

Aus der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
der Philipps-Universität Marburg

Direktor: Professor Dr. med. M. Rothmund



**Immunsolation durch Mikroenkapsulierung:
Protektion vor Sensibilisierung des Empfängers bei der transgenen
Transplantation von Nebenschilddrüsengewebe ohne Immunsuppression ?**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Klaus Stelter
aus München

Marburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 6.5.2004
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch
Referent: Priv.- Doz. Dr. med. C. Hasse
Coreferent: Prof. Dr. med. Renz

Inhaltsverzeichnis

1. Zielstellung.....	3
2. Einleitung	5
2.1. Zur Geschichte der Nebenschilddrüse.....	5
2.2. Physiologische Aufgaben der Nebenschilddrüsen	5
2.3. Hypoparathyreoidismus	6
2.4. Nebenschilddrüsentransplantation als kausale Therapie	7
2.5. Immunologische Aspekte.....	8
2.6. Immunisolierung als Weg zum Erfolg.....	9
3. Material und Methoden	10
3.1. Aufbau der Studie	11
3.1.1. Versuchstiere.....	11
3.1.2. Versuchsablauf.....	12
3.1.3. Studiengruppen	13
3.2. Operative Eingriffe.....	25
3.2.1. Narkose	25
3.2.2. Parathyreoidektomie	25
3.2.3. Allotransplantation der Nebenschilddrüsenpartikel	27
3.2.4. Hauttransplantation	27
3.3. Alginat und Mikroenkapsulierung	29
3.3.1. Alginat.....	29
3.3.2. Gewebekulturpassage.....	29
3.3.3. Mikroverkapselung	29
3.4. Erhebung der Messgrößen.....	32
3.4.1. Blutentnahmen	32
3.4.2. Kalziumbestimmung	33
3.4.3. Mikrolymphozytotoxizitätstest.....	33
3.5. Statistische Berechnung der Stichprobenumfänge	35
4. Ergebnisse	38
4.1. Operative Eingriffe.....	38
4.1.1. Narkose	38
4.1.2. Parathyreoidektomie, Hypokalzämie und Mortalität.....	38
4.1.3. Hauttransplantation	39
4.2. Messwerte	40
4.2.1. Studienarm I (Test- und Kontrollgruppe) – Maximale Immunstimulation.	40
4.2.2. Testgruppe II – Auftreten einer Frühreaktion ?.....	43
4.2.3. Kontrollgruppe II - Auftreten einer Frühreaktion ?.....	46
4.2.4. Testgruppe III – Auftreten einer Spätreaktion ?.....	49
4.2.5. Kontrollgruppe III – Auftreten einer Spätreaktion ?	52

5. Diskussion	55
5.1. Die Nebenschilddrüse: Modell für allogene Transplantation von endokrinem Gewebe	55
5.2. Methodenkritik	56
5.3. Ergebnisdiskussion	62
5.4. Ausblick	66
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis	71
8. Anhang	81
8.1. Rohdatenblätter der Studiengruppen	81
8.1.1. Testgruppe I	81
8.1.2. Kontrollgruppe I	81
8.1.3. Testgruppe II	82
8.1.4. Kontrollgruppe II	83
8.1.5. Testgruppe III	84
8.1.6. Kontrollgruppe III	85
8.2. Curriculum Vitae	86
8.3. Akademische Lehrer	87
8.4. Danksagung	88
8.5. Eidesstattliche Erklärung	89

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 in Form einer Allotransplantation der Parathyreoidea als unbestritten. Da dieses Mangelsyndrom die Patienten jedoch selten vital bedroht, ist eine systemische Immunsuppression post transplantationem nicht gerechtfertigt.

Seit Beginn der 20er Jahre arbeitet die Chirurgische Klinik der Universität Marburg an Lösungen für dieses Problem. 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 gelangten 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 über 12 Wochen eine normokalzämische Stoffwechsellage erhalten werden bei vorher jahrelangem, symptomatischem, therapieresistenten, postoperativen Hypoparathyreoidismus (Hasse et al., 1998).

Die grundlegenden Funktionen der Immunisolation durch die Mikro kapseln sind ungeklärt. Zwei verschiedene Wege der Protektion sind denkbar.

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

Ziel dieser Arbeit war es, Aspekte der prinzipiellen Frage zu beantworten, ob die Mikroenkapsulierung eine Sensibilisierung des Empfängers in vivo verhindert.

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. Zur Geschichte der Nebenschilddrüse

Die Nebenschilddrüse wurde erstmals im Jahre 1850 von Richard Owen bei einer Autopsie eines indischen Nashorns des Londoner Zoos beschrieben. Obwohl er diese anatomische Entdeckung 1862 veröffentlichte, blieb diese Jahrzehnte lang völlig unbeachtet. Es war ein schwedischer Medizinstudent, Ivar Sandström, der zwischen 1877 und 1880 50 Leichen obduzierte und die histologische, sowie anatomische Struktur, der von ihm so benannten *glandulae parathyreoideae*, erstmalig beim Menschen systematisch untersuchte (Sandström, 1880).

Erst über Studien zur Funktion der Nebenschilddrüsen erschloss sich langsam die Bedeutung derselben. Eugène Gley aus Paris erkannte 1892 als erster die Bedeutung der Parathyreoidea im Prinzip. Er beschrieb in der Zeitschrift *Lancet*, dass eine Tetanie nach Entfernung der Schilddrüse erst dann auftritt, wenn die Nebenschilddrüsen mitentfernt wurden. 30 Jahre später konnten Hanson und Collip serumkalziumsteigernde Präparate aus Nebenschilddrüsen herstellen (Hanson, 1924; Collip, 1925). Wegen ihrer kurzen Halbwertszeit und Unreinheit konnten diese Gewebeextrakte allerdings nicht zur Therapie des Hypoparathyreoidismus eingesetzt werden. Das Parathormon aus Nebenschilddrüsen zu extrahieren, gelang erst ein halbes Jahrhundert später (Arnaud et al., 1970).

2.2. Physiologische Aufgaben der Nebenschilddrüsen

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)

2.3. 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.

2.4. Nebenschilddrüsentransplantation als kausale Therapie

Bisher ist eine Allotransplantation der Nebenschilddrüse nur unter systemischer Immunsuppression gelungen (Blumthal 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, Ultraviolett-Bestrahlung 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).

2.5. 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.

2.6. 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).

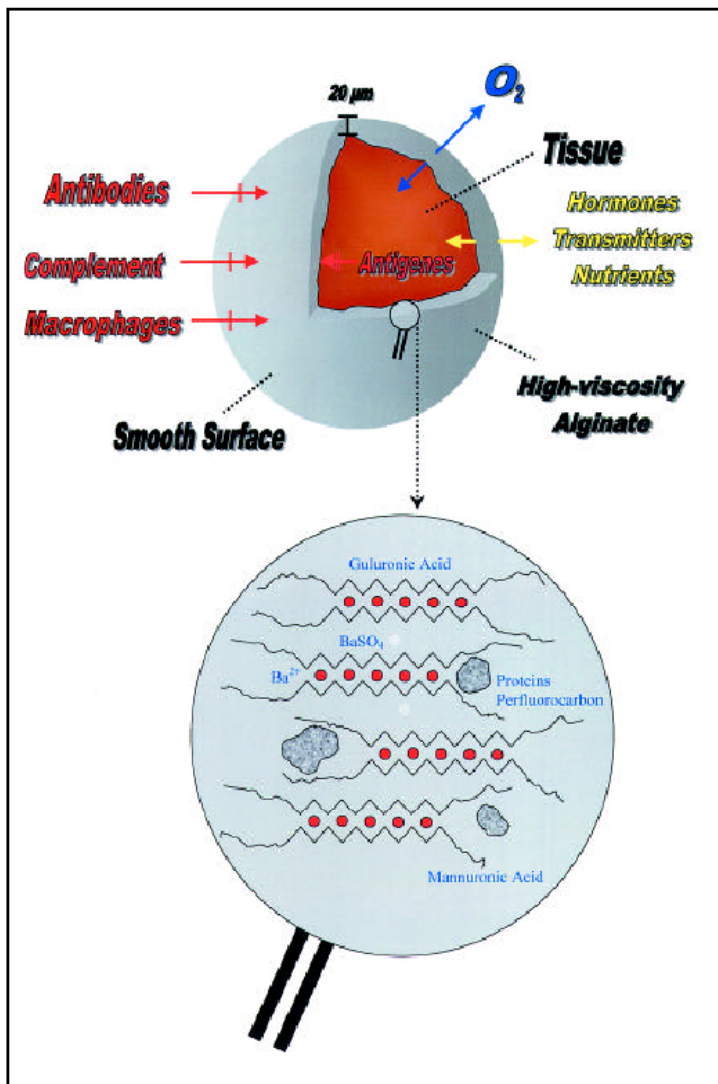


Abbildung 2.1.: Konzept und Aufbau einer Bariumalginat-Mikrokapsel. (Quelle: Zimmermann et al.: Hydrogel-based non autologous cell and tissue therapie. BioTechniques 2000; 29: S. 569)

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

3. Material und Methoden

Mit den vorzustellenden tierexperimentellen Studienarmen dieser randomisierten, tierexperimentellen Studie sollte erforscht werden, in wie weit die Mikroenkapsulierung von Nebenschilddrüsengewebe bei der Allotransplantation einen Schutz vor der Sensibilisierung des Empfängers bietet. Bei einer eventuellen

Aktivierung des Immunsystems des Empfängers war zu untersuchen, ob der Empfängerorganismus mit einer immunologischen Früh- oder Spätreaktion reagiert. Die immunologische Reaktion und der Aktivierungsgrad des Empfängers wurde durch die quantitative Untersuchung spezifischer Antikörper gegen das Spendergewebe und durch die Abstoßungszeit eines spenderspezifischen allogenen Hauttransplantates bestimmt. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurden in den Testgruppen mikroenkapsulierte Nebenschilddrüsen transplantiert, während die Kontrollgruppen native Nebenschilddrüsen erhalten haben. Als Referenzgruppen dienten Tiere, bei denen das Immunsystem durch zwei aufeinanderfolgende Hauttransplantationen maximal stimuliert wurde. Die Referenzgruppen sollten Basiswerte für Antikörpertiter liefern und die Immunkompetenz der Versuchstiere nach Parathyreoidektomie und unter Hypokalzämie beweisen.

3.1. Aufbau der Studie

3.1.1. Versuchstiere

In dieser Studie wurden 300 männliche, 200g schwere Ratten des Stammes Lewis (LE) und 300 männliche, 200g schwere Ratten des Stammes Dark Agouti (DA) verwendet. Bei diesen Versuchstieren handelte es sich um männliche Tiere zweier Inzuchtstämme [Firma Harlan-Winkelmann, Holland; Stammnummer DA/OLA Hsd, Art. Nr.9205M (DA) und LEW/HAN Hsd, Art. Nr.86150M (LE)].

Die Tiere wurden in einem Versuchstierraum, für Langzeitversuche zugelassen, innerhalb des Klinikums der Universität Marburg bei einer Raumtemperatur von 22° Celsius, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45% und einem physiologischen Hell-Dunkel Rhythmus gehalten. Je zwei Ratten wurden in einem durchsichtigen Polycarbonkäfig der Größe 3 (15cm x 42cm x 26,5cm) auf Weichholzgranulat gehalten. Sie wurden mit einem standardisierten, keimfreien Alleinfutter (Altromin® 1324, Alleinfuttermittel; Altromin GmbH Lage, Deutschland) mit 0,9% Kalzium gefüttert. Die Tiere erhielten zusätzlich Wasser aus Trinkflaschen ad libidum.

Die Genehmigung zu den Tierversuchen wurde am 28.06.1996 vom Regierungspräsidium Giessen unter der Nummer 20-15(1) MR 20/16-11/96 erteilt.

3.1.2. Versuchsablauf

Unter Berücksichtigung der bisher im Labor der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Marburg vorliegenden Erfahrung mit der experimentellen Nebenschilddrüsentransplantation und der Unterstützung bei immunologischen Fragen durch Dr. Wonnigeit, Medizinische Hochschule Hannover, wurde ein umfassendes Studienprotokoll erstellt, das nachfolgend vorgestellt wird.

200 Tiere zweier genetisch unterschiedlicher Inzuchtstämme, 100 Dark Agouti (DA) und 100 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). Nur Versuchstiere, die 3 Wochen nach Parathyreoidektomie noch immer hypokalzämisch waren, wurden als Empfängertiere akzeptiert.

Nach der Parathyreoidektomie der Spendertiere wurden deren Epithelkörperchen zuerst einer standardisierten Gewebekulturpassage unterzogen. Danach wurden die Nebenschilddrüsen von jeweils 10 Spendertieren (20 Nebenschilddrüsen) mikroenkapsuliert und entsprechend der Randomliste jeweils einem Empfängertier implantiert (Testgruppe). Die Parathyroideae von 5 Spendertieren (10 Nebenschilddrüsen) wurden unverändert, d.h. nativ, jeweils einem Empfängertier transplantiert (Kontrollgruppe).

Der Versuchsaufbau der Testgruppen teilte sich in 2 verschiedene Studienarme mit jeweils 5 Tieren auf, in denen unterschiedlich verfahren wurde (siehe 3.1.3.).

Alle Tiere bekamen während des Versuchsablaufs wöchentlich ca. 1ml Blut abgenommen. Aus dem gewonnenen Blut wurden zytotoxische 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 durch einen computergestützten Zufallsgenerator randomisiert vorgenommen. Die Auswertung der Blutentnahmen erfolgte verblindet.

3.1.3. Studiengruppen

Zunächst wurden zwei Studiengruppen erstellt, um

1. einige Referenzwerte für die Hauttransplantatabstoßung bei unstimuliertem und maximal stimuliertem Immunsystem zu erhalten (Testgruppe I) und
2. eine Beeinflussung der Parathyreoidektomie auf die Immunantwort auszuschließen (Kontrollgruppe I).

Testgruppe I (n = 5 Tiere): Es wurden fünf Tiere parathyreoidektomiert (Empfängertiere). Nach 3 Wochen erfolgte dann eine Allotransplantation von Vollhaut von fünf Spendertieren auf die Empfängertiere. Nach weiteren 2 Wochen erfolgte eine erneute allogene Hauttransplantation. Ziel war es, die maximale Abstoßungsreaktion von vorsensibilisierten Tieren zu studieren.

Um genügend Referenzwerte zu erhalten, wurde bei den Versuchstieren wöchentlich der Antikörpertiter und das Gesamtkalzium im Serum gemessen. Außerdem wurden die Tiere nach Einwachsen des Hauttransplantates täglich fotografiert, um den exakten Zeitpunkt der Hauttransplantatabstoßung ermitteln zu können.

Hypothese: das zweite Hauttransplantat müsste wesentlich schneller abgestoßen werden, als das erste (Abbildung 3.1).

Testgruppe I - Maximale Immunstimulation

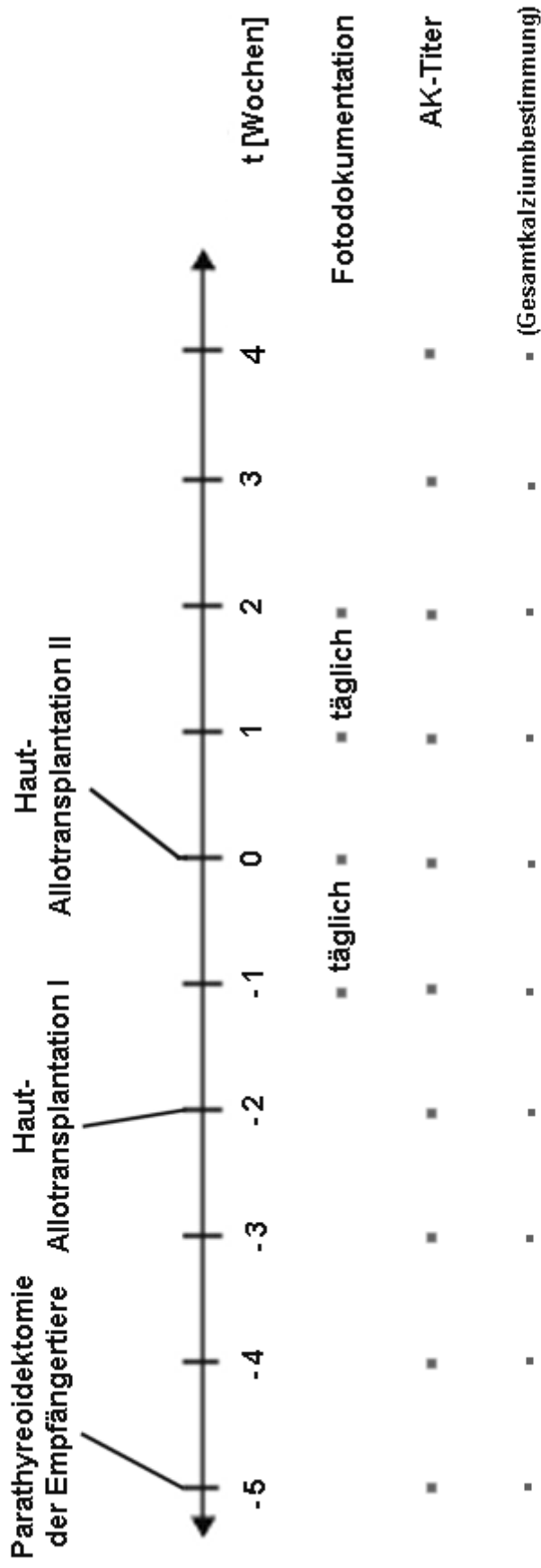


Abbildung 3.1.: Synopsis der Testgruppe I. Maximale Immunstimulation nach Parathyreoidektomie durch zwei aufeinanderfolgende allogene Hauttransplantationen.

Kontrollgruppe I (n = 5 Tiere) Im Gegensatz zur Testgruppe I wurden die Tiere nicht parathyreoidektomiert, um einen Einfluss der Parathyreoidektomie auf die Abstoßungsreaktion auszuschließen.

Hypothese: Die Hauttransplantate werden genauso abgestoßen wie in Testgruppe I, denn die Parathyreoidektomie hat keinen Einfluss auf die Immunantwort (Abbildung 3.2).

Kontrollgruppe I - Maximale Immunstimulation

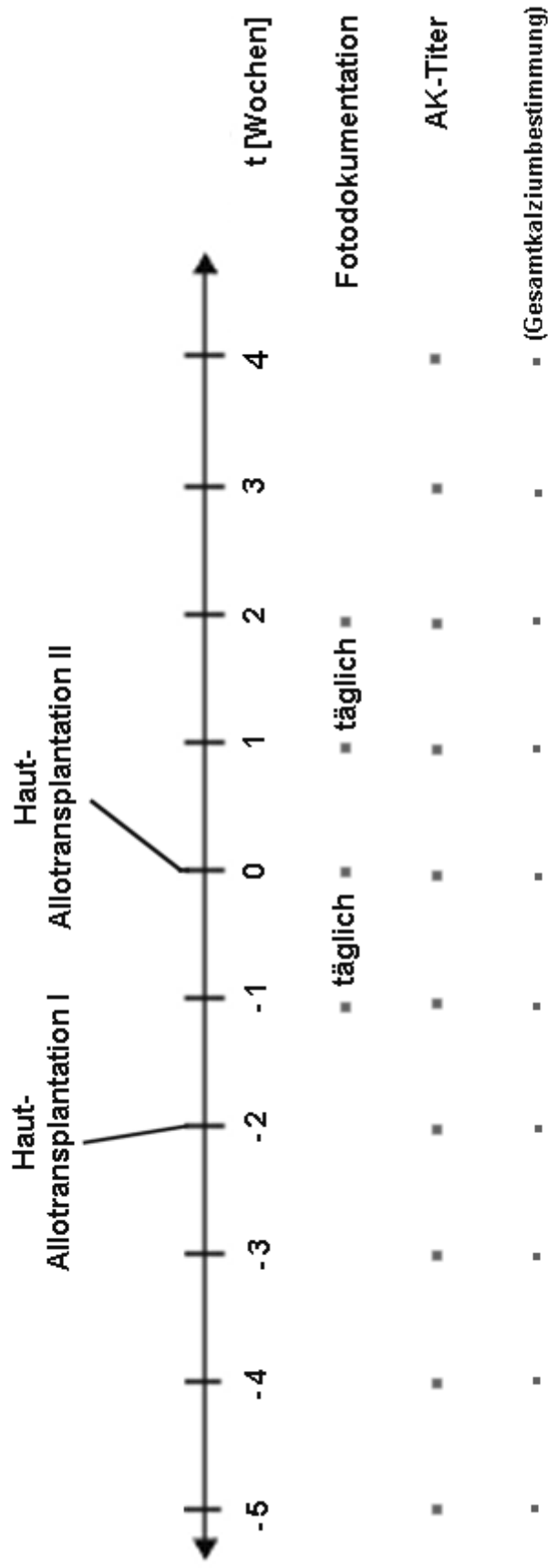


Abbildung 3.2.: Synopsis der Kontrollgruppe I. Maximale Immunstimulation durch zwei aufeinanderfolgende, allogene Hauttransplantationen ohne vorangegangene Parathyreoidektomie.

Testgruppe II (n = 5 Tiere) Hier wurde drei Wochen nach Transplantation von mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsen eine allogene Hauttransplantation vorgenommen.

