

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

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

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

**vorgelegt von
Vasiliy Moskalenko
aus Minsk, Weißrussland**

Würzburg, im März 2004

Referentin: Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs

Korreferent: Professor Dr. med. A. Thiede

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2004

Der Promovend ist Arzt

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Fragen	7
3	Material und Methoden	8
3.1	Untersuchungsmaterial	8
3.2	Chemikalien und Medien	8
3.3	Alginat	8
3.4	Gewebepräparation	9
3.4.1	Herstellung von Gefrierschnitten	9
3.4.2	Hämalaun-Eosin Färbung	9
3.4.3	Mechanische Gewebezerkleinerung unter dem Dissektionsmikroskop ...	10
3.4.4	Mechanische Gewebezerkleinerung mittels Siebpassage	10
3.4.5	Enzymatische Gewebezerkleinerung mit Kollagenase	10
3.5	Vitalität des Nebenschilddrüsengewebes	11
3.5.1	Trypanblaufärbung	11
3.5.2	Fluoreszein-Diacetat Färbung	11
3.6	Verkapselungsapparatur	12
3.7	Produktion leerer Barium-Alginatkapseln	13
3.8	Mikroverkapselung von Nebenschilddrüsenpartikeln	14
3.9	Mikroverkapselung von Nebenschilddrüsenzellen/Zellclustern	15
3.10	<i>In-Vitro</i> -Funktion von Nebenschilddrüsengewebe	15
3.10.1	<i>In-Vitro</i> -Funktion von frischem hyperplastischem Nebenschilddrüsen- gewebe	15
3.10.2	<i>In-Vitro</i> -Funktion von kryokonserviertem Nebenschilddrüsen- gewebe	15
3.10.3	<i>In-Vitro</i> -Funktion von mikroverkapseltem Nebenschilddrüsen- gewebe ...	16
3.11	Bestimmung des Parathormons	17
3.12	Mechanische Stabilität der Barium-Alginat-Mikrokapseln.....	17
3.13	Lichtmikroskopische Auswertung und Fotodokumentation.....	17
4	Ergebnisse	18
4.1	Morphologische und physiologische Untersuchungen des Spendergewebes.....	18
4.1.1	Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen des Spendergewebes.....	18

4.1.2	<i>In-Vitro</i> -Funktion von frischem hyperplastischem humanem Nebenschilddrüsengewebe	20
4.1.3	<i>In-Vitro</i> -Funktion von kryokonserviertem humanem Nebenschilddrüsengewebe	21
4.2	Untersuchungen zur Optimierung der Gewebepräparation	23
4.2.1	Mechanische Gewebezerkleinerung unter dem Dissektionsmikroskop	23
4.2.2	Mechanische Gewebezerkleinerung mittels Siebpassage	25
4.2.3	Enzymatische Gewebezerkleinerung mit Kollagenase	25
4.3	Untersuchungen zur optimalen Methode der Mikroverkapselung des Nebenschilddrüsengewebes	26
4.3.1	Mikroverkapselung der Gewebepartikeln	26
4.3.2	Mikroverkapselung von Einzelzellen und Zellclustern	28
4.4	<i>In-Vitro</i> -Funktion des mikroverkapselten Nebenschilddrüsengewebes ..	30
4.4.1	Frisches mikroverkapseltes Nebenschilddrüsengewebe	30
4.4.2	Kultiviertes mikroverkapseltes Nebenschilddrüsengewebe	31
4.4.3	Mikroverkapselte Zellen und Zellcluster	32
4.5	Untersuchungen zur mechanischen Stabilität der Mikro kapseln	34
4.5.1	Einfluss der Zelldichte auf die mechanische Stabilität der Alginat-Mikro kapseln	34
4.5.2	Einfluss der Zellcluster auf die mechanische Stabilität der Alginat-Mikro kapseln	35
5	Diskussion	37
6	Zusammenfassung	49
7	Literaturverzeichnis	52
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
Ba	Barium
FDA	Fluoreszein-Diacetat
GMP	<i>good medical practise</i>
h	Stunde(n)
min	Minute(n)
PI	Propidium Jodid
PTH	Parathormon
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
xg	ein Vielfaches der Erdanziehung

1 Einleitung

Der permanente Hypoparathyreoidismus (Nebenschilddrüsenunterfunktion) ist eine irreversible Reduktion des intakten Parathormons und des Gesamtkalziums im Blutserum des Patienten mit eingeschränkter bzw. fehlender Funktion der Nebenschilddrüsen. Obwohl ein primärer permanenter Hypoparathyreoidismus in Form eines autoimmunen Hypoparathyreoidismus, des DiGeorge Syndroms oder des Kenny-Linarelli Syndroms vorliegen kann, ist der sekundäre Hypoparathyreoidismus als Folge des chirurgischen Eingriffs an der Schilddrüse oder den Nebenschilddrüsen die hauptsächliche Ursache dieser Erkrankung. Laut statistischem Bundesamt werden in Deutschland 1.000 neu erkrankte Patienten pro Jahr gezählt. Die Inzidenz des permanenten Hypoparathyreoidismus bei Operationen an den Schilddrüsen beträgt 0,5-4% und hängt von den Operationsindikationen und von der chirurgischer Technik ab [63, 64].

Der permanente Hypoparathyreoidismus kann verschiedene klinische Beschwerden wie Tetanie, Knochendeformationen, Haar- und Nagelwuchsstörungen, depressive Stimmungslagen und Herzstörungen verursachen [40]. Die Standardtherapie des Hypoparathyreoidismus besteht aus der bedarfsabhängigen Substitution von Kalzium und Vitamin D. Obwohl lebensbedrohende Situationen eines Patienten, wie z. B. die hypokalzämische Krise, die mit schmerzhaften tonischen Krämpfen der Muskulatur, Parästhesien und seltener mit Stimmritzenkrämpfen einhergehen, mit dieser Therapie sehr gut behandelbar sind und ihnen damit auch vorgebeugt werden kann, bleibt die Kalzium/Phosphat-Homöostase unreguliert. Die chronische Hypokalzämie und das langfristige Fehlen des Parathormons führen zur Verschlechterung des Allgemeinbefindens und verschiedenen psychischen Störungen [5]; intrakranielle Verkalkungen, Katarakte, sekundäre Candida- und Onychomykosen sind bei diesen Patienten ebenfalls zu beobachten [40]. Auf der anderen Seite ist diese konservative Therapie mit einigen Komplikationen behaftet (osmotische Diarrhöe, Nephrolithiasis und Verkalkungen von verschiedenen Geweben usw.) [24, 43]. Diese Nachteile der Substitutionstherapie sind der Grund für die Suche nach neuen, physiologischeren Behandlungsformen des permanenten Hypoparathyreoidismus.

Die bis heute durchgeführten randomisierten klinischen Studien mit humanem rekombinantem Parathormon (PTH-1-34) deuteten darauf hin, dass die Wiederherstellung der Kalzium-

Homöostase nach der subkutanen Injektion des Hormons grundsätzlich möglich ist: Kalziumwerte im Serum und Urin der Patienten liessen sich in normalen Grenzen nachweisen [65, 72, 73]. Dennoch blieben die Phosphatwerte über dem normalen Niveau [72]. Da das Parathormon instabil war, traten Fälle von Hypokalzämie während der Substitutionstherapie auf [72]. Ausserdem wurden einzelne Nebenwirkungen während dieser Therapie, wie Nocturia, Erbrechen, Hyperkalzämie und andere beobachtet [72, 73]. Obwohl keine negativen Veränderungen in den Knochen nach 3-jähriger PTH-Behandlung der 19 Patienten erkennbar waren [73], besteht jedoch das Risiko des dosisabhängigen Osteosarkoms bei solchen Patienten [74]. Um eine physiologischere Substitution des Parathormons zu erzielen, und um die potenzielle Gefahr der Komplikationen für den Knochen zu verringern, sollen neue Therapieansätze erprobt werden: z. B. die *PTH pump* Therapie, die Gabe langfristig wirkender Parathormone und mehrmalige PTH-Injektionen [73]. Es scheint jedoch, dass die Transplantation des Nebenschilddrüsengewebes und die regulierbare *De-Novo*-Synthese des Parathormons eine sehr viel bessere Alternative zur artifiziellen Hormon-Substitution bei der konservativen Therapie des permanenten Hypoparathyreoidismus bieten.

Die ersten Untersuchungen zur experimentellen Therapie der Tetanie nach Schilddrüsenoperationen mittels Transplantation des Schilddrüsen-Nebenschilddrüsen-Gewebes wurden von Anton von Eiselsberg (Professor der Chirurgie, Allgemeines Krankenhaus, Wien), Schüler von Theodor Billroth, im Jahr 1892, und 5 Jahre später nach der Entdeckung der Nebenschilddrüsen im Jahr 1887 von Ivar Victor Sandström (medizinischer Student an der Universität Uppsala), durchgeführt; dies, obwohl die genauen Ursachen der Tetanie weitgehend unklar waren [66]. Die ersten klinischen Versuche, die akuten Symptome des chronischen postoperativen Hypoparathyreoidismus zu behandeln, erfolgten im Jahr 1907 von W. S. Halsted (Johns Hopkins Hospital) mittels einer Injektion von Nebenschilddrüsenextrakt und Kalzium. Anschliessend konnten H. Pfeiffer und O. Mayer die ersten klinischen Erfolge nach Autotransplantation der Epithelkörperchen im Jahr 1907 zeigen [66]. Seitdem wurden zahlreiche experimentelle und klinische Transplantationen autogenen bzw. allogenen Gewebes zur Therapie bzw. Prophylaxe des Hypoparathyreoidismus nach Schilddrüsen/Nebenschilddrüsenoperationen von verschiedenen Gruppen durchgeführt.

Obwohl die Autotransplantation der Nebenschilddrüsen eine Routineprozedur geworden ist, ist ihre Allotransplantation bis heute noch kein Standardverfahren. Die ehemaligen Vermu-

tungen, dass die Epithelkörperchen *immunologisch privilegiert* seien, bewahrheiteten sich nicht [68], und die ersten langfristigen Funktionen des transplantierten Gewebes waren ausschliesslich entweder in immunsupprimierten Empfängern [67, 2] oder durch die Transplantation an *immunprivilegierte* Orte zu erzielen [69, 70]. Ein erfolgreiches Ergebnis wurde auch nach der klinischen Isotransplantation (zwischen homozygoten Zwillingen) beobachtet [21]. Verschiedene experimentelle Untersuchungen zeigten, dass allogene Nebenschilddrüsentransplantate ihre Funktion in Folge einer akuten zellulären Abstoßungsreaktion verlieren [20, 75]. Es stellte sich heraus, dass die Überlebenszeit der Epithelkörperchen von der Expression der Haupthistokompatibilitätsantigene abhängt, so dass Nebenschilddrüsen von den Inzuchtratten, die eine stärkere Expression der MHC Klasse I-Antigene zeigten, ihre Funktion in kürzester Zeit nach Allotransplantation (ohne Immunsuppression) einstellten [75]. Untersuchungen zur MHC-Expression von humanen Nebenschilddrüsenzellen wiesen darauf hin, dass sowohl die stromalen als auch die parenchymatösen Zellen des hyperplastischen Gewebes ein erhöhtes Niveau an MHC-Molekülen, im Vergleich zu normalen Nebenschilddrüsenzellen, besitzen: 69% und 24% adenomatösen Zellen wiesen MHC-Antigene der Klasse I und der Klasse II auf; auf allen stromalen Zellen (bei sekundärem Hyperparathyreoidismus) fand man MHC-Klasse II Antigene und bei 94% der Zellen MHC Klasse I Antigene; normale Nebenschilddrüsenzellen exprimierten im Vergleich dazu in 23% MHC-Klasse I aber keine MHC Klasse II Antigene [71]. Ausserdem führte die Kultivierung mit IFN- γ bzw. IFN- γ zu einer Erhöhung von MHC Klasse I bzw. MHC Klasse II auf den hyperplastischen und adenomatösen Zellen, jedoch nicht auf den normalen Zellen [71].

Um eine langfristige Funktion des Allotransplantates zu erzielen, wurden verschiedene Therapieansätze erprobt: (1) Reduktion der Immunogenität des Gewebes, (2) Immunsuppression der Empfänger und (3) *Immunprotektion* des Gewebes. Die Reduktion der Immunogenität des Transplantates stützt sich darauf, dass durch Depletion der MHC Klasse II exprimierenden Zellen im Stroma des Nebenschilddrüsenorgans eine erniedrigte Immunogenität und damit Langfunktion des Transplantates zu erzielen wären. Im Bemühen, die Anzahl von *passenger leukocytes* zu reduzieren wurden verschiedene Ansätze, (a) die Zellkulturpassage [77, 79], (b) die Nacktmauspassage (*interim host system*) [20], und (c) Antikörper-gebundene magnetische Partikeln [78] verwendet. Obwohl die Depletion der *passenger leukocytes* der direkten Allo-Antigenerkennung vorbeugen und damit das Überleben des Transplantates kurzfristig verlängern konnte [77, 78, 79], wurde gezeigt, dass der indirekte Weg der Allo-Antigenerkennung

für die Abstossung des Nebenschilddrüsen-Allotransplantates eine sehr viel grössere Bedeutung hat [80].

Da eine chronische Immunsuppression der Empfänger nach Allotransplantation der Epithelkörperchen nicht gerechtfertigt ist, wurden verschiedene Versuche unternommen, um das Überleben des Transplantates mittels einer kurzfristigen immunsuppressiven Therapie zu verlängern. Obwohl manche Gruppen eine verlängerte Transplantatfunktion von mehr als 80 Tagen nach zeitlich limitierter Medikation aus Cyclosporine A und anti-MHC Klasse I Antikörpern erzielen konnten [82], liessen sich diese Ergebnisse nicht reproduzieren [76, 80]. Allerdings stellt die Immunsuppression immer dann einen Therapieansatz dar, wenn Patienten im Rahmen einer kombinierten Nebenschilddrüsen/Nieren-Transplantationen eine lebenslange Medikation benötigen. [2].

Unter *Immunprotektion* des Gewebes versteht man eine Ummantelung des Gewebes bzw. der Zellen mit einer Membran, die selektiv permeabel ist und dadurch die Versorgung des Transplantates mit *low molecular weight* Stoffen, wie Sauer- und Nährstoffen, erlaubt, während die immunreaktiven Zellen, Antikörper und Komplement vom Transplantat ferngehalten werden. Eine Vorbedingung für die Anwendung solcher Methoden ist die freie Ausschüttung des Zellproduktes, z. B. des Parathormons, durch die Membran und seinen Übertritt in die Mikrozirkulation. Um die *Immunprotektion* des Transplantates zu gewährleisten, wurden zwei unterschiedliche Ansätze verwendet: die Makro- und die Mikroverkapselung [61]. Bei der Makroverkapselung überführt man das Gewebe bzw. die Zellen in eine Kammer, die von einer semipermeablen Membran umgeben ist. Solche Makroverkapselungsanlagen sind beispielsweise Perfusionskammern (*vascular devices*) und Diffusionskammern (*hollow fibers* bzw. *planar devices*). Die Perfusionskammer besteht aus einer semipermeablen rohrförmigen Membran, die mittels eines Standard-PTFE-Graftes via arteriovenösem Shunt mit der Zirkulation des Empfängers verbunden ist; das Spendergewebe richtet sich in einem Reservoir um die semipermeable Membran herum ein [61]. Die Nachteile der Perfusionskammer (Notwendigkeit eines ‚grösseren‘ operativen Eingriffs, Gefahr von Thrombosen und Infektionen) überwiegen jedoch deren Vorzüge: Diese Methode garantiert einen engen Kontakt zwischen arteriellem Blut und dem Transplantat und sichert damit die bessere Versorgung mit Sauer- und Nährstoffen. Im Gegensatz zu den Perfusionskammern sind die verkapselten Zellen in den Diffusionskammern sehr abhängig von der Diffusion der Nährstoffe aus den umgebenden Geweben.

Zusätzliche äussere Schichten, die verschiedene Wachstumsfaktoren enthalten, können die Neovaskularisierung um das Transplantat herum aktivieren und damit die Ernährung der Zellen verbessern. Da besonders die makroverkapselten Zellen zur Verklumpung neigen, wurden zentrale Nekrosen in den Aggregaten beobachtet [85]. Dieses Problem wurde mittels Immobilisierung der Zellen in verschiedenen Matrices (Kollagen-Matrix, Ca²⁺-Alginat, Chitosan) gelöst [85, 86, 87]. Die klinischen Untersuchungen von Diffusionskammern zeigten, dass das makroverkapselte Nebenschilddrüsengewebe nach Allotransplantation mehr als 1 Jahr überleben konnte; dennoch beobachtete man intensives Wachstum von Fibroblasten innerhalb der Kammer, womit sich die Anzahl von endokrinen Zellen verringerte, so dass sich der funktionelle Effekt der Allotransplantation verringerte [83]. Trotz anfänglich viel versprechender Ergebnisse auch mit der Makroverkapselung konnte bisher keine ausreichende Langzeit-Transplantatfunktion erzielt werden.

Eine *Immunprotektion* endokrinen Gewebes (z. B. von Inselzellen, Nebenschilddrüsenzellen) durch Mikroverkapselung wurde erstmals durch F. Lim und A. M. Sun beschrieben [88, 6] und von der Gruppe um C. Hasse seit einigen Jahren für die Nebenschilddrüsentransplantation intensiv untersucht. Überlebenszeiten von bis zu 6 Monaten in iso-, allo- und xenogenen Rattenmodellen wurden hier berichtet [8, 9, 10]. Die Ummantelung des Spendergewebes mit einem hoch reinen Polymer bietet verschiedene Vorteile gegenüber der Makroverkapselung des Gewebes: Die sphärische Form der Mikrokapseln hat ein besseres Oberflächen-/Volumen-Verhältnis als ein scheiben- oder rohrförmiges Gebilde und damit bessere Diffusionsbedingungen; das Verkapselungspolymer dient zugleich als extrazelluläre Matrix für die verkapselten Zellen; Mikrokapseln sind mechanisch stabiler als Makrokapseln bzw. *hollow fibers* [61]. Als hauptsächliche Vorbedingung für die erfolgreiche klinische Anwendung der Mikroverkapselungstechnik hielten C. Hasse et al. vor allem eine hohe Reinheit des Alginates [4]. Im Rahmen der Inselzelltransplantation beobachtete man, dass, obwohl non-mitogenes Alginat verwendet wurde, die Mikrokapseln fibrosierten [17]. Dieses Ergebnis konnte vor allem mit einer unvollständigen Verkapselung erklärt werden, da deformierte Mikrokapseln und unvollständig verkapselte Zellen auch dokumentiert wurden [17]. Allerdings wurde der Einfluss der Präparation des Nebenschilddrüsengewebes wie auch der Mikroverkapselungstechnik auf die Qualität der Mikrokapseln und das Überleben der Nebenschilddrüsentransplantate überhaupt nicht hinreichend untersucht. Unklar ist auch, ob sich pathologisch verändertes Nebenschilddrüsengewebe für die Allotransplantation eignet. Zur Zeit gibt es kein allgemeingül-

tiges Standardverfahren zur Mikroverkapselung des Nebenschilddrüsengewebes; so unterscheidet man Mikrokapseln aus Poly-L-Lysin-Ca²⁺-Alginat [6], Ba²⁺-Alginat [8-10, 16] und Polyelektrolyten [7]; die Kapselgrößen messen zwischen 2 mm [16] und 500-600µm [6] im Durchmesser; als Methoden der Gewebepräparation dienen die mechanische Zerkleinerung mit anschließender Verkapselung von Gewebepartikeln [8-10] und die enzymatische Digestion und nachfolgende Verkapselung von Gewebebröckchen [7] bzw. Einzelzellen [16]. Die mechanische Stabilität der für die Nebenschilddrüsentransplantation vorherbestimmten Mikrokapseln wurde nicht untersucht.

Die vorliegende Arbeit befasst sich zunächst mit der Untersuchung des hyperplastischen Gewebes (sekundärer Hyperparathyreoidismus) als potenzieller Quelle für die Allotransplantation der Epithelkörperchen. Hierbei wird insbesondere die Funktion von frischem und kryokonserviertem Gewebe analysiert. Der weiteren werden verschiedene Methoden der Gewebepräparation miteinander verglichen. Auch wird der Einfluss von verschiedenen Faktoren auf die Mikroverkapselungsqualität hinsichtlich einer späteren Allotransplantation untersucht. Analysiert werden auch die akuten *In-Vitro*-Sekretionsdynamiken von mikroverkapselten Gewebepartikeln bzw. Zellclustern/Einzellzellen und die Bedeutung der Gewebeintegrität für die regulierbare Funktion der Nebenschilddrüsenzellen. Abschliessend, und ebenfalls sehr bedeutsam, wird die mechanische Stabilität der Barium-Alginat-Mikrokapseln geprüft.

2 Fragen

1. Inwiefern eignet sich pathologisch verändertes Nebenschilddrüsengewebe für die spätere Allotransplantation? In diesem Zusammenhang wurden die folgenden Parameter untersucht: die Morphologie des Gewebes und die Ca^{+2} -abhängige Funktion von frischem und kryokonserviertem Gewebe.
2. Welche Methode der Gewebepräparation ist die am wenigsten belastende? Hier wurde die mechanische mit der enzymatischen Präparation verglichen.
3. Welche Unterschiede gibt es hinsichtlich der Verkapselungsqualität, wenn Gewebepartikeln bzw. Zellcluster/Einzelzellen mikroverkapselt werden? Hier wurden folgende Parameter untersucht: die Kapselform, die Kapselgrösse, die möglichst komplette Verkapselung, den Anteil leerer Kapseln an der Gesamtkapselzahl und die Vitalität der verkapselten Zellen.
4. Welche funktionellen Unterschiede gibt es zwischen mikroverkapselten bzw. unverkapselten Nebenschilddrüsenpartikeln? Am Beispiel von frischem und kultiviertem Gewebe wurde die Frage geklärt, in wie fern die Verkapselung per se einen Einfluss auf die Gewebefunktion ausübt. Zusätzlich wurde analysiert, ob die Gewebeintegrität für die Funktion der mikroverkapselten Nebenschilddrüsenzellen bedeutsam ist.
5. Sind die leeren Barium-Alginat-Kapseln ausreichend stabil? Wie beeinflusst die Dichte der mikroverkapselten Zellen die Stabilität der Kapseln, und welche Wirkung haben die Zellcluster auf die mechanische Stabilität der Kapseln?

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit war pathologisch verändertes Nebenschilddrüsengewebe von Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus. Die Diagnose *sekundärer Hyperparathyreoidismus* wurde durch die klinischen Symptome und die histologischen Untersuchungen bestätigt. Sogleich nach der chirurgischen Entfernung wurden die Epithelkörperchen in komplettes RPMI 1640 Medium (s. u.) überführt und bei 4°C ins Labor transportiert. Die kalte Ischämiezeit betrug weniger als 15 min. Danach wurde die Eignung des Gewebes für die nachfolgenden Untersuchungen insofern geprüft, als hämorrhagisches und nekrotisches Gewebe von den Versuchen sicher ausgeschlossen wurde. Ein Teil des Nebenschilddrüsengewebes wurde kryokonserviert und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert. Alle Untersuchungen an menschlichem Material waren zuvor von der örtlichen Ethikkommission genehmigt worden.

3.2 Chemikalien und Medien

Das komplette Medium für die Gewebepräparation, die Gewebekultur und die Perfusion basierte auf RPMI 1640 Zellkulturmedium mit 25mM HEPES und stabilem L-Glutamin (Fa. CellConcepts; Umkirch) mit folgenden Zusätzen: 10% Hitze-inaktiviertem FCS (*fetal calf serum*; Fa. JUK Kraeber; Wedel), 1% Natriumpyruvat (Fa. Gibco BRL; Karlsruhe), 1% nicht-essenziellen Aminosäuren (Fa. Gibco BRL), 1% Penicillin-Streptomycin (Fa. CellConcepts) und 5µM 2-Merkaptoethanol (Fa. Gibco BRL). Da der Gehalt des ionisierten Kalziums in komplettem Medium 0,42mM betrug, wurde letztes als *Niedrig-Kalzium-Medium* für die *In-Vitro*-Untersuchungen verwendet. Um Medien mit einem erhöhten Kalziumgehalt herzustellen, wurde Kalziumchlorid (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in komplettem Medium unter Kontrolle des ionisierten Kalziums aufgelöst, so dass Medien mit unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen für die Perfusionen zur Verfügung standen. Der Magnesiumgehalt im Medium betrug bei allen Versuchen 0,75mM.

