

**Aus der Klinik für Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin**

**DISSERTATION**

**Mikroverkapselung von humanen  
Parathyreozyten mit Natrium-  
cellulosesulfat und Poly-DADMAC in der  
Behandlung des postoperativen  
Hypoparathyreoidismus**

**Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin**

**Von Markus Gärtner  
aus Stuttgart**

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter E. Goretzki

2. Priv. Doz. Dr. Jochen Klupp

3. Prof. Dr. Joachim Steinmüller

Datum der Einreichung: 28. Oktober 2003

Datum der Promotion: 24. September 2004

*Hoc se quisque modo semper fugit*

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Postoperativer Hypoparathyreoidismus .....	3
1.2 Physiologische Grundlagen.....	4
1.2.1 Kalzium .....	4
1.2.2 Parathyrin .....	5
1.2.3 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol).....	7
1.2.4 Calcitonin .....	7
1.3 Klinisches Bild des Hypoparathyreoidismus .....	8
1.4 Medikamentöse Therapie des Hypoparathyreoidismus .....	9
1.5 Transplantation von humanem Nebenschilddrüsengewebe.....	9
1.5.1 Autotransplantation .....	9
1.5.2 Allotransplantation .....	10
1.6 Mikroverkapselung .....	12
1.6.1 Mikroverkapselung mit Alginat / Polylysin (ALG / PLL).....	12
1.6.2 Mikroverkapselung mit Natriumcellulosesulfat und Poly-DADMAC .....	13
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	15
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Präparation und Kultivierung humaner Parathyreozyten.....	16
2.1.1 Kryokonservierung.....	16
2.1.2 Anlegen der Zellkulturen .....	16
2.2 Mikroenkapsulierung .....	18
2.2.1 Natriumcellulosesulfat und Polydiallyldimethylammoniumchlorid .....	18
2.2.2 Encapsulator AP <sup>TM</sup> .....	20
2.3 Bestimmung der mechanischen Eigenschaften (LUMiTester).....	23
2.4 Porengrößenbestimmung .....	24
2.5 Bestimmung von Zellzahl, Viabilität und Steuerbarkeit humaner Parathyreozyten	25
2.5.1 Hämozytometer .....	25
2.5.2 Viabilitätsprüfung mit Trypanblau.....	25
2.5.3 Kalziumsuppressionstest .....	25
2.6 PTH-Bestimmung .....	26
2.6.1 Elektrochemilumineszenzimmunoassay (ECLIA).....	26
2.7 Versuchsaufbau.....	27

2.8	Statistische Methoden .....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1	Viabilität und Morphologie humaner Parathyreozyten in Zellkultur.....	31
3.2	Eigenschaften der hergestellten Mikrokapseln .....	33
3.2.1	Bestimmung der mechanischen Eigenschaften .....	33
3.2.2	Porengrößenbestimmung.....	35
3.3	In vitro-Sensitivität unverkapselter Parathyreozytenkulturen.....	37
3.4	PTH-Sekretion unverkapselter Parathyreozyten.....	39
3.5	In vitro-Sensitivität enkapsulierter Parathyreozyten.....	41
3.6	PTH-Sekretion enkapsulierter Parathyreozyten.....	43
3.6.1	PTH-Sekretion enkapsulierter Parathyreozyten - Kurzzeitversuche.....	43
3.6.2	PTH-Sekretion enkapsulierter Parathyreozyten - Langzeitversuche.....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>47</b>
4.1	Bisherige Behandlungsansätze des postoperativen Hypoparathyreoidismus .....	47
4.2	Substanzen zur Mikroenkapsulierung .....	49
4.3	Biokompatibilität und Immunkompatibilität .....	50
4.4	Mikroenkapsulierung – Auswahl bisheriger Anwendungen.....	54
4.5	Bewertung der eigenen Ergebnisse .....	57
4.5.1	Unverkapselte Parathyreozytenkulturen .....	57
4.5.2	Bewertung des Verkapselungsverfahrens .....	58
4.5.3	Bewertung der Kalziumsensitivität enkapsulierter Parathyreozyten .....	60
4.5.4	Bewertung der PTH-Sekretion enkapsulierter Parathyreozyten im zeitlichen Verlauf.....	60
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung an Eides Statt.....</b>	<b>76</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Postoperativer Hypoparathyreoidismus

Der permanente, postoperative Hypoparathyreoidismus stellt eine schwerwiegende Komplikation nach Schilddrüsenoperationen dar. Neben einer möglichen Schädigung des Nervus recurrens gehört die Schädigung der an der Dorsalseite der Schilddrüse gelegenen Epithelkörperchen zu den ernstzunehmenden Komplikationen bei thyreoidalen Eingriffen. Gekennzeichnet ist der Hypoparathyreoidismus durch einen Mangel an Parathyrin. Mögliche Folgen sind die transiente oder permanente Hypokalzämie. Die Häufigkeit hängt hierbei von der Genese der Schilddrüsenerkrankung, der Erfahrung des jeweiligen Operateurs und der gewählten Operationsmethode ab. Die Inzidenz des permanenten Hypoparathyreoidismus wird alleine in Deutschland auf ca. 1500 Patienten pro Jahr geschätzt.

In der internationalen Literatur sind die Fallzahlen sehr unterschiedlich und reichen von 0,5 bis 9 %<sup>1,2</sup>.

Das Risiko einer Hypokalzämie ist bei ausgedehnten Resektionsverfahren höher. Die Lymphadenektomie bei Schilddrüsenkarzinomen erhöht das Risiko zusätzlich<sup>1,3</sup>.

Steinmüller et al.<sup>4</sup> verzeichneten bei einem Gesamtkollektiv von 2235 Patienten mit benigner Struma multinodosa in 16,1% eine transiente und in 1,4% der Fälle eine permanente Hypokalzämie. Die vermeintlich risikoträchtigeren Hemithyreoidektomie mit kontralateraler subtotaler Resektion wies gegenüber der subtotalen Resektion beidseits lediglich bei der Inzidenz der transienten Hypokalzämie ein signifikant erhöhtes Risiko auf. Rezidivoperationen hatten im Vergleich zum Gesamtkollektiv kein erhöhtes Risiko, während Patienten mit einer Struma WHO III oder retrosternalen Anteilen teilweise hochsignifikant höhere Raten an transientser Hypokalzämie aufwiesen.

## 1.2 Physiologische Grundlagen

### 1.2.1 Kalzium

Kalzium erfüllt im menschlichen Organismus vielfältige biochemische Funktionen (*Abb.1*). Gemeinsam mit Phosphat bildet Kalzium den anorganischen Anteil des Knochens und trägt somit wesentlich zu seiner mechanischen Stabilität bei. Der überwiegende Anteil des Körperkalziums (ca. 99 %) ist hier fest gebunden. Die Knochensubstanz dient weiterhin als Speicherorgan für Kalziumionen, aus dem dieses Kation bei längerdauerndem Kalziummangel mobilisiert werden kann. Schätzungsweise ein Prozent des Kalziumpools kann zu diesem Zwecke verfügbar gemacht werden<sup>5,6</sup>.

Auch bei der Blutgerinnung spielt Kalzium eine entscheidende Rolle. Hier ist es als freies Ion durch Bildung von Komplexen mit Phospholipiden und Gerinnungsfaktoren an der Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Systems beteiligt<sup>6,7</sup>.

Kalzium dient als Signalvermittler bei der Zellaktivierung, indem es Informationen von der Membran der aktivierten Zelle auf Rezeptormoleküle innerhalb der Zelle überträgt. Meist geht die Zellaktivierung mit einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration von  $10^{-7}$  mol/l auf Werte von etwa  $10^{-5}$  mol/l einher. Diese Konzentrationserhöhung erfolgt sowohl durch Öffnen spezifischer Membrankanäle als auch durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Die so erhöhte Kalziumkonzentration ermöglicht wichtige Reaktionen in der Zelle, wie die Kontraktion der Myofibrillen, die der Muskelkontraktion zugrundeliegt, oder die Freisetzung von Transmittervesikeln aus Nervenendigungen<sup>6</sup>.

Eine Verringerung der Kalziumkonzentration im Extrazellulärraum führt zur Erniedrigung der Erregbarkeitsschwelle von Muskel- und Nervenzellmembranen. Umgekehrt verursacht eine Erhöhung der Kalziumkonzentration eine Abnahme der Natriumpermeabilität und damit der Erregbarkeit der Membran.

Die komplexe Regulation der Kalziumhomöostase wird im wesentlichen durch drei Hormone vermittelt, auf die im weiteren näher eingegangen werden soll: Parathormon (PTH), Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) und Calcitonin. Zielgewebe dieser Hormone sind Darmmukosa, Nierentubuli und der Knochen<sup>6</sup>.

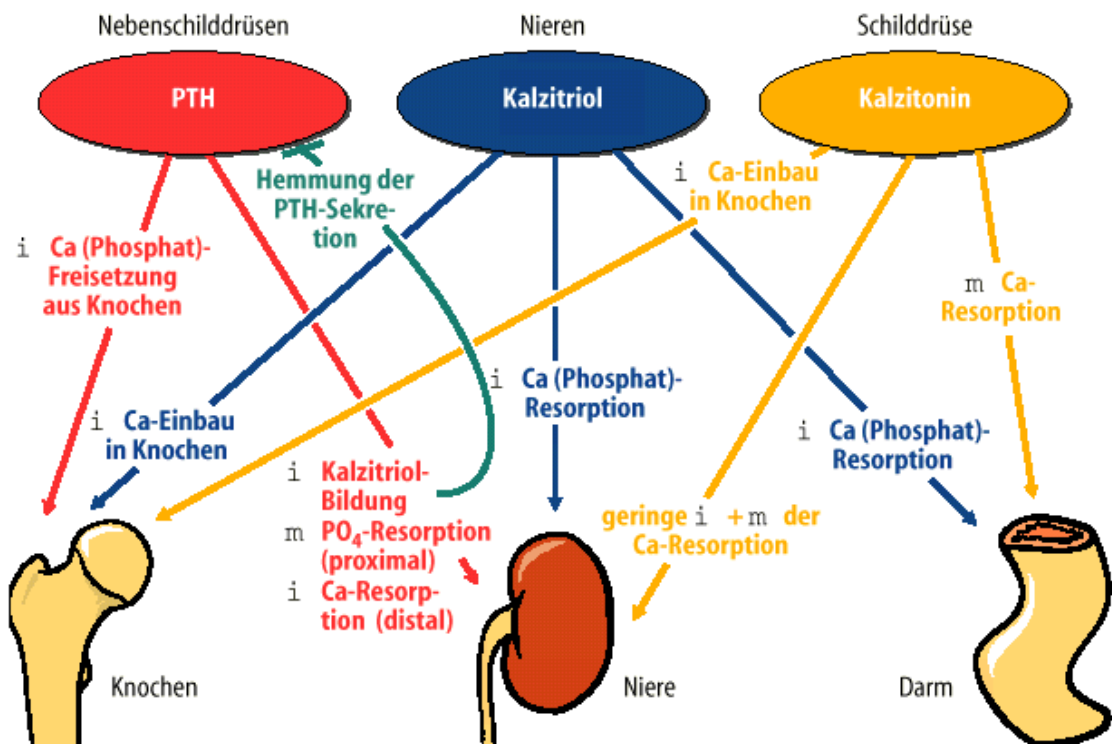


Abbildung 1: Kalziumstoffwechsel

(aus: Schmidt, Thews: Physiologie des Menschen, 27. Auflage; Springer Verlag, Berlin)

### 1.2.2 Parathyrin

Parathyrin (PTH,  $M_w = 9500$ ) ist ein aus 84 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, das in den Hauptzellen der vier Epithelkörperchen aus einer größeren Vorstufe des Präparathyrin synthetisiert wird. Aktiver Metabolit ist das Molekül mit der Aminosäuresequenz 1-84. Dieses ist zur immunologischen Parathormonmessung besonders geeignet und erlaubt so die genauesten Aussagen über den Funktionszustand der Nebenschilddrüsen und ihrer Erkrankungen.

Zusammen mit Calcitonin und 1,25-Dihydroxycholecalciferol spielt Parathyrin eine entscheidende Rolle in der komplexen Regulation der Kalziumhomöostase.

Neben dem Intaktmolekül finden sich im Blut weitere PTH-Fragmente: Ein aminoterminales Fragment ist ebenfalls aktiv und besteht aus 34 Aminosäuren. Vermutlich biologisch inaktiv ist das aus den Aminosäuren 35-84 bestehende C-Fragment. Es hat eine längere Halbwertszeit als die anderen beiden Moleküle und wurde eine Zeit lang zur PTH-Messung herangezogen<sup>6,7</sup>.



Intaktes Parathormon, PTH 1-84, hat eine Halbwertszeit von wenigen Minuten und wird anschließend in den Epithelkörperchen selbst sowie in Leber und Niere proteolytisch abgebaut. Das entstehende N-terminale Fragment mit den Aminosäuren 1-33 besitzt noch die volle biologische Aktivität und wird offensichtlich schneller zu kleineren Bruchstücken abgebaut als das C-terminale, biologisch inaktive Fragment mit den Aminosäuren 34-84. Resultierend befindet sich im Blut ein Gemisch aus intaktem PTH 1-84 sowie dessen zahlreichen, biologisch unterschiedlich aktiven Bruchstücken.

Eine exakte Erfassung der biologischen Aktivität der Nebenschilddrüse erfordert das selektive Messen des intakten Parathormons<sup>6</sup>.

Aufgrund einer früheren Gen-Duplikation besitzt PTH ein Geschwisterhormon, das *parathyroid hormone related proteine* PTHrP. Es verfügt über wechselnde Längen mit 141-147 Aminosäuren. Seine biologische Wirksamkeit, die vergleichbar dem PTH ist, erhält es durch die Sequenz 1-34. Medizinische Bedeutung hat es bei der Tumorhyperkalzämie durch solide Tumoren, die PTHrP neoplastisch bilden können.

Sowohl PTH- als auch PTHrP wirken auf die Zielzellen über einen 7-Transmembrandomänenrezeptor, der an heterotrimere G-Proteine gekoppelt ist und die Adenylatcyclase stimuliert.

Parathormon wird freigesetzt, wenn der Kalziumspiegel im Blut sinkt. Hierbei wird durch einen kalziumregistrierenden Rezeptor ein stimulierender Reiz auf den PTH-produzierenden Apparat vermittelt. Umgekehrt wird bei erhöhten Kalziumspiegeln die PTH-Sekretion gedrosselt. Ebenfalls inhibierende Wirkung auf die PTH-Sekretion besitzt Calcitriol. Im Gegensatz dazu können Katecholamine sowie Lithium die Parathyrinsekretion stimulieren<sup>5</sup>.

Wesentliche Erfolgsorgane des Parathyrin sind Nieren, Knochen sowie intestinale Mukosa. An der Niere entfaltet es drei entscheidende Wirkungen: als Akuteffekt wird die Reabsorption von Kalzium gefördert und einem weiteren Abfall des Serumkalziums entgegengesteuert. Weiterhin verstärkt es die Phosphaturie durch Hemmung der Phosphat-Reabsorption. Ein weiterer sehr wichtiger Effekt an der Niere besteht darin, die Hydroxylierung von 25-Hydroxycholecalciferol zum biologisch aktiven 1,25-Dihydroxycholecalciferol zu stimulieren. Damit schafft es die Voraussetzungen zur Steigerung der intestinalen Kalziumresorption bei erniedrigten Plasmakalziumkonzentrationen<sup>5,6,7</sup>.

Am Knochen führt Parathormon nach einer Latenzphase von etwa 60 Minuten zu einer Kalziummobilisierung. Es stimuliert hier die Freisetzung von Kollagenasen durch Osteoblasten. Durch *Interleukin 1* vermittelt fördert es die Differenzierung von Makrophagen zu

mehrkernigen Osteoklasten, die maßgeblich am Abbau organischer und anorganischer Knochenmatrix beteiligt sind. Freiwerdende Kalziumionen werden von den Osteoklasten aufgenommen, in den Extrazellulärraum transportiert und gelangen schließlich in die Blutbahn.

An der Dünndarmmukosa stimuliert PTH die Resorption von Kalzium und Magnesium, wobei dieser Effekt im Vergleich zu den anderen Wirkungen des Parathyrins nur von untergeordneter Bedeutung ist<sup>6,7</sup>.

### **1.2.3 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol)**

Vitamin D ist in der Blutbahn praktisch unwirksam, es wird in der Leber durch das Enzym 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol) umgewandelt.

Calcidiol gelangt über den Blutkreislauf in die Niere, um dort erneut hydroxyliert zu werden. Die 1 $\alpha$ -Hydroxylase katalysiert die Umwandlung zum 1,25-Dihydroxycholecalciferol, dem aktiven Stoffwechselmetaboliten.

Ein erhöhter Parathyrin- sowie ein erniedrigter Kalzium- oder Phosphat Spiegel stimulieren die 1 $\alpha$ -Hydroxylase. Umgekehrt wird das Enzym durch einen erhöhten PTH-Spiegel oder eine Hyperkalzämie inhibiert.

Rezeptoren für Calcitriol finden sich ubiquitär im Organismus, vor allem jedoch im Darm. Calcitriol ist in seiner Wirkung eng mit dem Parathyrin verwoben. Im Darm verstärkt es die Kalziumaufnahme durch Induktion des kalziumbindenden Proteins. Gleichzeitig steigert es die Absorption von Phosphationen. Hierdurch werden dem Skelett die notwendigen Ionen für die Mineralisation zur Verfügung gestellt.

Calcitriol fördert direkt den Knochenanbau. Ein Vitamin-D-Exzess kann jedoch auch zu einem verstärkten Abbau von Knochengrundsubstanz führen<sup>5,6,7</sup>.

### **1.2.4 Calcitonin**

Calcitonin wird im menschlichen Organismus hauptsächlich in thyreoidalen C-Zellen hergestellt. Weitere Syntheseorte sind Gehirn, Thymus, Lungen und Nebennierenmark, ohne dass die lokale Bedeutung bekannt wäre.

Bei einem Anstieg des Serumkalziumspiegels vermindert sich die Parathormonsekretion der Nebenschilddrüsen, gleichzeitig erhöht sich die Calcitoninfreisetzung aus den C-Zellen der Schilddrüse. Parathormonantagonistisch bewirkt es eine verminderte Osteolyse und einen vermehrten Kalziumeinbau in den Knochen.

Gastrointestinale Hormone wie Gastrin, Cholezystokinin-Pankreozymin und Glukagon können ebenso einen starken Reiz für die Freisetzung von Calcitonin darstellen, wodurch im Sinne einer Rückkopplung die Verdauung verzögert und die Kalziumfreisetzung aus dem Knochen gehemmt wird<sup>5</sup>.

### **1.3 Klinisches Bild des Hypoparathyreoidismus**

Die klinische Symptomatik des Hypoparathyreoidismus ist abhängig von der Serumkonzentration ionisierten Kalziums. Aufgrund einer gestörten Funktion des sensorischen Teils der Nerven kann es an Gesicht und Extremitäten zu Parästhesien kommen. Positive Chvostek- und Trousseau-Zeichen können erhoben werden. Bei Konzentrationen unter 1,1 mmol/l manifestiert sich in der Regel das tetanische Syndrom. Durch eine Erniedrigung der neuromuskulären Erregbarkeit kommt es zu Krämpfen und Spasmen der Muskulatur: Pfötchenstellung der Hände, Karpopedalspasmen der Füße sowie der sog. Karpfenmund sind pathognomonisch. Spasmen der glatten Muskulatur können einhergehen mit Kontrakturen der Bronchialmuskulatur, Gallenkoliken, Durchfällen sowie Krämpfen in Magen und Darm.

Trotz der vorhandenen Hypokalzämie kann es aufgrund wechselnder Hyperphosphatämien in Abhängigkeit vom Phosphatreichtum der Nahrung zu sogenannten paradoxen Verkalkungen kommen. In typischer Weise manifestiert sich dies als tetanische Katarakt oder Stammganglienverkalkung.

Bei einigen Patienten mit lang anhaltender Hypokalzämie wurde eine Erhöhung des intrakraniellen Druckes, der oft mit einem Papillenödem assoziiert war, festgestellt. Mögliche Symptome des endokrinen Psychosyndroms sind erhöhte Reizbarkeit, depressive Verstimmung, Angstgefühle sowie Antriebslosigkeit<sup>5,8</sup>.

## **1.4 Medikamentöse Therapie des Hypoparathyreoidismus**

Therapie der Wahl bei transienter und permanenter Hypokalzämie ist die medikamentöse Zufuhr von 1- $\alpha$ -hydroxilierten Derivaten des Vitamin D, Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) und Alfacalcidol (1-Hydroxycholecalciferol). Beide Medikamente verfügen über einen raschen Wirkungseintritt sowie ein schnelles Abfluten nach Dosisreduktion. Die tägliche Dosis der Medikamente beträgt 1-2  $\mu\text{g}$ <sup>8</sup>.

Um eine lebenslange medikamentöse Substitution von Kalzium und Vitamin-D-Derivaten bei parathyreopriver Hypokalzämie zu umgehen, wurde nach anderen Formen der Behandlung gesucht. Entgegen früheren Annahmen über die vermeintliche Wirksamkeit von oral zugeführten Parathormonpräparaten<sup>9</sup> scheidet diese Form der Behandlung aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Parathyrins von wenigen Minuten aus.

## **1.5 Transplantation von humanem Nebenschilddrüsengewebe**

### **1.5.1 Autotransplantation**

In der Therapie des sekundären Hyperparathyreoidismus konnten bisher vielfältige klinische Erfahrungen mit der Kryokonservierung und Autotransplantation von Nebenschilddrüsengewebe gemacht werden. Es wurden daher Anstrengungen unternommen, auch die allogene Transplantation in die Behandlung der permanenten, parathyreopriven Hypokalzämie einzuführen.

Erste Versuche zur Autotransplantation von Nebenschilddrüsengewebe wurden Anfang des 20. Jahrhunderts von Halsted<sup>10</sup> durchgeführt, der die Vitalität von Autotransplantaten im Tierexperiment histologisch sichern konnte.

Erst in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts konnte sich die Transplantation von humanem Nebenschilddrüsengewebe klinisch etablieren. Maßgeblich vorangetrieben hatten diese Entwicklung Wells et al., die die ersten Autotransplantationen von parathyreoidalem Gewebe an größeren Patientenkollektiven durchgeführt hatten und dessen Funktion klinisch, histologisch und physiologisch belegen konnten.

