-112
741. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR (1979) Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254: 9933-9937
742. Tombolini V, Zurlo A, Cavaceppi P, Sarro A, Guidi C, Osti MF, Vitturini A, Banelli E (1995) Radiotherapy for T1 carcinoma of the glottis. *Tumori*. 81 (6): 414-418
743. Tournier JM, de-Bentzman S, Gaillard D, Puchelle E (1992a) Morphogenesis and modifications of the respiratory epithelium. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 100: A47-49
744. Tournier JM, Goldstein GA, Hall DE, Damsky CH, Basbaum CB (1992b) Extracellular matrix proteins regulate morphologic and biochemical properties of tracheal gland serous cells through integrins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6: 461-471
745. Tournier JM, Merten M, Meckler Y, Hinnrasky J, Fuchey C, Puchelle E (1990) Culture and characterization of human tracheal gland cells. *Am Rev Respir Dis* 141 (5/1): 1280-1288
746. Tournier JM, Polette M, Hinnrasky J, Beck J, Werb Z, Basbaum C (1994) Expression of gelatinase A, a mediator of extracellular matrix remodeling, by tracheal gland serous cells in culture and in vivo. *J Biol Chem* 269: 25454-25464
747. Tralongo V, Rodolico V, Burruano F, tortrici S, Mancuso A, Daniele E (1997) Malignant myoepithelioma of the minor salivary glands arising in a pleomorphic adenoma. *Anticancer Res* 17(4A): 2671-2675
748. Ts'ao C, Ward WF, Tsao FH, Taylor JM, Molteni A (1997) Annexin I in fibrotic rat lung and cultured lung fibroblasts following irradiation. *Int J Radiat Biol* 72 (2): 227-234
749. Tschumperlin DJ, Drazen JM (2001) Mechanical stimuli to airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 164 (10/2): 90-94
750. Tsubara A, Shikata N, Inui T, Sakaida N, Morii S (1988) Morphological and biological characteristics of mammary tumours induced by the direct application of DMBA powder to rat mammary glands. *Virch. Arch. A. Pathol. Anat.* 414: 1-7
751. Tsubochi H, Suzuki T, Suzuki S, Ohashi Y, Ishibashi S, Moriya T, Fujimura S, Sasano H (2000) Immunohistochemical study of basaloid squamous cell carcinoma, adenoid cystic and mucoepidermoid carcinoma in the upper aerodigestive tract. *Anticancer Res* 20 (2B): 1205-1211
752. Tsunoda K, Soda Y (1996) Hoarseness as the initial manifestation of systemic lupus erythematosus. *J Laryngol Otol* 110 (5): 478-479
753. Tsutsumi K, Iwatake H, Kuwabara D, Hyodo A, Kobayashi T, Koizuka I, Kato I (2000) Effects of calcium on HPV16 gene transcription in cultured laryngeal epithelial cells. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 103 (6): 727-733
754. Turner SL, Tiver KW (1991) Radical radiotherapy for carcinoma of the larynx-Westmead Hospital experience. *Aust Radiol* 35: 242-247
755. Tzaphlidou M, Kounadi E, Leontiou I, Matthopoulos DP, Glaros D (1997) Influence of low doses of gamma-irradiation on mouse skin collagen fibrils. *Int J Radiat Biol* 71 (1): 109-115
756. Urano M, Kenton LA, Kahn J (1989) The effect of hyperthermia on the early- and the late-appearing mouse foot reactions and on radiation carcinogenesis. Part II. Effect on radiation carcinogenesis (thermal enhancement and oxygen enhancement). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16: 437-442
757. Urano M, Koike S, Ohara BS (1979) Secondary malignant neoplasms following radiotherapy of the mouse mammary carcinoma. *Cancer* 43: 151-156
758. Valesky A, Lehnhardt FJ, Schildberg FW (1981) Wundheilung von Tracheoanastomosen. *Chirurg* 52 (10): 648-653
759. van-den-Brenk HA, Sparrow N, Moore V (1969) Effect of x-irradiation on salivary gland growth in the rat. I. Effect of single doses on post natal differentiation and growth of acinar and duct components. *Int J Radiat Biol* 16: 241-266
760. van-Dyke DC, Simpson ME, Koneff AA, Tobias CA (1959) Long-term effects of deuteron irradiation of the rat pituitary. *Endocrinology* 64: 240-257
761. van-der-Voet JC, Keus RB, Hart AA, Hilgers FJ, Bartelink H (1998) The impact of treatment time and smoking on local control and complications in T1 glottic cancer (see comments). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42 (2): 247-255
762. van-Dieren EB, Nowak PJ, Wijers OB, van-Sornsens-de-Koste JR, van-der-Est H, Binnekamp DP, Heijmen BJ, Levendag PC (2000) Beam intensity modulation using tissue compensators or dynamic multileaf collimation in three-dimensional conformal radiotherapy of primary cancers of the oropharynx and larynx, including the elective neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47(5): 1299-1309
763. van-Putten WL, van-der-Sangen MJ, Hoekstra CJ, Levendag PC (1994) Dose, fractionation and overall treatment time in radiation therapy—the effects on local control for cancer of the larynx. *Radiother Oncol* 30: 97-108
764. Varga J, Rosenbloom J, Jimenez SA (1987) Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 247: 597-604
765. van-der-Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, Ruiters DJ, Ramaekers CS, Kuijpers W (1997) Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and squamous cell carcinomas of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254 (8): 376-383
766. Virtanen I, Lehto VP, Lehtonen E, Vartio T, Stenman S, Kurki P, Wager P, Small JV, Dahl D, Badley RA (1981) Expression of intermediate filaments in cultured cells. *J Cell Sci* 50: 45-63
767. Vissink A, Down JD, Konings AW (1992) Contrasting dose-rate effects of gamma-irradiation on rat salivary gland function. *Int J Radiat Biol* 61: 275-282
768. Vissink A, Gravenmade ES, Ligeon E, Konings A (1991a) Effects of split - dose x irradiation on rat salivary gland function. *Radiat Res* 127(1): 52-57
769. Vissink A, Gravenmade ES, Ligeon EE, Konings W (1990a) A functional and chemical study of irradiation effects on rat parotid and submandibular/sublingual glands. *Radiat Res* 124(3): 259-265
770. Vissink A, Kalicharan D, Gravenmade ES, Jongebloed W, Ligeon EE, Nieuwenhuis P, Konings AW (1991b) Acute irradiation effects on morphology and function of rat submandibular glands. *J Oral Pathol Med* 20 (9): 449-456

771. Vissink A, Konings AW, Ligeon EE,-Gravenmade ES (1990b) Irradiation-induced changes in secretion and composition of rat saliva. *J Biol Buccale* 18: 3-8
772. Vissink A, Spijkervet FK, van-Nieuw-Amerongen A (1996) Aging and saliva: a review of the literature. *Spec Care Dentist* 16: 95-103
773. Vollrath M, Altmannsberger M, Debus E, Osborn M (1983) Differentialdiagnose von Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs mit Hilfe immunhistologischer und elektronenoptischer Untersuchungen. *Laryng Rhinol Otol* 63: 475-482
774. Vujaskovic Z, Anscher MS, Feng QF, Rabbani ZN, Amin K, Samulski TS, Dewhirst MW, Haroon ZA (2001) Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50: 851-855
775. Walkin CM, Freedman RB, Law MP (1987) Biosynthesis and degradation of collagen in X-irradiated mouse lung. *Radiat Res* 112 (2): 341-350
776. Wallner F, Maier H, Fischer HP, Born A, Altmannsberger M (1990) Koexpression von Keratin und Vimentin in nicht-therapierten Plattenepithelkarzinomen des HNO-Traktes. *Laryngol Rhinol Otol* 69: 636-641
777. Walner DL, Heffelfinger SC, Stern Y, Abrams MJ, Miller MA, Cotton RT (2000) Potential role of growth factors and extracellular matrix in wound healing after laryngotracheal reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 122: 363-366
778. Walsh KM, Poteracki J (1994) Spontaneous neoplasms in control Wistar rats. *Fund Appl Toxicol* 22: 65-72
779. Wang CC, Blitzer PH, Suit HD (1985) Twice-a day radiation therapy for cancer of the head and neck. *Cancer* 55: 2100-2104
780. Wang CC, McIntyre J (1993) Re-irradiation of laryngeal carcinoma – techniques and results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26 (5): 783-785
781. Wang CC, Nakfoor BM, Spiro IJ, Martins P (1997) Role of accelerated fractionated irradiation for supraglottic carcinoma: assessment of results. *Cancer J Sci Am* 3: 88-91
782. Wang CZ, Evans MJ, Cox RA, Burke AS, Zhu Q, Herndon DN, Barrow RE (1992) Morphologic changes in basal cells during repair of tracheal epithelium. *Am J Pathol* 141 (3): 753-759
783. Wang J, Richter KK, Sung CC, Hauer-Jensen M (1999) Upregulation and spatial shift in the localization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor during radiation enteropathy development in the rat. *Radiother Oncol* 50 (2): 205-213
784. Wang J, Robbins ME (1996) Radiation-induced alteration of rat mesangial cell transforming growth factor-beta and expression of the genes associated with the extracellular matrix. *Radiat Res* 146 (5): 561-568
785. Wang J, Zheng H, Hauer-Jensen M (2001) Influence of short-term octreotide administration on chronic tissue injury, transforming growth factor beta (TGF-beta) overexpression, and collagen accumulation in irradiated rat intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 297 (1): 35-42
786. Wang JL, Sun Y, Wu S (2000) Gamma-irradiation induces matrix metalloproteinase II expression in a p53-dependent manner. *Mol Carcinog* 27 (4): 252-258
787. Wang Q, Dickson GR, Carr KE (1996) The effect of graft-bed irradiation on the healing of rat skin grafts. *J Invest Dermatol* 106 (5): 1053-1057
788. Wang S, Cukierman E, Swaim WD, Yamada KM, Baum BJ (1999) Extracellular matrix protein-induced changes in human salivary epithelial cell organization and proliferation on a model biological substratum. *Biomaterials* 20 (11): 1043-1049
789. Ward PH, Calcaterra TC, Kagan AR (1975) The enigma of post-radiation edema and recurrent or residual carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 85: 522-529
790. Ward WF, Molteni A, Fitzsimons EJ, Hinz J (1988) Serum copper concentration as an index of lung injury in rats exposed to hemithorax irradiation. *Radiat Res* 114: 613-620
791. Ward WF, Solliday NH, Molteni A, Port CD (1983) Radiation injury in rat lung. II. Angiotensin-converting enzyme activity. *Radiat Res* 96 (2): 294-300
792. Warde P, Kroll B, O'Sullivan B, Aslanidis J, Tew-George E, Waldron J, Maxymiw W, Liu FF, Payne D, Cummings B (2000) A phase II study of Biotene in the treatment of postradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer* 8 (3): 203-208
793. Wegrowski J, Lafuma C, Lefaix JL, Daburon F, Robert L (1988) Modification of collagen and noncollagenous proteins in radiation-induced muscular fibrosis. *Exp Mol Pathol* 48 (3): 273-285
794. Wegrowski J, Lafuma C, Lefaix JL, Robert L, Daburon F (1986) Modifications of collagen, fibronectin and glycosaminoglycans of the pig thigh muscle after acute local gamma irradiation. *Br J Radiol Suppl*: 19113-19116
795. Wegrowski J, Lefaix JL, Lafuma C (1992) Accumulation of glycosaminoglycans in radiation-induced muscular fibrosis. *Int J Radiat Biol* 61 (5): 685-693
796. Wegrowski J, Remy J, Martin M, Lafuma C (1989) Fibronectin and glycosaminoglycan synthesis by fibrotic pig fibroblasts in primary culture. *Connect Tissue Res* 23 (4): 237-249
797. Wendt Th (1981) Ergebnisse der Strahlentherapie und der chirurgischen Behandlung von Oropharynxkarzinomen. *Strahlentherapie* 157: 361-364
798. Wenig BL, Reuter VC, Steinberg BM, Strong EW (1987) Tracheal reconstruction: in vitro and in vivo animal pilot study. *Laryngoscope* 97: 959-965
799. Werner JA (1995) Morphologie und Histochemie von Lymphgefäßen der oberen Luft- und Speisewege: eine klinisch orientierte Untersuchung. *Laryngorhinootologie* 74 (9): 568-576
800. Werner JA (2002) Lymphbahnen: Embryologie und Anatomie und Einflüsse der Strahlentherapie. In: *Lymphknotenerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich* (Werner JA, Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3-43
801. Wetzels RH, Robben HC, Leigh IM, Schaafsma HE, Vooijs GP, Ramaekers FC (1991) Distribution patterns of type VII collagen in normal and malignant human tissues. *Am J Pathol* 139 (2): 451-459
802. Wiedemann HP, Matthey RA (1989) Pulmonary manifestations of the collagen vascular diseases. *Clin Chest Med* 10: 677-722
803. Wiernik G, Alcock CJ, Bates TD, Berry RJ, Brindle JM, Dalby JE, Fowler JF, Gajek WR, Goodman S, Haybittle JL (1989) First interim progress report on the second British Institute of Radiology fractionation study: Short versus long overall treatment times for radiotherapy of the laryngo-pharynx. *Br J Radiol* 62: 450-456
804. Wiernik G, Bates TD, Bleehe NM, Brindle JM, Bullimore J, Fowler JF, Haybittle JL, Howard N, Laing AH, Lindup R (1990) Final report of the general clinical results of the British Institute of Radiology fractionation study of 3F/wk versus 5F/wk in radiotherapy of carcinoma of the laryngo-pharynx. *Br J Radiol* 63: 169-180
805. Wild GA, Lobeck H, Mischke D (1987) Keratinexpression im normalen und maligne transformierten Plattenepithel der Kopfdarmschleimhaut. *Laryngol Rhinol Otol* 66: 615-621
806. Wolfe JM, Bryan WR, Wright AW (1938) Histologic observations on the anterior pituitaries of old rats with particular reference to the spontaneous appearance of pituitary adenomata. *Cancer* 34: 352-372
807. Wolterbeek AP, Schoevers EJ, Bruyntjes JP, Rutten AA, Feron VJ (1995) Benzo[a]pyrene-induced respiratory tract cancer in hamsters fed a diet rich in beta-carotene. A histomorphological study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 14 (1): 35-43

808. Woodcock-Mitchell J, Adler KB, Low RB (1984) Immunohistochemical identification of cell types in normal and in bleomycin-induced fibrotic rat lung. Cellular origins of interstitial cells.
809. Woodcock-Mitchell J, Burckardt AL, Mitchell JJ, Rannels SR, Rannels DE, Chiu JF, Low RB (1986) Keratin species in type II pneumocytes in culture and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 134: 566-571
810. Woodcock-Mitchell J, Mitchell JJ, Reynolds SE, Leslie KO, Low RB (1990) Alveolar epithelial cell keratin expression during lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2 (6): 503-514
811. Woodcock-Mitchell J, Rannels SR, Mitchell JJ, Rannels DE, Low RB (1989) Modulation of keratin expression in type II pneumocytes by the extracellular matrix. *Am Rev Respir Dis* 139: 343-351
812. Yamaguchi T, Shin T, Sugihara H (1996) Reconstruction of the laryngeal mucosa. A three-dimensional collagen gel matrix culture. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122 (6): 649-654
813. Yamamoto T, Iyonaga K, Takeya M, Saita N, Suga M, Ando M, Takahashi K (1998) Morphological alteration of cultured tracheobronchial epithelial cells is accompanied by the expression of chemokines, MCP-1 and CINC/gro, in rats. *Int J Exp Pathol* 79 (2): 81-92
814. Yanagi M, Kishida A, Shimotakahara T, Matsumoto H, Nishijima H, Akashi M, Aikou T (1994) Experimental study of bioactive polyurethane sponge as an artificial trachea. *ASAIO* 40 (3): 412-418
815. Yeager VL, Archer CR (1982) Anatomical routes for cancer invasion of laryngeal cartilages. *Laryngoscope* 92: 449-452
816. Yi-Qing C, Bjermer L, Frojd O, Nettelbladt O, Karlsson-Parra A, Henriksson R (1995) Effects of IL-2 treatment on different compartments of the irradiated rat lung analysed by bronchoalveolar lavage and lung tissue morphology. *Eur Respir J* 8 (11): 1872-1878
817. Zackheim HS, Zurcher C, Krutovskikh VA, Troyanovsky SM (1990) Tumors of the skin. *In: Pathology of tumors in laboratory animals (Turusov VS & Mohr U, Hrsg.)*, Vol. I, Tumors of the rat. Scientific publication No. 99, IARC, Lyon
818. Zaia AA, Almeida OP, Line SR (1997) Immunochemical analysis of laminin in duct-ligated submandibular glands of rats. *J Oral Pathol Med* 26: 451-453
819. Zantut-Wittmann DE, Boechat LH, Pinto GA, Zollner RL, Trevisan MA, Vassallo J (1999) Alteration of the follicular basement membrane in non-obese diabetic mice with spontaneous autoimmune thyroiditis. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31 (4): 581-583
820. Zeilstra LJ, Vissink A, Konings AW, Coppes RP (2000) Radiation induced cell loss in rat submandibular gland and its relation to gland function. *Int J Radiat Biol* 76: 419-429
821. Zhang K, Gharaee-Kermani M, Mc Garry B, Phan SH (1994) In situ hybridization analysis of rat lung alpha 1(I) and alpha 2(I) collagen gene expression in pulmonary fibrosis induced by endotracheal bleomycin injection. *Lab Invest* 70 (2): 192-202
822. Zhao W, O'Malley Y, Wei S, Robbins ME (2000) Irradiation of rat tubule epithelial cells alters the expressions of gene products associated with the synthesis and degradation of extracellular matrix. *In J Radiat Biol* 76 (3): 391-402
823. Zimmermann JS, Budach W, Müller RG (2000a) Strahlentoleranz der Normalgewebe - Individuelle Varianz und Vorhersage. *In: Nebenwirkungen in der Radioonkologie (Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Hrsg.)*, Urban & Vogel Verlag, München, 33-44
824. Zimmermann JS, Dörr W, Seegenschmiedt MH (2000b) Nebenwirkungen in der Radioonkologie - Ein Überblick. *In: Nebenwirkungen in der Radioonkologie (Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Hrsg.)*, Urban und Vogel Verlag, München, 24-32
825. Zöllner C, Strutz J, Bruggmoser G, Knuferrmann H, Schäfer HE (1988) Implantation of 125 iodine seeds in the dog vocal cord. An experimental morphologic study. *Laryngol Rhinol Otol Stuttg* 67 (9): 475-479

8 Thesen

1. Gemäß der modifizierten Klassifikation nach Seifert (**Tab. 14**) fanden sich bei nach einem humantherapeutisch relevanten Protokoll (2 Gy/Tag) direkt strahlenexponierten Rattensubmandibulardrüsen (GSM) überwiegend späte Stadien 1 nach 20 Gy, Übergangsstadien 1-2 nach 40 Gy und Stadien 2 nach 60 Gy Gesamtdosis. Nur ausnahmsweise bestand ein Terminalstadium. Die zunehmende dosisabhängige Strahlenreaktion der GSM war auch bei den geringeren Gesamtdosen zumeist nicht latenz- oder altersabhängig. Dies weist auf den Dosiseinfluss und daneben auf die Dauerhaftigkeit der Strahlenreaktion hin, indem auch noch ein Jahr nach Ende der RT (bis auf geringe Restitutionstendenzen nach 20 Gy- und 40 Gy-Exposition) morphologische Gewebealterationen auffielen. Das gewählte Strahlenprotokoll erscheint dennoch geeignet, Maximalausprägungen radiogener GSM-Reaktionen zu reduzieren.

2. Cytokeratine (CK) bzw. Intermediärfilamentproteine (IF-Proteine) zeigen ein differenzierungsabhängiges Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen. Als intrazelluläres Stützgerüst spielen sie eine wichtige Rolle bei der mechanischen Stabilisation der Einzelzelle und des epithelialen Gewebeverbandes. Das CK/IF-Proteinexpressionsmuster einer direkt exponierten GSM zeigte oberhalb einer Exposition mit 20 Gy zumeist eine gesteigerte Expression für die CK 5/6, 8, 13, 13/15/16, 17/19, 18 und das IF-Protein Vimentin, die nach 60 Gy-Exposition am deutlichsten ausgeprägt war. Die zelltypspezifische Expression blieb weitgehend erhalten. Eine echte Neoexpression ließ nicht beobachten. Tieralter und Latenz der RT spielten nur eine untergeordnete Rolle und verdeutlichten den Einfluss der RT und der RT-Dosis. Das deutet auch im Gewebeverband daraufhin, dass die RT auf „CK/IF-Proteinebene“ Veränderungen bewirkt, die durch Phänomene wie z. B. einen vermehrten CK/IF-Proteingehalt, veränderte Proteinkonfigurationen, erhöhte Antikörperzugänglichkeit und Filamentdestruktionen erklärt werden können.

3. Basalmembranen (BM) sowie BM-assoziierte Proteinverbindungen, die spezialisierte Strukturen der extrazellulären Matrix (ECM) darstellen, beeinflussen Zelldifferenzierung, Zellpolarisation, Zellmigration sowie die Zellproliferation und spielen eine wichtige Rolle bei der mechanischen Stabilisierung und Kompartimentierung der Gewebsstrukturen. Sowohl die interstitiellen Kollagene (C) I und III als auch die BM-Komponenten Laminin und CIV und das BM-assoziierte Fibronectin zeigten v. a. positiv dosisabhängige Expressionssteigerungen mit verbreiterten und verstärkten Färbereaktionen sowie Konglomeratbildungen in direkt strahlenexponierten GSM, die nach Exposition mit 60 Gy am stärksten waren. Dies deutet darauf hin, dass die sich entwickelnde radiogene Fibrose nicht auf Anhäufungen der interstitiellen Kollagene allein zurückzuführen ist, sondern auch spezialisierte Strukturen der ECM wie BM mit einzubeziehen sind. Die radiogenen BM-Expressionsveränderungen lassen es denkbar erscheinen, dass durch Alterationen dieser die Gewebeintegrität normalerweise aufrechterhaltenden Strukturen Gewebeumbauvorgänge nach RT mit erklärt werden können.

4. Alle Tiere zeigten eine Gewichtszunahme von im Mittel 282 g (Ausgangs-KG) auf ein mittleres KG von 480 g (End-KG), die jedoch bei bestrahlten Tieren, insbesondere den mit 60 Gy exponierten Tieren, signifikant geringer ausfiel. Diese geringere KG-Zunahme war v. a. im Langzeitverlauf evident, da es während der eigentlichen Bestrahlungszeit nur zu einer tendenziell geringeren KG-Zunahme gegen Ende der RT-Serie (6 Wochen nach RT-Beginn) bei 60 Gy exponierten Tieren kam. Das unterstreicht die Notwendigkeit, auch langfristig den Allgemeinzustand zu dokumentieren. Das Gewicht linksseitig direkt exponierter Ratten-GSM lag insbesondere nach 60 Gy Exposition signifikant unter dem von Kontrollen bzw. rechtsseitigen GSM strahlenexponierter Tiere. Dieser im Wesentlichen von der RT, nicht hingegen von Alter oder Latenz der RT abhängige Befund unterstützt die für Späteffekte beschriebenen Parenchymhypoplasien.

5. Mit Hilfe immunhistologischer Techniken wurde weiterhin die Expression des proliferationsassoziierten Antigens Ki-67 in den GSM und teilweise den Gl. sublinguales (GSL) untersucht, da Normalgewebsreaktionen durch Proliferationsstörungen miterklärt werden. Die Proliferationsrate (PR) war bei bestrahlten Tieren insgesamt gering erhöht, was neben der RT insbesondere vom Zeitverlauf abhängig war. Besonders nach Gesamtdosen von 20 Gy und 60 Gy zeigten sich v. a. 6 Monate nach RT erhöhte PR, die späterhin (12 Monate nach RT) wieder absanken und sich den Vergleichswerten von unbestrahlten Drüsen näherten. Dieses Verhalten war insbesondere in den GSM nachweisbar, wohingegen die GSL nur einen tendenziellen PR-Anstieg zeigten. Dies unterstützt einerseits das Konzept einer wenigstens passageren Proliferationsveränderung i. B. strahlenexponierter Normalgewebe und spricht andererseits für eine geringere Strahlenreagibilität rein muköser Drüsen wie der GSL. Bemerkenswert erscheint, dass die PR-Änderung beide GSM betraf, obwohl nur eine Seite direkt strahlenexponiert war. Dies könnte auf einem möglichen Streustrahlungseffekt beruhen, daneben aber auch mit einer möglichen organismusbezogenen allgemeinen RT-Wirkung zusammenhängen.

6. Während der Untersuchungen wurde eine extrakranielle Tumorentwicklung beobachtet. Neben 9 benignen Tumoren [(TM); ein TM i. B. der großen Speicheldrüsen (SD) eines bestrahlten Tieres, 8 TM bei nicht bestrahlten Tieren i. B. der Milchleiste] fanden sich 9 maligne TM i. B. der großen SD, 3 maligne Neoplasien i. B. der Milchleiste und 2 weitere Malignome i. B. der Maxilla. Die Lokalisation und die Histologie (PECA, Adenokarzinome) der malignen TM erschienen ungewöhnlich, da für „strahlenassoziierte“ maligne TM überwiegend Ursprungsorte i. B. der Haut und des Subkutanegebietes genannt werden und sonstige TM wie Sarkome oder Karzinosarkome fehlten. Die relativ kurze Latenzzeit (im Median 6 Monate) wies auf eine recht frühe und insbesondere in den SD-Parenchymzellen auftretende maligne Transformation hin. Die gutartigen TM und die wenigen bösartigen Milchleisten-TM bei unbestrahlten Tieren sind den bei Laborratten, insbesondere im höheren Alter häufig anzutreffenden „Spontantumoren“ der Brustregion bzw. der Milchleistenregion zuzuordnen. Daher sind nicht nur Sarkome, sondern unter Umständen auch relativ früh auftretende Karzinome

verschiedener Ursprungsgewebe (SD, Maxilla, Milchleiste) im möglichen Zusammenhang mit einer RT zu beachten. Im Falle sehr aggressiver TM könnte das unterschiedliche Therapiestrategien indizieren.

7. Das CK-Expressionsmuster der TM, die histomorphologisch z. T. durch sehr ungewöhnliche Wachstums- und Zellmuster gekennzeichnet und dadurch schwierig zu interpretieren waren, unterstützte in vielen Fällen die Auswertung und erlaubte die Zuordnung zu epithelialen Ursprungsgeweben. CK-Expressionsprofile können somit auch an Rattengeweben zur TM-Differentialdiagnostik beitragen. Bezüglich der ECM-Expression existierte kein einheitliches Muster. Einerseits zeigten sich verbreiterte BM mit vermehrten Immunreaktionen (Adenokarzinome). Andererseits konnten schwache BM-Expressionen (PECA, adenoidzystische Karzinome), BM-Verluste (PECA) und BM-Fragmente (PECA, Zystadenokarzinome, mikrozystisches Adenokarzinom) herausgearbeitet werden, insbesondere in verstärkt anaplastischen TM-Arealen. Weiterhin wurden BM-Konglomerate beobachtet. Trotz der ungewöhnlichen TM-Wachstumsmuster können die, vor allem in undifferenzierten TM-Arealen beobachteten ECM-Irregularitäten auf eine Dedifferenzierung des TM-Gewebes hinweisen.

8. Bei der Hirnsektion wurden zumeist als Zufallsbefunde Hypophysenadenome entdeckt. Die Rate von 15% bei bestrahlten Tieren betrug etwa die Hälfte der zu erwartenden spontanen Hypophysenadenome bei Ratten, wobei jedoch die TM früher als erwartet auftraten. Dies sprach für ein beschleunigtes Auftreten nach RT. Dass die TM überwiegend nach geringeren Gesamtdosen beobachtet wurden, deutete auf die mögliche Gefahr von früheren TM-Entstehungen selbst nach geringerer Dosis hin. Da es sich jedoch um Zufallsbefunde nach vorbestimmten Nachuntersuchungszeiten handelte, konnten für längere Nachbeobachtungszeiten mögliche Hypophysenadenomratenanstiege auch nach höherer Strahlenexposition nicht ausgeschlossen werden. Die Empfehlung einer allgemeinen Sektion zur Überprüfung der Untersuchungsbedingungen bei experimentellen Studien an Ratten kann dahingehend ergänzt werden, dass insbesondere bei experimenteller Kopf-Hals-RT die Hirnautopsie routinemäßig erfolgen sollte. Da 5 unserer 9 Tumoren endokrin aktiv waren und Hormone produzierten, ist auch bei unauffälliger klinischer Symptomatik für die Verlaufskontrolle von strahlentherapierten Patienten, deren Gehirn oder Hirnanteile im Strahlenfeld lagen, die chemische Kontrolle der Hypophysenleistung nach wie vor anzuraten.

9. Im Laryngo-Trachealbereich, welcher dosisabhängig und nach Alter und Latenz ausgewertet wurde, fanden sich histomorphologische Veränderungen zumeist erst nach einer Exposition von 40 Gy, wobei sich die Befunde bezüglich der Ausprägung und der Inzidenz bei den Dosisgruppen nach 40 und 60 Gy-Exposition etwas unterschieden (**Tab. 51**). Es dominierten Lymphgefäßektasien, Ödeme, Blutgefäßdilatationen, interstitielle Zellinfiltrate, Fibrosen, supraglottische pseudopapilläre Formationen sowie Drüsenveränderungen, wohingegen Knorpel- und Knochennekrosen, ödematöse Obst-

raktionen, obturierende Blutgefäß- und Lymphgefäßsklerosen sowie schwerwiegende Epithelveränderungen der auskleidenden Schleimhäute fehlten. Die insgesamt geringe bis moderate Befundausprägung kann als Folge eines fraktionierten RT-Protokolls mit konventioneller Fraktionsdosis und der Unterschreitung der sog. Toleranzdosis in einem komplexen Organverband interpretiert werden, während die Befundpersistenz bis 12 Monate nach RT daraufhin weist, dass auch geringere Veränderungen bei Spätreaktionsmustern in Normalgeweben mit einzubeziehen sind. Hierbei ist in Bezug zur Klinik von besonderen Interesse, dass Ödeme, wenn auch nicht massiv und obstruierend, zum regelmäßig auftretenden Bild radiogener Spätreaktionen gehören.

10. Das normale CK-Profil im Laryngo-Trachealbereich bestätigte im wesentlichen die aus humanen Gewebe bekannten sowie speziell für die Rattenspezies mitgeteilten Expressionsmuster. Hingegen war die CK-Expression bei bestrahlten Tieren ausgesprochen heterogen. Dies betraf einerseits lokalisationsdifferente Strahleneffekte, was mit unterschiedlicher Strahlenreagibilität verschiedener Zelltypen und Gewebe zusammenhängen könnte. Andererseits kam die Heterogenität in radiogenen zu- bzw. abnehmenden und in dosisabhängigen, wechselnden Expressionsprofilen zum Ausdruck. Dieses heterogene Expressionsmuster betraf ebenso das IF-Protein Vimentin. Dies deutet daraufhin, dass die in vitro beschriebenen IF-Proteinalterationen auch im Gewebe eine Rolle spielen. Je nach Schädigungs- bzw. Umstrukturierungsstatus könnten damit verstärkte wie auch verminderte Expressionen erklärt werden.

11. Für das interstitielle CIII überwog im Laryngo-Trachealbereich lokalisations- und dosisabhängig eine gesteigerte und mehr verbreiterte Immunreaktivität. Dies ergänzt den Begriff der radiogenen Fibrose dahingehend, in dem neben CI ein weiteres fibrilläres Kollagen auch im Laryngo-Trachealbereich vermehrt exprimiert wird. Die beiden BM-Bestandteile Laminin und CIV zeigten dosisabhängig einerseits Expressionssteigerungen, zumeist oberhalb einer Exposition von 20 Gy. Diese waren insgesamt leicht bis z. T. mittelgradig ausgeprägt und je nach Parenchymstruktur unterschiedlich häufig und unterschiedlich deutlich. An einzelnen Geweben waren jedoch auch verringerte Immunreaktivitäten festzustellen. Weniger bei Laminin, deutlicher beim CIV waren die Expressionsprofile durch auffällige, dosisabhängige Fluktuationen gekennzeichnet. Das BM-assoziierte Fibronectin zeigte dosisabhängige und oberhalb einer Exposition mit 20 Gy zunehmende Reaktivitäten bei verschiedenen Lokalisationen. Wesentliche Alters- und Latenzeffekte ließen sich nicht nachweisen. Auch wenn im Zeitverlauf keine nennenswerten Veränderungen auftraten, können in den lokalisations- und dosisabhängigen Expressionsveränderungen radiogene ECM-Umgestaltungsprozesse zum Ausdruck kommen. Zu der eher geringgradigen Expressionsveränderung trägt vermutlich neben der Toleranzdosisunterschreitung die komplexe Organstruktur des Laryngo-Trachealbereichs und das fraktionierte RT-Schema mit Vermeidung hoher Einzeldosen bei.

