Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Nordwestdeutsche Kieferklinik)
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Schmelzle)
Kopf- und Hautzentrum
Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur postoperativen Reinnervation im Transplantatgebiet des Latissimus dorsi-, Radialis- oder Pectoralislappen

DISSERTATION

zur
Erlangung eines Doktors der Zahnmedizin

dem Fachbereich der
Universität Hamburg

vorgelegt
von **Birgit Wiehe**
geboren in Lübbecke

Hamburg, 2003

Datum der Disputation: 15.06.2004

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Dr. M. Vesper

Inhaltsverzeichnis

1.0. Einleitung 1
1.1. Überblick 1
1.2. Geschichte der Lappenchirurgie 3
1.3. Transplantation 5
1.4. Latisssimus dorsi-Lappen 7
1.5. Pectoralis major-Lappen 9
1.6. Radialislappen 10
1.7. Regeneration durchtrennter peripherer Nerven 12
1.8. Innervation der Haut 13
1.9. Fragestellung 14
2.0. Material und Methoden 15
2.1. Probenentnahme und Aufbewahrung 15
2.2. Fixierung 15
2.3. Einbettung 16
2.4. Schneiden 17
2.5. Färbung 18
2.6. Schnitttechnik 18
2.7. Kontrastierung 18
2.8. Gewinnung und Herstellung von Präparaten für den immunhistochemischen Nachweis 19
2.9. Immunhistologischer Nachweis 20
2.10. Klinische Untersuchung 21
2.11. Patienten 23
2.12. Geräte 25
2.13. Materialien 26
3.0. Ergebnisse 27
3.1. Ergebnisse der klinischen Untersuchung 27

3.2. Ergebnisse aus immunhistochchemischen Untersuchungen 30
3.3. Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen..... 37
4.0. Diskussion 48
5.0. Zusammenfassung 53
6.0. Literaturverzeichnis..... 55
7.0. Anhang 64
7.1. Übersicht über sämtliche erfaßten Patientendaten 64
Lebenslauf..... 71
Danksagung..... 72
Eidesstattliche Versicherung..... 73

1.0. Einleitung

1.1. Überblick

Unter plastischen und wiederherstellenden Operationen im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich faßt man Maßnahmen zusammen, die der Rekonstruktion von Form und Funktion dienen. Kennzeichnend für diese Operationen sind die Verpflanzung und Verlagerung von Haut, Muskeln, Faszien, Nerven, Fett, Knochen und Knorpel sowie Einlagerung von eigenen oder körperfremden Stoffen (Lee et al. 1995, Matloub et al. 1989). Defekte, die durch Tumoroperationen oder Verletzungen entstanden sind, machen diese Eingriffe erforderlich. Ebenso gehört die chirurgische Behandlung von angeborenen Fehlbildungen, wie Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten oder kraniofacialen Anomalien in dieses Gebiet (Beigel et al. 1988, Kornfehl et al. 1997, Schusterman et al. 1994, Urken et al. 1995).

Für den Patienten stellen Erkrankungen oder Defekte gerade im Gesichtsbereich durch die oft damit verbundene kosmetische Entstellung eine erhebliche psychische Belastung und Beeinträchtigung der gesellschaftlichen Akzeptanz und Integrität dar. Die Minderung oder sogar Beseitigung des als störend empfundenen Erscheinungsbildes hat dabei für den Patienten hohe Priorität (Rogers et al. 1999, Schliephake et al. 1998, Rogers et al. 1998).

Dank der Entwicklung innerhalb der plastischen Chirurgie ermöglichen es moderne Operationsmethoden, eine zufriedenstellende ästhetische und funktionelle Rehabilitation für den Patienten zu erreichen.

Dabei stehen immer mehr funktionelle Ergebnisse nach plastischen Operationen im Vordergrund, die über das rein kosmetische Operationsergebnis hinausgehen. Beispielsweise stellt das Wiedererlangen der Hautsensibilität nach Lappenplastik eine entscheidende Verbesserung der Lebensqualität des Patienten dar (Urken et al. 1991, Vesper et al. 1999).

Diverse Untersuchungen an Patienten mit gestielten und freien Lappentransplantaten haben gezeigt, dass die Einheilung des Transplantates zumeist mit einem Verlust an vaskulärer und

nervaler Versorgung verbunden ist. Dabei ist postoperativ sowohl die epikritische als auch protopathische Sensibilität betroffen. Mikrochirurgische Nervanschlüsse zur gezielten und gesteuerten Nervregeneration gehören zu den eingesetzten Operationsvarianten. Für den Radialislappen und Latissimus dorsi-Lappen wird dieses in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert (Baumann et al. 1996, Bootz et al.1995, Dabb und Conklin 1981, Vriens et al. 1996).

In der vorliegenden prospektiven Studie werden die funktionellen Ergebnisse von gestielten und freien menschlichen Myokutanlappen nach Transplantation anhand des Ausmaßes der postoperativ bestehenden Hautsensibilität untersucht.

Als Untersuchungsmethoden dienen hier neben der klinischen Sensibilitätsprüfung am Patienten die histologische Befundung von Gewebeproben des Transplantates in Form einer elektronenmikroskopischen Untersuchung. Vorher wurden immunhistochemische Nachweise durchgeführt.

1.2. Geschichte der Lappenchirurgie

Die Geschichte der Lappenchirurgie und die der plastischen Chirurgie sind der Überlieferung nach eng verknüpft. Die älteste dokumentierte Lappentechnik ist die indische Nasenersatzplastik aus dem sechsten oder siebten Jahrhundert vor unserer Zeitrechnung, die im indischen Susruta Samhita beschrieben wurde, wobei die Nase mit einem Hautlappen von der Wange gebildet wurde. Der bekannte als indische Nasenplastik bezeichnete Stirnlappen wurde wahrscheinlich erst wesentlich später beschrieben. Soweit überliefert, wurden in den nächsten fast zweieinhalbtausend Jahren entweder Hauttransplantate oder gestielte Lappen ohne Ausrichtung nach Gefäßverläufen, je nach Defekt in mehr oder weniger zufälliger Form (random pattern flaps) verwendet. Das Längen-Breiten-Verhältnis durfte deshalb 2:1 nicht überschreiten.

Erst ab Mitte des 19. Jahrhunderts wurden Bestrebungen, dieses Längen-Breiten-Verhältnis zu ändern, dokumentiert. Bereits 1906 hatte Iginio Tansani einen wichtigen arteriellen axialen Lappen beschrieben, der nach Mastektomie verwendet wurde.

Wesentliche Fortschritte ergaben sich durch systematische Studien der Anatomie, wenn auch mit großer zeitlicher Verzögerung. 1889 veröffentlichte Carl Manchot von der Kaiser-Wilhelms-Universität in Straßburg seine anatomischen Untersuchungen über „Hautarterien des menschlichen Körpers“. Johann Friedrich Esser, ein Schüler Manchots, griff diese Forschungsergebnisse auf und beschrieb 1918 und 1934 verschiedene Lappen im Kopf-Hals-Bereich, die auf diesen gefundenen Gefäßen basierten. Der Begriff „Insellappen“ wurde so geprägt. Auch Jaques Joseph, der für seine Rhinoplastiken berühmt war, beschrieb schon 1931 einen medial gestielten axialen pektoralen Lappen, der auf den Erkenntnissen über Gefäßverläufe Manchots beruhte. Die anatomische Arbeit Manchots wurde von Michael Salmon 1936 in seinem Werk „Les Artère de la Peau“ ergänzt und wesentlich erweitert.

Klinisch lange unbeachtet gingen die nächsten Vorstöße in Richtung axialer Lappen von Handchirurgen aus: Littler veröffentlichte 1954 seine Methode zur neurovaskulär gestielten Fingertransposition und Erik Moberg seinen neurovaskulären Insellappen zur Resensibilisierung des Daumens.

Das Zeitalter der Mikrochirurgie begann mit der Entwicklung der mikrochirurgischen Technik durch Harry Bunke, der 1966 den ersten freien Zehentransfer am Rhesusaffen erfolgreich durchführte.
1971 glückte Antia und Buch der erste erfolgreiche mikrochirurgische Lappentransfer. In den siebziger Jahren wurde das Prinzip der Stromumkehr in Lappen bekannt und erfuhr seinen Aufschwung nachdem Stock, Mühlbauer und Biemer 1983 (Biemer et al. 1983) zeigten, dass sich der von Yang 1981 beschriebene Unterarmlappen auch nach diesem Prinzip verwenden ließ.
Ponten stellte 1981 neben kutanen Lappen, Muskellappen und myokutanen Lappen das Prinzip der fasziokutanen Lappen vor, welches Cormack und Lamberty 1986 in ihrem Buch „The Arterial Anatomy of Skin Flaps“ erweiterten.

Bis heute wurden sowohl in der Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie des Gewebetransfers als auch mit neuen Lappenkonzepten große Fortschritte gemacht.

1.3. Transplantation

In Hinblick auf den Verpflanzungsmodus werden freie und gestielte Transplantation unterschieden. Eine Sonderform der freien Transplantation stellt die Transplantation mit mikrochirurgischen Gefäßanastomosen am Einpflanzungsort dar, so dass ein sofortiger Anschluß an den Blutstrom gegeben ist (Schwenzer und Grimm 1990, Schmelzle et al. 1993).

Freie Transplantation bedeutet, dass ein Gewebestück an einer Stelle entnommen und an einer anderen ohne ernährenden Stiel zur Einheilung gebracht wird. Der Erfolg ist wesentlich von der Ernährung des Transplantates abhängig. Ein gut durchblutetes Transplantatlager sorgt nicht nur für eine optimale Ernährung sondern senkt auch die Infektionsgefahr.

Die Haut kann als Hautschichttransplantat und als Vollhautlappen transplantiert werden. Günstige Lager für freie Hautplastiken sind gut durchblutetes Muskelgewebe, Korium, Periost und subkutanes Bindegewebe. Die Schichtdicke des Transplantates ist ebenfalls ein wichtiger Faktor, da für eine erfolgreiche Einheilung der Grad der Revaskularisierung entscheidend ist. Produkte aus dem Zellstoffwechsel des Transplantates induzieren im Transplantatlager eine chemotaktische Reaktion, die zwei bis vier Tage postoperativ zur Aussprossung von Kapillaren und Nerven aus dem Lager in Richtung Transplantat führen. Die Blutzirkulation ist anfangs diffus, dann ab ca. dem siebten Tag gerichtet (Seckel et al. 1984, Nachemson et al. 1988, Lundborg et al. 1994).

Mikrovaskulär anastomosierte Transplantate als Sonderform der freien Tranplantation erhalten Anschluß ihrer versorgenden und abführenden Gefäße an diese der Empfängerregion. Arterie und Vene werden hier in der Regel unter dem Mikroskop anastomosiert. Das Gewebe bleibt durch die sofortige Durchblutung primär vital und führt auch bei ungünstigeren Transplantatlagern, z.B. nach Bestrahlung, zu einer besseren Einheilung (Schmelzle et al. 1993).

Für diese Art der Transplantation kommen in der Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie mehrere Gewebe in Betracht, wie Haut, Fett, Haut mit Fett und Muskel aber auch Knochen mit oder ohne Haut und Muskel.

Gestielte Transplantation bedeutet, dass ein sogenannter Stiel als Gewebebrücke sowohl mit der Entnahmestelle verbunden als auch mit dem zu- und abführenden Blutgefäßsystem in Verbindung bleibt. Mit dieser Technik ist die Verlagerung von Haut, Fett, Muskulatur, Faszie und Periost möglich.

Alle Lappenplastiken lassen sich wiederum in Nah- und Fernlappen unterteilen. Nahlappen entstammen aus der unmittelbaren und weiteren Umgebung des Defektes. Diese werden häufig in der plastischen und wiederherstellenden Gesichtschirurgie benutzt. Sie haben den Vorteil der Beschaffenheit des fehlenden Abschnittes bezüglich Dicke, Behaarung und Kolorit weitgehend zu entsprechen. Die Entnahmestelle wird entweder primär verschlossen oder durch ein freies Hauttransplantat gedeckt. Lappen mit einer größeren ernährenden Brücke, d.h. einer größeren Distanz zwischen Defekt und Entnahmeort, machen häufig einen weiteren Eingriff erforderlich. Der Stiel wird durchtrennt und rückverlagert.

Der Erfolg der Nahlappenplastik ist von bestimmten Regeln der Lappengestaltung abhängig, damit keine Ernährungsstörungen mit anschließender Nekrose entstehen, die zum partiellen oder sogar totalen Verlust des Transplantates führen können. Die Wahl eines günstigen Verhältnis zwischen Länge und Breite ist entscheidend. Für einseitig gestielte Lappen hat sich ein Längen-Breiten-Verhältnis von 2:1 bewährt. Ebenso wichtig ist die Beachtung einer ausreichenden Blutstillung zur Vermeidung einer Hämatombildung, die die Ernährungssituation negativ beeinflussen kann (Schwenzer und Grimm 1990).

Die Transplantation eines Fernlappens wird bei der Behandlung größerer Defekte, bei denen auch subkutanes Gewebe fehlt und ortsständiges Material nicht ausreichend zur Verfügung steht, eingesetzt. Dieses ist häufig vor allem nach umfangreichen Tumoroperationen oder traumatisch bedingten ausgedehnten Substanzverlusten der Fall. Mehrere Methoden der Lappenplastik sind möglich. Im Folgenden wird nur auf die operativen Techniken von Myokutanlappenplastiken eingegangen, da diese in der vorliegenden Studie ausschließlich untersucht wurden.

1.4. Latissimus dorsi-Lappen

Schon um die Jahrhundertwende, von Tansani 1896 erstmals beschrieben, wurde die gestielte myokutane Lappenplastik zur Rekonstruktion nach Mastektomie angewendet. Nachdem diese später in Vergessenheit geriet wurde sie erst 1976 von Olivari erneut beschrieben. Seither findet sie als axiale und als freie Lappenplastik vielfältige Anwendungsgebiete.

Erfolgreich wird die gestielte Lappenplastik vor allem zum Brustwiederaufbau, zur Thoraxwandrekonstruktion, im Hals- und Kopfbereich als auch am Oberarm angewendet. Der frei transferierte Lappen bewährt sich in der Deckung auch großer Defekte an der gesamten Körperoberfläche. Die hervorragende Vaskularisierung des Muskels ermöglicht darüber hinaus die Behandlung chronischer Infekte wie Osteotitiden im Unterschenkelbereich. Auch eine freie Verpflanzung als funktionierender Muskel ist möglich (Geishauer und Schwarz 1995).

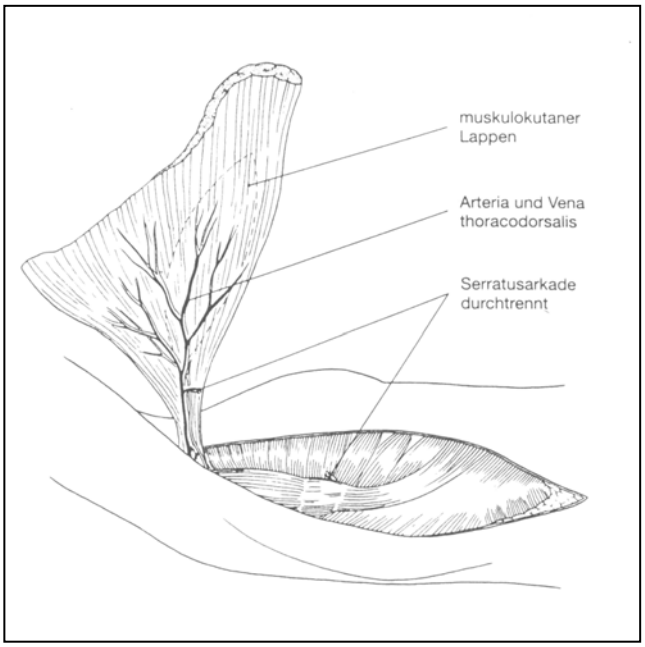

Abbildung 1: Präparation des muskulokutanen Latissimus dorsi-Lappens
(Geishauer und Schwarz 1995)

Anatomisch erstreckt sich der Musculus latissimus dorsi großflächig dünn über den Rücken. Seine Fasern laufen von den Dornfortsätzen der unteren sechs Brust- und der Lendenwirbel, vom hinteren und seitlichen Beckenkamm, meist auch von den unteren drei Rippen sowie der unteren Spitze der Scapula spiralförmig um den Musculus teres major unter Bildung der hinteren Axillarfalte und setzen am Sulcus bicipitalis des Humerus an.

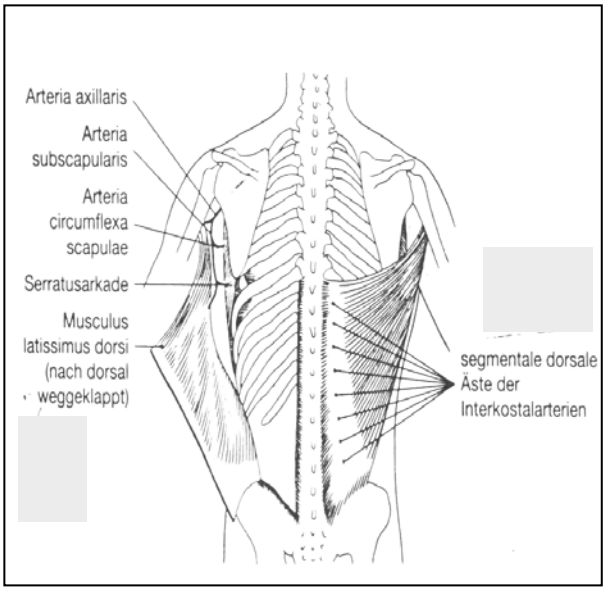

Abbildung 2: Gefäßversorgung des M. latissimus dorsi
(Geishauer und Schwarz 1995)

Arteriell wird der Musculus latissimus dorsi von der dominanten Arteria thoracodorsalis als Endast der Arteria subscapularis und sekundären segmentalen Lumbal- und Intercostalarterien versorgt. Mit der Arteria thoracodorsalis ziehen zwei Venen und der Nervus thoracodorsalis als Gefäß-Nervenbündel. Intramuskulär verlaufen die Gefäße in tieferen Schichten. Dieses ist von Vorteil, da die Lappenplastik in späteren Korrektureingriffen tangential ausgedünnt werden kann.