3.3 Alginat

Für die Mikroverkapselung des Nebenschilddrüsengewebes wurde hochreines Alginat, entsprechend den GMP-Bedingungen, verwendet (Pronova UP MVG, Fa. NovaMatrix; Oslo, Norwegen). Der Gehalt an Endotoxinen betrug weniger als 100 EU/g. Das Alginat wurde

2,2%ig in A. bidest. gelöst, sein pH-Wert auf 7,0-7,5 eingestellt und durch einen Filter (FP 30/0,2 CA-S; Fa. Schleicher & Schüll; VWR, Nürnberg) mit 0,2µm Porengröße steril filtriert. Die isotone 2%ige Alginatlösung bestand aus einer Mischung von 100µl steriler 9%iger NaCl-Lösung und 900µl Alginatlösung. Die non-mitogenen Eigenschaften des Alginates – keine Aktivierung von immunkompetenten Zellen und erniedrigte Ausschüttung von Entzündungszytokinen im Vergleich zu mitogenem Alginat – wurden *in vitro* und *in vivo* (keine Fibrose nach der Transplantation leerer Kapseln) in eigenen, bisher unveröffentlichten Arbeiten bestätigt.

3.4 Gewebepräparation

Nach dem Transport ins Labor wurden die humanen Nebenschilddrüsen sofort gewogen und mit mikrochirurgischem Instrumentarium in komplettem Medium bei 4°C auf Partikeln von ca. 3 mm Kantenlänge mechanisch zerkleinert. So wurden auch Fettgewebe, nekrotische und hämorrhagische Bereiche entfernt. Nach der Entnahme der Gewebepartikel für die histologische Untersuchung und die Kryokonservierung wurde das restliche Gewebe entweder mechanisch oder enzymatisch weiter bearbeitet.

3.4.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Die Gewebepartikel für die histologische Untersuchung wurden in Blöckchen zerteilt und mit *Tissue Tek* Einfriermedium (Fa. Sakura, Sakura Finetek Europe B.V.; Zoeterwoude, Holland) in Einfrierröhrchen (Fa. Brand GmbH; Wertheim) überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C tief gefroren. Mit Hilfe eines Kryostaten (Frigocut-N-2800, Reichert Jung; Fa. Leica; Bensheim) wurden bei -20°C 10µm dicke Gefrierschnitte angefertigt.

3.4.2 Hämalaun-Eosin Färbung

Die Gewebemorphologie und verschiedene pathologische Veränderungen wurden mit der Hämalaun-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) beurteilt. Dazu wurden die Gefrierschnitte zunächst mit Aceton (Fa. Backer; Deventer-Holland, Holland) bei 4°C für 5 min fixiert. Die Zellkerne wurden sodann mit 1% wässriger Hämalaun-Lösung nach Mayer (Fa. Merck; Darmstadt) für 7-10 min gefärbt. Nach der Spülung der Präparate mit Leitungswasser und A. dest. erfolgte die Cytoplasma-Kontrast-Färbung für 1-3 min mit einer 0,5% wässrigen Eosin-Lösung (Fa. Merck; Darmstadt). Unter Zusatz von 1 Tropfen Eisessig auf 100 ml Farblösung wurde durch Abbruch des alkalischen Bläuens die Kontrastbildung erleichtert, so dass Cy-

toplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot gefärbt wurden. Anschließend wurde ausreichend mit A. dest. gespült. Nach beendeter Färbung wurden die Schnitte über die absolute Alkoholreihe (4x pro min) und anschließend mit Xylol (Fa. Merck) entwässert. Die Einbettung erfolgte konventionell mit dem Schnelleinbettmedium Pertex (Fa. Medite GmbH; Burgdorf).

3.4.3 Mechanische Gewebezerkleinerung unter dem Dissektionsmikroskop

Um Gewebebröckchen kleiner 500 μm herzustellen, wurden Gewebepartikeln von 3 mm Kantenlänge unter dem Dissektionsmikroskop (Helmut Hund GmbH; Wetzlar) in komplettem Medium bei 4°C mit mikrochirurgischem Instrumentarium zerkleinert. So wurden Form und Grösse der Partikeln gezielt reguliert. Um eine bessere Verkapselungsqualität der Partikeln (bei Kapselgrößen unter 800 μm) zu erzielen, wurden gleichförmige Partikeln von 200x300x300 μm Grösse für die Mikroverkapselung vorbereitet. Nach mechanischer Zerkleinerung und dem anschliessenden Vitalitätstest wurden die Partikeln 3x mit Medium gespült und vor Verkapselung bzw. Perfusion für ca. 60 min in komplettem RPMI 1640 Medium im Brutschrank kultiviert.

3.4.4 Mechanische Gewebezerkleinerung mittels Siebpassage

Das frische Nebenschilddrüsengewebe wurde durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 350 μm passiert; so ließen sich gleichförmige Gewebebröckchen und Einzelzellen gewinnen. Die gesamte Prozedur wurde in komplettem Medium bei 4°C in Petrischalen (10 cm Ø) durchgeführt. Die Präparationszeit betrug 5-10 min. Die Gewebebröckchen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und in komplettem Medium suspendiert.

3.4.5 Enzymatische Gewebezerkleinerung mit Kollagenase

Die enzymatische Zerkleinerung des Nebenschilddrüsengewebes wurde in 75 cm² Kulturflaschen (Cellstar®; Fa. Greiner Bio-One GmbH, VWR; Nürnberg) im Brutschrank bei 37°C und 4% CO₂ durchgeführt. Als Enzym diente Kollagenase Typ II (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH). 1,2 Milligramm Kollagenase wurden in 1 ml DMEM-HAM's F-12 Medium (Fa. CellConcepts) gelöst. Dieser Verdauungslösung wurden die bereits unter RPMI 1640 genannten Komponenten zugesetzt. 100 mg Nebenschilddrüsenpartikeln (3 mm Kantenlänge) wurden mit 10 ml Verdauungslösung im Brutschrank inkubiert. Um den Desintegrationsvorgang

zu unterstützen, wurden die Gewebepartikeln mit einer 30 ml Pipette erstmalig nach 20 min und später alle 10 min vorsichtig durchmischt. Der Verdauungsgrad wurde kontinuierlich makroskopisch und mikroskopisch kontrolliert. Nach 30 min Verdauung wurde das Medium mit den Einzelzellen und kleinen Zellclustern abgesondert und für 5 min bei 500 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS-Puffer (pH 7,6) 3x gespült und in komplettes Medium überführt. Zum restlichen Gewebe wurde frische Verdauungslösung gegeben und die Digestion fortgesetzt. Nach 40 min und dann alle 10 min wurden 100 µl-Proben entnommen; in diesen wurden Vitalität (Trypanblau-Färbung) und Gewebeintegrität geprüft. Wenn Zellcluster (20-300 µm Grösse) und einzelne Zellen erkennbar waren – nach 40-120 min – wurde die enzymatische Verdauung unterbrochen. Die Verdauungslösung wurde über ein Edelstahlsieb (Maschenweite 350 µm) gegossen und nicht verdaute Gewebepartikeln abgetrennt. Nach der Zentrifugation (500 xg, 5 min) wurde das Pellet mit PBS-Puffer gespült, abschliessend in 30 ml komplettem Medium resuspendiert und im Brutschrank weiter kultiviert.

3.5 Vitalität des Nebenschilddrüsengewebes

Die Vitalität des Nebenschilddrüsengewebes und der Einzelzellen wurde mit der Exklusionsmethode getestet, die darauf basiert, dass lebende Zellen einen geladenen Farbstoff, z.B. Trypanblau oder Propidiumiodid, ab einem bestimmten Molekularradius nicht aufnehmen können. Zellen mit geschädigter Zellmembran verlieren ihre Semipermeabilität, inkorporieren den Farbstoff und lassen sich so als tote Zellen identifizieren [90].

3.5.1 Trypanblaufärbung

Die Trypanblaufärbung wurde wie folgt durchgeführt: Etwa 100 µl Zellsuspension bzw. 2-3 Gewebepartikeln wurden mit 3,6 ml PBS-Puffer (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) versetzt und mit vorgewärmter Trypanblau-Lösung (2,7 ml einer 0,5%igen Lösung; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) versetzt. Die Suspension wurde mit einer Pipette durchgemischt und für 2-5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Lebende Zellen blieben ungefärbt, während tote Zellen durchgängig blau waren. Diese Methode wurde vor allem für die Vitalitätstestung der unverkapselten Zellen/Zellcluster während der Gewebepreparation verwendet.

3.5.2 Fluoreszein-Diacetat Färbung

Die Doppelfärbung mit Fluoreszein-Diacetat (FDA) und Propidium Jodid (PI) [89], beide von der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, wurde für die Vitalitätsbestimmung unverkapselter als

auch mikroverkapselter Gewebepartikeln/Zellcluster/Einzelzellen verwendet. Der Esterase-spezifische Farbstoff mit Grünfluoreszenz (FDA) färbt ausschließlich vitale Zellen. Im Gegensatz dazu färbt PI nur die Kerne toter Zellen rot. Es wurden 1,25 mM FDA und 9,0 mM PI in N,N-Dimethylformamid (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gelöst und 1:100 mit HBSS (Fa. Gibco BRL) verdünnt. Je 100 µl Zellcluster und Einzelzellen sowie Gewebepartikeln wurden nach diesem Verfahren gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch (BX50, Fa. Olympus; Hamburg) beurteilt.

3.6 Verkapselungsapparatur

Mikrokapseln aus Barium-Alginat wurden nach dem Vertropfungsverfahren hergestellt [91]. Diese Art der Verkapselung basiert auf der Tropfenbildung mittels eines co-axialen Luftstromes; hierbei wird durch Applikation des Luftstromes um die Verkapselungsdüse herum der Alginattropfen von der Düse „abgerissen“ (Abb. 1). Die Verkapselungsanlage besteht aus einer kleinen Zweikanaldüse, einem Druckluftballon mit einem regelbaren Kolbenvorschub als Dosiersystem, einer Spritzenpumpe (für 1ml Omnifix Spritzen) und einem Fällungsbad in einer Petrischale mit Vernetzerlösung. Die Zweikanaldüse besteht aus einer inneren Düse (0,8 mm Ø), durch welche die Alginat-Zellsuspension mit der Spritzenpumpe gedrückt wird, und einer äusseren Düse (Luftfokussieraufsatz), deren Luftstrom die innere Düse umspült. Der Abstand der Düse zum Fällungsbad betrug in allen Experimenten 10 cm. Um Sterilität zu gewährleisten, wurde die Druckluft durch einen Membranfilter (Midisart® 2000, 0,2µm PTFE; Fa. Sartorius, VWR; Nürnberg) geführt, der vor den Druckreglern angebracht war. Der Vor- druck wurde auf 3 bar eingestellt.

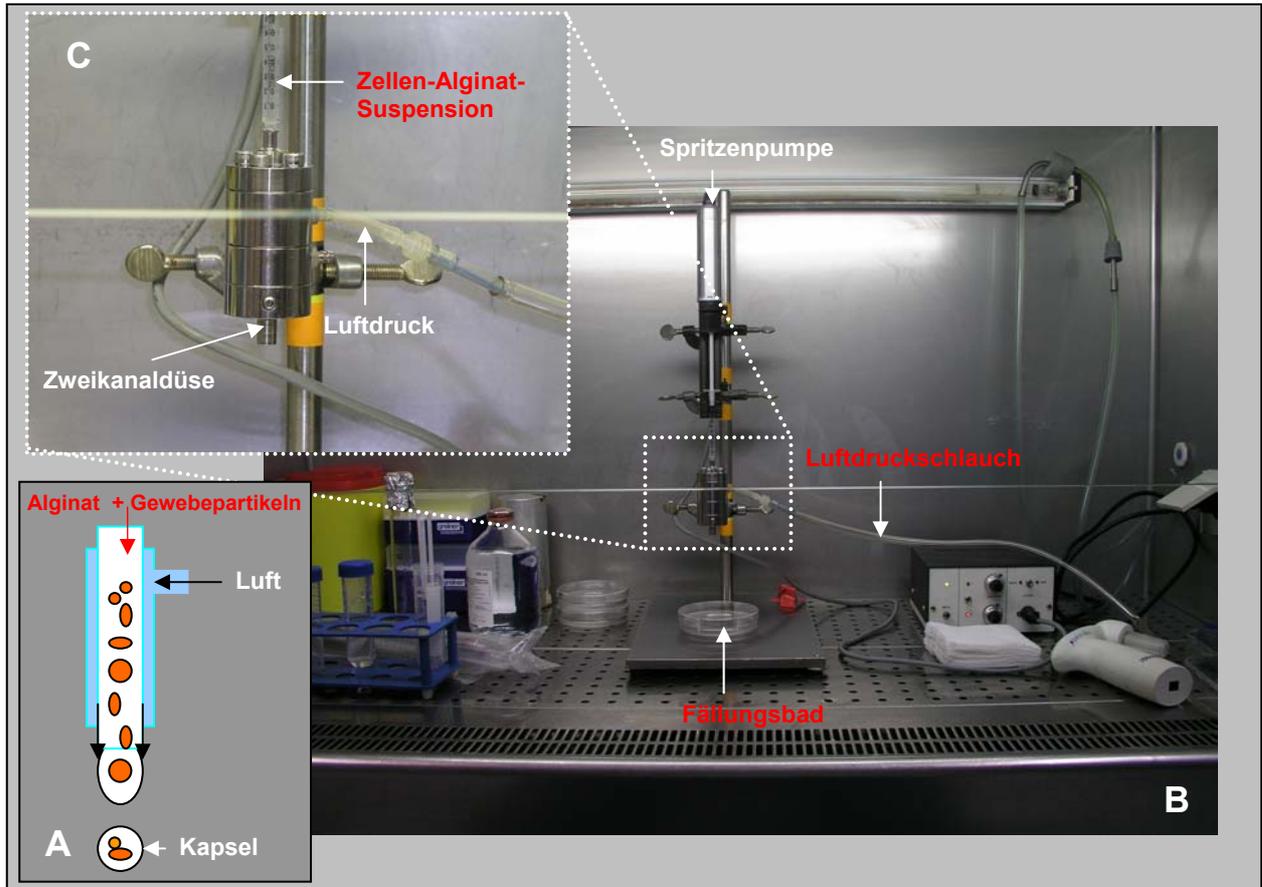


Abb. 1: Prinzip der Mikroverkapselung nach dem Luftstrom-Abrissverfahren (A) und die von uns betriebene Anlage der Firma Steinau, Verfahrenstechnik, Berlin (B). Die in Alginat suspendierten Gewebepartikeln/Zellen werden mittels einer Spritzenpumpe durch ein Düsensystem (C) getrieben. Der so erzielte Flüssigkeitsstrom wird mit Luftdruck unterbrochen. Die Alginate tropfen in ein Fällungsbad mit Bariumchlorid-Lösung; in dieser werden die langkettigen Alginatmoleküle kovalent miteinander vernetzt.

3.7 Produktion leerer Barium-Alginatkapseln

Die Verkapselungsparameter wurden zunächst durch die Herstellung leerer Mikro kapseln standardisiert. Hierfür wurde 1ml 2%ige Alginatlösung in einer 1ml-Spritze aufgenommen und mit der Spritzenpumpe durch den Zentralkanal der Zweikanaldüse getrieben. Die Kapselgrößen liessen sich durch Änderung der Alginatviskosität, der Durchflussgeschwindigkeit des Alginates, des Luftstromes und des Düsendurchmessers variieren. Im Folgenden wurden die Kapselgrößen ausschliesslich durch Veränderung des Luftstromes variiert (Abb. 2); alle übrigen Verkapselungsparameter blieben stets konstant.

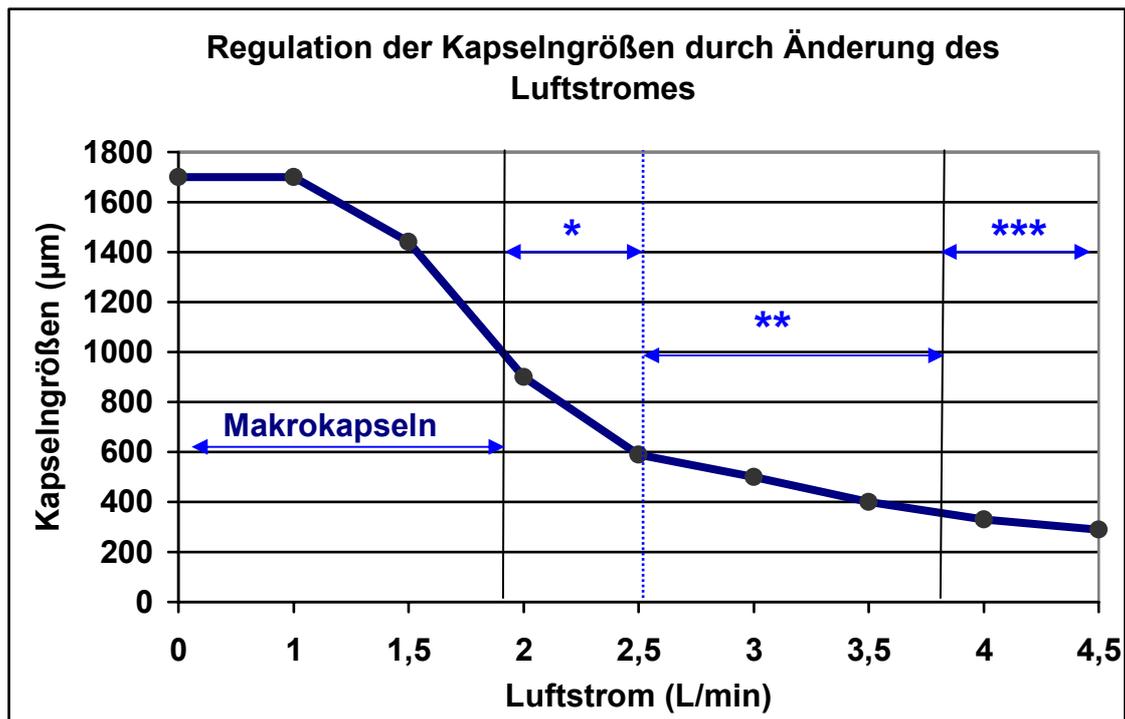


Abb. 2: Die Kapselgrößen wurden durch Veränderung des Luftstromes variiert; kleinere Kapseln wurden mit einem stärkeren Luftstrom hergestellt. Angezeigt sind die optimalen Parameter für jeden Kapseltyp: die mikroverkapselten Gewebepartikeln (*) und die Zellcluster/Einzelzellen (**). Obwohl Kapseln von weniger als 300µm Ø mit einem Luftstrom von 3,7 L/min produziert werden konnten (***), steigerte sich die Zahl der unvollständigen und deformierten Kapseln dramatisch; desgleichen nahm die Streuung der Kapselgrößen rapide zu.

3.8 Mikroverkapselung von Nebenschilddrüsenpartikeln

Die Zellkulturflasche mit den Nebenschilddrüsenpartikeln wurde nach der einstündigen Inkubation aus dem Brutschrank genommen und ihr Inhalt 3x mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Um ggf. vorhandene Luftblasen zu entfernen, wurde die Alginat-Lösung bei 1.000 xg für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Pellet wurde mit 1-3 ml Alginat-Lösung vorsichtig resuspendiert. Diese Alginat-Partikel-Suspension wurde mit einer 1ml-Spritze aufgezogen und diese in die Verkapselungsapparatur eingesetzt. Von entscheidender Bedeutung für eine gute Verkapselungsqualität waren die korrekte Regulation der Kapselgröße, entsprechend der Partikelgrößen, sowie die gute Gewebepreparation (s. Kapitel 4.3.1). Obwohl eine sehr gute Verkapselungsqualität bei Kapselgrößen über 1.000 µm erzielt wurde, wurden diese mittels Luftstromregulation (Abb. 2) bewusst in den Grenzen von 600-800 µm gehalten. Die Alginattropfen wurden für 4 min in 40 ml Vernetzerlösung, bestehend aus 20 mM BaCl₂, 10 mM MOPS (*3-[N-morpholino]-propanesulfonic acid*; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 115 mM NaCl, geliert. Anschliessend wurden die Kapseln 3x mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und lichtmikroskopisch inspiziert.

3.9 Mikroverkapselung von Nebenschilddrüsenzellen/Zellclustern

Die Mikroverkapselung der Einzellen/Zellcluster wurde in gleicher Weise wie die der Gewebepartikeln durchgeführt, obwohl die Kapselgrößen bei guter Verkapselungsqualität breitere Grenzen aufwiesen (s. Kapitel 4.3.2). Mikrokapseln mit optimalen Parametern: Größe <600µm, gleichmässig runde Form, niedrige Anzahl defekter Kapseln, wurden bei einem Luftstrom von 3-3,5 L/min hergestellt. Die weitere Erhöhung des Luftstromes führte zu einer höheren Anzahl deformierter Kapseln mit unvollständig verkapselten Zellclustern/-Einzellen und einer grösseren Schwankung der Kapselgrößen (20-350 µm).

3.10 *In-Vitro*-Funktion von Nebenschilddrüsengewebe

Die *In-Vitro*-Funktion des humanen Nebenschilddrüsengewebes wurde mit einem Mikroperifusionssystem getestet, das im Rahmen der Doktorarbeit von Herrn A. Kerscher im Teilprojekt D3 des IZKF Würzburg unter Leitung von Frau Prof. Dr. K. Ulrichs entwickelt wurde. Dieses System besteht aus einer Mikroperifusionskammer, einer Rollerpumpe, Verbindungsschläuchen und Perifusionsmedien. Die präzise technische und funktionelle Beschreibung des Systems erfolgt zeitgleich in der Doktorarbeit von Herrn A. Kerscher. Nebenschilddrüsenpartikeln bzw. Mikrokapseln mit diesem Gewebe wurden von komplettem Medium (s.o.) umspült. Dieses enthielt unterschiedliche Kalziumkonzentrationen (0,42 mM; 1,3 mM bzw. 1,62 mM; 2,1 mM bzw. 2,69 mM). Die Perifusionsproben wurden in regelmässigen Abständen gewonnen und bis zur Messung des Parathormons (s. u.) bei -20°C gelagert.

3.10.1 *In-Vitro*-Funktion von frischem hyperplastischem Nebenschilddrüsengewebe

Um die PTH-Ausschüttung der Nebenschilddrüsenzellen nach Gewebepreparation (3 verschiedene Spender) mittels mechanischer Zerkleinerung zu verringern, wurden die Gewebepartikeln mit PBS-Puffer 3x gespült und in komplettem Medium (RPMI 1640 + 10% FCS; 1,3 mM Ca²⁺) im Brutschrank bei 37⁰C und 5% CO₂ für 60 Minuten vorkultiviert. Erst dann wurde ihre Funktion im o.g. Mikroperifusionssystem analysiert.