12. Sowohl CK/IF-Proteine als auch BM-Strukturen sind neben den mit dem Begriff der radiogenen Fibrose verbundenen Kollagenveränderungen in den morphologisch und immunhistochemisch dokumentierten Prozess der Umstrukturierung nach Strahlenexposition mit einzubeziehen. Diese Befunde können wenigstens teilweise zur Erklärung der klinischen Normalgewebsreaktionen mit Strukturveränderungen (z. B. den häufigen Larynxödemen) und Funktionsstörungen (z. B. Dysphonien) beitragen.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sylva Bartel-Friedrich
Geburtsdatum: 21. Februar 1960
Geburtsort: Lüchow
Eltern: Erhard Bartel, Oberpostrat
Verstorben 1994
Rosemarie Bartel, geb.
Grundmann, Drogistin/
Bibliothekarin



Schulbildung

1966 – 1969 Grundschule Lüchow
1969 – 1978 Gymnasium Lüchow
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

1979 – 1985 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin

Beruflicher Werdegang

6.1985 – 9.1987 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pathologie und Paidopathologie im Klinikum Charlottenburg der FU Berlin (Direktor: Prof. Dr. S. Blümcke)

10.1987 – 9.1994 Wissenschaftliche Assistentin an der HNO-Klinik im Klinikum Benjamin Franklin (Direktor: Prof. Dr. H. Scherer) der FU Berlin (UKBF)

In dieser Zeit:
10.1987 – 4.1989 Schwerpunktätigkeit als wissenschaftliche Assistentin in der Abteilung für Phoniatrie und Pädaudiologie im UKBF
4.1993 – 9.1994 (Leiterin: OÄ Dr. I. Törring; Leiter ab 1989: Prof. Dr. M. Gross)

1988 Promotion

1991 Zusatzbezeichnung: Stimm- und Sprachstörungen

Seit 3.1993 FÄ für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

Seit 9.1994 FÄ für Phoniatrie und Pädaudiologie

Seit 10.1994 Leitende Oberärztin der Sektion Phoniatrie und Pädaudiologie an der Universitätsklinik und Poliklinik für HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. A. Berghaus; komm. Leiter ab 4.2003: PD Dr. M. Bloching)

Seit 1995 Weiterbildungsbefugnis: Stimm- und Sprachstörungen
Seit 1999 Weiterbildungsbefugnis: Phoniatrie und Pädaudiologie

Halle, d. 23. 8. 2003

Dr. med. S. Bartel-Friedrich

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. A. **Berghaus** sowie den Herren Prof. Dr. H. **Scherer** (Direktor der HNO-Klinik der Charité Berlin) und Prof. Dr. M. **Gross** (Direktor der Klinik für Phoniatrie & Audiologie der Charité Berlin) danke ich für die fortwährende Unterstützung bei meiner klinischen Ausbildung zur HNO-Ärztin und FÄ für Phoniatrie & Pädaudiologie sowie für die wertvollen Anregungen und Diskussionen bei der Bearbeitung dieses Forschungsthemas. Herrn PD Dr. M. **Bloching** (Kommissarischer Leiter der HNO-Klinik der MLU) danke ich für die Fortführung der Unterstützung und weitere konstruktive Anregungen bei der Erstellung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. Dr. R. E. **Friedrich** gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, wesentliche methodische Untersuchungen im immunhistochemischen Labor der MKG-Chirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchführen zu können sowie für dauerhafte und freundschaftliche Unterstützung während der gesamten Zeit. Den Herren Prof. Dr. **Beck-Bornholdt** und PD Dr. F. **Zywietz**, Institut für Biophysik und Strahlenbiologie der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. Jung), danke ich für die Beratung und Unterstützung bei den Bestrahlungsexperimenten. Herrn Dr. **Dimigen**, Leiter der Abteilung für Versuchstierhaltung des UKE, und seinen Mitarbeitern danke ich für die Betreuung der untersuchten Tiere. Den Pathologen Prof. Dr. HJ. **Holzhausen** (kommissarischer Leiter des Pathologischen Institutes der MLU), Prof. Dr. R. **Moll** (Direktor des Pathologischen Institutes der Philipps-Universität Marburg), Prof. Dr. H. **Arps** (Direktor des Pathologischen Institutes des Klinikums Fulda) und Prof. Dr. W. **Saeger** (Direktor des Pathologischen Institutes des Marienhospitals Hamburg) gilt mein aufrichtiger Dank für die unermüdliche Unterstützung und Supervision bei der Auswertung der histologischen Präparate. Frau Dr. **Lautenschläger** vom Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der MLU danke ich für die intensive Beratung bei der statistischen Aufarbeitung. Für die Anfertigung der histologischen und aufwendigen immunhistologischen Färbungen bedanke ich mich weiterhin bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau B. **Makareinis** und Frau A. **Voigt** (Mitarbeiterinnen der Klinik für MKG-Chirurgie des UKE) sowie Frau E. **Wolfsteller** und Frau O. **Pietz** (Mitarbeiterinnen der HNO-Klinik der MLU). Darüberhinaus gilt mein Dank allen Mitarbeitern der HNO-Klinik, insbesondere der Sektion Phoniatrie & Pädaudiologie, sowie der Doktorandin Frau N. **Hieke**, die mich mit Rat und Tat unterstützten und zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Hier sind besonders Frau Dr. C. **Welzel**, Frau Dr. W. **Vorwerk**, Frau Dr. C. **Rasinski**, Frau D. **Pilchowski**, Frau U. **Sievert** und Herr M. **Nussbaum** zu nennen. Zu guter Letzt danke ich Herrn Prof. Dr. J. **Dunst** (Direktor der Klinik für Stahlentherapie der MLU) für die konstruktive Ermutigung während der Abschlussphase dieser Arbeit sowie meinen Freunden S. **Neufeld**, C. **Schneider**, S. **Fenzel** und Dr. M. **Passmann**, die mit Verständnis den Freiraum zur Vollendung dieser Arbeit gaben und viel ihrer eigenen freien Zeit opferten. Die Arbeit wurde teilweise durch eine Sachmittelbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht (DFG-Projekt FR 1035/1-1 und 1-2).

11 Anhang

Tab. 1: wesentliche Bestandteile der Grundsubstanz der ECM

Grundsubstanzart		Vorkommen
Proteoglykane (PG)		ubiquitär
	Hauptklassen	
= Glukosaminoglykane (GAG) = kovalent an Proteine gebundene Polysaccharidketten (früher: Mukopolysaccharide)	Hyaluronsäure 2,5µm langes Molekül Mol.-Gewicht: 10^6 Disaccharid-Einheiten aus: N-Azetylglukosamin+Glukuronsäure Nicht sulfatiert	Geringes Vorkommen in vielen Geweben, für PG-Aggregate wichtig, viel in der Gelenkflüssigkeit und im Glaskörper
	Chondroitinsulfat Mol.-Gewicht: 30.000 Disaccharid-Einheiten aus: N-Azetylgalaktosamin+Glukuronsäure Sulfatiert	Allgemein gering im lockeren Bindegewebe, aber viel im Knorpelgewebe; Basalmembranen
	Dermatansulfat Mol.-Gewicht: 30.000 Disaccharid-Einheiten aus: N-Azetylgalaktosamin4-Sulfat+L-Iduronsäure Sulfatiert	Vor allem Sehnen, Haut, Aortenwand
	Keratansulfat Geringes Mol.-Gewicht Disaccharid-Einheiten aus: N-Azetylglukosamin6-Sulfat+Galaktose Sulfatiert	Hornhaut, Knorpel- und Knochengewebe
	Heparansulfat Mol.-Gewicht: etwa 15.000 Disaccharid-Einheiten aus: N-Azetylglukosamin+ Glukuronsäure+z. T. L-Iduronsäure Sulfatiert	Vor allem Aorta, Leber, Lunge; Basalmembranen
		⇒ Die jeweiligen Hauptklassen werden als Proteoglykan-Untereinheiten zu PG-Aggregaten zusammengefügt

Tab. 2: wesentliche Fasern der ECM

Faserart	Helixlänge [nm]	Struktur	Vorkommen	
Kollagene	Typ I "Reißkollagen"	300	Fibrillen mit 68nm-Periode	Sehr weit verbreitet: v. a. Knochenmatrix, Sehnen/Bänder, Dentin, Haut, Blutgefäße (bes. Gefäßadventitia), Septen parenchymatöser Organe
	Typ II "Knautschkollagen"	300	Kleine Fibrillen mit 68nm-Periode	Hyaliner Knorpel, Corpus vitreum, Nucleus pulposus der Bandscheibe
	Typ III "Rutschkollagen"	300	Kleine Fibrillen mit 68nm-Periode Früher: Retikulinfasern, argyrophile Fasern	Etwa wie Typ I, aber kaum im Knochen (nur Endost entlang der Knochenbälkchen, nicht in der osteoiden Knochenmatrix), sehr wenig in Sehnen/Bändern (nur Peri- und Epitendineum) aber feine Stützgerüste in vielen Organen, um glatte Muskelzellen und Nerven, in Blutgefäßwänden (bes. Media und Intima), bes. viel in lymphatischen Geweben; 30% des Dermiskollagens
	Typ IV	390	Nichtfibrilläre Netzwerke keine periodische Querstreifung	Basalmembranen
	Typ V	300	Sehr dünne und kurze Fasern	In den meisten Bindegeweben (häufig etwa wie Typ I), hoher Anteil in Amnion, Chorion, Muskulatur, Sehenscheiden; Knochen: end-ostal, um Osteozyten, entlang der Canaliculi der Osteozyten, nicht in der osteoiden Matrix
	Typ VI	105	Mikrofibrillen mit 100nm-Perioden (mikrofibrilläre Netzwerke)	Weite Verbreitung im Bindegewebe, zumeist in Assoziation mit den interstiellen Kollagenen I, III und V, höhere Anteile in der Aortenwand Verknüpfung von Kollagenfibrillen, Zellen und BM
	Typ VII	450	Antiparallel angeordnete Dimere, nicht fibrillär	Verankerungsfibrillen zwischen BM und bindegewebigem Stroma im Bereich platten-epithelialer Haut- und Schleimhautgewebe
	Typ VIII	?	?	Endothelien
	Typ IX	200	Aggregate mit hoher Molekularmasse	Knorpelgewebe
	Typ X	150	Kleine Fibrillen	Epiphysenscheibe (Zone des großblasigen Knorpels)
	Typ XI	300	Kleine Fibrillen	Knorpelgewebe

Tab. 2 (Fortsetzung)

Faserart	Struktur	Vorkommen
Elastische Fasern	Glykoprotein-Mikrofibrillen von 10-12nm Durchmesser (0,010-0,012µm) und Elastin (homogene Komponente), keine periodische Querstreifung	In vielen Organen, bes. Gefäßwände (insbes. Aortenwand), elastischer Knorpel, elastische Bänder (Ligamenta flava, Stimmlippe, Conus elasticus)

Tab. 3: weitere Bestandteile der Grundsubstanz der ECM

Grundsubstanzart	Struktur	Vorkommen
Glykoproteine	Polypeptidketten mit geringem Kohlenhydratanteil, der aus verzweigten KH-Ketten mit unterschiedlichen, periodisch eingebauten Monosacchariden besteht	In äußerst geringen Mengen im Bindegewebe
Wasser Gebunden von den großen polyanionischen KH-Molekülen der GAG		Ubiquitär
Sowie Salze, niedermolekulare Substanzen= kleine Moleküle, Gase und Ionen		

Feinstrukturierung der Intermediärfilamentproteine (IF-Proteine)

Gemeinsam ist den Mitgliedern dieser Multi-Gen-Familie eine zentrale stabförmige Domäne (310 bis 315 Aminosäuren) mit sekundärer α -helikaler Konformation. Durch laterale Assoziation der α -helikalen Mitteldomänen (Ausbildung einer „coiled-coil“-Formation) werden aus 4 Proteinmolekülen über Dimere Tetramerkomplexe gebildet, welche die Grundbaueinheit der IF darstellen. Durch End-zu-End-Anlagerung der Komplexe und dann weitere laterale Assoziation wird das Intermediärfilament aufgebaut. Beidseits den α -helikalen Anteil flankierend weisen die IF-Proteinketten noch jeweils ein in Länge und Aminosäuresequenz sehr variables, nicht helikales Kopfstück und Schwanzstück auf, welche aus dem Filamentkern herausragen und vermutlich Wechselwirkungen mit anderen Proteinen erlauben.

Charakteristische Merkmale und Einteilung der 7 IF-Proteinklassen

CK	Die CK-Filamente sind der IF-Typ der Epithelzellen. Sie besitzen eine hohe molekulare Komplexität und die einzelnen Proteine werden differenzierungsspezifisch in den verschiedenen Epitheltypen exprimiert.
Vimentin	Vimentin (Molekulargewicht: 57.000) ist typisch für mesenchymale Zellen z. B. Fibroblasten, Fettgewebszellen, hämatopoetische Zellen, Leukozyten und Endothelien. Zusammen mit Desmin kommt es auch in manchen vaskulären Muskelzellen, mit Gliafilamenten in Astrozyten und mit Neurofilamenten in embryonalen Nervenzellen vor. Bedeutsam ist die Koexpression mit CK in bestimmten epithelialen Zellen (z. B. Myoepithelien) sowie in seltenen nichtepithelialen Zelltypen. Die Koexpression mit CK wird auch vielfach bei Epithelien in der Zellkultur beobachtet.
Desmin	Desmin (Molekulargewicht: 53.000) ist weitgehend spezifisch für glatte und quergestreifte Muskelzellen. Ausnahmen wurden für nichtmuskuläre Zellen wie extrafollikuläre (fibroblastische) Retikulumzellen des Lymphknotens und Mesothelien beschrieben.
Gliafilamentprotein	Gliafilamentprotein (Molekulargewicht: 51.000) ist typisch für Gliazellen, vor allem Astrozyten, Bergmann-Glia, Tanyzyten des Ependyms, oft zusammen mit Vimentin. Es kommt aber auch teilweise in Schwann'schen Zellen peripherer Nerven sowie in Chondrozyten vor. Ebenso ist es in Koexpression mit Vimentin und CK in bestimmten Epithelien, vor allem in Myoepithelien nachweisbar.
Neurofilamente	Die Neurofilamente sind wesentliche Strukturbestandteile von Nervenzellen. Die Tripletproteine (Molekulargewicht: 68.000, 160.000, 210.000) tragen lange carboxyterminale Schwanzstücke, die in den Axonen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit Mikrotubuli spielen. Auch α -Internexin gehört zu den Neurofilamenten.
Peripherin	Peripherin (Molekulargewicht: 58.000) ist ebenfalls nervenzellspezifisch und wird bevorzugt in peripheren Neuronen exprimiert.
Nestin	Nestin (Molekulargewicht: 200.000) wurde in neuroepithelialen Stammzellen gefunden.

Tab. 4: CK-Expressionsmuster der Rattenspeicheldrüse (modifiziert nach Mori 1991 & Gustafsson et al. 1998)

Drüsenzellen AK	Azini	Sekretorische Tubuli	Schaltstücke	Streifenstücke
RGE53 (CK 18)	1 (ZG: 2)	3 (ZG)	5-6	1
RPN1162 (CK7)	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv
K8.60 (CK 10, 11)	1	3-4	1	1
RPN1160 (CK 18)	1	2 (ZG)	3-4	4
RPN1164 (CK 8)	1 (ZG: 2)	1	4	3
RPN1166 (CK 8)	1	1-2	6	3

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = leicht 4 = moderat 5 = stark 6 = sehr stark
 ZG = Zellgrenzen positiv = luminale Region von sekretorischen Drüsenepithelien (keine spezifischen
 Angaben zur Färbeintensität: „considerable extent“) AK = Antikörper

Tab. 5: Typische CK-Expressionsmuster der Epithelien im Laryngo-Trachealbereich und Bronchialbereich (nach Schlage et al. 1998, Evans et al. 1993) bzw. Bronchialbereich (nach Kasper et al. 1993) der Ratte und bei Humangeweiben (unterer Teil)

	Basalzellen	Flimmerepithel*	Drüsen	Autor
Trachea	5/8, 14, 13/16, 19			Evans et al. 1993
	7, 14, 15, 18, 19	7, 8, 15, 18, 19	14, 15, 18, 19	Schlage et al. 1998
Bronchien		8, 18, 19 7 (fokal+schwach), 4 (EZ)		Kasper et al. 1993
Trachea und Bronchien	5, 14, 15, 17, 19	7, 8, 18, 19 4+13 (heterogen+ schwach)		Moll 1993 und Seifert 1996

EZ = Einzelzellen

*Vimentin (Humangewebe): EZ, besonders basaler Pol

Tab. 5: (Fortsetzung)

Larynx	Basalzellen	Kuboide Zellen	Squamoide Zellen	Flimmerepithel	Drüsen	Autor
Dorsale Hälfte	14, 15	14, 15, 8, 18, 19		14, 15, 8, 18, 19		Schlage et al. 1998
Ventrale Hälfte und „ventral pouch“	4, 14, 15, 19	4, 13, 14, 15, 8, 18, 19	4, 13, 14, 15, 8, 18, 19		14, 15, 7, 8, 18, 19	
Larynx (Human- gewebe)		Plattenepithel				
	19	13, 19 (suprabasal betont)		8, 19 (BZ: 19)		Saito 1994
	5, 14, 19, 8/18	4, 13, 6/16 (suprabasal)				Moll 1993 (für Mund- und Rachenschleimhaut)
	7 (schwach), 19	13 (parabasale+intermediäre Zellen), 8 (intermediäre+superfizielle Zellen), 19 (alle Schichten)		7, 8, 18, 19, 13 (incl. BZ)	8, 19, 7 13 (schwach)	Meister & Görtchen 1994 (Grenzzonenepithel: 13, 19; Deckzellen: nur 8)
	5, 6, 16, 18, 19	4, 5, 6, 13, 16 18, 19 (suprabasal betont)		7, 8, 18, 19 (BZ: 4, 5, 6, 16, 18, 19)		Lobeck et al. 1986 & 1988 (Transitionalzellen: wie PE+BZ, bes. stark 18+19 in allen Schichten)

Charakteristische Merkmale der wesentlichen Komponenten der BM und BM-assoziierten Matrix sowie des angrenzenden Interstitiums

Das klassische **Laminin** (Glykoprotein) wird in der internen und externen Lamina rara lokalisiert und gilt als Haftprotein für endotheliale und epitheliale Zellen zum Kollagen IV. Das relativ große Glykoprotein (MG 99 kDa) besitzt eine kreuzartige Molekülstruktur und zeigt mit 3 kurzen Armen eine Bindungsaktivität zum Kollagen IV und mit dem langem Arm zu HPSG. Es spielt eine wichtige Rolle beim Zellwachstum, bei der Zellpolarisierung und Zelldifferenzierung (über einen spezifischen Lamininrezeptor an der Zelloberfläche) sowie bei der Adhäsion von der BM aufsitzenden Zellen.

Kollagen IV stellt die wesentliche strukturelle Komponente der BM im Sinne eines dreidimensionalen polygonalen Netzwerkes dar und ist vorwiegend in der Lamina densa, weniger kompakt auch in der Lamina rara lokalisiert. Die nicht fibrillären Netzwerke werden von Molekülen mit einer Größe von ca. 550 kDa und einer Länge von 400 nm aufgebaut, die über weite Bereiche in einer Tripelhelix mit üblicherweise 2 verschiedenen Peptidketten ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) organisiert (mechanische Stabilitätsgewährleistung) und mit 4 nichthelikalen Domänen strukturiert sind. Die Peptidketten weisen zudem häufige Unterbrechungen auf, was Elastizität und Flexibilität fördert, aber auch für proteolytische Enzyme anfälliger macht. Es enthält mehr hydroxylierte Aminosäuren und mehr Oligosaccharide als die interstitiellen Kollagene, meistens Glukosyl-Galaktosyl-Gruppen. Die kollagenen Moleküle lagern sich zu Oligomeren zusammen, was in situ durch die Ausbildung kovalenter Quervernetzungen stabilisiert wird, woraus sich das Netzwerkmodell ableitet.

HPSG (MG 200 – 400 kDa) zeigen sich als 100 nm lange, und um 60 nm zueinander versetzte Fäden oder als 10 – 20 nm große Granula, z. T. in der Lamina densa, wohl aber bevorzugt auch in beiden Laminae rarae. Sie leisten einen Beitrag zur selektiven Permeabilität (Filterfunktion der BM), in dem die negative Ladungsausrichtung die ladungsabhängige Filterfunktion gewährleistet (im Bereich der glomerulären BM). Daneben vermitteln sie den Zellmembrankontakt zur Interzellulärsubstanz. Bei diesen Zellmembran-Matrix-Kontakten greifen sie auf ihre hohe Bindungsfähigkeit zu Lamininmolekülen zurück (bis zu 10 Lamininmoleküle werden durch ein HPSG-Molekül gebunden).

Entaktin und Nidogen entsprechen sulfatierten Glykoproteinen (MG 150 kDa). Beide zeigen Kopräzipitationen bzw. Bindungsaktivitäten zu Laminin, was auf eine Komplexbildung der Makromoleküle mit Laminin in vitro hinweist. Sie sind somit bevorzugt in der Lamina rara zu lokalisieren. Die Bedeutung ist z. T. noch spekulativ. Die Assoziation mit Laminin weist jedoch auf Bedeutungen bei der Zell-Matrix-Interaktion und bei der Verknüpfungsreaktion zwischen Laminin und Kollagen IV-Molekülen hin.

Charakteristische Merkmale der wesentlichen Komponenten der BM und BM-assoziierten Matrix sowie des angrenzenden Interstitiums (Fortsetzung)

Kollagen VII besitzt eine tripelhelikale Sequenz (Domäne) mit einer Länge von 450 nm, welche an den Enden globuläre Segmente zeigt. Durch Kopf-an-Kopf-Lagerung werden 2 Moleküle verknüpft und Dimere gebildet. Durch weitere laterale Assoziation werden Bündel geformt, von denen ein Ende in der Lamina densa verankert ist, während das gegenüberliegende Ende in „Verankerungsplatten“ mit anderen Verankerungsfibrillen und Kollagen IV interagiert. Zusätzlich werden die Bündel durch Fibrillen der interstitiellen Kollagene I, III und V, eventuell auch VI durchflochten und stabilisiert. Die Hauptfunktion wird in der Stabilisation der BM gegenüber Scherkräften (Haut und Schleimhäute) gesehen.

Das Glykoprotein **Fibronektin** besteht aus 2 mit Disulfidbrücken verknüpften Untereinheiten, das MG beträgt insgesamt ca. 440 kDa. Das Molekül besitzt zahlreiche funktionelle Domänen, die mit Zellrezeptoren, Heparin, verschiedene Kollagentypen sowie Fibrin und Plastik agieren können. Anheftungsstellen für Bakterienbestandteile deuten auf eine Opsoninfunktion, für Fibrin auf Funktionen bei Gerinnungsprozessen hin. Mit Kollagenen können Komplexe gebildet werden, die über einen Integrinrezeptor an der Zellmembran „kleben“ und das Ausbreiten der Zellen begünstigen. Ebenso kann Fibronektin als Klebprotein zusammen mit Kollagen via Zellmembranrezeptor Blutplättchen, Fibroblasten, Endothelzellen und Gliazellen anbinden. Im Bereich der BM stellt es die Verbindungszone zum angrenzenden Stroma dar.

Die interstitiellen **Kollagene I, III und V** strahlen in die Pars fibroreticularis vom Stroma her ein. Sie bilden mehr oder weniger kompakte Fibrillen, die aus 3, tripelhelikalangeordneten Alphaketten aufgebaut sind und eine charakteristische Querstreifung aufweisen. Es bilden sich Mikrofibrillen (30 bis 100 nm bzw. 0,02 / 0,03 bis 0,1 µm), Fibrillen (200 bis 500 nm bzw. 0,2 bis 0,5 µm) und Fasern aus (1000 bis 10 000 nm bzw. 1 bis 10 µm). Durch kurze nichthelikale terminale Sequenzen wird die Quervernetzung im extrazellulären Raum begünstigt. Die Funktionen bestehen in der Gewährleistung der Zugfestigkeit (besonders durch dicke Kollagen I Fibrillen), während den mehr dünnen Kollagen III-Fasern mehr „plastisch-elastische“ Eigenschaften zugeordnet werden. Kollagen V reguliert offenbar durch laterale Assoziation die Fibrillendicke der Kollagene I-Fasern.

Das **mikrofibrilläre Kollagen VI** wird aus 3 Polypeptid-Alphaketten gebildet, die zumeist in heterotrimerer Form vorliegen, wobei die tripelhelikale Domäne charakteristischerweise sehr kurz ist und zusätzlich 2 große, nicht helikale, globuläre Domänen existieren. Interaktionsmöglichkeiten mit Fibronektin und Integrinrezeptoren an der Zelloberfläche werden angenommen. Die Zusammenlagerung erfolgt über eine Kopf-zu-Schwanz-Anordnung mit Dimerbildung, 2 Dimere bilden ein Tetramer, welche durch lineare Aggregation zu Filamenten werden. Das mikrofibrilläre Netzwerk kommt in Assoziation mit den anderen interstitiellen Kollagenfibrillen vor, hat aber möglicherweise eine hiervon unabhängige Fibrillenausrichtung. Man nimmt an, dass das Kollagen VI-Netzwerk als Verknüpfung zwischen den Kollagenfibrillen und Zellen sowie der BM dient.

Tab. 7: BM-Expression im Trachealgewebe der Ratte (nach Laurie et al. 1983)

BM-Komponenten	Kollagen IV	Laminin	HPSG	Fibronectin
Tracheastrukturen				
Epithel				
-suprabasal	1	1	1	1
-Basalzellen*	„dezent positiv“	„leicht positiv“	„dezent positiv“	„leicht positiv“
Subepithelial	4	5	4	3
Um Drüsen / Drüsengänge	4	4-5	4	3
Kapillaren	4	5	4	3
Arteriolen	4	5	4	3
Venolen	4	4-5	4	2-3
Lymphgefäße	3	3	3	3
Lamina propria	1	1	1	3

1 = negativ 2 = sehr schwach 3 = sehr leicht bis schwach 4 = moderat 5 = stark
 * = Einzelzellen

Tab. 8: Klinische Merkmale der „Strahlen-Sialadenitis“ (modifiziert nach Seifert 1996)

Akutes Stadium - etwa 20 bis 30 Gy - häufig reversibel	<ul style="list-style-type: none"> • Speicheldrüsenschwellung • Anstieg der Serumamylase • Freisetzung von Plasmin • Anstieg von Phospholipid-Mediatoren • Reduzierung der Speichelflussrate • Reduzierung der Proteinsekretion • Abnahme von Sekretionsparametern (Na, Cl, pH, Bikarbonat)
Dauerschäden - 50 bis 60 Gy und darüber - partiell reversibel	<ul style="list-style-type: none"> • Schluckbeschwerden • Geschmacksstörungen • Sprechstörungen • Xerostomie • Erhöhte Kariesfrequenz

Tab 9: Pathohistologische Stadien der „Strahlen-Sialadenitis“ (modifiziert nach Seifert 1996 & Dreyer et al. 1989)

Initialstadium (Stadium I) — bis etwa 30 Gy — partiell reversibel	<ul style="list-style-type: none"> • Schädigung der serösen Azinuszellen <ul style="list-style-type: none"> - Schwellung und Vakuolisierung der Zellen - Verminderung der Sekretgranula - pyknotische Zellkerne • geringe leukozytäre Infiltration mit neutrophilen und eosinophilen Granulozyten
Späteres Initialstadium	<ul style="list-style-type: none"> • fokale Atrophie von serösen Azini • mäßige periduktale lymphozytäre Infiltration und Fibrose
Stadium II — bis etwa 75 Gy — meist irreversibel	<ul style="list-style-type: none"> • Atrophie der serösen Drüsenazini • Erweiterung der Speichelgänge mit endoluminalem Sekretverhalt und desquamierten Epithelien • Metaplasien des Gangepithels <ul style="list-style-type: none"> - Plattenepithel- und Becherzellmetaplasien • fokale duktale Proliferationen • zunehmende interstitielle Fibrose mit verstärkter lymphozytärer Infiltration • herdförmige, geringe interstitielle Lipomatose • nur geringe sklerotische Blutgefäßveränderungen
Terminalstadium (Stadium III) — bis etwa 75 Gy — meist irreversibel	<ul style="list-style-type: none"> • Zerstörung der Läppchenstruktur • zirrhotischer Drüsenumbau • weitgehende Reduktion des sezernierenden Drüsenparenchyms • fortgeschrittene Destruktion des Gangsystems • Ektasie und Sekretstauung der Gänge • Schleimgranulome • ausgeprägte Metaplasien des Gangepithels mit Plattenepithelinseln und Becherzellen • Gangepitheldysplasien im Bereich von Proliferationen • ausgeprägt sklerosiertes Drüseninterstitium mit lymphozytärer Infiltration • fokale Intimaproliferationen mit Ausbildung von Gefäßstenosen an den Blutgefäßen

Tab. 10: Darstellung einiger Daten zur Inzidenz und Persistenz von Larynxödemen

Autoren -- Jahr	Bestrahlungsschema	Inzidenz	Persistenz bzw. Rückbildungsfähigkeit
Herrmann / Baumann 1997	Konventionell	TD 5/5 bei 70 Gy	persistierend
Burman et al. 1991	Konventionell	TD 5/5 bei 50 Gy TD 50/5 bei 70 Gy	keine spezifische Angabe
Budach 1998	Konventionell	Ca. 50%	überwiegend rückbildungsfähig
Fu et al. 1982	Konventionell	15.4%	überwiegend rückbildungsfähig
Parsons 1994	Konventionell	Max. 29%	rückbildungsfähig
Rezvani et al. 1991	Konventionell	36%	keine spezifische Angabe
Deore et al. 1991	Akzeleriert	17.2%-31.1% (Gesamt: 22.1%)	„persistierend“
Kaanders et al. 1992	Konventionell Akzeleriert	16.6% 40%	überwiegend rückbildungsfähig überwiegend rückbildungsfähig
Dietz et al. 1998	Akzeleriert + CT	44.1% bzw. 58.8%	persistierend

TD = „Toleranzdosis“ (% aller Patienten, die innerhalb von 5 Jahren einen spezifischen pathologischen Larynxbefund entwickeln), CT = Chemotherapie

Tab. 11: Darstellung einiger Daten zu Rezidivraten von Larynxkarzinomen im Zusammenhang mit Larynxödemen

Kriterium	Ödeme N (% vom GK)	Ödeme ohne Rezidiv = „radiogen“ N (% vom GK / % der Ödeme)	Ödeme mit Rezidiv = „TM - abhängig“ N (% vom GK / % der Ödeme)
Autoren -- Jahr			
Dietz et al. 1998	40 (58.8%)	30 (44.1% / 75%)	10 (14.7% / 25%)
Bahadur et al. 1985	52	2 (- / 4%)	50 (- / 96%)
Fu et al. 1982	38 (15.4%)	21 (8.5% / 55.2%)	17 (6.9% / 44.7%)
Ichimura et al. 1997	14 (20.9%)	8 (11.9% / 57%)	6 (9% / 43%)
Jordan & Piotrowski 1994	22	1 (- / 4.5%)	21 (- / 95.5%)
Schultz et al. 1995	102 (55.1%)	80 (43.2% / 78%)	22 (11.9% / 22%)

Tab. 12: Darstellung einiger Daten zu Rezidivraten von Larynxkarzinomen im Zusammenhang mit den klinischen Kriterien Larynxödem oder Nekrose nach RT (auszugsweise zitiert nach O'Brien 1996)

Autoren -- Jahr	Lokalisation	T- Stadium	N (Patienten)	Kriterium	N (Anzahl mit Ödem oder Nekrose)	Rezidive	
						N	%
Wiernik et al. 1990	Laryngopharynx	T1-T4	713	Nekrose	14	10	71
Wiernik et al. 1989	Laryngopharynx	T1-T4	611	Nekrose	5	3	60
Turner & Tiver 1991	Larynx	T1-T4	141	Ödem	9	5	55
Mills 1979	Glottis	T1-T3	96	Ödem	13	6	46
Mintz et al. 1981	Larynx	T1-T4	348	Perichondritis oder Chondronekrose	52	26	50
Fu et al. 1982	Glottis	T1-T4	247	Ödem (> als 3 Monate)	38	17	45
Stevens et al. 1994	Glottis	T1-T4	127	Ödem	3	0	0

Tab. 12a: Angaben verschiedener Autoren zur Inzidenz, Ausprägung und Dauer von Larynxödemen als Spätreaktion nach verschiedenen RT-Schemen oder kombinierter Radiochemotherapie

Autoren -- Jahr	Inzidenz	Ausprägung	Dauer
Dinges et al. 1997	+	+	-
Fu et al. 1995	+	+	(-)
Kaanders et al. 1992	(+)	(+)	+
Deore et al. 1991	+	(+)	(+)
Olmi & Fallai 1997	+	+	-
O'Brien 1996	+	(+)	+

+ = Angabe eindeutig, - = Angabe fehlt, () = Angabe etwas uneindeutig

Tab. 14: Pathohistologische Stadien der „Strahlen-Sialadenitis“ (modif. nach Seifert 1996 & Dreyer et al. 1989)

Stadium I	<ul style="list-style-type: none"> • Schädigung der serös-mukoiden Azinuszellen <ul style="list-style-type: none"> - Schwellung und Vakuolisierung der Zellen - Verminderung der Sekretgranula - pyknotische Zellkerne • geringe leukozytäre Infiltration mit neutrophilen und eosinophilen Granulozyten
Späte(re)s Stadium I	<ul style="list-style-type: none"> • fokale Atrophie von serös-mukoiden Azini • mäßige periduktale lymphozytäre Infiltration und Fibrose
Stadium II	<ul style="list-style-type: none"> • Atrophie der serös-mukoiden Drüsenazini • Erweiterung der Speichelgänge mit endoluminalem Sekretverhalt und desquamierten Epithelien • Metaplasien des Gangepithels <ul style="list-style-type: none"> - Plattenepithel- und Becherzellmetaplasien • fokale duktale Profilerationen • zunehmende interstitielle Fibrose mit verstärkter lymphozytärer Infiltration • herdförmige, geringe interstitielle Lipomatose • nur geringe sklerotische Blutgefäßveränderungen
Stadium III	<ul style="list-style-type: none"> • Zerstörung der Läppchenstruktur • zirrhotischer Drüsenumbau • weitgehende Reduktion des sezernierenden Drüsenparenchyms • fortgeschrittene Destruktion des Gangsystems • Ektasie und Sekretstauung der Gänge • Schleimgranulome • ausgeprägte Metaplasien des Gangepithels mit Plattenepithelinseln und Becherzellen • Gangepitheldysplasien im Bereich von Profilerationen • ausgeprägt sklerosiertes Drüseninterstitium mit lymphozytärer Infiltration • fokale Intimaprofilierungen mit Ausbildung von Gefäßstenosen an den Blutgefäßen

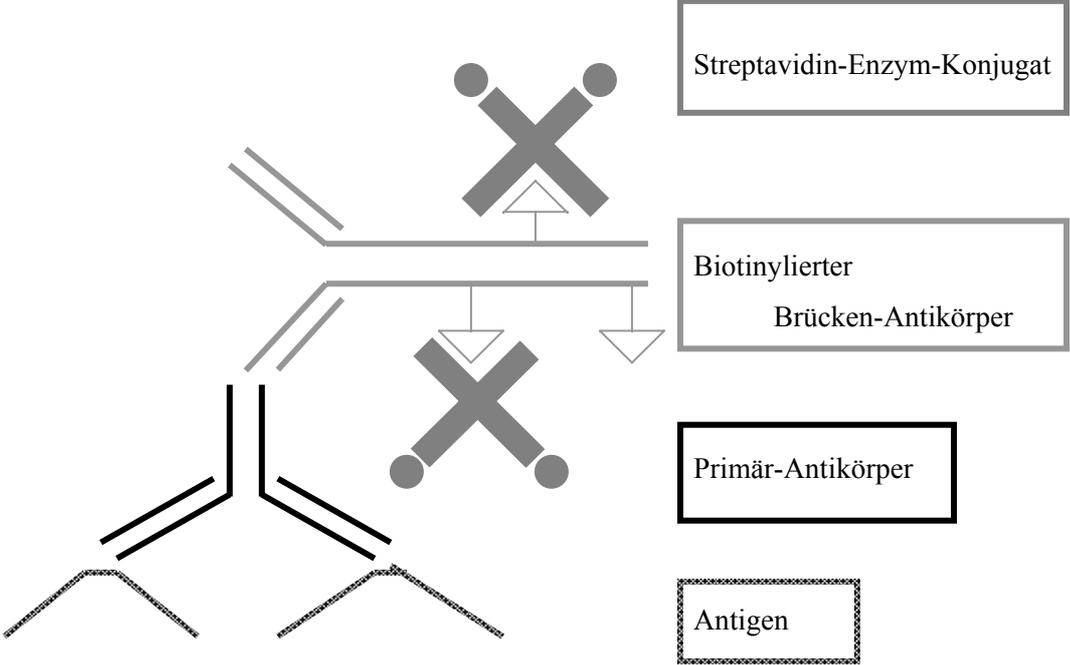
Tab. 15: Liste und Spezifikationen der verwendeten AK

Antikörper	Klon/Kode-Nr	Zielantigen	Verdünnung	Vorbehandlung	Bemerkungen	Quelle
Anti-Laminin	pk/L-9393	Laminin	1000	P	geeignet	SIGMA
Anti-Fibronektin	pk/F-3648	Fibronektin	2000	∅	geeignet	SIGMA
Anti-Kollagen III	pk/600-401-105	Kollagen III	25	P	geeignet	ROCK-LAND
Anti-Kollagen IV	pk/1340-08	Kollagen IV	50	P	geeignet	SOUTHERN BIO-TECHNOLOGY
Anti-Kollagen VII	mk/LH 7.2	Kollagen VII	100	∅ / P	unspezifisch	BIOTREND/NOVO-CASTRA
Anti-S 100	mk/S-2644	S 100	150	P	geeignet für Schwann-Zellen, ansonsten mehr diffuse Reaktionen	SIGMA
Anti-Tenascin	mk/TN2/M636	Tenascin	25	P	häufiger	DAKO
Anti-Aktin	mk/ASM-1/61001	Glattmuskelaktin	500	∅ / P	unspezifische	PROGEN
Anti-Aktin	mk/1A4/M0851	Glattmuskelaktin	1000	MW	Reaktionen	DAKO

Tab. 15: Liste und Spezifikationen der verwendeten AK (Fortsetzung)

Antikörper	Klon/Kode-Nr	Zielantigen	Verdünnung	Vorbereitung	Bemerkungen	Quelle
Anti-CK 17	mk/ CK-E3	CK 17 CK 19 (Ratte)	600	P	geeignet	SIGMA
Anti-CK 13	mk/ Ks 13.1	CK 13	20	P	geeignet	PROGEN
Anti-CK 8 (18/19)	mk/ NCL-5D3	CK 8	5	P	geeignet	ICN
Anti-CK 8.12	mk/ K8.12	CK 13/15/16	40	P	geeignet	ICN
Anti-CK 17	mk/ E3/M7046	CK 17	40	P	geeignet (wie oben)	DAKO
Anti-CK 18	mk/ CY-90	CK 18	200	P	Keine bzw. untypische oder sehr heterogene Reaktionen	SIGMA
Anti-CK Nr. 5/6	mk/ D5/16B4	CK 5/6	bis 40	P		BOEHRINGER
Anti-CK Nr. 4	mk/ 215/B8	CK 4	bis 20	P		BOEHRINGER
Anti-CK 8.60	mk/ K8.6	CK 1/10/11	600	P		ICN
Anti-CK 8	mk/ 35βH11/M631	CK 8	bis 25	P		ENZO
Anti-CK 19	mk/ RCK 108/M888	CK 19	Bis 150	Ø / P		DAKO
Anti-Vimentin	mk/ V 9/M0725	Vimentin	bis 50	Ø / P	Häufiger unspezifische Reaktionen	DAKO
Anti-Vimentin	mk/ V 13.2/V5255	Vimentin	bis 300	P		SIGMA

Abb. 7: Schematisierte Darstellung der immunhistochemischen Reaktionsweise



Tab. 17: Reaktionsprofil im Rattengewebe für CK bzw. IF-Proteine, BM- bzw. ECM-Komponenten sowie weitere Antigenstrukturen

Antikörper	Spezifität ^a			Rattenkontrollgewebe ^d	
	Human-Antigen ^b	Ratten-Antigene ^c		positiv	negativ
		Mutmaßlich entsprechendes Antigen	MG (kDa)		
CK-E3	17	17/19	41	Dünndarm (5), Gallengänge (4), Zunge (BZ: 2), Urothel / Tubulusepithel (4, z. T. basal betont), Glomerulum (EZ: 2), Bronchien (2-3, z. T. basal betont), Pankreasgänge (4)	Haut, Hepatozyten
Ks 13.1	13 (14, 16)	13 (15)	51(48)	Zunge (SB: 4)	Haut, Hepatozyten, Dünndarm, Niere
NCL-5D3	8 (18, 19)	8	55	Dünndarm (4), Hepatozyten (2), Urothel / Tubulusepithel (2), Bronchien (2-3)	Zunge
K8.12	13, (15), 16	13, (15), 16	51, 48	Zunge (SB: 4), Bronchien (EZ:2), Urothel (EZ: 2)	Haut, Hepatozyten, Dünndarm, Tubulusepithel
E3/M7046	17	17/19	41	wie oben	wie oben
CY-90	18	18	52	Hepatozyten (2-3), Bronchien (3), Dünndarm (3)	Zunge, Haut
D5/16B4	5/6	5/6		Zunge (BZ: 2-3)	Leber, Dünndarm
215/B8	4	4	57	Zunge (SB: 3), Bronchien (SB: 2)	Leber, Dünndarm, Niere
K8.60	(1), 10, 11	1, 10/11	66, 57	Haut (SB: 3)	Zunge
35BH11/M631	8	8	55	wie oben (etwas schwächer)	wie oben
RCK 108/M888	19	19	40/41	Bronchien (3), Gallengänge (3), Dünndarm (3), Zunge (BZ: 2)	Haut, Hepatozyten
V 9/M0725	Vimentin	Vimentin	57/58	Endothelien, Fibroblasten, Glattmuskelnzellen, Fettzellen (alle 3), Bronchien (EZ: 2), lymphoide Zellen (2)	Zunge, Dünndarm, Urothel / Tubulusepithel, Leber
V 13.2/V5255	Vimentin	Vimentin	57/58		

^a = CK-Nummer(n) in Klammern gemäß Literatur mit schwachen Reaktionen.

