

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med., Dr. med. dent. J. Reuther

**Freies Jejunumtransplantat in die Mundhöhle:
Immunhistochemische Analyse der Grenzstrukturen zwischen
Transplantat und Mundschleimhaut mit bis zu
21 Jahren Transplantat-Liegedauer**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Jochen Klaus Alius
aus Alzenau in Ufr.**

Würzburg, Mai 2006

Referent: Prof. Dr. Dr. J. Reuther

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Dr. Josip S. Bill

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Zahnarzt

Meiner verehrten Großmutter Annemarie in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1.	Einleitung	1
1.1	Thema und Zielstellung der Arbeit	1
1.2	Historischer Überblick	2
1.3	Operationstechnik	3
1.4	Vorteile bei der Versorgung mit einem freien Dünndarmtransplantat	5
1.5	Probleme bei der mikrochirurgischen Revaskularisierung unter Verwendung eines freien Jejunumtransplantates und unter Berücksichtigung der Auswahl des geeigneten Patienten	6
1.6	Histologische Grundlagen	8
1.6.1	Mundschleimhaut	8
1.6.2	Dünndarm	10
1.6.3	Intermediärfilamente	14
1.6.4	Konventionelle Histologie	15
1.6.5	Immunhistochemie	16
1.6.5.1	Immunglobuline	16
1.6.5.2	Immunhistochemischer Nachweis	17
1.6.5.2.1	Hitzeinduziertes Epitop-Retrieval	17
1.6.5.2.2	Nachweismethode	17
2.	Material und Methodik	19
2.1	Patientenkollektiv	19
2.2	Probengewinnung	23
2.3	Histologische Aufbereitung	24
2.3.1	Verwendete Materialien	24
2.3.2	Konventionelle Histologie	26
2.3.4	Immunhistochemie	27
3.	Ergebnisse	29
3.1	Immunhistochemische Auswertung	29
3.2	Vergleichende Histologie bei unterschiedlicher Transplantat Liegedauer	39

4.	Diskussion	44
5.	Zusammenfassung	47
6.	Literatur- und Abbildungsverzeichnis	49

1. Einleitung

1.1 Thema und Zielstellung der Arbeit

Im Rahmen der kurativen Therapie maligner Tumoren wird eine operative Entfernung des Tumors in toto vorausgesetzt. Bei Karzinomen der Mundhöhle (Plattenepithelkarzinom) wird bei der Resektion ein Sicherheitsabstand von ein cm bis zwei cm gefordert [1, S.111-112].

Bei Radikaloperationen von Malignomen im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich kommt es durch die engen Lagebeziehungen meist zu einem erheblichen Gewebsverlust [24].

Auch stellt die primäroperative Beschränkung auf eine radikale Tumorausräumung allein kein ausreichendes Therapiekonzept mehr dar. Vielmehr soll die Funktion der in der Mundhöhle vereinten lebenswichtigen Abläufe wie Nahrungsaufnahme, Sprache und Atmung gesichert werden. Eine Rekonstruktion mit ortständiger Schleimhaut stellt den Idealfall dar, ist aber auf grund des begrenzten Angebotes auf kleinste Defekte limitiert [2]. Dem freien Jejunumtransplantat kommt indessen durch sein fast unbegrenztes Materialangebot bei der Deckung ausgedehnter Schleimhautdefekte eine Sonderstellung zu [3].

In der vorliegenden Studie sollte an histologischen Präparaten geklärt werden, ob sich die Strukturen im Übergangsbereich zwischen freiem Jejunumtransplantat und oraler Mukosa funktionell verändern und ob das Dünndarmepithel einer morphologischen Umwandlung unterliegt.

1.2 Historischer Überblick

„Mit der Einführung der freien, mikrovaskulären Dünndarmtransplantation zum Ersatz großer Schleimhautdefekte der Mundhöhle durch REUTHER und STEINAU im Jahre 1980 steht uns heute ein Verfahren zur Verfügung, das in geradezu idealer Weise einen funktionell vollwertigen Ersatz der Mundschleimhaut ermöglicht.“ (HAUSAMEN [4])

REUTHER et al. verfügten bereits 1984 über eine große klinische Erfahrung mit bis dato 66 mikrochirurgischen Dünndarmtransfers[3].

Die Techniken der Mikrogefäßchirurgie, welche nötig sind um eine freie Transplantation eines Jejunumteilsegmentes durchzuführen, wurden allerdings bereits im 18. Jahrhundert eingeführt [5]. Im Jahre 1759 führte HALLOWEL die Naht einer arteriellen Wunde nach der Methode von LAMBERT durch und 1816 TRAVERS an einer Vene [5]. Die erste End zu End Anastomose an einem Menschen führte MURPHY im Jahre 1897 durch [5] und die ersten experimentellen Dünndarmtransplantate erfolgten im Jahre 1906 durch CARREL und GUTHRIE [5]. SEIDENBERG et al. berichteten 1959 über den Ersatz eines teilresezierten Ösophagus mittels eines freien Jejunumtransplantats [6]. Die Versorgung eines großen Gaumendefektes durch ein freies Jejunumtransplantat wurde von BLACK et al. 1971 beschrieben [7].

Dies alles wäre aber undenkbar ohne die Entwicklung von speziellen Operationsbestecken, Nahtmaterialien und Mikroskopsystemen durch welche eine funktionelle Vereinigung dieser feinen Strukturen erst möglich wurde [5].

1.3 Operationstechnik

Im Folgenden werden die präoperative Phase sowie der prinzipielle Ablauf zur Entnahme eines Dünndarmtransplantates dargestellt. Für eine differenziertere Darstellung wird auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen.

Nachfolgender Text wurde entnommen aus „Technik und Probleme bei der Dünndarmsegmententnahme zur freien Transplantation“ (D. LÖHLEIN [8]).

„Präoperativ: Am Tag vor der geplanten Operation sollen die Patienten nur noch klare Suppe und ab dem Abend nur noch klare Flüssigkeit zu sich nehmen. Gleichzeitig erhält der Patient ein orales Abführmittel und abends einen Einlauf, bzw. ein Doppelklysma zur Reinigung des Dickdarmes.

Intraoperativ: Schon zu Beginn der Operation soll das mittlere bis obere Abdomen so vorbereitet werden, dass direkt im Anschluss an die Tumorsektion mit dem abdominalen Eingriff begonnen werden kann.

Als Standardzugang dient eine mediane Oberbauchlaparatomie mit Linksumschneidung des Nabels.

Nach Hochschlagen des Omentum majus und Abheben des Kolon transversum kann der proximale Anteil des Dünndarms in der Regel ohne Probleme dargestellt werden. Die Identifizierung der Gefäßarkaden erfolgt mittels Diaphanoskopie.



Abb.: 1 Das Mesenterium ist keilförmig reseziert, und an seiner Basis sind die Mesenterialgefäße präpariert

Das Ziel der Präparation liegt in der Gewinnung einer ausreichenden Segmentlänge mit möglichst günstigem Gefäßstiel. Soll das Transplantat als Interponat verwendet werden so wird der proximale Rand markiert, um eine isoperistaltische Implantation zu gewährleisten.

Wird das entnommene Transplantat zur Defektdeckung verwendet, also kontramesenterial eröffnet, erübrigt sich selbstverständlich die Markierung für eine isoperistaltische Implantation. Zur Unterfütterung des Transplantatlagers ist eine trapezförmige Skelettierung des Mesenteriums von Vorteil, ansonsten kann diese auch keilförmig erfolgen.

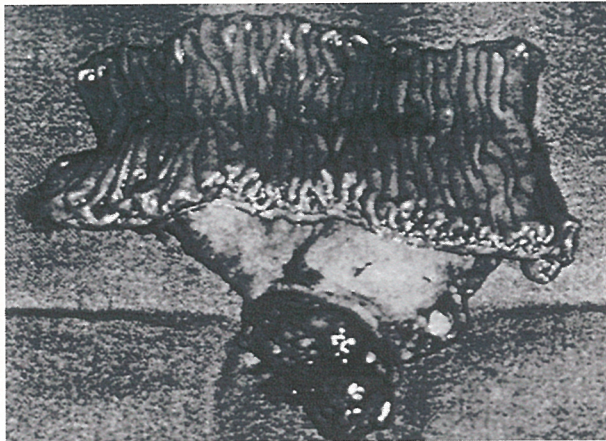


Abb.: 2 Darmrohr kontramesenterial eröffnet

Bereits zu Beginn der Präparation werden die Vene und Arterie dargestellt, um nach der Segmententnahme Durchblutungsstörungen durch etwaige atypische Gefäßverläufe im Entnahmegebiet zu umgehen.

Bei der Entnahme des Transplantates erfolgt als erstes die Skelettierung und Durchtrennung der Darmwand, um eine Durchblutung des Transplantates so lange wie möglich zu erhalten.

Dann erfolgt zuerst die Absetzung der Arterie und anschließend die der Vene, um einen Venösenrückstau im mesenterialen und submukösen Gefäßbett zu vermeiden. Anschließend wird das entnommene Dünndarmtransplantat in Ringerlaktatlösung zur unmittelbaren weiteren Verwendung für das Operationsteam der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie aufbewahrt.“

1.4 Vorteile bei der Versorgung mit einem freien Dünndarmtransplantat

„Ca. 3% bis 5 % aller malignen Tumoren sind im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich lokalisiert. Sie sind somit statistisch von untergeordneter Bedeutung für den einzelnen Patienten aber schicksalhaft“ (HAUSAMEN) [9].

Neben der immer noch angestrebten radikalen Tumorausräumung stellt heutzutage die Wiederherstellung von Form und Funktion ein primäres Therapieziel da, da der operative Eingriff neben psychosozialen Belastungen auch zu erheblichen Funktionseinschränkungen von lebenswichtigen Funktionen wie Nahrungsaufnahme, Atmung und Sprache führt [2]. Die Verwendung eines Dünndarmtransplantates zur funktionellen und ästhetischen Rekonstruktion erlaubt durch sein fast unbegrenztes Gewebeangebot [3, 23] die Einhaltung der Sicherheitsgrenzen und fördert somit die Radikalität des Eingriffs [23]. Ein freies Jejunumtransplantat erlaubt einen spannungsfreien Verschluss [9] sowie durch sein mesenteriales Fettgewebe und dessen optimale Formbarkeit die Rekonstruktion extremer Defekte [10, 11, 12, 23]. Auch wird es mit dieser Technik möglich, eine nahezu vollständige Beweglichkeit des Unterkiefers und der intraoral gelegenen Weichteile in physiologischen Grenzen zu erhalten [9, 12]. Die anfänglich starke Schleimproduktion sistiert und im weiteren postoperativen Verlauf erfolgt die Abflachung der Dünndarmzotten [9]. Somit besteht die Möglichkeit ein autologes Material zu verwenden, welches in fast unbegrenzter Menge vorliegt, eine sehr gute Konturanpassung aufweist und wie kein anderes Material die feuchtigkeitsspendende Schleimhaut ersetzt [13, 3, 9]. Durch ein freies Jejunumtransplantat lässt sich zum einen, die bei Verwendung gestielter Lappen unvermeidbare Narbenbildung im Donorbereich [3, 13], sowie die Schrumpfung und Fibrosierung, also die narbige Induration des Transplantates, welche zu einer Einschränkung der Artikulationsbewegungen führen würde, vermeiden [3]. Ebenso entfallen die Talgsekretion, das regelmäßige Abschilfern des Stratum corneum und der Haarwuchs, welche bei einem gestielten Lappen auftreten würden [9].

1.5 Probleme bei der mikrochirurgischen Revaskularisierung unter Verwendung eines freien Jejunumtransplantates und unter Berücksichtigung der Auswahl des geeigneten Patienten

Nach REUTHER et al. [3] kommen, dafür stark verallgemeinert dieselben Misserfolgsparameter wie bei jedem chirurgischem Vorgehen in Betracht:

- a) falsche Methode
- b) falscher Patient
- c) technische Fehler

Neben der obligaten Verwendung von Mikroskopen und mikrochirurgischen Nahtmaterialien sollte als oberste Maxime die absolute Beherrschung der Operationstechniken stehen [3].

Ein entscheidender Punkt ist die Durchgängigkeit der Anastomose [3], aufgrund dessen forderte O´BRIEN 1977 [9] eine über 90 prozentige Durchgängigkeitsrate bei Anastomosen (mit dem Durchmesser von 1mm) im Tierexperiment, bevor der Chirurg auch klinisch Anastomosierungen an Gefäßen durchführen darf.

Die meisten intraoperativen Probleme lassen sich auf anatomische Varianten der Spenderregion und technische Schwierigkeiten zurückführen [3]. Dabei ist zu beachten, dass der venöse Reflow stark genug ist, um die Vene über die komplette Länge offen zu halten. Aus diesem Grunde so REUTHER sollten nur noch dünnwandige Venen aus der Kopf-Hals-Region zur Gefäßüberbrückung verwendet werden [3].

Der größte Schwachpunkt bei der Verwendung von freien Transplantaten liegt in einer partiellen oder totalen thrombotischen Obliteration des venösen Schenkels der Anastomose [4].

Eine Kontraindikation für einen mikrochirurgischen Eingriff ist eine starke Intimafibrose mit Atherombildung aufgrund der Begünstigung von Einrissen und Abrissen des Gefäßes [3, 14]. Ebenso sollte ein stark bestrahltes Empfängerbett vermieden werden da es zu einer strahleninduzierten

Intimahyalinose kommen kann [3]. Als Kriterium für eine Hypoämie des Transplantates gilt im Allgemeinen die charakteristische livide Verfärbung bei postoperativen Kontrollen [3]. Auch der Verlust der Peristaltik und das Sistieren der Schleimproduktion sind neben der Zyanose Marker, welche den Verlust des Transplantates ankündigen [4].

Gerade diese Beurteilung ist bei Dünndarmtransplantaten besonders schwierig, da diese einer starken postoperativen Schwellung mit dunkelroter Verfärbung unterliegen [4]. Deshalb soll besondere Sorgfalt auf die Lage des venösen Abflusses und die Auswahl der anastomosierenden Gefäße gelegt werden [3]. Eine geeignete Vene mit ausreichendem Durchmesser nach ausgedehnter Tumorresektion und Neck dissection zu lokalisieren, stellt eine entscheidende Bedingung zum Gelingen der Operation dar [4]. Hierbei kann eine Biopsie des Gefäßes wie von BITTER vorgeschlagen, von großem Nutzen sein [14]. Aus diesem Grunde sollte bereits bei der Durchführung einer radikalen Neck dissection ein geeigneter venöser Abfluss über die Schilddrüse zur Aufnahme einer Anastomose erhalten werden [9, 25].

Zu den häufig genannten Einwänden gegen eine Versorgung mit freiem autologem Jejunumtransplantat gehören die zusätzliche Operationsbelastung durch den Zwei-Körperhöhleneingriff, das entsprechend höhere Risiko bei Patienten mit Alkohol- und Nikotinabusus (da meist Gefäßvorschädigung), der Zustand der Mangelernährung sowie organisatorische und wirtschaftliche Faktoren [13, 4].

Allerdings wird dieser zusätzliche abdominalchirurgische Eingriff als komplikationsarme Maßnahme gewertet [13], und auch HAUSAMEN berichtete er habe bei keinem seiner Patienten Probleme bezüglich des Abdomens beobachtet [4]. Nach LÖHLEIN ist die Dünndarmsegmententnahme an darm- und gefäßgesunden Patienten ein Routineeingriff mit geringer postoperativer Komplikationsrate [9, 10, 8].

Außerdem besteht gegenüber herkömmlich verwendeten Transplantaten (Fernlappen, myokutanen Schwenklappen) eine geringere Komplikationsrate sowie eine höhere Sicherheit [15, 16, 17]. Allerdings gibt es von Seiten der

Abdominalchirurgen neben relativen auch absolute Kontraindikationen. Zu diesen zählen chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wie z.B. M. Crohn und arterielle Verschlusskrankheiten [8, 9].

Zur Gruppe der relativen Kontraindikationen zählen abdominale Voroperationen (z.B. biliodigestive Anastomose oder Magenresektion) sowie ausgedehnte Verwachsungen (z.B. Zustand nach Peritonitis oder Mehrfach-Laparatomie) [8].

1.6 Histologische Grundlagen

Im Folgenden werden die histologischen Merkmale der oralen Mukosa sowie der Dünndarmschleimhaut spezifiziert, um die erfolgten Färbungen der histologischen Schnitte sowie deren Auswertungen besser nachzuvollziehen.

1.6.1 Mundschleimhaut

Das Epithel der Mundschleimhaut ist größtenteils ein mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel. Lediglich die „attached gingiva“ und der harte Gaumen besitzen als Zeichen ihrer Verhornung ein Stratum corneum. Die Basalzellschicht sitzt der Lamina propria auf [18/S.466].

