

Aus der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Würzburg

Chirurgische Klinik I

Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede

**Experimentelle Nebenschilddrüsentransplantation:
Untersuchungen zur Wirksamkeit einer
temporären Immunsuppression
auf die Transplantatfunktion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Daniel Begrich

aus Geldern

Würzburg, Juni 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Otto
Korreferent: Prof. Dr. med. A. Thiede
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2005

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Erkrankungen der Nebenschilddrüsen: Hyper- und Hypoparathyreoidismus	1
1.2	Therapien zum Hypoparathyreoidismus	3
1.3	Zielsetzung	5
2	FRAGEN	6
2	MATERIAL UND METHODEN	7
3.1	Topographie der Nebenschilddrüsen bei der Ratte	7
3.2	Tiere und Tierhaltung.....	7
3.3	Experimentalgruppen.....	9
3.4	Blutentnahmen	9
3.5	Bestimmung des Serumkalziums zum Nachweis des Hypoparathyreoidismus	11
3.6	Die heterotope Nebenschilddrüsentransplantation	12
3.6.1	Die Narkose	12
3.6.2	Die Parathyreoidektomie.....	13
3.6.3	Die Transplantation.....	14
3.7	Immunhistologische Analysen	16
4	ERGEBNISSE	19
4.1	Induktion der experimentellen Hypokalzämie	19
4.2	Die experimentellen Gruppen	19
4.2.1	Die syngene Nebenschilddrüsentransplantation.....	20
4.2.2	Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation ohne Immunsuppression	22
4.2.3	Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation mit Immunsuppression	24
4.3	Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation: Variation des Dosierungsintervalls.....	29
4.4	Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation: Verkapselung der Transplantate	33
4.5	Immunhistochemische Analysen	33
4.5.1	Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation ohne Immunsuppression	33
4.5.2	Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation mit Immunsuppression	39

4.5.3	Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation: Verkapselung der Transplantate.....	40
5	BEANTWORTUNG DER FRAGEN	42
6	DISKUSSION	44
6.1	Klinischer Hypoparathyreoidismus: Krankheitsbild und Therapieoption.....	44
6.2	Charakteristika des experimentell induzierten Hypoparathyreoidismus im Rattenmodell	46
6.3	Kriterien für die Auswahl der Implantatorte der Ratte.....	48
6.4	Nebenschilddrüsentransplantation und Immunsuppression	50
7	AUSBLICK	55
8	ZUSAMMENFASSUNG	56
9	LITERATURVERZEICHNIS	58
	EIGENE PUBLIKATIONEN	
	DANKSAGUNG	
	LEBENS LAUF	

1 Einleitung

Chemische Botenstoffe haben die Aufgabe, die Übertragung von Signalen zwischen Gehirn, Organen und Effektorzellen sicherzustellen. Da sie für die Homöostase von essentieller Bedeutung sind, besitzt jeder komplexe Organismus spezielle Zellen oder Zellverbände zu ihrer Produktion und Freisetzung. So sezernieren Nebenschilddrüsen (*Glandulae parathyroideae*), die auch als Epithelkörperchen bezeichnet werden, das Parathormon oder PTH. Es reguliert mit seinem Gegenspieler, dem von den C-Zellen gebildeten Kalzitinin, den Kalziumhaushalt. (Klinke R et al., 2003). Durch diese hormonelle Regulation werden zu hohe und zu niedrige Kalziumspiegel (Hyper- bzw. Hypokalzämie) verhindert. Das Parathormon, das für seine Wirksamkeit Vitamin-D benötigt, erhöht die Aufnahme von Kalzium aus dem Darm, verstärkt die Abgabe von Kalzium und Phosphat aus den Knochen ins Blut und senkt die Ausscheidung von Kalzium über die Nieren (Akerstrom G et al., 1991; Greger RF, 2000). Kalzitinin wird bei einem deutlich erhöhten Plasmakalziumspiegel freigesetzt, es stoppt die Aufnahme von Kalzium aus dem Darm, lagert verstärkt Kalzium und Phosphat im Knochen ab und führt zu einer vermehrten Ausscheidung von Kalzium über die Nieren.

1.1 Die Erkrankungen der Nebenschilddrüsen: Hyper- und Hypoparathyreoidismus

Erkrankungen der Nebenschilddrüsen stellen sich pathophysiologisch als Hyper- oder Hypoparathyreoidismus dar. Die Nebenschilddrüsenüberfunktion lässt sich dabei in drei Formen unterteilen: primärer Hyperparathyreoidismus als Ursache einer Erkrankung der Nebenschilddrüse und sekundärer bzw. tertiärer Hyperparathyreoidismus als eine Reaktion der Nebenschilddrüse auf andere Erkrankungen.

Beim primären Hyperparathyreoidismus liegen ein oder mehrere Adenome vor, die als ursprünglich gutartige Neubildung zu einer erhöhten Ausschüttung von

Parathormon führen. Durch ihre operative Entfernung wird der Hyperparathyreoidismus therapiert. Auch eine diffuse Zellvermehrung (Hyperplasie) aller Nebenschilddrüsen kann einen primären Hyperparathyreoidismus zur Folge haben. Zur Behandlung werden bis auf eine halbe Drüse sämtliche Epithelkörperchen reseziert und im gefrorenen Zustand aufbewahrt, um sie bei einer möglichen Unterfunktion zu reimplantieren. In sehr seltenen Fällen kann die primäre Nebenschilddrüsenüberfunktion durch ein Nebenschilddrüsenkarzinom verursacht werden. Die Therapie dieser Erkrankung besteht in der Entfernung des Tumors einschließlich des gleichseitigen Schilddrüsenanteils.

Der sekundäre Hyperparathyreoidismus wird meist durch Hypokalzämien bzw. Vitamin-D-Mangel verursacht. Diese Erkrankungsformen finden sich bei chronischer Niereninsuffizienz oder Störungen der Metabolisierung (Verstoffwechslung) von Vitamin-D. Zur Besserung des Krankheitsbildes werden alle Epithelkörperchen entnommen und ein Teil in die Unterarmmuskulatur reimplantiert. Die restlichen Drüsen werden tiefgefroren. Nach mehreren Jahren kann sich aus einem sekundären ein tertiärer Hyperparathyreoidismus entwickeln, bei dem trotz eines normalen Kalziumspiegels weiterhin Parathormon ausgeschüttet wird. Oftmals wird dieses Krankheitsbild bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz beobachtet (Lorenz K und Dralle H, 2000).

Beim Hypoparathyreoidismus, der auf einer Nebenschilddrüsenunterfunktion basiert, wird zu wenig oder kein Parathormon gebildet. Infolgedessen kommt es pathophysiologisch zu einer Hypokalzämie und Hyperphosphatämie (Miyake I und Hiromatsu Y, 2002). Das Blut ist übersäuert, und die Betroffenen leiden unter Tetanie mit Stimmritzenkrampf und Pfötchenstellung aufgrund einer erhöhten neuromuskulären Erregbarkeit der Skelettmuskulatur. Längerfristige Folgen können eine gestörte Zahnentwicklung, trockene Haut, Katarakt („Tetaniestarr“) und Haarausfall sein. Seltener wird eine Verkalkung der Stammganglien mit einhergehender geistiger Retardierung beobachtet (Schafer M und Ferbert A, 1998). Diese Symptome unterstreichen, dass es sich bei einem un-

behandelten Hypoparathyreoidismus um eine schwerwiegende, in einigen Fällen sogar lebensbedrohliche Erkrankung handelt.

Ursache einer solchen Nebenschilddrüsenunterfunktion sind oft medizinische Eingriffe, so z. B. Bestrahlungen oder Schilddrüsenoperationen, wie die radikale Thyreoidektomie aufgrund maligner Neoplasmen (Lange A, 1986). Gerade in den Staaten der ehemaligen Sowjetunion, hauptsächlich in Russland, Weißrussland und der Ukraine, sind derzeit zahlreiche Fälle des Hypoparathyreoidismus bekannt. Ursache hierfür war die verheerende Reaktorkatastrophe in Tschernobyl im Jahre 1986 (Stiller CA, 2001). Die durch die hohe Strahlenexposition induzierten Schilddrüsentumore mussten oftmals radikal chirurgisch entfernt werden, wobei häufig die Nebenschilddrüsen nicht erhalten wurden.

Zur Ergänzung dieser Übersicht sei noch die idiopathische Form der Nebenschilddrüsenunterfunktion genannt. Ihre Ursache ist nicht genau bekannt. Sie tritt jedoch teilweise in Zusammenhang mit perniziöser Anämie (Vitamin-B-12-Mangel) oder M. Addison (Nebennierenrindeninsuffizienz) auf (Kistler HJ, 1996). Bei angeborenen Fehlbildungen wie dem DiGeorge-Syndrom (Nichtanlage des Thymus) ist eine verminderte Ausreifung der Gl. parathyroideae möglich, während sie bei der Nebenschilddrüsenagenese nicht angelegt werden (Greenberg F, 1989).

1.2 Therapien zum Hypoparathyreoidismus

Die Erfahrungen endokriner Chirurgen zeigen, dass Nebenschilddrüsen, die im Rahmen von Schilddrüsenoperationen entfernt wurden oder Störungen in ihrer Durchblutung aufweisen, durch Autotransplantate ersetzt werden können; dies bewahrt die Patienten vor einer Hypokalzämie. Diese Erfahrungen sind auch bei der chirurgischen Therapie des sekundären Hypoparathyreoidismus gemacht worden. Auch hyperplastische Nebenschilddrüsen funktionieren als Autotransplantate ohne Probleme langfristig. Des Weiteren ist es möglich,

Nebenschilddrüsengewebe von Dialysepatienten einzufrieren, um sie nach dem Auftauen erfolgreich als Autotransplantate zu übertragen.

Zur physiologischen Einstellung des Kalziumstoffwechsels ist die Autotransplantation von Epithelkörperchen in jedem Fall die optimale Therapieform. Wo die autologe Transplantation nicht möglich ist, z. B. bei nicht angelegten oder aufgrund von malignen Erkrankungen nicht reimplantierbaren Nebenschilddrüsen bzw. wenn bei Schilddrüsenoperationen von benignen Erkrankungen die Nebenschilddrüsen ohne Belassung eines Autotransplantates entfernt wurden, besteht das aktuelle Therapieregime in der lebenslangen Einnahme von Vitamin D und Kalzium (Arlt W et al., 2002). In der Regel treten nach Schilddrüsenoperationen Komplikationen mit den Nebenschilddrüsen bei einem von 100 Patienten auf; dies entspricht ca. 1000 Patienten pro Jahr. Wesentliche Probleme bei der Therapie mit Kalzium und Vitamin D bestehen in der dauerhaften und hochdosierten Applikation der Medikamente, wobei eine physiologische Spiegelanpassung nicht zu erreichen ist. Nach einiger Zeit zeigen die Patienten unter dieser Substitutionstherapie einen erkennbaren chronischen Kalziummangel. Als weitere Nebenwirkungen dieser Therapie sind Hyperkalziurie mit Nephrokalzinose, Nierensteine oder Nierenfunktionsstörungen zu nennen, was bis zur Dialysepflichtigkeit führen kann. Zusätzlich können sich Depressionen einstellen, die offenbar durch den Mangel an Parathormon hervorgerufen werden. Eine Therapie mit synthetischem humanen PTH kann hier zwar Abhilfe schaffen, doch induziert dieses PTH die Produktion von Antikörpern, was einen Therapieabbruch notwendig macht (Audran M et al. 1987).

Die klinischen Erfahrungen zeigen somit eindeutig, dass Patienten mit autologen Nebenschilddrüsentransplantaten in heterotoper Position (z.B. im Unterarm) gut von dieser Therapie profitieren (Feldman AL, 1999). Da jedoch, wie bereits erwähnt, eine solche autologe Transplantation nicht in jedem Fall möglich ist, könnte sich die Transplantation von MHC-differenten bzw. allogenen Nebenschilddrüsen als effektive therapeutische Alternative zur gegenwärtigen Therapie des Hypoparathyreoidismus erweisen. Der gravieren-

de Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass eine dauerhafte Immunsuppression notwendig ist, um die Transplantatabstoßung, also die Zerstörung der fremden Organe durch das Immunsystem, zu verhindern. Die dauerhafte immunsuppressive Therapie kann zwar die Transplantatabstoßung verhindern, sie führt jedoch häufig zu schwerwiegenden Nebenwirkungen wie einer gesteigerten Infektionshäufigkeit und zu einer erhöhten Tumorinzidenz (Penn I, 1975). Aus diesem Grund ist die allogene Nebenschilddrüsentransplantation gegenwärtig keine Alternative zu der konventionellen Substitutionstherapie. Ließen sich jedoch die Nachteile der Immunsuppression lösen, so wäre auch die allogene Nebenschilddrüsentransplantation die Therapie der Wahl.

1.3 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich im Wesentlichen mit der Frage, ob eine kurzfristige immunsuppressive Behandlung die Abstoßung von primär nicht-vaskularisierten Nebenschilddrüsentransplantaten verhindert. Nach aktuellen Erkenntnissen führt eine kurzfristige, d.h. eine weniger als drei Monate dauernde niedrigdosierte immunsuppressive Therapie nicht zu den gefürchteten Nebenwirkungen (s. oben). Diese Strategie ist zwar für vaskularisierte Großorgane wie Niere, Leber oder Herz nicht anwendbar, doch sind gegenwärtig keine Informationen vorhanden, ob nicht-vaskularisierte allogene Nebenschilddrüsentransplantate durch ein solches immunsuppressives Regime vor der Abstoßung geschützt werden. Um dies zu untersuchen, wurden Therapieansätze an transplantierten hypokalzämischen Lewis-Ratten getestet, die zuvor allogene Nebenschilddrüsentransplantate erhalten hatten. Darüber hinaus sollte für das Experimentalmodell Ratte die Frage geklärt werden, inwieweit der Transplantationsort, Glutaeusmuskel oder Nierenkapsel, die Wirkung der Immunsuppression beeinflusst.

2 Fragen

Folgende Fragen sollten im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Nebenschilddrüsen regeln den Kalziumspiegel über die Ausschüttung von Parathormon. Sind hierzu auch Nebenschilddrüsentransplantate in heterotoper Position in der Lage?
2. Cyclosporin schützt vaskularisierte Organe vor der Abstoßung. Ist es ebenfalls möglich, mit diesem Immunsuppressivum nicht-vaskularisierte Nebenschilddrüsentransplantate vor der Abstoßung zu schützen?
3. In dieser Arbeit wurden Nebenschilddrüsen in den Glutaeusmuskel und unter die Nierenkapsel transplantiert. Beeinflusst die Auswahl dieser Transplantationsorte die Transplantatfunktion und ist in Bezug auf den Transplantationsort ein Unterschied in der protektiven Wirkung von Cyclosporin festzustellen?
4. Zusätzlich zur Variation des Transplantationsortes wurden auch verschiedene immunsuppressive Therapieschemata ausgetestet. Welche Kombination aus Transplantationsort und immunsuppressiver Dosierung verlängert dabei die Transplantatüberlebenszeit am effektivsten?

3 Material und Methoden

3.1 Topographie der Nebenschilddrüsen bei der Ratte

Im Operationssitus imponieren die Epithelkörperchen als weißliche, leicht erhabene Strukturen (Abb. 3.1). Anders als der Mensch verfügen Ratten lediglich über zwei stecknadelkopfgroße Epithelkörperchen (Abb. 3.2), die beiderseits ventrolateral dem oberen Pol der Schilddrüse in unmittelbarer Umgebung der A. thyroidea sup. aufliegen.

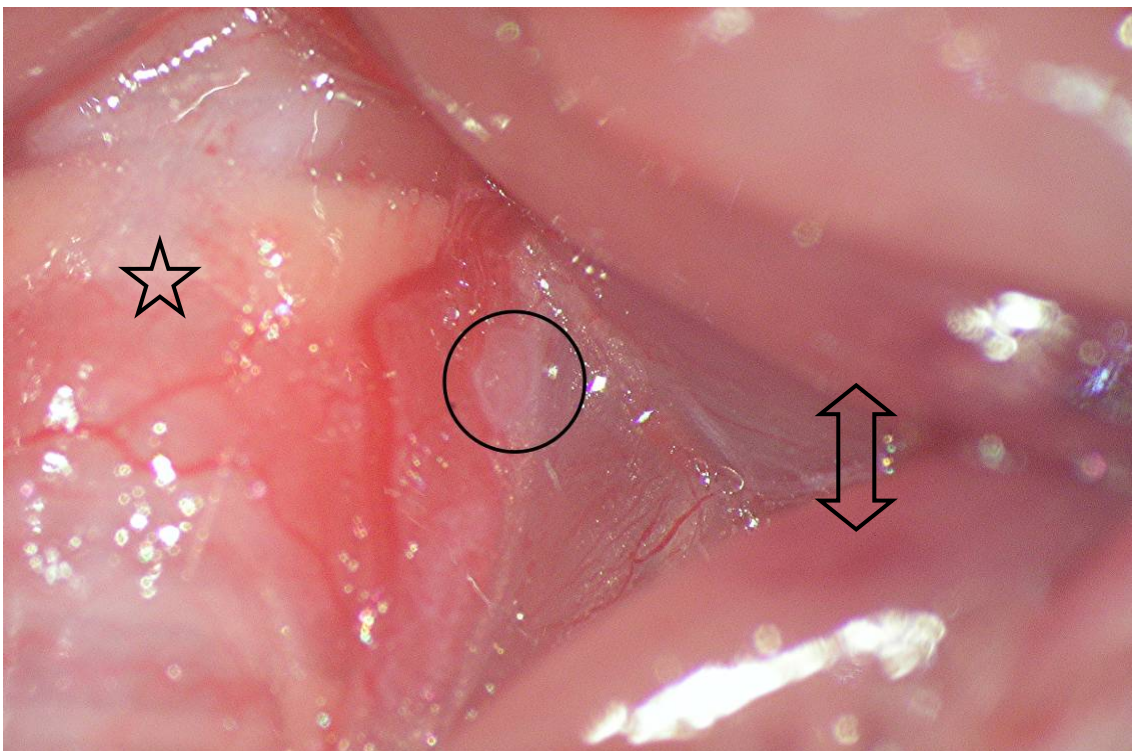


Abbildung 3.1: Darstellung eines Epithelkörperchens in situ (Kreis). Zu sehen ist oben links ein Anteil der Trachea, darunter der laterale Anteil der Schilddrüse (Stern). Rechts oben und unten lateralisierte Halsmuskulatur (Doppelpfeil). 10-fache Vergrößerung.

3.2 Tiere und Tierhaltung

Als Spender für die Epithelkörperchen wurden männliche Ratten des Inzuchtstammes Wistar Furth (WF, RT1^u) mit einem Körpergewicht zwischen 170 und 210 g verwendet. Die ebenfalls männlichen Empfängertiere vom

Inzuchtstamm Lewis (LEW, RT1¹) wogen zwischen 150 und 170 g. Beide Stämme wurden von der Fa. Charles River GmbH, Sulzfeld, bezogen.

