

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Chirurgische Klinik I  
Direktor: Professor Dr. med. A. Thiede

Einfluss der Histokompatibilitätsantigene MHC Klasse I und MHC Klasse II auf die  
Transplantatfunktion nach allogener Nebenschilddrüsen transplantation in der Ratte

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Marco Etzel  
aus Würzburg

Würzburg, Januar 2004

Referent: Prof. Dr. med. W. Timmermann  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. E. Blind  
Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2004

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
2 Fragen.....	5
3 Material und Methoden .....	6
3.1 Technische Durchführung .....	6
3.2 Ermittlung der benötigten Gewebemenge.....	12
3.3 Analyse der MHC-Antigene.....	13
3.4 Transplantation zur Ermittlung des MHC-Einflusses.....	15
4 Ergebnisse.....	16
4.1 Technische Durchführung .....	16
4.2 Ermittlung der benötigten Gewebemenge.....	18
4.3 Analyse der MHC-Antigene.....	19
4.4 Transplantation zur Ermittlung des MHC-Einflusses auf die Transplantatfunktionszeit.....	21
5 Beantwortung der Fragen .....	24
6 Diskussion .....	25
6.1 Tiermodell .....	26
6.2 Spender-Empfänger-Verhältnis .....	26
7 Literaturverzeichnis .....	32
8 Anhang .....	35
8.1 Verwendete Chemikalien und Antikörper.....	35
8.2 Immunhistochemisches Färbeprotokoll .....	37
8.3 Immunhistologische Färbungen.....	39
8.4 Tabellen.....	41

Danksagung

Lebenslauf



# 1 Einleitung

Die physiologische Balance verschiedener Parameter des menschlichen Organismus wie Blutdruck, Herzfrequenz oder Temperatur muss ständig kontrolliert und den aktuellen Bedürfnissen angepasst werden. Dies erfordert eine strenge Kontrolle durch ein exakt arbeitendes Steuerungssystem, das den jeweiligen Parameter innerhalb der physiologischen Grenzen hält.

Ein solcher Parameter ist auch der Blutkalziumspiegel. Er wird reguliert über die beiden Hormone Calcitonin, welches in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet wird, und Parathormon, welches in der Nebenschilddrüse (Epithelkörperchen) produziert wird. Das Parathormon (PTH) wirkt aktivierend auf die Osteoklasten im Knochen, was zum Hydroxylapatitabbau und damit zur Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen ins Blut führt. In der Niere stimuliert es die Kalziumresorption und fördert die Phosphatausscheidung. Außerdem bewirkt PTH eine verstärkte Bildung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol, welches die enterale Resorption von Kalzium fördert. Es resultiert also eine Erhöhung des Blutkalzium- sowie eine Senkung des Blutphosphatspiegels. Calcitonin aktiviert die Osteoblasten und führt über einen verstärkten Einbau von Kalzium in den Knochen zu einer Senkung des Kalziumspiegels im Blut.

Die Epithelkörperchen sind ovale Drüsenkörper mit einem Längsdurchmesser von ca. 4-6 mm und werden über Endäste der Arteria thyroidea inferior mit Blut versorgt. Die meisten Menschen haben 4 Epithelkörperchen, gelegentlich sind auch 5 oder 6 angelegt, in seltenen Fällen auch nur 3. Die oberen Epithelkörperchen liegen fast immer oberhalb (kranial) der Arteria thyroidea inferior und hinter (dorsal) dem Nervus laryngeus recurrens. In seltenen Fällen können sie auch unterhalb der Arteria thyroidea inferior liegen. Die unteren Epithelkörperchen liegen unterhalb (kaudal) der Arteria thyroidea inferior und vor (ventral) dem Nervus laryngeus recurrens in der Nähe des unteren Schilddrüsenpols. Hier sind Lagevariationen häufiger, sie liegen dann zum Beispiel im Thymus oder im vorderen Mediastinum.

Eine Dysfunktion der Epithelkörperchen führt zur Ausbildung eines Hyper- oder eines Hypoparathyreoidismus, also einer Über- bzw. Unterfunktion der Nebenschilddrüsen. Bei der Überfunktion unterscheidet man prinzipiell zwei Formen. Beim primären Hy-

perparathyreoidismus liegt die Ursache für die gesteigerte Produktion von Parathormon innerhalb der Epithelkörperchen. Man findet ein oder mehrere Adenome, also Zellverbände, die der Autoregulation des Organismus entzogen sind, oder eine diffuse Hyperplasie (Zellvermehrung) aller Epithelkörperchen. Beim sekundären Hyperparathyreoidismus liegt die Ursache für die Überfunktion außerhalb der Nebenschilddrüsen. Die vermehrte Ausschüttung von Parathormon erfolgt hier als Reaktion auf eine chronisch veränderte Stoffwechsellage, die meist durch eine chronische Niereninsuffizienz (eingeschränkte Nierenfunktion) oder durch eine Kalziummalabsorption (verminderte Aufnahme von Kalzium aus dem Darm) verursacht wird. Man behandelt die Überfunktion indem man entweder das Adenom entfernt (primärer Hyperparathyreoidismus), dreieinhalb Nebenschilddrüsen entfernt und einen Rest von der Größe eines normalen Epithelkörperchens belässt (Hyperplasie) oder alle Epithelkörperchen entnimmt und Teile daraus in die Unterarmmuskulatur implantiert (sekundärer Hyperparathyreoidismus). Das entnommene Gewebe wird in den beiden letzten Fällen tiefgefroren, um bei postoperativer Nebenschilddrüsenunterfunktion für eine erneute Autotransplantation verwendet werden zu können.

Der Unterfunktion (Hypoparathyreoidismus) liegt eine verminderte oder fehlende Sekretion von Parathormon zu Grunde. Dieser Mangel äußert sich in der Ausbildung einer Hypokalzämie und einer Hyperphosphatämie, also zu niedriger Spiegel von Kalzium und zu hoher Spiegel von Phosphat im Blut. Typisches Symptom des Hypoparathyreoidismus ist die Tetanie, bei der es wegen einer gesteigerten neuromuskulären Erregbarkeit zu schmerzhaften Krämpfen vor allem der Extremitätenmuskulatur kommt. Langfristige Folgen sind zum Beispiel Katarakt, Depressionen und Stammganglienverkalkung. Ein solcher Ausfall der Epithelkörperchen kann zum Beispiel als Folge von Bestrahlung oder Entfernung der Schilddrüse (Thyroidektomie) oder durch die operative Therapie eines Hyperparathyreoidismus auftreten. Bei der idiopathischen Form des Hypoparathyreoidismus ist die Ursache unbekannt, sie kommt aber nur sehr selten vor und ist gelegentlich verbunden mit Autoimmunerkrankungen wie z.B. Morbus Addison (eingeschränkte Funktion der Nebennierenrinde) oder perniziöser Anämie (Blutarmut wegen Vitamin-B12-Mangel). Bei Kindern mit dem Di-George-Syndrom kommt es zu einer Entwicklungsstörung der Nebenschilddrüsen, bei der Nebenschilddrüsenagenesie fehlen sie vollständig. Die bisherige Therapie des Hypoparathyreoidismus liegt in der

Substitution von Kalzium und Vitamin D. Diese Substitution muss in der Regel dauerhaft erfolgen, da sich auch bei postoperativem, also erworbenem Hypoparathyreoidismus, eine ausreichende Hormonproduktion nicht wieder einstellt. Weitere Probleme entstehen, wenn hohe Dosen Kalzium eventuell sogar intravenös appliziert werden müssen. Auch kann die normale tageszeitliche Schwankung des Kalziumspiegels nicht berücksichtigt werden. So entwickeln sich auch unter Substitution schleichend Beschwerden wie zunehmende neuromuskuläre Erregbarkeit, langsam progrediente geistige Retardierung, Katarakt oder Skelettdeformitäten (3). Die Therapie mit synthetischem Parathormon ist möglich, bedarf aber einer regelmäßigen ärztlichen Überwachung um hyperkalzämische Krisen (bedrohlich ansteigender Kalziumspiegel) zu vermeiden. Zudem ist die Entstehung von Antikörpern gegen dieses synthetische Parathormon beschrieben (4).

Als eine mögliche kausale Therapie des Hypoparathyreoidismus ist eine allogene Transplantation (hierunter versteht man die Übertragung zwischen genetisch nicht identischen Individuen einer Art) von Nebenschilddrüsengewebe seit längerem Gegenstand experimenteller Forschung. Das grundlegende Problem der allogenen Transplantation ist die Transplantatabstoßung, eine von T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort, deren Ursache in der Inkompatibilität des Major Histocompatibility Complex (MHC) zwischen Spender und Empfänger liegt (1). Es werden zwei Wege der Aktivierung von T-Lymphozyten unterschieden. Auf dem direkten Weg der Alloantigenerkennung erkennen die T-Lymphozyten des Transplantatempfängers fremde (allogene) MHC-Moleküle direkt auf der Zelloberfläche des transplantierten Gewebes oder auf den mit dem Transplantat übertragenen Spender-Leukozyten ("passenger leukocytes"). In der Regel präsentieren diese Zellen neben allogenen MHC-Klasse-I und Klasse-II weitere, für die T-Zellaktivierung notwendige Oberflächenmoleküle (Kostimulation). Auf dem indirekten Weg der Alloantigenerkennung nehmen antigenpräsentierende Zellen des Empfängers allogene MHC-Moleküle auf, prozessieren sie zu Peptidfragmenten und präsentieren sie in Selbst MHC-Klasse-II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche den eigenen T-Lymphozyten. Über den direkten Weg kommt es sowohl zur Aktivierung von CD8- als auch CD4-positiven Effektor-T-Lymphozyten, während über den indirekten Weg ausschließlich CD4-positive Zellen aktiviert werden. CD8-positive Effektorzellen zerstören Zellen mit Spender-MHC-Klasse-I-Molekülen, während die aktivierten CD4-

positiven Zellen in der Regel Helferfunktionen übernehmen, d.h. sie aktivieren verschiedene, an der Transplantatzerstörung beteiligte Effektorzellen, wie z.B. Makrophagen oder B-Lymphozyten.

Die vorliegende Arbeit verfolgt daher drei Ziele. Das erste Ziel ist die Etablierung eines für basisimmunologische Fragestellungen geeigneten Rattenmodells zur Nebenschilddrüsen transplantation einschließlich der Erarbeitung der Anatomie der Nebenschilddrüsen bei Ratten, der Überprüfung der technischen Durchführbarkeit einer heterotopen Transplantation (nicht an die anatomisch vorgegebene Position) und der Ermittlung bestimmter Normalwerte, wie z.B. des Kalziumspiegels bei Ratten. Das zweite Ziel ist die immunhistologische Untersuchung der Epithelkörperchen, um das Ausmaß der Expression der Histokompatibilitätsantigene MHC Klasse I und MHC Klasse II bei drei verschiedenen Rattenstämmen zu ermitteln. Das dritte Ziel ist die Durchführung von syngenem (Übertragung zwischen genetisch gleichen Tieren) und allogenen Transplantationen (Übertragung zwischen genetisch unterschiedlichen Tieren) zur Bestimmung des Einflusses der MHC-Antigene auf die Dauer der Transplantatfunktion.



## 2 Fragen

Die Beantwortung folgender Fragen hinsichtlich der experimentellen Nebenschilddrüsen-  
sentransplantation ist Gegenstand unserer Untersuchungen:

1. Wie kann eine Nebenschilddrüsentransplantation an der Ratte technisch durchgeführt werden?
2. Wie viel Nebenschilddrüsen-  
gewebe muss für eine Normalisierung des Kalzium-  
spiegels übertragen werden?
3. Unterscheidet sich das Nebenschilddrüsen-  
gewebe der Inzuchtrattenstämme Lewis(Lew), Dark Agouti (DA) und Wistar Furth (WF) hinsichtlich der Expression von MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Antigenen?
4. Haben diese Unterschiede einen Einfluss auf die Dauer der Transplantatfunktion nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation?

## 3 Material und Methoden

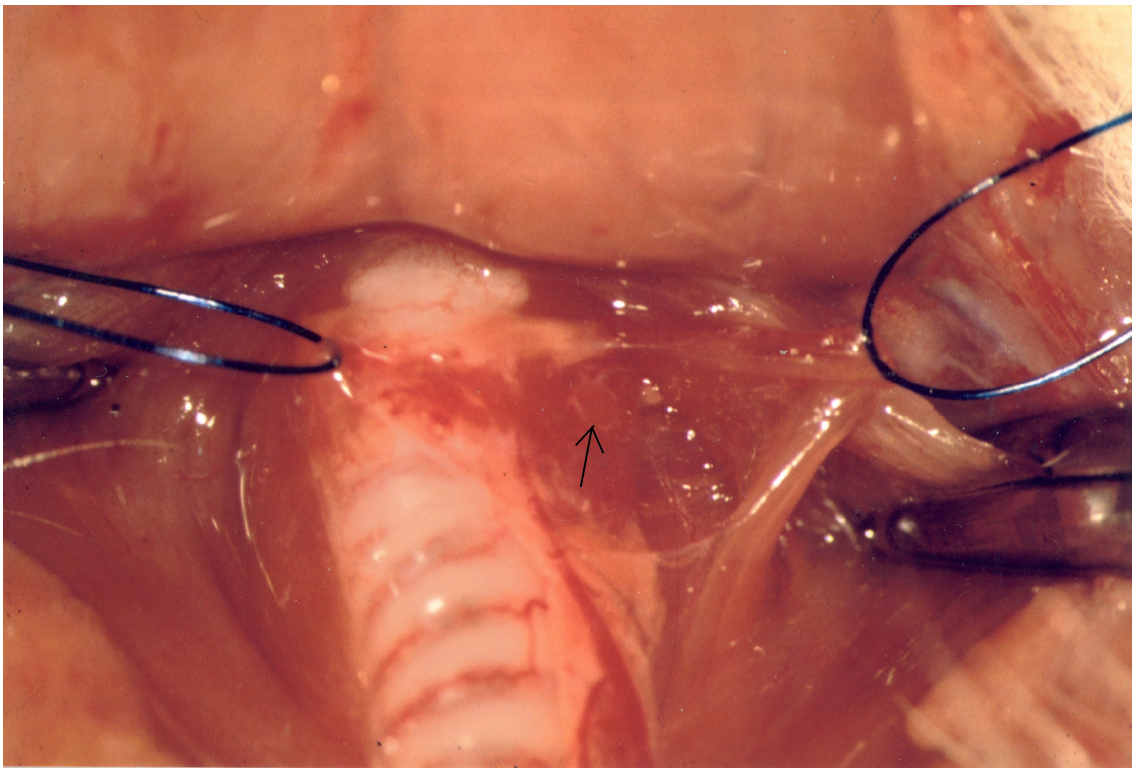
### 3.1 Technische Durchführung

Anatomie:

Im Gegensatz zum Menschen haben Ratten meist nur 2 Epithelkörperchen. Diese liegen seitlich am oberen Pol der Schilddrüsenlappen, meist zwischen einem kranial der Schilddrüse gelegenen Fettkörper und der Vena thyreoidea innerhalb der Organkapsel, Lagevariationen sind aber häufig.

