

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Chirurgische Klinik I

Direktor: Professor Dr. med. A. Thiede

**Zeitliche Analyse der histomorphologischen und  
durchflußzytometrischen Charakteristika der chronischen Abstoßung  
nach experimenteller Dünndarm-Transplantation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**Johannes Samuel Schad**

aus Stuttgart

Würzburg, März 2004

Referent: Prof. Dr. med. W. Timmermann  
Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs  
Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt

*Meinen Eltern*

*Ingeborg M. Schad*

*und*

*Dr. med. Michael C. Schad (in Memoriam)*

*gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Fragestellungen .....</b>	<b>4</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>5</b>
3.1 Versuchstiere .....	<b>5</b>
3.2 Versuchsgruppen .....	<b>5</b>
3.3 Mikrochirurgische Operationstechniken .....	<b>6</b>
3.4 Immunsuppressive Therapie .....	<b>7</b>
3.5 Nachuntersuchung und klinische Beurteilung .....	<b>8</b>
3.6 Organgewinnung .....	<b>8</b>
3.7 Bestimmung der Blutleukozyten .....	<b>8</b>
3.8 Bestimmung des Milz-Index .....	<b>8</b>
3.9 Histologische Untersuchung der Organe .....	<b>9</b>
3.10 Gewinnung von Lymphozyten und deren Doppel- und Dreifachfärbung mit Antikörpern .....	<b>10</b>
3.11 Durchflusszytometrische Messungen und Auswertung .....	<b>12</b>
3.12 Auswertungen und Fotodokumentation .....	<b>13</b>

<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>14</b>
4.1 Versuchsgruppen und klinische Parameter der Abstoßung	14
4.1.1 Gewichtsverläufe .....	17
4.1.2 Milz-Index .....	18
4.1.3 Blutleukozyten-Werte .....	19
4.2 Histomorphologische Kennzeichen der akuten und chronischen Abstoßung am Dünndarm-Transplantat .....	20
4.3 Histologische und durchflusszytometrische Analysen der Transplantat-Lymphknoten .....	27
4.4 Histologische und durchflusszytometrische Analysen der Milz und der Empfänger-Mesenteriallymphknoten (EMLK)...	31
<b>5. Beantwortung der Fragen .....</b>	<b>37</b>
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>40</b>
6.1 Immunbiologische Grundlagen der chronischen Abstoßung	40
6.2 Zusammenhang zwischen den histopathologisch-zellulären Ereignissen und der chronischen Transplantat-Abstoßung ..	42
6.3 Histomorphologische Zeichen der chronischen Abstoßung in den Transplantat-Langzeitfunktionsgruppen . .....	47

<b>7. Ausblick .....</b>	<b>48</b>
<b>8. Zusammenfassung .....</b>	<b>49</b>
<b>9. Literatur .....</b>	<b>51</b>

**Bildnachweis**

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Akute Abstoßung
BN	Rattenstamm Brown Norway, MHC-Haplotyp RT1 <sup>n</sup>
CA	Chronische Abstoßung
CD	(engl.) clusters of differentiation („Differenzierungsmarker“)
DD	Dünndarm
DDTX	Dünndarmtransplantation
EMLK	Mesenteriale Lymphknoten des Empfängers
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FK 506	Bezeichnung für das Immunsuppressivum Tacrolimus®
ICAM	(engl.) intercellular adhesion molecule (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
LEW	Rattenstamm Lewis, MHC-Haplotyp RT1 <sup>l</sup>
mAb	(engl.) monoclonal antibody (monoklonaler Antikörper)
MI	Milz-Index
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PE	Phycoerythrin
PP	Peyerscher Plaque
SMLK	Mesenteriale Lymphknoten des Spenders
SYN	Syngen transplantierte Kontroll-Gruppe
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

## 1. Einleitung

Der Dünndarm stellt auch weiterhin ein grundlegendes Problem in der Transplantationschirurgie dar. Im Gegensatz zu Herz, Leber oder Niere, die weltweit mit guten klinischen Resultaten in zahlreichen Zentren transplantiert werden, ist die Dünndarm-Transplantation derzeit den 55 Spezial-Zentren vorbehalten (nach dem „Intestinal Transplant Registry“). Dabei sind die Ergebnisse trotz Behandlung mit hoch potenten Immunsuppressiva, wie dem FK 506 (Tacrolimus®), mit einer Überlebensrate von nur rund 75% nach einem Jahr und von 42% nach 5 Jahren weiterhin unbefriedigend (Reyes 2002, Sigalet 2000, Jan 1999). Hierbei handelt es sich um die Daten von pädiatrischen Patienten, deren Immunsystem noch nicht voll ausgereift ist. Im Vergleich hierzu sind die Ergebnisse bei Erwachsenen noch ungünstiger. Nicht die optimal standardisierte chirurgische Technik der Dünndarm-Transplantation ist Ursache für diese Situation, sondern die ungewöhnlich starke Immunogenität der Dünndarm-Transplantate und die Nebenwirkungen der Immunsuppression.

Der Dünndarm als immunkompetentes Organ hat auch die Abwehr von Fremdartigen zur Aufgabe. Diese komplexe Funktion wird von den Lymphozyten der Lamina propria des Darmepithels, den Payerschen Plaques und den mesenterialen Lymphknoten wahrgenommen. Nach einer Transplantation sind sie es, die eine starke Immunantwort auslösen. Diese starke Immunogenität erfordert, dass der Empfänger hohe Dosen an Immunsuppressiva benötigt. Damit wird in der Regel die akute Abstoßung gut verhindert, jedoch verursachen sie in der Dauertherapie erhebliche Nebenwirkungen, die insbesondere auf die generelle Suppression des Immunsystems zurückzuführen sind. Diese sind hauptsächlich durch Bakterien, Pilze und Viren verursachte opportunistische Infektionen, die häufig zu einer Sepsis mit hoher Letalität führen (Reyes 1992, Goulet 1998) und lymphoproliferative Erkrankungen (Pollard 1997). Weitere Nebenwirkungen sind die von den Immunsuppressiva verursachten Organschädigungen; so führen z.B. die Calcineurin-Inhibitoren, insbesondere das Cyclosporin A, zu Nephrotoxizität, Neurotoxizität bzw. zur einem

de-novo-Diabetes (Braun 1998). Vor allem die klinische Dünndarm-Transplantation profitierte von der, im Vergleich zu Cyclosporin, stärkeren immunsuppressiven Wirksamkeit des ebenfalls zu den Calcineurin-Inhibitoren gehörenden FK 506 (Tacrolimus®). Ein weiterer Vorteil ist seine geringere Nephrotoxizität.

In der Regel stellt das Kurzdarm-Syndrom den Hauptgrund für eine Dünndarm-Transplantation dar. Dieses ist gekennzeichnet durch eine Malabsorption und Malassimilation. Bei Erwachsenen kann das Kurzdarm-Syndrom entstehen, wenn z.B. durch einen Mesenterialinfarkt, chronische Darmerkrankungen, Tumorbefall, Trauma oder eine Strahlenenteritis eine ausgedehnte Dünndarmresektion erforderlich wird. Bei Kindern kann es auch durch eine angeborene Darm-Atresie, Agangliose oder einer nekrotisierenden Enterocolitis zu einem Kurzdarm-Syndrom kommen. Die konservative Standard-Therapie hierfür, die „Total Parenteral Nutrition“, ist jedoch eine äußerst kostenintensive, komplikationsreiche und die Lebensqualität mindernde Therapie-Form. Hier könnte die Dünndarm-Transplantation in den nächsten Jahren Abhilfe schaffen. Um jedoch als ernst zunehmende therapeutische Alternative akzeptiert zu werden, ist die Sicherheit einer solchen Therapie zu gewährleisten. Hierzu sind verbesserte Therapieansätze erforderlich, um auch die chronische Abstoßung, neben der akuten Abstoßung, erfolgreich zu verhindern (Kocoshis 1997).

In experimentellen Modellen zur Dünndarm-Transplantation werden sowohl die akute als auch die chronische Abstoßung analysiert. Unsere Untersuchungen wurden an einem nach Deltz und Thiede (1985) modifizierten Modell der orthotopen Dünndarm-Transplantation in der Ratte durchgeführt. Durch Variation der FK 506-Dosierung konnte sowohl die chronische Abstoßung als auch Transplantatlangzeitfunktion induziert werden. Während die Tiere der chronischen Abstoßungsgruppe um den Tag 100 das Vollbild der chronischen Abstoßung aufwiesen, zeigten die Tiere der Langzeitfunktionsgruppe klinisch keine Zeichen der Abstoßung. Es wurden sowohl durchflußzytometrische als auch histologische Analysen von Dünndarm-Transplantaten zu verschiedenen

Zeitpunkten durchgeführt, um die morphologischen und zellulären Vorgänge, die mit der chronischen Abstoßung in Verbindung stehen, zu verfolgen. Auch die Reaktion des Empfängers auf das fremde Transplantat wurde an immunologisch relevanten Organen, wie Milz, Blut und Lymphknoten, untersucht.

Ziel dieser Arbeit war, die Auswirkungen der durch das Dünndarm-Transplantat verursachten dauerhaften Immunaktivierung zu untersuchen. Insbesondere die sich hieraus entwickelnde chronische Abstoßung sollte anhand histomorphologischer Merkmale charakterisiert werden. Hierzu wurden die zellulären Vorgänge in der Phase der akuten Abstoßung bzw. während der Transplantat-Langzeitfunktion als Vergleich herangezogen.

## **2. Fragestellungen**

Ziel der Untersuchungen war die Beantwortung folgender Fragen:

1. Welches sind die charakteristischen histomorphologischen Merkmale der akuten Abstoßung im Dünndarm-Transplantat?
2. Welches sind die charakteristischen histomorphologischen Merkmale der chronischen Abstoßung im Dünndarm-Transplantat?
3. Welche histomorphologischen Veränderungen korrelieren mit der chronischen Abstoßung?
4. Welche histomorphologischen Merkmale kennzeichnen die Dünndarm-Transplantate der Langzeitfunktionsgruppen?
5. Welche immunologischen Vorgänge induzieren die chronische Abstoßung?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere für die Dünndarm-Transplantationen dienten männliche Inzuchtratten aus kontrollierten Züchtungen, die in den Tierställen der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, Experimentelle Transplantations-Immunologie, unter standardisierten Bedingungen gehalten wurden.

- Brown Norway (BN): MHC-Haplotyp RT1<sup>n</sup>, erworben von der Fa. Charles River; sie dienten als Transplantatspender.
- Lewis (LEW): MHC-Haplotyp RT1<sup>l</sup>, erworben von der Fa. Charles River; sie dienten als Transplantatempfänger.

Die beiden Rattenstämme unterschieden sich in ihren MHC-Klasse-I und Klasse-II Antigenen. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns wogen die Tiere zwischen 220-240 Gramm. Die Haltung erfolgte jeweils paarweise in Makrolan<sup>®</sup>-Käfigen. Operierte Tiere wurden in keimarmen Klimaschränken (Scantainer<sup>®</sup>, Fa. Scanbur, Kögen, Dänemark) gehalten. Die Tiere erhielten am Operationstag Wasser, am 1. Tag post op. Wasser + 20% Glucose, am 2. Tag post op. Wasser + Fresubin und ab dem 3. Tag post op. Wasser + Altromin<sup>®</sup>-Pressfutter ad libitum.

#### **3.2 Versuchsgruppen**

Die Dünndarmtransplantation wurde in der syngenen (LEW→LEW) und in der allogenen (BN→LEW) Kombination durchgeführt (Tab. 3.1). Die syngenen transplantierten Tiere (SYN) stellten die Referenzgruppe dar. Die akute Abstoßung wurde an der allogenen unbehandelten Gruppe der akuten Abstoßungsgruppe (AA) untersucht. In der Versuchsgruppe mit der initialen FK 506-Gabe kam es am Tag 100 zu einer chronischen Transplantat-Abstoßung (Tab. 3.1). Sie wurde daher als chronische Abstoßungsgruppe (CA) bezeichnet und war die wichtigste Gruppe für diese Arbeit. Die chronische Abstoßung ließ sich durch eine unterschiedlich lange Applikation von FK 506 verzögern. Da diese Tiere

auch für eine lange Zeit klinisch unauffällig blieben, wurden sie der Langzeitfunktionsgruppe (LF-1 und LF-2) zugeordnet (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: Übersicht über die Transplantationsgruppen. Zur Immunsuppression wurde FK 506 verwendet.**

<b>Gruppe</b>	<b>Stamm-kombination</b>	<b>Immunsuppression</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Kommentar</b>
SYN	LEW-LEW	keine	n = 18	<u>S</u> YNgene Kontrolle
AA	BN-LEW	keine	n = 8	Gruppe der <u>A</u> kuten <u>A</u> bstoßung
CA	BN-LEW	Tag 0-5	n = 21	Gruppe der <u>C</u> hronischen <u>A</u> bstoßung
LF-1	BN-LEW	Tag 0-5 + 60-65	n = 9	<u>L</u> angzeit- <u>F</u> unktionsgruppe 1
LF-2	BN-LEW	Tag 0-9	n = 28	<u>L</u> angzeit- <u>F</u> unktionsgruppe 2

Die Organentnahmen in der SYN Gruppe als auch bei den Tieren der CA-Gruppe erfolgten an den postoperativen Tagen: 3, 7, 14, 30, 60, 100. Die unbehandelten Tiere der akuten Abstoßungsgruppe wurden am Tag 3 und 7 getötet. In der LF-1-Gruppe wurde am Tag 180 und in der LF-2-Gruppe am Tag 250 post op. die Organentnahmen vorgenommen. Weitere Erläuterungen und Hinweise finden sich in Tab. 4.2 auf Seite 16.

### **3.3 Mikrochirurgische Operationstechniken**

Die orthotope Dünndarmtransplantation wurde nach dem von Deltz und Thiede (1985) beschriebenen Modell in modifizierter Form durchgeführt. Als optische Hilfsmittel wurden Operationsmikroskope (Fa. Wild 1650 Heerbrugg, Schweiz) mit 10-bis 16-facher Vergrößerung verwendet. Gefäß-Anastomosen wurden mit

monofilen, nicht resorbierbaren Fäden der Stärke 7-0 (Prolene<sup>®</sup>, Ethikon<sup>®</sup>, Fa Ethikon, Hamburg) in fortlaufender, transluminärer Nahttechnik erstellt.

### **3.3.1 Spender-Explantation**

Nach Rasur des Spendertieres und Desinfektion erfolgte der Zugang über eine mediane Laparatomie. Danach wurden die V. porta, die A. mesenterica superior sowie die Aorta abdominalis präpariert. Nun erfolgte die Dünndarmpräparation vom Treitz'schen Band bis etwa 1 cm vor der Ileocecalklappe. Mit dem Darm wurde auch der Gefäßstiel der A. mesenterica superior sowie der V. portae entfernt. Mit einer Knopfkanüle wurde das Dünndarm-Transplantat gespült und in 4°C kaltem NaCl bis zur Implantation konserviert.

### **3.3.2 Empfängerimplantation**

Nach medianer Laparatomie und Explantation des Empfängerdarms wurde der Spender-Dünndarm orthotop eingesetzt. Die Gefäße (Aorta, A. mesenterica superior und V. porta) wurden End-zu-End in fortlaufender Nahttechnik verbunden. Der Verschluss des Peritoneums erfolgte in Einzelknopf-Nahttechnik und der Verschluss der Haut in fortlaufender Naht. Die Operationszeit betrug beim Spender ca. 30 und beim Empfänger ca. 50 Minuten. Tiere, die innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Operation verstarben, wurden als technische Versager deklariert und nicht in die Analysen mit einbezogen; ihr Anteil lag unter 6%.

## **3.4 Immunsuppressive Therapie**

Um die Abstoßungsreaktion nach allogener Dünndarmtransplantation zu verhindern, wurde als Immunsuppressivum FK 506, auch als Tacrolimus<sup>®</sup> bezeichnet (Fujisawa, Japan), verwendet. Die Tiere erhielten eine tägliche Dosis von 2 mg pro Kilogramm Körpergewicht abwechselnd in die rechte oder linke Unterschenkelmuskulatur appliziert. FK 506 inhibiert die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Pro-

zesse der Lymphokin-Synthese, insbesondere die zur Synthese von Interleukin-2 (IL-2), in den T-Lymphozyten. Es bindet an das Bindungsprotein FKBP 12, wodurch dieser Komplex in der Lage ist, das Enzym Calcineurin zu hemmen, das an der Aktivierung eines für die Synthese von IL-2 wichtigen Transkriptionsfaktors beteiligt ist. Zur Prophylaxe der bei Dünndarmtransplantationen häufig beobachteten bakteriellen Translokation erhielten die Empfänger für die Dauer der Immunsuppression alle 2 Tage 0,04 ml des Antibiotikums Tardomyocel®.

### **3.5 Nachuntersuchung und klinische Beurteilung**

Die Tiere wurden einmal täglich visitiert, wobei insbesondere auf Anzeichen einer beginnenden akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion (Schleimhautentzündung, Gewichtsverlust, etc.) geachtet wurde. Zur Beurteilung des Allgemeinzustandes wurden Vigilanz, Körperhaltung, Fellbeschaffenheit und der Gewichtsverlauf herangezogen. Die Abbruchkriterien außerhalb der festgesetzten Zeitpunkte zur Organentnahme waren dann erfüllt, wenn ein oder mehrere dieser Parameter starke Auffälligkeiten aufwiesen. Die Gewichtsverläufe wurden in Prozent des Ausgangswertes dargestellt, für alle anderen Parameter wurde eine 4-stufige Graduierungsskala verwendet: 0: Merkmal nicht erkennbar, 1-3: Merkmal leicht, mittel oder stark ausgeprägt.