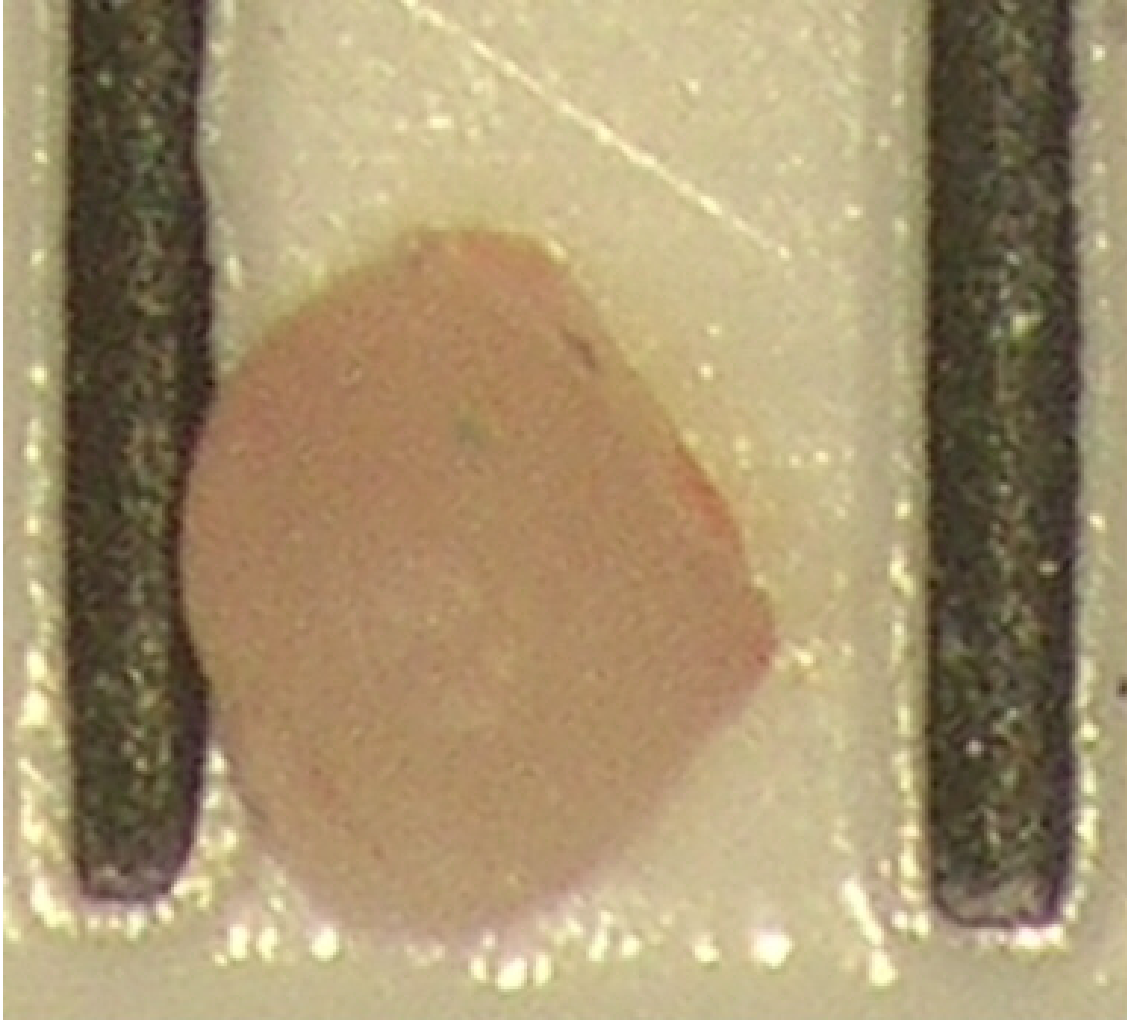


Abbildung 3.2: Explantiertes Epithelkörperchen. Der Abstand zwischen beiden Teilstrichen beträgt 1mm.

Abhängig von Größe und Gewicht der Tiere wurden jeweils zwei oder vier Ratten in einem Macrolon[®] Käfig gehalten. Die Unterbringung der Transplantatpender erfolgte räumlich getrennt von den Transplantatempfängern. Postoperativ wurden die Tiere mit den Boxen in Scantainer[®] Klimaschränken der Firma Scanbur, Køgen, Dänemark gehalten, die keimarme Bedingungen gewährleisteten. Das Raumklima war wie folgt: Temperaturkonstanz im Bereich von 22 ± 2 °C sowie eine relative Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Die Tiere, die

einem Hell-Dunkelrhythmus von jeweils 12 Stunden ausgesetzt waren, erhielten zu ihrer Ernährung Altromin[®] Pressfutter sowie Wasser in Trinkflaschen.

3.3 Experimentalgruppen

Als allogene Stamm-Kombination für die heterotope Nebenschilddrüsentransplantation wurde Wistar-Furth (WF) auf Lewis (LEW) gewählt. Das von unserer Arbeitsgruppe etablierte Spender-Empfänger-Verhältnis von 5:1 wurde auch für diese Arbeit übernommen (Timm S et al., 2001). Hierzu erhielt ein LEW-Empfängertier 10 Nebenschilddrüsentransplantate von WF-Ratten. Als Immunsuppressivum wurde Cyclosporin (Sandimmun[®] Infusionslösungskonzentrat) der Firma Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, verwendet. Die einzelnen Experimentalgruppen sind in Tabelle 4.1 im Ergebnisteil aufgelistet. Die jeweils notwendige Tagesdosis, verdünnt mit isotoner NaCl-Lösung, erhielten die Tiere subkutan in eine Hautfalte im Nacken injiziert. Je nach immunsuppressivem Protokoll erhielten die Tiere Cyclosporin über 9 oder 15 Tage. Dabei variierte das tägliche Zeitfenster für die Applikation der Immunsuppression nicht mehr als eine Stunde.

3.4 Blutentnahmen

Für eine regelmäßige Bestimmung des Serumkalziums durch das Zentrallabor der Universität waren jeweils 300 µl Vollblut notwendig. Zu ihrer Gewinnung wurden verschiedene Techniken der Blutentnahme durchgeführt. Alle hier vorgestellten Blutentnahmetechniken wurden in Narkose durchgeführt.

1. Sublinguale Blutgewinnung. Das Tier wurde mit dem Rücken auf eine Korkunterlage gelegt, und an der Innenseite seiner Oberkieferschneidezähne ein dünner Kunststoffschlauch mit ca. 2 mm Durchmesser über den Gaumen geführt und seitlich am Kopf mit Nadeln an der Unterlage befestigt. Ein zweiter Schlauch gleichen Durchmessers wurde an den Unterkieferschneidezähnen

vorbeigeführt und hiermit das Maul leicht gespreizt. Mit einem Klemmchen, das keine Riffelung aufweist, wurde die Zunge ca. 5 mm herausgezogen. Auf beiden Seiten des Zungengrundes wurden zwei oberflächliche Venen sichtbar. Die Punktion erfolgte mittels einer 1ml-Spritze mit einer 26G-Nadel. Nach erfolgter Blutgewinnung wurde die Punktionsstelle bis zur Blutstillung mit einem Watte­stäbchen tamponiert.

2. Finale Blutentnahme durch Herzpunktion. Das Tier wurde in Rückenlage gebracht. Mit den Fingern wurde auf der linken Thoraxseite das Herz ertastet. An diesem Punkt wurde in einem Winkel von ca. 45° eine 1ml-Spritze mit 26G-Nadel bis zur Hälfte der Nadel eingeschoben. Anschließend wurde der Punktionswinkel auf ca. 30° reduziert und die Spitze komplett eingeführt. Unter Aspiration wurde die Nadel soweit zurückgezogen, bis sich die Spritze mit Blut füllte.

3. Retrobulbäre Blutentnahme. Dieses technisch anspruchsvolle Verfahren beinhaltet bei sachgemäßer Durchführung kaum ein Risiko für das Tier. Der Kopf des betäubten Tieres wurde mit einer Hand fixiert, während mit der anderen vorsichtig eine Kapillare (wir verwendeten 30 mm lange heparinisierte Einmalkapillaren mit einem Durchmesser von 1 mm) mit regelmäßigen Drehbewegungen entlang der medialen knöchernen Begrenzung des Augenbulbus vorgeschoben wurde. Nach Überwinden eines leichten Widerstandes war der okulare Gefäßplexus eröffnet, und das Blut lief durch die Kapillare in ein 1 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Weitere Informationen zur fachgerechten Blutentnahme finden sich u.a. auf der Homepage des Bundesamtes für Veterinärwesen (www.bvet.admin.ch) der Schweiz im Unterverzeichnis Tierschutz.

3.5 Bestimmung des Serumkalziums zum Nachweis des Hypoparathyreoidismus

Das Blutkalzium wurde im Zentrallabor der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg nach der Schwarzenbach-Methode bestimmt. Hierfür stand das *Vitros Chemistry System 750XRC* zur Verfügung, für das „Ca-Slides“ der Firma Ortho-Clinical Diagnostics, Neckargemünd, verwendet wurden. Der Kalziumgehalt des Blutes, in mmol/l angegeben, wurde geräteseitig auf zwei Nachkommastellen bestimmt und standardmäßig vom Labor auf eine Nachkommastelle gerundet.

Innerhalb von sieben bis zehn Tagen nach Parathyroidektomie wurde eine Serumkalziumspiegelbestimmung bei den parathyroidektomierten Lewis-Ratten durchgeführt. Bei einem Wert von 1,8 mmol/l oder darunter wurde von einer erfolgreichen Entfernung der Epithelkörperchen ausgegangen, sodass diese Tiere die perfekten Transplantatempfänger darstellten. Nach Transplantation wurde der Kalziumspiegel in wöchentlichen Abständen kontrolliert. Stieg dabei der Kalziumspiegel unmittelbar (in der Regel zwischen dem 3. und 5. postoperativen Tag) nach Transplantation auf Werte von über 2,0 mmol/l an, so wurde das Transplantat als funktionell angesehen, und nur diese Tiere wurden auch weiter beobachtet. Ein späteres Absinken des Kalziumspiegels auf unter 2,0 mmol/l markierte den Abstoßungszeitpunkt. Der physiologische Referenzbereich für Kalzium liegt bei der Ratte zwischen 2.0 und 2.7 mmol/l (Mittelwert: 2.4 mmol/l; n = 62 Blutproben).

In der Klinik gehört die Bestimmung des Parathormonspiegels zur Standardmethode, um Hyperparathyreoidismus nachzuweisen. Zum Funktionsnachweis der Nebenschilddrüsen-Transplantate wurde der Kalziumspiegel bestimmt. Aufgrund der engen Interaktion zwischen Parathormonspiegel und Serumkalzium ist dies möglich, da die Ausschüttung von Parathormon einen Anstieg des Serumkalziumwertes bewirkt und umgekehrt (vergl. Einleitung).

3.6 Die heterotope Nebenschilddrüsentransplantationen

3.6.1 Die Narkose

Es wurden zwei unterschiedliche Narkoseverfahren angewandt:

1. Injektionsnarkose. Zur Durchführung wurden die Tiere in eine mit Zellstoff ausgelegte Kunststoffbox gesetzt, die mit einer Narkosegaszuführung und einem zweiten Schlauchanschluss zum Absaugen des Isofluran-Sauerstoffgemisches ausgestattet war. Für die Dosierung wurde 3 Prozent Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH) gewählt, das über einen Verdampfer (Vapor 19.3 der Firma Drägerwerk AG, Lübeck) mit einem Gasfluss von 2,0 Liter/Minute abgegeben wurde. Mit der Injektionsnarkose wurde begonnen, sobald das Tier eine dafür ausreichende Schlaftiefe erreicht hatte, was nach ca. 3 Minuten der Fall war. Als Medikamente wurden Ketamin in einer Dosierung von 100 mg/ml (Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn GmbH) und Xylazin 2% (Rompun[®], Bayer Vital GmbH) verwendet. Zur Berechnung der Applikationsmenge wurde die Ratte gewogen. Die Applikationsmenge von 10 mg Ketamin pro 100 g Körpergewicht zuzüglich 0,1 ml Rompun[®] wurde dem Tier intramuskulär in die mediale Oberschenkelmuskulatur injiziert. Die danach eintretende Narkosetiefe sollte im Allgemeinen ca. 2 Stunden andauern. Diese Narkose beinhaltet den Nachteil, dass sie nicht immer optimal steuerbar ist, sodass es zu Atemdepressionen kommen kann, was eine direkte unterstützende Beatmung erforderlich macht. Auch wurden in einigen Fällen leichte Reflexe auf Berührungsreize beobachtet, weshalb Isofluran über eine Maske zugeführt werden musste. Auf eine Nachdosierung der Injektionsnarkose wurde aufgrund der schlechten Steuerbarkeit verzichtet.

2. Inhalationsnarkose. Die Einleitung erfolgte wie unter 1. beschrieben. Anschließend wurde den Tieren auch während der Operation weiterhin das Narkosegas-Sauerstoffgemisch über eine Maskenkonstruktion, die lediglich Nase und Maulöffnung bedeckte, zugeführt. Als Vorteil ist hierbei herauszustellen, dass die Narkosetiefe durch Anpassung des Isoflurananteils jederzeit variiert werden konnte und das Tier kurz nach der Operation erwachte.

3.6.2 Die Parathyreoidektomie

Dem narkotisierten Tier wurde der ventrale Halsbereich zwischen Unterkiefer und Brustbein rasiert. Anschließend wurde es in Rückenlage auf ein mit Zellstoff bespanntes Korkbrett gelegt. Unmittelbar über dem Brustbein erfolgte medial der Hautschnitt, der bis kurz unterhalb des Unterkiefers verlängert wurde. (Abb. 3.3) Um eine bessere Übersicht des Operationssitus zu erlangen, wurde zu beiden Seiten das Unterhautfettgewebe mit einer feinen Schere vorsichtig nach lateral von der Haut abpräpariert. Mittig wurde das Bindegewebe von kaudal, unter Schonung der Speicheldrüsen und Gefäße, in ventrolateraler Richtung vorsichtig frei präpariert. Anschließend wurde der Bindegewebslappen nach kranial hochgeklappt und fixiert. Der darunter liegende Musculus sternohyoideus wurde mittig in Längsrichtung gespalten, wodurch der Blick auf die Luftröhre frei wurde.



Abbildung 3.3: Angedeutete Schnittführung für den Hautschnitt zur Entnahme der Epithelkörperchen.

Um im Operationsgebiet ausreichende Bewegungsfreiheit zu erhalten, war es notwendig, die muskulären Anteile lateral mit zwei Klemmchen zu befestigen. Auf beiden Seiten der Trachea lagen die Schilddrüsenlappen, die durch den der Luftröhre aufliegenden Isthmus miteinander verbunden waren. Zum Auffinden der Epithelkörperchen wurde der Musculus thyrohyoideus, der lateral der Schilddrüse anliegt, abpräpariert. Zum Auffinden der Epithelkörperchen wurde die Vena thyroidea nach kranial verfolgt. Zwischen der Vene und einem ebenfalls in diesem Bereich gelegenen Fettkörperchen imponierte die Glandula parathyroidea als leicht erhabene,



Abbildung 3.4: Paravertebraler Hautschnitt zur Transplantation der Epithelkörperchen in den Glutaeusmuskel.

Die Spenderratten erhielten intrakardial 300 µl T 61 (Hoechst Roussel Vet) zur exzitationslosen Tötung.

stecknadelkopfgroße Struktur, die mit einer Mikroschere entfernt wurde. Eventuell auftretende Blutungen wurden durch Kompression mit einem Wattestäbchen gestillt. Da das umliegende Gewebe sehr gut durchblutet war, war es dringend erforderlich, während des gesamten Operationsverlaufes auf eine ausreichende Blutstillung zu achten. Bei den Empfängertieren wurde die Muskulatur wieder leicht aneinandergedrückt und das Bindegewebe an den Ursprungsort zurückverlagert. Anschließend erfolgte die Hautnaht mit einem nichtresorbierbaren, feinen Faden (6-0 Prolene® blau, Ethicon, Norderstedt).

3.6.3 Die Transplantation

1. Muskel

Nach erfolgter Narkoseeinleitung wurde der Rücken des Empfängertieres im Bereich des Oberschenkelansatzes, einschließlich der über der Wirbelsäule liegenden Haut, rasiert und desinfiziert. Zur Durchführung der Operation befand sich die Ratte in Bauchlage, wobei die paravertebrale Schnitfführung 0,5 cm lateral der Lendenwirbelsäule erfolgte und eine Länge von ungefähr 2,5 cm aufwies. Nach



Abbildung 3.5: Muskeltasche zur Implantation der Epithelkörperchen in den Glutaeusmuskel.

Eröffnung der Haut wurde die darunter liegende Faszie durchtrennt und im Muskel mit Hilfe einer feinen Schere eine kleine Tasche gebildet. Die in 0,9% NaCl-Lösung aufbewahrten Epithelkörperchen wurden mit einer Pinzette in diese Tasche gelegt, welche anschließend mit 2-3 Einzelknopfnähten verschlossen wurde. Als Nahtmaterial wurde ein nichtresorbierbarer 6-0 Prolene® Faden der Firma Ethicon, Norderstedt, verwendet. Dieses Nahtmaterial erleichterte das Auffinden des Transplantationsortes. Der Verschluss der Haut erfolgte mit einem 3-0 Prolene® Faden.

2. Niere

Hierzu wurde das Abdomen des narkotisierten Tieres rasiert und desinfiziert.



Abbildung 3.6: Paramedianer Bauchschnitt.

Der gesetzte Bauchschnitt wurde ca. 0,5 cm kranial des Penisansatzes angesetzt und bis zum unteren Sternalrand geführt. Dabei war darauf zu achten, dass weder Blase noch Leber verletzt wurden. Die eröffnete Bauchhaut wurde mit Retraktoren beiseite gezogen. Die ausgelagerten Darmanteile wurden in eine mit isotoner NaCl-Lösung benetzten Kunststoffolie gelegt.

Die linke Niere wurde mit Wattestäbchen nach kaudal mobilisiert.

Mit der metallenen Führungsnadel einer 12G Venenverweilkanüle wurde die Nierenkapsel vorsichtig am unteren Nierenpol angeritzt, mit einer spitzen Pinzette leicht angehoben und die Venenverweilkanüle ohne Führungsnadel vorsichtig mit leichten Drehbewegungen zwischen Niere und Nierenkapsel eingeschoben, so dass die Auslassöffnung am oberen Nierenpol zu liegen



Abbildung 3.8: Das Epithelkörperchen wurde mit einer Kunststoffkanüle zwischen Nierenkapsel und Parenchym gelegt.

kam. Anschließend wurden die Epithelkörperchen unter die Nierenkapsel gespritzt, und die Kanüle vorsichtig herausgezogen. Der Darm wurde in das Abdomen zurückgelegt, und die Bauchmuskulatur mit einem 6-0 Prolene® Faden, die Haut mit einem 3-0 Prolene® Faden fortlaufend verschlossen.

3.7 Immunhistologische Analysen

A) Vorbereitung der Präparate

Die erforderlichen Gewebeproben wurden in Narkose entnommen und zusammen mit Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe B. V., Zoeterwoude, NL) in Probenbehälter aus Polyethylen (Hartenstein, Würzburg) gesammelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert. Von den Gewebeproben wurden Schnittpräparate mit einer Dicke von 5 µm angefertigt (Kryostat 2800 Frigocut N, Fa. Reichert-Jung) und anschließend auf Histo-Bond-Objektträger der Fa. Marienfeld aufgetragen, die gegenüber unbeschichteten Objektträgern eine verbesserte Haftung der Präparate aufwiesen. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 30 Minuten wurden die Schnitte entweder gefärbt oder bis zur späteren Verwendung bei -20°C gelagert.

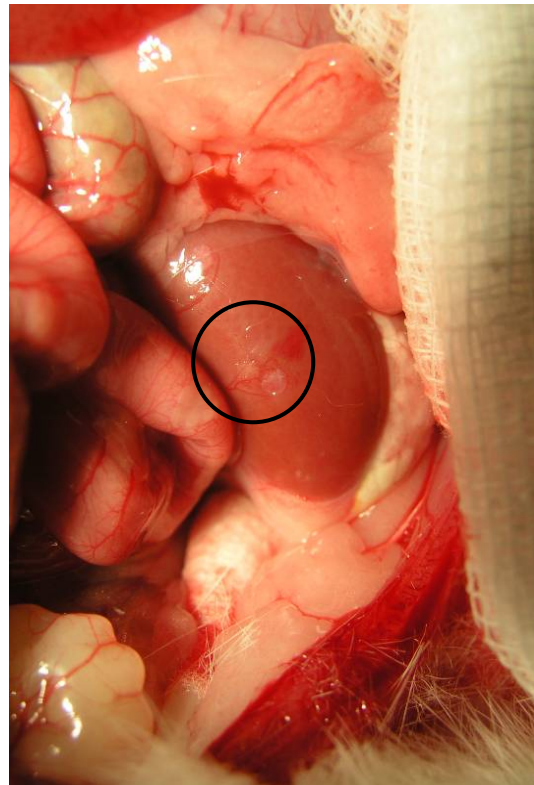


Abbildung 3.9: Niere mit Epithelkörperchen (Kreis) in situ.

B) Primärantikörper

Es wurden drei verschiedene Primärantikörper eingesetzt: Ox18 richtet sich gegen MHC-Klasse-I-Moleküle, die sich auf nahezu allen Körperzellen

befinden. Ox6 bindet spezifisch an MHC-Klasse-II-Moleküle. Diese werden hauptsächlich von Zellen des Immunsystems exprimiert. Der von uns eingesetzte Antikörper erkennt eine monomorphe Determinante des Ratten-Ia-Antigens, das auf B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, einigen Makrophagen und verschiedenen epithelialen Zellen vorliegt. Bei Ox42 handelt es sich um einen Antikörper, der ein bestimmtes Epitop auf den meisten Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten erkennt (Tab. 3.1).

