

Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. M. Rothmund

**Mikroenkapsulierung - Funktion eines Prinzips durch Schutz vor dem
aktivierten Immunsystem bei der Allotransplantation der Parathyreoidea ?**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich für Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Isabel Stelter, geb. Heil
aus Fulda

Marburg, 2005

Angenommen am Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am: 16.06.2005
gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch
Referent: Priv.- Doz. Dr. med. C. Hasse
Coreferent: Prof. Dr. med. Neubauer
2. Coreferent: Prof. Dr. med. Gemsa

Widmung

Meinen Eltern, Doris und Karlo Heil,
die mir das Medizinstudium überhaupt ermöglicht haben.

Meiner Großmutter Sophia Vogel,
der ich erhebliche Teile meiner Erziehung zu verdanken habe.

Meiner Schwiegergroßmutter Dr.med. Erika Lambertz †,
die mir durch Ihren Geist und Humor ein Vorbild für meine
medizinische Karriere und mein Leben ist.

Meinem Mann Klaus,
der mich besonders in schwierigen Zeiten ermutigt hat die Arbeit zu
Ende zu führen.

Inhaltsverzeichnis

1. Zielstellung	2
2. Einleitung	4
2.1. Die Nebenschilddrüseninsuffizienz als Modell endokriner Mangelzustände	4
2.2. Hypoparathyreoidismus	5
2.3. Kausale Therapie: Nebenschilddrüsentransplantation.....	6
2.4. Immunologische Aspekte.....	7
2.5. Immunisolation als Weg zum Erfolg.....	8
3. Material und Methoden.....	10
3.1. Versuchsablauf.....	10
3.2. Studiengruppen	11
3.3.. Versuchstiere und Tierhaltung	18
3.4. Alginat.....	19
3.5. Mikroenkapsulierung	19
3.6. Gewebekulturpassage.....	22
3.7. Narkose	23
3.8. Parathyreoidektomie	23
3.9. Transplantation von Nebenschilddrüsen	25
3.10. Hauttransplantation	26
3.11. Blutentnahmen und Kalziumbestimmung	27
3.12. Mikrolymphozytotoxizitätstest.....	28
3.13. Statistik.....	30
4. Ergebnisse	32
4.1. Operative Eingriffe.....	32
4.1.1. Narkose	32
4.1.2. Parathyreoidektomie und Mortalität.....	32
4.1.3. Hauttransplantation	33
4.4. Messergebnisse	34
4.4.1. Studiengruppe I und II: Vorsensibilisierung durch Hauttransplantation	34
4.4.2. Studiengruppe III: Schutz vor dem sensibilisierten Immunsystem ?	35
4.4.3 Studiengruppe IV : Kontrollgruppe zu Gruppe III	37
5. Diskussion.....	40
6. Zusammenfassung.....	53
6. Literaturverzeichnis	55
7. Curriculum Vitae.....	65
8. Akademische Lehrer	66
9. Danksagung.....	67
10. Eidesstattliche Erklärung	68

1. Zielstellung

Die medikamentöse Therapie des permanenten, symptomatischen Hypoparathyreoidismus ist aufgrund der vielfältigen Stoffwechselfunktionen des Parathormons von allen endokrinen Unterfunktionsstörungen eine der schwierigsten, oft unvollständig und damit unbefriedigend. Deshalb gilt der Bedarf nach einer kausalen Therapie dieses Mangelsyndroms in Form einer Allotransplantation der Parathyreoidea als unbestritten. Da dieses Krankheitsbild die Patienten jedoch selten vital bedroht, ist eine systemische Immunsuppression post transplantationem nicht gerechtfertigt. Ohne Immunsuppression war eine Transplantation der Parathyreoidea bislang jedoch erfolglos.

Seit Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts beschäftigt sich die Chirurgische Klinik der Universität Marburg mit der Transplantation endokrinen Gewebes. Im Anschluss an die Optimierung der Gewebekulturpassage hat die Arbeitsgruppe eine Methode aus den Studien der Inselzelltransplantation aufgegriffen, weiterentwickelt und für die Parathyreoidea modifiziert – die Mikroenkapsulierung. Hierbei wird das zu transplantierende Gewebe mit einer semipermeablen Membran, bestehend aus dem Naturstoff Alginat, umhüllt. Die Alginathülle soll das Transplantat vor dem Empfängerimmunsystem isolieren (Geisen et al., 1990; Clayton et al., 1993). 1994 gelangen damit in Marburg die ersten erfolgreichen isogenen, allogenen und sogar xenogenen Nebenschilddrüsentransplantationen über 26 Wochen im Tierversuch ohne Immunsuppression weltweit (Hasse et al. 1991; Hasse et al., 1994a; Hasse et al., 1994b). Bei der ersten klinischen Anwendung konnte temporär eine normokalzämische Stoffwechsellage erhalten werden bei vorher jahrelangem, symptomatischem, therapieresistenten, postoperativen Hypoparathyreoidismus. Nach über 12 Wochen kam es jedoch zu einem langsamen, stetigen Abfall der Transplantatfunktion bis zum totalen Transplantatausfall (Hasse et al., 1998).

Die grundlegenden immunologischen Funktionen der Immunisolation durch die Mikrokapseln sind ungeklärt. Zwei verschiedene Wege der Funktion sind denkbar:

- die Mikroenkapsulierung schützt das Transplantat vor der Immunantwort
- die Mikroenkapsulierung verhindert eine Sensibilisierung des Empfängers

In parallel laufenden Versuchen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Mikrokapseln eine Sensibilisierung des Empfängers verzögern können, jedoch nicht dauerhaft verhindern.

Somit war es Ziel dieser Arbeit, die prinzipielle Frage zu beantworten, ob die Mikrokapseln das Transplantat vor dem aktivierten Immunsystem in vivo schützen können.

Für den geplanten, erneuten Einsatz des Verfahrens am Patienten mit dem Ziel einer Langzeitfunktion ist das Wissen, inwieweit eine immunologische Schutzfunktion der Alginathülle im Tierversuch besteht, unabdingbar. Somit bildete diese Studie eine der Voraussetzungen für weitere klinische Allotransplantationen der Parathyreoidea ohne Immunsuppression.

2. Einleitung

2.1. Die Nebenschilddrüseninsuffizienz als Modell endokriner Mangelzustände

Der Hypoparathyreoidismus eignet sich als Modell endokriner Mangelzustände besonders gut. Er entsteht durch eine Fehlfunktion der Nebenschilddrüsen, die durch Sezernierung des Parathormones den Kalziumspiegel im Blut regeln. Der Mensch besitzt vier Nebenschilddrüsen, die aus der dritten und vierten Schlundtasche entstehen (Norris, 1937). Die Nebenschilddrüsen sezernieren das Parathormon (PTH) direkt in die Blutbahn. Erst 1978 wurde die 84 Aminosäuren lange Sequenz des Peptidhormons entschlüsselt (Keutmann et al., 1978). Das intakte Parathormon hat nur eine Halbwertszeit von 10 Minuten. In der Leber und der Niere wird es enzymatisch gespalten, so dass neben dem intakten Parathormon auch Carboxyl-C-terminale Fragmente und Amino-N-terminale Fragmente im Serum zu finden sind (Habener, 1979). Für die Hormonwirkung sind das intakte Parathormon, sowie die Amino-N-terminalen Fragmente verantwortlich (Reiss, 1969). Parathormon wirkt synergistisch mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Vitamin D3) und antagonistisch zu Calcitonin an den Endorganen Darm, Niere und Knochen (Martin et al., 1979). Die Konzentration des extrazellulären ionisierten Kalziums wird in einem sehr engen Bereich von Parathormon und Vitamin D3 eingestellt (Rothmund und Wagner, 1987). Das Parathormon wird bei Hypokalzämie sezerniert und bewirkt eine vermehrte Kalziumrückresorption in der Niere, eine erhöhte Kalziumaufnahme im Darm und einen Kalziumabbau aus dem Knochen in die Blutbahn. Gleichzeitig verringert das Parathormon im Serum Phosphat und Hydroxyprolin (Löffler und Petrides, 1997). Der Kalziumspiegel im Blutserum sollte zwischen 2,1-2,6 mmol/l betragen. Der Hypoparathyreoidismus ist der einzige endokrine Mangelzustand, bei dem der Totalausfall des endokrinen Organs nicht direkt lebensbedrohlich wirkt. Deshalb können unsere Versuchstiere auch nach einer totalen Parathyreoidektomie noch einige Wochen überleben.

2.2. Hypoparathyreoidismus

Charakteristisch für den chronischen Hypoparathyreoidismus ist die aus der Hypokalzämie resultierende, gesteigerte neuromuskuläre Erregbarkeit (Kaplan und Sadock, 1991). Sie führt, bei zumeist vollständig erhaltenem Bewusstsein, zu Krampfanfällen der Muskulatur. Diese treten entweder als generalisierte, klonisch-tonische Anfälle (Konvulsionen) oder isolierte Spasmen auf (Kruse und Kuhlencordt, 1994). Ein chronischer Mangel an Parathormon führt trotz adäquater Substitutionstherapie zu einer Inaktivierung des Knochenstoffwechsels und damit zur Osteoporose und Knochenschmerzen (Wagner et al., 1991). Organische Spätfolgen eines schlecht eingestellten Hypoparathyreoidismus können Hauterkrankungen, Katarakt („Tetaniestarr“), Basalganglienverkalkung und Kardiomyopathie sein (Weise et al., 1989).

Der Hypoparathyreoidismus entsteht meist postoperativ, nach subtotaler Schilddrüsenresektion (Demeester-Mirkin et al., 1992; Harris, 1992) oder Thyreoidektomie (Wax und Briant, 1992). Allein in Deutschland kommt es so zu circa 1.000 Neuerkrankungen pro Jahr, wenn man eine Inzidenz von 1% für subtotale Schilddrüsenresektionen und 10% für Thyreoidektomien (Ziegler, 1976; Gann und Paone, 1979) zugrunde legt (Angaben des Statistischen Bundesamtes Wiesbaden, 1998).

Angesichts der kurzen Halbwertszeit und der Nebenwirkungen der verfügbaren Präparate ist bis heute eine direkte Substitution mit Parathormon zur Therapie des permanenten, symptomatischen Hypoparathyreoidismus langfristig klinisch noch nicht möglich. Neue, gentechnisch hergestellte Parathormone deuten in ersten klinischen Erfahrungsberichten an, dass eine Substitutionstherapie in naher Zukunft möglich sein könnte (Winer et al., 1996). Die symptomatische Standardtherapie besteht momentan in einer lebenslangen Substitution mit Kalzium und Vitamin D3 (Ziegler, 1987). Durch die geringe therapeutische Breite resultieren dabei allerdings häufig Vitamin-D-Intoxikationen mit oft lebensbedrohlichen hyperkalzämischen Krisen. Übersteigt das Löslichkeitsprodukt von Kalzium und Phosphat 60 bis 75mg/dl kommt es zu diffusem Ausfällen von Kristallen in kleinen Arterien, den Augen, Gelenken, subkutan und intestinal (Parfitt, 1969). Engmaschige Kontrollen des Serums und Urins sind deshalb obligatorisch (Ziegler et al., 1975). Überdies ist die Substitutionstherapie mit Kalzium und Vitamin D allenfalls in der Lage, die Störungen des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels auszugleichen. Die vielfältigen

anderen Stoffwechselfunktionen des fehlenden Parathormons bleiben bei dieser Therapie dauerhaft unbehandelt. Deshalb besteht kein Zweifel an der Notwendigkeit einer kausalen Therapie.

2.3. Kausale Therapie: Nebenschilddrüsentransplantation

Bisher ist eine Allotransplantation der Nebenschilddrüse nur unter systemischer Immunsuppression gelungen (Blumenthal und Walsh, 1950; Wells et al., 1977; Wagner et al., 1991). Deshalb kann die Indikation zur allogenen Nebenschilddrüsentransplantation momentan nur bei kombinierten Immundefekten, wie dem DiGeorgi-Syndrom und der kongenitalen Thymus- und Nebenschilddrüsenaplasie gestellt werden (Wells et al., 1975).

Der Hypoparathyreoidismus gefährdet die Patienten nur selten vital und die Nebenwirkungen einer immunsuppressiven Therapie überwiegen die unbestrittenen Vorteile eines funktionellen Organersatzes. Somit scheiterten alle bisherigen Versuche der allogenen oder gar xenogenen Transplantation von Nebenschilddrüsen an der immunologischen Abstoßung und es wurde weltweit nach Alternativen gesucht. Dabei wurde stets versucht die Transplantatfunktion durch zwei Wege zu realisieren: Privilegierter Transplantationsort und Immunmodulation.

Durch die Wahl geeigneter Transplantationsorte, z.B. dem Hoden und Großhirnkortex der Nierenkapsel oder dem Peritoneum wurde versucht, das Transplantat vor der Immunantwort zu schützen (Tze und Tai, 1988; London et al., 1991; Siebers et al., 1993; Rayat et al., 1997). Dauerhaft konnte bisher jedoch ohne Immunsuppression ein Erkennen und Abstoßen des Transplantates nicht verhindert werden.

1975 entdeckten Lafferty und Sollinger, dass durch das Verfahren der Gewebekulturpassage eine deutlich längere Transplantatüberlebenszeit möglich ist (Lafferty et al., 1975; Sollinger et al., 1977). Durch Maßnahmen wie Gewebekulturpassage, Bestrahlung, Sauerstoffüberdruck Kultivierung, Ultraviolettbestrahlung oder Nacktmauspassage, werden die „Passenger Leukozyten“ aus dem Transplantat eliminiert, die für eine Antigenpräsentation primär verantwortlich gemacht werden (Gough und Finnimore, 1980; Lafferty et al., 1983). Im Labor der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Marburg erzielte

man durch Bestrahlung, Nacktmauspassage und Gewebekulturpassage für Allotransplantate der Nebenschilddrüse ohne Immunsuppression vielversprechende Ergebnisse (Wagner und Rothmund, 1988; Hasse et al., 1991; Hasse et al., 1994b). Hauptproblem bei diesen Maßnahmen war die Nekrose des Gewebes, die proportional zur Verringerung der Immunogenität ansteigt. So musste für die erste klinische Anwendung ein Kompromiss zwischen Vitalität und Immunogenität des Transplantatgewebes gefunden werden (Raaf et al., 1974; Hasse et al., 1999).

2.4. Immunologische Aspekte

1980 erhielt G.D. Snell den Nobelpreis, weil er mit R.A. Gorer in den dreißiger Jahren zuerst die Ursache für die Abstoßung allogener Transplantate entdeckte: Der Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (Major Histocompatibility Complex: MHC), eine hoch polymorphe Gensequenz im kurzen Arm des Chromosom Nr. 6. Der MHC wird nach seinen Genprodukten in drei große Gruppen unterteilt (Snell, 1992):

- **MHC Klasse I Gene** kodieren Glycoproteine, die auf fast allen Zelloberflächen zu finden sind. Sie präsentieren kurze, zelltypische Peptidketten. Da diese Glycoproteine von Leukozyten abgelesen werden können, bezeichnet man sie als Human Leucocyte Antigen: HLA. Die MHC Klasse I Gene kodieren 3 Gruppen von HLAs: HLA-A, HLA-B und HLA-C (Bjorkman und Burmeister, 1994).
- **MHC Klasse II Gene** kodieren Glycoproteine, die hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen vorkommen. Sie präsentieren dort verarbeitete Antigene für T-Zellen. Auch hier wird das Genprodukt in drei Gruppen eingeteilt: HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR (Rotzschke und Falk, 1994).
- **MHC Klasse III Gene** kodieren einige Serumproteine, die große Anteile an der Immunantwort haben, wie Komplement System Proteine und Tumor Nekrose Faktor α und β (Kuby 1996).

Für die Transplantatabstoßung werden vor allem die Oberflächenantigene des MHC Klasse I und II Komplexes verantwortlich gemacht. Prinzipiell trägt jedes Gewebe MHC Klasse I Moleküle auf seiner Zelloberfläche und kann so von zuvor aktivierten zytotoxischen-T-Lymphozyten als körperfremd oder körpereigen erkannt

werden. Um solche spezifisch aktivierten T-Lymphozyten zu bilden, müssen zuvor unaktivierte T-Lymphozyten von antigenpräsentierenden Zellen das körperfremde Antigen auf MHC Klasse II Genprodukten präsentiert bekommen. Dies kann durch sogenannte „Passenger Leukozyten“ geschehen. Das sind antigenpräsentierende Lymphozyten des Spenders, die in die Empfängerlymphbahn auswandern und dort spenderspezifische Antigene den Empfängerlymphozyten präsentieren (Lafferty et al., 1983). Dieser Weg wird als direkte Immunstimulation bezeichnet, da die Passenger Leukozyten die spendereigenen Antigene direkt dem Empfängerimmunsystem präsentieren und so nach bereits wenigen Tagen eine Abstoßungsreaktion in Gang setzen (Wonigeit und Pichlmayr, 1997). Bei der indirekten Immunstimulation werden Teile oder Produkte der Spenderzellen von antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers phagozytiert und als verarbeitetes Antigen auf MHC Klasse II Genprodukten der körpereigenen Immunabwehr präsentiert. Aktivierte T-Helferzellen, die so auf das Transplantat abgerichtet sind, können das Transplantat als körperfremd erkennen und setzen, über viele Zytokine gesteuert, die zelluläre Immunantwort in Gang. Der indirekte Weg dauert allerdings mindestens 6 Wochen, bis es zur maximalen Immunantwort kommt.

2.5. Immunisolation als Weg zum Erfolg

1980 wurde erstmals von Lim und Sun mit der Mikroenkapsulierung eine neue Methode gefunden, zu transplantierendes Gewebe vor immunologischer Erkennung oder Abstoßung zu schützen (Lim und Sun, 1980). Dabei wurden kleine Gewebestücke (Durchmesser ca. 0,5mm) mit einer Schicht aus Alginat umhüllt. Alginat ist ein Extrakt aus Seealgen, welches in der Lage ist, biologische Netzwerke mit porenähnlichen Zwischenräumen zu bilden. Diese Alginatkapsel sollte so eine selektive Diffusionsbarriere bilden, welche das Transplantat von dem Empfängerimmunsystem isoliert und gleichzeitig seine Ernährung und Hormonfreisetzung gewährleistet (Darquy und Reach, 1985; Darquy und Sun 1987).

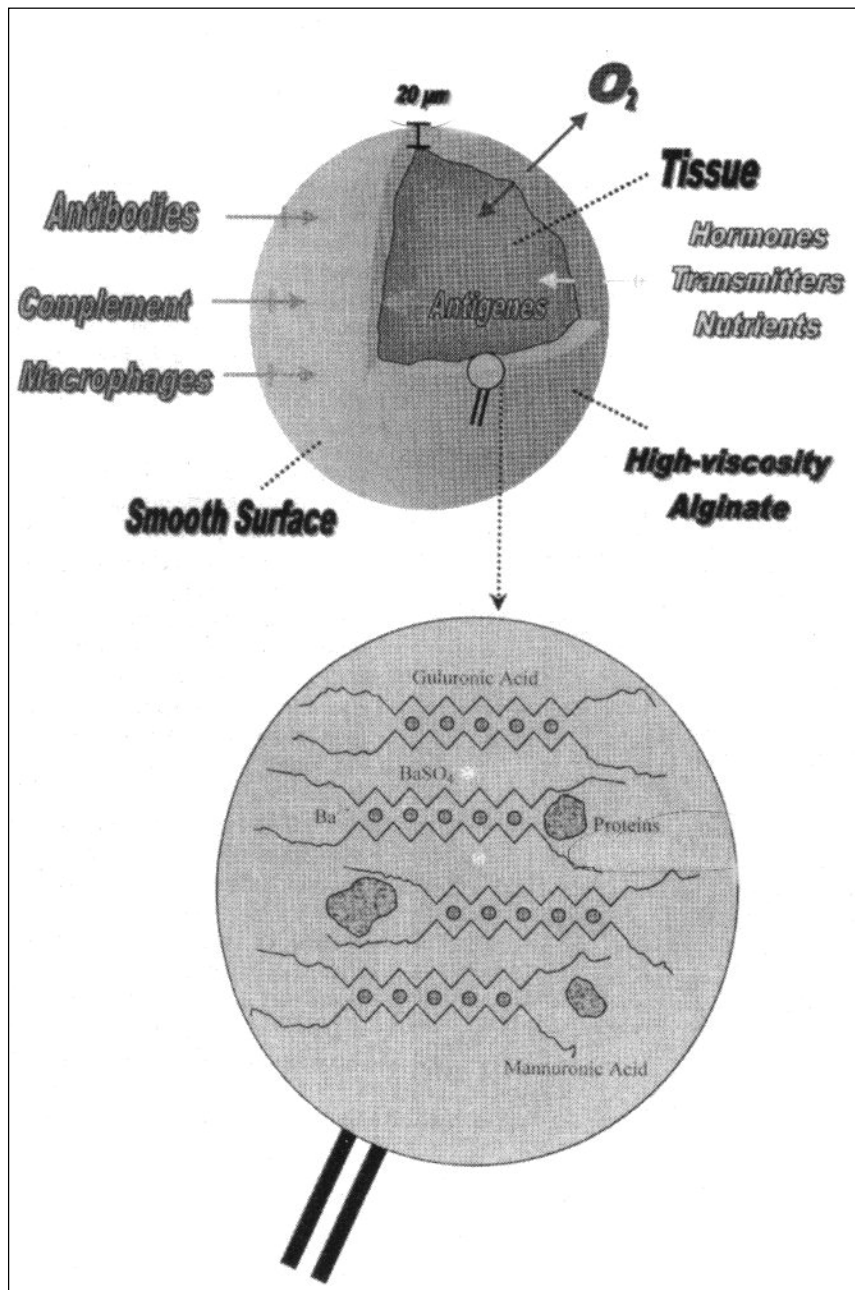


Abbildung 2.1.: Konzept und Aufbau einer Bariumalginat-Mikrokapsel. (Quelle: Zimmermann et al.: Hydrogel-based non autologous cell and tissue therapie. BioTechniques 2000; 29: S. 569)

Jedoch ist bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht bewiesen worden, ob und wie die Alginatkapsel die Immunisation im Tierversuch realisiert und somit das Transplantat suffizient vor dem Empfängerimmunsystem schützt. Die Ergebnisse dieser Studie sollen darüber erste Aufschlüsse geben.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsablauf

Die ausführliche Studienplanung wurde unter Berücksichtigung der bisher im Labor der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Marburg vorliegenden Erfahrung mit der experimentellen Nebenschilddrüsen- transplantation und in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Wonigeit, Transplantationslabor der Medizinischen Hochschule Hannover sowie mit Herrn Dr. Sitter, Institut für theoretische Chirurgie der Universität Marburg durchgeführt.