Indikationsstellungen waren die operative Therapie des sekundären Hyperparathyreoidismus, Wiederholungseingriffe bei persistierendem Hyperparathyreoidismus sowie die totale Thyreoidektomie aufgrund eines Karzinoms.

Nach totaler Parathyreoidektomie wurden jeweils 20 Nebenschilddrüsenpartikel von ca. 1-2 mm Durchmesser heterotop in Muskeltaschen der Unterarmmuskulatur eingepflanzt. Konnte nach erfolgter Parathyreoidektomie keine Aussage über potentiell verbliebene weitere Nebenschilddrüsen gemacht werden, wurde Nebenschilddrüsenengewebe kryokonserviert. Nachdem eine Persistenz des Hyperparathyreoidismus ausgeschlossen war, wurde das Gewebe schließlich autotransplantiert<sup>11,12</sup>.

Der Unterarm wurde gewählt, um bei einem transplantatbedingtem Hyperparathyreoidismusrezidiv eine schnelle und einfache Entfernung des Transplantates unter Lokalanästhesie gewährleisten zu können. Des Weiteren dient die PTH-Bestimmung im venösen Abfluss als Maß für die Funktion des Transplantates<sup>13,14</sup>.

### **1.5.2 Allotransplantation**

Aufgrund der Abstoßung des Spendergewebes durch das Immunsystem des Empfängers gestaltet sich die allogene im Vergleich zur autologen Transplantation sehr viel schwieriger.

Erste klinische Erfolge hierbei wurden ebenfalls von Wells et al. in den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts erzielt: Ein Patient mit renaler Osteodystrophie erhielt, nach totaler Parathyreoidektomie im Rahmen einer Nierentransplantation, zwei Nebenschilddrüsen seines Vaters. Diese wiesen bei dem immunsupprimierten Patienten eine längerfristig gute Funktion auf und wurden nach drei Jahren zusammen mit der Niere abgestoßen<sup>15</sup>.

Seither wurde eine Reihe erfolgreicher Allotransplantationen unter Immunsuppression durchgeführt<sup>16,17</sup>. Alfrey et al. berichteten über eine Patientin mit Normokalzämie noch dreizehn Jahre nach Transplantation von HLA-kompatiblen allogenem Nebenschilddrüsenengewebe<sup>18</sup>.

Da eine längerfristige Immunsuppression für die alleinige Transplantation von Nebenschilddrüsenengewebe in aller Regel nicht vertretbar erscheint, wurde nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten gesucht<sup>19</sup>.

Yao et al. berichteten über die erfolgreiche parathyreoidale Allotransplantation in den zerebralen Seitenventrikel von Ratten ohne Immunsuppression und zeigten so den offensichtlich privilegierten Immunstatus dieser Lokalisation<sup>20</sup>.

Weiterhin wurden verschiedene Konzepte entwickelt, die Immunantwort des Transplantatempfängers zu modulieren:

Lafferty et al. konnten im Tiermodell eine verlängerte Transplantatüberlebenszeit erreichen, indem sie das zu transplantierende Gewebe vor Allotransplantation für bestimmte Zeit *in vitro* kultivierten<sup>21</sup>.

Es wurde postuliert, dass eine effektive Empfängerimmunantwort durch die Gegenwart von MHC I und MHC II – Antigenen des Spenders hervorgerufen wird. Da nur bestimmte Zellpopulationen wie Lymphozyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen sowohl MHC I- als auch MHC II-Antigene exprimieren, wurde gefolgert, dass deren Abwesenheit die Immunogenität von transplantierten Geweben vermindert<sup>22</sup>.

Mit unterschiedlichen Methoden wurde versucht, diese auch als *passenger cells* bekannten Zellen in dem jeweiligen Transplantat zu minimieren.

Eine verlängerte Überlebenszeit von Allotransplantaten nach Inkubation in Organkultur konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden<sup>23,24,25</sup>. Feind et al. allotransplantierten *in vitro*-kultiviertes, humanes Parathyreozytengewebe. Sie konnten bei einem Patienten eine Überlebenszeit des allogenen Spendergewebes von mehreren Monaten ohne Immunsuppression und ohne zusätzliche Gabe von Kalzium und Vitamin D erreichen<sup>26</sup>.

Mittels Durchflusszytometrie wurde nachgewiesen, dass die Kultivierung von parathyreoïdalen Zellen zu einer verminderten Expression von MHC-Antigenen führt. Bezüglich der Allogrenität scheint also die Transplantation von kultivierten Einzelzellen gegenüber der von Gewebepartikeln deutliche Vorteile zu besitzen<sup>27</sup>.

Sollinger et al. entwickelten ein *in vivo*-Modell, in dem humanes Parathyreozytengewebe vorübergehend Nacktmäusen unter die Nierenkapsel verpflanzt wurde. Im nichtimmunsupprimierten, HLA-A und -B inkompatiblen Empfängertier konnten sie so eine längere Transplantatüberlebenszeit erreichen<sup>22</sup>.

Obwohl die Organkultur die Überlebenszeit der Allotransplantate wesentlich verlängern konnte, vermochte sie jedoch nicht die endgültige Abstoßung zu verhindern. Bloom et al. entwickelten deshalb im Rattenmodell eine Kombination aus Organkultur, *in vitro* Inkubation mit Anti-Ia Serum und Komplementfaktoren sowie die präoperative Behandlung des Empfängers mit Cyclosporin A<sup>28</sup>. Nach einem Beobachtungszeitraum von einem Jahr konnten bei 67% der Empfängertiere noch funktionierende Allotransplantate nachgewiesen werden.

Ebenso konnte mit einer lokalen Verabreichung von Cyclosporin A bei Serumkonzentrationen weit unter dem therapeutischen Bereich eine deutliche Reduzierung von MHC I- und MHC II-Antigenen erreicht werden<sup>29</sup>.

Bjerneroth et al. wiesen Unterschiede bezüglich der Immunogenität von hyperplastischen und adenomatösen im Vergleich zu normalen Parathyreozyten nach: In Monolayerkulturen reagierten hyperplastische und adenomatöse, nicht jedoch normale Nebenschilddrüsenzellen in der Anwesenheit von Interferon  $\alpha$  oder  $\gamma$  mit der Expression von MHC I- und MHC II-Antigenen<sup>30,31,32</sup>.

Einer südafrikanischen Arbeitsgruppe war es gelungen, die Anzahl von MHC I- und MHC II tragenden Zellen in Monolayerkulturen durch den Einsatz von mit Antikörpern verbundenen, magnetischen Mikropartikeln zu reduzieren<sup>33</sup>.

## **1.6 Mikroverkapselung**

Trotz der verbesserten längerfristigen Transplantatüberlebenszeit konnte ein durch Abstoßung bedingter Funktionsverlust bei der Mehrzahl der oben genannten Anwendungen nicht verhindert werden.

Die Technologie der Mikroenkapsulierung von parathyreoidealen Zellen erscheint daher als sinnvolle Alternative, die es ermöglicht, die immunogene Abstoßungsreaktion zu verhindern.

Grundgedanke dieses Verfahrens ist es, durch die Verkapselung von Zellen eine dauerhafte, semipermeable Barriere zwischen Spenderorgan und Empfängerorganismus zu etablieren.

Die Semipermeabilität dieser hybriden Mikroorgane ermöglicht einen ungehinderten Austausch von Stoffwechselmetaboliten und Hormonen und stellt doch gleichzeitig einen sicheren und dauerhaften immunogenen Schutz dar.

### **1.6.1 Mikroverkapselung mit Alginat / Polylysin (ALG / PLL)**

Erfolgversprechende in vitro und in vivo Versuche an Ratten wurden 1980 von Lim et al. mit der Mikroverkapselung von Langerhans-Inseln durchgeführt<sup>34</sup>. Dabei kamen Natriumalginat – Polylysin (ALG/PLL)- Mikrokapseln zur Anwendung.

Bei dieser Methode wurden die Langerhans-Inseln mit Natriumalginatlösung vermischt und in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Das Alginat-Zellgemisch wurde, nachdem es einen Tropfengenerator passiert hatte, in eine Kalziumchloridlösung getropft. Die hieraus resultierenden, gelifizierten ALG-Tropfen wurden dekantiert und mit einer Polylysin-Lösung behandelt.

Anschließend wurden die ALG/PLL-Mikrokapseln mit Kalziumchlorid gewaschen, in wässriger Polyethylenaminlösung resuspendiert, erneut mit Kalziumchlorid und physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und schließlich in isotonischer Natriumcitratlösung suspendiert, um das Alginat im Inneren der Kapsel zu verflüssigen.

Dieses Prinzip wurde schließlich Anfang der neunziger Jahre von Hasse et al. für die Allotransplantation von humanem Nebenschilddrüsengewebe aufgegriffen. Der Arbeitsgruppe gelang 1994 mit der Einkapsulierung von parathyreoidalen Gewebepartikeln die erste erfolgreiche Allotransplantation im Langzeitversuch ohne Immunsuppression<sup>35</sup>.

Die Gewebepartikel der Nebenschilddrüsen wurden, nach Isolation und Organkultur, mit Bariumalginat verkapselt und hypokalzämischen Ratten verpflanzt. Die Tiere zeigten auch nach einem Beobachtungszeitraum von 90 Tagen noch normale Serumkalziumkonzentrationen.

Wenig später gelang der selben Arbeitsgruppe die erste experimentelle parathyreoidale Xenotransplantation<sup>36</sup>.

Bevor jedoch diese Form der Einkapsulierung zum klinischen Einsatz kommen konnte, wurden mitogene Eigenschaften des hierfür verwendeten Alginates nachgewiesen.

Zimmermann et al. gelang es schließlich durch ein aufwendiges elektrophoretisches Aufreinigerungsverfahren, ein von mitogenen Kontaminationen freies Alginat herzustellen<sup>37</sup>.

Dieses amitogene Alginat wurde erfolgreich *in vitro* und *in vivo* getestet<sup>38,39,40</sup>. Bei dem Versuch des klinischen Einsatzes konnten erste Erfolge erzielt werden: Durch die Allotransplantation von enkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe bei zwei Patientinnen mit postoperativem Hypoparathyreoidismus konnte eine vorübergehende Besserung der klinischen Symptomatik bei halbierter Substitutionsdosis erreicht werden<sup>41</sup>.

### **1.6.2 Mikroverkapselung mit Natriumcellulosesulfat und Poly-DADMAC**

Dautzenberg et al. entwickelten bereits Anfang der achtziger Jahre ein Verkapselungsverfahren auf der Basis gegensätzlich geladener Polyelektrolyte. Natriumcellulosesulfat als



Polyanion wird dabei in ein aus dem Polykation Polydiallyldimethylammoniumchlorid bestehendes Fällbad getropft. Hierbei entstehen Mikrokapseln mit einer festen, semi-permeablen Polysalzmembran als Kapselwand und einem flüssigen Kern<sup>49,50</sup>.

Die Verkapselung erfolgt hierbei in einem einfachen Ein-Schritt-Verfahren ohne eine weitere Nachbearbeitung der entstandenen Mikrokapseln.

NaCS und Poly-DADMAC wurden seither erfolgreich in zahlreichen Anwendungen zur Einkapsulierung von Zellen eingesetzt<sup>55,61</sup>.

Stange et al. experimentierten mit einem extrakorporalen Leberunterstützungssystem auf der Basis von mikroverkapselten Hepatozyten<sup>61</sup>.

NaCS/Poly-DADMAC wurden im Tiermodell zur Immobilisierung von Knorpelgewebe sowie von Cytochrom P<sub>450</sub>-exprimierenden Zellen eingesetzt<sup>102,42</sup>.

In vitro Experimente mit Mikrokapseln, die hybride, monoklonale Antikörper produzierende Zelllinien enthielten, wurden von Pelegrin und Mitarbeitern durchgeführt<sup>43</sup>.

In Toxizitätsstudien des Bavarian Nordic Institutes München konnten bisher keinerlei mutagene oder toxische Eigenschaften der verwendeten Substanzen Natriumcellulosesulfat und Poly-DADMAC nachgewiesen werden<sup>55</sup>.

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, in in vitro Versuchen die Eignung von Natriumcellulosesulfat und Poly-DADMAC für die Mikroenkapsulierung von kryokonservierten, humanen Nebenschilddrüsenzellen zu prüfen.

Hierbei wurde die Parathormonsekretion sowohl verkapselter, als auch nichtverkapselter Zellkulturen beobachtet und als Parameter für den Funktionszustand herangezogen.

Mittels eines Kalziumsuppressionstestes wurde die physiologische Steuerbarkeit der Parathyreozyten überprüft.

Durch die Analyse der physikalischen Eigenschaften der Kapseln konnte deren mechanische Stabilität und Langlebigkeit sowie die Eignung des verwendeten Materials zur Enkapsulierung von parathyreoidalen Zellen verifiziert werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Präparation und Kultivierung humaner Parathyreozyten**

#### **2.1.1 Kryokonservierung**

Die Methodik der Kryokonservierung entsprach der von Wagner und Mitarbeitern<sup>44,45,46</sup> und geht zurück auf Wells, der erstmalig kryokonserviertes Nebenschilddrüsengewebe autolog transplantierte.

Die entnommenen Epithelkörperchen wurden von Fett und Bindegewebe befreit und bis zum Ende des Eingriffs bei einer Temperatur von 4 °C in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung in Gewebepartikel mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm. Diese wurden, je nach Menge der Präparate, auf bis zu zehn verschraubbare Kryoröhrchen (Nalgene Cryogenic Vial, 5000-0020, Nalge Europe, England) verteilt. Als Konservierungsmedium diente jeweils 1 ml einer Lösung aus 80 % RPMI 1640 (PAA Laboratories Austria, E15-039), 10 % fötalen bovines Serums, FBS (Gibco BRL, 10440022, Invitrogen, Deutschland) und 10 % Dimethylsulfoxid, DMSO (Sigma Chemical Co, D2650, Australien) bei einer Temperatur von 4 °C.

Die Kryoröhrchen wurden anschließend mittels eines programmierbaren Einfriergerätes (Kryo 10 Series III; Planer, England) mit einer Geschwindigkeit von zuerst 1 °C/min auf -80 °C, dann mit 10 °C/min auf -120 °C und schließlich mit -39 °C/min auf -195 °C schrittweise abgekühlt<sup>47</sup>. Danach erfolgte die Überführung und Lagerung in einem separaten Stickstofftank (Chronos 80 Biosafe<sup>®</sup>, Messer Griesheim, Deutschland) bei -196 °C.

#### **2.1.2 Anlegen der Zellkulturen**

Die Kryoröhrchen wurden dem Stickstofftank entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C (entspricht etwa einer Auftaugeschwindigkeit von 50 °C/min) zügig aufgetaut, bis das Medium gerade den Gefrierpunkt überschritten hatte. Die Gewebepartikel wurden anschließend sofort in 40 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium, D-MEM (Gibco BRL, 11965, Invitrogen, Deutschland) bei 4 °C überführt und dreimalig gespült, um das zytotoxische Dimethylsulfoxid möglichst stark zu verdünnen.

Das Gewebe wurde danach in einer Petrischale mit Skalpellern zerkleinert, anschließend durch ein Nyllonsieb (Porengröße 200 µm) gedrückt und erneut gewaschen. Es resultierten hieraus Einzelzellkulturen bzw. kleinere Zellaggregate von bis zu 20 Zellen. Diese wurden nach Zellzahlbestimmung und Viabilitätskontrolle in das endgültige Kulturmedium 87 % D-MEM, (Gibco BRL, 11965, Invitrogen, Deutschland), 10 Vol.% fötales bovines Serum, FBS (Gibco BRL, 10440022, Invitrogen, Deutschland), 2 Vol.% L-Glutamin (Gibco BRL, 25030081, Invitrogen, Deutschland) und 1 Vol.% Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, 15070, Invitrogen, Deutschland) überführt und in Gewebekulturflaschen (50 ml 353108 bzw. 250 ml, 353111, BD Falcon™, USA) kultiviert. Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank (Heraeus BB6060CU, Heraeus Instruments, Deutschland) bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % und einer Begasung mit 21 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert<sup>48,44</sup>.

## 2.2 Mikroenkapsulierung

### 2.2.1 Natriumcellulosesulfat und Polydiallyldimethylammoniumchlorid

Als Grundlage der Mikroenkapsulierung diente das von Dautzenberg entwickelte Verfahren: Natriumcellulosesulfat (2,4 %ige Lösung mit 0,63 % NaCl) als Polyanion wird in ein aus dem Polykation Polydiallyldimethylammoniumchlorid (4 %ige Lösung mit 0,63 % NaCl) bestehendes Fällbad getropft. Hierbei entstehen Mikrokapseln mit einer festen, semipermeablen Polysalzmembran als Kapselwand und einem flüssigen Kern<sup>49,50</sup>.

NaCS (2,4 %ige Lösung mit 0,63 % NaCl) (Abb.2) wurde bezogen von der Forschungsinitiative Bioaktive Polymersysteme e.V., Teltow. Die kationische Komponente Poly-DADMAC (4 %ige Lösung mit 0,63 % NaCl) (Abb.3) wurde von KatPol GmbH, Bitterfeld geliefert.

Die Herstellung des NaCS erfolgte nach der ebenfalls von Dautzenberg beschriebenen Methode der heterogenen Sulfatierung<sup>51,52,53</sup>. Aufgrund einer weniger aufwendigen Prozessführung und der Verwendung nichttoxischer Reagenzien konnte sich diese Methode gegenüber der homogenen Sulfatierung durchsetzen.

Als Celluloseausgangsmaterial dienten lufttrockene Baumwoll-Linters ( $DP_{\text{Cuoxam}} \sim 1400$ ), als Sulfatierungsmedium 94-96 %ige Schwefelsäure sowie n- bzw. Isopropanol (Wassergehalt <0,2 %). Hieraus resultierte ein hochviskoses, vollständig wasserlösliches Polyanion mit einem Substitutionsgrad DS von  $\sim 0,36$ .

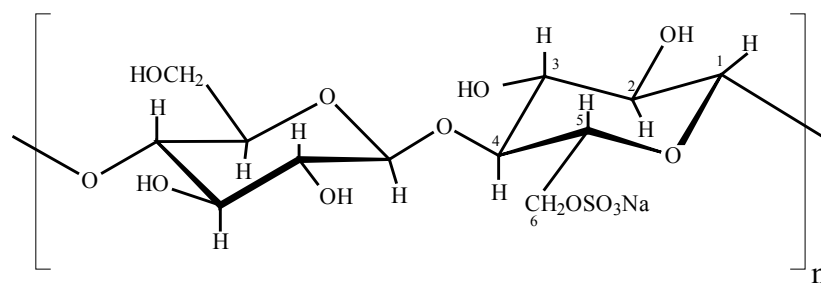


Abbildung 2: Natriumcellulosesulfat,  $M_W = 157700$ ,  $DS = 0,36$

Die Herstellung der polykationischen Komponente Poly-DADMAC erfolgte durch radikalische Polymerisation aus dem entsprechenden Monomer nach der von Wandrey et al. beschriebenen Methode<sup>54</sup>.

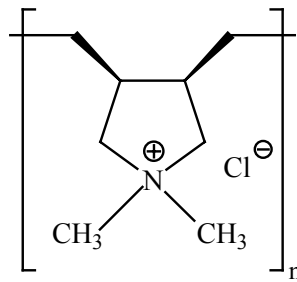


Abbildung 3: Polydiallyldimethylammoniumchlorid (Poly-DADMAC)  $M_w = 35500$

Die Formation der Mikro kapseln erfolgt über mehrere Teilschritte: Nach dem Eintauchen des polyanionischen NaCS-Tropfens in das polykationische Fällbad entsteht durch die Grenzflächenreaktion der gegensätzlich geladenen Reagenzien ein Präzipitat an der Tropfenoberfläche und bildet eine semipermeable Membran. Der weitere Membranbau erfolgt an der Innenseite der Primärmembran und ist somit diffusionsabhängig, d.h. er setzt sich nur so lange fort, wie Reaktionssubstrate durch die Membran permeieren können. Die Penetration des Poly-DADMAC wird durch die Gegenwart von NaCl erleichtert und führt bei den hier verwendeten Lösungen zu einer vollständigen Aushärtezeit zwischen drei und sechs Minuten.

Entsprechend des Reaktionsprozesses bei der Membranentstehung ergibt sich ein heterogener Aufbau der Kapselwand: Eine dichte Außenschicht wird gefolgt von einer Lockerzone und einer dann folgenden porösen Wand, deren Struktur sich zum Kapselinneren zunehmend auflockert. Im Inneren befindet sich schließlich der flüssige Kern aus Natriumcellulosesulfat, das als Trägermedium für die Parathyreozyten dient<sup>49,55,56,57,58,59</sup>.

Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes ist das Poly-DADMAC der Sterilfiltration zugänglich<sup>60</sup>. Natriumcellulosesulfat kann bei 121 °C dampfsterilisiert werden<sup>61</sup>.

### 2.2.2 Encapsulator AP™

Verwendet wurde der Encapsulator AP (Inotech Biosystems, Schweiz) mit zusätzlichem High Voltage System (Abb.4).



Abbildung 4: Encapsulator AP™

Das Natriumcellulosesulfat wurde mit dem Zellpellet vermischt (Abb.6) und in eine 50 ml-Perfusor® Spritze (B. Braun Melsungen, Deutschland) gefüllt (1b). Ein Perfusor®-Antrieb drückt das Gemisch mit definierter Geschwindigkeit  $V$  durch eine Düse (300  $\mu\text{m}$ , gebördelt) (2) und erzeugt so einen Flüssigkeitsstrom. Die Düse und somit der Flüssigkeitsstrom wird durch eine von einem Frequenzgenerator (14) getriggerte Vibrationseinheit (3) in Schwingung versetzt.

Die mechanische Disturbation bricht den Laminarstrom in einzelne, gleichgroße Tropfen auf. Der Flüssigkeits- bzw. Tropfenstrahl (Abb.5) fällt vor einem Stroboskop (13), das

ebenfalls durch den Frequenzgenerator getriggert wird, in das Fällbad aus Poly-DADMAC. Ein stehender Tropfenstrahl im Stroboskop zeigt ein optimales Ergebnis an.