### **3.6 Organgewinnung**

Hierzu wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und die entsprechenden Organe (Milz, Transplantat-Lymphknoten (auch als Spender-Mesenteriallymphknoten bezeichnet), Empfänger-Mesenteriallymphknoten, Jejunum und Ileum) entnommen und für die Histologie, Immunhistochemie und die durchflußzytometrische Analyse aufbereitet.

### **3.7 Bestimmung der Blutleukozyten**

Das aus der V. cava inferior gewonnene Blut der Empfängertiere wurde im Zentrallabor der Universitätsklinik untersucht. Bei dem untersuchten Differentialblutbild interessierte insbesondere die Verteilung der Lymphozyten und Leukozyten.

### **3.8 Bestimmung des Milz-Index**

Um den Einfluß der akuten oder chronischen Abstoßung auf die Immunktivierung in der Milz zu untersuchen, wurde der Milzindex (MI) ermittelt. Hierzu wurde das Verhältnis von Organ- zu Körpergewicht bestimmt.

### **3.9 Histologische Untersuchung der Organe**

Zur histologischen Beurteilung der Organe wurde jeweils ein ca. 0,5-1 cm großes Stück in 3,5%- igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die 1 µm dicken Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Folgende Organe wurden beurteilt:

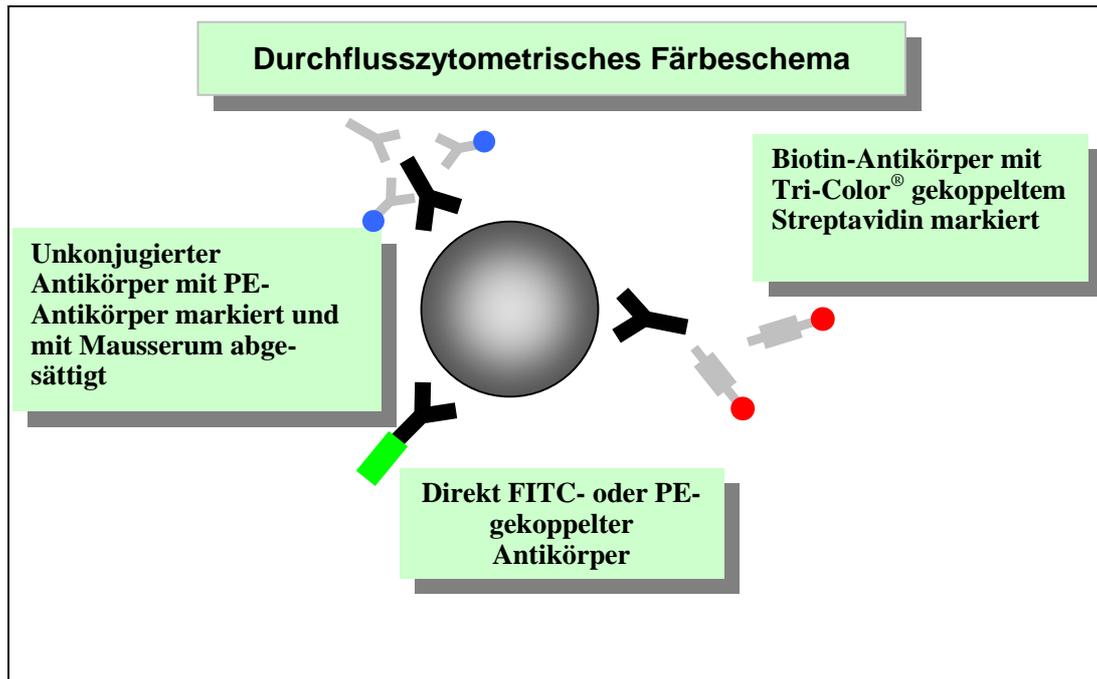
- Jejunum und Ileum des Transplantates
- Spender-Mesenteriallymphknoten SMLK oder(Transplantat-Lymphknoten)
- Empfänger-Mesenteriallymphknoten oder EMLK
- Milz

Bei der Auswertung der Transplantathistologien wurde besonders auf die Morphologie der epithelialen Zottenarchitektur, den vaskulären Status sowie auf die Menge und die Verteilung der immunkompetenten Zellen in den einzelnen Dünndarmabschnitten geachtet. Zur Beurteilung der Dünndarm-Transplantate siehe auch Tab. 4.3 auf S. 25.

### **3.10 Gewinnung von Lymphozyten und deren Doppel- und Dreifachfärbung mit Antikörpern**

Nach der Organentnahme wurden die Milz, sowie die Mesenteriallymphknoten zuerst durch ein Sieb zerkleinert und die Zellen für rund 3 Minuten mit einem Erythrozyten-Lysepuffer inkubiert. Um anschließend den Lysepuffer wieder zu entfernen, wurden die nicht-lysierten Leukozyten "gewaschen". Hierzu wurden sie zentrifugiert und anschließend mit PBS resuspendiert; dies wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Abschließend wurden die Leukozyten über Gaze mit einer Porengröße von 100 µm filtriert, um sie noch von bindegewebigen Bestandteilen zu reinigen. Die Einstellung der Zellsuspensionen auf  $10^4$  Zellen pro µl erfolgte mit Hilfe der vom Zellzähler im Zentrallabor ermittelten Daten.

Alle Inkubationsschritte zur Antikörper-Färbung wurden im Eisbad bei 4°C für 25 Minuten durchgeführt. Bis auf den Antikörper NDS 60 (Tab. 3.2) waren alle anderen Antikörper (Tab. 3.3) entweder mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC bzw. PE konjugiert oder sie waren mit Biotin markiert. Wurden Biotin-konjugierte Antikörper verwendet, so war ein anschließender Inkubationsschritt mit Streptavidin notwendig. Streptavidin (Fa. Caltag), das mit dem Fluoreszenzfarbstoff TriColor® verknüpft war, bindet mit sehr hoher Affinität an das kleine Biotinmolekül, so dass die Antikörperbindung an die entsprechenden Oberflächenmoleküle durchflußzytometrisch analysiert werden konnte. Waren Primärantikörper, wie der NDS 60 Antikörper, weder mit einem Fluoreszenzfarbstoff, noch mit Biotin konjugiert, dann mußte ein sog. Sekundärantikörper, hier der PE-konjugierte Esel-anti-Maus Antikörper, hinzugefügt werden, der sich an den Primärantikörper heftete. Sollten weitere Antikörper dem Färbeansatz zugesetzt werden, mußten, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, die Bindungsstellen des Sekundärantikörpers mit Mausserum blockiert werden (siehe auch Abb. 3.2).



**Abb. 3.2 Schematische Darstellung der Möglichkeiten zur Visualisierung der Antikörperbindung an Oberflächenstrukturen: Entweder sind die Antikörper direkt mit den Farbstoffen FITC oder PE konjugiert, oder der sog. Primärantikörper wird indirekt mit einem Farbstoff-markiertem Sekundärantikörper, der spezifisch an den Primärantikörper bindet, nachgewiesen. Ist der Primärantikörper mit Biotin verknüpft, dann wird dieser nach der Zugabe von Farbstoff-markiertem Streptavidin, das eine hohe Affinität zu Biotin aufweist, nachweisbar.**

Die Spender- und Empfängerlymphozyten wurden durch "Rattenstamm"-spezifische Antikörper, die die entsprechenden MHC-Klasse-I-Moleküle von BN und LEW erkennen, unterschieden (Tab. 3.2).

Tab. 3.2 Monoklonale Antikörper zur Differenzierung zwischen Empfängerleukozyten (NDS 60 positiv) und Spenderleukozyten (OX 27 positiv).

Antikörper	MHC Haplotyp	Spezifität
NDS 60	RT1.A <sup>l</sup>	MHC-I-Antigen (LEW)
OX 27	RT1.A <sup>n</sup>	MHC-I-Antigen (BN)

Mit diesen sog. "Rattenstamm"-spezifischen Antikörpern und den in Tab. 3.3 aufgelisteten Antikörpern wurden die aus Milz und mesenterialen Lymphknoten isolierten Lymphozyten analysiert, ob sie vom Spender- oder Empfänger stammten, ob sie aktiviert waren und zu welcher Subpopulation sie gehörten.

	Antikörper	Oberflächenmarker	Spezifität
<b>Leukozyten</b>	OX1	CD45	„Leucocyte common antigen“ (LCA), Positivkontrolle
<b>CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten</b>	W3/25	CD4	T-Helfer-Lymphozyten, Makrophagensubpopulation
<b>CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten</b>	OX8	CD8	Zytotoxische T-Lymphozyten, T-Suppressorzellen (CD8 $\alpha$ Kette)
<b><math>\alpha\beta</math> T-Zellrezeptor</b>	R73	$\alpha\beta$ -TCR	$\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor auf den meisten T-Lymphozyten
<b><math>\gamma\delta</math> T-Zellrezeptor</b>	V65	$\gamma\delta$ -TCR	$\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor auf CD3 positiven T-Lymphozyten
<b>B-Lymphozyten</b>	OX33	CD45RA o. A/B	„Leucocyte common antigen“ (LCA) nur auf B-Zellen
<b>NK-Zellen</b>	NKR-P1A	CD161	Natürliche Killerzellen (60 kD Homodimer)
<b>Aktivierte T-Lymphozyten</b>	OX39	CD25	IL-2-Rezeptor (55 kD, $\alpha$ -Kette) auf T-Zellen
<b>Aktivierte T-Lymphozyten</b>	1A29	CD54	ICAM-1 (90kD-Kette) auf T-Zellen (Adhäsionsmolekül, Ligand für LFA-1)

Tab. 3.3: Übersicht über die verwendeten Antikörper.

### **3.11 Durchflusszytometrische Messungen und Auswertung**

Die Bindung der monoklonalen Antikörper (Tab. 3.2 und 3.3) an die Lymphozyten wurde in einem Durchflußzytometer (FACScan, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) mit einem Argon Laser (488 nm) überprüft. Dieses Gerät misst neben der Zellgröße und Zellgranularität drei unterschiedliche Fluoreszenzfarben (Grün, Rot und Dunkelrot). Die Auswertung erfolgte mit dem Software Programm WinMDI (Joseph Trotter). Die Aufarbeitung der Daten und Darstellung der Ergebnisse wurde mit dem Software-Programm Excel 97 (Fa. Microsoft) durchgeführt. Zu jeder Versuchsserie wurden verschiedene Kontrollansätze durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die Färbung mit dem Antikörper OX 1 (CD45); bei den indirekten Verfahren zum Bindungsnachweis des unkonjugierten primären Antikörpers (s. auch Abb. 3.2) wurde als Negativkontrolle, um mögliche Kreuzreaktionen des Sekundärantikörpers auszuschließen, die alleinige Inkubation mit dem Sekundärantikörper vorgenommen. Alle durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden in Prozent, bezogen auf die Lymphozytenpopulation, angegeben.

### **3.12 Auswertungen und Fotodokumentation**

Sämtliche Zahlenwerte, wie Gewichtsverläufe, Laborwerte sowie durchflußzytometrisch ermittelten Prozentwerte, wurden der statistischen Analyse unterzogen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 97 ermittelt. Die histologischen und immunhistologischen Schnitte wurden mit einem Olympusfotomikroskop auf Agfa-chrom Professional-Filmen aufgenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Versuchsgruppen und klinische Parameter der Abstoßungen

Zur Untersuchung der klinischen und zellulären Phänomene nach Dünndarm-Transplantation in der Ratte wurden fünf Versuchsgruppen gebildet (s. Tabelle 4.1). Die Gruppe SYN diente als Kontrolle, um die durch den chirurgischen Eingriff induzierten Effekte nachzuweisen. Die akute Abstoßung wurde in der akuten Abstoßungsgruppe (AA-Gruppe) untersucht. Hierbei wurde auf eine Immunsuppression mit FK 506 verzichtet.

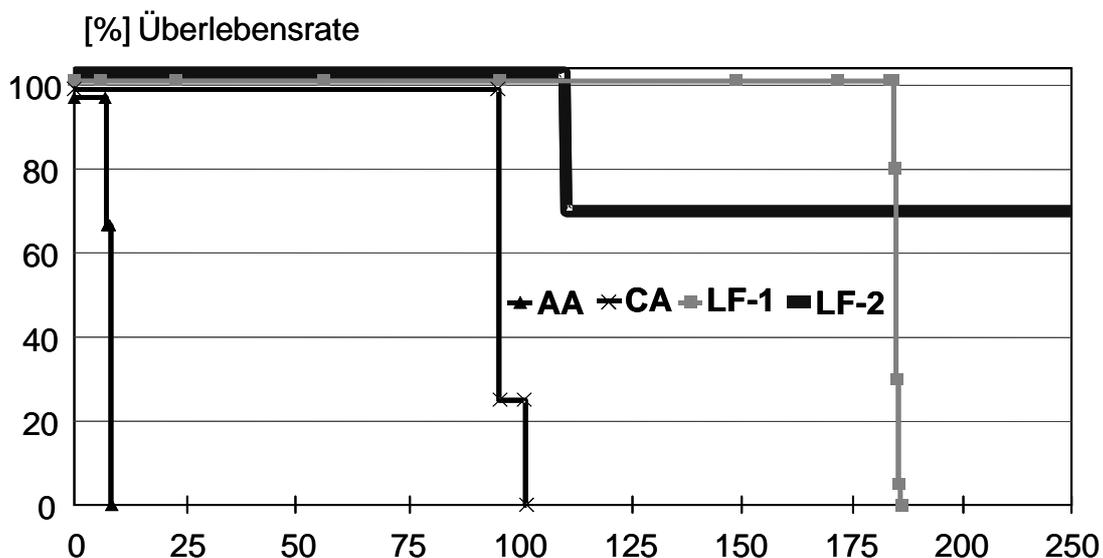
Tab 4.1: Darstellung der Versuchsgruppen zur Untersuchung der akuten (AA) und chronischen (CA) Abstoßung sowie der Langzeitfunktionsgruppen LF-1 und LF-2.

Gruppe	Stamm-kombination	Immunsuppression	Anzahl	Kommentar
SYN	LEW-LEW	keine	n = 18	<u>SYN</u> gene Kontrolle
AA	BN-LEW	keine	n = 8	Gruppe der <u>A</u> kuten <u>A</u> bstoßung
CA	BN-LEW	Tag 0-5	n = 21	Gruppe der <u>C</u> hronischen <u>A</u> bstoßung
LF-1	BN-LEW	Tag 0-5 + 60-65	n = 9	<u>L</u> angzeit- <u>F</u> unktionsgruppe 1
LF-2	BN-LEW	Tag 0-9	n = 28	<u>L</u> angzeit- <u>F</u> unktionsgruppe 2

Durch die initiale FK 506-Gabe von Tag 0 bis 5 kam es um den Tag 100 zu einer chronischen Transplantat-Abstoßung. Diese chronische Abstoßungsgruppe (CA-Gruppe) war die wichtigste Untersuchungsgruppe für diese Arbeit. An diesen Tieren wurden die zur CA führenden morphologischen Veränderungen an den Tagen 3, 7, 14, 30, 60 und 100 untersucht. Neben dem

Dünndarm-Transplantat wurden auch Milz, Blut sowie die mesenterialen Lymphknoten von Spender und Empfänger entnommen und analysiert.

Durch eine Dosis-Änderung in der immunsuppressiven Therapie wurden zwei unterschiedliche Langzeitfunktionsgruppen etabliert: In der LF-1-Gruppe wurde durch zusätzliche „Bolus“-Gaben von FK 506 zwischen den Tagen 60 bis 65 die chronische Abstoßung deutlich verzögert und die Überlebenszeit um nahezu 70 Tage verlängert (Abb. 4.1 und Tab. 4.2). Diese Tiere wiesen erst um den Tag 170 histomorphologische Zeichen der chronischen Abstoßung auf. In der LF-2 Gruppe wurde der Erfolg einer initial deutlich verlängerten Immunsuppression getestet. Hier überlebten rund 2/3 der Tiere langfristig und sie zeigten bis zum Versuchsende am Tag 250 keine klinischen Zeichen der Abstoßung. Bei dem anderen Drittel wurde der Versuch wegen der CA um den Tag 110 beendet (Tab. 4.2).



**Abb. 4.1:** Kaplan-Meier-Darstellung der allogenen Transplantationsgruppen. Die Tiere der CA- sowie der LF-1-Gruppe wiesen alle Zeichen der chronischen Abstoßung auf. Die LF-2-Gruppe war geteilt: Während etwa 2/3 keinerlei Zeichen der Abstoßung am Tag 250, dem Zeitpunkt des Versuchsendes, zeigten, wies etwa 1/3 der Tiere um den Tag 110 klinische und histologische Zeichen der chronischen Abstoßung auf.

Neben zu den zuvor festgelegten Zeitpunkten zur Organentnahme wurde der Versuch beendet, wenn die Tiere folgende klinische Zeichen der chronischen Abstoßung aufwiesen: Deutlicher Gewichtsverlust, Vigilanz-Verschlechterung, Entzündung der Nase und Ohren sowie ein struppiges Fell.

Tab. 4.2: Darstellung der Zeitpunkte der Organentnahmen.

Gruppenbezeichnung	Anzahl	Zeitpunkte der Organentnahmen <sup>1)</sup> [Tage]
SYN	n = 18	3,7,14,30,60,100 <sup>3)</sup>
AA	n = 8	3 und 7 <sup>4)</sup>
CA	n = 21	3,7,14,30,60 <sup>3)</sup> [96,96,98,101,102,106] <sup>2,6)</sup>
LF-1	n = 9	[158,162,166,166,170,173,176,181,182] <sup>2,7)</sup>
LF-2	n = 28	[97,98,98,99,104,112,113,118,140] <sup>2,5)</sup> 250 (x19)

<sup>1)</sup> Die Tage 3, 7, 14, 30 und 60 waren vor Versuchsbeginn als Entnahmezeitpunkt festgelegt worden, ebenso der Tag 100 in der SYN-Gruppe.

<sup>2)</sup> Der Entnahmezeitpunkt richtete sich nach dem Ausprägungsgrad der klinischen Abstoßungszeichen des Tieres.