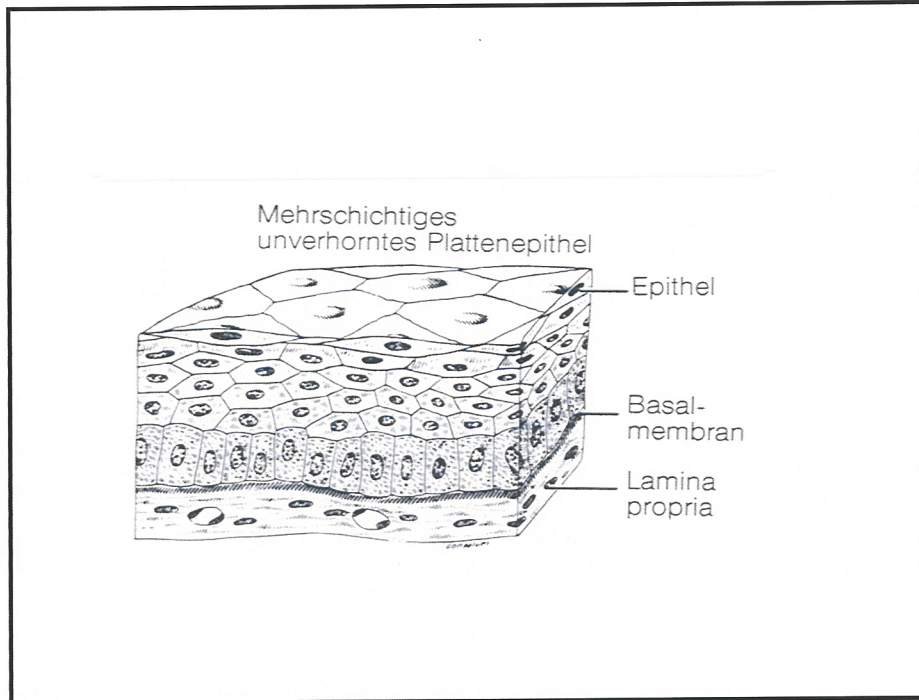


Abb.:3 Mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel (Skizze)

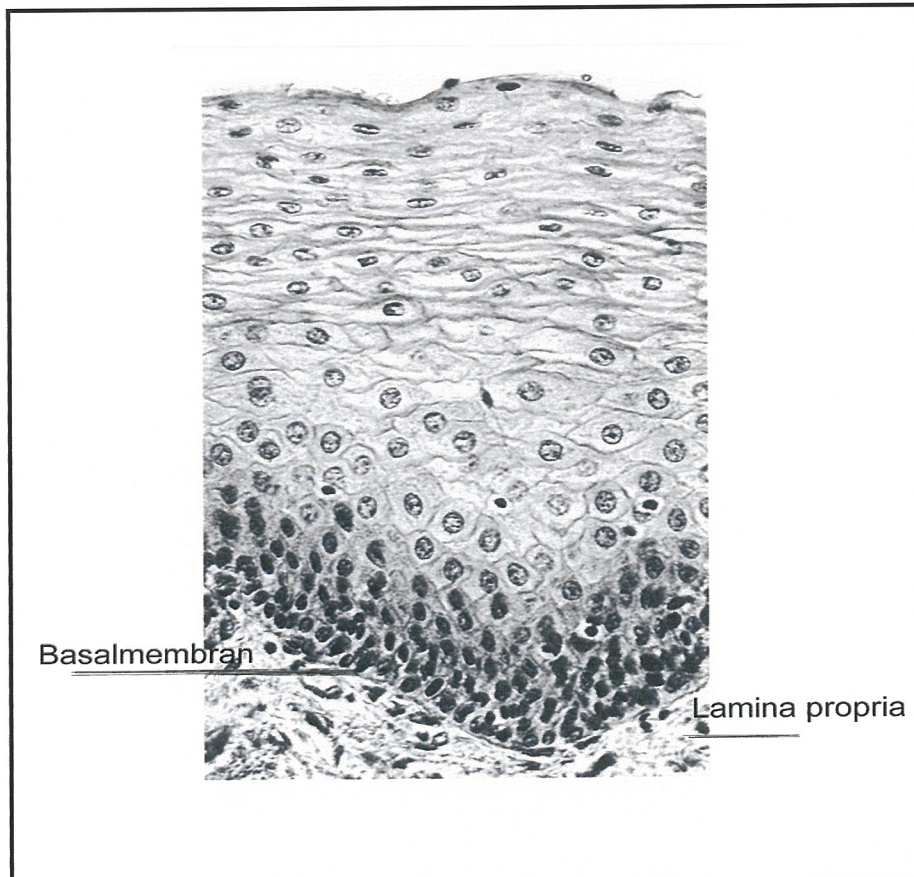


Abb.:4 Mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel der Wangenschleimhaut 200x

Die intraorale Schleimhaut besitzt eine Stärke zwischen 490 μm (planum buccale) und 86 μm (Mundboden). Das Epithel ist von Melanozyten, Langerhans-Zellen und kleinen Lymphozyten durchsetzt. Die Erneuerung der oberflächlichen Zellschicht erfolgt alle acht bis zehn Tage.

Die Lamina propria am Planum buccale und am Mundboden besteht aus aufgelockertem Bindegewebe, welches reich an elastischen Fasern ist. Ebenfalls kommen an vielen Stellen der Mundschleimhaut seromuköse Drüsen vor. Neben freien intraepithelialen Nervenfasereindigungen treten überall Meißner-Körperchen auf [18/S.466].

1.6.2 Dünndarm

Der Dünndarm besteht aus drei Abschnitten dem Duodenum (ca. 20 cm), Jejunum (ca. 200 cm) und Ileum (ca. 300 cm).

Das auskleidende Epithel des Dünndarms wird durch ein einschichtiges hochprismatisches Epithel gebildet, welches Mikrovilli trägt [18/S.494].

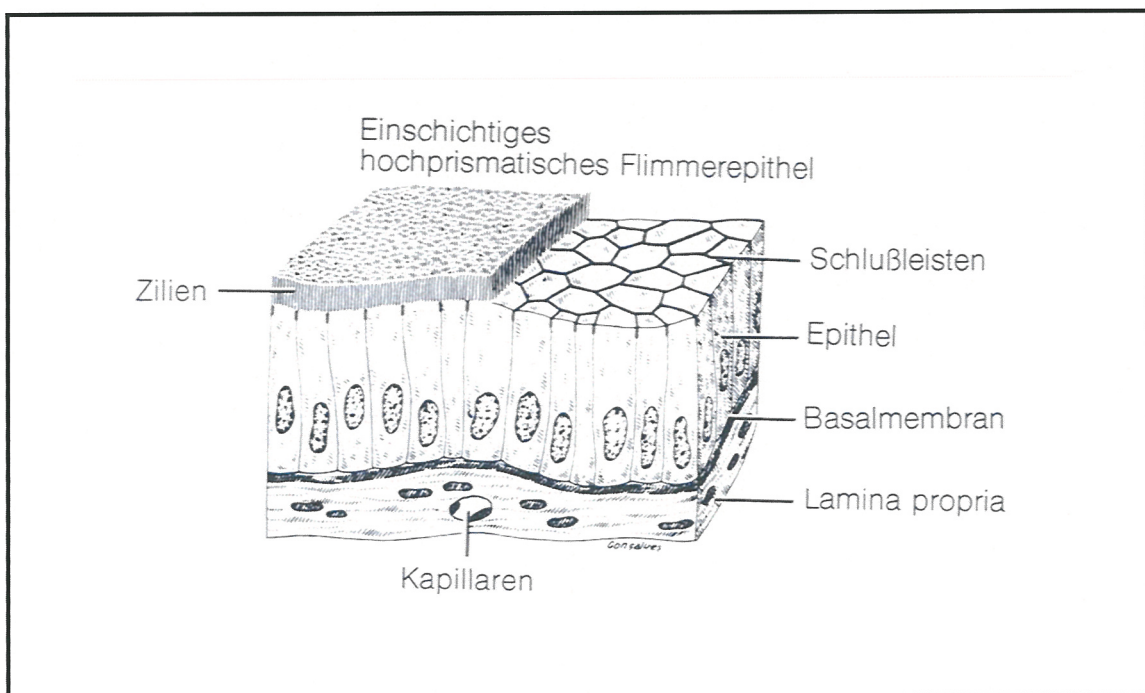


Abb.:5 Einschichtiges hochprismatisches Flimmerepithel (Skizze)

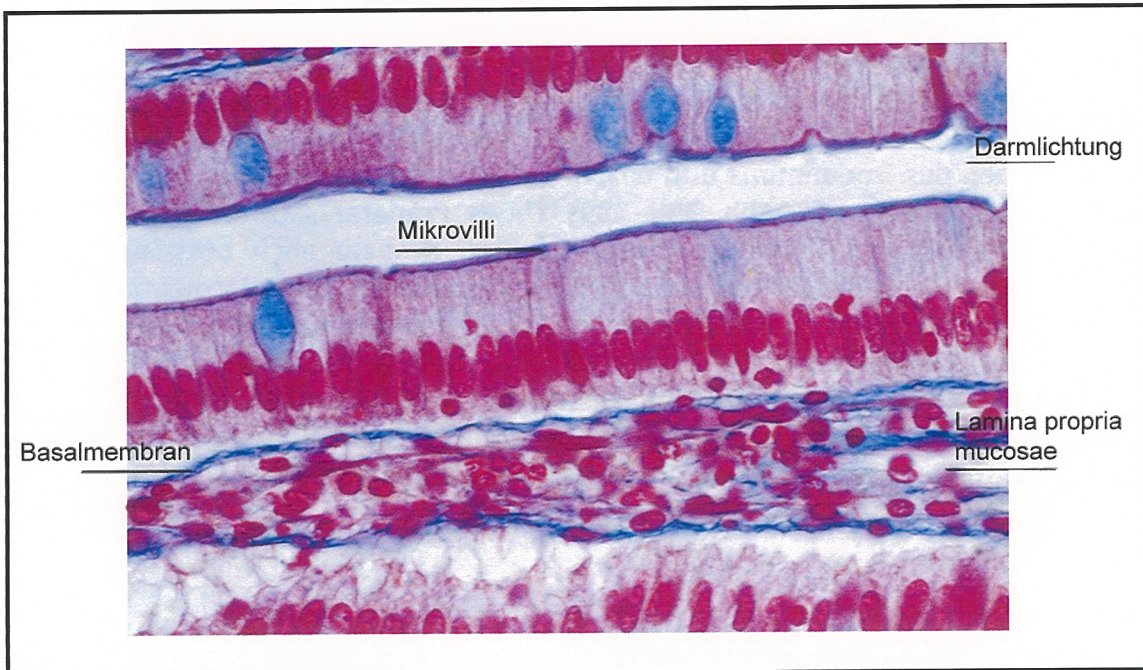


Abb.:6 Duodenum Färbung: Azan 200x

Im Gegensatz zur Mundschleimhaut sind der Aufbau und die Funktion des Dünndarms wesentlich komplexer, da zwischen den Krypten (Glandulae intestinales) und Zotten unterschieden werden kann. Die sich anschließende Lamina propria wird von der Lamina muscularis begrenzt.

Die Lamina propria die sich am Aufbau der Zotten beteiligt und zusammen mit der Lamina muscularis die Dünndarmfalten bildet, ist reich an Myofibroblasten und glatten Muskelzellen [18/S. 494-504].

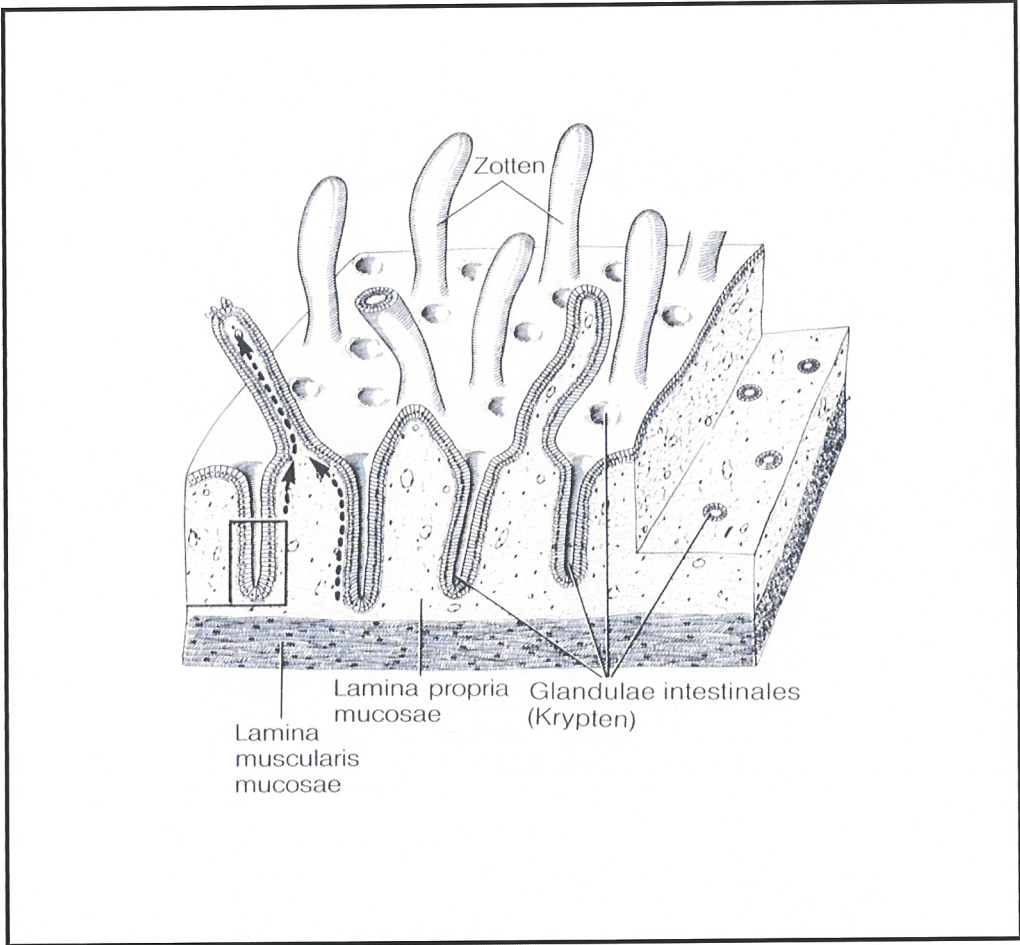


Abb.:7 Schema zur Struktur des Dünndarms (Skizze)

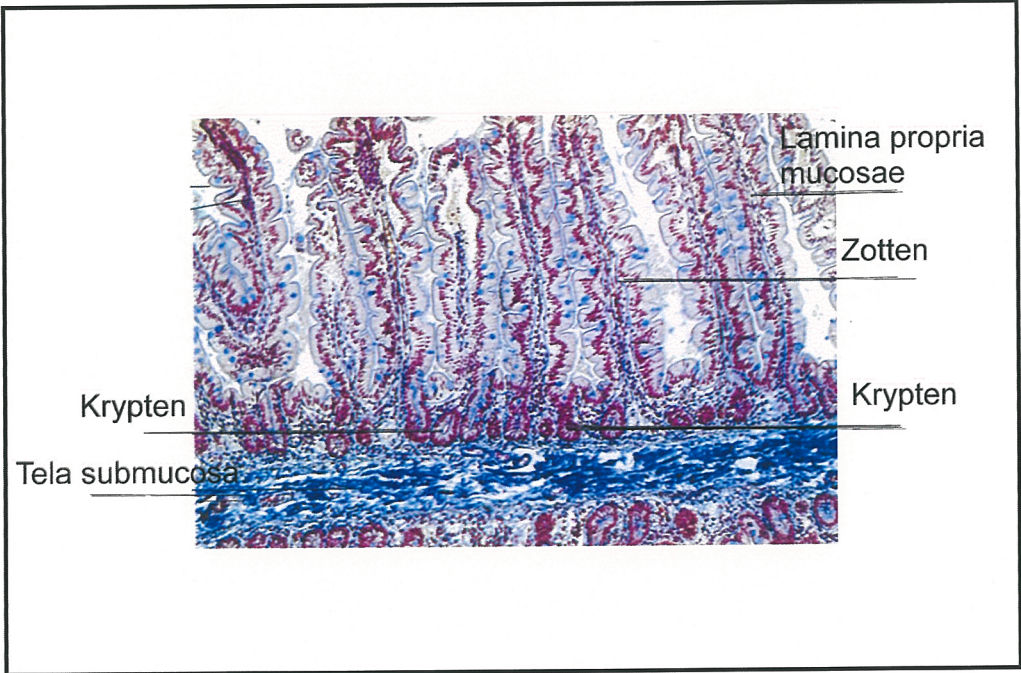


Abb.:8 Jejunum Färbung: Azan 80x

Neben den Enterozyten (resorbierende Darmepithelzellen) kommen auch Becherzellen (produzieren glykoproteinreichen Schleim), enterochromafine /endokrine Zellen (Hormonbildung) und Paneth'sche Körnerzellen (exokrine-seröse Drüsenzelle) als Epithelzellen vor. Der Zellersatz dauert von der Kryptentiefe bis zur Abstoßung an der Zottenspitze ca. 36 Stunden (Paneth'sche Körnerzellen ca. 30 Tage) [18/S.497-503].