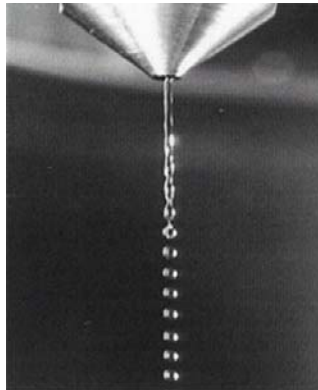


Abbildung 5: Tropfenstrahl bei der Herstellung von Mikrokapseln mit dem Encapsulator AP

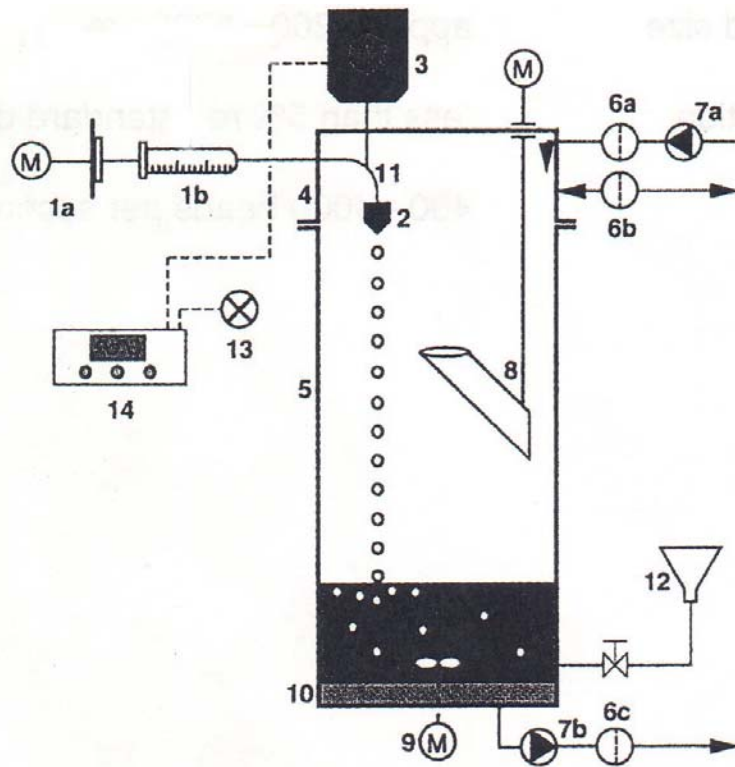
Um die Monodispersität der Tropfen zu verbessern und gleichzeitig deren Koaleszenz zu verringern, verfügt der Encapsulator über ein zusätzliches High Voltage System. Die elektrostatische Aufladung (positiv oder negativ) führt zu einer Abstoßung der einzelnen Tropfen. Im Reaktionsbehälter befindet sich ein Magnetrührer (9), der für eine gleichmäßige Verteilung der Kapseln bis zur völligen Aushärtung sorgt.

Eine Bypassseinheit (8), die unter den Tropfenstrahl geschaltet werden kann, entfernte zu Beginn und am Ende des Encapsulierungsprozesses entstehendes Abfallmaterial.

Das Poly-DADMAC wurde nach definierter Aushärtezeit über eine integrierte Pumpe (7b) entfernt. Mittels einer weiteren Peristaltikpumpe folgte eine zweimalige Spülung mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Braun, B. Braun Melsungen, Deutschland) über den Zufluss (7a).

Optional konnte zusätzlich ein Sterilfilter (6a) zwischengeschaltet werden. Die fertigen Kapseln wurden im angeschlossenen Sammelbehälter (12) aufgefangen. Anschließend wurden die Kapseln unter sterilen Bedingungen in einer Laminaflusskammer in D-MEM Zellkulturmedium (Gibco BRL, 11965, Invitrogen, Deutschland) überführt und in Gewebekulturflaschen (BD Falcon™ Deutschland, 353108) bei 37 °C und einem Gasgemisch aus 21 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert<sup>62</sup>.





- |    |                                |    |                    |
|----|--------------------------------|----|--------------------|
| 1a | Perfusor <sup>®</sup> -Antrieb | 9  | Magnetrührer       |
| 1b | Perfusor <sup>®</sup> -Spritze | 10 | Filtrationseinheit |
| 2  | Düse                           | 11 | Kapillare          |
| 3  | Vibrationseinheit              | 12 | Sammelbehälter     |
| 5  | Reaktionsbehälter              | 13 | Stroboskop         |
| 6  | Sterilfilter                   | 14 | Frequenzgenerator  |
| 7  | Peristaltikpumpen              | M  | Motor              |
| 8  | Bypass-Einheit                 |    |                    |

Abbildung 6: Schematische Darstellung des ENCAPSULATOR AP<sup>™</sup>

### 2.3 Bestimmung der mechanischen Eigenschaften (LUMiTester)

Die mechanischen Eigenschaften der Mikrokapseln wurden mit dem LUMI-Tester (L.U.M. GmbH Berlin, Deutschland) getestet. Die Stempelvortriebsgeschwindigkeit betrug hierbei 0,05 mm/s.

Für die Herstellung der Mikrokapseln wurde Natriumcellulosesulfat (2,4 %; CSB/99 mit 0,63 % NaCl) und Poly-DADMAC (PQ 39/97 mit 0,63 % NaCl) verwendet.

Die Mikrokapseln wurden mit dem Encapsulator AP<sup>TM</sup> (Inotech Biosystems, Schweiz) (gebördelte Düse, Durchmesser 300  $\mu\text{m}$ ) unter folgenden Geräteeinstellungen hergestellt (Tab.1):

Tabelle 1: Geräteeinstellungen der untersuchten Mikrokapseln

Anzahl [n]	Geschwindigkeit V	Frequenz [Hz]	Amplitude	Aushärtezeit t [min]	Spannung U [V]
18	7,5	800	50	3	1000

Mit Hilfe eines Linearvortriebes mit kombinierter Steuer- und Messkarte und einer elektronischen Waage, welche eine bidirektionale Datenschnittstelle besitzt, wurden die mechanischen Eigenschaften der Mikrokapseln bestimmt.

Die Steuerelektronik sorgte dafür, dass die Kapseln einer stetigen, kontinuierlich zunehmenden Belastung ausgesetzt wurden.

Das Messprinzip der Waage beruht auf der Detektion der relativen Veränderungen der Position der Waagschale bei unterschiedlich wirkenden äußeren Kräften.

Sowohl die Position des Linearvortriebs, seine Geschwindigkeit als auch die Gewichtsanzeige der Waage wurden durch eine spezielle Software permanent registriert und dargestellt. Die gewonnenen Messwerte mussten bezüglich der Eigenschaften der verwendeten Waage und der Parameter des Linearvortriebes durch Aufnahme einer Normkurve korrigiert werden.

Zwischen den ermittelten Daten, wie Anfangsdurchmesser R [mm], Berstdurchmesser am ersten lokalen Maximum r [mm], Berstdruck am ersten lokalen Maximum P(r) [kPa] sowie der Kraft F [N], die zum Bersten der Kapsel aufgebracht werden muss, besteht folgender Zusammenhang<sup>63</sup>:

$$F = p \left( \pi \sqrt{\left( \frac{2(R^3 - r^3)}{3r} + \frac{r^2 \pi^2}{16} \right)} - \frac{r\pi}{4} \right)^2$$

## 2.4 Porengrößenbestimmung

Die Porengrößenbestimmung der Mikrokapseln erfolgte am Institut für Biologie der Humboldt Universität zu Berlin mittels Größenausschlusschromatografie für Dextrangemische nach Ehwald, Woehlecke<sup>64,65</sup>.

Diese Methode basiert auf der Äquilibrierung eines definierten Kapselvolumens mit einer polydispersen Dextran-Mischung mit Molmassen von 500 bis 2000000 Dalton.

Die Anteile der in die Kapseln eindiffundierenden bzw. ausgeschlossenen Dextranmoleküle wurden durch Größenausschlusschromatografie der Ausgangs- und der abgereicherten Lösung und anschließende Quotientenbildung ermittelt. Aus der grafischen Darstellung der Quotienten in Form einer Trennstufe ließ sich die mittlere Trenngrenze der Membran als Halbstufenwert sowie die allgemein als Ausschlussgrenze bezeichnete obere Trenngrenze ermitteln. Größere Moleküle wurden durch die Membran ausgeschlossen. Die Angabe der Ausschlussgrenze erfolgt in Stokeschen Radien, die sich für die verwendeten Dextranmoleküle aus einer Kalibrierfunktion ergaben.

## **2.5 Bestimmung von Zellzahl, Viabilität und Steuerbarkeit humaner Parathyreozyten**

### **2.5.1 Hämozytometer**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved, Marienfeld, Deutschland). Die Kammer besteht aus neun Großquadraten mit einer Fläche von jeweils 1 mm<sup>2</sup>, einer Tiefe von 0,1 mm und einem Volumen von 0,1 µl. Es wurden jeweils 4 Großquadrate bei 100-facher Vergrößerung mäanderförmig im Lichtmikroskop ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Multipliziert mit 10<sup>4</sup> ergab sich die Zellzahl pro Milliliter<sup>66</sup>.

### **2.5.2 Viabilitätsprüfung mit Trypanblau**

Trypanblau (Seromed<sup>®</sup> Biochrom KG Deutschland, L 6313) ist ein saurer, anionischer Farbstoff, der in das Zellinnere von avitalen Zellen eindringt und diese anfärbt. Für die Anwendung wurde 0,1 ml Zellsuspension (aufgrund der hohen Proteinbindungsfähigkeit des Farbstoffes ohne Serum) mit 3,6 ml PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) und mit 2,7 ml einer vorgewärmten 0,5 % Trypanblaulösung vermischt und 2-5 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Längere Inkubationszeiten führten aufgrund der Zytotoxizität des Farbstoffes zu einem höheren Anteil an avitalen Zellen. Der Testansatz wurde im Hämozytometer ausgezählt. Lebende Zellen erschienen ungefärbt, avitale Zellen hingegen völlig oder teilweise blau angefärbt<sup>66</sup>.

### **2.5.3 Kalziumsuppressionstest**

Um die in vitro Sensitivität der Parathyreozyten, d.h. die physiologische PTH-Antwort der Zellen auf unterschiedliche Kalziumwerte zu überprüfen, wurden die Einzelzellkulturen bzw. die enkapsulierten Zellen in verschiedenen Kalziumkonzentrationen inkubiert.

Durch Zugabe von EGTA (Äthylenglykol-glykol-bis-(2-aminoäthyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) (Fluka Chemie, Schweiz) wurde dem durch HEPES (HEPES Buffer, Solution 1M, Gibco BRL, 15630-056, Invitrogen, Deutschland) gepufferten Medium Kalzium durch Komplexbildung entzogen bzw. durch 10 % Kalziumlösung (Calcium 10 % Braun<sup>®</sup>, B. Braun, Deutschland) zugeführt.

Auf diese Weise wurde eine aufsteigende Kalziumreihe mit den Konzentrationen 0,5 mmol/l, 1,5 mmol/l, 2,0 mmol/l, 2,5 mmol/l sowie 3,5 mmol/l titriert<sup>109</sup>.

Der jeweilige Leerwert, bei dem keine Zugabe von EGTA oder Kalzium erfolgte (2,0 mmol/l), wurde jeweils gleich Null gesetzt, um die Vergleichbarkeit der heterogenen Zellkulturen zu gewährleisten.

## 2.6 PTH-Bestimmung

### 2.6.1 Elektrochemilumineszenzimmunoassay (ECLIA)

Die Probenentnahme des Parathormons erfolgte aus dem Kulturmedium. Die Proben wurden sofort nach der Abnahme bei  $-70\text{ °C}$  tiefgefroren. Die PTH-Bestimmung wurde im Zentrallabor der Charité, Campus Virchow Klinikum mittels eines Elektrochemilumineszenzimmunoassay (ECLIA) an dem Roche Immunoassay Analysenautomaten Elecsys<sup>®</sup> 2010 (Roche Diagnostics, Deutschland) durchgeführt.

Der Test basiert auf einem sogenannten *Sandwichprinzip*. Hierbei erfolgt zuerst eine Inkubation der zu bestimmenden Probe mit einem biotinylierten monoklonalen Antikörper (*Abb.7*), der gegen das N-terminale Fragment 1-37 gerichtet ist. Danach erfolgt eine zweite Inkubation mit einem gegen das C-terminale Fragment 38-84 gerichteten und durch einen Ruthenium-Komplex markierten Antikörper.

Im nächsten Schritt wird die Probe in Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln inkubiert.

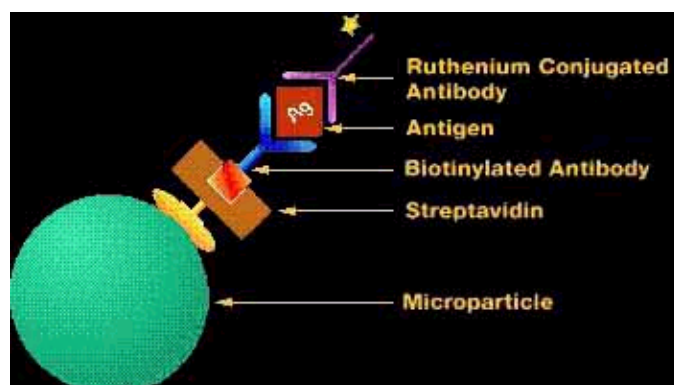


Abbildung 7: Biotin-Streptavidin Wechselwirkung bei der PTH-Bestimmung mit dem Elektro-chemilumineszenzimmunoassay (ECLIA)

Aufgrund der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung kommt es zur Bindung des biotinylierten PTH-Antikörpers an die Festphase. Im folgenden wird das Reaktionsgemisch

zusammen mit einer Tripropylamin (TPA) enthaltenden Pufferlösung in die Elektrochemilumineszenz-Messzelle überführt. Durch magnetische Wirkung werden die Mikropartikel als dünner, gleichmäßiger Film auf der Oberfläche einer Elektrode fixiert. Alle ungebundenen Substanzen werden durch einen Flüssigkeitsstrom weggespült.

Durch das Anlegen von Spannung an die Elektrode kommt es sowohl zur Oxidation des Ruthenium-Komplexes als auch des in der Lösung befindlichen Tripropylamins. Aus der Reaktion dieser beiden Komponenten resultiert die Überführung des Rutheniums in einen angeregten Zustand. Der Zerfall führt schließlich zur Emission von Photonen bei einer Wellenlänge von 620 nm. Durch den Prozess wird der Rutheniumkomplex regeneriert, was zu einer Amplifikation des Signales führt. Die Photonenstrahlung wird dann mittels einer sog. *Photomultiplier Tube* (PMT) gemessen und der resultierende Wert abschließend mit einer Kalibrationskurve verglichen. Dies ergibt den gesuchten PTH-Wert<sup>67</sup>.

## 2.7 Versuchsaufbau

Für die Versuche wurde kryokonserviertes, humanes Nebenschilddrüsengewebe aus der Chirurgischen Klinik der Charité, Campus Virchow-Klinikum verwendet. Im Zuge von Resektionseingriffen bei sekundärem Hyperparathyreoidismus und der regelhaften Kryokonservierung entstand eine Organbank mit Geweben von über 200 Patienten. Für die vorliegenden Versuche wurde nur Gewebe von Patienten verwendet, bei denen auch längerfristig ein Therapiebedarf ausgeschlossen werden konnte.

Die durchschnittliche Konservierungsdauer betrug zwei Jahre. Die Auswahl der Präparate erfolgte zufällig.

Es wurden zwei Gruppen gebildet: In der ersten Gruppe [ $n=10$ ] wurden unverkapselte Parathyreozyten über einen Zeitraum von 12 Tagen beobachtet (*Tab.2*). Diese Versuchsreihe diente vor allem zur Validierung des Versuchsablaufes. Die Parathyreozyten sollten hierbei in Bezug auf ihr Kulturverhalten, die PTH-Sekretion sowie die in vitro-Kalziumsensitivität überprüft werden.

In der zweiten Versuchsgruppe [ $n=30$ ] wurden die Zellen am dritten Tag nach Aufarbeitung mikroverkapselt und weitere neun Tage in ihrem Sekretionsverhalten beobachtet (*Tab.3*). Ein Versuchszyklus dauerte zwölf Tage. Da sich im Verlauf der Versuche ein unerwartetes Ansteigen der Hormonwerte enkapsulierter Parathyreozyten ergab, wurde ein

Teil der verkapselten Zellen [ $n=10$ ] im Langzeitversuch über insgesamt 85 Tage beobachtet.

Tabelle 2: Versuchsablauf – Unverkapselte Parathyreozyten [ $n=10$ ]

<b>Tag</b>	<b>Versuchsprogramm</b>
<b>1</b>	Auftauen der kryokonservierten Zellen Anlegen der Zellkulturen Zellzahlbestimmung Viabilitätsbestimmung Phasenkontrastmikroskopie
<b>2</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie
<b>3</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie Viabilitätsbestimmung
<b>4</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie
<b>6</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie Anlegen der Kalziumsuppressionsreihe
<b>8</b>	PTH-Bestimmung aus der Kalziumsuppressionsreihe Phasenkontrastmikroskopie
<b>10</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie
<b>12</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie

Tabelle 3: Versuchsablauf – Enkapsulierte Parathyreozyten [ $n=30$ ]

<b>Tag</b>	<b>Versuchsprogramm</b>
<b>1</b>	Auftauen der kryokonservierten Zellen Anlegen der Zellkulturen Zellzahlbestimmung Viabilitätstestung Phasenkontrastmikroskopie
<b>2</b>	PTH-Bestimmung der unverkapselten Zellen Phasenkontrastmikroskopie
<b>3</b>	PTH-Bestimmung der unverkapselten Zellen Phasenkontrastmikroskopie Viabilitätstestung Zellzahlbestimmung Mikroverkapselung Kultivierung der verkapselten Zellen PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie
<b>4</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie
<b>6</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie Anlegen der Kalziumsuppressionsreihe
<b>8</b>	PTH-Bestimmung aus der Kalziumsuppressionsreihe Phasenkontrastmikroskopie
<b>10</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie
<b>12</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie
<b>40</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie
<b>85</b>	PTH-Bestimmung Phasenkontrastmikroskopie



## 2.8 Statistische Methoden

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels deskriptiver Statistik. Bei den Ergebnissen von PTH-Sekretionsleistung und Kalziumsensitivität der Parathyreozyten sowie der mechanischen Kapseleigenschaften wurde der arithmetische Mittelwert unter Angabe der SEM, *standard error of the means*, verwendet.

Die PTH-Sekretionsleistung der verkapselten Zellen war aufgrund der unterschiedlichen Histologie sowie der von Kapsel zu Kapsel differierenden Zellbeladung nicht direkt vergleichbar. Um dennoch die Kalziumsekretionsleistung über den Versuchszeitraum hinweg darstellen zu können, wurden die absoluten Werte der PTH-Sekretion in Prozentualwerte umgerechnet. Hierbei wurde der erste Tag nach Enkapsulierung (Tag 4) gleich hundert Prozent gesetzt und diente als Bezugswert.

Bei den Versuchen zur Darstellung der Kalziumsensitivität wurden die Parathyreozyten in Medien mit jeweils 0,5 mmol/l, 1,5 mmol/l, 2,0 mmol/l, 2,5 mmol/l sowie 3,5 mmol/l Kalzium inkubiert. Um auch hier die Streubreite der heterogenen Zellkulturen zu reduzieren, wurde der Leerwert (2,0 mmol/l), bei dem keine Kalzium- oder EGTA-Zugabe erfolgte, gleich Null gesetzt. Dieser Wert wurde gewählt, da er in etwa dem normalen Kalziumgehalt des Kulturmediums entsprach.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Viabilität und Morphologie humaner Parathyreozyten in Zellkultur

Die Viabilität der Parathyreozytenkulturen wurde direkt nach Aufarbeitung (Tag 1) sowie am Tag der Verkapselung (Tag 3) bestimmt.

Am Tag 1 betrug die Viabilität durchschnittlich  $72 \pm 11,7$  %. Die Zellkulturen enthielten aufgrund der Kryokonservierung und der Präparation einen hohen Anteil an Zelltrümmern und avitalen Zellen.

Der Erythrozytenanteil nach Aufarbeitung war sehr hoch und übertraf den Anteil der Parathyreozyten um annäherungsweise den Faktor Hundert. Durch Autolyse reduzierte sich ihre Zahl sehr schnell, so dass nach 48 h praktisch keine Erythrozyten mehr nachweisbar waren.

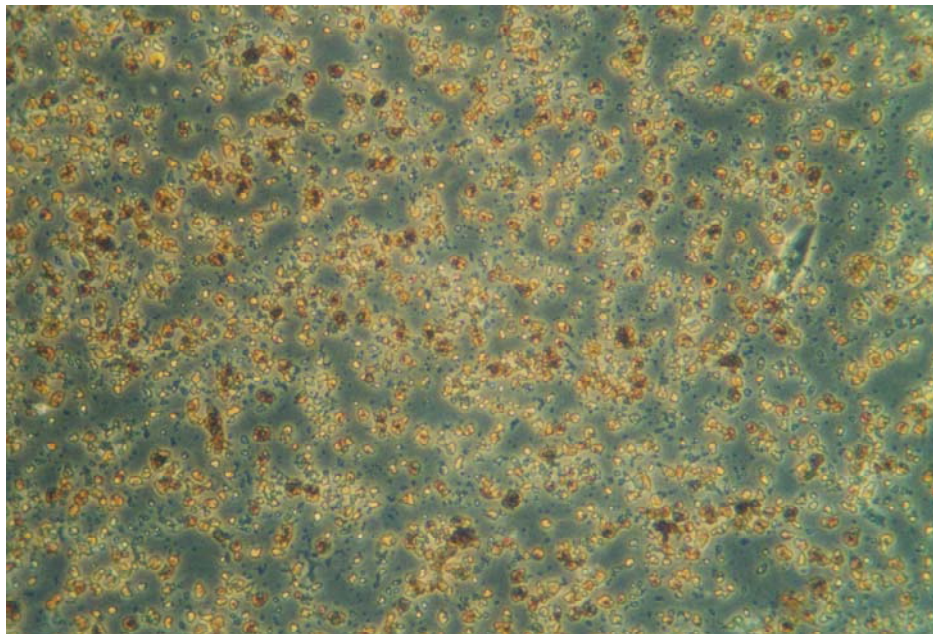


Abbildung 8: Einzelzellkultur humaner Parathyreozyten (Phasenkontrastmikroskop, 100-fache Vergrößerung)

Da innerhalb der ersten 2 Tage in Kultur ein Großteil der avitalen Zellen lysierte, konnte am Tag 3 eine Viabilität von  $95 \pm 4,3$  % bestimmt werden (*Tab.9*). Phasenkontrastmikroskopisch konnten einheitliche Parathyreozytenkulturen mit einem geringen Anteil an Zelltrümmern beobachtet werden. Einige Kulturen enthielten in den ersten Tagen nach Aufarbeitung einen geringen Anteil spindelförmiger Zellen, vermutlich Fibroblasten.

