Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der
Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. A. Baethmann

Ein neues Tiermodell zur Analyse von Angiogenese und endokriner Funktion bei Transplantation von humanem Nebenschilddrüsengewebe auf die athyme Nacktmaus in vivo

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Verena von Johnston
aus
München
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. K. Stalla Prof. Dr. med. M. Gratzl
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. S. Strieth, Dr. med. vet. E. Thein
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 3. März 2005

Gewidmet ist diese Arbeit meinen Eltern,
insbesondere meinem Vater in memoriam

1 EINLEITUNG 1

1.1 Klinik der Nebenschilddrüsentransplantation 6

1.2 Historischer Überblick der Klinik des Hyperparathyreoidismus 8

1.3 Fragestellung/ Zielsetzung 10

2 MATERIAL UND METHODEN 12

2.1 Klinik der Nebenschilddrüsentransplantation 12

2.2 Versuchstiere 12

2.3 Modell 13

2.3.1 Gewinnung und Aufbereitung des Nebenschilddrüsengewebes 13

2.3.2 Präparation der Rückenhautkammer 14

2.3.2.1 Chirurgische Durchführung 16

2.3.3 Transplantation des Nebenschilddrüsengewebes 17

2.4 Experimentelles Protokoll 17

2.5 Versuchsgruppen 19

2.6 Untersuchungstechniken 19

2.6.1 Mikrohämodynamik 19

2.6.1.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie 19

2.6.2 Mikrohämodynamische Parameter und Fläche des Transplantates 22

2.6.2.1 Messung der Fläche des transplantierten Nebenschilddrüsengewebes 22

2.6.2.2 Messung der funktionellen Gefäßdichte 22

2.6.2.3 Messung der Gefäßdurchmesser 22

2.6.2.4 Messung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit 23

2.6.3 Endokrine Transplantatfunktion 23

2.6.3.1 Messung des iPTH 24

2.6.3.2 Messung der Kalziumkonzentration 25

2.6.4 Nachweis von VEGF 26

2.7 Histologische Untersuchungen 27

2.7.1 Histologie 27

2.7.2 Immunhistochemie 27

2.8 Statistik 28

3 ERGEBNISSE 29

3.1 Klinik der Nebenschilddrüsentransplantation 29

3.2 Angiogenese der Nebenschilddrüsen-Transplantate 29

3.2.1 Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie 31

3.2.2 Fläche des transplantierten Gewebes 34

3.2.3 Funktionelle Gefäßdichte 36

3.2.4 Gefäßdurchmesser 38

3.2.5 Erythrozytenfließgeschwindigkeit 38

3.3 Endokrine Transplantatfunktion 39

3.3.1 Bestimmung des iPTH 39

3.3.2 Bestimmung der Kalziumkonzentration 39

3.3.3 Korrelation zwischen Angiogenese (fvd) und Transplantatfunktion (iPTH) 40

3.4 Expression des angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF 41

3.5 Histologie 42

3.5.1 Konventionelle Histologie 42

3.5.2 Immunhistochemie 44

4 DISKUSSION 45

4.1 Diskussion der Klinik der Nebenschilddrüsentransplantation 45

4.2 Modell der Rückenhautkammer und der Intravitalmikroskopie 47

4.3 Diskussion der Ergebnisse 50

4.3.1 Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie 50

4.3.1.1 Angiogenese /Revaskularisierung 50

4.3.1.2 Auswertung der mikrohämodynamischen Parameter 54

4.3.2 Endokrine Funktion 55

4.3.3 VEGF-Expression 57

5 ZUSAMMENFASSUNG 59

6 LITERATURVERZEICHNIS 61

7 DANKSAGUNG 70

8 PUBLIKATIONEN 72

9 LEBENSLAUF 73

Abkürzungen

AT	Autotransplantation
AZ	Aktenzeichen
Ca	Carcinom (=Karzinom)
CAMAS	Computer assisted microcirculation analysis system
d	day (=Tag)
EK	Epithelkörperchen
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent Essay
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
fvd	functional vessel density (=funktionelle Gefäßdichte)
HPT	Hyperparathyreoidismus
ICF	Institut für Chirurgische Forschung
iPTH	intaktes PTH
IVM	Intravitalmikroskopie
K	Baker/Wayland Proportionalitätsfaktor
KBF	Kapillarer Blutfluss
KBZG	Kapillare Blutzellflussgeschwindigkeit
KD	Kapillarer Durchmesser
MEN	multiple endokrine Neoplasie
MW	Molekulargewicht
p HPT	primärer Hyperparathyreoidismus
PTH	Parathormon
PTHrP	PTH related Peptide
PTX	Transplantatgruppe (Gruppe von Tieren, bei denen frisches Nebenschilddrüsengewebe transplantiert wurde)
ROI	region of interest
s HPT	sekundärer Hyperparathyreoidismus
sec	Sekunden
T HPT	tertiärer Hyperparathyreoidismus
VEGF	Vascular endothelial growth factor