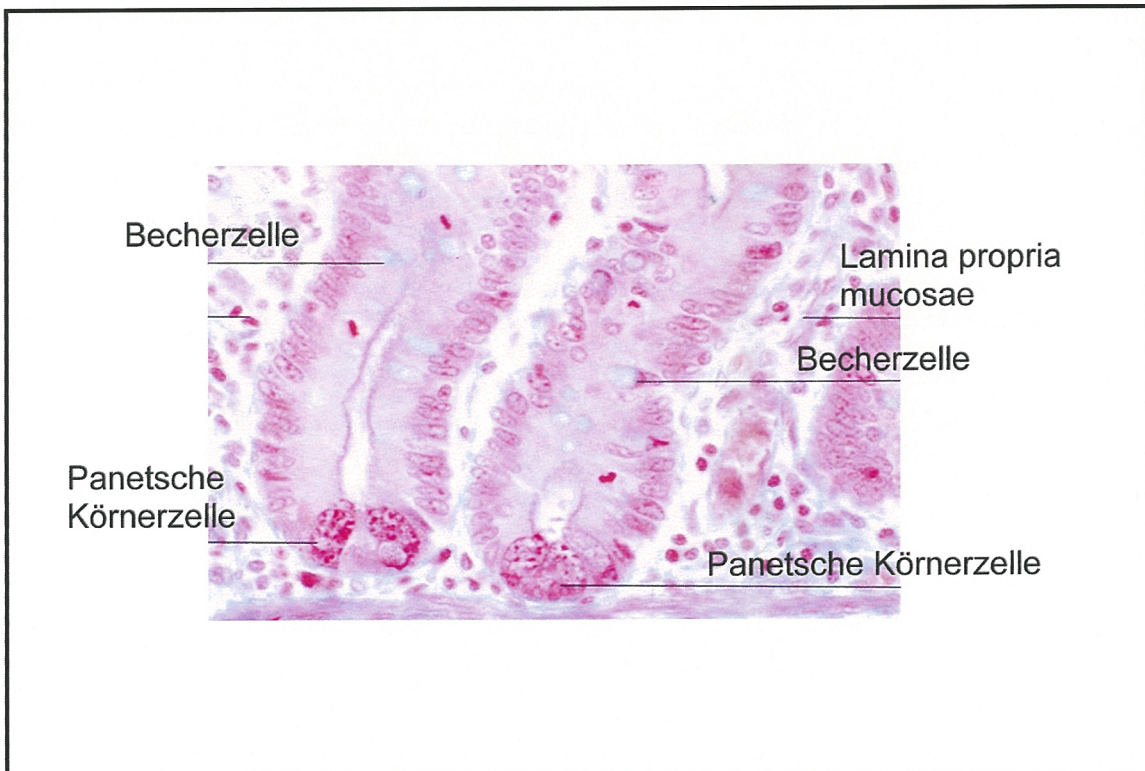


Abb.:9 Duodenum Paneth-Zellen Färbung: Azan 400x

1.6.3 Intermediärfilamente

Die für das Verständnis dieser Arbeit vorliegenden intrazellulären strukturellen Unterschiede basieren auf einer gewebsspezifischen Lokalisation der verschiedenen Subklassen von Zytokeratinen. Zytokeratine gehören zur ersten Klasse der Intermediärfilamente und besitzen ein Molekulargewicht zwischen 40-68 kDalton [18/S.72-73].

Die Hauptaufgabe der Intermediärenfilamente besteht in der Aufrechterhaltung der zellulären Stabilität bei mechanischer und thermischer Belastung, sowie die Verbindung epithelialer Schichten mittels Desmosomen.

Zytokeratinfilamente bilden die Tonofibrillen der Lichtmikroskopie.

Neben einer Aufgliederung in saures und basisches Keratin unterliegen die Zytokeratine, wie bereits oben erwähnt, einer regionenspezifischen Verteilung,

wobei die Zytokeratine CK 5/6 spezifisch in Plattenepithelien exprimiert werden und das Zytokeratin CK 20 spezifisch in intestinalen Epithelien vorkommt. Das CK 19 wird im gesamten Gastrointestinaltrakt gebildet und ist somit in der Mundschleimhaut als auch im Dünndarm vorhanden [18/S.72-73, 19/S.445-449, 20/S.62-63].

Mit diesem Wissen über die Anwesenheit bzw. Nachweisbarkeit von gewebsspezifischen Zytokeratinen ist es somit möglich diese beiden Gewebe histologisch zu unterscheiden.

1.6.4 Konventionelle Histologie

Da die meisten Gewebe eine einheitliche Dichte aufweisen und in der Regel farblos sind wurde die histologische Färbung eingeführt.

Sie dient dazu, unterschiedliche Gewebestandteile verschiedenartig anzufärben, so dass diese von einander differenziert werden können [18/S.17].

Dafür werden die Schnitte mit verschiedenen Farbstoffen angefärbt die entweder in einer gemeinsamen Lösung vorliegen (simultan) oder nacheinander auf das zu färbende Gewebe einwirken (sukzedan) [18/S.17].

Die Farbstoffe können an azidophile, basophile oder neutrale Strukturen binden, je nachdem ob ihre Farbmoleküle negativ (Elektronendonator > azidophil) oder positiv (Elektronenakzeptor > basophil) geladen sind.

Neutrale Strukturen sind ungeladen und binden azidophile sowie basophile Farbstoffe gleich gut. Allerdings wird die Färbung durch die Lipidlöslichkeit, die Teilchengröße der Farbmoleküle sowie der Strukturichte des Gewebes beeinflusst [18/S.18-19].

Zur Färbung der Schnitte wurde das Farbstoffgemisch Hämatoxylin/Eosin (HE-Färbung) verwendet. Basophile Zell- und Gewebestrukturen (z.B. Chromatin der Zellkerne, Knorpelgrundsubstanz) werden dadurch blau angefärbt. Alle azidophilen Gewebe (z.B. Zytoplasma, Kollagenfasern und die meisten Interzellulärsubstanzen) färben sich rot [18/S.18-19].

1.6.5 Immunhistochemie

1.6.5.1 Immunglobuline

Immunhistochemische Färbemethoden beruhen auf der Tatsache, dass Immunglobuline (Ig) an spezifischen Regionen (Epitop) eines Antigens binden.

Die Immunglobuline umfassen die 5 Hauptklassen Ig-G-A-M-D und E.

Sie bestehen aus jeweils 2 identischen schweren sowie 2 identischen leichten Ketten. Die leichten Ketten (light chains) sind entweder vom kappa (κ) oder lambda (λ) Typ [21/S.381-397, 22/S.5-6].

Da hier nur Antikörper der Immunglobulinklasse gamma (IgG) verwendet wurden wird nur auf deren Aufbau im Folgenden eingegangen.

Das IgG kann somit als $\text{gamma}_2\text{-kappa}_2$ oder $\text{gamma}_2\text{-lambda}_2$ aufgebaut sein und besitzt ein Molekulargewicht von 150 kDalton [21/S.395]. Des Weiteren kann der Antikörper in ein antigenbindendes Fragment (Fab) und in ein kristallines Fragment (Fc) unterteilt werden, wobei aber sowohl die schweren, als auch die leichten Ketten in ihrem Fab-Teil die variablen Domänen tragen, welche die Vielfalt der Antikörper widerspiegeln und deren Spezifität bestimmen [21/S.381-397].

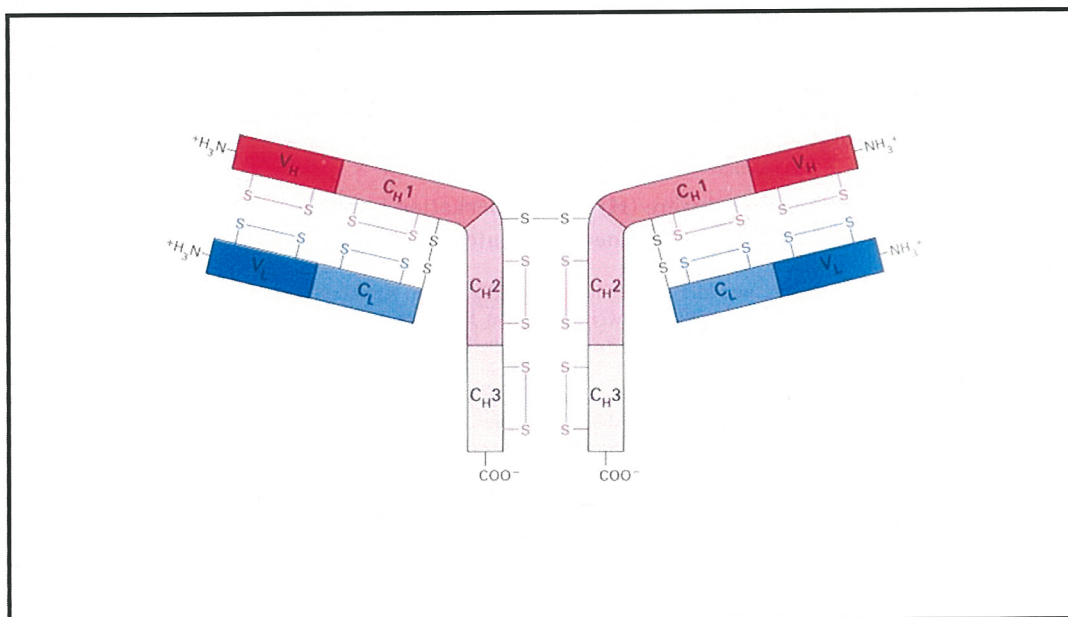


Abb.:10 Immunglobulin Klasse gamma (IgG)

1.6.5.2 Immunhistochemischer Nachweis

Im Folgenden werden einzelne Vorgänge der immunhistochemischen Färbung zum allgemeinen Verständnis des unter Punkt 2.3.4 aufgeführten Protokolls genauer dargelegt.

1.6.5.2.1 Hitzeinduziertes Epitop-Retrieval

Im Rahmen der Gewebefixierung mit Formalin zeigen Formalin sensitive Epitope eine Konformationsänderung ihrer dreidimensionalen Struktur. Verantwortlich für die Konformationsänderung vieler Epitope ist eine Formalin induzierte Quervernetzung innerhalb desselben Proteins (intramolekulare Cross-Links) sowie zwischen verschiedenen Proteinen (intermolekulare Cross-Links). Durch die Epitopdemaskierung kommt es zu einem partiellen oder vollständigen Verlust der antigenen Eigenschaften und eine ausbleibende Reaktion der Antikörper im immunhistochemischen Nachweis.

Um die so eingebüßten antigenen Eigenschaften wieder zu aktivieren, wurde eine Epitopdemaskierung durchgeführt [22/S.30-32], wofür die Proben in Citratpuffer 10 mM, 5 min bei pH 5,5 auf 95-99°C erhitzt wurden (hitzeinduziertes Epitop-Retrieval).

1.6.5.2.2 Nachweismethode

Die Färbungen wurden mit der Streptavidin-Biotin-Methode (LSABC) durchgeführt.

Nach der Epitopdemaskierung wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper (siehe Liste) inkubiert. Dieser bindet mit seinem Fab-Anteil an das für ihn spezifische Epitop.

Nach Entfernen des nicht gebundenen Primärantikörpers wird der biotinierte Sekundärantikörper hinzugefügt, welcher mit seinem Fab Anteil an das Fc Segment des Primärantikörpers bindet.

Der nicht gebundene und somit überschüssige Sekundärantikörper wird ebenfalls entfernt und das enzymmarkierte Streptavidin hinzugefügt.

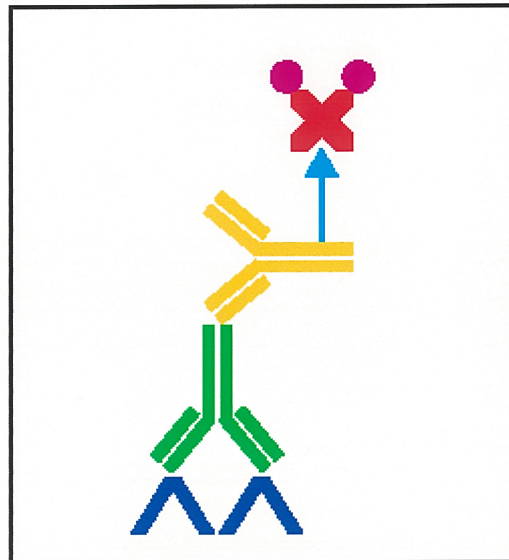


Abb.:11 LSAB Nachweismethode

(blau Epitop des Antigens, grün prim. Antikörper, orange sek. Antikörper, rot/violett enzymmarkiertes Streptavidin)

Anschließend wird der so entstandene Komplex mit einer Substrat-Chromogenlösung inkubiert bis die gewünschte Farbintensität entstanden ist. Als Chromogen wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet, das einen braunen Farbniederschlag bildet.

Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte durch eine Gegenfärbung mit Hämalun [22/S.20, 34-39].

2 Material und Methodik

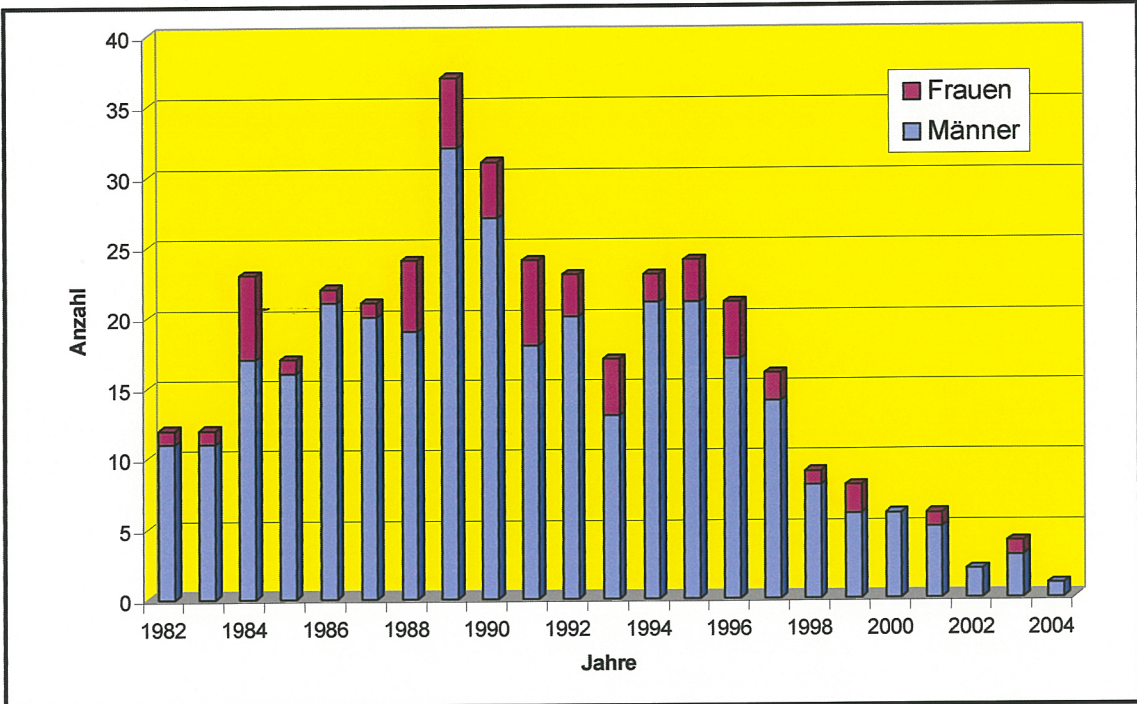
2.1 Patientenkollektiv

Die Erfassung der Daten der Patienten welche in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie in den Jahren von 1982 bis 2004 ein freies Jejunum Transplantat erhielten erfolgte unter Anderem mit Microsoft® Access™. Die Informationen wurden aus den Operationsprotokollen der Jahrgänge 1980-2004 entnommen, mit den Daten der klinikinternen Software Dampsoft® abgeglichen und gegebenenfalls aktualisiert.

The image shows a screenshot of a Microsoft Access data entry form with a dark blue background. The form contains various text boxes and checkboxes for patient data. The fields are arranged in a grid-like fashion. At the top left, there is a 'Patienten - ID' field with a green 'Auti' button next to it, and a 'Geschlecht' checkbox. Below this are 'Nachname' and 'Vorname' text boxes. To the right, there are 'Verstorben' and 'am' checkboxes, and a 'Straße' text box. Further down, there are 'Geburtsdatum', 'DDT - EX', 'Ort', 'PLZ', and 'Telefon' fields. A red 'Cave' button is located next to a text box. Below that are 'OP - Datum', 'Datum der Probenentnahme', 'Lokalisation der Biopsie', 'Liegedauer des Transplantates', 'präop. Raucher', 'postop. Raucher', 'IMH-Wert', 'zum Zeitpunkt der Biopsie (d)', 'Alter im OP Jahr', and 'zum Zeitpunkt des Todes (d)' fields. At the bottom, there is a large 'Diagnose' text box.