Es werden die Nebenschilddrüsen der Inzuchtstämme Lewis (Lew, RT1<sup>l</sup>), Wistar Furth (WF, RT1<sup>u</sup>) und Dark Agouti (DA, RT1<sup>av1</sup>) untersucht, alle Tiere sind Männchen zwischen 150 und 250 g Körpergewicht. Die Epithelkörperchen imponieren als subkapsulär gelegene milchigtrübe linsenartige Drüsen. Die Abgrenzung zum Schilddrüsenewebe ist bei DA-Ratten schwieriger als bei den anderen Stämmen.

Abbildung 3.1: Epithelkörperchen WF-Ratte, 16-fache Vergrößerung



Narkose:

Die Narkose untergliedert sich in zwei Teile, in die Einleitungsnarkose und in die eigentliche Injektionsnarkose. Die Einleitungsnarkose ist nur kurz wirksam und soll die Anwendung der Injektionsnarkose erleichtern. Als Narkosegas wird Isofluran mit einem Volumenanteil von 3,0% bei einem Fluss von 3,0 Liter/Minute verwendet. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe erhält die Ratte eine Injektion von Ketamin (10 mg pro 100 g Körpergewicht) und Rompun<sup>®</sup> (0,1 ml pro Tier) intramuskulär in die mediale Oberschenkelmuskulatur. 5-10 Minuten nach Injektion ist eine ausreichende Narkosetiefe für operative Eingriffe erreicht, die für ca. 2 Stunden anhält.

Blutentnahme:

Zur Blutentnahme stehen drei Methoden zur Wahl: Punktion einer Schwanzvene, Punktion eines hinter dem Auge liegenden, retrobulbären Venengeflechts und Punktion einer unterhalb der Zunge liegenden, sublingualen Vene. Die retrobulbäre Punktion kann zwar ausreichend Blut zur Verfügung stellen, ist aber technisch kompliziert, sehr invasiv und kann nicht in ausreichender Häufigkeit angewandt werden (maximal einmal pro Woche). Auch die Punktion der Schwanzvene erweist sich als technisch schwierig und ungeeignet für eine häufigere Blutentnahme. Die Punktion einer sublingualen Vene dagegen zeigt sich für unseren Bedarf als geeignet. Sie ist technisch einfacher als die anderen Methoden, liefert eine zur Kalziumbestimmung genügend große Menge Blut (250 bis 300 µl) und kann in ausreichender Häufigkeit (bis dreimal pro Woche) durchgeführt werden. Die anschließende Beobachtung der Tiere zeigt, dass sie durch die Blutentnahme nicht beeinträchtigt werden. So ist die Nahrungsaufnahme bereits wenige Stunden nach der Entnahme wieder möglich.

Zur Durchführung der Blutentnahme wird die Ratte narkotisiert und in Rückenlage gebracht. Dann werden Unter- und Oberkiefer fixiert, so dass man die Zunge vorsichtig mit einer Pinzette greifen und richtig positionieren kann. Nun sieht man zwei oberflächlich verlaufende Venen, die zum Mundboden etwas stärker werden. Man punktiert eine dieser Venen mit einer 1ml-Spritze und einer 26G-Nadel und entnimmt ca. 300 µl Blut. Anschließend wird die Punktionsstelle so lange komprimiert, bis die Blutung zum Stillstand gekommen ist.

### Parathyreoidektomie:

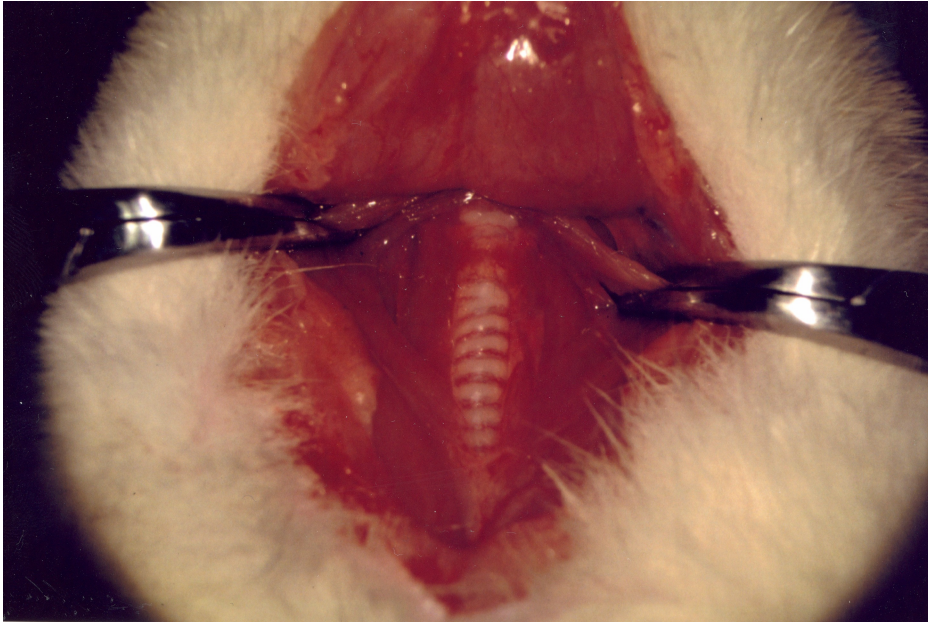
Die Ratte wird narkotisiert, zwischen Brustbein und Unterkiefer vorsichtig rasiert und in Rückenlage gebracht. Die Vorderläufe werden durch Klebestreifen fixiert, ohne dass dabei eine zu große Spannung im Halsbereich entsteht. Der Hautschnitt erfolgt knapp oberhalb des Brustbeines über den Kehlkopf hinweg bis in den Bereich des Unterkiefers. Nun wird die Haut vorsichtig mit einer feinen Schere beiderseits ca. 1,5 cm nach lateral vom Unterhautfettgewebe abpräpariert, was den Blick auf einen Bindegewebslappen freigibt, in dem die Speicheldrüsen der Ratte (Gl. submandibularis und Gl. sublingualis) eingelagert sind. Am kaudalen Ende dieses Lappens wird nun inzidiert und der Lappen mitsamt den enthaltenen Drüsen nach kranial bis zu den laterokranial liegenden Gefäßen freipräpariert.

Abbildung 3.2: Hals einer Ratte, 16-fache Vergrößerung



Darunter kommt der *Musculus sternohyoideus* zum Vorschein, welcher medial in Längsrichtung gespalten und gespreizt wird.

Abbildung 3.3: Hals einer Ratte, 16-fache Vergrößerung

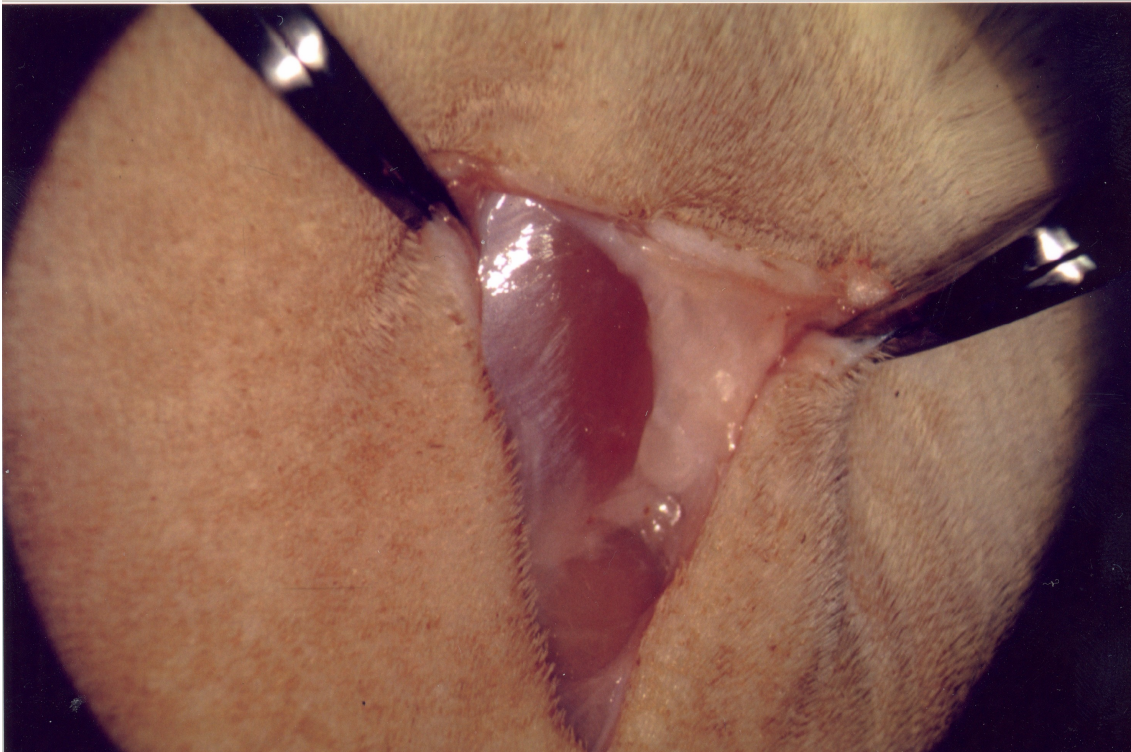


Jetzt hat man einen direkten Blick auf die Luftröhre und die beiderseits davon liegenden Schilddrüsenlappen mit dem verbindenden Isthmus in der Mitte. Um nun das Epithelkörperchen zu finden, muss man den der Schilddrüse lateral anliegenden Musculus thyrohyoideus abpräparieren. Als Orientierung dient nun die Vena thyreoidea und ein am oberen Pol der Schilddrüse gelegenes Fettkörperchen. Das Epithelkörperchen liegt oft zwischen Vene und Fettkörperchen auf der lateralen Seite des Schilddrüsenlappens und erscheint meist als milchigtrübe, linsenartige Struktur. Das Epithelkörperchen wird nun vorsichtig mit einer Mikroschere aus dem Schilddrüsenengewebe herausgeschnitten. Die Ratte wird anschließend noch in Narkose durch Injektion von T61 getötet.

#### Implantation:

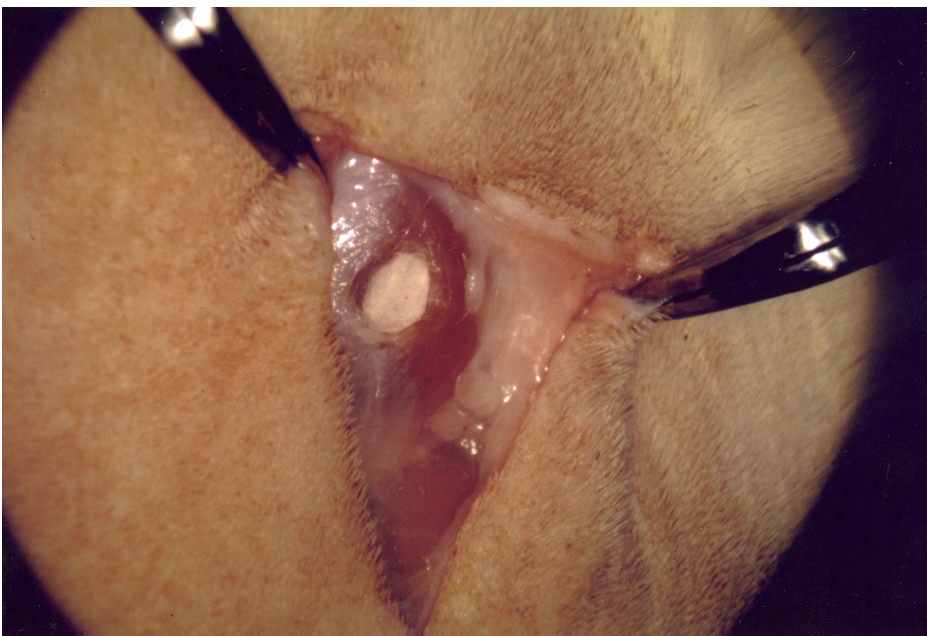
Die Ratte wird narkotisiert, außerdem wird die kaudale Hälfte des Rückens im Bereich der Wirbelsäule und einseitig davon ca. 3 cm nach lateral vorsichtig rasiert und desinfiziert. Der Hautschnitt erfolgt in der Mitte des rasierten Areals, etwa 0,5 cm neben der Wirbelsäule und auf einer Länge von ca. 2,5 cm.