V_{RBC}	(=Erythrozytenfliessgeschwindigkeit)
vWF	von Willebrand Faktor

1 Einleitung

Der Hyperparathyreoidismus (HPT) zählt neben dem Diabetes mellitus zu den häufigsten endokrinen Erkrankungen. Die Prävalenz liegt bei ca. 80 pro 100.000 Einwohnern weltweit [Möslein, 2003].

Unter Hyperparathyreoidismus versteht man eine Überfunktion der Nebenschilddrüsen.

Die Nebenschilddrüsen sind paarig angelegte Organe, von denen jeweils zwei dem oberen Pol und zwei dem unteren Pol der Schilddrüse anliegen. Trotz ihrer gemeinsamen embryonalen Entwicklung haben sie außer ihrer ähnlichen topographischen Lage mit der Schilddrüse keine Gemeinsamkeiten. Da die Nebenschilddrüsen aus Epithelgewebe bestehen, werden sie in der Literatur auch häufig als Epithelkörperchen (EK) bezeichnet. Sie sind für die Produktion von Parathormon zuständig. Parathormon (PTH) ist ein aus 84 Aminosäuren bestehendes Peptid und für die Regelung des Kalziumhaushaltes verantwortlich.

Kalzium ist von großer Bedeutung für essentielle physiologische Vorgänge wie Integrität und Funktion der Zellmembran, Übertragung nervaler Impulse und neuromuskuläre Erregbarkeit [Fliser and Ritz, 1998].

PTH wirkt also der Hypokalzämie entgegen und die Hypokalzämie stimuliert direkt die Sekretion des PTH. Je weiter der Kalziumspiegel im Blut absinkt, um so mehr PTH wird ausgeschüttet, während die Hyperkalzämie graduell zur Unterdrückung der PTH-Sekretion führt [Ziegler, 1991].

Unterschieden wird zwischen einem primären (pHPT), einem sekundären (sHPT) und einem tertiären (tHPT) Hyperparathyreoidismus, wobei der primäre Hyperparathyreoidismus die häufigste Form darstellt. Beim pHPT kommt es zu einer übermäßigen, autonomen PTH-Produktion mit folgender Hyperkalzämie. Die häufigste Ursache sind gutartige Nebenschilddrüsentumore, sog. Adenome. Auch im Rahmen von malignen Tumoren der Nebenschilddrüsen, den Nebenschilddrüsen-Karzinomen, oder im Zusammenhang mit einem MEN (multiple endokrine Neoplasie) -Syndrom kann es zur vermehrten PTH-Produktion kommen. Bedingt durch die hohe Serumkonzentration von Parathormon wird vermehrt Kalzium aus dem Knochen ausgebaut, so dass neben der resultierenden Hyperkalzämie vor allem Knochenschäden und Organverkalkungen auftreten können. Die klinischen Symptome im Rahmen des Hyperkalzämiesyndroms reichen von Lumbo-Ischialgien, Ureterkoliken, abdominellen Beschwerden, neurologisch-psychiatrischen Auffälligkeiten (Schwäche, Hyporeflexie, depressive Verstimmung und Antriebsarmut), Störungen des Elektrolythaushaltes (renaler Kalzium- und Natriumchloridverlust) bis hin zu

Herzrhythmusstörungen [Delorme and Hoffner, 2003]. Früher wurden daher die Symptome des Krankheitsbildes im Klinikjargon recht treffend mit „Stein- Bein- Magenpein“ umschrieben [St.Goar, 1957]. Durch die heute frühzeitige Diagnosestellung und Therapie wandelte sich das klinische Bild. Der pHPT läßt sich heute nicht mehr mit wenigen Begriffen charakterisieren. Es besteht eine Vielfalt möglicher Beschwerden (s.o.).
Das klinische Vollbild der „Ostitis fibrosa generalisata von Recklinghausen“ im Rahmen einer Osteopathie mit braunen Tumoren und Frakturneigung ist heute eine Rarität.