Hypothese: Die Mikroenkapsulierung kann eine Frühsensibilisierung des Empfängers verhindern. Eine Frühsensibilisierung wird durch antigenpräsentierende Zellen des Spenders vermittelt, die dem Empfänger direkt die spenderspezifischen Antigene präsentieren (Wonigeit und Pichlmayr, 1997). Bei einer erfolgreichen Immunisation ohne Frühsensibilisierung ist mit einem sehr niedrigen Antikörpertiter und einer verzögerten Abstoßung (größer 10 Tage) des Hauttransplantates zu rechnen (Abbildung 3.3)

Testgruppe II - Immunologische Frühreaktion

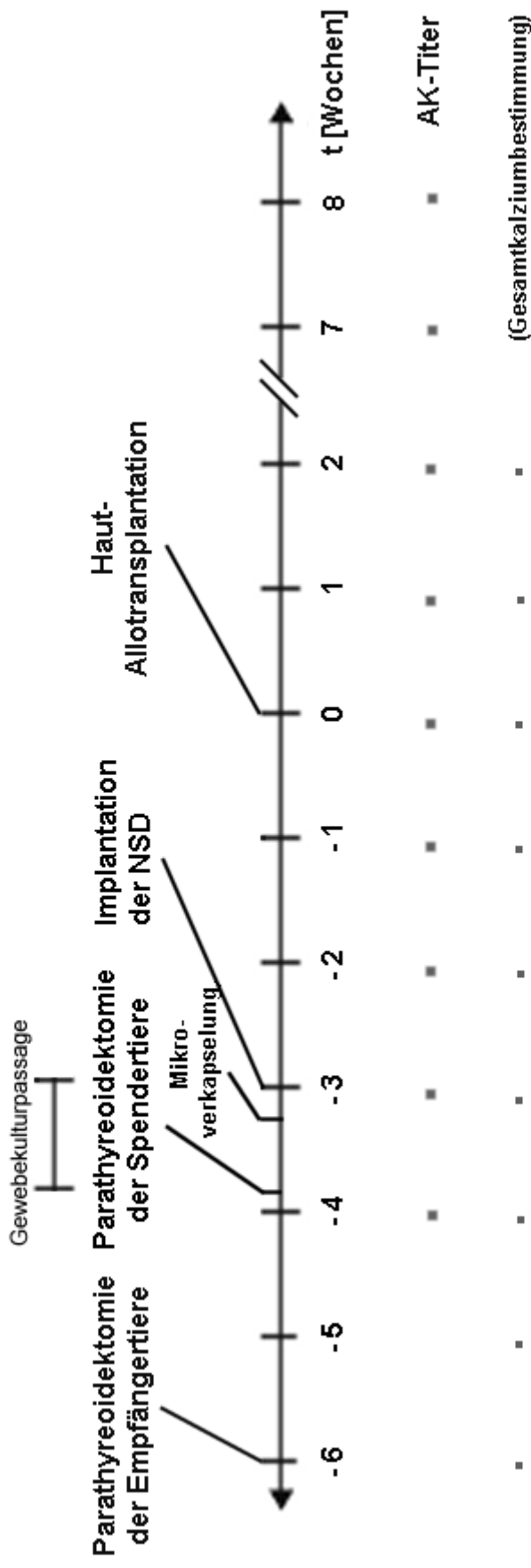


Abbildung 3.3.: Synopsis der Testgruppe II. Ausprägung einer immunologischen Frühreaktion nach Transplantation von mikroverkapsulierten Nebenschilddrüsen und darauffolgender allogener Hauttransplantation.

Kontrollgruppe II (n = 5 Tiere) Der Versuchsaufbau war identisch der Testgruppe II, jedoch erfolgte bei den Empfängertieren eine Allotransplantation von nativen (unverkapselten) Nebenschilddrüsen.

Hypothese: Bei Immunisation durch die Mikrokapseln in der Testgruppe II ist in der Kontrollgruppe ein höherer Antikörpertiter und eine raschere Abstoßung der transplantierten Haut zu erwarten (Abbildung 3.4).

Kontrollgruppe II - Immunologische Frühreaktion

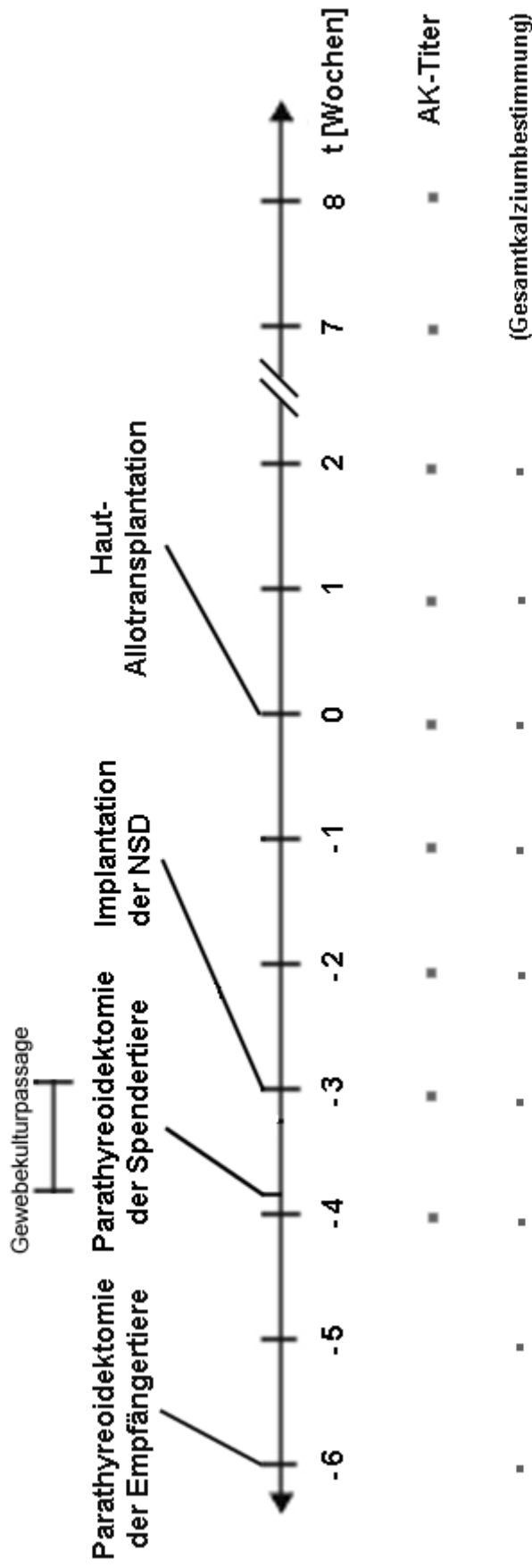


Abbildung 3.4.: Synopsis der Kontrollgruppe II. Ausprägung einer immunologischen Frühreaktion nach Transplantation von nativen Nebenschüldrüsen und darauffolgender allogener Hauttransplantation.

Testgruppe III (n = 5 Tiere) Der Versuchsaufbau war identisch mit dem der Testgruppe II, nur erfolgte die Hauttransplantation erst acht Wochen nach der Transplantation von mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsenpartikeln.

Hypothese: die Mikroenkapsulierung von Nebenschilddrüsenengewebe kann eine späte Sensibilisierung des Empfängers verhindern. Die Spätreaktion wird vermittelt durch Präsentation von spenderspezifischen Antigenen auf antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers. Diese antigenpräsentierenden Zellen müssen zuvor Teile der Spenderzellen erkennen und phagozytieren, um die Antigene den eigenen Lymphozyten zu präsentieren. Dieser Weg der Immunsensibilisierung wird deshalb als indirekt bezeichnet und benötigt die doppelte Zeit, bevor es zu einer maximalen Immunreaktion kommt (Wonigeit und Pichlmayr, 1997). Bei einer erfolgreichen Immunisation ohne Sensibilisierung ist also mit einem sehr niedrigen Antikörpertiter und einer verzögerten Abstoßung (länger als 10 Tage) des Hauttransplantates zu rechnen (Abbildung 3.5).

Testgruppe III - Immunologische Spätreaktion

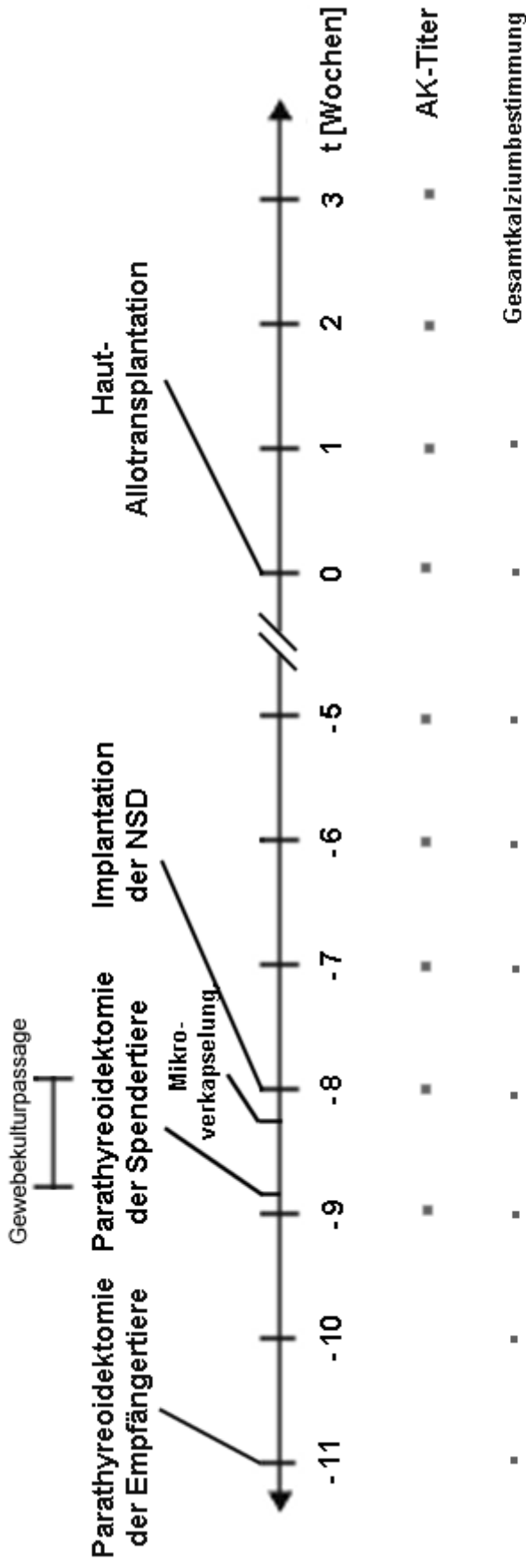


Abbildung 3.5.: Synopsis der Testgruppe III. Ausprägung einer immunologischen Spätreaktion nach Transplantation von mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsen und darauffolgender allogener Hauttransplantation.

Kontrollgruppe III (n = 5 Tiere) Hier erfolgte bei identischen Studienbedingungen, im Gegensatz zur Testgruppe III, die Allotransplantation von nativen Nebenschilddrüsen.

Hypothese: Bei erfolgreicher Immunisation durch die Mikrokapseln der Testgruppe ist in der Kontrollgruppe eine raschere Abstoßung der transplantierten Haut zu erwarten (Abbildung 3.6).

Kontrollgruppe III - Immunologische Spätreaktion

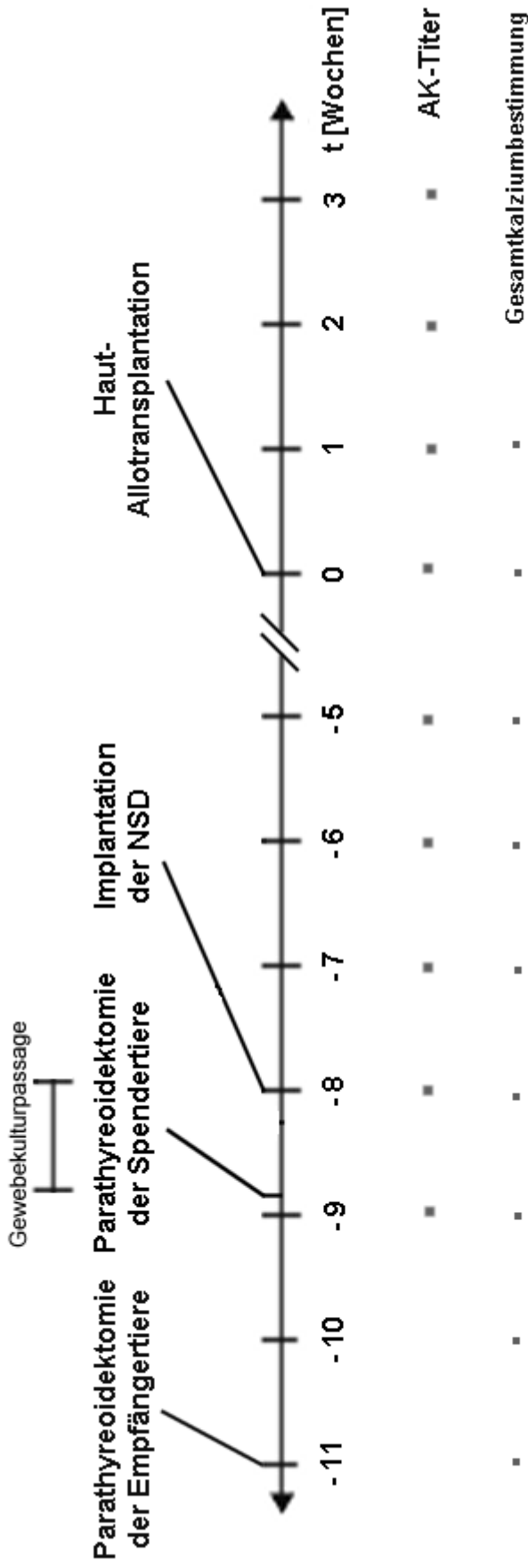


Abbildung 3.6.: Synopsis der Kontrollgruppe III. Ausprägung einer immunologischen Spätreaktion nach Transplantation von naiven Nebenschilddrüsen und darauffolgender allogener Hauttransplantation.

3.2. Operative Eingriffe

Alle zuvor genehmigten Tierversuche (R.p. Giessen: N° 20-15(1) MR 20/16-11/96) wurden dem Tierschutzgesetz strikt folgend und nur von den dazu Ermächtigten durchgeführt.

3.2.1. Narkose

Sämtliche Versuchstiere wurden stets in Narkose operiert. Für die Parathyreoidektomie, die Allotransplantation und die Hauttransplantation wurden die Tiere mit einer Injektionsnarkose aus Ketaminhydrochlorid (Ketanest®: Parke Davis, Freiburg; Art N° 440944/1) und Xylocain (Rompun®: Bayer AG, Leverkusen; Art N° 8033 hg) narkotisiert. Rompun® und Ketanest® wurden im Verhältnis 1:20 gemischt und 0,5 ml intramuskulär in einen Oberschenkel injiziert. Nach ca. 10 Minuten hatten die Tiere das Narkosestadium erreicht.

Für die Blutentnahmen leiteten wir eine Kurzzeitnarkose mit Diethylaether (Merck, Darmstadt; Art N° 159016) in Form einer Inhalationsnarkose ein.

3.2.2. Parathyreoidektomie

Nach dem Einsetzen der Injektionsnarkose mußte zunächst die Halsvorderfläche rasiert und desinfiziert (Kodan®: Schülke und Mayer, Norderstedt; Art N° 1001501) werden. Die Tiere wurden dann in Rückenlage auf einen Tier-Op-Tisch gelegt, wobei die Vorder- und Hinterläufe in Metallclips eingespannt wurden. Unterhalb der Protuberantia mentalis wurde eine ca. 1,5 cm lange, mediane Inzision bis zum Sternum durchgeführt. Es wurden nun die beiden großen Anteile der Glandula submaxillaris sichtbar. Diese wurden mit einer Mikroschere stumpf auseinanderpräpariert. Die nun sichtbaren Muskelbäuche des Musculus sternohyoideus und des Musculus omohyoideus wurden durch Haltefäden umschlungen und nach lateral gezogen, um eine gute Sicht auf das Operationsfeld zu haben. Nun wurden Trachea und Schilddrüse wie auf Abbildung 3.7. einsehbar.

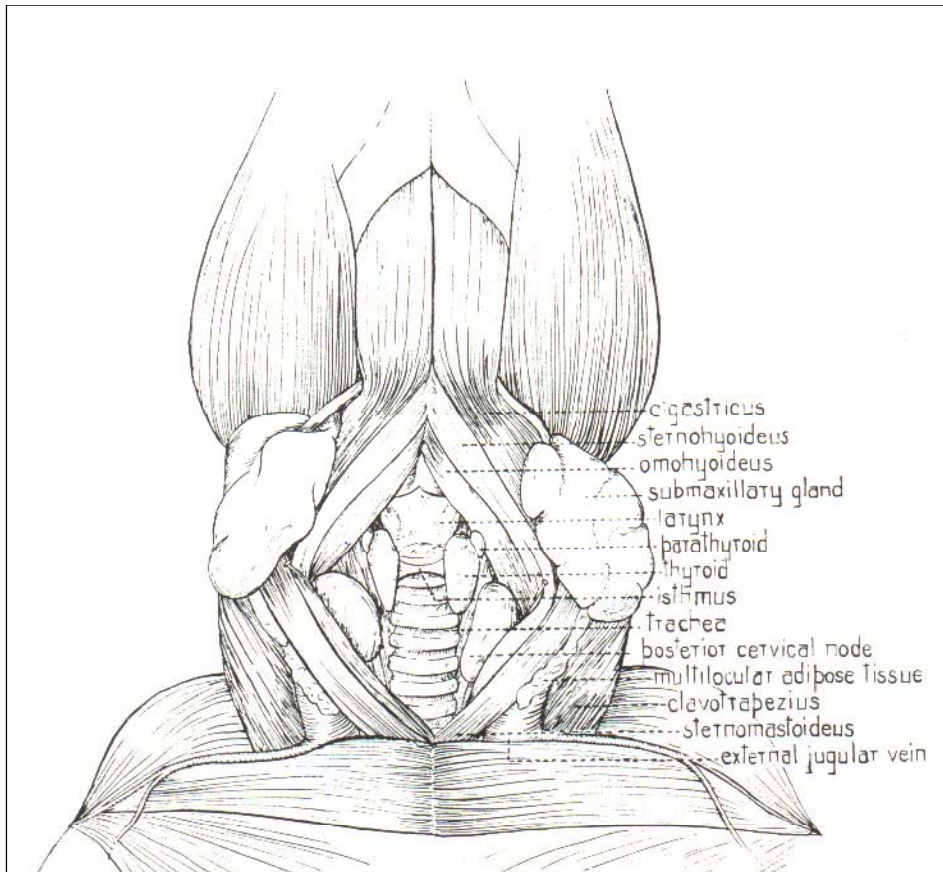


Abbildung 3.7.: Anatomische Übersicht der Nebenschilddrüse und Schilddrüse der adulten Ratte (Quelle: Eunice Chace Greene: Anatomy of the rat. Hafner Publishing Company, New York and London 1963)

Das weitere Vorgehen erfolgte unter einem binokularen Operationsmikroskop (M3Z; Fa. Wild, Heerbrugg, Schweiz) bei 25facher Vergrößerung. Die am dorsolateralen Rand der Schilddrüse liegenden, milchglasartigen, 1-2mm großen Nebenschilddrüsen wurden aufgesucht und vorsichtig mit einer Mikropinzette angehoben, um dann mit der Mikroschere von der Schilddrüse getrennt zu werden. Häufig waren die Nebenschilddrüsen stark mit der Schilddrüse verwachsen oder schlecht abgrenzbar, so dass kleine Teile des Schilddrüsengewebes mitentfernt werden mussten, um eine vollständige Entnahme der Nebenschilddrüse zu gewährleisten. Das entnommene Material lagerten wir in einem Zentrifugenröhrchen mit RPMI 1640 Medium (Fa. Gibco Life Technologies, Germany; Art. N° 21875-03) bei Raumtemperatur bis zum Abschluss der Operation.

Nach Entfernen der Haltefäden wurden die Muskeln mit einer Einzelknopfnah adaptiert. Als Nahtmaterial verwendeten wir resorbierbares Polygalactin (Vicryl® USP Stärke 4/0; Ethicon, Norderstedt; Art. N° JM9CRRA0). Abschließend wurde

die Haut in Einzelknopfnahntechnik mit Polypropylenfaden (Prolene® USP Stärke 3/0: Ethicon, Norderstedt; Art. N° JM9CRRA0) verschlossen.