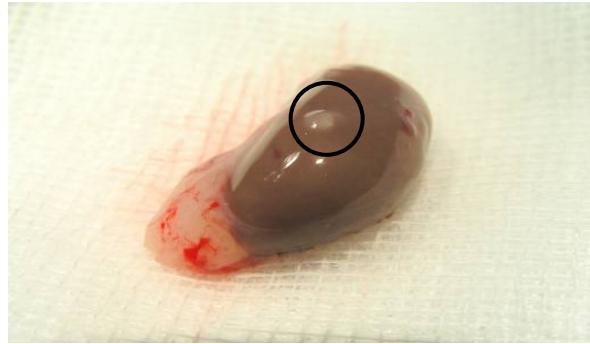


Abbildung 3.10: Niere mit aufgelagertem Epithelkörperchen (Kreis).

Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten Antikörper und ihre Spezifität

Antikörper	Antigen	Spezifität
Ox18	MHC I	alle kernhaltigen Zellen
Ox6	MHC II	B-Lymphozyten, dendritische Zellen, teils Makrophagen und epitheliale Zellen
Ox42	CD11b/c	Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten

C) Färbungen

Die Schnittpräparate wurden für 15 Minuten in Aceton fixiert und anschließend für 20 Minuten luftgetrocknet. Danach wurden sie, wie auch nach jedem weiteren Färbeschritt, zweimal in PBS für jeweils 5 Minuten getaucht („gewaschen“). Anschließend wurden sie mit einem Gemisch aus Natriumacid (1-2 g/l PBS) und 30% Wasserstoffperoxid zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase behandelt. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen mit 2% bovinem Serumalbumin wurden die Präparate mit dem jeweiligen Primär-

antikörper (Verdünnung 1:100) für 30 Minuten inkubiert. In einem weiteren Schritt wurde der biotinylierte Sekundärantikörper aus dem *LSAB-Kit* (Labelled StreptAvidin-Biotin von Dako, Hamburg) zugegeben, für 15 Minuten inkubiert und anschließend mit phosphatgepufferter, physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Die *LSAB Kits* zeichnen sich durch eine gesteigerte Sensitivität aus, die eindeutige und empfindliche Anfärbungen ergeben. Das mit Meerrettichperoxidase konjugierte Streptavidin wurde hinzugefügt und für 15 Minuten inkubiert. Die Färbung zeigte sich nach Zugabe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) und Wasserstoffperoxid. Durch die Reaktion der Peroxidase kam es zu einer Braunfärbung der von den Primärantikörpern markierten Zellen. Abschließend wurde mit Hämalaun gegengefärbt und nach zehnmütigem Spülen mit kaltem Wasser die Schnitte für zehn Sekunden in 100% Ethanol entwässert. Bis zu ihrer Eindeckung mit Entellan (Merck) wurden die Objektträger in einem mit Xylol gefüllten Rack belassen.

D) Verwendete Puffer- und Färbelösungen

Phosphate Buffered Saline (PBS): Pro Liter Aqua dest. wurden eingewogen: 8,2 g NaCl, 0,89 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,68 g KH₂PO₄ (pH 7,4).

Tris-HCl-Puffer: Pro Liter Aqua dest. wurden 7,88 g Tris-HCl eingewogen und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Wässriges Hämalaun nach Mayr: Für 5 Liter Aqua dest. wurden eingewogen: 6 g Hämatoxylin, 1 g Natriumjodat, 250 g Kaliumaluminiumsulfat und 5 g Zitronensäure. Die Lösung wurde 6 Wochen im Dunkeln unverschlossen aufbewahrt.

E) Auswertung der Färbungen

Die Schnitte wurden mikroskopisch begutachtet (Olympus BH-2, Olympus Optical Co. Ltd., Hamburg) und mit einer auf das Mikroskop aufgesetzten Digitalkamera (Olympus C5050 Zoom) unter Zuhilfenahme einer Software (Camera Controller, Pine Tree Computing, LLC) zur Steuerung der Kamera fotografiert. Mit der Bildbearbeitungssoftware *Photoimpact XL Trial* (Ulead Systems GmbH, Kaarst) wurden die Bilder nachbearbeitet.

4. Ergebnisse

4.1 Induktion der experimentellen Hypokalzämie

Untersuchungen der eigenen Gruppen an Lewis-Ratten haben ergeben, dass die komplette Entfernung der Epithelkörperchen zu einem dauerhaften Absinken des Kalziumspiegels führt (Marco Etzel: Einfluss der Histokompatibilitätsantigene MHC Klasse I und II auf die Transplantatfunktion nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation in der Ratte. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg; <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus/volltexte/2004/992/>).

Als Hypoparathyreoidismus wird bei Ratten die Situation bezeichnet, bei der der Serumkalziumspiegel dauerhaft unter 2,0 mmol/l fällt. Um die Wirkung der Nebenschilddrüsentransplantation auf den Serumkalziumspiegel klarer darzustellen, wurden ausschließlich hypokalzämische Empfängertiere ausgewählt, deren Kalziumspiegel unter 1,8 mmol/l lag. Parathyreoidektomierte Tiere, deren Kalziumspiegel zwischen 1,8 und 2,0 mmol/l schwankte, wurden deshalb als Empfänger ausgeschlossen. Dies traf jedoch nur bei fünf von 60 Tieren zu. Als Ursache hierfür wird eine inkomplette Resektion oder eine ektopische Parathormonproduktion angenommen.

4.2 Die experimentellen Gruppen

Als Transplantatempfänger dienten in allen Gruppen Ratten der Inzuchtlinie Lewis. Pro Tier wurden Epithelkörperchen von 5 Spendertieren, somit 10 Nebenschilddrüsen, transplantiert. Die syngene Kontrollgruppe sowie die allogenen transplantierte Gruppe NK2 (vergl. Tab. 4.1) bestand aus zwei Tieren; alle weiteren Gruppen enthielten je drei Tiere. In der nachfolgenden Tabelle 4.1 sind die in dieser Arbeit untersuchten experimentellen Gruppen aufgelistet.

Tabelle 4.1: Übersicht über die experimentellen Gruppen, den Transplantationsort (Tx-Ort), die Dosierung an Cyclosporin A in mg/KG Körpergewicht (#) und den Zeitpunkt und die Dauer der Applikation (Zeitintervall angegeben in Tagen (~)).

Gruppe	Kombination	Tx-Ort*	CsA-Dosierung (#)	Zeitintervall (~)	n*
K-Syn	LEW → LEW	M* / NK*	----	----	4
K-Allo	WF → LEW	M* / NK*	----	----	6
M1	WF → LEW	M*	20	0 bis 14	3
M2	WF → LEW	M*	10	0 bis 14	3
NK1	WF → LEW	NK*	10	0 bis 14	3
M3	WF → LEW	M*	5	0 bis 14	3
M4	WF → LEW	M*	10	-7 bis +7	3
NK2	WF → LEW	NK*	10	6 bis 14	2

In den allogenen Gruppen Allo, M1 bis M4 sowie NK1 und NK2 erhielten parathyreoidektomierte LEW-Ratten Nebenschilddrüsentransplantate von WF-Ratten (Symbol: WF → LEW). In der syngenen Kontrollgruppe K-Syn erhielten parathyroid-ektomierte LEW-Ratten Nebenschilddrüsentransplantate von LEW-Tieren (Symbol: LEW → LEW).

*Abkürzungen: „K-Syn“: syngene Kontrollgruppe; „K-Allo“: allogene Kontrollgruppe; LEW: Lewis-Ratte; WF: Wistar-Furth-Ratte; NK: Nierenkapsel; M: Muskel; n: Anzahl der transplantierten Empfängertiere innerhalb der Gruppe.

4.2.1 Die syngene Nebenschilddrüsentransplantation

Transplantationsort Glutaeusmuskel

In vorausgegangenen Untersuchungen hat die Arbeitsgruppe gezeigt, dass bei hypokalzämischen Lewis-Ratten, die syngene Nebenschilddrüsentransplantate von Lewis-Spendern erhielten, der Kalziumspiegel innerhalb von drei bis vier Tagen nach Transplantation auf einen Wert von über 2,0 mmol/l anstieg. Dabei

war diese Normalisierung für einen Beobachtungszeitraum von mehr als 100 Tagen stabil. Aus praktischen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch am 56. postoperativen Tag beendet. Wie Abb. 4.2 zeigt, war der Kalziumspiegel bis zum Versuchsende uneingeschränkt stabil.

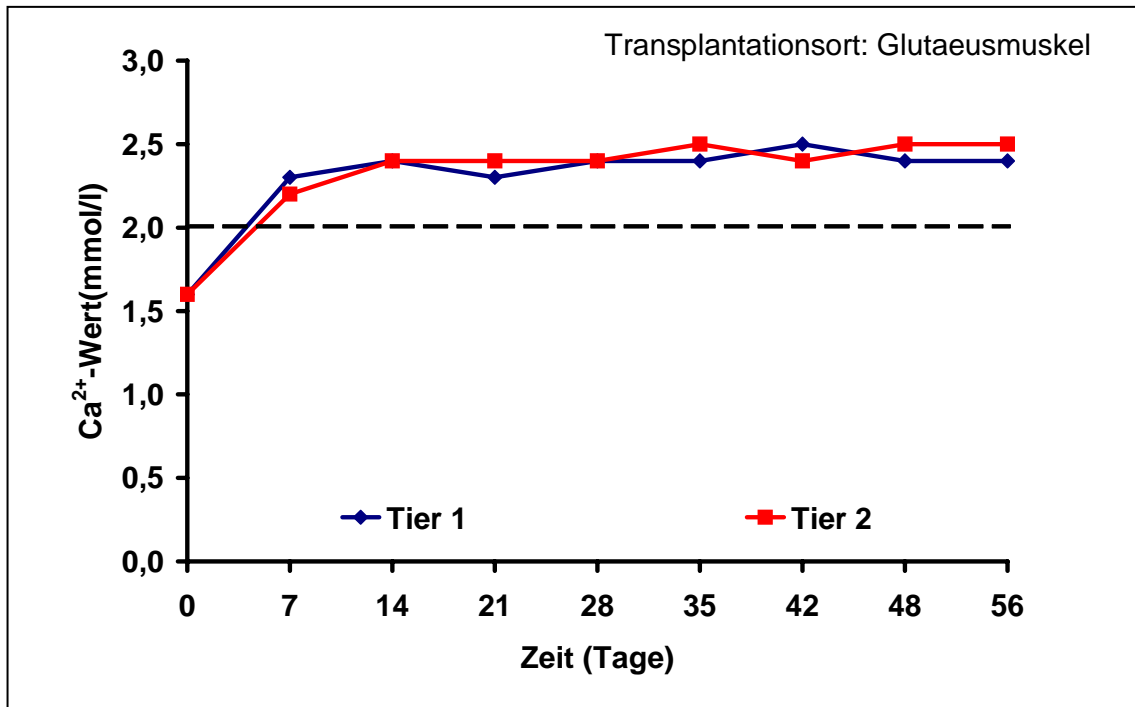


Abbildung 4.1: Verlauf des Serumkalziumspiegels in mmol/l nach syngener Nebenschilddrüsentransplantation ohne Immunsuppression (Gruppe K-Syn; Tab. 4.1). Hypokalzämische Lewis-Ratten mit einem Kalziumspiegel unter 2,0 mmol/l erhielten zehn Nebenschilddrüsentransplantate in den Glutaeusmuskel. Innerhalb von sieben Tagen stieg der Serumkalziumspiegel auf über 2,0 mmol/l an.

Transplantationsort Nierenkapsel

Hypokalzämische Lewis-Ratten erhielten zehn Nebenschilddrüsentransplantate unter die Nierenkapsel, um festzustellen, ob der Serumkalziumspiegel auch bei diesem Transplantationsort in den physiologischen Bereich ansteigt. Wie bei der Transplantation in den Glutaeusmuskel, so war auch für diesen Transplantationsort festzustellen, dass der Kalziumspiegel am dritten bzw. vierten postoperativen Tag auf über 2,0 mmol/l angestiegen war (Abb. 4.2).

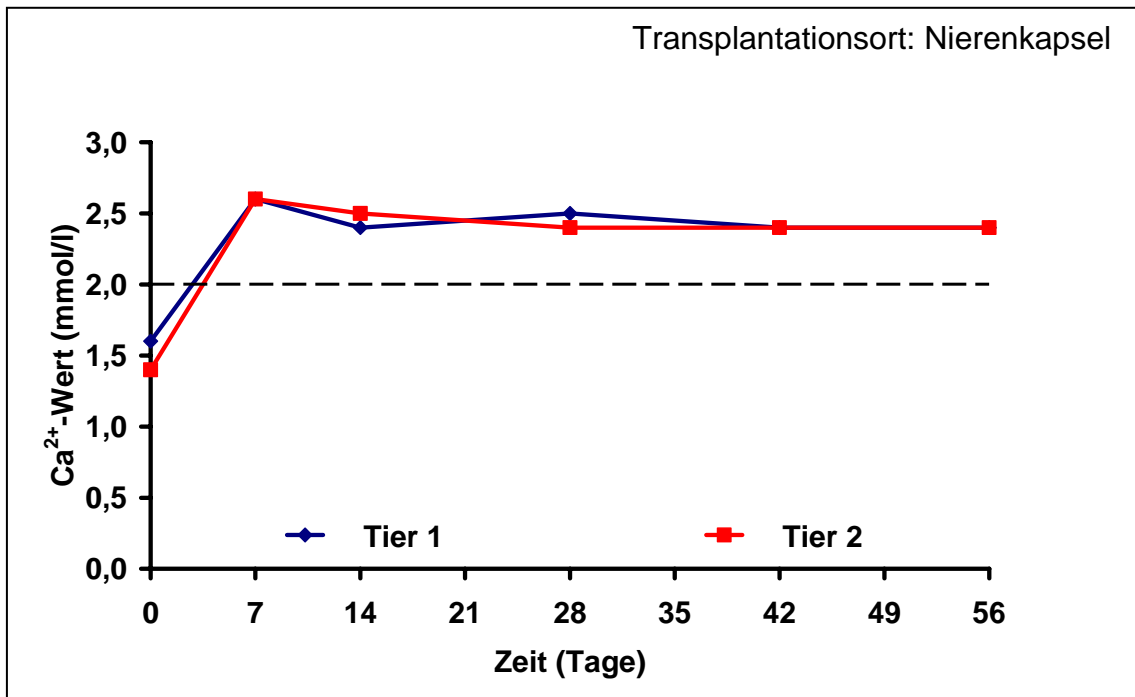


Abbildung 4.2: Verlauf des Serumkalziumspiegels in mmol/l nach syngener Nebenschilddrüsen transplantation ohne Immunsuppression (Gruppe K-Syn; Tab. 4.1). Hypokalzämische Lewis-Ratten mit einem Kalziumspiegel unter 2,0 mmol/l erhielten zehn Nebenschilddrüsen transplantate unter die Nierenkapsel. Wie bereits für den Transplantationsort Glutaeusmuskel (Abb. 4.1) gezeigt, stieg innerhalb von sieben Tagen der Serumkalziumspiegel dauerhaft auf über 2,0 mmol/l an.

4.2.2 Die allogene Nebenschilddrüsen transplantation ohne Immunsuppression

Wie gezeigt, stellt die heterotope Nebenschilddrüsen transplantation eine effektive Therapieoption zur Behandlung des induzierten Hypoparathyreoidismus dar. Bei der syngenen Transplantation werden die Transplantate jedoch nicht durch das Empfängerimmunsystem attackiert. Da aber die autologe Transplantation (gleichzusetzen mit der syngenen Transplantation im Tiermodell) in der Klinik eher die Ausnahme darstellt, sollte nun die Möglichkeit der allogenen Nebenschilddrüsen transplantation untersucht werden. Deshalb erhielten hypokalzämische Lewis-Ratten Nebenschilddrüsen transplantate von Wistar-Furth-Ratten (allogene Stammkombination).

Transplantationsort Glutaeusmuskel

Auch nach der Übertragung allogener Nebenschilddrüsen stieg der Serumkalziumspiegel innerhalb von drei bis vier Tagen nach Transplantation auf Werte von über 2,0 mmol/l an (Abbildung 4.3). Im Gegensatz zur syngenen Transplantation kam es jedoch zwischen dem 12. und 16. postoperativen Tag zu einem erneuten Abfall des Kalziumspiegels in den hypokalzämischen Bereich. Diese erneute und dauerhafte Hypokalzämie wurde durch die Transplantaterstörung oder Abstoßung verursacht (vgl. auch Abbildung 4.14 a-c).

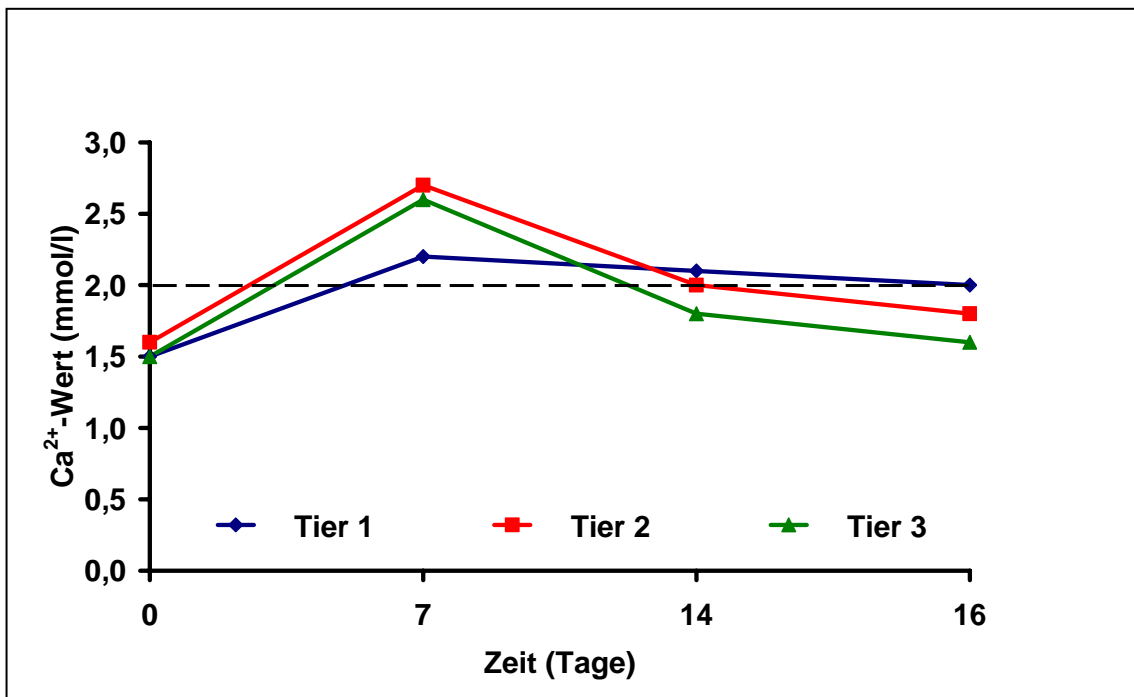


Abbildung 4.3: Verlauf des Serumkalziumspiegels in mmol/l nach allogener Nebenschilddrüsen transplantation ohne Immunsuppression (Gruppe K-Allo; Tab. 4.1). Die Epithelkörperchen wurden in den Glutaeusmuskel transplantiert. Nach einem initialen Anstieg des Serumkalziumspiegels fiel dieser binnen 16 Tagen kontinuierlich aufgrund der einsetzenden Abstoßung ab. Diese gegen die allogenen Nebenschilddrüsen transplantate gerichtete Immunantwort führte zu einem irreversiblen Funktionsverlust.

Transplantationsort Nierenkapsel

Wie bereits für den Transplantationsort Glutaeusmuskel gezeigt, normalisierten auch die unter der Nierenkapsel befindlichen allogenen Nebenschilddrüsen-

transplantate den Kalziumspiegel auf Werte von über 2,0 mmol/l. Auch hier war aufgrund der fortschreitenden Abstoßung ein erneuter Abfall des Serumkalziumspiegels zu beobachten. Im Vergleich zum Glutaeusmuskel scheint sich jedoch hier die vollständige Organzerstörung etwas früher auszubilden und zwar zwischen dem 8. und 13. postoperativen Tag (Abb. 4.4).

