Article original

Mise au point d'un modèle expérimental d'irradiation mandibulaire chez le lapin : résultats préliminaires

Soufyane Debbache^{1,*}, Stephan Langonnet¹, Frédéric Lafay², Bertrand Fleury², Anne-Gaëlle Bodard^{1,2}

¹ Institut de Chirurgie expérimentale (ICE), Centre régional de Lutte contre le Cancer et LabTAU – Inserm U1032, Lyon, France

² Centre Léon Bérard, Lyon, France

(Reçu le 4 avril 2013, accepté le 24 mai 2013)

Mots clés :
modèle animal / tête
et cou / radiothérapie /
effets secondaires

Résumé – Introduction : La radiothérapie est une modalité thérapeutique utilisée de manière systématique dans le traitement des cancers des voies aéro-digestives supérieures. L'ostéoradionécrose (ORN) représente son principal effet secondaire ; elle peut survenir tout au long de la vie du patient et compromettre le pronostic vital. Le but de ce travail est de mettre au point un modèle d'irradiation de la mandibule chez le lapin afin de mieux connaître la pathogénie de l'ORN et de proposer une meilleure prévention et un traitement plus efficace. **Matériel et méthodes :** Un groupe contrôle de 7 lapins a permis de connaître l'anatomie et l'histologie de la mandibule de lapin. Un premier groupe de 14 lapins a été irradié à raison d'une séance hebdomadaire de 5,5 Gy pendant 5 semaines, soit un équivalent de dose de 46,8 Gy. Ils ont été sacrifiés 1, 4, 12 et 24 semaines après la fin de la radiothérapie. L'analyse statistique n'ayant pas montré de différences significatives avec le groupe contrôle, un second groupe de 3 lapins a été irradié avec une séance hebdomadaire de 8,0, 8,5 et 9,0 Gy pendant 5 semaines. **Résultats :** Les premiers résultats histologiques ont montré une altération vasculaire, une diminution du nombre de cellules osseuses et des modifications de l'architecture osseuse. **Discussion :** Le rôle des éponges collagéniques intra-alvéolaires, du PRF®, des ultrasons et des cellules souches sera étudié ultérieurement.

Key words:
animal model / head
and neck /
radiotherapy / adverse
effects

Abstract – A model of mandibular irradiation in the rabbit: preliminary results. Introduction: Radiotherapy is widely used in the treatment of head and neck cancers. Its major adverse effect is osteoradionecrosis, which can occur during the whole life of the patient, involving the vital prognosis. The aim of the study was to develop a model for irradiation of the rabbit mandible in order to have a better knowledge of radiotherapy-induced bone alterations and thus a better prevention and treatment of osteoradionecrosis. **Material and methods:** The control group consisted in 7 rabbits and was used to assess anatomical and histological parameters of the rabbit's mandible. A first group of 14 rabbits was weekly irradiated at doses of 5.5 Gy during 5 weeks, at a total dose of 46.8 Gy. Sacrifices were done at 1 week, 4 weeks, 12 weeks and 24 weeks. As histological analysis did not reveal statistical differences with the control group, a second group (3 rabbits) was weekly irradiated at 8.0, 8.5 and 9 Gy during 5 weeks. **Results:** The first histological results seem to show vascular alterations, bone cells decrease and alterations of bone architecture. **Discussion:** The role of intra alveolar collagen sponges, PRF®, ultrasounds and stem cells in bone regeneration after radiotherapy will be further studied.

Dans la prise en charge des cancers des voies aéro-digestives supérieures, le recours à la radiothérapie est presque systématique. Les effets secondaires de cette modalité thérapeutique concernent l'ensemble des tissus oro-faciaux. L'ostéoradionécrose (ORN) constitue l'un des effets les plus redoutables. L'ORN est causée par une hypoxie, une hypovascularisation et une diminution des cellules osseuses [1]. Elle

provoque des modifications de l'endothélium vasculaire et augmente l'excrétion du collagène [2]. Mais aussi une diminution de la vascularisation, de l'activité et de la différenciation cellulaires, de la synthèse du collagène et de l'expression des facteurs de croissance [3]. Ainsi, l'os devient incapable de cicatrifier normalement après une exposition traumatique ou iatrogène. Malgré la diminution de l'incidence de l'ORN (elle est