Abbildung 3.4: Rücken einer Ratte, 16-fache Vergrößerung



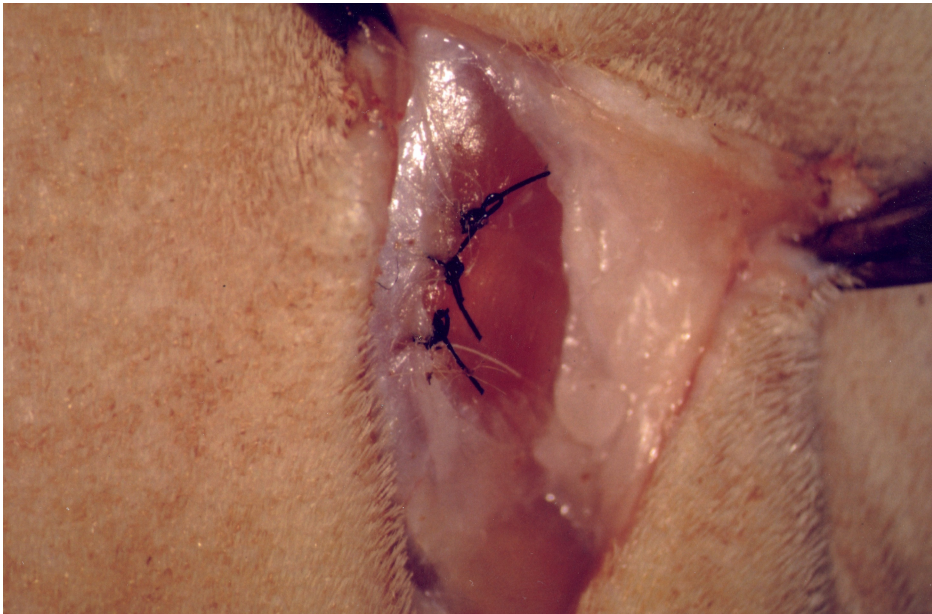
Man eröffnet die darunter liegende Muskulatur mit einer feinen Schere auf einer Länge von ca. 5 mm Länge und schafft sich durch Spreizung der Muskelfasern eine Tasche mit einer Tiefe von ebenfalls ca. 5 mm (im Bild ist die Tasche mit einer kleinen Komresse gefüllt).

Abbildung 3.5: Rücken einer Ratte, 16-fache Vergrößerung



Die Epithelkörperchen werden nun in diese Tasche gelegt, welche anschließend mit 2 bis 3 Einzelknopfnähten verschlossen wird. Es wird ein nichtresorbierbarer Faden (Prolene 5/0) verwendet, um das spätere Auffinden zu erleichtern.

Abbildung 3.6: Rücken einer Ratte, 16-fache Vergrößerung



Zum Abschluss wird der Hautschnitt mit Prolene 5/0 zugenäht.

Normalwerte:

Zur Festlegung des Normbereiches werden bei 10 Tieren Blutproben entnommen und der Kalziumspiegel bestimmt. Dieser Bereich wird als normokalzämisch definiert. Nach 10 erfolgreich durchgeführten Parathyreoidektomien wird ebenfalls der Kalziumspiegel bestimmt. Dieser Bereich wird dann als hypokalzämisch definiert.

### 3.2 Ermittlung der benötigten Gewebemenge

Um den Kalziumspiegel hypokalzämischer Tiere sicher zu normalisieren, ist eine Mindestmenge an transplantiertem Gewebe erforderlich. Um genaue Vorgaben zu erhalten, führen wir Transplantationen mit unterschiedlichen Gewebemengen laut nachfolgender Tabelle durch. Alle als Organempfänger verwendeten Ratten sind parathyreoidektomiert und liegen im hypokalzämischen Bereich. Postoperativ wird überprüft, ob es zu einem Anstieg des Kalziumspiegels gekommen ist oder nicht.

Tabelle 3.1: Übersicht der durchgeführten Transplantationen zur Ermittlung der benötigten Gewebemenge

Anzahl der transplantierten Nebenschilddrüsen pro Empfängertier	Spender / Empfänger (Stamm)	Anzahl der durchgeführten Transplantationen
2	WF / Lewis	3
4	Lewis / Lewis	1
	WF / Lewis	1
6	WF / Lewis	2
10	WF / Lewis	2
14	WF / Lewis	2



### 3.3 Analyse der MHC-Antigene

Um den Einfluss der MHC-Antigene auf eine Abstoßung besser abschätzen zu können, ist es erforderlich zu wissen, in welcher Menge diese auf den Nebenschilddrüsen der Ratten verschiedener Inzuchtstämme expremiert werden. Dazu werden Tiere jedes Stammes (Lewis, WF, DA) laut folgender Tabelle parathyreoidektomiert und das entnommene Nebenschilddrüsengewebe immunhistologisch untersucht.

Tabelle 3.2: Übersicht der histologisch untersuchten Epithelkörperchen

Inzuchtstamm	MHC-Antigen	Anzahl der untersuchten Nebenschilddrüsen
Lewis	Klasse I	10
	Klasse II	10
WF	Klasse I	10
	Klasse II	10
DA	Klasse I	10
	Klasse II	10

Das entnommene Gewebe wird in Tissue-Tek O.C.T. Compound der Firma Sakura eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die für die immunhistologischen Färbungen verwendeten Objektträger werden vor ihrer Verwendung mit einer Silanverbindung beschichtet, dies verbessert die Haftung der Organschnitte und erleichtert die Färbung. Dazu werden folgende 3 Lösungen zubereitet:

Lösung 1: 4 ml 3-Aminopropyltriethoxysilan  
196 ml Aceton

Lösung 2: 200 ml Aceton

Lösung 3: 200 ml Aceton

Die Objektträger werden der Reihe nach in die vorbereiteten Lösungen gegeben und verbleiben dort jeweils 1 Minute. Anschließend werden sie zum Trocknen ausgelegt.

Zum Schneiden der Gewebeproben steht ein Kryostat 2800 Frigocut N der Firma Reichert-Jung zur Verfügung. Die Schnitte werden bei  $-26^{\circ}\text{C}$  und mit einer Schichtdicke von  $5\ \mu\text{m}$  angefertigt. Nach dem Auftragen auf die vorbereiteten Objektträger werden sie für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Nun können sie sofort gefärbt oder bis zur späteren Färbung tiefgefroren werden.

#### Immunhistologische Färbung:

Zuerst werden die Objektträger in Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet.

Dann muss das in den Zellen vorhandene Enzym Peroxidase inaktiviert werden, da im weiteren Verlauf der Färbung ebenfalls Peroxidase verwendet wird und nur diese an der Farbreaktion teilhaben soll. Dazu werden die Objektträger für eine Stunde in ein Gemisch aus Natriumacid und Wasserstoffperoxid gegeben.

Als nächstes wird für 30 Minuten der Primärantikörper aufgetragen. Dieser bindet nur an spezielle Eiweißstrukturen des Objektes, in unserem Fall also an MHC-I- bzw. MHC-II-Antigene. Dann wird für weitere 30 Minuten der Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser ist gegen den Primärantikörper gerichtet und bindet nur an diesen. Danach wird ebenfalls für 30 Minuten der Tertiärantikörper aufgetragen, welcher nur an den Sekundärantikörper bindet. An einem Primärantikörper hängen nun mehrere Sekundärantikörper und an diesen noch mehr Tertiärantikörper, welche mit dem Enzym Peroxidase verbunden sind. Dies hat eine verstärkende Wirkung auf die folgende Farbreaktion, da so an einem Primärantikörper viele Enzyme gebunden sind und reagieren können.

Zur eigentlichen Färbung kommen die Objektträger in ein Gemisch aus Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid. Dieses Gemisch reagiert mit der Peroxidase und führt zur Farbreaktion.

Zum Abschluss werden die Objektträger noch mit Hämalan gefärbt um wichtige Zellstrukturen wie z.B. den Kern erkennen zu können.

#### Auswertung der Färbungen:

Um die durchgeführten Färbungen standardisiert auswerten zu können, verwenden wir ein semiquantitatives Schema, das der Anzahl der positiv gefärbten Zellen laut nachfolgender Tabelle eine Beschreibung des Ausmaßes der Expression von MHC-Antigenen

zuordnet. Diese Auswertung wird für Parenchym und Interstitium getrennt durchgeführt.

Tabelle 3.3: semiquantitatives Auswertungsschema

Anzahl der positiv gefärbten Zellen	Ausmaß der Expression	Abkürzung
keine	keine Expression	-
weniger als 1/3	schwache Expression	+
zwischen 1/3 und 2/3	mittelstarke Expression	++
Mehr als 2/3	starke Expression	+++

### 3.4 Transplantation zur Ermittlung des MHC-Einflusses

Um den Einfluss der MHC-Expression für die Transplantatfunktion untersuchen zu können, werden Transplantationen entsprechend der folgenden Tabelle durchgeführt. Bei der syngenen Transplantation von Lewis auf Lewis überprüfen wir, ob hier die Transplantatfunktion auch über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt. Die allogene Transplantation von WF auf Lewis und von DA auf Lewis soll überprüfen, ob die unterschiedliche Expression von MHC-Antigenen auf den Nebenschilddrüsen von WF und DA mit einer unterschiedlichen Dauer der Transplantatfunktion in Zusammenhang gebracht werden kann. Dazu werden die beiden allogenen Gruppen untereinander und mit der syngenen Gruppe verglichen und mittels Student-t-Test auf Signifikanz geprüft.

Tabelle 3.4: Übersicht der durchgeführten Transplantationen

	Spender	Empfänger	Anzahl der Transplantationen
syngen	Lewis	Lewis	2
allogen	WF	Lewis	5
	DA	Lewis	4

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Technische Durchführung

Normalwerte:

Die bei den gesunden Ratten gemessenen Blutkalziumwerte ergeben einen physiologischen Normbereich von 2,2-2,6 mmol/l. Nach Entfernung der Nebenschilddrüsen sinkt der Spiegel auf Werte im Bereich von 1,4-1,9 mmol/l. Man kann von einer ausreichenden Parathyreoidektomie ausgehen, wenn der Kalziumspiegel auf unter 2,0 mmol/l abfällt, optimal sind Werte zwischen 1,5 und 1,8 mmol/l. Nur Ratten, deren Kalziumwert entsprechend abfällt, sind als Empfänger geeignet. Inkomplett parathyreoidektomierte Ratten werden in Narkose getötet. Eine zweite Operation ist nicht Erfolg versprechend, da bei diesen Tieren auch akzessorische Epithelkörperchen vorhanden sein könnten, deren Auffinden nicht möglich ist.

Anatomie und Explantation:

Wir verwenden für unsere Versuche Ratten der Inzuchtstämme Lewis, WF und DA, die von uns hinsichtlich der technischen Durchführbarkeit einer Parathyreoidektomie untersucht werden. Es zeigt sich, dass bei den Stämmen Lewis und WF 9 von 10 Epithelkörperchen sicher identifiziert und entfernt werden können. Die Abgrenzung der Epithelkörperchen vom Schilddrüsengewebe beim Stamm DA ist schwieriger als bei den anderen Stämmen, hier können etwa 8 von 10 Epithelkörperchen sicher identifiziert werden. Wir erreichen also für die Durchführung der Parathyreoidektomie eine Erfolgsrate von 90% für die Stämme Lewis und WF und 80% für den Stamm DA.

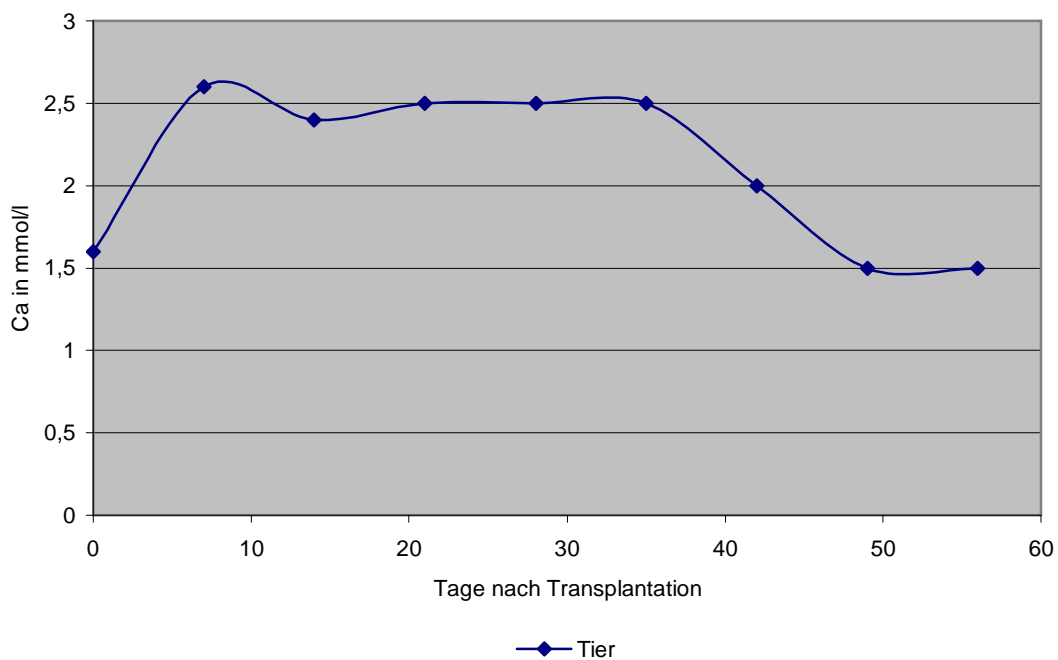
Implantation:

Nach Implantation zeigt sich bei etwa 8 von 10 Transplantationen ein Kalziumanstieg auf über 2,0 mmol/l, was einer Erfolgsrate von 80% entspricht.

Transplantation:

Zur Überprüfung der Transplantatfunktion transplantieren wir 6 Epithelkörperchen syngen von Lewis auf Lewis. Am 39. Tag nach der Operation werden die transplantierten Epithelkörperchen wieder entnommen. Zur Dokumentation des Kalziumspiegels werden vom Tag der Transplantation (Tag 0) bis Tag 56 nach Transplantation Blutentnahmen durchgeführt. Der Verlauf des Kalziumspiegels (in mmol) wird graphisch dargestellt.

Abbildung 4.1: Ca-Verlauf bei syngener Transplantation



Die Auswertung zeigt, dass nach Implantation der Epithelkörperchen der Kalziumspiegel in den Normbereich ansteigt und nach deren Explantation wieder in den hypokalzämischen Bereich abfällt. Das gewählte Versuchsmodell ist daher prinzipiell zur Beantwortung der gestellten Fragen geeignet.