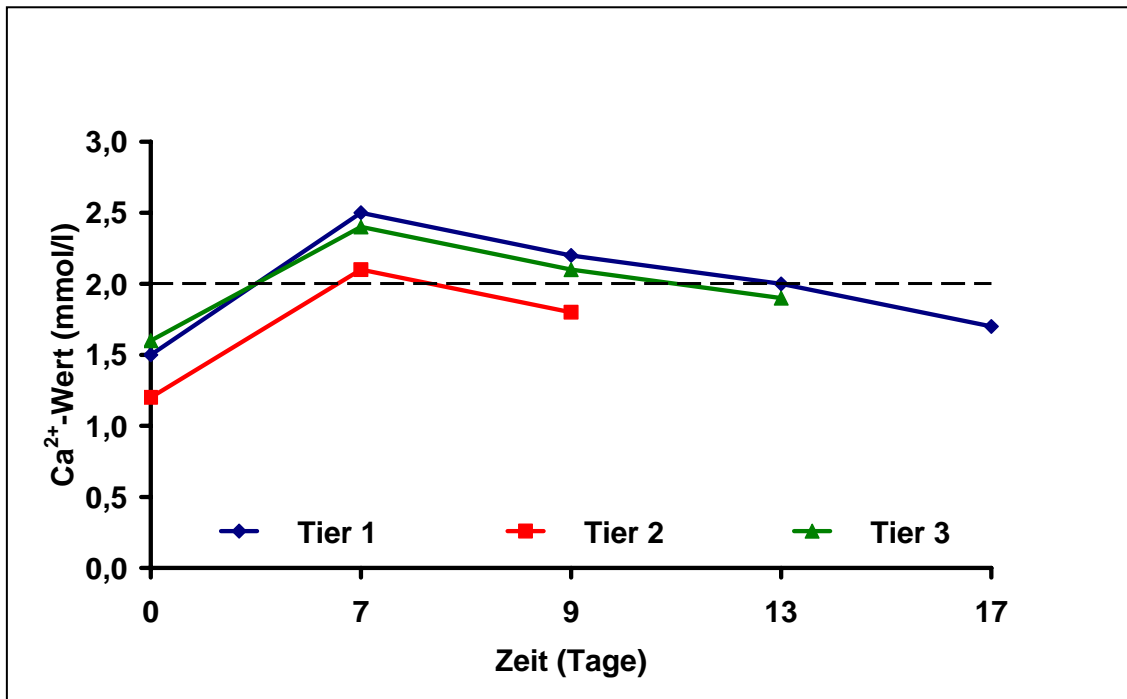


Abbildung 4.4: Verlauf des Serumkalziumspiegels in mmol/l nach allogener Nebenschilddrüsen transplantation ohne Immunsuppression (Gruppe K-Allo; Tab. 4.1). Die Epithelkörperchen wurden unter die Nierenkapsel gelegt. Im Vergleich zur Transplantation in den Glutaeusmuskel (Abb. 4.3) kam es bereits zwischen dem 8. und 13. postoperativen Tag zur vollständigen Zerstörung der Nebenschilddrüsen transplantate, weshalb der Kalziumspiegel erneut abfiel.

4.2.3 Die allogene Nebenschilddrüsen transplantationen mit Immunsuppression

Da das Immunsystem der Empfängertiere die allogenen Nebenschilddrüsen transplantate irreversibel zerstört, wurde in einer weiteren Experimentalserie versucht, den Zeitpunkt der Transplantatabstoßung durch Immunsuppression hinauszuzögern. Hierzu erhielten die hypokalzämischen Lewis-Tiere eine

Dosierung von 20, 10 oder 5 mg Cyclosporin A pro kg Körpergewicht für jeweils 15 Tage, beginnend mit dem Tag der Operation, als gewichtsbezogene Dosierung subkutan in den Nackenbereich injiziert.

Transplantationsort Glutaeusmuskel; Immunsuppressive Dosierung: 20 mg/kg KG

Bei allen drei Tieren stieg der Serumkalziumspiegel drei bis vier Tage nach Transplantation auf 2,0 mmol/l an. Die verabreichte Immunsuppression bewirkte, dass die Transplantate erst um den Tag 28 bis 35 abgestoßen wurden (Serumkalziumspiegel unter 2,0 mmol/l). Somit führte diese zeitlich begrenzte Immunsuppression zu einer Verlängerung der Transplantatfunktionszeit.

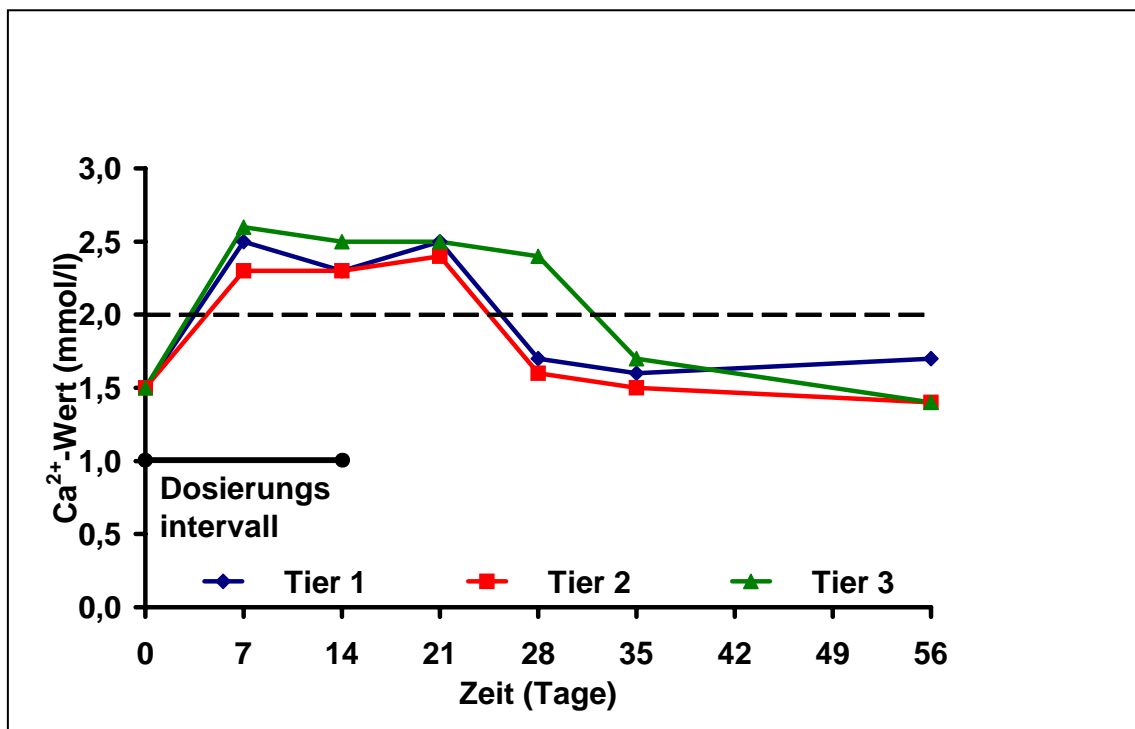


Abbildung 4.5: Verlauf des Serumkalziumspiegels in mmol/l nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation mit Immunsuppression Gruppe M1; Tab. 4.1). Die Nebenschilddrüsen wurden in den Muskel transplantiert. Vom Tag der Transplantation an erhielten die Tiere fünfzehn Tage lang eine immunsuppressive Dosis an Cyclosporin A von 20 mg/kg KG. Während der Immunsuppression kam es zu keiner Abstoßung.

**Transplantationsort Glutaeusmuskel; Immunsuppressive Dosierung:
10 mg/kg KG**

Bei weiteren drei Tieren wurde die immunsuppressive Therapie auf 10 mg pro kg Körpergewicht reduziert. Auch hier war ein Anstieg des Serumkalziumspiegels nach Transplantation auf Werte von über 2,0 mmol/l zu beobachten (Abb. 4.6). Nach vier Wochen waren die Kalziumwerte zweier Tiere unter den Grenzwert von 2,0 mmol/l abgefallen, beim dritten Tier war dies eine Woche später der Fall. Trotz Halbierung der Immunsuppression war keine wesentliche Verkürzung der Transplantatüberlebensdauer gegenüber der hohen Dosierung (Abb. 4.5) feststellbar.

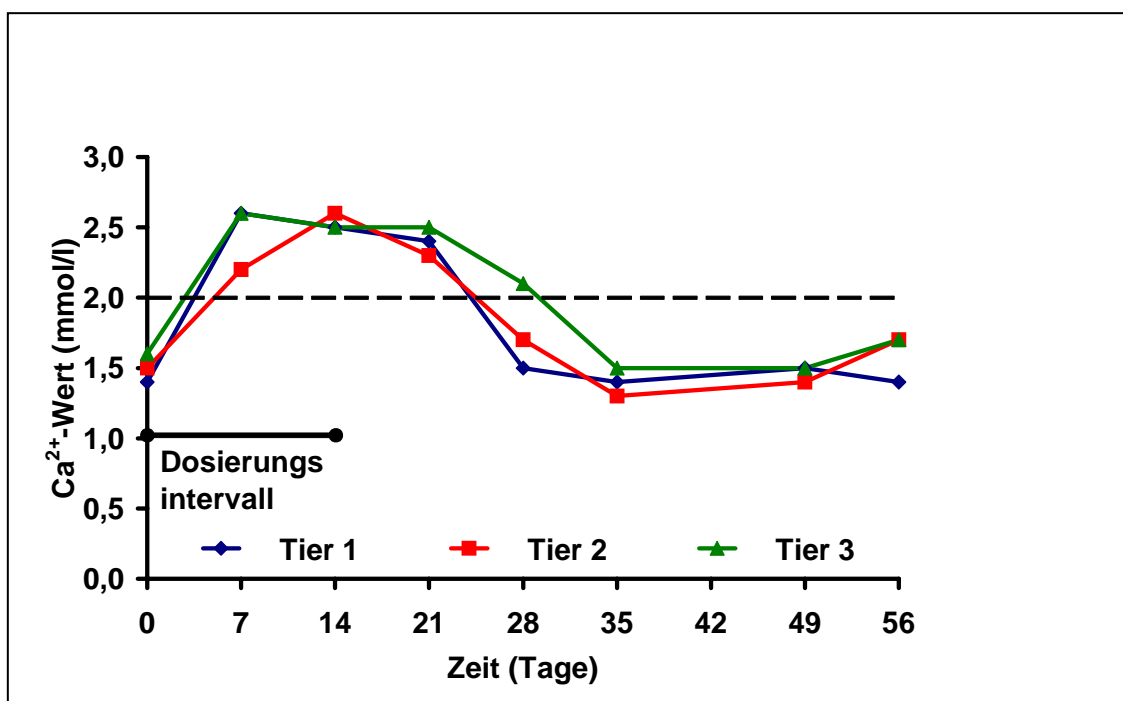


Abbildung 4.6: Verlauf des Serumkalziumspiegels in mmol/l nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation mit Immunsuppression (Gruppe M2; Tab. 4.1). Die Nebenschilddrüsen wurden in den Glutaeusmuskel transplantiert. Vom Tag der Transplantation an erhielten die Tiere fünfzehn Tage lang eine immunsuppressive Dosis von 10 mg pro kg Körpergewicht. Während der Immunsuppression kam es zu keiner Abstoßung. Der Abfall des Kalziumspiegels fand im gleichen Zeitintervall statt wie bei der Gruppe, die mit 20 mg Cyclosporin A behandelt wurde.

Transplantationsort Nierenkapsel; Immunsuppressive Dosierung: 10 mg/kg KG

Bei 10 mg Cyclosporin A pro kg Körpergewicht, verabreicht über 15 Tage ab Transplantation der Epithelkörperchen unter die Nierenkapsel, kam es zu einem Anstieg des Serumkalziumspiegels auf physiologische Werte binnen einer Woche nach Transplantation. Diese Transplantatfunktionszeiten sind vergleichbar mit der Muskulatur als Transplantationsort. Innerhalb der darauf folgenden zwei Wochen fiel dieser zunächst mäßig ab. Die Abstoßung der Transplantate erfolgte zwischen dem 21. und 28. postoperativen Tag.

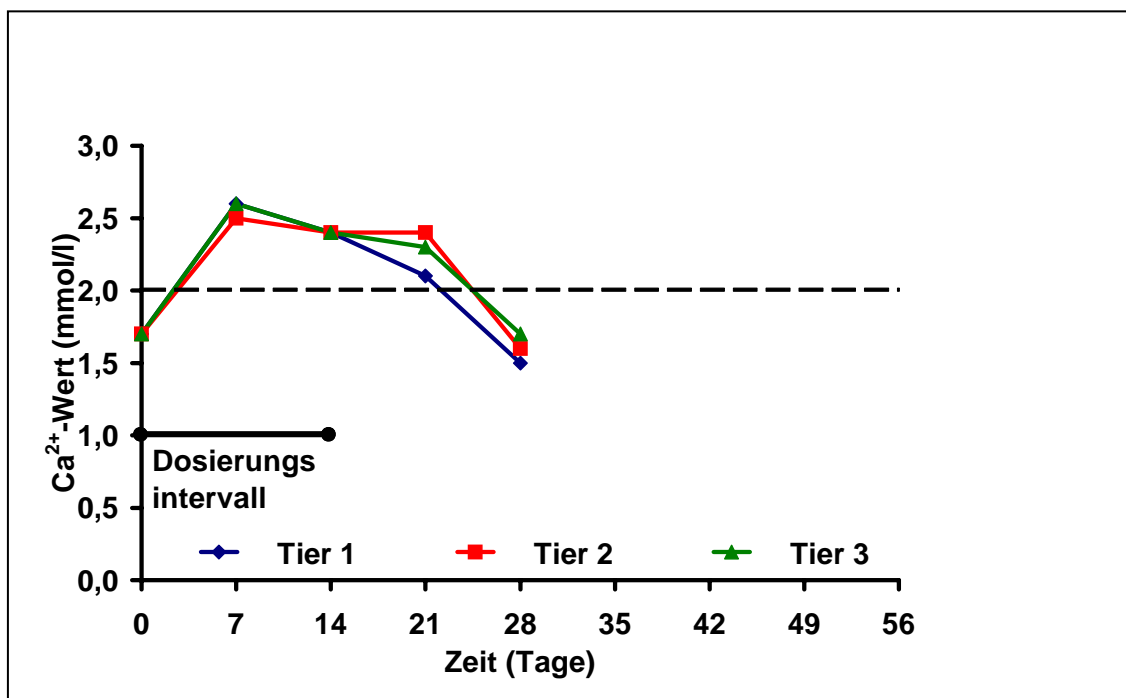


Abbildung 4.7: Verlauf des Serumkalziumspiegels in mmol/l nach allogener Nebenschilddrüsen transplantation mit Immunsuppression (Gruppe NK1; Tab. 4.1). Die Nebenschilddrüsen wurden unter die Nierenkapsel transplantiert. Vom Tag der Transplantation an erhielten die Tiere fünfzehn Tage lang eine immunsuppressive Dosis von 10 mg Cyclosporin pro kg Körpergewicht. Während der Dauer der Immunsuppression kam es zu keiner Abstoßung, während nach Absetzen der Immunsuppression die Abstoßung zwischen Tag 21 und 28 zu beobachten war.

**Transplantationsort Glutaeusmuskel; Immunsuppressive Dosierung:
5 mg/kg KG**

Nachdem es ebenfalls in dieser Versuchsgruppe zu einem Anstieg der Serumkalziumwerte in den normokalzämischen Bereich gekommen war, zeigte sich bei den drei Empfängertieren ein Verlust der Transplantatfunktion bereits nach 20 Tagen (Abb. 4.8).

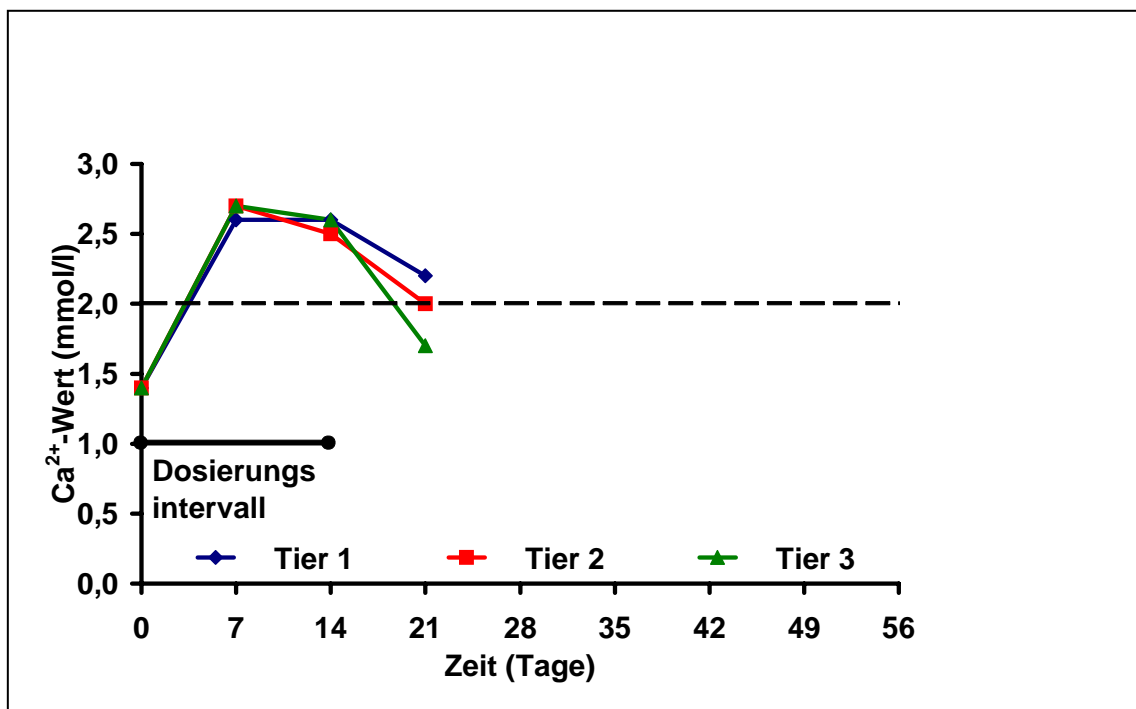


Abbildung 4.8: Verlauf des Serumkalziumspiegels in mmol/l nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation mit Immunsuppression (Gruppe M3; Tab. 4.1). Die Nebenschilddrüsen wurden in den Glutaeusmuskel transplantiert. Vom Tag der Transplantation an erhielten die Tiere fünfzehn Tage lang eine immunsuppressive Dosis von 5 mg Cyclosporin A pro kg Körpergewicht. Während der Immunsuppression kam es zu keiner Abstoßung. Doch bereits eine Woche nach Beendigung der immunsuppressiven Therapie war die Abstoßung feststellbar und fand damit deutlich früher statt als bei den Gruppen M1 (20 mg/kg) und M2 (10 mg/kg).

4.3 Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation: Variation des Dosierungsintervalles

Der Vergleich der Versuchsergebnisse der Gruppen M1 bis M3 (Tab. 4.1) zeigt, dass die mit 20 mg/kg höchste von uns eingesetzte immunsuppressive Dosierung an Cyclosporin A (Versuchsgruppe M1) im Vergleich zur Versuchsgruppe M2, die 10 mg/kg erhielt, keinen wesentlichen Unterschied in der Verlängerung des Transplantatüberlebens aufwies. Hingegen bewirkte die immunsuppressive Dosierung mit 5 mg/kg Cyclosporin A eine sehr viel geringere Verlängerung der Transplantatfunktionszeit. Aus diesem Grund erhielten alle nachfolgenden experimentellen Gruppen (M4, NK1 und NK2; Tab. 4.1) eine Dosierung von 10 mg/kg Cyclosporin A.

Eine eventuelle Beeinflussung des Abstoßungszeitpunktes durch den Beginn der immunsuppressiven Therapie sowie durch ihre Dauer sollte durch die Variation weiterer Parameter untersucht werden. So erhielt eine Versuchsgruppe bereits präoperativ eine Woche lang Cyclosporin A. Bei diesen Tieren trat jedoch bereits nach 21 beziehungsweise 28 Tagen eine hypokalzämische Stoffwechsellage ein, sodass das Vorgehen keinen Vorteil gegenüber der rein postoperativen Gabe von Cyclosporin A zeigte.