^b = Gemäß Hersteller- und Literaturangaben. CK-Nummer(n) gemäß Moll et al. 1982 und Moll 1993.

^c = Gemäß Hersteller- und Literaturangaben.

^d = Skalenwert der Immunreaktion in Klammern.

MG = Molekulargewicht EZ = Einzelzellen

BZ = Basalzellen

SB = Suprabasale Zellschichten

Tab. 17: Reaktionsprofil im Rattengewebe für CK bzw. IF-Proteine, BM- bzw. ECM-Komponenten sowie weitere Antigenstrukturen (Fortsetzung)

Antikörper	Spezifität ^a		Rattenkontrollgewebe ^d		
	Human-Antigen ^b	Ratten-Antigene ^c Mutmaßlich entsprechendes Antigen	MG (kDa)	positiv	negativ
S-2644	S 100	S 100	10-12	Schwann-Zellen (3), Milzretikulumzellen (2), Myoepithelien (2-3)	Epithelien (Zunge, Haut, Bronchien)
TN2/M636	Tenascin	Tenascin	1900	Interstitium (3), Fibroblasten (2-3), Blutgefäße (v. a. TME: 3), Septen (3)	Epithelien (Dünndarm, Zunge)
ASM-1/61001 1A4/M0851	Glattmuskel-Aktin	Glattmuskel-Aktin	k. A.	Glattmuskelzellen (Dünndarm, Gefäße: 3), Myoepithelien (2-3)	Epithelien (Dünndarm, Zunge, Bronchien)

TME = Tunica media der Blutgefäße k. A. = keine Angabe

Tab. 17: Reaktionsprofil im Rattengewebe für CK bzw. IF-Proteine, BM- bzw. ECM-Komponenten sowie weitere Antigenstrukturen (Fortsetzung)

Antikörper	Spezifität ^a		Rattenkontrollgewebe ^d	
	Human-Antigen ^b	Ratten-Antigene ^c Mutmaßlich entsprechendes Antigen	positiv	negativ
pk/L-9393	Laminin	Laminin	BM: Haut (3), Zunge (3), Dünndarm (3), Niere / Tubulus (3), Gallengänge (4), Gefäße (subendothelial) / Art. / Ven. (3), Kapillaren (4), Muskelzellen (2-3), Fettzellen (3), Nervenzellen / Schwann-Zellen (4)	Hepatozyten, Leber / Milzsinusoide, Fibroblasten (zumeist), Gefäßadventitia
pk/F-3648	Fibronectin	Fibronectin	BM-nahe: Haut (2-3), Zunge (3), Dünndarm (2-3), Niere / Tubulus (3-4), Hepatozyten (2), Gallengänge (2-3), Leber- / Milzsinusoide (2), Gefäße (subendothelial) / Art. / Ven. (3), Kapillaren (2), Gefäßadventitia (3-4), Fibroblasten (4), Muskelzellen (2), Nervenzellen / Schwann-Zellen (3)	Fettzellen (zumeist), intrazytoplasmatisch bis auf Mastzellen (4)
pk/600-401-105	Kollagen III	Kollagen III	BM-nahe: Haut (2-3), Zunge (2-3), Dünndarm (2), Niere / Tubulus (2, fokal 4), Gallengänge (2), Hepatozyten (2), Leber- / Milzsinusoide (2-3), Gefäße (subendothelial) / Art. / Ven. (3), Kapillaren (2), Gefäßadventitia (2), Fibroblasten (2), Muskelzellen (2-3), Fettzellen (2-3), Nervenzellen / Schwann-Zellen (2)	Intrazytoplasmatisch
pk/1340-08	Kollagen IV	Kollagen IV	BM: Haut (2-3), Zunge (2-3), Dünndarm (3), Niere / Tubulus (3-4), Gallengänge (4), Hepatozyten (2), Leber- / Milzsinusoide (4), Gefäße (subendothelial) / Art. / Ven. (4), Kapillaren (3-4), Muskelzellen (2-3), Fettzellen (3), Nervenzellen / Schwann-Zellen (2)	Fibroblasten, Gefäßadventitia

Tab. 19: Immunhistologische ABC-Färbemethode (LSAB[®]2- und Vector Kit[®]): Arbeitsschritte

Schritt	Behandlung	Konzentration / Verdünnung	Zeit (min)
Blockierung der endogenen Peroxidase (nur Vector Kit [®])	Methanol/H ₂ O ₂	200 ml Methanol + 6 ml 30% H ₂ O ₂	30
Waschen (nur Vector Kit [®])	Aqua dest.		mind. 5
Antigen-Demaskierung („Präsentierung“)	MW	in Citratpuffer (pH 6.0)	4x5
	Und / oder Protease	0.2% in 0.05 M Tris-HCL-Puffer	10-15
	Und / oder Trypsin	0.001% in 0.05 M Tris-HCL-Puffer	15 bei 37°C
	Und / oder TRS	Originallösung	20 (95-99°C)
Waschen	Nach MW bzw. TRS: Abkühlung bei Raumtemperatur danach TBS bzw. PBS-Spül-Puffer / Aqua dest.	1:10	15-20 5 5
	Und / oder nach Protease: bzw. Und / oder nach Trypsin: Aqua dest.		5
Blockade unspezifischer Immunoglobulinbindungsstellen	Hintergrundreduzierendes AK-Verdünnungsmedium (Zugabe zum Primär-AK) oder nicht-immunes Globulserum (speziesanalog zum Brücken-AK) in PBS-Puffer (Vector Kit [®]) in TBS-Puffer (LSAB [®] 2 Kit)	Originallösung 20% 1:10 1:10	15-20
Inkubation mit Primär-Antikörper	Antigen-spezifisch: polyklonale oder monoklonale AK der IgG Klasse (meist Maus / Kaninchen-AK)*	Je nach Vortestung* (s. Tab. 20)	60 bei 37°
Waschen	PBS-Puffer (Vector Kit [®]) TBS-Puffer (LSAB [®] 2 Kit)	Unverdünnt pH 7.4	10
		Unverdünnt pH 7.5	10
Inkubation mit 2. AK (Brücken-AK), biotinyliert	**ab hier Extra-Darstellung Vector Kit [®] Verfahren	Lösung 2: LSAB [®] 2 Kit anti-Maus /anti-Kaninchen	Unverdünnt 30
Waschen (Küvette)	TBS-Puffer	Unverdünnt	10
Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat-Inkubation	Lösung 3: LSAB [®] 2 Kit	Unverdünnt	30
Waschen (Küvette)	TBS-Puffer	Unverdünnt	10
Färben	Fast red bzw. Neufuchsin	1 Tbl. auf 3 ml Substratpuffer bzw. 1%	30-40
Waschen	Aqua dest.		10
Gegenfärbung	Meyers Hämalaun (MERCK, 4g/l, Nr. OB 043983)	1:4 in Aqua dest.	5-8
Bläuen	Leitungswasser (handwarm)		10
Eindeckelung	Gelatine (ca. 50°)	Unverdünnt	Bis zum Gelieren

* = Antikörperspezifikation und Verdünnung: siehe **Tab.20 im Anhang**

Tab. 19: ** Vector Kit® -Verfahren: weitere Arbeitsschritte

Schritt	Behandlung	Konzentration / Verdünnung	Zeit (min)
Inkubation mit 2. Antikörper (Brücken-AK), biotinyliert	Zum Primär-AK passender (speziesspezifischer) Antikörper anti-Maus / anti-Meerschweinchen	1:100	30
Waschen	PBS-Puffer	Unverdünnt	10
Avidin-Meerrettichperoxidase-Komplex-Inkubation	20µl Lösung A und 20 µl Lösung B pro 1 ml PBS-Puffer	Unverdünnt	30 (Mind. 30 vorher herstellen)
Waschen	PBS-Puffer	Unverdünnt	10
Färben	DAB	200 mg DAB auf 200ml 0.05 M Tris-HCL-Puffer, Filtration; Startmittel: 200 µl 10% H2O2)	5
Waschen	Leitungswasser und Aqua dest		10 und 5
Gegenfärbung	Meyers Hämalaun	1:4 in Aqua dest.	5-8
Bläuen	Leitungswasser (handwarm)		10
Eindeckelung	Gelatine (ca. 50°)	Unverdünnt	Bis zum Gelieren

Tab. 20: Liste der verwendeten AK mit den entsprechenden Verdünnungen und Vorbehandlungen

Antikörper	Klon	Zielantigen	Verdünnung		Vorbehandlung		Methode	Quelle (Primär-AK)
			GSM	Larynx Trachea	GSM	Larynx Trachea		
Maus Anti-Human CK 5/6	mk/D5/16B4	CK 5/6	250	75	T/MW	T	Vector Kit®	BOEHRINGER
Maus Anti-Human CK 13	mk/Ks 13.1	CK 13	20	20	P	P	LSAB®2	PROGEN
Maus Anti-Human CK 17	mk/E3	CK 17 CK 19 (Ratte)	40	40	P	P	LSAB®2	DAKO
Maus Anti-Rind CK 8.12	mk/K8.12	CK 13/15/16	40	40	P/MW	P	Vector Kit®	ICN
Maus Anti-Human CK 18	mk/Ks 18.04	CK 18	keine	keine	T/MW	T	Vector Kit®	PROGEN
Meerschweinchen Anti-Human Vimentin	pk/GP 53	Vimentin	200	200	T/MW	T	Vector Kit®	PROGEN

Immunhistologische Prozedur zur Darstellung des Antigens Ki-67

Die immunhistologische Prozedur erfolgte mit dem Detektionssystem Urea Hydrogen Peroxidase-Reaktionsset (Sigma Fast/DAB Peroxidase Substrate Tablet Set, SIGMA D4168). Die Paraffinschnitte wurden nach Entparaffinierung (in absteigender Alkoholreihe) und Wässerung (in destilliertem Wasser) zunächst im Schnellkochtopf für 4 Minuten (in Citratpuffer, pH-Wert 6,0, 1,21 g/l) gekocht, um das durch das Fixans (4%-iges Formalin) maskierte Antigen für den AK (besser) zu exponieren. Anschließend wurden nach Blockierung der endogenen Peroxidase (20 Minuten mit 3%-iger H₂O₂-Lösung) nun nacheinander die AK MIB-5 (Verdünnung 1:30, Kat.-Nr. DIA5055, DIANOVA, Hamburg), peroxidasekonjugierter Ziege anti-Maus IgG-AK (Verdünnung 1: 20, Kat. Nr. 115-035-062, DIANOVA) und peroxidasekonjugierter Kaninchen anti-Ziege IgG-AK (Verdünnung 1: 50, Kat. Nr. 305-035-045, DIANOVA) jeweils 30 Minuten inkubiert. Die Verdünnungen erfolgten mit TBS / FCS 10% (fötales Kälberserum, SO 115, BIOCHROM, Berlin, Deutschland) bei Raumtemperatur und zwischen den einzelnen Färbeschritten wurde wiederholt mit TBS Puffer gespült. Als Chromogen diente DAB (D4168, SIGMA), gegengefärbt wurde mit Hämalaun nach Mayer, eingedeckelt mit Immu-Mount (Kat.-Nr. 9990402, SHANDON, Baltimore, USA). Als positives Ergebnis finden sich leuchtend braune Zellkerne. Als Kontrollen dienten Rattenmilzgewebeschnitte. Das Prinzip dieser immunhistochemischen Färbemethode ist für den eingesetzten AK etabliert und für Mäusegewebe bestätigt (Ito et al. 1998). Für den Einsatz im Rattengewebe waren auch hier Voruntersuchungen mit Variationen der Verdünnungen und Inkubationszeiten des Primär-AK und der Brücken-AK zur Optimierung der Färbereaktion notwendig.

Tab. 25: Charakterisierung der einzelnen extrakraniellen Tumoren im Verhältnis zu den Auswertungskategorien

Tumoren	RT Dosis (Gy)	Latenz der RT (Monate)	Alter (Monate)	Lokalisation	
				ISF	ASF
1	60	4	10	Hals / SD	
2	60	4	10	Hals / SD	
3	60	4	10	Hals / SD	
4	60	6	12	Hals / SD	
5	60	5	11	Hals / SD (vorw. GP)	
6	60	6	12	Maxilla	
7	60	6	12	GP	
8	40	6	12	GP / Tränendrüse	
9	Keine RT		12		Abdomen / ML
10	Keine RT		9		Abdomen / ML
11	Keine RT		13		Rechte Flanke / ML
12	Keine RT		12		Maxilla rechts
13	Keine RT		12		Thorax rechts
14	Keine RT		24		Abdomen / ML
15	Keine RT		24		Abdomen / ML
16	Keine RT		24		Leiste inguinal
17	Keine RT		30		Brustregion links
18	Keine RT		30		Leiste inguinal links
19	Keine RT		12		Thorax rechts
20	Keine RT		30		Brustregion links
21	60	3	9	Hals / SD	
22	60	8	14	Hals / SD zerstört	
23	60	8	14	GP	

GP = Glandula parotis SD = Speicheldrüsen, vorwiegend GSM-Region ML = Milchleistenregion

Tab. 26: Liste, Verdünnung und Quelle der verwendeten AK bei der Untersuchung der Hypophysentumoren

Antikörper	Code / Charge / Klon Monoklonal (mc) / polyklonal (pc)	Verdünnung	Quelle
Anti-GH (Ratte)	Kat.-Nr. B981202 (pc)	1:200	BIOTREND
Anti-GH (Human)	G-8523 (mc)	1:80	SIGMA
Anti-Prolaktin (Ratte)	Charge-Nr. 370718 (pc)	1:50	QUARTETT
Anti-Prolaktin (Human)	164.2216/Kat.-Nr. 0371 (mc)	1:100	IMMUNOTECH
Anti-ACTH (24-39) (Ratte)	Charge-Nr. 360818 (pc)	1:100	QUARTETT
Anti-ACTH (24-39) (Human)	M3501 (mc)	1:40	DAKO
Anti-TSH (Ratte)	Charge-Nr. F970872 (pc)	1:400	BIOTREND
Anti-TSH (Human)	27.18.4 (mc)	1:100	IMMUNOTECH
Anti-FSH (Human)	Code-Nr. 300.10.E.14.5 (mc)	1:300	BIOTREND
Anti-LH (Ratte)	Kat.-Nr. N990211 (pc)	1:300	IMMUNOTECH
Anti-LH (Human)	Kat.-Nr. 0374/Klon 430.16 (mc)	1:300	IMMUNOTECH
Anti-a-Untereinheit	Code-Nr. 6 E 4 (mc)	1:150	IMMUNOTECH
Anti-S-100-Protein	Code-Nr. Z 311 (mc)	1:500	DAKO
MIB-1	Code-Nr. MM1 (mc)	1:100	NOVOCASTRA

GH = Gonadotropes Hormon ACTH = Adrenokortikotropes Hormon TSH = Thyreotropes Hormon
FSH = Follikelstimulierendes Hormon LH = Luteinisierendes Hormon

Tab. 27: CK-Expressionsmuster der GSM. Die Gruppen (a-c) beziehen sich auf die Befunde bei nicht bestrahlten Drüsen (a; n = 25), außerhalb des Strahlenfeldes liegende GSM (b; n = 15; rechte Seite bestrahlter Tiere) und direkt strahlenexponierte (innerhalb des Strahlenfeldes) liegende GSM (c; n = 19)

Drüsengewebe Gruppe	Gruppe	NG	I	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK 17 / E3	a	1	1	1	1	3-4-5	<u>2</u> -3	3-4-5	4-5
	b	1	1	1	1	3-4-5	2-3	3-4-5	3-4-5
	c	1	1	1	1	4-5	2-3	3-4- <u>5</u>	4- <u>5</u>
CK 13 / Ks 13.1	a	1	1	1	1	2- <u>3</u> -4	2-3	2-3- <u>4</u>	3
	b	1	1	1	1	3	2- <u>3</u>	3	2-3-4
	c	1	1	1	1	3-4	2- <u>3</u>	3-4	3-4
CK 8/NCL 5D3	a	1	1	1	1	2-3	1/fokal 2-3	3-4	3-4
	b	1	1	1	1	2- <u>3</u>	2-3	4-5	2- <u>3</u> -4
	c	1	1	1	1	2- <u>3</u>	2-3	4-5	3-4- <u>5</u>
CK 13-15-16 / K8.12	a	1	1	2-3	1	1	1	1	2- <u>3</u> -4*
	b	1	1	2-3-4	1	1	1	1	2- <u>3</u> -4*
	c	1	1	3-4-5	1	1	1	1	1// <u>3</u> -4*

1 = negativ 2 = sehr zart, hauchartig 3 = leicht, gering 4 = moderat, mittel 5 = stark ausgeprägt
(bei stärker variabler Expression wurde der gegebenenfalls dominierende Befund unterstrichen) // = siehe Text
* = Basalzellen

NG = Nervengewebe I = Interstitium

Abb. 8a: GSM, keine RT, Vergrößerungsfaktor x200. Der AK E3 färbt leicht bis teilweise stark die Schaltstück-, Streifenstück- und Gangepithelien, weniger intensiv die sekretorischen Tubuli

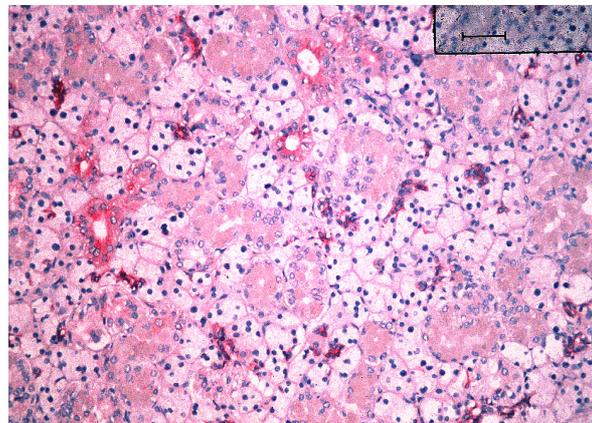
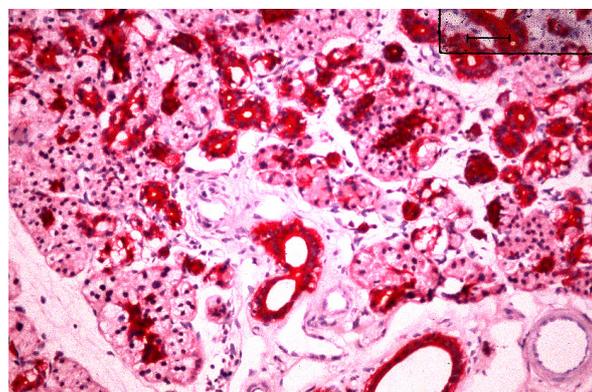


Abb. 8b: GSM, RT (direkt exponierte Drüse), LR 4-6 Monate, Vergrößerungsfaktor x200. Der AK CKE3 produziert eine stärkere Färbereaktion im Drüsengewebe, insbesondere i. B. der Schaltstück-, Streifenstück- und Gangepithelien



Tab. 28: EMP-Expressionsmuster der GSM. Die Gruppen (a-c) beziehen sich auf die Befunde bei nicht bestrahlten Drüsen (a; n = 25), außerhalb des Strahlenfeldes liegende GSM (b; n = 15; rechte Seite bestrahlter Tiere) und direkt strahlenexponierte (innerhalb des Strahlenfeldes) liegende GSM (c; n = 19)

Drüsengewebe Gruppe AK	Gr.	Nervengewebe	Gefäßwand				Kapsel	Septen
			Kapillaren	subendothelial	Tunica media	Adventitia		
Anti-Laminin	a	3-4	2	2-3	2-3	1	1	1
	b	3-4	2	2-3	2-3	1	1	1
	c	(3)-4-(5)	3-(4)	3-(4)	3-(4)	1	1	1
Anti-Fibronektin	a	1	1/2*	2	(1)-2	(2)-3	3-(4)	2-3-(4)
	b	1	1/2*	2	(1)-2	(2)-3	3-(4)	2-3
	c	1	1/2*	2-3	2-(3)	3-(4)	(3)-4-(5)	3-4
Anti-Kollagen-III	a	3	1/2*	2-3	2-(3)	2	3	2-3
	b	3	1/2*	3	2-3	2	3	2-3
	c	3-(4)	1/2*	3	3	(2)-3	3-4-(5)	3-4
Anti-Kollagen-IV	a	(2)-3-(4)	2	3	3	1	1	1
	b	(2)-3-(4)	2	3	3	1	1	1
	c***	3-(4)	2-3	3	3-4	1	1	1

Tab. 28: Fortsetzung

Drüsengewebe Gruppe AK	Gr.	um MYO**	um AZ	um SCH	um ST	um STR	um GE
Anti-Laminin	a	1	2-(3)	2-3	(1)-2-(3)	2-(3)	2-3
	b	1	2-3	2-3	2-(3)	2-(3)	2-3
	c	1	(2)-3-(4)	3-4	2-3	(2)-3-(4)	(2)-3-(4)
Anti-Fibronektin	a	1	2-(3)	2-(3)	2-(3)	2-(3)	(2)-3-4
	b	1	2-(3)	2-(3)	2-(3)	2-3	(2)-3-4
	c	1	2-4	(2)-3-(4)	(2)-3	(2)-3-(4)	(3)-4-(5)
Anti-Kollagen-III	a	1	2	2-(3)	2-(3)	2-(3)	3
	b	1	2-3	2-3	2-3	2-3	3
	c	1	(2)-3	(2)-3-(4)	(2)-3-(4)	(2)-3-(4)	(3)-4
Anti-Kollagen-IV	a	1	(1)-2-(3)	(1)-2-(3)	1-2	(1)-2-(3)	(1)-2-(3)
	b	1	(1)-2-(3)	(1)-2-(3)	1-2-(3)	(1)-2-(3)	(1)-2-(3)
	c***	1	(1)-2-3	(1)-(2)-3	(1)-2-(3)	(1)-(2)-3	2-4

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = zart, dünn, kontinuierlich, leicht 4 = mäßig- bis mittelgradig, deutlich linienförmig 5 = stark bis sehr stark, balkenartig oder mehr flächenhaft

Bei stärkerer Variabilität der Befunde wurden die gegebenenfalls nicht dominierenden Bewertungen in Klammern () aufgeführt.

* = sehr zart akzentuierte Färbereaktion im unmittelbar an die BM angrenzenden Stroma, die allerdings häufiger nicht sicher von der weiteren umgebenden Stromareaktion abgegrenzt werden konnte.

** = Reaktionen oftmals nicht sicher von denen angrenzender Strukturen zu trennen

*** = Einzelpräparate mit stark akzentuierter Expression und Konglomeratbildungen

Abb. 9a: GSM, keine RT, Originalvergrößerung x200; Anti-Kollagen IV färbte sehr zart bis leicht die BM um die AZ, die SCH, die ST, die STR und GE. Ebenso waren die intraglandulären Nervenfasern leicht positiv. Im Bereich der KA, der bindegewebigen SE und der AD war keine Reaktion zu beobachten.

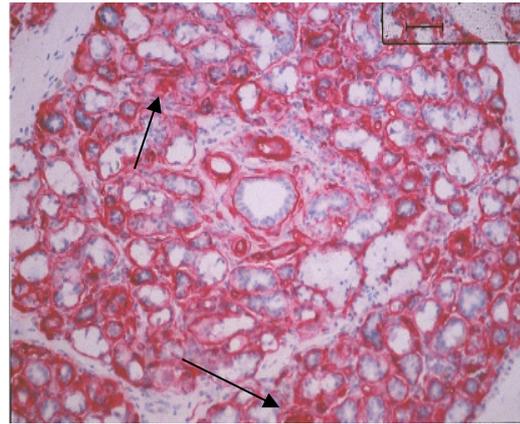
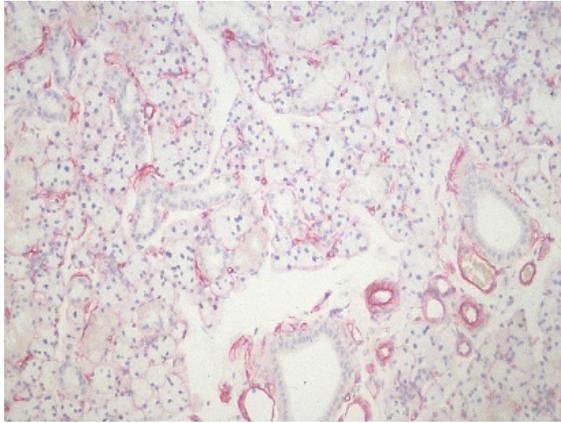


Abb. 9b: GSM, RT (im Feld liegende, bestrahlte Drüse), LR 5 Monate, Originalvergrößerung x200; Bei den verschiedenen Parenchymstrukturen waren merklich akzentuierte CIV-Färbereaktionen nachweisbar. Weiterhin finden sich CIV-positive Konglomerate (↑) im Interstitium.

Abb. 10: Graphische Darstellung der Körpergewichte [Gramm] in Abhängigkeit von der RT (alle Tiere)

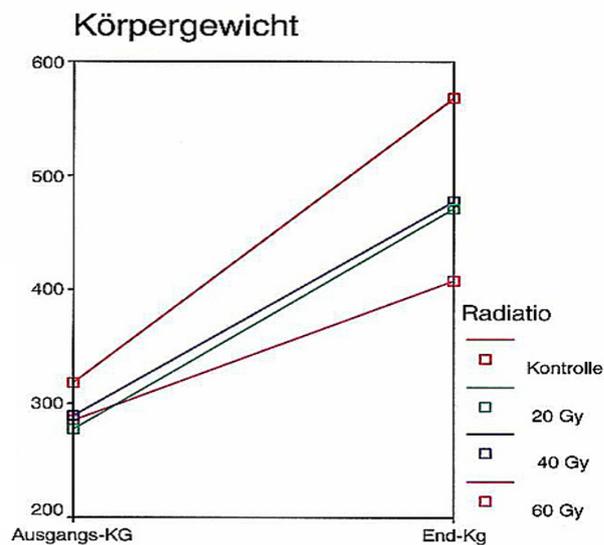


Abb. 11: Graphische Darstellung der Körpergewichte [Gramm] in Abhängigkeit von der Radiatio (1½ Jahre alte Tiere)

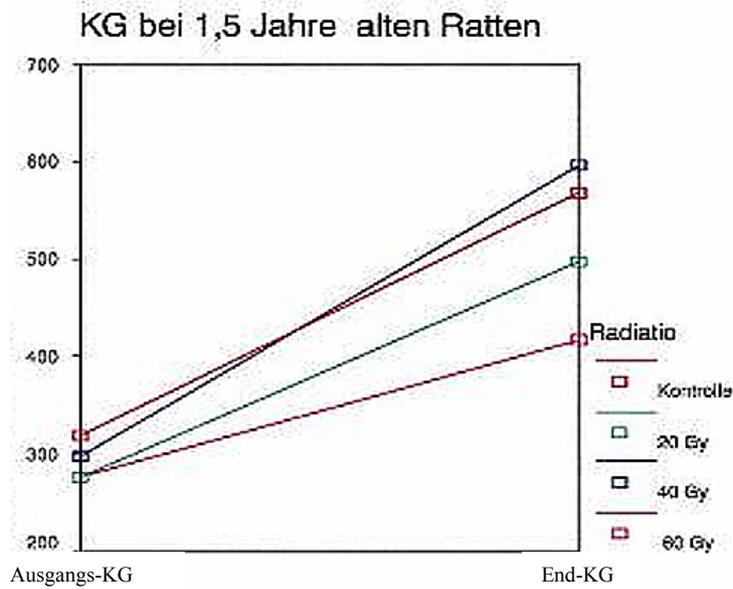


Abb. 12: Übersicht über den Gewichtsverlauf während der RT

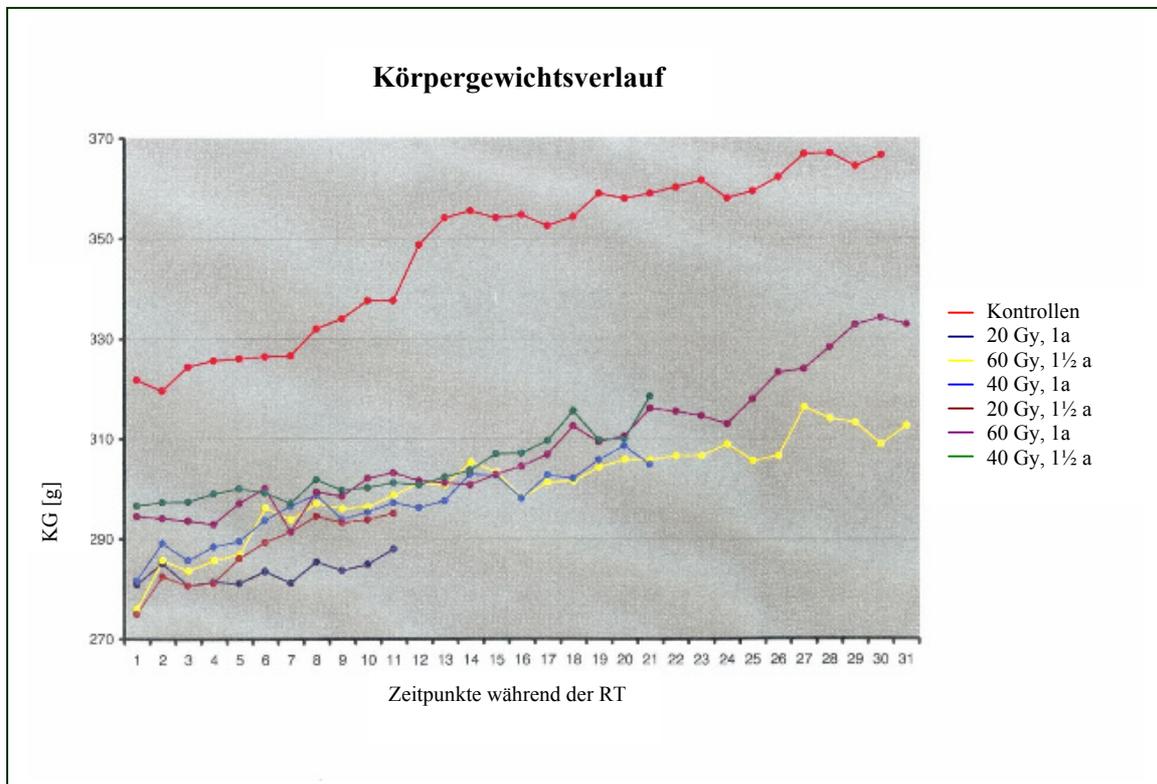


Abb. 14a: RT-KG bei 20 Gy- Exposition (1 Jahr alte Tiere)