Die Funktion des Muskels besteht in der Adduktion des Arms im Schultergelenk. Er senkt den erhobenen Arm, zieht ihn dorsalwärts und rollt ihn nach innen. Der Funktionsausfall durch Entfernung des Muskels ist im täglichen Leben normalerweise nicht störend, führt aber funktionell bei aktiven Sportlern zu einem Kraftverlust (Horch1990). Klinisch bedeutsam ist

dieser jedoch für Rollstuhlfahrer. In diesen Fällen sollte auf eine andere Lappentechnik zurückgegriffen werden.

1.5. Pectoralis major-Lappen

Der Pectoralis major-Lappen wurde von Ariyan 1979 erstmals beschrieben. Als axiale Lappenplastik gilt er als einer der wichtigsten gestielten Lappenplastiken zur Rekonstruktion im Hals –und Gesichtsbereich (Withers et al. 1979, Magee et al. 1980, Manni und Bruaset 1986, Hoppenreijs et al. 1990). Vor allem dort, wo z. B. nach großen Tumorresektionen, nicht nur Haut-, sondern auch Volumenersatz zur Defektdeckung erforderlich ist. So kann auch beispielsweise die Innnenauskleidung der Mundhöhle gestaltet werden. Als osteomyokutaner Lappen (Rippe) besteht die Möglichkeit gleichzeitig verlorengegangene Ober- oder Unterkieferanteile zu rekonstruieren (Koch und Dieckmann 1996).

Andere Anwendungsbereiche liegen in der Rekonstruktion im Halsbereich, an der Thoraxwand sowie am Oberarm. Früher sehr häufig bei der Rekonstruktion nach Karzinomen im Mundbereich mit Erfolgsraten über 90 Prozent angewandt, wurde diese Lappenplastik in den letzten Jahren zunehmend vom freien Radialislappen verdrängt. Damit ließen sich die beim Pectoralis major-Lappen häufigeren intraoralen Sekundärheilungen vermeiden (Geishauser und Schwarz 1995). Dabei kommt es infolge einer bakteriellen Entzündung zur Auffüllung des Gewebedefektes mit Granulationsgewebe und ausgedehnteren Narbenbildungen.

Der M. Pectoralis major entspringt mit seiner Pars clavicularis vom Schlüsselbein medial, mit der Pars sternocostalis vom Brustbein, der Pars abdominalis vom vorderen Blatt der Rectusscheide und setzt am Tuberculum majus des Humerus an. Die Innervation erfolgt über die Nn. pectoralis medialis et lateralis. Arteriell wird der Muskel über die Rami pectoralis der Arteria thoracoacromialis versorgt. Jedes der Pectoralissegmente hat eine eigene Blutversorgung und Innervation, so dass ein separater Transfer möglich ist. Die Funktion des Muskels besteht in der kräftigen Adduktion, z. B. bei der Senkung des gehobenen Armes sowie Bewegung des Arms unter Innenrotation zur Ventralfläche des Körpers.

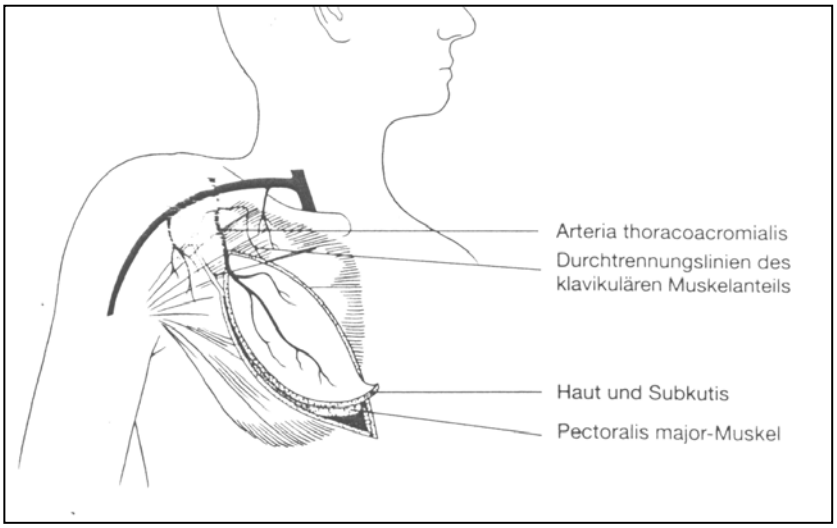

Abbildung 3: Präparation des muskulokutanen Pectoralis major-Lappens
(Geishauer und Schwarz 1995)

1.6. Radialislappen

Der freie Radialislappen ist der wahrscheinlich am weitesten verbreitete freie Lappen. Er wurde in den siebziger Jahren in Shanghai entwickelt (Yang et al.1981). Durch eine Veröffentlichung von Mühlbauer 1980, der die Technik des Unterarmlappens dort lernte, fand dieser auch in Europa und im amerikanischem Raum Verbreitung (Mühlbauer et al. 1982). Die Verfeinerung der Technik bot auch die Möglichkeit einen gestielten osteokutanen Lappen zum einseitigen Daumenaufbau herzustellen (Biemer und Stock 1983). Als freier Lappen dient dieser als Durchflusslappen zur simultanen Hautbedeckung und Rekonstruktion der Gefäßstrombahn.

Der Unterarmlappen ist als sehr dünner, anschmiegsamer myofasziokutaner Lappen besonders als dünne Bedeckung auch über unebenen Empfängergebieten geeignet (Mühlbauer et al. 1982, Rasheed et al. 2000). Gebräuchliche Lappenformen sind unter anderem der proximal an der Art. radialis anastomosierte freie Lappentransfer, gestielt zur Defektdeckung am mittleren Unterarm bis zur Oberarmmitte oder als Radialisdurchflußlappen, wobei die Art. radialis proximal und distal anastomosiert wird. Ein Nervanschluß des Lappens ist durch die Anastomosierung des entsprechenden Unterarmhautnerven (Nervus cutaneus antebrachii) zu erreichen.

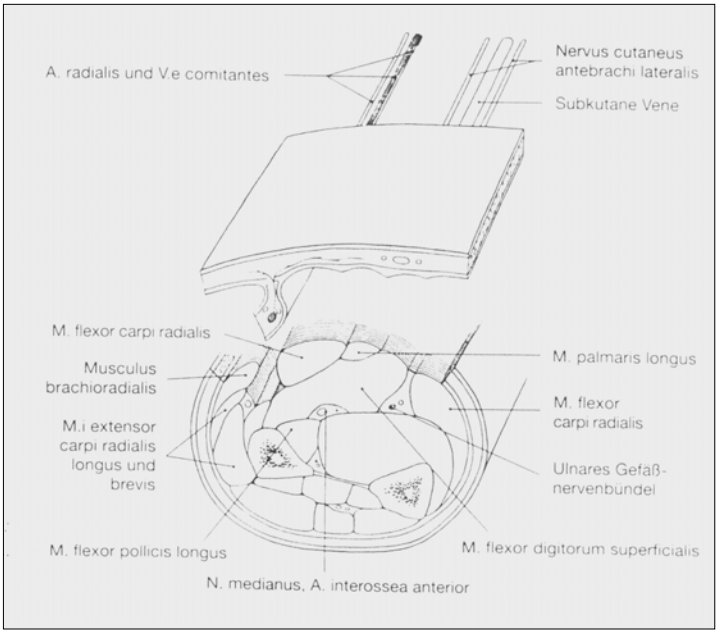

Abbildung 4: Anatomie des Radialislappens: Schnittbild
(Geishauer und Schwarz 1995)

Die Hebung des Lappens ist im Stromgebiet der Art. radialis möglich. Diese verläuft in dem Septum, welches die beuge- und streckseitigen Muskelkompartimente am Unterarm trennt. Hier verlaufen feine fasziokutane Gefäße, die nahezu die gesamte Haut des Unterarms vom Ellbogen bis zum Handgelenk versorgen. Venös wird das Gebiet von der V.e. comitantes drainiert. Der sensible Anschluß erfolgt über Hautäste des N. cutaneus antebrachii.

1.7. Regeneration durchtrennter peripherer Nerven

Neben der Vitalfunktion von Lappentransplantaten ist für den Patienten nicht nur das ästhetische Ergebnis von Bedeutung, sondern auch die Sensibilitätsrückkehr im Operationsgebiet.

Da es bei Verpflanzung eines Transplantates unweigerlich zur Durchtrennung peripherer Nerven kommt, verlieren die peripheren Axone die ernährende Verbindung zu ihrem Perikaryon (Zilles und Rehkämper 1994). Dieser Prozeß wird in der Literatur als anterograde oder Waller-Degeneration bezeichnet. Dieses führt bei myelinisierten Neuronen, die für die epikritische Sensibilität verantwortlich sind, zum Untergang der Schwannschen Zellen und somit zum Verlust der Markscheide. Der Zerfallsprozeß kann sogar invasiv auf noch intakte Neurone in der Umgebung übergreifen. Es kommt zur transneuralen Degeneration.

Andererseits kann es bei Trennung von Perikaryon und Axon auch zu einer retrograden Degeneration kommen, bei dem der Zellkörper degeneriert. Die Regenerationsbereitschaft des Axons nimmt zu, je weniger das Perikaryon in Mitleidenschaft gezogen wird; d. h. desto peripherer die Nervläsion liegt. Unter günstigen Voraussetzungen proliferiert zunächst von proximal Gliagewebe und überbrückt die Läsion oder sucht sich einen Weg zur Gewebsoberfläche. Dieses Gliaband (Hanken-Büngner-Band) wird von dem proximal wachsenden Axon als Leitschiene benutzt (Hall 1989, Castaldo und Ochoa 1996). Die Regenerationsgeschwindigkeit beträgt ca. 1-1,5 mm pro Tag.

Der neue sensorische Anschluß der Peripherie entsteht nicht durch Zusammenwachsen des proximalen mit dem distalen Axonstumpf, sondern ausschließlich durch Aussprossung von Nervenfasern vom proximalen Nervende her.

Somit dient die mikrochirurgische Nervanastomose als Leitstruktur für die Proliferation von Nervenfasern zum distalen Stumpf hin.

1.8. Innervation der Haut

Die Hautinnervation läßt sich in einen sensorischen und einen autonomen Anteil unterteilen. Die sensorischen Nervenfasern liegen in der Epidermis und Dermis als freie oder spezialisierte Nervendigungen und in Begleitung mit Gefäßen an Drüsen und Haarfollikeln (Halata u. Munger 1986, Halata 1990, 1993). Autonome Nervenfasern werden innervierend an den Blutgefäßen, Drüsen und M. erector pili an Haarfollikeln gefunden.

Die Vibration wird dabei über die Vater-Pacinischen Körperchen vermittelt, deren Schwingungen zwischen 40-1000 Hertz liegen. Druck wird über Merkel-Nervendigungen und Ruffini-Körperchen vermittelt. Die Merkelendigungen bestehen aus einem Merkel-Tastkörperchen und einer Axonterminale, welche sich im Stratum basale der Haut und Schleimhaut befinden. Die Ruffini-Endkörperchen kommen in der behaarten und unbehaarten Haut sowie in Gelenkkapseln vor. Die Berührung wird durch mehrere Strukturen vermittelt. Dazu gehören die Meissnerschen-Tastkörperchen, die an verschiedenen Stellen lokalisiert sind, z. B. im Stratum papillare der intraoralen Schleimhaut, im Bereich der Lippe und des Augenlides. Mit zunehmenden Alter verringert sich deren Anzahl.

Die Sinnesmodalität der Thermozeption werden in Kaltrezeptoren und Warmrezeptoren unterteilt. Die Kaltrezeptoren sind markarme oder marklose Fasern, die unter der Epidermis liegen. Warmrezeptoren bestehen ausschließlich aus dem Fasertyp C und sind im Corium lokalisert. Der Schmerz wird über freie Nervendigungen vom markarmen Typ A und vom marklosen Typ C vermittelt.

1.9. Fragestellung

Betrachtet man die Entwicklung der rekonstruktiven Lappenoperationen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, so rückt die Wiedererlangung der Hautsensibilität im transplantierten Areal für Operateur und Patient zunehmend mit in den Vordergrund des operativen Erfolges. Für diese Empfindungsmodalitäten der Haut müssen Nervenfasern aus dem Transplantatlager in das ortsfremde transplantierte Gewebe einsprossen, die zu den unterschiedlichen Hautrezeptoren führen.

In dieser Studie wird anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen mit zusätzlichen immunhistochemischen und klinischen Tests folgenden Fragen nachgegangen:

1. Erfolgt die Reinnervation bei den Transplantaten von peripher oder zentral?
2. Gibt es Gesetzmäßigkeiten bei der Rückkehr der verschiedenen Empfindungsqualitäten im Hinblick auf die Reihenfolge?
3. Und als entscheidende Frage dieser Arbeit: Lassen sich mittels Elektronenmikroskopie neuronale Strukturen verifizieren?

Dazu wurden bei 18 Patienten, davon 14 Patienten mit einem Latissimus dorsi-Lappentransplantat, zwei Patienten mit einem Pectoralislappen und drei Patienten mit einem Unterarmlappen elektronenmikroskopische Aufnahmen als Nachweis von Nervenfasern, erstellt. Einer dieser Patienten erhielt sowohl ein Latissimus dorsi- als auch ein Radialislappentransplantat.

2. 0. Material und Methoden

2.1. Probenentnahme und Aufbewahrung

Von 18 Patienten, die ein Lappentransplantat erhalten haben, konnten Gewebeproben vom Ausgangsbefund und bei notwendigen Korrekturoperationen weitere Proben gewonnen werden, um die histomorphologische Situation des Transplantates untersuchen zu können.

Die Proben wurden mit Hilfe einer Stanze oder einem Skalpell entnommen, wobei die Entnahme stets aus dem Materialüberschuß des Transplantates erfolgte, so dass keine ästhetischen oder funktionellen Einschränkungen verursacht wurden.

Das gewonnene Material wurde sofort nach der Entnahme in einen Plastikzylinder überführt und nativ für maximal 15 Min. bei 7° C im Kühlschrank bis zur Fixierung zwischengelagert.

2.2. Fixierung

Die Herstellung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie und von Semidünnschnitten für die Lichtmikroskopie erforderte eine von der üblichen lichtmikroskopischen Technik abgewandeltes Vorgehen.

Die Fixierung wurde in einem Gemisch durchgeführt, das ein optimale Strukturerhaltung sichert und welches gepuffert den pH-Wert und durch entsprechende Konzentration den osmotischen Wert des lebenden Gewebes aufwies. Die Gewebeprobe wurde für 25 Min. in 6%igem Glutaraldehyd in 0,2 m Phosphatpuffer fixiert. Dabei wurde die eiweißvernetzende Wirkung der Aldehyde genutzt.

Darauf folgte ein zweiter Fixierungsschritt für zwei Stunden in einem 1%igem OsO_4 – Phosphatpuffersaccharosegemisch zur Proteindenaturierung, so dass diese unlöslich gemacht werden. Dabei wird die stabilisierende Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins gelöst. Unter Erhalt der Polysaccharide und des Glycogens erfolgte die Entwässerung schrittweise:

in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei einer Temperatur von 4º C,

beginnend mit	35%igem	
dann	50%igem	
	70%igem	
	96%igem Alkohol	für jeweils 15 Min.

Danach wurden die Proben zweimal in reinem 100%igem Alkohol bei Zimmertemperatur für 15 Min., gefolgt von zweimal je 15 Min. in Propylenoxyd weiter entwässert.

Dieses schrittweise Vorgehen ist notwendig, um möglichst Zerreißung und Schrumpfung der Gewebe zu vermeiden. Dennoch kommt es zu einer Schrumpfung von 10-15% des ursprünglichen Volumens. Das Überschreiten der Verweildauer insbesondere in hohen Alkoholkonzentrationen führt zu unerwünschten Härtung des Präparates. Die Entwässerung ermöglicht die Durchtränkung der Proben mit dem hydrophoben Einbettmedium.

2.3. Einbettung

Um zu verhindern, dass sich beim Schneiden Gewebekomponenten unterschiedlicher Konsistenz gegeneinander verschieben, war es erforderlich einen einheitlichen Gewebeblock zu erzeugen. Zu diesem Zweck wurden die Proben in polymerisierendem Kunstharz eingebettet.
Vorausgehend wurde eine Epon-Mischung angesetzt:

Lösung A	(Epon/DDSA) und
Lösung B	(Epon/MNA) im Verhältnis 2:3 , versetzt mit einem 2%igem Accelerator

Die Einbettung erfolgte schrittweise bei Zimmertemperatur:

1. Für 1 h in einem Gemisch aus Propylenoxid und Epon-Mischung im Verhältnis 1:1
2. Für 16 h in Propylenoxid und Epon-Mischung im Verhältnis 1:3

Zur Polymerisation wurden die Proben in Formen mit Epon-Mischung überführt, wobei die Proben unter einem Lichtmikroskop bei schwacher Vergrößerung in die richtige Lage zur späteren Anschnittfläche gebracht wurden.
Die Polymerisation wurde in einem Brutschrank durchgeführt, wo die Gewebe erst für 10 Stunden bei 37º C, dann 12 Stunden bei 45º C und schließlich bei 60º C für weitere 12 Stunden gelagert wurden. Auf einem Metallblöckchen gesockelt wurden die auspolymerisierten Gewebeproben an einem Fräsgerät getrimmt, um überschüssigen Kunststoff zu entfernen.

2.4. Schneiden

Die 1µ dicken Schnitte wurden an einem Semidünnschnittmikrotom geschnitten und in sterilem Aqua dest. aufgefangen. Dieses Feinschneiden wurde mit besonders gebrochenen Glasmessern durchgeführt.