<sup>3)</sup> je 3 Tiere pro Entnahmetag.

<sup>4)</sup> je 4 Tiere pro Entnahmetag.

<sup>5)</sup> Mittelwert  $108,8 \pm 14$  Tage

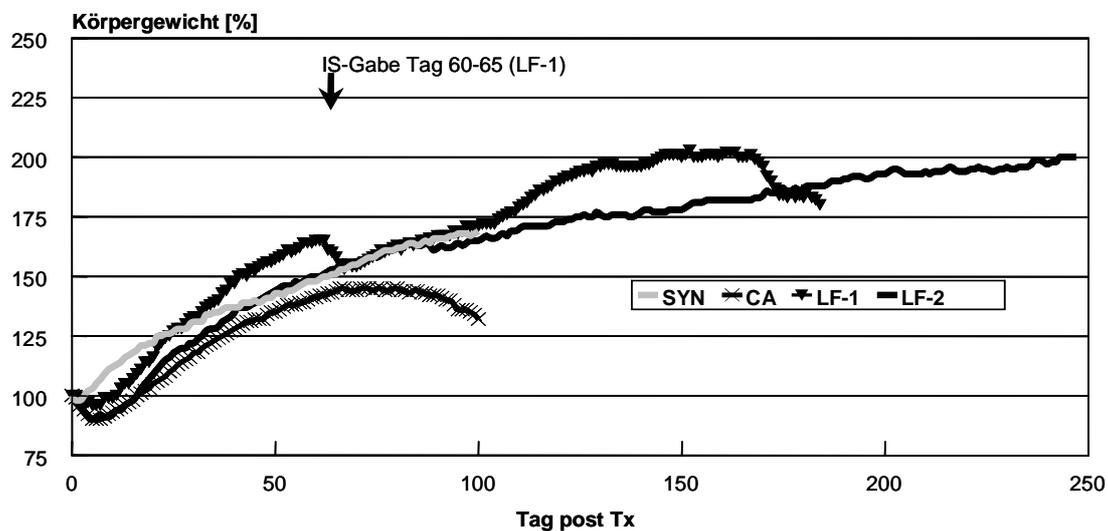
<sup>6)</sup> Mittelwert  $99,8 \pm 3,9$  Tage

<sup>7)</sup> Mittelwert  $170 \pm 8,3$  Tage

#### 4.1.1 Gewichtsverläufe

Die Tiere der SYN-Gruppe (siehe Abb. 4.2) erreichten am dritten postoperativen Tag wieder ihr Ausgangsgewicht. Im folgenden Verlauf kam es zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme auf das Doppelte des Ausgangsgewichtes. Im Gegensatz dazu waren die Gewichtszunahmen bei den Tieren der allogenen Gruppen verzögert.

Die Tiere der CA-Gruppe zeigten bereits ab Tag 65, also rund 35 Tage vor dem Versuchsende, eine deutliche Stagnation und anschließend eine Abnahme ihres Körpergewichts. Dies war vor allen anderen klinischen Zeichen der erste Hinweis auf die CA. In der LF-1-Gruppe kam es unter der zweiten FK 506-Therapie zwischen Tag 60-65 zu einem temporären Gewichtsverlust, der aber wieder ausgeglichen werden konnte. Erst um den Tag 160 fiel in dieser Gruppe die Gewichtskurve im Rahmen der chronischen Abstoßung wieder ab. Die langzeitüberlebenden Tiere der LF-2-Gruppe (s.Tab. 4.2) zeigten hinsichtlich ihres Gewichtsverlaufes bis zum Versuchsende keine Auffälligkeiten.

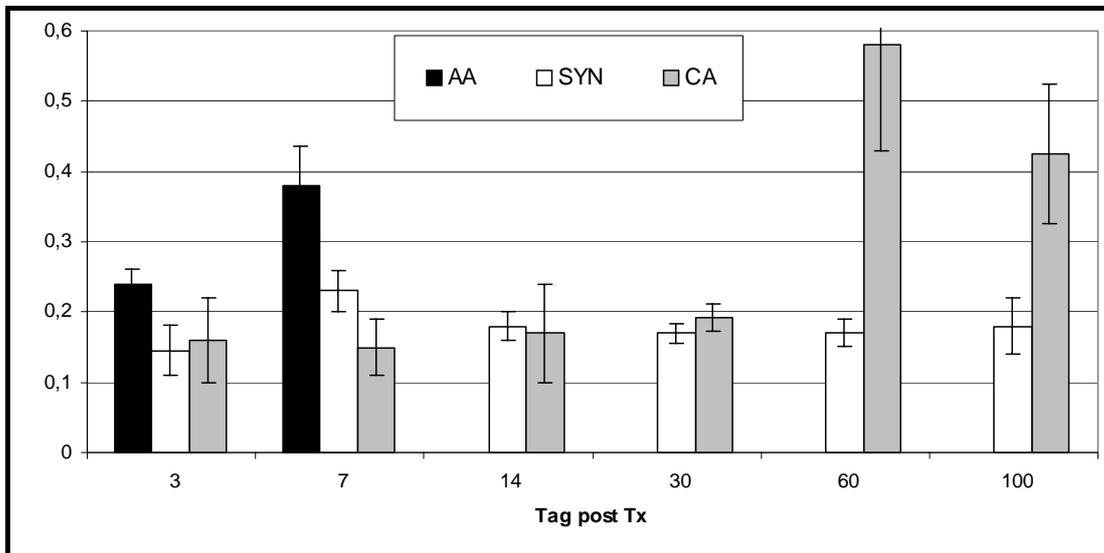


**Abb. 4.2: Übersicht über die Entwicklung des Körpergewichts der verschiedenen Gruppen. Die Gewichtsstagnation in der CA- und LF-1-Gruppe stellte dabei den ersten Hinweis auf eine chronische Abstoßung der Dünndarm-Transplantate dar.**

#### 4.1.2 Milz-Index

Der Milz-Index stellt das Verhältnis des Milzgewichtes zum Körpergewicht da (Abschnitt 3.8). Sowohl in der akuten Abstoßungsgruppe (AA) am Tag 7 als auch in der chronischen Abstoßungsgruppe (CA) am Tag 60 war die Milz deutlich vergrößert, was auf eine gesteigerte immunologische Reaktion

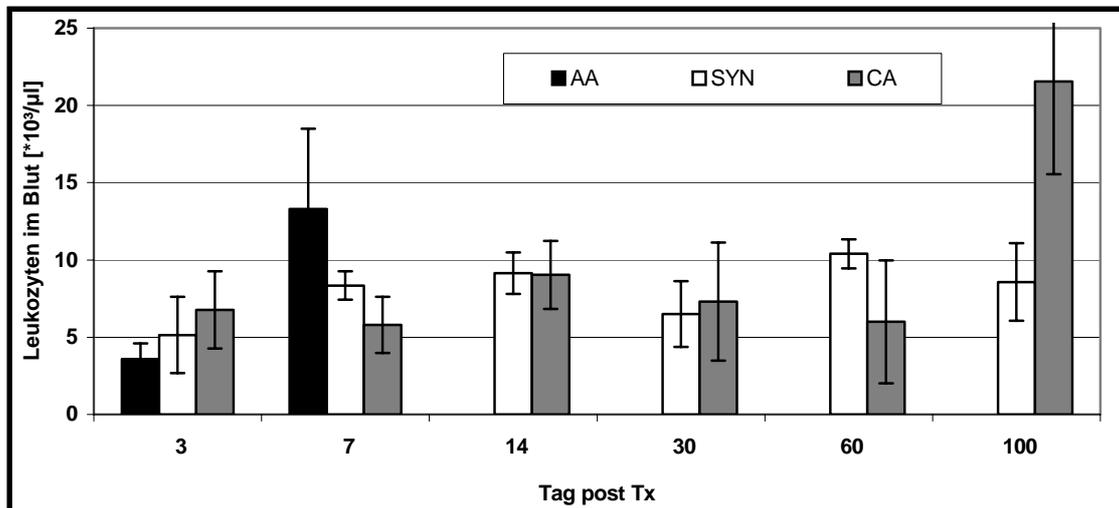
hindeutete. Dagegen veränderte sich der Milz-Index in der SYN-Gruppe über die Zeit kaum. Die Milz reagierte damit als immunkompetentes Organ sowohl auf die akute als auch auf die chronische Abstoßung.



**Abb. 4.3: Die Veränderung des Milz-Index in der Abstoßung. Eine Splenomegalie war sowohl bei der akuten Abstoßung am Tag 7 als auch bei der chronischen Abstoßung ab Tag 60 zu beobachten.**

### 4.1.3 Blutleukozyten-Werte

Zum Explantationszeitpunkt wurde Blut aus der V. cava inferior zur Bestimmung der Leukozytenzahl entnommen. Es zeigten sich in der klinisch unauffälligen SYN-Gruppe keine erhöhten Werte im Sinne einer Entzündung. Der physiologische Leukozytenwert im Ratten-Blut lag zwischen 5 bis  $10 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$ . Eine echte Blut-Leukozytose mit mehr als  $10 \times 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$  war in der AA-Gruppe am Tag 7 zu beobachten. Auch in der CA-Gruppe fand sich eine solche Leukozytose am Tag 100. Die Blutleukozytose war damit ein wichtiger systemischer Parameter der durch das Transplantat induzierten Immunaktivierung.



**Abb. 4.4: Eine Blut-Leukozytose fand sich sowohl bei der akuten Abstoßung am Tag 7 als auch bei der chronischen Abstoßung am Tag 100.**

## **4.2 Histomorphologische Kennzeichen der akuten und chronischen Abstoßung am Dünndarm-Transplantat**

Vom Dünndarm-Transplantat wurde sowohl das Jejunum als auch das Ileum begutachtet. Die syngenen Transplantate am Tag 100 (Abb. 4.5 A) zeigten ein weitgehend ähnliches Bild wie der nicht transplantierte Darm. Für die akute Abstoßung war eine massive transmurale Entzündungsreaktion mit lymphozytärer Infiltration kennzeichnend. Diese ging von den großlumigen Verteilergesäßes der Submukosa als perivaskuläres Infiltrat aus und infiltrierte alle Schichten der Darmwand einschließlich der Muskulatur (nicht gezeigt). Das Epithel war deutlich in seiner Höhe reduziert und ebenfalls entzündlich infiltriert. Zeichen der Sklerose fanden sich keine. Die frühe Immunsuppression, mit der die akute Abstoßung verhindert wurde, hatte das entzündliche Infiltrat in den Gruppen CA, LF-1 und LF-2 deutlich reduziert.

In der CA-Gruppe kam es durch die von Tag 0 bis 5 verabreichte Immunsuppression ab Tag 14 zu einer mäßigen lymphozytären Infiltration der Submukosa und der Lamina propria. Dieses Infiltrat verstärkte sich ab dem Tag 60 (Abb. 4.5 B+D). Am Tag 100 schließlich war die CA gekennzeichnet durch eine Hypertrophie der Muskulatur und Sklerosierung des Bindegewebes sowie einer Transplantat-Vaskulopathie (Abb. 4.8). Außerdem zeigte sich eine massive Entzündung aller Wandabschnitte und eine Reduktion der Zottenhöhe mit dem Verlust des Bürstensaums (Abb. 4.6 B+C).

Auch die Tiere der LF-1-Gruppe zeigten das oben beschriebene Vollbild der CA. Durch die zusätzliche Immunsuppression von Tag 60 bis 65 wurde jedoch der Zeitpunkt der CA um fast 70 Tage verzögert (Abb. 4.1).

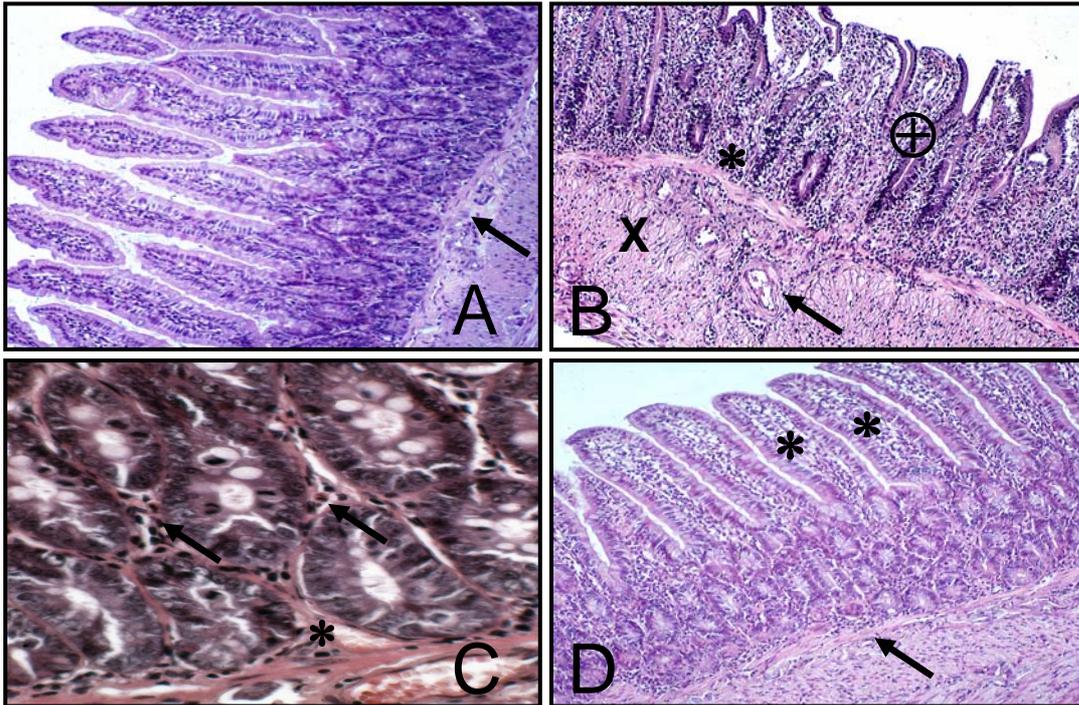


Abb. 4.5: Übersichtsdarstellung der Transplantat-Dünndärme (HE-Färbung; A, B, D x400, C x800).

- A) SYN, Tag 100      Unauffälliges Epithel und Submukosa (↑) ohne lymphozytäres Infiltrat.
- B) CA, Tag 100      Verlust der lokalen Integrität durch entzündliche Destruktion der Zotten (⊕) und Kryptitis (\*). Hypertrophie (X) der Muskelschichten und Transplantat-Vaskulopathie (↑) mit perivaskulärem Infiltrat.
- C) LF-2, Tag 250      Darstellung des lymphozytären Infiltrats (↑) und der Bindegewebs-Proliferation (\*) zwischen den Krypten des Epithels.
- D) LF-2, Tag 250      Darstellung des persistierenden Infiltrats in der Submukosa (↑) und der Lamina propria (\*).

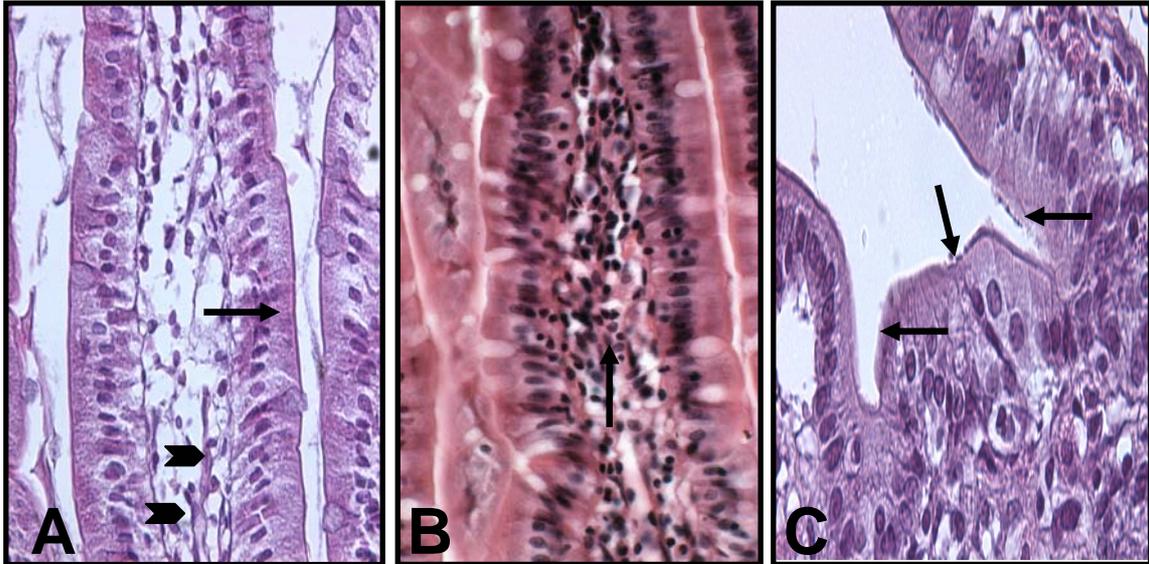
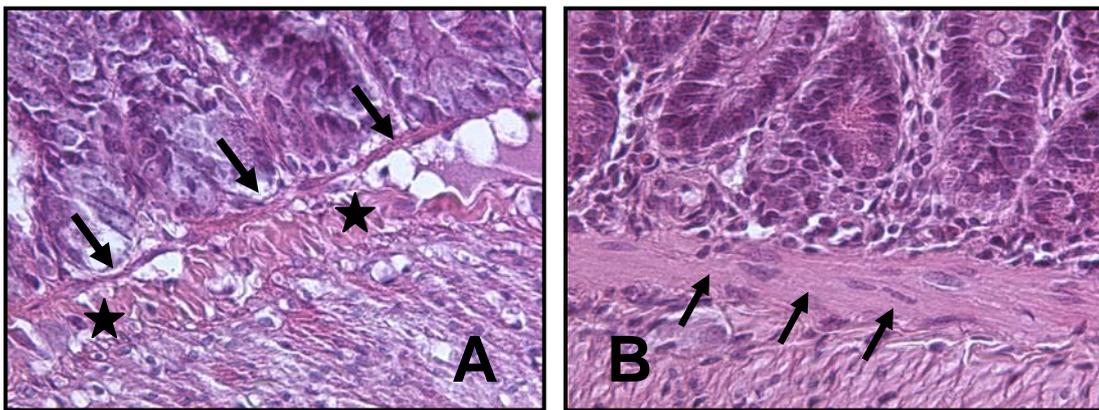


Abb. 4.6: Vergleich der Infiltration der Lamina propria im Bereich der Zotten und der epithelialen Integrität zum Zeitpunkt der chronischen Abstoßung (HE, x800).