## 4.2 Ermittlung der benötigten Gewebemenge

Zur Ermittlung einer ausreichenden Gewebemenge werden die unten aufgeführten Transplantationen in den genannten Spender- und Empfängerkombinationen und der jeweils angegebenen Zahl an Epithelkörperchen durchgeführt. Transplantiert wird entweder syngen oder allogene. Außerdem wird am Tag der Transplantation (Tag 0) und am Tag 7 nach Transplantation (Tag 7) Blut zur Ermittlung des Kalziumspiegels entnommen. Wenn der Kalziumwert über 2,0 mmol/l steigt, kann man von einer erfolgreichen Transplantation ausgehen, falls der Wert unter 2,0 mmol/l bleibt, war die Transplantation nicht erfolgreich.

Tabelle 4.1: Ergebnisse nach allogener Transplantation zur Funktionskontrolle

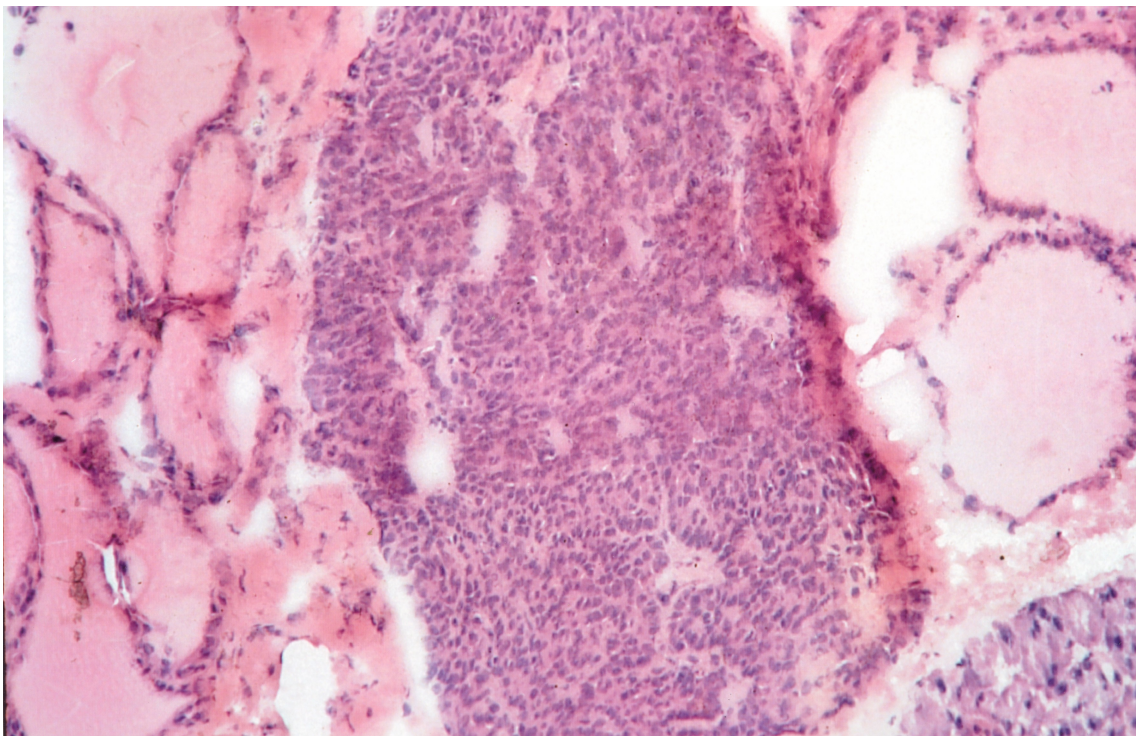
Zahl der Epithelkörperchen	Art der Transplantation	Spender	Empfänger	Ca in mmol/l an Tag 0	Ca in mmol/l an Tag 7
2	allogen	WF	Lewis	1,7	2,5
	allogen	WF	Lewis	1,6	1,6
	allogen	WF	Lewis	1,5	2,2
4	syngen	Lewis	Lewis	1,6	1,7
	allogen	WF	Lewis	1,6	2,7
6	allogen	WF	Lewis	1,7	2,5
	allogen	WF	Lewis	1,6	2,5
10	allogen	WF	Lewis	1,6	2,3
	allogen	WF	Lewis	1,6	2,2
14	allogen	WF	Lewis	1,5	2,6
	allogen	WF	Lewis	1,6	2,2

Man sieht, dass erst ab 6 übertragenen Epithelkörperchen bei allen durchgeführten Transplantationen ein Anstieg in den normokalzämischen Bereich erfolgt. Es sind also mindestens 6 Epithelkörperchen nötig, um einen ausreichenden Anstieg des Kalziumspiegels zu erhalten.

### 4.3 Analyse der MHC-Antigene

Durch Beurteilung einer Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) lässt sich das Nebenschilddrüsengewebe in Parenchym und Interstitium einteilen. Im Parenchym kann man überwiegend Hauptzellen für die Hormonproduktion und einige oxyphile Zellen mit bisher unbekannter Funktion erkennen, das Interstitium wird hauptsächlich aus Septen und Endothelzellen gebildet.

Abbildung 4.2: Schnitt durch Epithelkörperchen, HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung



Das Nebenschilddrüsengewebe wird nun immunhistologisch zum Nachweis von MHC-Antigenen angefärbt. Bei der Auswertung der Präparate mit spezifischer Anfärbung der MHC-I-Antigene zeigt sich, dass im Interstitium aller drei Rattenstämme nur wenige positive Zellen nachgewiesen werden können. Im Parenchym findet sich ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Stämmen in der Anzahl der positiv gefärbten Zellen. Bei Lewis sind weniger als 1/3 der Zellen positiv gefärbt, bei WF etwa 1/3 bis 2/3 der Zellen, bei DA mehr als 2/3 der Zellen.

Die Präparate mit spezifischer Anfärbung der MHC-II-Antigene fallen für alle drei Stämme gleich aus. Im Interstitium finden sich nur vereinzelt positiv gefärbte Zellen, im Parenchym sind keine Zellen angefärbt.

Bei Anwendung der semiquantitativen Bewertung auf die durchgeführten Färbungen erhält man folgende Ergebnisse:

Tabelle 4.2: Ergebnisse der MHC-Färbungen an Nebenschilddrüsen in Abhängigkeit vom Tierstamm

Stamm	Antigen	Anzahl der Färbungen	Expression im Interstitium	Expression im Parenchym
Lews	MHC I	5	+	+
	MHC II	5	+	-
WF	MHC I	5	+	++
	MHC II	5	+	-
DA	MHC I	5	+	+++
	MHC II	5	+	-

Die hier interpretierten Färbungen sind im Anhang als Bilder angefügt.

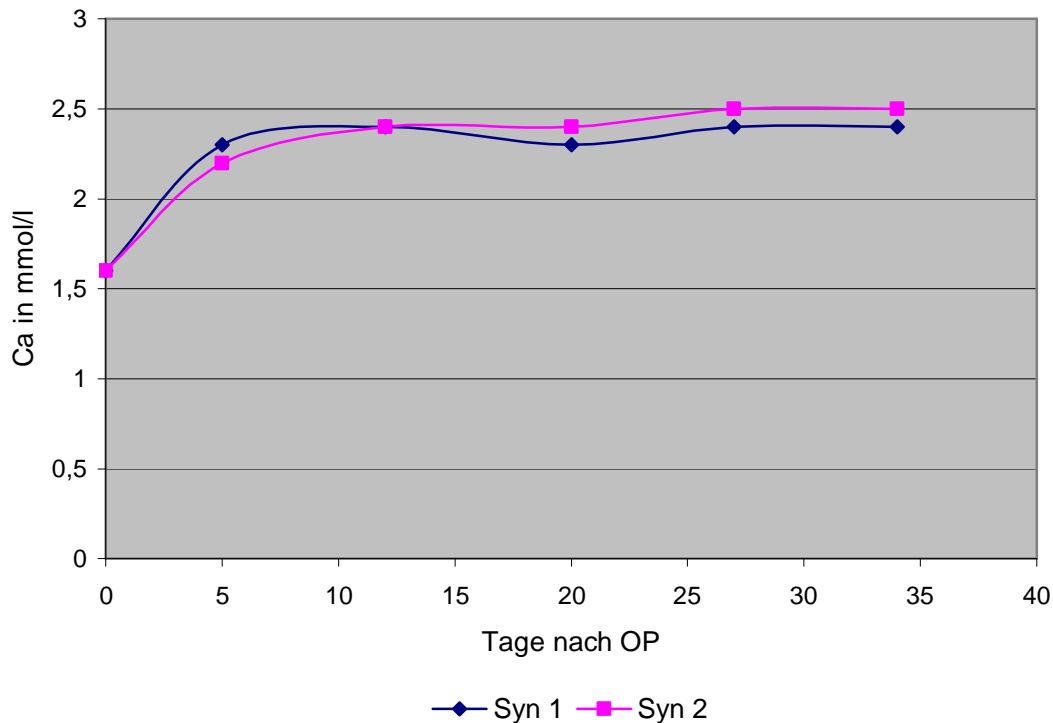


#### 4.4 Transplantation zur Ermittlung des MHC-Einflusses auf die Transplantatfunktionszeit

Syngene Kontrollgruppe:

Es werden 2 syngene Transplantationen von Lewis auf Lewis durchgeführt, um zu zeigen, dass hier die Transplantatfunktion auch über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden kann. Es werden 10 Epithelkörperchen pro Transplantation übertragen. Der Verlauf des Kalziumspiegels (in mmol/l) wird durch Blutentnahmen zwischen Tag 0 und Tag 34 dokumentiert und graphisch dargestellt.

Abbildung 4.3: Serum-Ca-Spiegel bei syngener Transplantation von Lewis auf Lewis

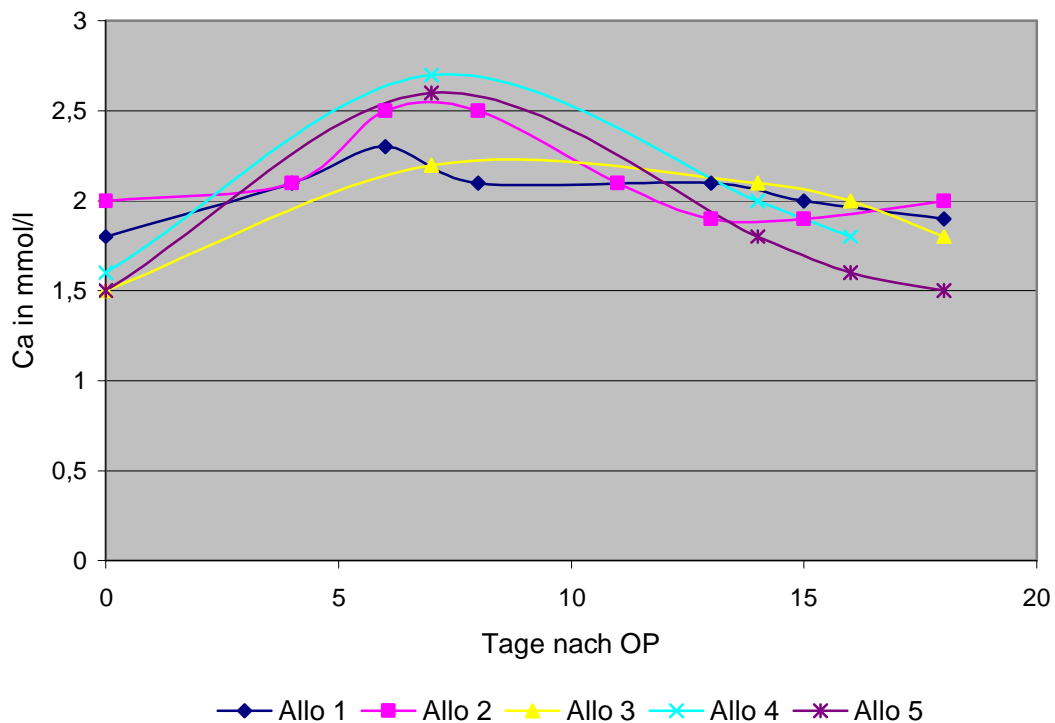


Man erkennt, dass der Kalziumspiegel zwischen Tag 3 und Tag 4 nach Transplantation in den normokalzämischen Bereich ansteigt und bis zum Ende des Versuches dort bleibt. Bei einer syngenen Transplantation mit der Übertragung gleicher MHC-Antigene ist auch über einen längeren Zeitraum hinweg kein Nachlassen der Transplantatfunktion nachweisbar.

### Allogene Transplantationsgruppe I:

Zur Bestimmung der Dauer der Transplantatfunktion werden nun allogene Transplantationen von WF auf Lewis durchgeführt, es werden 10 Epithelkörperchen pro Transplantation übertragen. Der Verlauf des Kalziumspiegels wird durch Blutentnahmen von Tag 0 bis Tag 18 dokumentiert und graphisch dargestellt.