Tiere zweier genetisch unterschiedlicher Inzuchtstämme, Dark Agouti (DA) und Lewis (LE) Ratten, wurden einer Randomliste entsprechend parathyreoidektomiert. Der Operationserfolg, die vollständige Extirpation der beiden Epithelkörperchen, wurde durch einen Abfall des Serumgesamtkalziums auf einen Wert unter 1,9 mmol/l (Normbereich: 2,1 – 2,6 mmol/l) nach dem Eingriff definiert (Hasse et al., 1996). Versuchstiere, die 3 Wochen nach Parathyreoidektomie konstant Serumkalziumwerte unter 1,9mmol/l aufwiesen, wurden als Empfänger akzeptiert. Bei einem Serumkalzium unter 1,9mmol/l muss von einer totalen Parathyreoidektomie ausgegangen werden, da das Serumkalzium stark mit der PTH-Sekretion korreliert und somit als alleiniger Marker für die Nebenschilddrüsenfunktion geeignet ist (Ziegler, 1987).

Nach der Parathyreoidektomie der Spendertiere wurden deren Epithelkörperchen zuerst einer standardisierten Gewebekulturpassage unterzogen. Danach wurden die Nebenschilddrüsen von jeweils 10 Spendertieren mikroenkapsuliert und einem Empfängertier implantiert (Testgruppe). In der Kontrollgruppe wurden die Parathyroideae von 5 Spendertieren (10 Nebenschilddrüsen) unverändert, d.h. nativ, jeweils einem Empfängertier transplantiert.

Alle Tiere bekamen während des Versuchsablaufs wöchentlich ca. 1ml Blut abgenommen. Aus dem gewonnenen Blut wurden die zytotoxischen Antikörper und das Gesamtkalzium im Serum bestimmt. Jedes Versuchstier wurde am Tag der Ankunft im Tierstall der Universitätsklinik gekennzeichnet. Die Zuordnung der Versuchstiere zu den einzelnen Studiengruppen wurde randomisiert vorgenommen und die Auswertung der Blutentnahmen erfolgte verblindet.

3.2. Studiengruppen

Die Studie wurde in die vier folgenden Gruppen unterteilt:

- In der **Studiengruppe I** wurden 5 Ratten zunächst parathyreoidektomiert. Diese Ratten erhielten nach drei Wochen eine Hauttransplantation und nach weiteren zwei Wochen eine zweite Hauttransplantation. Die Hauttransplantation diente der maximalen Immunstimulation, da eine allogene Hauttransplantation den stärksten möglichen Immunstimulus darstellt (Hildemann, 1970). Der Erfolg der Hauttransplantation wurde fotodokumentiert. Nach dem Abnehmen des Verbandes, der das Hauttransplantat teilweise anwachsen lassen sollte, wurden die Versuchstiere jeden Tag fotografiert, bis das Hauttransplantat vollständig abgestoßen wurde. Ziel dieser Versuchsgruppe war es, den immunogenen Stimulus der Hauttransplantationen zu erfassen und Referenzwerte für die Antikörpertiter zu erstellen.
- In der **Kontrollgruppe I** wurden im Gegensatz zur Studiengruppe I die Ratten nicht parathyreoidektomiert, um einen Einfluss der Parathyreoidektomie auf die Abstoßungsreaktion auszuschließen. Wie in der Studiengruppe I wurde eine zweimalige Hautallotransplantation im Abstand von zwei Wochen an 5 Ratten durchgeführt.

Studiengruppe I - Maximale Stimulation

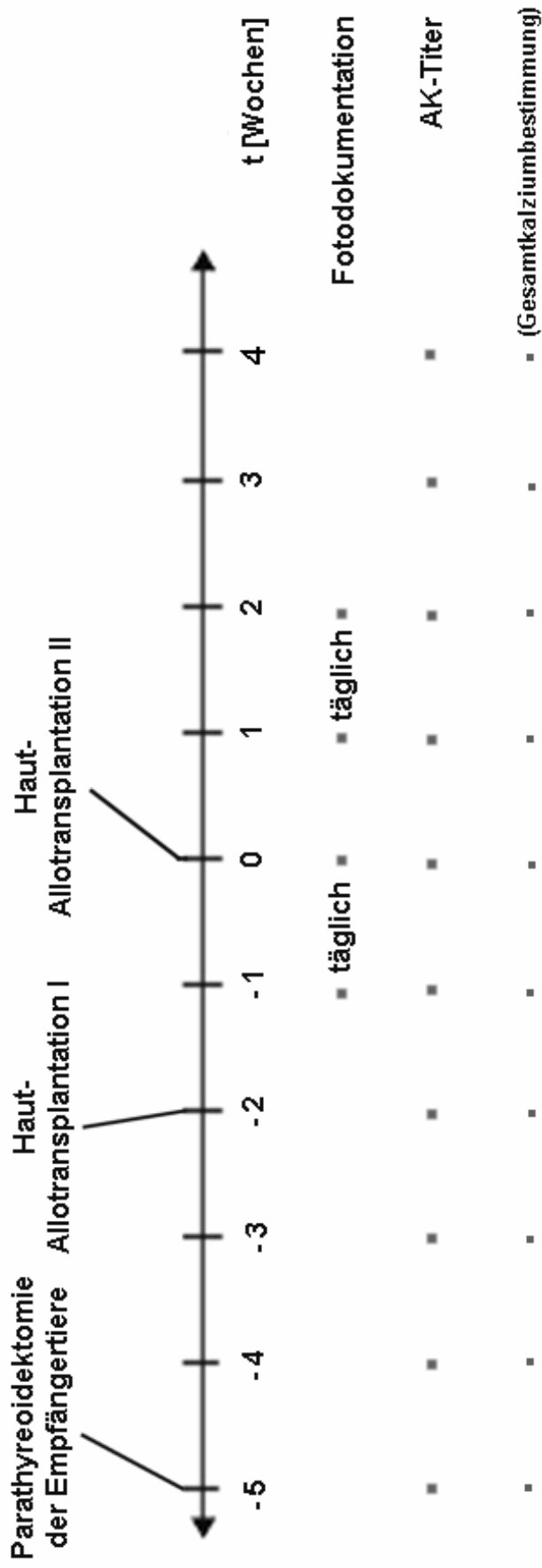


Abbildung 3.1.: Synopsis der Studiengruppe I. Maximale Immunstimulation nach Parathyroidektomie durch zwei aufeinanderfolgende, allogene Hauttransplantationen.

Kontrollgruppe I - Maximale Immunstimulation. Kontrolle

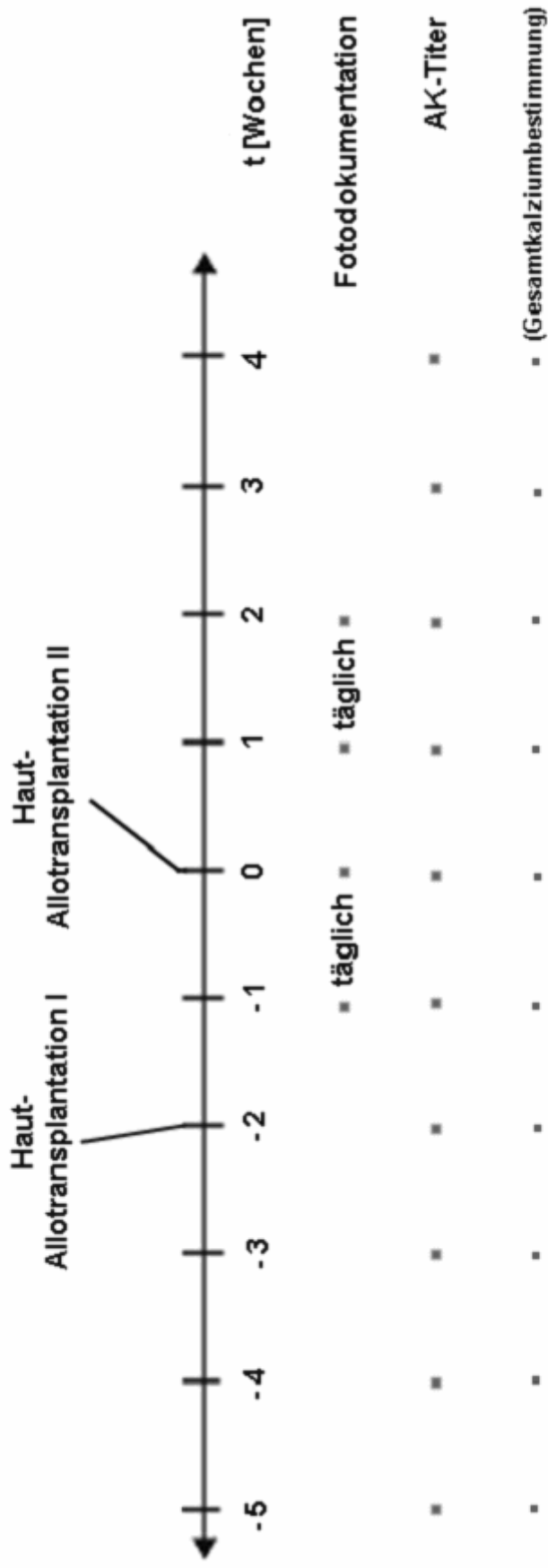


Abbildung 3.2.: Synopsis der Kontrollgruppe I. Maximale Immunstimulation durch zwei aufeinanderfolgende, allogene Hauttransplantationen ohne vorangegangene Parathyreoidektomie

- In der **Studiengruppe II** wurden 7 Ratten parathyreoidektomiert. Sie wurden dann vier Wochen danach allogene Hauttransplantiert. Nach weiteren drei Wochen erfolgte die Allotransplantation des zuvor in Alginate-encapsulierten Nebenschilddrüsengewebes. Mit Hilfe dieser Gruppe sollte erforscht werden, ob die Alginatekapsel das Transplantat vor dem maximal sensibilisierten Immunsystem schützen kann.

Studiengruppe II - Immunologische Vorsensibilisierung

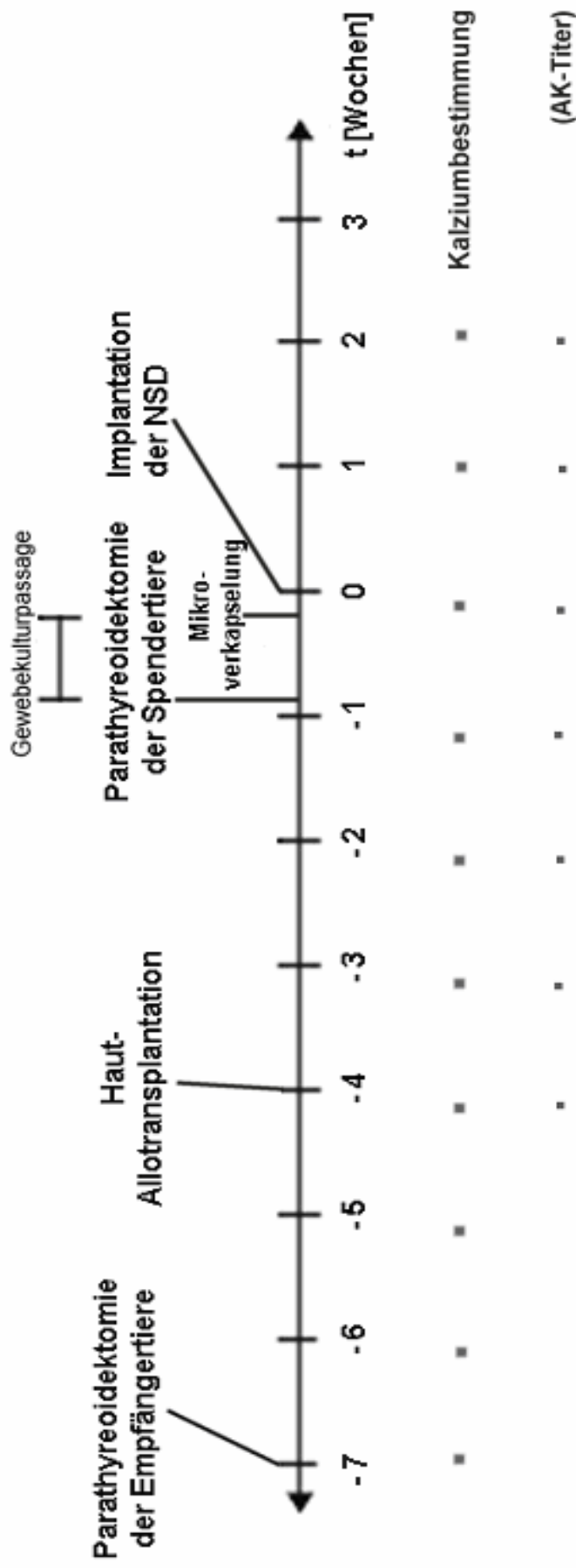


Abbildung 3.3: Synopsis der Studiengruppe II. Immunologische Vorsensibilisierung durch Hauttransplantation, dann allogene, mikroenkapsulierte Nebenschilddrüsentransplantation und Messung der Transplantatfunktion.

- **Kontrollgruppe II** zu Studiengruppe II. Zuerst wurden 7 Ratten parathyreoidektomiert, dann nach zwei Wochen allogene Hauttransplantiert. Nach weiteren drei Wochen wurde hier allerdings natives, nicht verkapseltes Nebenschilddrüsengewebe transplantiert. Somit wird die Abstoßung sowohl von nativen, als auch mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsen bestimmt.

Kontrollgruppe II - Immunologische Vorsensibilisierung

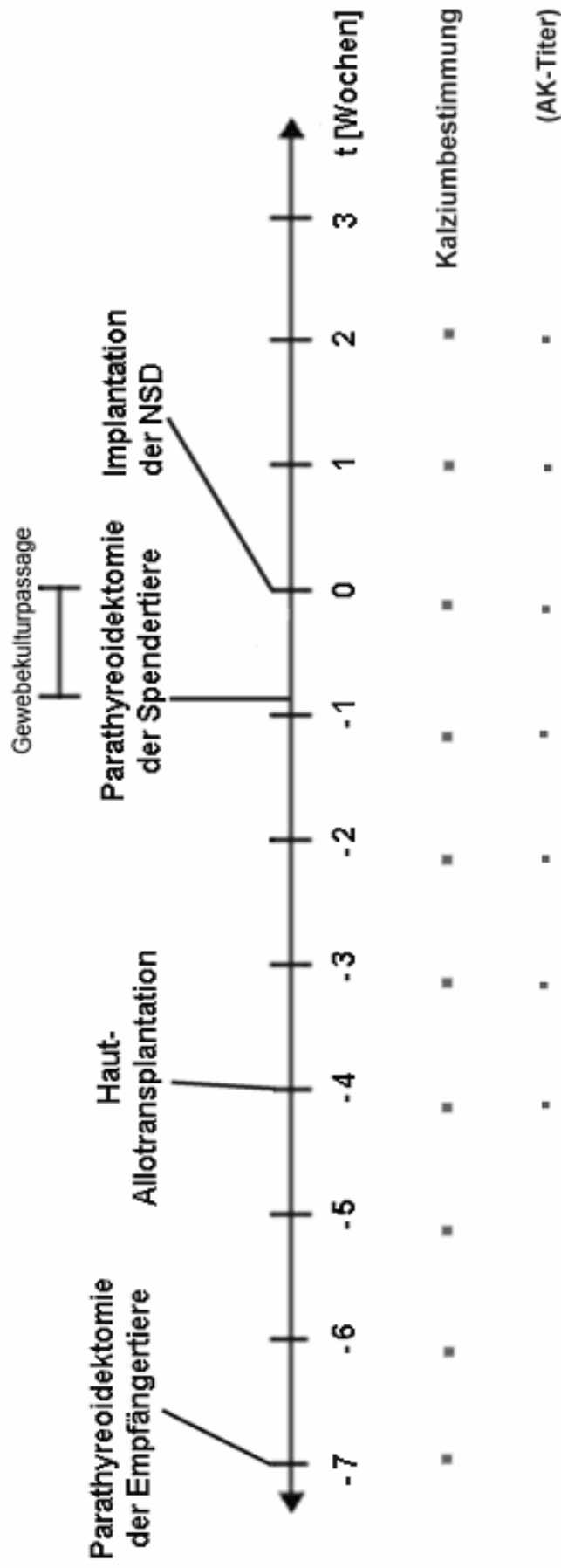


Abbildung 3.4.: Synopsis der Kontrollgruppe II. Immunologische Vorsensibilisierung durch Hauttransplantation, dann allogene, native Nebenschilddrüsentransplantation und Messung der Transplantatfunktion.

Für jede Transplantation mit enkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe an einem Empfängertier wurden 10 Spenderratten benötigt. Für jede native Nebenschilddrüsentransplantation wurden dagegen pro Empfänger nur 5 Spenderratten benötigt.

Dieses unterschiedliche Transplantationsverhältnis zwischen Testgruppe und Kontrollgruppe entstand, da durch den Vorgang des Mikroenkapsulierens und das spätere Aussortieren von nicht intakten Kapseln am Mikroskop etwa 50% des Nebenschilddrüsengewebes verloren ging. Um damit eine vergleichbare Menge an Nebenschilddrüsengewebe zwischen Testgruppe und Kontrollgruppe zu transplantieren, mußte das Spender/Empfängerverhältnis in der Testgruppe verdoppelt werden.

3.3.. Versuchstiere und Tierhaltung

Die Erlaubnis zur Durchführung dieser Tierstudie wurde am 28.06.1996 vom Regierungspräsidium in Gießen unter dem Aktenzeichen 20-15(1) MR 20/16-11/96 erteilt.

Als Versuchstiere wurden zwei genetisch völlig unterschiedliche Inzuchtstämme von Ratten benötigt. Zum einen wurden Dark Agouti (DA/OLA Hsd, Art. Nr.9205M) und zum anderen Lewis (LEW/HAN Hsd, Art. Nr.86150M) Ratten der Firma (Harlan Winkelmann GmbH, Deutschland) verwendet.

Die Ratten wurden in einem Tierstall für Langzeitversuche bei einer Temperatur von ca. 22 Grad Celsius und einer Luftfeuchtigkeit von 45% in einem für die Tiere physiologischen Tag-Nacht Verhältnis gehalten. Je zwei Ratten lebten dabei in einem Polycarbonkäfig der Größe 15 x 42 x 26,5 cm. Nach Transplantation lebten die Tiere in Einzelhaltung. Sie erhielten kontinuierlich Futter und Wasser über Trinkflaschen ad libitum. Das kalziumarme Futter (Altromin GmbH & Co KG, Lage, Haltungsdiät 1324) setzte sich zusammen aus folgenden Bestandteilen: Proteinen, Rohfett, Rohfaser, Rohasche, Calcium (0,9 %), Phosphor, Natrium, Magnesium und Vitamin A, D3, E. Es wurden ausschließlich männliche Dark Agouti und Lewis Ratten der Firma Harlan mit einem Gewicht zwischen 150-200 g verwendet.

3.4. Alginat

Alginat setzen sich im Verhältnis 30% Guluronsäure zu 70% Mannuronsäure zusammen (York et al., 2000). Eine besondere Fähigkeit dieser wässrigen Substanz ist es, Gele durch Quervernetzung der Säureketten zu bilden. Diesen Prozess beschrieb Grant et al., 1973. Die Verwendung von Alginaten hat sich heute schon in verschiedenen Bereichen, wie z.B. in der Lebensmittelindustrie der Biotechnologie und in der Medizin durchgesetzt. Zum Einkapsulieren des Nebenschilddrüsengewebes wurde ultrahochgereinigtes M-Alginat (Charge UHV/CG) verwendet, welches aus der Seealge *Laminaria pallida* gewonnen wird. Dieses Alginat hat eine höhere Biokompatibilität im Vergleich zu dem herkömmlichen Alginat (Zimmermann et al., 2000).

3.5. Mikroenkapsulierung

Das Prinzip der Mikroenkapsulierung von Nebenschilddrüsen wurde schon im Jahre 1980 von Lim und Sun beschrieben. Dieses Verfahren wurde von Geisen et al., 1990 zur Verkapselung von Inselzellen noch verfeinert. Wir übernahmen dieses Verfahren und modifizierten es für die Mikroenkapsulierung von Nebenschilddrüsengewebe weiter (Hasse et al., 1994a). Die für die Transplantation eingesetzten Kapseln sind Doppelschicht-Alginat-Kapseln, zu deren Herstellung wir eine von uns entwickelte Dreikanaldüse verwendeten.