* Correspondance : debbachesoufyane@yahoo.fr

passée de 11,8 % dans les années 1960 à environ 1 % actuellement), il n'existe pas de traitement satisfaisant de l'ORN, affection qui peut compromettre la vie du patient. Certains éléments de sa pathogénie restent toujours inconnus. De nombreuses études ont été menées pour évaluer les effets de la radiothérapie sur le tissu osseux, mais la plupart d'entre elles concernaient des fémurs de lapins ou de rats [4, 5]. Une étude canadienne a mis au point un modèle d'irradiation du complexe orbito-zygomatique chez le lapin immature (7 semaines) [6] ; dans ce modèle, deux doses ont été délivrées, 25 et 35 Gy. Zhang et al. [7] ont étudié les effets de la radiothérapie sur la régénération osseuse au cours d'une distraction mandibulaire. Les lapins ont subi 5 séances de 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 et 9,0 Gy. Les effets étaient dose-dépendants et les altérations osseuses ont été observées avec les doses supérieures à 8,0 Gy [7]. Par ailleurs, le recours à l'oxygénothérapie hyperbare (HBO pour Hyperbaric Oxygen) serait recommandé lors d'une distraction mandibulaire afin d'atténuer les effets délétères de la radiothérapie [8].

L'objectif de cette étude est de développer un modèle animal de lésions mandibulaires radio-induites permettant ainsi une meilleure connaissance de la pathogenèse de l'ORN, une meilleure prévention et, à plus long terme, de proposer un traitement plus efficace pour l'ORN.

Matériels et méthodes

Des lapines de race New Zealand White (NZW) dont le poids variait entre 3,5 et 4,0 kg ont été utilisées. Une période d'acclimatation de 7 jours a été observée pour l'ensemble des animaux. Les lapins ont été répartis en trois groupes. 7 lapins n'ont pas été irradiés : ils constituaient le groupe contrôle (G0). Les 14 lapins du groupe G1 ont reçu 5 séances hebdomadaires d'irradiation de 5,5 Gy chacune et ont été sacrifiés 1 semaine (2 lapins), 4 semaines (4 lapins), 12 semaines (4 lapins) et 24 semaines (4 lapins) après la fin de la radiothérapie. Les 3 derniers lapins (G2) ont reçu respectivement 5 séances hebdomadaires de 8,0, 8,5 et 9,0 Gy et leur sacrifice a eu lieu 8 semaines après la fin de la radiothérapie.

Un scanner a été réalisé sur un lapin témoin pour établir la dosimétrie de la radiothérapie (Fig. 1). Une prémédication par injection intramusculaire a été réalisée un quart d'heure avant le début de l'irradiation avec un mélange de kétamine (1 à 1,6 ml d'Imalgène® 1000 ND) – xylazine (0,6 à 1 ml de Rompun® ND) – glycopyrrolate (0,2 ml de Robinul® V). Un cathéter 22G (9,5/10) a été mis en place à la veine marginale de l'oreille. L'induction a été réalisée par injection intraveineuse d'un quart de dose du mélange utilisé pour la prémédication. L'entretien de l'anesthésie a été assuré par une injection intraveineuse à la demande du même mélange anesthésique. Une feuille en silicone, ayant une densité équivalent-tissu, a été utilisée pour augmenter artificiellement l'épaisseur

Fig. 1. Scanner pré-irradiation avec délimitation des organes critiques.
Fig. 1. Pre-irradiation CT scan with delineation of critical organs.

des tissus mous de la face du lapin et concentrer la dose délivrée sur le tissu osseux. Une reconstruction radiographique numérique (dite DRR pour Digital Reconstruct Radiograph) a été réalisée au préalable afin de valider le positionnement de l'animal avant le début de l'irradiation. Les yeux, l'encéphale et le corps de l'animal ont été protégés par des caches en plomb. Les rayons ciblaient le maxillaire et la mandibule avec des doses équivalent à celles utilisées pour l'irradiation des tumeurs des voies aéro-digestives supérieures (entre 30 et 70 Gy). À l'aide d'un accélérateur linéaire, habituellement utilisé en clinique, des photons de 6 MeV ont été délivrés. Un ratio alpha/bêta de 2 a été adopté [9, 10] afin de reproduire les effets osseux tardifs [8, 11].