Abbildung 4.4: Serum-Ca-Spiegel bei allogener Transplantation WF auf Lewis

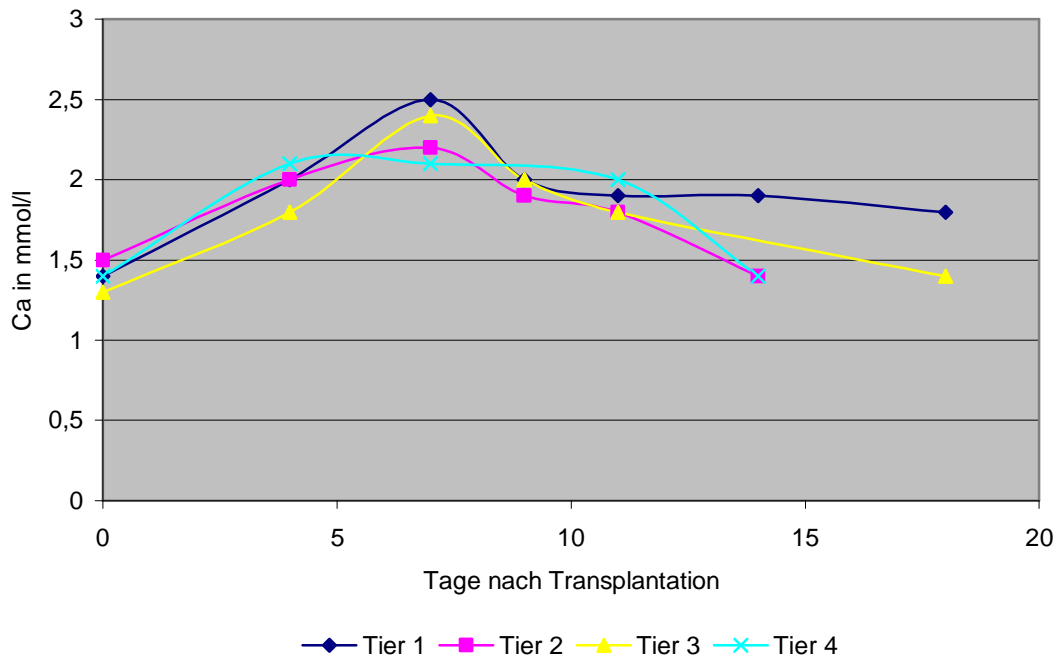


Hier steigt der Kalziumspiegel ebenfalls zwischen dem 3. und 4. Tag nach Transplantation in den normokalzämischen Bereich. Im Gegensatz zur syngenen Gruppe kommt es aber zwischen den Tagen 12 und 16 (Mittelwert 13,9, Standardabweichung 1,68) nach Transplantation zu einem Abfall in den hypokalzämischen Bereich. Bei einer allogenen Transplantation von WF auf Lewis ist also die Transplantatfunktion nur zwischen den Tagen 4 und 14 nach Transplantation nachweisbar.

Allogene Transplantationsgruppe II:

Wir transplantieren nun allogen von DA auf Lewis, es werden 10 Epithelkörperchen pro Transplantation übertragen. Der Verlauf des Kalziumspiegels wird wieder durch Blutentnahmen von Tag 0 bis Tag 18 dokumentiert und graphisch dargestellt.

Abbildung 4.5: Serum-Ca-Spiegel bei allogener Transplantation DA auf Lewis



Auch hier steigt der Kalziumspiegel zwischen dem 3. und 4. Tag nach Transplantation in den normokalzämischen Bereich an, fällt allerdings bereits zwischen dem 8. und 11. Tag (Mittelwert 9,4, Standardabweichung 1,14) nach Transplantation wieder in den hypokalzämischen Bereich zurück. Die Transplantatfunktion ist also bei allogener Transplantation von DA auf Lewis nur zwischen dem 4. und 9. Tag nach Transplantation nachweisbar. Dieser Unterschied zwischen den beiden allogenen Gruppen ist signifikant (siehe Statistik im Anhang). Im Vergleich beider Gruppen stellt man fest, dass eine Übertragung von Nebenschilddrüsengewebe mit einer höheren Expression von MHC-I-Antigen (DA) eine kürzere Transplantatfunktion zur Folge hat als eine Übertragung von Gewebe mit einer niedrigeren Expression von MHC-I-Antigen (WF).

## 5 Beantwortung der Fragen

- Zu 1.: Eine experimentelle Nebenschilddrüsentransplantation kann erfolgreich durchgeführt werden. Der Kalziumspiegel, der als Kontrolle dient, fällt ca. 1 Woche nach Entfernung der Epithelkörperchen unter den Normbereich ab und kehrt innerhalb von ca. 4 Tagen nach erfolgter Transplantation wieder in diesen zurück.
- Zu 2.: Für die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Transplantatfunktion, gemessen an einem permanenten Kalziumspiegel von über 2,0 mmol/l, muss eine Mindestmenge von 6 Nebenschilddrüsen im Rattenmodell transplantiert werden. Dies entspricht einem Spender-Empfänger-Verhältnis von 3:1.
- Zu 3.: Die Expression von MHC Klasse I Antigen auf Nebenschilddrüsenzellen unterliegt einer stammabhängigen Varianz: Tiere des Stammes Lewis zeigen eine schwache Expression, Tiere des Stammes WF eine mittelstarke und Tiere des Stammes DA eine starke Expression. MHC Klasse II Antigen ist auf den Nebenschilddrüsenzellen nicht vorhanden und nur im Interstitium schwach nachweisbar.
- Zu 4.: Es findet sich eine Transplantatfunktion in Abhängigkeit vom Ausmaß der MHC Klasse I Expression auf Spendernebenschilddrüsenzellen. Starke MHC I Expression führt zu einem schnelleren Transplantatfunktionsverlust. Die Anzahl der MHC II exprimierenden Zellen im Interstitium scheint hierauf keinen Einfluss zu haben.

## 6 Diskussion

Laut statistischem Bundesamt werden in Deutschland jährlich circa 100.000 Patienten einer Schilddrüsenresektion und etwa 1000 Patienten einer Thyreoidektomie unterzogen. Legt man für diese Eingriffe eine Inzidenz des permanenten Hypoparathyreoidismus von 1-5% zugrunde, so ergibt sich eine Zahl von über 1000 Patienten, die pro Jahr an einer Nebenschilddrüsenunterfunktion erkranken (31). Aufgrund der komplexen Funktion des Parathormons und der physiologischerweise vorhandenen Tagesrhythmik der Hormonproduktion ist die konservative Therapie der Nebenschilddrüsenunterfunktion schwierig. Häufig bedürfen die Patienten hoher intravenöser Dosierungen von Kalzium. Daher besteht nach wie vor Bedarf an einer kausalen Therapie dieser Mangelerkrankung. Aufgrund der Erkenntnisse, die im Rahmen der Nebenschilddrüsenautotransplantation nach Operationen an Schilddrüsen und Nebenschilddrüsen gesammelt wurden, ist belegt, dass dieses Gewebe prinzipiell ohne Funktionsverlust übertragbar ist (31). Daher ist die Nebenschilddrüsentransplantation als mögliche kurative Therapie des Hypoparathyreoidismus seit längerem Gegenstand experimenteller und klinischer Forschung (9, 13, 14, 15). Zur Therapie eines postoperativen Hypoparathyreoidismus müsste jedoch eine Gewebeübertragung von einem Patienten auf einen anderen Patienten erfolgen. Die hierbei zu erwartende Abstoßungsreaktion kann aber nicht, wie bei anderen Organübertragungen üblich, durch eine lebenslange Immunsuppression verhindert werden, da die Nebenwirkungen dieser Therapie den Nutzen der Transplantation relativieren würden.

Eine Analyse der Abstoßungsvorgänge könnte weitere Erkenntnisse zur Lösung der immunologischen Probleme liefern. Daher ist es wichtig, ein geeignetes experimentelles Tiermodell zu finden, dessen Ziel und Nutzen in der Entwicklung alternativer Formen der Beeinflussung der Abstoßungsreaktion nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation liegen.

## 6.1 Tiermodell

Zur Überprüfung der Transplantatfunktion wird der Kalziumspiegel herangezogen. Um den Normbereich zu definieren, werten wir Blutproben gesunder Tiere aus und erhalten einen Normbereich von 2,2 bis 2,6 mmol/l. Nach erfolgter Parathyreoidektomie fällt der Kalziumspiegel signifikant auf Werte zwischen 1,6 und 1,9 mmol/l ab, so dass wir Werte kleiner als 2,0 mmol/l als den hypokalzämischen Bereich definieren.

Die bereits veröffentlichte Literatur von Hasse (13) gibt einen Normbereich von 2,4 bis 2,6 mmol/l an. Hasse definiert den hypokalzämischen Bereich von 1,4 bis 1,9 mmol/l, Xiao Wen Fu alle Werte kleiner 1,7 mmol/l.

Innerhalb von etwa einer Woche nach Entfernung der Epithelkörperchen werden die Tiere hypokalzämisch, ca. 3 bis 6 Tage nach erfolgter Transplantation ist der Kalziumspiegel wieder in den Normbereich angestiegen und verbleibt dort. Nach Explantation der Nebenschilddrüsen am Tag 30 fällt der Kalziumwert wieder auf hypokalzämische Werte ab.

Alle von uns ermittelten Werte stimmen mit den in der Literatur (13) veröffentlichten Werten überein, der Kalziumspiegel verläuft erwartungsgemäß und ebenfalls konform mit den verfügbaren Literaturergebnissen.

## 6.2 Spender-Empfänger-Verhältnis

Um eine für eine ausreichende Transplantatfunktion nötige Gewebemenge zu ermitteln, führen wir Transplantationen mit der Übertragung von 2, 4, 6, 10 und 14 Epithelkörperchen durch. Bei 2 und 4 übertragenen Epithelkörperchen kommt es bei einigen Transplantationen nicht zu einem Anstieg der Kalziumwerte, so dass man davon ausgehen muss, dass diese Verhältnisse für eine funktionale Transplantation nicht ausreichend sind. Ab einer Menge von 6 Epithelkörperchen ist bei der Verwendung von nativem Gewebe eine ausreichende Transplantatfunktion nachweisbar. Wird eine zusätzliche Behandlung des transplantierten Gewebes oder des Empfängers durchgeführt, sollten 10 Epithelkörperchen übertragen werden. Dies entspricht einem Spender-Empfänger-Verhältnis von 5:1. Eine Übertragung von 14 Epithelkörperchen

Verhältnis von 5:1. Eine Übertragung von 14 Epithelkörperchen ergibt keine nennenswerte Verbesserung der Ergebnisse.

Hasse (15) verwendet für seine Transplantationen ein Verhältnis von 10:1, er transplantiert also 20 Epithelkörperchen. Das von ihm entnommene Gewebe durchläuft eine Kulturpassage und wird im Anschluss daran mikroverkapselt. Wir nehmen an, dass Hasse eine höhere Ausgangsmenge verwendet, um das möglicherweise bei der traumatisierenden Vorbehandlung zugrunde gehende Gewebe kompensieren zu können.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass durch eigene Versuche der in der Literatur veröffentlichte Wert von 10:1 auf 5:1 gesenkt werden konnte, ohne die Transplantatfunktion zu gefährden.

### **6.3 Transplantationen**

Syngene Kontrollgruppe:

Bei der Betrachtung des Kalziumspiegels zeigt sich, dass der Wert der transplantierten Tiere, der am Tag der Transplantation (Tag 0) bei 1,6 mmol/l liegt, bereits am Tag 5 nach Operation auf 2,2 bzw. 2,3 angestiegen ist und auch im weiteren Verlauf der Beobachtung sehr stabil bleibt. Die Ratten sind also schon wenige Tage nach der Transplantation normokalzämisch und bleiben dies auch bis zum Ende des Versuches. Das transplantierte Gewebe wird offensichtlich ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, so dass es auch über längere Zeit vital bleibt, das produzierte Parathormon kann abtransportiert und dem gesamten Körper systemisch zu Verfügung gestellt werden, und die transplantierten Epithelkörperchen können so gut auf Schwankungen im Kalziumspiegel reagieren, dass dieser auch über Wochen stabil bleibt. Dies zeigt eindeutig den Erfolg der Transplantation.

Auch diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein. Hasse (13) gibt an, dass nach syngener Transplantation nach 42 Tagen 100% und nach 90 Tagen immer noch 57% der transplantierten Tiere normokalzämisch waren. Bei Transplantation von mit Barium-Alginat (15) verkapselten Epithelkörperchen konnte er die Funktion sogar über einen Zeitraum von 26 Wochen nachweisen.

### Allogene Gruppen:

Es werden die beiden Gruppen mit Transplantationen von WF auf Lewis und DA auf Lewis untersucht. Die Kalziumwerte liegen am Tag 0 zwischen 1,5 und 1,9 mmol/l (Mittelwert 1,68 mmol/l) und steigen ähnlich wie in der Kontrollgruppe am Tag 6 auf 2,3 bis 2,5 mmol/l an. Da auch in diesen Gruppen der Kalziumwert innerhalb weniger Tage den Normalbereich erreicht, kann davon ausgegangen werden, dass die Transplantationen hier ebenfalls erfolgreich waren. Im weiteren Verlauf treten jedoch Unterschiede zur Kontrollgruppe auf, die im Einzelnen nun diskutiert werden sollen. Die Gemeinsamkeit beider Gruppen ist der Abfall des Kalziumspiegels, der Unterschied ist der Zeitpunkt dieses Abfalls. Man kann erkennen, dass die Grenze von 2,0 mmol/l in der Gruppe WF auf Lewis zwischen dem 12. und dem 16. postoperativem Tag unterschritten wird (Mittelwert: Tag 13,9), in der Gruppe DA auf Lewis geschieht dies zwischen Tag 8 und Tag 11 (Mittelwert: Tag 9,35). Der Abfall des Kalziumspiegels lässt vermuten, dass eine Reaktion des Immunsystems auf das körperfremde Gewebe erfolgt ist, so dass es in den beiden Gruppen etwa an den Tagen 9 (DA auf Lewis) bzw. 14 (WF auf Lewis) nach Operation zu einer Abstoßung des transplantierten Gewebes kommt. Vermutlich hat hier die unterschiedliche Expression von MHC-I einen wichtigen Einfluss, denn in der Gruppe, die nach etwa 9 Tagen abgestoßen hat, ist Gewebe mit einer höheren MHC-I Expression transplantiert worden als in der Gruppe, die nach etwa 14 Tagen abgestoßen hat. Diese zeitliche Differenz ist, mittels t-Test (Student-Test) verifiziert, signifikant unterschiedlich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 1%. Man kann also folgern, dass eine höhere Expression von MHC-I eine schnellere Abstoßungsreaktion bewirkt. Dies wäre dadurch zu erklären, dass eine höhere Expression von MHC-I einen stärkeren Reiz auf T-Lymphozyten ausübt, sich in stärkerem Maß in zytotoxische T-Lymphozyten umzuwandeln, welche bei einer höheren Expression von MHC fremde Zellen dann auch schneller erkennen und abtöten können.