Im Gegensatz dazu handelt es sich beim sHPT um eine reaktiv vermehrte PTH-Ausschüttung aufgrund von Kalziummangel, meist im Rahmen einer Niereninsuffizienz, in seltenen Fällen auch im Zusammenhang mit einem Maldigestionssyndrom.
Bei der terminalen Niereninsuffizienz kommt es durch die gestörte Nierenfunktion zur Phosphatretention, was über das Kalzium-/Phosphatprodukt zur Hypokalzämie führt. Diese Hypokalzämie und der durch die Niereninsuffizienz bedingte Phosphatüberschuss regt die Nebenschilddrüsen zur vermehrten PTH-Produktion an mit dem Ziel, eine Normokalzämie wiederherzustellen. Es entsteht eine reaktive Vierdrüsenhyperplasie.
Die klinische Symptomatik des sHPT ist sehr vielseitig. Sie reicht im Rahmen der renalen Osteopathie bis zu Knochendeformitäten und Spontanfrakturen. Bei der renalen Osteopathie entsteht ein Mischbild aus Demineralisation (durch den Hyperparathyreoidismus) und frustraner Osteoidbildung bei fehlender Möglichkeit zur Mineralisierung (Osteomalazie durch Mangel des wirksamen Vitamin-D-Metaboliten 1α,25 Dihydroxycolecalciferol). Laut Reichel und Ritz [Reichel and Ritz, 1991] haben nach zehnjähriger Dialysedauer etwa 30% der erwachsenen Patienten entsprechende klinische Veränderungen.
Kommt es beim sHPT zu einer permanenten Stimulation der Nebenschilddrüsen, schießt die PTH-Produktion über das Ziel der Normokalzämie hinaus.
Von einem tHPT spricht man, wenn infolge eines sHPT eine funktionelle Autonomisierung der hyperplastischen Nebenschilddrüsen eingetreten ist, d.h. die Nebenschilddrüsen produzieren wie beim pHPT vermehrt PTH, was zu einer Hyperkalzämie mit den oben erwähnten Symptomen führen kann [Delorme and Hoffner, 2003]. Klinisch gleicht der tHPT somit dem pHPT.
Bei der operativen Therapie eines HPT gibt es einige grundsätzliche Dinge zu beachten:
PTH kann nach totaler Parathyreoidektomie nicht einfach substituiert werden, wie es beispielsweise nach totaler Thyreoidektomie erfolgreich und problemlos mittels oraler Hormonsubstitution von T3/T4 (Trijodthyronin/Thyroxin) durchgeführt wird, da PTH ein aus

84 AS bestehendes Peptid ist, und daher zu groß ist, um vollständig im Darm resorbiert zu werden. Es wird daher von Peptidasen gespalten und bereits im Darm funktionsunfähig gemacht. Eine orale Substitution kommt daher nicht in Frage. Um das Hormon parenteral zu verabreichen ist die Halbwertzeit zu kurz. Sie liegt bei nur zwei Minuten, so dass das Hormon permanent verabreicht werden müsste.

Bis zum heutigen Tage ist daher die operative Entfernung des hyperplastischen Nebenschilddrüsengewebes (Parathyreoidektomie) mit anschließender Autotransplantation in den Musculus brachioradialis des Unterarms die erfolgreichste klinische Therapiemöglichkeit bei Patienten mit sHPT. Sie wurde erstmals 1926 von Frank Lahey durchgeführt [Lahey, 1926].

Thema der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Angiogenese bei der Transplantation von Nebenschilddrüsengewebe in einem in *vivo*- Tiermodell. Diese Untersuchung bietet einen interessanten Ansatz, da die Angiogenese vermutlich eine grosse Bedeutung im Rahmen der Transplantatfunktion einnimmt.

Trotz des technisch leicht möglichen Ersatzes von Nebenschilddrüsengewebe durch einen Fremdspender (Allotransplantation) ist diese Vorgehensweise nicht empfehlenswert, da eine damit verbundene Immunsuppression zu belastend und nebenwirkungsreich für den Patienten wäre. Eine derartige Therapie wäre z.B. nur im Zusammenhang mit einer Nierentransplantation denkbar, wenn der Patient ohnehin eine immunsuppressive Therapie erhalten muss. Versuche einer Mikroenkapsulierung von PTH mit Alginaten wurden durchgeführt, um eine Allotransplantation ohne Immunsuppression zu ermöglichen: Fu und Sun publizierten 1989 die Ergebnisse erster erfolgreicher Allotransplantationen ohne Immunsuppression im Tierversuch nach Implantation von Nebenschilddrüsenzellen, die in dem Naturstoff „Alginat“ zur Immunisolation eingeschlossen wurden [Fu and Sun, 1989]. Derzeit gibt es jedoch noch keine zufriedenstellenden Ansätze zur Etablierung in der Klinik.