3.2.3. Allotransplantation der Nebenschilddrüsenpartikel

Nach Einsetzen der Injektionsnarkose wurde die Bauchwand großzügig rasiert und desinfiziert (Kodan®: Schülke und Mayer, Norderstedt; Art N° 1001501). Die Tiere lagerten in Rückenlage auf einem Ratten-Op-Tisch, wobei die Vorder- und Hinterläufe in Metallclips eingespannt wurden. Nach einer ca. 5cm langen Inzision in der Medianlinie, konnte der Musculus rectus abdominis freipräpariert werden. Die beiden Hautlappen wurden mit Haltefäden nach lateral gezogen, um eine optimale Sicht auf die Bauchmuskulatur zu gewährleisten. Nach stumpfer Präparation von ca. 1cm großen Muskeltaschen im Musculus rectus abdominis oder Musculus obliquus externus abdominis setzten wir die Transplantate ein. In jedes Transplantatfach wurden 2 Allotransplantate vorsichtig eingesetzt. Pro Versuchstier wurden in den Testgruppen 20 mikroverkapselte, bzw. in den Kontrollgruppen 20 native Nebenschilddrüsenpartikel eingesetzt (Transplantatrate 1:10 = 2:20 Nebenschilddrüsen). Die Muskeltaschen wurden dann mit einem nichtresorbierbaren Faden (Prolene® USP Stärke 3/0: Ethicon, Norderstedt; Art. N° JM9CRRA0) in Einzelknopfnahntechnik verschlossen. Abschließend nähten wir die Haut in 10-12 Einzelknopfnähten mit Polypropylenfaden (Prolene® USP Stärke 3/0: Ethicon, Norderstedt; Art. N° JM9CRRA0). Die Tiere wurden nach der Allotransplantation einzeln im Käfig gehalten.

3.2.4. Hauttransplantation

Dazu wurden die Spendertiere durch eine Injektionsnarkose betäubt. Diesen entnahmen wir dann ca. 2x2cm große Vollhautareale mit Unterhautfettgewebe und Fell aus der lateralen Thoraxapertur. Die Hautareale wurden in eine sterile Petrischale mit Nährlösung (TC100 Medium, GIBCO; Art. N° 13055-025), versetzt mit 5% Penicillinstreptomycin Lösung (Biochrom KG, Berlin; Art. N° A2212), überführt. Die Hauttransplantate mussten nach 5 Minuten aus der Nährlösung genommen und mit einem Einmalskalpell (Größe 22: Produkte für Medizin AG, Köln; Art. N° 5890) vom Unterhautfettgewebe befreit werden, da nur die Epidermis anwachsen kann. Deshalb mussten die Transplantate frei von Fett sein und wurden bis zum Erscheinen der Haarbälge im Korium mit dem Skalpell abgetragen.

Nach dem Einsetzen der Injektionsnarkose wurden die Empfängertiere auf einer Fläche von 4x4cm an der lateralen Bauchwand mit einem Einmalrasierer rasiert und desinfiziert. Die Epidermis wurde nun mit einer chirurgischen Präparierschere abgetragen, bis die zarten Gefäßzeichnungen der Dermis sichtbar wurden. Das Abtragen der Epidermis musste sehr sorgfältig geschehen, da Hauttransplantate weder auf verhorntem Plattenepithel, noch auf Hämatomen anwachsen. Das präparierte Hauttransplantat legten wir nun auf den so vorbereiteten Transplantationsort (ohne Naht). Das Wundgebiet wurde anschließend mit einer Fettgaze und einer sterilen Kompresse abgedeckt und mit Fixomull®-Klebeband fixiert. Den Klebeverband wickelten wir zirkulär um das Abdomen und den Thorax, um eine optimale Kompression des Hauttransplantates an die Empfängerhaut für 6 Tage zu gewährleisten, ohne die Bewegungsfreiheit des Versuchstieres zu sehr einzuschränken. Im Falle, dass sich der Verband vor dem fünften Tag lösen sollte, mußte er erneut angelegt werden. Da die Hauttransplantation initial schmerzhaft sein konnte, wurden die Tiere postoperativ für drei Tage mit 0,1mg Tramal, subkutan appliziert, analgesiert.

Nach 6 Tagen wurde der Verband gelöst und das Hauttransplantat bis zur Abstoßung täglich fotodokumentiert.



Abbildung 3.8.: Optischer Befund 7 Tage nach Hauttransplantation. Das allogene Hauttransplantat ist fest angewachsen und behaart.

3.3. Alginat und Mikroenkapsulierung

3.3.1. Alginat

Für diese Studie wurde ultrahochgereinigtes Alginat der *Laminaria pallida* verwendet. Das Mischungsverhältnis Guluronsäure zu Mannuronsäure betrug 30:70. Ba²⁺ wurde als vernetzendes Kation benutzt, Empfängerserum als Proteinzusatz. Das vorbehandelte Alginat wurde von der Abteilung für Biotechnologie an der Universität Würzburg, Leiter Prof. U. Zimmermann, zur Verfügung gestellt. Dieses Alginat zeigte sehr gute biophysikalische Eigenschaften: die Viskosität betrug 281mPa/s in einer 0,5% Lösung bei einer Molekülmasse von über 250 kDa (Jork et al., 2000). Eine Abstoßungsreaktion auf leere Alginatkapseln konnte nach 3 Wochen in vivo nicht nachgewiesen werden (Zimmermann et al., 2000).

3.3.2. Gewebekulturpassage

Die Nebenschilddrüsen wurden nach Entnahme sofort einer standardisierten Gewebekulturpassage von drei Tagen unterzogen. Dazu wurden die Epithelkörperchen zunächst in ein steriles Petrischälchen dekantiert und mit einem Kulturmedium gewaschen. Dieses Medium bestand aus 500ml RPMI 1640 mit L-Glutamin (Fa. Gibco Life Technologies, Germany; Art. N° 21875-03), 10ml Penicillin-Streptomycin (Biochrom KG, Berlin; Art. N° A2212), 9ml Calciumchlorid (147mg ad 10ml Aqua dest: Apotheke der Universität Marburg) und 50ml Serum des zukünftigen Empfängerstammes. In frischem Kulturmedium verblieb das Gewebe bei 37° Celsius und einer Atmosphäre von 95% O₂ zu 5% CO₂ im Brutschrank (Heraeus, Hanau; Art. N° 30165-0) für drei Tage.

3.3.3. Mikroverkapselung

Zum Verkapseln der Nebenschilddrüsenpartikel wurde ein modifiziertes Verfahren nach Geisen (1990) benutzt. Das Transplantatgewebe wurde dabei in doppelschichtige Bariumalginat Kapseln eingeschlossen. Zur Herstellung der Alginatkapseln wurde eine Dreikanaldüse (siehe Abbildung 2.7.) verwendet. Prinzipiell wurde dabei durch Kanal 1 kontinuierlich Druckluft insuffliert, der die Mikroverkapselung antreibt. Ein höherer Druckluft-Flow beschleunigt den

Verkapselungsvorgang und lässt konsekutiv kleinere Kapseln entstehen. Durch Kanal 2 wurde Alginat in einer 0,65%igen Konzentration mit den darin gelösten Nebenschilddrüsenpartikeln kontinuierlich hinzugeführt. Durch Kanal 3 haben wir Alginat in einer 0,7%igen Konzentration hinzugeführt. Somit ergaben sich zwei Alginschichten unterschiedlicher Viskosität. Eine äußere, visköser Schicht (0,75iges Alginat), die

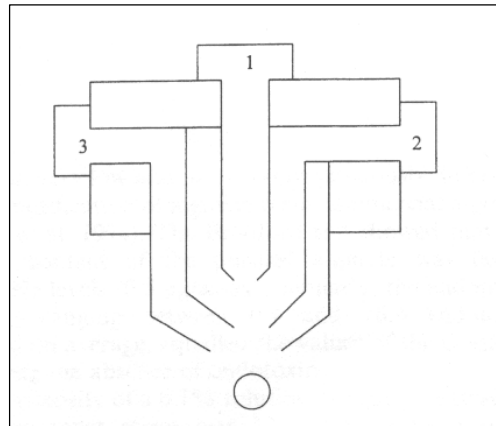


Abbildung 3.9.: Schematische Darstellung der Dreikanaldüse zur Herstellung von Alginatkapseln

sollte das Transplantat vor mechanischen Einflüssen schützen, während die innere, flüssigere Schicht (0,65%iges Alginat) bessere Ernährung durch Diffusion gewährleisten sollte (Jork et al., 2000). Im folgenden wird das Mikroverkapselungsverfahren, wie es in dieser Studie zur Anwendung kam, geschildert:

Der komplette Vorgang des Mikroverkapselns mußte steril unter einer Mikrobiologischen Sicherheitsbank (NUNC Germany GmbH, Art. Nr. 3S 115G 125M) durchgeführt werden.

1. Dem ultrahochgereinigten, gekühlten (5° Celsius) 0,7%igen Alginat wurde zunächst 10% seines Volumens Rattenserum des Empfängerstammes zugesetzt und bei 2400 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend filtrierten wir den Alginatüberstand durch einen 0,22µm großen Sterilfilter (Fa. Schleicher und Schuell, Weinheim, Germany; Art. N° 462200). Ein Teil des 0,7%igen Alginates wurde mit isotoner Natrium-Chlorid Lösung (Fa. Roth GmbH und Co., Karlsruhe, Germany; Art. N° 3957.1) auf eine Konzentration von 0,65 % verdünnt.
2. Die Dreikanaldüse (Abbildung 3.9) mußte auf einem Stativ befestigt und mit Aqua bidest und 0,9prozentiger Natrium-Chlorid Lösung (Fa. Roth GmbH und Co., Karlsruhe; Art. N° 3957.1) gereinigt werden. Vor die Kanäle 2 und 3 wurden Perfusoren befestigt, die den kontinuierlichen Kolbenvorschub einer 2ml und 10ml Einmalplastikspritze gewährleisteten.
3. Die Nebenschilddrüsen wurden in dem Gewebekulturpassagemedium in ca. 2mm große Partikel mit einem Einmalskalpell (Größe 22: Produkte für Medizin

AG, Köln; Art. N° 5890) geschnitten und anschließend zweimal 5 Minuten in einer isotonen Kochsalzlösung (Waschlösung) gewaschen.

4. Die Nebenschilddrüsenpartikel wurden nun in das 0,65%ige Alginat überführt und mit einer 2ml Einmalplastikspritze (Fa. Braun, Melsungen; Art. N° 205789/5) aufgezogen. Diese Spritze wurde dann in den Perfusor vor Kanal 2 eingespannt. In eine 10ml Einmalplastikspritze (Fa. Braun, Melsungen; Art. N° 460605/1) wurde das 0,7%ige Alginat aufgezogen und in den Schlitten vor Kanal 3 eingespannt. Auf Kanal 1 applizierten wir über einen Plastikschlauch ein kontinuierlichen Druckluftstrom von 6,5 l/min. Die Mikroenkapsulierung wurde nun gestartet, indem über den 2.Kanal 1 ml/min Alginat, und über den 3.Kanal 4,5 ml/min Alginat in die Düse gestoßen wurden.
5. Unter den Düsenausgang wurde eine sterile Petrischale (Greiner Labortechnik; Art. N° 294763310) mit dem Barium-Fällbad gestellt, in die die Alginatsphären tropfen. Dieses Fällbad setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 20mmol Barium-Chlorid (Fa. Merck, Darmstadt; Art. N° 159070), 5mmol Histidine (SIGMA, 25g; LOT:87H1335, H-80000) und 115mmol Natrium-Chlorid (Fa. Merck, Darmstadt; Art. N° 101540) in 1 Liter Aqua bidest gelöst und mit Natronlauge (Merck, Darmstadt, Art. N° 1.09137.1000) auf einen pH Wert von 7,4 eingestellt. Die Osmolarität dieser Lösung sollte 0,29mosmol betragen und wurde unter Zunahme eines Osmometers mit Natriumchlorid eingestellt. Auch dieser Lösung wurden 10% Rattenserum hinzugefügt. Die Verweildauer der Kapseln im Fällbad betrug 90 Sekunden.
6. Um das überschüssige Barium-Chlorid zu entfernen, wurden die Kapseln zweimal zu je 5 Minuten mit der Natrium-Chlorid Waschlösung gewaschen. Die Alginatkapseln wurden nun für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer Natriumsulfatlösung inkubiert (6mmol Natriumsulfat [Fa. Merck, Darmstadt; Art. N° 1.06649.10000] in einem Liter Aqua bidest gelöst und die Osmolarität auf 0,29mosmol mit Natriumchlorid eingestellt, abschließend mit 10% Rattenserum versetzt).

Nach 20 Minuten wurden die verkapselten Nebenschilddrüsenpartikel in die Nährlösung (500ml RPMI 1640 mit L-Glutamin [Fa. Gibco Life Technologies, Germany; Art. N° 21875-03], 10ml Penicillin-Streptomycin [Biochrom KG, Berlin; Art. N° A2212], 9ml Calciumchlorid [147mg ad 10ml Aqua dest: Apotheke der Universität Marburg] und 50ml Empfängerserum) überführt. Die Mikrokapseln wurden nun unter einem Zweiphasenauflichtmikroskop (Fa.

Nikon, Japan) bei 25facher Vergrößerung auf die Integrität ihrer Membranen überprüft (Siehe Abbildung 3.10). Rupturierte oder beschädigte Mikro kapseln wurden ausgesondert. Die verkapselten Nebenschilddrüsenpartikel inkubierten wir in der oben genannten Nährlösung einen weiteren Tag im Brutschrank bei 37° Celsius und einer Atmosphäre von 95% O₂ zu 5% CO₂.



Abbildung 3.10.: Mikroverkapseltes Nebenschilddrüsen Gewebe in Nährlösung. Zweiphasenauflichtmikroskop (Fa. Nikon, Japan), Vergrößerung: 1:25

3.4. Erhebung der Messgrößen

3.4.1. Blutentnahmen

Während des Beobachtungszeitraumes wurde jedem Versuchstier einmal wöchentlich in Inhalationsnarkose Vollblut abgenommen, um zytotoxische Antikörper und das Gesamtkalzium im Serum zu bestimmen.

Nach dem raschen Einsetzen der Äther-Inhalationsnarkose wurde mit einem Kapillarröhrchen (75 mm / 75 µl, Natrium-Heparin beschichtet: Germany; Art. N° 9100275), unter leichtem Stau der Halsvenen, 0,5ml bis 0,7ml Blut aus dem Plexus orbitalis in ein Eppendorfzentrifugenröhrchen (Reaktionsgefäß 3810: Eppendorf, Hamburg; Art. N° 048016) abgenommen. Das Vollblut wurde direkt nach Entnahme für 20 Minuten bei 6000 U/min. zentrifugiert. Dabei setzten sich die korpuskulären Bestandteile ab und der Überstand, das Serum, kann abpipettiert werden. 100µl des Serums wurden bei -20° Celsius eingefroren, um daraus die Antikörper zu bestimmen, aus weiteren 100µl wurde das Gesamtkalzium bestimmt.

3.4.2. Kalziumbestimmung

Das Gesamtkalzium im Serum wurde im Zentrallabor der Universitätsklinik Marburg mit einem klinisch-chemischen Analyseautomaten des Typs Roche/Hitachi 917 (Nagoya, Japan) bestimmt. Es handelte sich hierbei um einen Farbumschlagtest mit Endpunkt-Bestimmung und Probenleerwert. Der Analyseautomat mischte das Testserum mit Pufferlösung und Chromogenlösung (Roche Diagnostics; Art N° 1730240). Die Farbintensität des gebildeten violetten Komplexes ist direkt proportional der Kalziumkonzentration und wurde photometrisch bestimmt.

3.4.3. Mikrolymphozytotoxizitätstest

Mit Hilfe des Mikrolymphozytotoxizitätstests wurde der logarithmische Titer der zytotoxischen Antikörper im Serum bestimmt. Zytotoxische Antikörper sind eine Gruppe von Antikörpern (hauptsächlich IgG₃ und IgM) die ihre Zielzellen unter Anwesenheit von Komplement lysieren (Frank und Fries, 1991). 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 Armström große Poren in der Zellwand formt (Müller-Eberhard, 1986). Die Zelle ist nun nicht mehr in der Lage, ihr ionales Gleichgewicht aufrecht zu erhalten und geht zugrunde. Das Prinzip des Mikrolymphozytotoxizitätstests basiert darauf, dass sich diese lysierten Zellen anfärben lassen, da sie einen Farbstoff, wie Eosinrot, nicht mehr aus dem Zellinneren abtransportieren können (Terasaki et al., 1978).

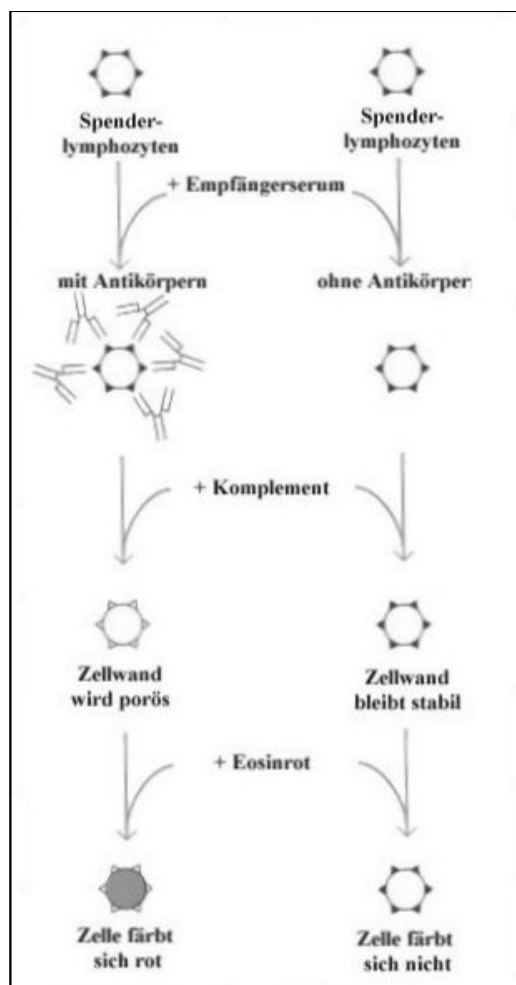


Abbildung 3.11.: Prinzip des Mikrolymphozytotoxizitätstests

Zunächst mussten dazu Spenderlymphozyten, als Zielzellen, gewonnen werden. Dazu wurde eine Spenderratte (DA oder LE, je nachdem welches Serum untersucht werden sollte) eingeschläfert (Euthanasie-Unit; Fa. UNO, Zevenaar, Holland). Ihr wurden drei bis vier Lymphknoten aus dem infrahyalen Fettgewebe mit einer Präparierschere entnommen. Die entnommenen Lymphknoten wurden in ein Zentrifugenröhrchen mit Nährmedium (TC100 Medium, GIBCO; Art. N° 13055-025) überführt. Die Lymphknoten wurden in eine sterile Petrischale dekantiert und mit zwei spitzen Pinzetten vom Fett gelöst. Nach einem Wechsel des Nährmediums wurden die Lymphknoten vorsichtig „gezupft“, dabei entstanden „Lymphozyten-Wolken“. Die nun im Nährmedium gelösten Lymphozyten wurden dann möglichst quantitativ mit einer Pasteurpipette (Pasteur Capillar Pipette, 150mm) in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Der Lymphozytenüberstand wurde dann zweimal mit Nährmedium ausgewaschen und anschließend bei 21° Celsius für 10 Minuten bei 900 U/min zentrifugiert. Der Lymphozyten-Niederschlag wurde daraufhin mit einer Pasteurpipette in 10ml Nährmedium (TC100 Medium, GIBCO; Art. N° 13055-025) überführt und die Zellzahl unter der Neubauerzählkammer auf 10^7 Zellen pro ml mit weiterem Nährmedium eingestellt.

Nach dem langsamen Auftauen der Empfängerseren, wurden 3µl in den ersten Napf einer Mikrotiterplatte (72 Well; Braun-Melsungen, Art. N° 654180) gegeben. Es wurde dann in den verbleibenden 5 Kavitäten der Mikrotiterplatte eine logarithmische Verdünnungsreihe der Empfängerseren mit Nährlösung hergestellt. In jeden Napf der Platte wurde ein Tropfen Parafinöl (Fluka Chemie AG, Art. Nr.76235) pipetiert, um einem Austrocknen der Seren vorzubeugen.

In jede Kavität wurde 3µl Lymphozytenlösung hinzu pipetiert. Die Lymphozyten wurden mit den Testseren eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden 6µl Kaninchenkomplement (Behring ORAX, 07) in jeden Napf gegeben und das Gemisch zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Anfärben der lysierten Zellen wurden 3µl Eosinrotlösung 5% (Apotheke des Klinikums der Philipps-Universität Marburg) in jede Kavität pipetiert. Nach fünf Minuten wurde der Vorgang durch Hinzufügen von 6µl 37prozentigem Formaldehyd (SIGMA-Alchid Chemie GmbH, Steinheim; Art. N° 25,254-9) konserviert. Die Mikrotiterplatte wurde nun mit einem Deckglas abgedeckt. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur hatten sich die Lymphozyten auf dem Boden der Kavitäten abgesetzt. Der Test wurde mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop

(Fa. Leitz, Wetzlar) bei 100facher Vergrößerung ausgewertet. Ab 50% lysierter, also dunkelrot angefärbter Zellen, wurde das Serum als antikörperpositiv angesehen. Da bei diesem Test äußere Störfaktoren, wie Temperaturschwankungen, UV-Licht und suboptimale Ernährung die Lebenszeit der Lymphozyten verkürzten, wiesen erst Lyseraten ab 50% eindeutig auf eine Komplementbindungsreaktion mit Zytotoxischen Antikörpern hin (Mueller-Eckhardt, 1994).