- |                 |   |
|-----------------|---|
| A) SYN, Tag 100 | Unauffällige Dünndarm-Zotte mit intaktem Bürstensaum (↑). Lamina propria ohne entzündliches Infiltrat. Sichtbar ist auch der lockere Verbund der Kapillargefäße in der Zottenmitte(▶) . |
| B) CA, Tag 100  | Hochgradiges lymphozytäres Infiltrat in der Lamina propria (↑) als Zeichen einer Entzündung.  |
| C) CA, Tag 250  | Abnehmende Zottenhöhe durch Abschilferung und Verlust des Bürstensaumes (↑).  |

Anders dagegen das histomorphologische Bild bei den Tieren der LF-2-Gruppe (siehe Abb. 4.5 D). Hier war am festgesetzten Entnahmetag 250 kein Vollbild der CA zu sehen, sondern nur ein mäßiges lymphozytäres Infiltrat im Bereich der Submukosa und Lamina propria. Trotz leicht reduzierter Zottenhöhe war das histologische Bild in der Übersicht zufriedenstellend (Tab. 4.3).

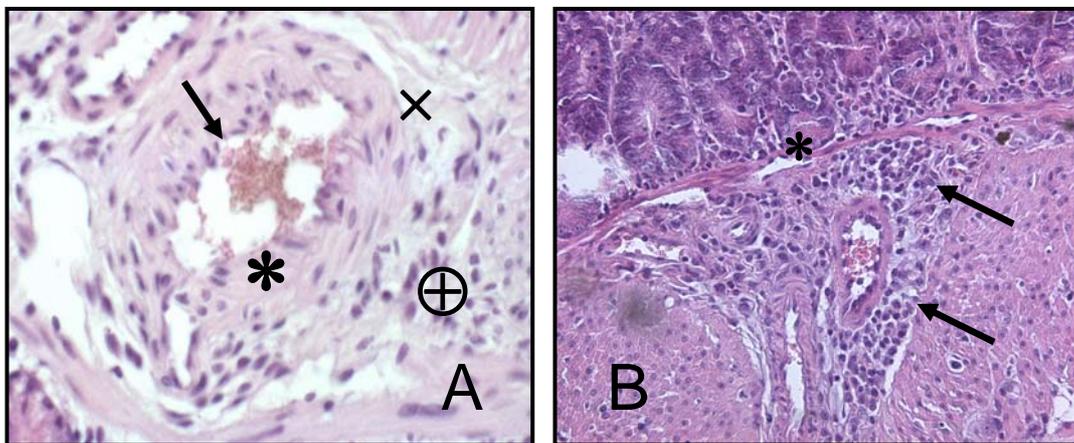
In der Phase der CA zeigte sich in allen histologischen Präparaten eine massive Hypertrophie der Lamina muskularis mukosa und eine Sklerosierung der gefäßreichen Submukosa am Tag 100 (Abb. 4.7). Dies führte dazu, daß beide Schichten nicht mehr voneinander zu unterscheiden waren.



**Abb. 4.7: Hypertrophie der Lamina muskularis mukosae und Sklerosierung der Submukosa bei der chronischen Abstoßung (HE, x800).**

- |    |              |  |
|----|--------------|--|
| A) | SYN, Tag 100 | Gute Abgrenzbarkeit der feinen Lamina muskularis mukosa (↑) von der Submukosa (*). |
| B) | CA, Tag 100  | Verschmelzung beider Schichten durch Hypertrophie und Sklerose (↑).                |

Ab Tag 60 zeigte sich erstmals die für die CA charakteristische Transplantat-Vaskulopathie. Alle Ausläufer der A. mesenterica superior und auch die Venen des submukösen Plexus wiesen eine akzelerierte Arteriosklerose sowie eine ödematöse Endothel-Schädigung auf. Weiter zeigte sich an den Gefäßen eine deutliche Hypertrophie und Fibrose der Media. Dies führte am Tag 100 neben einer weitgehenden Verschmelzung der Gefäßwandschichten zu einer erheblichen Lumenreduktion. Betroffen waren alle Gefäße, jedoch variierte das Ausmaß der pathologischen Veränderungen.



**Abb. 4.8: Repräsentative Beispiele für eine Transplantat-Vaskulopathie (A) und ein massives perivaskuläres Infiltrat (B) am Tag 100 in der CA-Gruppe (HE, x800).**

- A) Deutliche Media-Hypertrophie (\*) und Sklerose-Bildung (X) der Ausläufer der A. mesenterica superior in der Submukosa. Außerdem ödematöse Endothelitis (↑), perivaskuläres Infiltrat (⊕) und Aufhebung der Abgrenzbarkeit der einzelnen Gefäßwandschichten.**
- B) Massives perivaskuläres Infiltrat (↑), das auf die Kryptenregion übergreift. Dabei kommt es oberhalb der Gefäße zu einer Destruktion der Lamina muscularis mucosae (\*).**

In Tabelle 4.3 sind die histologischen Charakteristika zum Entnahmezeitpunkt für die verschiedenen Versuchsgruppen zusammengefasst. Diese Tabelle verdeutlicht, dass die CA wie auch die AA, durch einen erheblichen Zottenschaden und eine massive Entzündung gekennzeichnet waren. Doch ausschließlich während der CA fanden sich solche histomorphologischen Merkmale wie Hypertrophie, Transplantat-Vaskulopathie und Sklerosierung.

**Tab. 4.3: Übersicht über die histologischen Hauptkriterien der Dünndarm-Transplantate zum Entnahme-Zeitpunkt. Zusätzlich wurde die Qualität der Transplantate beurteilt.**

Gruppen- Bezeichnung	Zotten- Schaden	Transplantat- Vaskulopathie	Sklerosierung Fibrosierung	Entzündungs- Zeichen	Transplantat Qualität <sup>6)</sup>
<b>SYN<sup>1)</sup></b>	<b>+</b>	<b>----</b>	<b>----</b>	<b>----</b>	<b>[+++]</b>
<b>AA<sup>2)</sup></b>	<b>+++</b>	<b>----</b>	<b>----</b>	<b>+++</b>	<b>[----]</b>
<b>CA<sup>3)</sup></b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>[----]</b>
<b>LF-1<sup>4)</sup></b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>[----]</b>
<b>LF-2<sup>5)</sup></b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>[++]</b>

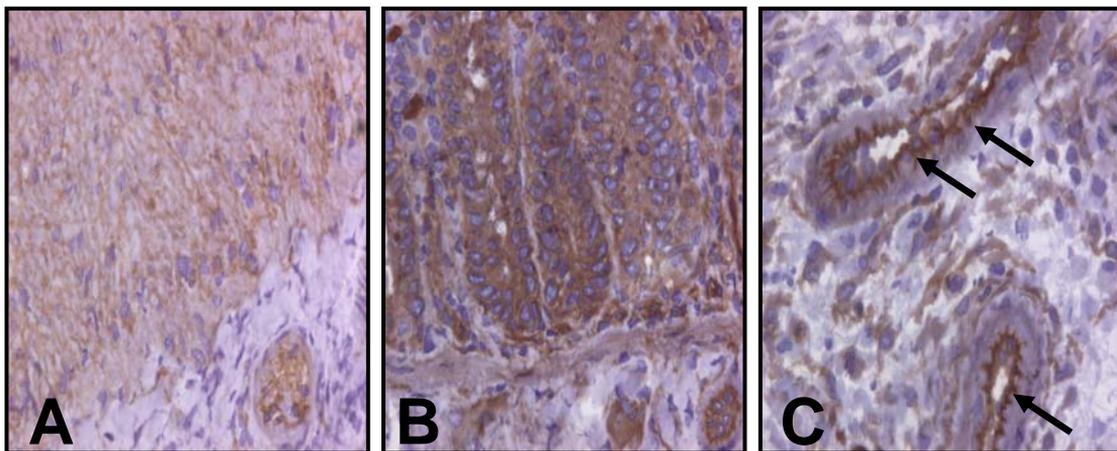
(+ = gering, ++ = mittelgradig +++ = hochgradig ---- = negativ)

<sup>1)</sup>Tag 100, <sup>2)</sup>Tag 7, <sup>3)</sup>zw. Tag 96-106, <sup>4)</sup>zw. Tag 158-182, <sup>5)</sup>Tag 250. siehe auch Tab. 4.2.

<sup>6)</sup>([++] = mäßig, [+++] = gut, [----] = schlecht)

Um die Ursache für die Infiltration im Transplantat festzustellen, wurden immun-histologische Färbungen mit dem Antikörper OX 27 angefertigt, der sich spezifisch gegen die allo genen MHC-Klasse-I-Moleküle des Spenders richtet. Während sich am Tag 7 sowohl unterschiedliche Gewebestrukturen des Transplantates, wie Binde- und Fettgewebe, Muskulatur und Gefäße und sich die im Transplantat befindlichen "passenger leukocytes" mit diesem Antikörper anfärben ließen (Daten nicht gezeigt), traf dieses am Tag 100 ausschließlich für die Gewebestrukturen des Transplantates zu. Somit ist davon auszugehen, dass die von ihnen exprimierten allo genen MHC-Moleküle nach dem Verschwinden der "passenger leukocytes" für die Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten verantwortlich sind.

Wie am Beispiel der Transplantat-Lymphknoten in Abb. 4.13 gezeigt, reduziert sich der Anteil der "passenger leukocytes" wenige Tage nach Transplantation drastisch, während die Immunzellen des Empfängers diese Strukturen infiltrieren. Dadurch, dass die Transplantat-Gewebe auch weiterhin allogene MHC-Moleküle exprimieren, wird dies als Ursache für die Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten angesehen. Über verschiedene, von diesen Zellen freigesetzte Mediatoren werden weitere immunkompetente Zellen angelockt. Somit erscheint dieses Infiltrat Ausdruck einer ständigen Immunaktivierung zu sein, die als "low-grade" Entzündung bezeichnet wird.

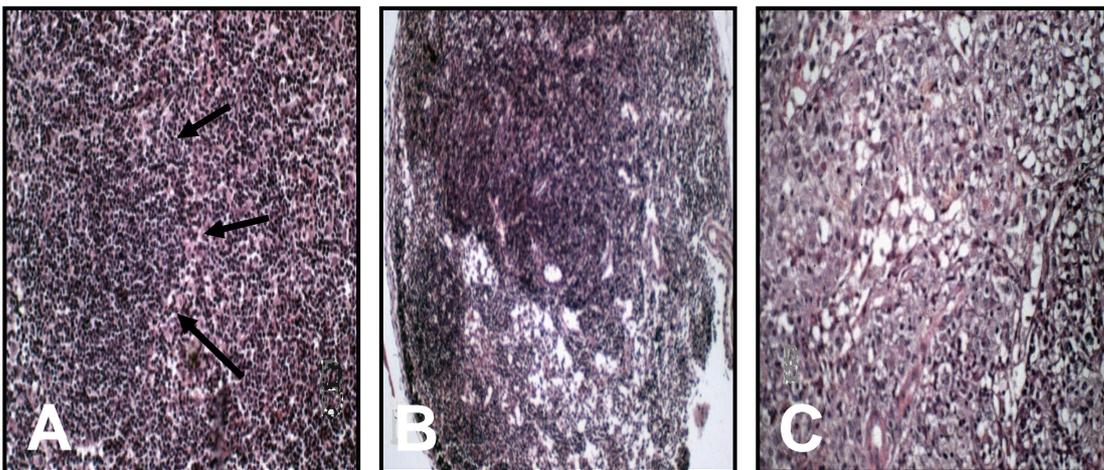


**Abb. 4.9: Immunhistologischer Nachweis der MHC-Klasse-I-Expression (Braun-Färbung) unterschiedlicher Gewebe des Dünndarmtransplantates zum Zeitpunkt der chronischen Abstoßung am Tag 100.**

- A )            Muskulatur und Fettgewebe der Dünndarm-Wand**
- B )            Bindegewebe der Kryptenregion**
- C )            Gefäße der Submukosa**

### 4.3 Histologische und durchflusszytometrische Analysen der Transplantat-Lymphknoten

Die Transplantat-Lymphknoten des Spenders waren, im Mesenterium liegend, mit transplantiert worden und aufgrund ihres hohen Anteils allogener lymphatischer Zellen die Ursache für die starke Aktivierung des Empfänger-immunsystem. Aus diesem Grund konnten auch keine durchflußzytometrischen Analysen am Tag 100 durchgeführt werden, da zu diesem Zeitpunkt die Lymphknoten nahezu vollständig fibrosiert waren. Die Lymphknoten syngener Transplantate zeigten postoperativ nur geringe Veränderungen durch die Transplantation. In der AA-Gruppe zeigten sich jedoch am Tag 3 und 7 massive Infiltrationen der Sinus-Areale (Abb. 4.10). Diese gingen mit einer deutlichen Prominenz der Reaktionszentren einher. Am Tag 7 war zusätzlich eine entzündliche Destruktion des gesamten Lymphknotens zu beobachten.

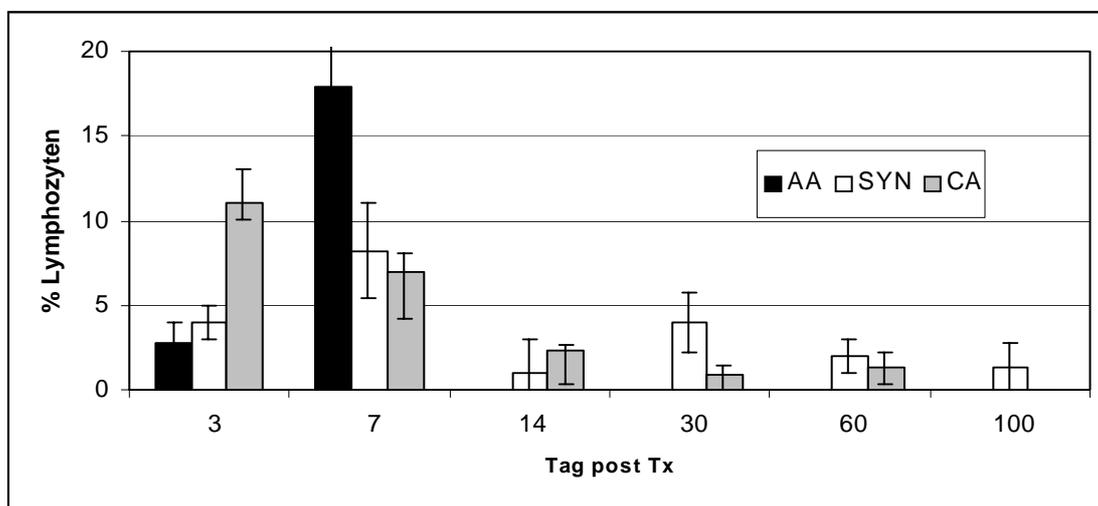


**Abb. 4.10: Morphologie der Transplantat-Lymphknoten während der akuten und chronischen Abstoßung**

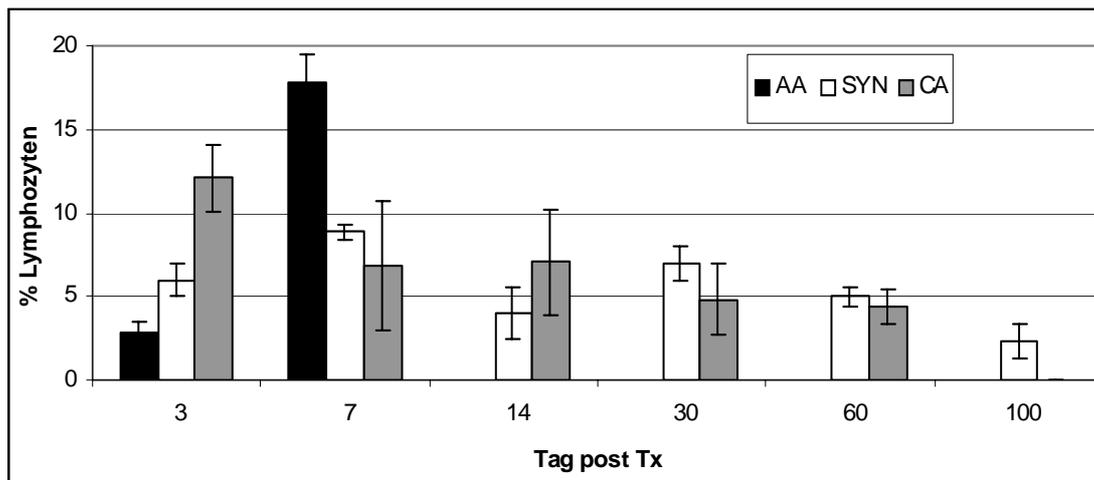
- A) AA, Tag 3** Ausschnitt mit Darstellung der fulminanten Lymphozyteninfiltration in den Reaktionszentren (↑).
- B) AA, Tag 7** Entzündliche Destruktion der regelhaften Lymphknoten-Architektur.
- C) CA, Tag 60** Deutliche Organ-Sklerose und Reduktion der Lymphozytendichte.