Durch Kanal 1 wurde kontinuierlich Druckluft insuffliert, der die Mikroverkapselung antrieb. Mit einem konstanten Druck von 6,5 l/min strömte der Luftdruck durch die Düse, um einen einheitliche Partikelgröße zu garantieren. Durch Kanal 2 strömte das Alginat in einer Konzentration von 0,65% in einer Geschwindigkeit mit 1 ml/min. In dieser Konzentration befanden sich die Nebenschilddrüsenpartikel. Durch Kanal 3 (Abbildung 2.3) strömte Alginat in einer Konzentration von 0,7% mit 4,5 ml/min. Die Größe der Alginatkapseln

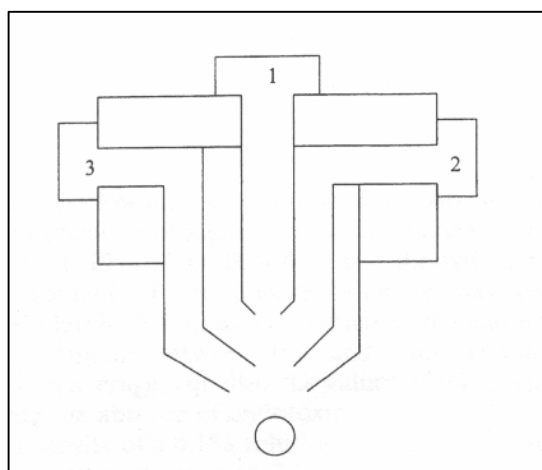


Abbildung 3.5.: Schematische Darstellung der Dreikanaldüse zur Herstellung von Alginatkapseln (eigene Abbildung)

konnte durch den Luftdruck geregelt werden, je höher der Druck, desto kleiner die Kapseln und umgekehrt. Der gesamte Vorgang des Mikroenkapsulierens wurde

steril unter einer Mikrobiologischen Sicherheitsbank (NUNC GmbH, Art. Nr. 3S 115G 125M) vorbereitet und durchgeführt. Auf diese Weise entstanden Doppelschicht-Alginat-Kapseln mit einer Konzentration von 0,65% Alginat in der Innenschicht und 0,7% in der Außenschicht.

- **Schritt 1:** Das Alginat wurde zunächst mit Rattenserum des Empfängerstammes versetzt und dann in einem Zentrifugenröhrchen (Cellstar®, Greiner Labortechnik; PP-Röhrchen, steril, Art. Nr.227261) zentrifugiert (20 min. bei 2400 U/min). Nach dem Zentrifugieren wurde das Alginat durch einen 0,22µm großen Pyrogenfilter (Fa. Schleicher und Schuell, Weinheim, Art. Nr. 462200) in ein 50ml Becherglas (Fa. Duran, Art. Nr.2110617) steril filtriert.
- **Schritt 2:** Die Dreikanaldüse mußte justiert, auf einem dafür vorgesehenen Stativ befestigt und mit Aqua dest. (Braun, Melsungen; 1000ml, Art. Nr.0422A61) und NaCl (Roth GmbH und Co., Karlsruhe; Art. Nr.3957.1) gereinigt werden. Die drei Tage zuvor von 10 Spenderratten entnommenen Nebenschilddrüsen wurden einer Gewebekulturpassage (siehe Kapitel 2.2.2.) unterzogen. Sie wurden in einer sterilen Petrischale (Sarstedt AG, Art. Nr.82.1473) mit einem Einmalskalpell (Größe 22, Produkte für Medizin AG, Köln; Art. Nr.9907200) in 2 mm große Partikel geschnitten und zweimal zu je 5 Minuten in einer Waschlösung gereinigt. Das Abpipetieren oder Hinzufügen von Lösungen geschah unter Zuhilfenahme eines Pipetus akku® (Hirschmann Laborgeräte; Art. Nr.9907200). Diese Waschlösung war eine isotonische Kochsalzlösung mit einer Osmolarität von 0,290 mOsmol, versetzt mit Rattenserum des Empfängerstammes. Alle verwendeten Lösungen wurden mit 10% Rattenserum (Harlan Winkelmann GmbH; Art. Nr.29600) gemischt, um durch die im Serum enthaltenen Proteine eine höhere Stabilität der

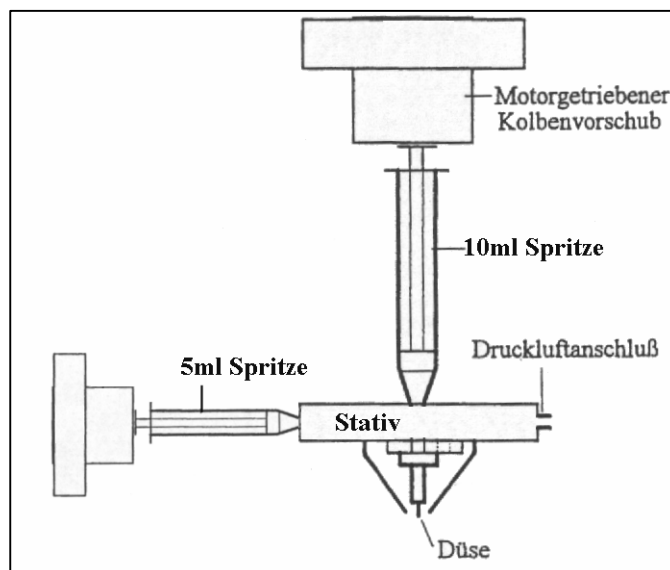


Abbildung 3.6.: Schematischer Aufbau zur Mikroenkapsulierung (eigene Abbildung)

Alginatkapseln zu erzielen (York et al., 2000).

- **Schritt 3:** Die Neben-schilddrüsenpartikel (NSD-Partikel) wurden nun mit einem scharfen Löffel in die 0,65% Alginatlösung gegeben und mit einer 2ml Spritze (Braun, Melsungen ; Art. Nr. 205789-5) aufgezogen. In eine 10 ml Spritze wurde 0,7% Alginatlösung aufgezogen. Beide Spritzen wurden an der Düse befestigt und ausgerichtet (Abb. 2.4.).
- **Schritt 4:** Unter den Düsenausgang wurde eine sterile Petrischale mit dem Fällbad gestellt, in dem die Kapseln aufgefangen wurden. Diese Lösung setzt sich zusammen aus 20 mmol Bariumchlorid (Merck, Darmstadt; Art. Nr. 159070), 5mM Histidine (SIGMA, 25g, LOT:87H1335, H-80000) und 115mmol NaCl (Merck, Darmstadt; Art. Nr. 101540) in 1 Liter Aqua bidest. gelöst. Diese Lösung mußte nun auf einen pH wert von 7,4 mit Natronlauge (Merck, Darmstadt,1L; Art. Nr. 1.09137.1000) eingestellt werden. Die Osmolarität dieser Lösung sollte 0,290 mOsmol betragen und wurde unter Zunahme eines Osmometers eingestellt. Das Bariumchlorid im Fällbad sollte der Verknüpfung der beiden Säureketten des Alginats dienen, wodurch das Alginat seine Stabilität erhalten sollte (Grant et al., 1973). Die durchschnittliche Verweildauer der Kapseln im Fällbad sollte maximal 60-90 Sekunden betragen. Der eigentliche Mikroenkapsulierungsvorgang wurde nun gestartet.
- **Schritt 5:** Das mikroenkapsulierte NSD-Gewebe fiel nun aus der Düse in das Fällbad. Das Fällbad wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und die Kapseln wurden zweimal zu je 5 Minuten mit der Waschlösung gereinigt, um überschüssiges Bariumchlorid abzuwaschen. Diese Lösung wurde dann ebenfalls abpipetiert und die Kapseln mußten nun für 20 Minuten bei Raumtemperatur in der Natriumsulfatwaschlösung inkubiert werden. Für diese Lösung wurden 6mM Natriumsulfat (Merck, Darmstadt; 1L, Art. Nr. 1.06649.10000) in einem Liter Aqua bidest. gelöst und die Osmolarität ebenfalls auf 0,290 mOsmol eingestellt.
- **Schritt 6:** Nach 20 Minuten wurde die Natriumsulfatlösung durch ein Inkubationsmedium ersetzt. Diese Lösung setzte sich zusammen aus 250ml RPMI 1640 mit L-Glutamin (RPMI 1640; Gibco Life Technologies,Germany; Art. Nr. 21875-03), 5ml Penicillin-Streptomycin Antibiotika Kombination (Biochrom KG , Berlin 46; Art. Nr. A 221), 4,5 ml Calciumchlorid (147mg ad 10ml Aqua dest.). In dieser Lösung mußte das NSD-Gewebe nun einen Tag im

Brutschrank (Heraeus, Hanau; Art.-Nr. 30165-0) bei 37 Grad Celsius und einem 5% CO₂ Anteil vor der Allotransplantation inkubiert werden. Vor der Inkubation wurden Kapseln, deren Hülle nicht intakt war oder bei denen Gewebestücke herausragten, ausgesondert. Hierfür wird ein Zweiphasen-Auflicht-Mikroskop (Nikon, Japan; Modell TMS, Art. Nr. 302052) bei 100facher Vergrößerung benötigt.

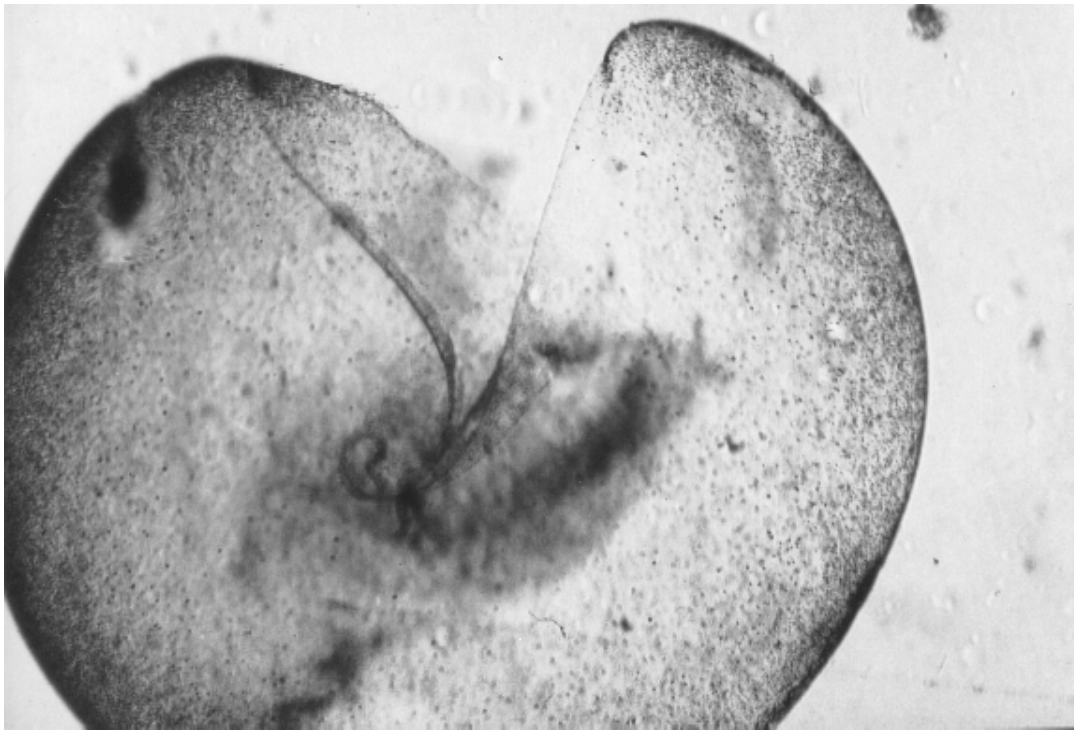


Abbildung 3.7.: Mikroskopisches Bild einer defekten Mikrokapsel ohne Gewebeinhalt (Bild aus Fotodokumentation)

3.6. Gewebekulturpassage

Nach Entnahme der Nebenschilddrüsen wurden diese einer Gewebekulturpassage von drei Tagen unterzogen. Dieses Verfahren diente dazu, die Immunogenität des Nebenschilddrüsengewebes herabzusetzen, indem die antigenpräsentierenden Zellen aus dem Gewebe eliminiert wurden (Lafferty et al., 1975, 1976, 1983; Sollinger et al., 1977, 1983).

Das NSD-Gewebe wurde vorsichtig in ein steriles Petrischälchen gegeben, nachdem zuvor das RPMI-Medium dekantiert wurde. In diese Petrischale wurde nun erneut RPMI-Medium hinzugegeben, welches mit Calciumchlorid, Penicillin-Streptomycin und 10% Rattenserum des Empfängerstammes versetzt war. Das Aufarbeiten des Gewebes für die Gewebekulturpassage geschah unter sterilen Bedingungen. In diesem Kulturmedium verblieb das Gewebe im Brutschrank bei

37 Grad Celsius und bei 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid für drei Tage. In dieser Zeit wurde das Medium nicht gewechselt.

3.7. Narkose

Für alle operativen Eingriffe an den Ratten wurde eine Injektionsnarkose verwendet. Diese Narkose setzte sich zusammen aus dem Anästhetikum Ketaminhydrochlorid (Ketamin 500 Hexal®; Art. Nr.8728439) und dem Hypnotikum Xylocin (Rompun 2%®, Bayer AG, Leverkusen; Art. Nr.865333) im Verhältnis 20:1. Es wurde jeweils 0,5 ml dieser Narkoselösung in die mediale Oberschenkelmuskulatur injiziert. Nach 10 Minuten hatten die Tiere ein ausreichend tiefes Narkosestadium erreicht, so dass mit den Operationen begonnen werden konnte. Die Narkose hielt für etwa zwei Stunden an.

Die Blutentnahmen hingegen wurden mit dem Inhalationsnarkotikum Diethylether (Hoechst, Art. Nr.254) durchgeführt. Dafür wurden die Ratten in einen Glaskäfig mit Deckel, auf dessen Boden sich eine mit Ether getränkte Zellstofflage befand, verbracht. Mit Ether konnte eine gute analgetische und hypnotische Wirkung erzielt werden. Die Wirkung hielt für etwa ein bis zwei Minuten an. Ether ist eine lipophile Substanz, so dass nur eine geringe Konzentration eingeatmet werden muss, um ein ausreichend tiefes Narkosestadium zu erreichen (Lüllmann et al., 1996).

3.8. Parathyreoidektomie

Nach Gabe des Injektionsnarkotikums konnte nach 10 Minuten mit der Operation begonnen werden. Alle operativen Eingriffe wurden in einem abgesperrten Tier-OP unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Zuerst wurde die Halsvorderfläche rasiert und mit Kodanspray (Schülke und Mayer, Norderstedt, Art. Nr. 1001501) desinfiziert. Die Ratten wurden dann in Rückenlage auf einen Ratten-Op-Tisch eingespannt. Circa 1 cm unterhalb der Protuberantia mentalis wurde ein 1-1,5 cm langer, medianer Hautschnitt bis kurz vor das Sternum durchgeführt. Mit Hilfe von zwei Haltefäden (Seralone blau, Art. Nr. 370802) wurde die Haut, um die Sicht in das Operationsfeld herzustellen, auseinandergeschlagen. Zuerst wurden die beiden großen Speicheldrüsen, die Glandula submaxillaris, der Ratte sichtbar. Diese

wurden stumpf unter Schonung derselben mit einer Mikroschere abpräpariert. Die darunterliegende infrahyale Muskulatur, der Musculus sternohyoideus und der Musculus omohyoideus wurden nun in der Medianlinie ebenfalls stumpf mit Haltefäden auseinandergezogen. Nun waren Trachea und Schilddrüse einsehbar. Das weitere Vorgehen erfolgte nun mit einem binokularen Operationsmikroskop mit 20facher Vergrößerung.

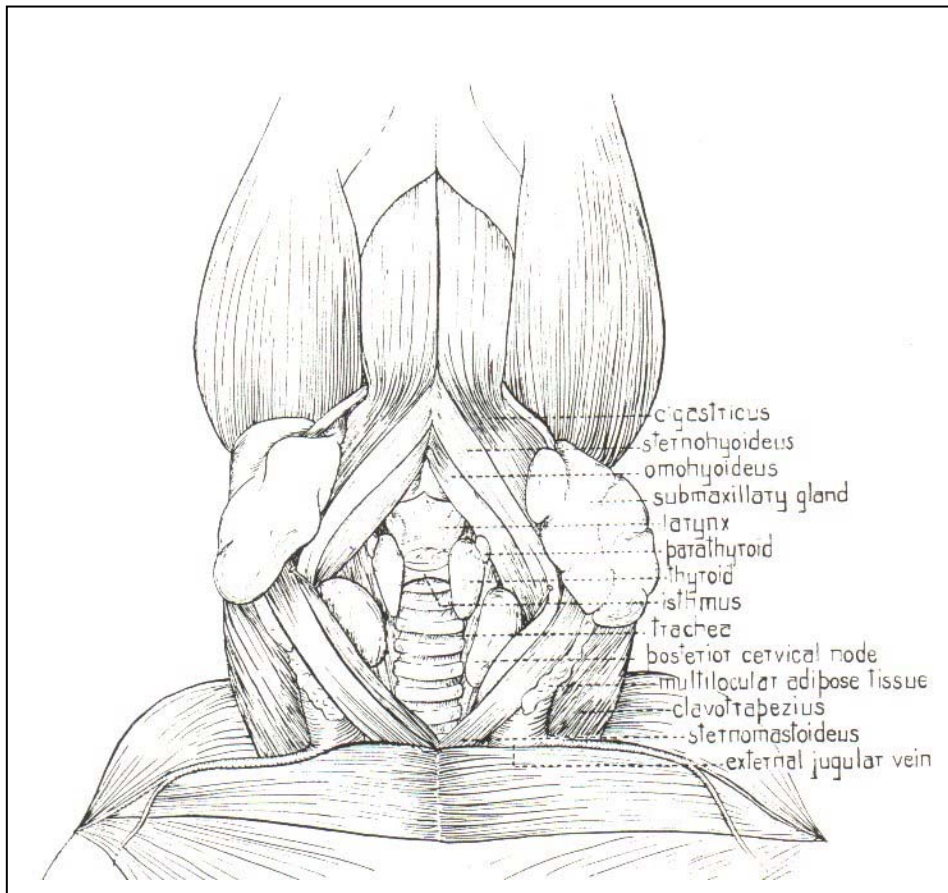


Abbildung 3.8.: Anatomische Übersicht der Nebenschilddrüse und Schilddrüse der adulten Ratte. (aus: Eunice Chace Greene: Anatomy of the rat. Hafner Publishing Company, New York and London, 1963)

Die am dorsolateralen Rand der Schilddrüse liegenden Nebenschilddrüsen (Abb. 2.6.) wurden aufgesucht. Dies erfolgte unter vorsichtiger Präparation, um keine Blutung zu verursachen, da diese die Sicht auf das Operationsfeld stark behindern würde. Die milchig-glasig erscheinenden Nebenschilddrüsen von 0,3-0,5 mm Größe wurden dann vorsichtig mit einer Mikropinzette und mit einer Mikroschere von dem oberen Pol der Schilddrüse getrennt. In manchen Fällen war die Nebenschilddrüse sehr stark mit der Schilddrüse verwachsen oder nur schlecht abgrenzbar, so dass ein Teil des Schilddrüsengewebes mitentfernt werden mußte,

um sicher zu gehen, dass eine vollständige Entnahme der Nebenschilddrüse gewährleistet war. Das entnommene Material wurde nun in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen mit RPMI-Medium gegeben und verweilte dort bis die Operation abgeschlossen war.

Die Haltefäden der infrahyalen Muskulatur wurden nun entfernt. Die Muskeln wurden adaptiert und mit einer Einzelknopfnahnt genäht. Als Nahtmaterial wurde resorbierbares Polygalactin (H-Vicryl; USP Stärke 4/0; Ethicon, Norderstedt; Art.Nr. JM9CRRA0) verwendet.

3.9. Transplantation von Nebenschilddrüsen

Die Empfängerratte wurde in oben genannter Weise narkotisiert. War ein ausreichend tiefes Narkosestadium erreicht, konnte mit der Rasur im Bereich der gesamten vorderen Bauchwand begonnen werden. Die Ratte wurde auf dem Ratten-Op-Tisch auf dem Rücken gelagert. Nun wurde mit einer Präparierschere eine Inzision von 4-5 cm in der Medianlinie durchgeführt. Dann wurde die Bauchmuskulatur mit der darüberliegenden Faszie sichtbar. Mit Haltefäden wurde das Operationsfeld offengehalten. Nun konnte mit der vorsichtigen Präparation der Muskeltaschen begonnen werden. Die Alginatkapseln mit dem Nebenschilddrüsengewebe wurden in Muskeltaschen des Musculus rectus abdominis allotransplantiert. Mit einer chirurgischen Pinzette wurde die obere Schicht des Muskels angehoben, um dann mit der Schere den Muskel stumpf auseinanderzuspreizen. Die so entstandenen Muskeltaschen waren circa 0,5cm tief und 1cm breit. In diese Taschen wurden jeweils zwei Alginatkapseln mit einem scharfen Löffel überführt. Dies mußte sehr vorsichtig geschehen, um die Integrität der Kapsel zu gewährleisten. Die Muskeltaschen wurden dann per Einzelknopfnahntechnik verschlossen, dabei wurde nicht resorbierbares Fadenmaterial verwendet, um die Transplantatlager zu markieren. Auf diese Weise wurden zehn Taschen mit Alginatkapseln gefüllt. Nach Beendigung der Transplantation wurden die Haltefäden herausgezogen und die Bauchdecke wurde mit resorbierbarem Material zugenäht. Nach der Transplantation des NSD-Gewebes wurden die Tiere alleine im Käfig gehalten.

3.10. Hauttransplantation

Für die Hauttransplantation wurde ein Haut-Spendertier mit der Euthanasie-Unit (Fa. UNO, Zevenaar, Holland) eingeschläfert. Anschließend wurde diesem Tier ein zwei mal zwei Zentimeter großes Hautareal mit einer Schere entnommen. Die Haut mußte intakt, mit Fell bedeckt sein und durfte keine Löcher vorweisen. Dieses Hautstück wurde nun in TC.100 Medium (GIBCO; Art. Nr. 13055-025) vermischt mit 5% Penicillin–Streptomycin in einer sterilen Petrischale eingelegt. Das Hauttransplantat durfte nicht in direktem Kontakt mit Plastik geraten, deshalb wird die Petrischale zuvor mit Faltenfilter (Schleicher & Schuell, Art. Nr.311652) ausgelegt.

Nun wurde das allogene Empfängertier vorbereitet und per Injektion (s.o. Punkt 2.4 Narkose) narkotisiert. Das Empfängertier wurde auf einer Fläche von circa 4x4 cm an der lateralen Bauchwand mit einem Einmalrasierer rasiert. Dann wurde vorsichtig mit einer Präparierschere die Epidermis abgetragen. Nun wurde die Dermis mit ihren zarten Gefäßzeichnungen sichtbar. Es durfte nicht zu Blutungen kommen, da ansonsten kein Anwachsen des Hauttransplantats erfolgte.