Nach circa sieben Tagen war der Boden der Zellkulturflaschen stets mit einem dichten Zellrasen konfluierender Parathyreozyten bedeckt.

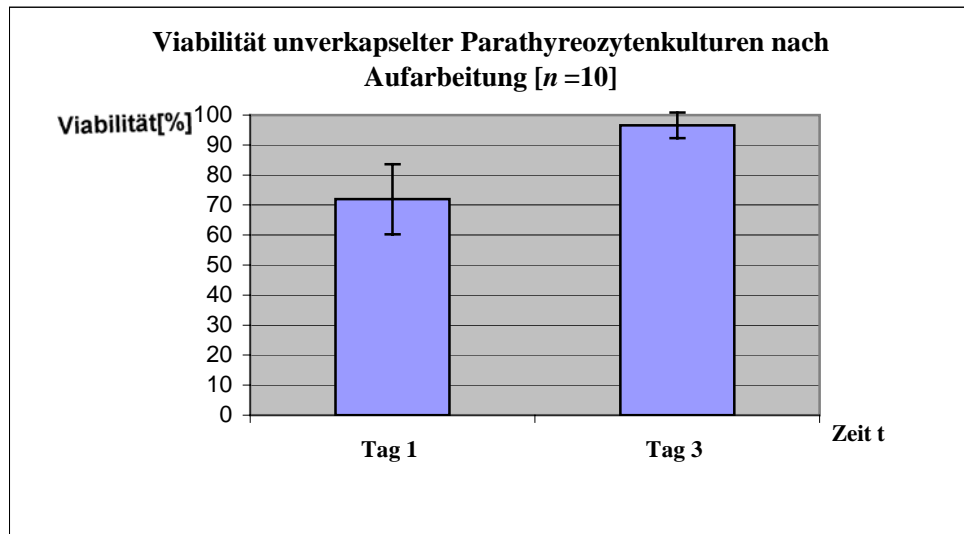


Abbildung 9: Viabilität unverkapselter Parathyreozytenkulturen nach Aufarbeitung

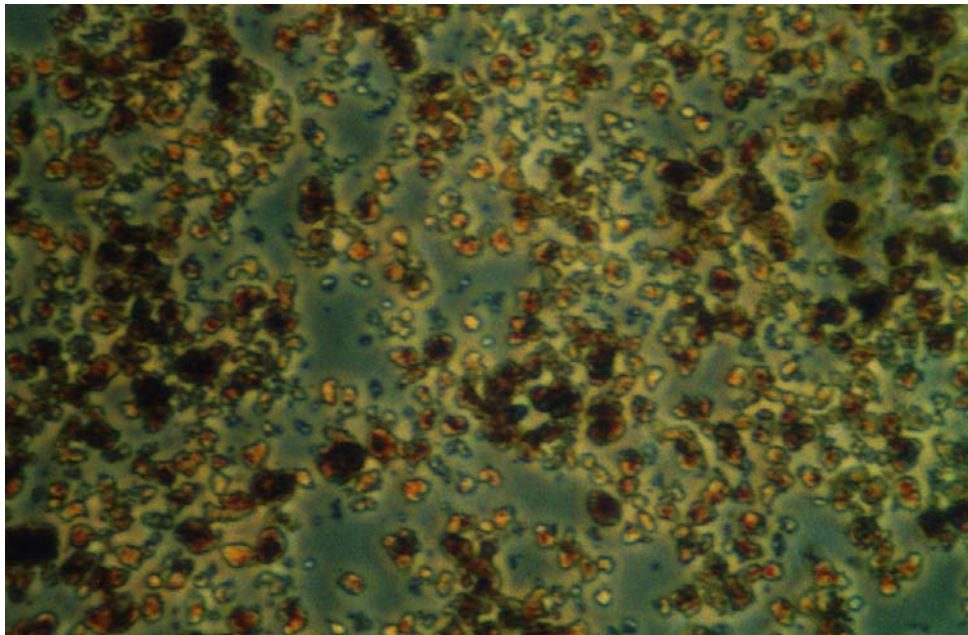


Abbildung 10: Einzelzellkultur humaner Parathyreozyten (Phasenkontrastmikroskop, 200-fache Vergrößerung)

## 3.2 Eigenschaften der hergestellten Mikrokapseln

### 3.2.1 Bestimmung der mechanischen Eigenschaften

Bei definierten Geräteeinstellungen konnte ein mittlerer Anfangsdurchmesser ( $D(A)$ ) der Kapseln von  $0,33 \pm 0,02$  mm ermittelt werden. Der Berstdurchmesser am ersten lokalen Maximum betrug  $0,04 \pm 0,00$  mm. Der Berstdruck ( $P(B)$ ) wurde mit  $3801,66 \pm 708,50$  kPa bestimmt. Die zum Zerplatzen pro Kapsel aufgewendete Kraft  $F$  konnte mit  $2,84 \pm 0,25$  N berechnet werden (*Tab.4*).

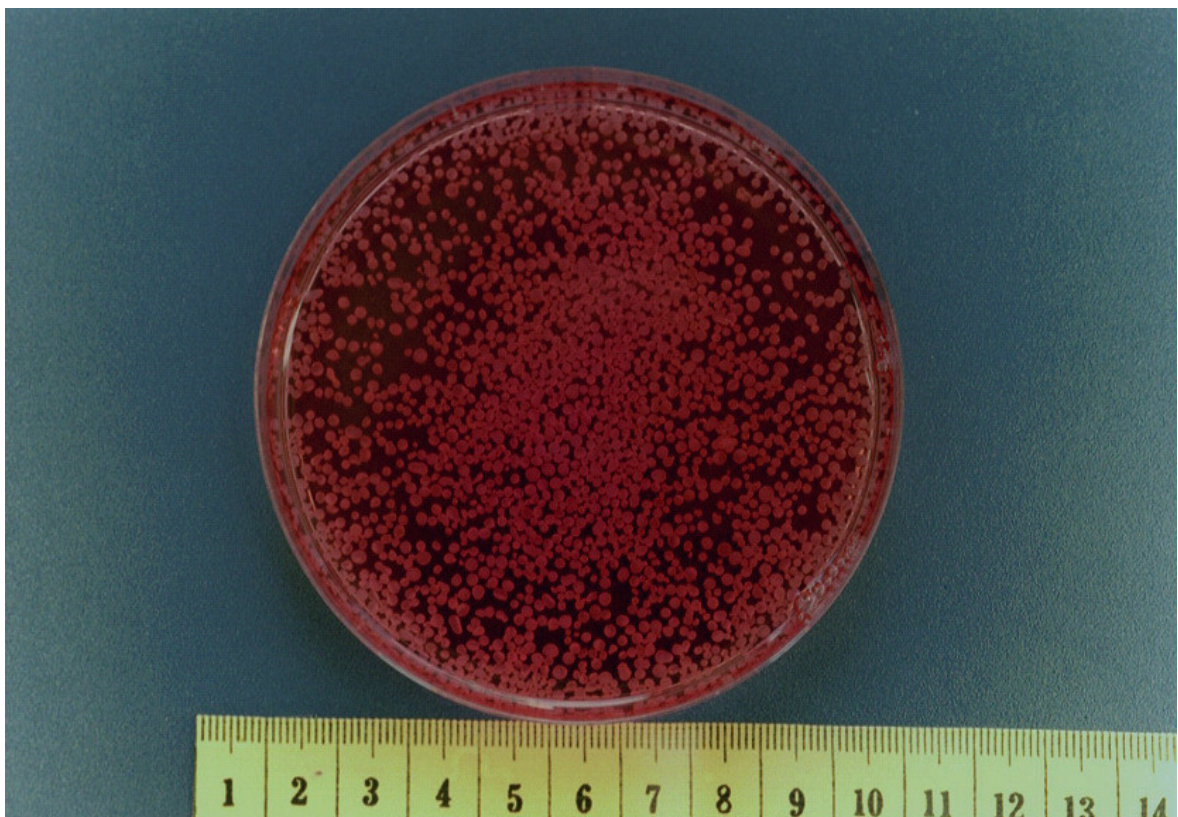


Abbildung 11: Mikrokapseln enkapsulierter Parathyreozyten in Zellkulturmedium

Tabelle 4: Mechanische Eigenschaften der untersuchten Mikro kapseln

Versuch	D(A)[mm]	D(B)[mm]	P(B)[kPa]	F[N]
1	0,40	0,06	1696,28	2,65
2	0,50	0,06	846,40	2,67
3	0,40	0,07	867,69	1,13
4	0,50	0,05	790,62	3,06
5	0,40	0,04	721,63	1,79
6	0,50	0,02	478,14	4,84
7	0,30	0,03	1517,98	2,11
8	0,40	0,06	1696,28	2,65
9	0,50	0,06	846,40	2,67
10	0,40	0,07	867,69	1,13
11	0,50	0,05	790,62	3,06
12	0,40	0,04	721,63	1,79
13	0,50	0,02	478,14	4,84
14	0,30	0,03	1517,98	2,11
15	0,43	0,05	988,39	2,53
16	0,20	0,04	5718,10	1,57
17	0,20	0,03	15210,00	5,95
18	0,30	0,05	4753,17	3,69
19	0,20	0,03	5993,29	2,34
20	0,20	0,05	6567,29	1,34
21	0,20	0,03	6680,99	2,61
22	0,20	0,03	5577,18	2,18
23	0,30	0,04	4839,45	4,88
24	0,30	0,06	2060,02	1,27
25	0,20	0,06	8196,79	1,27
26	0,20	0,04	13798,39	3,79
27	0,40	0,04	1783,67	4,41
28	0,20	0,02	6517,65	4,03
29	0,30	0,07	3072,42	1,55
30	0,20	0,02	8455,64	5,23
Mittelwert	0,33	0,04	3801,66	2,84
SEM	0,02	0,00	708,50	0,25

**Legende:**

- D(A) [mm] : Anfangsdurchmesser  
D(B) [mm] : Berstdurchmesser am ersten lokalen Maximum  
P(B) [kPa] : Berstdruck am ersten lokalen Maximum  
F [N] : aufgewendete Kraft, die zum Bersten der Kapsel führt

### 3.2.2 Porengrößenbestimmung

Mittels chromatographischer Messung der Verteilung eines Dextrangemisches zwischen Kapselinnenraum und der Umgebung wurde die Porengröße von vier Chargen der hergestellten Mikrokapseln bestimmt.

Die untere Trenngrenze betrug im Mittelwert  $1,25 \pm 0,04$  nm, die mittlere Trenngrenze, als Maß für die Porengröße, betrug  $1,39 \pm 0,04$  nm und die obere Trenngrenze wurde mit  $1,55 \pm 0,04$  nm bestimmt (Tab.5).

Tabelle 5: Porengrößenbestimmung

Trenngrenze Charge [nm]	untere	mittlere	obere
1	1,12	1,27	1,45
2	1,32	1,47	1,62
3	1,28	1,41	1,57
4	1,28	1,41	1,57
Mittelwert	1,25	1,39	1,55
SEM	0,04	0,04	0,04



Abbildung 12: Mikrokapseln mit deutlich fokussierten Zellen in der Kapselperipherie (Phasenkontrastmikroskop, 100-fache Vergrößerung)

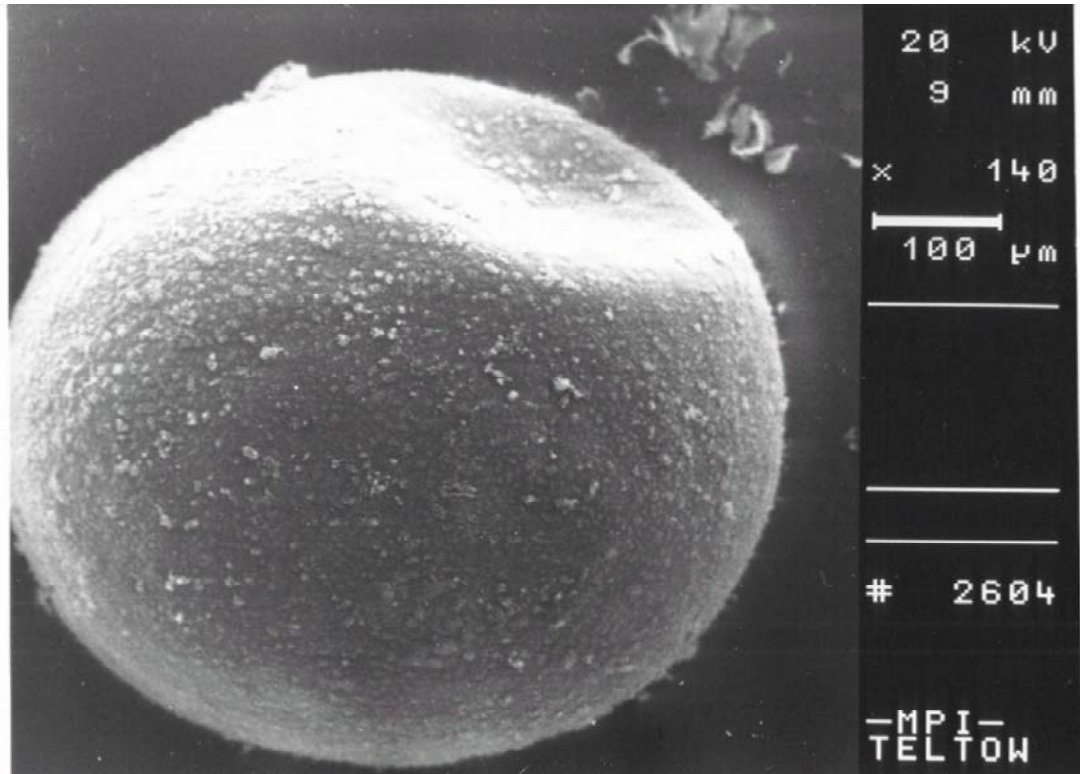


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mikrokapsel  
(Quelle: Dr. Brigitte Thiersch, Universität Potsdam)

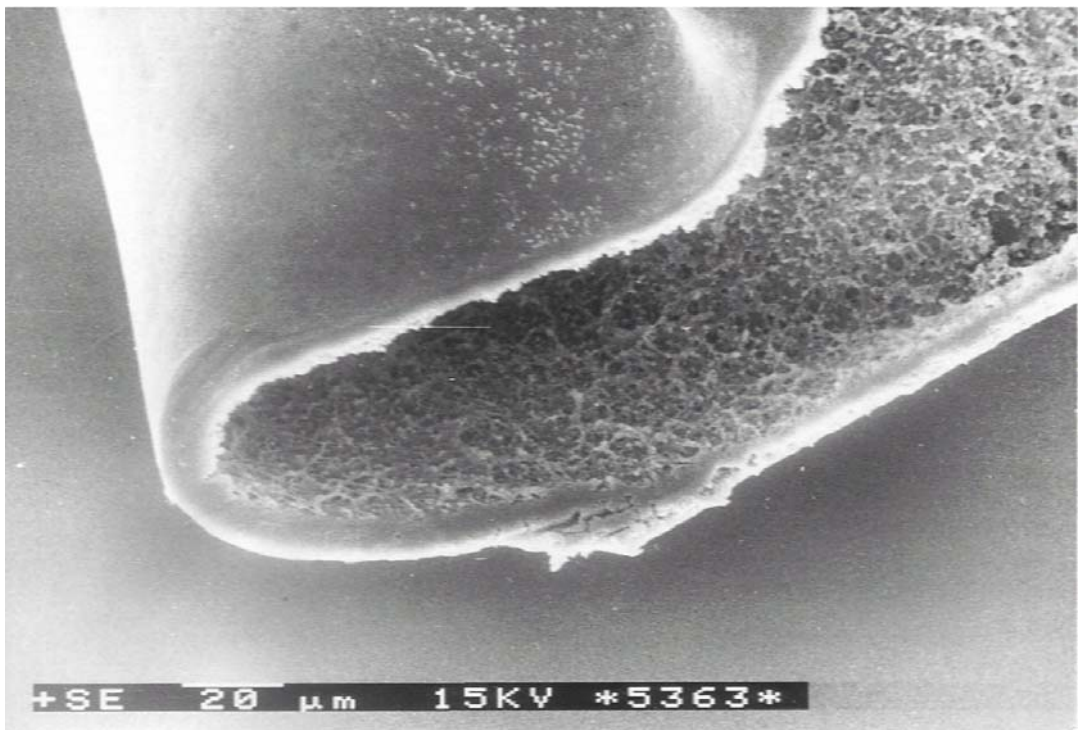


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Kapselmembran  
(Quelle: Dr. Brigitte Thiersch, Universität Potsdam)

### 3.3 In vitro-Sensitivität unverkapselter Parathyreozytenkulturen

Um die in vitro-Sensitivität der Parathyreozyten zu überprüfen, wurden  $n=10$  Kulturen am Tag 6 des Versuchszyklus in unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen inkubiert.

Die Zellkulturen wurden so in einer aufsteigenden Kalziumreihe mit Konzentrationen von 0,5 mmol/l, 1,5 mmol/l, 2,0 mmol/l, 2,5 mmol/l sowie 3,5 mmol/l inkubiert und die jeweilige Parathormonsekretion am Tag 8 des Versuchszyklus bestimmt (Abb.15).

Die Kalziumsensitivität der Parathyreozyten wurde als Differenz zwischen den an Tag 8 bestimmten Hormonwerten und den Ausgangswerten von Tag 6 definiert (Tab.6).

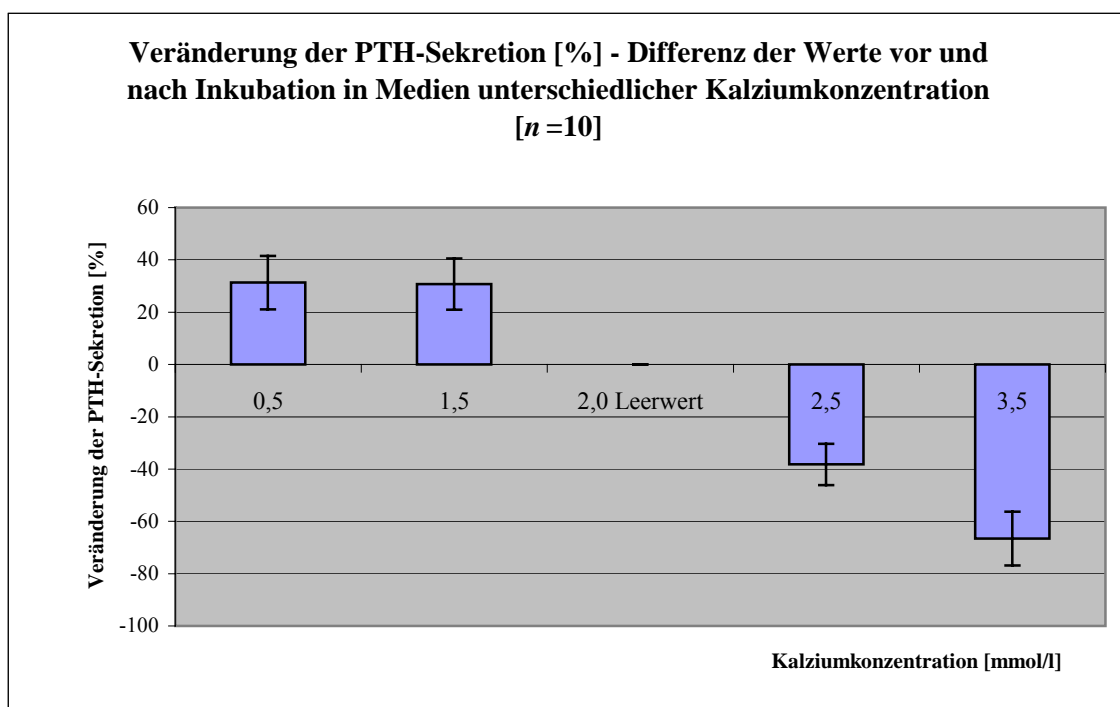


Abbildung 15: Kalziumsensitivität unverkapselter Parathyreozyten [ $n=10$ ]

In den Kulturen, in denen dem Medium Kalzium entzogen wurde, konnte mit Werten von  $31,3 \pm 10,2$  % bei 0,5 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  bzw.  $30,80 \pm 9,80$  % bei 1,5 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  ein Ansteigen der PTH-Sekretion festgestellt werden.

Unter Zugabe von Kalzium wurde hingegen ein deutliches Abfallen der PTH-Sekretion mit  $-38,2097 \pm 7,9$  % bei 2,5 mmol/l Kalzium bzw.  $66,60 \pm 10,30$  % bei 3,5 mmol/l festgestellt (Tab.6).



Tabelle 6: Veränderung der PTH-Sekretion unverkapselter Parathyreozyten [%] (Differenz der Werte vor und nach Inkubation in unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen) [n=10]

mmol/l Versuch	0,5	1,5	2,0	2,5	3,5
V 1	6,00	-3,00	0,00	20,00	8,00
V 2	6,00	-10,00	0,00	-41,00	-47,00
V 3	79,00	63,00	0,00	11,00	2,00
V 4	10,00	22,00	0,00	-1,00	-6,00
V 5	81,00	87,00	0,00	-13,00	-22,00
V 6	4,00	42,00	0,00	-28,00	-69,00
V 7	71,00	54,00	0,00	-65,00	-96,00
V 8	27,00	30,00	0,00	-29,00	-29,00
V 9	16,00	3,00	0,00	-26,00	-47,00
V 10	13,00	20,00	0,00	-19,00	-27,00
Mittelwert	31,30	30,80	0,00	-38,20	-66,60
SEM	10,20	9,80	0,00	7,90	10,30

### 3.4 PTH-Sekretion unverkapselter Parathyreozyten

Als Parameter für den Funktionszustand der Zellen wurde die PTH-Sekretion gemessen.