Während der massiven Infiltration der Transplantat-Lymphknoten in der Phase der AA (Abb. 4.10) wurde der Anteil aktivierter Lymphozyten durchflußzytometrisch bestimmt. Als Marker für die Aktivierung dienten das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 und der Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R). Die Abbildungen 4.11 und 4.12 zeigen den Anteil ICAM-1 positiver CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in den Transplantat-Lymphknoten. Auffällig ist der Unterschied am Tag 7 zwischen der AA- und CA-Gruppe: Der Anteil ICAM-1-positiver Zellen war während der AA und der CA in der Frühphase jeweils deutlich erhöht.

Ein ähnliches Bild wie für die ICAM-1 positiven Lymphozyten zeigte sich auch für die IL-2 Rezeptor positiven Zellen in den Transplantat-Lymphknoten (keine Graphik). Das Interleukin-2 und sein Rezeptor spielt in der frühen Phase der Abstoßung bei der Aktivierung naiver T-Lymphozyten eine große Rolle. In der AA-Gruppe waren sowohl die CD4<sup>+</sup> als auch die CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten aktiviert. In der SYN-Gruppe fanden sich dagegen kaum IL-2R-positive Zellen.

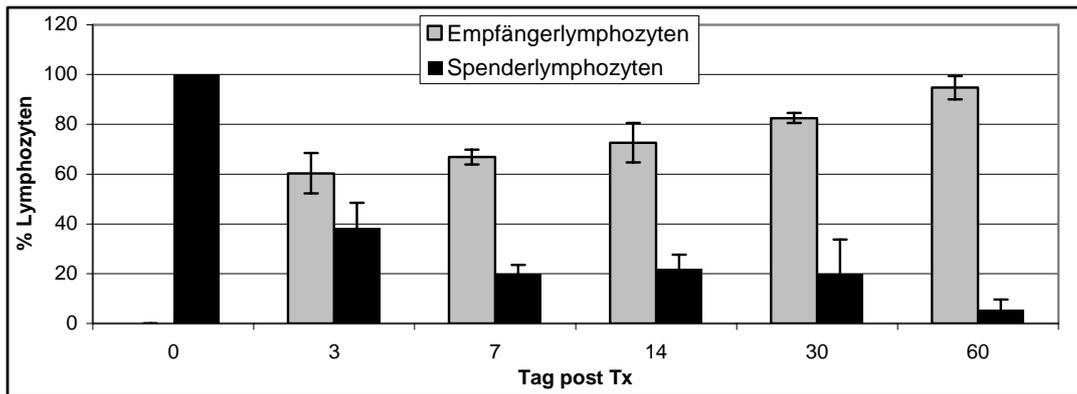


**Abb. 4.11: Anteil ICAM-1-positiver CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in den Transplantat-Lymphknoten.**



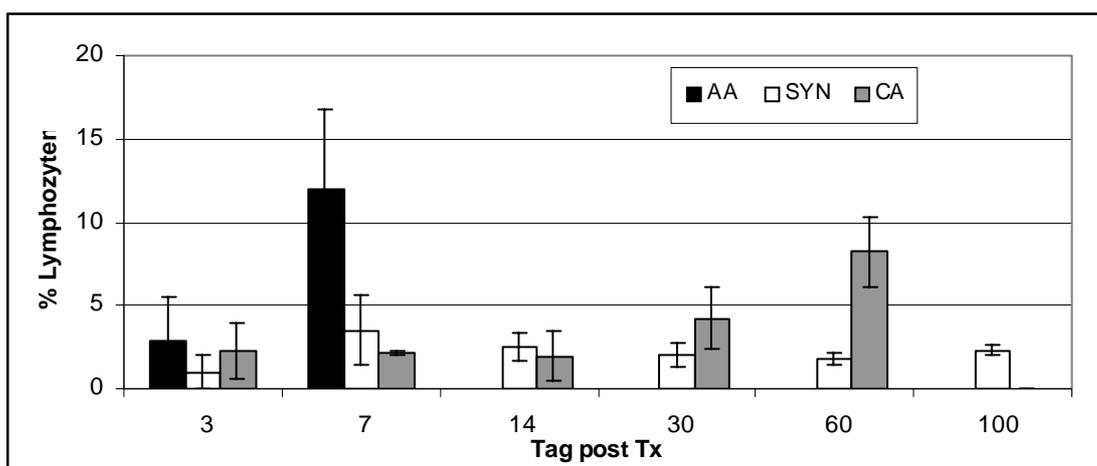
**Abb. 4.12: Anteil ICAM-1-positiver CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in den Transplantat-Lymphknoten.**

Ab dem Tag 60 zeigten sich in der CA-Gruppe Veränderungen in der Zusammensetzung der die Transplantat-Lymphknoten infiltrierenden Zellen (Abb. 4.14 bis 4.16). Histologisch war das Bild ab Tag 60 durch die zunehmende Sklerosierung der Transplantat-Lymphknoten geprägt (Abb. 4.10 C). Um den Ursprung der sich in den Transplantat-Lymphknoten befindlichen Lymphozyten während der AA und CA zu klären, d.h. handelte es sich hierbei, wie vermutet, um immunkompetente Zellen des Empfängers, wurden diese Zellen mit den stammspezifischen Antikörpern OX 27 und NDS 60 (Tab. 3.2) gefärbt. Die Abbildung 4.13 zeigt, dass innerhalb von nur 3 Tagen bereits 60% der ursprünglichen Spender-Lymphozyten nicht mehr vorhanden waren; entweder waren sie in lymphoide Organe des Empfängers ausgewandert oder sie waren zerstört worden. Danach erfolgte eine kontinuierliche Reduktion ihrer Zellzahl bis zum Tag 60. Währenddessen infiltrierten die Empfängerlymphozyten bis zum Tag 60 die Transplantat-Lymphknoten fast vollständig. Der Anstieg der Zellzahlen während der AA und der CA (Abb. 4.14 bis 4.16) ist daher fast ausschließlich auf den Einstrom von Empfänger-Lymphozyten zurückzuführen.



**Abb. 4.13: Rasche Infiltration der Transplantatlymphknoten mit Empfänger-Lymphozyten und Reduktion der Spender-Lymphozyten.**

Das in Abb. 4.10 gezeigte Infiltrat besteht somit zum größten Teil aus Immunzellen des Empfängers, das sich in der AA-Gruppe hauptsächlich aus  $CD8^+$  T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen zusammensetzte (Abb. 4.14 bis 4.16). Diese Zellen verfügen über ein zytotoxisches Potential und könnten somit an Zellschäden beteiligt sein. Auch in der CA-Gruppe kam es ab Tag 60 zu einem deutlichen Anstieg dieser drei Subpopulationen. Die Transplantat-Lymphknoten der LF-1- und LF-2-Gruppe waren wegen der Organsklerose zum Zeitpunkt der Organentnahme nicht mehr zu untersuchen.



**Abb. 4.14: Anteil der NK-Zellen in den Transplantat-Lymphknoten.**

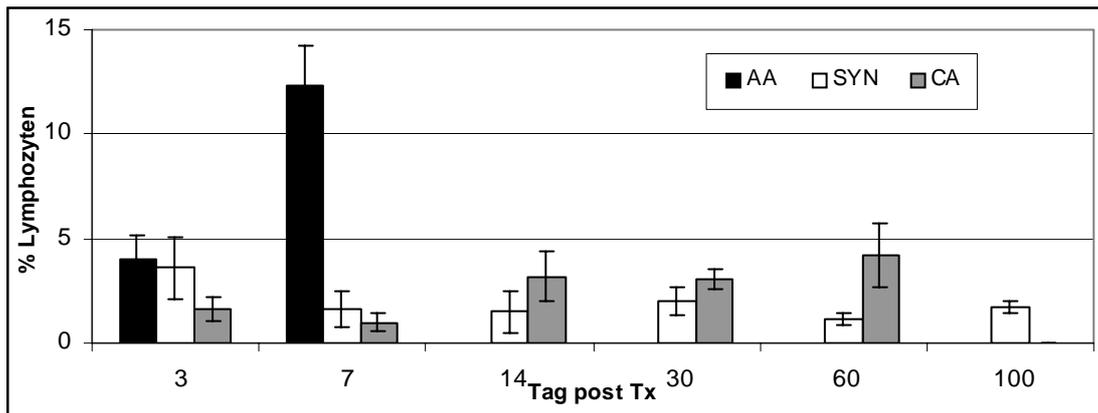


Abb. 4.15: Anteil der Makrophagen in den Transplantat-Lymphknoten.

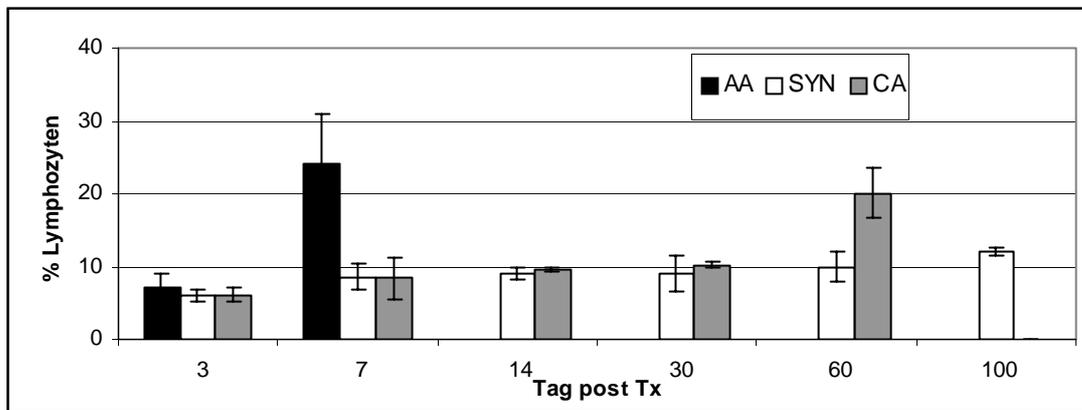


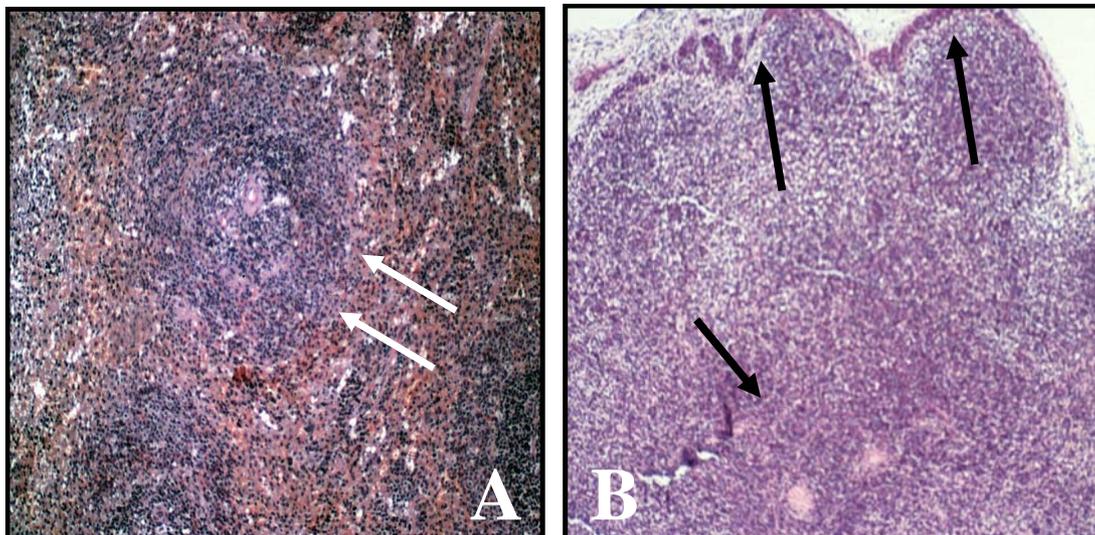
Abb. 4.16: Anteil CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in den Transplantat-Lymphknoten.

#### 4.4 Histologische und durchflußzytometrische Analysen der Milz und der Empfänger-Mesenteriallymphknoten (EMLK)

Um zu zeigen, ob und wann sich die AA und die CA des Dünndarm-Transplantats zu einer systemischen Immunantwort manifestierten, wurden Milz und EMLK untersucht. Während der AA zeigten sich folgende Veränderungen: Die Reaktionszentren waren ebenso wie die periarteriellen lymphatischen Scheiden (PALS) deutlich prominent. Neben einer großen Anzahl an Lymphozyten war die regelhafte Organstruktur am Tag 7 nahezu aufgelöst (Abb. 4.17). Ab dem Tag 60 fand sich in der CA-Gruppe eine zunehmende Verbreiterung der PALS und eine Infiltration des Randsinus als Zeichen vermehrter Organ-Aktivität. In der LF-2-Gruppe fand sich am Tag 250 dagegen

ein heterogenes Bild: Neben einer deutlichen Auflockerung dieses Randsinus sowie einer sklerotischen Rarefizierung der Organarchitektur zeigten sich auch hier teilweise multiple, aktivierte Reaktionszentren und prominente PALS. Dies war auf Grund der unauffälligen Klinik nicht zu erwarten gewesen.

Die Verbreiterung der PALS am Tag 60 und Tag 100, die als Zeichen eines vermehrten T-Lymphozyten-Umsatzes gewertet werden, sind möglicherweise auch verantwortlich für die deutliche Blut-Leukozytose (Abb. 4.4) im Rahmen der AA und der CA. Ebenso scheint der Milz-Index, der während der AA und der CA deutlich anstieg, mit diesen Ergebnissen zu korrelieren (Abb. 4.3).

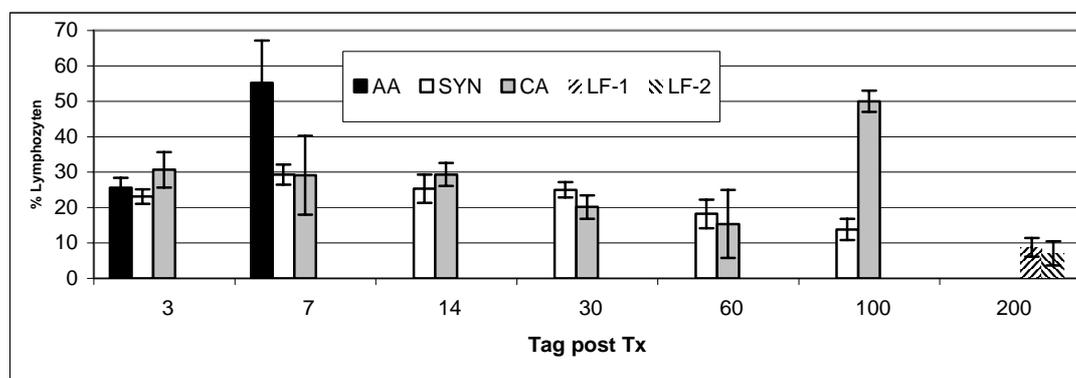


**Abb. 4.17: Milz-Morphologie zum Zeitpunkt der akuten und chronischen Abstoßung.**

- |                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>A) AA, Tag 7</b>   | <b>Massiv aktivierte Milz mit prominenten PALS (↑) und diffusen Einblutungen.</b> |
| <b>B) CA, Tag 100</b> | <b>Deutliche Lymphozytendichte in Rand- und Marksinus (↑).</b>                    |

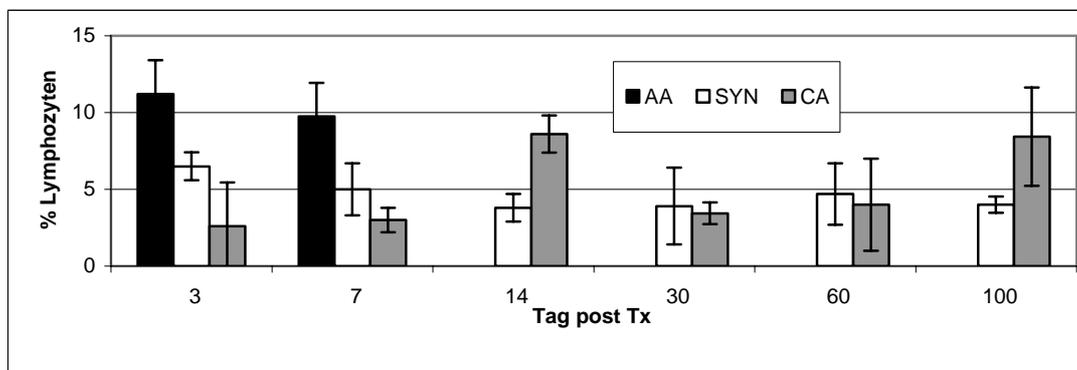
Während der AA waren in der Milz alle Zeichen einer fulminanten Entzündung mit diffusen Einblutungen und Organdestruktion am Tag 7 zu beobachten. Auch unter der immunsuppressiven Therapie war das lymphozytäre Infiltrat in Rand- und Marksinus, das bis zum Tag 14 in der CA-Gruppe auftrat, nicht zu vermeiden. Ebenso war die Prominenz der Reaktionszentren im Vergleich zur SYN-Gruppe deutlich höher. Ab Tag 60 bestimmte eine zunehmende Sklerose das Bild: Die Gliederung der Lymphknoten in Mark und Rinde war nicht mehr vorhanden. Neben einer leichten chronischen Lymphadenitis und einer histozytären Reaktion im Sinus, zeigte sich ein verbreitetes T-Zell-Areal.

Mit Blick auf die histologisch sichtbaren entzündlichen Veränderungen in Milz und EMLK wurde auch hier der Aktivierungszustand der Lymphozyten analysiert. Dabei zeigte sich in der Milz ein deutlicher Anstieg ICAM-1 positiver Lymphozyten sowohl in der AA als auch in der CA, während in der LF-1- und LF-2-Gruppe keine Veränderungen auftraten (Abb. 4.18). Dies war für die LF-1-Gruppe, die zum Zeitpunkt der Organentnahme deutliche klinische Zeichen der Abstoßung aufwies, nicht zu erwarten.