2.5. Färbung

Die gewonnenen Semidünnschnitte wurden mit Hilfe der Toluidin-Blau-Färbung angefärbt.
Das basische Farbstoffgemisch setzte sich zusammen aus :
vier Teilen 1%igem Toluidin, in Borax gelöst
und einem Teil 1%igem Pyronin, in H_2O gelöst

Der Färbevorgang erfolgte in Dappengläsern, die sich auf einer 60-70º C erwärmten Heizplatte befanden. Die Schnitte wurden zuerst in demineralisiertes H_2O gegeben. Die Erwärmung bewirkte eine Streckung der Schnitte. Darauf wurden die Schnitte 3 Min. in Toluidin-Blau gefärbt. Danach wurden diese in demineralisiertem Wasser gespült. Eine zweite und dritte Spülung schlossen sich an.

Zum Umsetzen der Schnitte wurde eine Platinöse benutzt. Beim Aufsetzen auf die Objektträger wurde diesen mit einer Papierspitze das Wasser entzogen und auf einer Heizplatte getrocknet. Schließlich wurden die Präparate mit Xylit eingedeckt.

2.6. Schnitttechnik

Auf dem Semidünnschnittpräparat wird die darzustellende Region festgelegt. Die Blockgröße darf maximal einen Durchmesser von 3 mm aufweisen. Mit Hilfe eines Diamantmessers wurden diese an einem Ultramikrotom manuell geschnitten und in Aqua ad injekt aufgefangen. Die Ultradünnschnitte sollten eine Schichtdicke von 80 µ besitzen, die anhand einer Farbskala zu beurteilen ist. Die Schnitte erscheinen unter Licht goldglänzend.
Mit einer Platinöse wurden die Schnitte auf ein Kupfer-Grid (Kupfer-Schlitzträger 200 mit parallelen Stegen) aufgezogen.

Zur Fixierung auf dem Träger erfolgte der Wasserentzug erst durch Auflegen auf ein Filterpapier und die entgültige Trocknung bei 50° C im Brutschrank für 120 Min..

2.7. Kontrastierung

Zur Darstellung unter dem Elektronenmikroskop erfolgt eine Kontrastierung indem die Ultradünnschnitte für 30 Min. in Uranylacetat gegeben wurden, dann in sterilem Aqua dest. gespült. Anschließend 5 Min. in Bleinitrat nach Reynolds weiterkontrastiert, darauf nochmals gespült und schließlich getrocknet.

Die Beurteilung der Ultradünnschnitte wurde an einem Elektronenmikroskop (Philips EM 300) durchgeführt. Die Photographien wurden mit Hilfe von Planfilmen erstellt.

2.8. Gewinnung und Herstellung von Präparaten für den immunhistochemischen Nachweis

Da in dieser Arbeit exemplarisch auch auf den immunhistochemischen Nachweis von Nervenfasern eingegangen wird, sei hier im Überblick die Methodik dieser Untersuchungsform dargestellt.

Die Probenentnahme erfolgte zusammen mit denen für die Elektronenmikroskopie wie oben beschrieben. Zur Fixierung wurden die Gewebestücke für 12-48 Std. je nach Beschaffenheit und Materialdicke in 4%igem Formalin gegeben. Hierbei reagieren Aminogruppen mit dem Fixans, eine Denaturierung und die damit verbundene Inaktivierung der Proteine wie bei der Glutaraldehydfixierung wird so ausgeschlossen.

Für die Paraffineinbettung wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach der Entwässerung ist die Behandlung mit einem Intermedium, hier Xylol, erforderlich, da dieses mit Ethanol als auch mit Paraffin mischbar ist. So wurden Reste von Wasser und Alkohol entzogen und das Material dem hydrophoben Einbettmedium zugänglich gemacht. Nach einer ca. zweistündigen Durchtränkung der Proben in geschmolzenem Paraffin (Paraplast Plus 60°C) wurden diese in dafür vorgesehene Einbetträhmchen ausgegossen und auf einer Kühlplatte zügig auf Raumtemperatur abgekühlt. Die erstarrten und versäuberten Paraplastpräparate wurden bis zum Schneiden im Kühlschrank bei 7°C gelagert.

An einem Schlittenmikrotom wurden in einem ersten Schneidedurchgang Schnitte für eine Hämatoxilin-Eosin-Übersichtsfärbung erstellt; in einem weiteren Durchgang die Präparate für die Antikörperaustestung.

2.9. Immunhistologischer Nachweis

Das Neurofilament gehört zu den Intermediärfilamenten des Zytosklettes. Es befindet sich in regelmäßigen Abständen in Perikaryen, Dendriten und Axonen der Nervenzelle und besteht aus drei Polypeptiduntereinheiten, welche sich immunhistochemisch nachweisen lassen.
Die hier verwendete APAAP-Methode ist eine immunenzymatische unkonjugierte Antikörper Enzym-Brückenmethode. Ein Brückenantikörper verbindet den unkonjugierten Primärantikörper, der an der nachzuweisenden antigenen Determinante bindet, mit einem weiteren Antikörper, der sowohl an der Brücke als auch an dem Markerenzym bindet.
Die optimale Antikörperkonzentration wurde in zahlreichen Vorversuchen ausgetestet. Für den monoklonalen Antikörper Anti Neurofilament 200 zeigte sich ein Verhältnis von 1:80, für den Antikörper Anti NF 160 eine Konzentration von 1:40 als optimal. Die Verdünnung erfolgte mit TBS-Puffer (Tris gepufferte physiologische Kochsalzlösung pH 7,5). Die Brückenantikörper rabbit- anti- mouse wurden im Verhältnis 1:100 mit TBS verdünnt, der APAAP- Komplex im Verhältnis 1:200.
Bei der Austestung wurden neben Kontrollpräparaten stets Positiv-, Negativ- und Substitutionskontrollen mitgeführt. Als Positivkontrollen dienten Haut und Lappen-transplantate, als Negativkontrollen wurden Muskel und Leberpräparate benutzt.

Zur Durchführung des Nachweises wurden die entparaffinierten Präparate mit Schweineserum der Konzentration 1:10 vorbehandelt und 10 Min. bei 37° C inkubiert. Nach Spülung mit TBS wurden die jeweiligen Primär-AK aufgetragen und wiederum für 30 Min. inkubiert. In einem weiteren Schritt wurde der Brücken-AK aufgetragen und für 15 Min. in den Brutschrank gegeben. Anschließend wurde der APAAP-Komplex aufgetragen und 15. Min. inkubiert. Die Zwischenspülungen erfolgten jeweils mit TBS. Abschließend wurden die Präparate für 30 Min. in einem abgedunkelten Raum in Substratlösung aufbewahrt. Die Färbung der Schnitte wurde nach Spülung unter fließendem Wasser für 2 Min. in Meyer-Hämalaun-Lösung durchgeführt, erneut gespült und nach Trocknung mit Eukitt eingedeckt.

2.10. Klinische Untersuchung

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die Patienten, die ein Lappentransplantat erhalten haben, postoperativ zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf verschiedene Empfindungsmodalitäten der Haut untersucht. Hierzu gehören die Sensibilitätsparameter Druck, Berührung, Wärme, Kälte, Schmerz, Vibration und Zwei-Punkt- Diskrimination.
Eingangs wurden die Patienten über ihr subjektives Empfinden der Hautsensibilität im transplantierten Areal befragt. Anschließend wurden die unterschiedlichen Qualitäten in folgender Weise geprüft:

- Zwei- Punkt Diskrimination mit Hilfe eines Tasterzirkels
- Vibration mit einer Stimmgabel von 128 und 256 Hz in jeweils drei Durchgängen
- Schmerz mit einer Nadel getestet
- Kälte mit 5° C kaltem Wasser
- Wärme mit 37° C warmen Wasser
- Druck mit einem Wattepellet, zentral als auch peripher ausgeübt
- Berührung mit Semmes-Weinstein Monofilamenten durchgeführt.

Folgende Semmes-Weinstein Monofilamente fanden in der Studie Anwendung:

Haarnummer	Durchmesser [mm]	Länge [mm]	Nominale Kraft [g]	Druck [g/mm^2]
3	0,14	46	0,026	1,7
4	0,14	40	0,034	2,3
5	0,17	46	0,064	2,9
6	0,18	46	0,085	3,3
7	0,20	46	0,145	4,5
8	0,25	46	0,320	6,8
9	0,26	43	0,390	7,3
10	0,32	46	1,1	14,1
11	0,35	46	1,7	17,5
12	0,41	46	3,3	25,0
13	0,45	43	5,1	31,6
14	0,52	43	8,3	39,1
15	0,61	43	17,0	57,8
16	0,65	40	24	72,5
17	0,72	40	34	84,4
18	0,81	40	50	96,1
19	1,01	40	110	137,3

Tab.-Nr. 1: Semmes-Weinstein Monofilamente (Fa. SENSELab® AETHESIOMETER)

Die Monofilamente wurden in waagerechter Position langsam niedergedrückt. Dazu waren drei Intervalle von jeweils 1,5 Sek. erforderlich. Der erste Intervall beinhaltet den Zeitraum von der initialen Berührung bis zum Druck, der Zweite das Halten mit konstantem Druck und schließlich der dritte Intervall das Entfernen mit anschließender Beurteilung vom Patienten. Die Untersuchung wurde in einer ruhigen Umgebung durchgeführt.

2.11. Patienten

In der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Eppendorf wurden 18 Patienten mit einem Lappentransplantat zur plastischen Deckung versorgt und elektronenmikroskopisch untersucht. Davon wurde 14 mal ein Latissimus dorsi-Lappen, zehn gestielt und vier mikrochirurgisch, verwendet. Zwei Patienten erhielten einen gestielten Pectoralis major-Lappen und drei Patienten einen mikrochirurgisch angeschlossenen freien Radialislappen. Bei einem Patienten wurde beides, ein Radialis- und Latissimus dorsi-Lappen, transplantiert. Die Lappengrößen variierten bei dem Latissimus dorsi-Lappen zwischen 24 cm² und 456 cm^2, beim Pectoralis major-Lappen zwischen 128 cm² und 396 cm^2 und beim Radialislappen zwischen 35 cm² und 40 cm^2.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in der Abteilung für funktionelle Anatomie bei Prof. Z. Halata durchgeführt.

Die 18 Patienten, 10 Männer und 8 Frauen im Alter zwischen 11 und 80 Jahren, wurden nach der Primäroperation die oben genannten Untersuchungen in einem Zeitraum von 20 bis zu 1227 Tagen postoperativ durchgeführt. Dieses erfolgte zumeist im Rahmen von Erweiterungs- und Korrekturmaßnahmen.

Bei 10 Patienten (Pat.-Nr.: 2, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 14, 15, 17, 18) wurde ein Plattenepithelkarzinom, nach TNM klassifiziert, festgestellt. Bei 5 dieser Patienten (Pat.-Nr.: 2, 5, 9, 15, 18) wurde der Tumor erst im Stadium T4 diagnostiziert. Ein Patient (Pat.-Nr.: 6) wurde mit Stadium T3 und 4 Patienten mit Stadium T2 befundet.
Jeweils ein Patient war an einem Osteosarkom (Pat.-Nr.: 3), hellzelligen odontogenen Karzinom (Pat.-Nr.: 10), einem Fibrosarkom (Pat.-Nr.: 11) sowie an einem brachiogenen Karzinom (Pat.-Nr.: 16) erkrankt.
Zwei Patienten (Pat.-Nr.: 1, 13) hatten schwere Verbrennungen erlitten.

Sechs Patienten wurden präoperativ, 4 Patienten postoperativ bestrahlt. Bei 2 Patienten fand vor mehr als 20 Jahren eine Radiatio statt.

Zehn Patienten konsumierten täglich zwischen 10 g und 150 g Alkohol und rauchten zwischen 0,5 und 3 Packungen Zigaretten pro Tag.

2.12. Geräte

Das Semidünnschnittmikrotom Mikrom Heidelberg HM 350 wurde von der Firma Mikrom Laborgeräte in 69091 Walldorf bezogen.

Der Knife Maker Type 7801 A wurde von der Firma LKB Produkter in Schweden bezogen.

Das Fräsgerät TM 60 wurde von der Firma C. Reichert in Österreich bezogen.

Der Brutschrank wurde von der Firma Memmert GmbH & Co KG in Schwabach bezogen.

Der Objektträgerstrecktisch bis 100° C wurde von der Firma Nagel GmbH Laborgeräte in 23210 Kiel bezogen.

Die Lymphbecken klar oder schwarz wurden von der Firma Assistent Glaswarenfabrik K. Hecht in 87401 Sondheim i. d. Rhön bezogen.

Das Elektronenmikroskop Phillips 300 wurde von der Firma Phillips bezogen.

Das Lichtmikroskop CH 40 stammt von der Firma Olympus.

Das Ästhesiometer (Semmes-Weinstein Monofilamente, Haar 3-19, SenseLab®) stammt von der Firma Somedic Sales AB, Box 194, 24222 Hörby, Schweden.

SenseLab® , Östemarksgaten 27, 12342 Farsta, Schweden.

2. 13. Materialien

Von der Firma Serva Feinbiochemica GmbH, 69115 Heidelberg wurden folgende Materialien bezogen:
Glycidether for electron mikroskopy Art. 21045
DDSA (2- Dodecentylsuccinic acid anhydride) Art. 20755
MNA (Methylnadic anhydride) Art. 29452
DePeX (Objekteindeckmaterial)

Von der Firma Riedl-de Haen, 30926 Seelze wurde 100% Alkohol rein bezogen.

Von der Firma Braun, 34209 Melsungen wurde Aqua ad injectabilia bezogen.

Von der Firma Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, 34295 Edermünde wurden Objektträger (76x26 cm) bezogen.

Von der Firma Marienfeld, Germany wurden Deckgläser No. 1 (26x60) bezogen.

Von der Firma Chroma Gesellschaft, 73160 Köngen wurde Toluidin 1% bezogen.

Von der Firma Merck, 64271 Darmstadt wurden bezogen:
Pyronin Art. L 627518
Glutardialdehydlösung 25%
Natriumphosphat-Puffer
Uranylacetat
Bleicitrat
Natriumtetraborat-10-hydrat (Borax)

Die Messer für Ultradünnschnitte, Diatom Ultra 45° stammen von der Firma Diatom in Fort Washington (7.0 Box 125).

Von der Firma Plano GmbH, 35578 Wetzlar wurden die Grids Typ G200 P-C3 bezogen.

Die verwendeten Antikörper stammen von der Firma Dianova, 20354 Hamburg.

3.0. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der klinischen Untersuchung

Achtzehn Patienten dieser Studie wurden im Rahmen von Nach- und Kontrolluntersuchungen auf die verschiedenen Empfindungsmodalitäten hin untersucht.

Zur Auswertung kamen hier die Sensibilitätsqualitäten Wärme, Kälte, Schmerz, 128-Hz-Vibration sowie der Semmes-Weinstein Monofilament Test. Dabei wurde das Transplantatgebiet in fünf Hautareale unterteilt. Die Unterteilung erfolgte nach Hoppenreijs (s. Abb. 5).

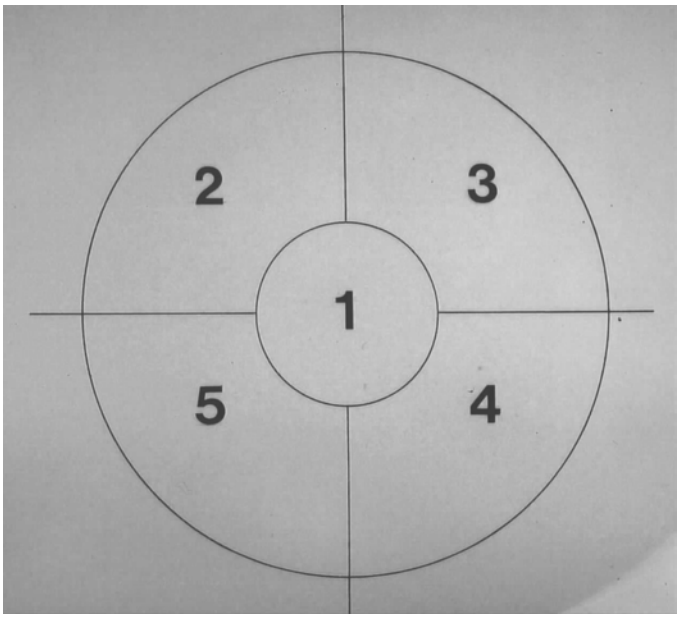

Abb.5: Einteilung nach Hoppenreijs et al. (1990)

Die 14 untersuchten Latissimus dorsi-Lappen wiesen durchschnittlich eine Transplantatgröße von 160,2 cm^2 (24-360 cm^2) auf und wurden in Zeiträumen zwischen 3 und 83 Monaten (Mittelwert: 21,7 Mon.) untersucht.

Bei fünf dieser Patienten kehrten alle hier untersuchten Qualitäten zurück. Vier davon (Pat.: 1, 2, 11, 18) gaben zwischen drei und fünf positive Hautareale an, wobei die Prüfungen mit den Semmes-Weinstein Monofilamenten Werte zwischen fünf (Haarnr.: 3) und 18 (Haarnr.: 9) ergaben. Ein Patient (Pat.: 14) konnte die 128-Hz-Vibration in zwei Arealen, Wärme und Kälte nur in einem Hautareal jedoch Schmerz in fünf Arealen verspüren.

Bei sieben Latissimus dorsi lappentransplantierten Patienten (Pat.: 3, 5, 6, 7, 8, 15, 16) konnten ein oder mehr Qualitäten gar nicht wahrgenommen werden. Die Werte mit den Semmes-Weinstein-Monofilamenten lagen zwischen 23 (Haarnr.: 10) und 90 (Haarnr.: 15) (Mittelwert: 22, 47).

Zwei Patienten (Pat.: 12, 17) zeigten einen kompletten Sensibilitätsverlust.

Die drei untersuchten Patienten (Pat.: 1a, 4, 10), die ein Radialislappen erhalten hatten, konnten alle Qualitäten in allen fünf Hautarealen mit einer positiven Reaktion vermerken. Die durchschnittliche Transplantatgröße betrug 32 cm^2 (21- 40 cm^2) und lag in einem Untersuchungszeitraum von 11,67 Monaten (11-12 Mon.) postoperativ.