Das Hauttransplantat wurde nun mit einem Einmalskalpell (Größe 22) vom Fett befreit und an den Rändern geglättet. Das Hautstück war dann transplantabel, wenn es beinahe transparent erschien und völlig intakt war und eine scharfe Randkontur aufwies. Das Hauttransplantat bestand nur noch aus Epidermis mit Fell. Der Empfängerratte wurde das allogene Hauttransplantat nun im Bereich der lateralen Thoraxwand transplantiert und mit einer fettbeschichteten Gaze fixiert. Mit einer sterilen Mullkomresse 10x10cm (Fa. Hartmann, Art. Nr.70260) wurde das Wundgebiet abgedeckt und danach mit Klebevlies (10cm, stretch, Fa. Hartmann; Art. Nr. 57220) befestigt. Dieser Kompressionsverband wurde 5 bis 7 Tage beibehalten. Bei zu festem Verband war es in dieser Zeit für einige Tiere schwierig aufgrund mangelnder Bewegungsmöglichkeit genügend Nahrung und Wasser zu sich zu nehmen. War der Verband zu locker konnten sich die Tiere den Verband entfernen und das Transplantat abreißen.

Die bei der Hauttransplantation entstandene Wundfläche konnte initial etwas schmerzhaft sein, deshalb wurden die Tiere postoperativ für zwei bis drei Tage analgesiert. Dies geschah durch eine subkutane Injektion von 0,1 mg Tramundin® 100 (Mundipharma GmbH, Limburg; Art. Nr.9806).

Nach Verbandentnahme wurde eine tägliche Fotodokumentation durchgeführt. Dabei wurde das Transplantat bis zum Zeitpunkt des Abfallens fotografiert. Dieser Zeitraum konnte bis zu 12 Tagen dauern.

3.11. Blutentnahmen und Kalziumbestimmung

Bei allen Spenderratten wurde vor Parathyreoidektomie eine Blutentnahme vorgenommen. Außerdem wurden am 7. und am 14. Tag Blutentnahmen durchgeführt. So konnte eine Kalziumverlaufskurve erstellt werden, mit deren Hilfe ersichtlich würde, ob die Spendertiere mit ihren Kalziumwerten nach Nebenschilddrüsenentnahme erwartungsgemäß abfielen. Zugleich stellte dies eine Erfolgskontrolle dar, ob die Nebenschilddrüsen vollständig entnommen worden waren. Alle Blutentnahmen wurden unter Narkose durchgeführt.

Am Tag der Hauttransplantation wurde Blut entnommen und danach einmal wöchentlich. Bei bereits hauttransplantierten Tieren wurde dann vor der Transplantation des Nebenschilddrüsen Gewebes ebenfalls eine Blutentnahme vorgenommen, um einen Ausgangswert zu ermitteln. Nach Transplantation wurde am Tag 7, 14 und 21 Blut entnommen. Somit konnte über einen Beobachtungszeitraum von 11 Wochen eine Kalziumverlaufskurve erstellt werden.

Es wurden jedem Tier pro Blutentnahme zwischen 0,5 bis 0,7 ml Blut aus dem Plexus orbitalis abgenommen. Zur Entnahme wurden Hämatokrit-Glaskapillare (75mm / 75 µl, Natrium-Heparin beschichtet; Germany; Art. Nr. 9100275) und Tupfer benötigt. Die einzelnen Blutropfen wurden in einem Eppendorfzentrifugenröhrchen (Reaktionsgefäß 3810; Eppendorf, Hamburg; Art. Nr. 048016) aufgefangen. Nach Entnahme wurde Kompression mit dem Tupfer auf das Auge ausgeübt, um eine Blutstillung zu bewirken. Unmittelbar nach Blutentnahme wurde das Blut 20 Minuten bei 6000 U/min. zentrifugiert. Die zellulären Bestandteile setzten sich dabei ab, und das überstehende Serum wird zum einen in ein frisches Eppendorfgefäß pipetiert und zur Kalziumserumbestimmung ins Zentrallabor gebracht, der andere Teil des Serums wurde ebenfalls in ein Eppendorfgefäß überführt und für die Antikörperbestimmung bei minus 20 Grad bis zur Testung aufbewahrt. Die Gesamtkalziumbestimmung erfolgte im Zentrallabor des Klinikums der Phillips-Universität Marburg mit einem klinisch-chemischen Analyseautomaten des Typs Roche/Hitachi 917.

3.12. Mikrolymphozytotoxizitätstest

Zytotoxischen Antikörper gehören der Gruppe IgG an, die ihre Zielzellen mit Hilfe von Komplement zerstören können (Frank und Fries, 1991). Die Antikörper erkennen die Oberflächenantigene und aktivieren das Komplement (Brekke et al., 1995). Das aktivierte Komplement zerstört in wenigen Minuten die Zellwand. Der Elektrolythaushalt der Zelle kann nicht länger erhalten werden und die Zelle wird zerstört (Müller-Eberhard, 1986). Diese Zellen lassen sich nun mit Eosinrot anfärben, da ihre Zellwand porös ist und der Farbstoff im Inneren verbleibt (Terasaki et al., 1978). Dieser Test stellte eine Erfolgskontrolle dar, ob das Hauttransplantat angewachsen war, und das Immunsystem dadurch so stimuliert wurde, dass es Antikörper bildete. Mit Hilfe des Mikrolymphozytotoxizitätstests wurde eine Titerverlaufskurve der zytotoxischen Antikörper erstellt.

Für diesen Test mussten zunächst Lymphknoten aus einer Ratte herauspräpariert werden. Sollten Seren von DA Ratten ausgewertet werden, waren Lymphknoten von LEW Ratten zu entnehmen und umgekehrt.

- **Schritt 1:** Es wurde eine Lymphknoten-Spenderratte durch die Euthanasie-Unit eingeschläfert. Anschließend wurden drei bis vier Lymphknoten aus dem Fettgewebe der Regio submaxillaris entnommen. Mit einer Präparierschere wurde die Ratte unterhalb der Protuberantia mentalis eröffnet. Die Lymphknoten lagen sehr oberflächlich und waren somit gut einsehbar. Die entnommenen Lymphknoten wurden in ein Zentrifugenröhrchen mit T.C.100 Medium gegeben.
- **Schritt 2:** Die Lymphknoten wurden nun in eine sterile Petrischale gegeben und mit einer anatomischen Pinzette vom Fett befreit. Danach mußten die Lymphknoten in eine neue Petrischale überführt werden. Die Lymphknoten wurden dann mit einer Pinzette vorsichtig ausgezupft. Alle freigesetzten Zellen mußten dann mit einer Pasteurpipette (Pasteur Capillar Pipette, 150mm) in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt werden. Die Lymphozyten wurden dann zweimal mit dem T.C.100 Medium ausgewaschen und anschließend bei 21 Grad Celsius für 10 Minuten bei 900 U/min zentrifugiert. Das danach sich absetzende Zellpellet wird in 10 ml T.C.100 Medium gelöst.

- **Schritt 3:** Das auszuwertende Serum wurde langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Dann wurde mit Hilfe eines Mikrodispensers (Art. Nr.830070) in eine Mikrotiterplatte (72 Well, Greiner Labortechnik; Art. Nr.654180) 3 μ l T.C. Medium gegeben. Danach wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe mit Empfängerserum und dem T.C. Medium hergestellt. Das Serum wurde mit einer Mikropipette (Eppendorf Varipette® 4710, 3 μ l) in die einzelnen Wells gegeben.
- **Schritt 4:** Jede Vertiefung der Platte wurde nun mit 3 μ l Paraffinöl (Fluka Chemie AG, Art. Nr.76235) beschichtet, um das Austrocknen des Serums zu vermeiden. Die vorbereiteten Lymphozyten wurden nun hinzupipetiert. Anschließend mußte die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
- **Schritt 5:** Im nächsten Schritt wurden 6 μ l gelöstes Kaninchenkomplement (Behring ORAX 07) in jedes Well dazugegeben. Danach mußte erneut das Serum mit dem Komplement für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
- **Schritt 6:** Im letzten Arbeitsabschnitt wurden die Vertiefungen mit 5% wässriger Eosinrotlösung beschichtet und nach fünf minütiger Einwirkzeit mit 6 μ l 37% Formaldehyd (SIGMA-Alchid Chemie GmbH, Steinheim; Art. Nr.25,254-9) abgestoppt. Die Mikrotiterplatte wurde nun mit einem Mikroskopischem Deckglas (Greiner Labortechnik; Art. Nr.653081) abgedeckt.
- **Schritt 7:** Nach 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Seren ausgewertet. Für die Testauswertung wurde ein Zweiphasen-Auflicht-Mikroskop mit einer 100fach Vergrößerung benötigt.

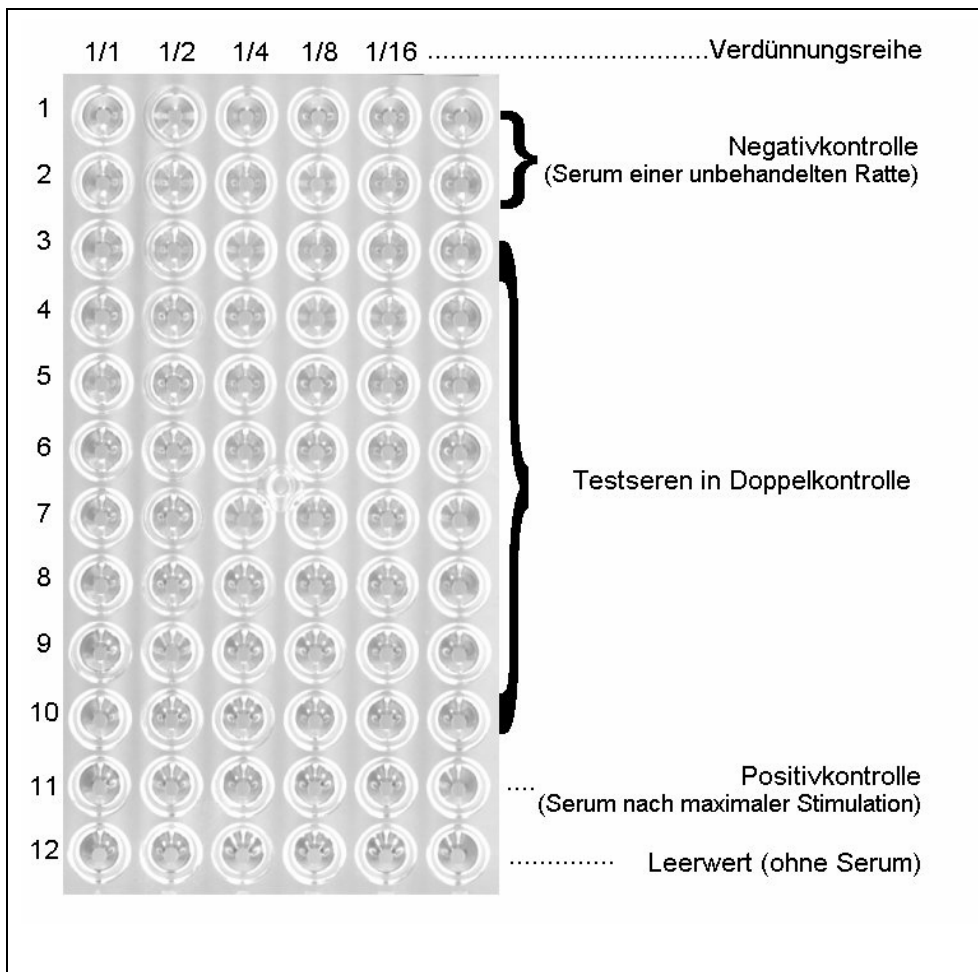


Abbildung 3.9.: Mikrotitertestplatte, 72 Wells, Greiner Labortechnik; Art. Nr.654180

3.13. Statistik

Die statistische Planung der Studie und Auswertung der Ergebnisse wurde mit Unterstützung von Dr. Sitter, Institut für theoretische Chirurgie der Universität Marburg durchgeführt. Im Vorfeld wurde die Fallzahl auf sieben Tiere pro Studiengruppe festgelegt. Sieben Tiere waren nach der Fuhrbergformel ausreichend, um einen Parameter der Studiengruppen an mehreren Tagen mit hinreichender Signifikanz ($\alpha \leq 0,05$) gegeneinander zu testen.

Die Fragestellung dieser Studie lautete: **Kann die Mikrokapsel das Transplantat und seine Funktion vor der Zerstörung durch das aktivierte Immunsystem schützen ?**

Ein funktionierendes Transplantat müsste durch die Freisetzung von Parathormon in der Lage sein, das Serumgesamtkalzium so anzuheben, dass es sich signifikant vom Serumgesamtkalzium eines Tieres mit nicht funktionierendem Transplantat

unterscheidet. Die Kalziumverläufe werden in mmol/l Gesamtkalzium im Serum angegeben. Da sich das Gesamtkalzium im Serum streng reziprok zur PTH-Sekretion verhält, ist die Kalziummessung ausreichend aussagekräftig über die Transplantatfunktion (Ziegler, 1987). Daraus leitet sich die folgende Nullhypothese H_0 ab: Das Serumgesamtkalzium an den Tagen ($t=0$ bis $t=8$) nach der Allotransplantation von nativen und verkapselten Nebenschilddrüsen ist in der Kontroll- und Testgruppe ein Produkt des Zufalls. Dazu formuliert sich die Alternativhypothese H_1 , dass das Serumgesamtkalzium nach der Allotransplantation von nativen Nebenschilddrüsen in der Kontrollgruppe und verkapselten Nebenschilddrüsen in der Testgruppe tatsächlich signifikante ($\alpha \leq 0,05$) Unterschiede aufweist.

Getestet werden die Kalziumwerte der Gruppen I und II an den Tagen $t=0$ bis $t=4$ gegeneinander, sowie der Gruppen III und IV an den Tagen $t=0$ bis $t=8$ gegeneinander. Zunächst werden diese Werte dem Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk unterzogen, um zu testen, ob sie tatsächlich normalverteilt und somit dem t-Test zugänglich sind, da dies in allen Studiengruppen zu allen Zeiten der Fall ist, werden die Kalziumwerte mit dem t-Test nach Student gegeneinander getestet. Hierbei wird getestet, ob die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($\alpha \leq 0,05$) abgelehnt werden kann. Ist dies der Fall, wird die Alternativhypothese mit entsprechender Wahrscheinlichkeit angenommen (Clauß und Ebner, 1982).

Der Antikörpertiter wird nicht statistisch ausgewertet, da von einer Abhängigkeit der Messwerte ausgegangen werden muss und sich somit die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie richtig ist (Fehler 1.Art) mit jedem zusätzlichen Messwert halbiert. Der Antikörpertiter ist lediglich ein deskriptiver Parameter, von dem Rückschlüsse auf den Aktivierungsgrad des Immunsystems gezogen werden können. Die Antikörpertiter werden erhoben, indem die Testseren immer höher verdünnt werden und diejenige Verdünnung als Messwert angegeben wird, bei der eben noch eine Antikörperreaktion nachweisbar ist. Bei einer höheren Verdünnung sind für die gleiche Reaktion quantitativ mehr Antikörper notwendig. Höhere Antikörper im Serum lassen auf ein aktivierteres Immunsystem schließen und dienen so der Erfolgskontrolle des immunogenen Reizes durch das Hauttransplantat.

4. Ergebnisse

4.1. Operative Eingriffe

4.1.1. Narkose

Die Injektionsnarkose mit Rompun und Ketanest wurde von den Lewis- und DA-Ratten gleichermaßen gut vertragen. In einigen Fällen reichte jedoch die gespritzte Menge von 0,5 ml Narkotikum nicht aus, so dass nochmals die gleiche Menge nachgespritzt werden konnte. Intraoperativ verstarb kein Tier.

Die Inhalationsnarkose mit Äther weist eine geringere therapeutische Breite auf. Bei 217 durchgeführten Äthernarkosen kam es siebenmal zum Herz-Kreislaufstillstand mit anschließender erfolgreicher Reanimation. Es verstarb also kein Tier während der Narkose.

4.1.2. Parathyreoidektomie und Mortalität

Alle Ratten, die zur Parathyreoidektomie herangezogen wurden, waren normokalzämisch und lagen mit ihren Kalziumwerten im Bereich von 2,1-2,7 mmol/l. Nach 150 Parathyreoidektomien fielen 82% mit dem Kalziumspiegel unter den Normgrenzwert von 1,9 mmol/l ab. 18% blieben normokalzämisch und konnten für weitere Transplantationen nicht verwendet werden. Der Mittelwert nach Parathyreoidektomie lag bei 1,56 mmol/l. An Ratten mit einer Hypokalzämie konnte bereits 2 Wochen postoperativ beobachtet werden, dass sie mattes, stumpfes Fell und Haarausfall aufwiesen.



Abbildung 4.1.: Hypokalzämische Ratte mit Haarausfall (Foto aus eigener Fotodokumentation)

Desweiteren nahmen sie nicht so wie normokalzämische Ratten an Gewicht zu und blieben während der gesamten Versuchsreihe untergewichtig. Vereinzelt kam es auch zu tetanischen Anfällen. An den Folgen der Hypokalzämie verstarb eine Lewis Ratte 7 Wochen nach Parathyreoidektomie bei einem Kalziumwert von 1,2 mmol/l.

4.1.3. Hauttransplantation

Die Transplantatabstoßungszeit variierte zwischen 11 und 14 Tagen. Das Hauttransplantat musste eine Woche durch einen Kompressionsverband fixiert werden, um anzuwachsen. Dieser Verband wurde von einigen Tieren schlecht toleriert. Bei einem zu festen Verband wurden die Tiere so in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt, dass sie schlecht Nahrung zu sich nehmen konnten. Bei einem zu lockeren Verband konnten sich die Tiere schnell befreien und das Hauttransplantat abreißen. Bei 3 Tieren musste der Verband neu angelegt werden, ohne dass sich das Transplantat gelöst hatte

4.2. Messergebnisse

4.2.1. Gruppen I (Studien- und Kontrollgruppe): Vorsensibilisierung durch Hauttransplantation

Die Gruppen I wurden erstellt, um Referenzwerte für die Immunstimulation durch Hauttransplantation zu erheben und um eine Beeinflussung der Serumkalziumwerte durch die Hauttransplantation auszuschließen.

In beiden Studiengruppen wiesen alle Versuchstiere 2 Wochen nach der zweiten Hauttransplantation einen maximalen Antikörpertiter auf.

Bei beiden Gruppen lag die durchschnittliche Abstoßungszeit des ersten Hauttransplantates bei 11,8 Tagen mit einer Standardabweichung von $\pm 1,1$ Tagen und die des zweiten Transplantates bei 6 Tagen mit einer Standardabweichung von nur $\pm 0,93$ Tagen. Somit verkürzte sich die Abstoßungszeit bei maximal vorstimuliertem Immunsystem um circa 50 Prozent.

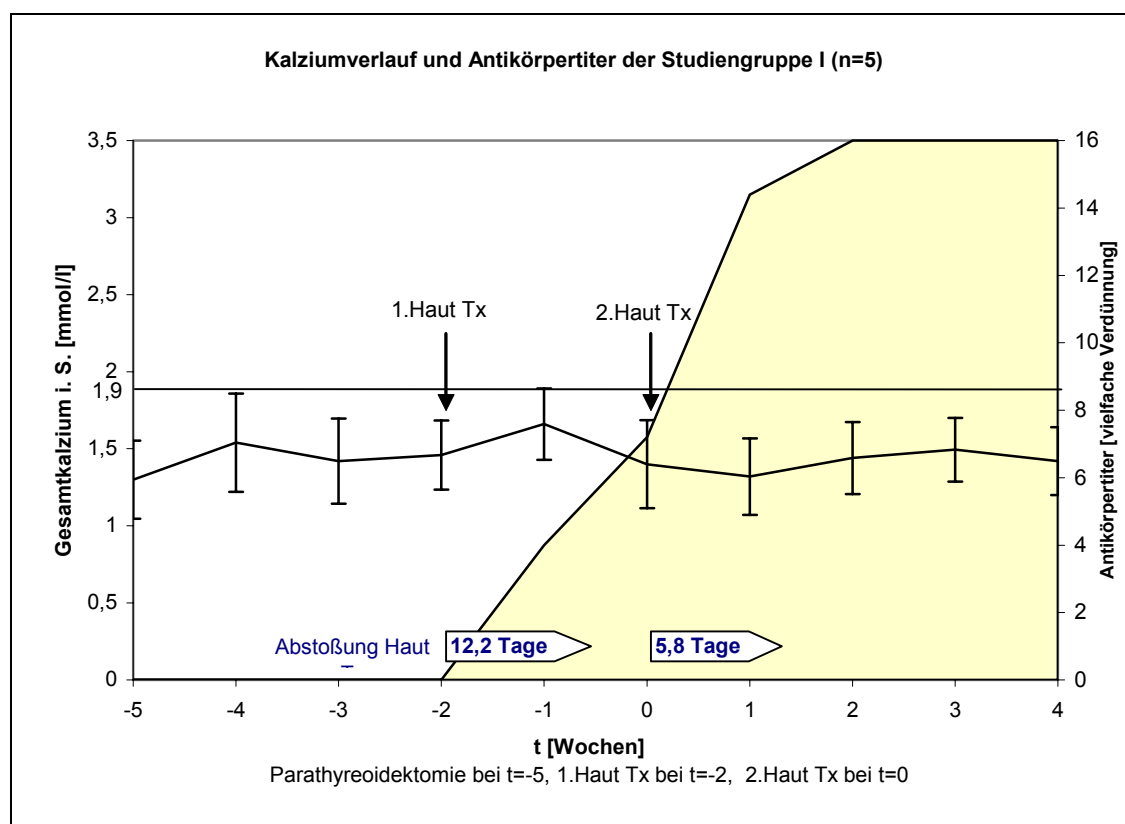


Abbildung 4.2.: Darstellung des Kalziumverlaufs, Antikörpertiters und Hauttransplantatabstoßung der Studiengruppe I.