Die Parathormonkonzentration wurde im Kulturmedium in  $n=10$  Versuchen jeweils an den Tagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 bestimmt. Die Zellzahl in den Kulturen war unterschiedlich und reichte von  $1 \times 10^6$  Zellen bis annähernd  $100 \times 10^6$  Zellen.

Die Bestimmung der PTH-Sekretion ergab folgende Werte (jeweils in pg/ml): Tag 2:  $371829 \pm 240460$ ; Tag 4:  $101074 \pm 58232$ ; Tag 6:  $169680 \pm 127819$ ; Tag 8:  $156663 \pm 122438$ ; Tag 10:  $140603 \pm 110543$ ; Tag 12:  $37745 \pm 19612$  (Tab.7).

Die einzelnen Zellkulturen waren aufgrund des Gewebes (Adenom oder Hyperplasie) und der Zellzahl sehr heterogen. Um dennoch eine bessere Vergleichbarkeit der Versuche zu erreichen, wurden die Absolutwerte in prozentuale Veränderungen umgerechnet und grafisch dargestellt. Hierbei wurde der PTH-Wert an Tag 2 gleich Hundert gesetzt und die Werte der nachfolgenden Tage als prozentuale Veränderungen zu diesem angegeben (Abb.16).

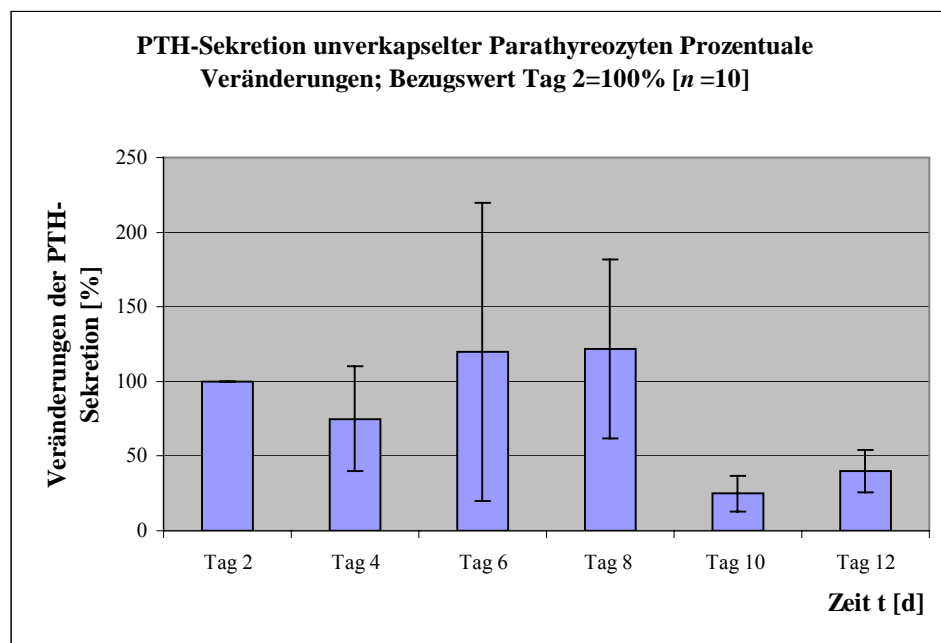


Abbildung 16: PTH-Verlauf unverkapselter Parathyreozyten [%]

Tabelle 7: PTH-Verlauf unverkapselter Parathyreozyten [ $n=10$ ] – Absolutwerte [pg/ml]

Tag Versuch	2	4	6	8	10	12
1	2515000	59500	15550	4988	4233	2366
2	96726	95382	59913	19864	11221	12092
3	147735	10330	1836	619	597	254
4	96474	41811	87738	81060	81444	90334
5	352225	98952	178552	160022	143698	36592
6	46956	9891	10771	22512	18933	15734
7	34062	16279	11298	10002	6592	9370
8	275415	52038	13028	6474	5095	3135
9	23604	10210	8759	11592	7470	10714
10	130095	616350	1309350	1249500	1126744	196857
Mittelwert	371829	101074	169680	156663	140603	37745
SEM	240460	58232	127819	122438	110543	19612

### 3.5 In vitro-Sensitivität enkapsulierter Parathyreozyten

Um die in vitro-Sensitivität verkapselter, humaner Parathyreozyten zu überprüfen, wurden  $n=30$  verkapselte Zellkulturen am Tag 6 des Versuchszyklus in Kalziumkonzentrationen von 0,5 mmol/l, 1,5 mmol/l, 2,0 mmol/l, 2,5 mmol/l sowie 3,5 mmol/l Kalzium inkubiert und nach 48 h die jeweilige Parathormonsekretion bestimmt. Die Kalziumsensitivität der Parathyreozyten wurde als Differenz zwischen den an Tag 8 bestimmten Hormonwerten und den Ausgangswerten von Tag 6 definiert. Um auch hier eine bessere Vergleichbarkeit der Zellkulturen zu gewährleisten, wurde der Leerwert (2,0 mmol/l Kalzium) gleich Null gesetzt (Abb.17).

Unter Kalziumentzug konnte ein deutlicher Anstieg der PTH-Sekretion beobachtet werden. So wird bei 0,5 mmol/l Kalzium eine Zunahme der PTH-Sekretion von  $14 \pm 11,00$  %, bzw. bei 1,5 mmol/l Kalzium von  $10 \pm 9,00$  % bestimmt (Tab.8).

Wurde dem Medium Kalzium hinzugegeben, konnte die PTH-Sekretion supprimiert werden. Bei 2,5 mmol/l Kalzium wurde ein Abfall von  $-26 \pm 12,00$  % bzw. bei 3,5 mmol/l Kalzium von  $-29 \pm 10,00$  % bestimmt.

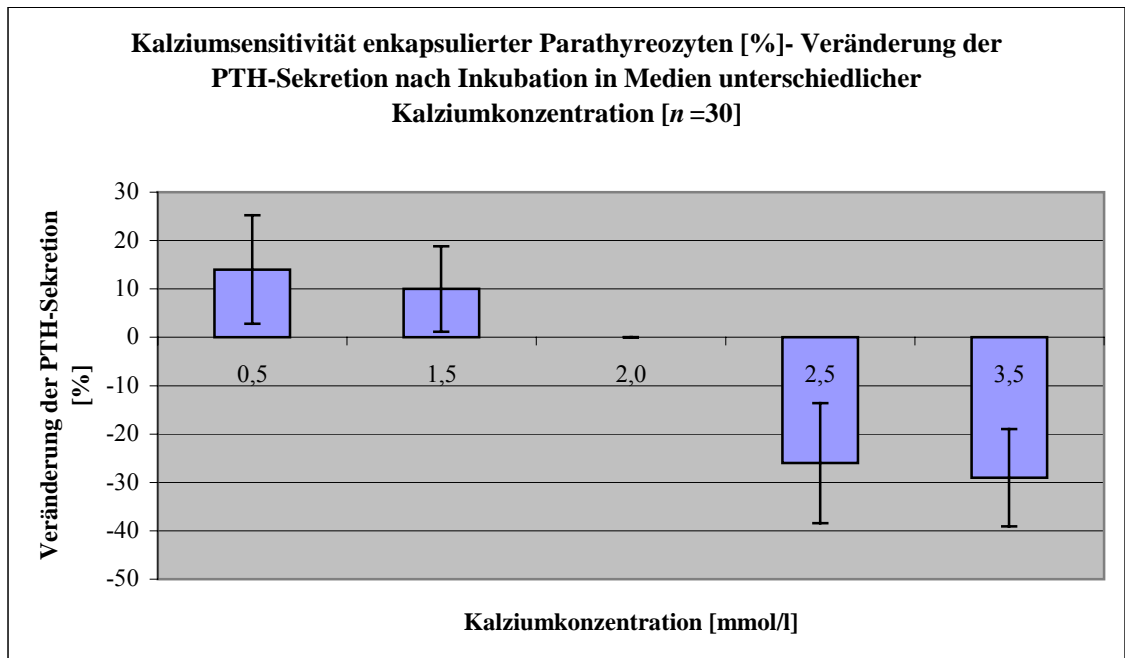


Abbildung 17: In vitro-Sensitivität enkapsulierter Parathyreozyten

Tabelle 8: Veränderung der PTH-Sekretion enkapsulierter Parathyreozyten [%] (Differenz zwischen den Werten vor und nach Inkubation in unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen) [ $n=10$ ]

mmol/l Versuch	0,5	1,5	2,0	2,5	3,5
V1	93,0	9,0	0,0	-17,0	-24,0
V2	-28,0	-61,0	0,0	-99,0	-64,0
V3	18,0	21,0	0,0	24,0	-39,0
V4	39,0	-2,0	0,0	7,0	4,0
V5	36,0	22,0	0,0	-36,0	-26,0
V6	17,0	35,0	0,0	-12,0	-8,0
V7	11,0	-6,0	0,0	7,0	-17,0
V8	33,0	-19,0	0,0	10,0	-10,0
V9	9,0	-10,0	0,0	41,0	59,0
V10	-32,0	24,0	0,0	-32,0	-20,0
Mittelwert	14,0	10,0	0,0	-26,0	-29,0
SEM	11,0	9,0	0,0	12,0	10,0



Abbildung 18: Enkapsulierte Parathyreozyten (Phasenkontrastmikroskop, 40-fache Vergrößerung)

### 3.6 PTH-Sekretion enkapsulierter Parathyreozyten

#### 3.6.1 PTH-Sekretion enkapsulierter Parathyreozyten - Kurzzeitversuche

Als Parameter für den Funktionszustand der enkapsulierten Parathyreozyten wurde deren PTH-Sekretion in  $n=30$  Versuchen an den Tagen 4 (= erster Tag nach Enkapsulierung), 6, 8, 10 und 12 bestimmt. Die PTH-Probe wurde jeweils aus dem Kulturmedium abgenommen.

Über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg konnte ein nahezu linearer Anstieg der PTH-Sekretion der einzelnen Zellkulturen verzeichnet werden. Dies konnte, trotz der sehr heterogenen Zellreihen, in allen Versuchen übereinstimmend beobachtet werden.

Es ergaben sich folgende Werte (*Tab.9*) (jeweils in pg/ml): Tag 4:  $1238 \pm 205$ ; Tag 6:  $2157 \pm 295$ ; Tag 8:  $3215 \pm 510$ ; Tag 10:  $3987 \pm 582$ ; Tag 12:  $5193 \pm 835$ .

Um die Vergleichbarkeit sowie die Anschaulichkeit der sehr heterogenen Zellkulturen zu verbessern, wurden die Absolutwerte in Relativwerte umgerechnet (*Abb.19*).

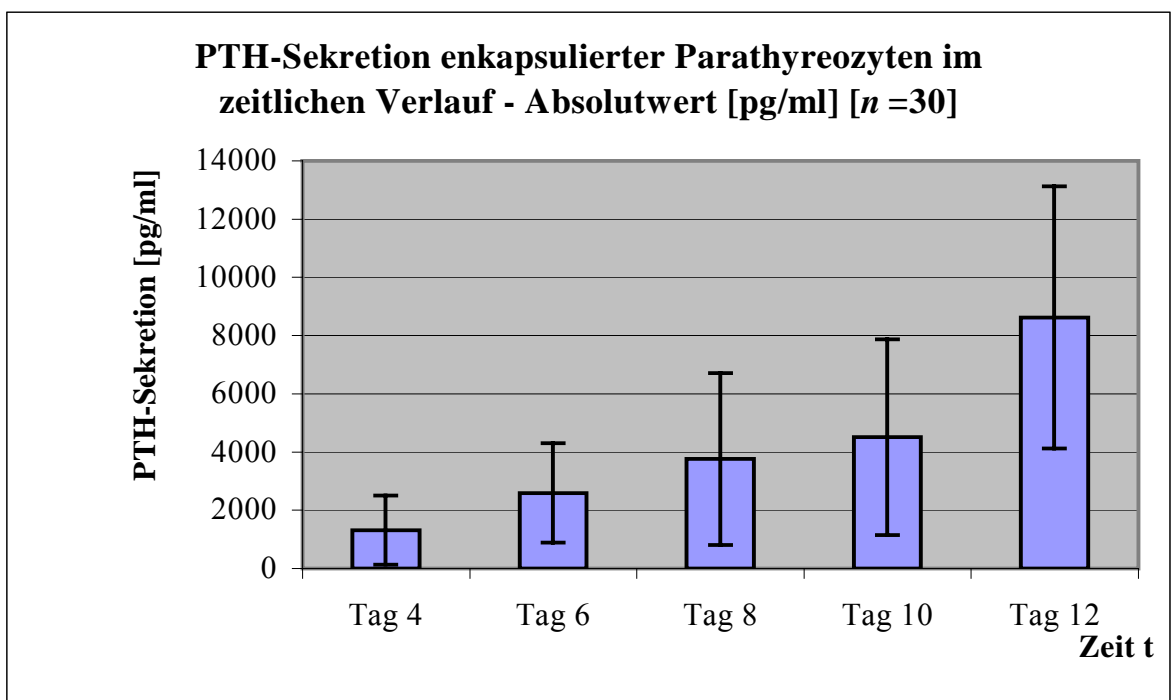


Abbildung 19: PTH-Verlauf enkapsulierter Parathyreozyten - Relativwerte [%]

Tabelle 9: PTH-Verlauf enkapsulierter Parathyreozyten [pg/ml] [n=30]

Versuch	Tag	4	6	8	10	12
1		1353	929	1264	1566	1750
2		1048	668	959	1127	1216
3		1002	3156	3721	5332	2673
4		673	2251	2621	2925	1181
5		42	170	204	164	211
6		62	183	178	129	144
7		488	1170	1939	2394	3744
8		546	1047	2972	2402	4232
9		1393	3639	11857	8434	10996
10		1028	4093	9788	8222	11750
11		482	1226	2974	2980	3081
12		461	1483	3959	1784	4326
13		286	446	647	1041	1761
14		1400	2359	3425	4187	5420
15		1030	1950	3015	3778	4914
16		1247	2154	3215	3998	5178
17		4211	4897	3715	3713	5775
18		1355	4235	4208	8822	10756
19		305	945	1186	2144	3327
20		4801	7262	8150	9826	16286
21		2800	2727	2039	2695	3267
22		1188	1187	1759	2280	2624
23		824	1390	1239	2113	2867
24		1939	2640	5636	9387	16290
25		2881	3041	6636	11903	13026
26		1611	3842	3578	7008	8866
27		418	255	258	415	717
28		990	2043	2420	4132	3543
29		276	764	672	1184	1364
30		1007	2546	2229	3524	4500
Mittelwert		1238	2157	3215	3987	5193
SEM		205	295	510	582	835

### 3.6.2 PTH-Sekretion enkapsulierter Parathyreozyten - Langzeitversuche

Da während des 12-tägigen Versuchszyklus unerwarteterweise ein kontinuierlicher Anstieg der PTH-Sekretion sämtlicher enkapsulierter Zellkulturen zu verzeichnen war, wurde beschlossen, die letzten zehn Versuche über einen längeren Zeitraum zu beobachten.

In diesen Versuchen wurden an den Tagen 40 und 85 zusätzliche PTH-Proben entnommen, um das Langzeitsekretionsverhalten zu überprüfen.

In allen zehn Versuchen wurde übereinstimmend eine weitere, nahezu lineare Zunahme der PTH-Sekretion festgestellt (*Tab.10*) (Werte jeweils in pg/ml): Tag 4:  $1238 \pm 287$ ; Tag 6:  $2157 \pm 354$ ; Tag 8:  $3215 \pm 656$ ; Tag 10:  $3987 \pm 1191$ ; Tag 12:  $5193 \pm 1663$ ; Tag 40:  $30484 \pm 8686$ ; Tag 85:  $54892 \pm 287$ .

Zur Verbesserung der Anschaulichkeit erfolgte die Darstellung in Prozentualwerten (*Abb.20*).

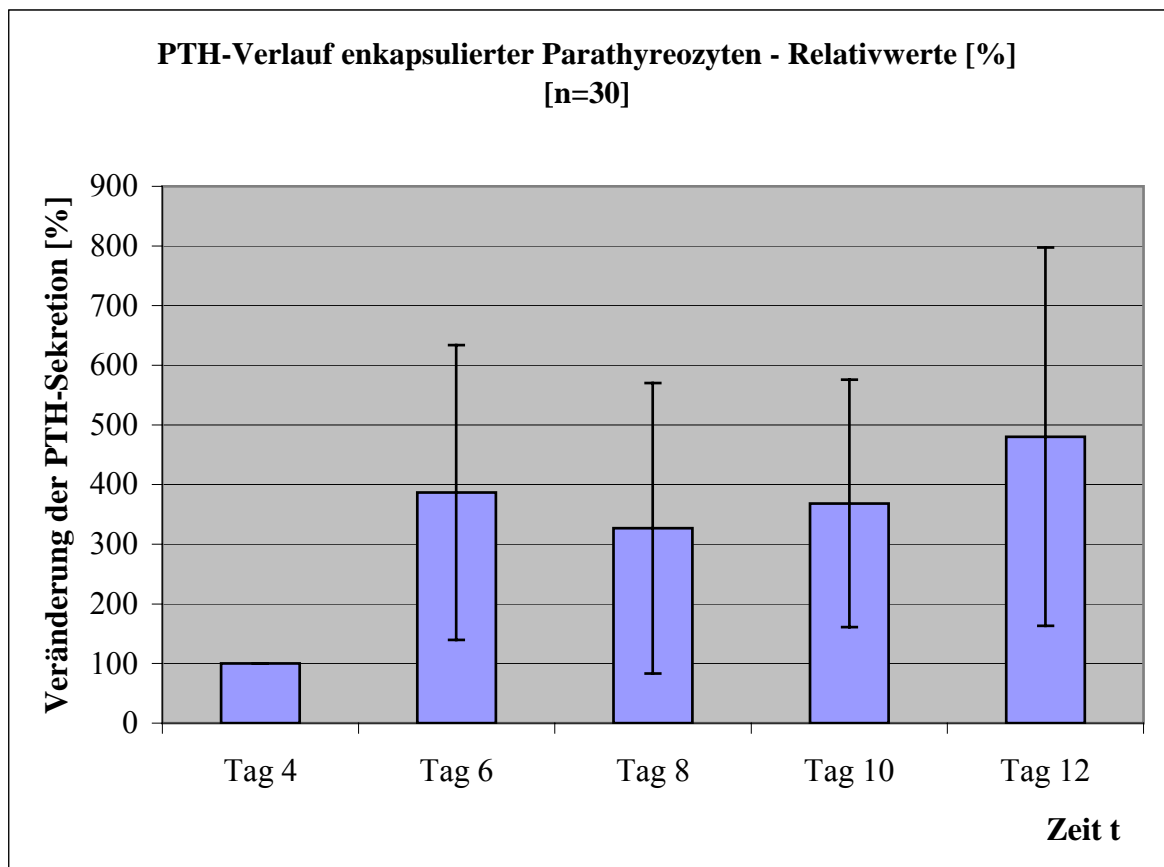


Abbildung 20: PTH-Verlauf enkapsulierter Parathyreozyten - Relativwerte [%] (Langzeitversuche) [n=10]



Tabelle 10: PTH-Verlauf enkapsulierter Parathyreozyten - Absolutwerte [pg/ml]  
(Langzeitversuche)

Tag Versuch	4	6	8	10	12	40	85
21	2800	2727	2039	2695	3267	8454	22345
22	1188	1187	1759	2280	2624	9998	36777
23	824	1390	1239	2113	2867	15987	45101
24	1939	2640	5636	9387	16290	62222	76888
25	2881	3041	6636	11903	13026	15623	22665
26	1611	3842	3578	7008	8866	76945	92346
27	418	255	258	415	717	6953	23415
28	990	2043	2420	4132	3543	56889	77973
29	276	764	672	1184	1364	3570	18587
30	1007	2546	2229	3524	4500	48195	132825
Mittelwert	1238	2157	3215	3987	5193	30484	54892
SEM	287	354	656	1191	1663	8686	287

## 4 Diskussion

### 4.1 Bisherige Behandlungsansätze des postoperativen Hypoparathyreoidismus

Der permanente, postoperative Hypoparathyreoidismus - Schätzungen zufolge sind alleine in Deutschland jährlich circa 1500 Menschen davon betroffen - stellt eine wesentliche Komplikation von Schilddrüsenoperationen dar.

Bei gegebener vitaler Gefährdung des Patienten durch tetanische Krampfanfälle ist eine lebenslange Kalzium- und Vitamin D-Substitution notwendig. Diese vermag jedoch in vielen Fällen nicht die vielfältigen Stoffwechselwirkungen des PTH zu ersetzen.

Zahlreiche Autoren<sup>16,17,18</sup> berichteten über die erfolgreiche Allotransplantation von humanem Nebenschilddrüsenewebe unter Immunsuppression.

Da eine lebenslange Immunsuppression bei der Transplantation von parathyreoidalem Gewebe unverhältnismäßig erscheint, wurde nach gangbaren Alternativen ohne Immunsuppression gesucht: Yao et al. berichteten über die erfolgreiche Allotransplantation in den zerebralen Seitenventrikel von Ratten ohne Immunsuppression und zeigten so den offensichtlich privilegierten Immunstatus dieser Lokalisation<sup>20</sup>.

Verschiedene Konzepte zielten darauf ab, die Immunantwort des Transplantatempfängers durch Reduktion sogenannter *passenger cells* – spezialisierter Zellpopulationen, wie Lymphozyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen, die sowohl MHC I- als auch MHC II-Antigene exprimieren - zu modulieren. Mehreren Arbeitsgruppen gelang dies durch die in vitro-Kultivierung des Spendergewebes. Es konnte so ein zeitweiliges Überleben der Allotransplantate ohne Immunsuppression erreicht werden<sup>21,23,24,25</sup>. Feind et al. konnten auf diese Weise im Tierversuch eine Überlebenszeit des allogenen Spenderorgans von mehreren Monaten ohne Immunsuppression und ohne Substitution von Kalzium oder Vitamin D erreichen<sup>26</sup>.