Hasse (13) beschreibt nach allogener Transplantation einen Abfall des Kalziumwertes nach 21 Tagen. Der Unterschied kann möglicherweise durch die Verwendung einer anderen Stammkombination (hier Transplantation von Lewis auf DA) erklärt werden. Das Resultat kann aber auch mit unseren oben diskutierten Ergebnissen erklärt werden, da Lewis als Spender eine niedrige MHC-I Expression aufweist als WF oder DA und man so eine längere Abstoßungszeit erwarten würde.



## 6.4 Expression der MHC Antigene

Entgegen früherer Vermutungen, endokrines Gewebe sei „immunologisch privilegiert“, da es aufgrund mangelnder Expression von Histokompatibilitätsantigenen vom Empfängerimmunsystem nicht als fremd erkannt und abgestoßen werden kann (29), zeigen neuere Untersuchungen jedoch, dass sowohl MHC I als auch MHC II Antigene auf menschlichem Nebenschilddrüsengewebe nachweisbar sind. Das Ausmaß der Expression scheint hierbei von pathologischen Veränderungen des Gewebes abhängig zu sein, wie eine Publikation von Bjerneroth et al zeigen konnte (6). Die Autoren fanden hier einen Unterschied in der Expression von MHC-I zwischen normalem, hyperplastischem und adenomatösem Gewebe, und dass auch MHC-II in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wird. Sie beschreiben für gesundes Gewebe eine sehr schwache Expression sowohl an MHC-I als auch an MHC-II, für pathologisch verändertes Gewebe dagegen eine deutlich gesteigerte Expression beider Antigene. Eine gezielte Untersuchung zur Expression der Histokompatibilitätsantigene auf Rattennebenshilddrüsengewebe findet sich bei der Literatursuche nicht, lediglich die Existenz MHC Klasse II exprimierender Zellen im Interstitium, also dem Bindegewebsraum zwischen den einzelnen Zellen, wurde beschrieben (25). Diesen Zellen, den so genannten „passenger leucocytes“, kommt bei der Vermittlung einer zellulären Abstoßungsreaktion eine besondere Rolle zu, weshalb deren Entfernung aus dem Transplantat vor einer Transplantation Gegenstand verschiedener experimenteller und klinischer Untersuchungen gewesen ist (32, 33, 34).

Unsere eigenen immunhistologischen Untersuchungen zur Expression von Histokompatibilitätsantigenen auf Nebenschilddrüsengewebe der Ratte zeigen eine regelmäßige Expression des MHC Klasse I Antigens auf den Zellen. Die Intensität der Expression ist dabei stammabhängig und findet sich in einem semiquantitativen Scoring-System schwach für den Lewis-Stamm, mittelstark für WF-Stamm und stark für DA-Stamm. Die Anzahl der MHC Klasse II positiven Zellen im Interstitium hingegen war bei allen untersuchten Stämmen gleich schwach. Die beobachteten Unterschiede bezüglich der

Dauer der Transplantatfunktion können demzufolge nicht ursächlich hierauf zurückgeführt werden.

Hinsichtlich der Mechanismen, welche eine zelluläre Abstoßungsreaktion initiieren können, werden derzeit zwei mögliche Aktivierungskaskaden diskutiert. 1.: Der direkte Weg der Antigenpräsentation, bei dem einer T-Zelle des Empfängers durch eine Spenderzelle fremdes MHC-Antigen präsentiert wird. Die Spenderzelle wird bei der Transplantation mit dem Organ in den Empfänger übertragen (passenger leucocytes). Diese Form der Antigenpräsentation stellt den stärksten Stimulus der T-Zell vermittelten Immunantwort dar und wird im Wesentlichen für die akute Abstoßungsreaktion verantwortlich gemacht. 2.: Bei der indirekten Antigenpräsentation wird der Empfänger-T-Zelle prozessiertes Fremd-MHC in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche einer Empfängerzelle von MHC-Molekülen des Empfängers präsentiert. Derzeit wird der indirekte Weg der allogenen Transplantaterkennung im Wesentlichen als ursächlich für die chronische Abstoßungsreaktion angesehen.

Zwei hypothetische Schlussfolgerungen lassen sich daher aus Vorgesagtem im Bezug auf die in unseren Versuchen feststellbaren Unterschiede der Transplantatfunktionsdauer ziehen: 1.: Die Anzahl der MHC Klasse II positiven Zellen im Interstitium der Transplantate unterscheiden sich bei den verschiedenen Stämmen nicht, so dass die Bedeutung dieser Zellen für das Abstoßungsverhalten aufgrund unserer Daten unklar bleibt. Dies steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus zwei klinischen Studien. Die Arbeitsgruppe um Sollinger konnte nach Entfernung von passenger leucocytes aus Nebenschilddrüsentransplantaten durch vorübergehende Implantation in Nacktmäuse eine signifikant verlängerte Transplantatfunktion nachweisen (25). In einer Arbeit von Anton et al wurde einem Patient Nebenschilddrüsenengewebe transplantiert aus dem zuvor sämtliche MHC Klasse II positiven Zellen entfernt wurden, was ebenfalls zu einer verlängerten Transplantatfunktion führte (35). Genauere Analysen hinsichtlich der Art der Abstoßungsreaktion und der beteiligten Zellen wurden in diesen Arbeiten nicht durchgeführt. 2.: Die Dauer der Transplantatfunktion in unseren Untersuchungen war abhängig vom Ausmaß der MHC Klasse I Antigene auf den Nebenschilddrüsenzellen des Spenders. Hierbei zeigte sich eine signifikant längere Funktionsdauer bei Transplantaten mit geringer ausgeprägter MHC Klasse I Expression im Vergleich zu stark exprimierendem Spendergewebe. Dies deutet darauf hin, dass der indirekte Weg der Antigenpräsentation

bei der allogenen Nebenschilddrüsen transplantation möglicherweise eine bedeutendere Rolle spielt, als bisher vermutet. Weiterführende Untersuchungen hierzu sollten daher neben der exakten Analyse der Abstoßungsreaktion in diesem Transplantationsmodell auch die Evaluation einer gezielten Vorbehandlung des Spendergewebes mit dem Ziel der Reduktion der MHC Klasse I Antigene auf den Nebenschilddrüsenzellen oder eine entsprechende spenderspezifische Vorbereitung der Empfängertiere beinhalten.

## **6.5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wird ein Modell zur Transplantation von Epithelkörperchen in der Ratte entwickelt, um grundlegende immunologische Daten für eine mögliche kausale Therapie des Hypoparathyreoidismus zu erhalten.

Es zeigt sich, dass ab einer Mindestmenge von 6 transplantierten Nebenschilddrüsen eine sichere Transplantatfunktion nachgewiesen werden kann. Die Dauer dieser Transplantatfunktion ist von der Stammkombination der Inzuchtratten abhängig, bei einer Transplantation von DA auf Lewis ist sie kürzer als bei einer Transplantation von WF auf Lewis. Bei der Untersuchung der MHC-Antigene kann eine stammabhängige Expression von MHC-I-Antigen nachgewiesen werden. Lewis zeigt eine schwache, WF eine mittelstarke und DA eine starke Expression, ein Student-t-Test ergibt einen signifikanten Zusammenhang zwischen dieser Expression und der Dauer der Transplantatfunktion. Die Expression von MHC-II-Antigen weist keinen Unterschied zwischen den beschriebenen Rattenstämmen auf.

Die logische Fortführung der Forschung und dieser Ergebnisse liegt zum Beispiel in einer genaueren Untersuchung und Verfeinerung der transplantationsbegleitenden Therapie mit Immunsuppressiva wie zum Beispiel Cyclosporin A oder anderen experimentellen Ansätzen zur Immunmodulation wie z.B. Zellkulturpassage oder präoperativer Antikörpertherapie.

## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Heeger P: T-Cell Allorecognition and Transplant Rejection: A Summary and Update. *American Journal of Transplantation* 2003; 3: 525-533
- (2) Åkerström G, Rastad J, Ljunghall S, Ridefelt P, Juhlin C, Gylfe E: Cellular Physiology and Pathophysiology of the Parathyroid Glands. *World Journal of Surgery* (1991); 15: 672-680
- (3) Arlt W, Fremerey C, Callies F, Reincke M, Schneider P, Timmermann W, Allolio B: Well-being, mood and calcium homeostasis in patients with hypoparathyroidism receiving standard treatment with calcium and vitamin D. *Eur-J-Endocrinol.* (2002); Feb 146(2): 215-222
- (4) Audran M, Basle M F, Defontaine A, Jallet P, Bidet M T, Ermias A, Tanguy G, Pouplard A, Zanelli J: Transient hypoparathyroidism induced by synthetic human parathyroid hormone-(1-34) treatment. *J-Clin-Endocrinol-Metab.* (1987); May 64(5): 937-943
- (5) Fleischhauer K, Groscurth P: Benninghoff Anatomie, 15. Auflage, Urban & Schwarzenberg (1994); Band 2: 197-200
- (6) Bjerneroth G, Juhlin C, Rastad J, Åkerström G, Klareskog L: MHC class I and II antigen expression on parathyroid cells and prospects for their allogenic transplantation. *Transplantation* (1993); 56: 717-721
- (7) Heitz Ph U, Klöppel G: Böker, Denk, Heitz Pathologie, Urban & Schwarzenberg (1997): 377-380
- (8) Daar A S, Fuggle V, Fabre J W, Ting A, Morris P J: The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation* (1984); 38 (3): 287-292
- (9) Duarte B, Mozes M F, John E, Aronson I, Pollak R, Jonasson O: Parathyroid allotransplantation in the treatment of complicated idiopathic primary hypoparathyroidism. *Surgery*; Vol.98/6: 1072-1074
- (10) Eickhoff W: Epithelkörperchen. 494-500
- (11) Feind C R, Weber C J, Derenoncourt F, Williams G A, Hardy M A, Reemtsma K: Survival and Allotransplantation of Cultured Human Parathyroids. *Transplantation Proceedings* (1979); XI No 1: 1011-1017

- (12) Scholz G H, Scherbaum W A, Schettler G, Greten H: Innere Medizin, Thieme Verlag, 2. Auflage (1998): 568-587
- (13) Hasse C, Schrezenmeir J, Stinner B, Schark C; Wagner P K, Neumann K, Rothmund M: Successful Allograft Transplantation of Microencapsulated Parathyroids in Rats. *World Journal of Surgery* (1994); 18: 630-634
- (14) Hasse C, Klöck K, Schlosser A, Zimmerman U, Rothmund M: Parathyroid Allograft Transplantation without Immunosuppression. *Lancet* (1997); 350: 1296-1297
- (15) Hasse C, Zielke A, Klöck G, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M: Isotransplantation of microencapsulated tissue in rats. *Endocrinology & Diabetes* (1997); 105: 53-56
- (16) Hasse C, Schlosser A, Klöck G, Barth P, Stinner B, Zimmermann U, Rothmund M: Heterologe Transplantation der humanen Parathyreoidea nach Mikroenkapsulierung mit klinisch einsetzbarem Alginat: Langzeitfunktion ohne Immunsuppression im Tierversuch. *Langenbecks Archiv der Chirurgie* (1998); Forumband: 713-717
- (17) Hasse C, Zielke A, Klöck G, Schlosser A, Barth P, Zimmermann U, Sitter H, Lorenz W, Rothmund M: Amitogenic Alginates: Key to First Clinical Application of Microencapsulation. *World Journal of Surgery* (1998); 22: 659-665
- (18) Hasse F M, Müller-Lange P: *Klinikleitfaden Chirurgie*, Fischer Verlag, 2. Auflage (1997): 314-315
- (19) Silbernagel S: *Lehrbuch der Physiologie*, 2. Auflage, Thieme (1996): 352-355
- (20) Matalanis G, Clunie G J A, Whitehead R H: A technique for the in vitro culture of human parathyroid gland tissue. *Aust. N. Z. J. Surg.* (1988); 58: 407-411
- (21) Naji A, Barker C F: The Influence of Histocompatibility and Transplant Site on Parathyroid Allograft Survival. *Journal of Surgical Research* (1976); 20: 261-267
- (22) Olds, Olds: *Farbatlas der Anatomie der Ratte*, Schober Verlags-GmbH (1984)
- (23) Segerberg E C, Grubb W G, Henderson A E: The first successful parathyroid transplant from an identical twin for the cure of permanent postoperative hypoparathyroidism. *Surgery* (1992); 111: 357-358
- (24) Rothmund M, Siewert J R: *Chirurgie*, Springer, 6. Auflage (1998): 524-531

- (25) Sollinger H W, Mack E, Cook K, Belzer F O: Allotransplantation of human parathyroid tissue without immunosuppression. *Transplantation* (1983); 36 No 6: 599-602
- (26) Wagner P K, Knuth A, Krause U, Gabbert H, Schärfe T, Rothmund M: An in vitro Model for the Study of Human Parathyroid Gland Tissue: Single Cell Suspensions and Monolayer Cultures. *Research in Experimental Medicine* (1982); 181: 147-154
- (27) Wozniewicz B, Migaj M, Giera B, Prokurat A, Tolloczko T, Sawicki A, Nawrot I, Górski A, Zabitkowska T, Kossakowska A E: Cell Culture Preparation of Human Parathyroid Cells for Allotransplantation Without Immunosuppression. *Transplantation Proceedings* (1996); 28 No 6: 3542-3544
- (28) Xiao Wen Fu, Sux A M: Microencapsulated parathyroid cells as a bioartificial parathyroid. *Transplantation* (1989); 47: 432-435
- (29) Yao C Z, Ishizuka J, Townsend C M, Thompson J C: Successful intracerebroventricular allotransplantation of parathyroid tissue in rats without immunosuppression. *Transplantation* (1993); 55 No 2: 251-253
- (30) Thyro-, Parathyroidektomy in Rats, Experimental and Surgical technique in the rat: 206-208
- (31) El-Sharaky M I, Kahalil M R, Sharaky O, Sakr M F, Fadaly G A, El-Hammadi H A, Moussa M M: Assessment of parathyroid autotransplantation for preservation of parathyroid function after total thyroidectomy. *Head Neck*. 2003 Oct;25(10):799-807
- (32) Lafferty K J, Cooley M A, Woolnough J, Walker K Z: Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture. *Science* 1975; 188: 259
- (33) Sollinger H W, Burkholder P M, Rasmus W R, Bach F H: Prolonged survival of xenografts after organ culture. *Surgery* (1977); 81: 74
- (34) Simeonovic C J, Lafferty K J: Effect of organ culture on function of transplanted foetal pancreas. *AJEBAK* (1981); 59: 707
- (35) Anton G, Decker G, Stark JH, Botha JR, Margolius LP: Allotransplantation of parathyroid cells; *Lancet* (1995); Vol. 345: 124