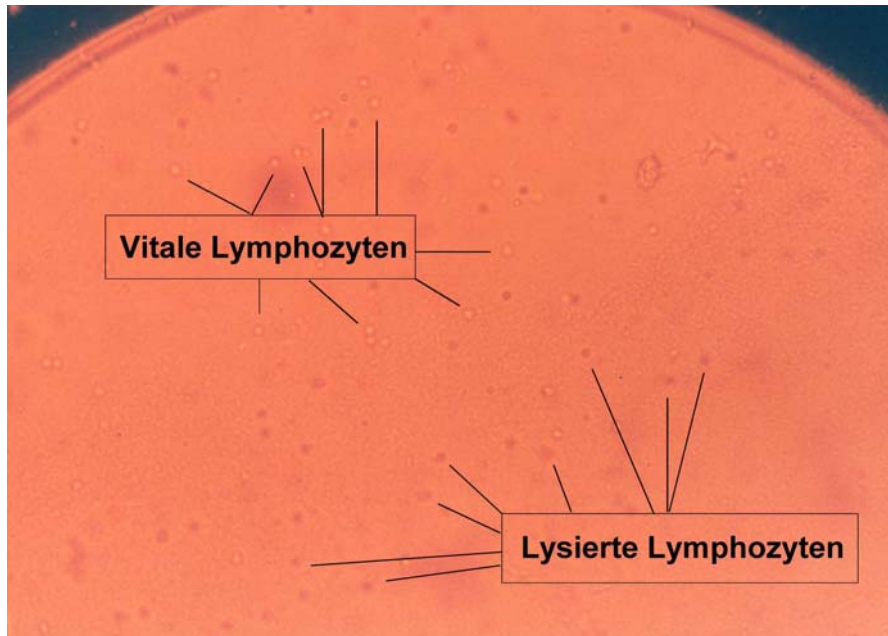


Abbildung 3.12.: Auswertung des Mikrolymphozytotoxizitätstests. Deutlich abzugrenzen: lysierte Zellen von intakten Zellen. Vergrößerung 1:100

3.5. Statistische Berechnung der Stichprobenumfänge

Das Studiendesign und die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Sitter, Institut für Theoretische Chirurgie der Universität Marburg, und Herrn Dr. Wonnigeit, Medizinische Hochschule Hannover, durchgeführt. Im Studiendesign wurde der Stichprobenumfang auf fünf Tiere pro Studiengruppe festgelegt. Fünf Tiere waren nach der Fuhrbergformel ausreichend, um ein Parameter der Studiengruppen mit hinreichender Signifikanz ($\alpha \leq 0,05$) und einem annehmbaren Fehler zweiter Art ($\beta \leq 0,2$) gegeneinander zu testen.

Die Hauptfragestellung dieser Studie lautete: Schützt die Mikroenkapsulierung vor der Bildung spezifischer Antikörper gegen den Kapselinhalt ?

Bei funktionierender Immunisolierung durch die Mikrokapsel müsste am Tage der Hauttransplantation der größte Unterschied im Antikörpertiter der Test- und Kontrollgruppen sein. Nämlich keine Antikörper in den Testgruppen im Gegensatz zu vielen Antikörpern in den Kontrollgruppen. Daraus leitete sich die folgende Nullhypothese H_0 ab: Die Antikörpertiter am Tage der Hauttransplantation ($t=0$) waren in der Kontroll- und Testgruppe ein Produkt des Zufalls. Dazu formulierte sich die Alternativhypothese H_1 , dass die Antikörpertiter am Tage der Hauttransplantation ($t=0$) in der Kontrollgruppe und der Testgruppe tatsächlich signifikante ($\alpha \leq 0,05$) Unterschiede aufwiesen.

Die Antikörpertiter wurden erhoben, indem die Testseren immer höher verdünnt wurden und diejenige Verdünnung als Messwert angegeben wurde, bei der eben noch eine Antikörperreaktion nachweisbar ist. Da logarithmisch verdünnt wurde (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16), lagen die Werte nicht in linearer Form vor. Deshalb wurde bei der Auswertung der Antikörpertiter auf den nichtparametrischen Test nach Mann-Whitney ausgewichen. Der Vorteil dieses Tests liegt darin, dass die Messwerte weder linear noch normalverteilt sein müssen.

Der Antikörpertiter wurde also als Hauptvariable ausgewertet, wobei getestet wurde, ob die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($\alpha \leq 0,05$) abgelehnt werden konnte. War dies der Fall, wurde die Alternativhypothese mit entsprechend hoher Wahrscheinlichkeit angenommen (Clauß und Ebner, 1982). Die Transplantatabstoßungszeit und die Kalziumverläufe konnten nicht statistisch ausgewertet werden, da von einer Abhängigkeit der Messwerte ausgegangen werden musste und sich somit die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie richtig ist (Fehler 1. Art) mit jedem zusätzlichen Messwert halbierte. Sie stellten jedoch deskriptive Nebenvariablen dar, aus denen Rückschlüsse auf den Immunstatus und den Transplantatzustand gezogen werden konnte. Die Transplantatabstoßungszeit wurde dabei in Tagen angegeben, wonach bei einer Transplantationsabstoßungszeit von unter 9 Tagen von einem spezifisch vorstimuliertem Immunsystem ausgegangen wurde und bei einer Transplantationsabstoßung nach 11 Tagen von einem unstimulierten Immunsystem ausgegangen werden konnte (Kuby, 1996). Die Kalziumverläufe wurden in mmol/l Gesamtkalzium im Serum angegeben. Da sich das Gesamtkalzium im Serum streng reziprok zur PTH-Sekretion verhält, war die Kalziummessung ausreichend aussagekräftig über die Transplantatfunktion (Ziegler, 1987). Zu Grunde gelegt wurden dabei die bisher aus Vorversuchen in der eigenen Arbeitsgruppe bekannten

Daten zur Serumkalziummessung im Versuchstier vor und nach Parathyreidektomie und nach Allotransplantation von Nebenschilddrüsen. (Hasse et al., 1994b und 1997a) Hiernach wurde von einem totalen Transplantatausfall bei Kalziumwerten unter 1,9mmol/l ausgegangen (Hasse et al., 1996).

4. Ergebnisse

4.1. Operative Eingriffe

4.1.1. Narkose

Die intramuskuläre Injektionsnarkose mit Ketanest[®] und Rompun[®] wurde von allen Tieren gut toleriert. Die meisten Tiere benötigten nur 0,5ml des Narkosegemisches, um eine optimale Narkosetiefe zu erreichen. Ansonsten konnte bis zu 1ml nachgespritzt werden, ohne dass es dabei zu Narkosezwischenfällen, im Sinne eines Atemstillstandes oder Kreislaufversagens, kam. So starb intraoperativ bei den 210 durchgeführten Operationen mit Injektionsnarkose kein Tier.

Die therapeutische Breite bei der Kurzzeitnarkose mit Äther war deutlich geringer. Es verstarben bei den Blutentnahmen von 930 durchgeführten Äthernarkosen 5 Tiere am akuten Kreislaufversagen.

4.1.2. Parathyreoidektomie, Hypokalzämie und Mortalität

Nach der Parathyreoidektomie von 600 Tieren fielen 83% mit dem Serumgesamtkalzium auf einen durchschnittlichen Wert von 1,47mmol/l. Die restlichen 17% blieben im Normbereich (2,1-2,6mmol/l), hier musste von einer inkompletten Explantation der Nebenschilddrüsen ausgegangen werden.

Bei eindeutig hypokalzämischen (Serumgesamtkalziumwerte unter 1,9mmol/l) Tieren konnte nach ca. 1-2 Wochen glanzloses Fell, Haarausfall und vereinzelt tetanische Anfälle beobachtet werden. Auch nahmen die hypokalzämischen Tiere im Vergleich zu den normokalzämischen Tieren kaum an Gewicht zu.

2 Tiere starben 7 und 8 Wochen nach Allotransplantation von verkapseltem Nebenschilddrüsengewebe und nach Hauttransplantation an den Folgen der akuten Hypokalzämie (bei Serumkalziumwerten unter 1,2mmol/l). Diese Tiere wurden aus der Studie ausgeschlossen. Bei der Explantation der Transplantatlager dieser Tiere fielen defekte, fibrosierte Alginatkapseln und vernarbtes Nebenschilddrüsengewebe auf.



Abbildung 4.1.: Optischer Befund bei Hypokalzämie. Haarausfall und glanzloses Fell sind typische Symptome.

4.1.3. Hauttransplantation

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 5 Tieren musste der Verband neu angelegt werden, ohne dass sich das Transplantat gelöst hatte. Bei einem Tier musste die Hauttransplantation wiederholt werden, da sich am zweiten Tag nach der Operation der Verband und das Transplantat gelöst hatten. Alle Allotransplantate wuchsen initial an, allerdings variierte die Abstoßungszeit der Hauttransplantate innerhalb derselben Gruppe (Studiengruppe I) zwischen 8 und 15 Tagen.

4.2. Messwerte

4.2.1. Studienarm I (Test- und Kontrollgruppe) – Maximale Immunstimulation.

Die Testgruppe I und ihre Kontrollgruppe wurden als Referenzgruppen erstellt, um eine Beeinflussung der Antikörperbildung und Hauttransplantatabstoßung durch die Parathyreoidektomie auszuschließen. Außerdem sollten die Antikörperwerte bei maximaler Immunstimulation ermittelt werden.

In beiden Studiengruppen hatten alle Versuchstiere 2 Wochen nach der zweiten Hauttransplantation einen maximalen Antikörpertiter. Zwar scheint die Parathyreoidektomie und daraus resultierende Hypokalzämie in der Testgruppe zunächst eine leichte Verzögerung der Antikörperbildung zu induzieren, dieser Trend wird aber bei der 2. Hauttransplantation ausgeglichen.

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. Die Parathyreoidektomie und daraus resultierende Hypokalzämie hatten keinen Einfluss auf das Abstoßungsverhalten der Hauttransplantate in den beiden Studiengruppen.

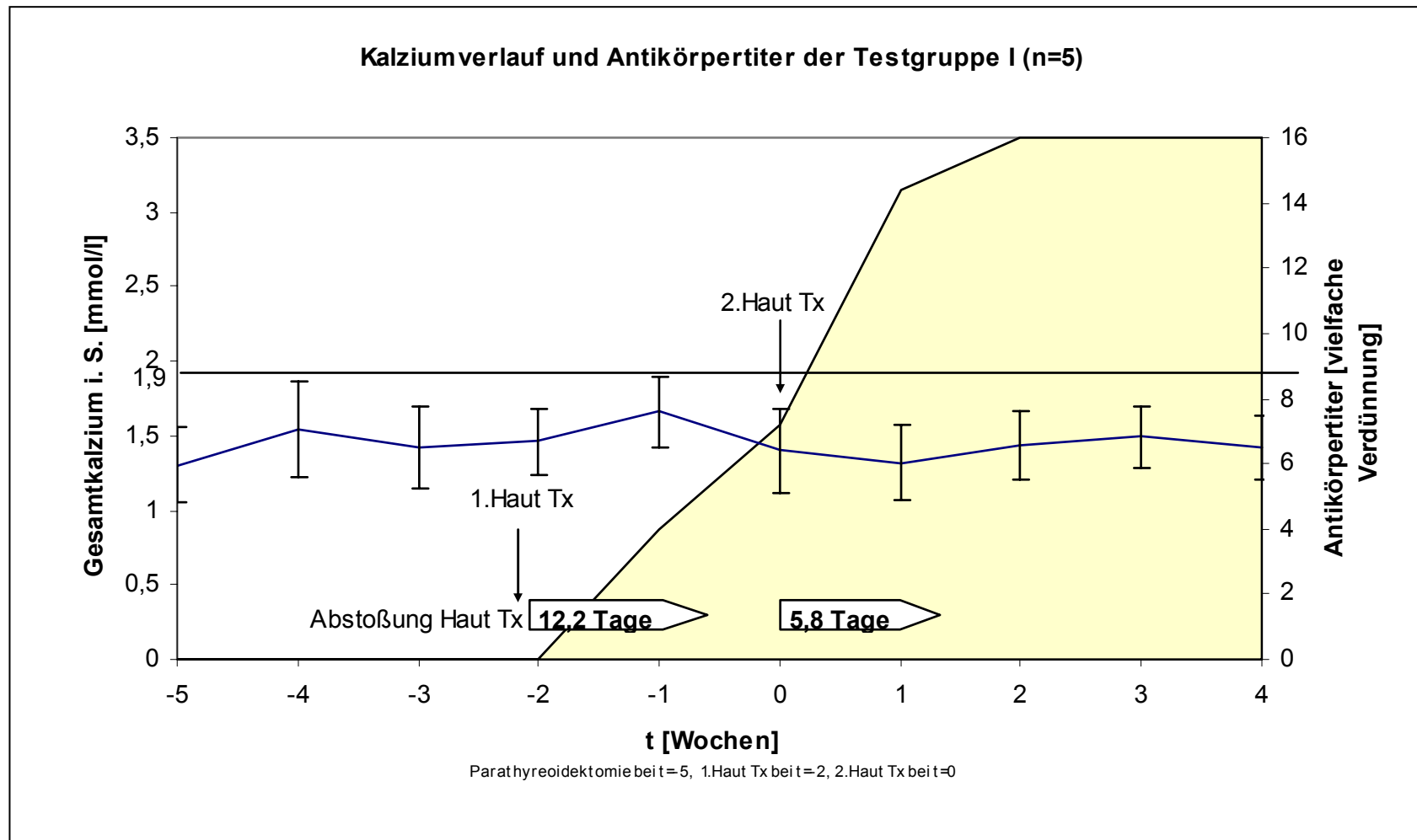


Abbildung 4.2.: Darstellung des Kalziumverlaufs, Antikörpertiters und Hauttransplantatabstoßung der Testgruppe I. Die dauerhaft hypokalzämischen Tiere nach Parathyreoidektomie bilden rasch spezifische Antikörper und stoßen das zweite Hauttransplantat deutlich schneller ab, als das erste. Der Kalziumverlauf ist blau und der Antikörpertiter hellgelb dargestellt.

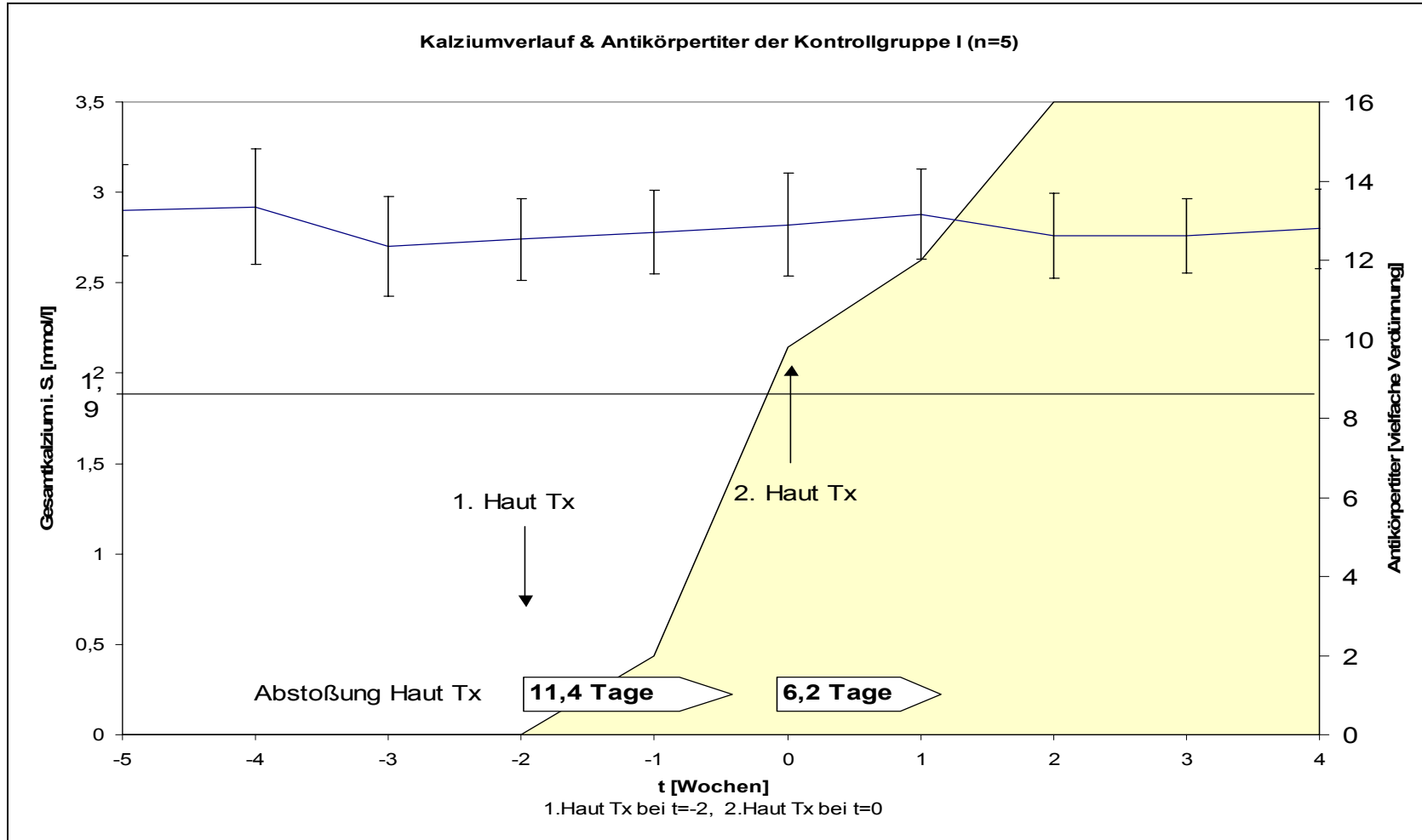


Abbildung 4.3.: Graphische Darstellung des Kalziumverlaufs mit Standardabweichung und mittleren Antikörpertiters der Kontrollgruppe I.

4.2.2. Testgruppe II – Auftreten einer Frühreaktion ?

In der Testgruppe II konnten trotz Gewebekulturpassage und der fraglichen Immunisation durch die Mikro kapsel bei 4 von 5 Versuchstieren nach zwei Wochen Antikörper nachgewiesen werden. Nach der Hauttransplantation stiegen die zytotoxischen Antikörper im Serum steil an und erreichten nach vier Wochen den maximal möglichen Wert.

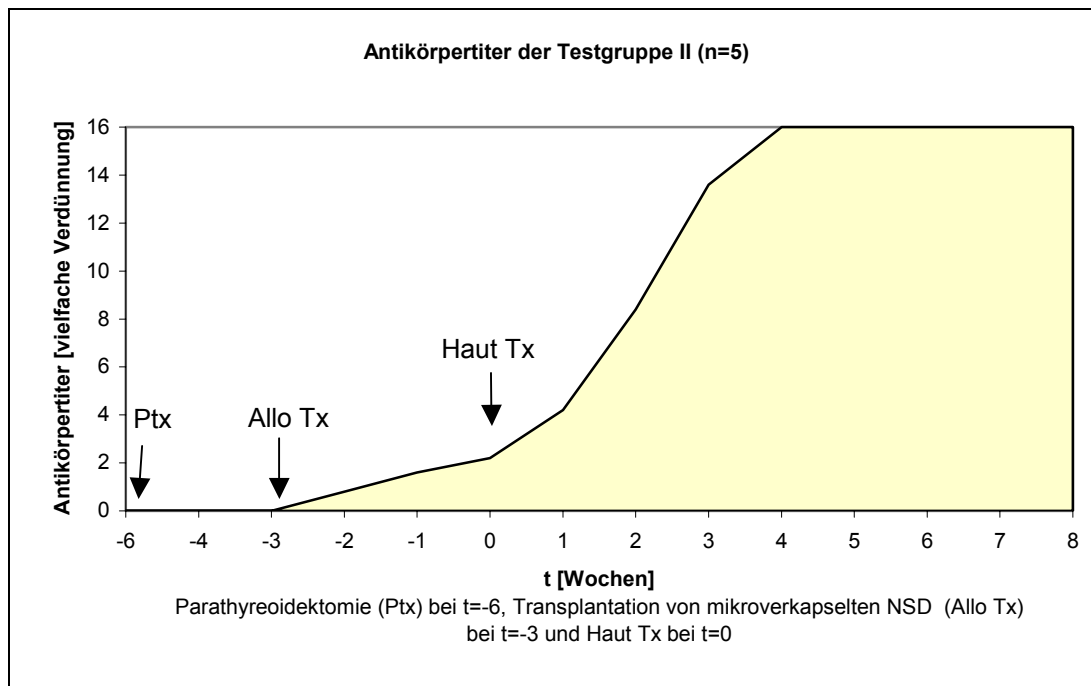


Abbildung 4.4.: Darstellung des Antikörpertiters der Testgruppe II - Frühreaktion nach verkapselten NSD-Transplantaten und Hauttransplantation (Haut Tx); 16 gibt die größtmögliche Verdünnung (1:16) des Antikörpertiters an

Das Serumgesamtkalzium wurde in dieser Studiengruppe wöchentlich gemessen, um Rückschlüsse auf die Transplantatfunktion in vivo zu ziehen. Bei Kalziumwerten im Normbereich (2,1-2,6mmol/l) ist von einer guten Transplantatfunktion auszugehen. Bei einem Serumgesamtkalzium unter 1,9mmol/l ist von einem totalen Transplantatausfall der verkapselten Nebenschilddrüsen (NSD) auszugehen. Alle Versuchstiere sind nach der Nebenschilddrüsentransplantation mit dem Serumkalzium wieder in angestiegen und halten ihr Gesamtkalzium im unteren Normbereich über ca. 9 Wochen.