Für die Patienten mit einem Pectoralislappen-Transplantat wurden im Rahmen dieser Studie keine klinischen Werte erhoben.

Bis auf die o.g. zwei Patienten mit kompletten Sensibilitätsverlust gaben alle Patienten an, dass die Rückkehr der Gefühlsempfindung eher von peripher bzw. diffus vom Lappenbereich aus beginnen und nicht von zentralen Anteilen des Transplantates.

Zehn der untersuchten Patienten (Pat.: 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 16, 17, 18) konsumierten täglich zwischen 10g und 150g Alkohol.

Obwohl es keine signifikanten Unterschiede gibt, zeigt sich eine Tendenz in der Hierarchie der Wiedererlangung der Sensibilität dahingehend, dass die Schmerzempfindung am schnellsten zurückgewonnen wird.

Patient / Nr.	Lappenart	Semmes-Weinstein	Wärme	Kälte	Schmerz	128-Hz Vibration	Monate post-OP	Hautareal [cm^2]
1. A.A.E.	Lat. dorsi- Lappen	6 (4)	4	4	4	4	9	252
1a. A.A.E	Radialislappen	5 (5)	5	5	5	5	12	40
2. B.I.	Lat. dorsi- Lappen	7 (3)	3	3	3	3	12	128
3. B.T.	Lat. dorsi- Lappen	38 (3)	3	0	3	3	14	308
4. G.H.	Radialislappen	4 (5)	5	5	5	5	12	35
5. H.H.	Lat. dorsi- Lappen	38 (4)	1	0	1	0	38	319
6. H.W.	Lat. dorsi- Lappen	23 (5)	0	0	1	2	47	24
7. J.H.	Lat. dorsi- Lappen	53 (5)	5	0	5	0	36	150
8. K.A.	Lat. dorsi- Lappen	38 (2)	0	3	3	2	20	360
10. M.J.	Radialislappen	5 (5)	5	5	5	5	11	21
11. M.U.	Lat. dorsi- Lappen	18 (5)	5	5	5	5	15	110
12. N.H.D.	Lat. dorsi- Lappen	(0)	0	0	0	0	14	105
14. P.E.	Lat. dorsi- Lappen	5 (5)	1	1	5	2	12	108
15. R.G.	Lat. dorsi- Lappen	90 (1)	0	0	1	0	12	104
16. R.M.	Lat. dorsi- Lappen	90 (4)	4	4	2	0	3	153
17. Z.W.	Lat. dorsi- Lappen	(0)	0	0	0	0	83	126
18. Z.R.	Lat. dorsi- Lappen	6 (4)	4	4	4	5	11	156
Mittelwert		22,47(3)	2,65	2,29	3,06	2,41	21,24	147,00

Tab. Nr. 2.: Übersicht über die erzielten Resultate der klinischen Sensibilitätsprüfungen

In den Spalten für die verschiedenen Sensibilitäten ist jeweils die Anzahl der positiven Sektoren angegeben, wobei die Hautoberfläche in fünf Sektoren unterteilt wurde. In der Spalte Semmes-Weinstein ist das zuletzt gefühlte Semmes-Weinstein Monofilament in g/mm^2 angegeben. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der positiven Hautsektoren an.

3.2. Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Bei den untersuchten Patienten wurden neben Biopsien für die Elektronenmikroskopie auch Proben für immunhistochemische Untersuchungen entnommen. Dieses wurde während der Primäroperation bzw. im Rahmen der Folgeoperationen durchgeführt. In dieser Studie sollen nur anhand von ausgewählten Beispielen die immunhistologischen Ergebnisse dargestellt werden. Es handelt sich dabei um die Untersuchung auf Neurofilament durch die APAAP-Methode mittels der Antikörper NF 200 und NF 160.

Von einem Patienten werden die Untersuchungsergebnisse der Biopsien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lappentransfer gezeigt. Anhand eines anderen Patientenfalls werden die unterschiedlichen Färbeintensitäten der beiden Antikörper veranschaulicht.

Im ersten Fall (Abb. 6) handelt es sich um einen Patienten mit Radialislappentransplantat nach Verbrennungen. Das Material wurde 45 Tage postoperativ bei einer Lappenkorrektur entnommen. Das Präparat zeigt einen oberflächlich liegenden Nerv in der Peripherie in unmittelbarer Relation zur Kutis, wobei die Immunreaktion mit NF 160 nur schwach positiv ausfiel.

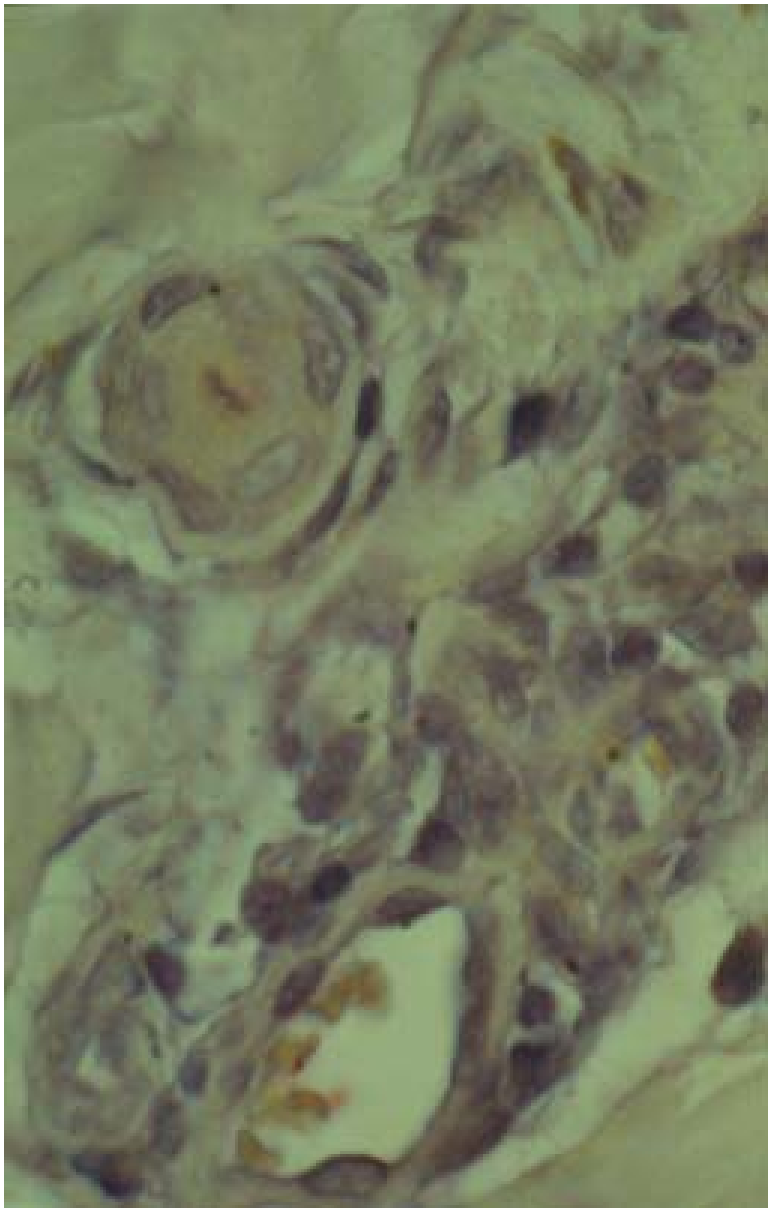

Abb.6: V73/96 Vergrößerung x100 (NF 160), schwach positive Reaktion
Pat.: A.A.E., 11 Jahre, männlich, Verbrennung, Radialislappen

Ein weiteres Präparat (Abb. 7 u. 8) zeigt ein schwach gefärbtes Nervenbündel umgeben von mehreren mittelgroßen Gefäßanschnitten (Venen) aus dem Randgebiet des Lappens. Die Entnahme erfolgte 65 Tage postoperativ.

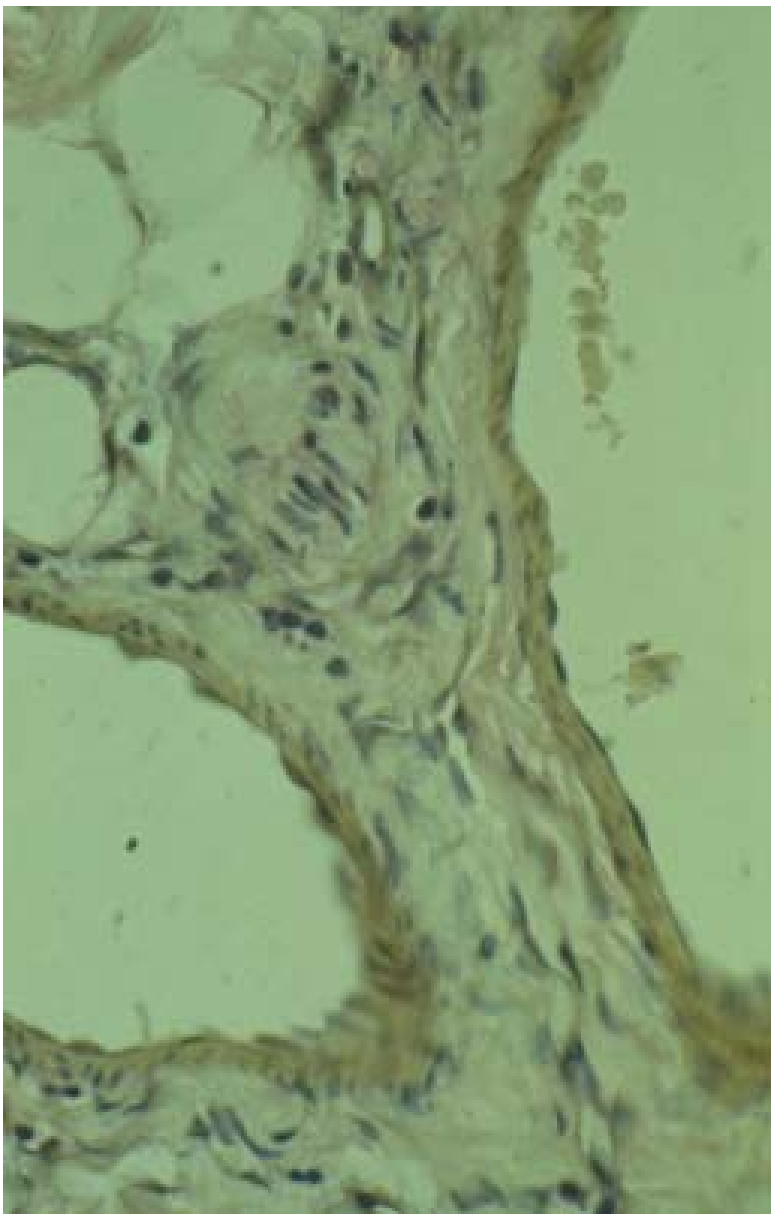

Abb. 7: V5/97 Vergrößerung x25 (NF 160), schwach positive Reaktion
Pat.: A.A.E., 11 Jahre, männlich, Verbrennung, Radialislappen

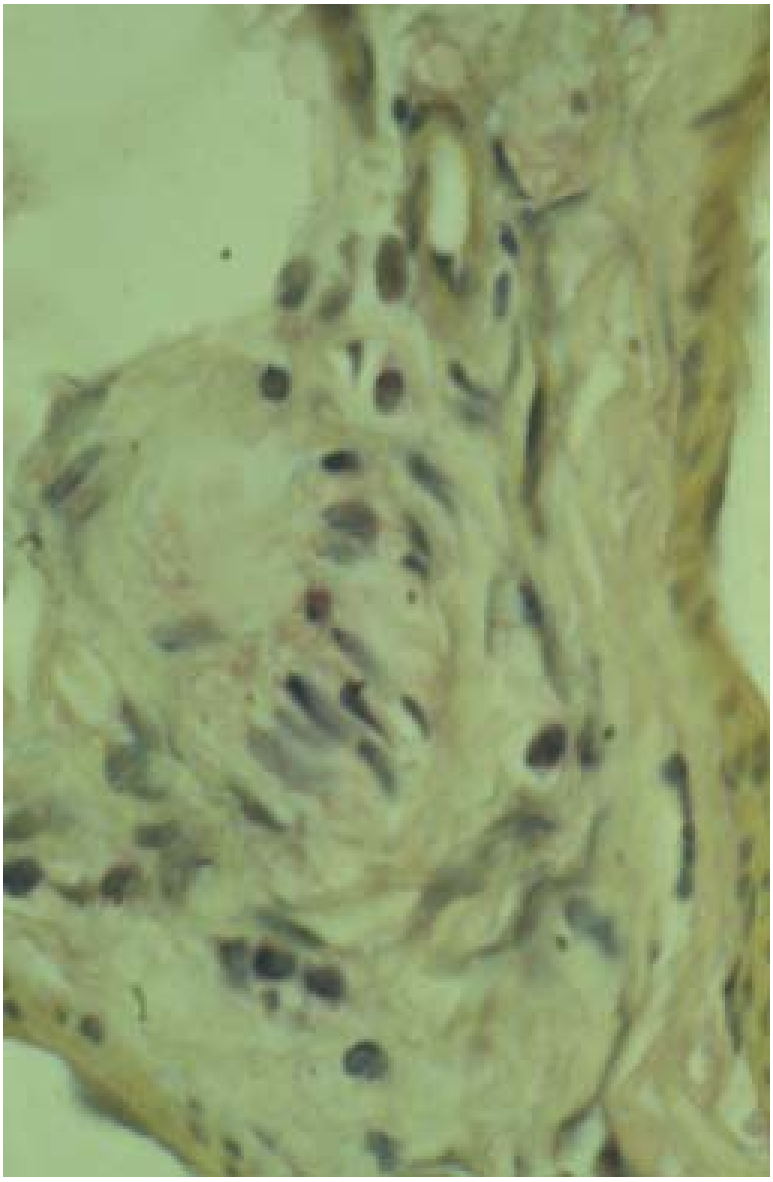

Abb. 8: V5/97 Vergrößerung x100 (NF 160), schwach positive Reaktion
Pat.: A.A.E., 11 Jahre, männlich, Verbrennung, Radialislappen

In zentralen Anteilen des Transplantates konnten keine neuronalen Strukturen entdeckt werden. Dieses deckt sich mit den klinischen Angaben des Patienten, der eine Gefühlsarmut im Zentrum gegenüber den peripheren Anteilen beschrieb.

Im zweiten Fallbeispiel handelt es sich um einen 63-jährigen Patienten, bei dem ein Plattenepithelkarzinom im Stadium T4 diagnostiziert wurde. Nach Tumorresektion wurde ein gestielter Pectoralis major-Lappen in den Defekt verlagert. Die Probenentnahme erfolgte bei der Primäroperation.

Zur Dokumentation der unterschiedlichen Färbeintensität mit der APAAP-Methode wurde die Immunreaktion jeweils mit dem Antikörper NF 160 und NF 200 durchgeführt (Abb. 9-11).

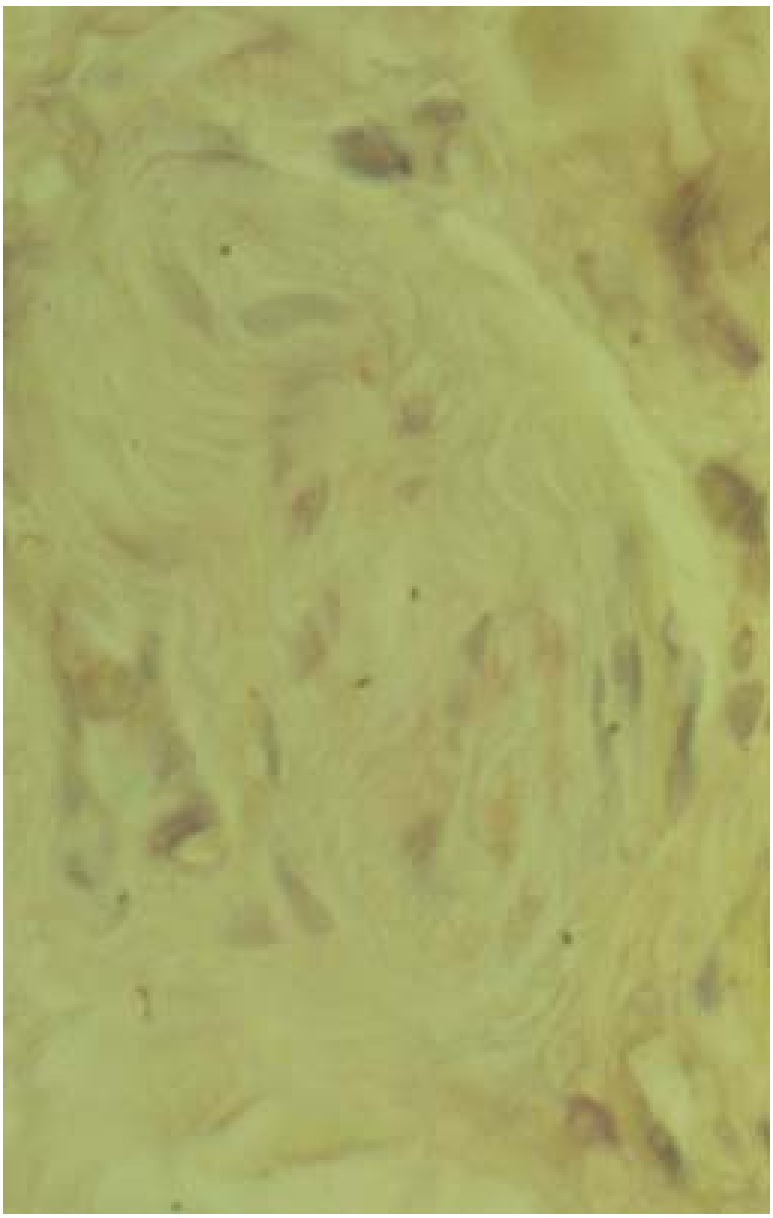

Abb. 9: V29/96 Vergrößerung x100 (NF 160), schwach positive Reaktion
Pat.: K.F.J., 63 Jahre, männlich, Plattenepithelkarzinom, gestielt. Pectoralis major-Lappen

Die Färbeintensität der Reaktion mittels Antikörper gegen das Neurofilament 200 zeigt sich stets deutlich intensiver als die bei dem Antikörper gegen Neurofilament 160 (s. Abb. 9 und 10).