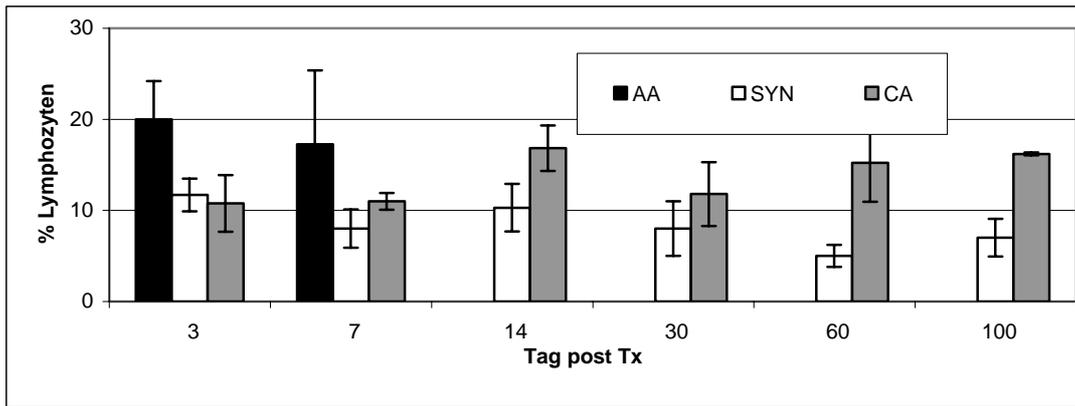
**Abb. 4.18: Anteil ICAM-1-positiver Lymphozyten in der Milz. Sowohl in der AA als auch in der CA führte die vom Transplantat ausgehende Immunaktivierung zu einem deutlichen Anstieg ICAM-1-positiver Zellen.**

Weitere Untersuchungen zeigten, dass während der AA vor allem CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten unter den ICAM-1-positiven Zellen in der Milz nachzuweisen waren (nicht gezeigt). Dies war unter Immunsuppression nicht zu sehen. So fanden sich in der CA-Gruppe ICAM-1-positiv CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten erst nach dem Absetzen der Immunsuppression am Tag 14 (nicht gezeigt). Ähnliches war für die IL-2R-positiven Zellen zu beobachten. Auch hier kam es zu einer starken Zunahme IL-2R-positiver Zellen im Rahmen der AA und der CA, nicht aber unter Immunsuppression (Abb. 4.19).

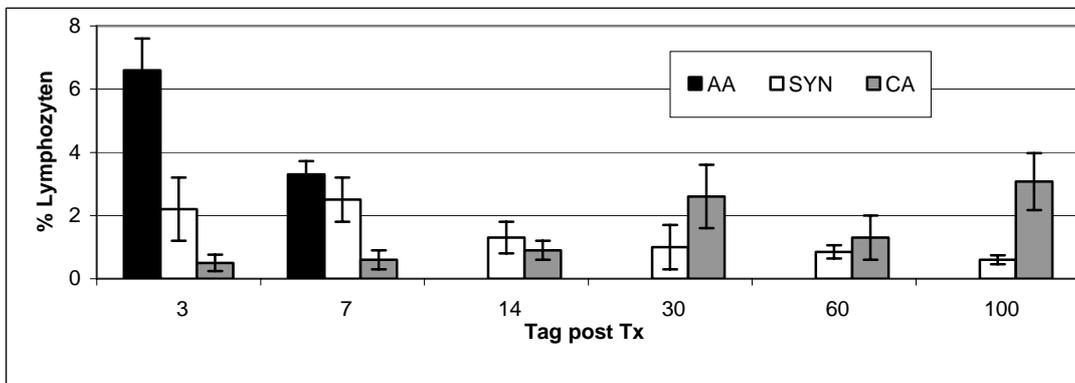


**Abb. 4.19 Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R) positive Lymphozyten in den EMLK. Nach dem Absetzen der Immunsuppression am Tag 5 in der CA-Gruppe, kam es zu einem temporären Anstieg IL-2R-positiver Lymphozyten am Tag 14 und dann wieder am Tag 100, dem Zeitpunkt der chronischen Abstoßung.**

Der Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die mit 40-45% die größte Subpopulation in beiden Organen bildete, blieb konstant. Ihnen wird eine zentrale Rolle bei der Immunaktivierung zugeschrieben. Auch der Anteil an B-Lymphozyten und NK-Zellen blieb unverändert. Hingegen erhöhte sich der Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und Makrophagen während der akuten und chronischen Abstoßung deutlich (Abb. 4.20 und 4.21).

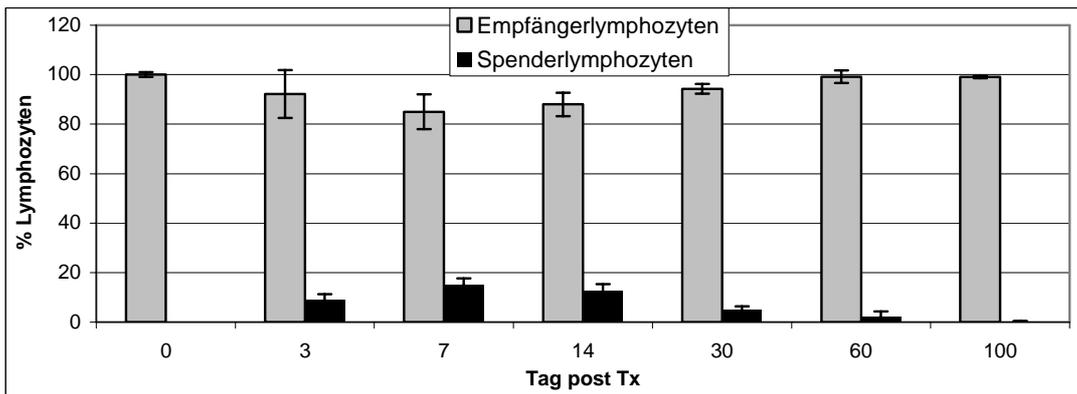


**Abb. 4.20: CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in den EMLK. Sowohl in der akuten als auch in der chronischen Abstoßung war ihr Anteil deutlich erhöht.**

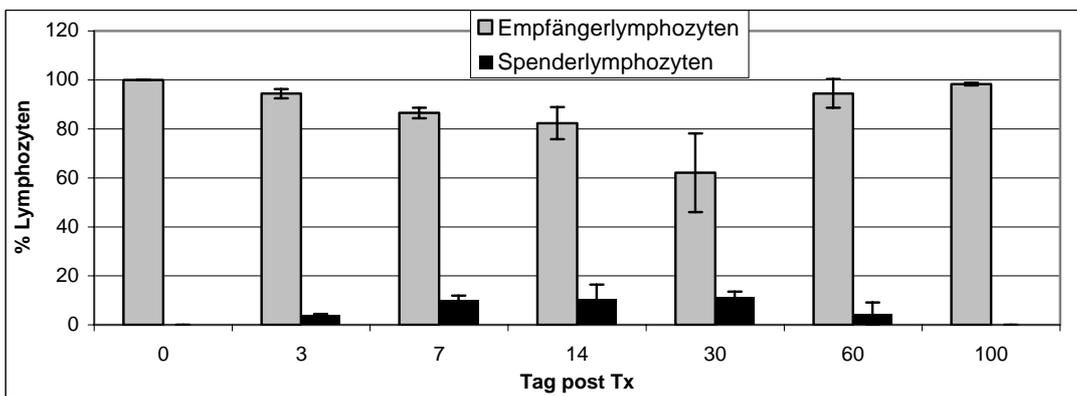


**Abb. 4.21: Makrophagen in den EMLK. Insbesondere in der frühen Phase der akuten Abstoßung und ab Tag 30 in der CA-Gruppe war ihr Anteil erhöht.**

Um die aus dem Dünndarm-Transplantat und den Transplantat-Lymphknoten emigrierten immunkompetenten "passenger leukocytes" zu verfolgen, wurden ihre Präsenz in Milz und EMLK mit dem Rattenstamm-spezifischen Antikörper Ox 27 nachgewiesen (Kap. 3.10). Der Anteil, dieser aus dem Transplantat stammenden Zellen stieg bis auf 15% an, um dann bis zum Tag 60 kontinuierlich abzufallen.



**Abb. 4.22: Infiltration der Milz der CA-Gruppe mit Spenderlymphozyten**



**Abb. 4.23: Infiltration der Empfängerlymphknoten der CA-Gruppe mit Spenderlymphozyten.**

## 5. Beantwortung der Fragen

### **Ad (1) Welches sind die charakteristischen histomorphologischen Merkmale der akuten Abstoßung im Dünndarm-Transplantat?**

Folgendes histologisches Bild kennzeichnete die akute Abstoßung am Tag 7: Ein ausgeprägtes perivaskuläres Infiltrat, das die gesamte Darmwand und die Zotten erfaßte, die zudem massiv in ihrer Höhe reduziert waren. Zu diesem Zeitpunkt war weder eine Schädigung der Gefäße noch eine Sklerosierung zu beobachten. Die durchflußzytometrischen Analysen der mesenterialen Lymphknoten zeigten, dass sowohl das adaptive (mit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten) als auch das nicht-adaptive (mit Makrophagen und NK-Zellen) Immunsystem an dieser akuten Abstoßung beteiligt sind.

### **Ad (2) Welches sind die charakteristischen histomorphologischen Merkmale der chronischen Abstoßung im Dünndarm-Transplantat?**

Das histologische Vollbild der chronischen Abstoßung war durch vier morphologische Haupt-Merkmale gekennzeichnet:

- A) Hypertrophie der glatten Muskelschichten, insbesondere der Lamina muskularis mukosae, und Sklerosierung des Bindegewebes, vor allem der Submukosa;
- B) Transplantat-Vaskulopathie der Gefäße mit Lumenreduktion;
- C) massive, transmurale Entzündung und Infiltration der Darmwand;
- D) deutliche Reduktion der Zottenhöhe und Verlust der epithelialen Integrität.

**Ad (3) Welche histomorphologischen Veränderungen korrelieren mit der chronischen Abstoßung verantwortlich zu sein?**

Eine große Bedeutung für die Induktion der chronischen Abstoßung wird dem persistierenden Infiltrat beigemessen, das in der chronischen Abstoßungsgruppe bereits ab Tag 14 zu beobachten war. Dieses Infiltrat wird als eine "low-grade"-Entzündung interpretiert, das die histomorphologischen Veränderungen um den Tag 100 induziert, wie z.B. die deutliche Hypertropie der Lamina muskularis mukosae. Diese Hypertrophie führt dazu, dass sie nicht mehr von der darunter liegenden sklerosierten Submukosa abzugrenzen war. Es ist bekannt, dass sämtliche zur Versorgung der Zotten notwendigen Arteriolen und Kapillaren durch die Lamina muskularis mukosae verlaufen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass sowohl die Hypertrophie der Lamina muskularis mukosae als auch die Sklerosierung der Submucosa dazu führten, dass diese Gefäße von außen komprimiert wurden. In Kombination mit der ebenfalls beobachteten Transplantat-Vaskulopathie und der damit verbundenen Lumenverengung führte dies zu einem ischämischen Schaden, der sich histologisch in einer massiven Reduktion der Zottenhöhe zeigte.

**Ad (4) Welche histomorphologischen Merkmale kennzeichnen die Dünndarm-Transplantate der Langzeitfunktionsgruppen?**

Zum Zeitpunkt der Analyse zeigten die Transplantate der LF-1-Gruppe deutliche Zeichen der chronischen Abstoßung, während die Transplantate der LF-2-Gruppe milde Zeichen der chronischen Abstoßung am Tag 250 aufwiesen. Diese waren mit denen der am Tag 30 beobachteten morphologischen Veränderungen der chronischen Abstoßungsgruppe vergleichbar.

**Ad (5) Welche immunologischen Vorgänge induzieren die chronische Abstoßung?**

Wie alle kernhaltigen Zellen exprimieren auch die Zellen des Transplantat-Gewebes, wie Muskulatur und Bindegewebe, MHC-Klasse-I-Moleküle. Nach allogener Transplantation stellen sie eine dauerhafte Quelle zur Aktivierung der Immunzellen des Empfängers, insbesondere der T-Lymphozyten, dar. Die MHC-Moleküle werden von empfängereigenen antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und präsentiert. Hingegen können die mit dem Transplantat übertragenden Immunzellen, die sog. "passenger leukocytes", nicht Ursache einer langfristigen Immunaktivierung sein, die sie bereits innerhalb kurzer Zeit nach Transplantation vom Empfängerimmunsystem zerstört werden (Abb. 4.13). Die Aktivierung spiegelt sich histologisch in einem permanenten, milden lymphozytären Infiltrat ab Tag 14 in der chronischen Abstoßungsgruppe wider. Diese Beobachtung wird als Ursprung einer "low-grade"-Entzündung gewertet, die zwischen Tag 14 und Tag 60 zu einer zunehmenden Sklerosierung und ersten Zeichen einer Transplantat-Vaskulopathie führte. Diese Entwicklung verstärkte sich bis Tag 100 und resultierte in einem Transplantatversagen.

## 6. Diskussion

Die Monate bzw. Jahre nach Transplantation auftretende chronische Abstoßung ist das Haupthindernis für eine erfolgreiche Transplantat-Langzeitfunktion verschiedenster vaskularisierter Organe, wie z.B. Herz (Paul 1992), Niere (Libby 1994) und Dünndarm (Orloff 1999). Ziel dieser Arbeit war, an einem Experimentalmodell zur orthotopen Dünndarmtransplantation sowohl die histomorphologischen Merkmale der chronischen Abstoßung zu beschreiben als auch die zugrunde liegenden immunologischen Vorgänge zu untersuchen.

### 6.1 Immunbiologische Grundlagen der chronischen Abstoßung <sup>1</sup>

Zu den allgemeinen pathophysiologischen Merkmalen der chronischen Abstoßung, wie der Intimaproliferation und Fibrosierung, war das Vollbild der chronischen Dünndarm-Transplantat-Abstoßung am Tag 100 durch folgende morphologischen Veränderungen charakterisiert: Fulminante transmurale Entzündungen (Abb. 4.6), u.a. Hypertrophie der Lamina muscularis (Abb. 4.7), Transplantat-Vaskulopathien (Abb. 4.8) sowie hochgradige Abschilferungen des Epithels (Abb. 4.6).

Die Entwicklung der chronischen Abstoßung wird als Folge eines persistierenden milden Infiltrats im Bereich der Lamina propria und Submukosa angesehen (Abb. 4.5). Dieses Infiltrat wurde bereits kurz nach dem Absetzen der Immunsuppression am Tag 14 in der CA-Gruppe sichtbar, auch wenn sich zu diesem Zeitpunkt in den Transplantat- oder Spender-Lymphknoten kein Hinweis für eine Immunaktivierung fand. Erst am Tag 60, als sich erste histomorphologische Veränderungen am Transplantat manifestierten, wurde

---

<sup>1</sup>) Die antigenunabhängigen Faktoren, ausgelöst durch Ischämie und Reperfusion, sind in dieser Arbeit nicht berücksichtigt worden, da aufgrund der Standardisierung, wie der Verwendung von Inzuchtieren, genormte Ischämie- und Transplantationszeiten, der Einfluss dieser Faktoren als sehr gering betrachtet wird.

auch ein Anstieg von zytotoxischen T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen in den Transplantat-Lymphknoten beobachtet. Um den Tag 100, also zum Zeitpunkt der maximalen Ausprägung der CA, kam es zu einer fulminanten Zunahme immunkompetenter Zellen im Transplantat als Grundlage einer sich ausweitenden systemischen Immunaktivierung. Neben einem extrem hohen Milz-Index (Abb. 4.3) und einer Leukozytose (Abb. 4.4) kam es zu einer deutlichen Ansammlung aktivierter Lymphozyten in Milz und Empfänger-Lymphknoten (Abb. 4.18 und 4.19). Klinisch korrelierte dies mit einer massiven Gewichtsabnahme (Vgl. Tab. 4.3).

Im Mittelpunkt der Auseinandersetzung zwischen Transplantat und Empfängerimmunsystem stehen die T-Lymphozyten, die über den direkten und indirekten Weg der Antigenerkennung aktiviert werden (Rogers 2001, Sayegh 1999, Waaga 1998, Sykes 1996). Die Hauptursache dieser T-Zell-Aktivierung ist die Erkennung von allogenen MHC-Molekülen bzw. hieraus prozessierten MHC-Peptiden. Diese Antigene werden sowohl von Zellen des Transplantates als auch von den sog. "passenger leukocytes" exprimiert, die mit dem Transplantat übertragen werden. Da nach einer gewissen Zeit die "passenger leukocytes" weder im Transplantat (Abb. 4.13) noch im Empfänger zu finden sind (Abb. 4.22 und 4.23), kommt auch der von ihnen ausgelöste direkte Weg der Antigenerkennung zum Erliegen. Hingegen bleibt der indirekte Weg unverändert bestehen. Dabei nehmen antigenpräsentierende Zellen des Empfängers vom Transplantat abgeschilferte MHC-Moleküle auf, prozessieren diese zu Peptid-Bruchstücken und präsentieren sie auf der Zell-Oberfläche den eigenen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Shirwan 1995). Diese aktivieren ihrerseits durch ihre Zytokine weitere Effektor-Zellen, wie B-Lymphozyten, CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und Makrophagen (Rogers 2001, Gould 1999, Thorsby 1997). Untersuchungen zum Zytokin-Muster in diesem Infiltrat zeigten, das u.a. vermehrt Interleukin-4 sowie TNF $\alpha$  exprimiert wurden (Walgenbach 1996, Toogood 1996). Auch die vermehrte Expression von Interferon- $\gamma$  scheint für die Hypertrophie charakteristisch zu sein (Su 1996). Für die Bindegewebs-Sklerosierung

scheinen spezifische Wachstumsfaktoren, wie der "fibroblast growth factor", verantwortlich zu sein (Kouwenhoven 1999).