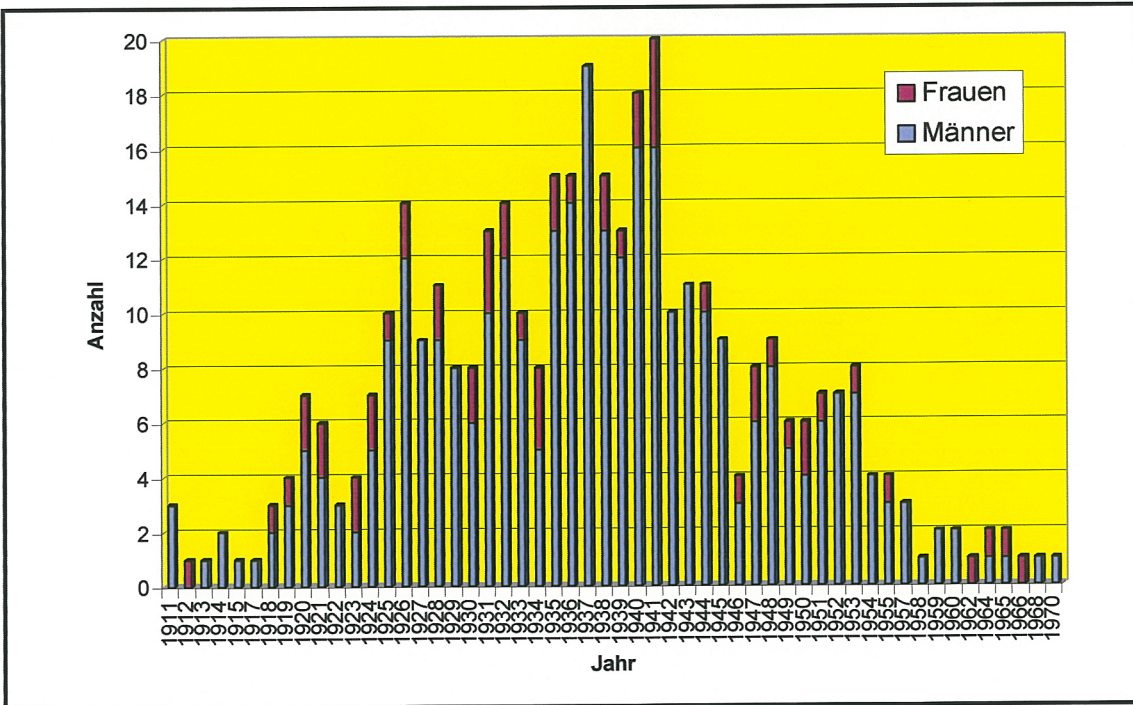
(Beispiel eines Formulars der Access Datenbank)

In den Jahren von 1982 bis 2004 wurden in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie insgesamt 383 Patienten mit einem freien Jejunum-transplantat versorgt, darunter waren 329 Männer und 54 Frauen.



Anzahl der Dünndarmtransplantationen von 1982-2004

Die Patienten stammten aus den Geburtsjahrgängen von 1911 bis 1970.



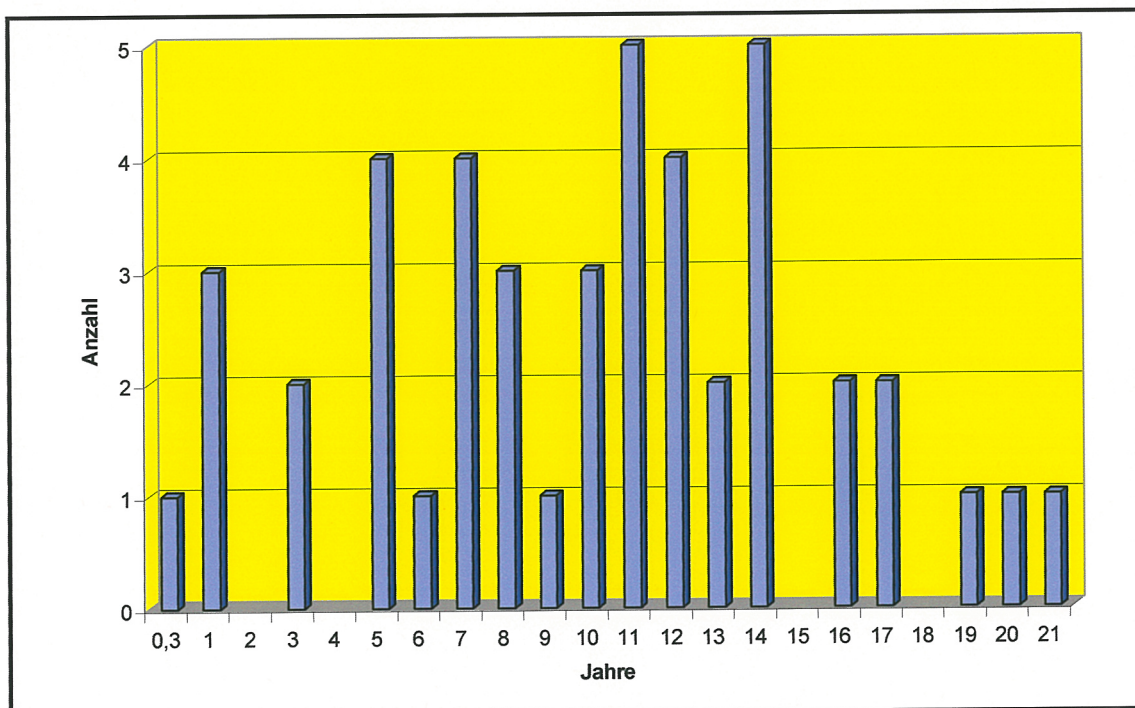
Anzahl der Patienten pro Geburtsjahrgang

Bei insgesamt 20 Patienten musste das Dünndarmtransplantat aufgrund von postoperativen Komplikationen wieder explantiert werden.

Die männlichen Patienten waren zum Zeitpunkt der Transplantation im Durchschnitt 53,4 Jahre (Standartabweichung $\pm 10,0$), die weiblichen Patienten 54,5 Jahre alt (Standartabweichung $\pm 11,5$).

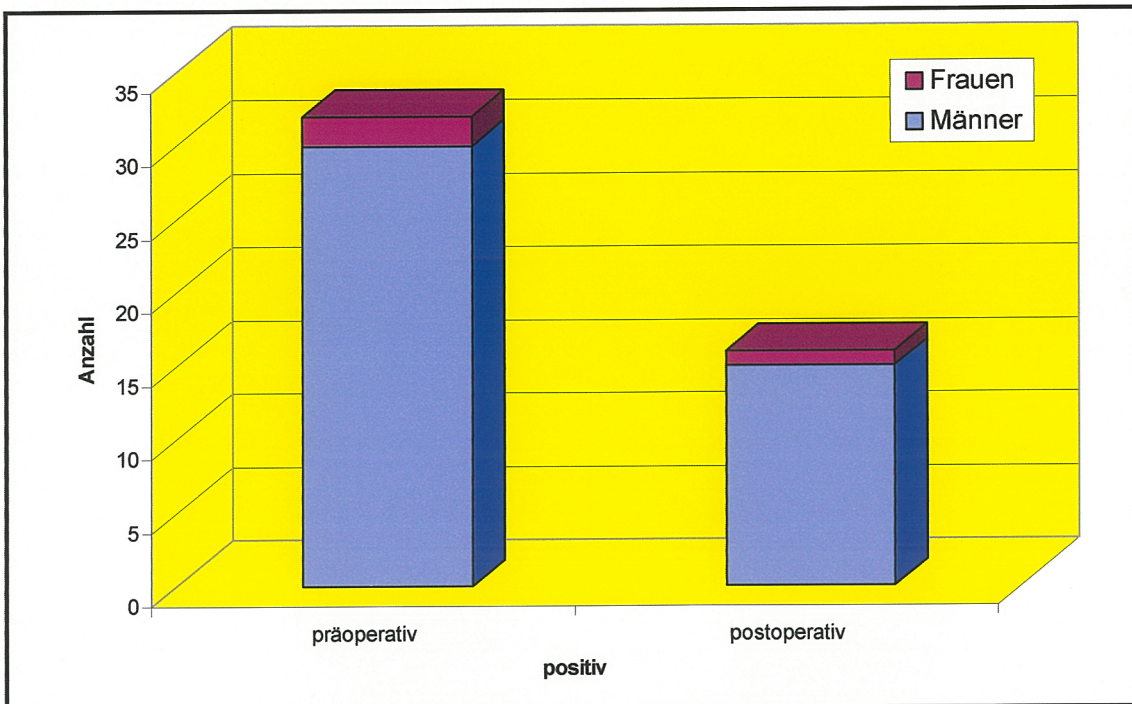
Von den 383 operierten Patienten konnten 74 Patienten als noch lebend ermittelt werden. Davon erklärten sich 43 Patienten (39 Männer und 4 Frauen) bereit, eine Biopsie im Übergangsbereich zwischen Transplantat und oraler Mukosa entnehmen zu lassen. 147 Patienten wurden bei uns im Tumorregister als verstorben geführt, von den restlichen 221 Patienten konnte postalisch keine Adresse ermittelt werden.

Die durchschnittliche Liegedauer der Transplantate bis zur Biopsie beträgt 10,1 Jahre (Standartabweichung $\pm 5,0$), wobei das längste 21 Jahre und das kürzeste 0,3 Jahre in situ war.



Liegedauer der Transplantate bis zur Biopsie

Insgesamt 32 Probanden waren Raucher, davon 30 Männer und 2 Frauen. Postoperativ hat sich die Zahl der Raucher exakt halbiert (also auf 15 Männer und 1 Frau).



Anzahl der Patienten die präoperativ und postoperativ zum Zeitpunkt der Befragung nikotinabhängig waren

Die mittlere Überlebenszeit unseres Patientengutes betrug bei einem T1 Tumorstadium 6,8 Jahre und bei einem T4 Tumorstadium 3,4 Jahre. Während über die Hälfte bei einem T1 Tumorstadium die ersten fünf Jahre überlebten schafften dieses bei einem T4 Tumorstadium nur knapp 10 %. Allerdings wurde hier nicht nach Tumorlokalisierung oder Tumorart unterschieden.

Tumorstadium	mittl. Überlebenszeit	Standartabweichung	Überlebensrate in %	
			5 Jahre	10 Jahre
	in Jahren			
T1	6,8	4,2	56,0	12,5
T2	7,7	6	26,7	35,6
T3	7,3	5,1	28,9	31,1
T4	3,4	3,9	10,2	15,3

Die fünf bzw. zehn Jahres Überlebensrate unseres Patientengutes in Abhängigkeit des Tumorstadiums

2.2 Probengewinnung

Die Proben wurden im Rahmen der allgemeinen Tumornachsorge in der Poliklinik für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie Würzburg entnommen.

Nach Abschluss der Nachsorgeuntersuchungen erfolgte die Probebiopsie unter Lokalanästhesie (UDS® Aventis).

Die Gewebeproben wurden durch eine spindelförmige Excision mittels Einmalskalpell (Klinge Nr.15) gewonnen und lagen genau im Übergangsbereich zwischen oraler Mukosa und Dünndarmtransplantat.

Die excidierten Gewebeproben waren im Mittel 0,3 cm² groß.

Der Verschluss erfolgte durch 2 Einzelknopfnähte (5/0 Seide) und die Nahtentfernung fand am siebten bis zehnten Tag postoperativ statt.

Die Gewebeproben wurden in Formalin aufbewahrt und an das Pathologische Institut der Universität Würzburg (Leitung: Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink) gesendet.

Von jedem Patienten wurde nur eine Gewebeprobe entnommen.

2.3 Histologische Aufbereitung

Die gesammelten Proben wurden wie oben dargestellt, einer konventionellen HE-Färbung, sowie einer Immunhistochemie unterzogen.

Im Folgenden werden nun die dabei verwendeten Materialien aufgelistet sowie der Ablauf der Probenaufbereitung besprochen, wobei die einzelnen Schritte und Materialien dem Routine Protokoll des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg (Leitung: Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink) entsprechen.

2.3.1 Verwendete Materialien

- * Shandon Histocentre 2
- * Mikrotom Leica SM 2000 R
- * Objektträger Glas 2,5 cm x 7,5 cm (bei Immunhisto Silan beschichtet)
- * Tissue Stainer TST 40
- * Tissue-Tek SCA
- * Dampfdrucktopf
- * Coverblades von Shandon
- * Genesis RSP 200 Tecan
- * Färbekit Histostain-Plus von Zymed
- * Leitungswasser
- * Xylol
- * Methylbenzoat
- * Benzol
- * Formalin (gesättigte Lösung 37 Vol% Formaldehydgas in Wasser 1:10)
- * Paraffin
- * Xylol
- * HE Färbung (Hämatoxylin/Eosin)
- * Citratpuffer CS Citronensäure 10mM pH 5,5
- * Blocking Reagenz
- * prim. Antikörper

* PBS Phosphatpuffer

(14,8g Na₂HPO₄ / 72g NaCl / 4,3 g KH₂PO₄) in 10 L bei pH 7,4

* sek. Antikörper (biotinyliert)

* Streptavidin POX

* DAB (3,3'-Diaminobenzidin) von Sigma

* Häkalaun

(6g Hämatoxilin / 1g Natriumjodat / 250g Kaliumaluminiumsulfat /
230g Chloralhydrat / 5g Citronensäure) in 5000 ml Aqua dest.

Primär- Antikörper	Markiert	Bezugsfirma	Chargen- Nummer
CK 5/6	spezifisch Plattenepithel	DAKO	M 7237
CK 20	intestinales Epithel	DAKO	M 7019
CK 19	gastrointestinales Epithel	DAKO	M 0772
CD 34	Endothel	DAKO	M 7165
CD 4	Helfer-T-Zellen	DAKO	M 7103
α-Aktin	alpha-Aktin	Beckmann- Coulter	IM 1144

2.3.2 Konventionelle Histologie

Die Proben wurden im Pathologischen Institut der Universität Würzburg (Leitung: Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink) über Nacht in Formalin fixiert.

Die Fixierung diente der Härtung als auch die Konservierung und wurde als Immersionsfixierung mit einem Proteinkoagulator (gesättigte Lösung 37 Vol% Formaldehydgas in Wasser 1:10) durchgeführt.

Zum Schneiden der Proben erfolgte die Einbettung der Proben in Paraffin (Shandon Histocentre 2).

Da Paraffin nicht wasserlöslich ist, erfolgten folgende Zwischenschritte:

- Zum Entwässern wurde das Fixierungsmittel aus den Proben mit Leitungswasser herausgewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils fünf Minuten (70% > 80% > 90% > 100%) durch Xylol ersetzt
- Für die Aufhellung und als Ersatz von Alkohol durch ein Paraffinlösungsmittel wurde das Gewebe zuerst mit Methylbenzoat und anschließend mit Benzol versetzt.
- Anschließend erfolgte das Einbetten in flüssigem Paraffin (Schmelzpunkt 58-60°C)

Die Paraffinblöcke wurden tiefgekühlt und mit dem Mikrotom (Leica SM 2000 R) zu ca. ein bis zwei µm dicken Scheiben geschnitten. Diese wurden dann im Wasserbad auf die Objektträger (Glas 2,5 x 7,5 cm) aufgebracht und mit Hilfe einer Wärmeplatte geglättet.

Vor dem Färben erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100% > 90% > 80% > 70%) für jeweils fünf Minuten.

Die Hämatoxilin/Eosin Färbung der Schnitte erfolgte vollautomatisch im Tissue Stainer TST 40 und die Eindeckung wurde im Tissue-Tek SCA vorgenommen.

2.3.4 Immunhistochemie

Im Allgemeinen ähnelt das Vorbereiten der Proben für die Immunhistochemie dem für die konventionelle Histologie.

Die Proben wurden ebenfalls über Nacht in Formalin fixiert und im Histocentre 2 von Shandon mit den oben bereits erwähnten Zwischenschritten in Paraffin eingebettet. Die Anfertigung der einzelnen Schnitte wurde ebenfalls mit dem Mikrotom SM 2000 R der Firma Leica durchgeführt. Die Proben wurden ebenfalls mit Hilfe eines Wasserbades auf die Objektträger aufgezogen.

Der Unterschied beim Aufziehen der Schnitte auf die Objektträger für die Immunhistochemie besteht darin, dass diese silanbeschichtet sind. Dadurch wird zwar einerseits ein Abschwimmen der Schnitte beim Färbevorgang verhindert, allerdings können die Schnitte auf der Wärmeplatte nicht mehr geglättet werden.

Durchführung, bzw. Vorbereitung der Proben für die Immunhistochemie:

Die mit dem Probenmaterial beschichteten Objektträger müssen über Nacht bei Raumtemperatur trocknen.

Anschließend erfolgt die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte in absteigender Alkoholreihe (100% > 90% > 80% > 70%) für jeweils fünf Minuten. Die Proben wurden im Dampfdrucktopf für 22 Minuten mit Citratpuffer (CS Citronensäure 10 mMolar) bei pH 5,5 auf 95°C - 99°C erhitzt (Epitop-demaskierung).

Die Schnitte werden mit Leitungswasser abgekühlt, anschließend in PBS (Phosphatpuffer) überführt und mit Deckgläsern von Shandon eingedeckt.

Die Färbung erfolgt im Färbeautomaten Genesis RSP 200 der Firma Tecan mit dem Färbekit Histostain-Plus von Zymed.

Im Folgenden werden nun die einzelnen Schritte der im Färbeautomaten ablaufenden Immunhistochemie chronologisch aufgeführt. Eine ausführlichere Beschreibung der hier aufgeführten Schritte ist unter Punkt 1.6.5.2 nachzulesen.