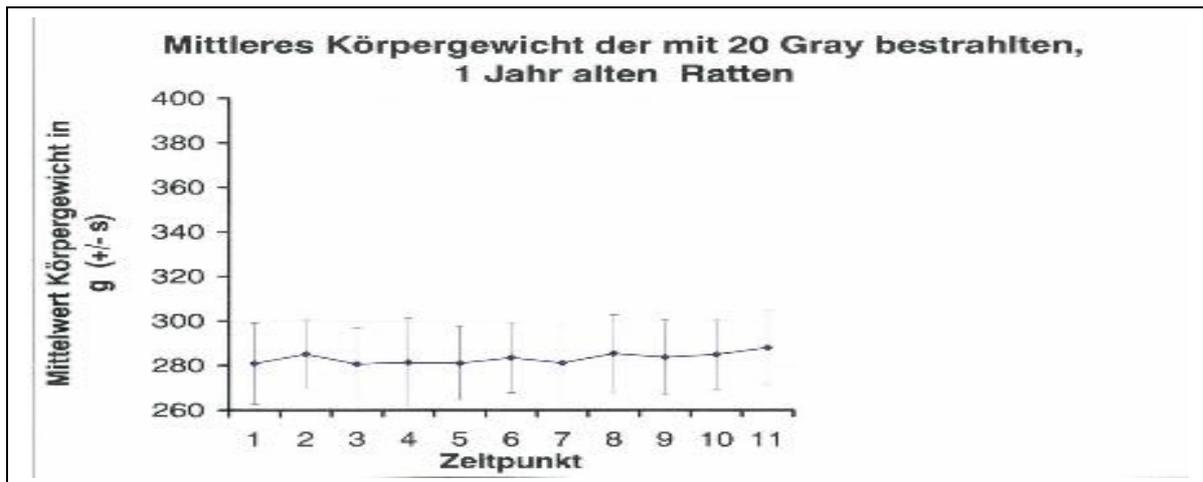


Abb. 15a: RT-KG bei 40 Gy- Exposition (1 Jahr alte Tiere)

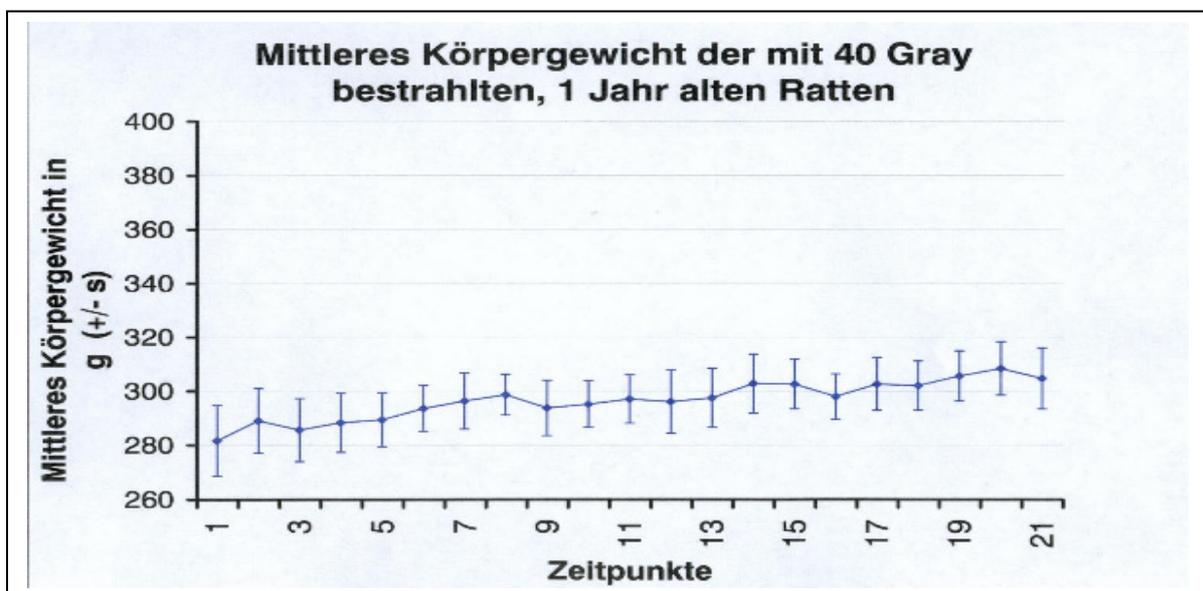


Abb. 16a: RT-KG bei 60 Gy- Exposition (1 Jahr alte Tiere)

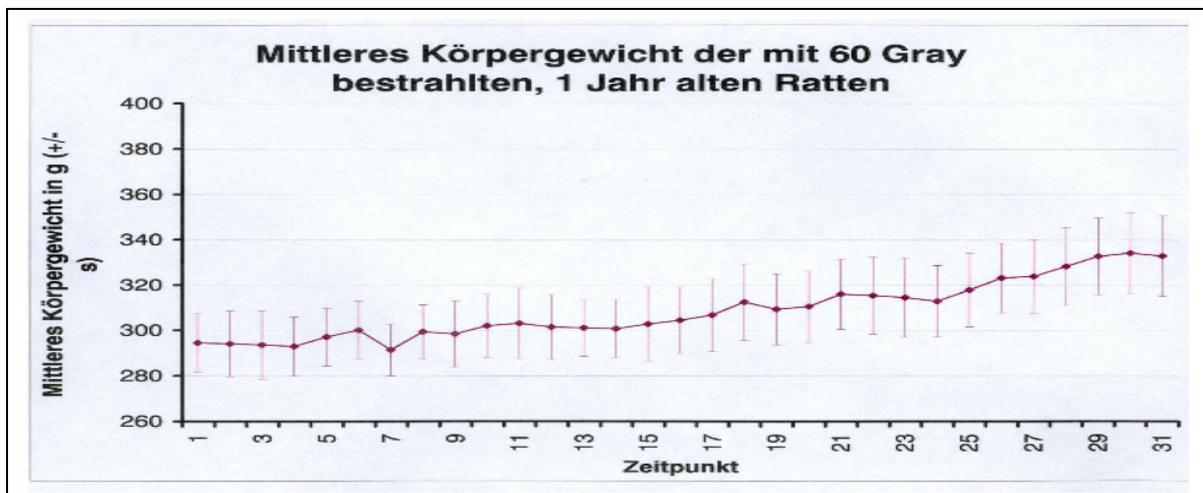


Abb. 14b: RT-KG bei 20 Gy- Exposition (1 ½ Jahre alte Tiere)

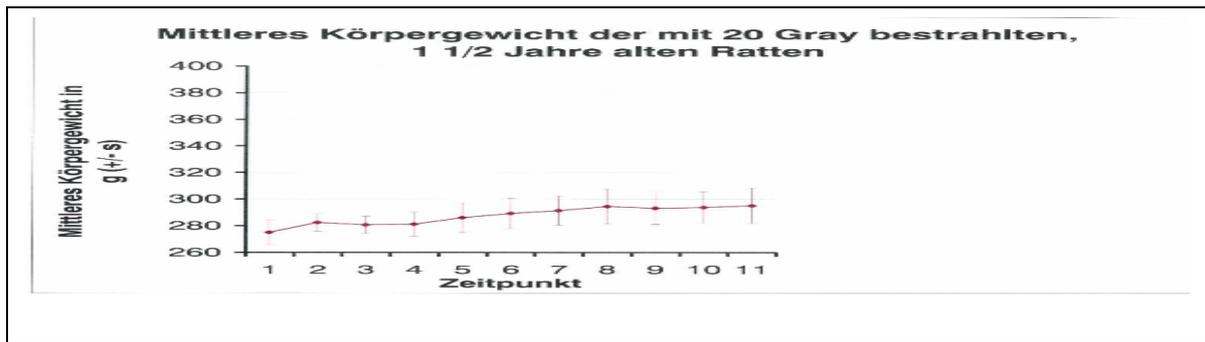


Abb. 15b: KG bei 40 Gy- Exposition (1 ½ Jahre alte Tiere)

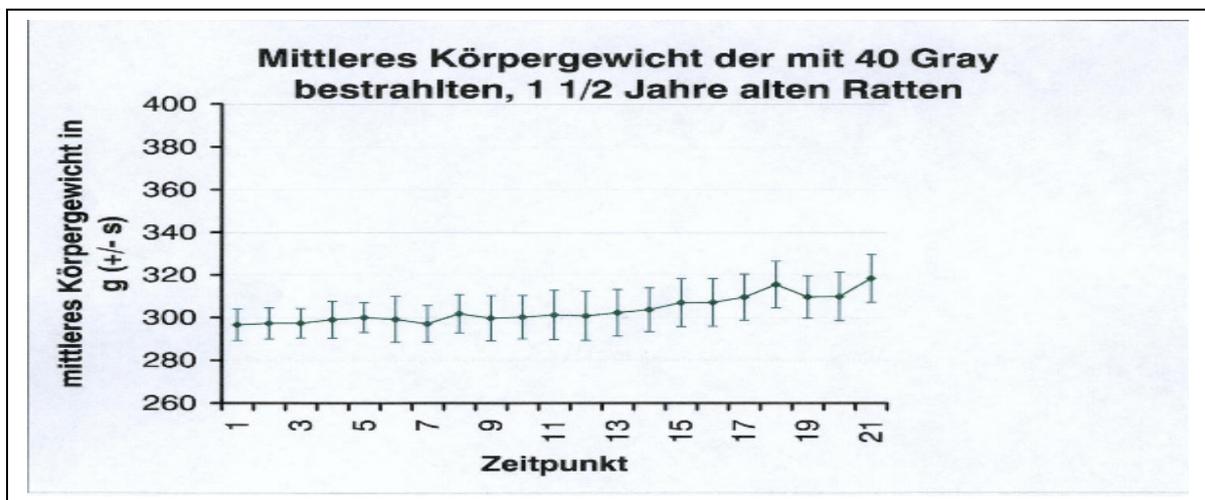


Abb. 16b: KG bei 60 Gy- Exposition (1 ½ Jahre alte Tiere)

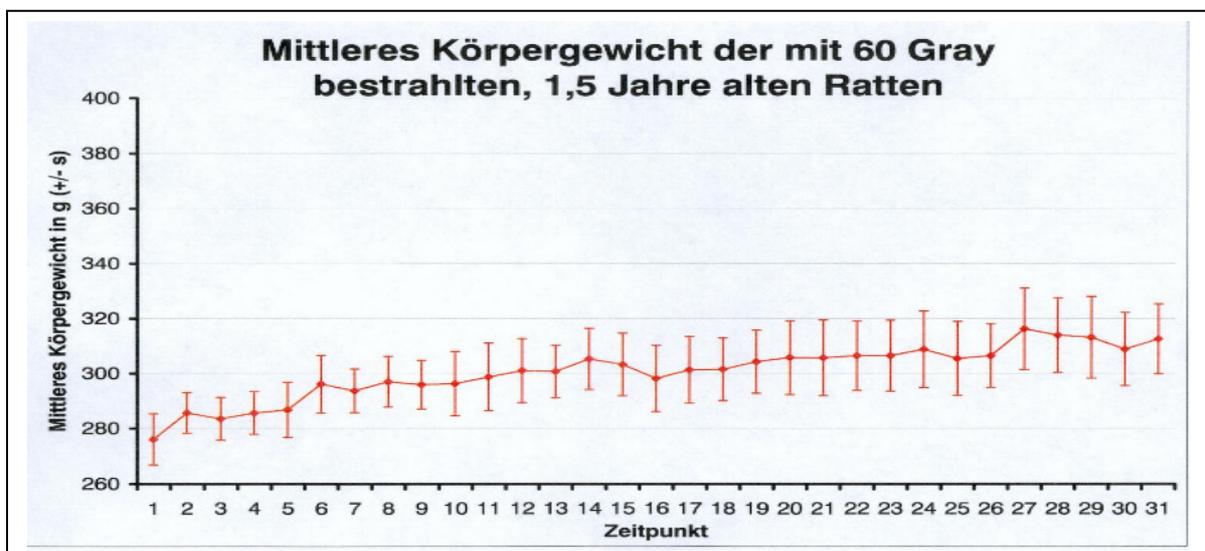
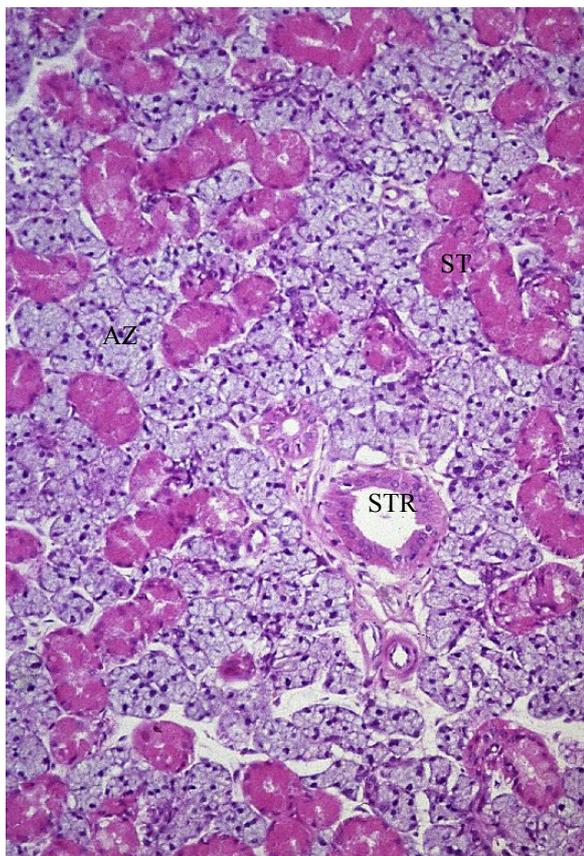
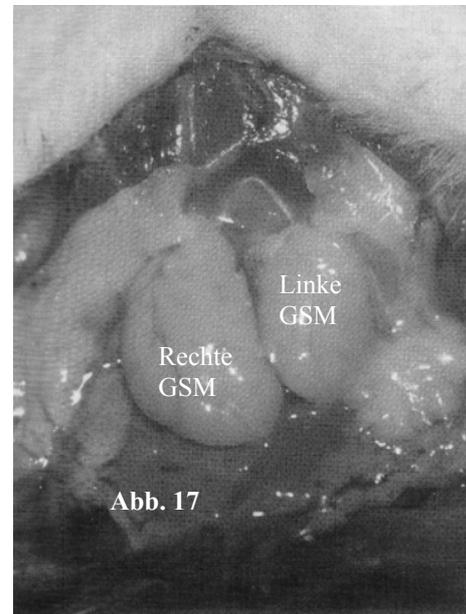
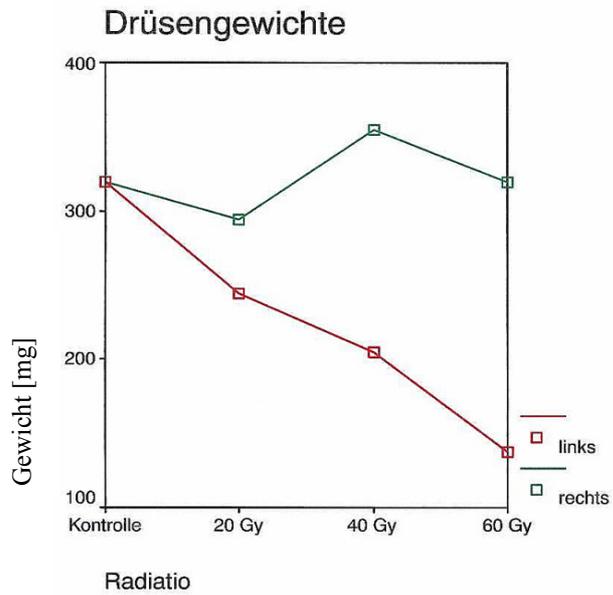


Abb. 18: Graphische Darstellung der Drüsengewichte [mg] in Abhängigkeit von der Radiatio



Normale GSM

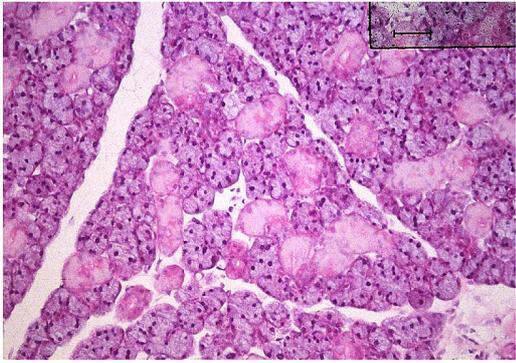
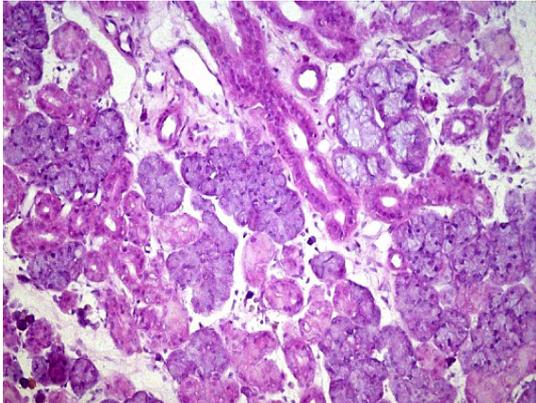
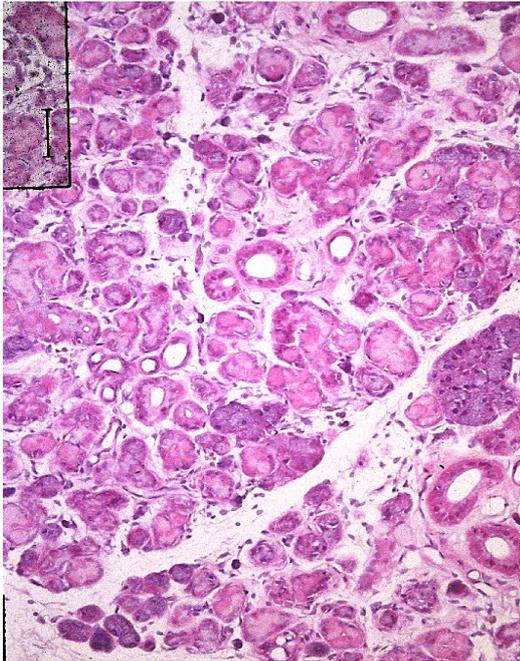
AZ = Azini
ST = Sekretorische Tubuli
STR = Streifenstücke

Tab. 32: Verteilungsmuster der Strahlenschäden nach der pathohistologischen Stadieneinteilung [(nach Seifert 1996 und Dreyer et al., 1989), n = 61 untersuchte Tiere, n = 122 links- und rechtsseitige GSM]

Stadium RT-Gruppen	n	Normal- befunde	Stadium 1	Spätes Stadium 1	Stadium 1-2	Stadium 2	Stadium 2-3	Stadium 3
Linksseitige Submandibulardrüsen (linksseitige Drüsen von Kontrollen und linksseitige, direkt strahlenexponierte Drüsen)								
a. Kontrollen	10	10						
b. 20 Gy	15			14	1			
c. 40 Gy	18		1	1	14	1	*	1
d. 60 Gy	18	1			1	16	*	
Rechtsseitige Submandibulardrüsen (rechtsseitige Drüsen von Kontrollen und rechtsseitige, strahlengeschützte Drüsen von strahlenexponierten Tieren)								
a. Kontrollen	10	10						
b. 20 Gy	15	14		1				
c. 40 Gy	18	17		1				
d. 60 Gy	18	17		1				

* sehr vereinzelt und fokal im Randbereich

Tab. 33: Darstellung der pathohistologischen Befunde in Abhängigkeit von der Strahlendosis. In der 1. Spalte wurde das den Befunden zuzuordnende Stadium (nach Seifert 1996 & Dreyer et al. 1989) bezeichnet, welches für die überwiegende Anzahl der Präparate in der Strahlendosisgruppe charakteristisch war [n = 51, linksseitige Drüsen, davon n = 15 (20 Gy), n = 18 (40 Gy) und n = 18 (60 Gy)]
Die zugeordneten Abb. zeigen jeweils typische Bilder.

Dosis Stadium (S)	Befunde	Histologie
20 Gy Spätes S 1	<ul style="list-style-type: none"> • Fokale Verluste der Drüsenazini • Geringe periduktale Fibrose • Einige Infiltratzellen (vorwiegend Lymphozyten) • Geringe fokale ödematöse Auflockerungen 	
40 Gy Übergangsstadium S 1-2	<ul style="list-style-type: none"> • Z. T. deutliche, aber noch fokal betonte Azinverluste • Mäßige Dilatation der Ausführungsgänge • Mäßige periduktale Fibrose • Wechselnde, mehr mäßige Infiltratzellen (Lymphozyten und Mastzellen) • Ödematöse Auflockerungen 	
60 Gy S 2	<ul style="list-style-type: none"> • Ausgeprägtere Reduktion der AZ • Verbleibende AZ: Zellen und Zellkern etwas vergrößert, teils scholliges Zytoplasma, teils Vakuolenbildung, wechselnd sekretgestaute und im Sekretgranulagehalt verminderte Zellen • Verluste der ST und teilweise der SCH • Verbleibende ST: verringerter Sekretgehalt, Zellkern etwas vergrößert, fokal adenomartige Proliferate • Minderung der basalen Streifung bei STR • Gangdilatationen, insbesondere der STR und GE • Vereinzelt Plattenepithelmetaplasien des Gangepithels • Interstitielle Fibrose, insbesondere um die GE • Interstitielles Ödem • Verbreiterung und Auflockerung der interlobulären Septen • Verdickung der AD, fokale Gefäßeinengungen • Wechselnd gering bis mäßig, z. T. reichlicher Infiltratzellen (Lymphozyten und Mastzellen) 	

Tab. 34a: Linksseitige GSM (n = 61), CK 5/6-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Gruppe Antigen/ AK	Gruppe	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK5/6 D516B4	A	(2)-3	1	1	1	1	3*
	B	3-(4)	1	1	1	1	3*
	C	(3)-4	1	1	1	(1)-2*	3-4*
	D	(3)-4	1	1	1	(1)-2*	3-(4)*

Tab. 34b: Rechtsseitige GSM (n = 61), CK 5/6-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Gruppe Antigen/ Antikörper	Gruppe	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK 5/6 D516B4	A	2-3	1	1	1	1	(2)-3*
	B	((2))-3	1	1	1	1	(2)-3*
	C	3	1	1	1	1-((2))*	((2))-3*
	D	(2)-3	1	1	1	1-((2))*	(2)-3*

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = gering, leicht 4 = mäßig-mittelgradig, moderat 5 = stark bis sehr stark

* = Basalzellen

Tab. 35a: Linksseitige GSM (n = 61), CK 13-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Gruppe Antigen/ AK	Gruppe	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK 13 KS 13.1	a	1	1	3-4	2-(3)	3-4	3-(4)
	b	1	1	3-(4)	2	3-((4))	((2))-3
	c	1	1	4-((5))	2-((3))	((3))-4	3-((4))
	d	1	1	4	2-3	4-(5)	3-4

Tab. 35b: Rechtsseitige GSM (n = 61), CK 13-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Gruppe Antigen/ AK	Gruppe	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK 13 KS 13.1	a	1	1	(3)-4	2	(3)-4	3
	b	1	1	2	2	(2)-3	(2)-3
	c	1	1	3-4	2-((3))	3-(4)	3-((4))
	d	1	1	(3)-4	2	3-4	3

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = gering, leicht 4 = mäßig-mittelgradig, moderat 5 = stark bis sehr stark

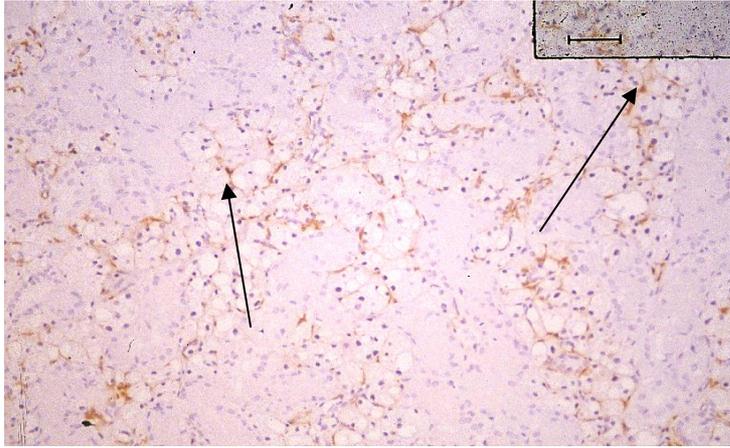


Abb. 19.1: GSM, Kontrolle. CK 5/6-Expression in Myoepithelzellen (↑) und wenigen Basalzellen. X200

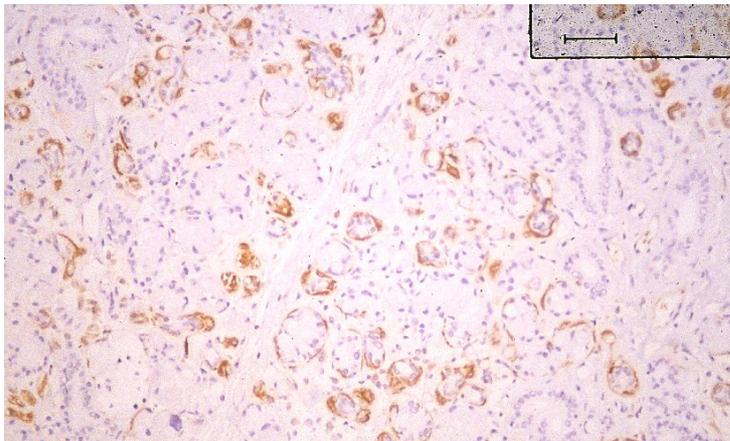


Abb. 19.2: GSM, 60 Gy-Exposition. Verstärkte CK 5/6-Expression in den Myoepithelien. X200

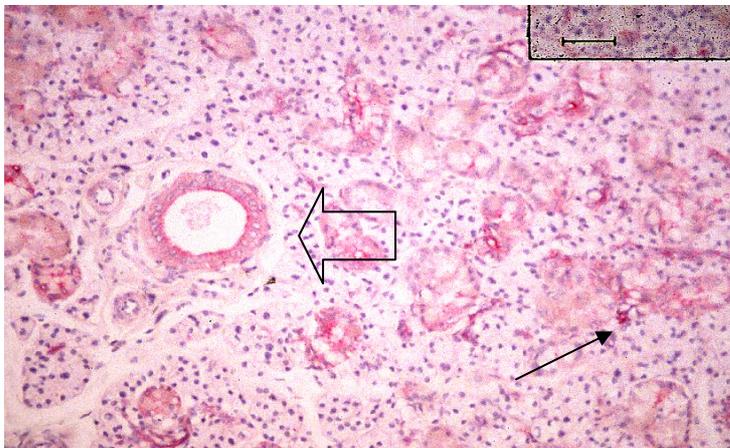


Abb. 19.3: GSM, Kontrolle. CK 13-Expression mit luminaler Betonung in SCH (↑), STR und GE (↑), deutlich zarter in ST. X200

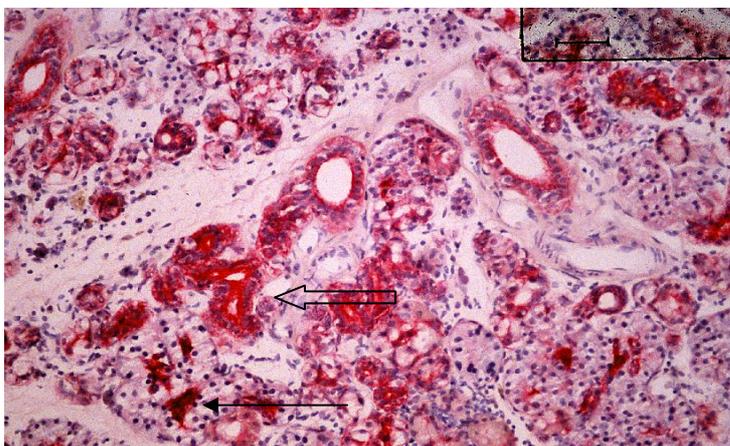


Abb. 19.4: GSM, 60 Gy-Exposition. Verstärkte CK 13-Expression, insbesondere in SCH (↑), STR (↑) und GE. X200

Tab. 36a: Linksseitige GSM (n = 61), CK 13/15/16-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Gruppe Antigen/ AK	Gruppe	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK 13-15-16 K8.12	a	2-(3)	1	1	1	1	2-3*
	b	(2)-3	1	1	1	1	((2))-3*
	c	3-4	1	1	1	1	3*
	d	3-4	1	1	1	1	((2))-3*

Tab. 36b: Rechtsseitige GSM (n = 61), CK 13/15/16-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Gruppe Antigen/ AK	Gruppe	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK 13-15-16 K8.12	a	2-(3)	1	1	1	1	2-3*
	b	2-((3))	1	1	1	1	2-((3))*
	c	2-3	1	1	1	1	(2)-3*
	d	2-3	1	1	1	1	2-3*

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = gering, leicht 4 = mäßig-mittelgradig, moderat 5 = stark bis sehr stark
* = Basalzellen

Tab. 37a: Linksseitige GSM (n = 61), CK 17/19-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Gruppe Antigen/ AK	Gruppe	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK 17/19 E3	a	1	1-(2)	(3)-4	1	3-4	(3)-4
	b	1	1-(2)	4-5	1-((2))	((3))-4	4-((5))
	c	1	1-(2)	4-5	1 (2*)	4-(5)	4-(5)
	d	1	1-((2))	(4)-5	1 (2*)	4-5	4-5

* = einzelne Präparate bzw. fokal

Tab. 37b: Rechtsseitige GSM (n = 61), CK 17/19-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Gruppe Antigen/ AK	Gruppe	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK 17/19 E3	a	1	1	4-((5))	1	3-4	4
	b	1	1-(2)	4-((5))	1	(3)-4	(3)-4
	c	1	1-((2))	4-((5))	1	((3))-4	((3))-4
	d	1	1	4-(5)	1	4	((3))-4

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = gering, leicht 4 = mäßig-mittelgradig, moderat 5 = stark bis sehr stark

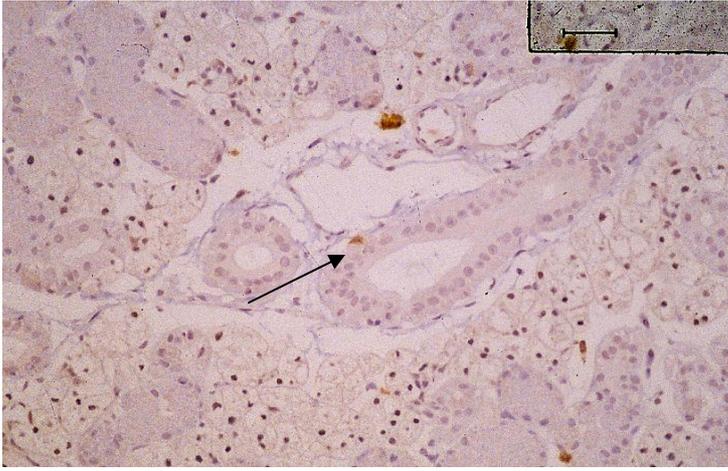


Abb. 20.1: GSM, Kontrolle. CK 13/15/16-Expression in Myoepithelien (sehr zart) und Basalzellen, hier i. B. eines schräg angeschnittenen Streifenstücks (↑). X300

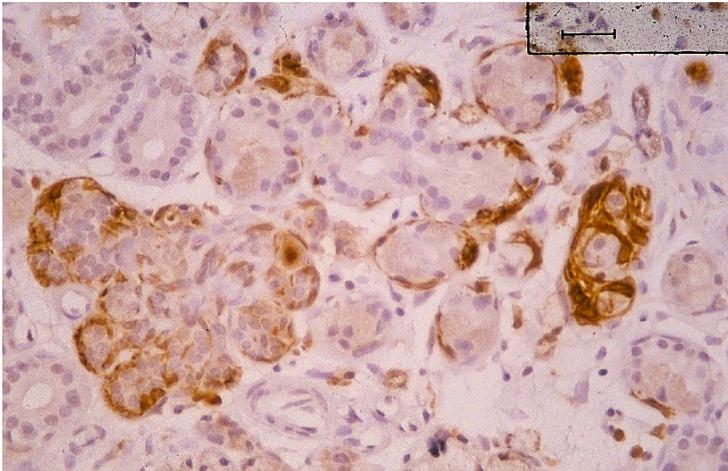


Abb. 20.2: GSM, 60 Gy-Exposition. Recht kräftige CK 13/15/16-Expression in Myoepithelien. X400

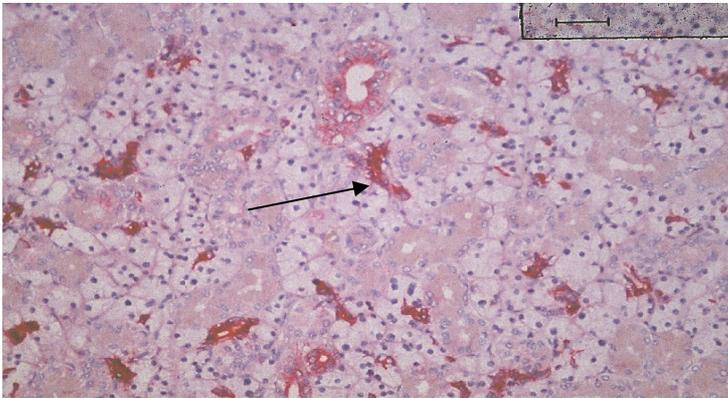


Abb. 21.1: GSM, Kontrolle. CK 17/19-Expression in Schaltstücken (↑) und Streifenstücken mit luminaler Betonung. X200

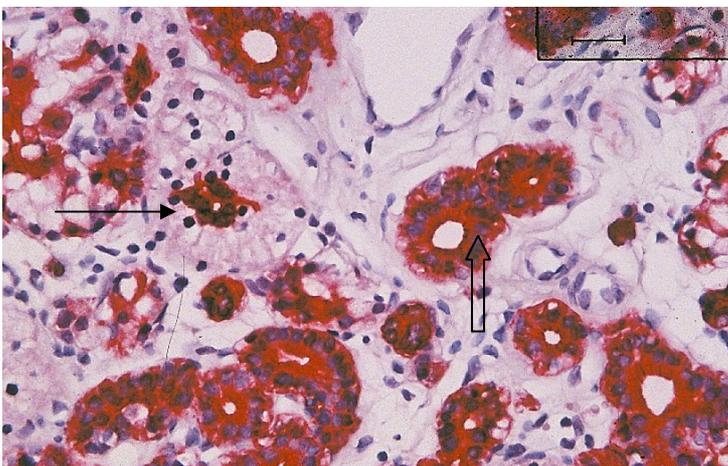


Abb. 21.2: GSM, 60 Gy-Exposition. Starke CK 17/19-Expression in Schaltstücken (↑) und Streifenstücken (↑↑). x400