Eine andere Forschergruppe transplantierte humanes Parathyreozytengewebe unter die Nierenkapsel von Nacktmäusen, die dabei als Zwischenwirt dienen. Im nichtimmunsupprimierten, HLA-A sowie B inkompatiblen Empfängertier konnte so eine längere Überlebenszeit des Transplantates erreicht werden<sup>22</sup>.

Die Mikroverkapselung von humanem Nebenschilddrüsengewebe zeigt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz in der Behandlung des parathyreoopriven, postoperativen Hypoparathyreoidismus auf.

Erfolgreiche in vivo und in vitro Experimente mit verkapselten Parathyreozyten wurden bereits in den neunziger Jahren von Hasse et al. beschrieben: 1994 gelang dieser Arbeitsgruppe im Langzeitversuch die Allotransplantation von enkapsuliertem Nebenschilddrüsengewebe im Tiermodell ohne Immunsuppression. Gewebepartikel der Nebenschilddrüsen wurden, nach Isolation und Gewebekultur, mit Bariumalginat verkapselt und hypokalzämischen Ratten verpflanzt. Diese zeigten auch nach einem Beobachtungszeitraum von 90 Tagen noch normale Serumkalziumkonzentrationen<sup>38,39,40</sup>.

Wenig später gelang ebenfalls Hasse et al. die erste experimentelle parathyreoidale Xenotransplantation ohne Immunsuppression<sup>36</sup>.

Eine italienische Forschungsgruppe beschrieb Versuche mit alginatverkapselten Parathyreozyten aus primären Monolayerkulturen. In einer in vitro Studie zeigten die mikroverkapselten gegenüber den unverkapselten Zellen der Vergleichsgruppe eine bessere PTH-Sensitivität sowie eine höhere Hormonsekretion<sup>68</sup>.

Erste klinische Erfolge mit alginatverkapselten Nebenschilddrüsenpartikeln gelang 1997 ebenfalls der Marburger Arbeitsgruppe um Hasse et al. Zwei weiblichen Patientinnen, die nach subtotaler, bilateraler Schilddrüsenresektion an einer postoperativen Hypokalzämie litten, wurden mikroverkapselte Parathyreozyten in die Unterarmmuskulatur eingepflanzt. Bei beiden konnte eine vorübergehende Besserung der klinischen Symptomatik bei halbiertem Substitutionsmedikation erreicht werden<sup>41</sup>.

## 4.2 Substanzen zur Mikroenkapsulierung

Grundlage einer funktionsfähigen Mikrokapsel ist ein optimales Verhältnis zwischen ausreichender nutritiver Permeabilität, die eine möglichst dünne Membran erfordert, und eine ausreichende mechanische Stabilität, die eine eher dickere Membran verlangt. Alginat ist das bisher am häufigsten eingesetzte Material für die Bildung von Mikrokapseln. Es kann sowohl alleine als auch in Kombination mit positiv geladenem Polylysin eingesetzt werden. Gebräuchlich sind auch durch divalente Kationen (v.a. Kalzium und Barium) quervernetzte und somit stabilere Alginat. In diesem Verfahren werden die Zellen mit einer 1-3 % Alginatlösung vermischt und die Tropfen während ca. 5 min. in einem 1 %igen Bad aus beispielsweise  $\text{CaCl}_2$  quervernetzt. Optional können die Tropfen anschließend in einem 0,05 - 0,1 % Bad aus Poly-L-Lysin präzipitiert werden, um eine zusätzliche äußere Membran zu schaffen<sup>69</sup>.

Agarose ist ein weiteres, aus Seealgen hergestelltes Enkapsulierungsmedium. Es handelt sich hierbei um ein sich thermisch verfestigendes Material. Bei höheren Temperaturen liegt es flüssig vor und verfestigt sich beim Abkühlen. Entscheidender Nachteil ist die im Langzeitverhalten mangelhafte immunisulatorische Eigenschaft dieses Stoffes<sup>70</sup>.

Bessere Eigenschaften diesbezüglich scheint eine weiterentwickelte Multilayer-Agarosekapsel zu besitzen: Diese modifizierte Mikrokapsel besteht aus einem Gemisch aus Agarose und Polystyrensulfonsäure (PSSa) mit einer äußeren Schicht aus Carboxymethylcellulose (CMC). Der Zusatz von PSSa scheint die Fähigkeit zu besitzen, Komplementaktivität durch eine Interaktion mit Komplementproteinen unterdrücken zu können. Im in vivo-Modell konnte eine längere Funktionsfähigkeit des Transplantates im Vergleich zur konventionellen Agarosekapsel gezeigt werden<sup>71</sup>.

Sefton et al. entwickelten Mikrokapseln aus einem synthetischen, wasserunlöslichen Polymer (Polyacrylate einschließlich Polyacrylmethylmethacrylat (PMMA), Hydroxyethylmethacrylat-Methylmethacrylat (HEMA-MMA) und Eudragit®). Diese scheinen gegenüber den wasserlöslichen Acrylaten Vorteile in bezug auf Biokompatibilität und Festigkeit zu besitzen. Polyacrylate wurden bisher für die Enkapsulierung von Inselzellen sowie PC-12 Zellen sowohl in vitro als auch in vivo eingesetzt<sup>72,73</sup>.

Dautzenberg entwickelte Anfang der achtziger Jahre ein Enkapsulierungssystem auf Basis der gegensätzlich geladenen Polyelektrolyte Natriumcellulosesulfat und Polydiallyldimethylammoniumchlorid, NaCS / Poly-DADMAC.

Die Verkapselung erfolgt hierbei über ein einfaches Ein-Schritt-System. Toxizitätsstudien konnten bisher keinerlei mitogene oder toxische Eigenschaften nachweisen<sup>55</sup>.

Die Mikroverkapselung mit NaCS und Poly-DADMAC wird seit den neunziger Jahren auf verschiedenen Gebieten der Medizin und Biotechnologie erfolgreich experimentell eingesetzt<sup>37,48,74</sup>.

In dieser Arbeit wird erstmalig die Eignung von NaCS und Poly-DADMAC für die Mikroverkapselung von kryokonservierten, humanen Nebenschilddrüsenzellen geprüft.

### **4.3 Biokompatibilität und Immunkompatibilität**

Voraussetzung für die Verkapselung lebender Zellen ist die Bio- und Immunkompatibilität des Verkapselungsmaterials. Eine fibrotische Gewebsreaktion, eine Makrophagenaktivierung sowie die Freisetzung von Zytokinen und zytotoxischen Stoffen sollte idealerweise nicht vorhanden oder nur sehr gering ausgeprägt sein. Direkte Konsequenz eines nicht-biokompatiblen Verfahrens ist die Fibrosierung mit nachfolgendem Funktionsverlust des Transplantates. Kapselgröße, äußere Beschaffenheit der Membran, enkapsuliertes Gewebe und das zur Verkapselung verwendete Material gelten als die Hauptparameter, die eine mögliche Reaktion des Empfängers beeinflussen können<sup>75</sup>.

Die Empfängerimmunantwort beginnt üblicherweise mit der Absorption von Zelladhäsionsproteinen, Immunglobulinen, Komplementkomponenten, Wachstumsfaktoren und anderen Serumproteinen an der Oberfläche der transplantierten Mikro kapsel. Die Spezifität und Menge der absorbierten Proteine ist abhängig vom verwendeten Enkapsulierungsmaterial<sup>76,77,78</sup>.

Bei der akuten Entzündungsreaktion sind vor allem eosinophile und polymorphkernige Granulozyten anwesend, während die chronische Entzündungsreaktion durch Makrophagen, Fibroblasten und Fremdkörperriesenzellen gekennzeichnet ist.

Die Implantation von Biomaterialien kann zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion führen, die sich hauptsächlich in einem Überwuchs des Materials mit fibroblastenähnlichen und makrophagenähnlichen Zellen manifestiert<sup>79</sup>. Eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Entzündungs- und Immunzellen an die Oberfläche von Mikro kapseln spielt die Interaktion ihrer Oberflächenrezeptoren mit absorbierten Proteinen an der Kapseloberfläche<sup>80</sup>.

Siebers et al. wiesen nach, dass der Grad der Fibrosierung transplantierte Alginatkapseln zunimmt, je differenter Spender- und Empfängergewebe sind<sup>81</sup>.

Offensichtlich wird die Adhäsion von Zellen nicht nur durch das verwendete Kapselmaterial, sondern auch durch das verkapselte Gewebe verursacht: Es konnte gezeigt werden, dass implantierte leere Mikrokapseln frei von adhären Zellen blieben, während Kapseln, die xenogene Zellen enthielten, eine Makrophagenaktivierung *in vitro* und eine fibrotische Reaktion *in vivo* auslösten<sup>82</sup>. Die Zerstörung des xenogenen Materials innerhalb der Kapsel wird möglicherweise durch von untergegangenen verkapselten Zellen freigesetzte und nach außen diffundierte Antigene ausgelöst. Diese Antigene werden u.a. von Makrophagen phagozytiert und CD4+ T-Zellen präsentiert, wodurch schließlich die Entzündungsreaktion ausgelöst wird, die in der Zerstörung der verkapselten Zellen mündet. Iwata et al. konnten die Menge der freiwerdenden xenogenen Antigene durch *in vitro* Kultivierung der Agarosekapseln vermindern. Hierdurch konnte offensichtlich eine Erholung der enkapsulierten Zellen erreicht und die Freisetzung von Antigenen reduziert werden<sup>83</sup>.

Die Kapselmembran dient als physikalische Barriere, um einen Kontakt zwischen transplantiertem Gewebe und Immunsystem zu verhindern. Faktoren, wie molekularer Aufbau, dreidimensionale Struktur, elektrostatische Ladung sowie intra- und extrakapsuläre Konzentrationen sind wichtige Faktoren, die die Diffusionsrate von Molekülen an der Kapselmembran beeinflussen können. Gelingt es Immunglobulinen, die Membran zu penetrieren, wird die Komplementkaskade aktiviert, was im Untergang der transplantierten Zellen mündet<sup>83</sup>.

Die Effektorphase sowohl des unspezifischen als auch des spezifischen Immunsystems wird zu einem großen Teil durch Gewebshormone, so genannte *Zytokine*, ausgelöst.

Folgende Zytokine sind an einer Entzündungsreaktion gegen enkapsulierte Zellen beteiligt: *Interferon  $\alpha$  ( $INF\alpha$ )*, *Interferon  $\beta$  ( $INF\beta$ )*, *Interleukin-15 ( $IL-15$ )*, *Interleukin-12 ( $IL-12$ )*, *Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ )*, *Interleukin-1 ( $IL-1$ )*, *Interleukin-6 ( $IL-6$ )* und *Interleukin-10 ( $IL-10$ )*.

Der Effekt von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wird in zwei Phasen unterteilt: In der Akutphase verstärken TNF und Interleukin-1 die T-Zell-initiierte Entzündungsreaktion.

In der chronischen Phase stimulieren die selben Zytokine Fibroblasten zur Proliferation und Kollagenproduktion. Folge der von den aktivierten Makrophagen freigesetzten Zytokinen ist die Bildung von fibrotischem Gewebe um die transplantierte Mikrokapsel.

Die fibrotische Gewebsreaktion ist das Ergebnis einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ, wenn die Elimination des Fremdartigens erfolglos geblieben ist. Auf-

grund ihres niedrigen Molekulargewichtes können Zytokine leicht die semipermeable Kapselmembran durchdringen und zu einer Beschädigung der enkapsulierten Zellen führen<sup>84</sup>.

Die Verwendung eines Alginate/Polylysin-Komplexes für die Einkapsulierung von Langerhans-Inseln ist die häufigste und somit am besten erforschte bisherige Anwendung eines Zellverkapselungssystems. Entsprechend groß ist die Zahl der vorhandenen Publikationen verschiedener unabhängiger Forschungsgruppen hierzu.

Seit der erstmaligen Anwendung durch Lim und Sun<sup>34</sup> wurde das ALG/PLL-System mehrfach modifiziert<sup>108</sup>, um eine Reduzierung der Empfängerimmunantwort auf die transplantierten Alginatekapseln zu erreichen.

Biokompatible Alginate/PLL-Kapseln zeichnen sich durch hohe mechanische Stabilität und eine glatte Oberfläche aus. Diese Eigenschaften werden durch die Verwendung eines höher viskosen anstelle eines niedrig viskosen Alginates erzielt.

Zunehmende Hydrophilie im Kapselinneren und ein daraus resultierendes Anschwellen der Kapseln durch freiwerdendes Kalzium nach dem Einkapsulierungsprozess konnte verhindert werden, indem durch die Verwendung von Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> divalentes Kalzium gegen monovalentes Natrium ausgetauscht wurde<sup>85</sup>.

Eine Forschungsgruppe um Schneider et al. konnte durch eine Modifikation der Membraneigenschaften eine verbesserte Diffusionskapazität und Insulinantwort erreichen<sup>86</sup>.

In in vivo Versuchen wurde ein Zusammenhang zwischen Kapseldurchmesser und Empfängerimmunantwort bei der Transplantation von verkapselten Langerhans-Inseln entdeckt: Die Reduzierung des Kapseldurchmessers von 800 µm auf 500 µm war mit einer Erhöhung des Anteils unzureichend enkapsulierter Zellen assoziiert. Hieraus wurde eine stärkere Empfängerimmunantwort und somit eine verminderte Transplantatfunktion abgeleitet<sup>87</sup>.

Als Hauptursache für eine unzureichende Transplantatfunktion zeigten sich die Fibrosierung sowie mitogene Eigenschaften der transplantierten Alginate-Mikrokapseln:

Kommerziell eingesetzte Alginate sind aufgebaut aus variablen homopolymerischen Regionen aus β-D-Mannuronsäure (sog. M-blocks) und α-L-Guluronsäure (sog. G-blocks) sowie alternierenden Regionen (sog. MG-blocks).

Alginate mit einem hohen Anteil an Mannuronsäure stimulieren offensichtlich Monozyten zur Produktion von proinflammatorischen Substanzen wie TNFα, Interleukin-1 und Inter-

leukin-6 und rufen somit eine Entzündungsreaktion sowie eine humorale Immunantwort hervor.

Zimmermann et al. konnten in der Elektrophorese nachweisen, dass Alginat mindestens zehn bis zwanzig Fraktionen unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität enthielten, die mitogene Eigenschaften besaßen.

Diese mitogenen Anteile konnten elektrophoretisch separiert werden. Die somit aufgereinigten Alginatzeigten in *in vitro* und *in vivo*-Versuchen keine mitogenen Eigenschaften mehr<sup>37,88</sup>. Der unerwünschte Effekt der Fibrosierung konnte um 90 % reduziert werden. Weiterhin zeigte sich, dass durch eine Erhöhung des Anteils an Glukuronsäure die mechanische Stabilität und somit ein Anschwellen der Kapseln mit der Folge einer fibrotischen Überwucherung verhindert werden konnte<sup>89,90</sup>.

Die Überlebenszeit der Mikrokapseln blieb jedoch weiterhin auf eine Zeitspanne von sechs bis zehn Wochen beschränkt. Es wurde postuliert, dass unzureichende Nutrition aufgrund mangelnder Blutversorgung der verkapselten Zellen hierfür verantwortlich ist<sup>91,92</sup>. Unterstützt wurde diese Annahme durch die Beobachtung, dass der größte Anteil nekrotischer Zellen im Kapselinneren zu finden war.

Bei der Transplantation von Mikrokapseln aus Natriumcellulosesulfat in die Bauchhöhle konnte während eines zehnmonatigen Beobachtungszeitraumes weder eine Entzündungsreaktion noch eine aseptische Peritonitis beobachtet werden<sup>74</sup>.

Zusammenfassend sind drei Aspekte der Bio- und Immunokompatibilität zu berücksichtigen<sup>93,94</sup>.

1. Die Reaktion des enkapsulierten Gewebes auf die Verkapselung
2. Fremdkörperreaktion des Empfängers gegen die Mikrokapseln
3. Immunologische Reaktion des Empfängers gegen das verkapselte Spendergewebe.



#### 4.4 Mikroenkapsulierung – Auswahl bisheriger Anwendungen

Die Verwendung von semipermeablen Mikrokapselfn zur Immobilisierung von Zellen repräsentiert eine wirkungsvolle Methode, einerseits eine nutritive Versorgung des verkapselten Gewebes und die freie Passage von Zellprodukten sicherzustellen und andererseits dessen immunologische Rejektion zu verhindern.

Die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten der Mikroenkapsulierungstechnologie sind vielfältig:

Der erstmalige erfolgreiche Einsatz der Mikroenkapsulierungstechnologie gelang Lim et al. 1980 mit der Verkapselung von Langerhans-Inseln des Pankreas zur Therapie des insulinabhängigen Diabetes mellitus Typ I<sup>34</sup>.

Zahlreiche Forschungsgruppen arbeiteten seither an der Verkapselung von Langerhans-Inseln. Trotz vielversprechender Ergebnisse bei der Transplantation von mikroverkapselten Insulin-produzierenden Zellen in in vivo Versuchen<sup>95</sup> blieb der klinische Einsatz bisher auf eine geringe Anzahl von Fällen beschränkt<sup>96,97,98</sup>.

Probleme der Biokompatibilität standen hierbei anfangs im Vordergrund: Die Insulinsekretion wurde durch in situ-Fibrosierung der transplantierten Alginat-Kapseln stark eingeschränkt. Durch Verwendung eines hochaufgereinigten Alginsates konnte dieses Problem reduziert werden. Die Funktionsdauer der Transplantate blieb jedoch weiterhin beschränkt<sup>99,100</sup>.

Im Tiermodell konnte mit der Verkapselung von genetisch veränderten, Erythropoetin-produzierenden Myoblasten ein vielversprechender Ansatz in der Behandlung von Anämien unterschiedlichster Genese aufgezeigt werden<sup>101</sup>.

Eine andere Anwendung verfolgt eine Forschungsgruppe der Abteilung für HNO an der Charité in Berlin<sup>102</sup>: Die autologe Verpflanzung von Knorpelgewebe ist eine allgemein akzeptierte Methode in der Wiederherstellungschirurgie. Die Empfängerimmunantwort bei allogener Transplantation führt jedoch in vielen Fällen zur Instabilität des Transplantates oder induziert eine chronische Entzündungsreaktion. Im Mausmodell konnte durch die Makroverkapselung von Knorpelgewebe eine signifikante Reduzierung der Entzündungsreaktion im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht werden. Die verkapselten Gewebe zeigten keinerlei Degenerationszeichen<sup>102</sup>.

Tobias et al. erprobten die Allotransplantation von mikroverkapselten BDNF-produzierenden Fibroblasten ohne den Einsatz von Cyclosporin A im Tiermodell<sup>103</sup>. Die BDNF-produzierenden Kapseln wurden in das geschädigte Rückenmark von adulten Ratten transplantiert. Die Vitalität der Zellen konnte noch nach einem Beobachtungszeitraum von vier Wochen nachgewiesen werden. Im Vergleich zur zellfreie Kapseln enthaltenden Kontrollgruppe zeigte sich in der Umgebung von Kapseln, die BDNF-produzierende Zellen enthalten, ein erhöhtes Wachstum von Axonen und Dendriten<sup>103</sup>.

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine Schutzfunktion zwischen Gefäßsystem und Hirnparenchym dar. Sie bereitet jedoch häufig Probleme in der Versorgung des Gehirns mit pharmakologisch wirksamen Substanzen oder Metaboliten<sup>104</sup>.

Eine Möglichkeit zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke stellt die Mikroverkapselung und intrazerebrale Transplantation von Zellen dar, die stoffwechselaktive Metabolite produzieren<sup>105</sup>.

Date et al. gelang es, enkapsulierte dopaminproduzierende Zellen in das Striatum von hemiparkinsonoiden Primatenaffen zu verpflanzen. Die Dopaminproduktion konnte noch nach 12 Monaten nachgewiesen werden. Es gab keinerlei Anzeichen einer Immunantwort und die histologische Reaktion des Umgebungsgewebes war gering. Klinisch konnte eine Verminderung des Tremors an den Händen der Versuchsaaffen beobachtet werden<sup>106</sup>.

Zu ähnlich positiven Ergebnissen kamen Xue et al. Die Verpflanzung von mikroverkapselten, dopaminproduzierenden, chromaffinen Zellen in das Striatum von hemiparkinsonoiden Versuchsratten führte ebenfalls zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik<sup>107</sup>.

Tabelle 11: Materialien und Gewebe für Mikrokapseln  
(modifiziert nach: Li, Materials for immunisolated cell transplantation)<sup>108</sup>

Polymer	Zell- / Gewebetyp	Modell / Empfänger
HEMA-MMA <sup>1</sup> und Versch. Polyacrylate	PC-12 humane Fibroblasten Inselzellen (Ratten) HepG 2	in vitro in vitro in vitro in vitro
ALG/PLL – PEI <sup>2</sup>	Inselzellen	Ratte
ALG/PLL – ALG <sup>3</sup>	mGH-C2C12 Myoblasten Inselzellen Humane Inselzellen Hepatozyten (Ratte) Hepatozyten (Ratte) Adrenerge chromaffine Zellen (Kalb) PC12 Inselzellen (Ratte)	Maus Ratte humanes Peritoneum Gunn –Rattenmodell Peritoneum (Ratte) Nagetier Primatenaffen Ratte
NaCS / Poly-DADMAC <sup>4</sup>	humane Parathyreozyten Knorpelzellen antikörperproduzierende Zellen humane Hepatozyten	in vitro Maus in vivo in vitro
ALG-Komplex	Guinea-Schwein	in vitro
HEMA – co – MMA	Erythrozyten	
Ba – ALG	Inselzellen (Ratte) Porcine Inselzellen	Maus Maus
Agarose	B6 Inselzellen (Maus) Inselzellen (Hamster)	Maus Maus
Agarose/PSS/PB/CMC <sup>5</sup>	PC-12 Inselzellen (Ratte)	Guinea-Schwein Maus
Photo – quervernetzte PVA	Inselzellen (Maus)	Peritoneum (Maus)

<sup>1</sup> Hydroxyethylmethacrylat-Methylmethacrylat

<sup>2</sup> Alginat-Polylysin-Polyethylenimin

<sup>3</sup> Alginat-Polylysin-Alginat

<sup>4</sup> Natriumcellulosesulfat-Polydiallyldimethylammoniumchlorid

<sup>5</sup> Agarose / Polystyrensulfonsäure / Carboxymethylcellulose

## 4.5 Bewertung der eigenen Ergebnisse

### 4.5.1 Unverkapselte Parathyreozytenkulturen

Für diese Arbeit wurden in zehn Versuchen unverkapselte Parathyreozyten untersucht. Die Bestimmung des zeitlichen PTH-Verlaufes sowie der PTH-Sekretionsantwort auf unterschiedliche extrazelluläre Kalziumkonzentrationen sollten Aufschluss über das in vitro Verhalten der Parathyreozyten geben und für die späteren Verkapselungsversuche als Vergleichsgröße dienen.