Dès la fin de l'irradiation, les animaux étaient transférés sous des lampes infrarouges et surveillés jusqu'au réveil complet. Un examen clinique était réalisé chaque jour pour évaluer la récupération et l'état de santé de chaque lapin. En cas d'atteinte d'un des points limites définis dans le protocole d'étude, le vétérinaire et le responsable de l'expérimentation étaient prévenus pour décider de l'euthanasie éventuelle de l'animal. Les points limites standard retenus étaient les suivants : décubitus permanent, convulsions, anémie sévère, fièvre persistante, anorexie prolongée, signes de douleur ne rétrocedant pas à la procédure d'analgesie. Aucun animal n'a été retiré de l'étude et aucun n'a atteint un point limite. Tous les sacrifices ont été planifiés préalablement et un calendrier

Fig. 2. Fragments osseux prélevés, maxillaire (1) et mandibulaire (2).
Fig. 2. Maxillary (1) and mandibular (2) bone samples.

prévisionnel établi. Le prélèvement des échantillons osseux a été réalisé à l'aide d'une scie chirurgicale fine. La zone de prélèvement était comprise entre les incisives et les prémolaires (Fig. 2). Les fragments ont été fixés dans du formol tamponné à 4 % pendant 5 jours.

Les critères retenus pour l'exploration histologique étaient : nombre et aspect des cellules osseuses (ostéoblastes, ostéocytes, et ostéoclastes), présence de tissu ostéoïde et de phosphatases acides, nombre et aspect des vaisseaux, présence de collagène de type I et aspect de la structure osseuse. Pour les groupes G0 et G1, la décalcification a été réalisée avec de l'acide trichloracétique ; pour le groupe G2, une déminéralisation plus douce avec de l'EDTA. Les coupes obtenues ont subi trois types de marquage : le trichrome HPS (hématoxyline, phloxine, safran), le trichrome de Goldner et le marquage histochimique TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase).

L'ensemble du protocole décrit a reçu un avis favorable du Comité d'éthique du laboratoire enregistré auprès du Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale (CNREEA) sous le numéro 10.

Résultats

Pour le groupe G1, l'irradiation a été réalisée selon le protocole délivrant une dose thérapeutique équivalente à environ 46,8 Gy. Le ratio alpha/bêta était de 2 pour tous les groupes. La dose équivalente a été calculée à partir d'un modèle a/b. Ce modèle dit linéaire quadratique permet de calculer les doses équivalentes au fractionnement classique à 2 Gy par séance selon la formule suivante : $D_{(eq \text{ à } 2Gy)} = D \text{ (physique dose d)} \times ((a/b + d)/(a/b + 2))$. En effet, $5 \times 5,5 \text{ Gy} = 27,5 \text{ Gy}$ (dose physique) équivaut en terme d'effets tardifs à 46,8 Gy délivrés par fraction de 2 Gy soit $23 \times 2 \text{ Gy}$.

Fig. 3. Aspect histologique de l'os mandibulaire dans le groupe témoin (Goldner).

A : tissu adipeux ; C : corticale osseuse avec ostéocytes, ostéoblastes et ostéoclastes ; D : dent.

Fig. 3. Histological aspect of the mandibular bone in the control group (Goldner).

A: fat tissue; C: bone with osteocytes, osteoblasts and osteoclasts; D: tooth.

Le suivi de l'état de santé des animaux a permis de noter quelques effets secondaires macroscopiques liés à l'irradiation, notamment sur les animaux du groupe G1 sacrifiés 4 semaines après la fin de la radiothérapie. Ils avaient principalement une atteinte des phanères : une légère dépilation submandibulaire et une dyschromie des poils latéraux situés en regard des zones irradiées. On n'a constaté aucune perte de poids, ni modification de l'alimentation, ni altération de l'état de santé générale. Aucun signe de douleur n'a été exprimé par les animaux.

Après la dernière séance d'irradiation, tous les lapins du groupe G2 ont présenté une interruption de l'alimentation et des apports hydriques d'environ 24 heures. Très rapidement, ils ont été placés sous surveillance continue avec un examen clinique approfondi toutes les 2 heures. Puis, ils ont recommencé à boire et à manger normalement 24 heures plus tard. Dans ce groupe, la dépilation sous-mentonnière était plus intense et associée à un érythème.

Les fragments prélevés avaient une taille standard : environ 2 cm de long sur 1 cm de large, le prélèvement concernait la hauteur totale de la mandibule (Fig. 2). Des fragments du maxillaire ont été prélevés dans le groupe G0. Dans le groupe G2, le tissu osseux semblait moins vascularisé et moins dense.