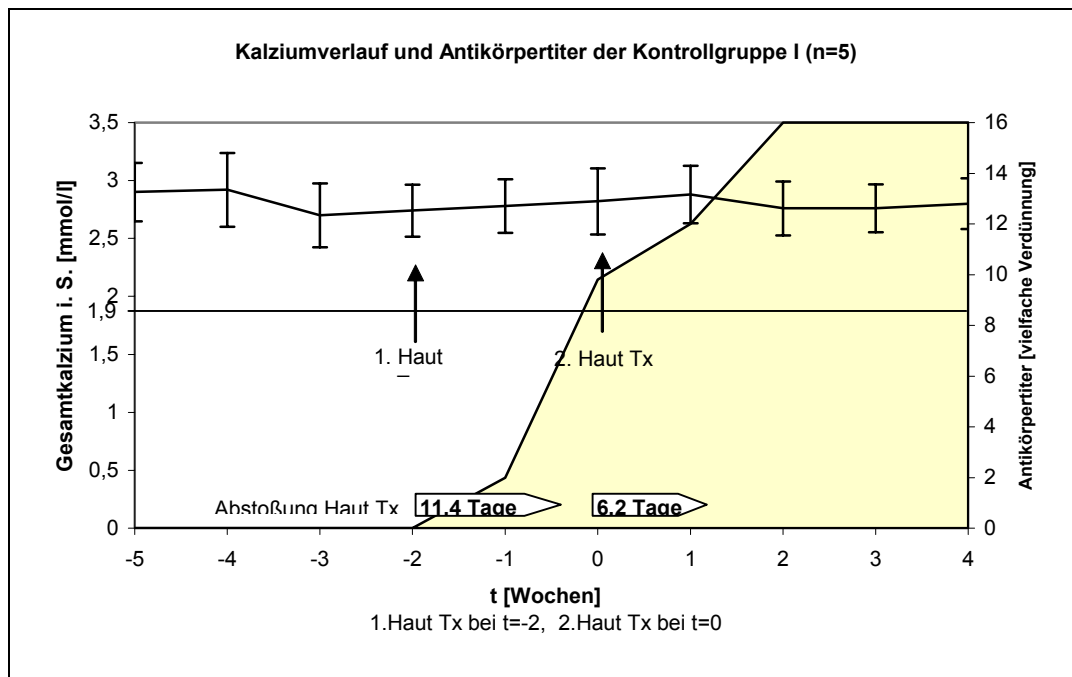


Abbildung 4.3.: Graphische Darstellung des Kalziumverlaufs mit Standardabweichung und mittleren Antikörpertiters der Kontrollgruppe I.

Die nacheinander durchgeführten allogenen Hauttransplantationen hatten keinen Einfluss auf die Serumgesamtkalziumwerte in den beiden Gruppen. Die mittleren Kalziumwerte in den Studiengruppe I und Kontrollgruppe I unterscheiden sich zu jedem Messzeitpunkt signifikant voneinander.

4.2.2. Studiengruppe II: Schutz vor dem sensibilisierten Immunsystem ?

Überraschenderweise war keines der Versuchstiere trotz des postulierten Schutzes durch die Alginatmembran nach der Nebenschilddrüsentransplantation mit dem Serumkalzium signifikant angestiegen. Bei einer mittleren Standardabweichung von nur 0,08mmol/l hielten sich sämtliche Kalziumwerte sehr dicht beieinander.

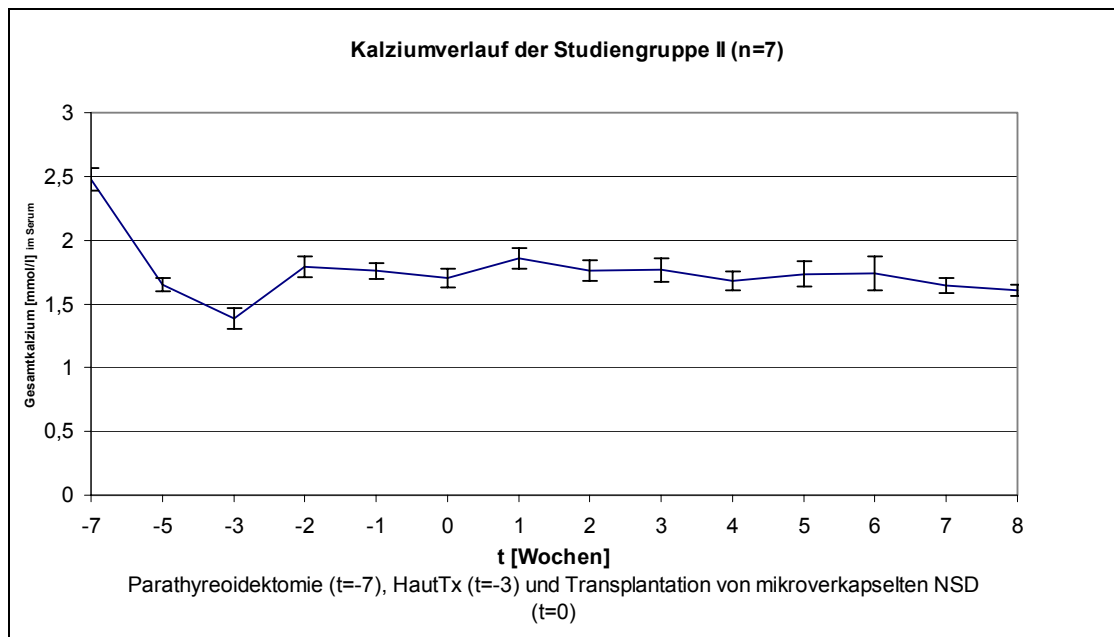


Abbildung 4.4.: Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichung des Serumkalziums der Studiengruppe II.

In der Studiengruppe II wurde 2 Wochen nach der Hauttransplantation bei allen Tieren der maximal mögliche Wert an spezifischen Antikörpern gemessen. Zum Zeitpunkt der Allotransplantation (t=0) der verkapseltem Nebenschilddrüsen ist also von einer maximalen Immunstimulation auszugehen.

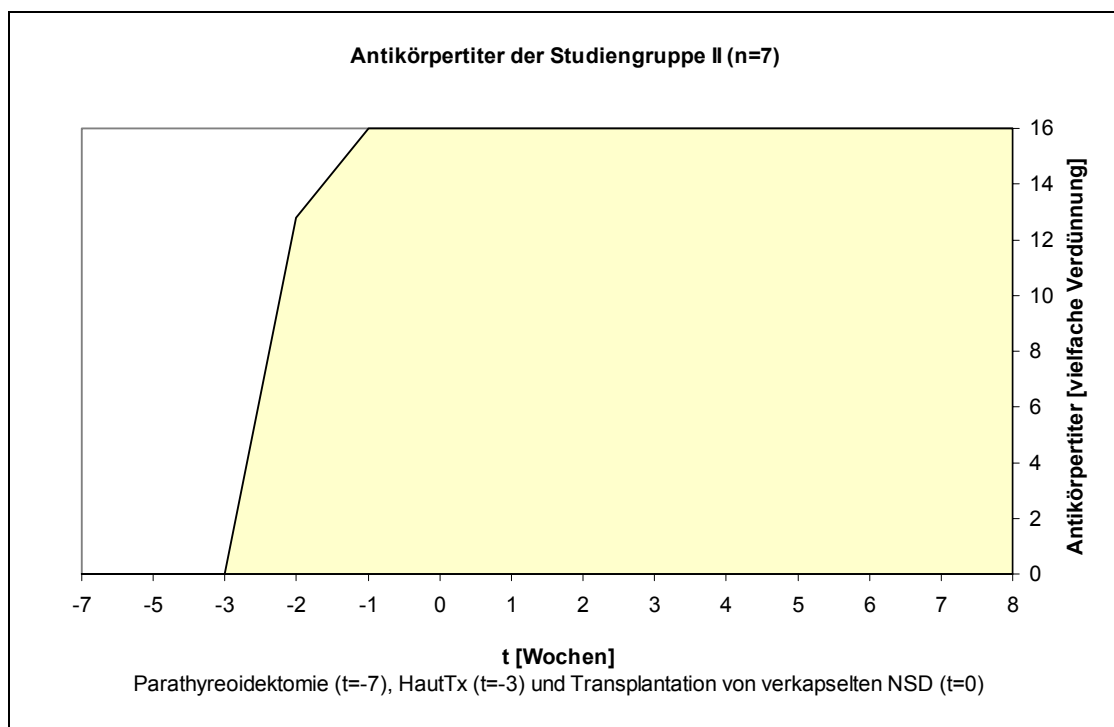


Abbildung 4.5.:Darstellung des Antikörpertiters der Studiengruppe II. 16 gibt die größtmögliche Verdünnung (1:16) des Antikörpertiters an.

Das Hauttransplantat wurde nach durchschnittlich **11,6 Tagen** abgestoßen, wobei dieser Wert bei einer Varianz $v=0,3$ **Tagen** keiner großen Schwankung unterlag.

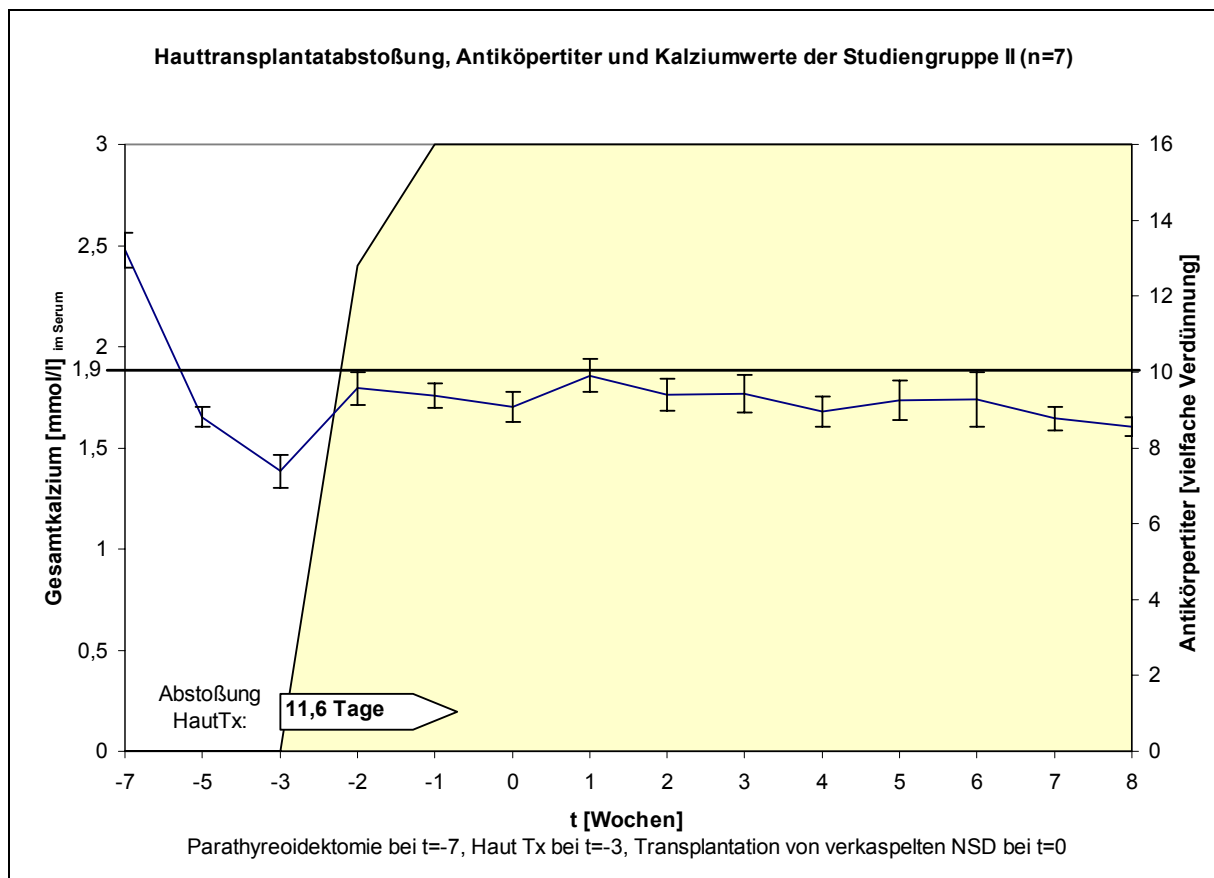


Abbildung 4.6.: Darstellung der Serumgesamtkalziumwerte, Antikörper und Hauttransplantatabstoßung der Studiengruppe II.

4.2.3 Kontrollgruppe II

Der Kalziumverlauf der Kontrollgruppe II zeigte den charakteristischen kurzen, sprunghaften Anstieg des Serumgesamtkalziums unmittelbar nach Transplantation der nativen Nebenschilddrüsenpartikel. Jedoch waren alle fünf Versuchstiere bereits 2 Wochen nach Allotransplantation der NSD wieder hypokalzämisch (unter 2,1mmol/l). Zwei Wochen nach Allotransplantation pendelten alle Kalziumwerte auf ein gleichbleibendes Niveau von 1,73mmol/l bei einer minimalen Standardabweichung von nur 0,06mmol/l. Bei allen Versuchstieren war somit bereits zwei Wochen nach Allotransplantation von einem totalen Transplantatausfall auszugehen.

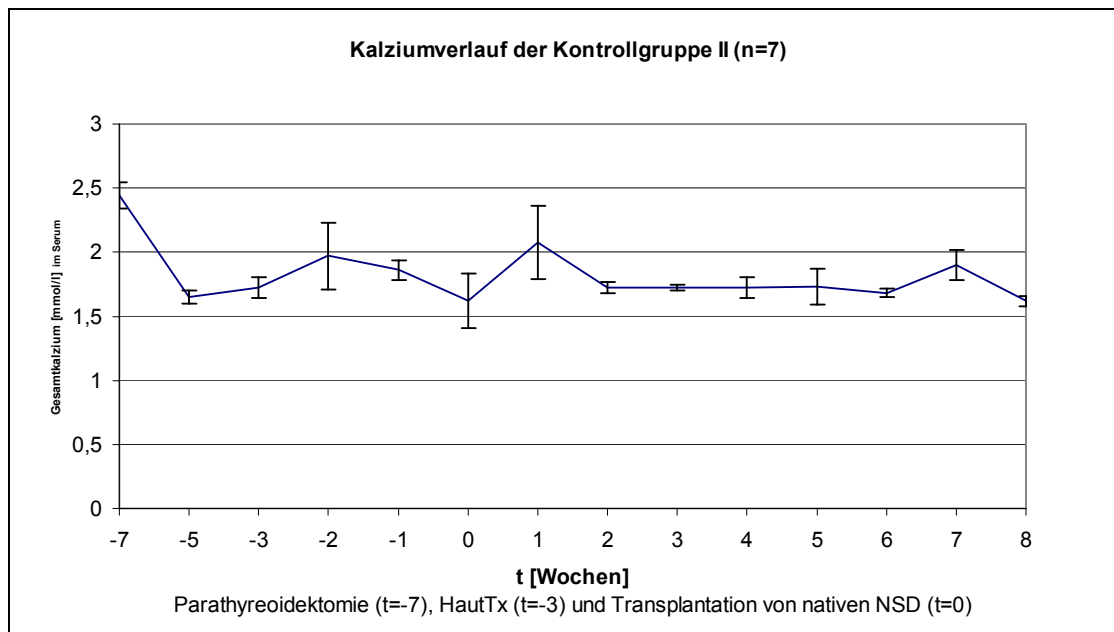


Abbildung 4.7.: Graphische Darstellung des Serumgesamtkalziums (Mittelwert mit Standardabweichung) der Kontrollgruppe II.

In der Kontrollgruppe II stiegen die Antikörpertiter nach dem starken Stimulus der Hauttransplantation bei nur 2 Tieren sofort auf den maximalen Wert. Während bei den restlichen drei Tieren die Antikörperbildung wesentlich schleppender war. Diese Tiere erreichten erst in der 5., 6. und 7. Woche den maximal messbaren Wert an spezifischen Antikörpern. Zum Zeitpunkt der Allotransplantation der nativen Nebenschilddrüsen hatte ein Tier nur einen Antikörpertiter von 1:2. Hier ist von einem noch nicht maximal stimulierten Immunsystem auszugehen.

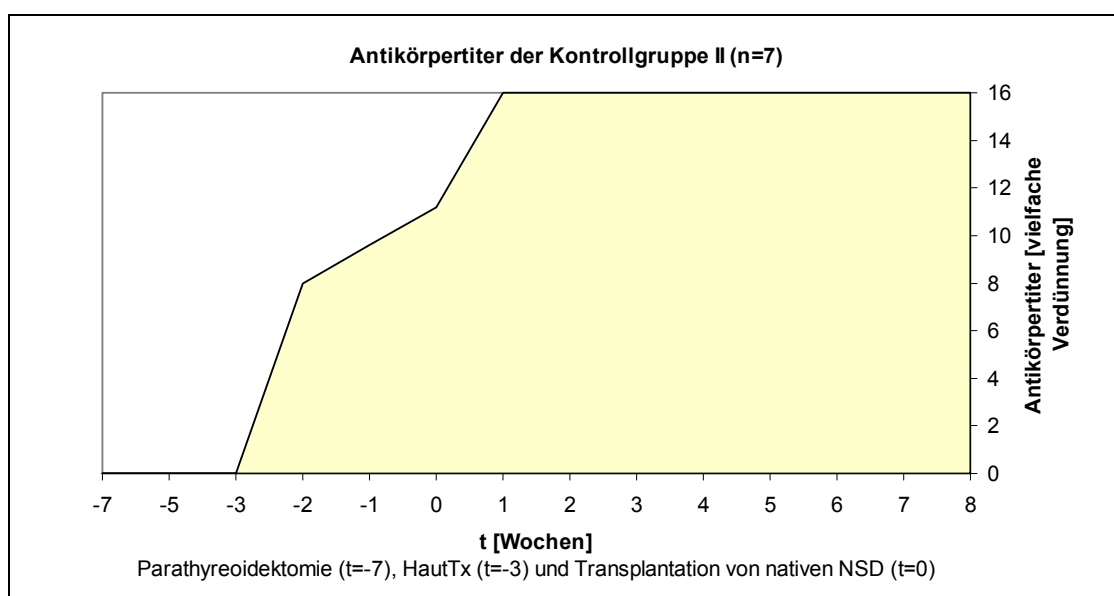


Abbildung 4.8.: Darstellung des mittleren Antikörpertiters der Kontrollgruppe II (16 gibt die größtmögliche Verdünnung (1:16) des Antikörpertiters an)

Das Hauttransplantat wurde nach durchschnittlich **11,8 Tagen** abgestoßen, wobei dieser Wert zwischen 11 und 14 Tagen schwankte und bei einer Varianz $v=1,7$ **Tagen** somit einer geringen Streuung unterlag. Eine Korrelation zwischen Antikörperbildung und Zeitpunkt der Hauttransplantatabstoßung konnte nicht festgestellt werden.

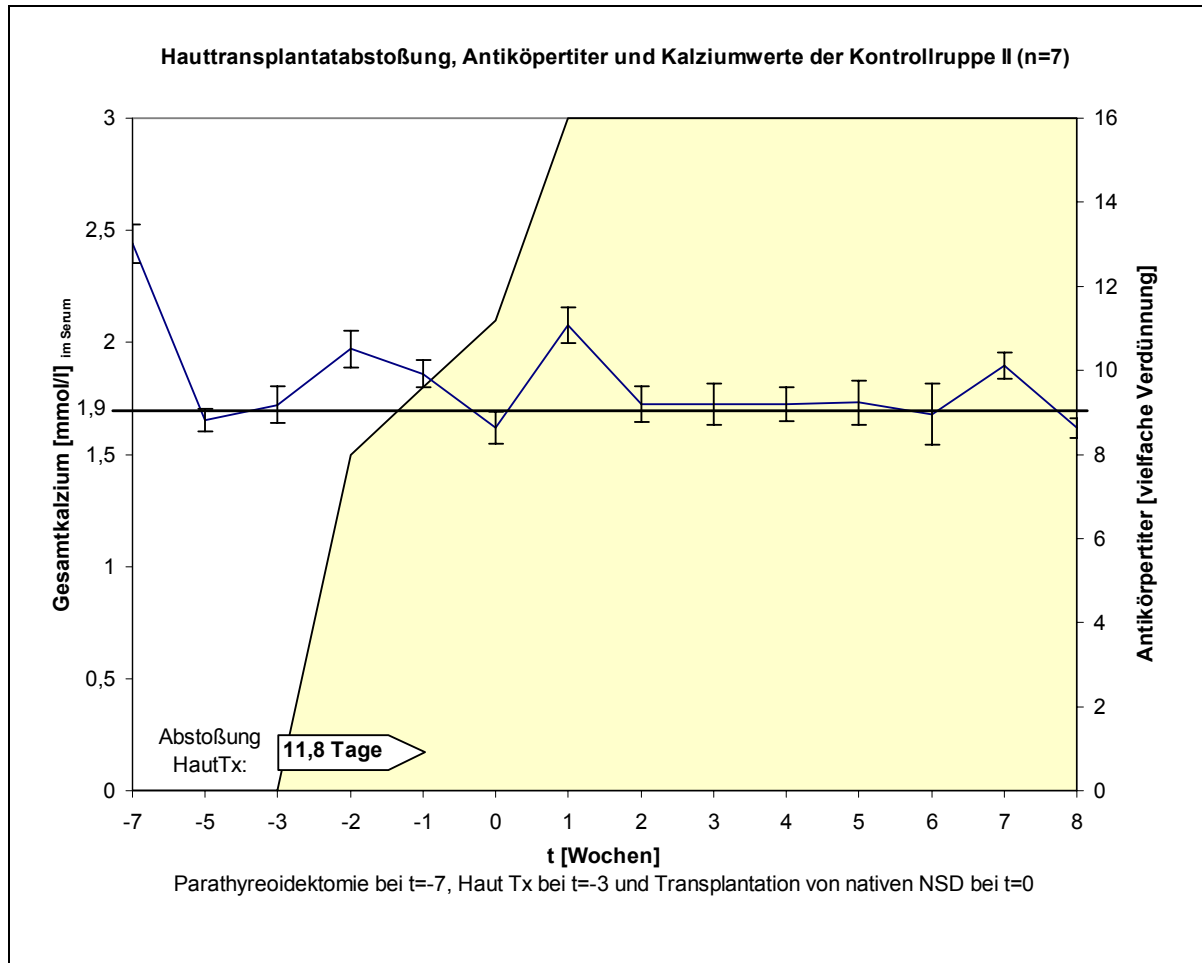


Abbildung 4.9.: Graphische Darstellung der Serumgesamtkalziumwerte, Antikörper und Hauttransplantatabstoßung der Kontrollgruppe II.