3.10.2 *In-Vitro*-Funktion von kryokonserviertem Nebenschilddrüsengewebe

Untersucht wurden die im Jahr 1998 kryokonservierten Nebenschilddrüsengewebe von drei verschiedenen Spendern. Zum Auftauen des Gewebes wurden die Kryoröhrchen nach ihrer Entnahme aus dem Stickstofftank in 37°C warmem Wasser so lange geschüttelt, bis sich das Einfriermedium vollständig verflüssigte (Auftaugeschwindigkeit ca. 50°C/min). Mit dem

Schütteln ließ sich eine homogene Temperaturverteilung in den Proben erzielen. Danach wurde das Medium abpipettiert und das Gewebe 5x im Abstand von jeweils 5 min mit RPMI 1640 + 20% FCS bei 4°C gewaschen. Mit diesen Waschvorgängen ließ sich die Konzentration des cytotoxischen Dimethylsulfoxids auf unter 0,1% des ursprünglichen Wertes senken. Nach der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes, dem Vitalitätstest und der Vorkultivierung in komplettem Medium mit 1,3 mM Ca^{2+} für 60 min wurden die Gewebepartikeln von zwei Spendern und teilweise vom dritten Spender im o.g. Mikroperifusionssystem funktionell geprüft. Der verbliebene Teil des Gewebes des dritten Spenders wurde in komplettem Medium mit 0,42 mM Ca^{2+} für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und erst dann *in vitro* getestet.

3.10.3 *In-Vitro*-Funktion von mikroverkapseltem Nebenschilddrüsengewebe

Nach der mechanischen Präparation (n=4 Spender) bzw. der enzymatischen Präparation (n=2 Spender), der Mikroverkapselung und der Inkubation im Brutschrank (komplettes Medium mit 1,3 mM bzw. 1,62 mM Ca^{2+} ; 37°C, 5% CO_2 , 24 h) wurden Perfusionen (s.o.) der mikroverkapselten Gewebepartikeln und Zellcluster/Einzelzellen durchgeführt. Die Gewebepartikeln eines Spenders wurden für 3 Tage kultiviert, erst am dritten Tag mikroverkapselt, sodann für weitere 3 Tage kultiviert (komplettes Medium mit 0,42 mM Ca^{2+} ; 37°C, 5% CO_2) (Abb. 3) und am 6. Tag funktionell analysiert (s. Kapitel 4.4.2).

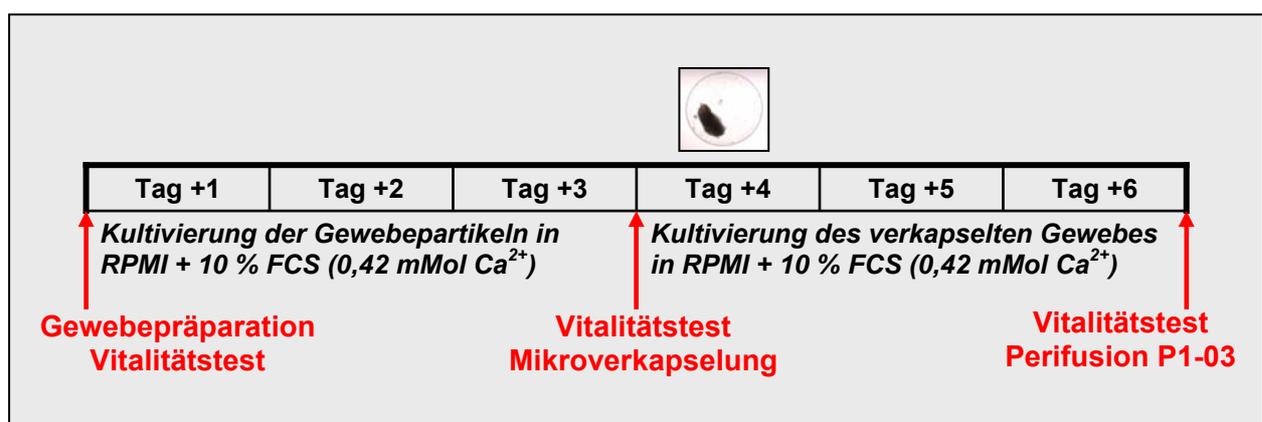


Abb. 3: Schematische Darstellung des Experimentes in 4.4.2. Nach der Kultivierung der mechanisch zerkleinerten Gewebepartikeln (für 3 Tage) und der Mikro kapseln (für weitere 3 Tage) wurden *In-Vitro*-Funktion und Vitalität des hyperplastischen Gewebes getestet.

3.11 Bestimmung des Parathormons

Der Gehalt an intaktem Parathormon (PTH) in den Perifusionsproben wurde mit dem IMMUNLITE 2000 PTH Intakt Assay (DPC Biermann GmbH; Bad Nauheim) gemessen. Nach Beschreibung der Hersteller handelt es sich hierbei um einen Festphasen-, sequestriellen Zweischritt-Chemilumineszenz-, Immuno-Assay, der im Labor der Abteilung für Endokrinologie (Leiter: Prof. Dr. B. Allolio) der Medizinischen Universitätsklinik etabliert ist. Der Assay basiert auf der Bindung eines Antikörpers an der Festphase gegen die C-terminale Region (44-84-PTH) des PTH sowie der Bindung eines Enzym-markierten Antikörpers gegen den N-Terminus (1-34-PTH) des PTH. So lässt sich intaktes Parathormon quantitativ nachweisen.

3.12 Mechanische Stabilität der Barium-Alginat-Mikrokapseln

Die mechanische Stabilität der Barium-Alginat-Mikrokapseln wurde mit dem *osmotic pressure test* geprüft [15]. Um den Einfluss der Zellzahl in den Mikrokapseln zu untersuchen, wurden zunächst porcine Milzzellen mittels Siebpassage (Maschenweite 150 µm) aus Milzen des Schweins isoliert. Danach wurden die Zellen durch ein engeres Sieb (Maschenweite 70 µm) geschickt und 3x mit PBS-Puffer gespült. Nach der Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Kammer wurden die Zellen routinemäßig mit Ba²⁺-Alginat (10⁵ und 10⁶ Zellen/ml Alginat) verkapselt. Anschliessend wurde die mechanische Stabilität der leeren Kapseln mit der Stabilität von Kapseln, die eine unterschiedliche Anzahl Zellen enthielten, verglichen. Der *osmotic pressure test* basiert auf osmotischem Quellen der Barium-Alginat-Mikrokapseln in hypoosmotischer Lösung: 100 µl Mikrokapseln wurden zunächst in 500 µl serumfreiem Medium RPMI 1640 (Fa. CellConcepts; Umkirch) mit 70 µl Trypanblau-Lösung versetzt. Danach wurde der Überstand abpipettiert und die hypoosmotische Lösung in Form von A. dest. zu den Kapseln gegeben. Nach Inkubation für 24 h bei 24°C wurden die Mikrokapseln unter dem Lichtmikroskop auf ihre mechanische Stabilität untersucht (Bestimmung der Anzahl noch intakter Kapseln) sowie auf Vergrößerung ihres mittleren Durchmessers. Nach dem gleichen Verfahren wurde auch der Einfluss der Nebenschilddrüsen-Zellcluster auf mechanische Stabilität der Mikrokapseln geprüft.

3.13 Lichtmikroskopische Auswertung und Fotodokumentation

Die lichtmikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation erfolgten mit einem BX50 Mikroskop (Fa. Olympus; Hamburg) und der digitalen Kamera ColorView12 (Fa. Olympus) unter Zuhilfenahme der Software analySIS® (Soft Imaging System; Münster).

4 Ergebnisse

4.1 Morphologische und physiologische Untersuchungen des Spendergewebes

Für die humane Transplantation der Nebenschilddrüsen steht grundsätzlich krankhaft verändertes Gewebe zur Verfügung, welches bei primärem oder sekundärem Hyperparathyreoidismus operativ entfernt wird und mittels Kryokonservierung für längere Zeit gelagert werden kann. Vorbedingungen für eine erfolgreiche Transplantation sind aber eine regulierbare, d.h. kalziumabhängige Funktion und eine hohe Viabilität des Transplantates. Daher wurde das Gewebe hinsichtlich seiner Eignung für eine spätere allogene Transplantation mit morphologischen und physiologischen Parametern untersucht.

4.1.1 Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen des Spendergewebes

Mit der makroskopischen Untersuchung des Spendergewebes wurde zunächst sondiert, ob sich die operativ entfernten Nebenschilddrüsen für eine Transplantation eignen. In Abb. 4 ist eine Nebenschilddrüse dargestellt, die anschliessend für eine *In-Vitro*-Untersuchung verwendet wurde (s. Kapitel 4.4.1, P5-02).

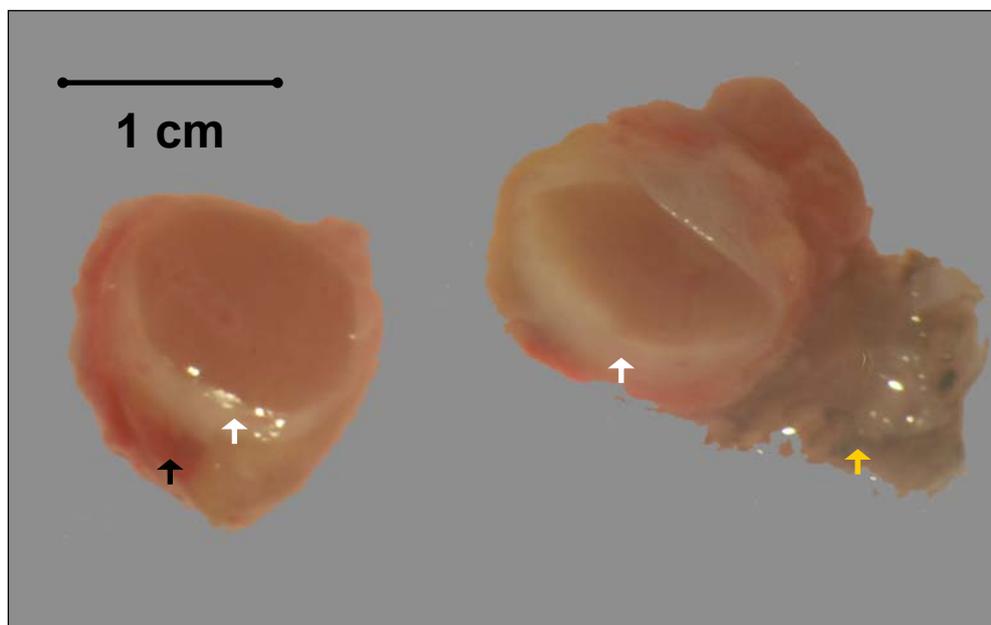


Abb. 4: Eine aufgeschnittene humane Nebenschilddrüse ex vivo (sekundärer Hyperparathyreoidismus). Die Drüse ist wegen einer sekundären Hyperplasie vergrössert (im Original ca. 19x23x26 mm gross). Das angrenzende Fettgewebe (gelber Pfeil), die Fibrosekapsel (weisse Pfeile) und das Gewebe mit den blutunterlaufenen Stellen (schwarzer Pfeil) werden vor Versuchsbeginn präparativ entfernt.

Mit der mikroskopischen, bzw. histologischen Untersuchung sollte die klinische Diagnose des sekundären Hyperparathyreoidismus bestätigt werden (Abb. 5 und Abb. 6). Damit lassen sich auch die nekrotischen und die hämorrhagischen Zonen als Folge der Gewebhyperplasie bzw. des chirurgischen Eingriffs nachweisen. Derartiges Gewebe wurde nicht für die folgenden Versuche verwendet. Mit der Histologie wurde auch das Verhältnis von Fett- und Bindegewebe zum endokrinen Gewebe abgeschätzt (Abb. 5).

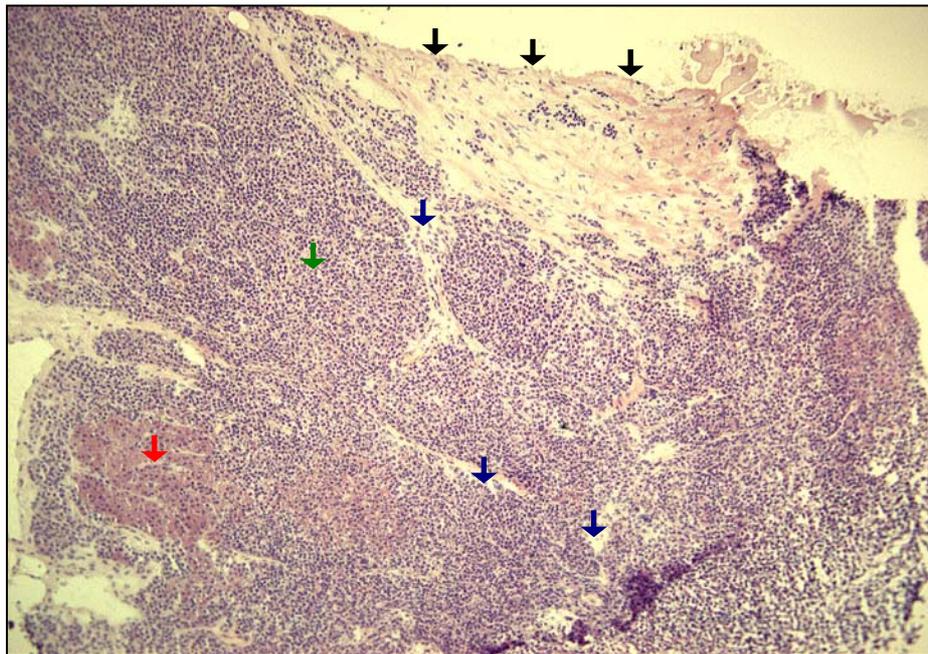


Abb. 5: Lichtmikroskopische Darstellung eines Epithelkörperchens (humanes Gewebe, sekundärer Hyperparathyreoidismus): Fibrosekapsel (schwarze Pfeile); Fett- und Bindegewebe (blaue Pfeile); Epithelzellhaufen aus oxyphilen Zellen (roter Pfeil); Epithelzellstränge aus den Hauptzellen (grüner Pfeil); Färbung mit Hämalaun-Eosin; 10x.

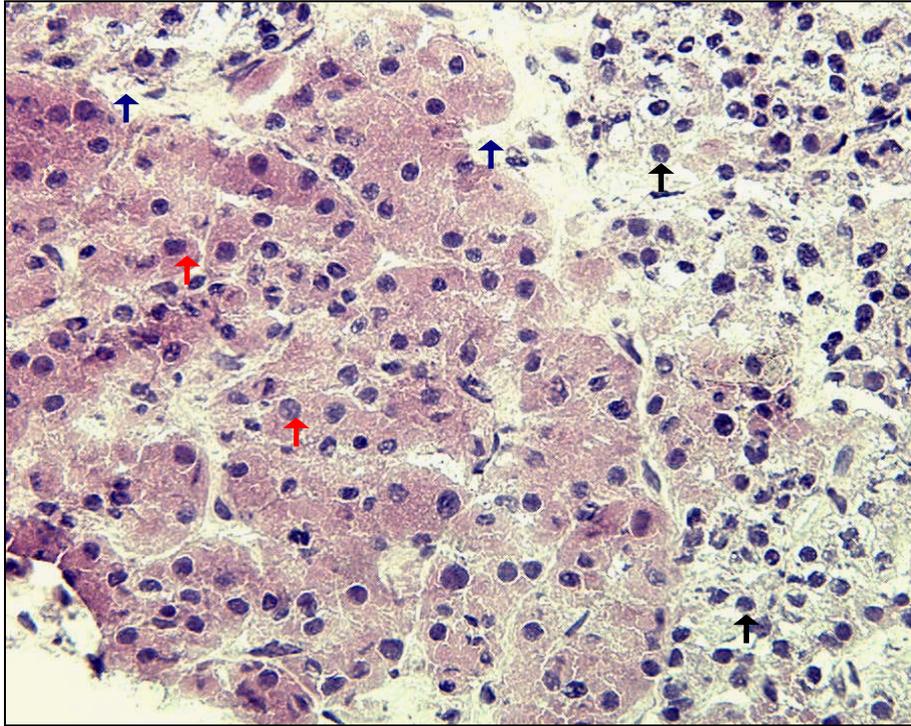


Abb. 6: Lichtmikroskopische Darstellung eines Epithelkörperchens in stärkerer Vergrößerung (humanes Gewebe, sekundärer Hyperparathyreoidismus): Polygonale Hauptzellen (schwarze Pfeile); stark azidophile oxyphile Zellen (rote Pfeile), die grösser sind als die Hauptzellen; Bindegewebe mit dem Kapillarnetz (blaue Pfeile); Färbung Hämalaun-Eosin; 40x.

4.1.2 *In-Vitro*-Funktion von frischem hyperplastischem humanem Nebenschilddrüsengewebe

Untersucht wurde humanes Nebenschilddrüsengewebe, das im Rahmen von Operationen wegen eines sekundären Hyperparathyreoidismus entfernt wurde. Nach der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes unter dem Dissektionsmikroskop und dem Vitalitätstest wurden die Gewebepartikel (ca. 300-500 μm) im Mikro-Perifusionssystem (s. Kapitel 3.10) kontinuierlich mit Medium, welches verschiedene Kalziumkonzentrationen aufwies, umspült. In regelmässigen Abständen wurden Proben aus den Perifusionslösungen entnommen und der Gehalt des intakten Parathormons mit dem Chemilumineszenz-Immuno-Assay (s. Kapitel 3.11) bestimmt. Ein typisches Perifusionsexperiment zur Untersuchung der *In-Vitro*-Funktion von frischem, hyperplastischem humanem Nebenschilddrüsengewebe ist in Abb. 7 dargestellt.

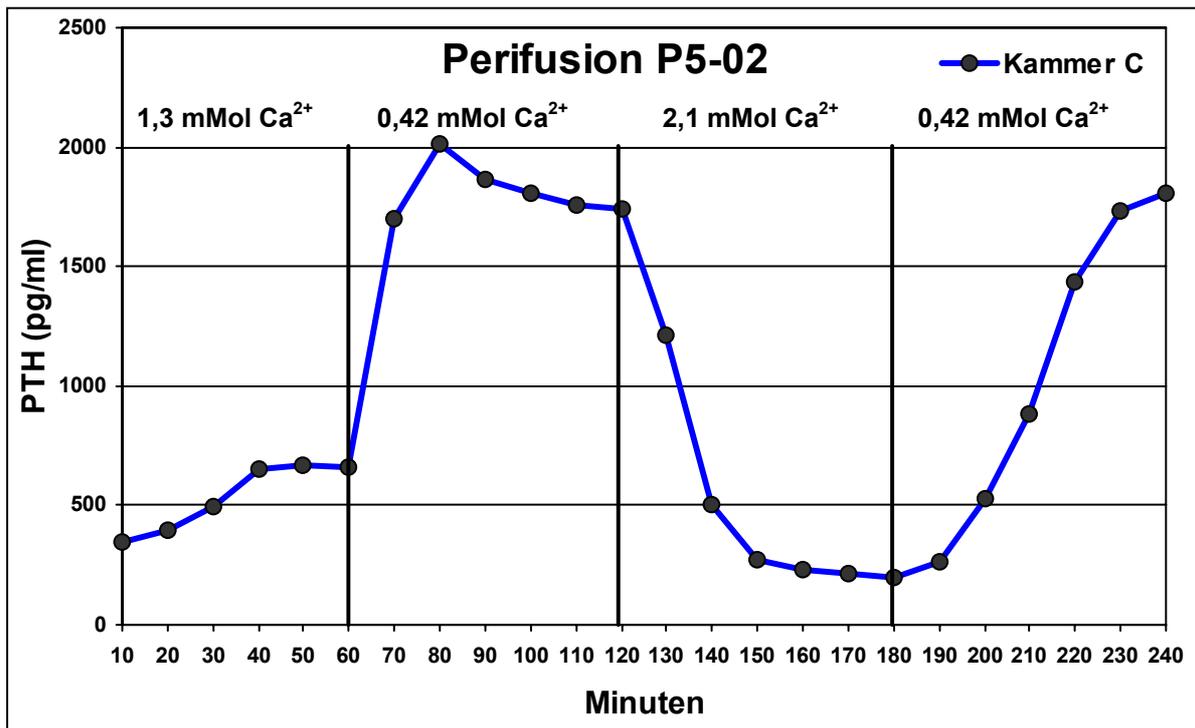


Abb. 7: Dynamische Parathormon(PTH)-Ausschüttung *in vitro* als Folge erniedrigter bzw. erhöhter Ca^{2+} -Konzentration im Perifusionsmedium (frisches humanes Gewebe, sekundärer Hyperparathyreoidismus).

Es zeigte sich, dass es eine adaptierte kalziumabhängige Funktion des hyperplastischen Nebenschilddrüsengewebes gibt. Nach 20-minütiger Stimulation mit der niedrigen Kalziumkonzentration im Medium ist ein 3-facher Anstieg des PTH-Gehaltes sichtbar. Nach Perifusion im Medium mit erhöhtem ionisiertem Kalzium lässt sich eine tiefe Suppression der PTH-Sekretion nachweisen (ca. 7,3-facher Abfall im Vergleich mit dem Sekretions-Maximum). Es dauert ca. 30 Minuten, um dieses Niveau zu erreichen. Am Ende der Perifusion, nach 4 Stunden, bewahren die Gewebepartikel unverändert ihre gute Funktion (s. Abb.7) und ihre Vitalität (Daten nicht gezeigt).

4.1.3 *In-Vitro*-Funktion von kryokonserviertem humanem Nebenschilddrüsengewebe

Um den Einfluss der Kryokonservierung von Nebenschilddrüsengewebe auf die Sekretionsdynamik des Parathormons zu untersuchen, wurden weitere Perifusionsversuche durchgeführt: Das im Jahr 1998 kryokonservierte Nebenschilddrüsengewebe wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, mit RPMI Medium gespült und mechanisch zerkleinert. Nach der Bestimmung seiner Viabilität wurden die so vorbereiteten Gewebepartikel halbiert: Der eine Teil wurde für die Perifusion verwendet, der zweite Teil wurde in RPMI Medium + 10% FCS

bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach der 24-stündigen *In-Vitro*-Kultur wurde die Ausschüttung des Parathormons gemessen. Abbildung 8 zeigt den Einfluss der Kryokonservierung auf die Funktion des Gewebes nach dem Auftauen. Danach ist eine dynamische, d. h., regulierbare Funktion nicht zu beobachten.

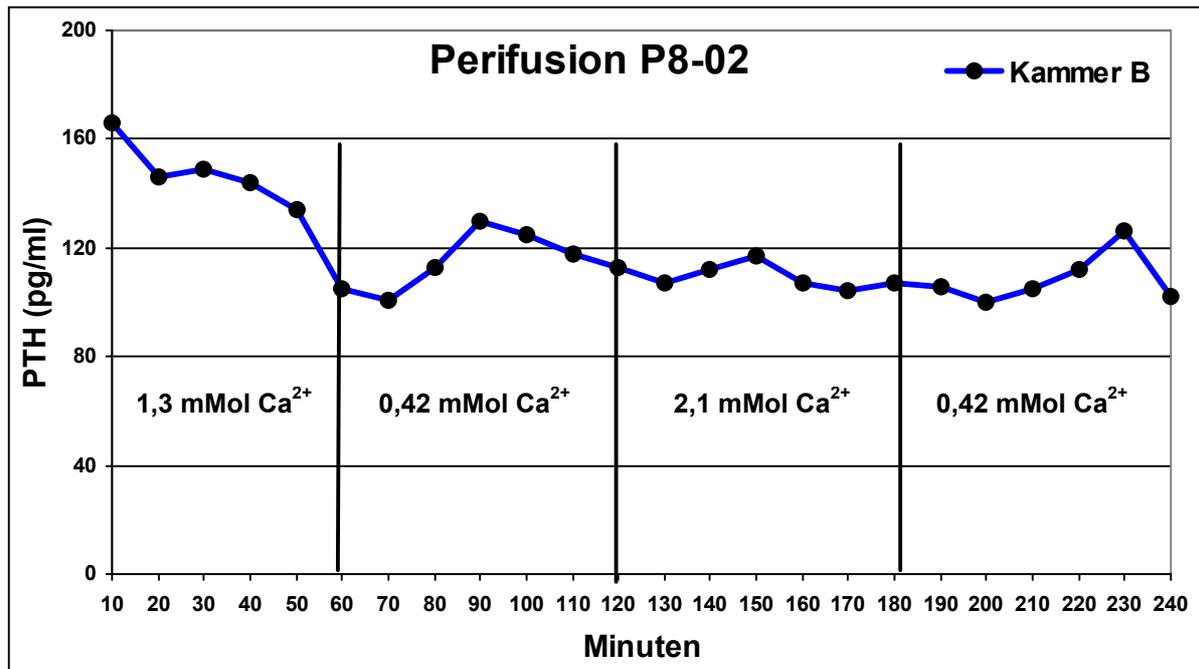


Abb. 8: Basale Sekretion des Parathormons (PTH) von kryokonserviertem Nebenschilddrüsengewebe unmittelbar nach dem Auftauen. Eine regulierbare Funktion des Gewebes ist nicht erkennbar.