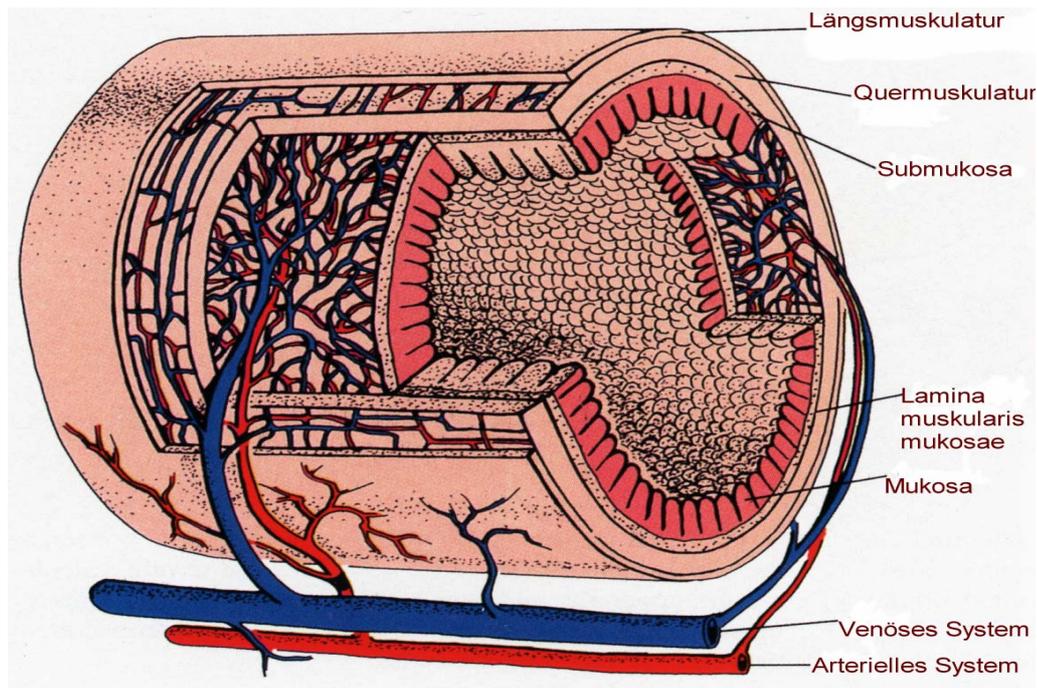
Eigene immunhistochemische Analysen zeigen, dass auch 100 Tage nach Transplantation verschiedene Zellen des Transplantates (z.B. Muskelzellen) weiterhin allogene MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren (Abb. 4.9). Damit kann der indirekte Weg der T-Zell-Aktivierung als wesentliche Ursache für die lokale Immunaktivierung angesehen werden, die schließlich in die chronische Abstoßung mündet.

## **6.2 Zusammenhang zwischen den histopathologisch-zellulären Ereignissen und der chronischen Transplantat-Abstoßung**

In diesem Kapitel wird der Zusammenhang zwischen den histomorphologischen Veränderungen, die in ihrer Summe als chronische Abstoßung bezeichnet werden, und den sich hieraus ergebenden Konsequenzen für das Transplantat-Überleben diskutiert. Ein prägnantes Zeichen der chronischen Abstoßung, das in dieser Arbeit beobachtet wurde, war die Hypertrophie der glatten Muskulatur, insbesondere der Lamina muskularis mukosae. Die glatte Muskulatur findet sich zum einen in der Darmwand als kräftige Longitudinal- und Transversalschicht, aber auch als feine Lamina muskularis mukosae im Epithel oberhalb der Submukosa (Abb. 6.1 und 6.2). Außerdem enthalten sämtliche Blut-Gefäße glatte Muskelzellen in ihrer Wand.

Die Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskulatur als Zeichen der chronischen Abstoßung ist bekannt (Heeckt 1993, Pritchard 1985), ist aber bisher nicht auf die Lamina muskularis mukosae fokussiert worden. Die massive Hypertrophie der Lamina muskularis mukosae führte dazu, dass diese lichtmikroskopisch nicht mehr von der sklerosierten Submukosa zu unterscheiden war (Abb. 4.7). Durch die Sklerosierung kommt es möglicherweise zu einer Kompression der durch sie hindurchtretenden Gefäße. Die Arteriolen und

Kapillaren verfügen über keine stabile Gefäß-Wand (Abb. 4.6A), um diesem Druck von außen standhalten zu können. Durch diese Lumenreduktion kommt es wahrscheinlich auch zur Ischämie (s. auch Kap. 5). Der Grund, dass die Lamina muskularis mukosae im Vergleich zu den Transversal- und Longitudinalschichten in besonderer Weise von der Infiltration betroffen ist, liegt in ihrer starken Durchsetzung mit Gefäßen (Abb. 6.1).



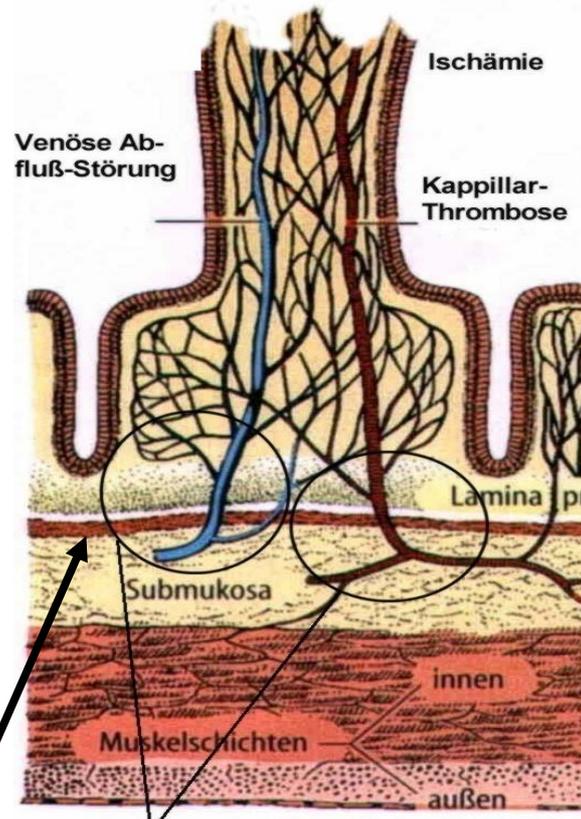
**Abb. 6.1: Physiologische Blutversorgung des Dünndarms: Die Submukosa enthält ein großes arterielles, venöses und lymphatisches Kapillar-Netzwerk.**

Ein weiterer Effekt, der im Rahmen der chronischen Abstoßung zu Veränderungen an den Gefäßen führte, ist die Transplantat-Vaskulopathie, die bereits in zahlreichen Arbeiten beschrieben wurde (Russel 2001, Orloff 1999, Sugitani 1997, Langrehr 1994). In der CA-Gruppe zeigten sich lichtmikroskopisch ab Tag 60 eindeutig pathologische Veränderungen der Gefäße (Abb. 4.8). Diese waren gekennzeichnet von einer Endothelitis, einer Zunahme der Wanddicke durch Hypertrophie der Media-Muskulatur und eine akzelerierten sklerotischen Umbau. Im Vollbild der Abstoßung waren die Gefäßschichten nicht mehr voneinander abzugrenzen. So kam es zu einer

zunehmenden Lumenreduktion und partiellen Okklusion. Solche Kapillar-Thrombosen wurden bereits früher durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt (Teitelbaum 1996).

**Abb. 6.2: Durchtrittsstelle der kapillären Gefäße der Submukosa durch eine normal breite Lamina muskularis mukosa (Kreise). Die in der chronischen Abstoßung zu beobachtende Hypertrophie dieser Lamelle und die zunehmende Sklerosierung der Submukosa führt wahrscheinlich zu einer Kompression der zu- und abfließenden Gefäße (Vgl. Abb. 4.7). Als Folge dieser Entwicklung kommt es zu Zirkulationsstörungen im Gefäßkreislauf und zur Ischämie mit Zottendestruktion.**

Lamina muskularis mukosae



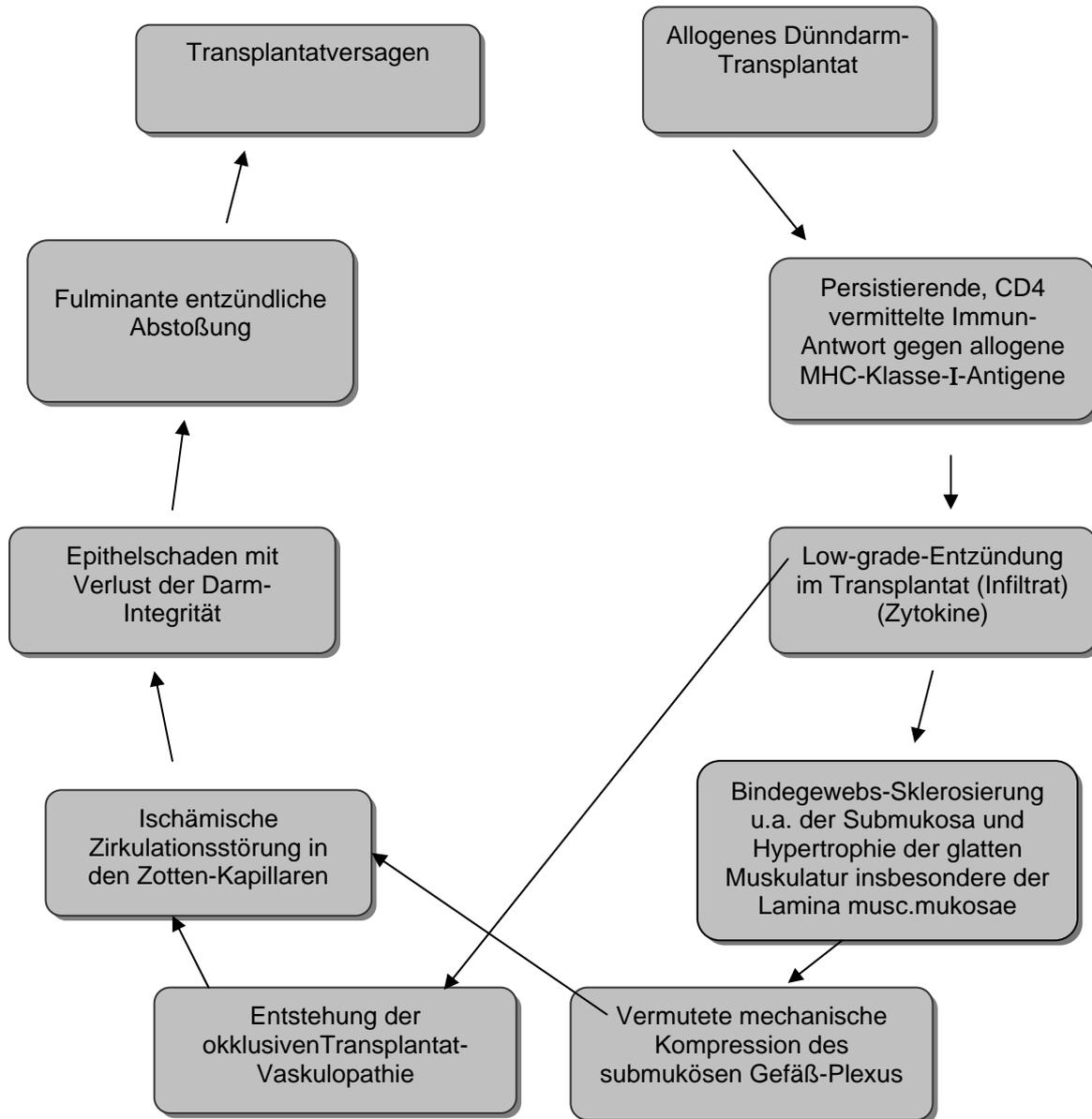
Diese beiden histopathologischen Vorgänge, Transplantat-Vaskulopathie und die durch Hypertrophie wahrscheinlich verursachte Gefäßkompression, führten zu einem zunehmenden Ischämie-Schaden. Dies könnte auch erklären, dass die Tiere in der chronischen Abstoßung am Tag 60 in ihrem Gewicht stagnierten und ab Tag 70 ein kontinuierlicher Gewichtsverlust festzustellen war. Als Ursache hierfür dürfte möglicherweise eine zunächst relative, und dann absolute Ischämie bei der Nahrungsresorption in Frage kommen. Während die Durchblutung des Transplantates im Normalzustand nur einen geringen Blutfluß erfordert, wird sie bei der Nahrungsresorption maximal beansprucht. Aufgrund der zunehmenden Ischämie ist eine Steigerung des Blutflusses während der chronischen Abstoßung nicht möglich. Dies führte möglicherweise zu intestinalen Schmerzen, die das Tier von der weiteren Nahrungsaufnahme abhielten. Ein ähnliches Bild findet sich klinisch z.B. bei der ischämischen Kolitis.

Für den Gewichtsverlust könnte auch die mit dem Epithelschaden (Abb. 4.5) einhergehende Reduktion der Resorptionskapazität verantwortlich gemacht werden. Jedoch war am Tag 60, dem Beginn des Gewichtsverlustes, das histologische Bild des Epithels noch zufriedenstellend. Die zunehmende Ischämie in den Dünndarmzotten führte zu einer Schädigung des Epithels. Selbst in der SYN-Gruppe war am Tag 100 die Zottenhöhe im Vergleich zu den nicht transplantierten Kontrollen leicht reduziert (Abb. 4.8). Dies lässt vermuten, dass auch immunologisch unabhängige Faktoren, wie z.B. die Denervierung und eine geringe postoperative Vernarbung dafür verantwortlich sind.

Durch den Epithelschaden kommt es zu einer erheblichen Reduktion der Resorptionsfläche. Diese wird erhöht durch die Falten (x3), durch die Zotten (x10) und durch die Mikrovilli (x30). Gerade letztere, die als Bürstensaum entscheidenden Anteil an der Resorption haben, werden als erste in das Lumen abgeschilfert und reduzieren damit die Aufnahme für Nährstoffe in erheblichem Umfang (Abb. 4.6A/C). Teitelbaum konnte auch den damit verbundenen Verlust der Integrität des Epithels elektronenmikroskopisch demonstrieren. Hierdurch nimmt die Permeabilität für Moleküle deutlich zu und führt zu einem Einstrom von Antigenen, Bakterien und Nahrungsbestandteilen (Teitelbaum 1996).

Die drei Mechanismen: (1) Transplantat-Vaskulopathie, (2) Hypertrophie und Sklerose sowie (3) der Epithelschaden führten zum Verlust der Transplantat-Funktion. Als immunologische Ursache wird die durch die allogenen MHC-Moleküle verursachte Immunaktivierung gesehen. Dies führte zu einer "low-grade"-Entzündung. Die hierbei frei gesetzten Zytokine IL-4 und IL-6 sowie das IFN- $\gamma$  induzierten eine bisher im Detail noch nicht vollständig erklärbare Muskelzellproliferation und diese wiederum mündete in der Hypertrophie u.a. der Lamina muscularis mukosae sowie in der Sklerosierung der Bindegewebsstrukturen der Submukosa.

Die Abb. 6.3 gibt dazu eine Übersicht über die chronologische Abfolge dieser auch z.T. parallel verlaufenden Prozesse, die dem Transplantat-Versagen vorausgehen.



**Abb. 6.3: Übersicht der zur chronischen Abstoßung führenden Hauptmechanismen nach allogener Dünndarm-Transplantation, die zum Teil in dieser Arbeit untersucht wurden.**

### **6.3 Histomorphologische Zeichen der chronischen Abstoßung in den Transplantat-Langzeitfunktionsgruppen**

In der Langzeitfunktionsgruppe 2 (LF-2), die initial eine verlängerte FK 506-Therapie erhielt (und zwar von Tag 0 bis 9), stieß rund 1/3 der Tiere das Transplantat um den Tag 110 ab (Tab. 4.2), während 2/3 der Tiere bis zum Versuchsende am Tag 250 keine klinischen Zeichen der Abstoßung zeigten. Der Unterschied zwischen diesen Tieren und denen der CA-Gruppe, die um den Tag 110 klinische Zeichen der CA aufwiesen, lag vor allem im Ausmaß der entzündlichen Veränderungen. Während bei den langzeitüberlebenden Tieren der LF-2-Gruppe erst ab Tag 250 ein persistierendes Infiltrat vorlag, zeigten die Tiere der CA-Gruppe dieses Bild bereits ab Tag 60. Ebenso wiesen die Transplantate der LF-2-Gruppe lediglich eine leicht reduzierte Zottenhöhe und nur milde Zeichen der Transplantat-Vaskulopathie auf. Es ist daher anzunehmen, dass bei einer noch längeren Versuchsdauer, z.B. über ein Jahr, auch diese Tiere in die chronische Abstoßung geraten wären. Die Dauer der initialen Immunsuppressionstherapie hatte somit einen entscheidenden Effekt auf die Verzögerung der chronischen Abstoßung.

Dass diese Tiere Zeichen der chronischen Abstoßung zeigten, war umso erstaunlicher, da sie alle Merkmale spenderspezifischer Toleranz aufwiesen. Hierzu erhielten diese Tiere ab Tag 150 (Tab. 4.2) zusätzlich ein heterotopes Herztransplantat entweder vom Spenderstamm Brown Norway (BN) oder von einem Drittstamm (Dark Agouti). Ohne Immunsuppression wurden die BN-Herzen spontan akzeptiert. Dass es sich hierbei um keine Immuninkompetenz der Dünndarmtransplantat-Empfänger handelte, zeigten die Ergebnisse der "Drittstamm-Herzen". Diese wurden regelhaft innerhalb von 7 Tagen akut abgestoßen. Diese Ergebnisse lassen transplantatspezifische Toleranz vermuten, da BN-spezifische Antigene toleriert werden, während Drittstammantigene eine spezifische Immunantwort induzieren (Timmermann et al. 2000).