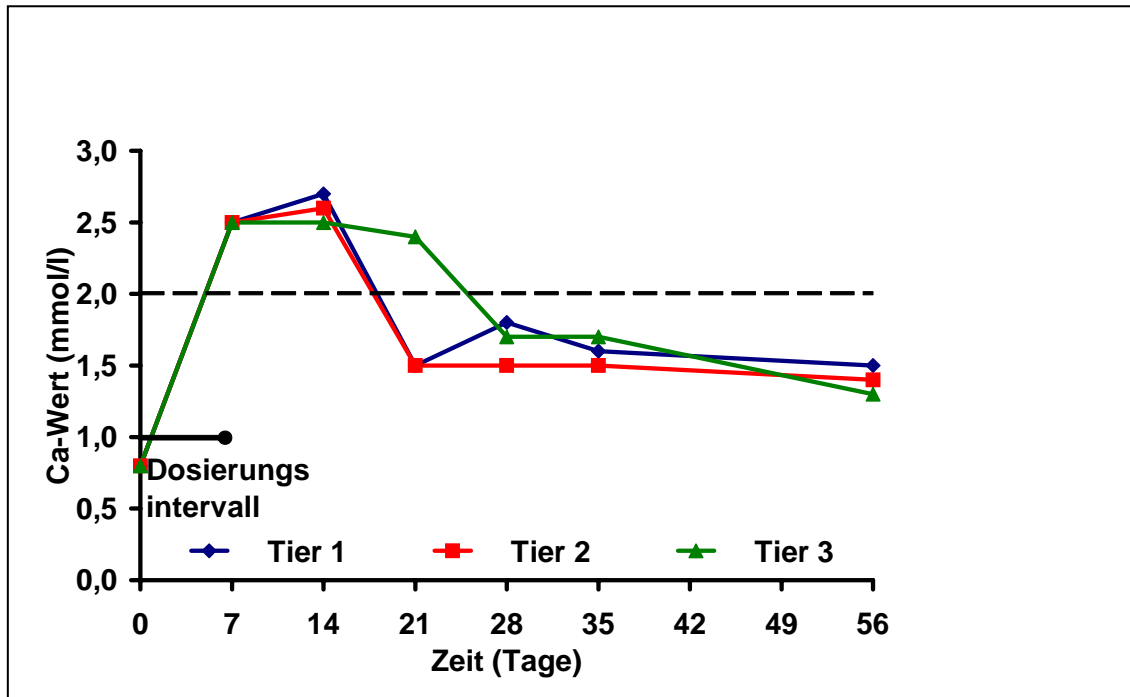


Abbildung 4.9: Verlauf des Serumkalziumspiegels in mmol/l nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation mit Immunsuppression (Gruppe M4; Tab. 4.1). Die Nebenschilddrüsen wurden in den Glutaeusmuskel transplantiert. Das Zeitintervall der Immunsuppression wurde verändert: Die hypokalzämischen Lewis-Tiere erhielten 7 Tage vor Transplantation sowie 7 Tage nach Transplantation Cyclosporin A in der täglichen Dosierung von 10 mg pro kg Körpergewicht.

In der Vergangenheit haben verschiedene Studien gezeigt, dass die postoperative Applikation eines Immunsuppressivums ebenfalls zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit führen kann. In unserer Versuchreihe erhielten zwei Empfängertiere, denen vorab allogene Nebenschilddrüsen unter die linke Nierenkapsel implantiert wurden, 10 mg Cyclosporin pro kg Körpergewicht, beginnend am 6. postoperativen Tag, um eine mögliche Beeinflussung der Transplantatüberlebensdauer zu untersuchen. Beide Tiere zeigten bei der ersten Blutentnahme eine Woche nach Transplantation einen Anstieg des Serumkalziumspiegels auf über 2,0 mmol/l, der sich auch an den folgenden Kontrolltagen 14, 21 und 28 bestätigte (Abb. 4.10). Trotz der verzögert begonnenen Immunsuppression war diese Therapie, von allen in dieser Arbeit getesteten Therapien, die wirkungsvollste.

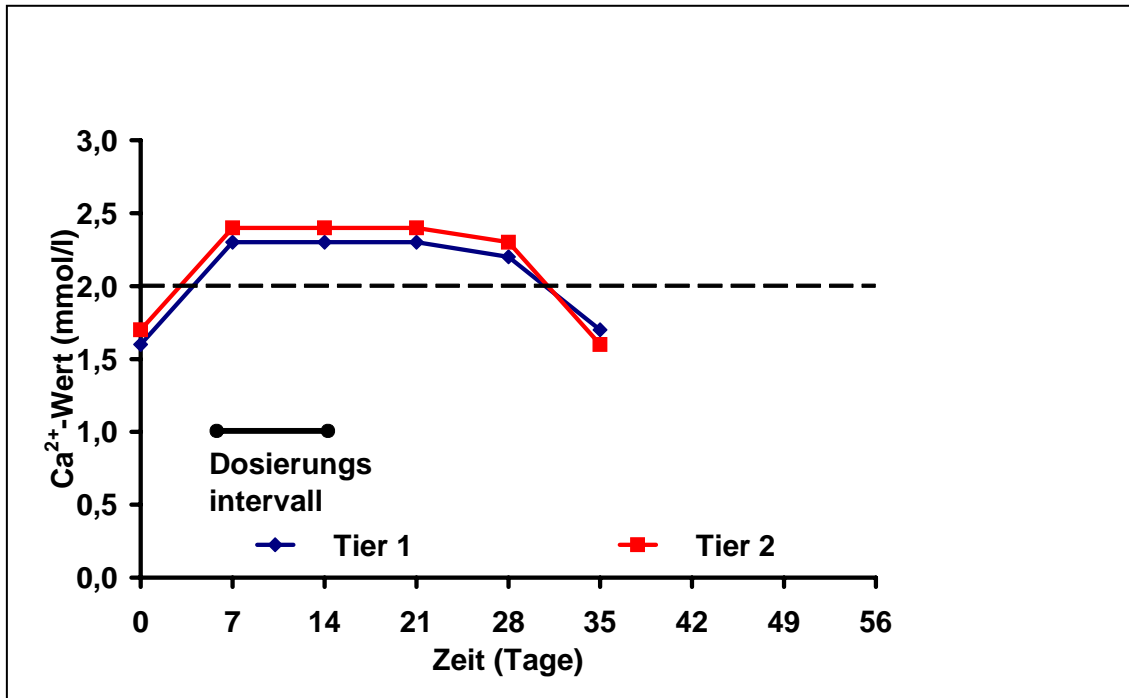


Abbildung 4.10: Verlauf des Serumkalziumspiegels in mmol/l nach allogener Nebenschilddrüsentransplantation mit Immunsuppression (Gruppe NK2; Tab. 4.1). Die Nebenschilddrüsen wurden unter die Nierenkapsel transplantiert. Auch in dieser Gruppe wurde das Zeitintervall der Immunsuppression verändert. Hierzu erhielten die hypokalzämischen Lewis-Tiere 10 mg Cyclosporin A pro kg Körpergewicht für neun Tage, beginnend am sechsten postoperativen Tag. Trotz der kurzen Medikationsdauer und der später begonnenen Immunsuppression kam es erst zwischen vier und fünf Wochen nach Transplantation zur Abstoßung der Transplantate.

Vergleich der Abstoßungszeitpunkte (Mittelwert und Standardabweichung) der behandelten experimentellen Gruppen

In der Übersicht zeigt sich, dass durch die Immunsuppression eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit erreicht wurde. Diese war abhängig von der applizierten Dosis, vom Beginn und der Dauer der Medikation und unabhängig vom Transplantationsort. Dabei wurde die längste Transplantatüberlebenszeit in der Gruppe NK2 erreicht; hier war der Transplantationsort die Nierenkapsel. Die verwendete Dosierung von

Cyclosporin A betrug 10 mg/kg Körpergewicht und wurde vom sechsten postoperativen Tag über neun Tage verabreicht.

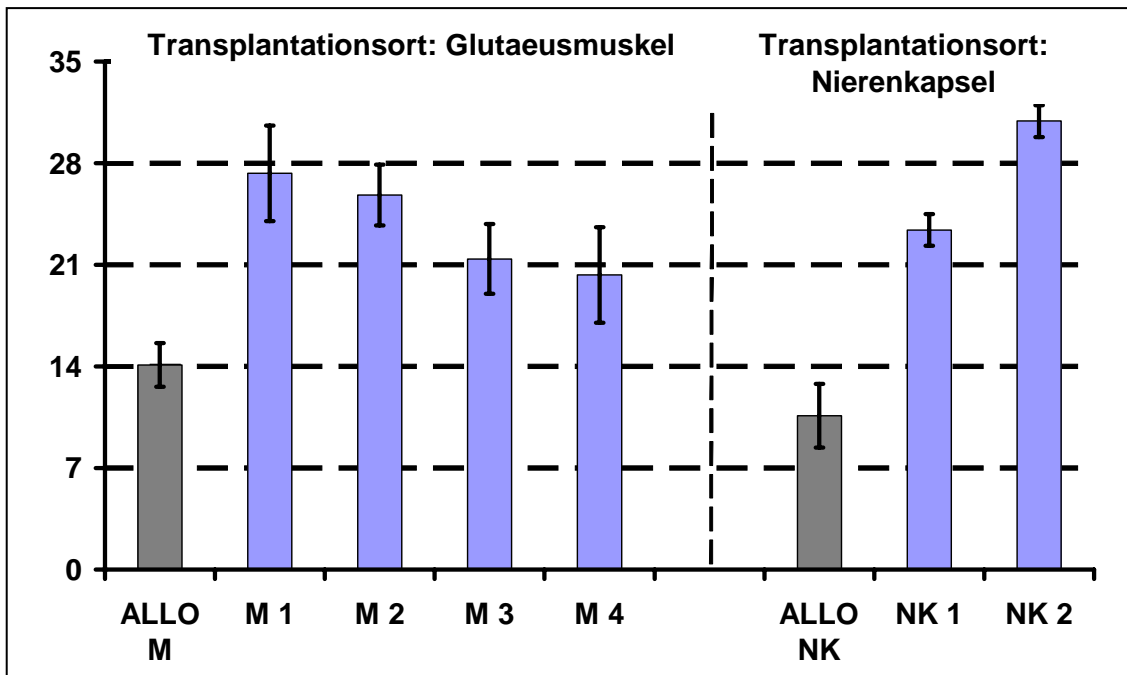


Abbildung 4.11: Übersicht über die Transplantatüberlebenszeiten der einzelnen Gruppen als Mittelwert und Standardabweichung. Die Transplantate der syngenen Kontrollgruppe waren auch nach über 56 Tagen noch funktionsfähig. Eine Übersicht über die immunsuppressive Therapie der einzelnen Gruppen gibt Tab. 4.2. Die Gruppen sind zudem nach dem Transplantationsort bezeichnet: M = Muskel und NK = Nierenkapsel.

Tabelle 4.2: Übersicht über die experimentellen Gruppen in Ergänzung zur Abb. 4.11. KG = Körpergewicht

Gruppe	ALLO M	M1	M2	M3	M4	ALLO NK	NK1	NK2
Applikation (Tage)	∅	0-14	0-14	0-14	-7 - +7	∅	0-14	6-14
Medikation (mg/kg KG)	∅	20	10	5	10	∅	10	10

4.4 Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation: Verkapselung der Transplantate

Eine weitere Möglichkeit, immunkompetentes Fremdgewebe vor einer Abstoßung durch das Empfängerimmunsystem zu schützen, stellt die Verkapselung mit biokompatiblen Alginat dar. Ziel unserer Versuche war es, die Durchführbarkeit dieses Verfahrens auch für Nebenschilddrüsentransplantate zu überprüfen. Hierzu wurden bis zu 20 Alginatkapseln mit einem Durchmesser von etwa 1,5 mm, die mit bis zu sechs zerkleinerten Epithelkörperchen gefüllt waren, in den Glutaeusmuskel der hypokalzämischen Lewis-Tiere transplantiert und sie dort für 56 Tage belassen. Eine Transplantation von Alginatkapseln unter die Nierenkapsel war aufgrund ihrer Größe nicht realisierbar. Diese kleine, nicht-repräsentative Versuchsserie zeigte, dass die Transplantate selbst nicht infiltriert worden waren (Daten nicht gezeigt). Andererseits konnte bei keinem Tiere ein Anstieg des Serumkalziumspiegels nachgewiesen werden, weshalb wir das Zerkleinern der Nebenschilddrüsen vor ihrer Transplantation als Ursache für diese Nichtfunktion sahen.

4.5 Immunhistochemische Analysen

Die Darstellung der immunhistologischen Analysen wird auf wesentliche Ergebnisse konzentriert.

4.5.1 Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation ohne Immunsuppression

Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 gezeigt, wurden allogene Nebenschilddrüsentransplantate nach 14 ± 2 Tagen (Glutaeusmuskel) bzw. nach 8-13 Tagen (Nierenkapsel) abgestoßen, wenn keine Immunsuppression verabreicht wurde. In den nachfolgenden immunhistologischen Analysen der allogenen Kontrollgruppe K-Allo (Tab. 4.1) wurden die postoperativen Tage 5, 10 und 15 näher für den Transplantationsort Glutaeusmuskel betrachtet. Für die unter der

Nierenkapsel befindlichen Transplantate wird der 9. postoperative Tag repräsentativ für die bereits ablaufenden Abstoßungsvorgänge präsentiert.

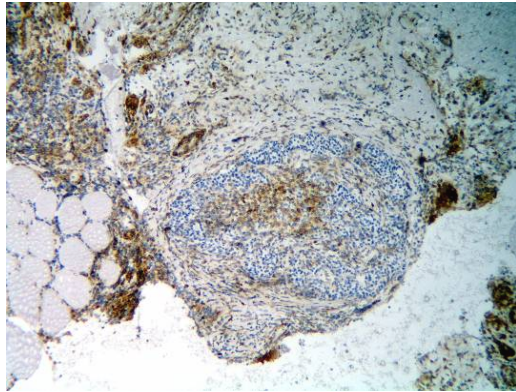
Transplantationsort: Glutaeusmuskel

5. postoperativer Tag (Abbildung 4.12): Die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper Ox 6, der gegen MHC-Klasse II-Moleküle gerichtet ist, zeigte innerhalb des Epithelkörperchens eine homogene, deutlich abgrenzbare Anfärbung von Zellen. Da nicht-transplantierte Epithelkörperchen kaum Ox6-positive Zellen aufwiesen (Daten nicht gezeigt), wurde dies als Infiltration mit immunkompetenten Zellen des Empfängers, wie B-Lymphozyten oder Makrophagen, interpretiert.

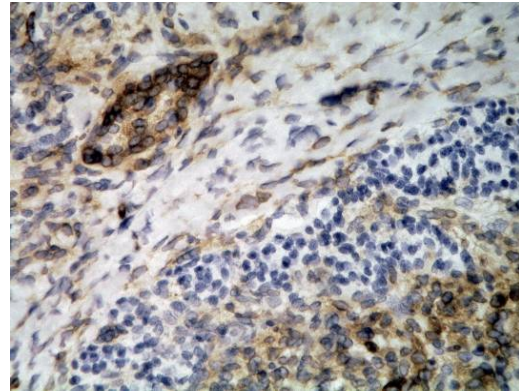
MHC-Klasse-I-positive Zellen befanden sich diffus verteilt innerhalb der Nebenschilddrüse sowie in unmittelbarer Umgebung. Dabei konnte nicht zwischen der MHC-Klasse-I-Expression auf Parenchymzellen (nicht gezeigt) und immunkompetenten Empfängerzellen unterschieden werden.

In der mit dem Antikörper Ox 42 durchgeführten Färbung erkannte man ein deutliches Infiltrat innerhalb der Nebenschilddrüse. Ebenfalls kam es zur Anfärbung einzelner Zellen in der Umgebung des Transplantates. Dies wurde als ein Einwandern von Makrophagen interpretiert.

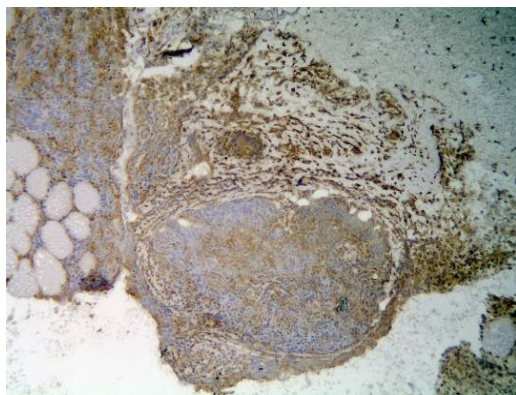
Die immunhistologischen Analysen belegen somit eine rasche Infiltration der allogenen Nebenschilddrüsentransplantate innerhalb der ersten 5 Tage nach Transplantation. Diese frühe Infiltration, die von MHC-Klasse-II-positiven Zellen (= Ox42-positive Makrophagen?) dominiert wurde, beeinflusste nicht die Sezernierung von Parathormon, da zu diesem frühen Zeitpunkt keine Auffälligkeiten beim Serumkalzium festzustellen waren (s. auch Abb. 4.3).



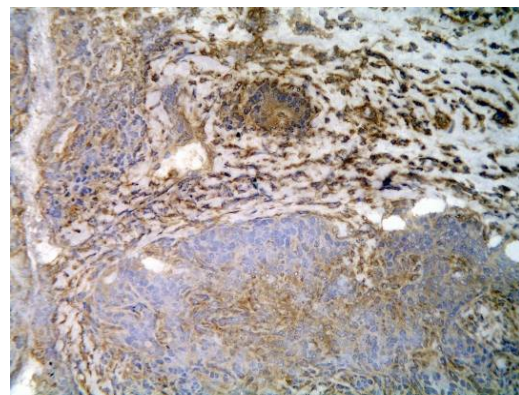
A) Ox6 (MHC-II)-positive Zellen, x100.



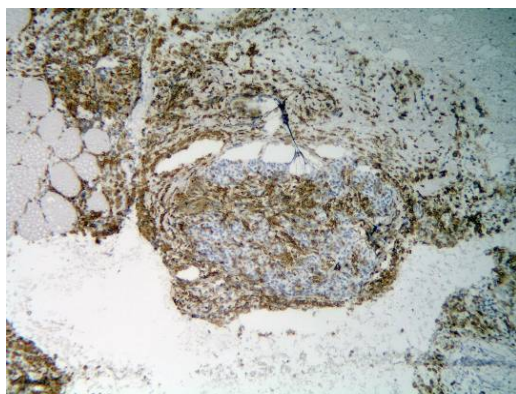
B) Ox6 (MHC-II)-positive Zellen, x 400.



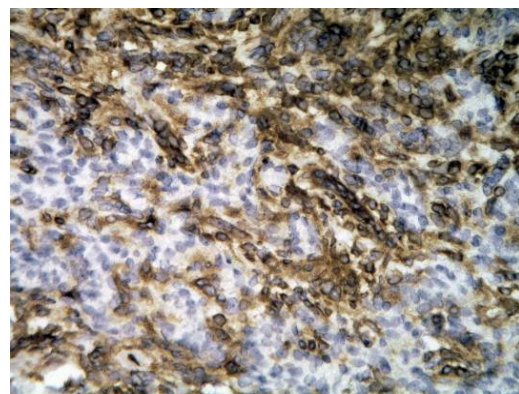
C) Ox18 (MHC-I)- positive Zellen, x100.



D) Ox18 (MHC-I)- positive Zellen, x200.



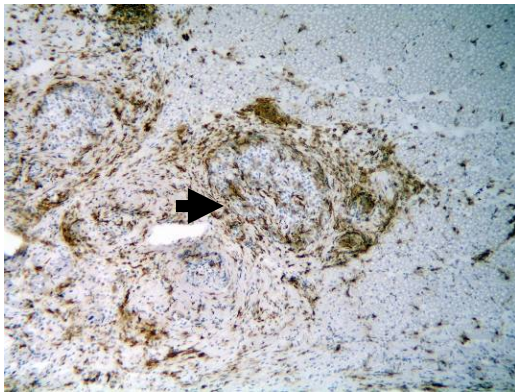
E) Ox42-positive Zellen (Makrophagen), x100.



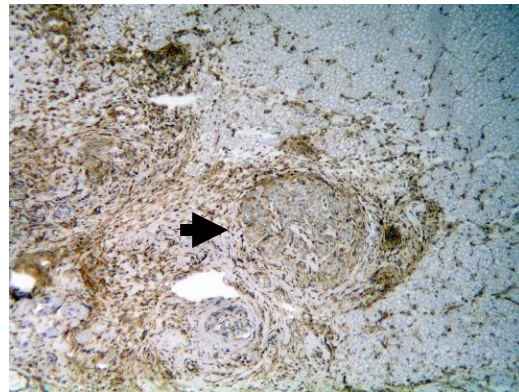
F) Ox42-positive Zellen (Makrophagen), x400.