Der Ersatz des Parathormons durch eine Vitamin D-/ Kalziumsubstitution ist daher eher praktikabel. Die Ergebnisse sind jedoch meist unbefriedigend, da diese Therapie eine Kalziumhomöostase nur unzureichend langfristig aufrechterhalten kann.

Die Nebenschilddrüsen-Autotransplantation (AT) in den M. sternocleidomastoideus im Rahmen der Strumachirurgie zur Vermeidung eines postoperativen Hypoparathyreoidismus ist nach wie vor der Standard und weitgehend komplikationslos.

Beim primären, sekundären und tertiären Hyperparathyreoidismus wird die Nebenschilddrüsentransplantation im Prinzip in gleicher Weise durchgeführt. Hier ergeben sich aber zum Teil erhebliche Probleme:

Es wird pathologisch verändertes Gewebe verpflanzt. Die unterschiedlich diffus oder nodulär veränderten Gewebeanteile können leicht erneut zum Transplantathyperparathyreoidismus führen.

Neben der normalen Gewebeverpflanzung beim HPT oder im Rahmen von Strumaresektionen – um einem postoperativen Hypoparathyreoidismus vorzubeugen – gibt es auch noch eine unbeabsichtigte Zellverschleppung von Nebenschilddrüsengewebe bei der Operation. Hierbei handelt es sich um die sogenannte ”Parathyreomatose”. Das verschleppte Gewebe wächst in Fett-Binde-, oder Muskelgewebe wieder an und vergrößert sich. Die Folge ist ein Rezidiv des HPT [Rothmund et al., 1999].

Ein weiteres, nicht unerhebliches Problem in der operativen Therapie des Hyperparathyreoidismus stellt der postoperative Hypoparathyreoidismus nach autologer Nebenschilddrüsen-Transplantation dar.

Bei Patienten, bei denen das zur Therapie des sHPT autolog transplantierte Gewebe nicht in der Lage war PTH zu sezernieren, um einen physiologischen PTH-Spiegel zu gewährleisten, muß erneut körpereigenes Gewebe, welches zuvor kryokonserviert wurde, transplantiert werden.

Das Prinzip der Kryokonservierung ermöglicht den Patienten somit eine wiederholte autologe Transplantation, falls das Transplantat im Rahmen der Therapie des sHPT nicht funktionstüchtig ist.

Patienten, die mehrfach transplantiert werden müssen, sind jedoch einer grossen Belastung ausgesetzt, da sie jedes Mal die allgemeinen Operationsrisiken wie bsp. Gefäß- oder Nervenverletzungen, postoperative Entzündungen etc. tragen müssen. Die Ursache für das Transplantatversagen ist meist weitgehend unklar. Es besteht somit nach wie vor Bedarf, die Ursachen eines postoperativen Hypoparathyreoidismus herauszufinden und zu beseitigen. Eine mögliche Erklärung für ein Transplantatversagen wäre eine unzureichende Revaskularisierung bzw. Angiogenese.

Da bei der freien Autotransplantation das Gewebe ohne Anschluß an das Gefäßsystem verpflanzt wird, ist das Gewebe unmittelbar nach Transplantation auf die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen angewiesen. Langfristig müssen jedoch Gefäße einwachsen, um das Gewebe ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen zu können.

Die Angiogenese nimmt somit eine zentrale Stellung bei der autologen Nebenschilddrüsentransplantation ein.

Unter Angiogenese versteht man allgemein die Bildung neuer Gefäße aus dem bereits bestehenden Gefäßsystem. Zunächst beginnt eine Endothelproliferation der bestehenden

Gefäße, es bilden sich Lumina. Man sieht die typischen Zeichen der Angiogenese wie neue Gefäßsprosse, sog. sprouts, Kalibersprünge (bezogen auf den Durchmesser des Gefäßes) und Gefäßwindungen, sog.coilings.

Angiogenese kommt physiologisch bei der Wundheilung vor und pathologisch bei Tumoren, der diabetischen Retinopathie, der rheumatoiden Arthritis, und bei Entzündungsreaktionen .

Der Stimulus, der zur Angiogenese führt, ist noch weitgehend unklar.

Wachstumsfaktoren scheinen jedoch als Aktivatoren eine Rolle zu spielen.

Hanahan und Folkman [Hanahan and Folkman, 1996] beschrieben in diesem Zusammenhang den sog. „Angiogenic switch“ (s. Abb. 1).