5. Diskussion

Durch die medikamentöse Immunsuppression ist die Transplantation vieler Organe heute möglich. Doch auch moderne Immunsuppressiva betreffen stets das gesamte Immunsystem und bewirken somit starke Nebenwirkungen. In die komplizierten Vorgänge des hochspezialisierten, menschlichen Immunsystems supprimierend einzugreifen bedeutet immer eine Verschlechterung der Resistenz gegenüber den täglichen Infektionserregern der Umwelt. Somit ergibt sich die Indikation zur systemischen Immunsuppression derzeit nur bei lebenswichtigen Transplantationen oder anderweitig unbeherrschbaren Zuständen. Bei der allogenen Nebenschilddrüsentransplantation würden die Nachteile der systemischen Immunsuppression die Vorteile der optimalen Kalziumhomöostase aufheben. So wird die allogene Transplantation von Nebenschilddrüsen derzeit bei Patienten durchgeführt, die entweder bereits immunsupprimiert sind, oder trotz Hormontherapie therapierefraktär bleiben und somit vital bedroht sind (Ross et al., 1979; Wells et al., 1974). Somit besteht der dringende Bedarf an einer Möglichkeit der allogenen Nebenschilddrüsentransplantation ohne dauerhafte, postoperative Immunsuppression. Das könnte dann die Basis einer nebenwirkungsfreien Therapie weiterer endokriner Mangelzustände darstellen.

Bisher scheiterten jedoch alle Versuche der allogenen Transplantation von Nebenschilddrüsen an der immunologischen Abstoßung. Für die Transplantatabstoßung werden vor allem die Oberflächenantigene des MHC Klasse I und II Komplexes verantwortlich gemacht. Der Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (Major Histocompatibility Complex: MHC) ist eine hoch polymorphe Gensequenz im kurzen Arm des Chromosom Nr. 6. Der MHC kann nach seinen Genprodukten in diese zwei großen Gruppen unterteilt werden (Snell, 1992):

MHC Klasse I Gene kodieren Glycoproteine, die auf fast allen Zelloberflächen zu finden sind. Sie präsentieren kurze, zelltypische Peptidketten. Da diese Glycoproteine von Leukozyten abgelesen werden können, bezeichnet man sie als Human Leucocyte Antigen: HLA. Die MHC Klasse I Gene kodieren 3 Gruppen von HLAs: HLA-A, HLA-B und HLA-C (Bjorkman und Burmeister, 1994).

MHC Klasse II Gene kodieren Glycoproteine, die hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Zellen vorkommen. Sie präsentieren dort verarbeitete

Antigene für T-Zellen. Auch hier wird das Genprodukt in drei Gruppen eingeteilt: HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR (Rotzschke und Falk, 1994).

Prinzipiell trägt jedes Gewebe MHC Klasse I Moleküle auf seiner Zelloberfläche und kann so von zuvor aktivierten zytotoxischen-T-Lymphozyten als körperfremd oder körpereigen erkannt werden. T-Lymphozyten werden aktiviert, indem Spenderzellen von antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers phagozytiert werden und als verarbeitetes Antigen auf MHC Klasse II Genprodukten den T-Lymphozyten präsentiert werden. So aktivierte T-Lymphozyten, die nun auf das Transplantat abgerichtet sind, können das Transplantat als körperfremd erkennen und setzen, über viele Zytokine gesteuert, die zelluläre Immunantwort in Gang. Auf diese Weise werden nicht nur T-Lymphozyten, sondern auch B-Zellen aktiviert. Die B-Zellen merken sich das präsentierte, spezifische Antigen und formen Antikörper, die exakt passen, dagegen. Bei Bedarf können diese B-Zellen zu Plasmazellen heranreifen und große Mengen dieser Antikörper in die Blutbahn sezernieren.

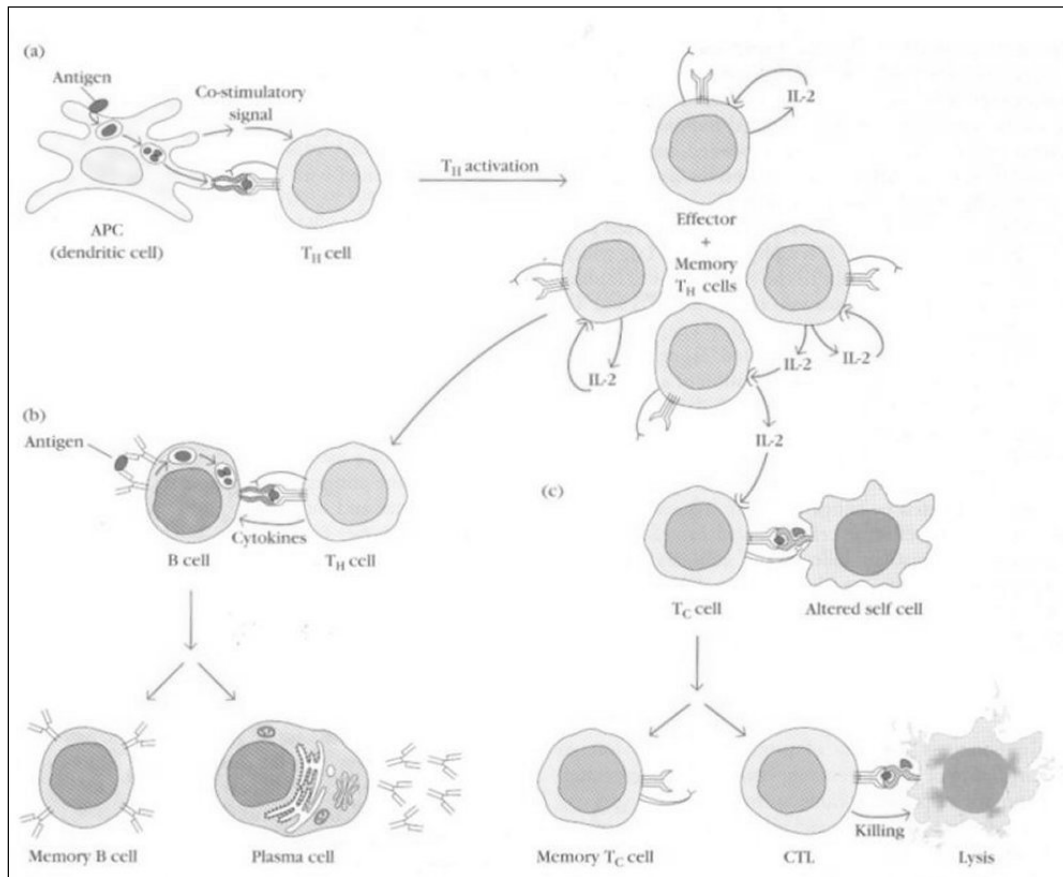


Abbildung 5.1.: Überblick über die zelluläre Immunantwort.

Nach Antigenpräsentation durch eine Antigenpräsentierende Zelle (APC), differenziert sich die T-Helferzelle (TH cell) unter Interleukin 2 (IL-2) Einfluß zur T-Killerzelle (TC cell), welche das zuvor präsentierte Oberflächenantigen erkennt und die zugehörige Zelle lysiert. Ausdifferenzierte T-Helferzellen regen außerdem B-Zellen (B cell) an, zur Plasmazelle zu werden, die spezifische, zytotoxische Antikörper produziert. (Immunology Third edition. Hrsg.: Kuby, 1996)

Die spezifischen Antikörper können die Transplantatzellen auf drei verschiedene Wege eliminieren:

1. Die Antikörper gehen feste Bindungen mit Oberflächenstrukturen mehrerer Zellen gleichzeitig ein und bilden somit große, unflexible Zellkonglomerate, die leichte Ziele für die Immunabwehr darstellen (typische Vertreter: IgM).
2. Die Antikörper markieren die Zelle und dienen als Andockstation für Makrophagen, die nun die Zelle phagozytieren können (typischer Vertreter: IgG).
3. Die Antikörper lysieren unter Anwesenheit von Komplement die Transplantatzellen. Sobald diese Antikörper ihr spezifisches Oberflächenantigen erkennen, binden sie daran und aktivieren die Komplementkaskade (Brekke et al., 1995). Das aktivierte Komplement bildet in wenigen Minuten den Zellwand-Angriffs-Komplex, der 70-100 Å große Poren in der Zellwand formt. Die Zelle ist nun nicht mehr in der Lage, ihr ionales Gleichgewicht aufrecht zu

erhalten und geht zugrunde. Diese Gruppe von Antikörpern ist also in der Lage die Zelle direkt zu zerstören und wird deshalb als „zytotoxisch“ bezeichnet (Frank und Fries, 1991).

Somit leiten sich zwei grundlegende Methoden zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung beim gesunden Immunsystem ab:

1. Die Verhinderung der Erkennung des Transplantates als fremd.
2. Die Verhinderung der Abstoßung durch das aktivierte Immunsystem.

Die Mikroenkapsulierung sollte sich beider Methoden bedienen. Die Alginathülle soll zum einen ein Austreten von Antigenen verhindern und somit einer Aktivierung des Immunsystems vorbeugen, zum anderen soll die Hülle eine Barriere bilden, die eine aktive Abstoßung verhindert. Da es jedoch in vivo trotz intakter Mikrokapseln immer wieder zum Transplantatausfall kommt, wird in dieser Studie die Frage untersucht, ob diese Barriere wirklich ein Zugriff des aktivierten Immunsystems verhindern kann. Gleichzeitig wurde parallel in einer anderen Arbeit gezeigt, dass die Mikroenkapsulierung eine Verzögerung der Erkennung des Transplantates bewirkt. Es konnte gezeigt werden, dass trotz der Barriere der Mikrokapsel das Empfängerimmunsystem in der Lage war, nach 2-5 Wochen spezifische Antikörper gegen das Transplantat im Kapselinneren zu bilden (noch nicht veröffentlicht).

Um möglichst realistische Verhältnisse zu schaffen, werden verschieden wirkende Methoden in vivo kombiniert:

- **Die Mikroenkapsulierung**, als zu testende Schutzhülle,
- **Die Gewebekulturpassage**, zur Herabsetzung der Antigenität,
- **Der Transplantationsort Muskel**, als klinisch durchführbarer Ort in vivo,
- **Die Hauttransplantation**, zur spezifischen Aktivierung des Immunsystems,
- **Der Lymphozytotoxische Antikörpertest**, als Qualitätskontrolle des spezifisch aktivierten Immunsystems.

Die Mikroenkapsulierung. 1964 entdeckte Chang erstmalig, dass semipermeable Membranen endokrines Gewebe von dem Immunsystem isolieren, aber gleichzeitig Nährstoffe und Hormone passieren zu lassen können. 1980 zeigten Lim und Sun eine erfolgreiche Immunisolierung von Inselzellen mittels der Mikroenkapsulierung in Alginat, welches aus Meeresalgen gewonnen wurde. In weiteren Studien wurden verschiedenste Polymere zur Immunisolierung verwendet, wobei Hydrogel

basierende Mikrokapseln die vielversprechendsten Ergebnisse *in vitro* und *in vivo* zeigten (Gentile et al., 1995; Hunkeler, 1997). Die Schwierigkeit bei der Mikroenkapsulierung besteht darin, dass Transplantat komplett in eine Membran zu schließen die biokompatibel ist und so fest, dass sie ihre Integrität bei mechanischen Irritationen behält und gleichzeitig die nutritive Versorgung gewährleistet. Hydrogele bestehen zu 95% aus Wasser und können ihre Stabilität durch drei verschiedene Möglichkeiten erhalten:

- durch ionisches Verknüpfen der geladenen Polymere, wie z.B. die Alginat;
- durch Abkühlen von erhitzten Polymeren, wie z.B. die Agarosegele; und
- durch chemische Vernetzung, wie z.B. Gelatine (Brodelius und Vandamme, 1987).

Von allen Hydrogelen werden die Alginat jedoch am häufigsten zur Mikroenkapsulierung verwendet, da sie die besten Ergebnisse in Langzeituntersuchungen bei endokrinen Allotransplantationen bisher ergaben (Kühtreiber, 1999). Alginat sind natürliche Polymere extrahiert aus Algen. Sie bestehen aus unverzweigten, anionischen Polysacchariden: der α -L-Guluronsäure (G-Blocks), der β -D-Mannuronsäure (M-Blocks) und gemischten Sequenzen (MG-Blocks), die durch multivalente anorganische Kationen (Ca^{2+} oder Ba^{2+}), die an die Karboxygruppe der G-Blocks binden, miteinander vernetzt werden (Smidsrød und Skjåk-Bræk, 1990). Geisen et al. zeigten 1990, dass Ba^{2+} Alginatkapseln wesentlich stabiler und einfacher herzustellen sind, als Ca^{2+} Alginatkapseln, da der osmotische Druck innerhalb der Ca^{2+} Alginatkapseln höher ist (De Vos, 1996 und 1997a). Allerdings müssen die freien Ba^{2+} Ionen schnell eliminiert werden, da sie in Zellen Kaliumkanäle blockieren und somit stark zytotoxisch wirken. Durch das Waschen der Ba^{2+} Alginatkapseln kurz nach dem Ausfällen in einer 6mMolaren Natriumsulfatlösung werden die überschüssigen Ba^{2+} Ionen gebunden und der zytotoxische Effekt minimiert (Zekorn und Bretzel, 1999). Um die Stabilität der Kapseln weiter zu verbessern, wurden Serumproteine in die Hülle inkorporiert, um so den kolloidosmotischen Druck zu erhöhen und einem Anschwellen der Kapsel *in vivo* vorzubeugen (Hillgärtner et al., 1999). Trotz aller Verbesserungen entstanden um die meisten leeren Alginatkapseln innerhalb der ersten 3 Wochen Fibrozytenansammlungen, obwohl diese Kapseln keinen Inhalt hatten. Diese Fremdkörperreaktion wurde auf den Anteil an M-Blocks in den verwendeten Alginaten zurückgeführt (Klöck et al., 1997; Kulseng et al., 1999). Neuere

Untersuchungen zeigen jedoch, dass diese Immunreaktionen auf Verunreinigungen (im Besonderen Polyphenole und Proteine) zurückzuführen sind und dass ultrahochgereinigte Alginat von frischen Algen keine signifikante fibrotische Reaktion zeigen (Zimmermann et al., 2000). Dieses ultrahochgereinigte Alginat, mit einer M-Block:G-Block Ratio von 70:30, wird in dieser Studie verwendet und zeigte in den jüngsten in vivo Versuchen die beste Viskosität und Biokompatibilität (York et al., 2000).

Doch trotz der Minimierung der Fremdkörperreaktion und ohne Bildung eines Fibrozytenwalls um die Alginatkapseln kommt es nach 5-6 Wochen zum Transplantatausfall (De Vos et al., 1999). Die meisten Autoren sehen diesen Transplantatausfall in einer Unterversorgung an Nährstoffen, besonders Sauerstoff, begründet (Schrezenmeier et al., 1994; De Vos et al., 1997b). Daher gehen die meisten Forschungen in die Richtung, eine Alginatmembran zu konstruieren, die durchlässiger für Sauerstoff und andere Nährstoffe ist. Es bleibt dabei jedoch ungewiss, ob die vollständige Immunisolation in vivo bei diesen Alginatmikrokapseln noch gewährleistet ist.

Gewebekulturpassage: Ziel aller Gewebepreparierungen ist es, die immunologisch relevanten Komponenten aus dem allogenen Transplantat zu eliminieren. Immunologisch besonders relevant sind Zellen, die MHC Klasse II Genprodukte auf ihrer Oberfläche tragen (Rotzschke und Falk, 1994). Das stimulierte Immunsystem produziert bestimmte Zytokine, wie γ -Interferon, die schwach immunogene Zellen anregen, MHC Klasse II Genprodukte zu exprimieren. So kommt es vor, dass unter bestimmten immunologischen Voraussetzungen Nebenschilddrüsenzellen auch MHC Klasse II Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen (Benoist und Mathis, 1990; Peters et al 1991). Das Immunsystem wird so zu noch größerer Aktivität gegen das körperfremde Material angeregt. Von Natur aus besonders viele MHC Klasse II Rezeptoren tragen Lymphozyten (Lafferty et al., 1983) und Gefäßendothelien (Leszczynski et al., 1988; Strom, 1988) und fungieren so als wichtige, antigenpräsentierende Immunstimulatoren. Um spezifisch aktivierte T-Lymphozyten bilden zu können, müssen zuvor naive T-Helferzellen von antigenpräsentierenden Zellen das körperfremde Antigen auf MHC Klasse II Genprodukten präsentiert bekommen. Dies kann durch sogenannte „Passenger Leukozyten“ geschehen. Das sind antigenpräsentierende Lymphozyten des Spenders, die in die Empfängerlymphbahn

auswandern und dort spenderspezifische Antigene den Empfängerlymphozyten präsentieren (Lafferty et al., 1983). In Verfahren wie der Gewebekulturpassage konnte nachgewiesen werden, dass diese „Passanger Leukozyten“ aus dem Gewebe auswandern und die Gefäßendothelien zerstört, bzw. denaturiert werden. So kann die Immunogenität des Spendergewebes durch die Gewebekulturpassage verringert, bzw. zum Zwecke der Transplantation positiv moduliert werden (Lafferty et al., 1976; Starling et al., 1977; Bowen et al., 1980).

Prinzipiell kommen als weitere, wichtigste Verfahren der Immunmodulation eine Bestrahlung des Gewebes mit Gammastrahlung (Wagner und Rothmund, 1988), UV-Licht (Weber et al., 1991), eine Nacktmauspassage (Sollinger et al., 1983) oder die Sauerstoffüberdruckbehandlung (Talmage und Dart, 1978) in Betracht.

Aufgrund guter Ergebnisse in der autologen Nebenschilddrüsentransplantation und eigener Erfahrung (Rothmund und Wagner, 1987) wurde in dieser Studie eine kurze Gewebekulturpassage als immunmodulatorisches Verfahren gewählt, um zusammen mit der Mikroenkapsulierung synergistische Effekte zu erzielen. Über die optimale Länge der Gewebekulturpassage gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Während Talmage und Lafferty 1976 eine Kulturzeit von 20 bis 27 Tagen als optimal ansahen, postulierte Raaf 1974, dass bei Kulturzeiten zwischen 3 und 42 Tagen kein Unterschied in der Abstoßungsdauer bestehe. Gough und Finnimore stellten 1980 sogar fest, dass eine dreiwöchige Gewebekulturpassage, sowohl mit spezifischem Antilymphozytenserum gegen die Spenderzellen, als auch ohne, keinen Unterschied in der Überlebenszeit der Nebenschilddrüsentransplantate bewirkte. Einig sind sich jedoch alle Autoren, dass mit steigender Länge der Gewebekulturpassage, ein unphysiologischer Stress auf die Zellen ausgeübt wird und somit mehr Zellen zu Grunde gehen, je länger die Kulturzeit ist (Lafferty et al., 1975 und 1976; Sollinger et al., 1977). In dieser Studie wird deshalb eine dreitägige Gewebekulturpassage in RPMI 1640 Nährmedium mit 10% Empfängerserum durchgeführt. Außerdem wird dem Nährmedium 0,03% Kalzium zugeführt, um eine endokrine Stimulation der Nebenschilddrüsenpartikel zu vermeiden. Es kommt dabei zu keiner mikroskopisch sichtbaren Strukturveränderung oder Untergang von Zellen.

Der Transplantationsort Muskel: Bei der Wahl eines geeigneten Transplantationsortes muss ein Kompromiss zwischen nutritiver Versorgung (Anschluss an das Blutsystem) und Erreichbarkeit durch das Immunsystem

(lymphatische Drainage) gefunden werden. So transplantierte Landois 1911 Nebenschilddrüsen in die Vena Jugularis und ging von einer besonders guten nutritiven Versorgung aus. In den darauffolgenden Jahrzehnten wurde klar, dass das vorbeiströmende Blut eben nicht nur Nährstoffe mit sich bringt, sondern auch Leukozyten, die für die Transplantatabstoßung hauptsächlich verantwortlich gemacht werden. Es wurden dann Transplantationsorte als privilegiert gesehen, die vom Blutsystem und der Lymphe besonders abgeschirmt sind. So transplantierten Sturgis und Castelanos 1962 erstmals Nebenschilddrüsen in die vordere Augenkammer und konnten teilweise Anwacherfolge erreichen. Noch längere Transplantatüberlebenszeiten ohne Immunsuppression wurden durch eine Transplantation in den Hoden (Dib-Kuri et al., 1975) und in Hirnventrikel (Yao et al., 1993) erreicht. Das Problem bei diesen Transplantationsorten ist jedoch neben der klinischen Durchführbarkeit, die Tatsache, dass endokrines Gewebe seine Hormone zum einem in die Blutbahn abgeben muss damit sie dort wirken, und zum anderen den Effekt der Abgabe durch ständige Messung der Serumelektrolyte (in diesem Fall Kalzium) im Sinne eines Regelkreislaufes kontrollieren muss. Zwar kann Parathormon durch die Bluthirnschranke oder den Schlemm'schen Kanal diffundieren, aber dafür stimmt die Kalziumkonzentration des Liquorsystems oder des Kammerwassers nicht mit der des Blutserums überein. 1976 zeigten Naji und Barker eine verlängerte Transplantatüberlebenszeit von Nebenschilddrüsen an lymphatisch armen Orten wie der Muskulatur im Vergleich zu lymphatisch gut drainierten Orten wie einer Hauttasche, der Leber oder der Niere. In dieser Studie fiel deshalb die Wahl des Transplantationsortes auf die Muskulatur. In Analogie zur menschlichen Autotransplantation von Nebenschilddrüsen kann hier von einem guten Kompromiss zwischen Blutversorgung, lymphatischer Drainage und Invasivität ausgegangen werden. Außerdem wäre bei einem nur begrenzenden Transplantatüberleben eine Applikation von verkapselten Nebenschilddrüsen in die Muskulatur über eine Depotspritze denkbar.