Abbildung 4.12: Immunhistologische Analysen allogener Nebenschilddrüsentransplantate im Glutaeusmuskel der Kontrollgruppe K-Allo (Tab. 4.1) am 5. postoperativen Tag.

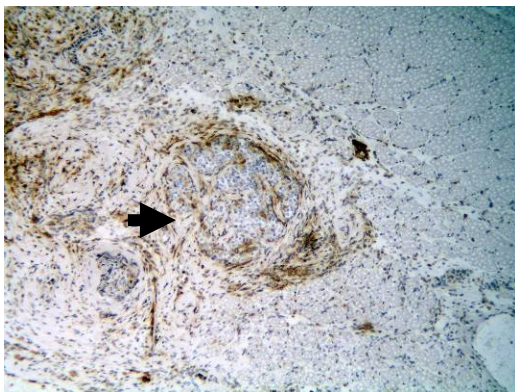
10. postoperativer Tag: Zu diesem Zeitpunkt waren nur noch vereinzelt Ox6-positive Zellen im Randbereich nachweisbar. Im Gegensatz zum Tag 5 (Abbildung 4.12) war die zentrale Region im Transplantat frei von Ox 6-positiven Zellen. Auch der Anteil Ox18- und Ox42-positiver Zellen ließ deutlich nach (Abbildung 4.13).



A) Ox6-positive Zellen, x100.



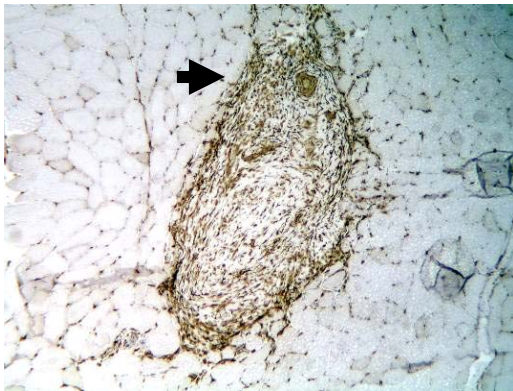
B) Ox18-positive Zellen, x100.



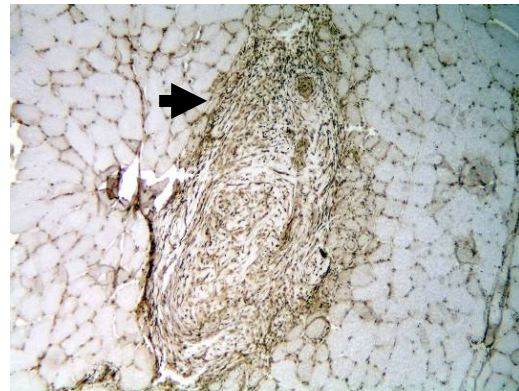
C) Ox42-positive Zellen, x100.

Abbildung 4.13: Immunhistologische Analyse allogener Nebenschilddrüsentransplantate (Pfeil) im Glutaeusmuskel der Kontrollgruppe K-Allo (Tab. 4.1) am 10. postoperativen Tag. Der Pfeil zeigt auf das Epithelkörperchen.

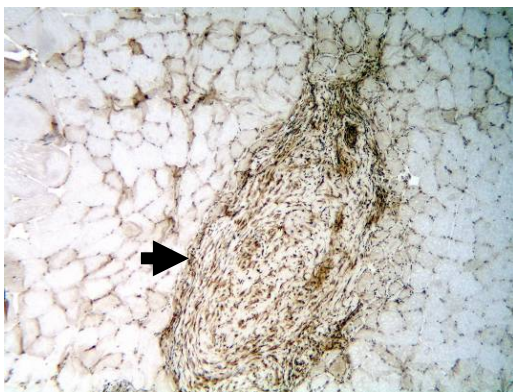
15. postoperativer Tag: Unmittelbar nach Abfall des Kalziumwertes auf unter 2,0 mmol/l war eine klare zelluläre Binnenstruktur im Epithelkörperchen nicht mehr zu erkennen (Abbildung 4.14).



A) Ox6-positive Zellen, x100.



B) Ox18-positive Zellen, x100.

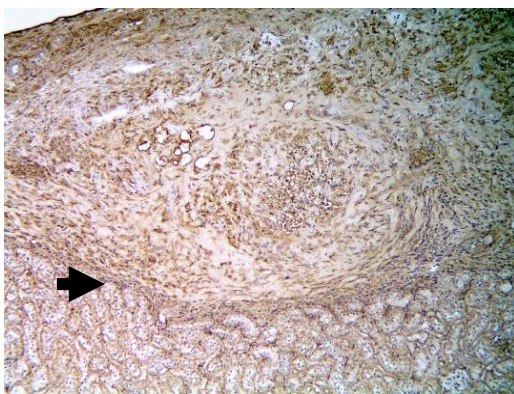


C) Ox42-positive Zellen, x 100.

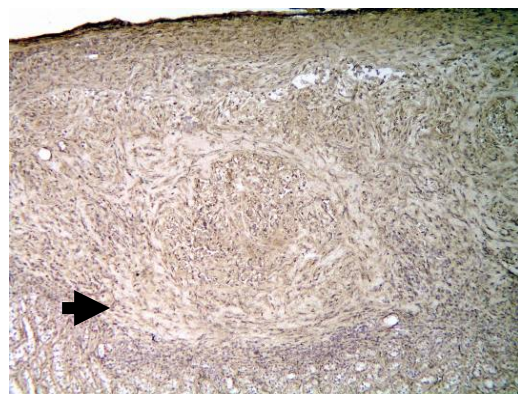
Abbildung 4.14: Immunhistologische Analyse allogener Nebenschilddrüsentransplantate (Pfeil) im Glutaeusmuskel der Kontrollgruppe K-Allo (Tab. 4.1) am 15. postoperativen Tag. Der Pfeil zeigt auf das Epithelkörperchen.

Transplantationsort: Nierenkapsel

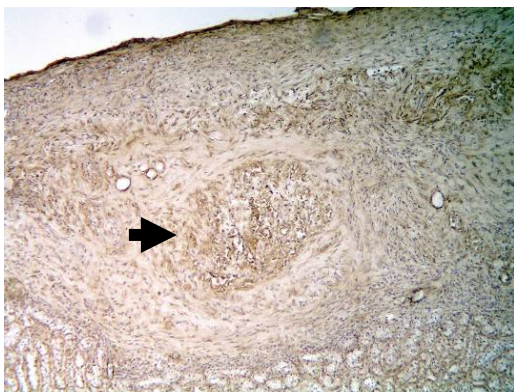
Nierenschilddrüsentransplantate unter der Nierenkapsel waren bereits am Tag 9 nach Transplantation abgestoßen (gesunkener Kalziumspiegel). Zu diesem Zeitpunkt waren keine klaren Strukturen in der Morphologie der Nebenschilddrüse mehr zu erkennen (Abbildung 4.15).



A) Ox6-positive Zellen, x 100.



B) Ox18-positive Zellen, x100.



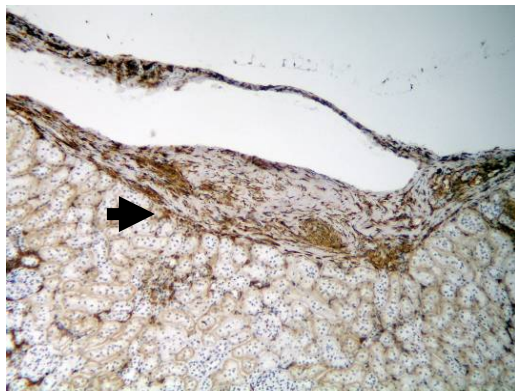
C) Ox42-positive Zellen, x100.

Abbildung 4.15: Immunhistologische Analyse allogener Nebenschilddrüsentransplantate (Pfeil) unter der Nierenkapsel der Kontrollgruppe K-Allo (Tab. 4.1) am 9. postoperativen Tag. Der Pfeil zeigt auf das Epithelkörperchen.

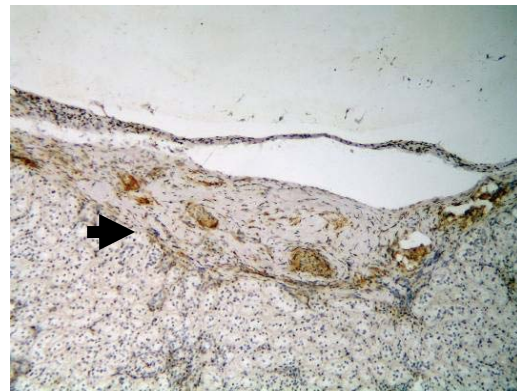
4.5.2 Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation mit Immunsuppression

Allogene Gruppe NK2, Nierenkapsel, 10 mg/kg Cyclosporin ab Tag 6

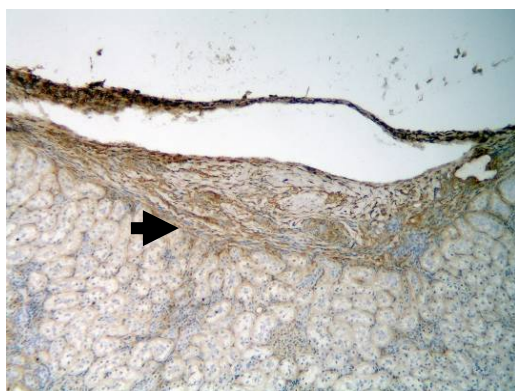
28. postoperativer Tag: Die Struktur der transplantierten Epithelkörperchen war auch vier Wochen nach der Transplantation noch deutlich von der Umgebung abzugrenzen. Dies ist auf die neuntägige immunsuppressive Therapie zurückzuführen. MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-positive Zellen befanden sich vornehmlich in identischen Bereichen des Epithelkörperchens, wohingegen die Ox42-positiven Zellen diffus verteilt waren (Abbildung 4.16).



A) Ox6-positive Zellen, x100.



B) Ox18-positive Zellen, x100.

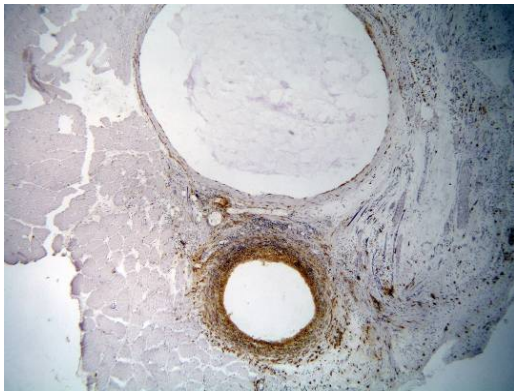


C) Ox42-positive Zellen, x100.

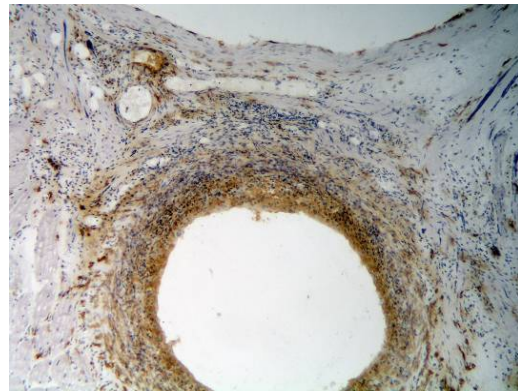
Abbildung 4.16: Immunhistologische Analyse allogener Nebenschilddrüsentransplantate unter der Nierenkapsel der Gruppe NK2. Der Pfeil zeigt auf das Epithelkörperchen

4.5.3 Die allogene Nebenschilddrüsentransplantation: Verkapselung der Transplantate

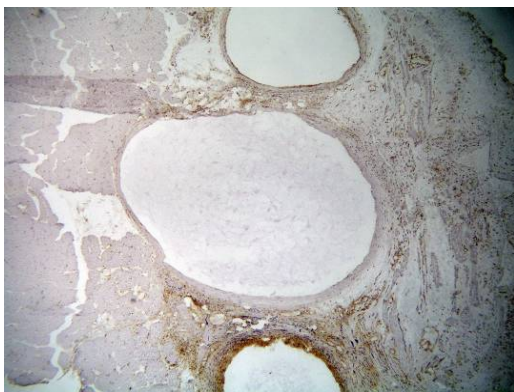
70. postoperativer Tag: Der Außenbereich der angeschnittenen Alginatkapseln war von einem massiven Infiltrat aus Ox6-positiven Zellen umgeben, während leere Alginat-Kapseln keinen Infiltrationssaum aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig waren ebenfalls eine hohe Anzahl Ox18-positiver Zellen sowie Ox42-positiver Makrophagen vorhanden. Diese Zellen umgaben die Kapsel saumartig (Abbildung 4.17). Die Bilder deuten darauf hin, dass sich die Infiltration der Nebenschilddrüsentransplantate effektiv durch Verkapselung verhindern lässt.



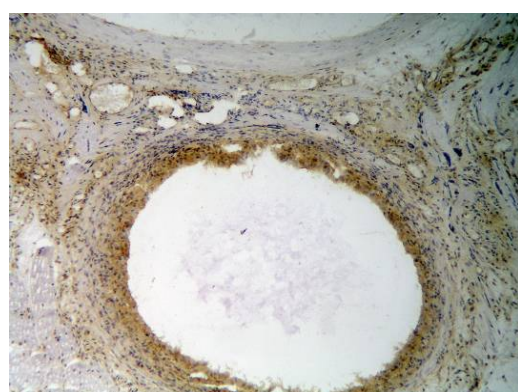
A) Ox6-positive Zellen, x40.



B) Ox6-positive Zellen, x100.

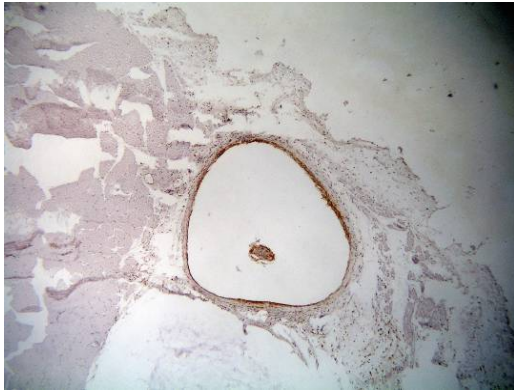


C) Ox18-positive Zellen, x40.

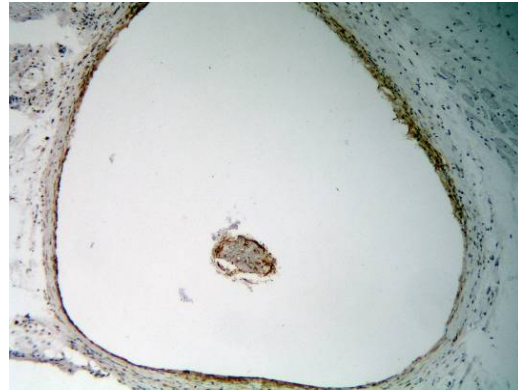


D) Ox18-positive Zellen, x100.

Abbildung 4.17: Bildlegende auf der nächsten Seite



E) Ox42-positive Zellen, x40.



F) Ox42-positive Zellen, x100.

Abbildung 4.17: Immunhistologische Analyse verkapselter Nebenschilddrüsentransplantate am 70. postoperativen Tag. Die Epithelkörperchen sind in der Färbung nicht zu erkennen, da sie durch den Gefrierschnitt aus der Kapsel herausgelöst wurden. In den Abbildungen E und F sind innerhalb der Kapseln Schnittartefakte zu erkennen.

5 Beantwortung der Fragen

1. **Nebenschilddrüsen regeln den Kalziumspiegel über die Ausschüttung von Parathormon. Sind hierzu auch Nebenschilddrüsentransplantate in heterotoper Position in der Lage?**

Der physiologische Kalziumspiegel bei Ratten liegt bei einem Median von 2,4 zwischen 2,0 und 2,7 mmol/l. Die Explantation der Nebenschilddrüsen führt innerhalb einer Woche zu einem dauerhaften Abfall des Serumkalziums auf 1,8 mmol/l oder darunter. Unmittelbar nach Transplantation nehmen sowohl syngen als auch allogene transplantierte Nebenschilddrüsen ihre Funktion auf, was sich in einem Anstieg des Kalziumwertes auf über 2,0 mmol/l widerspiegelt. Während bei syngen transplantierten Tieren dieser Wert auch 56 Tage nach Operation noch im physiologischen Bereich lag, kam es in den allogenen unbehandelten Gruppen spätestens 14 Tage nach Transplantation zu einem erneuten und dauerhaften Abfall des Kalziumspiegels. Die Ursache hierfür ist die Abstoßung der allogenen Transplantate.

2. **Cyclosporin schützt vaskularisierte Organe vor der Abstoßung. Ist es ebenfalls möglich, mit diesem Immunsuppressivum nicht-vaskularisierte Nebenschilddrüsentransplantate vor der Abstoßung zu schützen?**

Der Einsatz von Cyclosporin schützt die nicht-vaskularisierten Epithelkörperchen vor der Abstoßung. Bei allen in dieser Arbeit ausgetesteten Dosierungen kam es unter Therapie zu keiner Transplantatabstoßung. Jedoch waren Abstoßungszeichen (Abfall des Kalziumspiegels) nach Absetzen der Immunsuppression innerhalb von 6 bis 20 Tagen in Abhängigkeit der immunsuppressiven Therapie zu beobachten.

-
- 3. In dieser Arbeit wurden Nebenschilddrüsen in den Glutaeusmuskel und unter die Nierenkapsel transplantiert. Beeinflusst die Auswahl dieser Transplantationsorte die Transplantatfunktion und ist in Bezug auf den Transplantationsort ein Unterschied in der protektiven Wirkung von Cyclosporin festzustellen?**

Die Funktion allogener Nebenschilddrüsentransplantate ohne Immunsuppression betrug im Glutaeusmuskel durchschnittlich $14,1 \pm 1,5$ Tage und unter der Nierenkapsel $10,6 \pm 2,2$ Tage. Eine Cyclosporin-Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht über 15 Tage verabreicht, verlängerte die Funktion allogener Transplantate im Muskel auf durchschnittlich $25,8 \pm 2,1$ Tage und unter der Nierenkapsel auf $23,4 \pm 1,1$ Tage.

- 4. Zusätzlich zur Variation des Transplantationsortes wurden auch verschiedene immunsuppressive Therapieschemata ausgetestet. Welche Kombination aus Transplantationsort und immunsuppressiver Dosierung verlängert dabei die Transplantatüberlebenszeit am effektivsten?**

Der in dieser Arbeit erfolgreichste Therapieansatz bestand aus einer Cyclosporin-Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht, verabreicht vom 6. bis zum 14. postoperativen Tag nach Transplantation. Dies führte im Mittel zu einer Verlängerung der Transplantatfunktionszeit auf $30,9 \pm 1,1$ Tage, während die allogenen Transplantate der nichtbehandelten Kontrollgruppe K-Allo bereits nach durchschnittlich $10,6 \pm 2,2$ Tagen keine Funktion mehr aufwiesen.

6 Diskussion

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurde die Frage untersucht, ob eine kurzfristige immunsuppressive Behandlung der Empfänger mit Cyclosporin A die Abstoßung von Nebenschilddrüsentransplantaten im Rattenmodell langfristig verhindert.

6.1 Klinischer Hypoparathyreoidismus: Krankheitsbild und Therapieoptionen

Das Krankheitsbild des permanenten Hypoparathyreoidismus wird oftmals iatrogen verursacht (Thomusch O et al., 2002). Nach Zahlen des statistischen Bundesamtes werden in Deutschland pro Jahr circa 100.000 Schilddrüsenresektionen und ca. 1000 Thyreoidektomien durchgeführt. Bei einer Inzidenz von 1-5% ist davon auszugehen, dass es hierzulande in über 1000 Fällen zu einer manifesten, behandlungsbedürftigen Nebenschilddrüsenunterfunktion kommt. Die aktuelle Therapie besteht in der hochdosierten Gabe von Kalzium, doch werden die physiologischen Verhältnisse nicht adäquat erreicht. Dies bedeutet, dass beim Hypoparathyreoidismus die fehlende Nebenschilddrüsenfunktion dauerhaft nur schwer zu ersetzen ist.