Innerhalb der 24-stündigen *In-Vitro*-Kultur wurde jedoch die kalziumabhängige Funktion des Gewebes wieder hergestellt. Abbildung 9 dokumentiert die dynamische Ausschüttung des Parathormons. Der Abfall des PTH-Gehaltes während der ersten 40 Minuten der Perifusion deutet an, dass die Gewebepartikel im Medium mit einem niedrigeren Gehalt des ionisierten Kalziums (0,42 mMol) vorinkubiert wurden.

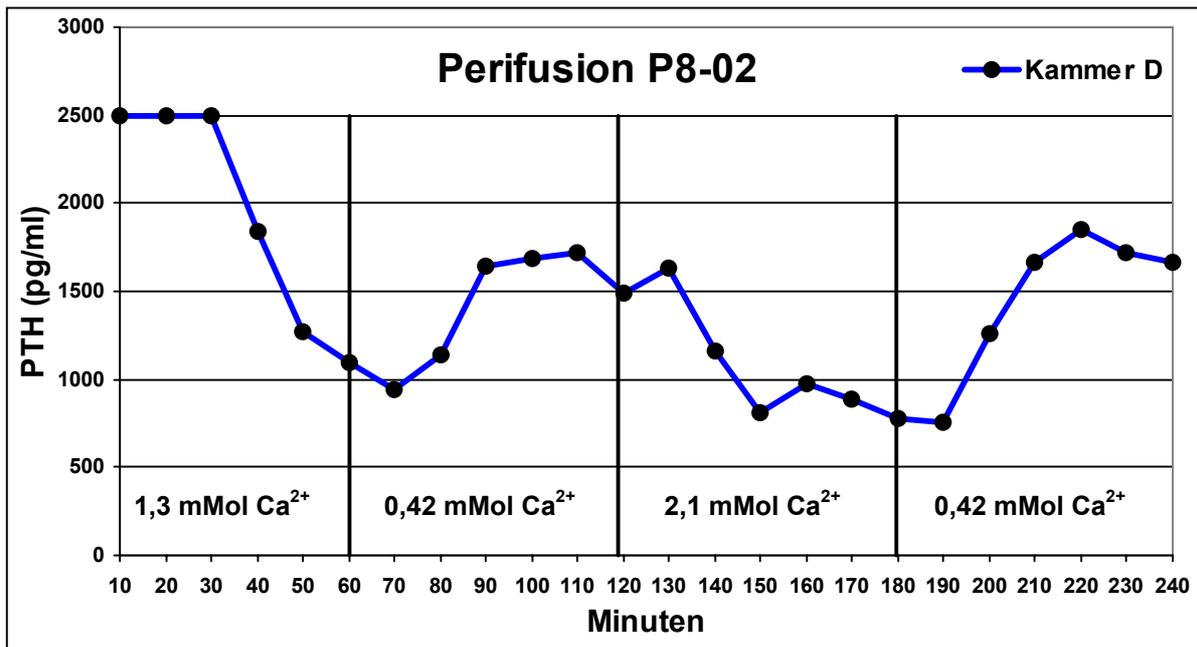


Abb. 9: Dynamische Ausschüttung des Parathormons (PTH) aus kryokonserviertem humanem Nebenschilddrüsengewebe nach dessen Auftauen und einer 24-stündigen *In-Vitro*-Kultur.

4.2 Untersuchungen zur Optimierung der Gewebepräparation

Da die Versorgung des Spendergewebes nach der Mikroverkapselung mit Barium-Alginat (s. u.) über Gefäßverbindungen nicht möglich ist, muss das Transplantat per diffusionem mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Um die Diffusionsstrecken so gering wie möglich zu halten und damit das Überleben des Transplantates zu verbessern, bestand ein Ziel darin, das Nebenschilddrüsengewebe ohne den Verlust der Viabilität und der Funktion zu zerkleinern. Drei unterschiedliche Methoden, (1) die mechanische Zerkleinerung unter dem Dissektionsmikroskop, (2) die Gewebepassage durch ein Sieb und (3) die enzymatische Digestion des Gewebes mittels Kollagenase wurden hierzu vergleichend untersucht.

4.2.1 Mechanische Gewebezerkleinerung unter dem Dissektionsmikroskop

Bei der humanen Autotransplantation und der überwiegenden Mehrheit experimenteller Allo- und Xenotransplantationen des Nebenschilddrüsengewebes verwendet man die mechanische Zerkleinerung des Spendergewebes unter dem Dissektionsmikroskop [8-10]. Damit lassen sich Grösse und Form der Partikeln beliebig verändern, ohne dass die Gewebeintegrität größeren Schaden erleidet. Untersucht wurde der Einfluss dieses mechanischen Zerkleinerungsprozesses auf die Viabilität und die Funktion des späteren Transplantates. Dazu wurden die frischen Nebenschilddrüsen von verschiedenen Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoi-

dismus mit mikrochirurgischem Instrumentarium und Skalpell entsprechend bearbeitet (s. Kapitel 3.4.3). Die Präparationszeit betrug ca. 50-90 Minuten. Anschließend wurden die Gewebestückchen mittels Trypanblau und Fluoreszein-Diacetat/Propidium-Jodid (FDA/PI) auf ihre Vitalität geprüft. Abbildung 10 zeigt deutlich, dass diese Methode der Gewebezerkleinerung das Gewebe traumatisiert. Ein „Kranz“ toter Zellen umgibt die Peripherie der Gewebepartikeln als Folge des mechanischen Schadens. Der Vitalitätsverlust beträgt schätzungsweise 5-40%. Dieser Wert steigt mit zunehmender Präparationsdauer und abnehmender Partikelgröße stetig an. Da die toten Zellen Parathormon in das umgebende Medium ausschütten, kommt es unmittelbar nach der Gewebezerkleinerung zum kräftigen Anstieg des PTH-Wertes in der Perfusion (Daten nicht gezeigt). Ausgehend von dieser Beobachtung wurden die Gewebepartikel vor dem eigentlichen Funktionstest in der Perfusion für 60 Minuten *in vitro* kultiviert (s. Kapitel 3.10.1), um so die PTH-Ausschüttung aus dem nekrotischen Gewebe zu verringern. Nach dieser kurzen Phase der *In-Vitro*-Kultur ist eine normal regulierbare PTH-Sekretion erkennbar (vergl. dazu Abb. 7).

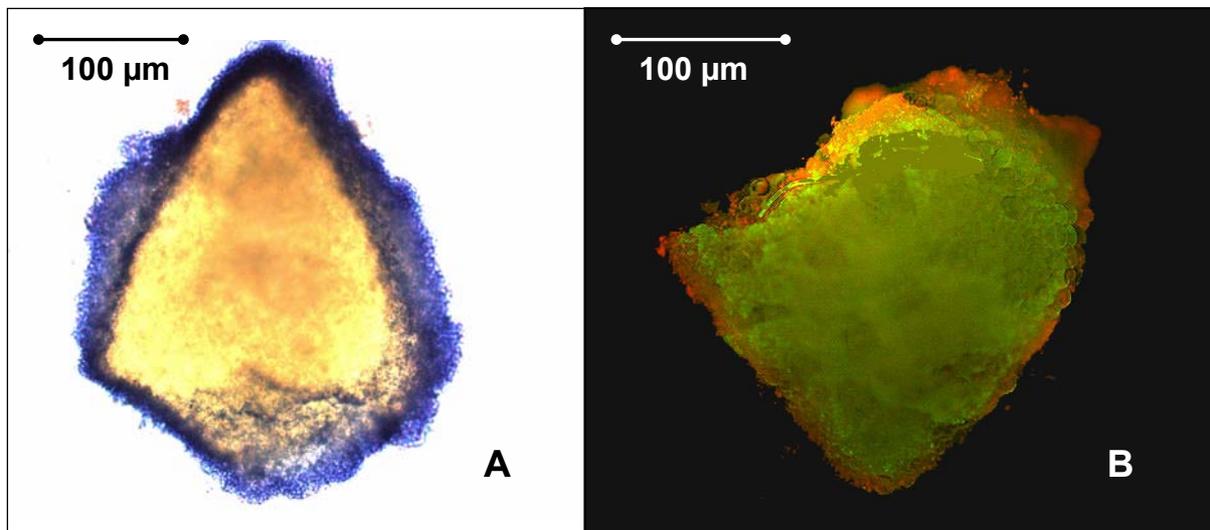


Abb. 10: Vitalität von frischem humanem Nebenschilddrüsengewebe (sekundärer Hyperparathyreoidismus) unmittelbar nach mechanischer Zerkleinerung mit mikrochirurgischem Besteck und Skalpell unter dem Dissektionsmikroskop. Zum Nachweis von lebenden bzw. toten Zellen wurden die so gewonnenen Gewebepartikel in Trypanblau (A) und FDA/PI (B) inkubiert. Die blau und rot gefärbten Areale an der Peripherie der Partikeln zeigen einen „Kranz“ toter Zellen als Folge des mechanischen Traumas; die grüne Fluoreszenz hingegen überwiegend vitale Zellen im Zentrum der Partikeln (B).

4.2.2 Mechanische Gewebezerkleinerung mittels Siebpassage

Um die Prozedur der mechanischen Gewebezerkleinerung zu beschleunigen und gleichmässig grosse Partikeln von weniger als 500 μ m zu gewinnen, wurde das frische humane Nebenschilddrüsengewebe durch ein Sieb mit 350 μ m Maschenweite passiert (s. Kapitel 3.4.4) und mit der Trypanblau-Färbung (s. o.) auf seine Vitalität überprüft. Das Ergebnis war enttäuschend. Obwohl man mit dieser Methode die gewünschten gleich grossen Gewebebröckchen (ca. 10-200 Zellen pro Bröckchen) und Gewebepartikeln von weniger als 500 μ m herstellen konnte, verringerte sich deren Vitalität auf nur noch 40-60 % (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 Enzymatische Gewebezerkleinerung mit Kollagenase

Da das mechanische Trauma eine negative Wirkung auf die Vitalität der Zellen ausübte, wurde die enzymatische Zerkleinerung des Gewebes erprobt. Dazu wurde die Kollagenase Typ II in der Konzentration 1,2 mg pro 1 ml Medium (DMEM-F-12) verwendet (s. Kapitel 3.4.5). Die Verdauungszeit betrug 40-120 Minuten und hing von der Gewebequalität ab. Um die Digestion zu kontrollieren, wurden die Gewebepartikeln makroskopisch beobachtet. Ausserdem wurden Proben von je 100 μ l zur mikroskopischen Prüfung der Vitalität (Trypanblau Färbung, s. o.) und der Verdauungsqualität, d. h. der Grösse der Zellbrocken, erstmalig nach 40 Minuten und später jede 10 Minuten entnommen. Um den enzymatischen Schaden der einzelnen Zellen und der kleinen Zellbrocken zu verringern, wurden diese nach 30 Minuten Verdauung abgesondert und in Medium plus 10% FCS aufgenommen. Mit dieser Technik liessen sich sowohl einzelne Nebenschilddrüsenzellen als auch Zellcluster unterschiedlicher Grösse (von 2-10 Zellen pro Cluster bis zu 200-300 μ m grossen Cluster) isolieren. Deren Vitalität betrug 65-90 % und hing von der Gewebequalität und der Verdauungszeit ab. Mit zunehmender Dauer der Digestion nahm die Anzahl der toten Zellen zu. Den grössten Vitalitätsverlust erlitten hauptsächlich die Einzelzellen. In der Peripherie der Gewebepartikeln wurden keine nekrotischen Zonen beobachtet (Abb. 11). Im Vergleich zu frischem Gewebe waren die Ergebnisse mit kryokonserviertem Gewebe insgesamt deutlich schlechter.

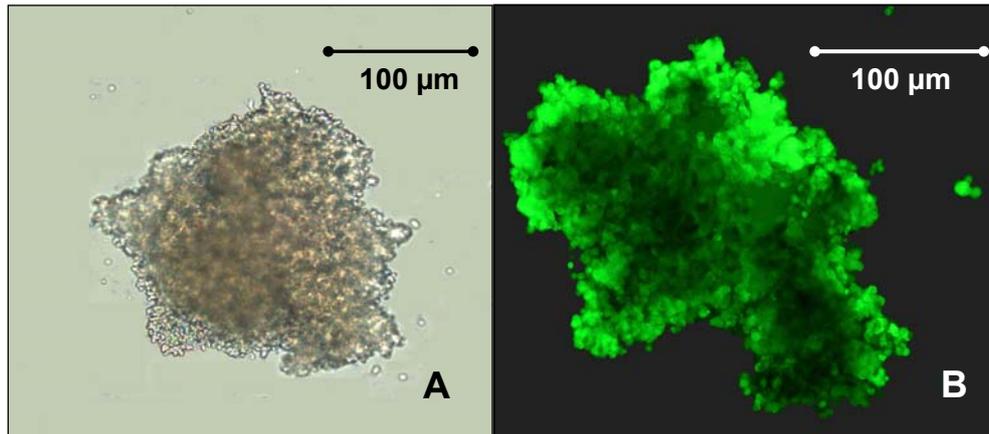


Abb. 11: Vitalität von frischem humanem Nebenschilddrüsengewebe (sekundärer Hyperparathyreoidismus) unmittelbar nach enzymatischer Digestion mit Kollagenase. Nach Inkubation der Partikeln in Trypanblau (A) bzw. in FDA/PI (B) ist hier keine dunkelblaue Färbung (A) bzw. rote Fluoreszenz (B) in der Peripherie der Partikeln zu erkennen, d.h., es gibt keine toten/nekrotischen Zellen.

4.3 Untersuchungen zur optimalen Methode der Mikroverkapselung des Nebenschilddrüsengewebes

Obwohl bereits experimentelle und sogar klinische Transplantationen mit mikroverkapseltem Nebenschilddrüsengewebe durchgeführt worden sind, war die Überlebenszeit der Transplantate, trotz der guten Biokompatibilität der zur Mikroverkapselung verwendeten Alginat, in den meisten Fällen begrenzt. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auch auf die noch unzureichende Verkapselungsqualität zurückzuführen. Da die inadäquate Ummantelung des Gewebes mit dem Polymer, hierfür wird auch der Begriff *Immunisolation* verwendet, das Risiko der Fibrose um die Kapseln verstärkt und die Chancen für eine langfristige Funktion des Transplantates *in vivo* reduziert, wurden im Folgenden jene Faktoren, welche die Qualität der Mikroverkapselung beeinflussen, definiert.

4.3.1 Mikroverkapselung der Gewebepartikeln

Nach der Präparation der Gewebepartikeln (s. Kapitel 4.2.1) wurden Ba²⁺-Alginatkapseln mit der Zweikanaldüse hergestellt (s. Kapitel 3.8). Die Kapselgröße war abhängig von dem Luftstrom, von der Durchflussgeschwindigkeit des Alginates, der Alginattemperatur, der Alginatviskosität und dem Düsendurchmesser. Um die Verkapselungsparameter zu standardisieren, wurden zunächst leere Kapseln bei konstanten Parametern produziert (s. Kapitel 3.7). Die leeren Kapseln waren transparent und gleichmässig geformt. Durch die Veränderung des Luftstromes von 3 auf 1,5 l/min liess sich der Kapseldurchmesser von 500 auf 1.500 µm vergrössern. Bei der mikroskopischen Inspektion der mikroverkapselten Nebenschilddrüsenpartikeln

konnte man feststellen, dass die Verkapselungsqualität entscheidend von der Qualität der Gewebepräparation abhing. In Abbildung 12 beispielsweise wurde die defekte längliche Kapsel als Folge des unproportionalen Verhältnisses zwischen der Grösse des Gewebebrocks und dem zuvor definierten Kapselvolumen gebildet. Da aber Gewebepartikeln unmittelbar nach ihrer Präparation aneinander haften können, sind solche grossvolumigen unperfekten „Mikrokapseln“ sogar nach optimaler Gewebezerkleinerung nachweisbar.

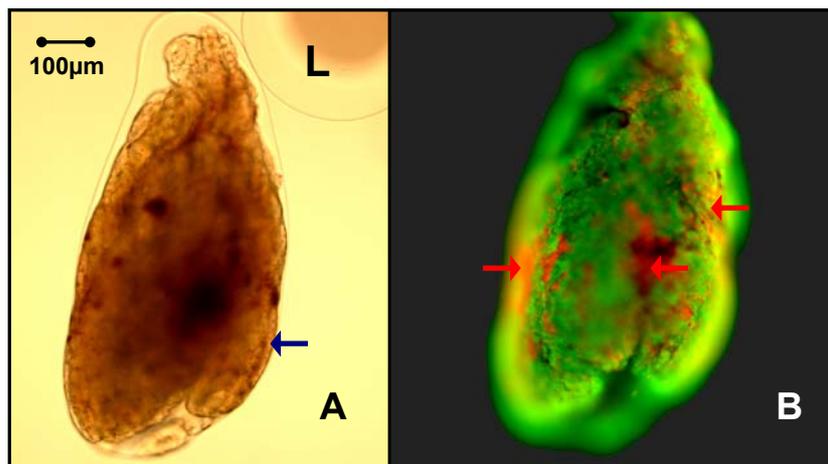


Abb. 12: (A) Eine längliche defekte Kapsel als Folge einer unangemessenen Gewebepräparation ist hier dargestellt. Ein Bereich unverkapselten Gewebes (blauer Pfeil) und ein Fragment einer leeren Kapsel (L) sind deutlich sichtbar. (B) FDA/PI-Färbung des mikroverkapselten Gewebebrocks. Sichtbar ist auch eine rote Fluoreszenz (rote Pfeile), die nekrotische Zonen in der Peripherie des Gewebes als Folge des mechanischen Traumas andeutet.

Nach Optimierung der Mikroverkapselungstechnik verringerte sich die Anzahl der Kapseln mit partiell unverkapseltem Gewebe (Abb. 13C) von ca. 50 % auf nur noch 4-8 %. Gleichmässige runde Kapseln, die 1-5 Gewebebrocken enthielten (Abb. 13A und B) waren gut erkennbar. Ein Vitalitätsverlust während der Mikroverkapselung wurde nicht beobachtet. Die Anzahl der leeren Kapseln betrug schätzungsweise 30-60%.

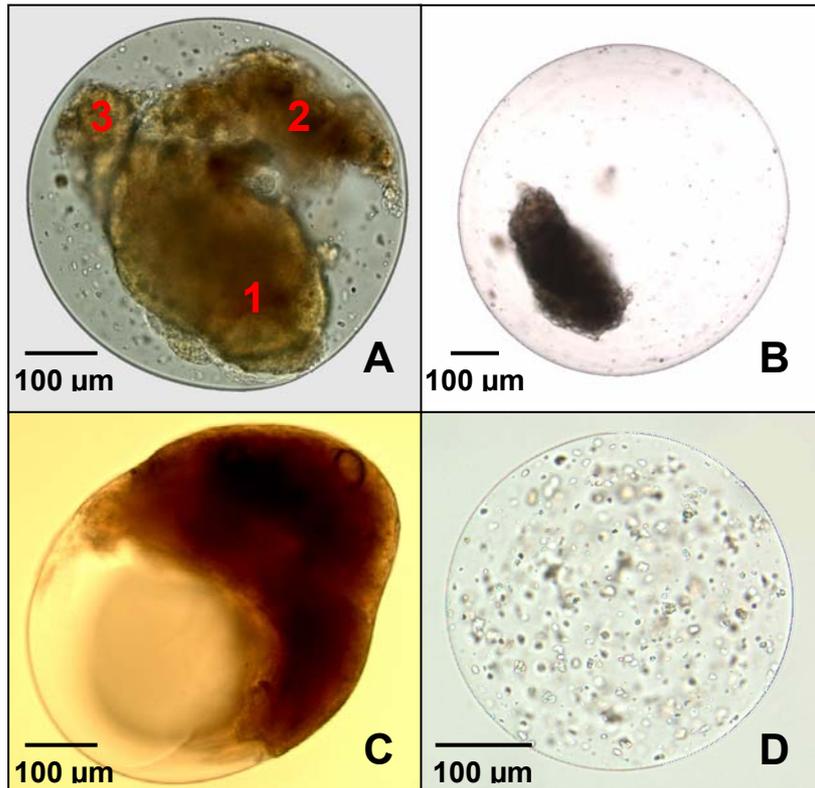


Abb. 13: Mikroverkapselte Gewebepartikeln (A-C) und Einzelzellen (D). (A) Die Kapsel enthält drei Gewebebrocken; „nackte“, d. h., unverkapselte Gewebezonen sind hier nicht erkennbar. (B) Ein Gewebepartikel richtet sich exzentrisch in der Kapsel aus. (C) Grosse Teile des Gewebes bleiben hier unverkapselt, obwohl die Partikelgrösse zum Kapselvolumen passen dürfte. (D) Mikroverkapselte Einzelzellen und kleine Bröckchen. Hier ist die Verkapselung komplett.

4.3.2 Mikroverkapselung von Einzelzellen und kleinen Zellclustern

Als Folge der erfolgreichen enzymatischen Digestion waren nun Nebenschilddrüsen-Einzelzellen und kleinere Zellcluster alternativ zu den sehr viel grösseren Gewebepartikeln für die Mikroverkapselung verfügbar. Die „Verpackung“ der Zellen und Zellcluster, d. h. die Anzahl der Zellen/Cluster pro 1 ml Alginat und die mittlere Grösse der Kapseln sind mit unserer Verkapselungstechnologie beliebig regulierbar. So hergestellte Mikro kapseln waren in hohem Masse gleichförmig (Abb. 14A), die mikroverkapselten Zellen/Cluster verteilten sich sehr gleichmässig in der Kapsel und der Anteil deformierter Mikro kapseln betrug weniger als 4% nach dieser Herstellungsmethode (s. Kapitel 3.9). Eine Vitalitätsverschlechterung mit diesem Verfahren wurde nicht beobachtet (Abb. 14B). Alle Mikro kapseln enthielten lebende Zellen/Cluster, d. h. es bildeten sich keine leeren Mikro kapseln.

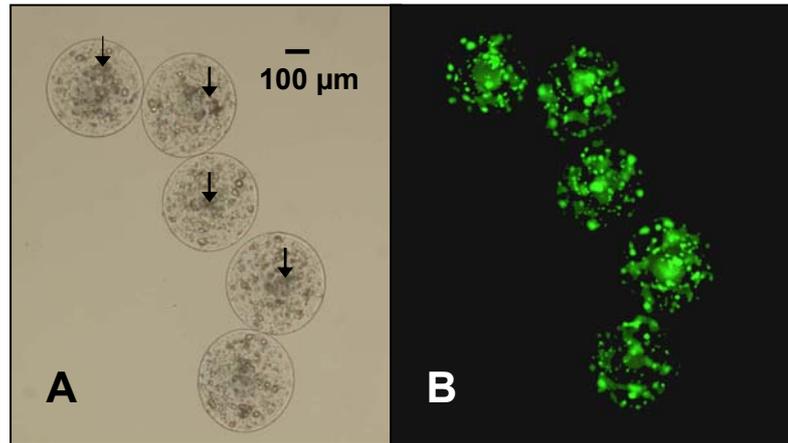


Abb. 14: A. Mikroverkapselte Nebenschilddrüsenzellen und Zellcluster (schwarze Pfeile). Die Kapseln sind gleichförmig und gleichmässig gefüllt. Leere Kapseln sind nicht erkennbar. B. Vitalitätsfärbung mit FDA/PI; (frisches humanes Nebenschilddrüsengewebe, sekundärer Hyperparathyreoidismus).