Tab. 38a: Linksseitige GSM (n = 61), CK 18-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Antigen/ AK Gruppe	Gruppe	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK 18 KS18.04	a	1	1-2	3-(4)	2-(3)	3-(4)	4
	b	1	((1))-2	3-(-(4))	2-((3))	3	3-4
	c	1	2-3	3-4	2-3	3-4	((3))-4
	d	1	(2)-3	(3)-4	2-3	3-4	4-((5))

Tab. 38b: Rechtsseitige GSM (n = 61), CK 18-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Antigen/ AK Gruppe	Gruppe	MYO	AZ	SCH	ST	STR	GE
CK 18 KS18.04	a	1	(1)-2	3	2	3	3-(4)
	b	1	((1))-2	3	2-((3))	3	(3)-4
	c	1	2	((2))-3	2-((3))	3	3-4
	d	1	((1))-2	3-(4)	2-((3))	3-(4)	3-(4)

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = gering, leicht 4 = mäßig-mittelgradig, moderat 5 = stark bis sehr stark

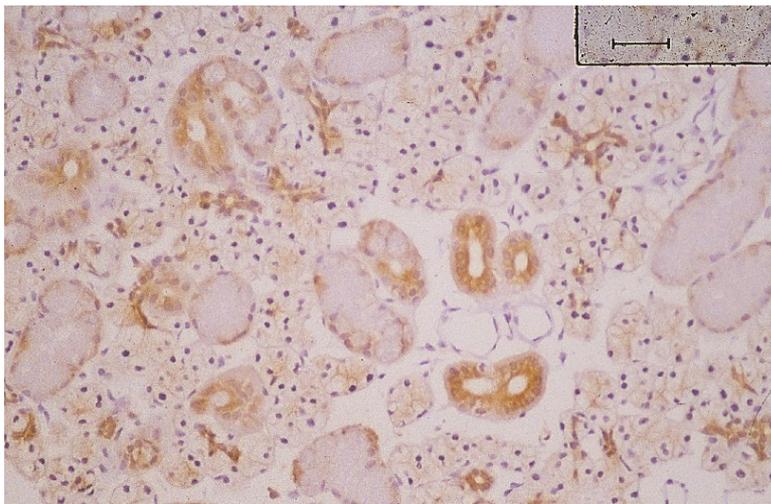


Abb. 22.1: GSM, Kontrolle. Leichte CK 18-Expression in Schaltstücken und Streifenstücken, deutlich zarter und basal betont in sekretorischen Tubuli. X300

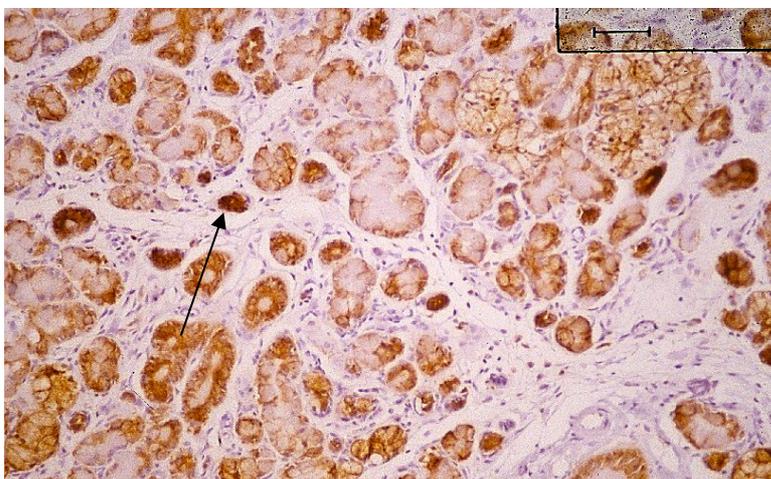


Abb. 22.2: GSM, 60 Gy-Exposition. Deutlich akzentuierte CK 18-Expression im Gangsystem, hier bes. i. B. der Schaltstücke (↑). X200

Tab. 39a: Linksseitige GSM (n = 61), Vimentin-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Gruppe	Gruppe	Nervengewebe	KAP	EN	TME	AD	Fibroblasten Fibrozyten	MYO	AZ SCH ST STR GE
Vimentin GP 53	a	2-3	2-3	3-(4)	2-3	1	(2)-3	1-2	1
	b	3-((4))	3-((4))	4-((5))	3-((4))	1	3-((4))	2-((3))	1
	c	3-((4))	3-(4)	4	3-(4)	1	3-(4)	2-((3))	1
	d	3-4	(3)-4	4-((5))	3-(4)	1	(3)-4	2-(3)	1

Tab. 39b: Rechtsseitige GSM (n = 61), Vimentin-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

Drüsengewebe Gruppe	Gruppe	Nervengewebe	KAP	EN	TME	AD	Fibroblasten Fibrozyten	MYO	AZ SCH ST STR GE
Vimentin GP 53	a	(2)-3	(2)-3	3-4	(2)-3	1	3-(4)	(1)-2	1
	b	3-((4))	3-((4))	((3))-4	((2))-3	1	3-((4))	2-((3))	1
	c	((2))-3	3-((4))	((3))-4	((2))-3	1	3-((4))	2	1
	d	3-((4))	3-((4))	4	3-((4))	1	3-((4))	2-((3))	1

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = gering, leicht 4 = mäßig-mittelgradig, moderat 5 = stark bis sehr stark

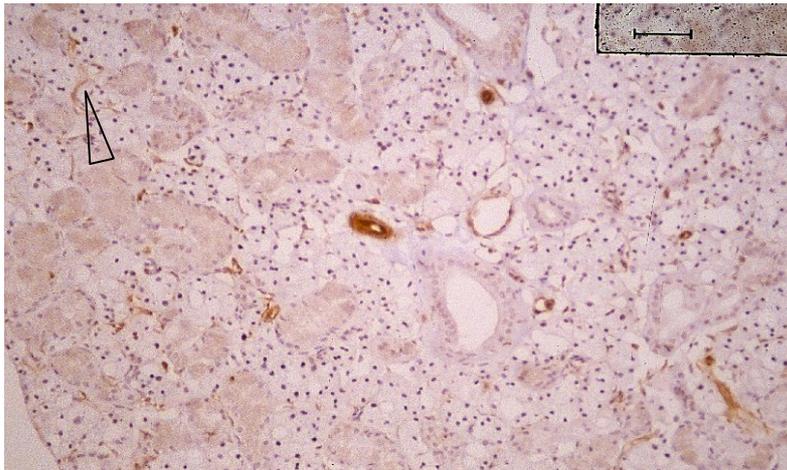


Abb. 23.1: GSM, Kontrolle. Leichte bis kräftige Vimentin-Expression bei Gefäßen (EN, TME), recht zart bei Myoepithelien (▽). X200

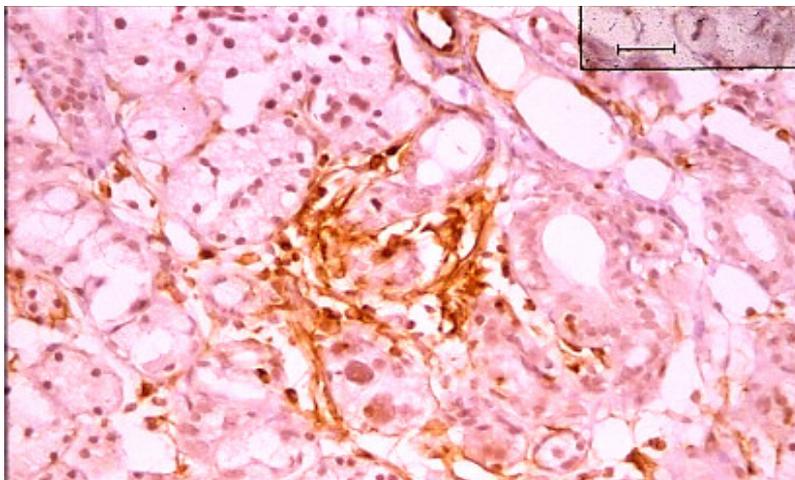


Abb. 23.2: GSM, 60 Gy-Exposition. Deutlich akzentuierte Vimentin-Expression in einem Myoepithelzellhaufen. X400

Tab. 40a: Linksseitige GSM (n = 61), Kollagen I-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

GSM-Gewebe Gruppe AK	Gr.	NERV	Gefäßwand		KA	SE	um MYO	um AZ	um SCH	um ST	um STR	um GE
			KAP SEN TME	AD								
Anti -CI	a	3	1	3	(2)-3	2-3	1	1*	1*	1*	2	3
	b	3-((4))	1	3-((4))	3-((4))	2-(3)	1	1	1	1	2-(3)	3-((4))
	c	(3)-4	1	(3)-4	3-((4))	2-3	1	1-((2))	1-(2)	1-(2)	3	(3)-4
	d	((3))-4	1	((3))-4	((3))-4	3	1	((1))-2	((1))-2	((1))-2	3-((4))	((3))-4

* = äußerst zart, häufiger auch fehlend

Tab. 40b: Rechtsseitige GSM (n = 61), Kollagen I-Expression, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

GSM-Gewebe Gruppe AK	Gr.	NERV	Gefäßwand		KA	SE	um MYO	um AZ	um SCH	um ST	um STR	um GE
			KAP SEN TME	AD								
Anti -CI	a	3	1	3-(4)	3	2-3	1	1*	1*	1*	2	3-(4)
	b	3-((4))	1	3-((4))	3	2-((3))	1	1	1	1	2-((3))	3-((4))
	c	3-((4))	1	3-((4))	3	2	1	1	1	1	2-(3)	3-((4))
	d	3-((4))	1	3-((4))	3-((4))	2-((3))	1	1	1-((2))	1-((2))	2-((3))	3-((4))

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = zart, dünn, kontinuierlich, leicht linienförmig 4 = mäßig-mittelgradig, deutlich

5 = stark bis sehr stark, balkenartig oder mehr flächenhaft

* = äußerst zart, häufiger auch fehlend

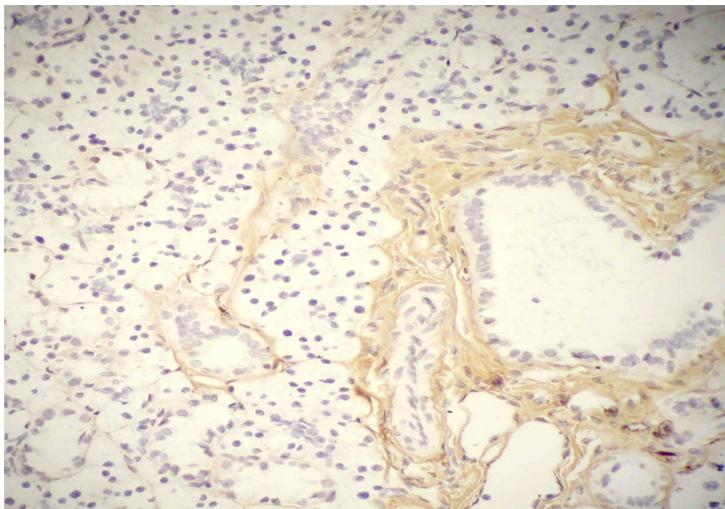


Abb. 24.1: GSM, Kontrolle. Zarte bis leichte CI-Expression um Streifenstücke und Gangepithelien. Extrem zart und fokal um Azini und sekretorische Tubuli. X200

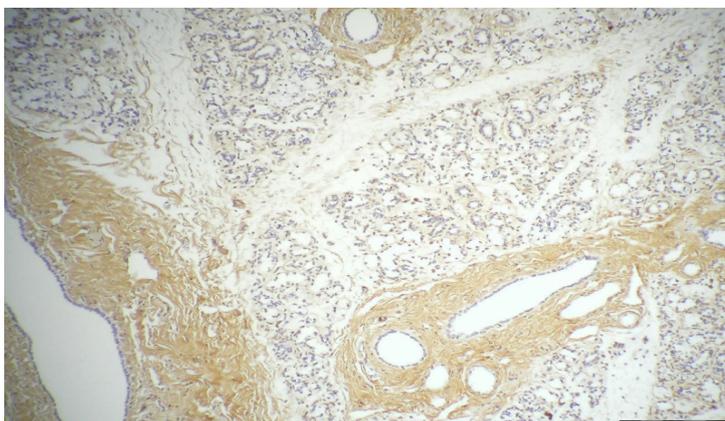


Abb. 24.2: GSM, 60 Gy-Exposition. Deutlich verbreiterte und akzentuierte CI-Expression um Gangepithelien. Flächenhafte Immunreaktionen um sonstige Drüsenstrukturen und i. B. verbliebener Azini. X150

Tab. 41a: Linksseitige GSM (n = 61), Lamininexpressionsprofil, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

GSM-Gewebe Gruppe AK	Gr	NG	Gefäßwand				KA	SE	um MYO	um AZ	um SCH	um ST	um STR	um GE
			KAP	SEN	TME	AD								
Anti-Laminin	a	3-4	3	3	2-(3)	1	1	1	1	(2)-3	2-3	2	2-3	2
	b	3-(4)	(2)-3	3	2-((3))	1	1	1	1	2-3((4))	2-3	2	2	2-((3))
	c	3-4	3-4	3-4	2-3	1	1	1	1	2-3	(2)-3	2-((3))	2-3	(2)-3((4))
	d	(3)-4-(5)	(3)-4	(3)-4	(2)-3	1	1	1	1	(2)-3-(4)	(3)-4	2-3	((2))-3	3-(4)

Tab. 41b: Rechtsseitige GSM (n = 61), Lamininexpressionsprofil, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

GSM-Gewebe Gruppe AK	Gr	NG	Gefäßwand				KA	SE	um MYO	um AZ	um SCH	um ST	um STR	um GE
			KAP	SEN	TME	AD								
Anti-Laminin	a	3-(4)	(2)-3	(2)-3	2-(3)	1	1	1	1	2-(3)	2-(3)	2	2-(3)	2
	b	3	(2)-3	3	2	1	1	1	1	2-(3)	2	2	2	2
	c	3	((2))-3	3	2	1	1	1	1	2-3	2-((3))	2	2-(3)	2
	d	3-4((5))	3-((4))	3-((4))	2-((3))	1	1	1	1	(2)-3	(2)-3	2-((3))	2-(3)	2-(3)

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = zart, dünn, kontinuierlich, leicht deutlich linienförmig 4 = mäßig- bis mittelgradig, 5 = stark bis sehr stark, balkenartig oder mehr flächenhaft

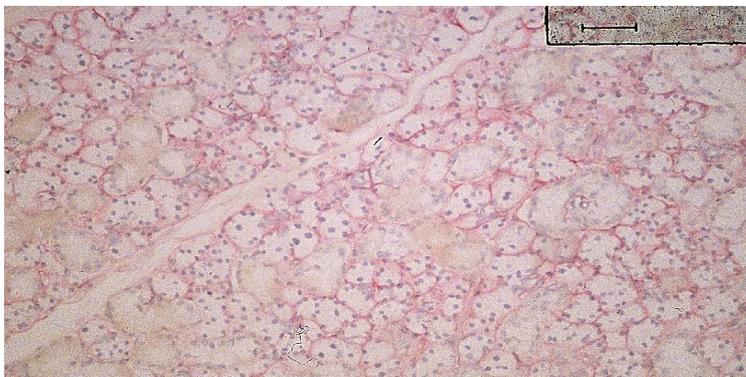


Abb. 25.1: GSM, Kontrolle. Zarte bis leichte Lamininexpression um die verschiedenen Strukturen des Drüsenparenchyms. X200

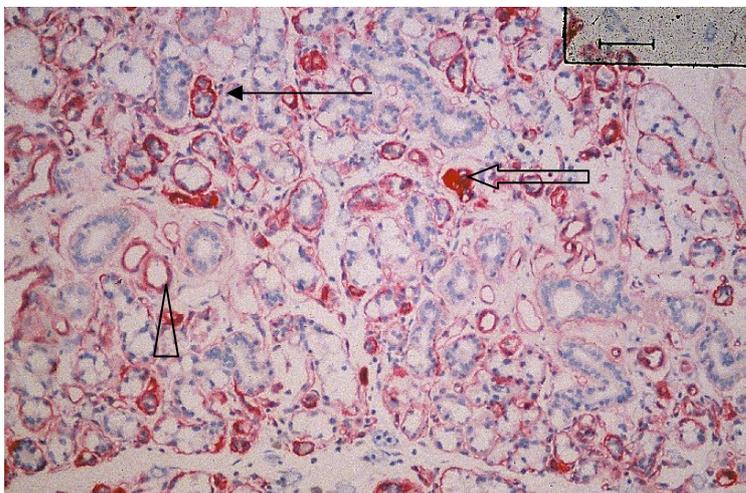


Abb. 25.2: GSM, 60 Gy-Exposition. Kräftige Lamininexpression, hier besonders um die Schaltstücke (↑) und i. B. miterfasster Gefäße (∇). Daneben sind fokal Konglomerate (△) sichtbar. X200

Tab. 42a: Linksseitige GSM (n = 61), Fibronectinexpressionsprofil, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

GSM-Gewebe Gruppe AK	Gr	NG	Gefäßwand				KA	SE	um MY O	um AZ	um SC H	um ST	um STR	um GE
			KAP	SEN	TME	AD								
Anti-Fibronectin	a	1-2	2-(3)	2-(3)	2	3	3	2	1	1-(2)	1-2	(1)-2	2-3	3-4
	b	((2))-3	2-(3)	((2))-3	2-((3))	((2))-3	2-3	2	1	1-(2)	(1)-2	2-((3))	((2))-3	(3)-4
	c	3-((4))	2-3	((2))-3	2-((3))	3-((4))	3-((4))	((1))-2	1	1-2	1-2	(2)-3	3-((4))	((3))-4
	d	(3)-4	((2))-3	3	2-((3))	(3)-4	4	3-((4))	1	(1)-2	(1)-2	((2))-3	(3)-4	(4)-5

Tab. 42b: Rechtsseitige GSM (n = 61), Fibronectinexpressionsprofil, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

GSM-Gewebe Gruppe AK	Gr	NG	Gefäßwand				KA	SE	um MY O	um AZ	um SC H	um ST	um STR	um GE
			KAP	SEN	TME	AD								
Anti-Fibronectin	a	(1)-2	2-3	2-3	2	3	3	2	1	1-(2)	(1)-2	2-(3)	(2)-3	(3)-4
	b	((2))-3	2-(3)	((2))-3	2	((2))-3	2-(3)	1-2	1	1-((2))	1-(2)	((1))-3	((2))-3	3-(4)
	c	(2)-3	2-((3))	2-3	2	((2))-3	2-3	1-(2)	1	1-(2)	1-(2)	2-((3))	(2)-3	3-(4)
	d	3	2-((3))	((2))-3	2	((2))-3	3-(4)	(1)-2	1	1-(2)	1-(2)	2-((3))	(2)-3	3-4

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = zart, dünn, kontinuierlich, leicht 4 = mäßig- bis mittelgradig, deutlich linienförmig 5 = stark bis sehr stark, balkenartig oder mehr flächenhaft

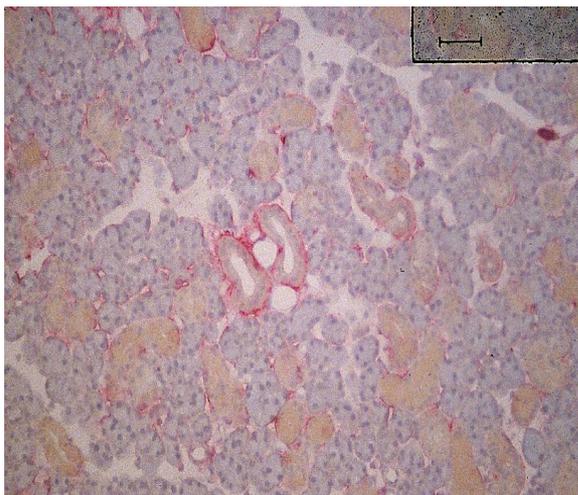


Abb. 26.1: GSM, Kontrolle. Zarte interstitielle Fibronectinexpression mit linearer Verdichtung um Gangepithelien. X200

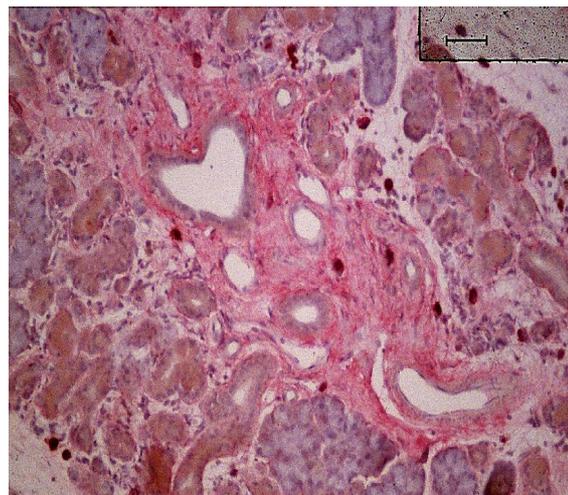


Abb. 26.2: GSM, 60 Gy-Exposition. Deutlich verbreiterte Fibronectinexpression um Gangepithelien und Streifenstücke. Mehr flächenhafte Kondensationen um Azini und sekretorische Tubuli. Reichlich stark positive Infiltratzellen. X200

Tab. 43a: Linksseitige GSM (n = 61), C III-Expressionsprofil, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

GSM-Gewebe Gruppe AK	Gr	NG	Gefäßwand				KA	SE	um MYO	um AZ	um SCH	um ST	um STR	um GE
			KAP	SEN	TME	AD								
Anti-Kollagen III	a	3	(2)-3	3	3	2	(1)-2	(1)-2	1	2-3	(2)-3	2	3	2-3
	b	3-((4))	3-((4))	3-4	3-((4))	2-((3))	(1)-2	((1))-2	1	2-3	(2)-3	2-(3)	2-(3)	2-(3)
	c	3-4	3-4	((3))-4	3-4	2-((3))	2	((1))-2	1	3	3-(4)	2-3	(2)-3	(2)-3
	d	4-5	4-(5)	(4)-5	4-(5)	2-3	(1)-2	(1)-2	1	(3)-4	(4)-5	(3)-4	3-4	(3)-4

Tab. 43b: Rechtsseitige GSM (n = 61), C III-Expressionsprofil, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

GSM-Gewebe Gruppe AK	Gr	NG	Gefäßwand				KA	SE	um MYO	um AZ	um SCH	um ST	um STR	um GE
			KAP	SEN	TME	AD								
Anti-Kollagen III	a	3	(2)-3	3	3	2	1-2	1-2	1	2-3	2-3	2-(3)	2-3	2-(3)
	b	3	((2))-3	3-((4))	((2))-3	2	1-2	1-2	1	2-3	2-3	2-((3))	2	2
	c	3-((4))	3-(4)	3-(4)	3	((1))-2	(1)-2	(1)-2	1	(2)-3	(2)-3	2-((3))	2-(3)	2-((3))
	d	3-(4)	3-4	3-4	3-(4)	2-((3))	1-2	1-2	1	2-3	3	2-3	2-3	2-3

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = zart, dünn, kontinuierlich, leicht 4 = mäßig- bis mittelgradig, deutlich linienförmig 5 = stark bis sehr stark, balkenartig oder mehr flächenhaft

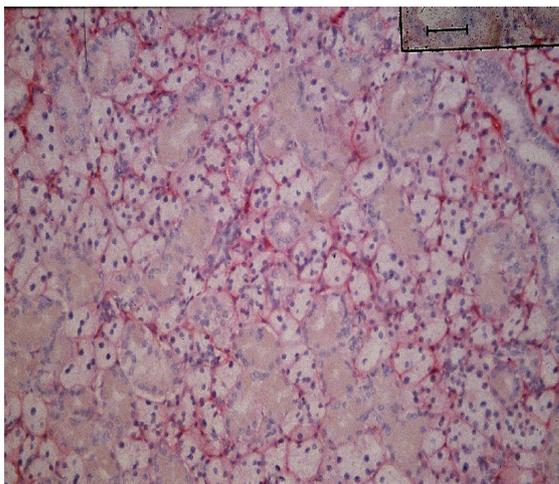


Abb. 27.1: GSM, Kontrolle. Zarte bis leichte interstitielle CIII-Expression mit Verdichtungen um die Parenchymstrukturen. X200

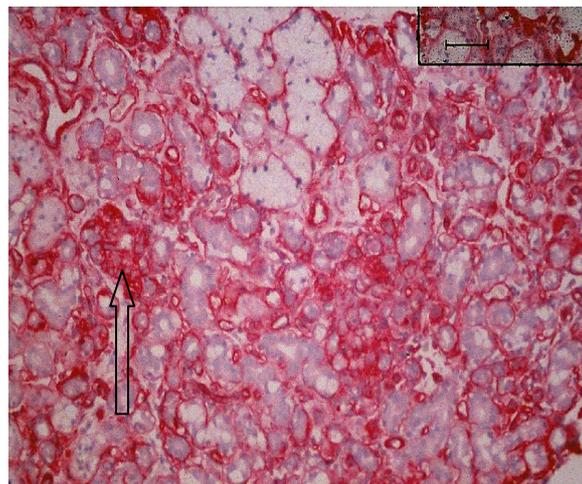


Abb. 27.2: GSM, 60 Gy-Exposition. Recht kräftig verstärkte, teilweise flächenhafte und Konglomerate (↑) bildende CIII-Expression. X200

Tab. 44a: Linksseitige GSM (n = 61), C IV-Expressionsprofil, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

GSM-Gewebe Gruppe AK	Gr	NG	Gefäßwand				KA	SE	um MYO	um AZ	um SCH	um ST	um STR	um GE
			KAP	SEN	TME	AD								
Anti-Kollagen IV	a	2-3	2-3	3-4	2-3	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	b	2-3	3	4	3	1	1	1	1	2-3	2-3	2-((3))	2-((3))	2-((3))
	c	3-((4))	(3)-4	4	3-((4))	1	1	1	1	(2)-3	3-(4)	2-3	2-3	2-3
	d	3-(4)	4	((4))-5	4	1	1	1	1	3-(4)	(4)-5	3-4	3-(4)	3-(4)

Tab. 44b: Rechtsseitige GSM (n = 61), C IV-Expressionsprofil, a = Kontrollen, b = 20 Gy, c = 40 Gy, d = 60 Gy

GSM-Gewebe Gruppe AK	Gr	NG	Gefäßwand				KA	SE	um MYO	um AZ	um SCH	um ST	um STR	um GE
			KAP	SEN	TME	AD								
Anti-Kollagen IV	a	2-3	2-3	3-4	(2)-3	1	1	1	1	2-(3)	2-(3)	(1)-2	2	2
	b	2-3	((2))-3	(3)-4	(2)-3	1	1	1	1	2-((3))	2-((3))	2	2	2
	c	((2))-3	3-(4)	(3)-4	((2))-3	1	1	1	1	2-(3)	2-(3)	2-((3))	2-((3))	2-((3))
	d	3-((4))	3-(4)	4-((5))	3-((4))	1	1	1	1	2-(3)	2-(3)	2-(3)	2-(3)	2-(3)

Bewertung der Färbereaktion:

1 = negativ 2 = hauchzart 3 = zart, dünn, kontinuierlich, leicht 4 = mäßig- bis mittelgradig, eher flächenhaft

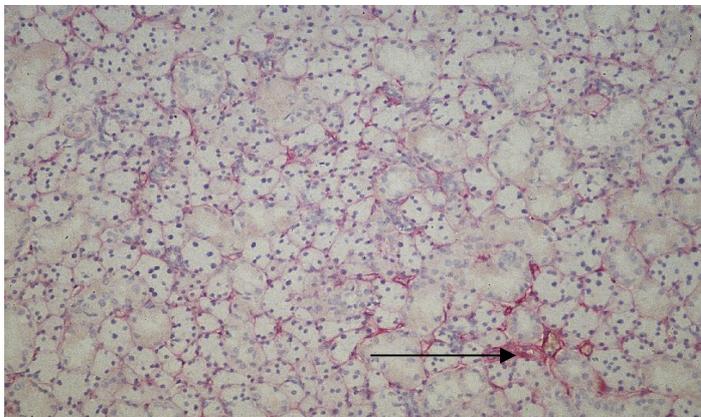


Abb. 28.1: GSM, Kontrolle. Recht zarte CIV-Expression der BM um die Drüsenstrukturen, akzentuierte Reaktion (↑) i. B. miterfasster Gefäße (SEN, TME, KAP). X200

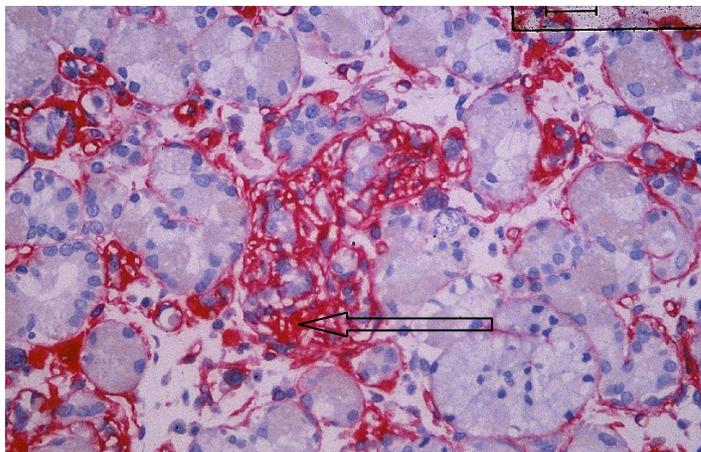


Abb. 28.1: GSM, 60 Gy-Exposition. Verbreiterte und verstärkte sowie teilweise mit Konglomeratbildung (↑) einhergehende CIV-Expression. X400

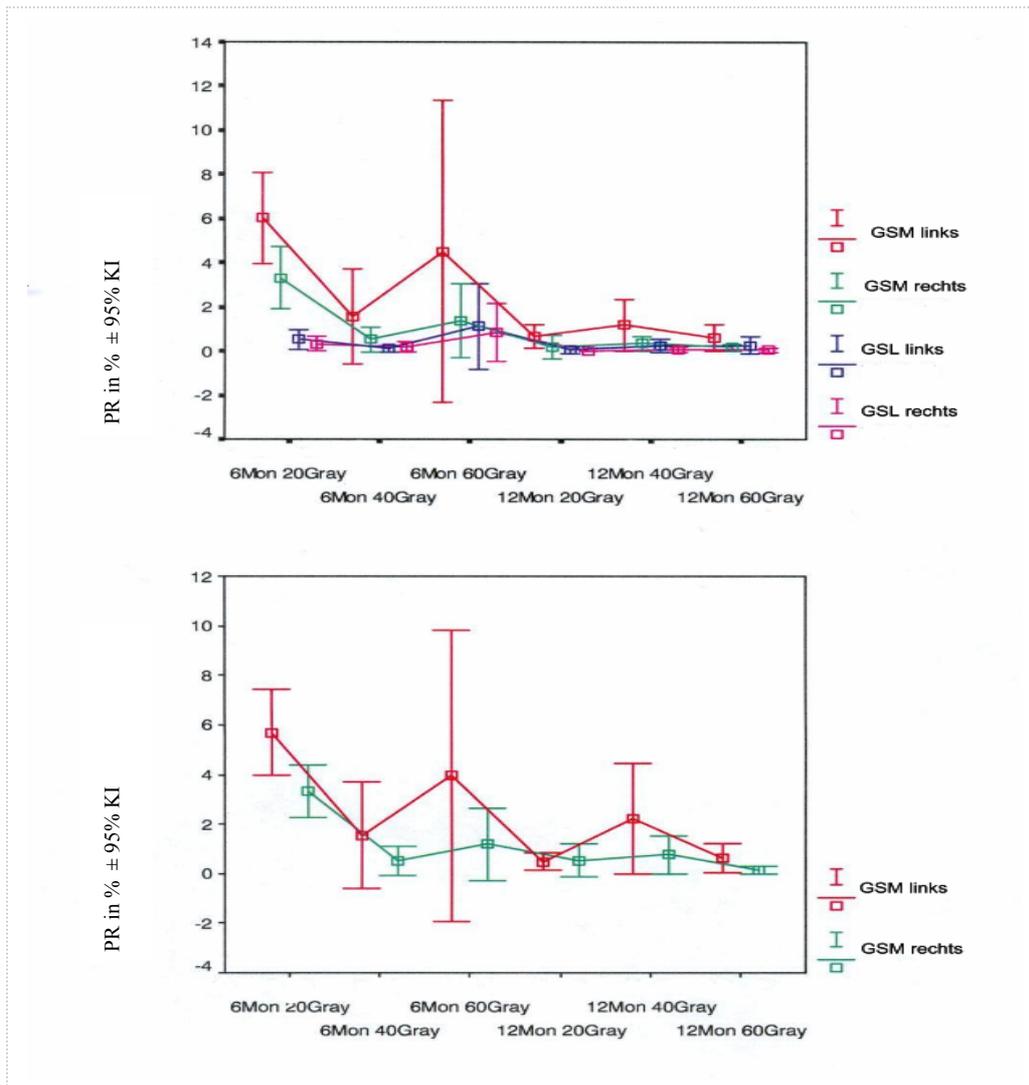


Abb. 29a: Darstellung der PR in Gruppen und im Zeitverlauf, die als Interaktionsvariable gebildet wurden. Oben sind alle 4 Drüsen, unten die beiden GSM zusammengefasst

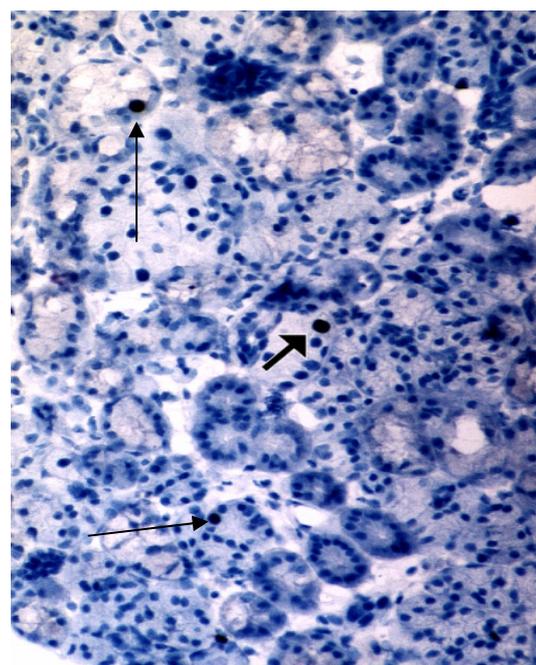


Abb. 29b: Ki-67-Expression (AK: MIB-5). GSM (60 Gy-Exposition, LR: 1/2a).