Eine sinnvolle Alternative wäre ein kausaler Therapieansatz, der den natürlichen hormonellen Regelkreis berücksichtigt. Die heterotope Transplantation autologer Nebenschilddrüsen wird, wo möglich, mit großem Erfolg angewandt (Lutz L und Sundler F, 1998). In der Regel sind jedoch autologe Transplantationen, wie bereits in der Einleitung erläutert, nicht immer zu realisieren. In solchen Fällen wäre die allogene Nebenschilddrüsentransplantation eine Alternative, doch sind hierfür Immunsuppressiva zur Verhinderung der Abstoßung notwendig (s. auch Abschnitt 1.2 der Einleitung). Der durch eine lebenslange Immunsuppression zu erwartende Nutzen einer physiologischen Parathormonausschüttung steht jedoch in keinem Verhältnis zur Belastung der Patienten mit Immunsuppressiva, weshalb die Suche nach Alternativen, um die allogene

Nebenschilddrüsentransplantation als klinische Therapieoption etablieren zu können, von allergrößter Relevanz ist.

Um dieses Ziel zu erreichen, wird ein wesentlicher Ansatz sein, die Immunogenität der Nebenschilddrüsentransplantate zu reduzieren. Diese Auffassung basiert auf Beobachtungen von Lafferty, wonach die in Schilddrüsentransplantaten befindlichen Leukozyten für die Transplantat-Immunogenität verantwortlich sind (Lafferty KJ et al., 1975). Diese organständigen Leukozyten werden auch als „passenger leukocytes“ bezeichnet, da sie mit dem Organtransplantat in den fremden Organismus übertragen werden. Die Ergebnisse der Gruppe um Lafferty zeigen, dass diese „passenger leukocytes“ selektiv entfernt werden können. Neben der von den Autoren vorgeschlagenen *in vitro* Kultivierung sind im Laufe der Zeit weitere Verfahren hinzugekommen, die insbesondere an Nebenschilddrüsentransplantaten erprobt wurden. Hierzu gehört neben der selektiven Depletion der „passenger leukocytes“, z.B. mit Hilfe monoklonaler Antikörper oder durch Kryokonservierung, die temporäre Passage dieser „kleinen Organe“ in immuninkompetenten Tieren wie der Nacktmaus (Sollinger HW et al., 1983; Wozniwicz B et al., 1996; Saxe AW et al., 1990; Timm S et al., 2001). Weitere Protokolle, die Toleranz gegenüber dem Transplantat induzieren, beinhalteten den Einsatz von Spenderantigenen in Verbindung mit einer kurzfristigen perioperativen Immunsuppression (z.B. Oluwole SF et al., 2004).

Ebenso stellt die Verkapselung des Spendergewebes mit biokompatiblen Materialien, z.B. mit Alginaten, einen hochattraktiven Ansatz dar. Hierdurch wird zum einen die Erkennung des Fremdgewebes durch das Empfängerimmunsystem erschwert, zum anderen werden zytotoxische Zellen, wie CD8+ T-Lymphozyten, NK-Zellen aber auch Makrophagen, gehindert, mit dem Fremdgewebe in Kontakt zu kommen (Hasse C et al., 1994; Picariello L et al., 2001; Orive G et al., 2003). Die Effektivität der Verkapselung wird ebenfalls durch die Tatsache unterstützt, dass sie die einzige Methode ist, die sich bisher langfristig erfolgreich im experimentellen Bereich durchsetzen konnte; sie wird momentan auch für eine klinische Anwendung favorisiert (Otto C et al., 2005).

6.2 Charakteristika des experimentell induzierten Hypoparathyreoidismus im Rattenmodell

Die wichtigste hormonelle Funktion der Nebenschilddrüsen liegt in der Bildung von Parathormon, das für die Bereitstellung von Kalzium aus Knochen und der Nahrung verantwortlich ist (siehe hierzu auch die Einleitung). Eine Minderfunktion der Epithelkörperchen oder ihre operative Entfernung führt somit zu einem Abfall des Serumkalziumspiegels (Hypokalzämie).

Auch in der Ratte führt die operative Entfernung der beiden Epithelkörperchen zu einer dauerhaften Hypokalzämie, die sich durch die Transplantation syngener (Abb. 4.2) bzw. allogener (Abb. 4.10) Nebenschilddrüsentransplantate erfolgreich therapieren lässt. Nach allogener Transplantation kommt es jedoch, wie in dieser Arbeit gezeigt, 8 bis 14 Tage nach Transplantation zu einem dauerhaften Abfall des Kalziumspiegels (Abb. 4.3). Dieser ist darauf zurückzuführen, dass die Epithelkörperchen durch das Empfängerimmunsystem vollständig zerstört werden, wie die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigen (Abb. 4.14). Ein wesentliches histologisches Zeichen der Abstoßung ist die massive Infiltration der Transplantate u.a. mit Ox6-positiven immunkompetenten Zellen. Wie bereits Untersuchungen einer weiterführenden Doktorarbeit aus dieser Gruppe zeigen, dominieren in diesem Infiltrat in erster Linie Makrophagen (Michael Ulbrich, Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg, in Fertigstellung). Es scheint sich immer mehr herauszustellen, dass Makrophagen bei der Abstoßung nicht-vaskularisierter Transplantate eine größere Bedeutung sowohl bei Zellzerstörung als auch bei der Aktivierung von T-Lymphozyten zukommt, als bei vaskularisierten Organen.

Eine Immunantwort gegen allogene Transplantate wird ausgelöst, wenn die Zellen des Immunsystems diese als fremd erkennen, wobei den T-Lymphozyten hierbei eine besondere Bedeutung zukommt. Für ihre Aktivierung sind zwei unterschiedliche Wege bekannt: Auf dem direkten Weg der Alloantigenerkennung erkennen CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten des Empfänger-Immunsystems

die MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Zelloberfläche von Spenderleukozyten oder „passenger leukocytes“. Dabei sind in erster Linie die antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen aus dem Spenderorgan von Bedeutung, da sie die zur Aktivierung von T-Lymphozyten notwendigen kostimulatorischen Moleküle exprimieren (Kreisel D et al., 2002; Wood KJ, 2003).

Trotz intensiver Untersuchungen ist bisher nicht vollständig geklärt, ob die Abstoßung von Epithelkörperchen-Transplantaten über den indirekten Weg der Alloantigenerkennung, als den zweiten wichtigen Weg (neben dem indirekten Weg; siehe oben) der T-Zellaktivierung, erfolgt. Nach Daten unserer Gruppe ist nämlich der Anteil an „passenger leukocytes“ in diesen Organen zu gering, um eine so heftige Abstoßung auszulösen (Timm S et al., 2001). Im Gegensatz dazu konnten Bloom et al. zeigen, dass Epithelkörperchen, deren „passenger leukocytes“ depletiert wurden, eine deutlich verlängerte Transplantatfunktion aufwiesen als unbehandelte Epithelkörperchen (Bloom AD, 1986; Bloom AD, 1987).

Unsere Gruppe favorisiert die Auffassung, dass das Ausmaß der MHC-Expression auf den Parenchymzellen die Stärke der Abstoßungsreaktion maßgeblich bestimmt (Timm S et al., 2001). Diese MHC-Moleküle werden wohl in erster Linie über die indirekte Alloantigenerkennung präsentiert (Rogers NJ, 2001). Hierzu nehmen antigenpräsentierende Zellen des Empfängers von der Zelloberfläche „abgeschilferte“ oder von abgestorbenen Zellen freigesetzte allogene Proteine über Endozytose auf und prozessieren diese. Anschließend werden sie als Fragmente über Selbst-MHC-Klasse II-Moleküle den eigenen CD4⁺ T-Lymphozyten präsentiert (Benichou G et al., 1992; Auchincloss H und Sultan H, 1996; Murphy B et al., 1996). Die über diesen Weg aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten steuern ihrerseits weitere Effektorzellen, die aktiv das allogene Organ zerstören.

6.3 Kriterien für die Auswahl der Implantationsorte bei der Ratte

Mögliche Implantationsorte für Nebenschilddrüsen sollen für den Operateur gut zugänglich sein, um eine einfache und schnelle Transplantation mit kurzer Narkosedauer und geringer Belastung des Empfängers zu ermöglichen. Die Auswahl des Transplantationsortes ist selbstverständlich auch klinisch relevant. Insbesondere bei der tierexperimentellen Nebenschilddrüsentransplantation sind Verletzungsfolgen durch Knabbern und Kratzen an der Operationsnarbe zu vermeiden. Außerdem ist es wichtig, bei der Auswahl des Transplantationsortes darauf zu achten, dass dieser die Nährstoffversorgung der Transplantate sicherstellt, d.h. er sollte gut durchblutet sein. Auch sollten sich die Präparate zum Zeitpunkt der Explantation gut auffinden lassen. Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile der ausgewählten Implantationsorte bei der Ratte gegenübergestellt.

6.3.1 Glutaeusmuskel

Hierbei handelt es sich um ein exponiert gelegenes Organ, das sich unmittelbar unterhalb der kaudalen Rückenhaut lateral der Wirbelsäule befindet. Die Kutis ist sehr dick und verheilt schnell. Zur Eröffnung ist lediglich ein 2 cm langer Schnitt nötig, der postoperativ mit 3 Nähten verschlossen wird. Da sich die Wunde auf dem Rücken des Tieres befindet, ist eine Beeinflussung der Wundheilung durch Nagen oder Kratzen nicht zu erwarten. Eine Beeinträchtigung der Transplantate durch die starke mechanische Beanspruchung im Muskelgewebe wurde nicht beobachtet. Von wesentlichem Nachteil ist jedoch, dass die Epithelkörperchen an diesem Transplantationsort nicht leicht wieder aufzufinden sind, da sie mit dem Muskelgewebe verwachsen. Aufgrund der Narbenbildung im Muskel ist auch eine genaue makroskopische Lokalisation nicht möglich. Andererseits sichern diese Verwachsungen, dass sich kryokonservierte Epithelkörperchen beim Schneiden mit dem Kryostaten nicht aus dem Strukturverband lösen. Die Verwendung von nicht resorbierbarem Nahtmaterial, mit der die

Muskeltasche, in der sich die Epithelkörperchen befinden, verschlossen wird, kann als „Landmarke“ genutzt werden.

6.3.2 Nierenkapsel

Die Nierenkapsel umgibt als feines „Häutchen“ die Niere, die sich dorsal im Bauchraum des Tieres befindet. Bei der Implantation ist die linke Niere des Empfängertieres zu bevorzugen, da der Zugang aufgrund der anatomischen Gegebenheiten einfacher ist, und das Organ besser mobilisiert werden kann. Die Epithelkörperchen werden zwischen Kapsel und Nierenparenchym mit einer Kunststoffkanüle eingebracht. Vorteilhaft hierbei ist, dass die Niere gut geschützt und von äußeren Einflüssen weitestgehend unbeeinträchtigt ist. Da es sich um ein gut durchblutetes Organ handelt, ist die ausreichende Nährstoffversorgung der Transplantate gesichert. Das Auffinden der Epithelkörperchen ist im Gegensatz zum Glutaeusmuskel hier unproblematisch, da sie als weiße, erhabene Bereiche auf dem roten Nierengewebe imponieren und somit auch makroskopisch sofort wieder erkannt werden (siehe auch Abb. 3.9).

Verglichen mit dem Muskelgewebe ist jedoch der Aufwand bei diesem Transplantationsort deutlich größer: Das Abdomen der Ratte muss mit einem 10 cm langen medianen Bauchschnitt eröffnet werden, und die Wunde ist nach Beendigung der Operation sorgfältig zu verschließen und abzudecken. Durch die Eröffnung der Nierenkapsel mit einer scharfen Kanüle kann es zu Verletzungen des Nierenparenchyms mit Blutungen kommen. Während die Epithelkörperchen in den Muskel hineinwachsen, liegen sie der Niere auf, ohne mit ihr zu verwachsen. Dies kann bei der Anfertigung von Gefrierschnitten zu Problemen führen, da sich die Epithelkörperchen vom Nierengewebe ablösen. Dies ist ein wesentlicher Nachteil dieser Methode.

6.4 Nebenschilddrüsentransplantation und Immunsuppression

Um den durch die Abstoßung verursachten Funktionsausfall nach einer allogenen Organtransplantation zu verhindern, ist es notwendig, das Immunsystem des Transplantat-Empfängers dauerhaft zu supprimieren. Hierzu sind so genannte Immunsuppressiva notwendig.

Die Entdeckung der immunsuppressiven Wirkung von 6-Mercaptopurin im Jahre 1959 gilt als Beginn der immunsuppressiven Ära in der Transplantation (Schwartz R, und Dameshek W, 1959 und 1960). Ein Meilenstein der medikamentösen Immunsuppression ist zweifelsohne die Entdeckung von Cyclosporin A, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Seine Einführung in die Klinik führte zu einer Steigerung der Ein-Jahres-Überlebensrate auf mehr als 78 Prozent nach Nierentransplantation. Bei Cyclosporin A handelt sich um ein aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* Gams isoliertes Peptid, das als Calcineurininhibitor durch selektive Bindung an Cyclophiline den Calcineurin-Calmodulin-Komplex hemmt und so die Transkription von Interleukin-2 unterdrückt (Clipstone NA und Crabtree GR, 1992; O`Keefe SJ et al., 1992; Li W, 1993). Da T-Lymphozyten bei fehlendem IL-2 nicht aktiviert werden und solche, die bereits aktiviert sind, nicht mehr proliferieren können, sollte dies einen wesentlichen Teil des Immunsystems selektiv hemmen.

Die Abbildung 6.1 verdeutlicht die Wirkungsweise von Cyclosporin auf zellulärer Ebene. Jedoch birgt der Einsatz immunsuppressiver Medikamente nicht zu vernachlässigende Risiken: Eine „Über-Immunsuppression“, vor allem kurz nach der Transplantation, kann zu vermehrten bakteriellen, viralen und fungalen Infekten mit gelegentlich fulminantem Verlauf führen. Eine langfristige Immunsuppression birgt die Gefahr lymphoproliferativer Erkrankungen (Stiller CR, 1996). Auch die dosisabhängige toxische Wirkung dieser Medikamente stellt ein Problem dar: Für Cyclosporin sind als häufigste Nebenwirkungen Nierenschädigungen, arterielle Hypertonie, Beeinträchtigung des Nervensystems und gastrointestinale Beschwerden beschrieben (Miller LW et al., 1996). Während für die „Vollorgane“ eine dauerhafte Immunsuppression unerlässlich ist, liegen

für solche „kleinen“ Organtransplantate, wie den Epithelkörperchen, keinerlei Daten über den Einsatz einer zeitlich begrenzten Immunsuppression vor. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten deshalb die Wirksamkeit einer solchen Therapiestrategie untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die kurzfristige immunsuppressive Behandlung mit Cyclosporin die Transplantatüberlebenszeit im Vergleich zur unbehandelten Gruppe deutlich verlängerte. Ohne Immunsuppression kam es nach spätestens 16 Tagen zur Transplantatabstoßung. Die Medikation mit Cyclosporin führte im günstigsten Falle zu einer Funktionsdauer von 28 Tagen. Diese Verlängerung wurde erreicht, wenn mit der Therapie erst am sechsten postoperativen Tag begonnen wurde. Unter diesen Bedingungen konnte die medikamentöse Belastung minimiert werden (Abb. 4.11).

Diese Beobachtung unterstützt die aktuelle Meinung, dass für einen effektiven Transplantatschutz eine intensive Auseinandersetzung zwischen Immunsystem und Transplantat stattfinden muss. Diese Erkenntnis bildet die Grundlage der von Sir R. Calne formulierten WOFIE-Hypothese (= window of opportunity for immunological engagement) (Calne R, 1996; Dresske B et al., 2003). Die Gültigkeit dieser Hypothese, nämlich die Interaktion zwischen immunkompetenten Zellen des Transplantates und des Empfängers für einen bestimmten Zeitraum kontrolliert zuzulassen, scheinen die Ergebnisse der Gruppe NK2 (vergl. Abb. 4.11) zu bestätigen. Sollte sich dies bewahrheiten, so wäre in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass WOFIE auch auf primär nicht vaskularisierte Organe anzuwenden ist. Trotz dieser ermutigenden Ergebnisse bleibt aber festzuhalten, dass Transplantatfunktionszeiten von mehr als 100 Tagen nicht erreicht wurden.

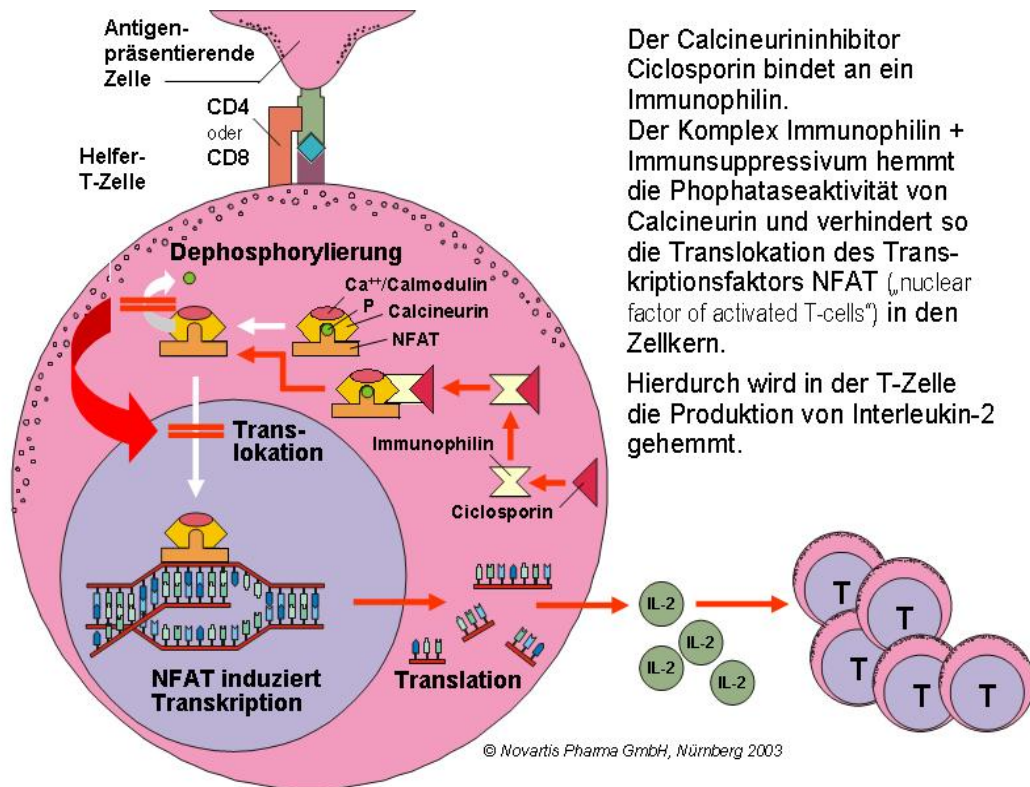


Abbildung 6.1: Hemmung der IL-2-Bildung durch Cyclosporin Quelle: Novartis Pharma GmbH, Nürnberg 2003

Im Gegensatz zu dieser Arbeit konnten andere Gruppen, die mit ähnlichen immunsuppressiven Protokollen arbeiteten, Langzeitüberleben von mehr als 100 Tagen erzielen. So berichtete die Gruppe um Bloom von Funktionszeiten bis zu einem Jahr (Bloom AD, 1986 und 1987). Bei diesem Versuchsansatz waren die Empfängertiere unmittelbar vor der Transplantation drei Tage lang mit 30 mg/kg Cyclosporin A pro Kilogramm Körpergewicht behandelt worden. Von ähnlichen Ergebnissen berichtete auch Zhang. Dabei kombinierte er die Depletion der „passenger leukocytes“ (s. oben) mit einer immunsuppressiven Therapie (Zhang TP et al., 1986). Leider sind bisher seine Daten in keiner internationalen Zeitschrift veröffentlicht worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei unbehandelten Tieren der Abstoßungszeitpunkt um den Tag 16 und bei behandelten Tieren um den Tag 28 festgestellt (Abb. 4.11). Dass an der Abstoßung von Nebenschilddrüsentransplantaten auch CD4+ T-Lymphozyten beteiligt sind, zeigen experimentelle Arbeiten, in denen die Transplantatempfänger vor Erhalt von humanem Nebenschilddrüsen-gewebe mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD4 behandelt worden waren (Niimi M et al., 2000). Über einen Zeitraum von 30 Tagen wurde eine stabile Transplantatfunktion beobachtet, und im Blut der Tiere wurde humanes Parathormon nachgewiesen. Doch auch mit dieser Methode war kein Langzeitüberleben zu erreichen.