## 8 Anhang

### 8.1 Verwendete Chemikalien und Antikörper

- Aceton
- 3-Aminopropyltriethoxysilan
- Natriumacid ( $\text{NaN}_3$ )
  - PBS 1 Liter
  - $\text{NaN}_3$  1-2 g
- Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30%
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
  - Aqua Destillata 1 Liter
  - $\text{NaCl}$  8,20 g
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0,89 g
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,68 g
  - pH 7,4
- Bovines Serum Albumin (BSA) 2%, 0,5%
- Rattennormalserum (RNS)
- Tris-HCl-Puffer
  - Aqua Destillata 1 Liter
  - Tris-HCl 7,88 g
  - pH 7,6
- 3,3-Diaminobenzidin ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4 \times 4\text{HCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$ , DAB)
- Hämalaun nach Mayr – wässrig
  - Aqua Destillata 5 Liter
  - Hämatoxylin 6 g
  - Natriumjodat 1 g
  - Kaliumaluminiumsulfat 250 g
  - Zitronensäure 5 g

Zutaten mit Aqua dest. anrühren, danach 6 Wochen im Dunkeln unverschlossen reifen lassen.
- Ethanol

- Xylol
- Eukit Kleber

Verwendete Primär-Antikörper:

Mouse anti Rat MHC Class 1 RT1a

MCA280

Clone Number: MN4-91-6

Arbeitsverdünnung: 1:50

Mouse anti Rat RT1a Class 1

MCA51G

Clone Number: OX 18

Arbeitsverdünnung: 1:100

Mouse anti I-A (Mouse/Rat) (IgG)

MCA46G

Clone Number: MRC OX 6

Arbeitsverdünnung: 1:100

Mouse anti I-A (Mouse/Rat) (IgG)

MCA45R

Clone Number: MRC OX 3

Arbeitsverdünnung: 1:100

Sekundär-Antikörper:

Rabbit anti Mouse

Code No. P0161

DAKO A/S, Denmark

1 : 50 Verdünnung mit 30% Rattennormalserum (RNS)

Tertiär-Antikörper:

Goat anti Rabbit

Code No. L42007

Caltag Laboratories, Burlingame, CA

1 : 50 Verdünnung mit 30% Rattennormalserum (RNS)



## 8.2 Immunhistochemisches Färbeprotokoll

### Fixierung:

- Silan-beschichtete Objektträger in 4°C kaltes Aceton stellen
- 15 min in Aceton auf rocking platform wirken lassen
- Objektträger einzeln auf Papier legen, mindestens 20 min an Luft trocknen lassen
- 2 x 5 min in 200 ml PBS auf rocking platform waschen

### Peroxidase-Hemmung:

- Objektträger in 200 ml Natriumacid-Lösung + 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60 min auf rocking platform wirken lassen
- 2 x 5 min in 200 ml PBS auf rocking platform waschen
- Objektträger mit 500 µl BSA 2% beschichten und 15 min bei 37°C inkubieren

### Primär-Antikörper:

- Antikörperkonzentrat mit BSA 0,5% auf Arbeitskonzentration verdünnen
- Rück- und Vorderseite des Objektträgers trocknen, ohne den Schnitt zu berühren und ohne ihn austrocknen zu lassen
- Objektträger mit Primär-Antikörper (100 µl pro Objektträger) beschichten
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 x 5 min in 200 ml PBS auf rocking platform waschen

### Sekundär-Antikörper:

- Antikörperkonzentrat mit RNS 30% auf Konzentration 1:50 verdünnen
- Rück- und Vorderseite des Objektträgers trocknen, ohne den Schnitt zu berühren und ohne ihn austrocknen zu lassen
- Objektträger mit Sekundär-Antikörper (100 µl pro Objektträger) beschichten
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 x 5 min in 200 ml PBS auf rocking platform waschen

#### Tertiär-Antikörper:

- Antikörperkonzentrat mit RNS 30% auf Konzentration 1:50 verdünnen
- Rück- und Vorderseite des Objektträgers trocknen, ohne den Schnitt zu berühren und ohne ihn austrocknen zu lassen
- Objektträger mit Tertiär-Antikörper (100 µl pro Objektträger) beschichten
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 x 5 min in 200 ml PBS auf rocking platform waschen

#### Entwicklung:

- in 200 ml Tris-HCl-Puffer 40 mg DAB lösen und filtrieren
- starten der Entwicklung: 34 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris/DAB-Lösung pipettieren
- Objektträger in dieser Lösung entwickeln (Dauer abhängig von Primär-Antikörper)
- Entwicklung in Spülung mit 2 x 5 min in 200 ml PBS auf rocking platform stoppen

#### Abschließen der Färbung:

- Objektträger 1 min in Hämalaun färben
- 10 min unter fließendem Wasser spülen
- in aufsteigende Ethanol-Reihe (60%, 80%, 100%) jeweils ca. 10 s wirken lassen
- in Xylol ca. 10 s wirken lassen
- Eindeckeln der Objektträger mit Eukit

### 8.3 Immunhistologische Färbungen

Lewis:

Abbildung 8: Lewis MHC-I, immunhistologische Färbung, 200-fache Vergrößerung

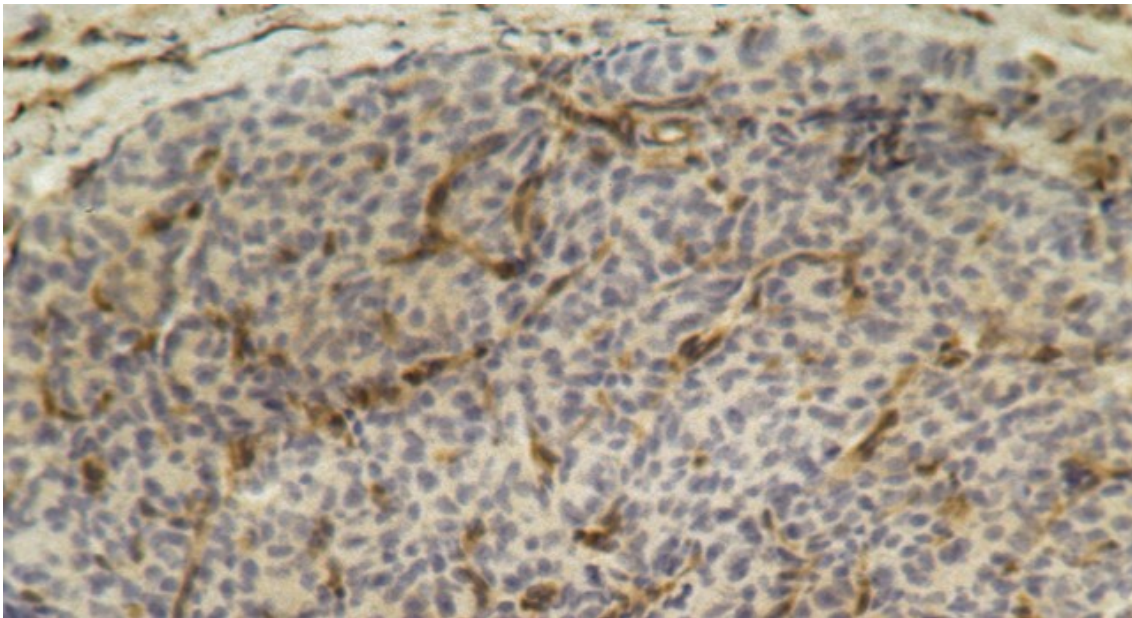
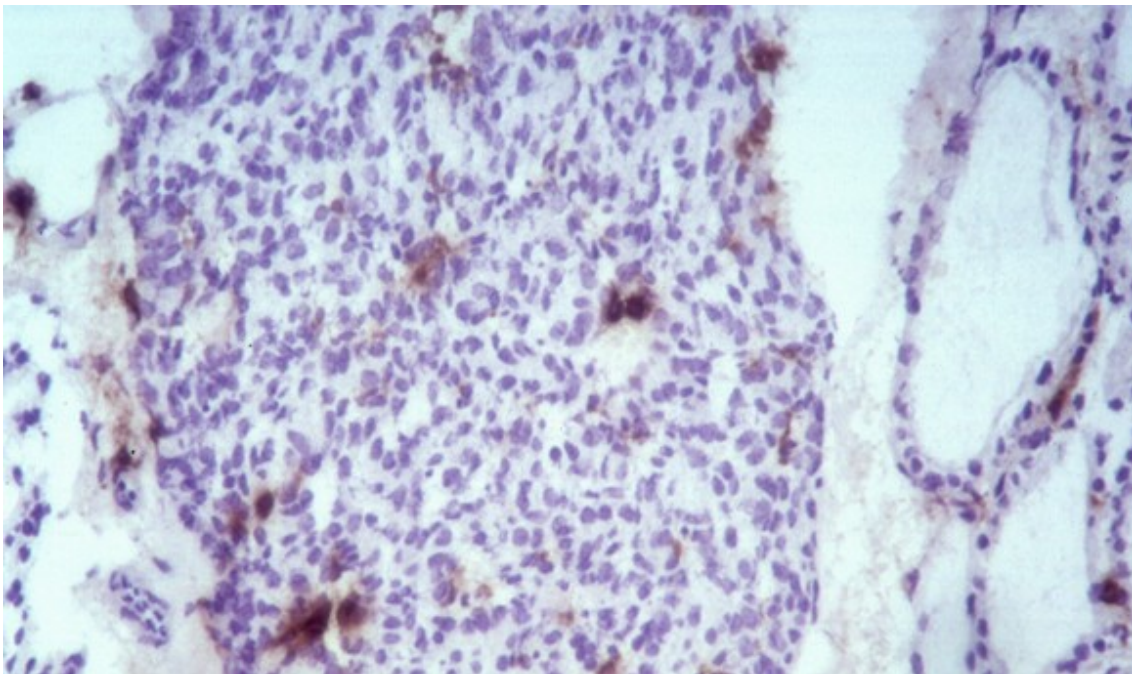


Abbildung 9: Lewis MHC-II, immunhistologische Färbung, 200-fache Vergrößerung



WF:

Abbildung 10: WF MHC I , immunhistologische Färbung, 200-fache Vergrößerung

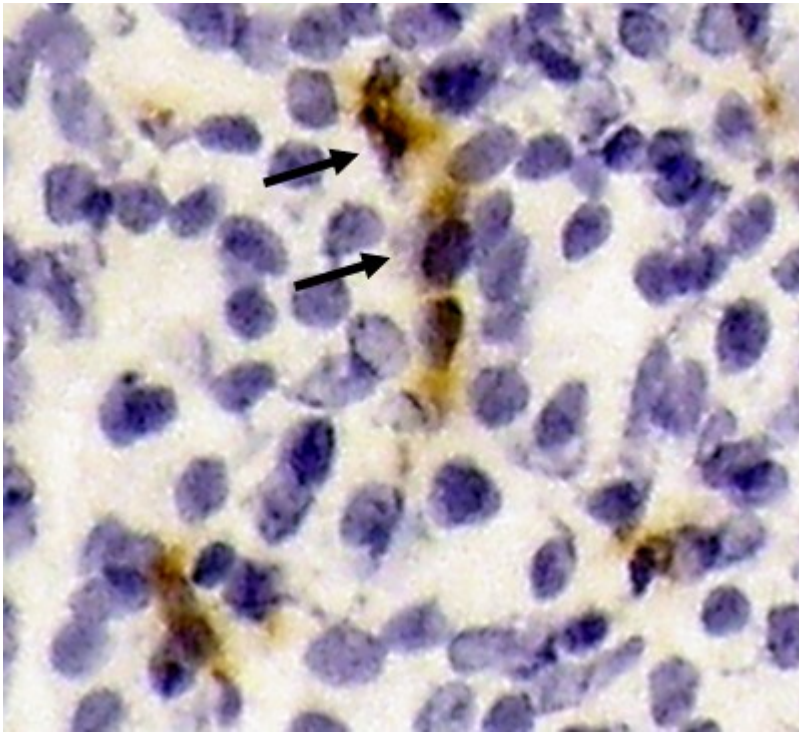
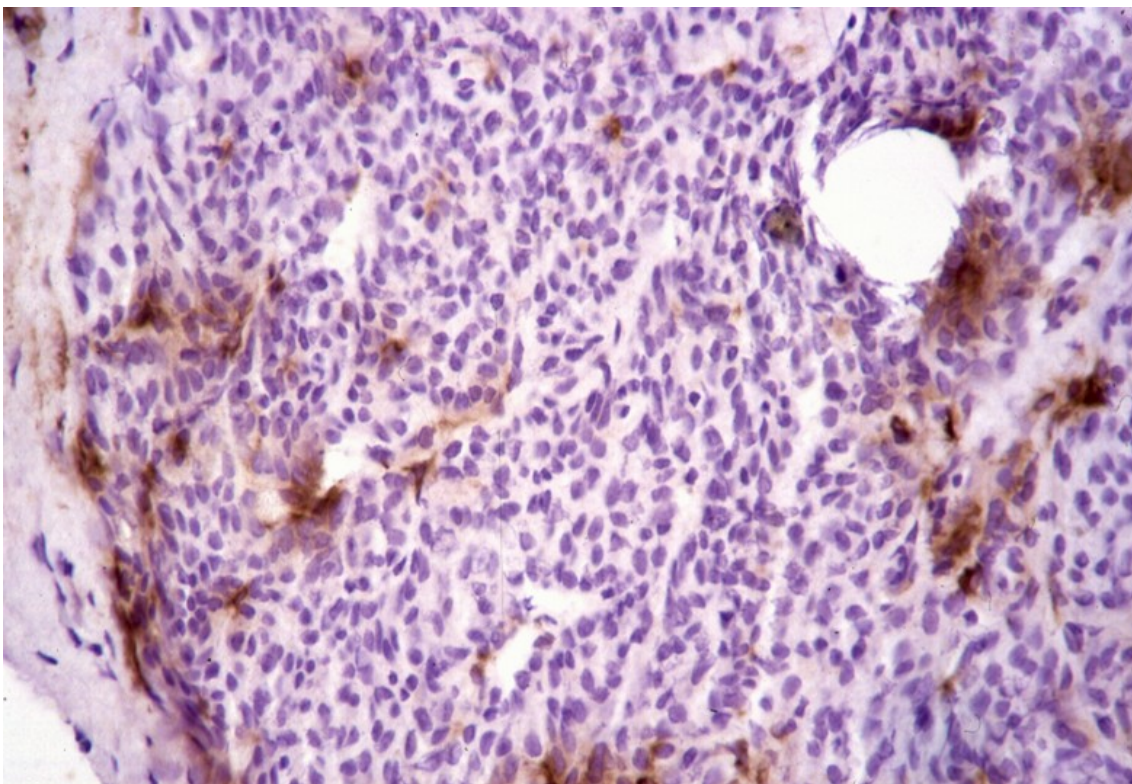