Dennoch, trotz der sehr guten Qualität der mikroverkapselten Einzelzellen, kann man vereinzelt Zellen in der Peripherie erkennen, die nicht komplett verkapselt sind (Abb. 15).

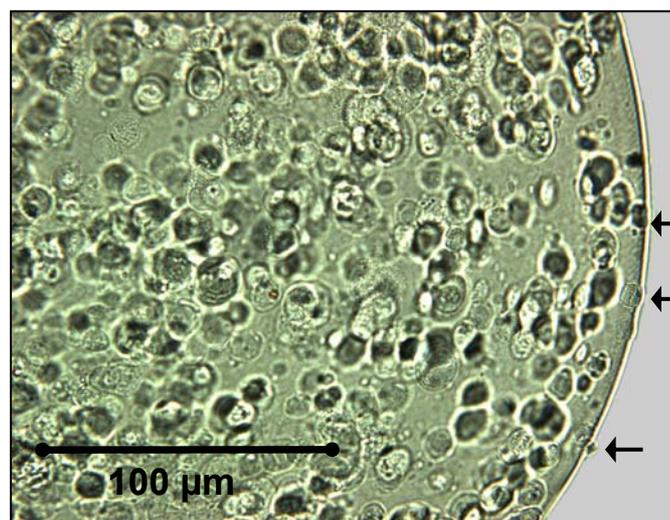


Abb. 15: Die Nebenschilddrüsenzellen und Zellcluster (ZK-5-03) verteilen sich gleichmässig in der Mikrokapself. Einzelne Zellen in der Kapselperipherie sind unvollständig vom Alginat umhüllt (Pfeile).

4.4 *In-Vitro*-Funktion des mikroverkapselten Nebenschilddrüsengewebes

Essentielle Vorbedingungen für die spätere klinische Verwendung „bioartifizierlicher“ Nebenschilddrüsen sind (1) ein adäquater Transport der Nährstoffe, des Sauerstoffs und der regulatorischen Stimuli ins Kapselinnere und (3) ein adäquater Transport des produzierten Hormons durch die Kapselmembran in das umgebende Gewebe. Wie sich die Mikroverkapselung auf die *In-Vitro*-Funktion des Nebenschilddrüsengewebes auswirkt, wurde im Folgenden untersucht.

4.4.1 Frisches mikroverkapseltes Nebenschilddrüsengewebe

Um mögliche funktionelle Unterschiede zwischen mikroverkapselten und „nackten“ Gewebepartikeln nachzuweisen, wurde das frische Nebenschilddrüsengewebe eines Spenders *in vitro* vergleichend untersucht. Da durch die Mikroverkapselung kein Vitalitätsverlust dokumentiert wurde (s. Kapitel 4.3.1) und deshalb keine zusätzliche Ausschüttung von PTH aus absterbenden Zellen zu erwarten war, lassen sich die Sekretionsdynamiken von mikroverkapselten (Abb. 16) und „nackten“ (s. Abb. 7) Gewebepartikeln gut miteinander vergleichen. Danach übte die Mikroverkapselung des Nebenschilddrüsengewebes keine negative Wirkung auf die PTH-Sekretionsdynamik aus. Sowohl ein etwa 2,6-facher Anstieg der PTH-Sekretion, als auch eine ca. 8,8-fache Suppression des PTH waren erkennbar. Am Ende des Experimentes war das mikroverkapselte Gewebe immer noch vital (FDA/PI-Färbung, Daten nicht gezeigt). Dieses Perifusionsergebnis wurde insgesamt mit Gewebe von vier verschiedenen Spendern reproduziert.

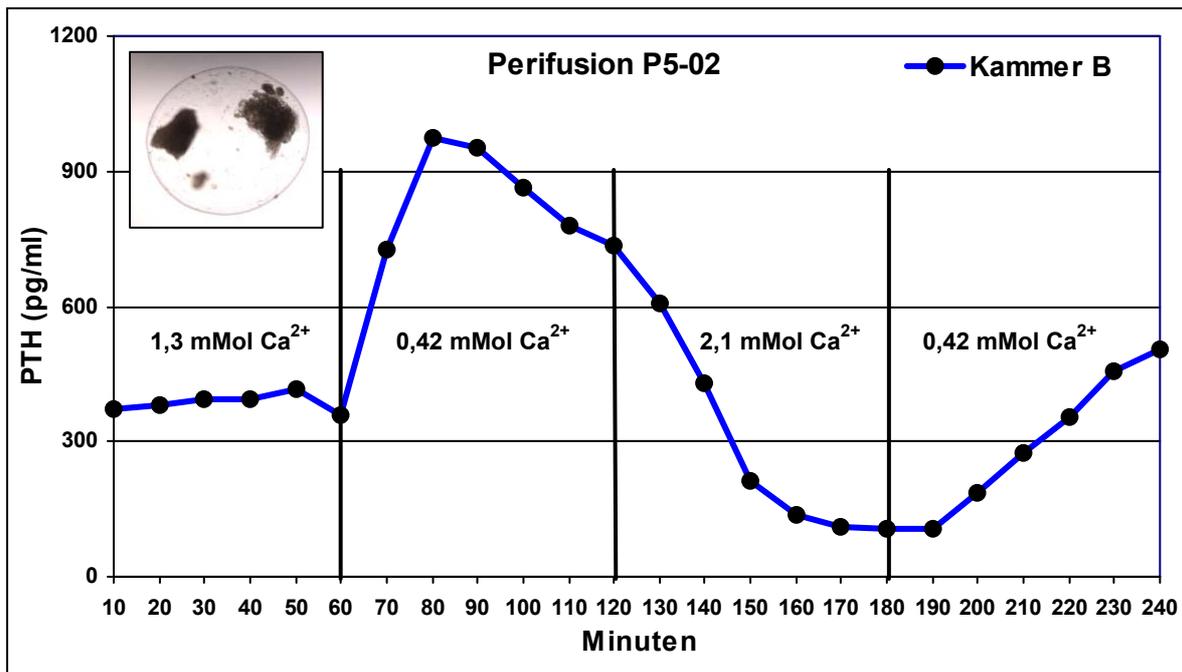


Abb. 16: *In-Vitro*-Funktion mikroverkapselter Gewebepartikeln (frisches humanes Nebenschilddrüsengewebe, sekundärer Hyperparathyreoidismus). Die PTH-Sekretion ist sehr gut regulierbar und entspricht der Sekretionsdynamik des unverkapselten Gewebes vom gleichen Spender (s. Abb. 7).

4.4.2 Kultiviertes mikroverkapseltes Nebenschilddrüsengewebe

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine *In-Vitro*-Kultur des Nebenschilddrüsengewebes die Immunogenität des Transplantates über eine Depletion der *passenger cells* reduzieren kann [77]. Unklar ist jedoch, ob die Viabilität, d. h. die Funktion der Zellen unter einer mehrtägigen *In-Vitro*-Kultur vor und nach der Mikroverkapselung leidet. Um diese Frage zu klären, wurden mikroverkapselte Gewebepartikeln von Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus untersucht. Unmittelbar nach der mechanischen Zerkleinerung betrug die Vitalität mittels FDA/PI-Färbung annähernd 80%. Anschliessend wurden die Partikeln für 3 Tage kultiviert, am dritten Tag mit Barium-Alginat mikroverkapselt und danach für 3 weitere Tage kultiviert. (Siehe schematische Darstellung des Experimentes und Kultivierungsbedingungen im Kapitel 3.10.3, Abb.3). Am sechsten Tag wurden Vitalitäts- und Funktionsteste durchgeführt; hier betrug die Vitalität des Gewebes immer noch ca. 75% (FDA/PI). Die Funktion der mikroverkapselten Gewebepartikeln nach der 6-tägigen Kultivierung ist in Abb. 17 dargestellt.

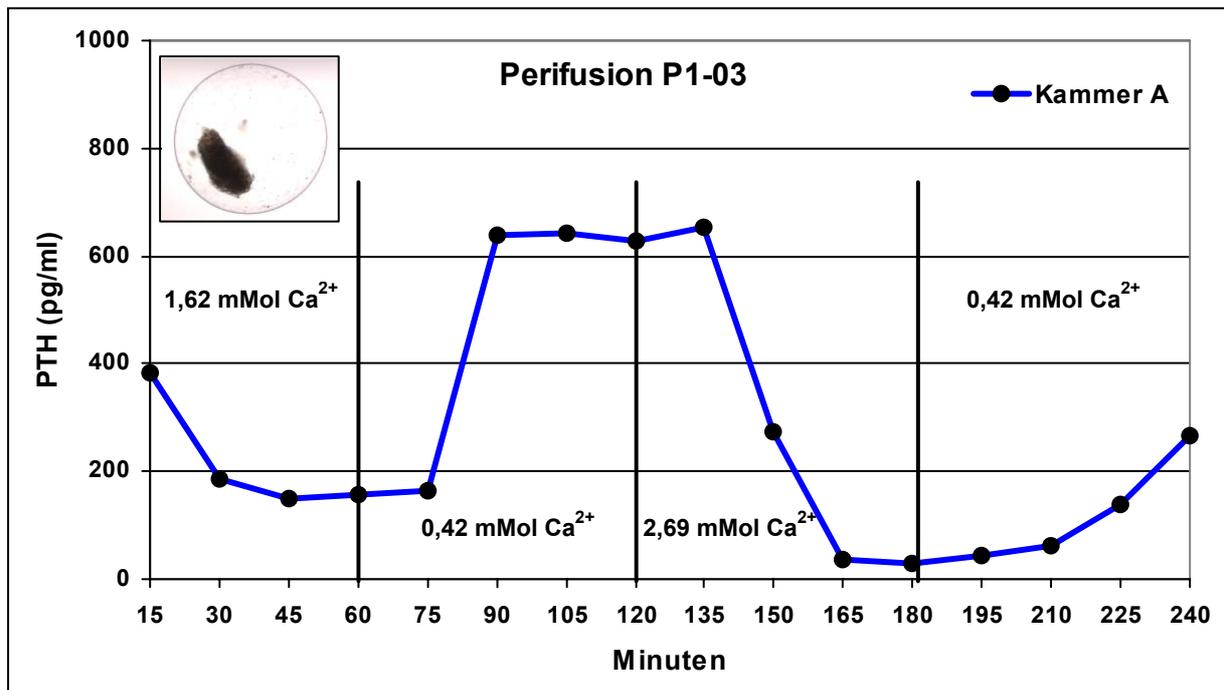


Abb. 17: *In-Vitro*-Funktion der Gewebepartikeln nach 3-tägiger *In-Vitro*-Kultur des frischen humanen Nebenschilddrüsengewebes (sekundärer Hyperparathyreoidismus), anschliessender Mikroverkapselung und weiterer 3-tägiger *In-Vitro*-Kultur. Erkennbar ist ein Sekretionsabfall während ersten 30 Minuten als Folge der Vorinkubierung in einem Medium mit niedrigerem Kalziumniveau. Weitere Unterschiede in der Sekretionsdynamik zu Gewebepartikeln, die nicht vorinkubiert wurden, sind nicht nachweisbar.

Eine gut regulierbare kalziumabhängige Funktion des Transplantates war sichtbar. Ein negativer Einfluss der 6-tägigen *In-Vitro*-Kultur auf die anschliessende Sekretion des PTH war nicht zu beobachten: Die mikroverkapselten Nebenschilddrüsenpartikeln reagierten mit dem ca. 4-fachen Anstieg der Ausschüttung des PTH auf die Stimulation mit erniedrigtem Kalzium. Während der Perifusion mit der hoch konzentrierten Kalziumlösung kam es zu dem erwarteten tiefen Abfall der PTH-Sekretion. Das Ergebnis zeigt, dass Vitalität und *In-Vitro*-Funktion des mikroverkapselten Gewebes auch nach mehrtägiger Kulturdauer nicht beeinträchtigt wird.

4.4.3 Mikroverkapselte Zellen und Zellcluster

Da die enzymatische Zerkleinerung die normale Architektur des Gewebes bricht, d. h., die üblichen Wechselbeziehungen zwischen den epithelialen Zellen und dem Bindegewebe unterbindet, könnte die Regulation der PTH-Sekretion von Einzelzellen und Zellclustern erheblich beeinträchtigt sein. Im Folgenden sollte die Bedeutung der Gewebeintegrität für die Funktion

der mikroverkapselten Epithelkörperchen evaluiert werden. Dazu wurden die Nebenschilddrüsenzellen und Zellcluster aus dem frischen hyperplastischen Gewebe (sekundärer Hyperparathyreoidismus) mittels Kollagenasedigestion isoliert (s. Kapitel 4.2.3) und mit dem Barium-Alginat mikroverkapselt (s. Kapitel 4.3.2). Die Vitalität der mikroverkapselten Zellen/Cluster betrug ca. 85-90% (FDA/PI-Färbung). Die Ergebnisse dieser Perifusion sind in Abb. 18 dargestellt.

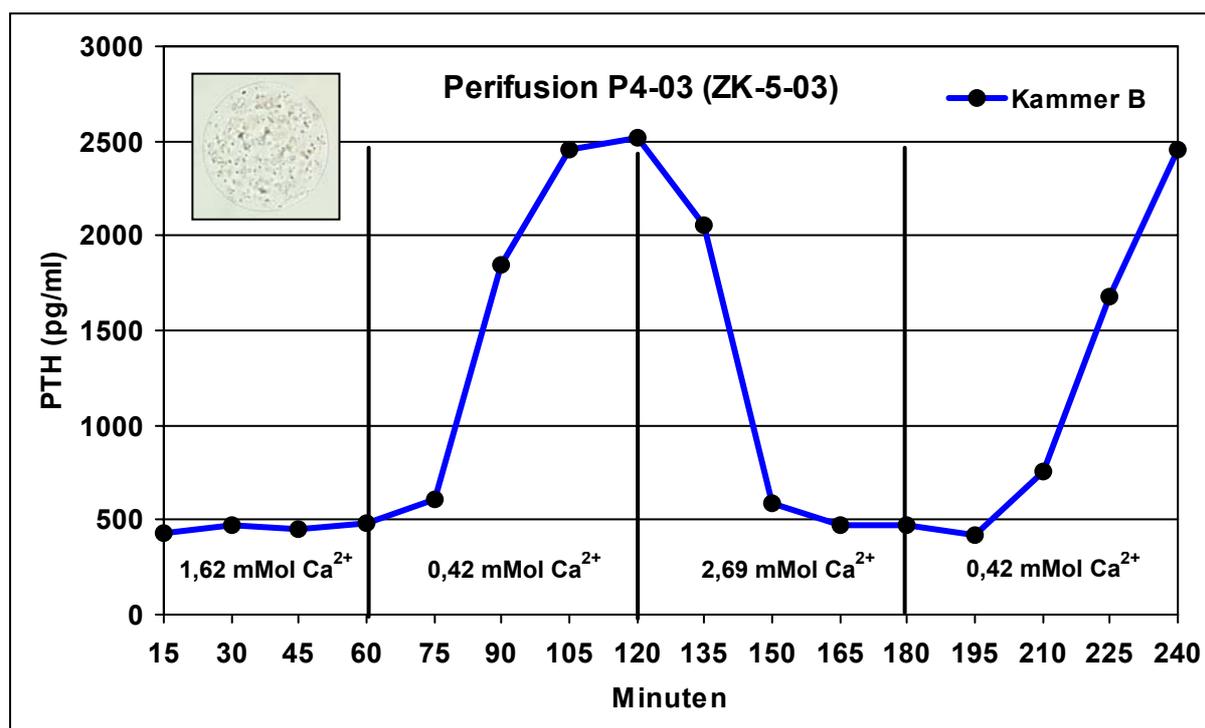


Abb. 18: *In-Vitro*-Funktion der mikroverkapselten Nebenschilddrüsenzellen und Zellcluster (frisches humanes Nebenschilddrüsenengewebe, sekundärer Hyperparathyreoidismus).

Die Einzelzellen zeigten eine deutlich regulierbare Sekretionsdynamik. Die enzymatische Zerkleinerung des Gewebes wie auch die Mikroverkapselung störten die kalziumabhängige Funktion der Nebenschilddrüsenzellen und Zellcluster nicht: Der schon bekannte Anstieg wie auch der Abfall der PTH-Ausschüttung, Folge des erniedrigten bzw. erhöhten ionisierten Kalziums, sind gut sichtbar. Dass die PTH-Werte bei der Perifusion mit 1,62 mM Ca²⁺ bzw. 2,69 mM Ca²⁺ nahezu identisch waren, dürfte keine Folge der Gewebedesintegration, sondern die Folge einer veränderten Kalziumsensitivität der Nebenschilddrüsenzellen sein, die in hyper-

plastischem Gewebe unterschiedlich sein kann (siehe Diskussion im Kapitel 5). Nach der 4-stündigen Perifusion der Zellen/Cluster war deren Vitalität unverändert.

4.5 Untersuchungen zur mechanischen Stabilität der Mikrokapseln

Manche bioartifiziellen Transplantate verlieren ihre Funktion *in vivo* wegen der Zerstörung der Mikrokapseln [10]. Dann käme es zur Exposition der ungeschützten Zellen und folglich zur Aktivierung des Immunsystems des Empfängers; anschliessend würden die Zellen vernichtet werden, oder es käme, als Folge der Aktivierung des Immunsystems, zu einer Fibrose und Infiltration immunkompetenter Zellen um die noch intakten Mikrokapseln herum. Die mechanische Stabilität von Alginat-Mikrokapseln kann mittels des osmotischen Quellens, mit dem so genannten *osmotic pressure test* in hypo-osmolarer Lösung, z. B. in destilliertem Wasser, geschätzt werden [14, 15].

4.5.1 Einfluss der Zelldichte auf die mechanische Stabilität der Alginat-Mikrokapseln

Unklar ist bislang, wie sehr die Zelldichte in der Mikrokapsel deren mechanische Stabilität beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurde die Stabilität leerer Mikrokapseln mit der Stabilität von Mikrokapseln verglichen, die eine unterschiedliche Anzahl porziner Milzzellen (10^5 und 10^6 Zellen pro 1 ml Alginat) enthielten. Dazu wurde eine Hälfte der Mikrokapseln in komplettem RPMI 1640-Medium (normo-osmolare Lösung) und die andere Hälfte in A. dest. (hypo-osmolare Lösung) inkubiert. Die Stabilität der Mikrokapseln wurde nach 1, 2, 3 und 24 Stunden bewertet (s. Kapitel 3.12). Erst nach 3 Stunden Inkubationsdauer vergrösserten sich die Mikrokapseln als Folge des osmotischen Quellens wie folgt: (A) Leere Mikrokapseln von 571 μm mittlerem Durchmesser auf 828 μm ; (B) Mikrokapseln mit 10^5 Zellen pro 1 ml Alginat von 595 μm auf 929 μm ; (C) Mikrokapseln mit 10^6 Zellen pro 1 ml Alginat von 525 μm auf ca. 750 μm) (Tab.1). Nach 24 Stunden Inkubationsdauer wurde keine zusätzliche Vergrösserung der Kapseln dokumentiert (Daten nicht gezeigt). Trotz des starken Quellens der Kapseln wurden zu keinem der vier Zeitpunkte zerplatzte Mikrokapseln beobachtet. Dieses Ergebnis signalisiert, dass die mikroverkapselten Zellen selbst keinen zusätzlichen, die Stabilität der Mikrokapseln vermindernenden Einfluss ausüben.

Tabelle 1: Ergebnisse der *In-Vitro*-Untersuchung zum Einfluss der zu verkapselnden Zellzahl auf die mechanische Stabilität der Ba-Alginat-Mikrokapseln. *Durchmesser der Kapseln nach 3 Stunden Inkubationszeit in komplettem RPMI 1640-Medium; **Durchmesser der Kapseln nach 3 Stunden Inkubationszeit in Aqua destillata.

Typ der Mikrokapseln	RPMI 1640-Medium (normo-osmolare Lösung)		Aqua destillata (hypo-osmolare Lösung)		Anzahl der zerplatzten Mikrokapseln			
	Anzahl der untersuchten Mikrokapseln	Grösse der Mikrokapseln *	Anzahl der untersuchten Mikrokapseln	Grösse der Mikrokapseln **	nach 1h	nach 2h	nach 3h	nach 24h
Leere Mikrokapseln	587	400-700µm (~571µm)	841	700-900 µm (~828µm)	0	0	0	0
Mikrokapseln mit 10 ⁵ Zellen/ml Alginat	192	400-640µm (~595µm)	153	460-1000 µm (~929µm)	0	0	0	0
Mikrokapseln mit 10 ⁶ Zellen/ml Alginat	421	400-560µm (~525µm)	737	700 - 820 µm (~750µm)	0	0	0	0

4.5.2 Einfluss der Zellcluster auf die mechanische Stabilität der Alginat-Mikrokapseln

Da die mikroverkapselten Zellen und Zellcluster die Struktur der Barium-Alginat-Matrix verändern können, wurde deren Wirkung auf die mechanische Stabilität der Kapseln mittels des *osmotic pressure testes* (s. o.) untersucht. Nach 3 Stunden Inkubation von 185 Mikrokapseln in A. dest., welche die Nebenschilddrüsenzellen und Zellcluster enthielten, steigerten sich die mittleren Durchmesser von 604 µm auf 1.006 µm, während sich die Durchmesser jener 210 Mikrokapseln nach 3 Stunden Inkubation in Medium nicht veränderten (602 µm und 607 µm entsprechend) (Abb. 20). Auch waren zu keinem Zeitpunkt zerbrochene Kapseln zu erkennen (Abb. 20). Die Stabilitäten von Mikrokapseln mit Einzelzellen, mit Zellclustern und grösseren Gewebepartikeln unterschieden sich nicht voneinander.

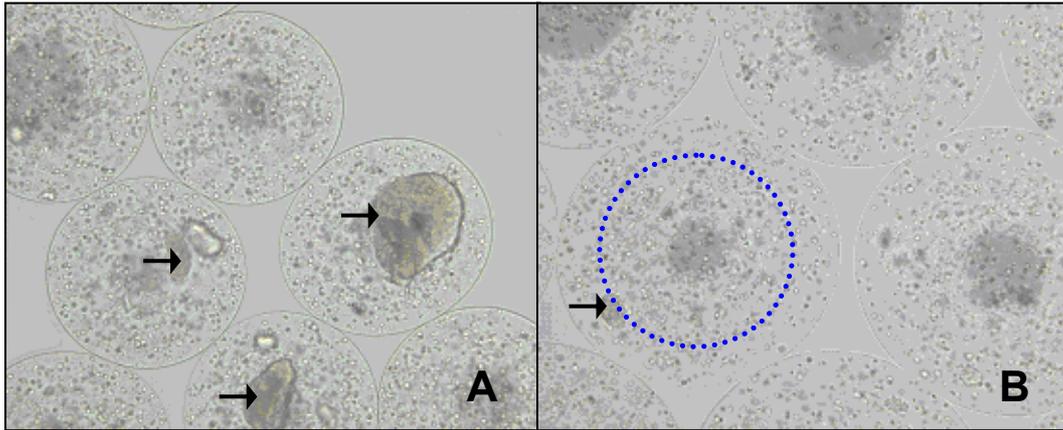


Abb. 20: Mikrokapseln mit den Nebenschilddrüsenzellen/Zellclustern (schwarze Pfeile) nach 3 Stunden Inkubation in Medium (A) bzw. in Aqua destillata (B). B. Es sind keine geplatzten Mikrokapseln nach der Inkubation in hypo-osmolarer Lösung sichtbar. Mit dem blauen Kreis ist die mittlere Grösse der Kapseln vor dem osmotischen Quellen dargestellt. Obwohl die Mikrokapseln quellen, bleibt ihre Stabilität unbeeinflusst.