Der lymphozytotoxische Antikörpertest wird seit den achtziger Jahren an Transplantationszentren durchgeführt, um eine Vorsensibilisierung des Empfängers auf das Spendergewebe auszuschließen (Hopkins K.A., 1990). Besonders vorteilhaft bei diesem Test ist neben seiner einfachen, etablierten und kostengünstigen Durchführung, dass er nur die spezifischen Antikörper misst, die Komplement binden und so das Transplantat direkt schädigen (Sumitran-Karuppan,

1999). Besonders bei diesen Antikörpern der Gruppe IgG³ und IgM ist es denkbar, dass sie die Mikrokapsel durchdringen und zum Transplantatausfall führen.

Die allogene Hauttransplantation und ihre Abstoßungszeit ist ebenfalls ein gut erforschter funktioneller Parameter zur Messung der Immunaktivierung. Da allogene Hauttransplantate sehr immunogen sind, stimulieren sie das Immunsystem beim ersten Kontakt so stark, dass beim erneuten Transplantationsversuch die Haut deutlich schneller abgestoßen wird (Hildemann, 1970). Allerdings war bisher nicht bewiesen, dass eine Hypokalzämie nach Parathyreidektomie keinen Einfluss auf die Transplantatabstoßung hat.

Zu diesem Zwecke wurden die **Studiengruppen I (Test- und Kontrollgruppe)** konzipiert. Alle Versuchstiere der Testgruppe I sind stark hypokalzämisch, trotzdem zeigen sowohl die Hautabstoßungen, als auch die Antikörperbildung beider Gruppen, dass die Hypokalzämie nach Parathyreidektomie keinen Einfluss auf die Immunkompetenz und Immunreaktion hat. In beiden Gruppen steigen die spezifischen Antikörper fast gleichermaßen schnell an und das erste Hauttransplantat wird ca. 12 Tage toleriert. Alle Versuchstiere beider Gruppen reagieren auf den starken Immunstimulus mit der raschen Bildung von zytotoxischen Antikörpern und einer starken Immunsensibilisierung, die hauptverantwortlich ist für die typische Akutphase Abstoßung des zweiten Hauttransplantates nach nur 6 Tagen (Wonigeit und Pichlmayr, 1997). Diese Gruppen dienten außerdem der Etablierung der Methode der allogenen Hauttransplantation. Die Schwierigkeit besteht in der sorgfältigen Präparation des Transplantationsortes und des Hauttransplantates und im Anlegen eines Druckverbandes, der das Transplantat anwachsen lässt, aber das Tier nicht zu sehr in seiner Bewegung einschränkt. In Vorversuchen wurden deshalb isogene Hauttransplantate mit guten Einwacherfolgen durchgeführt. Die Isotransplantate wurden entgegengesetzt der Fellrichtung der Empfängertiere transplantiert. Nach 6 Wochen erinnerte nur noch die Unregelmäßigkeit in der Fellrichtung an die Hauttransplantation.

Die Deutlichkeit der Ergebnisse der **Studiengruppen II (Test- und Kontrollgruppe)** entspricht jedoch kaum den Erwartungen. In beiden Gruppen verläuft die Immunstimulation mit der allogenen Hauttransplantation problemlos. Die Hauttransplantate werden nach ca. 12 Tagen abgestoßen, der Antikörpertiter steigt binnen 3 beziehungsweise 4 Wochen auf maximale Werte. Das heißt, dass 4

Wochen nach der Hauttransplantation die Immunsysteme aller Versuchstiere maximal stimuliert sind und auf Hochtouren spezifische Antikörper gegen Transplantatzellen des allogenen Spenders bilden.

In dieses hochstimulierte Immunsystem werden nun in der **Kontrollgruppe** native, also ungeschützte, Nebenschilddrüsentransplantate eingebracht. Wie zu erwarten, werden diese sofort als körperfremd erkannt und heftig abgestoßen. In der ersten Woche nach Nebenschilddrüsentransplantation ist noch soviel Gewebe intakt, dass genug Parathormon gebildet wird, um niedrignormale Kalziumwerte im Blut zu erhalten. Jedoch ist schon in der zweiten Woche nach Transplantation von einem totalen Transplantatsausfall (mit Kalziumwerten dauerhaft unter 1,9mmol/l) auszugehen.

Die Testgruppe II beantwortet die Fragestellung dieser Studie hoch signifikant ($\alpha < 0,1$). Nach der Transplantation von verkapselten Nebenschilddrüsen in das maximal stimulierte Immunsystem können die Transplantate ihre Funktion erst gar nicht aufnehmen. Die Kalziumwerte bleiben dauerhaft unter 1,9mmol/l. Auch unterliegen die Kalziumwerte kaum einer Schwankung bei minimaler Streuung (Standartabweichung von 0,08mmol/l). Der totale Transplantationsausfall unmittelbar nach der Transplantation lässt sich auf das stimulierte Immunsystem zurückführen, da es bei anderen Versuchen der Arbeitsgruppe noch nie zum sofortigen Transplantatausfall von verkapselten Nebenschilddrüsen kam (Hasse et al., 1994b; Hasse et al., 1996; Hasse et al., 1997a). Ebenfalls aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Mikrokapseln eine leichte Verzögerung der Parathormonausschüttung ins Blut bewirken. Dadurch lässt sich der sprunghafte Serumkalziumanstieg in der Kontrollgruppe mit nativen Nebenschilddrüsen kurz nach Transplantation erklären, der bei Studiengruppen mit mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsen typischerweise fehlt. Da die Nebenschilddrüsentransplantate in der Studiengruppe II offensichtlich so schnell zerstört werden, dass das gebildete Parathormon die Barriere der Mikrokapsel erst gar nicht überwinden kann, fehlt die kurze Normalisierung des Serumkalziums, wie sie in der Kontrollgruppe mit unverkapselten Transplantaten vorhanden ist.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass es zu keinen signifikanten ($\alpha < 0,5$) Unterschieden im Serumkalzium bei der Implantation von nativen Nebenschilddrüsen zu mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsen kommt. Das Serumkalzium steigt bei Implantation von verkapselten Nebenschilddrüsen in ein

Empfängertier mit spezifisch vorstimuliertem Immunsystem gar nicht an. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Mikrokapseln nicht im Stande sind, das Transplantat vor einer Abstoßungsreaktion zu schützen. Da es bei fast allen Versuchstieren bereits ab der ersten Woche zum totalen Transplantatausfall kommt, ist nicht von einem zufälligen Herstellungsfehler der Mikrokapsel auszugehen. Es ist eher wahrscheinlich das zytotoxische Antikörper der Gruppe IgG³ mit einer Molekulargröße von 150k Dalton (Kuby J., 1994) die Kapselmembranen durchdringen und zusammen mit Komplement die Transplantatzellen direkt zerstören, da die Alginate Poren besitzen, die für Moleküle dieser Größe passierbar sind (Gåserød et al., 1999).

Ausblick: Trotz der aufschlussreichen Ergebnisse dieser Studie, bleiben einige immunologische Fragen in der Transplantation mit Mikrokapseln offen. Die zytotoxischen Antikörper scheinen für die Abstoßungsreaktion verantwortlich zu sein. Allerdings gibt es mehrere Subklassen von zytotoxischen Antikörpern (Kuby J., 1994). Die Auswertung der Antikörperseren mittels flowzytometrischer Messungen oder einem enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) könnte Aufschluss darüber geben, welche Antikörper quantitativ eine Rolle bei der Transplantatabstoßung spielen (Loewenthal et al., 1999). Auch müsste bewiesen werden, dass genau diese Antikörper durch die intakte Kapselwand diffundieren können. Hierzu müsste nach Transplantatexplantation eine immunhistochemische Färbung der mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsenzellen vorgenommen werden. Eine nach 12 Wochen explantierte Mikrokapsel zeigte eine perikapsuläre Makrophageninfiltration und Zerstörung der Kapselwand, welche den Transplantatausfall erklären würde (Hasse et al., 1999), jedoch bleibt unklar, wann die Kapsel zerstört wurde. Weiteren Aufschluss über diese Fragestellung könnten wöchentliche Transplantatexplantationen mikroskopischen Kontrollen auf Integrität der Alginatkapseln bringen.

Der Einbau der mikroenkapsulierten Transplantate in die Bauchmuskulatur hat sich in dieser Studie zwar nicht als nachteilig erwiesen, aber eine nähere Untersuchung anderer Transplantationsorte könnte den Kompromiss zwischen lymphatischer Drainage, Sauerstoffversorgung, mechanischer Beanspruchung und einfacher Durchführbarkeit noch optimieren. Eine experimentelle Implantation in die Nierenkapsel, frei in die Bauchhöhle, in eine Gefäßprothese oder den Hoden wäre sinnvoll und durchführbar.

Insbesondere am Anfang ist die immunologische Adaptation des Empfängers an das Transplantat Voraussetzung für den klinischen Transplantationserfolg (Wonigeit und Pichlmayer, 1997). Um deshalb bessere Einwachserfolge zu erreichen und eine initiale Abstoßungsreaktion zu verhindern wäre eine kurzzeitige Immunsuppression sinnvoll. Dies könnte zum einen systemisch mit Immunsuppressiva durchgeführt werden, aber auch ein lokaler Einbau von immunsuppressiv wirksamen Substanzen in die Mikrokapsel wäre denkbar.

Durch die Benutzung neuer, ultrahochgereinigter, hochstabiler Bariumalginat kann die Abstoßungsreaktion bei leeren Kapseln auf ein Minimum reduziert und die Stabilität in vivo optimiert werden (York et al., 2000; Zimmermann et al., 2000). Die Überlebenszeit der Transplantate hat sich aber nur wenig verbessert. Dies kann, wie bisher vermutet, an einer Mangelversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff liegen (Van Schilfgaarde und De Vos, 1999). Nach den Erkenntnissen dieser Studie muss jedoch auch eine Abstoßungsreaktion durch kleine Antikörper berücksichtigt werden, die durch die Kapselwand dringen können. Die Mikroenkapsulierungstechnologie muss bei der weiteren Optimierung und Permeabilitätssteigerung diesen Sachverhalt berücksichtigen.

Um gegen ein Transplantat Antikörper bilden zu können, muss das Empfängerimmunsystem in direkten Kontakt mit den Spenderzellen treten. Eine Mikrokapsel, die diesen Kontakt dauerhaft verhindert, würde der Abstoßungsreaktion vorbeugen, auch wenn die Kapselwand für Antikörper permeabel wäre. Der Immunstatus des Empfängers müsste durch regelmäßige Kontrollen der spezifischen Antikörper **nach** der Transplantation kontrolliert werden.

Um den Transplantatausfall durch eine Abstoßungsreaktion mit zytotoxischen Antikörpern gegen einen spezifischen Spender zu kompensieren, wäre eine Studie mit Spenderzellen von genetisch verschiedenen Stämmen (Pooling) sinnvoll.

Resümee: Aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich schlussfolgern, dass die verwendeten Mikrokapseln dem Antikörperansturm eines sensibilisierten Immunsystems nicht standhalten können. Die vernetzten Polysaccharidketten der verwendeten Alginat sind für Teile des Immunsystems, wie Antikörper und Komplement, durchlässig. Diese Durchlässigkeit bewirkt, dass die allogenen Transplantate vom vorstimulierten Immunsystem sofort abgestoßen werden.

Der Erfolg der bisher entwickelten Alginat-Kapseln ist also darauf zurückzuführen, dass ein direkter Kontakt des allogenen Transplantatgewebes mit dem Empfängerimmunsystem temporär verhindert werden konnte. Denn ohne direkten Kontakt kann es nicht zur Immunsensibilisierung und Abstoßungsreaktion kommen. Für diese Möglichkeit spricht auch, dass eine gewisse Kapselpermeabilität nicht unterschritten werden darf, da sonst die nutritive Versorgung des Kapselinhaltes nicht mehr möglich ist.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen jedoch, dass der immunologische Faktor in vivo stärker berücksichtigt werden muss als bisher geschehen. In zukünftigen vivo Studien mit Alginaten sollte das Blut des Empfängers auf spezifische zytotoxische Antikörper regelmäßig untersucht werden, um frühzeitig Abstoßungsmechanismen zu erkennen.

6. Zusammenfassung

Der permanente, symptomatische Hypoparathyreoidismus ist ein häufiges und klinisch relevantes Problem. Seine medikamentöse Therapie ist von allen endokrinen Unterfunktionsstörungen aufgrund der vielfältigen Stoffwechselfunktionen des Parathormons eine der schwierigsten, oft unvollständig und damit unbefriedigend. Deshalb gilt der Bedarf nach kausaler Therapie in Form der transgenen Transplantation der Parathyreoidea als unbestritten. Andererseits ist dieses Mangelsyndrom nur selten lebensbedrohlich. Deshalb ist post transplantationem eine systemische Immunsuppression nicht gerechtfertigt. Ohne diese blieb die klinische Allotransplantation der Parathyreoidea jedoch bisher langfristig erfolglos.

Aus Studien zur Inselzelltransplantation wurde eine Technik der Immunisolation modifiziert und weiterentwickelt, bei der das zu transplantierende Gewebe mit einer semipermeablen Membran, bestehend aus dem Naturstoff Alginat, umhüllt wird - die Mikroenkapsulierung. In Kombination mit einer Gewebekulturpassage, die in Einzelfällen die Transplantatfunktion verlängern kann, gelangen damit die ersten Iso-, Allo- und Xenotransplantationen der Parathyreoidea im Langzeittierversuch ohne Immunsuppression. Jedoch sind die grundlegenden Funktionen der Immunisolation durch die Mikro kapseln ungeklärt. Zwei verschiedene Wege der Funktion sind denkbar. Zum einen verhindert die Mikroenkapsulierung eine Sensibilisierung des Empfängers, zum anderen schützt die Mikroenkapsulierung das Transplantat vor der Immunantwort. Vor weiteren klinischen Allotransplantationen der Parathyreoidea unter Verwendung der Mikroenkapsulierungstechnologie ist es unabdingbar, zu untersuchen, inwieweit die Mikro kapseln das Transplantat vor einer Abstoßung durch das spezifisch stimulierte Immunsystem schützen können.

Für alle Untersuchungen wurden männliche Ratten von zwei genetisch unterschiedlichen Inzuchtstämmen (Lewis and Dark-Agouti) verwendet. Die exakte Fallzahlberechnung zur Erlangung signifikanter Ergebnisse wurde vorher durch das Institut für theoretische Chirurgie der Universität Marburg durchgeführt. Nach Parathyreoidektomie der Empfängertiere wurde eine allogene Hauttransplantation der Spendertiere zur Immunstimulation durchgeführt. In der Testgruppe (n = 7 Tiere) wurde 3 Wochen danach in das maximal vorstimulierte Immunsystem eine

allogene Transplantation von mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsen durchgeführt. In der Kontrollgruppe (n = 7 Tiere) wurde *natives* Nebenschilddrüsengewebe allotransplantiert. Die zytotoxischen Antikörper und die Transplantatfunktion (Messung des Serumkalziums) wurden ein Mal wöchentlich für insgesamt mindestens 8 Wochen nach der letzten Transplantation bestimmt. Ein Transplantatversagen wurde als Abfall der Kalziumspiegel von über 2,1 mmol/l auf < 1.9 mmol/l definiert. Die zytotoxischen Antikörper wurden mit den maximal möglichen Titern von 5 Tieren, die innerhalb von 2 Wochen eine allogene Hauttransplantation erhielten, verglichen.

Ergebnis dieser Studie war, dass erstaunlicherweise alle Tiere der Testgruppe keinerlei Transplantationserfolg aufwiesen, kein Tier entwickelte eine Normokalziämie während der gesamten Testperiode. Die allogenen Hauttransplantate wurden innerhalb von 11,6 d abgestoßen. Ein sofortiger Anstieg der zytotoxischen Antikörper nach allogenen Hauttransplantationen bei allen Empfängertieren dokumentierte die Immunstimulation.

Schlussfolgerung: Unsere Studie untersucht erstmalig systematisch die Alginatstabilität und Permeabilität gegenüber starken immunologischen Reizen anhand des Modells der Allotransplantation von Nebenschilddrüsengewebe *in vivo*. Dabei scheinen immunologische Faktoren, wie z.B. zytotoxische Antikörper, die immunologische Barriere der Mikrokapsel passieren zu können und rasch zu einer Destruktion der Transplantate zu führen. Somit bedarf es offensichtlich verschiedener Verfahren zur Reduktion der Immunogenität und der Immunisation, um eine suffiziente Funktion von transgenen Nebenschilddrüsentransplantaten ohne Immunsuppression langfristig zu gewährleisten. Ziel weiterer Studien ist die erfolgreiche Kombination dieser unterschiedlichen Methoden und die Optimierung der Eigenschaften von Mikrokapseln anhand dieser immunologischen Kenntnisse.

6. Literaturverzeichnis

1. **Arnaud G., Tsao H.S., Oldham S.B.:** Native human parathyroid hormone: An immunchemical investigation. Proc. Nat. Acad. Sci. 1970; 67: 415-416
2. **Benoist C., Mathis D.:** Regulation of major histocompatibility complex class II genes: X,Y and other letters of the alphabet. Annu. Rev. Immunol. 1990; 8: 681-689
3. **Bjerneroth G., Juhlin C., Rastad J., Åkerström G., Klareskog L.:** MHC Class I and II antigen expression on parathyroid cells and prospects for their allogeneic transplantation. Transplantation 1993; 56: 717-721
4. **Bjorkman, Burmeister:** Structures of two classes of MHC molecules elucidated: crucial differences and similarities. Curr. Opin. Struc. Biol. 1994; 4: 852-6
5. **Blumenthal H.T., Walsh L.B.:** Survival of guinea pig thyroid and parathyroid autotransplants previously subjected to extremely low temperatures. Proc. Soc. Esp. Biol. 1950; 73: 62
6. **Bowen K. M., Andrus L., Lafferty K.J.:** Successful allotransplantation of mouse pancreatic islets to nonimmunosuppressed recipients. Diabetes 1980; 29(1): 98-104
7. **Brekke O.H., Michaelsen T.E., Sandlie I.:** The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge ? Immunol. Today 1995; 16: 85-102
8. **Brodelius P., Vandamme E.J.:** Immobilized cell systems. In H.-J. Rehm and G.Reed: Biotechnology, Vol 7a. Verlag Chemie, Weinheim, Germany: 405-463
9. **Chang T.M.S.:** Semipermeable microcapsules. Science 1964; 146: 534-552
10. **Clauß und Ebner:** Grundlagen der Statistik, Band 1, 4.unveränderte Auflage. Harri Deutsch Verlag, Thun 1982
11. **Clayton H.A., James R.F.L., London N.J.M.:** Islet Microencapsulation: A Review. Acta Diabetol. 1993; 30: 181-189
12. **Collip J.B.:** The extraction of a parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and which regulates the level of blood calcium. J. biol. Chem.1925; 63: 293-301

13. **Coradin T., Merecey E., Lisnard L., Livage J.:** Design of silicia-coated microcapsules for bioencapsulation. *Chem. Commun.* 2001; 23: 2496-2497
14. **Darquy S., Reach G.:** Immunoisolation of pancreatic B cells by microencapsulation. *Diabetologia* 1985; 28: 776-780
15. **Darquy S., Sun M.A.:** Microencapsulation of parathyroid cells as a bioartificial parathyroid. *Trans. Am. Soc. Artif. Intren. Organs* 1987; 33: 356-358
16. **De Vos P., De Haan B.J., Wolters G.H.J., Strubbe J.H., Van Schilfgaarde R.:** Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets. *Transplantation* 1996; 62: 888-893
17. **De Vos P., De Haan B.J., Wolters G.H.J., Strubbe J.H., Van Schilfgaarde R.:** Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate – polylysine microcapsules. *Biomaterials* 1997a; 18: 273-278
18. **De Vos P., De Haan B.J., Wolters G.H.J., Strubbe J.H., Van Schilfgaarde R.:** Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 1997b; 40: 262-270
19. **De Vos P., Van Straaten J.F.M., Nieuwenhuizen A.G., De Groot M., Ploeg R.J., De Haan B.J., Van Schilfgaarde R.:** Why do microencapsulatet islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth ? *Diabetes* 1999; 48: 1381-1388
20. **Demeester-Mirkin N., Hooghe L., Van Geertruyden J., De Maertelaer J.:** Hypocalcemia after thyroidectomy. *Arch. Surg.* 1992; 127: 854-862
21. **Dib-Kuri A., Revilla A., Chavez-Peon F.:** Successful rat parathyroid allograft and xenografts to the testis without immunosuppression. *Transpl. Proc.* 1975; 7: 753-756
22. **Frank M. M., Fries L.F.:** The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 1991; 12: 322-345
23. **Gann D.S., Paone J.F.:** Delayed hypocalcemia after thyroidectomy dor Graves' disease is prevented by parathyroid autotransplantation. *Ann. Surg.* 1979; 190: 508-513
24. **Gåserød O., Sannes A., Skjåk-Bræk G.:** Microcapsules of alginat-chitosan. A study of capsule stability and permeability. *Biomaterials* 1999; 20: 773-783