Tab. 45: PR in % (Mittelwerte \pm Standardfehler) bei den 4 untersuchten Speicheldrüsen (GSM links: n = 54, GSM rechts: n = 54; GSL links: n = 44; GSL rechts: n = 44) im Verhältnis zu den verschiedenen RT-Dosisgruppen (B-D) und Latenzzeiten (E-F) sowie bei Kontrollen (A)

Drüse / Gruppe	Gruppe	GSM links	GSM rechts	GSL links	GSL rechts
Proliferationsrate in % (MIB-5-AK)	A Kontrollen	0.32 \pm 1.46	0.16 \pm 0.53	0.075 \pm 0.45	0 \pm 0.3
	B 20 Gy	2.753 \pm 0.84	1.933 \pm 0.27	0.272 \pm 0.25	0.175 \pm 0.19
	C 40 Gy	1.885 \pm 0.86	0.773 \pm 0.25	0.175 \pm 0.24	0.128 \pm 0.16
	D 60 Gy	2.275 \pm 0.79	0.679 \pm 0.24	0.687 \pm 0.21	0.392 \pm 0.14
	E 6-M-LR	3.755 \pm 0.73	1.769 \pm 0.22	0.578 \pm 0.21	0.414 \pm 0.13
	F 12-M-LR	1.099 \pm 0.62	0.488 \pm 0.19	0.178 \pm 0.17	0.05 \pm 0.13

6 M-LR bzw.12-M-LR = Untersuchung 6 bzw. 12 Monate nach abgeschlossener RT

Tab. 46: PR in % mit Angabe der Mittelwerte \pm Standardabweichung sowie Variationsbreite (in Klammern) bei den 4 untersuchten Speicheldrüsen (GSM links: n = 54, GSM rechts: n = 54, GSL links: n = 44, GSL rechts: n = 44) im Verhältnis zu den 6 Gruppen (B-G), die als Interaktionsvariable gebildet wurden, zum Gesamtwert der exponierten Tiere (H) sowie bei Kontrollen (A)

Drüse / Gruppe	Gruppe	GSM links	GSM rechts	GSL links	GSL rechts
Proliferationsrate in % (MIB-5-AK)	A Kontrollen	0.32 \pm 0.21 (0-1)	0.16 \pm 0.22 (0-0.6)	0.075 \pm (0-0.3)	0 \pm (0-0.1)
	B 20 Gy 6-M-LR	5.028 \pm 2.34 (1-7.7)	3.333 \pm 1.00 (2.2-5)	0.52 \pm 0.34 (0.2-0.9)	0.35 \pm 0.24 (0-0.7)
	C 40 Gy 6-M-LR	1.550 \pm 2.03 (0-4.2)	0.785 \pm 0.88 (0-2.4)	0.05 \pm 0.15 (0-0.4)	0.166 \pm 0.22 (0-0.5)
	D 60 Gy 6-M-LR	3.950 \pm 7.01 (0-21)	1.187 \pm 1.74 (0-5)	1.114 \pm 2.09 (0-5.8)	0.725 \pm 1.34 (0-4)
	E 20 Gy 12-M-LR	0.477 \pm 0.44 (0-1.1)	0.533 \pm 0.86 (0-2.7)	0.05 \pm 0.16 (0-0.2)	0 \pm 0 (0)
	F 40 Gy 12-M-LR	2.220 \pm 3.15 (0-10.7)	0.760 \pm 1.05 (0-3.2)	0.25 \pm 0.28 (0-0.7)	0.05 \pm 0.15 (0-0.4)
	G 60 Gy 12-M-LR	0.60 \pm 0.81 (0-2.3)	0.170 \pm 0.22 (0-0.7)	0.26 \pm 0.53 (0-1.7)	0.05 \pm 0.12 (0-0.4)
	H GW-RT	2.172 \pm 3.58 (0-21)	0.982 \pm 1.35 (0-5)	0.359 \pm 0.90 (0-5.8)	0.239 \pm 0.62 (0-4)

6 M-LR bzw.12-M-LR = Untersuchung 6 bzw. 12 Monate nach abgeschlossener RT

GW-RT = PR-Gesamtwert exponierter Tiere

Histologische Feinstruktur der extrakraniellen Tumore

PECA (im Bereich der Maxilla)

Die Tumorzellen zeigen eine angedeutete epidermoide Differenzierung mit deutlich ausgebildeten Interzellularbrücken, z. T. sind glanduläre Strukturen entwickelt. Es besteht eine Kernpolymorphie mit variabler Chromatindichte und Kerngröße. Prominente Nucleoli. Ausgedehnte Tumordinfiltrate sind im Oberkieferknochen nachweisbar. Im Randgebiet der Kompakta ist einseitig Drüsengewebe mit soliden epithelialen Tumorformationen erkennbar. Das Bild spricht für mittelgradig differenzierte, nicht verhornende PECA mit Knochendestruktion.

PECA (im Bereich der Speicheldrüsen)

Die epithelialen Tumorzellformationen schließen zumeist deutlichere Verhornungen mit ein. Die Tumorzellen bilden zumeist größere Komplexe mit moderaterer Pleomorphie der Tumorzellen und moderater Atypie der Zellkerne, häufiger findet sich ein vesikuläres Kernbild. Daneben sind prominente Nucleoli und Mitosen erkennbar. Nachweis von Apoptosen. Fokal sind ausgedehntere Nekrosen erkennbar. Das Bild spricht für überwiegend mittelgradig bis hochdifferenzierte PECA.

Mikrozystische Adenokarzinome

Es finden sich drüsenartig-tubuläre Zellformationen sowie wechselnd dominierende mikrozystische Strukturen bzw. Formationen. Multilokuläres Wachstumsmuster. Ein aktiviertes Kernbild mit Polymorphie ist entwickelt, z. T. finden sich vesikuläre Kernbilder. Teilweise kommt es zu bizarren Kernatypien. Die Zellordnung ist gelegentlich doppelreihig. Abschnittsweise sind nur gelegentlich nachweisbare Mitosen, abschnittsweise erhöhte Mitoseraten auffällig. Das Bild spricht am ehesten für mikrozystische Adenokarzinome.

Zystadenokarzinome

Es zeigen sich tubuläre, mikrozystische und papilläre Tumorzellformationen, z. T. auch solidere Formationen. Die auskleidenden Epithelien sind z. T. zweireihig angeordnet. Die innere Epithelschicht zeigt eine kubische bis zylindrische Gestalt. In den wechselnd weiten Lumina finden sich reichlich Schaumzellen. Es sind schmale Stromasepten entwickelt, teilweise zeigt sich ein kribriiformes Bild. Wenige Mitosen und einige Kernatypien sind nachweisbar. Das Bild spricht am ehesten für niedrig maligne Zystadenokarzinome.

Adenokarzinom mit sebazöser Differenzierung

Es finden sich atypische adenoide Tumorzellformationen und solid-trabekuläre (tubuläre) Formationen. Stromadesmoplasie. Gelegentlich sind Mitosen nachweisbar, ebenso sind Apoptosen und aktivierte blastäre Kernbilder zu finden. Teilweise kommt es zu sebazösen Differenzierungen. Das Bild weist am ehesten auf ein mögliches Adenokarzinom mit sebazöser Differenzierung hin.

Adenoid-zystische Karzinome

Es zeigen sich unterschiedlich große Tumorzellnester mit z. T. adenoiden Formationen. Dazwischen eingeschlossen sind unterschiedlich große, zylinderförmigen Pseudozysten entsprechende Spalträume nachweisbar. Weiterhin sind Perineuralscheideninfiltrationen erkennbar. Teilweise besteht ein Zelldualismus. Kribriiforme Strukturmuster. Das Bild spricht am ehesten für Strukturmuster von adenoidzystischen Karzinomen, die dem glandulär-kribriiformen Subtyp zuzuordnen sind.

Fibrome bzw. Firboadenome

Es zeigen sich ausgeprägte Fibrosen und Sklerosen, im Randbereich ist oft miterfasstes Drüsenrestgewebe erkennbar. Zum Teil sind knotige Proliferationen im Sinne einer fibroadenomatösen Sklerose entwickelt.

Tab. 47: Lokalisation und Tumortypverteilungsmuster der „spontanen“ (nichtbestrahlte Tiere) und strahlenassoziierten (im Strahlenfeld gelegenen) Tumore (n = 23)

Tumortypen	Lokalisation	ISF		ASF	
	Radiatio	Ja	Nein	Ja	Nein
Maligne Tumore					
Zystadenokarzinome		2 (SD)	-	-	
Mikrozystische Adenokarzinome		1 (SD)	-	-	1 (ML)
Adenoid-zystische Karzinome		2 (SD)	-	-	1 (ML)
Adenokarzinom mit sebazöser Differenzierung			-	-	1 (ML)
Plattenepithelkarzinome		5 (4: SD, 1: Maxilla)	-	-	1 (Maxilla)
Benigne Tumore					
Fibrome / Fibroadenome / Fibrose / Sklerose		1 (SD)	-	-	8 (ML)

() = Tumorursprungsort

SD = Speicheldrüsen

ML = Milchleistenregion

ISF = Im Strahlenfeld

ASF = Außerhalb der linken Kopf- / Halsregion

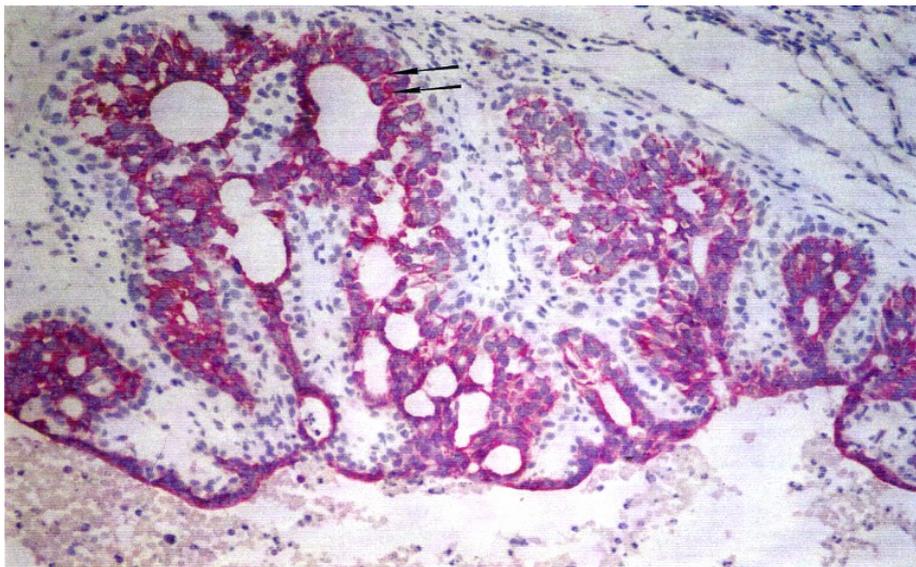


Abb. 30: CK 17/19-Expressionsmuster in einem adenoid-zystischen Karzinom. Die Pfeile weisen auf gangepithelähnliche Tumorformationen. X200

Tab. 48: CK-Verteilungsmuster und Ursprungsorte (ISF = innerhalb des Strahlenfeldes, ASF = außerhalb der linken Kopf-/ Halsregion) bei den malignen Tumoren (n = 14)

CK / Lokalisation	CK 5/6	CK 7	CK 8/18	CK 13/15/16	CK 17/19	ISF	ASF	n
Tumorentitäten								
Adenoid-zystische Karzinome	MYO 4-5 BZ bei GE 4-5	1	MYO 1 BZ bei GE 2-3	MYO 3 / <u>4-5</u> BZ bei GE 3	GE 3- <u>4</u>	X		2
Adenoid-zystisches Karzinom	MYO 4-5 BZ bei GE 4-5	1	MYO 1 BZ bei GE 2-3	MYO 4 BZ bei GE 3	3-4		X	1
Zystadenokarzinome	MYO 4-5 BZ bei GE 4-5	2	3-4	MYO 3-4 BZ bei GE 3-4	GE 3 / <u>4-5</u>	X		2
Mikrozystisches Adenokarzinom	MYO (3) BZ bei GE (3)	2	(3)	MYO 5 BZ bei GE (3)	GE 5	X		1
Mikrozystisches Adenokarzinom	MYO 4-5 BZ bei GE 4-5	1	3-4	MYO 4-5 BZ bei GE (3)	GE <u>3-4</u>		X	1
Adenokarzinom mit sebazöser Differenzierung*	1	2-3	(3)	(2)	(2)		X	1
PECA	4	1	(2-3)	1	<u>1</u> /5	X		5
PECA	4	1	(2-3)	1	2		X	1

Bewertung der Färbereaktion: 1 = negativ 2 = hauchhaft 3 = gering, leicht 4 = mäßig- bis mittelgradig, moderat 5 = stark bis sehr stark Bei variabler Expression wurde der dominante Befund unterstrichen.

BZ = Basalzellen GE = Gangepithelstrukturen/-formationen MYO = Myoepithelzellen PECA = Plattenepithelkarzinome
 () = fokale Immunreaktion * = CK 20: 1

Tab. 49: Kollagenverteilungsmuster und Ursprungsorte (ISF = innerhalb des Strahlenfeldes, ASF = außerhalb der linken Kopf-/ Halsregion) bei den malignen Tumoren (n = 14)

Bewertung der Färbereaktion: 1 = negativ 2 = hauchzart 3 = zart, dünn, kontinuierlich, leicht
 4 = mäßig- bis mittelgradig, deutlich linienförmig 5 = stark bis sehr stark, balkenartig oder mehr
 flächenhaft () = nicht dominierender Befund und / oder fokale Immunreaktion
 PECA = Plattenepithelkarzinome

Kollagene / Lokalisation	Kollagen III	Kollagen IV	ISF	ASF	n
Tumorentitäten					
Adenoid-zystische Karzinome	2-(3) Mastzellen 4	2-(3) in Pseudozysten 4	X		2
Adenoid-zystisches Karzinom	2-(3) Mastzellen 4	2-(3) in Pseudozysten 4		X	1
Zystadenokarzinome	3-4 Mastzellen 3	4-5 Fokale Fragmente und Konglomerate	X		2
Mikrozystisches Adenokarzinom	3-(4)	3-4 Fokale Fragmente und Konglomerate	X		1
Mikrozystisches Adenokarzinom	2-3 (4)	3-4 Fokale Fragmente und Konglomerate		X	1
Adenokarzinom mit sebazöser Differenzierung	(2)	(2)		X	1
PECA	2-3 (4) Fokale Fragmente	1 Fokale Fragmente (2-3)	X		5
PECA	2-3 (4) Fokale Fragmente	1 Fokale Fragmente (2-3)		X	1

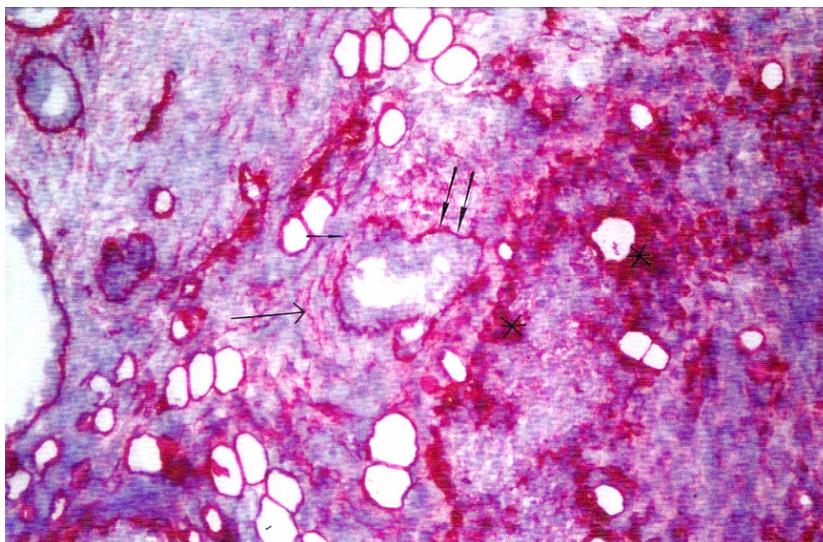


Abb. 31: CIV-Expression in einem Zystadenokarzinom. Moderate bis starke, teilweise fragmentierte (↑) BM-Färbereaktion. Daneben sind auch mehr verbreiterte kontinuierliche BM-Immunreaktionen nachweisbar (↑↑). Darüber hinaus fanden sich fokale CIV-positive BM-Konglomerate (*) im Interstitium. X200

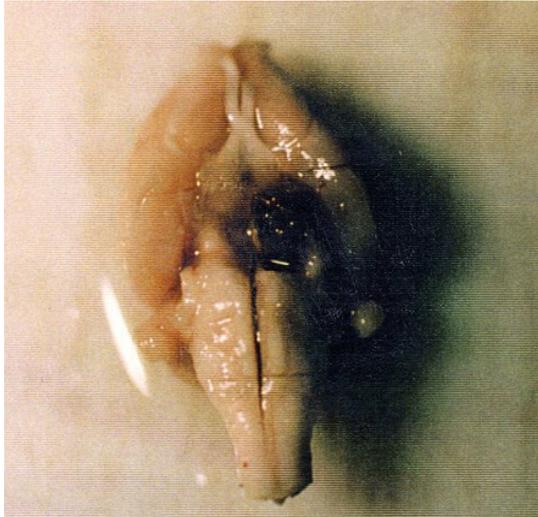


Abb. 32: Ansicht des explantierten Gehirn von kaudal. Großes Hypophysenadenom mit makroskopisch sichtbaren Einblutungen

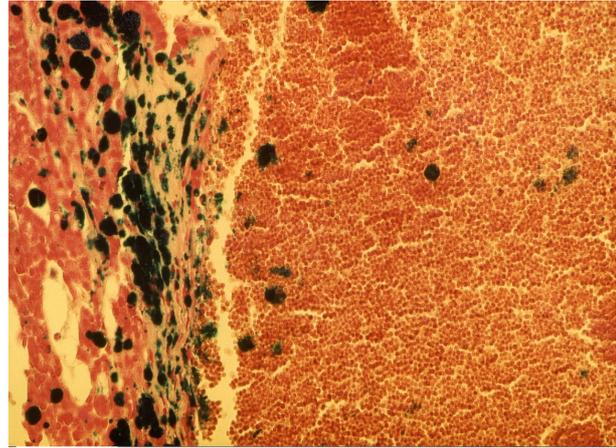


Abb. 33: TM-Gewebe mit subtotaler hämorrhagischer Nekrose. Randlich etwas Granulationsgewebe mit reichlichen Eisenablagerungen (blaue Schollen) zwischen TM-Gewebe und erhaltenem Vorderlappen. Einzelne Siderophagen auch im nekrotischen Tumorgewebe. Eisenfärbung. X220

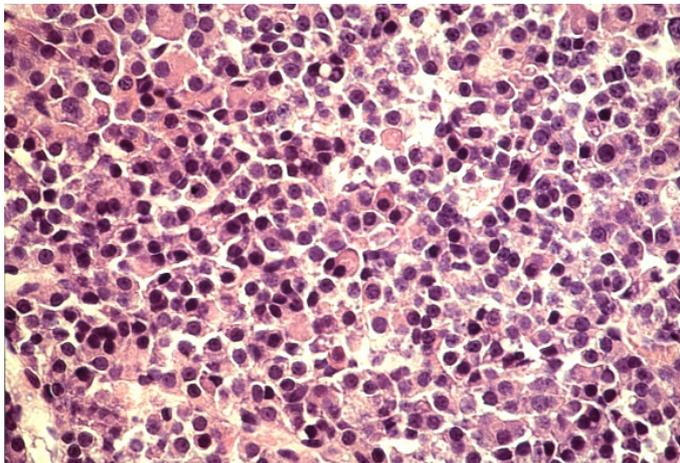


Abb. 34: Hypophyse. Medullär-diffus aufgebautes Tumorgewebe mit nur geringen Nekrobiosen einiger TM-Zellen in Form von Schrumpfungen des Kerns und des Zytoplasmas, sonst vital mittelgroße, leicht pleomorphe Tumorzellen mit mittelbreitem bis breitem, schwach azidophilen Zytoplasma. HE. X440

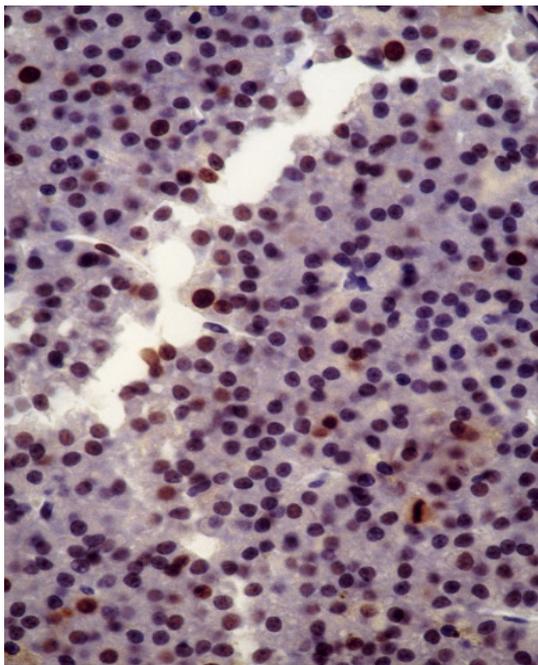


Abb. 35: Diffus aufgebautes TM-Gewebe. Etwa 50% der Kerne exprimieren Ki-67. X440

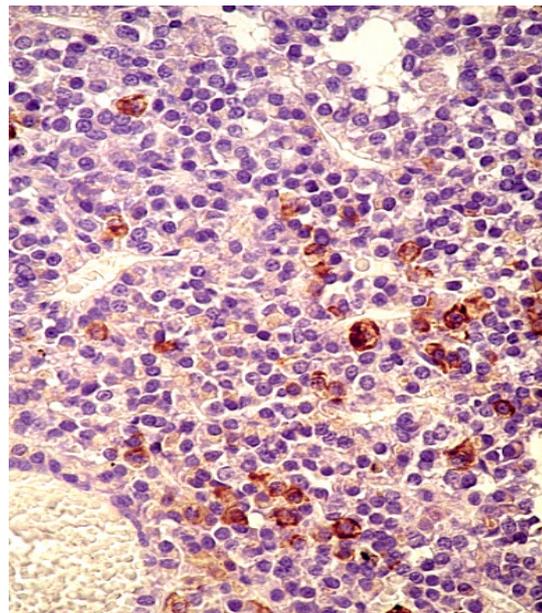


Abb. 36: TM-Gewebe mit herdförmigen Einblutungen und zystischen Transformationen. Etwa 10% der TM-Zellen exprimieren Prolaktin (braunes Reaktionsprodukt im Zytoplasma). X440

Tab. 50: Mikroskopischer Aufbau der Hypophysenadenome hinsichtlich Zelltyp, atypischer Mitosen, PR und Nekroserate sowie im Hinblick auf den Nachweis von Hormonen im Adenom und der residualen normalen Drüse

Nr.	Explantation Gesamtdosis	NR [%]	Morphologie der TM-Zellen	Atypische Mitosen/ PR (TM)	Hormonbildung im Adenom	Normale Hypophyse
1	nach 6 M 60 Gy	5	monomorph	Keine 40%	kein Nachweis	randständige normales Drüsengewebe [VL; GH, ACTH, PRL, TSH, LH: positiv (+)]
2	nach 12 M 20 Gy	5	pleomorph	Keine 40%	kein Nachweis	randständig normales Drüsengewebe [GH, ACTH, FSH, a-Untereinheit: positiv (+)]
3	nach 12 M 20 Gy	>5	monomorph	Keine 50%	GH (10%), PRL (2-10%), TSH (20%)	Anteile des VL und der Zwischenzone [GH, ACTH, FSH, a-Untereinheit, PRL, LH, S100 (Stützzellen): positiv (+); TSH: negativ]
4	nach 12 M 20 Gy	>5	monomorph	Einzelne 50%	GH (10%), PRL (2-10%)	randständige Anteile des VL [GH, ACTH, FSH, PRL, TSH, LH: positiv (+)]
5	nach 12 M 20 Gy	5	pleomorph	Keine 40%	GH (10%) TSH (5%) FSH (5%)	VL [GH, ACTH, FSH, a-Untereinheit, PRL, LH, S100 (Stützzellen): positiv (+); TSH: negativ]
6	nach 12 M 20 Gy	<5	pleomorph	Keine 40%	TSH (5-30%)	VL [GH, ACTH, FSH, a-Untereinheit, PRL, TSH, LH: positiv (+), Stützzellen in der Nähe des TM: stark positiv (++)]
7	nach 12 M 20 Gy	<5	pleomorph	Keine 40%	kein Nachweis	VL [GH, ACTH, FSH, a-Untereinheit, PRL, LH, Stützzellen: positiv (+)]
8	nach 12 M 60 Gy	5	pleomorph	Keine (einzelne doppelkernige TM-Zellen) 40%	kein Nachweis	randständig zum TM VL-Gewebe [GH, ACTH, FSH, a-Untereinheit, PRL, LH, Stützzellen: positiv (+)]
9	nach 10 M 60 Gy	5	pleomorph	Keine 40%	TSH (30-40%) GH (5-10%) FSH (10%)	randständig zum TM VL-Gewebe [GH, ACTH, FSH, a-Untereinheit, PRL, LH, Stützzellen: positiv (+)]

VL = Vorderlappen

NR = Nekroserate

M = Monate

TM = Tumor

Tab. 51: Darstellung der pathohistologischen Befunde (Feinauswertung) in Bezug zu den Dosisgruppen

Dosisgruppen / Kontrollen	Kontrollen	20 Gray	40 Gray	60 Gray
Pathohistologischer Befund				
Subepitheliale Lymphozyteninfiltrate	((+))	((+)) 22%	(+) 88%	<u>(+)</u> / 100%
Subepitheliale Lymphektasien	-	(+) 100%	+ 100%	(+)- 100%
Subepitheliales Ödem	-	((+)) 11%	(+) / <u>±</u> 89%	(+) 100%
Interstitielle Lymphozyteninfiltrate	((+))	((+)) 33%	(+) 78%	<u>(+)</u> / 90%
Interstitielles Ödem	-	((+))- 44%	(+) / <u>±</u> 89%	(+) 100%
Interstitielle Fibrose	-	((+)) 11%	(+)- 89%	(+) / <u>±</u> 90%
Mukosaverschmälerung i. B. des Ösophagus	-	-	((+)) 22%	((+)) 10%
Plattenepithelmetaplasie i. B. der Schilddrüse	-	((+)) 11%	((+)) 11%	(+) 40%
Fibrose/Lymphozyteninfiltrate i. B. der Schilddrüse	<u>(+)</u> / 90%	(+) 78%	±/++ 100%	(+) <u>±</u> 90%
Pseudopapilläre supraglottische Formationen	-	((+)) 22%	(+) 33%	+* 70%
Blutgefäßdilatationen	((+))	<u>(+)</u> / 100%	±/++ 100%	<u>±/++</u> 100%
Lymphgefäßektasien	(+)	<u>(+)</u> / 100%	±/++ 100%	±-++ 100%
Drüsenveränderungen (klassifiziert) • Dilatation der subglott. / trachealen Drüsen und -gänge • fokale Reduktion des subglott. / trachealen Drüsenparenchyms • fokale periazinäre und -duktale Fibrose der subglott. / trachealen Drüsen		spätes Stadium 1: ((+)) 22%	Übergangsstadium 1 – 2: ++ 100%	Übergangsstadium 1 – 2: ++ 100%

- * = einzelne Präparate mit zum Teil stark ausgeprägtem Befund
 - = negativ bzw. nicht vorhandener Befund
 ((+)) = sporadischer Befund
 (+) = sehr geringer Befund bei einzelnen oder mehreren Präparaten
 + = geringer Befund bei mehreren oder vielen Präparaten
 ++ = deutlicher, mittelgradiger Befund bei vielen Präparaten
 +++ = stark ausgeprägter Befund bei allen Präparaten
 (unterstrichen) = dominierender Befund innerhalb der Dosisgruppen
rot (unterlegt) = dominierender Befund beim Vergleich der 40 Gray und 60 Gray Dosisgruppen
pink (unterlegt) = etwa gleich ausgeprägter Befund beim Vergleich der 40 Gray und 60 Gray Dosisgruppen
kursiv = Rohinzidenz in %

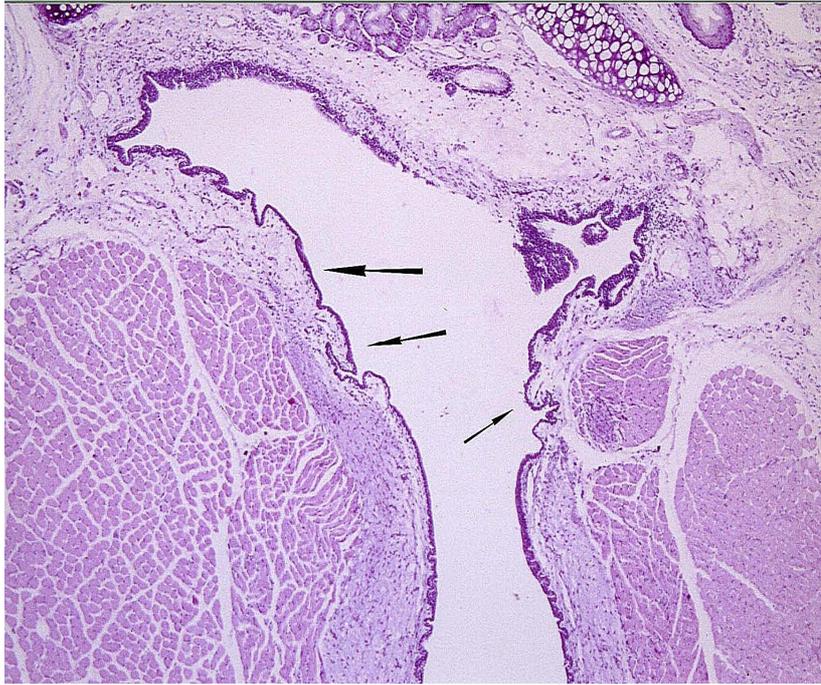


Abb. 39.1: Larynx (Kontrolle). Glottisniveau mit Übergang zur Supraglottis. Gering asymmetrische Darstellung der Gewebefalten im Bereich des „ventral pouch“ (↑). HE. X50



Abb. 39.2: Larynx (60 Gray-Exposition). Supraglottische PPF (↑) mit subepithelialer ödematöser Auflockerung sowie subepithelialen Lymphektasien (▲). Kranial ist eine breitere bindegewebige Zone mit fokalen Zellinfiltraten angeschnitten. HE. X100

Tab. 52: Darstellung auffälliger CK 13-Expressionsveränderungen unter Berücksichtigung verschiedener Lokalisationen bzw. Gewebearten in Bezug zu den RT-Dosisgruppen.
Die rosafarbene Unterlegung kennzeichnet die vom Gesamtaspekt her auffällige Expressionsabnahme.

Dosisgruppen	Kontrollen	20 Gray	40 Gray	60 Gray
Lokalisation / Gewebeart				
Glottale Schleimhaut	2-3	((1))-2	2-(3)	(1)-2



Abb. 40.1: Larynx (Kontrolle). CK 13-Expression im Glottisbereich. X100

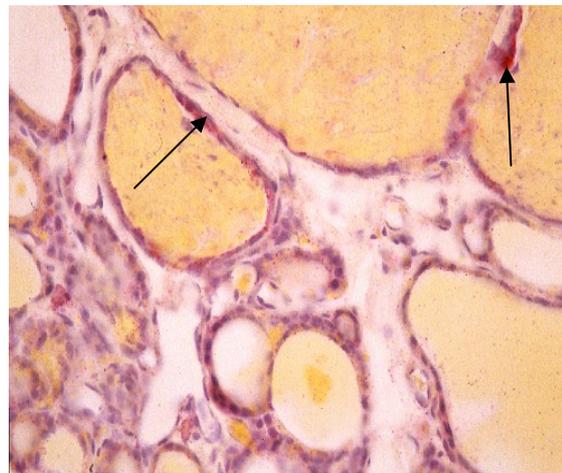


Abb. 40.3: CK 13-Expression. Schilddrüse. CK 13-Positivität (↑) bei PE-Metaplasien i. B. zystisch erweiterter Follikelstrukturen. X400

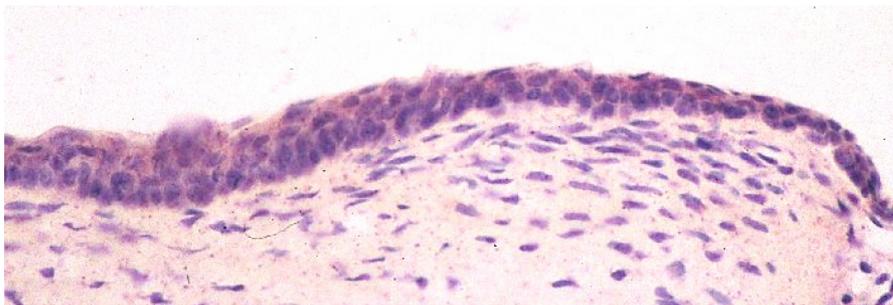


Abb. 40.2: Larynx (60 Gy-Exposition). Nur schwache CK 13-Expression im Glottisepithel. X400

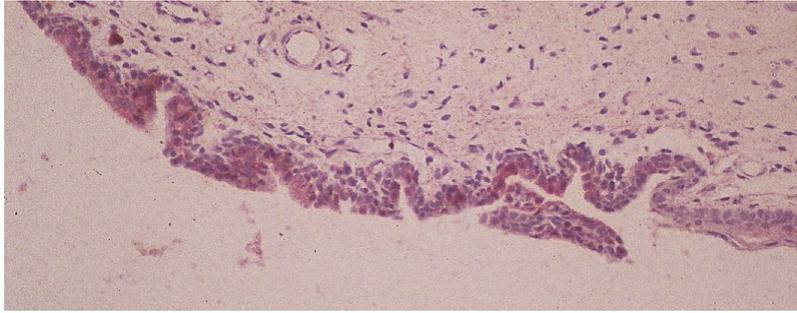


Abb. 41.1: CK 17/19-Expression. Kontrolle. Supraglottisches Indifferenzepithel mit zarter Färbung. Glottisepithelien (rechter Bildrand) zeigen keine Reaktion. X200

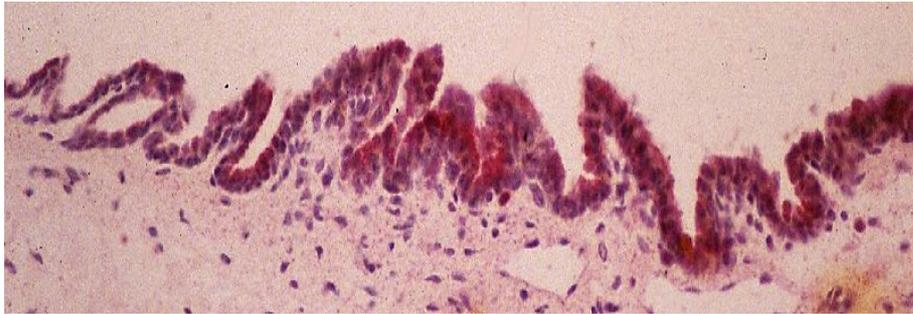


Abb. 41.2: CK 17/19-Expression. 40 Gy-Exposition. Supraglottisches Indifferenzepithel mit ausgeprägterer Färbung. X200

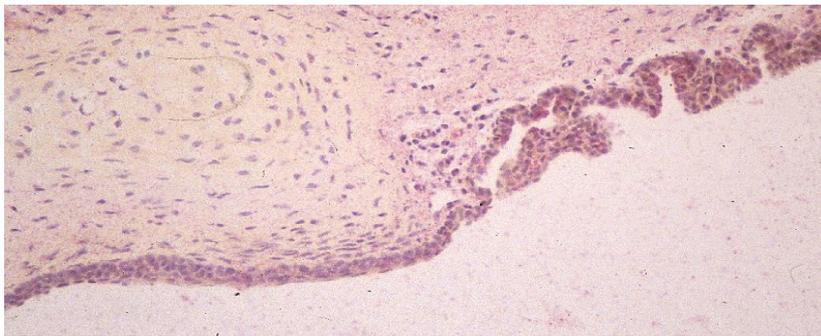


Abb. 41.3: CK 17/19-Expression. 60 Gy-Exposition. Supraglottisches Indifferenzepithel mit wieder verminderter Färbereaktion. Glottis: negativ. X200

Tab. 53: Darstellung auffälliger CK 17/19-Expressionsveränderungen unter Berücksichtigung verschiedener Lokalisationen bzw. Gewebearten in Bezug zu den Dosisgruppen.