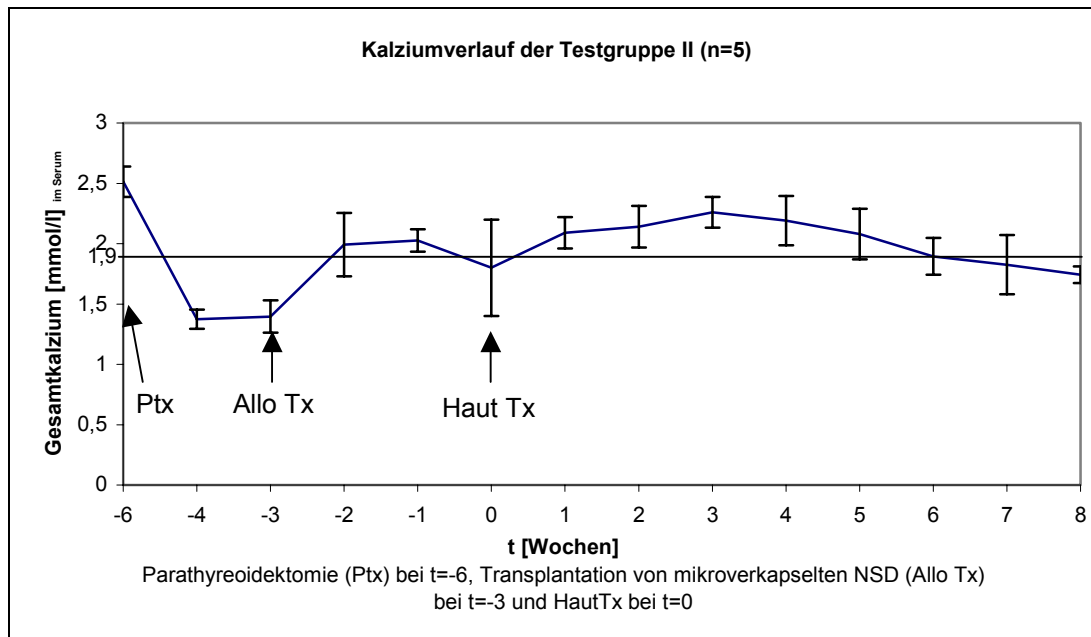


Abbildung 4.5.: Darstellung des Mittelwertes mit Standardabweichung des Serumkalziums der Testgruppe II. Deutlicher Anstieg des Serumkalziums auf Werte über 1,9mmol/l für 9 Wochen nach der Transplantation von mikroverkapselten Nebenschilddrüsen

Das Hauttransplantat wurde nach durchschnittlich **11 Tagen** abgestoßen, wobei dieser Wert bei einer Varianz $v=6,5$ **Tagen** einer starken Schwankung unterlag.

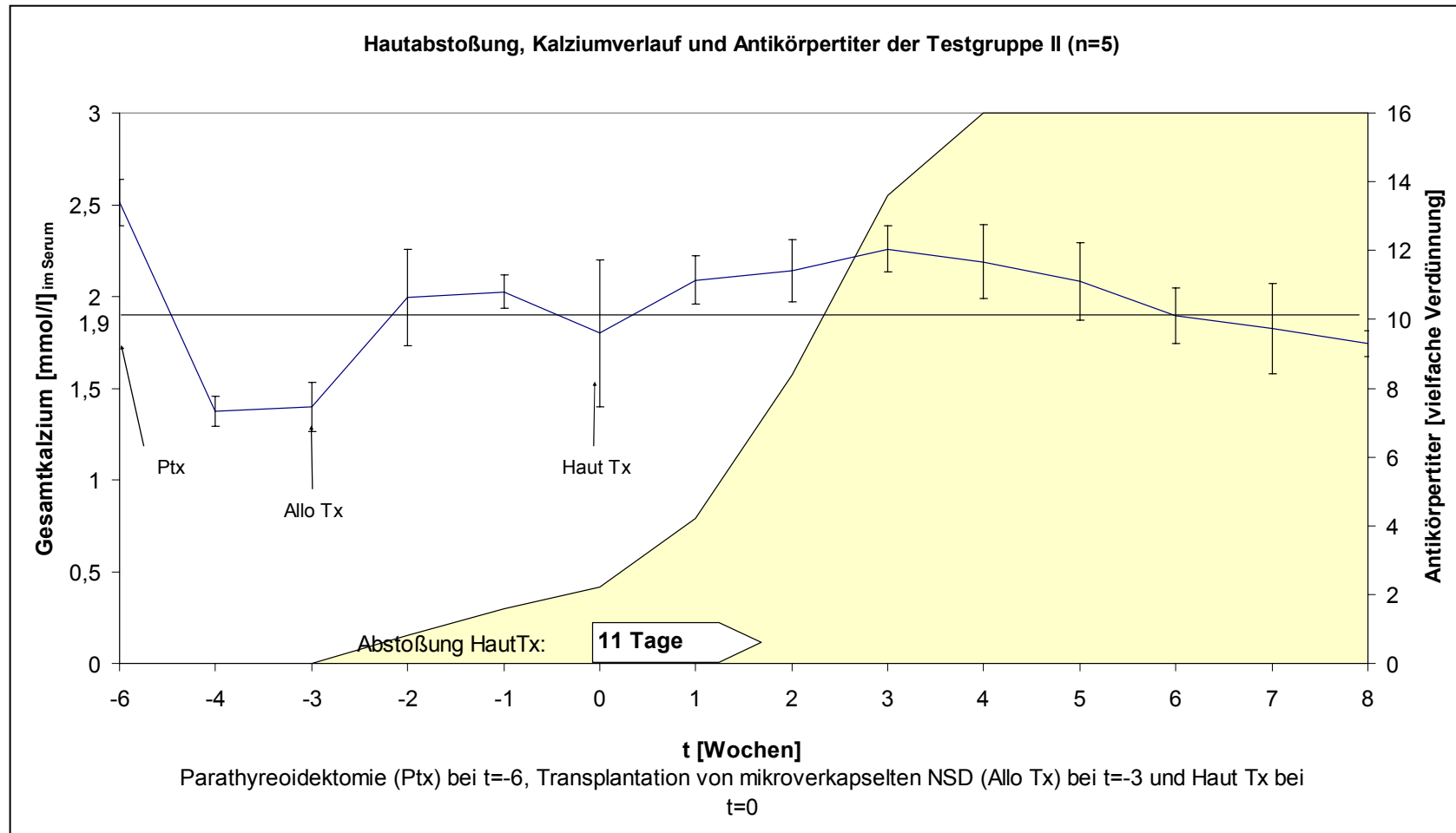


Abbildung 4.6.: Darstellung der Serumgesamtkalziumwerte, Antikörper und Hauttransplantatabstoßung der Studiengruppe III. Trotz vorhandener Antikörper, Hautabstoßung erst nach 11 Tagen.

4.2.3. Kontrollgruppe II - Auftreten einer Frühreaktion ?

In der Kontrollgruppe II stiegen die Antikörpertiter ohne den immunologischen Schutz der Mikrokapsel, aber nach Gewebekulturpassage, deutlich schneller an, als in der Testgruppe. So erreichten 2 von 5 Versuchstieren bereits vor der Hauttransplantation den maximal messbaren Wert. Nach der Hauttransplantation stiegen die zytotoxischen Antikörper im Serum weiter stetig an und erreichten nach zwei Wochen bei allen Versuchstieren den maximal möglichen Wert.

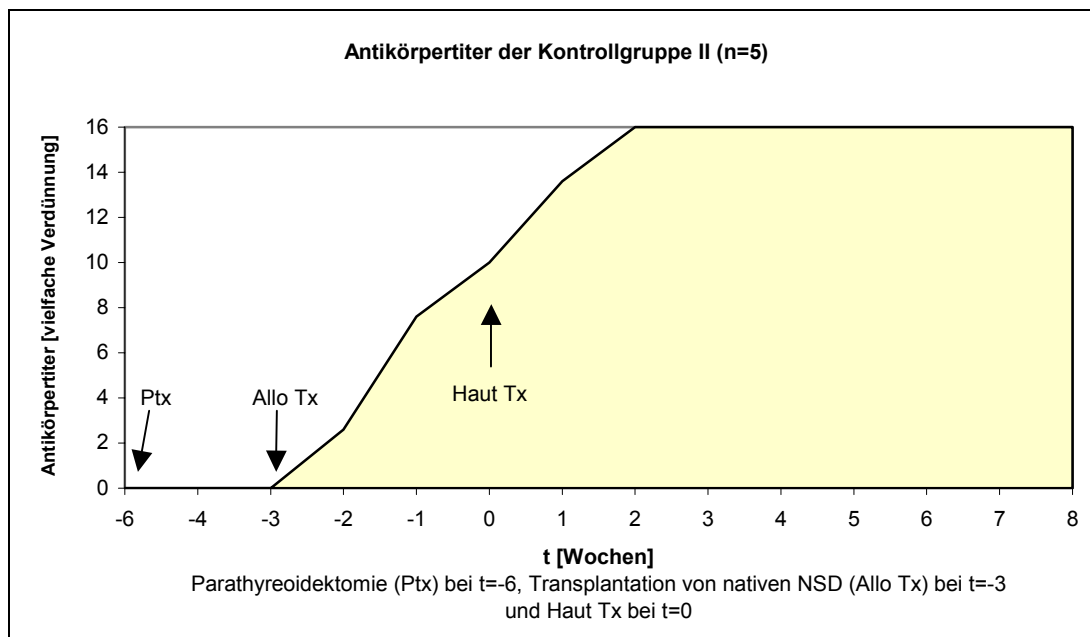


Abbildung 4.7.: Darstellung des mittleren Antikörpertiters der Kontrollgruppe II; 16 gibt die größtmögliche Verdünnung (1:16) des Antikörpertiters an

Der Kalziumverlauf der Kontrollgruppe II zeigte den charakteristischen sprunghaften, aber kurzen Anstieg des Serumgesamtkalziums unmittelbar nach Transplantation der nativen Nebenschilddrüsenpartikel. Jedoch waren alle fünf Versuchstiere bereits 3 Wochen nach Allotransplantation der NSD dauerhaft hypokalzämisch (unter 2,1mmol/l). 9 Wochen nach der Nebenschilddrüsentransplantation waren alle Tiere auf ein Serumgesamtkalziumwert unter 1,9mmol/l abgefallen. Hier ist von einem totalen Transplantatausfall auszugehen.

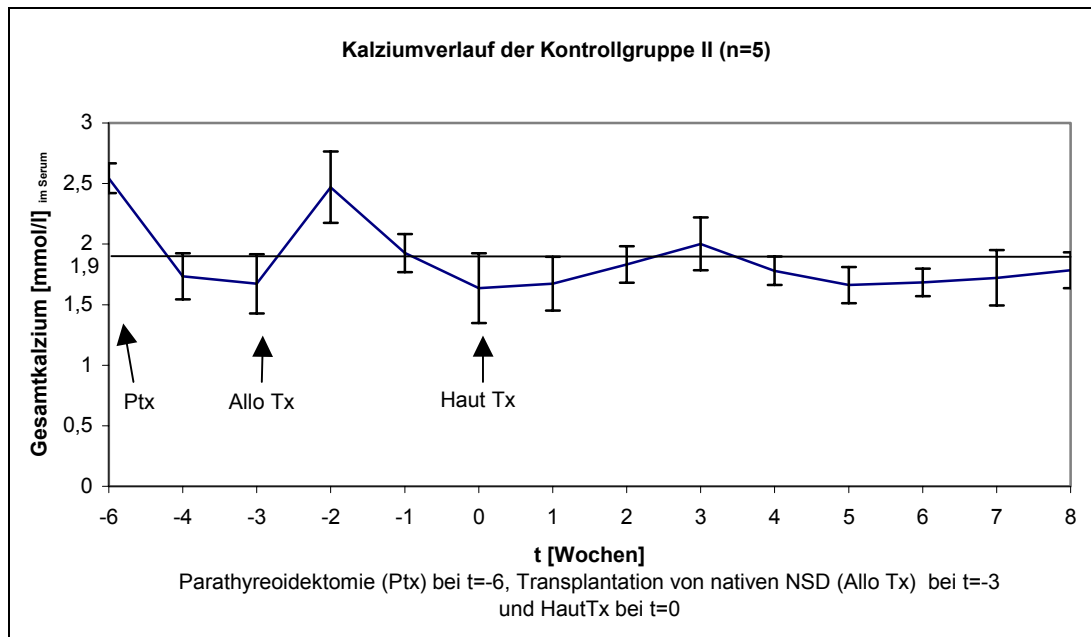


Abbildung 4.8.: Graphische Darstellung des Serumgesamtkalziums (Mittelwert mit Standardabweichung) der Kontrollgruppe II.

Das Hauttransplantat wurde trotz des hohen Antikörpertiters und Hypokalzämie (Kalzium unter 1,9mmol/l) aller Versuchstiere nach durchschnittlich erst **12 Tagen** abgestoßen, wobei dieser Wert bei einer Varianz $v=5,5$ **Tagen** einer starken Schwankung unterlag.

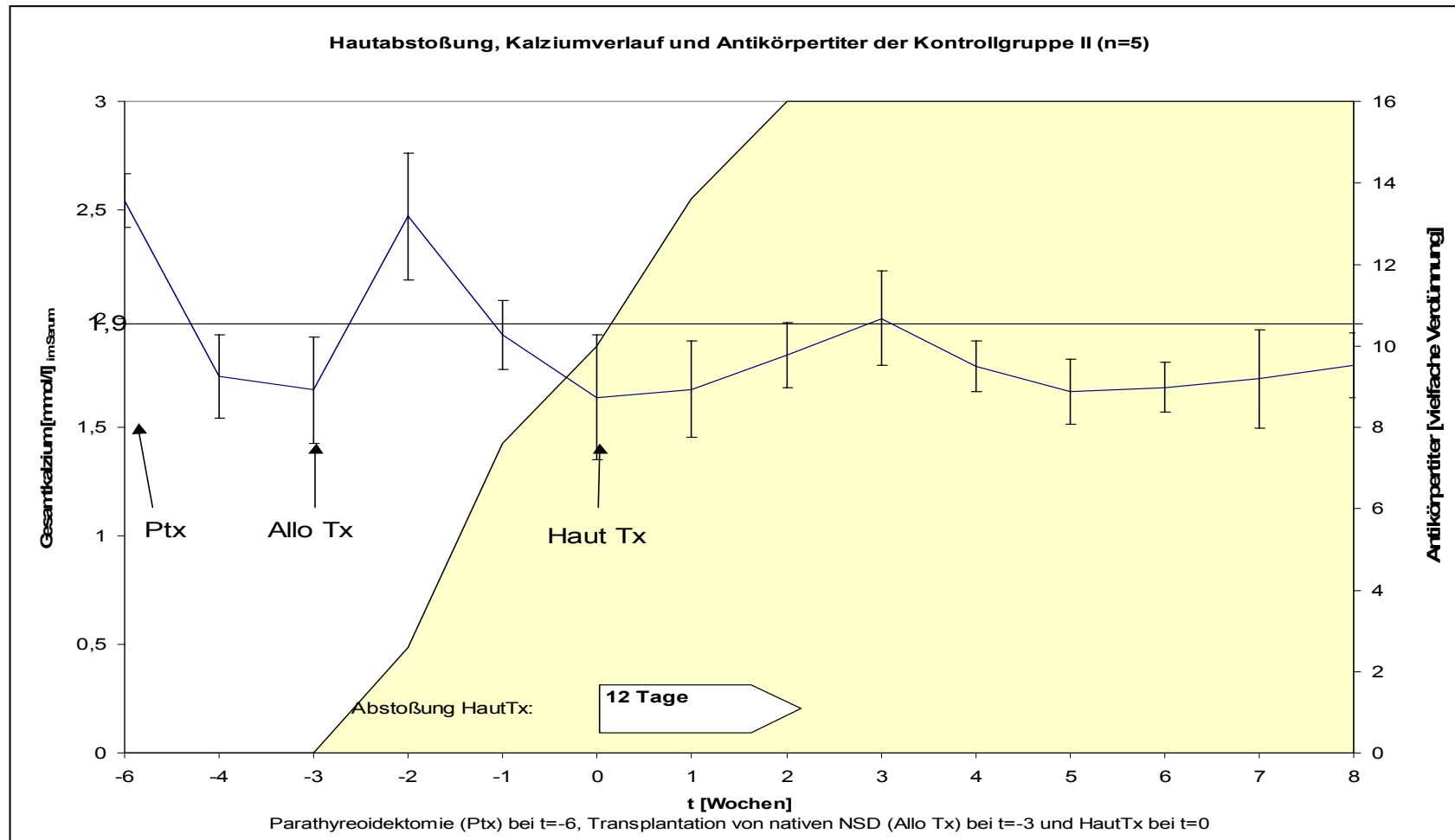


Abbildung 4.9.: Graphische Darstellung der Serumgesamtkalziumwerte, Antikörper und Hauttransplantatabstoßung der Kontrollgruppe II. Frühreaktion mit nativem Nebenschilddrüsengewebe.

4.2.4. Testgruppe III – Auftreten einer Spätreaktion ?

Auch in der Testgruppe III zeigte sich trotz der Immunisolation durch die Mikrokapself bei allen Versuchstieren ein Anstieg der spezifischen, zytotoxischen Antikörper gegen das allogene Nebenschilddrüsengewebe. Insbesondere in der 6. Woche nach Allotransplantation der NSD stiegen die Antikörpertiter bei 3 von 5 Tieren sprunghaft an. Zum Zeitpunkt der Hauttransplantation hatten bereits 2 von 5 Tieren den höchsten messbaren Antikörpertiter. Drei Wochen nach der Hauttransplantation verfügten alle Versuchstiere über den Maximalwert an Antikörpern.

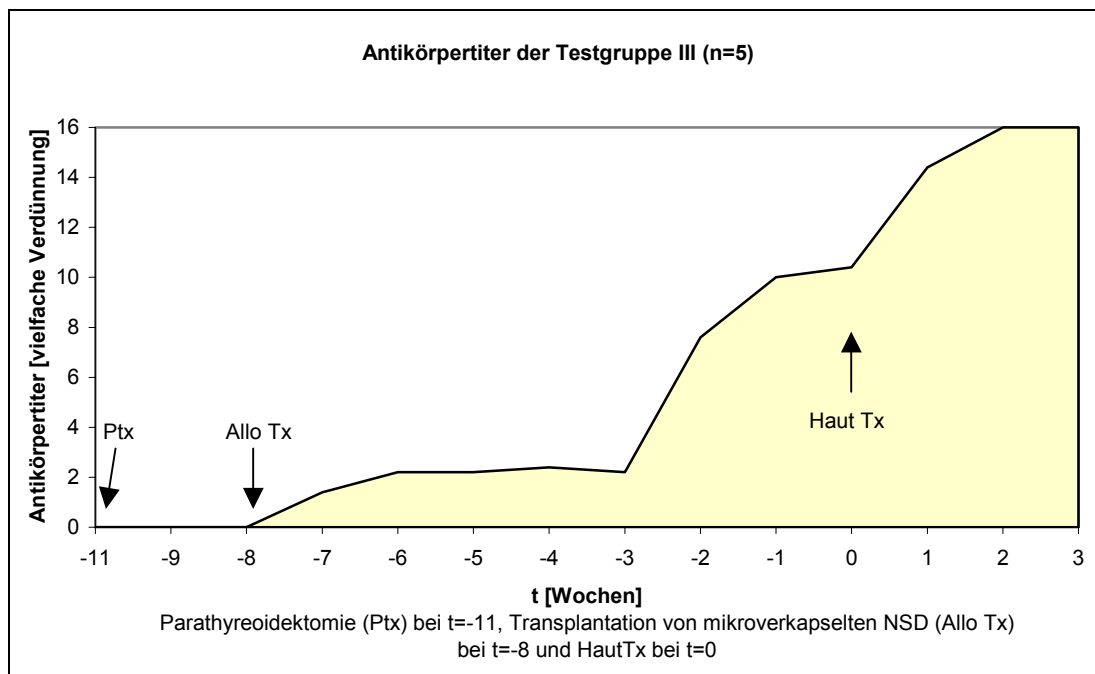


Abbildung 4.10.: Graphische Darstellung des mittleren Antikörpertiters mit Standardabweichung der Testgruppe III (Spätreaktion nach verkapseltem NSD-Transplantaten und Haut Tx); wobei 16 die größtmögliche Verdünnung angibt

Die Serumgesamtkalziumwerte dieser Testgruppe streuten nicht so sehr wie in der Testgruppe II (die mittlere Varianz $v=0,04\text{mmol/l}$). Allerdings fielen 3 von 5 Tieren bereits 3 Wochen nach Implantation der verkapselten Nebenschilddrüsenpartikel (NSD) auf Serumkalziumwerte unter $1,9\text{mmol/l}$ ab. Hier ist von einem Transplantatversagen auszugehen. Nach der Hauttransplantation stiegen die Kalziumwerte noch einmal für eine Woche kurzfristig an.