- 15 min Blocking Reagenz
- Primär AK 1 h
- Spülen mit PBS pH 7,4
- Biotinierter sek. AK 20 min.
- Spülen mit PBS9
- Streptavidin POX 20 min.
- Spülen mit PBS pH 7,4
- Färben mit DAB
- Gegenfärben mit Häkalaun

3. Ergebnisse

Die Schnitte wurden wie oben beschrieben mit Hämatoxylin/Eosin (konventionelle Histologie) oder mit DAB (Immunhistochemie) gefärbt, lichtmikroskopisch ausgewertet und selektiv für diese Arbeit photographiert.

Auf der linken Seite der nachfolgenden histologischen Schnitte ist mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel der Mundschleimhaut und rechts das transplantierte Jejunumsegment zu sehen.

3.1 Immunhistochemische Auswertung

Bei positivem Nachweis des gesuchten Antigens kommt es durch die Färbung mit DAB zu einem braunen Niederschlag.

Für eine bessere Anschauung wurden Schnitte eines Patienten verwendet, wobei sich das Jejunumtransplantat zum Zeitpunkt der Biopsie 11,4 Jahre in situ befand.

Je weiter man der Basalmembran in Richtung Dünndarmtransplantat folgt, umso mehr verliert sich das Stratum papillare der Dermis und wird durch ein kollagenfasereiches Bindegewebe ersetzt.

Während sich die Lamina propria mucosae scharf von der Epidermis abgrenzt kommt es im Bereich der Gewebsgrenzen, zwischen Dermis und Tela submucosa zur Vereinigung und Ausbildung eines kollagenfasereichen narbigen Bindegewebes, welches mit einem schütterem lymphozytären Infiltrat durchzogen ist. Auch erscheint das Stratum spinosum im Bereich der Gewebegrenze verbreitert.

Im Bereich des Dünndarms imponiert ein abgeflachtes Zottenrelief mit verringerter Anzahl von intestinalen Krypten.

Ebenfalls lässt sich eine numerische Atrophie der Becherzellen im Bereich der Dünndarmzotten erkennen, während ihre Anzahl im Bereich der Krypten unverändert erscheint. (Siehe Bild 1-3)

Bild 1 Pat. W.F. / Färbung: H/E 20-fach

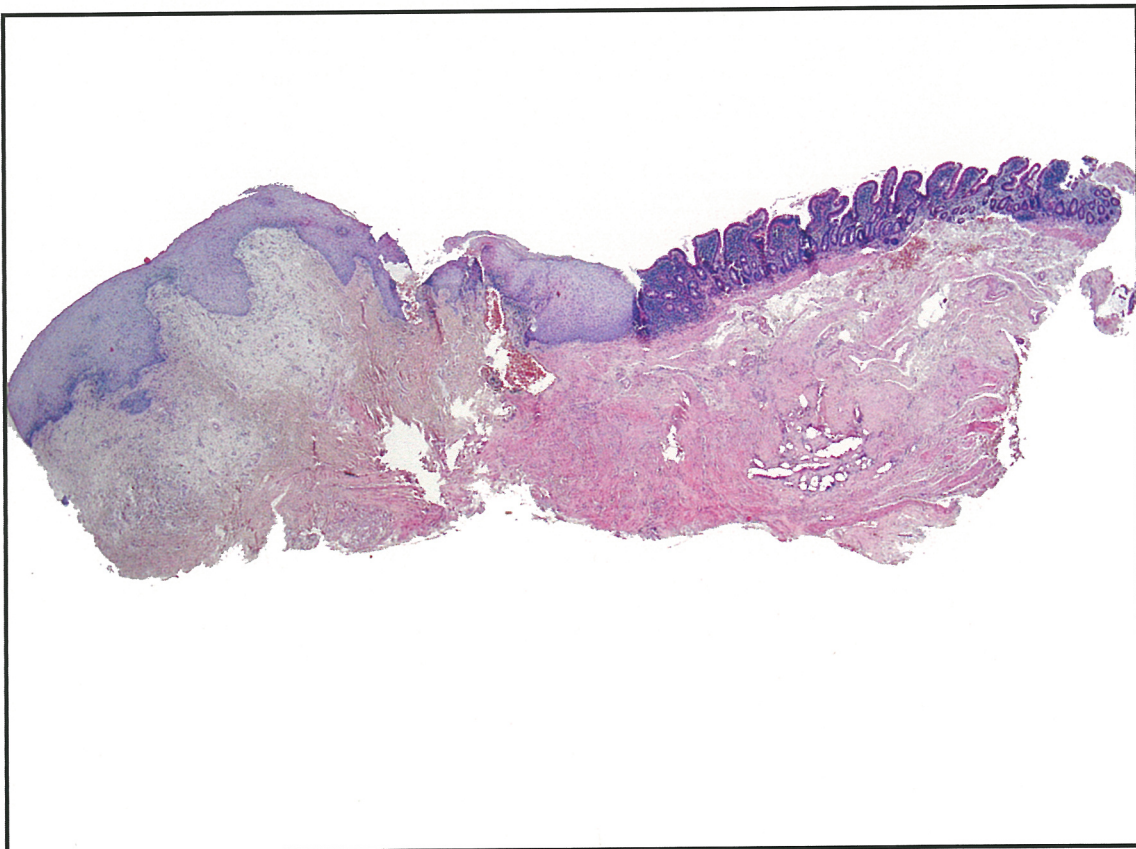


Bild 2 Pat. W.F. / Färbung: H/E 40-fach

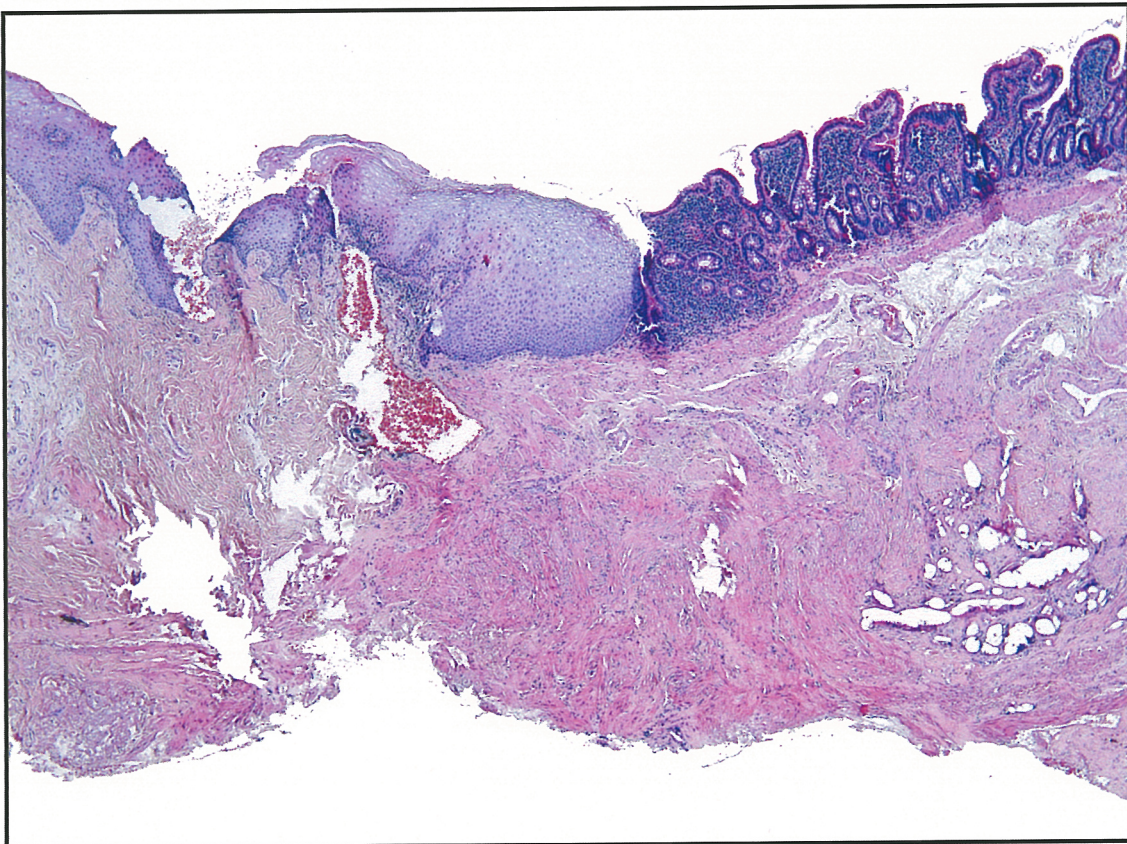
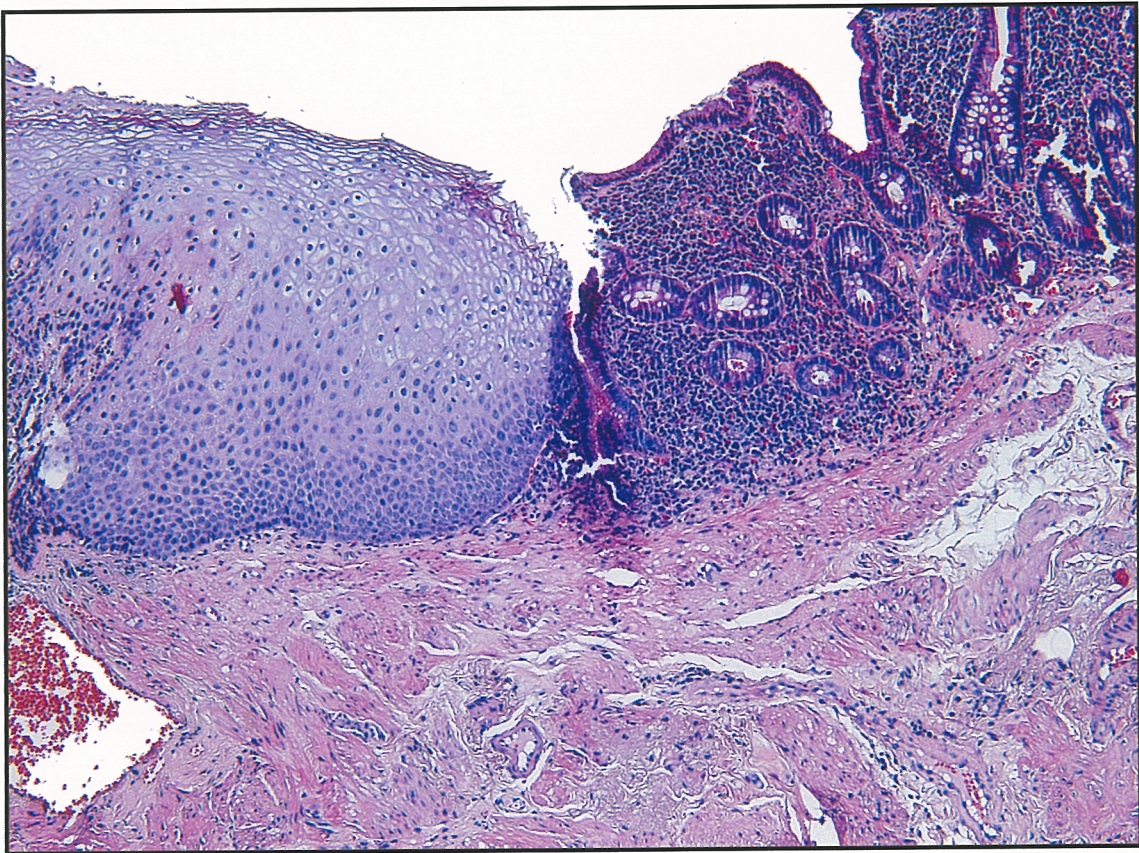


Bild 3 Pat. W.F. / Färbung: H/E 100-fach

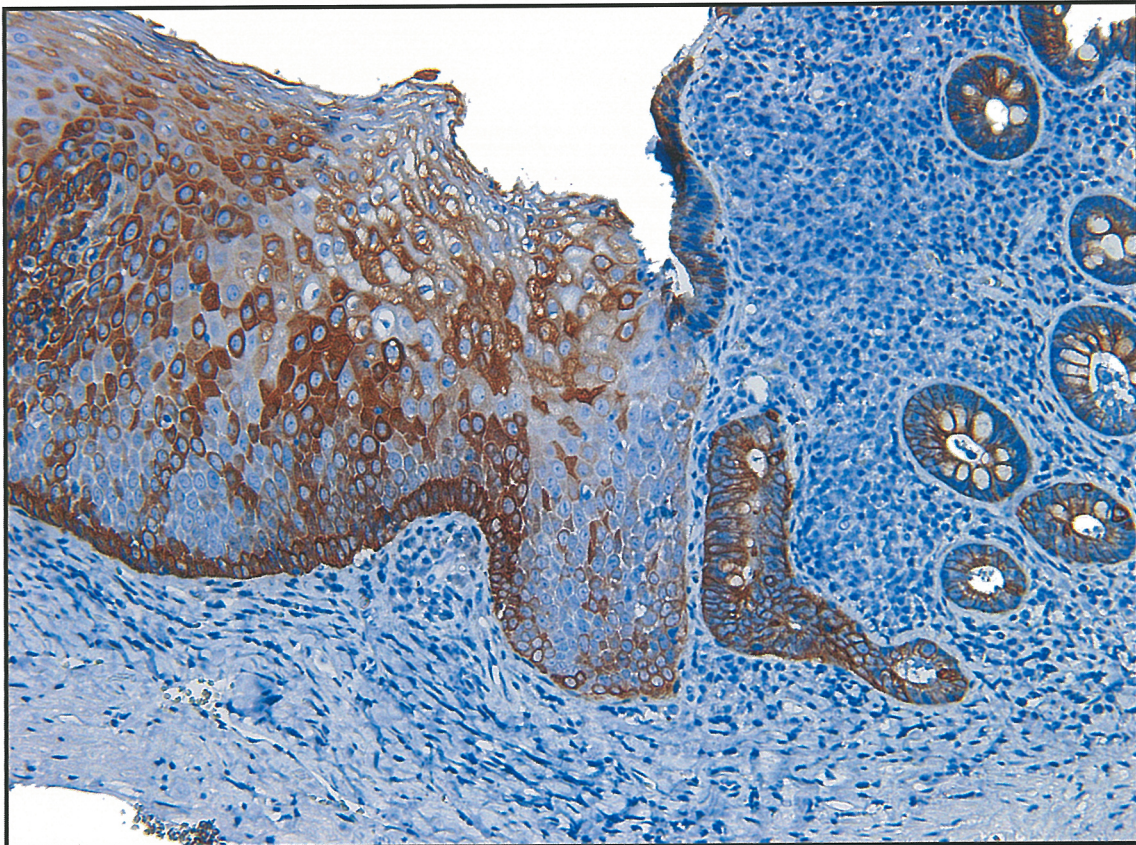


In Bild 4 wurde das Zytokeratin 19 dargestellt, welches in gastrointestinalen Epithelen vorliegt.

Dementsprechend stellt sich sowohl das Epithel der Mundschleimhaut, sowie das Dünndarmepithel CK 19 positiv dar.

Das Epithel der Mundschleimhaut endet abrupt und stellt sich scharf begrenzt gegenüber der Lamina propria mucosae des Dünndarmtransplantates dar.

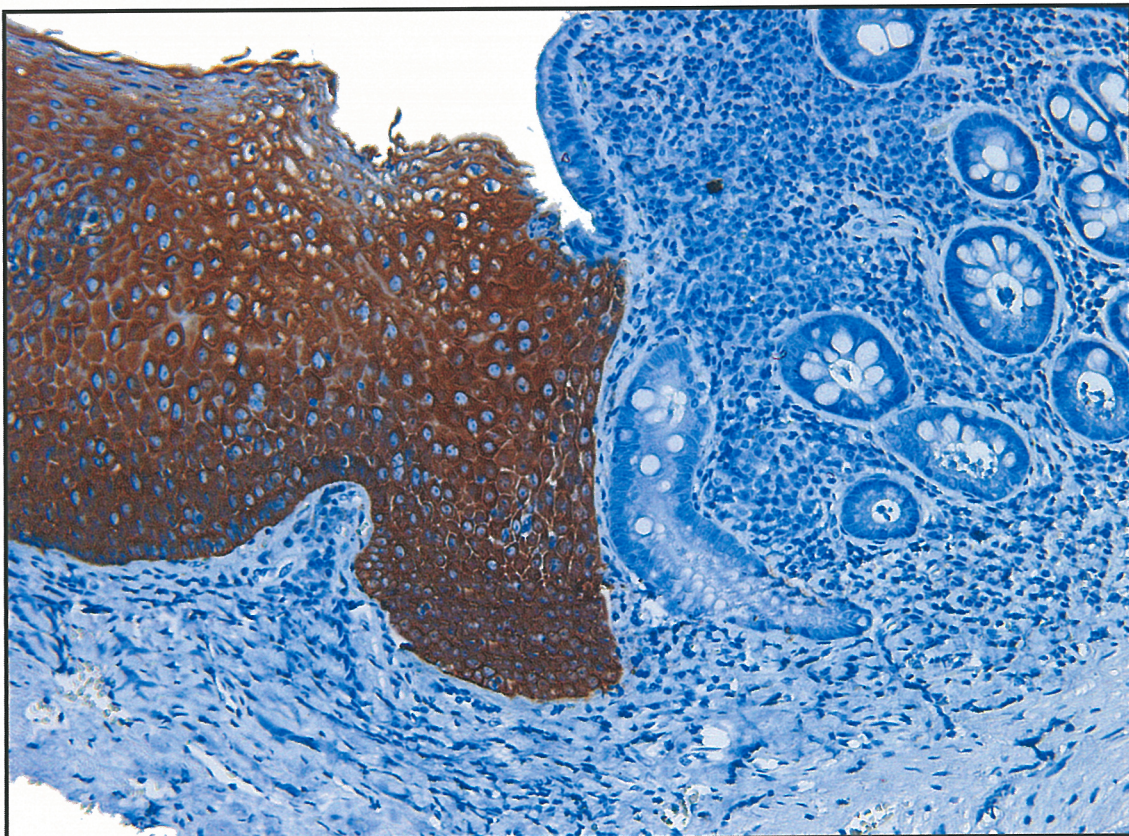
Bild 4 Pat. W.F. / Färbung: CK 19 200-fach



In Bild 5 wurden die Zytokeratine 5/6 markiert, welche spezifisch in Plattenepithel gebildet werden, wobei eine positive Anfärbung der Zellen im linken Bereich des Präparates (Mundschleimhaut) vorliegt.