Vom Gesamtaspekt her auffällige Expressionsfluktuationen erhielten eine grüne Unterlegung. Für die basalbetonte Expressionsveränderung wurde eine rot-gemusterte Unterlegung gewählt.

Dosisgruppen	Kontrollen	20 Gray	40 Gray	60 Gray
Lokalisation / Gewebeart				
Respiratorisches Epithel der Supra- und Subglottis	2-3	2	2-(3)	2
Innenseite der aryepiglottischen Falte (respiratorisches Epithel und z. T. kuboide Indifferenzepithelien)	2	2-((3))	2-3	2
Außenseite der aryepiglottischen Falte (un- bis schwach verhorntes PE)	1-(2)	1-2	(1)-2 _B	1
Hypopharynx (un- bis schwach verhorntes PE)	1-2	1-2	(1)-2 _B	1
Ösophagus (un- bis mäßig verhorntes PE)	1-2	1-2	(1)-2 _B	1-((2))

B = basalbetonte Expression

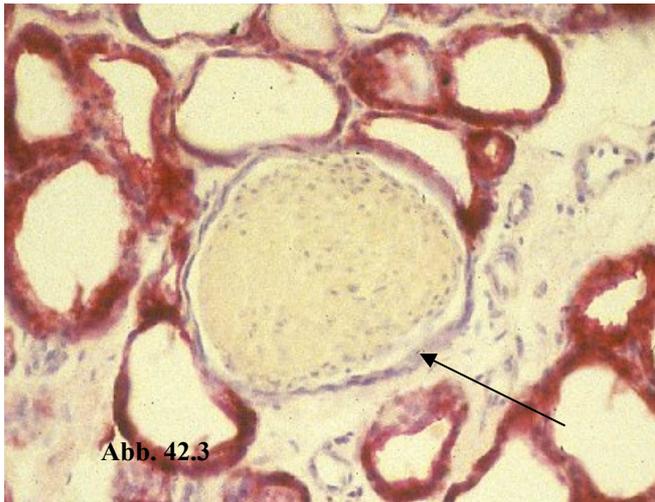


Abb. 42.3

Abb. 42.3: PE-Metaplasien im Bereich der Schilddrüse waren CK-18-negativ (↑). X200

Tab. 54: Darstellung auffälliger CK 18-Expressionsveränderungen unter Berücksichtigung verschiedener Lokalisationen bzw. Gewebearten in Bezug zu den Dosisgruppen
 Vom Gesamtaspekt her erhielten auffällige Expressionssteigerungen eine rote Unterlegung.

Dosisgruppen	Kontrollen	20 Gray	40 Gray	60 Gray
Lokalisation / Gewebeart				
Subglottische Drüsen und Drüsengänge	4-(5)	(4)-5	((4))-5	(4)-5

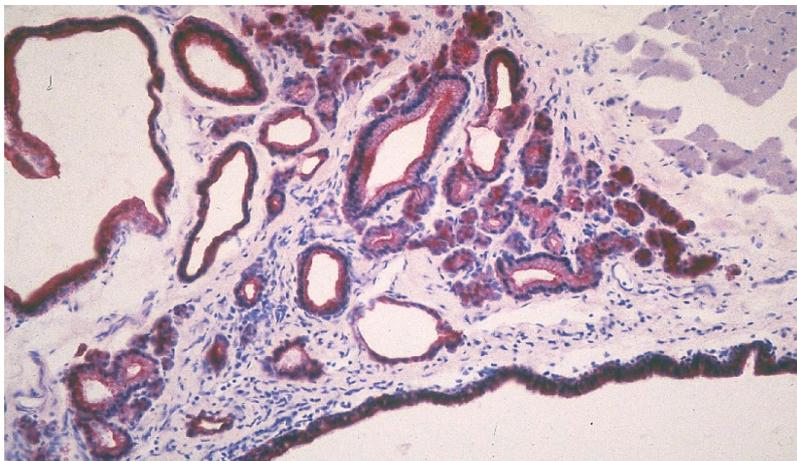


Abb. 42.1: CK 18-Expression. Kontrolle. Subglottische Drüsen mit moderater Reaktion. X200

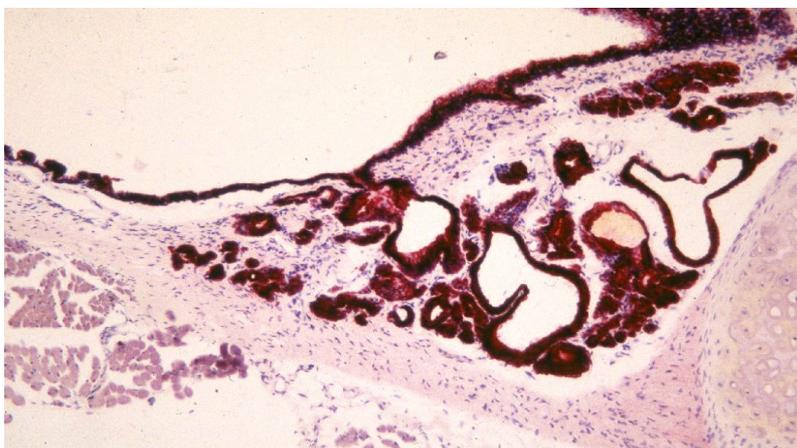


Abb. 42.2: CK 18-Expression. 60 Gy-Exposition. Stärkere Reaktion bei subglottischen Drüsen. X100

Tab. 55: Darstellung auffälliger Vimentin-Expressionsveränderungen unter Berücksichtigung verschiedener Lokalisationen bzw. Gewebearten in Bezug zu den Dosisgruppen.

Vom Gesamtaspekt her erhielten auffällige Expressionssteigerungen eine rote, Expressionsabnahmen eine rosa Unterlegung. Grün unterlegt wurden auffällige Expressionsfluktuationen. Bei noch mehr heterogenem Expressionsverlauf wurden zweifarbige Unterlegungen gewählt, wobei die größere Fläche den Hauptaspekt am ehesten repräsentierte

Dosisgruppen	Kontrollen	20 Gray	40 Gray	60 Gray
Lokalisation / Gewebeart				
M. thyreoarytaenoideus/M. vocalis	(2)-3	2	2-(3)	2-(3)
Supraglottische Muskulatur	(2)-3	2-((3))	2-3	2-(3)
Subglottische Muskulatur	(2)-3	2-((3)) ⁹	2-3	2-(3)
Epiglottisknorpel	2-(3)	2	2	2
Hypopharynxmuskulatur	(2)-3	2-((3))	2-3	2-(3)
Tracheales Bindegewebe	2-3	2	2	2
Trachealmuskulatur	3	2-(3)	2-3	(2)-3
Tracheaknorpel	2-3	2-((3))	2-((3))	2
Ösophagusbindegewebe	2-(3)	2	2	2
Ösophagusmuskulatur	3	2-(3)	2-(3)	(2)-3
Fettgewebe	2-3	2-(3)	2-((3))	2-((3))
Kapillaren	2-(3)	3	(2)-3	3
Kapilläre Schilddrüsengefäße	(1)-2	3	(2)-3	3-(4)
Gefäßadventitia	(2)-3	3	3	3
Hüllgewebe des N. recurrens	2-3	3	3-((4))	(3)-4

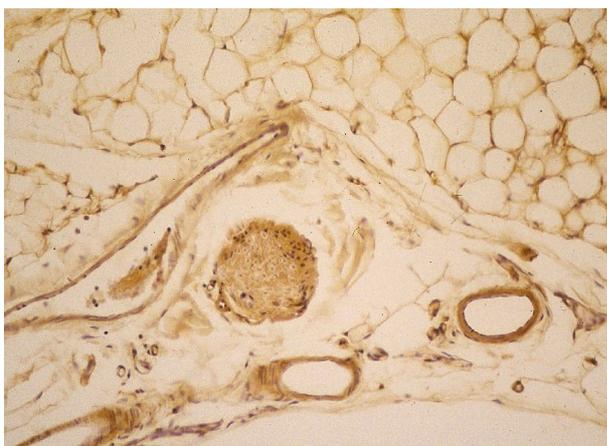


Abb. 43.1: Vimentinexpression. Kontrolle. Leichte, epineural betonte Reaktion i. B. des Rekurrensnerven. X200

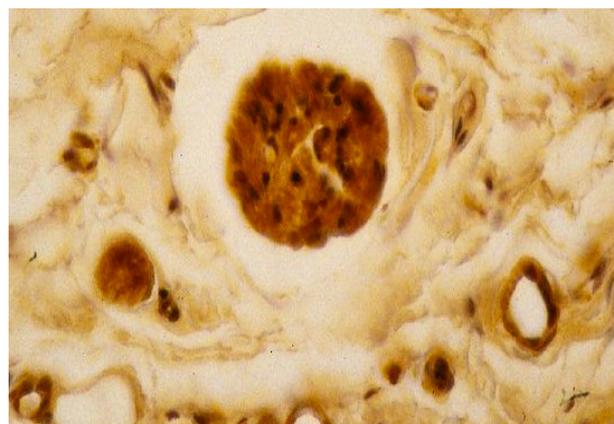


Abb. 43.2: Vimentinexpression. 60 Gy-Exposition. Deutlich kräftige Immunreaktivität im Hüllgewebe des Nerven. X400

Tab. 56: Darstellung auffälliger Laminin-Expressionsveränderungen unter Berücksichtigung verschiedener Lokalisationen bzw. Gewebearten in Bezug zu den Dosisgruppen. Vom Gesamtaspekt her erhielten auffällige Expressionssteigerungen eine rote, tendenzielle Expressionssteigerungen eine gelbe Unterlegung. Grün unterlegt wurden auffällige Expressionsfluktuationen. Bei noch mehr heterogenem Expressionsverlauf wurden zweifarbig unterlegungen gewählt, wobei die größere Fläche den Hauptaspekt am ehesten repräsentierte.

Dosisgruppen	Kontrollen	20 Gy	40 Gy	60 Gy
Lokalisation / Gewebeart				
M. thyroarytaenoideus / M. vocalis	2	2-(3)	2-(3)	((2))-3*
Andere Larynxmuskeln	2-(3)	2-(3)	2-(3)	(2)-3*
Laryngeale Nervenäste (vorwiegend Schwann-Zellen)	3	3	3-((4))	3-4*
Ösophageale Nervenäste (vorwiegend Schwann-Zellen)	3	3	3-((4))	3-4
Rekurrensnerv (vorwiegend Schwann-Zellen)	3	3	3-4	3-4*
Trachealmuskulatur	2-3	2-((3))	2-3	((2))-3
Drüsen- und Drüsengänge	2	2	2	2-(3)
Nervenäste im Sinus piriformis (vorwiegend Schwann-Zellen)	3	3-(4)	3-(4)	3-4
Ösophagmuskulatur	2-3	2-(3)	2-3	((2))-3
Subepitheliale Region der Supraglottis	2-3	2	2	2-3*
Subepitheliale Region der Subglottis	2-(3)	2	2	2-3*

Nachweisreaktion:

1 = kein Nachweis 2 = sehr zarte Reaktion 3 = leichte Reaktion 4 = moderate Reaktion

5 = starke bis sehr starke Reaktion

* = einzelne Präparate oder Präparatabschnitte mit zum Teil stärkerer Expression

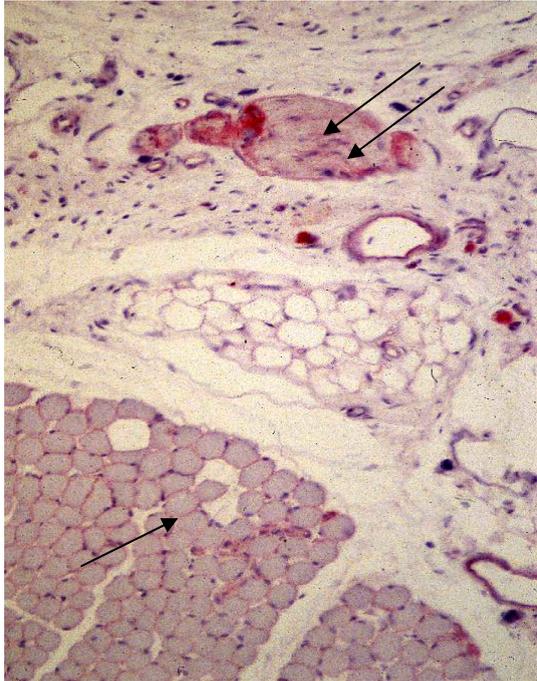


Abb. 44.1: Lamininexpression. Kontrolle. Zarte Reaktionen i. B. laryngealer Muskeln (↑) und Nervenäste (↑↑). Fokale Verdichtungen im Nervenrandbereich. X200

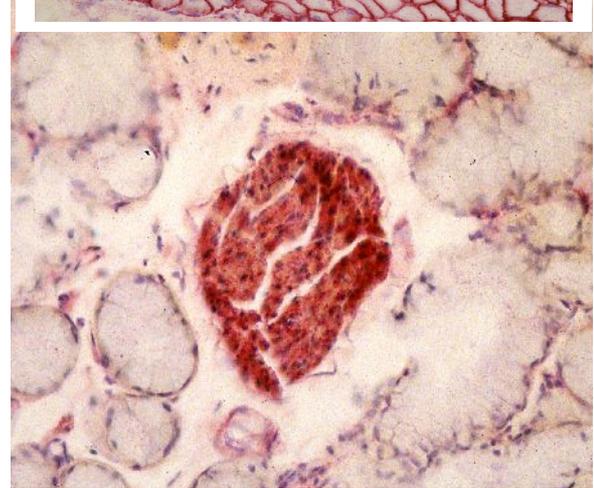
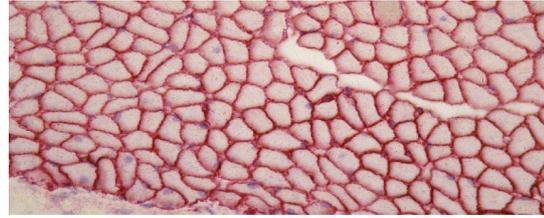


Abb. 44.2: Lamininexpression. 60 Gy-Exposition. Deutlich kräftige Expression im Nervengewebe, hier i. B. einer submukösen Drüse. X200
Einschub oben: Kräftige M. vocalis-Expression

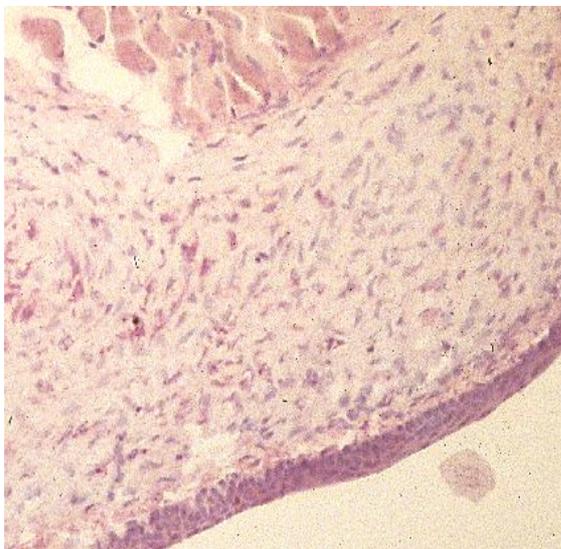


Abb. 45.1: Fibronektinexpression. Kontrolle. Sehr zarte subepitheliale Immunreaktion mit Übergang ins angrenzende Interstitium im Larynx (Glottisregion). X200

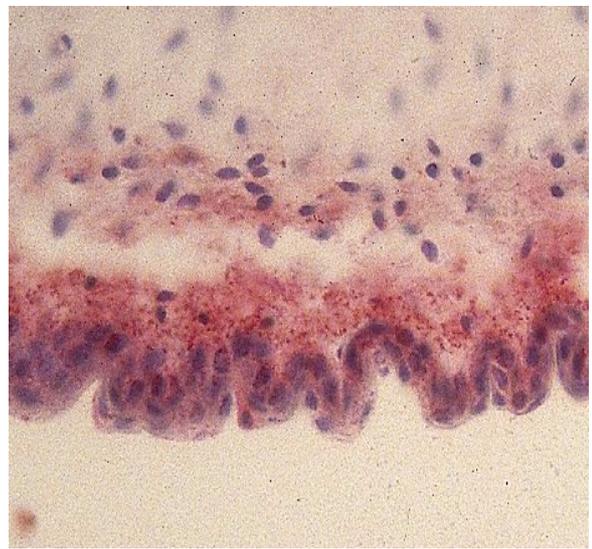


Abb. 45.2: Fibronektinexpression. 40 Gy-Exposition. Deutlich verbreiterte und intensivierete subepitheliale Färbereaktion i. B. der ventralen Glottisregion. X400

Tab. 57: Darstellung auffälliger Fibronektin-Expressionsveränderungen unter Berücksichtigung verschiedener Lokalisationen bzw. Gewebearten in Bezug zu den Dosisgruppen
 Vom Gesamtaspekt her auffällige Expressionssteigerungen erhielten eine rote Unterlegung (auch wenn für einige Regionen verringerte bzw. mehr gleichbleibende Reaktionen nach 20 Gy-Exposition auftraten).

Dosisgruppen	Kontrollen	20 Gray	40 Gray	60 Gray
Lokalisation / Gewebeart				
Subepithelialer Glottisbereich	2	2	(2)-3	(2)-3*
Sinus piriformis (subepithelial mit Übergang ins Interstitium)	2	2	(2)-3	(2)-3
Subepithelialer Trachealbereich	2-(3)	2-((3))	3-((4))	3-4
Tracheales Bindegewebe	2-(3)	2	3-((4))	3-(4)
Subepithelialer Ösophagusbereich	(1)-2	2	(2)-3	(2)-3
Supra- und Subglottis (subepithelial mit Übergang ins Interstitium)	2	2	(2)-3	(2)-3
Um tracheale Drüsen und Drüsengänge	2-(3)	2	3-((4))	3-((4))
Tracheales Perichondrium	3-(4)	3	3-4	(3)-4*
Um supra- und subglottische Drüsen	2	2	(2)-3	(2)-3
Aryepiglottische Falte (subepithelial)	2	2	(2)-3	(2)-3
Laryngeales Perichondrium	3-(4)	3	3-4	(3)-4*
Ösophageales Interstitium, incl. Adventitia	2-(3)	2	(2)-3	(2)-3
Perifollikuläre Schilddrüsenregion	2	2	2-3	3
Schilddrüsenbindegewebe	2-(3)	2	2-3	3
Schilddrüsenkapsel	2-(3)	2	2-3	(2)-3
Schilddrüsenkapillaren	2	2	2-3	2-3
Kapillaren	2-(3)	2	2-3	(2)-3
Gefäßadventitia	2-(3)	2	2-3	(2)-3
Rekurrensnerv (epineural betont)	2-(3)	2	2-3	(2)-3

Nachweisreaktion:

1 = kein Nachweis 2 = sehr zarte Reaktion 3 = leichte Reaktion 4 = moderate Reaktion
 5 = starke bis sehr starke Reaktion

* = einzelne Präparate oder Präparatabschnitte mit zum Teil stärkerer Expression

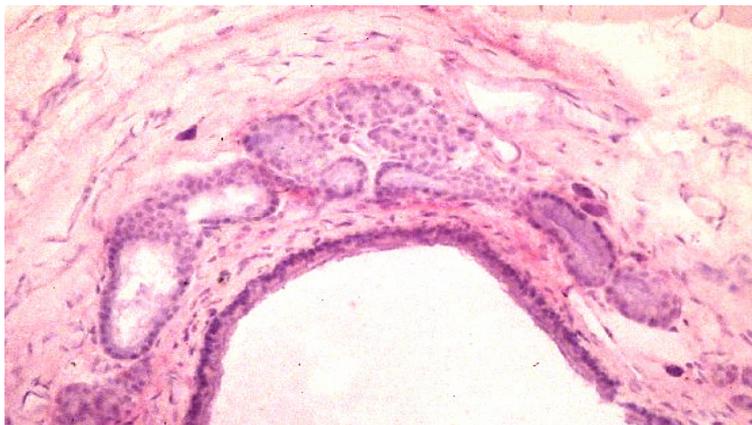
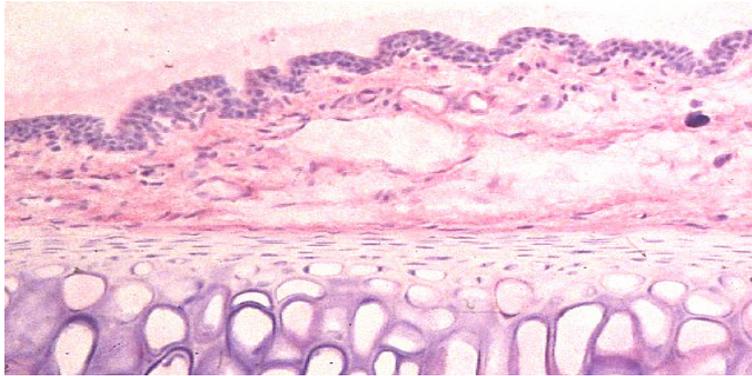


Abb. 46.1: CIII-Expression. Kontrolle. Recht zarte subepitheliale (oben: Supraglottis) und periglanduläre CIII-Expression i. B. trachealer Drüsen (unten). X200



Abb. 46.2: CIII-Expression. 60 Gy-Exposition. Deutlich verbreiterte und stärkere CIII-Expression periglandulär. Immunreaktivitätsverdichtung im angrenzenden Perichondrium (↑). X200

Tab. 58: Darstellung auffälliger CIII-Expressionsveränderungen unter Berücksichtigung verschiedener Lokalisationen bzw. Gewebearten in Bezug zu den Dosisgruppen
Vom Gesamtaspekt her auffällige Expressionssteigerungen erhielten eine rote Unterlegung

Dosisgruppen	Kontrollen	20 Gray	40 Gray	60 Gray
Lokalisation/Gewebeart				
Tracheales Perichondrium	2-3	(2)-3	3	3-(4)
Laryngeales Perichondrium	2-(3)	(2)-3	(2)-3	3-(4)
Um tracheale Drüsen und -gänge	2	((2))-3	((2))-3	3-(4)
Tracheales Interstitium	2	((2))-3	3	3-(4)
Ösophagusadventitia	2-3	((2))-3	((2))-3	3-((4))
Schilddrüseninterstitium	2-(3)	2-(3)	((2))-3	((2))-3
Tracheale Submukosa	2-3	(2)-3	3	3-(4)

Nachweisreaktion:

1 = kein Nachweis 2 = sehr zarte Reaktion 3 = leichte Reaktion 4 = moderate Reaktion
5 = starke bis sehr starke Reaktion

Tab. 59: Darstellung auffälliger CIV-Expressionsveränderungen unter Berücksichtigung verschiedener Lokalisationen bzw. Gewebearten in Bezug zu den Dosisgruppen
Vom Gesamtaspekt her erhielten auffällige Expressionssteigerungen eine rote, tendenzielle Expressionssteigerungen eine gelbe Unterlegung. Verminderte (auch tendenziell verringerte) Reaktionen wurden rosa markiert. Grün unterlegt wurden auffällige Expressionsfluktuationen. Bei noch mehr heterogenem Expressionsverlauf wurden zweifarbige Unterlegungen gewählt, wobei die größere Fläche den Hauptaspekt am ehesten repräsentierte.

Dosisgruppen	Kontrollen	20 Gy	40 Gy	60 Gy
Lokalisation / Gewebeart				
Trachealmuskulatur	2-(3)	2	(2)-3	2
Tracheales Perichondrium	2-(3)	2	2-3	2
Rekurrensnerv **	(2)-3	3	3-4*	3
Ösophagusmuskulatur	2-(3)	((2))-3	(2)-3	2-3
Kapillaren	(2)-3	3	3	3*
Lamina propria (Glottisregion)	1	2-((3))	((1))-2	2*
Glottische Nervenäste**	2-3	(2)-3	2-3	(2)-3
Supra-/subglottische Nervenäste**	2-3	2-3	2-(3)	(2)-3
Hypopharyngeale Nervenäste**	2-3	2-3	2-3	(2)-3
M. thyreoarytaenoideus / M. vocalis	2-3	2-((3))	2	((1))-2
Andere Larynxmuskeln	2-3	2-((3))	2-(3)	2
Hypopharynxmuskulatur	2-3	2-((3))	2-(3)	2

Nachweisreaktion:

1 = kein Nachweis 2 = sehr zarte Reaktion 3 = leichte Reaktion 4 = moderate Reaktion

5 = starke bis sehr starke Reaktion

* = einzelne Präparate oder Präparatabschnitte mit zum Teil stärkerer Expression

** = mit perineuraler Betonung

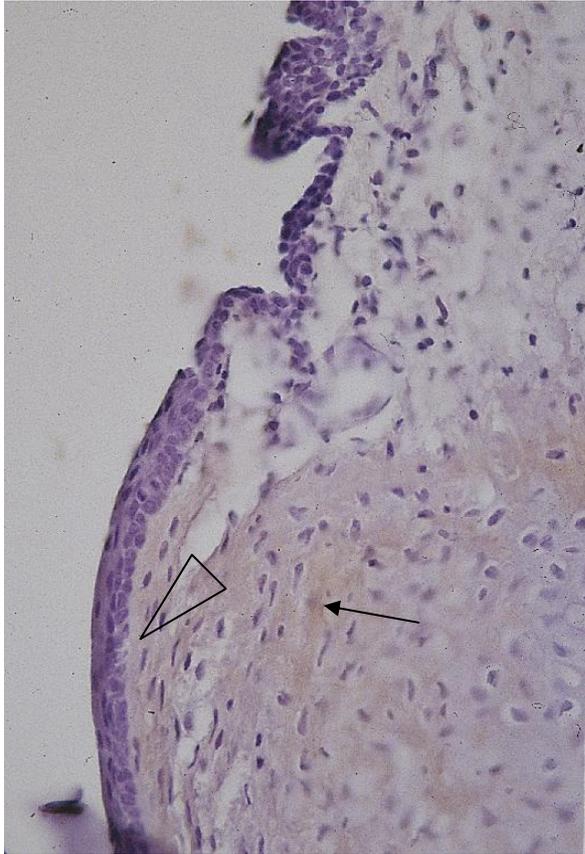


Abb. 47.1: CIV-Expression. Kontrolle. Nur sehr zarte CIV-Reaktion in der subepithelialen Glottisregion (▽) und fokale hauchartige Färbung in der Lamina propria (↑). X400

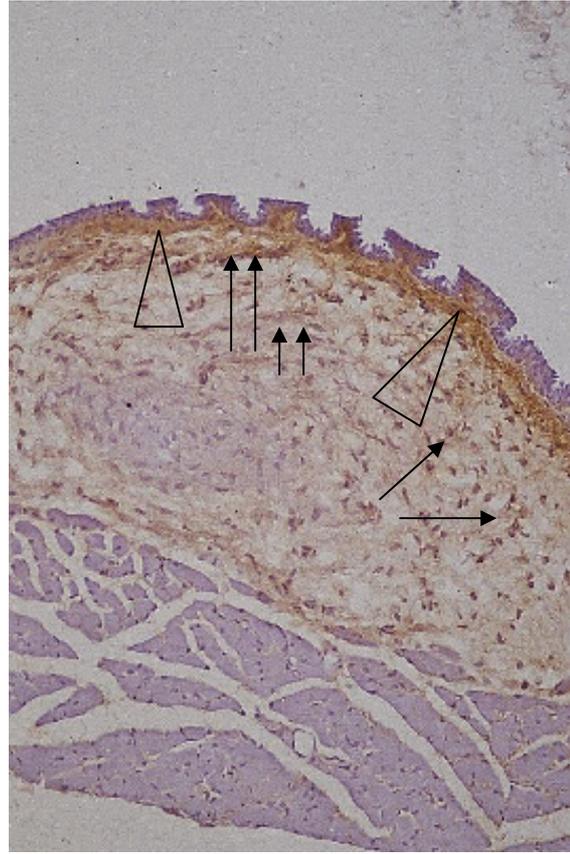


Abb. 47.2: CIV-Expression. 60 Gy-Exposition. Glottisregion. Die subepitheliale BM (▽) zeigt eine deutlich verbreiterte und gesteigerte CIV-Expression. In der Lamina propria finden sich in Assoziation zu Infiltrat- und Interstitiumzellen (↑) merkliche CIV-positive Verdichtungen. Daneben sind BM-Kondensationen nachweisbar (↑↑). x200

Tab. 60: Pathohistologische, enzymhistochemische, elektronenmikroskopische und immunhistologische Befunde nach den Literaturdaten (Chomette et al. 1981, Sholley et al. 1974, Stern et al. 1976, Stephens et al. 1986a, Saitoh et al. 1992, Aalto et al. 1998 & 1997, Forsgren et al. 1994, Nagler 1998, O'Connell et al. 1999, Paardecooper et al. 1998, Seifert 1996, Vissink et al. 1991a, Zeilstra et al. 2000, Lotz et al. 1990, Norberg & Lundquist 1989, Sagowski et al. 2003)

Frühe Strahlenreaktionen bis 90 Tage post RT – „Tage bis Wochen nach RT“	
Bis etwa 10 Tage	<p>Azinuszellen /Azini (AZ): Fokale Zytoplasmadegradationen mit großen Zytolysosomen</p> <ul style="list-style-type: none"> ••Nekrosen (ausgedehnt): •mit Vakuolen, in denen Kernreste, Fragmente des ER und Sekretgranula enthalten sind (MA: nach 2 Tagen) •mit Schrumpfung und Fragmentierung der Zellkerne, Kernpyknoten, Kondensationen des Zytoplasmas, membranbegrenzten Vakuolen mit Organellenresten, Phagozytose durch Infiltratzellen („Apoptosezeichen“) •mit weitgehender Zerstörung der Läppchenstruktur (abhängig vom Granulagehalt) ••Nekrosen (selektiv): •mit einzelnen Degenerationen, Erweiterung der interzellulären Spalträume, apikaler Sekretanreicherung, einzelnen basalen ballonierten Zisternen (unter radioprotektivem Schutz) ••Apoptosezeichen (in wenigen Zellen): Chromatinverplumpungen und lobulierte Kernfragmente <p>Atrophie•Lipidvakuolen•Kristalloide•Reduzierte und zusammenfließende Sekretgranula•Fibrilläre Schleimproduktkondensationen (muköse Zellen)•Geschwollene Zellorganellen•ER-Zisternenerweiterung und Fragmentationen•Mitochondriendegeneration•Kariolysekörper in Form von osmiophilen, granulären Kondensationen (nach 6-9Tagen)•Intrazytoplasmatische pleomorphe Einschlüsse mit sequestrierten Organellen und Sekretresten (bis 4 Tage)•Große Autophagosomen/autophage Vakuolen mit Membranresten und degenerativ verändertem Sekretmaterial (später als 4 Tage)•Membrangebundene klare intrazytoplasmatische Körper mit Organellenresten (Fragmente des ER, aufgebrochene Mitochondrien, Membranschlangen, verdichtete Kernreste)</p> <p>Aber auch: Bis 30 Tage kein wesentlicher Zellverlust</p> <p>Sekretorische Tubuli (ST): Degranulierung•Regranulierung (ab 6. Tag)</p> <p>Streifenstücke (STR): fokale Nekrosen•Mitochondrienschäden (Matrixvakuolen, Cristenlysis, ballonierende Degeneration)•Mitochondrienverringerng•Verlust der basalen Membraneinfaltungen</p>

Tab. 60: Fortsetzung

Bis etwa 10 Tage	<p>Makrophagen: Einwanderung•Intrazelluläre aus longitudinalen, membranbegrenzten, fibrillären Bündeln bestehende Kristalloide (bis 4 Tage)</p> <p>Mastzellreduktion••Vermehrte Kernverdichtungen bei vielen Zellen</p> <p>Nervenendigungen: Axonschwellungen•Auflösung der Neurofilamente und Verminderung der synaptischen Vesikel</p> <p>BM-Reste•Aber auch: Erhaltene lineare BM</p> <p>Gelegentlich moderate interstitielle entzündliche Reaktionen Keine mikrovaskulären Alterationen</p> <p>vermehrte Substanz P-Immunreaktivität•Anstieg der Hydrolaseaktivität•Reduktion der oxydativen Enzymaktivität des Gangsystems•Expressionsanstieg des PNCA (proliferating cell nuclear antigens) in AZ, SCH und STR•Reduktion der neuronenspezifischen Enolase in ST und STR•Vermehrte Neuropeptidexpression (Enkephalin und Bombesin) aber auch: Verringerte Bombesinexpression</p> <p>Regenerationszeichen (nach 9 Tagen): Reichlich vorhandene, große Zellkerne, reichlich entwickeltes ER, Zellteilungen, bes. in SCH</p>
-------------------------	--

Tab. 60: Fortsetzung

Nach ca. 45 Tagen	<p>Azinuszellen /Azini: nur noch wenige Vakuolenkörper•Kariolysekörper vor allem extrazellulär in der BM oder in Lymphozyten•Anomalien der Sekretgranula (intrazytoplasmatisch überreichlich akkumuliert mit Verdrängung des Kerns zur Zellbasis: Aspekt der verstopften Zelle mit einigen Nekrobiosen, Kernpyknosen und fragmentiertem ER)•Reichliches entwickeltes ER</p> <p>Sekretorische Tubuli: Uneinheitliche Größe und Dichte der Sekretgranula</p> <p>Streifenstücke: keine basalen Membraneinfaltungen•Geschwollene und mit lytischenVakuolen angefüllte Mitochondrien</p> <p>Nervenendigungen: Geschwollen•Abnorm wenige Neurofilamente•Spärliche synaptische Vesikel ohne dichtes Material</p>
--------------------------	---

Tab. 60: Fortsetzung

Nach ca. 70 Tagen	<p>Azinuszellen /Azini: Sekretorische Verstopfung•Zytolysis</p> <p>Streifenstücke: wenige vakuolisierte Mitochondrien•große Anzahl lysosomaler Körper, ansonsten normaler Aspekt•(wieder vorhandene) basale Membraneinfaltungen</p> <p>Nervenendigungen: Abnormalitäten wie nach 45 Tagen</p> <p>Sehr selten chronisch sklerosierende Entzündung mit endoduktaler Eiterung</p> <p>Verlauf: schnelle Regeneration initialer Zytolysen•residuale Sekretionsanomalien•persistierende Alterationen der Nervenendigungen</p>
--------------------------	---