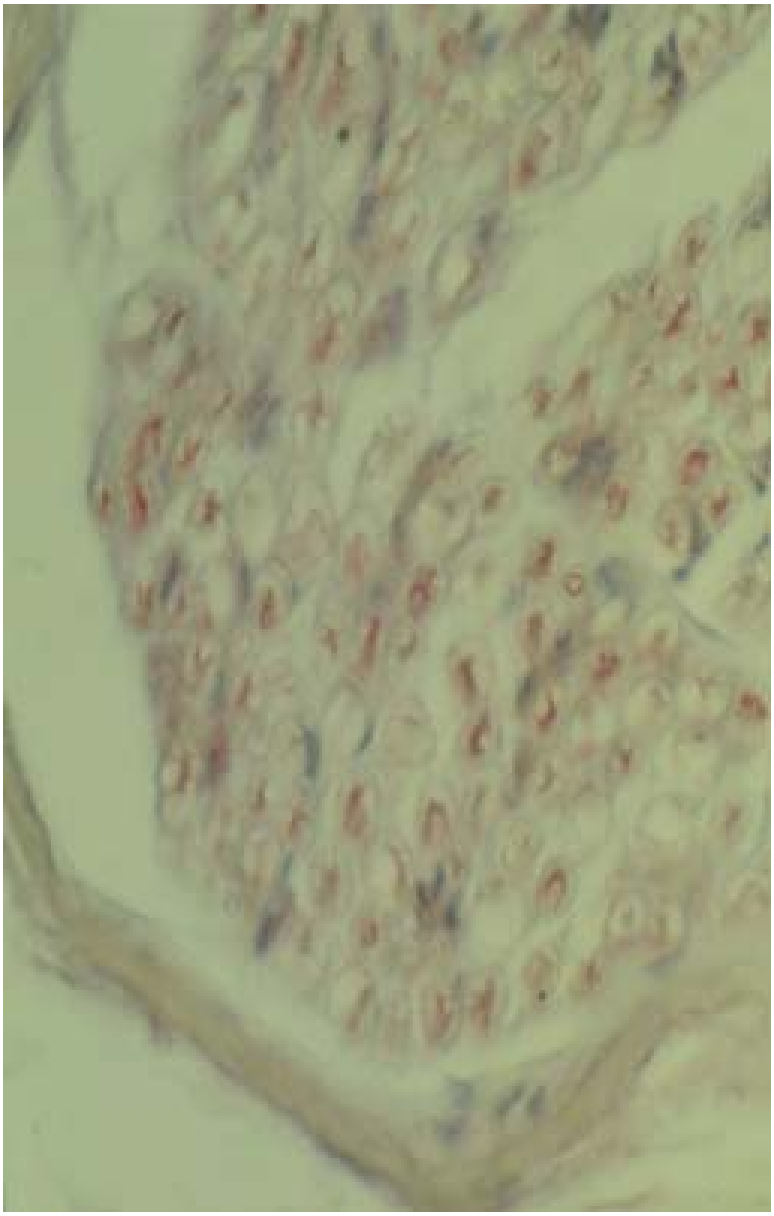

Abb.10: V29/96 Vergrößerung x25 (NF 200), stark positive Reaktion
Pat.: K.F.J., 63 Jahre, männlich, Plattenepithelkarzinom, gestielt. Pectoralis major-Lappen

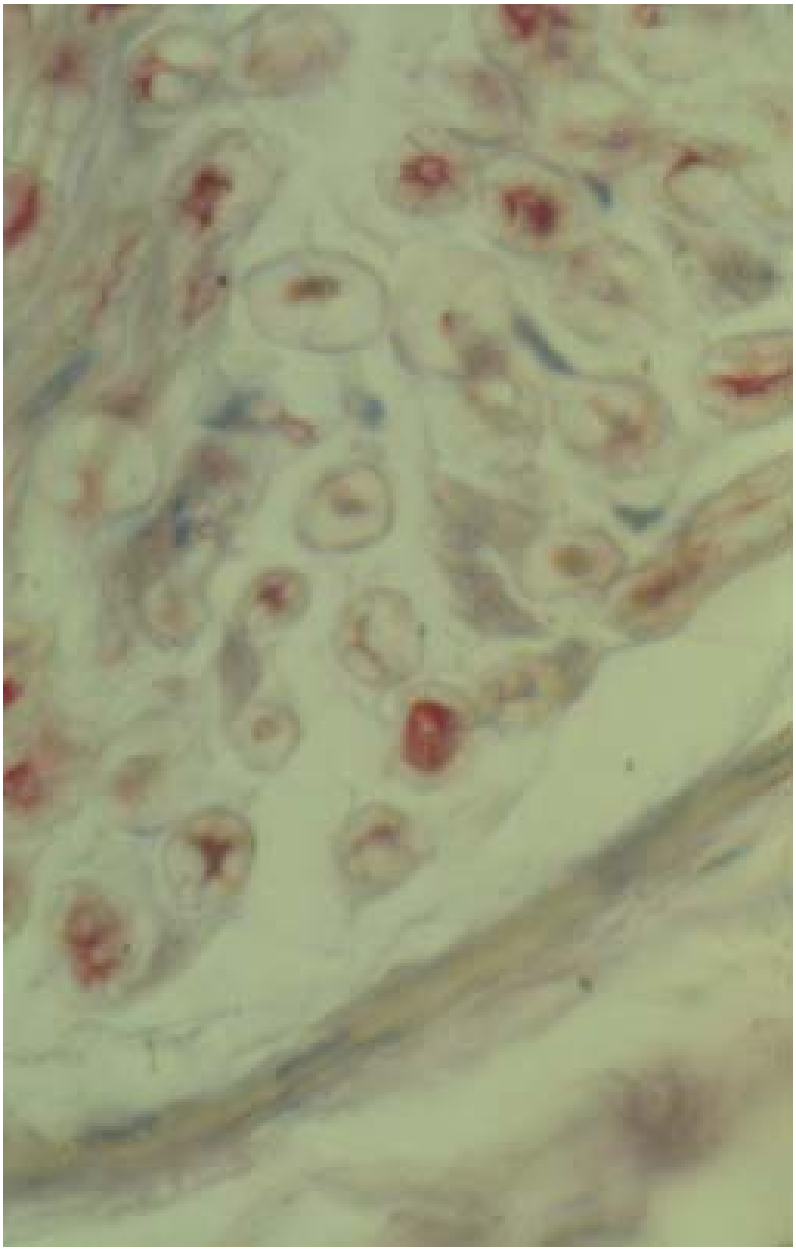

Abb. 11: V29/96 Vergrößerung x100 (NF 200), stark positive Reaktion

Pat.: K.F.J., 63 Jahre, männlich, Plattenepithelkarzinom, gestielt. Pectoralis major-Lappen

3.3. Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen

Abb. 12: V 55/96 Vergrößerung x3900 . Patient R.M. intraoperativ. Markhaltige und marklose Nerven. Gestieltes Musculus latissimus dorsi-Transplantat.

A- Axon für Vater-Pacinische-Körperchen (?)

🡻- Schmidt-Lantermannsche Einkerbung

✸- markhaltige Axone (A-delta)

Abb. 13: V55/96 Vergrößerung x15660. Patient R.M. intraoperativ. Markhaltige und marklose Nerven in einer Detailvergrößerung aus Abb. 12 unten links. Gestieltes Musculus latissimus dorsi-Transplantat.

1- Perineurium

2- marklose Nervenfasern (C-Fasern)

3- markhaltige Axone (Haarfollikel)

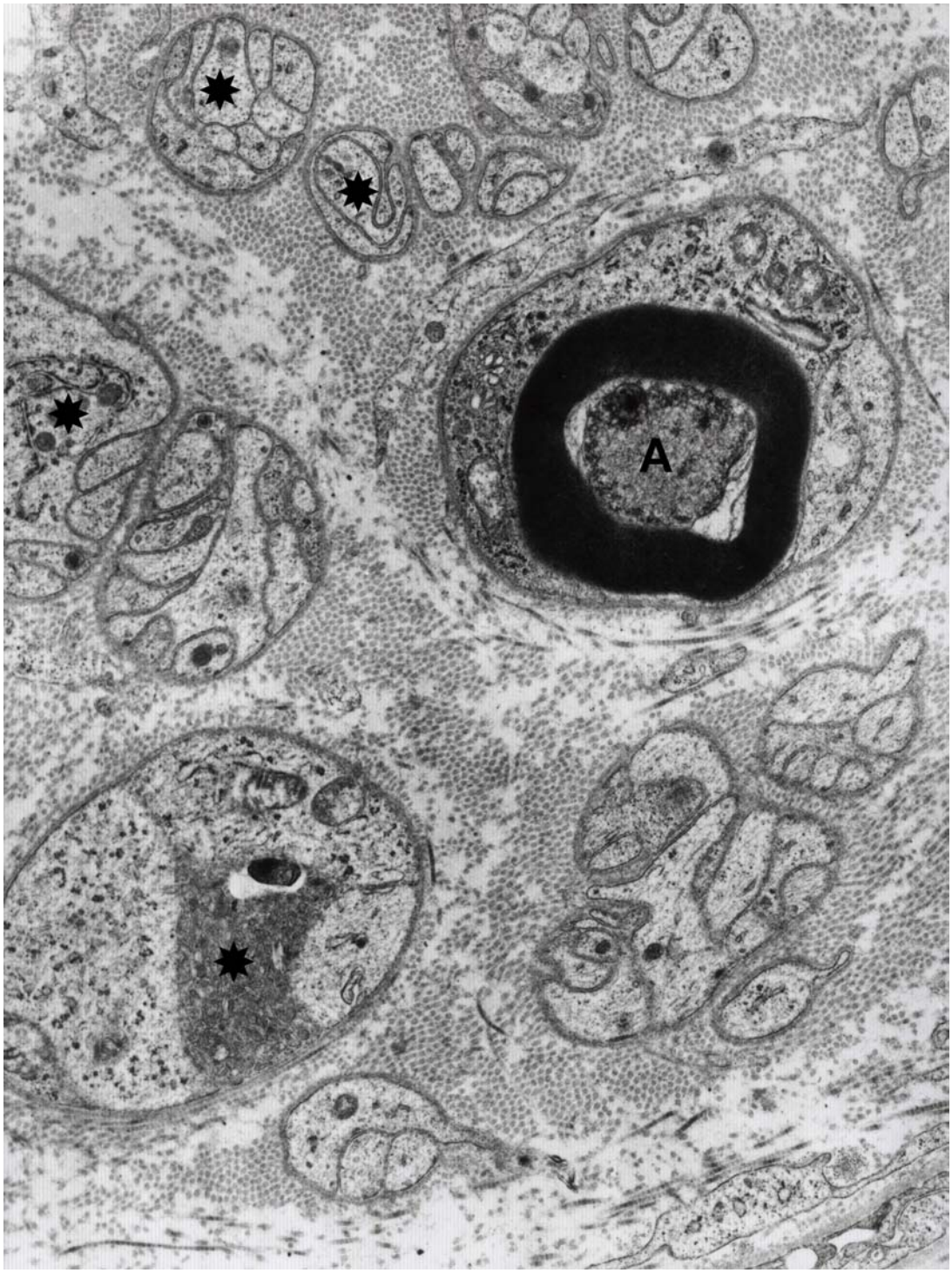

Abb. 14: V32/96 Vergrößerung x17000. Patient K.F.J. drei Wochen postoperativ. Markhaltige und marklose Nerven. Gestieltes Musculus pectoralis major-Transplantat.

A- Axon mit Markscheide

✸- marklose Axone

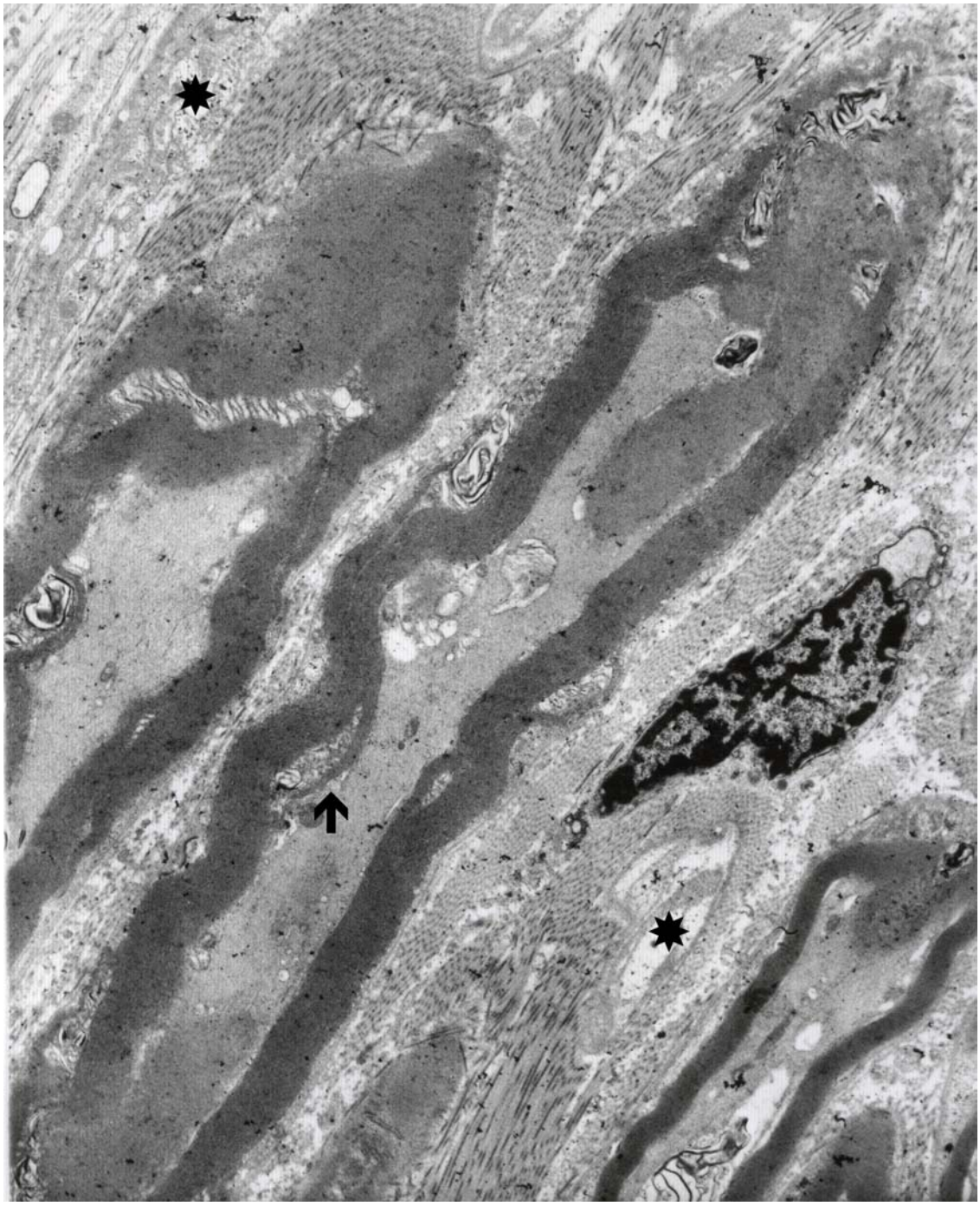

Abb.15: V1/99 Vergrößerung x7300. Patient P.E. vier Monate postoperativ. Myelinisierte Nervenfasern im Längsschnitt. Gestieltes Musculus latissimus dorsi-Transplantat.