Der rechte Bereich des Präparates (Dünndarm) stellt sich ausnahmslos negativ dar. Die epitheliale Grenze zwischen den beiden Gewebearten ist im Bereich von Zelle zu Zelle mauerartig scharf gezeichnet. Es lässt sich weder eine Zone der Zellmetaplasie noch ein Bereich des gegenseitigen Überwachsens erkennen.

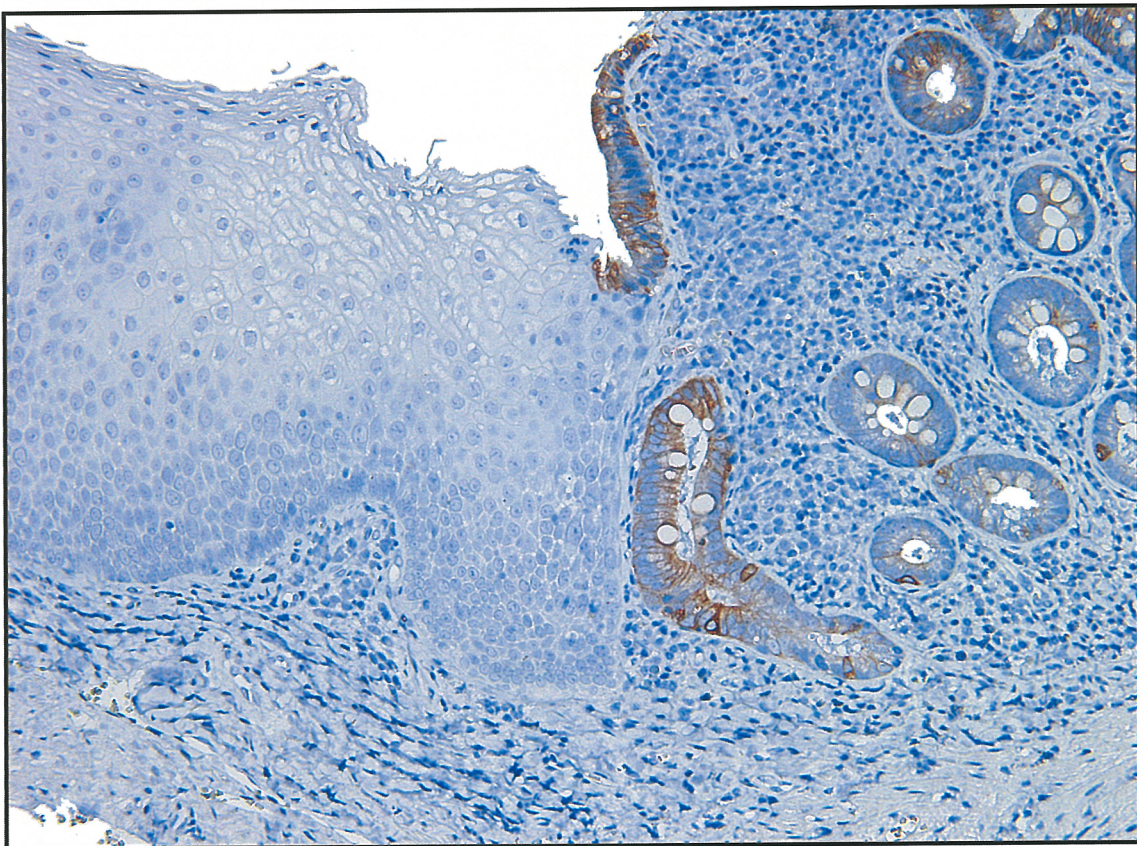
Bild 5 Pat. W.F. / Färbung: CK 5/6 200-fach



In Bild 6 wurde das Zytokeratin 20 markiert, welches spezifisch für intestinale Epithelien ist.

Zu erkennen ist eine deutliche positive Färbung der Dünndarmepithelien im Bereich der abgeflachten Zotten und Krypten, während sich das Epithel der Mundschleimhaut sich CK 20 negativ darstellt.

Bild 6 Pat. W.F. / Färbung: CK 20 200-fach



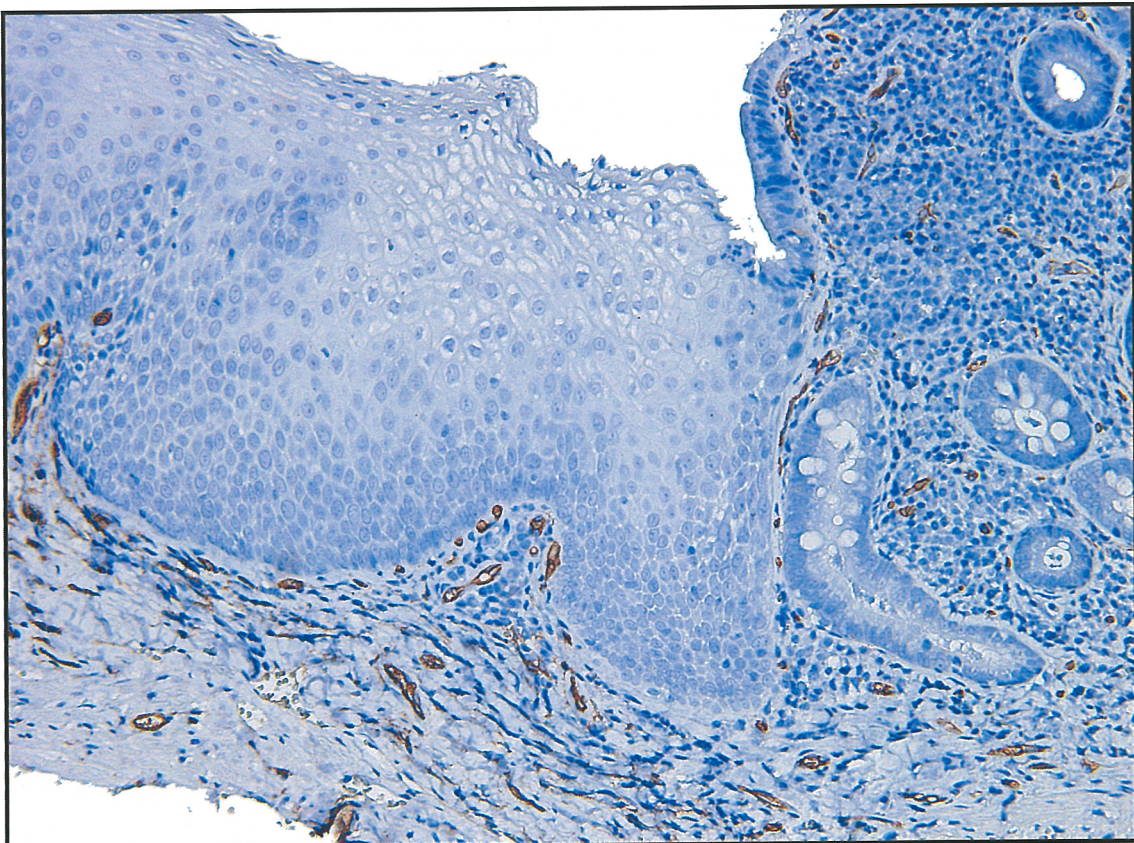
In Bild 7 erfolgte die Darstellung von Endothelzellen mittels Anfärbung von CD 34 (Clusters of differentiation).

Man sieht eine deutliche Gefäßeinsprossung subepidermal, welche die Basalmembran aber nicht überschreitet.

Ebenfalls lassen sich kleinere Gefäße im Bereich des Dünndarmtransplantates darstellen, die aber in ihrer Anzahl gegenüber regulärer Dünndarmschleimhaut reduziert sind. Auffallend ist der Grenzbereich zwischen Epidermis und Lamina propria mucosae.

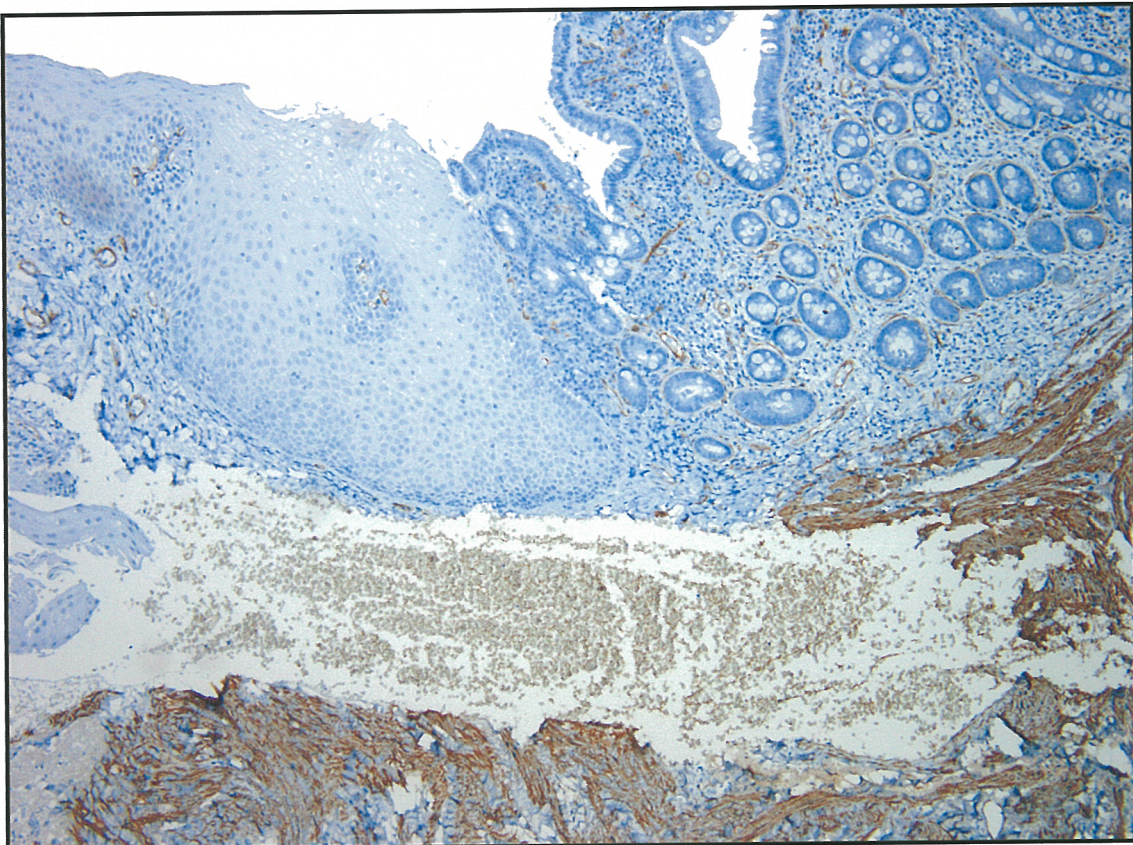
Die Gefäße verlaufen exakt an der Grenze, auf Seiten des Jejunumtransplantates, ohne Ausläufer in die Epidermis auszubilden.

Bild 7 Pat. W.F. / Färbung: CD 34 200-fach



In Bild 8 wurde das α -Aktin gefärbt welches in Muskelzellen vorkommt. Man sieht am rechten Bildrand die angefärbte Lamina muscularis mucosae. Ebenso sind über den gesamten Schnitt verteilte Myoepithelien zu sehen.

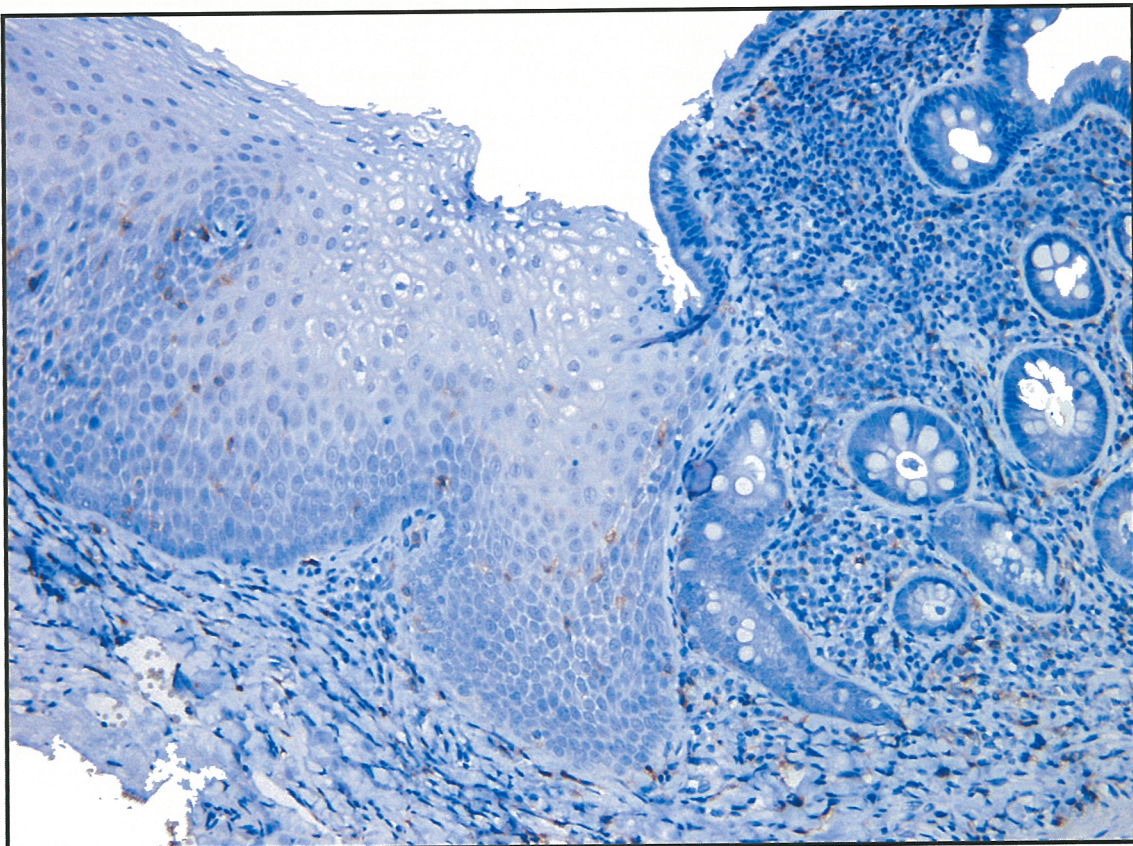
Bild 8 Pat. W.F. / Färbung: Aktin 200-fach



In Bild 9 erfolgte die Darstellung von Helfer-T-Zellen mittels Anfärbung von CD 4.

Man sieht vereinzelte CD 4 positive Zellen im Bereich der Dermis und Epidermis sowie im Jejunumtransplantat. Es ergibt sich damit kein Hinweis auf eine stärkere Entzündung im Bereich der Narbe.

Bild 9 Pat. W.F. / Färbung: CD 4 200-fach



3.2 Vergleichende Histologie bei unterschiedlicher Liegedauer

Mit zunehmender Liegedauer der Transplantate lässt sich eine Abflachung der Zotten feststellen. Während in Bild zehn und elf noch relativ viele schlanke Zotten vorhanden sind wird die Basis der Zotten im Laufe der Zeit immer breiter (siehe Bilder 12-14).

Während bei Bild 14 auch noch nach langer Liegedauer relativ viele Krypten vorhanden sind, ist in Bild zwölf keine einzige mehr im Bereich der Grenze zu erkennen.

Auch ist am Anfang subepithelial ein entzündliches Granulationsgewebe zu erkennen (Bild 10,11), welches im Laufe der Zeit durch ein kollagenfasereiches Bindegewebe narbig ersetzt wird (Bild 12,13,14).