Tab. 60: Fortsetzung

Späte Strahlenreaktionen		„Wochen bis Monate nach RT“
ab 90 Tage post RT	<p>Azinuszellen/Azini Verkleinerung•Reduzierung bis moderater bzw. kompletter Zellverlust•Aber auch: nur einige degenerierte Zellen mit Lysosomen und kariolytischen Kernen•Verringerter Granulagehalt bis Degranulierung•Vakuolen•Vergrößerte Kerne mit Chromatinverklumpungen•Gelegentlich bizarre Kernformen•Selten Kariolysis•Ballonierte Zisternen des Golgiapparates und des ER</p> <p>Gangsystem Abnorme adenomartige / adenomatöse Regenerate mit atypischen Mitosen (teilweise im Sinne einsetzender Regenerationsprozesse)</p> <p>Schaltstücke Relativ guter Größenerhalt (größeres relatives Volumen im Gewebeverband)•Proliferate mit Ektasien, endothelähnlichen, abgeflachten Epithelien und vergrößerten Kernen</p> <p>Sekretorische Tubuli Verringerter Granulagehalt•moderater Zellverlust•Verschmälerung (gleiches relatives Volumen m Gewebeverband)</p> <p>Streifenstücke Dilatationen•Abgeflachte Zellen mit zumeist komplettem Verlust der basalen Streifung / Membraneinfältelungen•Verringerte Mitochondrienzahl (vornehmlich lokalisiert am basalen Zellpol)•Reichlich Becherzellmetaplasien•Gelegentlich Epitheldysplasien•Selten Plattenepithel-Metaplasien</p> <p>Abnahme der Drüsengröße und des Drüsengewichtes•Drüsenatrophie•Parenchymatrophie•Zerstörung der Läppchenstruktur•Interstitielle Fibrose/Bindegewebsersatz•Fettgewebsproliferate•Sehr selten Mikrolithen•Diffuse Infiltrationen von Lymphozyten und Plasmazellen•Spärliche Infiltrationen von eosinophilen Granulozyten•Geringe Gefäß- und Kapillarveränderungen•Konzentrische Intimaprolierationen kleiner Arteriolen•Einige Obliterationen schmaler Blutgefäße Wieder normale Neuropeptidexpression</p>	

Literaturanhang

ECM-Veränderungen im Bereich der Speicheldrüsen

1. Asai S, Tang X, Ohta Y, Tsutsumi Y (1995) Myoepithelial carcinoma in pleomorphic adenoma of salivary gland type, occurring in the mandible of an infant. *Pathol Int* 45(9): 677-683
2. Azuma M, Sato M (1994) Morphogenesis of normal human salivary gland cells in vitro. *Histol Histopathol* 9(4): 781-790
3. Azumi N, Battifora H (1987a) The cellular composition of adenoid cystic carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* 60(7): 1589-1598
4. Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA (1983) Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 49: 140-147
5. Broverman RL, Nguyen KH, da-Silveira A, Brinkley LL, Macauley SP, Zeng T, Yamamoto H, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Kerr M, Humphreys-Beher MG (1998) Changes in the expression of extracellular matrix (ECM) and matrix metalloproteinases (MMP) of proliferating rat parotid acinar cells. *J Dent Res* 77(7): 1504-1514
6. Campbell WJr, Priest RE, Weathers DR (1985) Characterization of two types of crystalloids in pleomorphic adenomas of minor salivary glands. A light-microscopic, electron-microscopic, and histochemical study. *Am J Pathol* 118(2): 194-202
7. Caselitz J, Schmitt P, Seifert G, Wustrow J, Schuppan D (1988) Basal membrane associated substances in human salivary glands and salivary gland tumours. *Pathol Res Pract* 183(4): 386-394
8. Caselitz J, Schulze I, Seifert G (1986a) Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: An immunohistochemical study. *J Oral Pathol* 15: 308-318
9. Chen JC, Gnepp DR, Bedrossian CW (1988) Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: an immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 65(3): 316-326
10. Cheng J, Irie T, Munakata R, Kimura S, Nakamura H, He RG, Lui AR, Saku T (1995) Biosynthesis of basement membrane molecules by salivary adenoid cystic carcinoma cells: an immunofluorescence and confocal microscopic study. *Virch Arch* 426(6): 577-586
11. Cheng J, Saku T, Okabe H, Furthmayr H (1992) Basement membranes in adenoid-cystic carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* 69: 2631-2640
12. Chomette G, Auriol M, Labrousse F, Raphael M, Szpirglas H, Vaillant JM (1988) Immunopathology of the labial salivary glands in Sjogren's syndrome and other autoimmune diseases. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 89(4): 237-241
13. Chomette G, Laudenbach P, Auriol M, Szpirglas H (1983) The accessory salivary glands in Sjogren's syndrome. Histological and ultrastructural study. Correlations with sialographic changes in the principal glands. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 84(3): 121-127
14. Cutler LS (1990) The role of extracellular matrix in the morphogenesis and differentiation of salivary glands. *Adv Dent Res* 4: 27-33
15. Cutler LS, Christian CP, Rendell JK (1987) Glycosaminoglycan synthesis by adult rat submandibular salivary-gland secretory units. *Arch Oral Biol* 32(6): 413-419
16. D'Ardenne AJ (1989) Use of basement membrane marker in tumor diagnosis. *J. Clin Pathol* 42: 449-457
17. D'Ardenne AJ, Burns J, Sykes BC, Bennett MK (1983) Fibronectin and type III collagen in epithelial neoplasms of gastrointestinal tract and salivary gland. *J Clin Pathol* 36(7): 756-63
18. Durbeek M, Ekblom P (1997) Dystroglycan and laminins: glycoconjugates involved in branching epithelial morphogenesis. *Exp Lung Res* 23(2): 109-118
19. Durbeek M, Talts JF, Henry MD, Yurchenco PD, Campbell KP, Ekblom P (2001) Dystroglycan binding to laminin alpha1LG4 module influences epithelial morphogenesis of salivary gland and lung in vitro. *Differentiation* 69(2-3): 121-134
20. Erlanson RA, Cardon-Cardo C, Higgins PJ (1984) Histogenesis of benign pleomorphic adenoma (mixed tumor) of the major salivary glands. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 8: 803-820
21. Felix A, Rosa JC, Fonseca I, Cidadao A, Soares J (1999) Laminin and collagen IV in pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 30(8): 964-969
22. Felix A, Rosa JC, Nunes JF, Fonseca I, Cidadao A, Soares J (2002) Hyalinizing clear cell carcinoma of salivary glands: a study of extracellular matrix. *Oral Oncol* 38(4): 364-368
23. Franca CM, Jaeger MM, Jaeger RG, Araujo NS (2000) The role of basement membrane proteins on the expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in an adenoid cystic carcinoma cell line. *Oral Oncol* 36(2): 248-252
24. Friedmann I, Hodges GM (1975) Morphogenesis and ultrastructure of the mouse embryonic salivary gland in tissue culture. Normal, and following exposure to trypsin. *Acta Otolaryngol* 79(3-4): 197-213
25. Hardman P, Spooner BS (1992) Collagen in organ development. *Trans Kans Acad Sci* 95(1-2): 29-33
26. Hashimura K, Kasai T, Yamada K, Mori M, Chomette G, Auriol M, Vaillant JM (1990) Proteoglycans detected by monoclonal antibodies in adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Anticancer Res* 10(4): 1083-1089
27. Hayakawa T, Kishi J, Nakanishi Y (1992) Salivary gland morphogenesis: possible involvement of collagenase. *Matrix Suppl* 1: 344-351
28. Hoffman MP, Kibbey MC, Letterio JJ, Kleinman HK (1996) Role of laminin-1 and TGF-beta 3 in acinar differentiation of a human submandibular gland cell line (HSG). *J Cell Sci* 109 (Pt 8): 2013-2021
29. Irie T, Cheng J, Kimura S, Munakata R, Taira S, Saku T (1998) Intracellular transport of basement membrane-type heparan sulphate proteoglycan in adenoid cystic carcinoma cells of salivary gland origin: an immunoelectron microscopic study. *Virch Arch* 433(1): 41-48
30. Ivanova SA, Shekhonin BV, Chumakov AA (1997) Phenotypic characterization of cells and structure of the extracellular matrix in pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Arkh Patol* 59(4): 49-55
31. Kadoya Y, Katsumata O, Yamashina S (1997) Substructures of the acinar basement membrane of rat submandibular gland as shown by alcian blue staining and cryo-fixation followed by freeze-substitution. *J Electron Microsc (Tokyo)* 46 (5): 405-412
32. Kahn LB (1979) Benign lymphoepithelial lesion (Mikulicz's disease) of the salivary gland: an ultrastructural study. *Hum Pathol* 10(1): 99-104
33. Karja V, Syrjanen K, Syrjanen S (1995) Collagen IV and tenascin immunoreactivity as prognostic determinant in benign and malignant salivary gland tumours. *Acta Otolaryngol* 115(4): 569-575
34. Kimura S, Cheng J, Ida H, Hao N, Fujimori Y, Saku T (2000) Perlecan (heparan sulfate proteoglycan) gene expression reflected in the characteristic histological architecture of salivary adenoid cystic carcinoma. *Virch Arch* 437(2): 122-128
35. Kimura S, Cheng J, Toyoshima K, Oda K, Saku T (1999) Basement membrane heparan sulfate proteoglycan (perlecan) synthesized by ACC3, adenoid cystic carcinoma cells of human salivary gland origin. *J Biochem (Tokyo)* 125(2): 406-413
36. Loducca SV, Raitz R, Araujo NS, Araujo VC (2000) Polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma: distinct architectural composition revealed by collagen IV, laminin and their integrin ligands (alpha2beta1 and alpha3beta1). *Histopathology* 37(2): 118-123

37. Lorber M (1991) Branchings and course of the larger ducts and accompanying structures within the rat submandibular salivary gland. *Am J Anat* 190(2): 133-156
38. Lorber M (1992) Elastic fibers in the duct system of the rat submandibular salivary gland. *Anat Rec* 234(3): 335-347
39. Luna MG (1996) Immunohistochemical localization of Type I, II and IX collagens in pleomorphic adenoma of human salivary glands. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 63(1): 122-130
40. Macauley SP, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Chegini N, Oxford GE, Humphreys-Beher MG (1997) Extracellular-matrix gene expression during mouse submandibular gland development. *Arch Oral Biol* 42(6): 443-454
41. Mao L, Yu S, Sun K (2001) An experimental study of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 inhibits the invasion and metastasis of the human salivary adenoid cystic carcinoma in vitro and in vivo]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 36(4): 304-307
42. McArthur CP, Fox NW, Kragel P (1993) Monoclonal antibody detection of laminin in minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 6(5): 649-661
43. Nakamura Y, Yamamoto M, Sakamoto K, Ohta K, Umeda A, Tsukamoto T, Nakashima T (2001) Growth factors, extracellular matrix components and cell adhesion molecules Warthin's tumor. *J Oral Pathol Med* 30(5): 290-295
44. Nochomovitz LE, Kahn LB (1977) Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland and its histologic variants. A clinicopathologic study of thirty cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 44(3): 394-404
45. Ormos J, Halasz A (1991) Electron microscopic study of adenoid cystic carcinoma. *Ultrastruct Pathol* 15(2): 149-157
46. Palmer RM (1985) Epithelial-myoepithelial carcinoma: an immunocytochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 59(5): 511-515
47. Palmer RM (1986) The identification of myoepithelial cells in human salivary glands. A review and comparison of light microscopical methods. *J Oral Pathol* 15(4): 221-229
48. Palmer RM, Eveson JW, Gusterson BA (1986) Epimyoepithelial' islands in lymphoepithelial lesions. An immunocytochemical study. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 408(6): 603-609
49. Palmer RM, Lucas RB, Knight J, Gusterson B (1985) Immunocytochemical identification of cell types in pleomorphic adenoma, with particular reference to myoepithelial cells. *J Pathol* 146(3): 213-220
50. Reuterving CO, Hagg E, Henriksson R, Holm J (1987) Salivary glands in long-term alloxan-diabetic rats. A quantitative light and electron-microscopic study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 95(3): 131-136
51. Saku T, Cheng J, Okabe H, Koyama Z (1990) Immunolocalization of basement membrane molecules in the stroma of salivary gland pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med* 19(5): 208-214
52. Seifert G (1971) Die Pathologie der Speicheldrüsen im Rahmen der Kollagenkrankheiten. *HNO* 19(7): 193-200
53. Shi H, He R, Lin G (1997) Role of type IV collagene and type IV collagenase in the invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 15: 218-219, 222
54. Shintani S, Al calde RE, Matsumura T, Terakado N (1997) Extracellular matrices expression in invasion area of adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Cancer Lett* 116(1): 9-14
55. Shirasuna K, Saka M, Hayashido H, Yoshioka H, Sugiura T, Matsuya T (1993) Extracellular matrix production and degradation by adenoid cystic carcinoma cells: participation of plasminogen activator and its inhibitor in matrix degradation. *Cancer Res* 53: 147-152
56. Shirasuna K, Watatani K, Furusawa H, Saka M, Morioka S, Yoshioka H, Matsuya T (1990) Biological characterization of pseudocyst-forming cell lines from human adenoid cystic carcinomas of minor salivary gland origin. *Cancer Res* 50(13): 4139-4145
57. Skalova A, Leivo I (1992a) Basement membrane proteins in salivary gland tumours. Distribution of type IV collagen and laminin. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 420 (5): 425-431
58. Skalova A, Leivo I (1992b) Extracellular collagenous spherules in salivary gland tumors. Immunohistochemical analysis of laminin and various types of collagen. *Arch Pathol Lab Med* 116(6): 649-653
59. Skalova A, Leivo I, Michal M, Saksela E (1992) Analysis of collagen isotypes in crystalloid structures of salivary gland tumors. *Hum Pathol* 23(7): 748-754
60. Skalova A, Michal M, Leivo I (1993) Collagenous crystalloids and collagenous spherules in salivary gland tumors. A light microscopy and immunohistochemistry study. *Cesk Patol* 29(2): 73-78
61. Soini Y, Autio-Harmainen H (1993) Synthesis and degradation of basement membranes in benign and malignant salivary gland tumours. A study by in situ hybridization. *J Pathol* 170(3): 291-296
62. Spooner BS, Faubion JM (1980) Collagen involvement in branching morphogenesis of embryonic lung and salivary gland. *Dev Biol* 77(1): 84-102
63. Spooner BS, Paulsen A (1986) Basal lamina anionic sites in the embryonic submandibular salivary gland: resolution and distribution using ruthenium red and polyethyleneimine as cationic probes. *Eur J Cell Biol* 41(2): 230-237
64. Sternlicht MD, Barsky SH (1997) The myoepithelial defense: a host defense against cancer. *Med Hypotheses* 48(1): 37-46
65. Strassburger S, Berndt A, Hyckel P, Katenkamp D, Kosmehl H (1998) Differential expression of laminin chains in the human major salivary gland. *Histochem J* 30: 81-88
66. Takahashi Y, Nogawa H (1991) Branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in basement membrane-like substratum separated from mesenchyme by the membrane filter. *Development* 111(2): 327-335
67. Toida M, Takeuchi J, Hara K, Sobue M, Tsukidate K, Goto K, Nakashima N (1984) Histochemical studies of intercellular components of salivary gland tumors with special reference to glycosaminoglycan, laminin and vascular elements. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 403(1): 15-26
68. Toida M, Takeuchi J, Sobue M, Tsukidate K, Akao S, Fukatsu T, Nakashima N (1985) Histochemical studies on pseudocysts in adenoid cystic carcinoma of the human salivary gland. *Histochem J* 17(8): 913-924
69. Toyoshima K, Kimura S, Cheng J, Oda Y, Mori KJ, Saku T (1999) High-molecular-weight fibronectin synthesized by adenoid cystic carcinoma cells of salivary gland origin. *Jpn J Cancer Res* 90(3): 308-319
70. Tralongo V, Rodolico V, Burruano F, tortrici S, Mancuso A, Daniele E (1997) Malignant myoepithelioma of the minor salivary glands arising in a pleomorphic adenoma. *Anticancer Res* 17(4A): 2671-2675
71. Wallaert B, Janin A, Lassalle P, Copin MC, Devisme L, Gosset P, Gosselin B, Tonnel AB (1994) Airway-like inflammation of minor salivary gland in bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 150(3): 802-809
72. Watanabe I, Yamada E, Kawano YK, Ogawa K (1994) Scanning electron microscopy of acinar cells of rat submandibular salivary glands. *Braz J Med Biol Res* 27(9): 2197-2206
73. Wetzels RH, van der Velden L, Schaafsma H, Manni J, Leigh I, Vooijs G, Ramaekers F (1992) Immunohistochemical localization of basement membrane type VII collagen and laminin in neoplasms of the head and neck. *Histopathology* 21: 459-464
74. Yamada K, Kunikata M, Mori M, Chomette G, Auriol M, Vaillant J, Tubura A, Mori S, Hilgers J (1991) Immunohistochemical localization of MAM-3 and MAM-6 antigens in adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med* 20(2): 57-63
75. Yoshihara T, Kanda T, Yaku Y, Kaneko T (1983) Chronic sialadenitis of the submandibular gland (so-called Kuttner tumor). *Auris Nasus Larynx* 10(2): 117-123

CK- bzw. IF-Proteinexpressionsmuster im Bereich der Speicheldrüsen

76. Araujo VC, Loduca SV, Sousa SO, Williams DM, Araujo NS (2001) The cribriform features of adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma: cytokeratin and integrin expression. *Ann Diagn Pathol* 5(6): 330-334
77. Asai S, Tang X, Ohta Y, Tsutsumi Y (1995) Myoepithelial carcinoma in pleomorphic adenoma of salivary gland type, occurring in the mandible of an infant. *Pathol Int* 45(9): 677-683
78. Azumi N, Battifora H (1987b) The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* 88: 286-296
79. Batsakis JG (1981) Tumors of the head and neck. Williams & Wilkins, Baltimore/London, 2nd Edition, 188-199
80. Caselitz J, Becker J, Seifert G, Weber K, Osborn M (1984) Coexpression of keratin and vimentin filaments in adenoid-cystic carcinomas of the salivary glands. *Virch. Arch. A Pathol. Anat.* 403: 337-344
81. Caselitz J, Osborn M, Hamper K, Wustrow J, Rauchfuss A, Weber K (1986c) Pleomorphic adenomas, adenoid cystic carcinomas and adenolymphomas of salivary glands analysed by a monoclonal antibody against myoepithelial/basal cells. An immunohistochemical study. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 409(6): 805-816
82. Caselitz J, Schulze I, Seifert G (1986a) Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: An immunohistochemical study. *J Oral Pathol* 15: 308-318
83. Caselitz J, Walther B, Wustrow J, Seifert G, Weber K, Osborn M (1986b) A monoclonal antibody that detects myoepithelial cells in exocrine glands, basal cells in other epithelia and basal and suprabasal cells in certain hyperplastic tissues. *Virch Arch A Pathol Anat* 409: 725-738
84. Chan JK, Suster S, Wenig BM, Tsang WY, Chan JB, Lau AL (1997) Cytokeratin 20 immunoreactivity distinguishes Merkel cell (primary cutaneous neuroendocrine) carcinomas and salivary gland small cell carcinomas from small cell carcinomas of various sites. *Am J Surg Pathol* 21 (2): 226-234
85. Cho KJ, Kim YI (1989) Monomorphic adenomas of the salivary glands. A clinico-pathologic study of 12 cases with immunohistochemical observation. *Pathol Res Pract* 184(6): 614-620
86. Chomette G, Aurioi M, Vaillant JM, Kasai T, Okada Y, Mori M (1991) Basaloid carcinoma of salivary glands, a variety of undifferentiated adenocarcinoma. Immunohistochemical study of intermediate filament proteins in 24 cases. *J Pathol* 163(1): 39-45
87. Dardick I, Cavell S, Boivin M, Hoppe D, Parks WR, Stinson J, Yamada S, Burns BF (1989) Salivary gland myoepithelioma variants. Histological, ultrastructural, and immunocytological features. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 416(1): 25-42
88. Dardick I, Claude A, Parks WR, Hoppe D, Stinson J, Burns BF, Little J, Brown DL, Dairkee SH (1988a) Warthin's tumor: an ultrastructural and immunohistochemical study of basilar epithelium. *Ultrastruct Pathol* 12(4): 419-432
89. Dardick I, Stratis M, Parks WR, DeNardi FG, Kahn HJ (1991) S-100 protein antibodies do not label normal salivary gland myoepithelium. Histogenetic implications for salivary gland tumors. *Am J Pathol* 138(3): 619-628
90. De-Araujo VC, Kowalski LP, Soares F, de-Araujo NS, Loduca SV, Sobral AP (2002) Salivary duct carcinoma: cytokeratin 14 as a marker of in-situ intraductal growth. *Histopathology* 41(3): 244-249
91. De-Sousa SO, Schwarzschild M, de-Araujo NS, de-Araujo VC (2000) Basal cell adenocarcinoma of the palate with squamous metaplasia. *J Clin Pathol* 53(2): 153-156
92. Draeger A, Nathrath WB, Lane EB, Sundstrom BE, Stigbrand TI (1991) Cytokeratins, smooth muscle actin and vimentin in human normal salivary gland and pleomorphic adenomas. Immunohistochemical studies with particular reference to myoepithelial and basal cells. *APMIS* 99(5): 405-415
93. Erlandson RA, Cardon-Cardo C, Higgins PJ (1984) Histogenesis of benign pleomorphic adenoma (mixed tumor) of the major salivary glands. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 8: 803-820
94. Foschini MP, Marucci G, Eusebi V (2002) Low-grade mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: characteristic immunohistochemical profile and evidence of striated duct differentiation. *Virch Arch* 440(5): 536-542
95. Franquemont DW, Mills SE (1993) Plasmacytoid monomorphic adenoma of salivary glands. Absence of myogenous differentiation and comparison to spindle cell myoepithelioma. *Am J Surg Pathol* 17(2): 146-153
96. Gnepp DR, Wick MR (1990) Small cell carcinoma of the major salivary glands. An immunohistochemical study. *Cancer* 66(1): 185-192
97. Gupta RK, Naran S, Dowle C, Simpson JS (1992) Coexpression of vimentin, cytokeratin and S-100 in monomorphic adenoma of salivary gland; value of marker studies in the differential diagnosis of salivary gland tumours. *Cytopathology* 3(5): 303-309
98. Gustafsson H (1986) Salivary gland neoplasms. Studies on the cytoskeleton, the secretory apparatus and the nuclear content. Dissertation, Universität Umeå, Schweden
99. Gustafsson H, Bergman F, Virtanen I, Thornell LE (1989b) Myoepithelial cells in salivary gland neoplasms. *APMIS* 97(1): 49-55
100. Gustafsson H, Carlsoo B, Kjorell U, Thornell LE (1986) Immunohistochemical and ultrastructural observations on adenoid cystic carcinoma of salivary glands. With special reference to intermediate filaments and proteoglycan particles. *Acta Otolaryngol* 102 (1-2): 152-160
101. Gustafsson H, Virtanen I, Thornell LE (1988b) Expression of cytokeratins and vimentin in salivary gland carcinomas as revealed with monoclonal antibodies. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 412(6): 515-524
102. Gustafsson H, Virtanen I, Thornell LE (1989a) Glial fibrillary acidic protein and desmin in salivary neoplasms. Expression of four different types of intermediate filament proteins within the same cell type. *Virch Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 57(5): 303-313
103. Hamper K, Schmitz-Watjen W, Mausch HE, Caselitz J, Seifert G (1989) Multiple expression of tissue markers in mucoepidermoid carcinomas and acinic cell carcinomas of the salivary glands. *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 414(5): 407-413
104. Huang JW, Mori M, Yamada K, Isono K, Ueno K, Shinohara M, Harada T, Oka M (1992) Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: immunohistochemical distribution of intermediate filament proteins, involucrin and secretory proteins. *Anticancer Res* 12(3): 811-820
105. Kahn HJ, Baumal R, Marks A, Dardick I, van-Nostrand AW (1985) Myoepithelial cells in salivary gland tumors. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 109 (2): 190-195
106. Kusama K, Jiang Y, Ohno J, Shikata H, Ishikawa F, Taguchi K, Kikuchi K, Mori K, Sakashita H, Sakagami H, Kaneko T, Yamamoto Y (2000) Immunohistochemical detection of cytokeratin 18 and its neo-epitope in human salivary glands and pleomorphic adenomas. *Anticancer Res* 20: 2485-2487
107. Li C, Okamoto Y, Ohmura H, Ogawa K, Shrestha P, Mori M (1996) Expression of cytokeratins in Warthin's tumour (adenolymphoma) of parotid glands: specific detection of individual cytokeratin types by monoclonal antibodies. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32B (5): 352-358
108. Nagao T, Sugano, I, Ishida Y, Tajima Y, Matsuzaki O, Konno A, Kondo Y, Nagao K (1998) Salivary gland malignant myoepithelioma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of ten cases. *Cancer* 83(7): 1292-1299

109. Norberg L, Dardick I, Leung R, Burford-Mason AP, Rippstein P (1992) Immunogold localization of actin and cytokeratin filaments in myoepithelium of human parotid salivary gland. *Ultrastruct Pathol* 16 (5): 555-568
110. Ohara N, Taguchi K, Yamamoto M, Nagano T, Akagi T (1998) Sebaceous carcinoma of the submandibular gland with high-grade malignancy: report of a case. *Pathol Int* 48(4): 287-291
111. Palmer RM (1986) The identification of myoepithelial cells in human salivary glands. A review and comparison of light microscopical methods. *J Oral Pathol* 15(4): 221-229
112. Palmer RM, Lucas RB, Knight J, Gusterson B (1985) Immunocytochemical identification of cell types in pleomorphic adenoma, with particular reference to myoepithelial cells. *J Pathol* 146(3): 213-220
113. Quddus MR, Henley JD, Affify AM, Dardick I, Gnepp DR (1999) Basal cell adenocarcinoma of the salivary gland: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol-Endod* 87(4): 485-492
114. Ramaekers F, Huysmans A, Moesker O, Kant A, Jap P, Herman C, Vooijs P (1983a) Monoclonal antibody to keratin filaments, specific for glandular epithelia and their tumors. *Lab Invest* 49: 353-361
115. Ramaekers F, Puts J, Moesker O, Kant A, Jap P, Vooijs P (1983b) Demonstration of keratin in human adenocarcinomas. *Am J Pathol* 111: 213-223
116. Regauer S, Beham A, Mannweiler S (2000) CK7 expression in carcinomas of the Waldeyer's ring area. *Hum Pathol* 31 (9): 1096-1101
117. Rezende RB, Drachenberg CB, Kumar D, Blanchaert R, Ord RA, Ioffe OB, Papadimitriou JC (1999) Differential diagnosis between monomorphic clear cell adenocarcinoma of salivary glands and renal (clear) cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 23(12): 1532-1538
118. Saveria AT, Sloman A, Huvos AG, Klimstra DS (2000) Myoepithelial carcinoma of the salivary glands: a clinicopathologic study of 25 patients. *Am J Surg Pathol* 24(6): 761-774
119. Seifert G, Donath K (1996) Das hyalinisierende hellzellige Karzinom der Speicheldrüsen. *Pathologie* 17(2): 110-115
120. Seifert G, Donath K (1997) The congenital basal cell adenoma of salivary glands. Contribution to the differential diagnosis of congenital salivary gland tumours. *Virch Arch* 430(4): 311-319
121. Shirasuna K, Watatani K, Furusawa H, Saka M, Morioka S, Yoshioka H, Matsuya T (1990) Biological characterization of pseudocyst-forming cell lines from human adenoid cystic carcinomas of minor salivary gland origin. *Cancer Res* 50(13): 4139-4145
122. Shrestha P, Namba M, Yang L, Liu B, Oosumi H, Mori M (1994a) Papillary cystadenocarcinoma of salivary glands: An immunohistochemical study. *Inter. J. Oncol.* 4: 587-597
123. Shrestha P, Yang LT, Liu BL, Namba M, Qin CL, Isono K, Tsukitani K, Mori M (1994b) Clear cell carcinoma of salivary glands: immunohistochemical evaluation of clear tumor cells. *Anticancer Res* 14(3A): 825-836
124. Takahashi H, Fujita S, Okabe H, Tsuda N, Tezuka F (1991) Immunohistochemical characterization of basal cell adenomas of the salivary gland. *Pathol Res Pract* 187(2-3): 145-156
125. Takahashi H, Fujita S, Okabe H, Tsuda N, Tezuka F (1992) Distribution of tissue markers in acinic cell carcinomas of salivary gland. *Pathol Res Pract* 188(6): 692-700
126. Takai Y, Dardick I, Mackay A, Burford-Mason A, Mori M (1995) Diagnostic criteria for neoplastic myoepithelial cells in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas. Immunocytochemical detection of muscle-specific actin, cytokeratin 14, vimentin, and glial fibrillary acidic protein. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79(3): 330-341
127. Tralongo V, Becchina G, Genovese F, Nagar C, Ottovoggio G, Pinto G (2002) Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the salivary glands: clinicopathological and immunohistochemical study of a case. *Anticancer Res* 22(2B): 1347-1352
128. Tralongo V, Rodolico V, Burruano F, tortrici S, Mancuso A, Daniele E (1997) Malignant myoepithelioma of the minor salivary glands arising in a pleomorphic adenoma. *Anticancer Res* 17(4A): 2671-2675
129. Williams SB, Ellis GL, Auclair PL (1993) Immunohistochemical analysis of basal cell adenocarcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 75 (1): 64-69

Radiogene ECM-Veränderungen im Bereich der Lunge

130. Adamson IY, Bowden DH (1983) Endothelial injury and repair in radiation-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 112 (2): 224-230
131. Adamson IY, Hedgecock C, Bowden DH (1990) Epithelial cell-fibroblast interactions in lung injury and repair. *Am J Pathol* 137 (2): 385-392
132. Adamson IY, King GM, Bowden DH (1988) Collagen breakdown during acute lung injury. *Thorax* 43 (7): 562-568
133. Berdjis CC (1971) Pathology of irradiation. Williams & Wilkins Company, Baltimore
134. Dubrovskaja VF (1991) Dynamics of structural parameters of mast cells and accumulation of collagen fibers during radiation-induced pneumosclerosis in rats. *Radiobiologia* 31: 485-490
135. Franko AJ, Nguyen GK, Sharplin J, Vriend R (1996) A comparison of the ultrastructure of perfusion-deficient and functional lung parenchyma in CBA mice during the late phase after irradiation. *Radiat Res* 146 (5): 586-589
136. Giri PG, Kimler BF, Giri UP, Cox GG, Reddy EK (1985) Comparison of single, fractionated and hyperfractionated irradiation on the development of normal tissue damage in rat lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11 (3): 527-534
137. Herrmann T, Schorch J, Molls M (1995) Radiation Pneumopathy. Experimental and clinical data. In: Late sequelae in oncology (Dunst J und Sauer R, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 135-140
138. Jennings FL, Arden A (1961) Development of experimental radiation pneumonitis. *Arch Pathol* 71: 437-446
139. Karvonen RL, Fernandez-Madrid F, Maughan RL, Palmer KC, Fernandez-Madrid I (1987) An animal model of pulmonary radiation fibrosis with biochemical, physiologic, immunologic, and morphologic observations. *Radiat Res* 111 (1): 68-80
140. Law MP (1985) Vascular permeability and late radiation fibrosis in mouse lung. *Radiat Res* 103: 60-76, 1985
141. Miller GG, Kenning JM, Dawson DT (1988) Radiation-induced changes in collagen isotypes I, III, and IV in the lung of LAF1 mouse: effects of time, dose, and WR-2721. *Radiat Res* 115 (3): 515-532
142. Molteni A, Moulder JE, Cohen EF, Ward WF, Fish BL, Taylor JM, Wolfe LF, Brizio-Molteni L, Veno P (2000) Control of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II type 1 receptor blocker. *Int J Radiat Biol* 76 (4): 523-532
143. Murray JC, Parkins CS (1987) Collagen metabolism in mouse lung after X irradiation. *Radiat Res* 111 (3): 498-510
144. Pauluhn J, Baumann M, Hirth-Dietrich C, Rosenbruch M (2001) Rat model of lung fibrosis: comparison of functional, biochemical, and histopathological changes 4 month after single irradiation of the right hemithorax. *Toxicology* 161 (3): 153-163
145. Penney DP, Rosenkrans WA (1984) Cell-cell matrix interactions in induced lung injury. I. The effects of X-irradiation on basal laminar proteoglycans. *Radiat Res* 99 (2): 410-419
146. Penney DP, Siemann DW, Rubin P, Shapiro DL, Finkelstein J, Cooper RA (1982) Morphologic changes reflecting early and late effects of irradiation of the distal lung of the mouse: a review. *Scan Electron Microsc (Pt1)*: 413-425
147. Riesenbeck D, Herrmann T (2000) Lunge und Bronchialsystem. In: Nebenwirkungen in der Radioonkologie (Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Hrsg.), Urban und Vogel Verlag, München, 165-177
148. Rubin P (1995) In: Late effect of normal tissues consensus conference (Rubin P, Hrsg.), *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 1035-1364
149. Rubin P, Constine LS, Fajardo LF, Phillips TL, Wasserman TH (1995) RTOG Late Effects Working Group. Overview. Late Effects of Normal Tissues (LENT) scoring system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 1041-1042
150. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, Mc Donald S, Finkelstein JN (1995) A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33 (1): 99-109
151. Seegenschmiedt MH (1998) In: Nebenwirkungen in der Onkologie. Internationale Systematik und Dokumentation (Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH, Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
152. Shapiro DL, Finkelstein JN, Penney DP, Siemann DW, Rubin P (1982) Sequential effects of irradiation on the pulmonary surfactant system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8 (5): 897-882
153. Song L, Wang D, Cui X, Hu W (1998) The protective action of taurine and L-arginine in radiation pulmonary fibrosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 17 (2): 151-157
154. Song L, Wang D, Cui X, Shi Z, Yang H (1998) Kinetic alterations of angiotensin-II and nitric oxide in radiation pulmonary fibrosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 17: 141-150
155. Thresiamma KC, George J, Kuttan R (1996) Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced toxicity. *Indian J Exp Biol* 34 (9): 845-847
156. Ts'ao C, Ward WF, Tsao FH, Taylor JM, Molteni A (1997) Annexin I in fibrotic rat lung and cultured lung fibroblasts following irradiation. *Int J Radiat Biol* 72 (2): 227-234
157. Vujaskovic Z, Anscher MS, Feng QF, Rabbani ZN, Amin K, Samulski TS, Dewhirst MW, Haroon ZA (2001) Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50: 851-855
158. Walkin CM, Freedman RB, Law MP (1987) Biosynthesis and degradation of collagen in X-irradiated mouse lung. *Radiat Res* 112 (2): 341-350
159. Ward WF, Solliday NH, Molteni A, Port CD (1983) Radiation injury in rat lung. II. Angiotensin-converting enzyme activity. *Radiat Res* 96 (2): 294-300
160. Warren S (1942) Effects of radiation on normal tissues. *Arch Pathol* 34: 1070-1079