↑- Schmidt-Lantermannsche Einkerbung

✸- marklose Axone

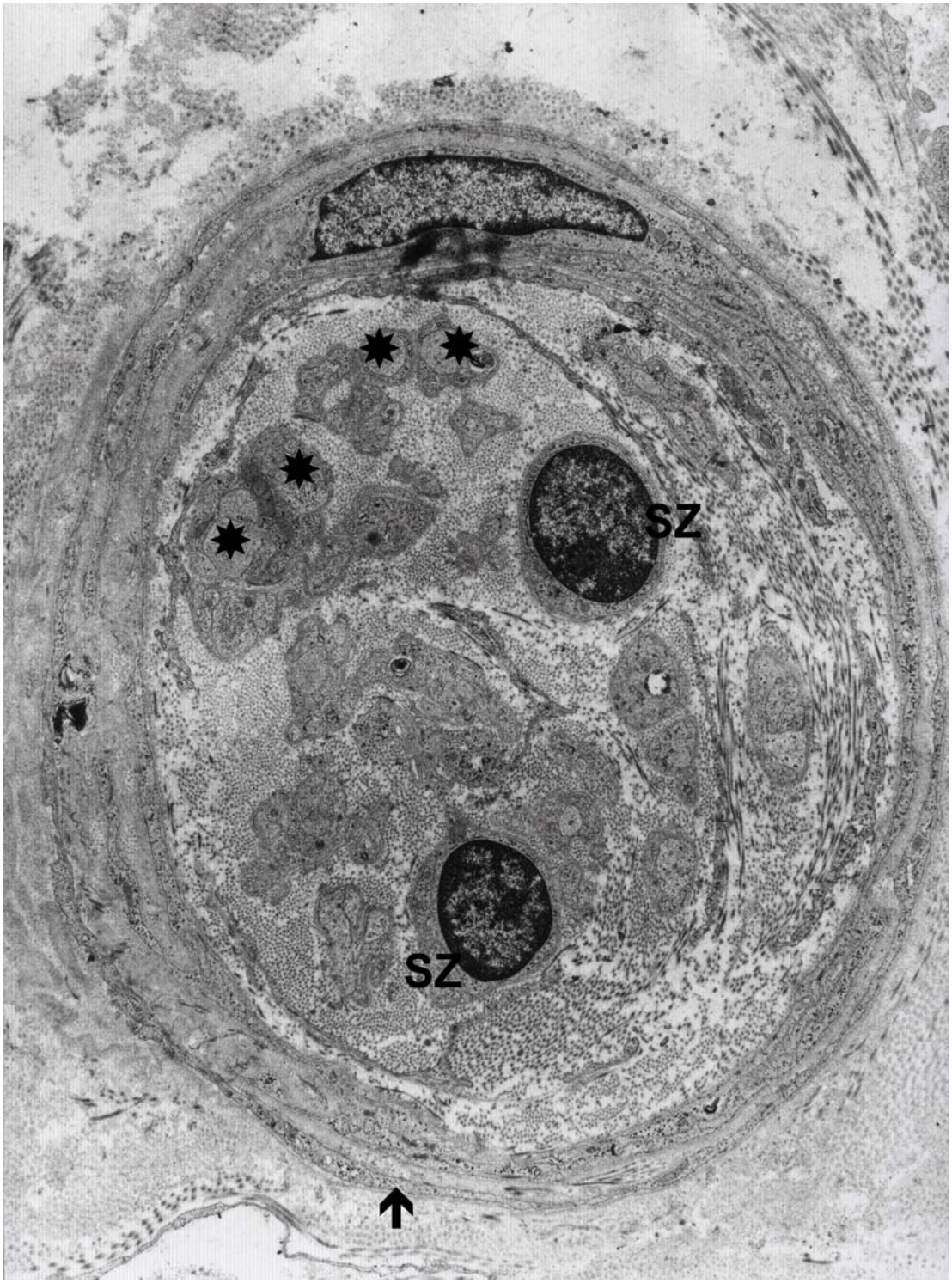

Abb. 16: V83/98 Vergrößerung x8000. Patient M.U. sechs Monate postoperativ. Kleiner peripherer Nerv mit marklosen Axonen. Gestieltes Muskulus latissimus dorsi-Transplantat.
SZ- Schwannsche Zelle
✸- marklose Axone
🡅- Perineurium

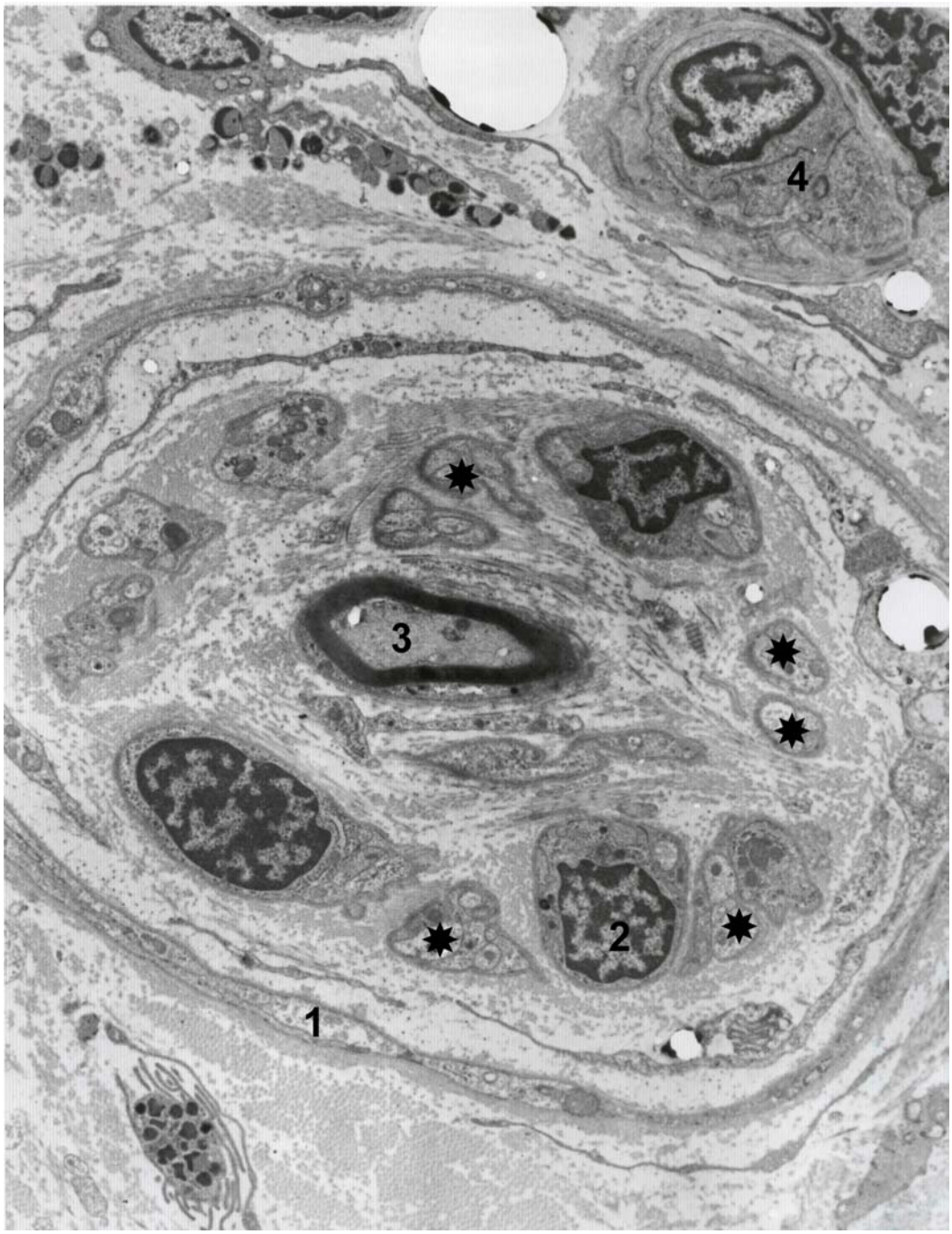

Abb.17: V57/97 Vergrößerung x7040. Patient A.A.E. sieben Monate postoperativ. Peripherer Nerv aus dem Kinnbereich. Freies Musculus latissimus dorsi-Transplantat.

1- Perineurium

2- Schwannsche Zelle mit marklosen Axonen

3- markhaltige Axone

✸- marklose Axone

4- Blutkapillare

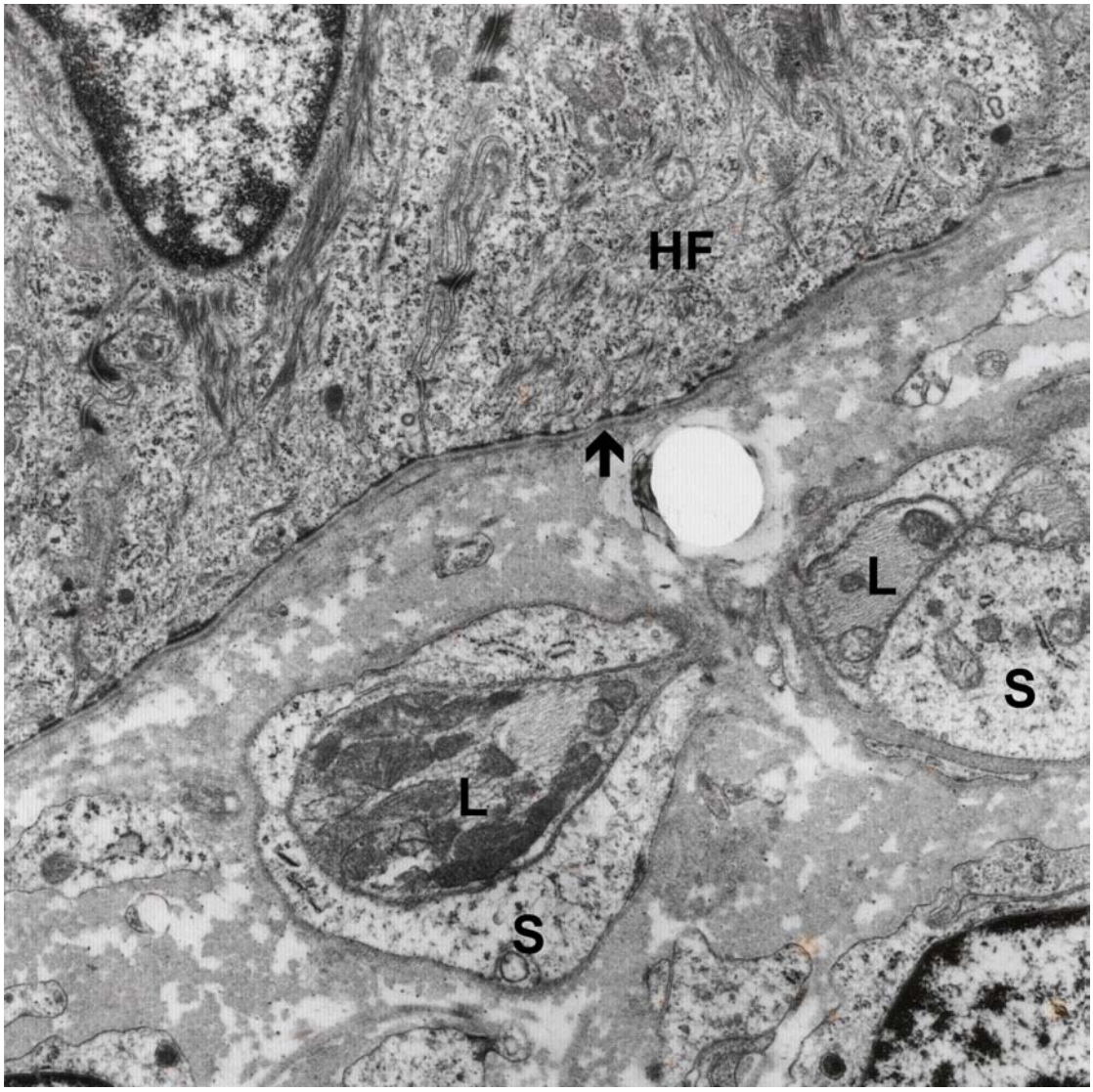

Abb.18: V57/97 Vergrößerung x7040. Patient A.A.E. sieben Monate postoperativ. Lanzettenförmige Nervendigungen (schnell auf Druck adaptierende Mechanorezeptoren). Im oberen Bereich Haarfollikel. Freies Musculus latissimus dorsi-Transplantat.

HF- Haarfollikel

L- Lanzettenförmige Nervendingung

S- terminale Schwannsche Zelle

↑- Basallamina der Haarfollikel

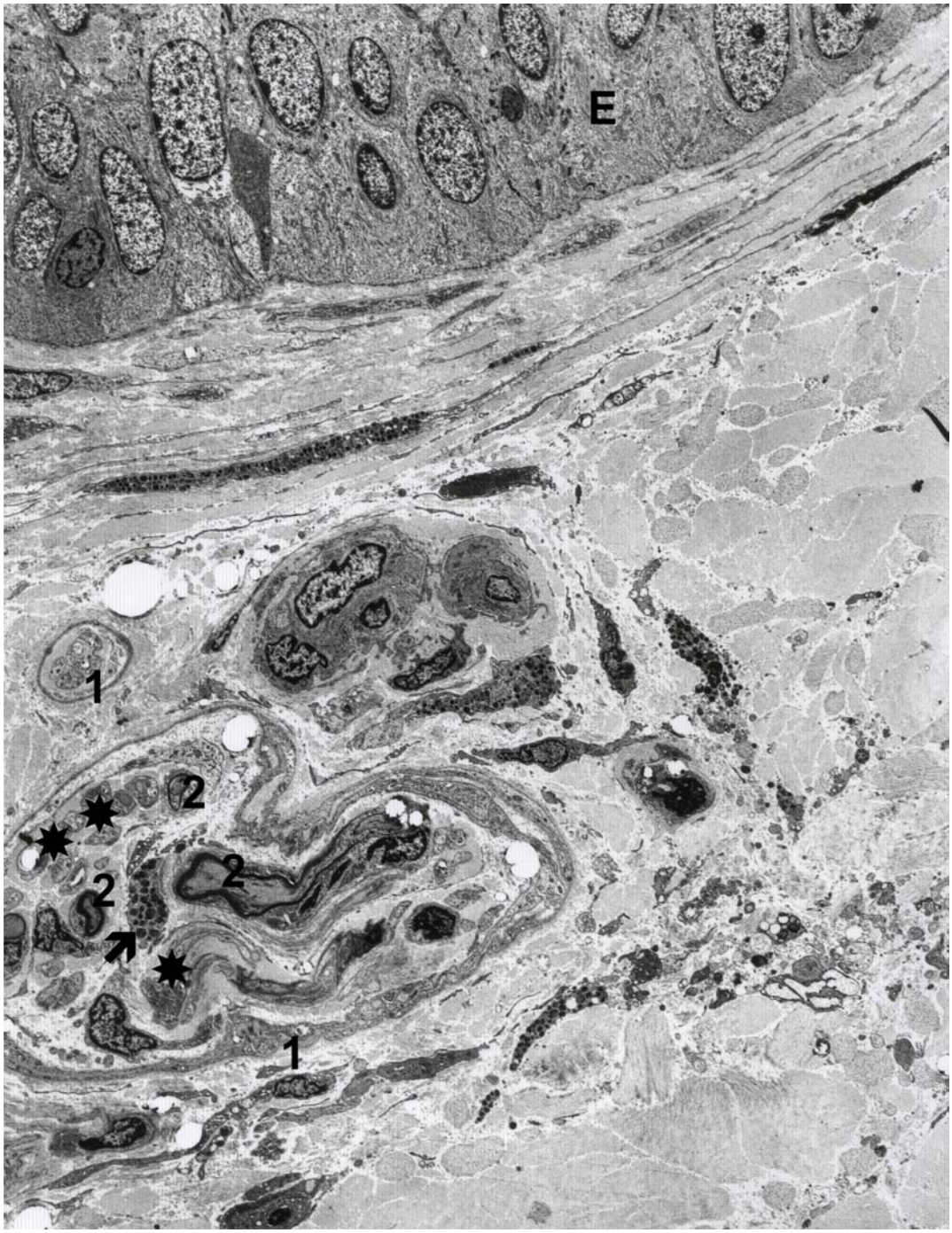

Abb.19: V57/97 Vergrößerung x7040. Patient A.A.E. sieben Monate postoperativ. Nerv direkt unterhalb des Epithels. Freies Musculus latissimus dorsi-Transplantat.

E- Epithel

1- Perineurium

2- markhaltige Axone

✸- marklose Axone

🡅- Mastzelle

Abb.20: V 56/97 Vergrößerung x8000. Patient G.H. acht Monate postoperativ. Peripherer Nerv. Freies Radialislappentransplantat.

A- markhaltiges Axon mit Markscheide

F- Fibroblast mit Endoneurium

Abb.21: V29/98 Vergrößerung x7200. Patient J.H. 25 Monate postoperativ. Ausschließlich marklose Nerven. Gestieltes Musculus latissimus dorsi-Transplantat.

↑- Perineurium

✸- marklose Nerven

Abb.22: V29/98 Vergrößerung x15500. Patient J.H. 23 Monate postoperativ.

Detailvergrößerung aus der Abb. 21. Gestieltes Musculus latissimus dorsi-Transplantat.

✸- marklose Axone

SZ- Schwannsche Zelle

🡅- Perineurium

4.0. Diskussion

4.1. Klinischer Teil

Die postoperative Reinnervation im Transplantatgebiet wurde von vielen Arbeitsgruppen untersucht und in der Literatur kontrovers diskutiert (Baumann et al. 1996, Bootz et al. 1995, Dabb und Conklin 1981,Vesper et al. 2002, Vriens et al. 1996). Die Wiederkehr der sensiblen und motorischen Fähigkeiten im Transplantat werden scheinbar von vielen unterschiedlichen Faktoren beeinflußt, wie Transplantatgröße, Grunderkrankung und Alter. So zeigten Kinder deutlich bessere Ergebnisse in den untersuchten Modalitäten (Vesper et al.1999). Auch andere Arbeitsgruppen wie Petrosino et al. (1982) und Vriens et al. (1996) konnten dieses bei jüngeren Patienten feststellen.

Eine Quantifizierung der verschiedenen untersuchten Sensibilitäten scheint problematisch. Die klinisch oft angewandten einfachen Untersuchungsmethoden, wie Nadeln, Watteträger, temperiertes Wasser, Tasterzirkel und Stimmgabel sind von der Compliance des Patienten und von der vorhandenen Erfahrung des Untersuchers abhängig (Noever et al. 1986).

Die Semmes-Weinstein Monofilamente sind ein etabliertes manuelles Standardverfahren, das auch eine gewisse Quantifizierung der Ergebnisse zuläßt und gegenüber der Zwei-Punkt Diskriminierung als überlegen gilt (Westermark 2001). Mit dieser Methode können die langsam adaptierenden Nervenfasern und Rezeptorgruppen untersucht werden (Posnick et al. 1990, Weinstein 1993).

In der Literatur wird jedoch immer wieder belegt, dass sich die protopathische und epikritische Sensibilität nicht gleichzeitig und nicht in gleichem Maße wieder einstellt (Orgel et al. 1972, Erdogan 1989, Rautio 1990, Engin et al. 1996). Es zeigt sich eine gewisse Reihenfolge, wobei zunächst Schmerz- und Druckempfinden, später Kälte- und Vibrationsempfinden wiedererlangt werden (Terzis et al.1978, Karanth et al. 1990).

Detaillierte Untersuchungen zur Reinnervation wurden schon in den dreißiger Jahren von Kredel und Evans (1933) und Davis (1934) durchgeführt. Sie beobachteten eine Reinnervation vom proximalen Nervenstumpf ausgehend und nach distal fortschreitend. Dabei wurden zuerst die Ränder und zum Schluß das Zentrum innerviert. Erste Reaktionen auf Druck und Berührung wurden schon nach vier bis fünf Wochen festgestellt. Mit der Abhängigkeit von anderen Faktoren wie z.B. Lappenart, Lokalisation, Bestrahlung oder Vorschädigung kann die Reinnervation auch Jahre dauern und die Sensibilität komplett oder nur teilweise wiederkehren (Noever et al. 1986, Turkoff et al. 1993).