5 Diskussion

Gegenwärtig besteht kein Zweifel daran, dass eine Allotransplantation des Nebenschilddrüsengewebes die bessere Alternative zur konservativen Therapie des Hypoparathyreoidismus darstellt [5, 11]. Eine lebenslange Immunsuppression der Empfänger ist ausschliesslich nach Kombinationstransplantation, z.B. einer Nieren-Nebenschilddrüsentransplantation [2], gerechtfertigt, nicht aber nach alleiniger Nebenschilddrüsentransplantation; hier bietet die Mikroverkapselung des Nebenschilddrüsengewebes eine ausgezeichnete Möglichkeit zur *Immunprotektion* des Spendergewebes [6], so dass die Immunsuppression entfallen kann. Obwohl experimentell eine Dauerfunktion allo- und sogar xenogener Transplantate erzielt wurde [9,10], ist die Übertragung dieser Langzeitergebnisse auf den Menschen bisher nicht gelungen. Im Jahr 2003 wurden in *Nature Medicine* die Vorbedingungen für den klinischen Erfolg der Mikroverkapselung von Zellen/Geweben wie folgt zusammengefasst [3]: (1) Eine ausreichende Menge *funktionseller Zellen*, (2) *Biokompatibilität* der Materialien für die Mikroverkapselung, (3) entsprechende *Permeabilität* der Mikro kapseln, (4) *mechanische* und *chemische Stabilität* der Mikro kapseln, (5) *biologische Sicherheit*, (6) *adäquate Funktion* und (7) *langfristiges Überleben* des Transplantates. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Faktoren hinsichtlich der späteren Allotransplantation der Nebenschilddrüsen analysiert. Da sich in der Literatur widersprüchliche Angaben zur Regulation der PTH-Sekretion pathologisch veränderter Nebenschilddrüsenzellen finden, wurden Funktionsteste mit hyperplastischem Gewebe (sekundärer Hyperparathyreoidismus) durchgeführt. Hier zeigte sich, dass hyperplastisches Gewebe mit einer dynamischen Ausschüttung des Parathormons auf die unterschiedlichen Ca^{2+} -Konzentrationen reagiert. Hinsichtlich der Gewebepräparation sind verschiedene Verfahren beschrieben worden [6, 7, 9, 16]. Ein Vergleich der mechanischen Zerkleinerung mit der enzymatischen Digestion deutet darauf hin, dass die enzymatische Präparation infolge des besseren Erhalts der Zellvitalität vorteilhafter zu sein scheint. Da die Reinheit des Polymers eine wichtige Bedeutung für das Überleben des Transplantates hat [3, 4], wurde bei unseren Versuchen hoch reines Alginat für die Mikroverkapselung verwendet (s. Kapitel 3.3), das per se keine Mitogenität besitzt. In der aktuellen Literatur wird angenommen, dass trotz der hohen Variabilität der Porengrössen (*cut off*) die *einfachen* Alginat-Mikro kapseln, d.h. Kapseln ohne zusätzliche Schichten (z.B., aus den Polykationen: Poly-L-Lysin, Poly-L-Ornithin), eine gute Verkapselungsqualität vorausgesetzt, eine adäquate *Immunprotektion* des Allotransplantates gewährleisten [3, 12, 18]. Wir konnten zeigen, dass sich Zellcluster/Einzelzellen im

Vergleich zu den Gewebepartikeln sehr viel besser ummanteln lassen. Die Verwendung von Ba^{2+} -Ionen für die Polymerisierung des Alginates führte zur Bildung mechanisch sehr stabiler Mikrokapselformen, die mit dem *osmotic pressure test* eindrucksvoll bestätigt wurde. Die Mikroverkapselung per se hatte keinen negativen Einfluss auf die Funktion des Nebenschilddrüsengewebes: Beide, mikroverkapselte Gewebepartikeln als auch Zellcluster/Einzelzellen, zeigten sehr gute akute Sekretionsdynamiken.

Untersuchungen des Spendergewebes

Ein potenzieller Vorteil der Allotransplantation des mikroverkapselten Gewebes ist die kontrollierte und kontinuierliche Ausschüttung eines biologischen Produktes an den Empfänger, das von den Spenderzellen *de novo* sezerniert wird. So lassen sich physiologischere Konzentrationen der therapeutischen Proteine erzielen [38]. Die Wahl der *richtigen Quelle* des Spendergewebes spielt eine wichtige Rolle für das Schicksal des Transplantates und für den klinischen Erfolg der Therapie [3]. Für die humane Allotransplantation der Nebenschilddrüsen kann man normales und pathologisch verändertes (primärer bzw. sekundärer Hyperparathyreoidismus), bzw. frisches und kryokonserviertes Gewebe verwenden. Der Vorteil der hyperplastischen Nebenschilddrüsen als Spendergewebe besteht ohne Frage in ausreichenden Mengen Gewebe, das man nach der operativen Entfernung vor Ort verarbeiten kann.

Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen des Spendergewebes wurden vor der Gewebepräparation routinemässig durchgeführt. Nur so ließ sich die Eignung der Nebenschilddrüsen zur Transplantation prüfen, denn Nebenschilddrüsen, die breite hämorrhagische Zonen bzw. Nekrosen als Folge der Operation aufwiesen, wurden von den folgenden Versuchen ausgeschlossen. Die mikroskopische Bestätigung der Diagnose *sekundärer Hyperparathyreoidismus* ist bedeutsam, weil das makroskopische Erscheinungsbild der Epithelkörperchen (d.h. Form, Größe, Farbe, Konsistenz) den Lymphknoten bzw. dem Fettgewebe sehr ähnlich sein kann.

Bei der Allotransplantation der Epithelkörperchen erwartet man eine adäquate, d.h. regulierbare Sekretion des Parathormons. Die Biosynthese des Parathormons lässt sich in zwei Ebenen regulieren: (1) Sekretion des Hormons bzw. (2) Proliferation und Wachstum der Nebenschilddrüsenzellen [30, 40]. Während des primären oder sekundären Hyperparathyreoidismus verändern sich sowohl die Proliferation der Zellen als auch die normale Kalziumregulation

der PTH-Sekretion: Mehr PTH lässt sich bei niedrigem, normalem und sogar erhöhtem Blutkalzium ausschütten (Abb. 21) [30].

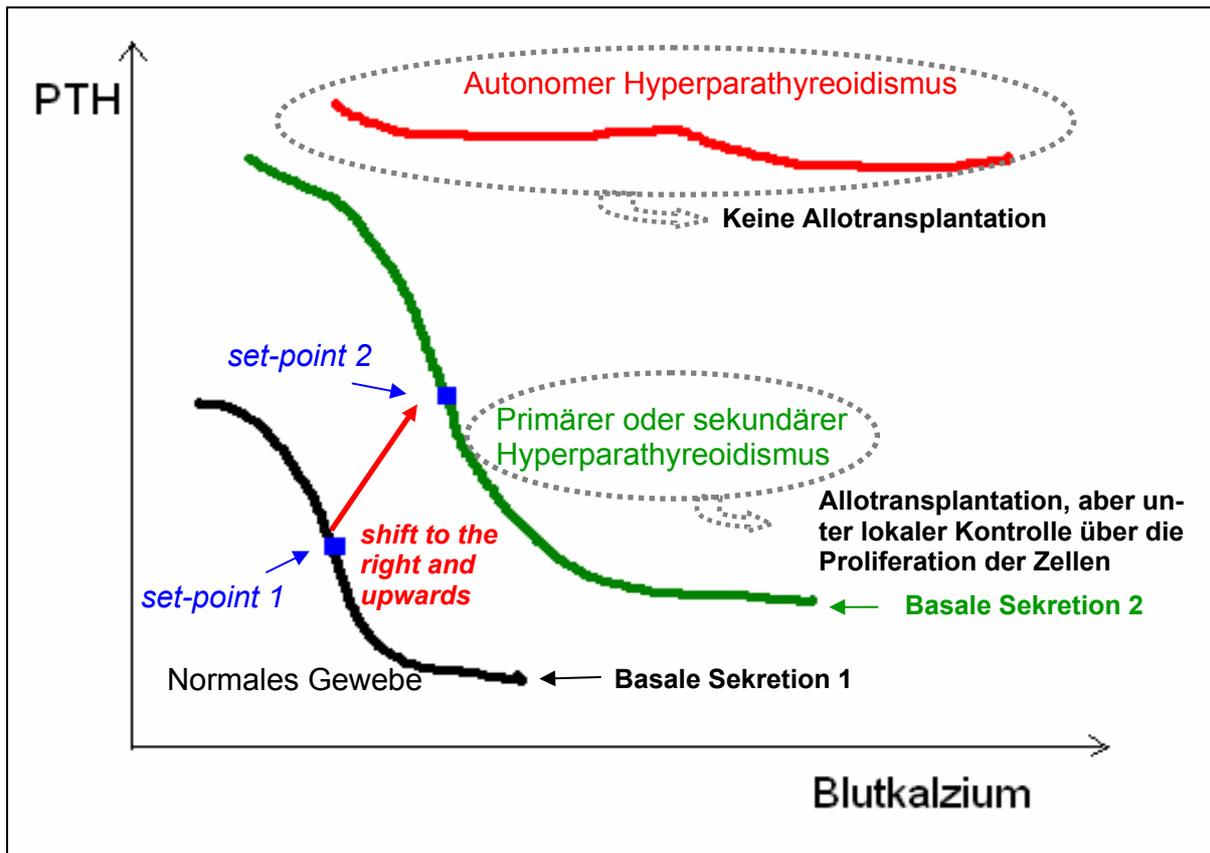


Abb. 21: Schematische Darstellung der Sekretionsdynamiken des Parathormons von normalem und pathologisch verändertem Gewebe. Obwohl eine regulierbare, kalziumabhängige Funktion des hyperplastischen Gewebes (primärer und sekundärer Hyperparathyreoidismus) existiert, verschiebt sich der *set-point* der Regulation, und zugleich erhöht sich auch die basale Sekretion des Hormons. Beim *autonomen* Hyperparathyreoidismus ist eine regulierbare Sekretionsdynamik nicht zu erkennen.

Es ist bekannt, dass die hyperplastischen Epithelkörperchen weniger Kalziumrezeptoren tragen als normale [39]. Obwohl in der aktuellen Literatur keine Fälle von Hyperparathyreoidismus nach Allotransplantation des Nebenschilddrüsengewebes beschrieben wurden, findet man einen tertiären Hyperparathyreoidismus nach autologer Transplantation bei 7-30% der Patienten [22]. In Tab. 2 sind verschiedene Faktoren zusammengefasst, die zur Hyperfunktion des Autotransplantates führen könnten. So entsteht ein tertiärer Hyperparathyreoidismus vor allem bei jenen Patienten, denen *hyperplastisches* Gewebe autolog transplantiert wurde [35, 36]; dennoch bleibt unklar, ob die veränderte Regulation der PTH-Ausschüttung oder die Hyperplasie des Gewebes für die Hyperfunktion nach Autotransplantation verantwortlich sind.

Tabelle 2. Fälle von tertiärem Hyperparathyreoidismus nach Autotransplantation von Nebenschilddrüsengewebe. Die Risikofaktoren der Hyperfunktion des Autotransplantates sind in Spalte 3 zusammengefasst. Erklärung: 1°HyperPTH – primärer Hyperparathyreoidismus; 2°HyperPTH – sekundärer Hyperparathyreoidismus; FHPT – familiärer Hyperparathyreoidismus; nFHPT – unfamiliärer Hyperparathyreoidismus; FHHH – familiärer hypokalzurischer, hyperkalzämischer Hyperparathyreoidismus.

Literaturstelle	Gewebeart % der Rezidive	Voraussichtliche Risikofaktoren des tertiären Hyperparathyreoidismus nach Autotransplantation
S. A. Wells et al. 1980 [35]	1°HyperPTH: nFHPT – 20 Patienten; FHPT – 16 Patienten (9 – MEN I; 3 – MEN II; 4 –FHHH) 30%	Typ des Gewebes bzw. empfängerabhängige Bedingungen? Rezidivrate bei FHPT > nFHPT (p<0.005). 100% Rezidivrate bei den Patienten mit FHHH. 0% Rezidivrate bei Patienten mit nFHPT, die nur eine Operation wegen 1°HyperPTH erhalten hatten.
A. Saxe 1984 [42]	2°HyperPTH 6,4 %	Erhöhte Phosphatkonzentration und erniedrigte Vitamin D-Metabolite als Folge des Nierenversagens? Veränderte Regulation der PTH-Sekretion des pathologisch veränderten Gewebes (<i>shift to the right and upward</i>)?
L. E. Mallette et al. 1987 [36]	1°HyperPTH: nFHPT – 9 Patienten, FHPT – 6 Patienten mit MEN I HyperPTH; 4 von 6 Patienten mit MEN I, im Vergleich zu 0 von 9 Patienten mit nFHPT, hatten ein Rezidiv des HyperPTH	Typ des Gewebes bzw. empfängerabhängige Bedingungen? Rezidive nur bei den Patienten mit FHPT. Die Menge des autotransplantierten Gewebes?
M. Brandi et al. 1986 [37], 1988 [55]	Experimentelle Kultivierung der Kalbnebenschilddrüsenzellen mit den Seren von den Patienten mit MEN I 1°HyperPTH	<i>Humoral parathyroid mitogenic factor</i> im Blut der Patienten mit familiärem MEN I HyperPTH.
A. D’Avanzo et al. 2000 [22]	normales Gewebe; 3 Fälle	#1: Therapeutische Bestrahlung des Halses, #2: Nierenversagen und #3: Hypokalzämie

Es scheint so, als habe die zuletzt genannte hier die größere Bedeutung, weil der tertiäre Hyperparathyreoidismus auch nach Transplantation normalen Gewebes dokumentiert wurde [22]. Ausserdem ist bekannt, dass eine erhöhte Phosphatkonzentration und erniedrigte Vitamin D-Metaboliten im Blut des Rezipienten (eine gewöhnliche Situation bei Patienten mit Nierenversagen) Hyperplasie und Hypertrophie der Nebenschilddrüsenzellen verursachen können [30, 32, 33].

Da jedoch die Gefahr existiert, dass man nach Allotransplantation des hyperplastischen Gewebes sowohl eine Hypo- als auch eine Hyperfunktion des Transplantates erhält, wurden in der vorliegenden Arbeit die Funktionen der hyperplastischen Gewebe (sekundärer Hyperparathyreoidismus) näher analysiert.

Bei pathologisch verändertem Nebenschilddrüsen Gewebe, adenomatös wie auch hyperplastisch, erwartet man eine regulierbare Sekretion des Parathormons; dennoch kann sich der *set-point* für die Kalziumsuppression der PTH-Ausschüttung verschieben (*shift to the right and upwards*), so dass ein erhöhtes Kalziumniveau notwendig ist, um die PTH-Sekretion zu verringern (s. Abb. 21) [40]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass frische Gewebepartikel (sekundärer Hyperparathyreoidismus) von verschiedenen Spendern auf die Stimulation mit niedrigem Kalziumgehalt im Medium mit einem Anstieg der PTH-Sekretion reagieren und bei Erhöhung der Kalziumkonzentration auf das basale Sekretionsniveau zurückkehren. Damit lässt sich die dynamische *minute-to-minute* Regulation der PTH-Ausschüttung bestätigen. Unsere Perifusionsergebnisse korrelieren sehr gut mit den Resultaten, die von anderen Gruppen sowohl bei statischen Inkubationen (*flask incubation*), aber auch bei Perifusionen des hyperplastischen Nebenschilddrüsen Gewebes erzielt wurden [29, 40]. Es wurde keine *autonome* Sekretion des Parathormons beobachtet. Da sich die basale PTH-Ausschüttung der hyperplastischen Zellen, d.h. jenes Niveau, bei dem keine Suppression der PTH-Produktion mehr stattfindet (s. Abb. 21), infolge der Hyperplasie verändert, kann die Anzahl der funktionellen Zellen eine entscheidende Bedeutung für die Hypersekretion des Parathormons haben [29]. Deshalb sollte man bei der Allotransplantation von krankhaft verändertem Gewebe, hierzu gibt es bisher kaum Literaturdaten, eine lokale Kontrolle über die Proliferation der Zellen herstellen. Die Mikroverkapselung mit hoch reinen Polymeren bietet grundsätzlich eine solche Möglichkeit.

Die Kryokonservierung der Nebenschilddrüsen hat eine wichtige Bedeutung für die Behandlung jener Patienten, bei denen wiederholte Parathyroidektomien infolge eines persistierenden Hyperparathyreoidismus bzw. eine totale/subtotale Parathyroidektomie wegen eines primären, eines sekundären bzw. eines tertiären Hyperparathyreoidismus durchgeführt werden [23]. Die zeitlich unbegrenzte Lagerung des kryokonservierten Gewebes gewährleistet ein hohes Mass an Flexibilität der experimentellen Untersuchungen und der klinischen Therapie. Dennoch beträgt die Erfolgsrate bei der Autotransplantation des kryokonservierten Nebenschilddrüsenorgans nur 17-80% [23]. Trotz technisch verbesserter und standardisierter Einfrier-/Auftauprotokolle [44, 45] wurde eine Verringerung der Vitalität der Nebenschilddrüsenzellen nach dem Auftauen dokumentiert, die letztlich zum Verlust des Autotransplantates führen dürfte [23, 46, 58]. Allerdings bescheinigen manche Autoren den Einzelzellen, die sie mittels enzymatischer Digestion aus kryokonserviertem Gewebe gewinnen [56], eine gute Vitalität (über 88%). Dennoch, andere Autoren konstatieren, dass die Vitalität der Einzelzellen nach dem enzymatischen Verdau von kryokonserviertem Gewebe (80-97%) und die Anzahl der toten Zellen in den kryokonservierten Gewebepartikeln (0,1%-30,5% tote Zellen, morphometrische Analyse) nicht miteinander korrelieren [58]. Daraus schliessen sie, dass die toten Zellen (in den Gewebepartikeln) infolge der Enzymbehandlung „zerplatzen“ und daher als solche nicht mehr identifizierbar sind [58]. Ausserdem wurde gezeigt, dass die Kryokonservierung nach dem Auftauen zu einer 70-90%igen Reduktion der Anzahl vitaler Zellen pro 1 Gramm kryokonservierten Nebenschilddrüsenorgans bzw. pro 1 Gramm kryokonservierter Einzelzellen (im Vergleich mit frischen Gewebepartikeln bzw. frischen Einzelzellen) führte [23]. Unsere Arbeitsgruppe hat solche Vitalitätsverluste ebenfalls beobachtet; aber im Gegensatz zu anders lautenden Berichten [23, 56, 58], konnten wir keine dynamische kalziumabhängige Funktion der kryokonservierten Gewebepartikeln nach dem Auftauen (Gewebe von 3 verschiedenen Spendern) nachweisen. Ursache dafür könnten die Nekrose und die damit verbundene erhöhte Ausschüttung des Parathormons aus den sterbenden Zellen während der ersten Stunden nach dem Auftauen sein. Dies scheint plausibel, da bei einem der drei Spender die dynamische Regulation nach 24-stündiger Inkubation der Gewebepartikeln wieder hergestellt wurde. Die indirekte Bestätigung dieser Beobachtung ist die Verbesserung der Vitalität der Nebenschilddrüsenzellen nach der 24-stündigen Kultur von 54,9% auf 89,8%, die von einer anderen Arbeitsgruppe berichtet wurde [46].

Optimierung der Gewebepräparation

Obwohl die Autotransplantation des Nebenschilddrüsengewebes ein standardisiertes Verfahren ist, beträgt die Erfolgsrate zwar ca. 80-90% nach der Transplantation frischen, aber nur etwa 17-83% nach Transplantation kryokonservierten Gewebes [23]; dies bedeutet, dass das Überleben des Transplantates von der Vitalität des Spendergewebes und von der Versorgung des Transplantates mit Sauerstoff und Nährstoffen abhängt. Gewebepartikeln von der Grösse einiger Kubikmillimeter können nicht mittels Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff überleben, sondern benötigen die Versorgung über neu gebildete Blutgefäße [60]. Nach Autotransplantation von Nebenschilddrüsenpartikeln (Grösse 1-3 mm³) findet die Revaskularisierung des Gewebes innerhalb von 10-20 Tagen statt [35, 54]. Da eine *direkte* Verbindung der Empfängergefäße mit den transplantierten Zellen im Falle von mikroverkapseltem Gewebe nicht möglich ist, spielt die Diffusion der Nährstoffe durch die Mikrokapsel bei der Allogtransplantation eine sehr viel bedeutendere Rolle (s. auch Abb. 22) [13].

Obwohl in der aktuellen Literatur zwei prinzipiell unterschiedlichen Methoden der Gewebepräparation des Nebenschilddrüsengewebes (mechanische Zerkleinerung und enzymatische Digestion) beschrieben worden sind, bleibt die Präparation der Nebenschilddrüsenzellen/Gewebepartikeln dennoch für verschiedene Zwecke eine *Hausprozedur* mit einer Vielzahl von Modifikationen (Tab. 3). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die mechanische Zerkleinerung zur Nekrose der Zellen in der Peripherie der Gewebepartikeln führt. Damit kann die massive Ausschüttung der verschiedenen Proteine aus den sterbenden Zellen zu einer Immunisierung des Empfängers über den *indirect pathway* der T-Zellaktivierung [12] oder zu einer unspezifischen Entzündungsreaktion mit der Folge des Verlustes des Allogtransplantates führen. Im Gegensatz dazu lassen sich die Zellcluster/Einzelzellen ohne einen „Kranz“ toter Zellen mit Hilfe der enzymatischen Digestion gewinnen. Die Vitalität der mittels Kollagenasedigestion gewonnenen Zellcluster war signifikant besser, als die Vitalität der Gewebepartikeln nach mechanischer Zerkleinerung. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den aktuellen Literaturdaten (s. Tab. 3.)

Table 3. Methode der Präparation des Nebenschilddrüsengewebes. Zwei verschiedene Ansätze, die enzymatische Digestion und die mechanische Zerkleinerung sind beschrieben. Obwohl die enzymatische Digestion (ED) bisher nicht standardisiert ist (Typ und Konzentration der Enzyme, Verdauungszeit usw.), sind die Präparationsergebnisse durchaus vergleichbar. Auch für die Mikroverkapselung des Nebenschilddrüsengewebes (Gewebeart, Methode der Gewebepräparation, Kapseltyp, Kapselgröße usw.) ist in der aktuellen Literatur bislang kein Standardverfahren beschrieben worden.