Die Viabilität der Nebenschilddrüsenzellen nach Anlegen der Zellkultur am Tag 1 betrug durchschnittlich  $72 \pm 11,7 \%$  und erhöhte sich bis zu Tag 3 des Versuchszyklus aufgrund der Lyse avitaler Zellen auf durchschnittlich  $95 \pm 4,3 \%$ .

Die nekrotische Zellfraktion sowie der hohe Anteil an Zelltrümmern nach Aufarbeitung war sowohl bedingt durch die Prozessierung der kryokonservierten Zellen zur Zellsuspension als auch durch die Kryokonservierung selbst.

Wagner führte in seiner Habilitationsschrift die Nekroserate kryokonservierter Parathyreozyten größtenteils auf Zellschäden zurück, die beim Einfrieren und Auftauen der Präparate entstehen<sup>44</sup>. In seinen Untersuchungen konnte er keinen nennenswerten Einfluss der Dauer der Kryokonservierung auf die Viabilität der Zellen feststellen. Dies deckt sich mit den Erfahrungen, die in der vorliegenden Arbeit gemacht wurden: Die durchschnittliche Konservierungsdauer betrug zwei Jahre. Es wurden jedoch auch Epithelkörperchen mit einer Lagerungsdauer von bis zu zehn Jahren aufgearbeitet, ohne dass nennenswerte Unterschiede bezüglich der Viabilität festgestellt wurden.

Das in vitro Sekretionsverhalten der Parathyreozyten wurde durch Inkubation der Zellen in einer aufsteigenden Kalziumreihe mit Konzentrationen von 0,5, 1,5, 2,0, 2,5 sowie 3,5 mmol/l Kalzium überprüft.

Da es sich hierbei um sehr heterogene Zellkulturen handelte, wurde der jeweilige Leerwert (2,0 mmol/l) in der Testreihe gleich Null gesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Werte zu erreichen. In den Kulturen, in denen dem Medium Kalzium entzogen wurde, kann ein Ansteigen der PTH-Sekretion festgestellt werden. Durch Kalziumzugabe wurde die PTH-Sekretion supprimiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren konnte so eine adäquate PTH-Antwort der Nebenschilddrüsenzellen auf unterschiedliche Kalziumkonzentrationen nachgewiesen werden<sup>48,109</sup>.

Der PTH-Verlauf der Zellkulturen wurde über 12 Tage hinweg beobachtet. An Tag 2 konnte ein maximaler PTH-Wert von annähernd 2,5 Mio pg/ml beobachtet werden. Die Zellkulturen bildeten innerhalb des Beobachtungszeitraumes dichte Kulturen aus. Eine wesentliche Reduzierung der Zellzahlen konnte phasenkontrastmikroskopisch nicht festgestellt werden. Bei hohem *standard error of the means* konnte ein zeitliches Absinken der PTH-Sekretion der Zellen beobachtet werden. Die im zeitlichen Verlauf abnehmende *in vitro* Sekretionsleistung der Parathyreozyten konnte bei allen Kulturen, trotz teilweise erheblichen Unterschieden in den einzelnen Werten, festgestellt werden und deckte sich im wesentlichen mit den Erfahrungen anderer Autoren bei der Kultivierung kryokonservierter Parathyreozyten<sup>48,44</sup>.

Mögliche Einflüsse der Kryokonservierung auf die Sekretionsleistung oder Steuerbarkeit von Nebenschilddrüsenzellen konnte Wagner in einer Vergleichsstudie ausschließen<sup>44</sup>.

#### **4.5.2 Bewertung des Verkapselungsverfahrens**

Zu Beginn der Versuche war es notwendig, die Verkapselungsmedien NaCS und Poly-DADMAC in ihren Eigenschaften zu überprüfen und den Encapsulator AP<sup>TM</sup> auf die spezifische Anwendung mit Natriumcellulosesulfat zu optimieren.

Hierzu galt es, die Variablen NaCS-Temperatur, Aushärtezeit der Kapseln sowie Geschwindigkeit, Frequenz und Amplitude des Tropfenstrahls aufeinander abzustimmen.

Als ein Hauptproblem in den Vorversuchen erwies sich zunächst die teilweise ungenügende Aushärtung sowie die daraus resultierende Verklebung der Mikrokapseln. Durch eine Verlängerung der Aushärtezeit im Fällbad konnte dieses Problem reduziert werden. Eine prolongierte Verweildauer der Mikrokapseln im Präzipitationsbad führte jedoch zu einer Verschiebung des osmotischen Gradienten zwischen Kapselinneren und seiner Umgebung, was Einziehungen an der Kapselmembran und die Entstehung der sogenannten *Rosinenform* zur Folge hatte. Die Aushärtezeit wurde im Laufe der Versuche so optimiert, dass einerseits ein Verkleben der Kapseln minimiert wurde, andererseits eine runde Kapselmembran für einen optimalen Substrataustausch geschaffen wurde.

Nach Einhaltung weitgehend konstant gehaltener Versuchsparameter und Geräteeinstellungen erwies sich die Verkapselung mit NaCS / Poly-DADMAC als relativ unkompliziert und die Eignung als schnelles, reproduzierbare Ergebnisse erzielendes Ein-Schritt-

Verfahren konnte bestätigt werden. Hieraus ergeben sich deutliche Vorteile im Vergleich zu dem aus mehreren Arbeitsschritten und somit größere Fehlerquellen beinhaltendem Verkapselungssystem aus Alginat / Polylysin<sup>55</sup>.

Die Größe der in diesen Versuchen hergestellten Mikrokapseln mit einem Mittelwert von  $0,33 \pm 0,02$  mm war relativ einheitlich, was sowohl als Zeichen der guten Reproduzierbarkeit gewertet werden kann als auch Voraussetzung für den klinischen Einsatz der Kapseln ist.

Uludag et al. bewerteten Mikrokapseln (hierzu rechneten sie Kapseln mit Durchmessern von 0,3 - 1,5 mm) als vorteilhafter in Bezug auf die Immunkompatibilität sowie die Diffusionskapazität von Substraten<sup>75</sup>.

Die Porengrößenbestimmung der Kapselmembran ergab als Maß für die Porengröße eine mittlere Trenngrenze von  $1,39 \pm 0,04$  nm. Eine Porengröße von 2 nm entspricht in etwa der Größe eines Moleküls mit einer Molmasse von 20000 Dalton<sup>108</sup>. Das IgG als kleinstes Immunglobulin besitzt ein Molekulargewicht von 150000 Dalton, ist also wesentlich größer und kann so die vorhandene Kapselbarriere nicht durchdringen.

Parathyrin hingegen liegt mit einem Molekulargewicht von 9500 Dalton deutlich unter der mittleren Trenngrenze und kann die semipermeable Membran frei passieren.

Die mechanische Stabilität der Mikrokapseln ist eine wichtige Voraussetzung für den klinischen Einsatz. Bei zahlreichen Versuchen mit Alginatkapseln kam es aufgrund mangelnder Festigkeit zu einem Aufbrechen der Kapseln mit nachfolgender Fibrosierung des Transplantates<sup>108,94</sup>. Dautzenberg et al. bestimmten experimentell ein Minimum von 0,5 N (Kraft, die zum Bersten der Kapsel führt) für eine sichere Handhabung von Mikrokapseln. In den vorliegenden Versuchen konnten mittlere Werte für die Kraft F / Kapsel von  $2,84 \pm 0,25$  N bestimmt werden<sup>55</sup>.

Die Kapseln wiesen eine wechselnde, jedoch stets dichte Auskleidung mit Zellen auf. Phasenkontrastmikroskopisch konnte eine Migration der Zellen vom Zentrum in Richtung Kapselperipherie nachgewiesen werden. Dies wird auf die dort offensichtlich besseren nutritiven Bedingungen zurückgeführt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Autoren<sup>110,111</sup> konnte keine sichtbare Zerstörung der Zellen durch den Verkapselungsprozess festgestellt werden.

Die metabolische Leistungsfähigkeit kann durch den Nachweis der PTH-Produktion und die vorhandene Steuerbarkeit durch Kalziumsuppression als bewiesen gewertet werden.

### **4.5.3 Bewertung der Kalziumsensitivität enkapsulierter Parathyreozyten**

Ziel dieser Arbeit war es, in einer in vitro Studie die Eignung von Natriumcellulosesulfat und Poly-DADMAC zur Verkapselung von kryokonserviertem, humanem Nebenschilddrüsengewebe zu überprüfen. In diesem Zusammenhang sollten die Verträglichkeit von enkapsulierten Zellen und den zur Verkapselung verwendeten Komponenten evaluiert sowie eventuelle negative Auswirkungen auf das Sekretionsverhalten ausgeschlossen werden.

Für den klinischen Einsatz ist die physiologische Reaktionsfähigkeit der verkapselten Zellen im Rahmen der Kalziumhomöostase unabdingbar.

Die in vitro Sensitivität der enkapsulierten Parathyreozyten im Kalziumsuppressionstest stellt in diesem Zusammenhang einen entscheidenden Parameter für die Beurteilung des Zustandes des verkapselten Zellmaterials dar<sup>109</sup>.

Hierbei wird die Kalziumsensitivität der Parathyreozyten als Differenz zwischen den vor und nach Anlegen der aufsteigenden Kalziumreihe bestimmten Hormonwerten definiert.

Die durch eine semipermeable Membran immobilisierten Parathyreozyten zeigten eine Erhöhung der PTH-Sekretion unter Kalziumentzug von  $14 \pm 11$  % (0,5 mmol/l Kalzium) bzw.  $10 \pm 9$  % (1,5 mmol/l Kalzium) sowie eine Supprimierbarkeit der PTH-Sekretion unter Kalziumzugabe von  $-26 \pm 12$  % (2,5 mmol/l Kalzium) bzw.  $-29 \pm 10$  % (3,5 mmol/l Kalzium).

Im Vergleich zur Gruppe unverkapselter Parathyreozyten konnte eine bessere Sensitivität der Zellen bei deutlich niedriger Standardabweichung bestimmt werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann eine erhaltene Steuerbarkeit von durch Parathyreozyten nach Enkapsulierung mit NaCS / Poly-DADMAC als bewiesen gewertet werden.

### **4.5.4 Bewertung der PTH-Sekretion enkapsulierter Parathyreozyten im zeitlichen Verlauf**

Die PTH-Sekretion der enkapsulierten Parathyreozyten wurde über einen Zeitraum von 12 Tagen [ $n=30$ ] bzw. 85 Tagen [ $n=10$ ] bestimmt.

In dem 12-tägigen Beobachtungszeitraum konnte ein kontinuierlicher Anstieg der PTH-Sekretion im Medium gemessen werden. Noch deutlicher konnte dies in den Langzeitversuchen gezeigt werden: Hier wurde ein nahezu linearer Zuwachs der gemessenen PTH-Werte auf der Zeitachse verzeichnet.

Diese Zunahme des PTH-Verlaufes war sehr gut reproduzierbar und findet sich in fast allen Versuchen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe unverkapselter Zellen, bei denen tendenziell ein Absinken der PTH-Sekretion während des Beobachtungszeitraumes beobachtet wurde, konnte also durch die Mikroverkapselung eine Zunahme der gemessenen Hormonwerte erreicht werden.

Ähnliche Ergebnisse, wenngleich mit weniger deutlichem Anstieg der PTH-Sekretion, erzielten Picariello et al. bei der Mikroverkapselung humaner Parathyreozyten mit ALG/PLL<sup>68</sup>. Im Vergleich zwischen unverkapselten Monolayerkulturen und alginatverkapselten Parathyreozyten zeigte die enkapsulierte Gruppe eine höhere Hormonfreisetzung in einem zehntägigen Versuchszyklus.

Mögliche Erklärung für die bessere hormonelle Sekretionsleistung enkapsulierter Zellen ist die dreidimensionale Struktur der Mikrokapselfn. Die Einbettung in eine flüssige, extrazelluläre Matrix aus Natriumcellulosesulfat bietet offensichtlich nutritive und metabolische Vorteile im Vergleich zur Kultivierung in Einzelzellsuspension und kommt dem natürlichen Aufbau einer Nebenschilddrüse näher. Die extrazelluläre Matrix bietet den Zellen die Möglichkeit, ihre differenzierten Funktionen auszuüben und unterstützen sie insgesamt in ihrer Formation zueinander, um eine optimale Funktion und Viabilität zu erreichen<sup>112,113</sup>.

Die Mikroverkapselung von Nebenschilddrüsenzellen mit NaCS / Poly-DADMAC scheint also neben den immunisulatorischen Eigenschaften zusätzlich einen positiven Einfluss auf die Funktion der verkapselten Zellen zu haben.

Neben der erhaltenen guten Kalziumsensitivität wird das in diesen in vitro Versuchen ermittelte PTH-Sekretionsverhalten der verkapselten Parathyreozyten als Zeichen einer guten Kompatibilität des Systems Natriumcellulosesulfat / Poly-DADMAC und dem verkapselten Zellmaterial bewertet.



## 5 Zusammenfassung

Die permanente, parathyreooprive Hypokalzämie stellte eine schwerwiegende Komplikation in der Schilddrüsenchirurgie dar.

Die derzeitige Therapie der Wahl ist die lebenslange Substitution von Vitamin D und Kalzium. Aufgrund der komplexen Stoffwechselwirkungen des Parathormons zeigt diese jedoch teilweise unbefriedigende Ergebnisse.

Bisherige Versuche der Allotransplantation von Parathyreozyten scheiterten letztlich immer an der Rejektion des Gewebes durch den Empfängerorganismus.

Die Mikroverkapselung von Zellen mittels einer semipermeablen Membran bietet einen wirkungsvollen Schutz vor immunologischer Abstoßung bei freiem Substrataustausch und ermöglicht so die Transplantation ohne Immunsuppression.

Bei den meisten der bisherigen Anwendungen zur Einkapsulierung von Zellen wird ein System aus Alginat / Polylysin verwendet. Aufgrund mitogener und toxischer Verunreinigungen der Alginate ist für die klinische Anwendung jedoch ein aufwendiges Reinigungsverfahren des Ausgangsproduktes notwendig.

Mikrokapseln aus den Komponenten Natriumcellulosesulfat und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (Poly-DADMAC) werden seit den neunziger Jahren erfolgreich auf vielen Gebieten zur Immobilisierung von Zellen verwendet. Bisherige Studien konnten keinerlei mitogene oder toxische Eigenschaften nachweisen. Die Einkapsulierung mit diesem Verfahren erfolgt über ein unkompliziertes, gut reproduzierbares Ein-Schritt-System. Ziel dieser Arbeit war es, die Eignung des Systems Natriumcellulosesulfat / Poly-DADMAC für die Mikroverkapselung von kryokonservierten, humanen Parathyreozyten zu prüfen.

Insbesondere sollten hierbei die mechanischen Eigenschaften der hergestellten Mikrokapselfellen sowie die Viabilität und Funktion der enkapsulierten Zellen verifiziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass

- die hergestellten Kapseln aus NaCS / Poly-DADMAC mit einer zum Zerplatzen aufzuwendenden Kraft  $F$  von  $2,84 \pm 1,36$  N über eine hohe mechanische Festigkeit verfügen.
- die Kapselmembran mit einer mittleren Trenngrenze (Maß für die Porengröße) von  $1,39 \pm 0,04$  nm den Erfordernissen einer semipermeablen und immunprotektiven Barriere entspricht.

- die Größe der hergestellten Kapseln relativ einheitlich ist (mittlerer Durchmesser  $0,33 \pm 0,02$  mm).
- durch die Verkapselung von Parathyreozyten mit NaCS / Poly-DADMAC kein schädigender Einfluss auf die enkapsulierten Zellen festzustellen ist.
- die Kalziumsensitivität der Parathyreozyten im Kalziumsuppressionstest auch nach Verkapselung der Zellen erhalten bleibt.
- mit NaCS / Poly-DADMAC enkapsulierte Parathyreozyten im Vergleich zu unverkapselten Zellen ein Ansteigen der PTH-Werte in Zellkultur zeigen.

Es konnte somit in vitro die Eignung von Natriumcellulosesulfat und Poly-DADMAC zur Mikroverkapselung von kryokonserviertem, humanem Nebenschilddrüsengewebe aufgezeigt werden.

Weitere Erkenntnisse bezüglich der Bio- und Immunkompatibilität dieses Enkapsulierungssystems müssen im Tierversuch sowie in klinischen Studien evaluiert werden.

-----  
-----

## 6 Literatur

1. Glinoyer D, Andry G, Chantrain G, Samil N: Clinical Aspects of early and late Hypocalcaemia after Thyroid Surgery. *Eur J Surg Oncol* 26: 571-77, 2000
2. Pattou F, Combemale F, Fabre S, Carnaille B, Decoulx M, Wemeau JL, Racadot A, Proye C: Hypocalcaemia Following Thyroid Surgery: Incidence and Prediction of Outcome. *World J Surg* 22: 718-24, 1998
3. Steinmüller T, Klupp J, Wenking S, Neuhaus P: Complications Associated with Different Surgical Approaches to Differentiated Thyroid Carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 384: 50-53, 1999
4. Steinmüller T, Ulrich F, Rayes N, Lang M, Seehofer D, Tullius SG, Jonas S, Neuhaus P: Operationsverfahren und Risikofaktoren in der Therapie der benignen Struma multinodosa. Ein statistischer Vergleich. *Der Chirurg* 72: 1453-57, 2001
5. Siegenthaler, Hrsg.: *Klinische Pathophysiologie*, 7.Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2001
6. Löffler G, Petrides EP: *Biochemie und Pathobiochemie*, 5. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1997
7. Schmidt FR, Thews G: *Physiologie des Menschen*, 27. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1997
8. Jipp P: *Erkrankungen endokriner Organe: Klinik, Diagnostik und Differentialtherapie*. 1.Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2001
9. Seyfarth C: *Lehrbuch der Speziellen Pathologie und Therapie der Inneren Krankheiten*. 29. und 30. Auflage, Verlag von F.C.W.Vogel, Leipzig, 1930
10. Halsted WS: Hypoparathyreosis, Status Parathyreoprivus, and Transplantation of the Parathyroid Glands. *Am J Med Sci* 134: 1-12, 1907
11. Caccitolo JA, Farley DR, vHeerden JA, Grant CS, Thompson GB, Sterioff S: The Current Role of Parathyroid Cryopreservation and Autotransplantation in Parathyroid Surgery: An Institutional Experience. *Surgery* 122: 1062-1067, 1997
12. Ledger GA: Hypocalcemia and Hypoparathyreodism. *Curr Ther Endocrinol Metab* 5: 508-510, 1994
13. Wells SA, Stirman JA, Bolman RM: Parathyroid Transplantation. *World J Surg* 1,6: 747-754, 1977.