In jüngeren tierexperimentellen Studien konnten diese Ergebnisse histologisch verifiziert werden (Karanth et al. 1990, Manek et al. 1993). Karanth et al. (1990) stellten in ihrer Untersuchung fest, dass die Regeneration von sensiblen gegenüber vegetativen Nerven um Tage bis Wochen schneller erfolgt.

Die Reinnervation von Lappentransplantaten wird scheinbar von vielen Faktoren beeinflußt. Einen maßgeblichen Einfluß hat die Fläche des Transplantates. Mit der Größe bis 200 cm² konnten die besten Ergebnisse für Vibration, Kälte, Wärme und Schmerz erzielt werden. Ab 300 cm² Transplantatfläche zeigten sich schlechtere Ergebnisse gegenüber kleineren Lappentransplantaten (Vesper et al. 2002b). Allerdings ergaben sich bei der Untersuchung mit Semmes-Weinstein Monofilamenten annähernd gleiche Empfindungsschwellen. Entsprechende Ergebnisse hatte auch Close et al. (1995) erarbeitet. So zeigten klinische Untersuchungen für das Radialislappentransplantat bessere Resultate gegenüber dem Latissimus dorsi-Lappentransplantat (Vesper et. al 2002a).

Ebenso sind diese Ergebnisse auch in Abhängigkeit von der Grunderkrankung zu betrachten. So ergaben sich die besten Ergebnisse für Semmes-Weinstein Monofilamente bei Patienten mit Verbrennungen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich hier um junge Patienten (s. Pat.-Nr.1) handelt (Vesper et al. 2000). Jüngere Patienten weisen grundsätzlich eine bessere Sensibilität als ältere auf (Almquist und Eeg-Olofson 1970, Petrosino et al. 1982). Bei einem direkten Vergleich der Lappentransplantate zum Alter des Patienten erzielten Patienten jünger als 20 Jahre bei allen Empfindungsmodalitäten die mit Abstand besten Ergebnisse (Vesper et al. 1999, 2001). Auch Vriens et al. (1996) zeigten, dass jüngere Patienten in allen Modalitäten

bessere Resultate erzielten. Die schlechtesten Untersuchungswerte erzielten die Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom, welches aber zu den Erkrankungen des höheren Lebensalters zählt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen können diese Ergebnisse hier nur qualitativ durch Nachweis der anatomischen Strukturen belegen. Eine quantitative Aussage lässt sich nicht treffen und bedarf weiterer detaillierter Untersuchungen.

Bei der nervalen Reanastomosierung des Transplantates gehen die wissenschaftlichen Auffassungen auseinander. Verschiedene Autoren (Boyd et al. 1990 und 1994, Dubner und Heller 1992, Urken et al. 1990 und 1992) forderten in den letzten Jahren bei Versorgung tumorbedingter Defekte mit fasziokutanen Transplantaten in der Mundhöhle und im Oropharynx die Anastomosierung, z.B. des Nervus cutaneus antebrachii an sensible Nerven des Kopf-Hals Bereiches. Andere Autoren (Hermanson et al. 1987, Manek et al. 1993, Turkof et al. 1993, Baumann et al. 1996) halten auf Grund ihrer Forschungsergebnisse einen mikrochirurgischen Nervanschluß für überflüssig. In den vorliegenden klinischen und unterschiedlichen histologischen Beobachtungen ließ sich zwischen Qualität und Quantität der Reinnervation des Radialislappen kein Unterschied zwischen Transplantaten mit und ohne neuronale Anastomosierung erkennen.

Ein interessanter Aspekt bezüglich der Sensibilitätswiederkehr ist der Alkoholkonsum der Patienten. Überraschenderweise zeigen die Lappentransplantate bei mittleren (≤ 50g/Tag) und hohem Alkoholkonsum bessere Ergebnisse bezüglich der Semmes-Weinstein Monofilamente und Schmerz. Dieses läßt sich nur mit Vorsicht werten, da die Angaben subjektiv sind, auch wenn bei suspekten Angaben ein zweiter Untersucher hinzugezogen wurde. Aussagen anderer Arbeitsgruppen zu dieser Problematik bestehen nicht.

Übereinstimmend mit der vorliegenden Literatur (Manek et al. 1993, Katou et al. 1995, Vriens 1996) zeigt sich in peripheren Anteilen des Transplantates in allen Modalitäten bessere Ergebnisse als in zentralen Bereichen.

4.2. Histologischer Teil

Im histologischen Teil dieser Studie wurden die Lappentransplantate elektronenmikroskopisch als auch immunhistochemisch untersucht.

Bei der immunhistochemischen Methode unter Verwendung von Antikörpern gegen Neurofilament 100 und 200 ergaben sich bekannte Problematiken, wie z. B. falsch positive Reaktionen oder Artefakte. Diese konnten durch Paralleltestung am N. ischiadicus vermindert werden (Vesper et al. 1993).

An den hier erarbeiteten Ergebnissen (siehe Pat.-Nr 1; 9; S. 30-37) ist abzulesen, dass NF 200 konstant bessere, bzw. deutlich positivere Reaktionen ergab, was auch in der Literatur beschrieben wird (Waris et al. 1983, Turkof et al. 1993, Bootz et al. 1995, Baumann et al. 1996). Jedoch konnte die Arbeitsgruppe um Hermanson 1987 bei 19 Patienten, darunter 13 Patienten mit einem M. latissimus dorsi-Transplantat keine positiven Reaktionen nachweisen. Möglicherweise lag ein methodischer Fehler vor oder die von der Arbeitsgruppe gewählte Größe der Stanzbiopsie von 2 mm ist sehr klein. In der vorliegenden Untersuchung betrug die Biopsiegröße mindestens 8 mm.

Diese konträren Ergebnisse zeigen, dass man von einem negativen immunhistochemischen Befund nicht auf die Abwesenheit von Nervenfasern schließen kann.

Eine eindeutige Darstellung und feine Beurteilung der histologischen Strukturen gelang mittels Elektronenmikroskopie. Die sensorische Innervation der behaarten Haut (oberes Augenlid, Lippe, Skalp und obere und untere Extremität) wurde ausführlich bei gesunden Patienten beschrieben (Halata 1990, 1993). Insbesondere können auch Nervendigungen dargestellt werden (Halata und Munger 1996, Dikanjan et al. 1992). Dies ist besonders bei freien Nervendigungen wichtig, die nur schwer immunhistologisch darzustellen sind. Sogar die freien Nervendigungen von A-delta und C-Fasern können dargestellt werden (Kruger et al. 1981, Munger und Ide 1988).

18 Patienten wurden elektronenmikroskopisch untersucht; 14 Patienten mit einem Latissimus-dorsi-Lappentransplantat, drei mit einem Radialis-Lappentransplantat und zwei mit einem Pectoralis major-Lappentransplantat. Bei 13 Patienten konnten die nervalen Strukturen eindeutig elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Davon konnte bei zwei Patienten kein klinisch positives Ergebnis erzielt werden, trotzdem ließen sich nervale Strukturen darstellen. Bei allen anderen Patienten wurde die Biopsie aus einem klinisch sensiblen Areal des Transplantates entnommen.

Alle wichtigen anatomischen Strukturen für die verschiedenen Empfindungsmodalitäten, wie markhaltige Axone (A-delta), marklose Nervenfasern (C-Fasern), lanzettförmige Nervendigungen und Schwannsche Zellen konnten dargestellt werden (siehe Abb.: 12 bis 22, Pat.-Nr. 1; 7; 16; 14). Durch diese eindeutige Darstellung lassen sich die Fasertypen den einzelnen Sensibilitätsqualitäten zuordnen, z. B. Schmerz, der von freien Nervendigungen vom markarmen Typ A und marklosen Typ C vermittelt wird. Die gleichen elektronenmikroskopischen Beobachtungen machte schon Turkof et al. (1993) bei elf Patienten mit einem M. latissimus dorsi-Transplantat. Dabei konnten Nervenfasern, freie Nervenendigungen, Axone mit Schwannschen Zellen und ein Perineurium nachgewiesen werden. Nur selten wurden sogenannte "leere" Nervfaszikel angetroffen. Insgesamt schien die Anzahl der Nervfasern in den Faszikeln aber vermindert zu sein. Diese Resultate erklärt die Arbeitsgruppe mit dem Einsprossen nervaler Strukturen entlang vorhandener Leitschienen, wobei vermutet wird, dass die Chemotaxis eine wichtige Rolle spielen könnte. Reinnervierte Muskelzellen und Meissnersche-Körperchen konnten von Dellon und Munger (1983) elektronenmikroskopisch eindeutig dargestellt werden. Auch Katou et al. (1995) konnten diese Ergebnisse bestätigen.

5.0. Zusammenfassung

In dieser Studie wurden 18 Patienten elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein nervaler Strukturen im Transplantatgebiet untersucht. Ergänzend fand eine immunhistochemische und klinische Untersuchung statt. 14 Patienten wurde ein Latissimis dorsi-Lappen, zwei Patienten ein Pectoralislappen und drei Patienten ein Radialislappen transplantiert, davon erhielt ein Patienten sowohl einen Latissimus dorsi Lappen als auch einen Radialislappen .

Die in der Einleitung gestellten Fragen bezüglich der Reinnervation der Lappentransplantate können so beantwortet werden.

Mit Hilfe der zusammengetragenen Ergebnisse läßt sich die Aussage treffen, dass die Reinnervation im Transplantatgebiet von peripher nach zentral fortschreitet. Bei der Rückkehr der verschiedenen Empfindungsqualitäten zeigen sich Gesetzmäßigkeiten, die eine Hierarchie erkennen lassen. Zunächst kehren Druck- und Schmerz-, dann zunehmend Kälte-, Vibrationsempfinden und zuletzt die Empfindung für Wärme und Berührung wieder. Jedoch beeinflußt das Lebensalter des Patienten das Ergebnis der Reinnervation. Jüngere Patienten, insbesondere Kinder zeigten die besten Resultate. Zur eindeutigen Verifizierung dieser Ergebnisse sind weitere detaillierte Untersuchungen notwendig.

Mittels Elektronenmikroskopie lassen sich nervale Strukturen verifizieren. So konnten markhaltige Axone (A-delta), marklose Nervenfasern (C-Fasern), lanzettenförmige Nervenendigungen und Schwannsche Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Ein positives klinisches Korrelat war bei zwei Patienten in dieser Untersuchung nicht vorhanden, trotzdem ließen sich nervale Strukturen darstellen.

Die zusätzliche immunhistochemische Untersuchung mittels Antikörper auf Neurofilament 160 und 200 eignet sich gut zum Nachweis nervaler Strukturen, wobei der Nachweis mit Neurofilament 200 deutlich bessere Ergebnisse zeigte.

6.0. Literaturverzeichnis

Almquist E, Eeg-Olofsson O (1970) Sensory- nerve- conduction velocity and two-point discrimination in sutured nerves. J Bone Joint Surg 52 A: 791-796

Antia NJ, Buch VI (1971) Transfer of an abdominal dermo-fat graft by direct anastomosis of blood vessels. Br J Plast Surg 24: 15

Ariyan S (1979) Further experiences with the pectoralis major myocutaneous flap for the immediate repair of defects from excisions of head and neck cancers. Plast Reconstr Surg 64: 605-612

Baumann I, Greschniok A, Bootz F, Kaiserling E (1996) Free transplanted, mikrovascular reanastomosed forearm flap for reconstruction of the mouth cavity and oropharynx. Clinical and morphologic findings with special reference to reinnervation. HNO 44: 616-623

Beigel A, Schubert C, Rudert H (1988) Morphologic changes in the epithelium of myocutaneous pectoralis major islands flaps. A light and electron optic study. Laryngol Rhinol Otol 67: 586-589

Biemer E, Stock W (1983) Total thumb reconstruction: a one-stage reconstruction using an osteo-cutaneous forearm flap. Br J Plast Surg 36: 52-55

Biemer E, Stock W, Duspiva W (1983) Replantations of the lower extremity. Chirurg 54: 361-365

Bootz F, Baumann I, Greschniok A, Kaiserlink E (1995) Morphologische und funktionelle Befunde an mikrovaskulär reanastomosierten Unterarmlappen in Mundhöhle und Oropharynx. In: Plastische und Wiederherstellungschirurgie, A. Berghaus (Hrsg), Einhorn-Presse Verlag

Boyd B, Markland B, Dorion D, Pang CY, Morris S (1990) Surgical augmentation of the skin blood flow and viabiltiy in the pig musculcutaneous flap model. Plast Reconstr Surg 86: 731-738

Boyd B, Rosen I, Rotstein L, Freemann J, Gullane P, Manktelow R, Zuker R (1990) The iliac crest and the radial forearm flap in vascularized oromandibular reconstraction. Am J Surg 159: 301-308

Boyd B, Mulholland RS, Gullane P, Irish J, Kelly L, Rotstein L, Brown D (1994) Reinnervated lateral antebrachial cutaneous neurosome flaps in the oral reconstruction: are we making sense? Plast Reconstr Surg 93: 1350-1359

Buncke HJ, Buncke GM, Schulz WP (1966) Immediate Nicoladoni procedure in the Rhesus Monkeya or hallux to hand transplantation utilizing microminiature vascular anastomoses. Br J Plast Surg 19: 332

Castaldo JE, Ochoa JL (1996) Mechanical injury of peripheral nerves. Clin Plast Surg 11: 9-11

Close G, Truelson JM, Milledge RA, Schweizer C (1995) Sensory recovery in noninnervated flaps used for oral cavity and oropharyngeal reconstruction. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 121: 967-972

Cormack GC, Lamberty BGH (1986) The arterial anatomy of skin flaps. Churchill Livingstone, Edingburgh.

Engin C, Denurkan F, Ayhan S, Atabay K, Baran NK (1996) Delayed effect of denervation on wound contraction in the rat skin. Plast Reconstr Surg 98: 1063-1067

Erdogan B (1989) Determining the veovascularization time of secondary island skin flapexpermiantal investigations in the rat. Eur J Plast. Surg 12: 175-178

Esser JFS (1934) Biological or artery flaps: General observations and techniques. Rev chirurg plast: 275

Dabb RW, Conklin WT (1981) A sensory innervated latissimus dorsi musculocutaneous free flap. Case report. J Microsurg 2: 289-293

Davis L (1934) The return of sensation to transplanted skin. Surg Gynec Obst 59: 533-539

Dellon AL, Munger BL (1983) Correlation of histology and sensibility after nerv repair. J Hand Surg 8: 871-875

Dikranjan K, Nikolov S, Belai A (1992) Histochemische und immunhistochemische Untersuchungen über die perivaskulären Nerven in der Colon-Schleimhaut der Ratte. Acta Histochem 92: 160-170

Dubner S, Heller KS (1992) Reinnervated radial forearm flaps in the head and neck reconstruction. J Reconstr Microsurg 8: 467-468

Geishauer M, Schwarz M (1995) Freie mikrovaskuläre und axial gestielte Lappen. Verlag Haus Hans Huber, Bern

Halata Z, Munger BL (1983) The sensory innervation of primate facial skin. I. Hairy skin. Brain Res Rev 5: 45-80

Halata Z (1990) Specific nerve endings in vellus hair, guard hair, and sinus hair. In: Orfanos CE, Happle R (eds.) Hair and hair disease. Springer Berlin, New York, pp 149-164

Halata Z (1993) Sensory innervation of the hairy skin (Light- and electronmicroskopic study). J Invest Dermatol 101: 755-815

Halata Z, Baumann KI (1999) Sensory nerve endings in the hard palate and papilla incisiva of the rhesus monkey. Anat Embryol 199: 427-437

Hall SM (1989) Regeneration in the peripheral nervous system. Neuropathol Appl Neurobiol 15: 513-529

Hermanson A, Dalsgaard CJ, Amander C, Lindblom U (1987) Sensibilty and cutaneous reinnervation in the free flaps. Plast Reconstr Surg 79: 422-425

Hermanson A, Dalsgaard CJ, Björklund H, Lindblom V (1987) Sensory reinnervation and sensibility after superficial skin wounds in human patients. Neurosci Lett 74: 377-382

Hoppenreijs TJ, Freihofer HP, Brouns JJ, Bruaset I, Manni JJ (1990) Sensibility and cutaneous reinnervation of pectoralis major myocutaneous island flaps. A premiminary clinical report. J Craniomaxillofac Surg 18: 237-242

Joseph J (1931) Nasenplastik und sonstige Gesichtsplastik. Kabitsch, Leipzig: 673

Karanth SS, Dhital S, Springall DR, Polak JM (1990) Reinnervation and neuropeptides in the mouse skin flap. J Autom Nerv Syst 31: 127-134

Katou F, Shirai N, Kamakura S, Ohki H, Motegi K, Andoh N, Date F, Nagura H (1995) Intraoral reconstruction with innervated forearm flap. A comparison of sensiblity and reinnervation in innervated versus noninnervated forearm flap. Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod 80: 638-644

Koch A, Dieckmann J (1996) The musculus pectoralis major rib flap. Personal experiences with 7 cases. Chirurg 67: 273-242

Kornfehl J, Foremanek M, Knerer B, Vajs A, Moser D, Millesi W (1997) Myocutaneous flaps in patients with head and neck cancer retain their immunological capacities in an activated functional state. J Oral Pathol Med 26: 29-35

Kredel FE, Evans JP (1933) Recovery of sensation in denervated pedicle and free skin grafts. J Neurol Neurosurg Psychiatry 29: 1203-1207

Kruger L, Perl ER, Sedivec MJ (1981) Fine structure of myelinated mechanical nociceptor endings in the cat hairy skin. J Comp Neurol 198: 137-154

Lee JH, Kim MJ, Kim JW (1995) Mandibular reconstruction with free vascularized fibular flap. J Craniomaxillofac Surg 23: 20-26

Littler W (1953) The neurovascular pedicle method of digital transposition for reconstruction of the hand. Plast Reconstr Surg 12: 303

Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Zhao Q (1994) Trophism, tropism and specifity in nerve regeneration. J Reconstr Microsurg 10: 345-354

Magee WP, McCraw JB, Horton CE, McInnis WD (1980) Pectoralis & quot; paddel & quot; myocutaneous flaps. The workhorse of head and neck reconstruction. Am J Surg 140: 507-513

Manchot C (1889) Die Hautarterien des menschlichen Körpers. Verlag F.C.W. Vogel, Leizig. in: Manchot C (1989) The cutaneous arteries of the human body. Springer Verlag, New York

Manek S, Terengui G, Shurey C, Nishikawa H, Green CJ, Polak JM (1993) Neovascularization precedes neural changes in the rat groin skin flap following denervation: an immunhistochemical study. Br J Plast Reconstr Surg 46: 48-55

Manni JJ, Bruaset I (1986) Reconstruction of the anterior oral cavity using the platysma myocutaneous island flap. Laryngoscope 96: 564-567

Matloub HS, Larson DL, Kuhn JC, Yousif NJ, Sanger JR (1989) Lateral arm free flap in oral cavity reconstruction: a functional evaluation. Head Neck 11: 205-211

Moberg E (1955) Discussion of D. Brooks: The place of nerve grafting in orthopedics surgery. J bone joint surg 37: 305

Mühlbauer W, Herndl E, Stock W (1982) The forearm flap. J Plast Reconstr Surg 70: 336-339

Munger BL, Ide C (1988) The structure and function of cutaneous sensory receptors. Arch Histol Cytol 51: 1-34

Nachemson AN (1988) Axonal regeneration and growth direction in square-shaped mesothelial chambers. Scand J Plast Reconstr Surg 22: 199-206

Noever G, Brüser P, Köhler L (1986) Reconstruction of heel and sole defects by free flaps. Plast Reconstr. Surg 78: 345-350

Olivari N (1976) The latissimus flap. Br J Plast Surg 29: 126-128

Orgel M, Aguayo A, Wiliams HB (1972) Sensory nerve regeneration: an experimental study of skin grafts in the rabbit. J Anat 111: 121-135

Petrosino L, Fucci D, Robey RR (1982) Changes in lingual sensitivity as a function of age and stimulus exposure time . Perceptual and Motor Skills 55:1083-1090

Ponten B (1981) The fascio-cutaneous flap. Its use in soft tissue defects of the lower leg. Br J Plast Surg 34: 215

Rasheed T, Lewis HG, Gordon DJ (2000) A review of 100 consecutive free tissue transfers. Ulster Med J 69: 14-18

Rautio J (1990) Pattens of recovery of sensibility in free flaps transferred to the foot: a prospective study. J Reconstr. Microsurg 6: 37-41

Rogers SN, Humphris G, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED (1998) The impact of surgery for oral cancer on quality of life as measured by the Medical Outcomes Short Form. Oral Oncol 34: 171-179

Rogers SN, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED (1999) The University of Washington head and neck cancer as a predictor of outcome following primary surgery for oral cancer. Head Neck 21: 394-401

Salmon M (1936) Arteres de la peau. In: Taylor GI, Tempest MN (eds.) Arteries of the skin. Churchill Livingstone, London

Schliephake H, Schmelzeisen R, Schonweiler R, Schneller T, Altenbernd C (1998) Speech, deglutition and life quality after intraoral tumour resection. A prospective study. Int J Oral Maxillofac Surg 27: 99-105

Schmelzle R, Brosche T, Ahlemann CM (1986) Mikrovaskularchirugie im bestrahlten Gebiet. Tierexperimentelle Ergebnisse und klinische Relevanz. Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir 10: 166-169

Schmelzle R (1993) Rekonstruktive Eingriffe im Gesichtsbereich. In: Neumann H-J Ästhetische und plastisch-rekonstruktive Gesichtschirugie. Einhorn-Presse Verlag. Reinbeck. pp. 125-133

Schultes G, Kärcher H, Gaggl A (1998) Postoperative Sensibilität des gefäßgestielten M.-latissimus-dorsi-Transplantats ohne neuronale Anastomose. Mund Kiefer GesichtsChir 2: 238-241

Schustermann MA, Miller MJ, Reece GP, Kroll SS, Marchi M, Goepfert H (1994) A single center`s experience with 308 free flaps for repair of head and neck cancer defects. Plast Reconstr Surg 93: 472-478

Schwenzer N, Grimm G Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Band 2: Spezielle Chirurgie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1990

Seckel BR, Chui TH, Nylias E, Sidman SL (1984) Nerve regeneration through synthetic biodegradable nerve guide: regulation by the target organ. Plast Reconstr Surg 74: 173-181

Stock W, Mühlbauer W, Biemer E (1983) Stromumkehr beim Unterarmlappen. Handchir, Mikrochir, Plast Chir 5: 45

Tansani I (1906) Sopra il mio nuovo processo di amputatione della mamella. Riforma Medica 12: 757

Terzis JK, Sweet RC, Dykes RW, Wiliams HB (1978) Recovery of function in the muscle transplantates using microneurovascular anastomoses. J Hand Surg 3: 37-59

Turkof E, Jurecka W, Sikos G, Piza-Katzer H (1993) Sensory recovery in myocutaneous, noninnervated free flaps: a morphologic immunhistochemical, and electron microkopic study. Plast Reconstr Surg 92: 238-247

Urken ML, Weinberg H, Vickery C (1990) The neurofasciocutaneous radial forearm flap in the head and neck reconstruction: a prelimary report. Laryngoscope 100: 161-173

Urken ML (1991) Functional evaluation following microvascular oromandibular reconstruction of the oral cancer patient: a comparative study of reconstructed and nonreconstructed patients. Laryngoscope 101: 935-950

Urken ML, Weinberg H, Vickery C, Aviv JE, Buchbinder D, Lawson W, Biller HF (1992) The combined sensate radial forearm and iliac free flaps for reconstruction of significant glossectomy-mandibulectomy defects. Laryngoscope 102: 543-558

Urken ML (1995) The restoration or preservation of sensation in the oral cavity following ablative surgery. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 121: 607-612

Vesper M, Garau I, Grimann N, Bschorer D, Hellner D, Gehrke G, Schmelzle R (1999) Sensory recovery in latissimus dorsi flap. 14th Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery. J Cran Max Surg 26, Sup 1: 201

Vesper M, Heiland M, Möller HC, Werner HO, Bschorer R, Gehrke G, Hellner D, Quante M, Lorenz J, Bromm B, Schmelzle R (1999) Sensibilität von Lappentransplantaten im Wachstumsalter. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 54: 776-778

Vesper M, Heiland M, Gehrke G, Bschorer R, Hellner D, Lorenz J, Schmelzle R (2000) Funktionelle Ergebnisse nach Lappentransplantaten bei Verbrennungsnarben im Wachstumsalter. Journal der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie 12: Nr.12 51-52

Vesper M, Zahn B, Heiland M, Schmelzle R (2001) Normale Hautsensibilität in für die Lappenchirurgie des Kopf-Halsbereiches relevanten Regionen. Journal der Deutschen Gesellschaft für Plastische und Wiederherstellungschirurgie 13: Nr. 13, 52-54

Vesper M, Heiland M, Flinzberg S, Blake F, Schmelzle R (2002) Clinical and histological results of sensory recovery after radial forearm flap transfer. Clinical Oral Investigations 6: 114-118

Vesper M, Heiland M, Flinzberg S, Schmelzle R (2002a) Klinische Ergebnisse der Resensibilisierung von Radialislappen- und Musculus latissimus dorsi-Transplantaten. Mund Kiefer GesichtsChir 5: 323-330

Vesper M (2002b) Untersuchungen zu Reinnervation von gestielten und freien myocutanen Muskulus latissimus dorsi- und fasciocutanen Radialislappen-Transplantaten. Habilitationsschrift, Hamburg

Vriens JPM, Acosta R, Soutar DS, Webster MHC (1996) Recovery of sensation in the radial forearm flap in oral reconstruction. Plast Reconstr Surg 98: 649-656

Vriens JPM, van Der Glas HW, Dellon AL (2002) The relationship of facial two-point discrimination to applied force under clinical test conditions. Plast Reconstr Surg 109: 953-959

Waris T, Rechardt L, Kyosola K (1983) Reinnervation of the human skin grafts: A histochemical study. Plast Reconstr Surg 72: 439-445

Westermark A (1993) A prospective electromyographic and computer- aided thermal sensitivity assessment of nerve lesions after sagittal split osteotomy and Le Fort I osteotomy. Discussion. J Oral Maxillofac Surg 59: 139-139

Withers EH, Franklin JD, Madden JJ, Lynch JB (1979) Pectoralis major musculocutaneous flap: a new flap in head and neck reconstruction. Am J Surg 138: 537-543

Yang G, Chen B, Gao Y (1981) Free transfer of forearm flap. Report of 56 cases. Nat Med J China 61: 139

Zilles K, Rehkämper G (1994) Funktionelle Neuroanatomie. 2. Auflage. Springer Verlag Berlin, Heidelberg

7.0. Anhang

7.1. Übersicht über sämtliche erfaßten Patientendaten

Name/Nr.	Alter	Geschlecht	Lappenart	Lappengröße cm^2	OP-Technik	Empfangsregion
1. A.A.E.	11	m	Lat.dors. Lappen Radialislappen	23x9 8x5	gestielt frei	Pectoral Perioral
2. B.I.	47	w	Lat. dorsi- Lappen	16x8	gestielt	Kinn, cervical
3. B.T.	24	m	Lat dors. Lappen	28x11	gestielt	Wange, Oberkiefer
4. G.H.	51	w	Radialislappen	7x5	frei	Mundboden
5. H.H.	80	m	Lat. dorsi- Lappen	23x10	gestielt	Wange, Oberkiefer
6. H.W.	66	m	Lat. dorsi- Lappen	6x4	mikrochirurgisch	Kinn
7. J.H.	55	w	Lat. dorsi- Lappen	9x6	gestielt	Cervical, pectoral
8. K.A.	14	m	Lat. dorsi- Lappen	20x10	gestielt	Cervical re. Pectoral li.
9. K.F.J.	60	m	Pectoralis major	16x8	gestielt	Wange, Oberkiefer
10. M.J.	58	m	Radialislappen	8x4	frei	Kinn, submandibulär
11. M.U.	27	w	Lat dors. Lappen	38x12	mikrochirurgisch	Wange

Name/Nr.	Alter	Geschlecht	Lappenart	Lappengröße cm^2	OP-Technik	Empfangsregion
12. N.H.D.	53	m	Lat. dorsi- Lappen	14x7,5	mikrochirurgisch	Wange
13. O.C.	48	w	Pectoralis major-Lappen	18x22	gestielt	Unterarm re.
14. P.E.	59	w	Lat. dorsi- Lappen	31x11	gestielt	Cervical, submandibulär
15. R.G.	47	m	Lat. dorsi- Lappen	24x9	gestielt	Kinn, cervical
16. R.M.	48	w	Lat. dorsi- Lappen	17x9	mikrochirurgisch	Cervical
17. Z.W.	51	m	Lat. dorsi- Lappen	18x7	gestielt	pectoral
18. Z.R.	46	w	Lat. dorsi- Lappen	25x10	gestielt	Kinn, cervical

Name / Nr.	Hauptdiagnose	TNM	unilokulär	Radiatio	gAlk/Tag	Zig/Tag
1. A.A.E.	Verbrennung	kein	falsch	nein	0	0
2. B.I.	PEC	T4N2MX	wahr	prä	20	20
3. B.T.	Osteosarkom	kein	wahr	nein	0	0
4. G.H.	PEC	T2N1M0	falsch	nein	50	20
5. H.H.	PEC	T4N0M0	wahr	post	15	15
6. H.W.	PEC	T3N1M0	wahr	prä	10	60
7. J.H.	PEC	T2N0M0	wahr	prä	150	40
8. K.A.	Verbrennung	kein	falsch	nein	0	0
9. K.F.J.	PEC	T4N2M0	wahr	post	80	10
10. M.J.	Hellzelliges odonto. Karzinom	kein	wahr	nein	36	20
11. M.U.	Fibrosarkom	T2N0M0	wahr	1971	0	0

Name / Nr.	Hauptdiagnose	TNM	unilokulär	Radiatio	gAlk/Tag	Zig/Tag
12. N.H.D.	PEC	T4N1MX	wahr	post	0	30
13. O.C.	Verbrennung	kein	falsch	nein	0	0
14. P.E.	PEC	T2N0M0	wahr	1958	0	0
15. R.G.	PEC	T4N2MX	wahr	post	0	0
16. R.M.	Brachiogenes Ca.	T4N2M0	wahr	prä	10	10
17. Z.W.	PEC	T2N1M0	wahr	prä	30	40
18. Z.R.	PEC	T4N2bM0	wahr	prä	120	20

Name/ Nr.	Datum Haupt-OP	Präparate-Nr.	Probenentnahme-Datum	Biopsietag-post-OP	Lappenmaterial
1. A.A.E.	02.12..96	V73/96	02.12.96	0	Radialislappen
		V5/97	17.02.97	413	
	05.03.97	V8/97	05.03.97	0	Lat.dors. Lappen
		V57/97	23.10.97	230	
		V64/97	03.12.97	271	
2. B.I.	05.06.96	V14/98	16.02.98	621	Pectoralislappen
		V44/98	22.04.98	685	Lat dors. Lappen
3. B.T.	15.01.96	V1/96	15.01.96	0	Lat.dors. Lappen
		V7/96	05.02.96	21	
		V8/96	20.01.98	734	
		V11/96	04.02.98	748	
4. G.H.	19.02.97	V12/97	18.02.97	0	Radialislappen
		V56/97	17.10.97	240	
5. H.H.	03.04.96	V43/96	01.08.96	119	Lat.dors. Lappen
		V45/96	12.08.96	131	
		V46/96	11.12.96	252	
6. H.W.	15.03.93	V40/96	26.07.96	1227	Lat.dors. Lappen
7. J.H.	06.05.96	V28/98	11.03.98	674	Lat.dors. Lappen
		V29/98	13.03.98	676	
		V30/98	13.03.98	676	
		V63/98-1	10.07.98	795	

Name/ Nr.	Datum Haupt-OP	Präparate-Nr.	Probenentnahme-Datum	Biopsietag-post-OP	Lappenmaterial
8. K.A.	11.04.95	V68/98 V16/99-1 V16/99-2 V16/99-3 V16/99-4	17.07.98 11.03.99	826 956	Lat.dors. Lappen
9. K.F.J.	03.06.96	V29/96 V32/96	03.06.96 24.06.96	0 20	Pectoralislappen
10. M.J.	13.08.97	V47/98	26.04.98	256	Radialislappen
11. M.U.	13.08.97	V46/97 V61/97 V01/98 V83/98-2 V83/98-5	13.08.97 14.11.97 06.01.98 21.10.98	0 91 143 164	Lat.dors. Lappen
12. N.H.D.	25.09.95.	V14/96 V81/96 V50/97 V65/97	01.03.96 12.12.96 21.08.97 10.12.97	156 412 695 806	Lat.dors. Lappen
13. O.C.	24.08.95	V38/96	25.07.96	335	Pectoralislappen
14. P.E.	13.08.97	V01/99	10.01.99	515	Lat.dors. Lappen
16. R.G.	09.04.96	V11/96 V50/96	06.09.96 16.09.96	150 160	Lat.dors. Lappen

Name/ Nr.	Datum Haupt-OP	Präparate-Nr.	Probenentnahme-Datum	Biopsietag-post-OP	Lappenmaterial
16. R.M.	07.02.95	V25/96 V55/96	06.05.96 16.10.96	88 616	Lat.dors. Lappen
17. Z.W.	20.06.96	V39/96	25.07.96	29	Lat.dors. Lappen
18. Z.R.	09.07.98	V09/99	09.02.99	214	Lat.dors. Lappen

Birgit Wiehe

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geb.- Datum:	21.04.65
Geb.- Ort:	Lübbecke/ Kreis Minden
Staatsangehör.:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbilduung

08.71 - 07.75	Grundschule Bad Münder
08.75 - 07.79	Otto-Hahn-Gymnasium, Springe
08.79 - 07.81	Realschule Bad Münder
09.90 - 10.92	2. Bildungsweg Abitur
27.06.92	Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang

08.81 - 07.83	Ausbildung zur Arzthelferin
08.83 - 03.86	Ausbildung zur Med. Tech. Assistentin
06.03.86	Staatliche Prüfung
04.86 - 04.93	Berufstätigkeit als MTA in der Abteilung für Abdominal- u. Transplantationschirurgie bei Prof. Dr. Dr. R. Pichlmayr an der Med. Hochschule Hannover mit Schwerpunkt in Klinik und Forschung der Lebertransplantation
04.93 - 07.99	Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg
20.07.99	Approbation als Zahnärztin
08.99 - 10.99	Abschluß der praktischen Tätigkeiten zur Promotionsarbeit in der Abteilung für Mund-, Kiefer- u. Gesichtschirurgie bei Prof. Dr. Dr. R. Schmelzle, Universität Hamburg
11.99 - 01.01	Assistenzzahnärztin in der Gemeinschaftspraxis Dr. Wierschem & Held, Essen
02.01 - 11.01	Assistenzzahnärztin in der Praxis M. von Mannstein, Blomberg
seit 01.01.02	Niederlassung als Zahnärztin in einer Gemeinschaftspraxis, Bad Oeynhausen

Danksagung

Mein Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Dr. M. Vesper für die Überlassung des Dissertationsthemas, seiner vielfältigen Anregung und Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Z. Halata für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Erstellung und Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder, sowie der Überlassung des Arbeitsplatzes im Labor der funktionellen Anatomie.

Frau B. Assmus für die intensive Unterstützung bei der Aufbereitung der histologischen Proben und Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate.

Frau U. Redlefsen für die Sammlung der Biopsien im Gewebelabor der Abt. für Mund-, Kiefer- u. Gesichtschirurgie.

Herrn Dipl. Ing. Karl-Heinz Lütnant für die Hilfe beim Erstellen des Layouts.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....