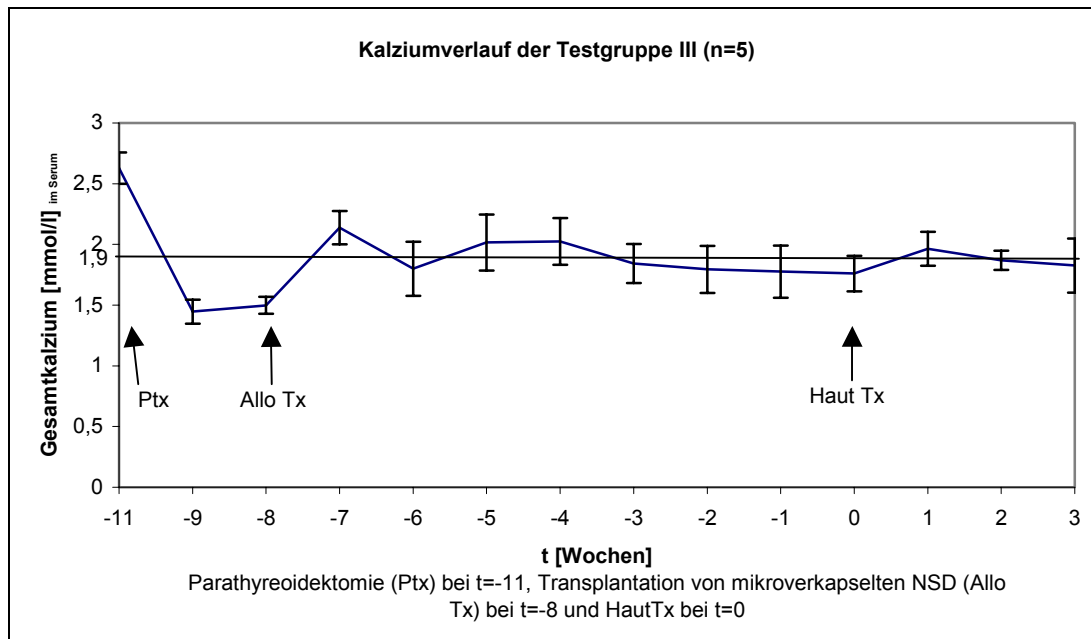


Abbildung 4.11.: Graphische Darstellung des Serumkalziums (Mittelwert mit Standardabweichung) der Testgruppe III.

Das Hauttransplantat wurde trotz des signifikanten Antikörpertiters erst nach durchschnittlich **11,6 Tagen** abgestoßen. Dieser Wert unterlag bei einer Varianz $v=1,8$ Tage kaum einer Schwankung.

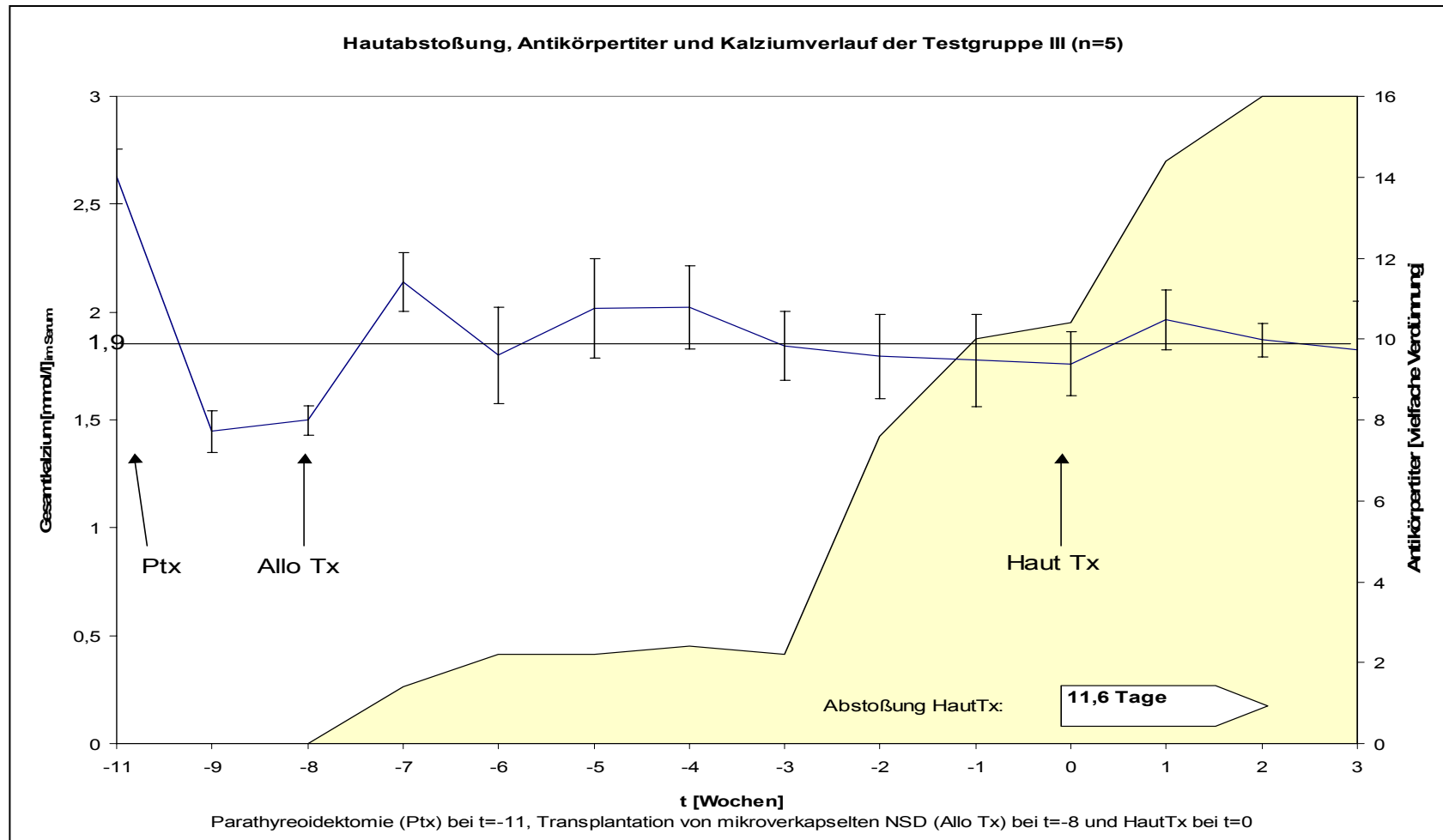


Abbildung 4.12.: Graphische Darstellung der Serumgesamtkalziumwerte, Antikörper und Hauttransplantatabstoßung der Testgruppe III.

4.2.5. Kontrollgruppe III – Auftreten einer Spätreaktion ?

In der Kontrollgruppe III stiegen die Antikörpertiter initial deutlich schneller an, als in der Testgruppe. Die Antikörpertiter streuten jedoch stark. So hatte ein Versuchstier bereits eine Woche nach der Nebenschilddrüsentransplantation den maximal messbaren Wert erreicht, während 2 von 5 Versuchstieren erst eine Woche nach der Hauttransplantation den maximalen Antikörpertiter von 1:16 erreichten.

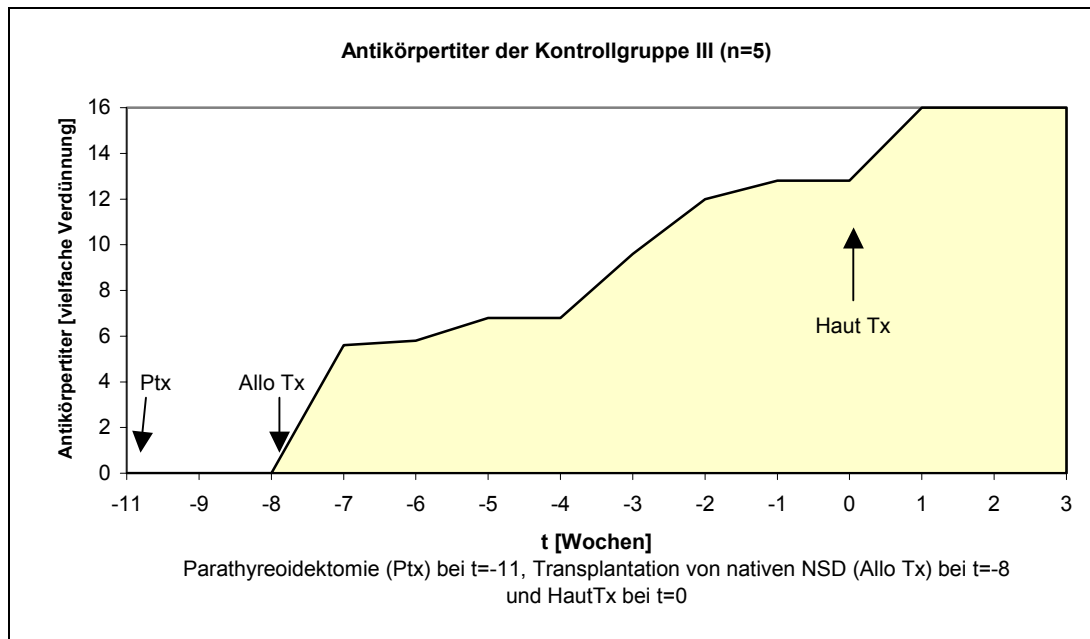


Abbildung 4.13.: Graphische Darstellung des Antikörpertiters (Mittelwert mit Standardabweichung) der Kontrollgruppe III; 16 gibt die größtmögliche Verdünnung (1:16) des Antikörpertiters an

Der Kalziumverlauf der Kontrollgruppe III zeigte, wie in der Kontrollgruppe II, den charakteristischen sprunghaften, aber kurzfristigen Anstieg des Serumgesamtkalziums unmittelbar nach Transplantation der nativen, ungeschützten NSD. Alle fünf Versuchstiere waren 4 Wochen nach Allotransplantation der NSD-partikel dauerhaft hypokalzämisch (unter 1,9mmol/l). Bereits 6 Wochen nach der Nebenschilddrüsentransplantation waren alle Tiere auf ein Serumgesamtkalziumwert unter 1,9mmol/l gesunken. Wobei 2 Wochen nach der Hauttransplantation der Kalziumspiegel im Durchschnitt um 0,3mmol/l auf circa 2,0mmol/l kurzfristig anstieg.

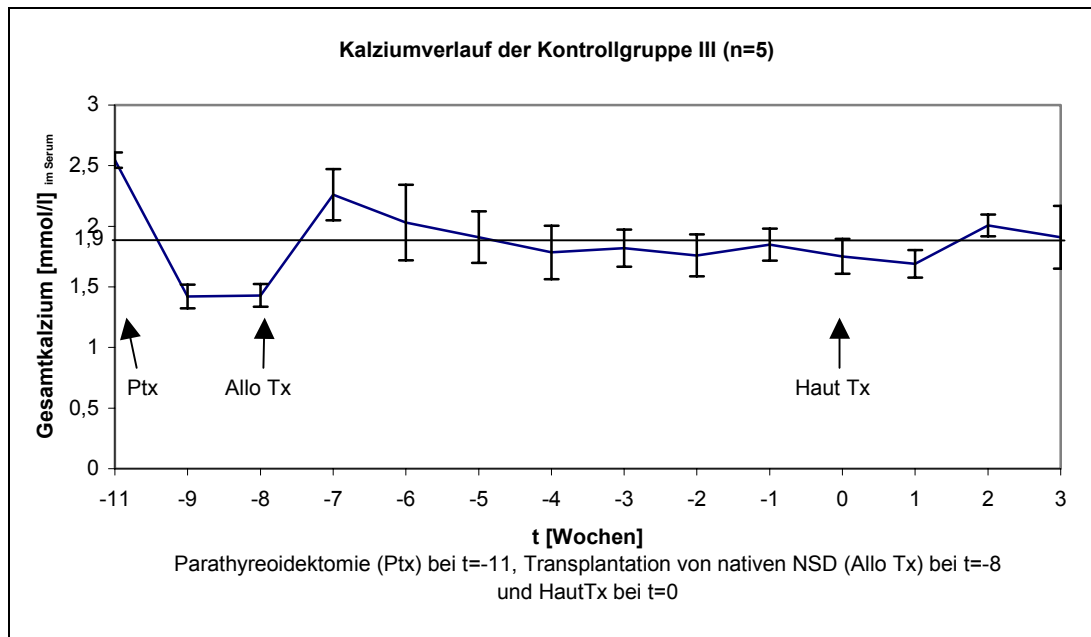


Abbildung 3.14.: Graphische Darstellung des Serumkalziums (Mittelwert mit Standardabweichung) der Kontrollgruppe III.

Das Hauttransplantat wurde trotz des hohen Antikörpertiters und deutlicher Hypokalzämie (unter 1,9mmol/l) erst nach durchschnittlich **12,4 Tagen** abgestoßen. Dieser Wert unterlag bei einer Varianz $v=4,3$ **Tagen** einer mittleren Schwankung.

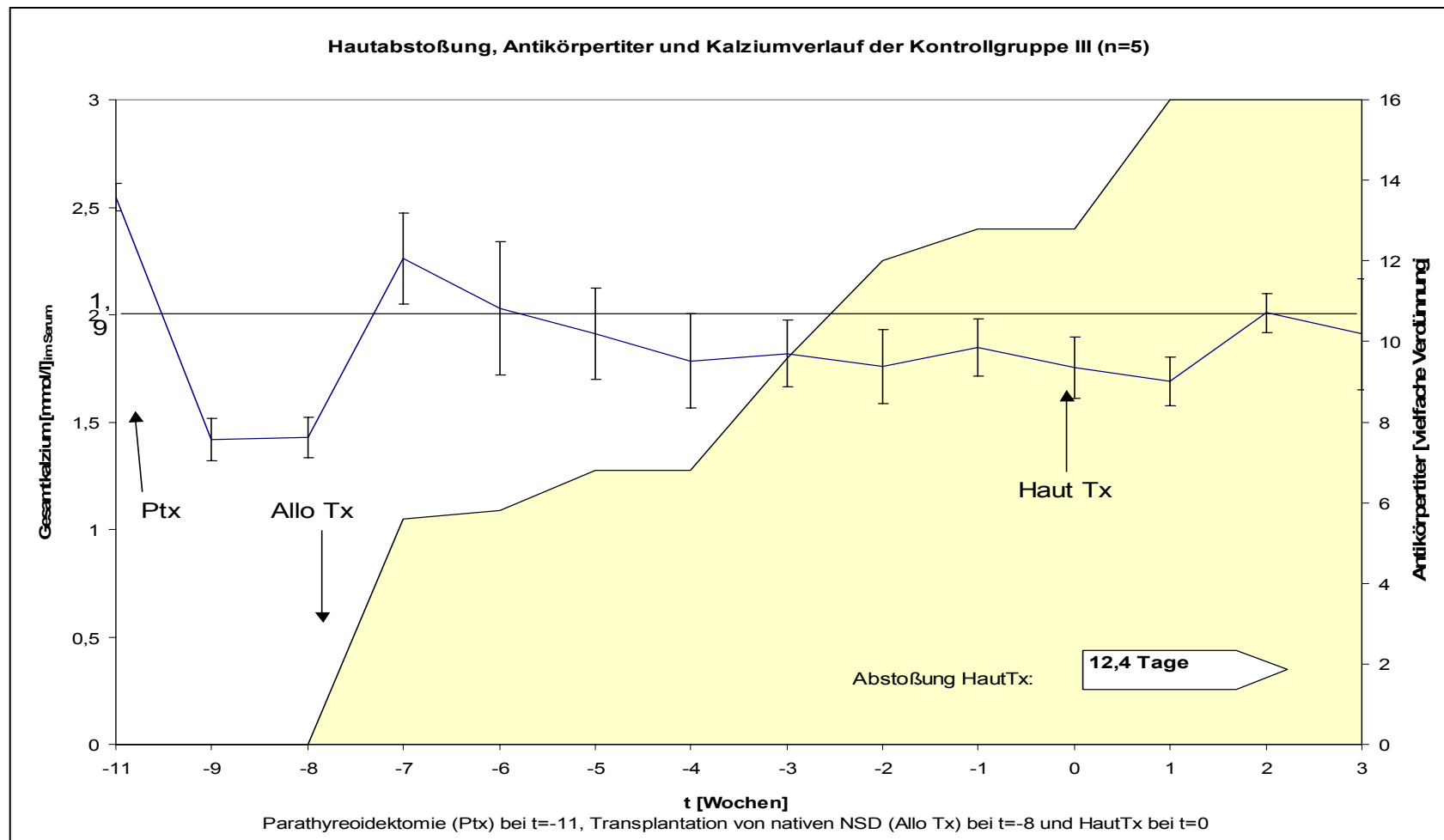


Abbildung 4.15.: Graphische Darstellung der Serumgesamtkalziumwerte, Antikörper und Hauttransplantatabstoßung der Kontrollgruppe III.

5. Diskussion

5.1. Die Nebenschilddrüse: Modell für allogene Transplantation von endokrinem Gewebe

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts stellt die Transplantation von endokrinem Gewebe eine der großen Herausforderungen in der Medizin dar. Durch die Transplantation von intaktem endokrinen Gewebe kann nicht nur der Mangel an Hormonen ausgeglichen werden, sondern auch die korrekte zeitliche und quantitative Regulierung der Hormonfreisetzung durch die Wiederherstellung eines funktionierenden Regelkreislaufes. Langzeitfolgen von endokrinen Mangelzuständen lassen sich derzeit durch eine Substitutionstherapie, sei es durch einfache, zeitlich feste Hormongabe, oder mittels aufwendiger Pumpen, nicht vermeiden.

Durch medikamentöse Immunsuppression ist die Transplantation vieler Organe heute möglich. Doch auch moderne Immunsuppressiva betreffen stets Teile des gesamten Immunsystems und bewirken somit starke, intermittierende 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.

Die allogene Transplantation von Nebenschilddrüsen wird derzeit bei Patienten durchgeführt, die entweder bereits immunsupprimiert sind, oder trotz Hormontherapie therapierefraktär bleiben und somit vital bedroht sind (Wells et al., 1974; Ross et al., 1979). Ansonsten wiegen die Vorteile einer Nebenschilddrüsentransplantation die Nachteile der systemischen Immunsuppression nicht auf. Es muss also eine Möglichkeit gesucht werden, Nebenschilddrüsentransplantationen ohne dauerhafte, postoperative Immunsuppression zu ermöglichen. Diese könnte dann die Basis einer nebenwirkungsfreien Therapie weiterer endokriner Mangelzustände darstellen.

5.2. Methodenkritik

Allen bisherigen Versuchen einer allogenen Transplantation ohne dauerhafte Immunsuppression ist gemeinsam:

- eine Aktivierung des Immunsystems des Empfängers zu verhindern, oder
- eine gewisse Toleranz gegenüber dem allogenen Gewebe zu induzieren.

In dieser Studie wurden mehrere Methoden kombiniert, um dieses Ziel zu erreichen:

- Eine Gewebepreparierung der Transplantate zur Immunmodulation
- Ein privilegierter Transplantationsort und Transplantationsverhältnis
- Die Mikroenkapsulierung des Transplantates mit amitogenem Alginat

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 Immunstimulatoren. In Verfahren wie der Gewebekulturpassage konnte nachgewiesen werden, dass diese Lymphozyten 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 wurde deshalb eine dreitägige Gewebekulturpassage in RPMI 1640 Nährmedium mit 10% Empfängerserum durchgeführt. Außerdem wurde dem Nährmedium 0,03% Kalzium zugeführt, um eine endokrine Stimulation der Nebenschilddrüsenpartikel zu vermeiden. Es kam dabei zu keiner mikroskopisch sichtbaren Strukturveränderung oder Untergang von Zellen.

Auswahl des Transplantationsortes: Bei der Wahl eines geeigneten Transplantationsortes muss ein Kompromiss zwischen nutritiver Versorgung (Anschluss an das Blutssystem) 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 Blutssystem 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 immer 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.

Transplantationsverhältnis: Die unterschiedlichen Transplantationsverhältnisse in den Test- und Kontrollgruppen erklären sich durch den fünfzigprozentigen Verlust von Nebenschilddrüsengewebe bei dem Vorgang der Mikroenkapsulierung. Somit hat sich aus Vorversuchen in der Arbeitsgruppe ein Transplantationsverhältnis von 10:1 bei der Transplantation von mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsen als optimal erwiesen (Hasse et al., 1994b). Um vergleichbare Ergebnisse in den Testgruppen zu erhalten, wurden hier einem Empfängertier die Nebenschilddrüsen von 5 Spendertieren transplantiert.

Das Alginat und die Mikroenkapsulierung stellen die entscheidende Möglichkeit dar, die Immunogenität von Transplantaten zu verringern. 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 Immunisolation von Inselzellen mittels der Mikroenkapsulierung in Alginat, welches aus Meeresalgen gewonnen wurde. In weiteren Studien wurden verschiedenste Polymere zur Immunisolation verwendet, wobei hydrogelbasierende Mikrokapselfn 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 et al., 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 Kalium Kanäle 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). Ein weiterer Versuch, die Stabilität der Kapseln zu verbessern, ist, Serumproteine in die Hülle zu inkorporieren, 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, wurde in dieser Studie

verwendet und zeigte in den jüngsten in vivo Versuchen die beste Viskosität und Biokompatibilität (Jork 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; King, 2002). 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.