Literaturstelle	Methode der Gewebepräparation	Vitalität nach Präparation	Untersuchungen des Nebenschilddrüsengewebes nach Präparation
M. L. Brandi et al. 1986 [47]	ED: Kollagenase II (1,5mg/ml) + DNAase (50µg/ml), 180 min	>90% nach 24-stündiger Inkubation	Die erste langfristige <i>In-Vitro</i> -Kultivierung der Nebenschilddrüsenzellen (bovine Nebenschilddrüsen): über 140 Kulturpassagen
X. W. Fu et al. 1989 [6]	ED: Kollagenase I (2mg/ml) + DNAase (40µg/ml), 60 min	92% Vitalität	Die erste Allotransplantation der mikroverkapselten Zellen (mehr als 8 Wochen Funktion <i>in vivo</i>). Alginat-Poly-L-Lysin Kapseln, 500-600µm
C. Hasse et al. [4, 8, 9, 10,11]	Mechanische Gewebezerkleinerung	Keine Angaben	Die ersten langfristigen experimentellen Funktionen von Iso-, Allo- und Xenotransplantaten (mikroverkapselte Gewebepartikeln). Die erste klinische Allotransplantation der mikroverkapselten Gewebepartikeln [11]. Ba-Alginat Mikrokapseln; die Kapselgrößen unbekannt
M.-C. Rousseau et al. 1998 [48]	ED: Kollagenase II (0,1%), 90 min	Keine Angaben	Die erste langfristige (5 Monate) Kultivierung der humanen Nebenschilddrüsenzellen (sekundärer Hyperparathyreoidismus)
S. Kobayashi et al. 2000 [7]	ED: Kollagenase I (2mg/ml) + DNAase (40µg/ml)	Keine Angaben	<i>In-Vitro</i> -Kultivierung der mikroverkapselten Gewebepartikeln. Mikrokapseln aus Polyelektrolyten; die Kapselgrößen unbekannt
L. Picariello et al. 2001 [16]	ED: Kollagenase II (1,2 mg/ml), 120 min	90% Vitalität nach 24 h in Kultur	<i>In-Vitro</i> -Untersuchungen (<i>flask incubation</i>) der mikroverkapselten Nebenschilddrüsenzellen (Alginat-Poly-L-Lysin Kapseln; Durchmesser 2 mm)

Mikroverkapselung des Nebenschilddrüsengewebes

Obwohl bereits einige exzellente experimentelle Transplantationen von mikroverkapseltem Nebenschilddrüsengewebe durchgeführt wurden [6, 8, 9, 10], findet sich in der aktuellen Literatur kein Standardverfahren für die Mikroverkapselung im Zusammenhang mit der Behandlung des permanenten Hypoparathyreoidismus. Dies hat zur Folge, dass die bisherigen experimentellen Ergebnisse von anderen Gruppen nicht reproduziert werden konnten. Für eine wesentliche Vorbedingung der erfolgreichen Transplantation von Nebenschilddrüsengewebe hielt die Arbeitsgruppe von C. Hasse die Reinheit des Alginates [4]; andere Parameter, die

das Überleben des Transplantates sehr wohl auch beeinflussen können, wurden nicht vollständig analysiert. Bei der Transplantation mikroverkapselter Langerhans-Inseln wurde nämlich gezeigt, dass eine unvollständige Ummantelung des Gewebes mit dem Polymer, ebenso wie die ungenügende Biokompatibilität des Alginates, zur Fibrose der Mikrokapseln führen kann [17]. In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Faktoren betrachtet, welche die Qualität der einfachen Barium-Alginat-Mikrokapseln verändern können. Als *optimal* wurden runde Mikrokapseln mit vollständiger Ummantelung des Gewebes/der Zellen angenommen. Auf der Grundlage unserer Ergebnisse konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Verkapselungsqualität der Gewebepartikeln und der Qualität der Gewebepräparation gezeigt werden. Obwohl die Gewebepartikeln im Durchmesser kleiner als 500 µm waren und zum Kapselvolumen passen dürften, betrug die Anzahl der *unperfekten* Kapseln ca. 50%. So waren einerseits die inkomplette Ummantelung des Gewebes, andererseits deformierte Kapseln zu beobachten. Diese Probleme konnten einmal durch Vergrößerung der Mikrokapseln und des Weiteren durch Optimierung der Gewebepräparation, bzw. das Handverlesen der *optimal* gefüllten Kapseln gelöst werden. So verbesserte sich die Verkapselungsqualität deutlich: Die Anzahl der deformierten Kapseln sank auf 4-8%. Allerdings ist aus der Literatur bekannt, dass die längeren Diffusionsstrecken bei grösseren Kapseln zu einem Nährstoff- und Sauerstoffmangel führen können: So wurden zentrale Nekrosen, die ein deutliches Zeichen der Ernährungsinsuffizienz sind, nach Transplantation mikroverkapselter Nebenschilddrüsenpartikeln (Partikelgröße <500 µm) und Langerhans-Inseln (>100 µm gross) beobachtet [10, 13] (s. auch Abb. 22). Um den Zellverlust durch zentrale Nekrosen nach Iso-, Allo- oder Xenotransplantation der mikroverkapselten Gewebebröckchen zu kompensieren und das normale Niveau des ionisierten Blutkalziums zu erreichen, wurden die Gewebepartikeln in der Proportion 1:10 (Empfängernebenschilddrüsen : Spendernebenschilddrüsen) transplantiert [8-10]. Zudem bildeten sich bei der Mikroverkapselung der Gewebebröckchen vermehrt leere Kapseln, womit sich das Volumen des Transplantates erhöhte. In aktuellen Untersuchungen überwiegt die Herstellung kleinerer Kapseln (<400 µm) [84]. Ein weiterer Nachteil der Mikroverkapselung von Gewebepartikeln ist die dezentrale Lage der Bröckchen in manchen Kapseln (s. Abb. 10B). Ursachen dafür dürften sein: (1) die niedrige Viskosität des Alginates, (2) die hohe Oberflächenspannung des Fällungsbades und damit die erhöhte Kraft beim Eintropfen und (3) die zufällige Lage der Gewebepartikeln im Alginat während der Verkapselung, die mit dem hier verwendeten Zweikanaldüsen-Sprühverfahren nicht gesteuert werden kann.

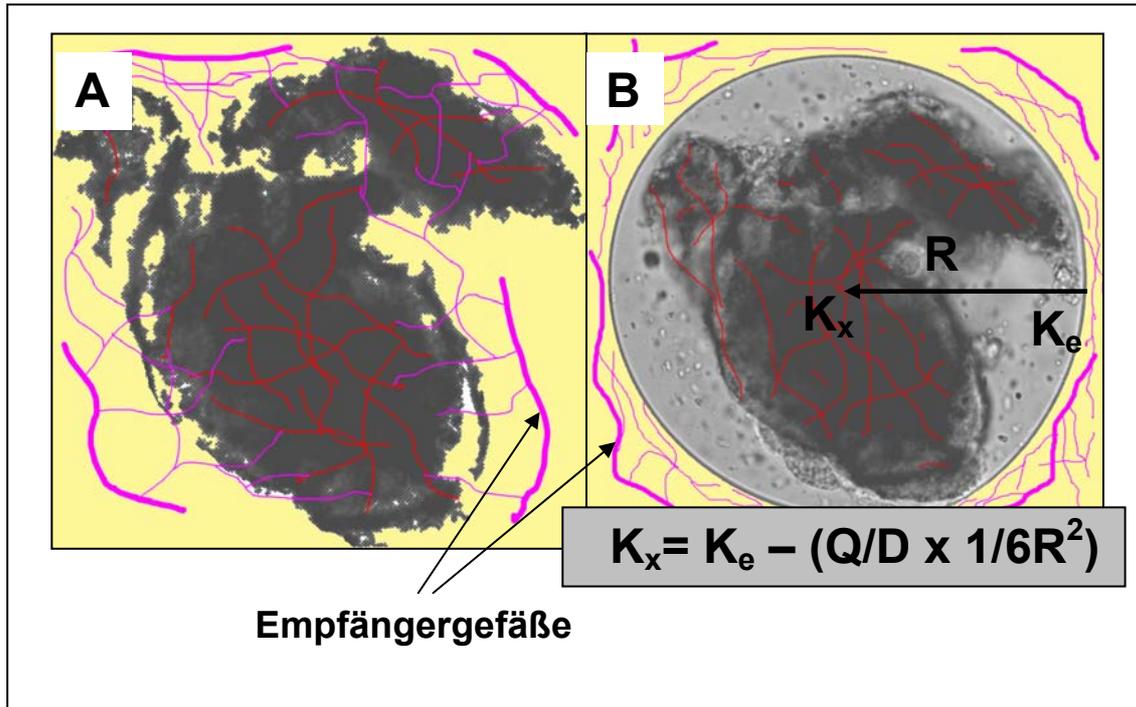


Abb. 22. Schematische Darstellung der Versorgung des (A) un- und (B) mikroverkapselten Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die direkte Verbindung der Spender- und Empfängergefäße erfolgt ausschliesslich nach Transplantation von un- und mikroverkapseltem Gewebe, während die mikroverkapselten Gewebepartikeln durch Diffusion ernährt werden. Somit hängt die Konzentration des Sauerstoffs in der Mitte der Kapsel (K_x) von der Konzentration des Sauerstoffs auf der Oberfläche der Mikrokapsel (K_e), dem Radius der Kapsel (R), dem Diffusionskoeffizienten des Sauerstoffs (D) und dem Konsum des Sauerstoffes durch die vitalen mikroverkapselten Zellen (Q) ab. Eine besonders schlechte Ernährungslage für die Zellen besteht in den grösseren Kapseln (längere Diffusionsstrecken), bei zu niedriger Sauerstoffkonzentration (ungeeigneter Transplantationsort) und bei einer zu grossen Anzahl vitaler Zellen in den Kapseln (intensiver Konsum von Sauerstoff und Nährstoffen).

Die Viskosität des Alginates und die Oberflächenspannung des Fällungsbades lassen sich verändern, während die zufällige Lage der Bröckchen nur mit einer zusätzlichen Schicht des Alginates, wie sie mit der Doppelverkapselungsmethode erzielbar ist, korrigierbar ist. Die exzentrische Position der Gewebepartikeln kann potenziell zum Bruch der Kapsel, vor allem an Stellen, an denen die Hülle sehr dünn ist, führen. Nach unseren Erfahrungen sind die Zellcluster ($<100 \mu\text{m}$) und die Einzelzellen eine sehr viel bessere Quelle für die Mikroverkapselung als die Gewebepartikeln: Die Kapselgrössen lassen sich ohne Verschlechterung der Kapselqualität beliebig regulieren; in ihnen sind die Zellcluster/Einzelzellen gleichmässig verteilt. Trotz der guten Verkapselungsqualität der Zellcluster/Einzelzellen finden sich aber noch unvollständig verkapselte Zellen auf den Kapseloberflächen. Ob diese unvollständig ummantelten Zellen zur Immunisierung des Empfängers führen und ggf. auch das Überleben des Transplantates vermindern, muss allerdings noch untersucht werden. Dennoch lässt sich dieses

Problem grundsätzlich mit der Technik der Doppelverkapselung (z.B. Alginat-Alginat; Alginat-Poly-L-Ornithin Kapseln) lösen.

In-Vitro-Funktion des mikroverkapselten Nebenschilddrüsengewebes

In der aktuellen Literatur finden sich nur unvollständige Informationen über die *In-Vitro*-Funktion des mikroverkapselten Nebenschilddrüsengewebes. Es ist unklar, ob die Mikroverkapselung mit Barium-Alginat auf die Sekretion und Regulation der Parathormon-Ausschüttung einen negativen Einfluss hat. Da sich die divalenten Kationen Ba^{2+} , Ca^{2+} oder Mg^{2+} während der Diffusion mit den *1,4-linked- α -guluronic* und *β -D-mannuronic* Säuren des Alginates verbinden können, birgt dies die Gefahr, dass sich die kalziumabhängige Funktion des mikroverkapselten Gewebes verändern kann. Der Vergleich der Perifusionsergebnisse der unverkapselten und der mikroverkapselten Gewebepartikeln spricht allerdings dafür, dass sich die Mikroverkapselung per se nicht negativ auf die akuten Sekretionsdynamiken des Nebenschilddrüsengewebes auswirkt: Sowohl die Suppressions- als auch die Stimulationsraten waren vergleichbar. Wir konnten eine *minute-to-minute* Regulation der PTH-Ausschüttung von mikroverkapseltem Gewebe klar dokumentieren. Wir konnten weiter zeigen, dass weder die Vitalität noch die Funktion der mikroverkapselten Gewebepartikeln durch eine mehrtägige Kultivierung beeinträchtigt werden.

Zur Zeit ist allerdings die Frage offen, ob die enzymatische Digestion des Gewebes und auch die Mikroverkapselung der Zellcluster/Einzelzellen langfristig deren Funktion verändern. Die hauptsächliche Ursache dafür, dass für die Allotransplantation der Epithelkörperchen Gewebepartikeln verwendet wurden, war der Wunsch, die Gewebeintegrität zu erhalten [9]. Es wurde beobachtet, dass für die phosphatabhängige Regulation der Parathormon-Ausschüttung *cell-to-cell* Kontakte wichtig waren: Für Rattennebenschilddrüsenzellen konnte – im Gegensatz zu Rattennebenschilddrüsenpartikeln – keine regulierbare Sekretion dokumentiert werden [62]. Andererseits bleibt völlig unklar, wie die Regulation über *cell-to-cell* Kontakte funktionieren kann, da die elektronmikroskopische Analyse der Hauptzellen keine spezifischen interzellulären Verbindungsstellen (*gap junctions*) demonstrieren konnte [40]. Unsere Perfusionen der mikroverkapselten Zellcluster/Einzelzellen zeigten hingegen eine völlig normale regulierbare kalziumabhängige Sekretionsdynamik des Parathormons. Allerdings konnten wir keine Unterschiede in den PTH-Werten bei Perifusion mit 1,62 mM Ca^{2+} bzw. 2,69 mM Ca^{2+} feststellen; möglicherweise hängt dies mit der veränderten Kalziumsensitivität des Gewebes

(*shift to the right and upwards*) ab (s. o.). Kalziumabhängige PTH-Ausschüttungen wurden auch von der Arbeitsgruppe Picariello et al. nach statischer Inkubation der mikroverkapselten Nebenschilddrüsenzellen (Kapselgröße 2 mm) dokumentiert [16].

Stabilität der Barium-Alginat-Mikrokapseln

Die dauerhafte mechanische Stabilität der Mikrokapseln ist eine essentielle Vorbedingung für die erfolgreiche Allotransplantation des mikroverkapselten Gewebes [3]. Nach Hasse et al. [10] waren 80% der Mikrokapseln bei den Ratten, die am Ende des Versuches leicht hypokalzämisch waren, zerbrochen. Diese Beobachtung kann mechanische Ursachen infolge anhaltender Muskelkontraktionen nach intramuskulärer Transplantation haben. Es ist bekannt, dass die runde Form der Kapseln die stabilste ist und mit der Vergrößerung der Mikrokapseln deren Stabilität nachlässt [61]. Deshalb kann die Optimierung der Mikroverkapselung indirekt zur Verbesserung der Stabilität der Kapseln führen (s. o.). Ein unzureichender Widerstand der Kapseln gegen das osmotische Quellen wurde bei der Mikroverkapselung schnell proliferierender, immortalisierter Zellen bemerkt [14]. Obwohl ein verändertes Wachstum und die Teilung der hyperplastischen Nebenschilddrüsenzellen, besonders in einem Milieu, das zur einer Hyperplasie führen kann (s. o.), bestätigt wurden [30], sind die Proliferationsraten der hyperplastischen Nebenschilddrüsenzellen und der immortalisierten Zellen [14] nicht vergleichbar. Ausserdem wurde eine verlangsamte Proliferation jener Zellen, die in Barium-Alginat immobilisiert wurden, bemerkt [14]. Mit dem *osmotic pressure test* konnten wir zeigen, dass die Barium-Alginat-Kapseln auch nach dem Quellen sehr stabil sind. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den Daten von J. M. van Raamsdonk et al. [15]. Obwohl bei anderen Kapseltypen, z.B. den Alginat-Poly-L-Lysin-Kapseln, eine Verringerung des osmotischen Widerstandes bei zunehmender Anzahl von Zellen im Kapselinneren bestätigt wurde [15], konnten wir keinen negativen Einfluss einer erhöhten Anzahl mikroverkapselter Zellen, bzw. keinen Einfluss der Zellcluster auf die Stabilität der Barium-Alginat-Kapseln dokumentieren.

6 Zusammenfassung

Der permanente Hypoparathyreoidismus besteht in einer irreversiblen Verminderung der Parathormon-Konzentration im Blutserum und löst in der Folge Störungen des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels aus; so besteht die Standardtherapie bis heute in einer bedarfsabhängigen Substitution von Vitamin D und Kalzium. Trotz suffizienter Regulation des Kalziumspiegels findet ein Ersatz des Parathormons nicht statt, was zu einer bleibenden Dysregulation der Kalzium- und Phosphat-Homöostase führt. Daher leidet ein Grossteil der Patienten mit chronischem Hypoparathyreoidismus an unterschiedlichen somatischen und psychischen Krankheitserscheinungen mit einer insgesamt schlechten Lebensqualität. Die Allotransplantation der Epithelkörperchen mit regulierbarer *De-Novo*-Sekretion des Parathormons stellt eine gute Alternative zur konservativen Therapie dar. Wesentliche Vorbedingung ist jedoch für die Anwendung dieser Therapie in der Klinik die Transplantation der Nebenschilddrüsen ohne dauerhafte Immunsuppression. Ein Ausweg aus diesem Dilemma ist die Mikroverkapselung mit hoch reinem Polymer, womit sich eine ausgezeichnete Möglichkeit für die *Immunprotektion* des Spendergewebes bietet. Obwohl anfänglich viel versprechende Ergebnisse nach experimenteller Iso-, Allo- und sogar Xenotransplantation mikroverkapselten Nebenschilddrüsengewebes erzielt wurden, konnten solche Resultate von anderen Gruppen bislang nicht reproduziert werden. So ist die Mikroverkapselung des Nebenschilddrüsengewebes bis heute kein Standardverfahren. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse verschiedener Faktoren, die das Überleben des Nebenschilddrüsentransplantates sowie seine Funktion beeinflussen können. Hierbei wurden die Funktionen von frischem und kryokonserviertem hyperplastischem Nebenschilddrüsengewebe vergleichend untersucht. Auch zwei unterschiedliche Verfahren der Gewebepreparation wurden miteinander verglichen. Abschliessend erfolgten Untersuchungen zur Qualität der Mikroverkapselung des Nebenschilddrüsengewebes, der Vergleich der *In-Vitro*-Funktionen mikroverkapselter Gewebepartikeln und Zellcluster/-Einzellen und die Analyse der mechanischen Stabilität der Barium-Alginat-Mikrokapseln. Die wichtigsten Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst:

1. Frisches hyperplastisches Nebenschilddrüsengewebe von Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus eignet sich grundsätzlich für die Allotransplantation und die Therapie des permanenten Hypoparathyreoidismus, da das Gewebe unterschiedlicher Spender eine regulierbare, Ca^{2+} -abhängige Funktion aufwies. Da sich aber die basale

Sekretion und der *set point* der Sekretion des Parathormons wegen der Hyperplasie verschieben können, besteht jedoch das Risiko eines Hyperparathyreoidismus nach Allotransplantation pathologisch veränderten Nebenschilddrüsengewebes. Dieses Problem scheint lösbar, wenn die Gewebeproliferation kontrollierbar ist, z. B. durch die Mikroverkapselung. Obwohl eine zeitlich unbegrenzte Lagerung des Nebenschilddrüsengewebes durch Kryokonservierung möglich ist, verringert sich die Vitalität des Gewebes; ebenso fehlt die adaptierte *In-Vitro*-Funktion des Gewebes unmittelbar nach dem Auftauen. Eine 24stündige *In-Vitro*-Kultur stellt die regulierbare Funktion des kryokonservierten Gewebes allerdings wieder her.

2. Die mechanische Zerkleinerung des Nebenschilddrüsengewebes führt zu Nekrosen an der Peripherie der Gewebepartikeln und zur massiven Ausschüttung des Parathormons aus den sterbenden Zellen. Im Gegensatz dazu kann man mittels enzymatischer Verdauung Einzelzellen und Zellcluster ohne diesen „Kranz“ toter Zellen gewinnen.
3. Die Verkapselungsqualität der Gewebepartikeln hängt von der Qualität der Gewebepreparation ab. Nach präziser Gewebepreparation und Vergrößerung der Mikrokapselfen von 600 auf 800µm Durchmesser sank die Anzahl der deformierten Kapseln und der unvollständig verkapselten Gewebepartikeln drastisch. Auch war eine Zunahme des Transplantvolumens zu verzeichnen, da sich vermehrt leere Kapseln bildeten. Die mittels enzymatischer Verdauung gewonnenen Einzelzellen und kleinen Zellcluster sind eine sehr viel bessere Quelle für die Mikroverkapselung und Allotransplantation, da sich die Verkapselungsparameter ohne Verschlechterung der Verkapselungsqualität gezielt regulieren lassen. Die Zellcluster/Einzelzellen verteilen sich gleichmässig in den Mikrokapselfen, während bei der Mikroverkapselung der Gewebepartikeln eine vornehmlich dezentrale Lage der Partikeln zu beobachten ist. Die Mikroverkapselung per se hat keine negativen Auswirkungen auf die Vitalität der Nebenschilddrüsenzellen.
4. Auch übt die Mikroverkapselung allein keinen Einfluss auf die adaptierte Funktion des Nebenschilddrüsengewebes aus: Die akuten Sekretionsdynamiken unverkapselten und verkapselten Gewebes waren vergleichbar. Weder die Vitalität, noch die Funktion des mikroverkapselten Gewebes wurden durch eine mehrtägige Kultivierung beeinflusst. Die Gewebeintegrität war für die normale kalziumabhängige Funktion der mikroverkapselten Spenderzellen nicht bedeutsam.

5. Die Barium-Alginat-Mikrokapseln waren ausreichend stabil, auch nach Steigerung der Zelldichte in den Mikrokapseln.

An Hand der hier erarbeiteten Ergebnisse kann festgestellt werden, dass die Allotransplantation mikroverkapselten Nebenschilddrüsengewebes keine triviale Aufgabe ist. Die richtige Wahl des Spendergewebes und die Standardisierung der Verkapselungsparameter sind essentielle Vorbedingungen für die Reproduktion langfristiger Ergebnisse. Infolge der höheren Vitalität und Verkapselungsqualität, sowie gut regulierbarer Funktion und besserer Diffusionseigenschaften ist die Mikroverkapselung der Zellcluster/Einzelzellen – verglichen mit den Gewebepartikeln – die bessere Alternative. Zukünftig kann insbesondere die Verkapselungsqualität durch Anwendung der Doppelverkapselung (Alginat-Alginat-Kapseln; oder eine zusätzliche Schicht aus Poly-L-Ornithin) noch verbessert werden. Ausgehend von einer optimierten Verkapselungsqualität, einer hohen Vitalität und gut regulierbaren Funktion der mikroverkapselten Zellen sowie ausreichender Stabilität der Mikrokapseln, können in naher Zukunft weitere Parameter *in vivo* untersucht werden, die einen wesentlichen Einfluss auf das Überleben des Transplantates ausüben könnten: z. B. die Vitamin D-Therapie nach Allotransplantation, die Erhöhung des Transplantatvolumens und die Analyse des geeigneten Transplantationsortes.

Die Standardisierung der Transplantationsparameter und das so angestrebte langfristige Überleben des Transplantates sind essenzielle Voraussetzungen für die erfolgreiche humane Allotransplantation von Nebenschilddrüsenzellen im Rahmen einer modernen Therapie des permanenten Hypoparathyreoidismus.