14. Baumann DS, Wells SA: Parathyroid Autotransplantation. *Surgery* 113: 130-133, 1993
15. Wells SA, Gunnells JC, Shelburne JD: Transplantation of the Parathyroid Glands in Man: Clinical Indications and Results. *Surgery* 78: 34-44, 1975
16. Groth CG, Hammond WS, Iwatsuki S, Popovitzer M, Cascardo S, Halgrimson CG, Starzl TE: Survival of a Homologous Implant in an Immunosuppressed Patient. *Lancet* 1, 7812: 1082-1085, 1973
17. Duarte B, Mozes MF, John E, Aronson I, Pollak R, Jonasson O: Parathyroid Allotransplantation in the Treatment of complicated idiopathic Primary Hypoparathyroidism. *Surgery* 98,6: 1072-1076, 1985
18. Alfrey JA, Perloff LA, Asplund MW, Dafoe DC, Grossman RA, Bromberg JS, Holland T, Naji A, Barker CF: Normocalcemia Thirteen Years after successful Parathyroid Allografting in a Recipient of a Renal Transplant. *Surgery* 11, 2: 234-236, 1992
19. Tolloczko T, Wozniewicz B, Sawicki A, Górski A: Allotransplantation of Cultured Human Parathyroid Cells: Present Status and Perspectives. *Transpl Proc* 29: 998-1000, 1997
20. Yao CZ, Ishizuka J, Townsend CM, Thompson JC: Successful Intracerebroventricular Allotransplantation of Parathyroid Tissue in Rats without Immunosuppression. *Transplantation* 55: 251-253, 1993
21. Lafferty KJ, Cooley MA, Woolnough J, Walker KZ: Thyroid Allograft Immunogenicity is reduced after a Period in Organ Culture. *Science* 188: 259-261, 1975
22. Sollinger HW, Mack E, Cook K, Belzer FO: Allotransplantation of Human Parathyroid Tissue without Immunosuppression. *Transplantation* 36, 6: 599-602, 1983
23. Starling JR, Fidler R, Corry RJ: Prolongation of Survival of Rat Parathyroid Allografts by Enhancing Serum and Tissue Culture. *Surgery* 81, 6: 668-675, 1977
24. Tolloczko T, Wozniewicz B, Sawicki A, Nawrot I, Migaj M, Zabitowska T, Górski A: Cultured Parathyroid Cell Transplantation without Immunosuppression in the Treatment of Surgical Hypoparathyroidism. *Transpl Proc* 4: 1901-1902, 1994

25. Wozniewicz B, Migaj M, Giera B, Prokurat A, Tolloczko T, Sawicki A, Nawrot A, Górski A, Zabitkowska T, Kossakowska AE: Cell Culture Preparation of Human Parathyroid Cells for Allotransplantation without Immunosuppression. *Transpl Proc* 6: 3542-3544, 1996
26. Feind CR, Weber CJ, Derenoncourt F, Williams GA, Hardy MA, Reemtsma K: Survival and Allotransplantation of Cultured Human Parathyroids. *Transpl Proc* 11, 1: 1011-1016, 1979
27. Tsuji K, Fuchinoue S, Kai K, Kawase T, Kitajima K, Sawada T, Nakajima I, Agishi T: Culture of Human Parathyroid Cells for Transplantation. *Transpl Proc* 31: 2697, 1999
28. Bloom AD, Economou SG, Gebel HM: Extension of Survival of Rat Parathyroid Allografts by Depletion of Ia Donor Cells plus Preoperative Cyclosporine. *Transplantation* 44,2: 171-174, 1987
29. Tatem L, Hou A, Black KS, Llull R, Hewitt CW: Digital Image Analysis of Major Histocompatibility Complex Class I and Class II Expression during Site-Specific Immune Suppression with topical Cyclosporine. *Transpl Proc* 1: 344-345, 1995
30. Bjerneroth G, Juhlin C, Rasted J, Åckerström G, Klareskog L: MHC Class I and II Antigen Expression on Parathyroid Cells and Prospects for their Allogenic Transplantation. *Transplantation* 56: 717-721, 1993
31. Hellman P, Karlsson-Parra A, Klareskog L, Ridefelt P, Bjerneroth G, Rastad J, Åckerström G, Juhlin C: Expression and Function of a CD 4-like Molecule in Parathyroid Tissue. *Surgery* 120: 985-992, 1996
32. Bjerneroth G, Juhlin C, Gudmundsson S, Rastad J, Åckerström G, Klareskog L: Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Parathyroid Autoantibodies in Primary Hyperparathyroidism. *Surgery* 124: 503-509, 1998
33. Anton G, Decker G, Stark JH, Botha JR, Margolius LP: Allotransplantation of Parathyroid Cells (Letter to the Editor ). *Lancet* 345: 124, 1995
34. Lim F, Sun AM: Microencapsulated Islets as Bioartificial Endocrine Pancreas. *Science* 210: 908-910, 1980
35. Hasse C, Schrezenmeier J, Stinner B, Schark C, Wagner PK, Neumann K, Rothmund M: Successful Allotransplantation of Microencapsulated Parathyroid in Rats. *World J Surg* 18: 630-634, 1994

36. Hasse C, Zielke A, Klöck G, Barth P, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M: First Successful Xenotransplantation of Microencapsulated Human Parathyroid Tissue in Experimental Hypoparathyroidism: Long-term Function without Immunosuppression. *J Microencapsulation* 14: 617-626, 1997
37. Zimmermann U, Klöck G, Federlin K, Hannig K, Kowalski M, Bretzel RG, Horcher A, Entenmann H, Sieber U, Zekorn T: Production of Mitogen-Free Alginates with Variable Ratios of Mannuronic Acid to Glucuronic Acid by Free Flow Electrophoresis. *Electrophoresis* 13: 269-274, 1992
38. Hasse C, Klöck G, Zielke A, Schlosser A, Barth P, Zimmermann U, Rothmund M: Transplantation of Parathyroid Tissue in Experimental Hypoparathyroidism: in vitro and in vivo Function of Parathyroid Tissue Microencapsulated with a Novel Amitogenic Alginate. *Int J Art Org* 12: 735-741, 1996
39. Hasse C, Zielke A, Klöck G, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M: Isotransplantation of Microencapsulated Parathyroid Tissue in Rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105: 53-56, 1997
40. Hasse C, Zielke A, Klöck G, Schlosser A, Barth P, Zimmermann U, Sitter H, Lorenz W, Rothmund M: Amitogenic Alginates: Key to First Clinical Application of Microencapsulation Technology. *World J Surg* 22: 659-665, 1998
41. Hasse C, Klöck G, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M: Parathyroid Allotransplantation Without Immunosuppression. *Lancet* 350: 1296-1297, 1997
42. Löhr M, Müller P, Karle P, Stange J, Mitzner S, Jesnowski R, Nizze H, Nebe B, Liebe S, Salmons B, Günzburg WH: Targeted Chemotherapy by Intramural Injection of Encapsulated Cells Engineered to Produce CYP2B1, an Ifosfamide Activating Cytochrome P450. *Gene Therapy* 5: 1070-1078, 1998
43. Pelegrin M, Marin M, Noel D, Del Rio M, Saller RM, Stange J, Mitzner S, Günzburg WH, Piechaczyk M: Systemic long-term Delivery of Antibodies in Immunocompetent Animals Using Cellulose Sulfate Capsules Containing Antibody-Producing Cells. *Gene Therapy* 5: 828-834, 1998
44. Wagner PK: Einfluß der Kältekonservierung auf Invitro-Sekretionsverhalten und Morphologie von menschlichem Nebenschilddrüsengewebe. Medizinische Habilitation, Mainz 1983
45. Wagner PK, Rothmund M, Gabbert H, Krause U: Kältekonservierung von humanem Nebenschilddrüsengewebe. *Langenbecks Arch Chir* 353: 183, 1980

46. Wagner PK, Rothmund M, Kümmerle F, Kessler FJ, Gabbert H, Krause U: Autotransplantation von kältekonserviertem Nebenschilddrüsengewebe. Dtsch Med Wochenschr 106: 363, 1981
47. Walgenbach S, Rosniatowski R, Bittinger F, Schicketanz KH, Hafner F, Hengstler J, Junginger T: Modified Cryopreservation and Xenotransplantation of Human Parathyroid Tissue. Langenbecks Arch Surg: 384: 277-283, 1999
48. Grzonka S: Etablierung von Parathyreozytenkulturverfahren zur Funktionsdiagnostik von kryokonserviertem, humanem Nebenschilddrüsengewebe. Medizinische Dissertation, FU Berlin, Berlin 1991
49. Dautzenberg H, Loth F, Wagenknecht W, Philipp B: Cellulose-Ausgangsmaterial für hochveredelte Produkte im biologisch-medizinischen Bereich. Das Papier 12: 601-607, 1985
50. Lukanoff B, Dautzenberg H: Natriumcellulosesulfat als Komponente für die Erzeugung von Mikrokapseln durch Polyelektrolytkomplexbildung. Das Papier 6: 287-298, 1994
51. Bischoff KH, Dautzenberg H, Philipp B, Wagenknecht W: Vergleichende Untersuchungen zur homogenen und heterogenen Sulfatierung der Cellulose. Faserforschung und Textiltechnik 27(3): 111-117, 1976
52. Lukanoff B, Philipp B, Schleicher H: Untersuchung zum thermischen Abbau von Cellulose unter homogenen Reaktionsbedingungen. Acta Polymerica 35: 339-344, 1984
53. Schleicher H, Loth F, Lukanoff B: Zum Einfluß der übermolekularen Struktur der Cellulose auf Reaktionsablauf und Produkteigenschaften. Acta Polymerica 40: 170-177, 1989
54. Wandrey C, Jaeger W, Reinisch G: Acta Polymerica 32: 197, 1981
55. Dautzenberg H, Schuldt U, Grasnick G, Karle P, Müller P, Löhr M, Pelegrin M, Piechaczyk M, Rombs K v, Güntzburg WH, Salmons B, Saller RM: Development of Cellulose Sulfate-based Polyelectrolyte Complex Microcapsules for Medical Applications. Ann NY Acad Sci 875: 46-63, 1999
56. Tiersch B, Hartmann J, Dautzenberg H, Loth F, Purz HJ, Philipp B: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Fällungen von Polyanion-Polykation Komplexen. Acta Polymerica 37: 47-52, 1986

57. Dautzenberg H, Lukanoff B, Eckert U, Tiersch B, Schuldt U: Immobilisation of Biological Matter by Polyelectrolyte Complex Formation. *Ber. Bunsenges. Phys Chem* 100: 1045-1053, 1996
58. Sittinger M, Lukanoff B, Burmester GR, Dautzenberg H: Encapsulation of Artificial Tissues in Polyelectrolyte Complexes: Preliminary Studies. *Biomaterials* 17: 1049-1051, 1996
59. Dautzenberg H, Arnold G, Tiersch B, Lukanoff B, Eckert U: Polyelectrolyte Complex Formation at the Interface of Solutions. *Progr Colloid Polym Sci* 101: 149-156, 1996
60. Dautzenberg H, Loth F, Fechner K, Mehlis B, Pommerening K: Preparation and Performance of Symplex Capsules. *Makromol Chem* 9: 211-217, 1985
61. Stange J: Biorektoren zur extrakorporalen Blutreinigung auf der Basis von mikro-verkapselten Leberzellen und Zellorganellen. Medizinische Dissertation, Universität Rostock, Rostock 1991
62. Inotech Biosystems International: Manual for the Encapsulator AP, 1998
63. L.U.M. GmbH: Handbuch LUMiTexture. L.U.M. GmbH, Berlin, 1999
64. Dautzenberg H, Schuldt U, Lerche D, Woehlecke H, Ehwald R: Size Exclusion Properties of Polyelectrolyte Complex Microcapsules Prepared from Sodium Cellulose Sulphate and Poly[diallyldimethylammonium chloride]. *J Membrane Sci* 162: 165-171, 1999
65. Woehlecke H, Ehwald R: Characterization of Size-Permeation Limits of Cell Walls and Porous Separation Materials by High-Performance Size-Exclusion Chromatography. *J Chromatogr* 708: 263-271, 1995
66. Lindl T: Zell- u. Gewebekultur, 4.Auflage, Spektrum Heidelberg, Berlin 2000
67. RocheDiagnostics: Produktinformationsbeilage Elecsys® 1010/2010, Elecsys® PTH-Immunoassay. Roche Diagnostics, 1999
68. Picarello L, Benvenuti S, Recenti R, Formigli L, Falchetti A, Morelli A, Masi L, Tonelli F, Cicchi P, Brandi ML: Microencapsulation of Human Parathyroid Cells: An In-Vitro Study. *J Surg Res* 96: 81-89, 2001
69. Winn SR, Tresco PA: Hydrogel Applications for Encapsulated Cellular Transplants. *Methods Neurosci* 21: 387-402, 1994
70. Iwata H, Takagi K, Kobayashi K, Oka T, Tsuji T, Ito F: Strategy for Developing Microbeads Applicable to Islet Xenotransplantation into a Spontaneous Diabetic NOD Mouse. *J Biomed Mat Res* 28: 1201-1207, 1994



71. Tun T, Inoue H, Hayashi T, Aung YJ, Gu R, Doi R, Kaji H, Echigo Y, Wang WJ, Setoyama H, Imamura M, Maetani S, Morikawa N, Iwata H, Ikada Y: A Newly Developed Three-Layer Agarose Microcapsule for Promising Biohybrid Artificial Pancreas: Rat to Mouse Xenotransplantation. *Cell Transpl* 5: S59-S63, 1996
72. Sefton MV, Dawson RM, Broughton RL: Microencapsulation of Mammalian Cells in a Water-Insoluble Polyacrylate by Coextrusion and Interfacial Precipitation. *Biotechnol Bioeng* 29: 1135-1143, 1987
73. Dawson RM, Broughton RL, Stevenson WTK, Sefton MV: Microencapsulation of CHO Cells in a Hydroxyethylmethacrylate-Methyl Methacrylate Copolymer. *Biomaterials* 8: 360-366, 1987
74. Karle P, Müller P, Renz R, Jesnowski R, Saller RM, vRombs K, Nizze H, Liebe S, Günzburg WH, Salmons B, Löhr M: Intratumoral Injection of Encapsulated Cells Producing an Oxazaphosphorine Activating Cytochrome P450 for Targeted Chemotherapy. *Adv Exp Med Bio* 451: 97-106, 1998
75. Uludag H, deVos P, Tresco P: Technology of Mammalian Cell Encapsulation. *Adv Drug Del Rev* 42: 29-64, 2000
76. Horbett TA, Cheng CM, Ratner BD, Hoffman AS, Hanson SR: The Kinetics of Baboon Fibrinogen Adsorption to Polymers: In Vitro and In Vivo Studies. *J Biomed Mater Res* 20: 739-772, 1986
77. Norman ME, Williams P, Illum L: In Vivo Evaluation of Protein Adsorption to Sterically Stabilised Colloidal Carriers. *J Biomed Mater Res* 27: 861-866, 1993
78. Veerman EC, Suppers RJ, Klein CP, deGroot K, Nieuw Amerongen AV: SDS-PAGE Analysis of the Protein Layers Adsorbing In Vivo and In Vitro to Bone Substituting Materials. *Biomaterials* 8: 442-448, 1987
79. Sawhney AS, Hubbel JA: Poly(ethylene oxide)-graft-poly(L-Lysine) Copolymers to Enhance the Biocompatibility of Poly(L-Lysine)-Alginate Microcapsule Membranes. *Biomaterials* 13: 863-870, 1992
80. Buck CA, Horwitz AF: Cell Surface Receptors for Extracellular Matrix Molecules. *Ann Rev Cell Biol* 3: 179-205, 1987
81. Siebers U, Horcher A, Bretzel RG, Federlin K, Zekorn T: Alginate-Based Microcapsules for Immunoprotected Islet Transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 31: 304-312, 1997

82. Kessler L, Jesser C, Lombard Y, Karsten V, Belcourt A, Pinget M, Poindron P: Cyto-toxicity of Peritoneal Murine Macrophages Against Encapsulated Pancreatic Rat Islets: In Vivo and In Vitro Studies. *J Leukocyte Biol* 60: 729-736, 1996
83. Iwata H, Kobayashi T, Takagi T, Oka T, Yang H, Amemiya H, Tsuji T, Ito F: Feasibility of Agarose Microbeads with Xenogenic Islets as a Bioartificial Pancreas. *J Biomed Mater Res* 28: 1003-1011, 1994
84. Rihová B: Immunocompatibility and Biocompatibility of Cell Delivery Systems. *Adv Drug Del Rev* 42: 65-80, 2000
85. Hobbs HA, Kendall WF, Darrabie M, Opara EC: Prevention of Morphological Changes in Alginate Microcapsules for Islet Xenotransplantation. *J Investig Med* 49: 572-575, 2001
86. Schneider S, Feilen PJ, Slotty V, Kampfner D, Preuss S, Berger S, Beyer J, Pommersheim R: Multilayer Capsules: A Promising Microencapsulation System for Transplantation of Pancreatic Islets. *Biomaterials* 22: 1961-1970, 2001
87. De Vos P, DeHaan B, Pater J, van Schilfgaarde R: Association between Capsule Diameter, Adequacy of Encapsulation, and Survival of Microencapsulated Rat Islet Allografts. *Transplantation* 62: 893-899, 1996
88. Klock G, Pfeffermann A, Ryser C, Grohn P, Kuttler B, Hahn HJ, Zimmermann U: Biocompatibility of a Mannuronic Acid-Rich Alginates. *Biomaterials*: 18: 707-713, 1997
89. Kulseng B, Skjak-Braek G, Ryan L, Andersson A, King A, Faxvaag A, Espevik T: Transplantation of Alginate Microcapsules: Generation of Antibodies Against Alginates and Encapsulated Porcine Islet-Like Cell Clusters. *Transplantation* 67: 978-984, 1999
90. Soon-Shiong P, Otterlie M, Skjak-Braek G, Smidsrod O, Heintz R, Lanza RP, Espevik T: An Immunologic Basis for the Fibrotic Reaction to Implanted Microcapsules. *Transpl Proc* 23: 758-759, 1991
91. De Vos, Wolters GH, Fritschy WM, van Schilfgaarde R: Obstacles in the Application of Microencapsulation in Islet Transplantation. *Int J Artif Organs* 16: 205-212, 1993
92. Van Schilfgaarde R, de Vos P: Factors Influencing the Properties and Performance of Microcapsules for Immunoprotection of Pancreatic Islets. *J Mol Med* 77: 199-205, 1999

93. Zekorn TD, Horcher A, Mellert J, Siebers U, Altug T, Emre A, Hahn HJ, Federlin K: Biocompatibility and immunology in the Encapsulation of Islets of Langerhans (Bioartificial Pancreas). *Int J Artif Organs* 19: 51-57, 1996
94. Rihova B: Immunocompatibility of Cell Delivery Systems. *Adv Drug Deliv Rev* 42: 65-80, 2000
95. Zhou D, Kintsourashvili E, Mamujee S, Vacek I, Sun AM: Bioartificial Pancreas: Alternative Supply of Insulin-Secreting Cells. *Ann N Y Acad Sci* 875: 208-218, 1999
96. Zekorn T, Horcher A, Siebers U, Federlin K, Bretzel RG: Islet Transplantation in Immunoseparating Membranes for Treatment of Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103: 136-139, 1995
97. Schneider S, Feilen PJ, Slotty V, Kampfner D, Preuss S, Berger S, Beyer J, Pommersheim R: Multilayer Capsules: A Promising Microencapsulation System for Transplantation of Pancreatic Islets. *Biomaterials* 22: 1961-1970, 2001
98. Kendall WF, Collins BH, Opara EC: Islet Cell Transplantation for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Expert Opin Biol Ther* 1: 109-119, 2001
99. Schilfgaarde R van, Vos P de: Factors Influencing the Properties and Performance of Microcapsules for Immunoprotection of Pancreatic Islets. *J Mol Med* 77: 199-205, 1999
100. Vos P de, Wolters GH, Fritschy WM, Schilfgaarde R van: Obstacles in the Application of Microencapsulation in Islet Transplantation. *Int J Artif Organs* 16: 205-212, 1993
101. Regulier E, Schneider BL, Deglon N, Beuzard Y, Aebischer P: Continuous Delivery of Human Mouse Erythropoietin in Mice by Genetically engineered Polymer Encapsulated Myoblasts. *Gene Ther* 5: 1014-1022, 1998
102. Haisch A, Groger A, Radke C, Ebmeyer J, Sudhoff H, Grasnack G, Jahnke V, Burmester GR, Sittinger M: Macroencapsulation of Human Cartilage Implants: Pilot Study with Polyelectrolyte Complex Membrane Encapsulation. *Biomaterials*. 21: 1561-1566, 2000
103. Tobias CA, Dhoot NO, Wheatley MA, Tessler A, Murray M, Fischer I: Grafting of Encapsulated BDNF-Producing Fibroblasts into the Injured Spinal Cord Without Immune Suppression in Adult Rats. *J Neurotrauma*. 18: 287-301, 2001
104. Shoichet MS, Winn SR: Cell Delivery to the Central Nervous System. *Adv Drug Deliv Rev* 42: 81-102, 2000

105. Emerich DF, Salzborg HC: Update on Immunoisolation Cell Therapy for CNS Diseases. *Cell Transplant* 10: 3-24, 2001
106. Date I, Shingo T, Yoshida H, Fujiwara K, Kobayashi K, Ohmoto T: Grafting of Encapsulated Dopamine-Secreting Cells in Parkinson's Disease: Long-Term Primate Study. *Cell Transplant* 9: 705-709, 2000
107. Xue Y, Gao J, Xi Z, Wang Z, Li X, Cui X, Luo Y, Li C, Wang L, Zhou D, Sun R, Sun AM: Microencapsulated Bovine Chromaffine Cell Xenografts into Hemiparkinsonian Rats: A Drug-Induced Rotational Behavior and Histological Changes Analyses. *Art Org* 25: 131-135, 2001
108. Li HR: Materials for Immunoisolated Cell Transplantation. *Adv Drug Del Rev* 33: 87-109, 1998
109. Brown EM, Brennan MF, Hurwitz S, Windeck R, Marx SJ, Spiegel M, Koehler J, Gardner G, Aurbach GD: Dispersed Cells Prepared from Human Parathyroid Glands: Distinct Calcium Sensitivity of Adenomas versus Primary Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 46: 267-276, 1978
110. Zhuhui C, Zhiqing S, O'Shea GM, Sun AM: Microencapsulated Hepatocytes for bioartificial liver supports. *Art Org* 8: 191, 1988
111. Chang TMS: Artificial Cells in Artificial Liver Support. *Printed Abstracts Artificial Liver Support*. 8, 1998
112. Zielinski BA, Aebischer B: Chitosan as a Matrix for Mammalian Cell Encapsulation. *Biomaterials* 15: 1049-1056, 1994
113. Babensee JE, DeBoni U, Sefton MV: Morphological Assessment of Hepatoma Cells (HepG2) Microencapsulated in a HEMA-MMA Copolymer with and without Matrigel. *J Biomed Mater Res* 26: 1401-1418, 1992

## 7 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ALG/PLL	Alginat/Polylysin
CMC	Carboxymethyle cellulose
EGTA	Ethylene glycole tetra-acetate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Degree of substitution – Substitutionsgrad
ECLIA	Elektrochemilumineszenzimmunoassay
FBS	Fötales bovines Serum
HEMA-MMA	Hydroxyethylmethacrylat-Methylmethacrylat
MHC	Major histocompatibility complexe
$M_w$	Molekulargewicht
NaCS	Natriumcellulosesulfat
PMT	Photomultiplier tube
PSSa	Polystyrene sulfone-acide
Poly-DADMAC	Polydiallyldimethylammoniumchlorid
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathyroid hormone related proteine
SEM	Standard error of the means
TPA	Tripropylamin

## **8 Danksagung**

Betreuung: Dr. Frank Ulrich, Priv. Doz. Dr. Jochen Klupp

Hilfe im Labor: Doris Bergfeldt-Malinowski, Anja Schirmeier, Susanne Wojtke

Durchsicht des Manuskriptes: Priv. Doz. Dr. Jochen Klupp, Dr. Frank Ulrich, Priv. Doz. Dr. Andreas Nüssler

Wissenschaftliche Zusammenarbeit: Dr. Gerd Grasnick (Polymer Consultant, Potsdam), Dr. Birgit Kamm (Biopos e.V., Potsdam)

EDV-Unterstützung: Dipl. geol. Alexander Thumm

Elektronenmikroskopie: Dr. Brigitte Thiersch (Universität Potsdam)

Fotografische Dokumentation: Tobias Schäfer

Sonstiges: Mark Wieschalla

Sowie Prof. Dr. Peter Neuhaus für die Überlassung des Themas

## **9 Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich, Markus Gärtner, dass die vorliegende Dissertation, "Mikroverkapselung von humanen Parathyreozyten mit Natriumcellulosesulfat und Poly-DADMAC in der Behandlung des postoperativen Hypoparathyreoidismus", von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde. Die vorliegende Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die Literatur ist vollständig angegeben.

Berlin im Februar 2004

Markus Gärtner