Aus immunologischer Sicht wären drei verschiedene Abstoßungsreaktionen denkbar (Zekorn et al., 1996):

1. Das enkapsulierte Gewebe reagiert auf die Mikroenkapsulierungstechnik oder das Alginat. Es kommt zum Transplantatausfall ohne relevante Entzündungsreaktion außerhalb der Mikrokapsel.
2. Die Alginatkapseln werden vom Empfänger nicht toleriert im Rahmen einer Fremdkörperreaktion, bzw. Bioinkompatibilität. Es kommt zu Fremdkörperreaktionen in Form von Abstoßungsreaktionen in der Peripherie der Mikrokapsel.
3. Das Empfängerimmunsystem erkennt trotz dem Schutz der Mikrokapsel das enkapsulierte Gewebe und versucht es abzustößen. Es kommt zu einer lokalen Abstoßungsreaktion mit Kumulation von Leukozyten am Kapselrand und zu einer systemischen Immunreaktion mit Bildung von spezifischen Antikörpern und Vorsensibilisierung gegen alle Zellen des Spenders.

Die ersten beiden Möglichkeiten konnten für das verwendete Alginat durch in vivo und in vitro Versuche ausgeschlossen werden (Jork et al., 2000).

Diese Studie sollte nun die Möglichkeit der Erkennung und Transplantatabstoßung von Nebenschilddrüsengewebe trotz des Schutzes der Alginatmembran und nach Gewebekulturpassage näher untersuchen. Dabei wurden folgende Parameter gemessen:

- Die systemische Immunreaktion durch die quantitative Bestimmung der spezifischen, zytotoxischen Antikörper im Blut
- Die Transplantatfunktion durch das Serumgesamtkalzium im Empfängertier
- Die funktionelle Immunreaktion durch die Abstoßungszeit von spenderspezifischen Hauttransplantaten

Lymphozytotoxischer Antikörpertest: Seit den achtziger Jahren werden an Transplantationszentren lymphozytotoxische Antikörpertests durchgeführt, um eine Vorsensibilisierung des Empfängers auf das Spendergewebe auszuschließen (Hopkins, 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 das Transplantat so direkt schädigen (Sumitran-Karuppan, 1999). Eine weitere Möglichkeit der genaueren Spezifikation der Immunantwort auf mikroverkapseltes Nebenschilddrüsengewebe wäre die Auswertung der Antikörperseren mittels flowzytometrischer Messungen oder einem enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Der einfach durchzuführende und kostengünstige ELISA hat gegenüber dem durchgeführten Mikrolymphozytotoxizitätstest den Vorteil der weitaus höheren Sensitivität (Antikörpertiter können bis zu einer Verdünnung von 1:1024 nachgewiesen werden) und der weiteren Spezifikation der Antikörper in ihre Subklassen (Loewenthal et al., 1999). Die wesentlich aufwendigere flowzytometrische Antikörpermessung ist ebenfalls sehr sensitiv und kann alle Antikörper quantitativ erfassen, die funktionell gegen das Transplantat wirken, nicht nur die komplementbindenden Antikörper, wie der durchgeführte Mikrolymphozytotoxizitätstest.

Bestimmung der Transplantatfunktion durch Serumgesamtkalzium: Da das Serumgesamtkalzium streng reziprok mit der Parathormonsekretion einhergeht, ist dieser Wert ausreichend für ein engmaschiges Transplantatmonitoring (Ziegler, 1987). Allerdings hängt das Gesamtkalzium im Serum unter anderem auch von der intestinalen Kalziumaufnahme ab, welche durch das Vitamin D3 und den Kalziumgehalt der Nahrung bestimmt wird (Rothmund und Wagner, 1987). Deshalb wurde in dieser Studie eine standardisierte kalziumarme Diät eingehalten und die Bildung von Vitamin D3 durch Neonlicht ohne UVA- und UVB-Anteil minimiert. Die Bestimmung des Parathormons mittels ELISA im Serum ist einfach,

gut standardisiert, jedoch sehr kostenintensiv. Wir verzichteten deshalb erstmals in dieser Studie auf die Parathormonbestimmung.

Die Transplantatabstoßung von Haut ist ebenfalls ein gut erforschter funktioneller Parameter zur Messung der Immunsensibilisierung (Medawar, 1948; Hildemann, 1970). Da allogene Hauttransplantate sehr immunogen sind, werden sie bei vorsensibilisierten Immunsystem deutlich schneller abgestoßen, als schwach immunogen wirksame Transplantate (Streilein und Bergstresser, 1980).

5.3. Ergebnisdiskussion

Bisher war nicht bewiesen, dass eine Hypokalzämie nach Parathyreoidektomie keinen Einfluss auf die Transplantatabstoßung hat. Zu diesem Zwecke wurde die Studiengruppe I erstellt:

Ergebnisse des Studienarms I (Test- und Kontrollgruppe): Alle Versuchstiere der Testgruppe I sind stark hypokalzämisch, trotzdem zeigen sowohl die Hautabstoßungen, als auch die Antikörperbildung in Test- und Kontrollgruppe, dass die Hypokalzämie nach Parathyreoidektomie 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). Dieser Studienarm diente außerdem der Etablierung der Methode der allogenen Hauttransplantation in unserem Labor. Die Schwierigkeit besteht nämlich 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 Einwachserfolgen durchgeführt. Die Isotransplantate wurden entgegengesetzt der Fellrichtung der Empfängertiere transplantiert. Nach 6 Wochen erinnerte nur noch die Unregelmäßigkeit in der Fellrichtung an die Hauttransplantation.

Der Studienarm II (Test- und Kontrollgruppe) zeigte keine so deutlich zu erwartenden Ergebnisse. **Die Transplantatfunktion** ist durch die Kalziumbestimmung dokumentiert und entspricht dem typischen Verlauf, wie er

aus Studien der eigenen Arbeitsgruppe (Hasse et al., 1996) und anderen Instituten (De Vos et al., 1997b) bekannt ist. In der Testgruppe II kommt es zum Transplantatausfall ca. 8-9 Wochen nach Implantation der mikroverkapselten Nebenschilddrüsen; dokumentiert durch einen dauerhaften Serumkalziumspiegel unter 1,9mmol/l (Hasse et al., 1996). Die Mikroenkapsulierung wirkt sich also offensichtlich positiv auf die Transplantatfunktion aus, da in der Kontrollgruppe die ungeschützten, nativen Nebenschilddrüsentransplantate bereits nach nur 3 Wochen ihre Funktion dauerhaft einstellen.

Der Antikörpertiter in der Kontrollgruppe II zeigt den typischen Verlauf bei einer erstmals durchgeführten Allotransplantation von nativem Nebenschilddrüsengewebe. Es werden von Anfang an kontinuierlich Antikörper gegen das Transplantat gebildet. Nach der Hauttransplantation als zweiter immunogener Reiz übersteigen die Antikörpertiter bereits den maximal messbaren Bereich. Anhand der Antikörper der Testgruppe II lässt sich nachweisen, dass die Immunisolation durch die Alginatmikrokapsel unkomplett ist. Bei vollständiger Immunisolation dürften sich überhaupt keine Antikörper bilden. Allerdings wird durch die Mikroenkapsulierung die Bildung stark verzögert, da im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit einem Antikörpertiter von 1:10 nach drei Wochen erst ein durchschnittlicher Titer von 1:2,2 erreicht wird. Die von Anfang an langsam ansteigenden Antikörper könnten ein Hinweis darauf sein, dass die Alginatkapseln konsekutiv abgebaut werden und nach und nach immer mehr immunogenes Material freigeben. Ein Grund hierfür könnte das Anschwellen der Alginatkapseln durch den inneren kolloidosmotischen Druck in physiologischer Elektrolytlösung sein, dass selbst bei den hochstabilen Bariumalginaten festgestellt wurde (Hillgärtner et al., 1999). Eine andere Möglichkeit wäre natürlich, dass vereinzelt defekte Mikrokapseln implantiert wurden, oder bei dem Vorgang der Implantation beschädigt wurden. Hierfür würde besonders die Tatsache sprechen, dass einige Versuchstiere bereits ab der ersten Woche Antikörper gegen den Kapselinhalt bilden konnten, während ein Tier selbst nach 3 Wochen noch kein messbaren Antikörper gebildet hat. Das alle Tiere aber in der Lage sind spezifische zytotoxische Antikörper gegen Spenderantigene zu bilden, zeigt der sprunghafte Antikörperanstieg nach dem starken immunogenen Reiz der Hauttransplantation.

Die Abstoßungszeit der Hauttransplantate unterlag zwar sowohl in Test- wie auch in Kontrollgruppe einer starken Schwankung, zeigt jedoch eindeutig, dass das Immunsystem nach dreiwöchiger Implantation weder von nativen, noch von

mikroverkapselten Nebenschilddrüsen so stimuliert wird, dass es die Hauttransplantate schneller abstößt. Verglichen mit der Referenzstudiengruppe I verhält sich die Hauttransplantatabstoßung der Studiengruppe II (Test- und Kontrollgruppe) etwa so wie ein völlig unstimuliertes Immunsystem beim ersten Kontakt mit einem Hauttransplantat. Trotz vorhandener zytotoxischer Antikörper, die das Hauttransplantat direkt angreifen, scheinen noch andere wichtige Faktoren eine Rolle bei der Abstoßung von Hauttransplantaten zu spielen. Bjerneroth et al. stellten 1993 fest, dass normales Nebenschilddrüsengewebe kaum MHC Klasse I und II Antigenprodukte auf der Zelloberfläche zeigen und sich deshalb besonders gut zur Allotransplantation eignen. Gerade die MHC Klasse II Antigene spielen eine wichtige Rolle bei der Transplantatabstoßung, da sie das Immunsystem besonders anregen. Bei der Gewebekulturpassage werden aber die meisten dieser MHC Klasse II tragenden Zellen inaktiviert (Lafferty et al., 1983). Bestimmte Transplantatzellen, die eben keine MHC Klasse II Genprodukte präsentieren, erzeugen bei Kontakt mit einer T-Zelle des Empfängerimmunsystems Anergie. So sind sie in der Lage, trotz deutlicher Infiltration durch Empfängerlymphozyten, langfristig toleriert zu werden und zu funktionieren (Wonigeit und Pichlmayr, 1997). Nebenschilddrüsenzellen scheinen diese Voraussetzungen zu erfüllen, weshalb allogene Transplantate auch ohne Vorbehandlung deutlich länger funktionieren als anderes endokrines Gewebe (Raaf et al., 1976). Dieser Unterschied in der Immunogenität würde erklären, dass das Immunsystem durch die Nebenschilddrüsenpräparate nicht so angeregt wird, wie durch den starken immunogenen Reiz des Hauttransplantates. Das Immunsystem reagiert nach Implantation von Nebenschilddrüsen zwar sofort mit Antikörperbildung, aber eine so starke Immunstimulation, wie nach einem Hauttransplantat, mit Akutphase Abstoßung binnen 6 Tagen bleibt nach 3 Wochen aus. Hierbei scheint es keine Rolle zuzuspielen, ob das Nebenschilddrüsengewebe verkapselt oder nativ implantiert wird.

Der Studienarm III (Test- und Kontrollgruppe) diente zur Beantwortung der Frage, ob die Mikroenkapsulierung von Nebenschilddrüsenengewebe eine späte Sensibilisierung des Empfängers verhindern kann. Die Spätreaktion wird vermittelt durch Präsentation von spenderspezifischen Antigenen auf antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers. Diese antigenpräsentierenden Zellen müssen zuvor Teile der Spenderzellen erkennen und phagozytieren, um die Antigene den eigenen Lymphozyten zu präsentieren. Deshalb wird dieser Weg der Immunsensibilisierung

als indirekt bezeichnet und benötigt etwa 6-8 Wochen, bevor es zu einer maximalen Immunreaktion kommt (Wonigeit und Pichlmayr, 1997). Aus diesem Grunde wurde das allogene Hauttransplantat erst 8 Wochen nach Implantation der Nebenschilddrüsen transplantiert.

Die Transplantatfunktion in der Kontrollgruppe III, entspricht ebenfalls dem typischen Verlauf, wie bereits in der Kontrollgruppe II. Nach 3 Wochen ist von einem totalen Transplantatausfall auszugehen, auch ohne den immunogenen Reiz des Hauttransplantates. Die Mikroverkapselung in der Testgruppe verzögert den Transplantatausfall auf 5 Wochen post implantationem. Auffällig in der Test- sowie Kontrollgruppe ist, dass nach der Hauttransplantation der zuvor dauerhaft niedrige Kalziumspiegel 1-2 Wochen lang wieder ansteigt. Dies hängt entweder mit der Narkose oder dem operativen Eingriff selbst zusammen bei dem Kalzium frei wird. Dieses Phänomen wurde schon bei anderen Tierversuchen mit hypokalzämischen Ratten festgestellt. Bei dem es sogar nach Explantation von Nebenschilddrüsentransplantaten zu kurzfristigem Kalziumanstieg kam (Hasse et al., 1996 und 1997c). Hier ist von einem vorübergehenden Effekt auszugehen, der mit der Transplantatfunktion nichts zu tun hat.

Die Antikörpertiter in der Testgruppe III sind besonders interessant. Ähnlich wie in der Testgruppe II werden von Anfang an Antikörper gegen den Kapselinhalt gebildet, aber nach 5 Wochen steigen die Antikörper plötzlich sprunghaft an. Gleichzeitig fällt das Serumkalzium dauerhaft auf Werte unterhalb 1,9mmol/l ab. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Alginatmikrokapseln nach 5 Wochen ihre Funktion in vivo verlieren. Denkbar wäre natürlich auch, dass das Immunsystem auf dem indirekten Weg stimuliert wird und erst nach 5 Wochen in der Lage ist, ausreichend Antikörper zu produzieren, die durch die Mikrokapsel dringen und so das Transplantat direkt zerstören. Ein auf dem indirekten Wege vollständig stimuliertes Immunsystem müsste allerdings das allogene Hauttransplantat nach 8 Wochen wesentlich schneller abstoßen.

Anhand **der Hautabstoßungszeit** in der Test- sowie Kontrollgruppe III ist das aber nicht nachvollziehbar. Die Hauttransplantate in beiden Studiengruppen werden so toleriert, als wäre das Immunsystem völlig unstimuliert. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Nebenschilddrüsen nativ oder mikroenkapsuliert transplantiert wurden. Dies kann ebenfalls als Hinweis gesehen werden, dass Nebenschilddrüsentransplantate zwar vom Immunsystem erkannt werden, aber nicht so stimulierend auf das Empfängerimmunsystem wirken wie Hauttransplantate.

Schlussfolgerung: Aus den Ergebnissen dieser Studie geht hervor, dass die Mikroenkapsulierung von Nebenschilddrüsengewebe die Bildung von zytotoxischen Antikörpern gegen das transplantierte Gewebe nicht verhindern kann, sondern nur verzögert. Die Immunisierung des Empfängers kann damit nicht verhindert werden. Ebenfalls wird die Abstoßungsreaktion der Transplantate durch die Mikroenkapsulierung verzögert, aber nicht verhindert. Da jedoch unmittelbar nach der Implantation von mikroenkapsulierten Allotransplantaten der Empfänger Antikörper gegen den Kapselinhalt bilden kann, ist davon auszugehen, dass einige Kapseln bereits während der Transplantation zerstört wurden. Weiterhin scheinen nach 5 Wochen viele Alginatkapseln plötzlich Antigene aus dem Inneren freizusetzen. Die Folge sind sprunghaft ansteigende Antikörpertiter und zunehmender Transplantatausfall.

Die bisherigen Erfolge mit der Mikroenkapsulierungstechnologie sind somit auf einen Schutz des Transplantates vor der Immunantwort zurückzuführen, und nicht auf eine Verhinderung der Sensibilisierung des Empfängers.

5.4. Ausblick

Trotz der aufschlussreichen Ergebnisse dieser Studie, bleiben viele immunologische Fragen in der Transplantation mit Mikrokapseln offen. Eine nach 12 Wochen explantierte Mikrokapsel (siehe Abbildung 5.1.) zeigt zwar eine perikapsuläre Makrophageninfiltration und Fibrosierung der Kapselwand, die für die Zerstörung des Transplantates verantwortlich gemacht wird (Hasse et al., 1999), jedoch bleibt unklar wann und wieso die Kapsel zerstört wurde. Weiteren Aufschluss über diese Fragestellung könnten wöchentliche Transplantatexplantationen mit histologischen Kontrollen auf Integrität der Alginatkapseln bringen.

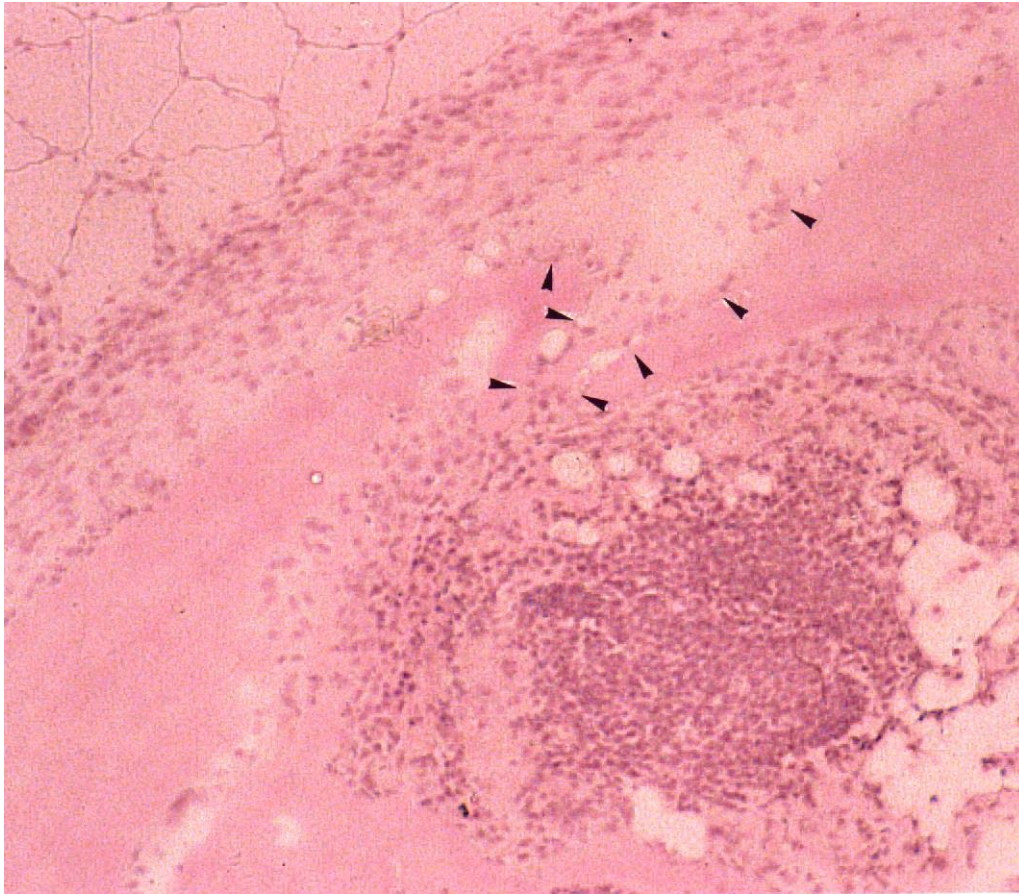


Abbildung 5.1.: Histologie eines verkapselten Nebenschilddrüsentransplantates 12 Wochen nach Allotransplantation. Die teilweise geplatzte Mikrokapsel ist von einem dünnen Fibrozytensaum umgeben. Makrophagen (Pfeile) wandern auf das Transplantat zu und zerstören die Nebenschilddrüsenzellen (Färbung: HE; Vergrößerung 1:50)

Durch die Benutzung neuer ultrahochgereinigter, hochstabiler und hochvisköser Bariumalginate kann der Fibrozytensaum bei leeren Kapseln auf ein Minimum reduziert und die Stabilität in vivo optimiert werden (Zimmermann et al., 2000). Die Überlebenszeit der Transplantate hat sich aber nur wenig verbessert. Dies kann zum einen an einer Mangelversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff liegen (Van Schilfgaarde und De Vos, 1999), zum anderen wäre eine immunologische Abstoßungsreaktion durch die Kapselwand denkbar. Aufschluss über die Fragestellung, ob die zytotoxischen Antikörper tatsächlich hauptverantwortlich für den Transplantatausfall sind, könnte ein Einsatz der verkapselten Nebenschilddrüsen in ein spezifisch vorstimuliertes Immunsystem bringen. Bei einer durchlässigen Kapselmembran müssten die Transplantate innerhalb der ersten 6 Tage im Sinne einer Akutphase Reaktion abgestoßen werden. Dies scheint durchaus möglich, da bei Diffusionsmessung verwandter Alginat für IgG permeable Porengrößen gemessen wurden (Gåserød et al. 1999).

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.

Neueste Studien zeigen, dass Mikrokapseln, die aus mehreren Schichten bestehen, oder mit Silizium überzogen (Coradin et al., 2001) haltbarer und stabiler sind. Die unterschiedlichen Alginatschichten ergänzen sich gegenseitig synergistisch (Schneider et al., 2001).