7 Literaturverzeichnis

1. Y. Chung, Y. K. Lam. Routine parathyroid autotransplantation during thyroidectomy. *Surgery* 129: 318-323, 2001
2. E. J. Alfrey, L. J. Perloff, M. W. Asplund, D. C. Dafoe, R. A. Grossman, J. S. Bromberg, T. Holland, A. Naji, C. F. Barker. Normocalcemia thirteen years after successful parathyroid allografting in a recipient of a renal transplant. *Surgery* 111: 234-236, 1992
3. G. Orive, R. M. Hernandez, A. R. Gascon, R. Calafiore, T. M. S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacik, J. Shapiro, J. L. Pedraz. Cell encapsulation: promise and progress. *Nature Medicine* 9: 104-107, 2003
4. C. Hasse, A. Zielke, G. Klöck, A. Schlosser, P. Barth, U. Zimmermann, H. Sitter, W. Lorenz, M. Rothmund. Amitogenic alginates: key to first clinical application of microencapsulation technology. *World Journal of Surgery* 22: 659-665, 1998
5. W. Arlt, C. Fremerey, F. Callies, M. Reincke, P. Schneider, W. Timmermann, B. Alolio. Well-being, mood, and calcium homeostasis in patients with hypoparathyroidism receiving standard treatment with calcium and vitamin D. *European Journal of Endocrinology* 146: 215-222, 2002
6. X. Wen Fu, A. M. Sun. Microencapsulated parathyroid cells as a bioartificial parathyroid. *Transplantation* 47: 432-435, 1989
7. S. Kobayashi, J. Amano, F. Minoru, A. Kazuhiko, K. Shingu, K. Itoh, Y. Hama, M. Takemoto, T. Iwasaki, A. Teramoto, K. Abe. Microcapsulated parathyroid tissue in vitro. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 54: 66-68, 2000
8. C. Hasse, A. Zilke, G. Klöck, A. Schlosser, U. Zimmermann, M. Rothmund. Isotransplantation of microencapsulated parathyroid tissue in rats. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 105: 53-56, 1997
9. C. Hasse, J. Schrezenmeir, B. Stinner, C. Scharf, P. K. Wagner, K. Neumann, M. Rothmund. Successful allotransplantation of microencapsulated parathyroids in rats. *World Journal of Surgery* 18: 630-634, 1994
10. C. Hasse, T. Bohrer, P. Barth, B. Stinner, R. Cohen, H. Cramer, U. Zimmermann, M. Rothmund. Parathyroid xenotransplantation without immunosuppression in experimental hypoparathyroidism: long-term in vivo function following microencapsulation with clinically suitable alginate. *World Journal of Surgery* 24: 1361-1366, 2000

11. C. Hasse, G. Klöck, A. Schlosser, U. Zimmermann, M. Rothmund. Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *The Lancet* 350: 1296-1297, 1997
12. D. W. R. Grey. An overview of the immune system with specific reference to membrane encapsulation and islet transplantation. *Annals of the New York Academy of Science* 944: 226-239, 2001
13. P. de Vos, J. van Straaten, A. G. Nieuwenhuizen, M. de Groot, R. J. Ploeg, B. J. de Haan, R. van Schilfgaarde. Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic Overgrowth? *Diabetes* 48: 1381-1388, 1999
14. A. M. Rokstad, B. Strand, K. Rian, B. Steinkjer, B. Kulseng, G. Skjak-Brak, T. Espevik. Evaluation of different types of alginate microcapsules as bioreactors for producing endostatin. *Cell Transplantation* 12: 351-364, 2003
15. J. M. van Raamsdonk, P. L. Chang. Osmotic pressure test: a simple, quantitative method to assess the mechanical stability of alginate microcapsules. *Journal of Biomedical Materials Research* 54: 264-271, 2001
16. L. Picariello, S. Benvenuti, R. Recenti, L. Formigli, A. Falchetti, A. Morelli, L. Masi, F. Tonelli, P. Cicchi, M. L. Brandi. Microencapsulation of human parathyroid cells: an “in vitro” study. *Journal of Surgical Research* 96: 81-89, 2001
17. P. de Vos, A. F. Hamel, K. Tatarkiewicz. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* 45: 159-173, 2002
18. V. F. Duvivier-Kali, A. Omer, F. J. Parent, J. J. O’Neil, G. C. Weir. Complete protection of islets against allojection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. *Diabetes* 50: 1698-1705, 2001
19. G. Orive, R. M. Hernandez, A. R. Gascon, M. Igartua, J. L. Pedraz. Encapsulated cell technology: from research to market. *Trends in Biotechnology* 20: 382-387, 2002
20. H. W. Sollinger, E. Mack, K. Cook, F. O. Belzer. Allotransplantation of human parathyroid tissue without immunosuppression. *Transplantation* 36: 599-603, 1983
21. E. C. Segerberg, W. G. Grubb, A. E. Henderson. The first successful parathyroid transplant from an identical twin for the cure of permanent postoperative hypoparathyroidism. *Surgery* 111: 357-358, 1992
22. A. d’Avanzo, S. Parangi, E. Morita, Q. Y. Duh, A. E. Siperstein, O. H. Clark. Hyperparathyroidism after thyroid surgery and autotransplantation of histologically normal parathyroid glands. *Journal of the American College of Surgeons* 190: 532-538, 2000

23. C. R. McHenry, D. B. Stenger, N. K. Calandro. The effect of cryopreservation on parathyroid cell viability and function. *The American Journal of Surgery* 174: 481-484, 1997
24. B. Duarte, M. F. Mozes, E. John, I. Aronson, R. Pollak, O. Jonasson. Parathyroid allotransplantation in the treatment of complicated idiopathic primary hypoparathyroidism. *Surgery* 98: 1072-1076, 1985
25. T. Tolloczko, B. Wozniewicz, A. Sawicki, A. Gorski. Allotransplantation of cultured human parathyroid cells: present status and perspectives. *Transplantation Proceedings* 29: 998-1000, 1997
26. G. Orive, A. R. Gascon, R. M. Hernandez, M. Igarta, J. L. Pedraz. Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends in Pharmacological Sciences* 24: 207- 210, 2003
27. Q. Zeng. Allotransplantation of parathyroid glands to treat intractable hypoparathyroidism. *Surgery* 99: 131-132, 1982
28. D. Hanley, L. M. Ayer. Calcium-dependent release of carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone by hyperplastic human parathyroid tissue in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 63: 1075-1079, 1986
29. M. E. Birnbauer, A. B. Schneider, D. Palmer, D. A. Hanley, L. M. Sherwood. Secretion of parathyroid hormone by abnormal human parathyroid tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 45: 105-113, 1977
30. T. B. Drüeke. Cell biology of parathyroid gland hyperplasia in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 11: 1141-1152, 2000
31. C. P. Schmitt, S. Löcken, O. Mehls, J. D. Veldhuis, T. Lehnert, E. Ritz, F. Schaefer. PTH pulsatility but not calcium sensitivity is restored after total parathyroidectomy with heterotopic autotransplantation. *Journal of the American Society of Nephrology* 14: 407-414, 2003
32. M.-C. Roussanne, M. Lieberherr, J. C. Souberbielle, E. Sarfati, T. B. Drüeke, A. Bourdeau. Human parathyroid cell proliferation in response to calcium, NPS R-467, calcitriol and phosphate. *European Journal of Clinical Investigation* 31: 610-616, 2001
33. M .C. M. de Castro, V. Jorgetti. Assessment of parathyroid hormone secretion before and after total parathyroidectomy with autotransplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation* 14: 2264, 1999

34. S. Walgenbach, G. Hommel, T. Junginger. Prospective evaluation of parathyroid graft function after total parathyroidectomy and heterotopic autotransplantation in renal hyperparathyroidism by bilateral determination of intact parathormone in cubital venous blood. *World Journal of Surgery* 22: 93-98, 1998
35. S. A. Wells, J. R. Farndon, J. K. Dale, G. S. Leight, W. G. Dilley. Long-term evaluation of patients with primary parathyroid hyperplasia managed by total parathyroidectomy and heterotopic autotransplantation. *Annals of Surgery* 192: 451-458, 1980
36. L. E. Mallette, T. Blevins, P. H. Jordan, G. P. Noon. Autogenous parathyroid grafts for generalized primary parathyroid hyperplasia constraining outcome in sporadic hyperplasia versus multiple endocrine neoplasia type I. *Surgery* 101: 738-745, 1987
37. M. L. Brandi, G. D. Aurbach, L. A. Fitzpatrick, R. Quarto, A. M. Spiegel, M. M. Bliziotis, J. A. Norton, J. L. Doppman, S. J. Marx. Parathyroid mitogenic activity in plasma from patients with familial multiple endocrine neoplasia type I. *New England Journal of Medicine* 314: 1287-1293, 1986
38. A. Dove. Cell-based therapies go live. *Nature Biotechnology* 20: 339-343, 2002
39. N. Chikatsu, S. Fukumoto, Y. Takeuchi, M. Suzawa, T. Obara, T. Matsumoto, T. Fujita. Cloning and characterization of two promoters for the human calcium-sensing receptor (CaSR) and changes of CaSR expression in parathyroid adenomas. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 7553-7557, 2000
40. *Endocrinology, Second Edition, Volume 2*. Eds. L. J. DeGroot et al. W. B. Saunders Company-Verlag, Philadelphia, London, Toronto, 1989
41. C. Hasse, H. Sitter, M. Brune, I. Wollenteit, C. Nies, M. Rothmund. Quality of life and patient satisfaction after reoperation for primary hyperparathyroidism: analysis of long-term results. *World Journal of Surgery* 26: 1029-1036, 2002
42. A. Saxe. Parathyroid transplantation: a review. *Surgery* 95: 507-526, 1984
43. P. K. Wagner, H. G. Seescko, M. Rothmund. Replantation of cryopreserved parathyroid tissue. *World Journal of Surgery* 15: 751-755, 1991
44. S. Walgenbach, R. Rosniatowski, F. Bittinger, K. H. Schicketanz, F. Hafner, J. Hengstler, T. Junginger. Modified cryopreservation and xenotransplantation of human parathyroid tissue. *Langenbeck's Archive of Surgery* 384: 277-283, 1999
45. A. W. Saxe, G. W. Gibson, S. Kay. Characterization of a simplified method of cryopreserving human parathyroid tissue. *Surgery* 108: 1033-1039, 1990

46. F. Ulrich, T. Steinmüller, N. Rayes, S. Gryonka, J. Gerlach, P. Neuhaus. Cryopreserved human parathyroid tissue: cell cultures for in vitro testing of function. *Transplantation Proceedings* 33: 666-667, 2001
47. M. L. Brandi, L. A. Fitzpatrick, H. G. Coon, G. D. Aurbach. Bovine parathyroid cells: cultures maintained for more than 140 population doublings. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 83: 1709-1713, 1986
48. M.-C. Roussanne, J. Gogusev, B. Hory, P. Duchambon, J. C. Souberbielle, B. Nabbarra, D. Pierrat, E. Sarfati, T. B. Drüeke, A. Bourdeau. Persistence of Ca²⁺-sensing receptor expression in functionally active, long-term human parathyroid cell cultures. *Journal of Bone and Mineral Research* 13: 354-362, 1998
49. P. Schachter, M. D. Christy, G. S. Leight, B. Lobaugh. Function in athymic nude mice of parathyroid heterografts from patients with primary hyperparathyroidism and secondary hyperparathyroidism. *Surgery* 108: 1040-1046, 1990
50. A. Gaumann, M. Laudes, B. Jacob, R. Pommersheim, C. Laue, W. Vogt, J. Schrezenmeir. Xenotransplantation of parathyroid in rats using barium-alginate and polyacrylic acid multilayer microcapsules. *Experimental Toxicology and Pathology* 53: 35-43, 2001
51. W. Liu, P. Ridefelt, G. Akerström, P. Hellman. Differentiation of human parathyroid cells in culture. *Journal of Endocrinology* 168: 417-425, 2001
52. C. G. Benishin, R. Lewanczuk, J. J. Shan, P. K. T. Pang. Parathyroid hypertensive factor secretion from subcultured spontaneously hypertensive rat parathyroid cells. *American Journal of Hypertension* 12: 1260-1263, 1999
53. K. Sakaguchi, A. Santora, M. Zimering, F. Curcio, G. D. Aurbach, M. L. Brandi. Functional epithelial cell line cloned from rat parathyroid glands. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84: 3269-373, 1987
54. A. W. Saxe. Angiogenesis of human parathyroid tissue. *Surgery* 96: 1138-1143, 1984
55. S. J. Marx, K. Sakaguchi, J. Green III., G. D. Aurbach, M. L. Brandi. Mitogenic activity on parathyroid cells in plasma from members of a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 67: 149-153, 1988
56. M. F. Herrera, C. S. Grant, J. A. van Heerden, D. Jacobsen, A. Weaver, L. A. Fitzpatrick. The effect of cryopreservation on cell viability and hormone secretion in human parathyroid tissue. *Surgery* 112: 1096-1102, 1992

57. M. Rothmund, P. K. Wagner. Assessment of parathyroid graft function after autotransplantation of fresh and cryopreserved tissue. *World Journal of Surgery* 8: 527-533, 1984
58. P. K. Wagner, H. J. Rumpelt, U. Krause, M. Rothmund. The effect of cryopreservation on hormone secretion in vitro and morphology of human parathyroid tissue. *Surgery* 99: 257-264, 1986
59. G. Orive, R. M. Hernandez, A. R. Gascon, R. Calafiore, T. M. Chang, P. De Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacik, J. L. Pedraz. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends in Biotechnology* 22: 87-92, 2004
60. S. Soker, M. Machado, A. Atala. Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering. *World Journal of Urology* 18: 10-18, 2000
61. Cell encapsulation technology and therapeutics. Eds. W. M. Kühtreiber, R. P. Lanza, W. L. Chick. Birkhäuser-Verlag, Boston, Basel, Berlin, 1999
62. Z. Almaden, A. Canalejo, A. Hernandez, E. Ballesteros, S. Garsia-Navarro, A. Torres, M. Rodriguez. Direct effect of phosphorus on parathyroid hormone secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* 11: 970-976, 1996
63. I. Rimpl, R. A. Wahl. Surgery of nodular goiter: postoperative hypocalcemia in relation to extent of resection and manipulation of the parathyroid glands. *Langenbeck's Archiv der Chirurgie, Supplement Kongressband* 115: 1063-1066, 1998
64. N. N. al-Suliman, N. F. Rytov, N. Ovist, M. Blichert-Toft, H. P. Graversen. Experience in a specialist thyroid surgery unit: a demographic study, surgical complications, and outcome. *European Journal of Surgery* 163: 13-20, 1997
65. K. K. Winer, J. A. Yanovski, G. B. Cutler. Synthetic human parathyroid hormone 1-34 vs calcitriol and calcium in the treatment of hypoparathyroidism. *Journal of the American Medical Association* 276: 631-636, 1996
66. C. H. Organ. The history of parathyroid Surgery, 1850-1996: The Excelsior Surgical Society 1998 Edward D Churchill Lecture. *Journal of American College of Surgeons* 191: 284-299, 2000
67. S. A. Wells, J. F. Burdick, B. G. Hattler, C. Christiansen, H. M. Pettigrew, M. Abe, L. M. Sherwood. The allografted parathyroid gland: evaluation of function in the immunosuppressed host. *Annals of Surgery* 180: 805-813, 1974

68. A. J. Ross III, J. K. Dale, J. C. Gunnels, S. A. Wells. Parathyroid transplantation: fate of a long-term allograft in man. *Surgery* 85: 382-384, 1979
69. C. Z. Yao, J. Ishizuka, C. M. Townsend, J. C. Thompson. Successful intracerebroventricular allotransplantation of parathyroid tissue in rats without immunosuppression. *Transplantation* 55: 251-253, 1993
70. X. Gao, Z. Xing, Y. Zhu. Preliminary observation of the thymus as a privileged site for parathyroid gland allotransplantation in rats. *Chinese Medical Scientific Journal* 8: 246-247, 1993
71. G. Bjerneröth, C. Juhlin, J. Rastad, G. Akerström, L. Klareskog. MHC class I und II antigen expression on parathyroid cells and prospects for their allogenic transplantation. *Transplantation* 56: 717-721, 1993
72. K. K. Winer, J. A. Yanovski, B. Sarani, G. B. Cutler. A randomized, cross-over trial of once-daily versus twice-daily parathyroid hormone 1-34 in treatment of hypoparathyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83: 3480-3486, 1998
73. K. K. Winer, C. W. Ko, J. C. Reynolds, K. Dowdy, M. Keil, D. Peterson, L. H. Gerber, C. McGarvey, G. B. Cutler. Long-term treatment of hypoparathyroidism: a randomized controlled study comparing parathyroid hormone-(1-34) versus calcitriol and calcium. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 4214-4220, 2003
74. M. Sato, Y. L. Ma, J. M. Hock, M. S. Westmore, J. Vahle, A. Villanueva, C. H. Turner. Skeletal efficacy with parathyroid hormone in rats was not entirely beneficial with long-term treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302: 304-313, 2002
75. S. Timm, C. Otto, W. Hamelmann, A. M. Gassel, W. Timmermann, K. Ulrichs, A. Thiede. Rat parathyroid allotransplantation: influence of MHC antigen expression on graft survival. *Microsurgery* 21: 221-222, 2001
76. S. Timm, C. Otto, D. Begrich, B. Illert, W. Hamelmann, K. Ulrichs, A. Thiede, W. Timmermann. Short-term immunosuppression after rat parathyroid allotransplantation. *Microsurgery* 23: 503-507, 2003
77. T. Tolloczko, B. Wozniewicz, A. Sawicki, I. Nawrot, M. Migaj, T. Zabitowska, A. Gorski. Cultured parathyroid cell transplantation without immunosuppression in the treatment of surgical hypoparathyroidism. *Transplantation proceedings* 26: 1901-1902, 1994

78. G. Anton, G. Decker, J. H. Stark, J. R. Botha, L. P. Margolius. Allograft transplantation of parathyroid cells. *The Lancet* 345: 124, 1995
79. J. R. Starling, R. Fidler, R. J. Corry. Prolongation of survival of rat parathyroid allografts by enhancing serum and tissue culture. *Surgery* 81: 668-675, 1977
80. S. Timm, C. Otto, D. Begrich, V. Moskalenko, W. Hamelmann, K. Ulrichs, A. Thiede, W. Timmermann. Immunogenicity of parathyroid allografts: comparison of graft function with that of vascular organ transplants under short-term immunosuppression. *Langenbeck's Archive of Surgery* 389: 45-52, 2003
81. M. Niimi, M. Takashina, H. Takami, N. Shirasugi, K. Hamano, K. Esato, K. Matsumoto, Y. Ikeda, T. Shatari, S. Kodaira, K. Kameyama. Experimental parathyroid transplantation: human parathyroid grafts survived and functioned in mice treated with anti-CD4 monoclonal antibody. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 54: 80-82, 2000
82. A. D. Bloom, S. G. Economou, H. M. Gebel. Extension of survival of rat parathyroid allografts by depletion of Ia Donor cells plus preoperative cyclosporine. *Transplantation* 44: 171-174, 1987
83. A. Tibell, E. Rafael, L. Wennberg, J. Nordenstrom, M. Bergström, R. L. Geller, T. Loudovaris, R. C. Johnson, J. H. Brauker, S. Neuenfeldt, A. Werners. Survival of macroencapsulated allogenic parathyroid tissue one year after transplantation in non-immunosuppressed humans. *Cell Transplantation* 10: 591-599, 2001
84. A. Cappai, P. Petruzzo, G. Ruiu, T. Congiu, E. Dessy, W. de Seta, G. Santa Cruz, G. Brotzu. Evaluation of new small barium alginate microcapsules. *The International Journal of Artificial Organs* 18: 96-102, 1995
85. P. E. Lacy, O. D. Hegre, A. Gerasimidi Vazeou, F. T. Gentile, K. E. Dionne. Maintenance of normoglycemia in diabetic mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets. *Science* 254: 1782-1784, 1991
86. C. K. Colton. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplantation* 4: 415-436, 1995
87. P. Metrakos, S. Yuan, S. J. Qi, W. P. Duguid, L. Rosenberg. Collagen gel matrix promotes islet cell proliferation. *Transplantation Proceedings* 26: 3349-3350, 1994
88. F. Lim, A. M. Sun. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210: 908-910, 1980
89. D. W. R. Gray, P. J. Morris. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. *Stain Technology* 62: 373-381, 1987

90. T. Lindl. Zell- und Gewebekultur, 4 Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2000
91. E. F. Graf, W. Bothe. Mikroverkapselung durch Zertropfen. Pharmazie in unserer Zeit 13: 71-82, 1984

Danksagung

Frau Prof. Dr. K. Ulrichs (Experimentelle Transplantations-Immunologie, ETI), meiner Doktor Mutter, möchte ich für das mir entgegenbrachte sehr grosse Vertrauen, die motivierende Unterstützung, die konkreten Anregungen und die korrigierenden Einwände während der gesamten Arbeit herzlich danken.

Für die grosszügige finanzielle Unterstützung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit, meine beruflichen Kenntnisse zu vertiefen und zu vervollständigen, möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik ganz herzlich danken.

Für die zahlreichen Diskussionen, Ideen, Gespräche und die konstruktive klinisch-wissenschaftliche Betreuung bin ich Herrn Prof. Dr. W. Timmermann, Herrn Dr. S. Timm, Herrn PD Dr. C. Otto, Herrn PD Dr. E. Blind und Herrn U. Beutner Ph.D. sehr verbunden.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. C. Reiners, Direktor der Klinik für Nuklearmedizin, Herrn Prof. Dr. Y. E. Demidchik, Leiter des Lehrstuhls der Onkologie der Weißrussischen Staatlichen Medizinischen Universität und Herrn Dr. J. Biko, Klinik für Nuklearmedizin, für Ihre stete Hilfsbereitschaft und besonders dafür, dass sie mir die Arbeit an der Universität Würzburg ermöglichten.

Allen Mitarbeitern der Experimentellen Transplantations-Immunologie, insbesondere Frau I. Chodnevsckaja, Frau S. Gahn, Frau. S. Eber, Frau K. Knoke, Frau L. Stevenson-Knebel, Herrn A. Reichert und Frau A. Prappacher-Lösch gehört ein großes *merci* für die Atmosphäre, in welcher ich mich wohl fühlte und die fachliche und private Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn A. Kerscher (AIP), ebenfalls Doktorand von Frau Prof. Dr. K. Ulrichs, Frau A. Luthe (Klinik für Endokrinologie) und Frau A. Böhmer (Chirurgische Universitätsklinik und Poliklinik) für die hervorragende technische und sehr freundschaftliche Zusammenarbeit, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich sehr beim Deutschen Akademischen Austauschdienst, DAAD) und dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) Würzburg.

Meinen Eltern bin ich unendlich dankbar für ihre liebeswerte Art, mit der sie mich seit jeher mit Rat und Tat unterstützten. Ihre Unterstützung und Liebe waren die wichtigste Stütze in manch turbulenter Phase in den vergangenen Jahren.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Vasiliy Moskalenko
Geburtsdatum	19. Mai 1977
Geburtsort	Minsk, Weißrussland
Familienstand	ledig, keine Kinder

Schulbildung

1984-1984	Allgemeinbildende Mittelschule in Minsk mit erweitertem Chemieunterricht. Zeugnis über den Erwerb der allgemeinen Mittelschulbildung mit Auszeichnung.
-----------	--

Hochschulausbildung

1994-2000	Studium an der Weißrussischen Staatlichen Medizinischen Universität, Minsk, Weißrussland
1996	Teilnahme an der wissenschaftlichen Studiengesellschaft für Immunologie. Der wissenschaftliche Vortrag, veröffentlicht im Rahmen der genannten Gesellschaft, wurde mit dem dritten Preis an der Republikanischen Studienkonferenz für Wissenschaft ausgezeichnet.
1997-2000	Teilnahme an der wissenschaftlichen Studiengesellschaft bei dem Lehrstuhl für Onkologie an dem Medizinischen Institut, Minsk. Alljährliche Teilnahme an den Studienkonferenzen für Wissenschaft:
1998	Der erste Preis der Republikanischen Studienkonferenz für Wissenschaft (Sektion für Onkologie),
1998	Der erste Preis der Republikanischen Studienkonferenz für Wissenschaft (Sektion für Anatomie),
1999	Der erste Preis der Republikanischen Studienkonferenz für Wissenschaft (Sektion für Onkologie),
2000	Der erste Preis der Republikanischen Studienkonferenz für Wissenschaft (Sektion für Onkologie).
2000	Abschluss der Weißrussischen Staatlichen Medizinischen Universität, Minsk; Diplom in Medizin mit Auszeichnung.

Berufliche Tätigkeit

- 2000-2001 Spezialisierung im Fach *Onkologie* an der Belorussischen Akademie für Nachdiplomausbildung und in der Klinik für Onkologie der Weißrussischen Staatlichen Medizinischen Universität.
- 2001-2002 Tätigkeit als Chirurg an der Minsker Städtischen Klinischen Onkologischen Beratungsstelle (Klinik für Onkologie, Weißrussische Staatliche Medizinische Universität, Minsk, Weißrussland).
- 07/2002–11/2002 DAAD-Stipendiat in der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik der Universität Würzburg (Prof. Dr. A. Thiede) und der dortigen Experimentellen Transplantations-Immunologie (Frau Prof. Dr. K. Ulrichs).
- 12/2002–03/2003 Gastwissenschaftler im Teilprojekt D3 des IZKF Würzburg in der Experimentellen Transplantations-Immunologie.
- Seit 04/2003 Wissenschaftlicher Assistent in der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik und der dortigen Experimentellen Transplantations-Immunologie.

Würzburg, im März 2004

Vasiliy Moskalenko