Dans les 52 lames histologiques provenant du groupe témoin G0, l'os mandibulaire était caractérisé par une corticale relativement mince, un os spongieux développé dont les espaces trabéculaires contenaient surtout du tissu adipeux et très peu de tissu hématopoïétique. Les trabécules osseuses étaient épaisses et non parallèles, témoignant d'un remodelage osseux intense. Il y avait peu de fibroblastes autour des vaisseaux et des nerfs (Fig. 3).

Fig. 4. Aspect histologique de l'os mandibulaire dans le groupe G2 (Goldner).

I : inflammation ; A : altérations de la structure osseuse et diminution des cellules osseuses.

Fig. 4. Histological aspect of the mandibular bone in the G2 group (Goldner).

I: inflammation; A: alterations of bone structure with decrease of bone cells.

Les échantillons du premier groupe G1 ont fourni 120 lames. Sur les lapins sacrifiés 1 semaine après la fin de la radiothérapie, il n'y avait aucun signe d'inflammation, ni fibrose, ni tissu pathologique. Les vaisseaux et les nerfs avaient un aspect normal. Seuls quelques ostéoclastes étaient visibles mais il n'y avait pas de différence statistiquement significative par rapport au groupe G0. Les résultats étaient comparables quelque soit le temps entre la fin de l'irradiation et l'analyse histologique.

Pour les 12 lames du groupe G2, l'analyse histologique préliminaire a montré des altérations osseuses sur tous les prélèvements (Fig. 4). Les altérations vasculaires comportaient une augmentation de l'épaisseur de l'endothélium, une diminution du nombre des cellules osseuses et une modification de l'architecture osseuse. L'analyse histologique se poursuit.

Discussion

Le modèle expérimental retenu est le lapin de race NZW. Malgré les nombreuses différences entre l'os mandibulaire humain et celui du lapin, ce dernier reste un modèle intéressant pour l'étude des effets de la radiothérapie sur le tissu osseux. En effet, afin d'établir un modèle plus proche de la réalité biologique, la dose totale reçue a été fractionnée : 5 séances espacées d'une semaine [8]. La tolérance du lapin aux manipulations d'anesthésie et d'irradiation répétitives a été optimale. D'autres études ont été réalisées sur des fémurs de rats [5] ou des beagles. Le lapin semble être un compromis intéressant

entre la fiabilité de l'étude, le coût et la simplicité des manipulations. Le choix du modèle animal était conditionné aussi par sa faisabilité clinique, l'irradiation ayant lieu sous un accélérateur linéaire utilisé en clinique.

L'irradiation du groupe G1 a été réalisée selon un protocole utilisé dans les tumeurs digestives. La dose clinique délivrée était de 5,5 Gy hebdomadaire pendant 5 semaines, ce qui correspond à un équivalent de dose thérapeutique de 46,8 Gy. Le ratio alpha/bêta était de 2 afin de déclencher des effets radio-induits à long terme [8, 11]. Pour explorer ces effets, nous avions besoin d'une espèce dont le remaniement osseux est rapide. Le turn-over osseux du lapin est 3 fois plus rapide que celui de l'homme [4]. De plus, l'os du lapin est facile à manipuler et son irradiation est simple à réaliser sous un accélérateur linéaire.

Dans le groupe G0, 7 lapins ont été inclus. 14 échantillons ont été obtenus (7 mandibulaires gauches et 7 mandibulaires droits) dont on a tiré 52 lames. Les prélèvements maxillaires ont été testés mais ils ont été très vite abandonnés en raison de la très mauvaise qualité de l'os maxillaire et de son architecture très atypique : les cavités aériennes sont très développées et permettent seulement de prélever quelques mm d'os alvéolaire. L'analyse histologique des coupes maxillaires a mis en évidence d'importantes différences entre l'os maxillaire et l'os mandibulaire, ainsi qu'entre le maxillaire humain et le maxillaire de lapin. L'os maxillaire du lapin avait donc peu d'intérêt pour notre étude.

Pour assurer une bonne reproductibilité du positionnement de l'animal lors de séances d'irradiation, des repères anatomiques ont été tracés sur une cale placée sous la tête de l'animal, à savoir : le nez, les yeux et la base de l'oreille. Des faisceaux de guidage laser ont également été établis sur la cale pour plus de précision. Les repères et les faisceaux laser palliaient l'absence du masque thermoplastique habituellement utilisé à cette fin. Avant chaque irradiation, une reconstruction radiographique numérique (DRR) a été réalisée pour s'assurer que le cerveau, les yeux et la moelle épinière étaient hors du champ d'irradiation (Fig. 5). Ces organes critiques ont été protégés grâce à des caches plombés.