Bild 10 Pat. J.S. / 0,3 Jahre in situ / Färbung: H/E 100-fach

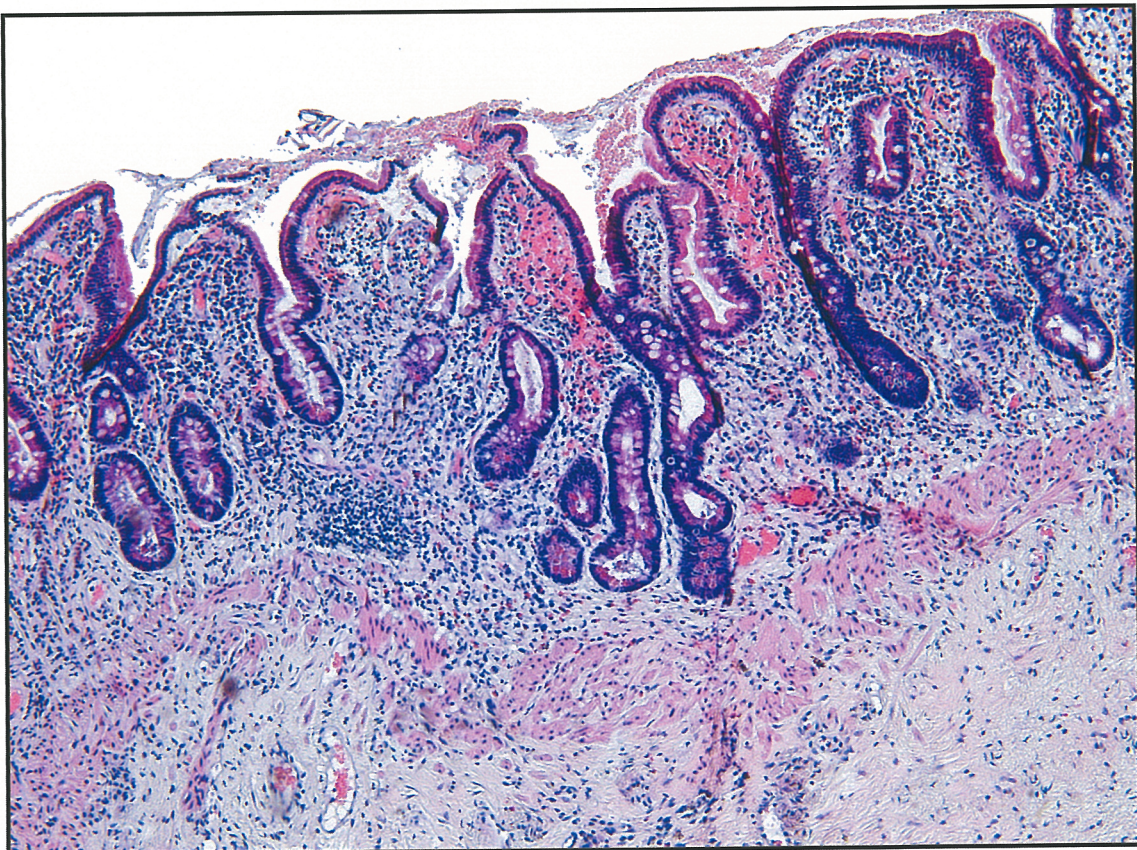


Bild 11 Pat. N.F. / 1,3 Jahre in situ / Färbung: H/E 100-fach

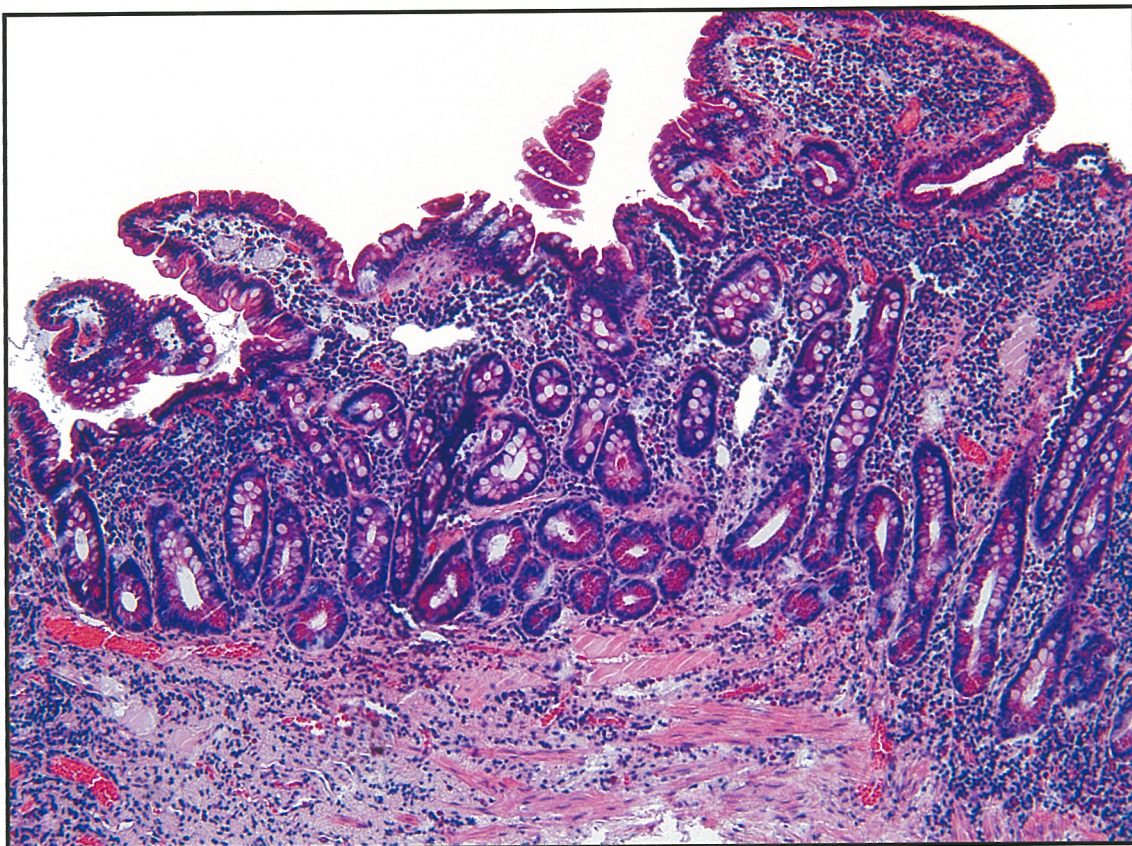


Bild 12 Pat. H.S. / 5 Jahre in situ / Färbung: H/E 100-fach

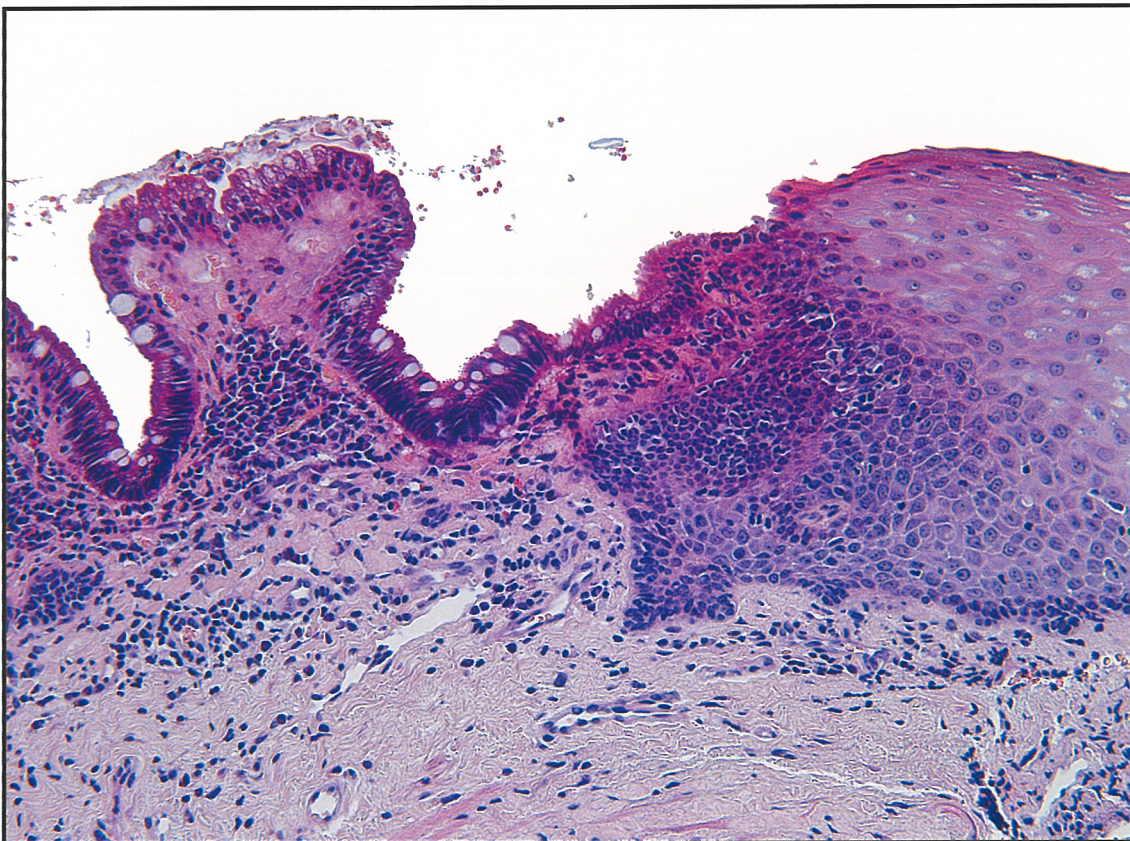


Bild 13 Pat. W.F. / 11,4 Jahre in situ / Färbung: H/E 100-fach

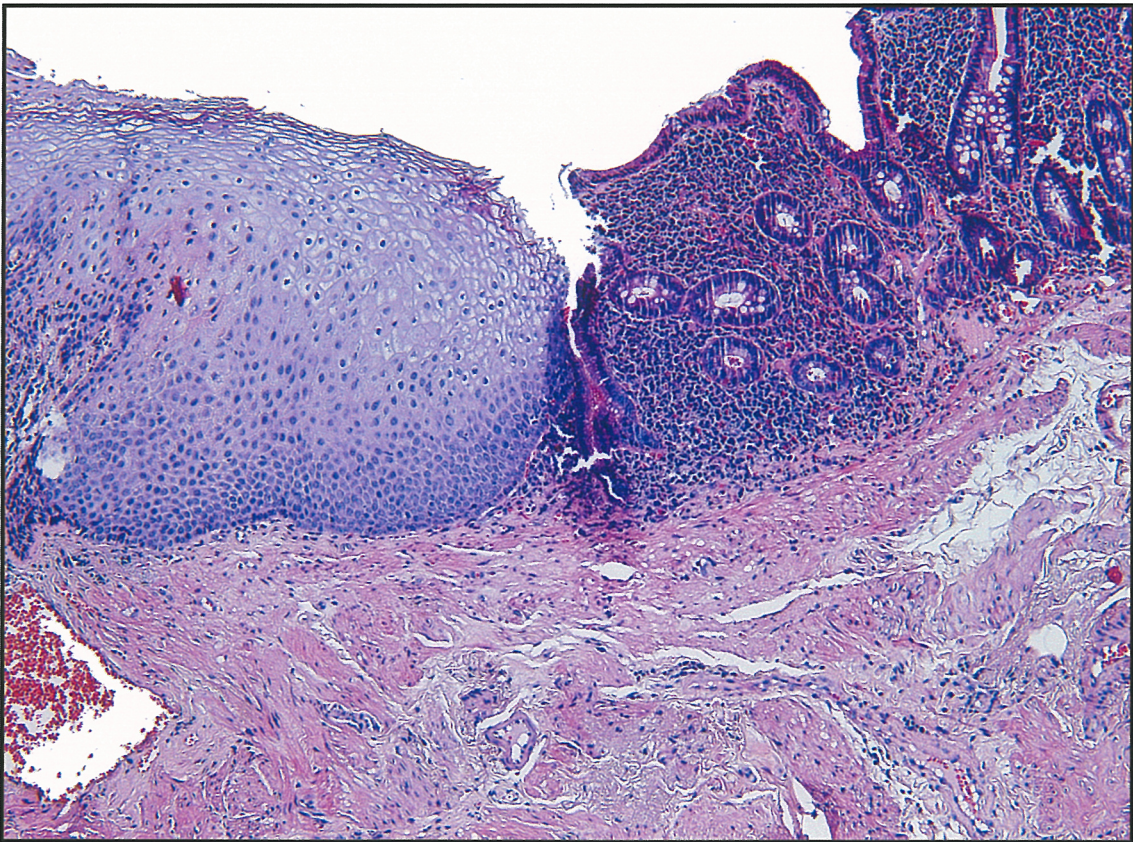
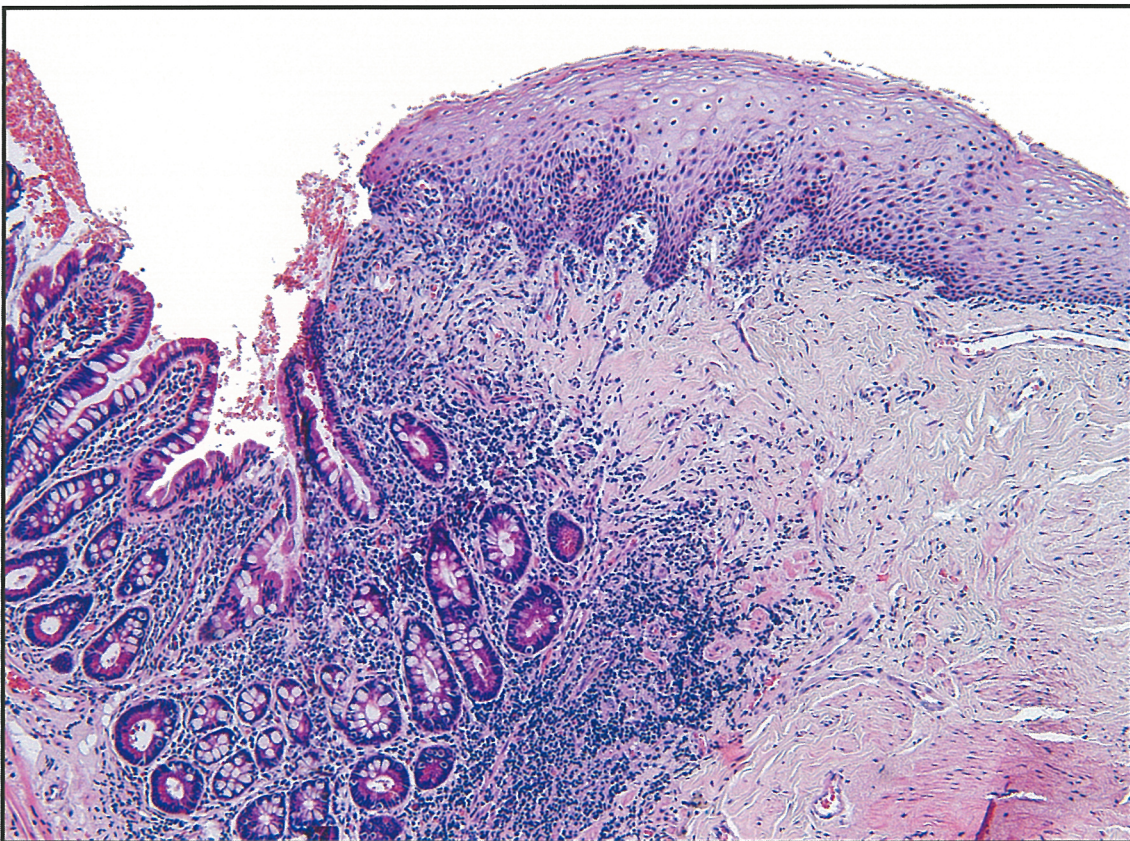


Bild 14 Pat. F.S. / 20,4 Jahre in situ / Färbung: H/E 100-fach



4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die sich ausbildenden Grenzstrukturen unter besonderer Berücksichtigung der epithelialen Gewebegrenzen, zwischen dem freien Jejunumtransplantat und der Mundschleimhaut immunhistochemisch untersucht.

Es existiert in der Literatur keine vergleichbare Studie, in der über einen so langen Zeitraum, von bis zu 21,3 Jahren eine derart umfangreiche Probe von 43 freien Jejunumtransplantaten histologisch nachuntersucht wurde unter der Berücksichtigung der Ausdehnung der Gewebegrenzen.

Die aktuellste Arbeit zum Thema freies Jejunumtransplantat stammt von KERMER C. et al. 2004 [26]. Diese Arbeit setzt sich aber, wie die Mehrzahl der anderen Arbeiten nur mit der Technik der Transplantation auseinander und der Präsentation von Behandlungsfällen.

Eine Ausnahme bildet die Arbeit von MILLESI W. et al. 2001 [27] in welcher mittels immunhistochemische Färbungen immunkompetente Zellen in transplantiertem Dünndarm untersucht wurden. Die Proben wurden sowohl intra-, als auch postoperativ (nach zwei, vier und sechs Monaten) entnommen. Die Studie kam zu dem Ergebnis dass das freie Jejunumtransplantat durch seine eigenen immunologischen Fähigkeiten die Abwehrfunktion des neuen Milieus unterstützt.