Abbildung 11: WF MHC II , immunhistologische Färbung, 200-fache Vergrößerung



DA:

Abbildung 12: DA MHC I , immunhistologische Färbung, 200-fache Vergrößerung

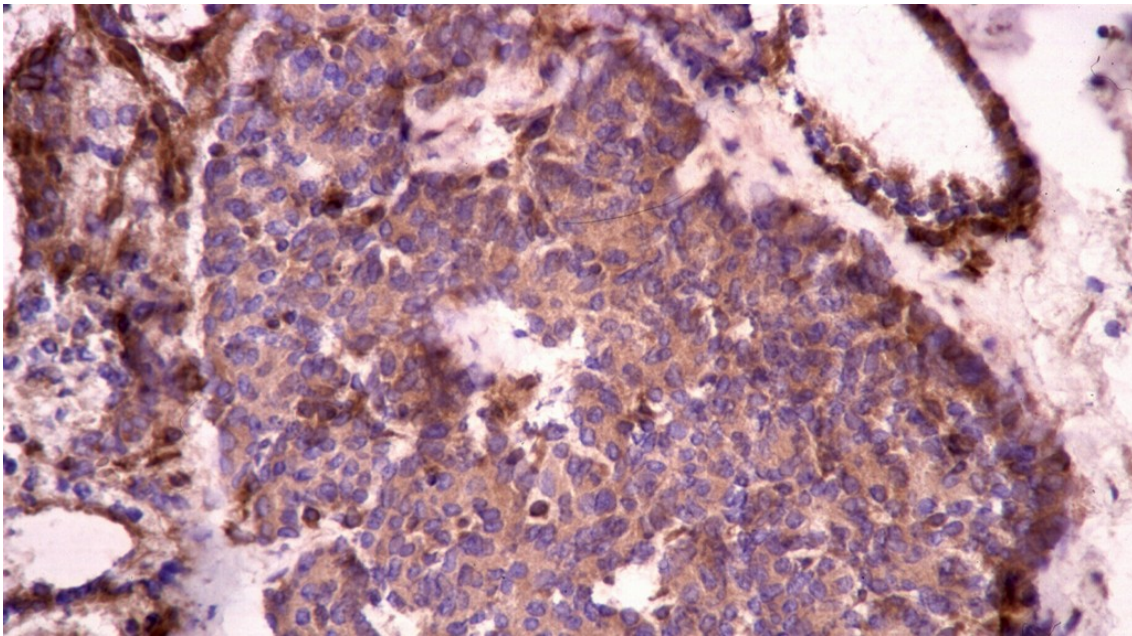
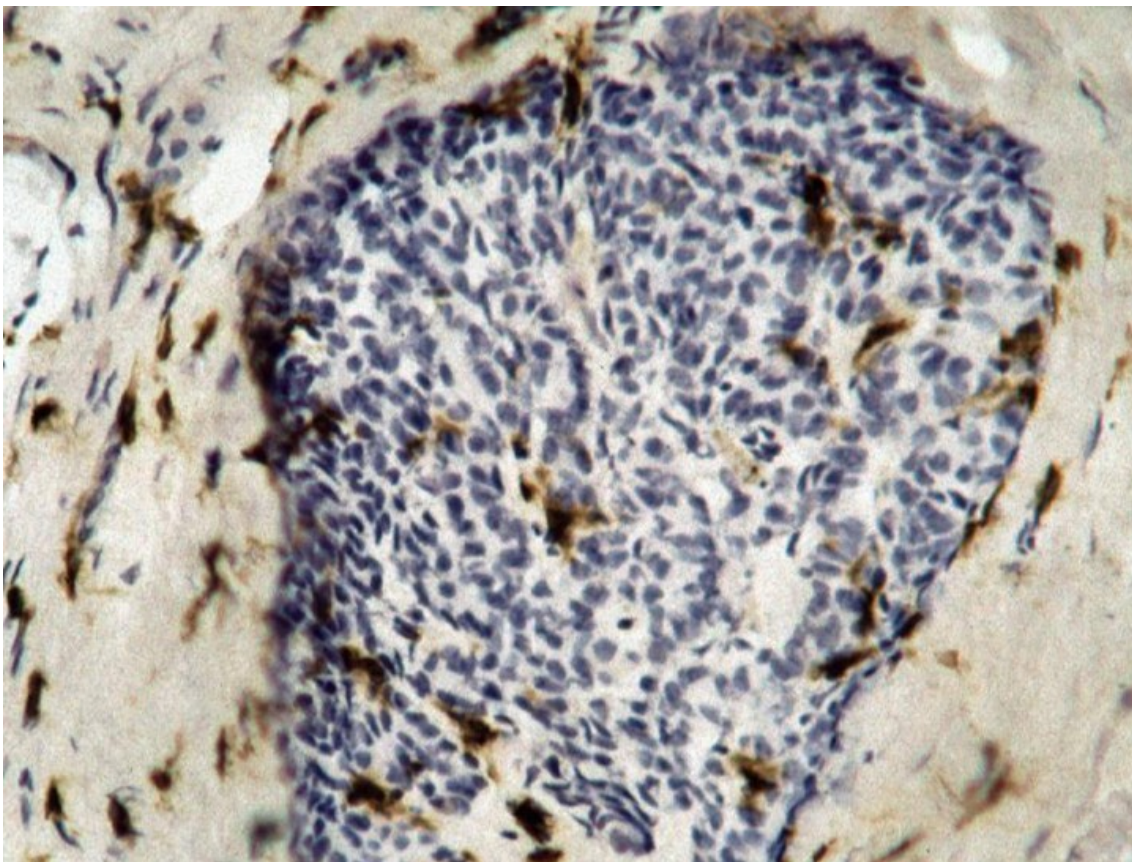


Abbildung 13: DA MHC II , immunhistologische Färbung, 200-fache Vergrößerung



## 8.4 Tabellen

Tabelle 8.1: Kalziumverlauf zur Überprüfung der Transplantatfunktion:

Tag	0	7	14	21	28	35	42	49	56
Wert in mmol/l	1,6	2,6	2,4	2,5	2,5	2,5	2,0	1,5	1,5

Tabelle 8.2: Syngene Kontrollgruppe:

Tag	0	5	12	20	27	34
Wert in mmol/l bei Tier 1	1,6	2,3	2,4	2,3	2,4	2,4
Wert in mmol/l bei Tier 2	1,6	2,2	2,4	2,4	2,5	2,5

Tabelle 8.3: Allogene Transplantationsgruppe I:

Tag	0	4	6	7	8	11	13	14	15	16	18
Ca in mmol/l bei Tier 1	1,8	2,1	2,3		2,1		2,1		2,0		1,9
Ca in mmol/l bei Tier 2	2,0	2,1	2,5		2,5	2,1	1,9		1,9		2,0
Ca in mmol/l bei Tier 3	1,5			2,2				2,1		2,0	1,8
Ca in mmol/l bei Tier 4	1,6			2,7				2,0		1,8	
Ca in mmol/l bei Tier 5	1,5			2,6				1,8		1,6	1,5

Tabelle 8.4: Allogene Transplantationsgruppe II:

Tag	0	4	7	9	11	14	18
Ca in mmol/l bei Tier 1	1,4	2,0	2,5	2,0	1,9	1,9	1,8
Ca in mmol/l bei Tier 2	1,5	2,0	2,2	1,9	1,8		
Ca in mmol/l bei Tier 3	1,3	1,8	2,4	2,0	1,8	1,4	1,4
Ca in mmol/l bei Tier 4	1,4	2,1	2,1		2,0	1,4	

## 8.5 Statistik:

Tabelle 8.5: Transplantatfunktionsdauern in Gruppe I: WF → Lewis:

Tier	1	2	3	4	5
Tage	15,0	11,9	16,0	14,0	12,6

Tabelle 8.6: Transplantatfunktionsdauern in Gruppe II: DA → Lewis:

Tier	1	2	3	4
Tage	9,0	8,4	9,0	11,0

Tabelle 8.7: Mittelwerte (x) und Standardabweichungen (s):

Gruppe	n	x	s
I	5	13,9	1,68
II	4	9,35	1,14

Berechnung der Prüfgröße t nach dem t-Test (Student-Test):

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 - 1 + n_2 - 1}} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Berechnung der Anzahl der Freiheitsgrade:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Setzt man die oben genannten Zahlen in die Formeln ein, erhält man für die Prüfgröße t:

$$t = \frac{13,9 - 9,35}{\sqrt{\frac{(5 - 1) \cdot 1,68^2 + (4 - 1) \cdot 1,14^2}{5 - 1 + 4 - 1}} \cdot \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{4}}}$$
$$t = 4,60$$

Bei der Berechnung der Freiheitsgrade erhält man:

$$v = 5 + 4 - 2$$

$$v = 7$$

In der Tabelle in Kapitel 8.1 werden  $\alpha$  (die Wahrscheinlichkeit mit der die beiden Gruppen fälschlicherweise für signifikant unterschiedlich gehalten werden) und  $v$  gegeneinander aufgetragen. Wir wählen  $\alpha = 0,01$  und  $v = 7$  und erhalten den kritischen Wert

$$t_{krit} = 3,50$$

Da unser berechnetes  $t$  größer ist als  $t_{krit}$ , kann also mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 1% angenommen werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht.

Wir können also zeigen, dass ein signifikanter Unterschied der Transplantatfunktionsdauer zwischen höherer und niedrigerer Expression von MHC-I-Antigen besteht.



## 8.6 Danksagung

Hiermit möchte ich folgenden Personen für ihre wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation danken:

- Professor Dr. W. Timmermann für die freundliche Vergabe der Dissertation
- Dr. S. Timm für die Einführung in das mikrochirurgische Themengebiet sowie für seine Betreuung der Dissertation
- Dr. Ch. Otto und allen Mitarbeitern der experimentellen Transplantationsimmunologie für ihre wertvolle und stets freundliche Unterstützung in allen von der Dissertation berührten Bereichen
- Den Tierpflegerinnen für ihre liebevolle Betreuung der Tiere
- Dr. A. Gassel vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg für ihre Unterstützung bei der Interpretation der immunhistologischen Färbungen

Ohne die Hilfe dieser Personen wäre die Durchführung dieser Dissertation nicht möglich gewesen. Deshalb noch einmal: Vielen Dank für die wertvolle Hilfe.

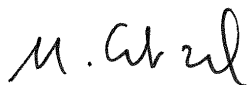
Marco Etzel



## 8.7 Tabellarischer Lebenslauf

10. Februar 1973	Geburt als erstes und einziges Kind von Einzelhandelskaufmann Lothar Etzel und Christel Etzel, geborene Joos in Werneck
1979 bis 1983	Besuch der Grundschule (Auenschule) in Schweinfurt
1983 bis 1986	Besuch von Internat und Gymnasium (Egbert-Gymnasium) in Münsterschwarzach
1986 bis 1993	Besuch des Walther-Rathenau-Gymnasiums in Schweinfurt
9. Juli 1993	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
1993 bis 1994	Zivildienst am Leopoldina-Krankenhaus der Stadt Schweinfurt
1994 bis 1996	Beginn eines Studiums Lehramt an Gymnasien in den Fächern Mathematik und Physik, dann Abbruch
1996 bis 2002	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
März 1998	Ärztliche Vorprüfung
März 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August / September 1998	Famulatur in der Chirurgie am Leopoldina-Krankenhaus der Stadt Schweinfurt
September / Oktober 1998	Famulatur in der Anästhesiologie am Leopoldina-Krankenhaus der Stadt Schweinfurt
Oktober 1999	Famulatur am Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg
März bis April 2000	Famulatur in der Radiologischen Gemeinschaftspraxis Dr. Keil, Dr. Roy in Würzburg

August 2000	Unterassistent in der Plastischen Chirurgie am Kantonsspital Aarau, Schweiz
Seit April 1999	Mitarbeiter im mikrochirurgischen Transplantationslabor der chirurgischen Klinik, Beginn der Doktorarbeit
2001 bis 2002	Ausbildung im praktischen Jahr an der Universität Würzburg 1. Tertial: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Wahlfach) 2. Tertial: Innere Medizin 3. Tertial: Chirurgie
7/2002 bis 11/2003	Arzt im Praktikum in der Chirurgie des Klinikums Landshut
12/2003	Arzt im Praktikum im Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg
ab 1/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg



M. Etzel