Die Frage, ob sich Nebenschilddrüsentransplantate in der Heftigkeit der von ihnen ausgelösten Immunantwort von den vaskularisierten Großorganen wie Niere, Leber oder Herz unterscheiden, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig beantworten. Doch bringt der Vergleich der Überlebensraten von Nebenschilddrüsen- und Dünndarmtransplantaten unter Immunsuppression überraschende Ergebnisse zutage: So wurde ein Langzeitüberleben von 165 ± 21 Tagen nach allogener Dünndarmtransplantation in der gleichen Stammkombination, in der auch die Nebenschilddrüsentransplantationen durchgeführt wurden, mit einer Dosierung von 20 mg/kg erreicht. Tiere, die 10 mg Cyclosporin pro Kilogramm Körpergewicht erhielten, wiesen immerhin noch eine Transplantatüberlebenszeit von 80 ± 19 Tagen auf (Timm S et al., 2004). Während, wie in Tab. 6.1 gezeigt, die immunsuppressive Dosierung sehr gut mit der Dauer der Transplantatfunktionszeit korreliert, ist dies für die Nebenschilddrüsen nur bedingt zu sehen. Die Gründe hierfür sind zurzeit noch unbekannt. Erste neuere Daten der eigenen Gruppe lassen jedoch den Schluss zu, dass dieser Effekt zumindest nicht abhängig vom verwendeten Immunsuppressivum zu sein scheint. So ist auch die Wirkung des neuen Immunsuppressivums Sirolimus für den Erhalt von Nebenschilddrüsentransplantaten geringer als bei Tieren mit vaskularisierten Herztransplantaten (Michael Ulbrich, Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg, in Fertigstellung).

Tabelle 6.1: Auswirkung unterschiedlicher immunsuppressiver Dosierungen auf das Transplantatüberleben von Nebenschilddrüsentransplantaten im Vergleich zum vaskularisierten Dünndarmtransplantat (aus Timm S et al., 2004).

Transplantate	Immunsuppressive Dosierung		
	20 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg
Nebenschilddrüse	28 ± 3 *	28 ± 3	20 ± 1
Dünndarm	165 ± 21	80 ± 19	50 ± 4

* Das Transplantatüberleben in Tagen ist jeweils als Mittelwert und Standardabweichung von wenigstens 3 Transplantationen angegeben. Die Stammkombination war WF → LEW (s. hierzu auch Tab. 4.1). Die angegebene immunsuppressive Dosierung wurde von Tag 0 bis 14 (= 15 Gaben) verabreicht.

Somit ist die durch allogene Nebenschilddrüsentransplantate ausgelöste Immunantwort nur schwer mit einer kurzzeitigen Immunsuppression zu kontrollieren. Selbst Dosierungen, die protektiv für den sehr immunogenen Dünndarm sind (Tab. 6.1), zeigen nur geringe Effekte auf die Transplantatfunktionszeit allogener Nebenschilddrüsen. Dieses überraschende Ergebnis ist bisher nicht bekannt gewesen. Eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass der Effekt der Immunsuppression dadurch gesteigert werden kann, dass die immunologische Auseinandersetzung zwischen Nebenschilddrüsentransplantaten und Immunsystem unter kontrollierten Bedingungen zugelassen wird (Abb. 4.10). Dieser in der Literatur als WOFIE bekannte Effekt könnte sich insbesondere für nicht-vaskularisierte Organe wie den Nebenschilddrüsen als bedeutsam zur Entwicklung neuer, zeitlich begrenzter immunsuppressiver Therapien herausstellen.

(WOFIE = window of opportunity for immunological engagement)

7 Ausblick

Die Transplantationsmedizin nimmt einen wichtigen Stellenwert im Bereich der medizinischen Therapie von Organerkrankungen, aber auch in der medizinischen Forschung ein: Ihr Ziel ist, allogene Organtransplantate dauerhaft und nebenwirkungsfrei zu erhalten.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, induziert eine zeitlich begrenzte Immunsuppression nicht ein dauerhaftes Überleben von Nebenschilddrüsen-Transplantaten. Trotzdem sind Daten zu der zeitlich verzögerten Immunsuppression sehr hoffnungsvoll. Sollten sie sich reproduzieren lassen, so wäre das zugrunde liegende WOFIE-Konzept (siehe Diskussion) auch für primär nicht-vaskularisierte Organtransplantate äußerst interessant, um die notwendige Immunsuppression reduzieren zu können. Aus diesem Grund sollten Experimente hierzu weitergeführt werden.

Eine weitere, sehr aussichtsreiche Methode, die auch von unserer Gruppe intensiv untersucht wird, ist die Verkapselung von Zellen und Gewebetransplantaten (Vasily Moskalenko, Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg; <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus/volltexte/2004/1037/>)*. Diese für Zelltransplantate attraktive Methode der Immunisolation wäre auch eine Alternative für die Nebenschilddrüsen-Transplantate. Hierzu ist wahrscheinlich ein Aufschluss des Gewebes in Einzelzellen erforderlich. Dies ist prinzipiell für die Nebenschilddrüsen von Ratte und Mensch möglich. Die optimale Lösung des Problems der Abstoßung bestünde jedoch in der Züchtung von parathormonproduzierenden Zellen aus autologen Stammzellen. Die erfolgreiche Realisierbarkeit dieses äußerst attraktiven Ansatzes wird jedoch noch mehrere Jahre in Anspruch nehmen.

* In-Vitro-Untersuchungen an mikroverkapseltem humanem Nebenschilddrüsengewebe : Vorarbeiten zur Therapie des permanenten Hypoparathyreoidismus mittels Allotransplantation ohne Immunsuppression

8 Zusammenfassung

Mit dem in unserer Gruppe etablierten klinisch relevanten Tiermodell zum Hypoparathyreoidismus ist es möglich, unterschiedliche Therapiestrategien auf ihre Wirksamkeit zu überprüfen. Eine äußerst attraktive Option, den permanenten Hypoparathyreoidismus langfristig und nebenwirkungsfrei zu heilen, stellt die allogene Nebenschilddrüsentransplantation dar. Ihre klinische Realisierbarkeit scheitert bisher jedoch daran, dass diesen Patienten die notwendige Immunsuppression zur Verhinderung der Transplantatabstoßung nicht zugebetet werden kann. Der Hypoparathyreoidismus stellt eine ernstzunehmende Erkrankung dar, doch sollte man diesen Patienten als Folge der allogenen Transplantation keine dauerhafte Immunsuppression zumuten.

Als Alternative zur Dauerimmunsuppression wäre eine zeitlich begrenzte niedrig-dosierte immunsuppressive Therapie vorstellbar. Doch liegen hierzu kaum experimentelle Daten vor. Das wesentliche Ziel dieser Arbeit war somit zu überprüfen, ob primär nicht-vaskularisierte Nebenschilddrüsentransplantate durch eine kurzfristige Immunsuppression vor der Abstoßung geschützt werden können. Hierzu wurden unterschiedliche Dosierungen (20, 10, 5 mg/kg Körpergewicht) sowie Applikationsintervalle (prä- oder postoperativ) des Immunsuppressivums Cyclosporin A untersucht.

Dabei zeigte sich, dass während der immunsuppressiven Therapie keines der Transplantate zerstört wurde. Dies war unabhängig davon, ob der Implantationsort der Glutaeusmuskel oder die Nierenkapsel ist. Nach Absetzen der Immunsuppression kam es innerhalb von 14 Tagen zur Abstoßung der Transplantate. Interessanterweise zeigte sich das längste Transplantatüberleben bei Tieren, die lediglich für neun Tage, beginnend ab dem sechsten postoperativen Tag, immunsuppressiv behandelt wurden. Dies unterstreicht, dass zur effektiven Verhinderung der Transplantatabstoßung nicht ausschließlich die immunsuppressive Dosis von Bedeutung ist, sondern dass dem Immunsystem im Vorfeld einer immunsuppressiven Therapie die Möglichkeit gegeben wird, sich mit

dem Transplantat effektiv auseinanderzusetzen. In der Literatur wird dieses Phänomen als „*window of opportunity for immunological engagement*“ oder abgekürzt WOFIE diskutiert.

Offenbar besitzen Epithelkörperchen als primär nicht vaskularisierte Organe eine starke Immunogenität, die zur frühzeitigen Abstoßung nach Absetzen der Immunsuppression führt. Die Experimente zeigen somit eindeutig, dass eine temporäre Immunsuppression zur Verhinderung der Transplantatabstoßung auch bei so kleinen Organen wie den Epithelkörperchen nicht effektiv genug ist. Ein Grund hierfür scheint zu sein, dass gegenwärtig die zellulären Mechanismen zur Abstoßung primär nicht vaskularisierter Transplantate im Detail noch nicht vollständig bekannt sind. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigen bereits sehr früh nach Transplantation eine starke Infiltration der Epithelkörperchen mit immunkompetenten Zellen, die letztlich zum Verlust der Organinnenstruktur und zum Funktionsverlust führen. Ein möglicher klinischer Ansatz für die allogene Nebenschilddrüsentransplantation könnte das WOFIE-Konzept sein, das kontrolliert eine immunologische Auseinandersetzung zwischen Transplantat und Immunsystem zulässt. Hierzu sind weiterführende Experimente notwendig.

9 Literaturverzeichnis

- Akerstrom G**, Rastad J, Ljunghall S, Ridefeldt P, Juhlin C, Gylfe E. Cellular physiology and pathophysiology of the parathyroid glands. *World J Surg* 1991; 15: 672-680
- Arlt W**, Fremerey C, Callies F, Reincke M, Schneider P, Timmermann W, Allolio B. Wellbeing, mood and calcium homeostasis in patients with hypoparathyroidism receiving standard treatment with calcium and vitamin D. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 215-222
- Auchincloss H**, Sultan H. Antigen processing and presentation in transplantation. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 681-687
- Audran M**, Basle MF, Defontaine A, Jallet P, Bidet MT, Ermias A, Tanguy G, Pouplard A, Zanelli J. Transient hypoparathyroidism induced by synthetic human parathyroid hormone-(1-34) treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 937-943
- Benichou G**, Takizawa PA, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med* 1992; 175: 305-308
- Bloom AD**, Economou SG, Gebel HM. Indefinite survival of rat parathyroid allografts without postoperative immunosuppression. *Surgery* 1986; 100: 1032-1038
- Bloom AD**, Economou SG, Gebel HM. Extension of survival of rat parathyroid allografts by depletion of Ia donor cells plus preoperative cyclosporine. *Transplantation* 1987; 44: 171-174
- Calne R**. WOFIE Hypothesis: some thoughts on an approach toward allograft tolerance. *Transplant Proc* 1996; 28: 1152
- Clipstone NA**, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357: 695-697
- Dresske B**, Zavazava N, Jenisch S, Exner B, Lenz P, El Mokhtari NE, Kremer B, Faendrich F. WOFIE synergizes with calcineurin-inhibitor treatment and early steroid withdrawal in kidney transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1286-1291
- Feldman AL**, Sharaf RN, Skarulis MC, Bartlett DL, Libutti SK, Weinstein LS, Marx SJ, Norton JA, Fraker DL, Alexander HR. Results of heterotopic parathyroid autotransplantation: a 13-year experience. *Surgery* 1999; 126: 1042-1048
- Greenberg F**. Hypoparathyroidism and the DiGeorge syndrome. *N Engl J Med* 1989; 320: 1146-1147
- Greger RF**. Physiology and pathophysiology of calcium homeostasis. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 2: 4-8

-
- Hasse C**, Schrezenmeier J, Stinner B, Scherk C, Wagner PK, Neumann K, Rothmund M. Successful allotransplantation of microencapsulated parathyroids in rats. *World J Surg* 1994; 18: 630-634
- Kistler HJ**. Idiopathic hypoparathyroidism-a rare disease? *Schweiz Med Wochenschr* 1996; 126: 718-722
- Klinke R**, Silbernagl S. Lehrbuch der Physiologie, 4. korrigierte Auflage 2003
- Kreisel D**, Petrowsky H, Krasinskas AM, Krupnik AS, Szeto WY, McLean AD, Popma SH, Gelman AE, Traum MK, Furth EE, Moore JS, Rosengard BR. The role of passenger leukocyte genotype in rejection and acceptance of rat liver allografts. *Transplantation* 2002; 73: 1501-1507
- Lafferty KJ**, Cooley MA, Woolnough J, Walker KZ. Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture. *Science* 1975;188 : 259-261
- Lorenz K**, Dralle H. Surgical treatment of hyperparathyroidism. *Chirurg* 2003; 74: 593-615
- Li W**, Handschumacher RE. Specific interaction of the cyclophilin-cyclosporin complex with the B subunit of calcineurin. *J Biol Chem* 1993; 268: 14040-14044
- Luts L**, Sundler F. Autotransplantation of parathyroid glands, a study on morphological changes. *Transplantation* 1998; 66: 446-453
- Miller LW**. Cyclosporine-associated neurotoxicity. The need for a better guide for immunosuppressive therapy. *Circulation* 1996; 94: 1209-1211
- Murphy B**, Auchincloss H, Carpenter CB, Sayegh MH. T cell recognition of xeno-MHC peptides during concordant xenograft rejection. *Transplantation* 1996; 61:1133-1137
- Niimi M**, Takashima M, Takami H, Shirasugi N, Hamano K, Esato K, Matsumoto K, Ikeda Y, Shatari T, Kodaira S, Kameyama K. Experimental parathyroid transplantation: human parathyroid grafts survived and functioned in mice treated with anti-CD4 monoclonal antibody. *Biomed Pharmacother* 2000; 54: 80-82
- O'Keefe SJ**, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992; 357: 692-694
- Oluwole SF**, Oluwole OO, Adeyeri AO, DePaz HA. New strategies in immune tolerance induction. *Cell Biochem Biophys* 2004; 40: 27-48
- Orive G**, Hernández RM, Gascón AR, Calafiore R, Chang TM, De Vos P, Hortelano G, Hunkeler D, Lacík I, Shapiro AM, Pedraz JL. Cell encapsulation: Promise and progress. *Nat Med* 2003; 9: 104-107

-
- Otto C**, Moskalenko V, Ulrichs K. Transplantationsimmunologische Forschung im Kleintier: Perspektiven für die klinische Praxis. In: Krukemeyer MG, Spiegel HU (Hrsg.) Chirurgische Forschung, Georg Thieme Verlag 2005 (im Druck)
- Penn I**. Immunosuppression and cancer. Importance in head and neck surgery. *Arch Otolaryngol* 1975; 101: 667-670
- Picariello L**, Benvenuti S, Recenti R, Formigli L, Falchetti A, Morelli A, Masi L, Tonelli F, Cicchi P, Brandi ML. Microencapsulation of human parathyroid cells: an "in vitro" study. *J Surg Res* 2001; 96: 81-89
- Rogers NJ**, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant* 2001; 1: 97-102
- Saxe AW**, Gibson G, Elfont E. In vitro assessment of parathyroid immunogenicity: the effect of cryopreservation. *Surgery* 1990; 108: 56-62
- Schafer M**, Ferbert A. Calcinosis of the basal ganglia and hypoparathyroidism. *Nervenarzt* 1998; 69: 873-878
- Schwartz R**, Dameshek W. Drug induced immunologic tolerance. *Nature* 1959; 183: 1682
- Schwartz R**, Dameshek W. The effects of 6mercaptopurine on homograft reactions. *J Clin Invest* 1960; 39: 952
- Sollinger HW**, Mack E, Cook K, Belzer FO. Allograft transplantation of human parathyroid tissue without immunosuppression. *Transplantation* 1983; 36: 599-603
- Stiller CA**. Thyroid cancer following Chernobyl. *Eur J Cancer* 2001; 37: 945-947
- Stiller CR**. An overview of the first decade of cyclosporine. *Transplant Proc* 1996; 28: 2005-2012
- Thomusch O**, Machens A, Sekulla C, Ukkat J, Brauckhoff M, Dralle H. The impact of surgical technique on postoperative hypoparathyroidism in bilateral thyroid surgery: a multivariate analysis of 5846 consecutive patients. *Surgery* 2003; 133: 180-1853
- Timm S**, Hamelmann W, Otto C, Gassel AM, Etzel M, Ulrichs K, Thiede A, Timmermann W. Influence of donor MHC class I antigen expression on graft survival after rat parathyroid allotransplantation. *Langenbecks Arch Surg* 2001; 386: 430-433
- Timm S**, Otto C, Begrich D, Moskalenko V, Hamelmann W, Ulrichs K, Thiede A, Timmermann W. Immunogenicity of parathyroid allografts in the rat: immunosuppressive dosages effective in passenger leukocyte-rich small bowel transplants are not effective in parathyroid gland transplants with few passenger leukocytes. *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389: 46-52
- Wood KJ**. Passenger leukocytes and microchimerism: what role in tolerance induction? *Transplantation* 2003; 75: 17S-20S

Wozniewicz B, Migaj M, Giera B, Prokurat A, Tolczko T, Sawichi A, Nawrot J, Gorski A, Zabritkowska T, Kossakowska AE. Cell culture of human parathyroid cells. *Transplant Proc* 1996; 28: 3542-3544

Zhang TP, Zhu Y, Wang S, Guan H, Tang W. Tolerance to rat parathyroid allograft induced by depletion of Ia+ donor cells plus short course cyclosporine. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 1986; 18: 457-460

Diese Arbeit wurde in Teilen publiziert:

Timm S, Otto C, Begrich D, Moskalenko V, Hamelmann W, Ulrichs K, Thiede A, Timmermann W. Immunogenicity of parathyroid allografts in the rat: immunosuppressive dosages effective in passenger leukocyte-rich small bowel transplants are not effective in parathyroid gland transplants with few passenger leukocytes. *Langenbecks Arch Surg* 2004; 389: 46-52.

Timm S, Otto C, Begrich D, Illert B, Hamelmann W, Ulrichs K, Thiede A, Timmermann W. Short-term immunosuppression after rat parathyroid allotransplantation. *Microsurgery* 2003; 23: 503-507.

Danksagung

Hiermit danke ich recht herzlich den folgenden Personen für ihre wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation:

- Professor Dr. med. W. Timmermann für die freundliche Vergabe der Dissertation
- Privatdozent Dr. med. S. Timm für die Einführung in die mikrochirurgische Operationstechnik und für die Betreuung der Dissertation
- Den MTAs für die Unterweisung in wichtige Arbeitsschritte
- Den Tierpflegerinnen für die liebevolle Betreuung der Ratten
- Meinen Eltern für ihre Geduld und ihre aufmunternden Worte

Mein ganz besonderer Dank gebührt jedoch Privatdozent Dr. rer. nat. C. Otto für die intensive Hilfe bei der Ausführung der schriftlichen Version und den unermüdlichen Einsatz, sich mit dem Thema zu befassen, sowie als Ansprechpartner kurzfristig und jederzeit zur Verfügung zu stehen.

Ohne diese Menschen wäre mir die Realisierung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Vor- und Zuname: Daniel Begrich

Geburtsdatum und -ort: 16.01.1976 in Geldern

Strasse und Wohnort: Alfried-Krupp-Str. 49, 45131 Essen

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Religionszugehörigkeit: römisch-katholisch

Eltern / Geschwister: Vater: Jost Begrich (Oberstudienrat), 62 Jahre
Mutter: Christiane Begrich-von Mook
(Kunsterzieherin), 57 Jahre
Geschwister: Matthäus (Dipl.-Ing. Architektur
FH), 26 Jahre

Schulbesuche 1982 – 1986 Grundschule St. Michael in Geldern
1986 – 1995 Friedrich – Spee – Gymnasium in
Geldern
Vollabitur mit gültiger
Hochschulzugangsberechtigung

Wehr- / Ersatzdienst Oktober 1995 – Januar 1996 Grundwehrdienst in
Pfullendorf; Februar 1995 – Oktober 1996
Zivildienst am St.-Clemens-Hospital in Geldern

Studium

WS 1996: ein Studiensemester Chemie an der RWTH Aachen

Von SS 1997 bis WS 2003 Studium der Humanmedizin an der Julius- Maximilians-Universität Würzburg

Nach WS 1998/99 (4. Semester) Physikum

Nach WS 1999/00 (6. Semester) 1. Staatsexamen

Anschließend Beginn der med. Dissertation in der experimentellen Chirurgie/Transplantationsimmunologie in Würzburg

Diverse Famulaturen, darunter eine Auslandsfamulatur in Malaysia

Nach SS 2002 (11. Semester) 2. Staatsexamen

Praktisches Jahr 21.10.02-21.09.03, Wahlfach Neurochirurgie am Inselspital Bern

3. Staatsexamen am 31.10.2003

Aktuelle Tätigkeit:

Seit 15.03.2004: zunächst AiP, seit dem 01.10.2004 Assistenzarzt im Alfred-Krupp-Krankenhaus, Essen, neurochirurgische Abteilung

Daniel Begrich