Le groupe G1 était composé de 14 lapins : 2 lapins ont été sacrifiés 1 semaine après la fin de la radiothérapie, 4 à 4 semaines, 4 à 12 semaines et 4 à 24 semaines. Seulement deux lapins ont été utilisés pour le délai d'une semaine car, à ce stade, les effets radio-induits observés sont précoces et principalement d'origine inflammatoire aiguë [12], or notre protocole avait pour but d'évaluer les effets tardifs radio-induits.

Les résultats d'irradiation sur le groupe G1 n'étaient pas concluants : aucune différence significative n'a été constatée par rapport au groupe G0. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Tout d'abord, l'absence dans la littérature de données anatomiques et histologiques sur l'os mandibulaire du lapin a rendu difficile l'ensemble des analyses. Cependant, cette étude a montré que l'anesthésie à répétition ne

Fig. 5. Reconstruction radiographique numérique pré-irradiation.
Fig. 5. Pre-irradiation DRR (Digital Reconstruct Radiograph).

représentait pas une véritable limite au protocole car aucun animal n'a été exclu du protocole après les 5 séances d'anesthésie générale. Seule une discrète accoutumance au produit a été observée nécessitant ainsi une légère augmentation de la dose injectée lors des dernières séances. Par ailleurs, le traitement histologique des échantillons des groupes G0 et G1 a consisté en une décalcification rapide qui a probablement altéré la qualité de l'os ; en particulier, le marquage histo-chimique au TRAP n'a pas révélé de phosphatases acides, enzymes caractéristiques des ostéoclastes. Enfin, la dose et/ou le fractionnement de l'irradiation étaient probablement insuffisants. La cicatrisation osseuse chez le lapin serait très rapide et la consolidation après une dose de 5,5 Gy probablement terminée au bout d'une semaine. Deux choix étaient possibles pour le groupe G2 : augmenter la dose délivrée par séance ou réduire l'espacement des séances (jusqu'à 2 séances par semaine). C'est finalement la première option qui a été retenue pour des raisons de tolérance. Zhang *et al.* [7] ont mis en évidence des altérations osseuses après 5 séances hebdomadaires de 8,5 et 9,0 Gy chacune sur l'os mandibulaire du lapin après une ostéogénèse provoquée par une distraction. Avec ce groupe G2, on avait pour objectif de valider les résultats de la littérature [7] : en conséquence, 3 lapins ont été irradiés selon ce protocole et l'analyse histologique détaillée est en cours. On doit noter que la toxicité clinique aiguë était importante et les premières observations histologiques ont montré des altérations osseuses notables, même sans traumatisme osseux (extraction dentaire, ostéogénèse par distraction...). Une irradiation bihebdomadaire semblait une option difficilement réalisable : selon l'équipe vétérinaire, le lapin n'aurait pas pu supporter les 2 séances hebdomadaires

d'anesthésie générale. De plus, les contraintes logistiques de cette option rendraient difficile la réalisation de ce protocole.

Conclusion

Étant donné le manque de données dans la littérature, l'objectif principal de cette étude était de mettre au point un modèle expérimental d'irradiation mandibulaire chez le lapin pour mieux comprendre les phénomènes osseux tardifs radio-induits et de déterminer à quel moment ces effets sont les plus délétères. Des ostéoblastes de lapin seront mis en culture, puis irradiés pour déterminer la dose exacte à délivrer et les modalités précises de l'irradiation, afin de valider au niveau cellulaire les altérations radio-induites.

Dans un second temps, les effets des pansements alvéolaires sur la cicatrisation d'un os irradié seront étudiés après des traumatismes chirurgicaux normalisés. Ces pansements, d'origine endogène (PRF pour Platelet Rich Fibrin) ou exogène (éponges de collagène), seront éventuellement enrichis par des cellules souches d'origine adipeuse (ADSCs pour Adipose-Derived Stem Cells). Différents sites de prélèvement des ADSCs ont été décrits chez le lapin : il semble que les cellules prélevées dans l'abdomen ont de meilleures propriétés histologiques [13]. Le prélèvement se fait par lipo-aspiration. Selon les données de la littérature, l'hypoxie stimulerait leur différenciation et leur adhérence [14]. Cette propriété pourrait être intéressante à étudier avec l'os irradié dont l'une des principales caractéristiques est l'hypoxie.