## 7. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der chronischen Dünndarm-Abstoßung eine permanente Aktivierung des Immunsystems als "low-grade"-Entzündung vorausgeht. Diese antigenspezifische Aktivierung kann derzeit mit keinem Immunsuppressivum wirksam unterbunden werden. In wie weit das neue Immunsuppressivum Sirolimus im klinischen Einsatz die konventionelle Therapie der Dünndarm-Transplantation erweitern oder ersetzen könnte, bleibt abzuwarten (Florman 2002, Allers 2002).

Es bedarf ebenfalls neuer Immunsuppressiva, die nicht nur die Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten inhibieren, sondern die auch die fatalen Folgen der chronischen Abstoßung, insbesondere der Muskel-Hypertrophie und Transplantat-Vaskulopathie, verhindern (Hayry 2002).

Vorstellbar ist auch, sollte es gelingen, das spezifische Zytokin-Muster der chronischen Abstoßung zu identifizieren, die Immunantwort gegebenenfalls selektiv mit monoklonalen Antikörpern gegen diese Zytokine zu inhibieren.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, war es prinzipiell möglich, mit einer FK 506 Therapie eine Organlangzeitfunktion nach experimenteller Dünndarm-Transplantation zu induzieren. Inwieweit es sich hierbei um "echte" spender-spezifische Toleranz handelt, wird gegenwärtig weiter untersucht. Dafür spricht, dass die langzeitüberlebenden Tiere alle Merkmale spenderspezifischer Toleranz erfüllten. Dagegen spricht das ein persistierendes Infiltrat im Transplantat, das, nach den Daten der CA-Gruppe, mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer chronischen Abstoßung auch bei diesen langzeitüberlebenden Tieren geführt hätte. Dieser interessanten Beobachtung wird in weiterführenden Arbeiten nachgegangen.

## 8. Zusammenfassung

Die Monate bzw. Jahre nach Transplantation vaskularisierter Organe auftretende chronische Abstoßung ist ein Haupthindernis für eine erfolgreiche Transplantat-Langzeitfunktion. Insbesondere das sehr immunogene Dünndarm-Transplantat unterliegt der chronischen Abstoßung. Das Ziel dieser Arbeit war, sowohl die histopathologischen Zeichen der chronischen Abstoßung des Dünndarm-Transplantats zu klassifizieren, als auch die hierzu führenden immunologischen Vorgänge zu klären.

Die histologischen und durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden an einem Experimentalmodell zur orthotopen Dünndarm-Transplantation durchgeführt. Dabei war der Rattenstamm Brown Norway der Transplantat-Spender und der Rattenstamm Lewis der Transplantat-Empfänger. Mit Hilfe des Immunsuppressivums FK 506, das die akute Abstoßung verhindert, war es möglich, die zeitliche Abfolge der immunologischen und hieraus resultierenden histomorphologischen Ereignisse der chronischen Abstoßung zu analysieren. Mit unterschiedlichen FK 506-Dosierungen ließ sich auch der Zeitpunkt der chronischen Abstoßung variieren. Wurde FK 506 täglich in einer Dosierung von 2 mg/kg bis Tag 5 verabreicht, war das Vollbild der chronischen Abstoßung um den Tag 100 nach Transplantation zu beobachten. Dieses war charakterisiert durch folgende vier histomorphologische Merkmale: (1) Massives transmurales Infiltrat, (2) deutliche Reduktion der Zottenhöhe und Verlust der Epithel-Integrität, (3) Hypertrophie der Muskulatur und Sklerosierung des Bindegewebes sowie (4) die okklusive Transplantat-Vaskulopathie.

Die chronische Abstoßung entwickelte sich mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einem milden lymphozytären Infiltrat im Bereich der Lamina propria und Submukosa, das sich innerhalb von 14 Tagen nach Transplantation manifestierte. Die Ursache für dieses Infiltrat wird in der antigenspezifischen Immunaktivierung durch die hochpolymorphen MHC-Moleküle gesehen, die von den Transplantatzellen exprimiert werden. Monoklonalen Antikörper, der

spezifisch für die allophenen MHC-Klasse-I-Moleküle des Transplantat-Spenders ist, zeigten, dass diese Gewebe auch am Tag 100 weiterhin allophen MHC-Moleküle exprimierten, während die mit dem Transplantat übertragenen "passenger leukocytes", auf deren Zelloberfläche ebenfalls allophen MHC-Moleküle zu finden sind, bereits wenige Wochen nach Transplantation nicht mehr zu detektieren waren. Folgendes immunpathologisches Modell zur chronischen Abstoßung ergibt sich aus den eigenen Daten: Antigenpräsentierende Zellen prozessieren aus den allophenen MHC-Molekülen antigene Peptide, die alloreaktive T-Lymphozyten aktivieren. Diese aktivieren ihrerseits über verschiedene Zytokine die an der Transplantatzerstörung beteiligten Effektorzellen, wie zytotoxische T-Lymphozyten oder Makrophagen. Insbesondere in der Phase, in der sich die chronische Abstoßung manifestierte, wurde ein drastischer Anstieg dieser Zellen in den mesenterialen Transplantat-Lymphknoten beobachtet.

Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass ein effektiver und langfristiger Erhalt der Dünndarm-Transplantat-Funktion nur durch eine effektive Verhinderung der lymphozytären Infiltration zu erreichen sein wird. Hierzu ist vor allem die Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten, die wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der Induktion der chronischen Abstoßung spielen, zu hemmen. Zusätzlich wird es notwendig sein, die pathologischen Folgen der chronischen Abstoßung, insbesondere die beobachtete Hypertrophie und Transplantat-Vaskulopathie, durch geeignete Medikamente zu verhindern. Die Kombination dieser beiden Therapie-Schemata könnte nach jetzigem Erkenntnisstand die chronische Transplantat-Abstoßung erfolgreich verzögern oder gar verhindern.

## 9. Literatur

- Blennerhassett MG, Vignjeviv P, Vermillion DL, Collins SM (1992) Inflammation and hyperplasia and hypertrophy in smooth muscle of rat small intestine. Am Physiol Soc 6: 1041-1046
- Braun F, Lorf T, Ringe B (1998) Update of current immunosuppressive drugs used in clinical organ transplantation. Transplant Int 11: 77-81
- Collins MH, Yang R, Liu Q, Cnaan A, Pescovitz MD, Grosfeld JL (1997) Histology of Rat small bowel Transplants: Cyclosporine A Ameliorates Features of Rejection Including Apoptosis and Ganglio Cell reduktion. J Ped Surg 32: 555-559
- De Bruin RWF, Stein-Oakley AN, Kouwenhoven E, Maguire JA, Jablonski P, Jin XJ, Dowling J, Thomson NM (2000) Functional, histological and inflammatory changes in chronically rejected small bowel transplants. Transplant Int 13: 1-11
- Deltz E, Thiede A (1985) Microsurgical technique for small intestine transplantation. Microsurgical models in rat for transplantation research. Springer Verlag, 51-55
- Fändrich F, Schröder J, Exner B, Papachrysanthou A, Peters J, Chamers W, Zavazava N (1996) Correlation between graft-versus-host induced immunosuppression and host natural killer cell aktivty in small bowel transplantation. World J Surg 20: 1041-1051
- Fishbein TM, Florman S, Gondolesi G, Schiano G, leLeiko N, Tschernia A, Kaufman S (2002) Intestinal transplantation before and after the introduction of sirolimus. Transplantation 73: 1538-1542
- Florman S, Gondolesi G, Schiano T, Tschernia A, LeLeiko N, Kaufman SS, Fishbein T (2002) Improved results in small bowel transplantation using Sirolimus. Transplant Proc 34: 936-941
- Grant D, Intestinal Transplantation (1999) Report of the International Registry. Transplantation 67: 1061-1064
- Gould S, Auchincloss H (1999) Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. Immunol Today 31: 233-237

- Goulet O (1998) Intestinal failure in children. *Transplant Proc* 30: 2523-2525
- Heeckt PF, Halfter WM, Schraut WH, Lee KKW, Bauer AJ (1993) Small bowel transplantation and chronic rejection alter rat intestinal smooth muscle structure and function. *Surgery* 114: 449-453
- Hayry P, du Toit D, Sarwal M, Aavik E, Hoffren A, Vamvakopoulos J (2002) Rational drug design: Making drugs that make a difference. *Transplant Proc* 34: 2000
- Jan D, Michel JL, Goulet O, Sarnacki S, Lacaille F, Damotte D, Cezard JP, Aigran Y, Brousse N, Peuchmaur M, Rengeval A, Colomb V, Jouvét P, Ricour C, Revillon Y (1999) Up-to-date evolution of small bowel transplantation in children with intestinal failure. *J Ped Surg* 34: 841-844
- Khan I, Collins SM (1994) Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of the rat. *Gastroenterology* 107: 691-693
- Kocoshis SA, Reyes J, Todo S, Strahl TE (1997) Small bowel transplantation for irreversible intestinal failure in children. *Dig Dis Sci* 42: 1997-2008
- Kouwenhoven WA, Stein-Oakley AN, Maguire JA, Jablonski P, de Bruin RWF, Thomson NM (1999) Increased expression of basic fibroblast growth factor during chronic rejection in intestinal transplants is associated with macrophage infiltrates. *Transplant Int* 12: 42-49
- Langrehr JM, Demetris AJ, Banner B, Müller AR, Thalmann U, Lee TK, Lee KKW, Schraut W (1994) Mucosal recipient-type mononuclear repopulation and low-grade chronic rejection occur simultaneously in indefinitely surviving recipients of small bowel allografts. *Transplantation* 7: 71-78
- Heeckt PF, Lee KK, Halfter WM, Schraut WH, Bauer AJ (1995) Functional impairment of enteric smooth muscle and nerves caused by chronic intestinal allograft rejection regresses after FK 506 rescue. *Transplantation* 59: 159-164
- Libby P, Tanaka H (1994) The pathogenesis of coronary atherosclerosis ("chronic rejection") in transplanted hearts. *Clin. Transplant* 3: 313-318

- Okamoto M, Arakawa K, Akioka K, Fujiwara I, Takeshita K, Oka T (1996) Role of natural killer cells on lethal graft-versus host disease following small bowel transplantation in the rat. *Transplant Proc* 28: 2467-2469
- Oluwole SF, Chowdhury NC, Jin MX, Hard MA (1993) Induction of transplantation tolerance to rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of allogenic soluble peptides. *Transplantation* 56: 1523-1527
- Orloff SL, Yin Q, Corless L, Loomis CB, Rabkin JM, Wagner CR (1999) A rat small bowel transplant model of chronic rejection histopathologic characteristics. *Transplantation* 68: 766-779
- Orloff MS, Fallon AM, DeMara E, Coppage ML, Leong N, Gerilli J (1994) Induction of specific tolerance to small bowel allografts. *Surgery* 116: 222-228
- Paul LC, Fellström B (1992) Chronic vascular rejection of the heart and the kidney- have rational options emerged ? *Transplantation* 53: 1169-1172
- Pollard S (1997) Small bowel and pancreas transplantation. *Transplant Proc* 29: 2721-2722
- Pritchard TJ, Kirkman RL (1985) Small bowel transplantation. *World J Surg* 9: 860-867
- Reyes J, Mazeriegos V, Bond GMD, Green M, Dvorchik I, Kosmach-Park B, Abu-Elmagd K (2002) Pediatric intestinal transplantation: Historical notes, principles and controversies. *Pediatric Transplant* 6: 193-207
- Reyes J, Abu-Elmagd K, Tzakis AG, Nour B, Casavilla A, Kusne S, Green M, Alessani M, Jain M, Fung A, Strahl TE (1992) Infectious complications after human small bowel transplantation. *Transplant Proc* 24: 249-250
- Rogers NJ, Lechler RI (2001) Allorecognition. *Am J Transplant* 1: 97-102
- Russell PS, Chase CM, Sykes M, Ito H, Shaffer J, Colvin RB (2001) Tolerance, mixed chimerism, and chronic transplant arteriopathy. *J Immunol* 167: 5731-5740
- Sayegh MH (1999) Why do we reject a graft ? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int* 56: 1967-1979
- Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB (1994) Mechanism of the T cell recognition of alloantigen. *Transplantation* 57: 1295-1302

- Shirwan H (1999) Chronic allograft rejection (overview). *Transplantation* 68: 715-726
- Shirwan H, Leamer M, Makowka L, Cramer DV (1995) Peptides derived from  $\alpha$ -helices of allogenic class-I major histocompatibility complex antigens are potent inducers of CD4+ and CD8+ and B cell responses after cardiac allografts rejection. *Transplantation* 59: 401-404
- Sigalet DL, Williams DC, Garola R, Thorne P, Matin G (2000) Impact of FK 506 and steroids an adaption after intestinal resection or segmental transplantation. *Ped Transplantation* 4: 12-20
- Sonnino RE, Riddle JM, Pritchard TJ (1992) Grading system for histologic changes in rat small bowel transplants. *Transplant Proc* 24: 1201-1202.
- Su G, Walgenbach KJ, Heekt PH, Wang Q, Halfter W, Whiteside TL, Bauer AJ (1996) Increased expression of interferon- $\gamma$  in rat model of chronic intestinal allograft rejection. *Transplantation* 62: 242-248
- Sugitani A, Bauer AJ, Reynolds JC, Halfter WM, Nomoto M, Strahl TE, TodeS (1997) The effect of small bowel transplantation on the morphology and physiology of intestinal muscle. *Transplantation* 63: 186-194
- Sugitani A, Reynolds JC, Todo S (1994) Immunohistochemical study of enteric nervous system after small bowel transplantation in humans. *Dig Dis Sci* 39: 2448-2456
- Sugitani A, Reynolds JC, Tsuboi M, Todo S (1998) Extrinsic intestinal reinnervation after canine small bowel autotransplantation. *Surgery* 6: 25-35
- Sykes M (1996) Immunobiology of transplantation. *The FASEB Journal* 10: 721-730
- Teitelbaum DH, Sonnino RE, Harmel RP jr (1996) Loss of intestinal integrity following small bowel transplant rejection in the rat. *Transplant Proc* 28: 2547-2548
- Timmermann W, Otto C, Gasser M, Meyer D, Parthum E, Schad J, Koch M, Gassel H-J, Ulrichs K, Thiede U (2000) Long-term small bowel allograft function induced by short-term FK 506 application is associated with split tolerance. *Transplant. Int* 13: 532-536

- Thorsby E (1997) Transplantation immunology: A brief update. *Transplant Proc* 29: 3129-3134
- Toogood GJ, Rankin AM, Tam PKH, Morris PJ, Dallman MJ (1996) The immune response following small bowel transplantation – an unusual pattern of cytokine expression. *Transplantation* 62: 851-855
- Waaga AM, Chandraker A, Spadafora-Ferreira M, Iyengar AR, Khoury SJ, Carpentier CB, Sayegh MH (1998) Mechanism of indirect allorecognition. *Transplantation* 65: 876-883
- Walgenbach KF, Heeckt PF, Stanson JD, Whiteside TL, Bauer AJ (1996) Increased presence of mast cells and interleukin-4 during chronic rejection of rat intestinal allografts. *Transplant Proc* 28: 2454
- Womer KL, Lee RS, Madsen JC, Sayegh MH (2001) Tolerance and chronic rejection. *The Royal Soc* 7: 727-738

## **Bildnachweis**

Abbildung 6.1: Aus Fenoglio-Preiser CM, Pathology 2<sup>nd</sup> Edition S. 284

Abbildung 6.2: Detailausschnitt aus Junqueira LC, Carneiro J Histologie, 3. Auflage S. 506 Abb. 20.37

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. A. Thiede, dem Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Transplantations-Immunologie.

Herrn Prof. Dr. med. W. Timmermann, Oberarzt der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, danke ich für die Überlassung des Themas und für das rege Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Experimentellen Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg, möchte ich mich sehr für die Unterstützung bedanken, mir die transplantationsimmunologische Problematik dieses Themas vor Augen zu führen sowie für die wertvollen Hinweise bei der Fertigstellung dieser Arbeit,

Herrn Dr. rer. nat. C. Otto aus der Arbeitsgruppe für Experimentelle Transplantations-Immunologie danke ich besonders für seine stete Diskussionsbereitschaft, für die wertvollen Anregungen zu weiterführenden Experimenten sowie für die sorgfältige Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Sehr herzlich danken möchte ich Frau A. Gebert und Frau N. Martens für ihre freundliche und engagierte Unterstützung im tierexperimentellen Labor sowie für ihre Hilfe beim Erlernen der Durchflußzytometrie.

Ebenso geht mein Dank an Frau Dr. med. M. Koch für die intensive Zusammenarbeit in der experimentellen Phase im Versuchslabor.

## Lebenslauf

### Name und Anschrift

Johannes Samuel Schad  
Gänsheidestr. 62  
70186 Stuttgart  
jsschad@web.de

### Schulbildung:

1979-1992	Freie Waldorfschule Uhlandshöhe Stuttgart
1989-1990	Pioneer High School Ann Arbor Michigan USA
1990	136. Moskauer Gesamtschule
1992	Abitur

### Berufsausbildung:

1993-1995	Vorklinik an der Universität Leipzig. Physikum.
1996	1. Staatsexamen an der Universität Würzburg
1999	2. Staatsexamen an der Universität Würzburg
2000	3. Staatsexamen am akad. Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen (Diakonissen-KH Stuttgart)

### Praktisches Jahr:

10/99–2/00	Orthopädische Universitäts-Klinik König-Ludwig-Haus Bezirk Unterfranken Würzburg
2/00-6/00	Diakonissenkrankenhaus Stuttgart Medizinische Klinik I
6/00-10/00	Diakonissenkrankenhaus Stuttgart Chirurgische Klinik

### AIP :

12/00-5/02	Diakonissenkrankenhaus Stuttgart Chirurgische Klinik
------------	---

### Approbation:

Juli 2002

### Assistenzarzt Chirurgie ab 9/02

Krankenhaus Freilassing Chirurgische Klinik