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.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Studie folgern, dass die Mikroenkapsulierung von endokrinen Allotransplantaten in der Lage ist, bedeutende Verlängerungen der Transplantatfunktion ohne Immunsuppression zu erreichen. Trotzdem ist die Transplantatüberlebenszeit auf ca. 6-8 Wochen post implantationem beschränkt. Hierbei scheint nicht nur eine Mangelversorgung des Transplantatgewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff eine Rolle zuzuspielen, sondern auch eine immunologische Abstoßungsreaktion des Empfängers. Bisherige Versuche die Amitogenität und die Diffusion von Nährstoffen durch die Kapselmembran zu verbessern reichen für einen dauerhaft erfolgreichen Einsatz allein nicht aus. Es wird für weitere, klinische Studien wesentlich sein, die spezifischen immunologischen Mechanismen, die für das Transplantatüberleben verantwortlich sind, zu definieren und daraufhin die Eigenschaften der Mikrokapseln zu optimieren.

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 posttransplantationem eine systemische Immunsuppression nicht gerechtfertigt. Ohne diese blieb die klinische Allotransplantation der Parathyreoidea jedoch bisher langfristig erfolglos.

Aus Studien zur Inselzelltransplantation wurde in unserem Labor 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 uns 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 eine suffiziente Immunisolation von enkapsulierten Transplantaten bewirken.

Das Tierversuchsvorhaben war in drei Studienarme mit jeweils einer Test- und Kontrollgruppe mit je fünf Dark Agouti und Lewis Ratten unterteilt. In den Studienarmen II und III sollte erforscht werden, wie weit die Mikroenkapsulierung von Nebenschilddrüsengewebe bei der Allotransplantation einen Schutz vor der Sensibilisierung des Empfängers bietet. Bei einer eventuellen Aktivierung des Immunsystems des Empfängers war zu untersuchen, ob der Empfängerorganismus mit einer immunologischen Früh- oder Spätreaktion reagiert. Die immunologische Reaktion und der Aktivierungsgrad des Empfängers wurde durch die quantitative

Untersuchung spezifischer Antikörper gegen das Spendergewebe und durch die Abstoßungszeit eines spenderspezifischen allogenen Hauttransplantates bestimmt. Der Studienarm I diente als Referenzgruppe inwieweit sich das Immunsystem des normo- und hypokalzämischen Versuchstieres durch zwei aufeinanderfolgende Hauttransplantationen stimulieren lässt.

Ergebnis in diesem Studienarm war, dass die allogenen Hauttransplantate nach der 1. Transplantation nach 12,2 Tagen und nach der 2. Hauttransplantation schon nach 5,8 Tagen abgestoßen wurden. Es konnte kein Unterschied zwischen normo- und hypokalzämischen Versuchstieren in der Antikörperbildung und der Hautabstoßung festgestellt werden. Somit beeinflusst eine Parathyreoidektomie und darausfolgende Hypokalzämie die Immunantwort in vivo nicht.

Die nativen Nebenschilddrüsentransplantate aller Kontrollgruppen verloren ihre Funktion spätestens nach 6 Wochen ($[Ca^{++}]$ i.s. unter 1,9 mmol/l). Die Empfängertiere von verkapselten, allogenen Nebenschilddrüsenpartikeln in den Testgruppen entwickelten dauerhaft höhere Serumkalziumwerte während der Untersuchungsdauer von 10 Wochen, als in den Kontrollgruppen. Die Hautabstoßungszeit betrug sowohl in den Test-, als auch in den Kontrollgruppen jeweils $11,6 \pm 0,5$ Tage, also ähnlich wie beim unstimulierten Immunsystem.

Zytotoxische Antikörper konnten in allen Studiengruppen ab der ersten Woche nach Transplantation nachgewiesen werden. Allerdings stiegen die Antikörpertiter bei den Versuchstieren mit verkapselten Nebenschilddrüsenpartikeln deutlich langsamer an, als bei den Kontrollgruppen.

Schlussfolgerung: Unsere Studie gibt erste Hinweise darauf, dass die Mikroenkapsulierung die Sensibilisierung des Empfängers nicht vollständig verhindern kann. Allerdings wird die Abstoßungsreaktion durch die Mikroenkapsulierung messbar verzögert.

Somit ist offensichtlich, dass es verschiedener Verfahren zur Reduktion der Immunogenität und der Immunisation bedarf, um eine suffiziente Funktion von transgenen Nebenschilddrüsentransplantaten ohne Immunsuppression langfristig zu gewährleisten. Auf die Optimierung dieser unterschiedlichen Methoden und ihre erfolgreiche Kombination muß sich die zukünftige Forschungstätigkeit konzentrieren.

7. Literaturverzeichnis

1. **Arnaud G., Tsao H.S., Oldham S.B.:** Native human parathyroid hormone: An immunochemical 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-Mirkine 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., Mimietz 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. **Kühtreiber 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.:** Hypoparathyreoidismus. 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., Efter 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., Korbitt 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 antigenes. 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: Kühnreiter 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 Dihydroxycholesterin 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

8. Anhang

8.1. Rohdatenblätter der Studiengruppen

8.1.1. Testgruppe I

Antikörper [Verdünnung]	-5 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	4 Wo.	1.Hautab- stoßung
LE 13-98	0	0	0	0	2	4	16	16	16	16	14 Tage
LE 11-98	0	0	0	0	4	4	8	16	16	16	12 Tage
LE 17-98	0	0	0	0	8	4	16	16	16	16	11 Tage
LE 15-98	0	0	0	0	4	8	16	16	16	16	13 Tage
LE 21-98	0	0	0	0	2	16	16	16	16	16	11 Tage
Mittelwert	0	0	0	0	4	7,2	14,4	16	16	16	12,2 Tage
Standartabw.:	0	0	0	0	2,19	4,66	3,2	0	0	0	1,17 Tage

Calcium [mmol/l]	-5 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	4 Wo.	2.Hautab- stoßung
LE 13-98	1,6	2	1,8	1,7	2	1,1	1,3	1,6	1,6	1,5	6 Tage
LE 11-98	1,4	1,5	1,5	1,6	1,9	1,2	1,1	1,5	1,7	1,6	7 Tage
LE 17-98	1,1	1,7	1,2	1	1,4	1,6	1,8	1,4	1,3	1,2	7 Tage
LE 15-98	1,2	1,2	1,1	1,6	1,5	1,4	1,2	1,4	1,1	1,1	5 Tage
LE 21-98	1,2	1,3	1,5	1,4	1,5	1,7	1,2	1,3	1,77	1,7	4 Tage
Mittelwert	1,3	1,54	1,42	1,46	1,66	1,4	1,32	1,44	1,49	1,42	5,8 Tage
Standartabw.:	0,18	0,29	0,25	0,25	0,24	0,23	0,25	0,1	0,25	0,23	1,17 Tage

 Haut Tx

8.1.2. Kontrollgruppe I

Antikörper [Verdünnung]	-5 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	4 Wo.	1.Hautab- stoßung
LE 16-98	0	0	0	0	0	1	4	16	16	16	12 Tage
LE 22-98	0	0	0	0	0	16	16	16	16	16	11 Tage
LE 14-98	0	0	0	0	2	8	8	16	16	16	10 Tage
LE 18-98	0	0	0	0	4	8	16	16	16	16	11 Tage
LE 19-98	0	0	0	0	4	16	16	16	16	16	13 Tage
Mittelwert	0	0	0	0	2	9,8	12	16	16	16	11,4 Tage
Standartabw.:	0	0	0	0	1,79	5,67	5,06	0	0	0	1,04 Tage

Calcium [mmol/l]	-5 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	4 Wo.	2.Hautab- stoßung
LE 16-98	3	3,2	2,4	2,7	2,8	3,2	3,3	2,7	2,8	2,7	7 Tage
LE 22-98	3	3,1	2,7	2,7	2,7	2,4	2,6	2,7	2,7	2,7	6 Tage
LE 14-98	2,4	2,3	2,4	2,4	2,5	2,6	2,7	2,4	2,4	2,5	5 Tage
LE 18-98	3	3	2,9	2,8	2,7	3	3	3,1	2,9	3	6 Tage
LE 19-98	3,1	3	3,1	3,1	3,2	2,9	2,8	2,9	3	3,1	7 Tage
Mittelwert	2,9	2,92	2,7	2,74	2,78	2,82	2,88	2,76	2,76	2,8	6,2 Tage
Standartabw.:	0,25	0,32	0,28	0,22	0,23	0,29	0,25	0,23	0,21	0,22	0,7 Tage

 Haut Tx

8.1.3. Testgruppe II

Calcium [mmol/l]	-6 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	4 Wo.	5 Wo.	6 Wo.	7 Wo.	8 Wo.
LE 132-99	2,51	1,35	1,31	1,51	1,87	2,42	2,1	1,82	2,25	2,18	2,1	1,64	1,55	1,67
LE 201-99	2,29	1,37	1,46	2,28	1,98	1,16	2,26	2,19	2,27	2,44	1,95	2,05	2,28	1,7
LE 203-99	2,52	1,51	1,58	2,07	2,14	1,86	1,87	2,33	2,46	2,25	2,36	2	1,78	1,74
LE 208-99	2,58	1,26	1,19	1,96	2,07	1,8	2,17	2,22	2,26	2,26	1,76	1,8	1,83	1,87
DA 228-99	2,67	1,38	1,44	2,14	2,07	1,76	2,05	2,14	2,06	1,82	2,23	1,98	1,69	1,73
Mittelwert	2,51	1,37	1,4	1,99	2,03	1,8	2,09	2,14	2,26	2,19	2,08	1,89	1,83	1,74
Standartabw.	0,13	0,08	0,13	0,26	0,09	0,4	0,13	0,17	0,13	0,2	0,21	0,15	0,25	0,07

Antikörper [Verdünnung]	-6 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	4 Wo.	5 Wo.	6 Wo.	7 Wo.	8 Wo.
LE 132-99	0	0	0	1	1	1	1	2	4	16	16	16	16	16
LE 201-99	0	0	0	1	4	4	8	8	16	16	16	16	16	16
LE 203-99	0	0	0	0	1	2	4	8	16	16	16	16	16	16
LE 208-99	0	0	0	2	2	4	4	16	16	16	16	16	16	16
DA 228-99	0	0	0	0	0	0	4	8	16	16	16	16	16	16
Mittelwert	0	0	0	0,8	1,6	2,2	4,2	8,4	13,6	16	16	16	16	16
Standartabw.	0	0	0	0,75	1,36	1,6	2,23	4,45	4,8	0	0	0	0	0

 Haut Tx

Haut- abstossung	
8	
11	
15	
10	
11	
11	Mittelwert
6,5	Varianz

8.1.4. Kontrollgruppe II

Calcium [mmol/l]	-6 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	4 Wo.	5 Wo.	6 Wo.	7 Wo.	8 Wo.
DA 420-01	2,58	1,65	1,7	2,34	1,69	1,7	1,7	1,7	1,91	1,72	1,56	1,65	1,7	1,65
DA 421-01	2,43	1,81	1,8	3,01	1,88	1,7	2	1,84	2,21	1,99	1,7	1,6	1,5	1,91
LE 413-01	2,61	1,89	1,76	2,19	2,18	1,8	1,8	2,11	1,77	1,69	1,62	1,55	1,45	1,56
LE 415-01	2,38	1,92	1,9	2,54	1,97	1,9	1,5	1,7	1,81	1,67	1,5	1,75	1,95	1,89
LE 196-99	2,72	1,4	1,2	2,27	1,91	1,08	1,37	1,81	2,31	1,83	1,93	1,87	2,01	1,91
Mittelwert	2,54	1,73	1,67	2,47	1,93	1,64	1,67	1,83	2	1,78	1,66	1,68	1,72	1,78
Standartabw.	0,12	0,19	0,24	0,29	0,16	0,29	0,22	0,15	0,22	0,12	0,15	0,11	0,23	0,15

Antikörper [Verdünnung]	-6 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	4 Wo.	5 Wo.	6 Wo.	7 Wo.	8 Wo.
DA 420-01	0	0	0	4	8	8	16	16	16	16	16	16	16	16
DA 421-01	0	0	0	1	2	16	16	16	16	16	16	16	16	16
LE 413-01	0	0	0	2	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
LE 415-01	0	0	0	4	4	2	4	16	16	16	16	16	16	16
LE 196-99	0	0	0	2	8	8	16	16	16	16	16	16	16	16
Mittelwert	0	0	0	2,6	7,6	10	13,6	16	16	16	16	16	16	16
Standartabw.	0	0	0	1,2	4,8	5,37	4,8	0	0	0	0	0	0	0

 Haut Tx

Haut- abstossung	
10	
14	
14	
13	
9	
12	Mittelwert
5,5	Varianz

8.1.5 Testgruppe III

Calcium [mmol/l]	-11 Wo.	-9 Wo.	-8 Wo.	-7 Wo.	-6 Wo.	-5 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	
DA 241-99	2,43	1,47	1,5	1,97	1,8	1,76	2,02	1,79	1,65	1,55	1,62	1,8	1,8	1,81	
DA 254-99	2,83	1,53	1,6	1,98	1,82	1,77	1,72	1,64	1,6	1,55	1,63	1,8	1,9	1,49	
DA 255-99	2,63	1,54	1,5	2,25	2,2	2,26	2,15	1,79	1,76	1,73	1,68	2	1,8	1,7	
LE 270-99	2,59	1,27	1,38	2,29	1,58	1,99	1,94	1,86	1,81	2,06	1,89	2,11	1,84	2,02	
LE 272-99	2,66	1,42	1,51	2,2	1,6	2,3	2,29	2,13	2,15	1,99	1,98	2,11	2,01	2,11	
Mittelwert	2,63	1,45	1,5	2,14	1,8	2,02	2,02	1,84	1,79	1,78	1,76	1,96	1,87	1,83	
Standartabw.:	0,13	0,1	0,07	0,14	0,22	0,23	0,19	0,16	0,19	0,21	0,15	0,14	0,08	0,22	
Varianz:	0,02	0,01	0,01	0,02	0,06	0,07	0,05	0,03	0,05	0,06	0,03	0,02	0,01	0,06	
Mittlere Standartabweichung:				0,16											
Mittlere Varianz:				0,04											

Antikörper [Verdünnung]	-11 Wo.	-9 Wo.	-8 Wo.	-7 Wo.	-6 Wo.	-5 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	
DA 241-99	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	16	16	16	
DA 254-99	0	0	0	0	2	1	2	1	8	16	16	16	16	16	
DA 255-99	0	0	0	2	4	4	4	4	8	8	8	8	16	16	
LE 270-99	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	4	16	16	16	
LE 272-99	0	0	0	4	4	4	4	4	4	8	8	16	16	16	
Mittelwert	0	0	0	1,4	2,2	2,2	2,4	2,2	7,6	10	10,4	14,4	16	16	
Standartabw.:	0	0	0	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	4,8	5,37	4,8	3,2	0	0	
Mittlere Standartabweichung:				1,85											

 Haut Tx

Haut- abstoßung	
11 Tage	
11 Tage	
10 Tage	
13 Tage	
13 Tage	
11,75 Tage	Mittelwert
2,25 Tage	Varianz

8.1.6. Kontrollgruppe III

Calcium [mmol/l]	-11 Wo.	-9 Wo.	-8 Wo.	-7 Wo.	-6 Wo.	-5 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.
LE 134-99	2,62	1,3	1,33	2,11	2,01	1,93	2,05	1,9	1,43	1,95	1,75	1,55	1,93	1,85
LE 135-99	2,48	1,4	1,38	2,56	2,6	2,31	1,38	1,64	1,87	2,04	2,01	1,61	2,15	2,15
DA 163-99	2,55	1,4	1,39	2,1	2,01	1,8	1,85	2,04	1,92	1,83	1,73	1,65	tot	
DA 424-01	2,47	1,6	1,6	2,47	1,86	1,8	1,82	1,87	1,8	1,68	1,57	1,79	1,93	1,55
DA 173-99	2,61	1,4	1,45	2,06	1,67	1,71	1,82	1,65	1,78	1,74	1,7	1,85	2,02	2,03
Mittelwert	2,55	1,42	1,43	2,26	2,03	1,91	1,78	1,82	1,76	1,85	1,75	1,69	2,01	1,91
Standartabw.:	0,06	0,1	0,09	0,21	0,31	0,21	0,22	0,15	0,17	0,13	0,14	0,11	0,09	0,26
Varianz:	0	0,01	0,01	0,06	0,12	0,06	0,06	0,03	0,04	0,02	0,03	0,02	0,01	0,1
Mittlere Standartabweichung:														0,16
Mittlere Varianz:														0,04

Antikörper [Verdünnung]	-11 Wo.	-9 Wo.	-8 Wo.	-7 Wo.	-6 Wo.	-5 Wo.	-4 Wo.	-3 Wo.	-2 Wo.	-1 Wo.	0 Wo.	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.
LE 134-99	0	0	0	2	2	4	4	4	4	8	8	16	16	16
LE 135-99	0	0	0	2	2	4	4	4	8	8	8	16	16	16
DA 163-99	0	0	0	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
DA 424-01	0	0	0	8	8	8	8	8	16	16	16	16	16	16
DA 173-99	0	0	0	0	1	2	2	16	16	16	16	16	16	16
Mittelwert	0	0	0	5,6	5,8	6,8	6,8	9,6	12	12,8	12,8	16	16	16
Standartabw.:	0	0	0	5,85	5,67	5	5	5,43	5,06	3,92	3,92	0	0	0
Mittlere Standartabweichung:														2,85

 Haut Tx

Haut- abstoßung	
14 Tage	
15 Tage	
10 Tage	
11 Tage	
12 Tage	
12,4 Tage	Mittelwert
4,3 Tage	Varianz

8.2. Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Klaus Burchard Stelter

Geburt: 24.10.1974 in München

Eltern: Prof. Dr. med. Wolf-Joachim Stelter,
Barbara Stelter, geb. v. Vietinghoff-Scheel

Geschwister: 2 jüngere Brüder

Ausbildung

1981 – 1985 Grundsule München/ Bayern
1985 – 1994 Bischof-Neumann Schule Königstein im Ts./ Hessen

- Abitur

1996 - 2001 Philipps Universität Marburg/ Hessen

- Studium der Humanmedizin

2001-2002 Ludwig-Maximilians Universität München/Bayern

- Praktisches Jahr

Seit 2003 Ludwig-Maximilians Universität München/Bayern

- Arzt im Praktikum in der Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde

Zivildienst

1994 - 1995 Deutsches Rotes Kreuz Main Taunus/ Hessen
Rettungsdienst

Examen

April 1998 Ärztliche Vorprüfung
März 1999 1.Abschnitt der ärztlichen Prüfung
August 2001 2.Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 2002 3.Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen

1998 Städtische Kliniken, Frankfurt am Main – Höchst:
4wöchiges Praktikum in der **Chirurgie/Unfallchirurgie**
2000 Mount Medical Center, Perth – Western Australia:
4wöchiges Praktikum in der **Gefäßchirurgie**
2000 Praxis Dr. Nolte, Marburg:
4wöchiges Praktikum in der **Hals-Nasen-Ohren Heilkunde**
2000 Insel Spital, Universität Bern – Schweiz:
4wöchiges Praktikum in der **Neurochirurgie**

Praktisches Jahr

1. Terial: Chirurgie/Neurochirurgie Universitätsklinikum Großhadern
2. Terial: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Universitätsklinikum Großhadern
3. Terial: Innere Medizin Lehrkrankenhaus Harlaching/München

Berufserfahrung

1996-2002 Kliniken des MTK Main Taunus Kreis/ Hessen
Pflegediensttaushilfe einer chirurgischen Intensivstation
1999-2001 Philipps Universität Marburg/ Hessen
Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Chirurgie
Seit 1999 Freiberuflich für Ärzte und Krankenhäuser
Firmengründung „MedWebdesign“. Erstellen von Internetseiten

Tätigkeiten neben dem Studium

Erstellen und Pflegen von Internetseiten für Kongresse, niedergelassene Ärzte und Krankenhäuser
Trainer der Universitätsmannschaft im Volleyball, Tandemgleitschirmfliegen

8.3. Akademische Lehrer

Meine Akademischen Lehrer in Marburg waren die Frau Professoren und Herrn Professoren:

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

Meine Akademischen Lehrer in München waren die Herrn Professoren:

Berghaus	Schildberg
Kastenbauer	Tonn

8.4. 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 Allgemeinchirurgie des Universitätsklinikums Marburg, danke ich für die freundliche Überlassung des wissenschaftlichen Themas und insbesondere für die in schwierigen Situationen gewährten Hilfe und sehr kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Herrn Dr. med. T. Bohrer danke ich für die wertvolle Unterstützung und die konsequente Betreuung dieser Arbeit, sowie für die hilfreiche Beratung und 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 Bollmann, MTA im Labor der Allgemeinchirurgie 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.

8.5. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Klaus Stelter, geboren am 24.10.1974, dass über mich keine gerichtlichen oder disziplinarischen Strafen verhängt wurden und derzeit keine Verfahren anhängig sind.

Klaus Stelter (München, den)

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich, Klaus Stelter, geboren am 24.10.1974, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Immunisolation durch Mikroenkapsulierung: Protektion vor Sensibilisierung des Empfängers bei der transgenen Transplantation von Nebenschilddrüsengewebe ohne Immunsuppression?“

in der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Marburg, Leiter Prof. Dr. med. M. Rothmund, mit Unterstützung von Herrn PD 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.

Klaus Stelter (München, den)