In der Poliklinik für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie Würzburg wurden histologische Untersuchungen an sechs Bastardhunden [2] bereits im Jahre 1983 und im Jahre 1990 ebenfalls eine klinische Studie von REUTHER et al. [28] durchgeführt.

Die Studien von REICHART et al. aus den Jahren 1984 [30] und 1990 [29] werden insbesondere für einen Vergleich herangezogen da zu diesen Arbeiten die meisten Parallelen bestehen.

Die von REUTHER [28] und REICHART [29, 30] beschriebene Abflachung des Zottenreliefs mit Atrophie der Becherzellen konnte von uns bestätigt werden, wobei aber von Patient zu Patient relativ große Unterschiede auftreten.

Während das Jejunumtransplantat nach unseren Erfahrungen makroskopisch eine glatte, glänzende Oberfläche besitzt die ein einheitliches geschlossenes Deckepithel vermuten lässt und auf den ersten Blick nur durch seine andere Farbe auffällt, lassen sich histologisch verschiedene Ausprägungen des Zottenreliefs bestimmen. So gibt es Präparate die nach einer mittlerer Liegedauer von fünf Jahren (Bild 12) nur noch vereinzelt sehr breitbasig gestielte Zotten aufweisen und andere obwohl schon bis zu 20 Jahren in situ (Bild 14) zwar ein abgeflachtes aber dennoch intaktes Zottenrelief mit Krypten präsentieren.

Allerdings lässt sich kein gemeinsamer Faktor, wie z.B. etwa das Rauchen oder erhöhte Belastung durch prothetische Rekonstruktionen für diese Unterschiede bestimmen.

Ein Über- oder Unterwachsen des Dünndarmes durch orale Mukosa wie es REUTHER bei seinen Bastardhunden 1983 und in seinem Artikel von 1990 [28, 2] beschrieben hat, konnte von uns nicht festgestellt werden. Auch eine Verwischung der Grenzen zwischen Platten- und Zylinderepithel im postoperativen Verlauf sowie ein Ersatz bzw. eine Umwandlung des Zylinderepithels durch eine zungenförmig, fortschreitende, plattenepitheliale Umwandlung, oder durch direkte Metaplasie in Plattenepithel [2] kann mit den Ergebnissen dieser Studie nicht bestätigt werden. Unsere Ergebnisse bezüglich einer ausbleibenden Metaplasie des Plattenepithels werden auch durch die Studie von REICHART et al. aus dem Jahre 1984 bestätigt [30].

In allen Schnitten wurde eine klare Abgrenzung zwischen Plattenepithel und Dünndarmtransplantat gefunden und zwar unabhängig von der Länge der Liegezeit der Transplantate (Bild 12 fünf Jahre, Bilder 4-6 11,4 Jahre). Das Dünndarmtransplantat stellte sich für CK 5/6 völlig negativ da, wir können aufgrund dessen die von REUTHER postulierte Umwandlung durch Metaplasie [2] nicht nachvollziehen, denn im Falle einer Metaplasie müssten sich im Dünndarm sowohl Zellen nachweisen lassen die CK 5/6 positiv sind. Auch sollten als Zeichen einer schrittweisen Epithelumwandlung Zellen vorhanden

sein die sowohl auf CK 5/6, sowie auf CK 20 einen positiven Farbnachweis erbringen.

Der von REICHART et al. 1984 beschriebene Einschluss von Darmepithel im ortständigen Plattenepithel [30], sowie die von Reichart et al. 1990 beobachtete Transformation [29] konnte durch die Ergebnisse dieser Studie nicht bestätigt werden.

In den Schnitten in denen CK 5/6 angefärbt wurde stellt sich der Dünndarm negativ dar, es lassen sich weder Transformationszonen im Übergangsbereich noch Zellcluster von CK 5/6 positiven Zellen im Dünndarm erkennen.

Es kommt zu einer Ausbildung einer scharfen Grenze zwischen den Geweben, die im Bereich von Zelle zu Zelle nachvollzogen werden kann und von Endothelzellen respektiert wird.

Subepithelial zeigte sich anfangs ein entzündliches Granulationsgewebe welches jedoch im Laufe der Zeit durch kollagenreiches Bindegewebe ersetzt wird. In späteren Schnitten konnte wie auch von REICHART [29] bestätigt keine entzündlich bedingte Gefäßproliferation erkannt werden und die nachweisbaren CD 4 positiven Entzündungszellen waren nicht über das gewöhnliche Ausmaß vermehrt.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass das transplantierte Jejunumsegment zwar eine morphologische Veränderung im Rahmen von Zottendysplasie und numerischer Becherzellatrophy erfährt, aber in keiner Weise einer Zelltransformation im Rahmen einer Metaplasie unterliegt.

5. Zusammenfassung

In vorliegender Studie wurde an histologischen Präparaten mittels immunhistochemischen Färbungen der Übergangsbereich zwischen oraler Mukosa und transplantiertem Jejunumsegment untersucht. Mit der Fragestellung ob sich die Strukturen im Übergangsbereich zwischen freiem Jejunumtransplantat und oraler Mukosa funktionell verändern und ob die Dünndarmepithelien einer morphologischen Umwandlung unterliegen.

Zu diesem Zweck wurden die Gewebeschnitte nach der LSABC Methode mit verschiedenen Antikörpern markiert die spezifisch das zu bestimmende Epithel anfärbten. Die Differenzierung der Epithelien erfolgte durch für jede Epithelart spezifische Zytokeratine. Nachgewiesen wurde eine Abflachung des Zottenreliefs sowie eine numerische Becherzellatrophie. In unseren histologisch nachuntersuchten Gewebeproben stellte sich die Grenze zwischen transplantiertem Jejunumsegment und mehrschichtigem Plattenepithel exakt und scharf begrenzt dar. Weder Zellcluster von mehrschichtigem Plattenepithel im Bereich des Dünndarms, noch eine Transformationszone, wie sie bei Zellmetaplasie vorkommt konnte nachgewiesen werden. Auch hielten die dünndarmeigenen Gefäße die Grenze zwischen den beiden Geweben strikt ein und verliefen ebenso scharf begrenzt. Subepithelial zeigte sich zwar zu Beginn eine entzündlich bedingte Gefäßproliferation mit schütterem leukozytären Infiltrat, welches aber im Laufe der Zeit durch kollagenfasereiches Bindegewebe narbig ersetzt wurde. Die nachweisbaren CD 4 positiven Entzündungszellen waren nicht über das gewöhnliche Ausmaß vermehrt, es kommt zur Ausbildung einer Gewebsgrenze die von beiden Epithelien respektiert wird unter der Vereinigung des subepithelialen Bindegewebes.

Dies alles kann als Bestätigung dafür angesehen werden, dass die Rekonstruktion großer Defekte mittels freiem Jejunumtransplantat auch über einen Zeitraum von mehr als 21 Jahren erfolgreich ist und das Transplantat seinen Anforderungen in der neuen Umgebung standhält.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Schwenzer N., Ehrenfeld M.
Zahn-Mund-Kieferheilkunde: Lehrbuch zur Aus- u. Weiterbildung
Band 2, Spezielle Chirurgie
Thieme Verlag Stuttgart, 3. Aufl. (2002)
- [2] Reuther J., Steinau H.U., Wagner R.
Wiederherstellung ausgedehnter Schleimhaut-Weichteil-Defekte
der Mundhöhle mit mikrochirurgischem Dünndarmtransfer
Chirurg, 1983, 54(6), p379-386
Springer-Verlag 1983
- [3] Reuther J., Muhling J., Michel C.
Probleme bei der freien Gewebetransplantation mit
mikrochirurgischer Revaskularisierung
Fortschr Kiefer Gesichtschir (Germany, West), 1985, 30 p158-160
- [4] Hausamen J.E., Berger A., Reich R.H.
Untersuchungen über die Komplikation der mikrovaskulären
Dünndarmtransplantation als Grundlage zur Verbesserung der
Operationstechnik
Fortschr Kiefer Gesichtschir (Germany, West), 1985, 30 p161-163
- [5] Reuther J.
Historische Entwicklung und derzeitiger Stand der
Mikrogefäßchirurgie
Fortschr Kiefer Gesichtschir (Germany, West), 1990, 35 p2-7

- [6] Seidenberg et al.
Immediate Reconstruction of the Cervical Esophagus by a
Revascularized Isolated Jejunal Segment
Ann. Surg. 1959, 149 p162
- [7] Black P.W., Bevin A.G., Arnold P.G.
One-stage palate reconstruction with a free neovascularized
jejunal graft
Plast. Reconstr. Surg. 1971, 47 p316
- [8] Löhlein D.
Technik und Probleme bei der Dünndarmsegmententnahme zur
freien Transplantation
Handchir Mikrochir Plast Chir 1988, 20 p189-191
Hippokrates Verlag GmbH
- [9] Hausamen J.E., Berger A., Löhlein D.
Neue Aspekte bei der Wiederherstellung von großen
Schleimhautdefekten der Mundhöhle durch mikrovasculär
anastomosierte Dünndarmtransplantate
Handchir Mikrochir Plast Chir 1985, 5 p259-265
- [10] Reuther J., Steinau U.
Mikrochirurgische Dünndarmtransplantation zur Rekonstruktion
großer Tumordefekte der Mundhöhle
Deutsch. Z. Mund-Kiefer-Gesichtschir 1980, 4 p131-136
- [11] Berger A., Hausamen J.D., Löhlein D.
Schleimhautersatz in der Mundhöhle mit freiem
Dünndarmtransplantat nach Tumorresektion
Handchir Mikrochir Plast Chir 1983, 15 p164-167

- [12] Sasaki T.M., Baker H.W., Mc Connell D.B., et al.
Free Jejunal Mucosal Patch Graft Reconstruction of the
Oropharynx
Arch Surg (United States) 1982, 4 p459-462
- [13] Zacherl J., Wild K., Öckher M., et al.
Dünndarmentnahme bei der autologen Jejunumtransplantation
zur Rekonstruktion in der Mundhöhle ist ein komplikationsarmer
Zusatzeingriff
Langenbecks Arch Chir (Germany) 1997, 382(1) p55-58
- [14] Bitter K.
Mikrochirurgische Eingriffe - Indikation und kritische
Bestandaufnahme
In Pfeifer G., Schwenger N.: Fortschritte der Kiefer- und
Gesichts-Chirurgie 1983, 28 p161
Thieme Verlag Stuttgart
- [15] Kornfehl J.
Autotransplanted jejunum in head and neck cancer
Eur J Cancer B Oral Oncol (England), Jan 1994, 30B(1) p16-22
- [16] Millesi W., Knabl J., Rath T., et al.
Rekonstruktion ausgedehnter Schleimhautdefekte im
Mundhöhlen- und Oropharynxbereich mit dem revaskularisierten
Jejunumtransplantat
Acta Chir Austr 1994, 26 p299
- [17] Schultz-Coulon H.J.
Das Jejunumtransplantat. Ein therapeutischer Fortschritt?
HNO 1991, 39 p203

- [18] Junqueira L.C., Carneiro J.
Histologie
Sprinter-Verlag Berlin, 4 Aufl. (1996)
- [19] Löffler G.
Basiswissen Biochemie
Springer Verlag Berlin, 4. Aufl. (2001)
- [20] Hirsch-Kaufmann M., Schweiger M.
Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 4. Aufl. (2001)
- [21] Stryer, L.
Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 4. Aufl. (1999)
- [22] Boenisch T. (Hrsg.)
Handbuch Immunchemische Färbemethoden
DakoCytomation GmbH Hamburg
DakoCytomation Corp. Carpintera, CA, USA (2003)
- [23] Meyer H.J., Terrahe K., Haug H., Schmidt W.
Die freie Dünndarmtransplantation zur plastischen
Rekonstruktion von Mundhöhle, Pharynx und zervikalem
Ösophagus
Laryn. Rhinol. Otol. 1988, 67 p1-6
Georg Thieme Verlag Stuttgart

- [24] Reuther J.
Fünfstufige Erfahrung mit dem mikrochirurgischen
Dünndarmtransfer zur Wiederherstellung ausgedehnter
Weichteildefekte des Oropharynx
Dtsch. Zahnärztl. Z. 1985, 40 p450460
- [25] Brachvogel P., Berger A., et al.
Langzeiterfahrungen mit der Dünndarmtransplantation
Fortschr Kiefer Gesichtschir (Germany, West), 1990, 35 p60-3
- [26] Kermer C, Ziya-Ghazvini F, Poeschl PW, et al.
Two stage reconstruction with revascularized grafts after
resection of retromolar and oropharyngeal carcinoma.
Int J Oral Maxillofac Surg (Denmark), Sep 2004, 33(6) p554-7
- [27] Millesi W, Formanek M, Moser D, et al.
Immune competent cells in non-irradiated autologous jejunal
grafts used for reconstruction of the oral cavity and oropharynx.
J Oral Pathol Med (Denmark), Feb 2001, 30(2) p91-7
- [28] Reuther J., Mühling J.
Zehnjährige Erfahrung mit dem mikrochirurgischen
Dünndarmtransplantat zur Rekonstruktion des Oropharynx
Fortschr Kiefer Gesichtschir (Germany, West), 1990, 35 p57-60
- [29] Reichart P. et al.
Zur Bedeutung epithelial-mesenchymaler Interaktionen in
mikrovaskulär gestieltem Dünndarmtransplantat zum Ersatz
oraler Mukosa
Fortschr Kiefer Gesichtschir (Germany, West), 1990, 35 p63-6

- [30] Reichart P, Loning T, Hausamen JE, et al.
Morphologic study of jejunal mucosal transplants for the
replacement of oral mucosa.
J Oral Pathol (Denmark), Dec 1984, 13(6) p595-603

Abbildungsverzeichnis

- Abb.: 1/2 Hausamen J.E., Berger A., Löhlein D.
Neue Aspekte bei der Wiederherstellung von großen
Schleimhautdefekten der Mundhöhle durch mikrovaskulär
anastomosierte Dünndarmtransplantate
Handchir Mikrochir Plast Chir 1985, 5 p259-265
- Abb.: 3 Junqueira L.C., Carneiro J.
Histologie
Seite 115(Abb.:5.6a)
Sprinter-Verlag Berlin, 4 Aufl. (1996)
- Abb.: 4 Junqueira L.C., Carneiro J.
Histologie
Seite 116(Abb.: 5.9)
Sprinter-Verlag Berlin, 4 Aufl. (1996)
- Abb.: 5 Junqueira L.C., Carneiro J.
Histologie
Seite 115(Abb.: 5.5c)
Sprinter-Verlag Berlin, 4 Aufl. (1996)

- Abb.: 6 Kühnel Wolfgang
Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen
Anatomie
Seite 291(Abb.: 400)
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1999)
- Abb.: 7 Junqueira L.C., Carneiro J.
Histologie
Seite 495(Abb.: 20.24a)
Sprinter-Verlag Berlin, 4 Aufl. (1996)
- Abb.: 8 Kühnel Wolfgang
Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen
Anatomie
Seite 294(Abb.: 405)
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1999)
- Abb.: 9 Kühnel Wolfgang
Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen
Anatomie
Seite 292(Abb.: 402)
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1999)
- Abb.: 10 Stryer, L.
Biochemie
Seite 388
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 4. Aufl. (1999)

Abb.: 11 Boenisch T. (Hrsg.)
Handbuch Immunchemische Färbemethoden
Seite 37(Abb.: 11)
DakoCytomation GmbH Hamburg
DakoCytomation Corp. Carpintera, CA, USA (2003)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Dr. Bill für die freundliche Überlassung des Themas, sowie Herrn Prof. Dr. Dr. J. Reuther für die Übernahme der Referententätigkeit und die mir gewährte Unterstützung seiner Abteilung.

Herrn Dr. P. Adam danke ich aufs herzlichste für seine histologische Unterstützung und liebenswürdige Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Ott danke ich für die Anregungen und die histologische Beratung.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, sowie bei den Mitarbeitern im Institut für Pathologie bedanken.

Lebenslauf

Name : Jochen Klaus Alius

Geboren : 30.12.1977 in Alzenau in Ufr.

Staatsangehörigkeit : deutsch

Eltern : Bernd Alius, Berufskraftfahrer
Sonja Plattner, geb. Ullrich

Familienstand : ledig

Schulbildung : 1984 - 88 Grundschule, Alzenau in Ufr.
1988 - 93 Hauptschule, Alzenau in Ufr.
1993 - 95 Kaufmännische Realschule,
Hanau
1995 - 98 Ludwig-Geissler-Schule berufl.
Gymnasium, Hanau

Allgemeine Hochschulreife : 10.06.1998

Grundwehrdienst : 1998 - 1999

Zahnmedizin-Studium : 1999 - 2004 Bayerische Maximilians-
Universität Würzburg
07.12.2004 Approbation als Zahnarzt

Berufstätigkeit : 01.01.2005 bis 31.12.2005
Assistenz Zahnarzt bei
Dr. Ralf Gerhart, Aschaffenburg
ab 01.02.2005
Assistenz Zahnarzt bei
Dr. Peter Schlichte, Nürnberg