25. **Geisen K., Deutschländer H., Gorbach S., Klenke C., Zimmermann U.:** Function of barium alginate microencapsulated xenogenic islets in different diabetic mouse models. Shafrir E. ed.: *Frontiers in diabetes research. Lessons from animal Diabetes III.* John Libbey London 1990: 142-150
26. **Gentile F.H., Doherty E.J., Rein D.H., Shoichet M.S., Winn S.H.:** Polymer science for macroencapsulation of cells for central nervous system transplantation. *Reactive Polymers* 1995; 25: 207-227
27. **Gley E.:** Functions of the thyroid gland. *Lancet* 1892; 142: 62
28. **Gough I.R., Finnimore M.:** Rat parathyroid transplantation. Allograft pretreatment with organ culture and antilymphocyte serum. *Transplantation* 1980; 29: 149-152
29. **Grant et al.:** Biological interactions between polysaccharides and divalente cations: The egg-box-model. *FEBS Letters* 1973; 32: 195-198
30. **Habener J.F.:** Parathyroid hormon biosynthesis. *Endocrinology.* De Groot, L.J. New York, San Francisco, London. Grune and Stratton 1979: 599
31. **Hanson A.M.:** The hydrochloric X sicca: A parathyroid preparation for intramuscular injection. *Milit. Surgn.* 1924; 54: 218-221
32. **Harris S.C.:** Thyroid and parathyroid surgical complications. *Am. J. of Surg.* 1992; 163: 476-488
33. **Hasse C., Stinner B., Wagner P.K., Rothmund M.:** Experimentelle Allotransplantation von Rattennebenschilddrüsen: Nachweis der Langzeitfunktion ohne Immunsuppression. *Langenbecks Arch. Chir., Chir. Forum f. exp. u. klein. Forsch.* 1991; 69-74
34. **Hasse C., Stinner B., Schrezenmeier J., Rothmund M.:** Erfolgreiche Xenotransplantation von mikroenkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe: Nachweis der Langzeitfunktion im Tierversuch. *Langenbecks Arch. Chir., Chir. Forum '94 f. exp. U. klein. Forsch.* 1994a: 209-214
35. **Hasse C. et al.:** Successful allotransplantation of microencapsulated parathyroid in rats. *World J. Surg.* 1994b; 18: 630-634
36. **Hasse C., Klöck G., Zielke A., Schlosser A., Barth P. Zimmermann U., Rothmund M.:** Transplantation of Parathyroid tissue in experimental hypoparathyroidism: In vitro and in vivo function of parathyroid tissue microencapsulated with a novel amitogenic alginate. *Int. J. Artificial Organs* 1996; 19: 1-7

37. **Hasse C., Klöck G., Schlosser A., Zimmermann U., Rothmund M.:**
Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *The Lancet* 1997a; 350:1296-97
38. **Hasse C. et al. :** First successful xenotransplantation of microencapsulated human parathyroid tissue in experimental hypoparathyroidism: long term function without immunosuppression. *J. Microencapsul* 1997b; 14: 617-626
39. **Hasse C., Zielke A., Klöck G., Schlosser A., Zimmermann U., Rothmund M.:** Isotransplantation of microencapsulated parathyroid tissue in rats. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 1997c; 105: 53-56
40. **Hasse C. et al.:** Amitogenic alginates: key to the first clinical application of microencapsulation technology. *World J. Surg.* 1998; 22: 659-665
41. **Hasse C., Zielke A., Zimmermann U., Rothmund M.:** Transplantation of microencapsulated parathyroid tissue: clinical background, methods and current status of research. In Kühnleiber W., Lanza R., Chick W.: *Cell encapsulation technology and therapeutics*. Birkhäuser, Boston 1999: 240-251
42. **Hildemann W.H.:** Components and concepts of antigenic strength. *Transplant. Rev.* 1970; 3: 5-21
43. **Hillgärtner M., Zimmermann H., Mimiets S., Jork A., Thürmer F., Schneider H., Nöth U., Hasse C., et al.:** Immunoisolation of transplants by entrapment in ¹⁹F-labelled alginate gels: production, biocompatibility, stability and longterm monitoring of functional integrity. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 1999; 30: 783-792
44. **Hopkins K.A.:** Basic microlymphocytotoxicity test. In: Zachary A.A., Terisi G.A., eds. *ASHI laboratory manual*, 2nd ed.: American society of histocompatibility and immunogenetics. 1990: 195
45. **Hunkeler D.:** Polymers for bioartificial organs. *Trends Polym. Sci.* 1997; 5: 286-293
46. **Jork A. et al.:** Biocompatible alginate from freshly collected *Laminaria pallida* for implantation. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 2000; 53: 224-229
47. **Kaplan H., Sadock B.:** Hypoparathyroidism. In: *Synopsis of Psychiatry*, Hrsg.: Kaplan H., Sadock B. Baltimore: W & W, 1991 S. 268
48. **Keutmann H.T., Sauer M.M., Hendy G.N., O'Riordan J.L.H., Potts J.T.:** Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone. *Biochemistry* 1978; 17: 5724-5731

49. **King A.:** Microencapsulation of islets of Langerhans: impact of cellular overgrowth. *Ups. J. Med. Sci.* 2001; 106(3): 161-174
50. **Klöck G., Pfeffermann A., Ryser C., Gröhn P., Kuttler B., Hahn H.J., Zimmermann U.:** Biocompatibility of mannuronic acid rich alginates. *Biomaterials* 1997; 18: 707-713
51. **Kuby J.:** General organization and inheritance of the MHC. In: *Immunology* 3rd edition. Editor: Kuby J., New York, Freeman 1996; S. 224-227
52. **Kühntreiber W.M., Lanza R.P., Chick W.L.:** Cell Encapsulation Technology and Therapeutics. Birkhäuser, Boston 1999
53. **Kulseng B., Skjåk-Bræk G., Ryan L., Andersson A., King A., Faxvaag A., Espevik T.:** Transplantation of alginate microcapsules. *Transplantation* 1999; 67: 978-984
54. **Kruse H., Kuhlencordt F.:** Hypoparathyroidismus. In: *Innere Medizin*, Hrsg.: Gross R., Schölmerich P., Gerok W. Stuttgart: Schattauer Verlag, 1994; 883-887
55. **Lafferty K. J., Bootes A., Dart G., Talmage D. W.:** Effect of organ culture on the survival of thyroid allografts in mice. *Transplantation* 1976; 22(2): 138-149
56. **Lafferty K. J., Prowse S.J., Simenovic C.J.:** Immunobiology of tissue transplantation. A return to the passenger leucocyte concept. *Ann Rev. Immunol* 1983; 1: 143-173
57. **Lafferty K.J., Cooley M.A., Woolnough J., Walker K.Z.:** Thyroid immunogenicity is reduced after a period in organ culture. *Science* 1975; 188: 259-261
58. **Landois F.:** Die Epithelkörperchentransplantation in die Blutbahn. Ein Beitrag zur Frage der auto- und homoioplastischen Organverpflanzung. *Beiträge zur klinischen Chirurgie* 1911; 75: 446-473
59. **Leszczynski D., Schnellekens H., Häyry P.:** Vascular endothelium in allograft rejection. *Transplant. Proc.* 1988; 20(2): 262-263
60. **Lim F., Sun M.A.:** Microencapsulated islets as a bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210: 908-912

61. **Loewenthal R., Shmuelian I., Efer T., Avishai O., Kalt R., Moskovich Y., Gazit E.:** Detection of Anti-HLA antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay, fluorescence activated cell sorter and microlymphocytotoxicity testing: A comparison of sensitivities and suggestions for standardization of ELISA. *Transplant. Proc.* 1999; 31: 1918-1919
62. **Löffler G., Petrides P.:** Nebenschilddrüse. In: *Biochemie und Pathochemie*, Hrsg.: Löffler G., Petrides P.; Berlin: Springer Verlag 1997: 873-879
63. **London N.J., Thirdborough S.M., Loftus I.M., Lake S.P., Bell P.R., James R.F.:** Renal subcapsular islet transplantation in the rat: a comparison of three techniques. *Diabetes Res.* 1991; 16: 81-83
64. **Martin K.J. Hruska K.A., Freitag J.J., Klahr S., Slatopolski E.:** The peripheral metabolism of parathyroid hormone. *N. Engl. J. Med.* 1979; 301: 1092-1098
65. **Medawar P.B.:** Immunity to homologous grafted skin. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. exp. Path.* 1948; 29: 58-69
66. **Mueller-Eckhardt G.:** Serologischer Nachweis von HLA-Antigenen und HLA-Antikörpern. *Infusionsther. Transfusionsmed.* 1994; 21: 192-197
67. **Müller-Eberhard H.J.:** The membrane attack complex of complement. *Annu Rev. Immunol.* 1986; 4: 503-512
68. **Naji A., Barker C.F.:** The influence of histocompatibility on transplant site on parathyroid allograft survival. *J. Surg. Res.* 1976; 20: 261-267
69. **Norris E.H.:** The Parathyroid glands and the lateral thyroid in man. Their morphogenesis, histogenesis topographic anatomy and prenatal growth. *Carnegie Inst. Washington Contrib. Embryol.* 1937; 159: 249
70. **Parfitt A.M.:** Soft-tissue calcification in uremia. *Arch. Intern. Med.* 1969; 124: 544-553
71. **Peters P.J. et al.:** Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 1991; 349: 669-78
72. **Raaf J.H., Farr H.W., Myers W.P.L., Good R.A.:** Transplantation of fresh and cultured parathyroid glands in the rat. *Am. J. Surg.* 1974; 128: 478-483
73. **Raaf J.H., Van Pilsom J.F., Good R.A.:** Fresh and cultured thyroid gland: survival and function after implantation. *Ann. Surg.* 1976; 183: 146-156

74. **Rayat G.R., Korbutt G.S., Elliott J.F., Rajotte R.V.:** Survival and function of syngeneic rat islet grafts placed within the thymus versus under the kidney capsule. *Cell Transplant* 1997; 6: 597-602
75. **Reiss R.E., Canterbury J.M.:** Primary hyperparathyroidism. Application of radioimmunoassay to differentiation of adenoma and hyperplasia and to preoperative localisation of hyperfunctioning parathyroid glands. *N. Engl. J. Med.* 1969; 274: 1381-1398
76. **Ross A. J., Dale J.K., Gunnells J.C., Wells S.A.:** Parathyroid transplantation: Fate of a longterm allograft in man. *Surgery* 1979; 85;4: 382-384
77. **Rothmund M., Wagner P.K.:** Epithelkörperchentransplantation. *Endokrine Chirurgie.* Thieme Verlag 1987: 77-95
78. **Rotzschke O., Falk K.:** Origin, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands, *Curr. Opin. Immunol.* 1994; 6: 45-51
79. **Sandström, I.:** On a new gland in man and several mammals (glandulae parathyreoideae). *Upsala Läk.-Fören* 1879-80; 15: 441
80. **Saxe A.:** Parathyroid transplantation: A review. *Surgery* 1984; 95(5): 507-526
81. **Schilfgaarde van R., Vos de P.:** Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. *J. Mol. Med.* 1999; 77: 199-205
82. **Schneider S., Feilen P.J., Slotty V., Kampfner D., Preuss S., Berger S., Pommersheim R.:** Multilayer capsules: a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets. *Biomaterials* 2001; 22: 1961-1970
83. **Schrezenmeir J., Kirchgessner J., Gerö L, Kunz L.A., Beyer J.:** Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islet organs. *Transplantation* 1994; 57: 1308-1314
84. **Siebers U., Horcher A., Bretzel R.G., Klöck G., Zimmermann U., Federlin K., Zekorn T.:** Transplantation of free and microencapsulated islets in rats: evidence for the requirement of an increased islet mass for transplantation in the peritoneal site. *Int. J. Artif. Organs* 1993 ; 16: 96-99
85. **Smidsrød O., Skjåk-Bræk G.:** Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 1990; 8: 90-94

86. **Snell G.D.:** The nobel lectures in Immunology- Lecture for the Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1980: Studies in histocompatibility. Scand. J. Immunol. 1992; 36: 513-526
87. **Sollinger H.W., Burkholder P.M., Rasmus W.R., Bach F.H.:** Prolonged survival of xenografts after organ culture. Surgery 1977; 81: 74-79
88. **Sollinger H.W., Mack E., Cook K., Belzer F.O.:** Allotransplantation of human parathyroid tissue without immunosuppression. Transplantation 1983; 36: 599-602
89. **Starling J.R., Fidler R., Cory R.J.:** Prolongation of survival of rat parathyroid allografts by enhancing serum and tissue culture. Surgery 1977; 81(6): 673-675
90. **Streilein J.W., Bergstresser P.R.:** Ia antigens and epidermal Langerhans cells. Transplantation 1980; 30: 319-323
91. **Strom T.B.:** The cellular and molecular basis of allograft rejection: What do we know ? Transplant. Proc. 1988; 20(2): 143-146
92. **Sturgis S.H., Castelanos H.:** Ovarian homografts in organic filter chambers. Ann. Surg. 1962; 156: 367-368
93. **Sumitran-Karuppan S.:** The clinical importance of choosing the right assay for detection of HLA-specific donor reactive antibodies. Transplantation 1999; 68: 502-509
94. **Talmage D.W., Dart G.A., Radovich J., Lafferty K.J.:** Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. Science 1976; 30(19): 385-388
95. **Talmage D.W., Dart G.A.:** Effect of oxygen pressure during culture on survival of mouse thyroid allografts. Science 1978; 200(2):1066-1067
96. **Terasaki P.L., Bernoco F., Park M.S., Ozturk G., Iwaki Y.:** Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. Am. J. Clin. Pathol. 1978; 69: 103-120
97. **Tze W.J., Tai J.:** Allotransplantation of dispersed single pancreatic endocrine cells in diabetic rats. Diabetes 1988; 37: 383-392
98. **Wagner P.K., Rothmund M.:** Tierexperimentelle Untersuchungen zur Nebenschilddrüsentransplantation ohne postoperative Immunsuppression. K.H. Schiefers et al. Chir. Forum. f. experim. u. klin. Forschung. Springer Verlag Berlin 1988: 87-90

99. **Wagner P. K., Seesko, Rothmund M.:** Replantation of cryopreserved human parathyroid tissue. *World J. Surgery* 1991; 15: 751-755
100. **Wax M.K., Briant T.D.:** Completion thyroidectomy in the management of well-differentiated thyroid carcinoma. *Otolaryng. Head and Neck Surg.* 1992; 107: 63-71
101. **Weber C., Krekun S., Koschitzky T., Zabinski S., D'Agati V., Reemtsma K.:** Prolonged functional survival of rat to NOD mouse islet xenografts by ultraviolet-B (UV-B) irradiation plus microencapsulation of donor islets. *Transplant. Proc.* 1991; 23: 764-766
102. **Weise D., Wüster Ch., Baldauf G., Schoels W.H., Ziegler R.:** Kardiomyopathie bei Hypocalcämie. *Dtsch. Med. Wschr* 1989; 114: 831-833
103. **Wells S. A., Burdick J.F., Hattler B.G.:** The allografted parathyroid gland: Evaluation of function in the immunosuppressed host. *Ann. Surg.* 1974; 180: 807-811
104. **Wells S.A., Gunnells J.C., Shelburne J.D., Schneider A.B., Sherwood L.M.:** Transplantation of the parathyroid glands in man: Clinical indications and results. *Surgery* 1975; 78(1): 34-44
105. **Wells S.A., Gunnells J.C., Gutman R.A., Shelburne J.D., Schneider A.B.:** The successful transplantation of frozen parathyroid tissue in man. *Surgery* 1977; 81: 86-98
106. **Winer K. K., Yanovski J.A., Cutler G.B.:** Synthetic human parathyroid hormone 1-34 vs calcitriol and calcium in the treatment of hypoparathyroidism. *JAMA* 1996; 276: 631-636
107. **Wonigeit K., Pichlmayr R.:** Organtransplantation. *Immunologie: Grundlagen-Klinik- Praxis.* Hrsg.: Gemsa D., Kalden J.R., Resch K. 4.Aufl. 1997: 636-660
108. **Yao C.Z., Ishizuka J., Townsend C.M., Tompson J.C.:** Successful intracerebroventricular allotransplantation of parathyroid tissue in rats without immunosuppression. *Transplantation* 1993; 55(2): 251-253
109. **Zekorn T.D.C., Horcher A., Mellert J., Siebers U., Altug T., Emre A., Hahn H.-J., Federlin K.:** Biocompatibility and immunology in the encapsulation of islet of Langerhans (bioartificial pancreas). *The int. J. of Artificial Organs* 1996; 19(4): 251-257

110. **Zekorn T.D.C., Bretzel R.G.:** Immunoprotection of islets of Langerhans by microencapsulation in barium alginate beads. In: Kühtreiber W.M., Lanza R.P., Chick W.L.: Cell Encapsulation Technology and Therapeutics. Birkhäuser, Boston 1999: 90-96
111. **Ziegler R., Minne H., Raue F., Paar G., Delling G.:** Beobachtungen zur Vitamin D- und Dihydrotachysterin Vergiftung. Dtsch. Med. Wschr. 1975; 100: 478-483
112. **Ziegler R.:** Hypoparathyreoidismus. In: Praktische Endokrinologie. Hrsg.: Jores A., Nowakowski H. Stuttgart, Thieme 1976; S. 122-131
113. **Ziegler R.:** Kalziumstoffwechsel und seine Störungen. In: Hormon und Stoffwechselbedingte Erkrankungen in der Praxis. Hrsg.: Ziegler R., edition medizin, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim 1987
114. **Zimmermann et al.:** Hydrogel-based non autologous cell and tissue therapie. BioTechniques 2000; 29: 564-581

7. Curriculum Vitae

Isabel-Sophie Stelter

Persönliche Angaben	<i>Geborene Heil am 14.9.1975 in Fulda</i> <i>Familienstand: verheiratet mit Dr. med. Klaus Stelter</i>		
Ausbildung	1982 – 1986	Grundschule	Fulda / Hessen
	1986 – 1995	Marienschule Fulda	Fulda / Hessen
		Abitur	
	1995 – 1996	Städtisches Klinikum Fulda	Fulda / Hessen
		Praktikantin im Pflegedienst	
	1996 - 2001	Philipps Universität	Marburg / Hessen
	Studium der Humanmedizin		
	2001- 2002	Ludwig-Maximilians Universität	München / Bayern
		Praktisches Jahr	
Examen	April 1998	Ärztliche Vorprüfung	
	März 1999	1.Abschnitt der ärztlichen Prüfung	
	August 2001	2.Abschnitt der ärztlichen Prüfung	
	November 2002	3.Abschnitt der ärztlichen Prüfung	
Famulaturen	August 1998	Städtische Kliniken Frankfurt am Main / Höchst 4-wöchiges Praktikum der Chirurgie – Unfallchirurgie	
	März 2000	Mount Medical Center, Perth / West Australien 4-wöchiges Praktikum der Hals-Nasen-Ohren Heilkunde	
	Juli 2000	Praxis Dr. Laufhütte, Marburg 4-wöchiges Praktikum der Kinder- und Jugendpsychiatrie	
	September 2000	Insel Spital, Universität Bern / Schweiz 4-wöchiges Praktikum der Schädel-Kiefer-Gesichtschirurgie	
Praktisches Jahr	1.Tertial: Innere Medizin	Städtisches Krankenhaus – Neuperlach	
	2.Tertial: Chirurgie/Kieferchirurgie	Klinikum Großhadern/Innenstadt	
	3.Tertial: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde	Klinikum Großhadern	
Ärztin im Praktikum	2002-2003	Hals-Nasen-Ohrenfachklinik Bogenhausen	
	2003-2004	Chirurgische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians Universität in München - Großhadern	
Tätigkeiten neben dem Studium	1998-2000	Aushilfe im Pflegedienst der Städtischen Kliniken Frankfurt am Main / Höchst.	
	2000-2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor der Allgemein- Chirurgie am Klinikum Lahnberge der Philipps Universität Marburg.	

8. Akademische Lehrer

Meine Akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Arnold	Kuni
Aumüller	Lammel
Barth	Lang
Basler	Lennats
Baum	Lorenz
Beato	Maisch
Cetin	Mees
Christiansen	Moll
Czubayko	Mueller
Daume	Müller Niessing
Doss	Oertel
Feuser	Pfab
Fruhstorfer	Reichardt
Fuhrmann	Remschmidt
Gemsa	Rothmund
Geus	Schachtschabel
Gotzen	Schäfer
Grieg	Schildberg
Griss	Schmitz-Moormann
Habermehl	Schulz
Happle	Seiler
Heiss	Siegel
Hellinger	Stelter
Hesse	Stummer
Hofmann	Tonn
Jauch	Volz
Kastenbauer	von Wichert
Kern	Wagner
Klenk	Weihe
Klose	Werner
Kretschmer	Westermann

9. Danksagung

Hiermit bedanke ich mich herzlich bei allen, die mich bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorgelegten Arbeit unterstützt haben.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. C. Hasse, Oberarzt der Abteilung für Allgemein Chirurgie des Universitätsklinikums Marburg, danke ich für die freundliche Überlassung des wissenschaftlichen Themas und insbesondere in schwierigen Situationen gewährten Hilfe.

Herrn Dr. med. T. Bohrer danke ich für die wertvolle Unterstützung und die konsequente Betreuung dieser Arbeit, sowie für die hilfreiche Beratung und kritische Durchsicht des Manuskripts,

Herrn Prof. Dr. med. G. Zimmermann sowie den gesamten Mitarbeitern des Zentrums für Biotechnologie der Universität Würzburg, für die freundliche Zusammenarbeit und Versorgung mit Alginat,

Herrn Dr. Sitter, Abteilung für theoretische Chirurgie der Universität Marburg, für die statistische Beratung und Auswertung der erhobenen Daten.

Frau Dietrich, MTA im Labor der Allgemein Chirurgie der Universitätsklinik Marburg, danke ich für Ihre Hilfe und die stets gute Zusammenarbeit.

Den Tierpflegern Herrn Demant und Herrn Reich gilt mein Dank für die gute und freundliche Unterstützung im Tier OP.

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Isabel Stelter, geboren am 14.09.1975, dass über mich keine gerichtlichen oder disziplinarischen Strafen verhängt wurden und derzeit keine Verfahren anhängig sind.

Isabel Stelter (München, den 16.06.2005)

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich, Isabel Stelter, geboren am 14.09.1975, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Mikroenkapsulierung - Funktion eines Prinzips durch Schutz vor dem aktivierten Immunsystem bei der Allotransplantation der Parathyreoidea ?“

in der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Marburg, Leiter Prof. Dr. med. M. Rothmund, mit Unterstützung von Herrn Priv. doz. Dr. med. C. Hasse ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen, als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem In- oder Ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Isabel Stelter (München, den 16.06.2005)