Deux projets liés sont en cours d'élaboration : le premier concerne le rôle des ultrasons à haute fréquence (HIFU pour High Intensity Focused Ultrasound) sur la cicatrisation de l'os alvéolaire irradié du lapin, le deuxième la radioprotection induite par l'injection de cellules adipeuses.

Les applications cliniques à court terme sont l'homogénéisation des protocoles d'extractions dentaires en terrain irradié. L'ORN, malgré sa faible fréquence, reste une complication redoutable impliquant parfois le pronostic vital du patient. Par ailleurs, le maintien d'un bon niveau d'os alvéolaire devrait permettre un recours plus fréquent aux implants dentaires qui sont, dans de nombreux cas, le seul moyen d'obtenir une réhabilitation bucco-dentaire fonctionnelle.

Ultérieurement, le modèle pourra être élargi aux autres types de nécroses osseuses notamment celles provoquées par certaines thérapies ciblées comme les bisphosphonates et les anticorps monoclonaux (bévacizumab, sunitinib, denosumab). Ces molécules peuvent provoquer une ostéochimionécrose en induisant des altérations vasculaires.

La pathogénie de l'ORN est encore incomplètement élucidée et il n'existe pas de traitement conservateur efficace pour cette affection. L'objectif est donc double : préventif lors des traumatismes chirurgicaux (extraction dentaire...), et curatif lors d'une ORN avérée.

Remerciements : cette étude a été réalisée avec le soutien de la Société française de Chirurgie orale (bourse Dentsply 2011) et celui de l'Institut français pour la Recherche en Odontologie (bourse 2012).

Conflits d'intérêt : aucun

Références

1. Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg* 1983;41:283-8.
2. Gevorgyan A, Sukhu B, Alman BA, Bristow RG, Pang CY, Forrest CR. Radiation effects and radioprotection in MC3T3-E1 mouse calvarial osteoblastic cells. *Plast Reconstr Surg* 2008;122:1025-35.
3. Delanian S, Lefaix JL. Radionécrose de l'os mature : connaissance physiopathologique récente motrice d'une thérapeutique médicale innovante. *Cancer Radiother* 2002;6:1-9.
4. Johnsson AA, Saxaii T, Jacobsson M, Granström G, Turesson I. A histomorphometric study of bone reactions to titanium implants in irradiated bone and the effect of hyperbaric oxygen treatment. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:699-706.
5. Phulpin B, Gangloff P, Tran N, Bravetti P, Merlin JL, Dolivet G. Rehabilitation of irradiated head and neck tissues by autologous fat transplantation. *Plast Reconstr Surg* 2009;123:1187-97.
6. La Scala GC, O'Donovan DA, Yeung I, Darko J, Addison PD, Neligan PC, Pang CY, Forrest CR. Radiation induced craniofacial bone growth inhibition: efficacy of cytoprotection following a fractionated dose regimen. *Plast Reconstr Surg* 2005;115:1973-85.
7. Zhang WB, Zheng LW, Chua D, Cheung LK. Bone regeneration after radiotherapy in an animal model. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:2802-09.
8. Clark CL, Strider J, Hall C, Fregusson HW, Armstrong KL, Runner RR, Baum DA. Distraction osteogenesis in irradiated rabbit mandibles with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:589-93.
9. Withers HR, Peters LJ, Taylor JM, Owen JB, Morrison WH, Schultheiss TE, Keane T, O'Sullivan B, van Dyk J, Gupta N, Wang CC, Jones CU, Doppke KP, Myint S, Thompson M, Parsons JT, Mendenhall WM, Dische S, Aird EG, Henk JM, Bidmead MA, Svoboda V, Chon Y, Hanlon AL, Peters TL, Hanks GE. Late normal tissue sequelae from radiation therapy for carcinoma of the tonsil: patterns of fractionation study of radiobiology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:563-8.
10. Jereczek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. *Cancer Treat Rev* 2002;28:65-74.
11. Hopewell JW. Radiation-therapy effects on bone density. *Med Pediatr Oncol* 2003;41:208-11.
12. Williams J, Chen Y, Rubin P, Finkelstein J, Okunieff P. The biological basis of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:182-8.
13. Chen L, Peng EJ, Zeng XY, Zhuang QY, Ye ZQ. Comparison of the proliferation, viability and differentiation capacity of adipose-derived stem cells from different anatomic sites. *Cells Tissues Organs* 2012;196:13-22.
14. Chung HM, Won CH, Sung JH. Responses of adipose-derived stem cells during hypoxia: enhanced skin-regenerative potential. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9:1499-5.