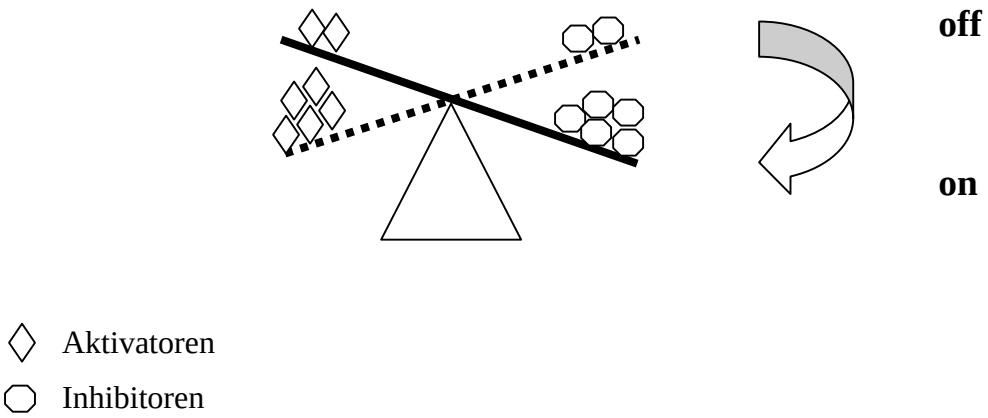


Abb. 1: „Angiogenic switch“ – Modell nach Hanahan & Folkman

Je nach Einfluß von Aktivatoren oder Inhibitoren wird die Angiogenese stimuliert bzw. gehemmt.

Bislang gibt es nur wenig Daten zur Angiogenese bzw. Revaskularisierung und zur mikrovaskulären Perfusion von transplantiertem Nebenschilddrüsengewebe.

Klinisch könnte jedoch die genaue Untersuchung der Angiogenese nach Transplantation von Nebenschilddrüsengewebe für Patienten, bei denen es immer wieder zu Transplantatdysfunktionen kommt, von enormer Bedeutung sein.

1.1 Klinik der Nebenschilddrüsentransplantation

Um ein besseres Verständnis der klinischen Relevanz der vorliegenden Arbeit zu erreichen, wurde zusätzlich eine Erhebung klinischer Daten durchgeführt.
Die vorliegende retrospektive Studie umfasst 2675 Patienten, die im Krankenhaus Martha-Maria in München-Solln in der Zeit vom 1. Januar 1982 bis zum 31. Dezember 1999
unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. med. F. Spelsberg wegen eines Hyperparathyreoidismus operiert worden sind.

Obwohl das Krankenhaus Martha-Maria auf endokrine Operationen spezialisiert ist, kam es dennoch bei einigen Patienten postoperativ zu Komplikationen bezüglich des transplantierten Gewebes.
Grundsätzlich kann es zu folgenden Transplantat-Dysfunktionen kommen:

- Transplantat-HPT

Wiederauftreten der typischen Krankheitszeichen und Laborparameter nach Entfernung aller Nebenschilddrüsen (totale Parathyroidektomie) und Autotransplantation (AT), nach vorübergehender Normalisierung.

- Persistierender Transplantat-HPT

Fortbestehen und Wiederauftreten der typischen Krankheitszeichen sowie der pathologischen Laborparameter innerhalb eines halben Jahres.

- Rezidiv eines Transplantat-HPT

Wiederauftreten der typischen Krankheitszeichen und Laborparameter nach vorausgegangener Entfernung der Nebenschilddrüsen und AT nach einem halben Jahr oder Jahre später.

- Pseudotransplantat-HPT

Wiederauftreten der typischen Krankheitszeichen und Laborparameter nach vermeintlicher totaler Parathyreoidektomie und AT, wobei jedoch nicht das Autotransplantat, sondern verbliebenes Gewebe (überzählige Epithelkörperchen / verbliebenes EK-Restgewebe) im Hals oder Mediastinum Krankheitsursache ist.

- Biloculärer HPT nach Autotransplantation

Wiederauftreten der typischen Krankheitszeichen und Laborparameter nach Parathyreoidektomie und AT, wobei sowohl das Autotransplantat als auch verbliebenes Gewebe im Hals oder Mediastinum Krankheitsursache ist.

• Hypoparathyreoidismus nach Parathyreoidektomie und AT

Postoperativ bis zu 6 Monaten verminderte Funktion der transplantierten Nebenschilddrüsen.

Die Einteilung des Transplantat-HPT (Punkte 1-5) entspricht der klinischen

Einteilung des Krankenhaus Martha-Maria in München-Solln. In dieser Arbeit wird jedoch nur unter zwei Dysfunktionen unterschieden:

Postoperativer Hyperparathyreoidismus

Postoperativer Hypoparathyreoidismus

Bei den Patienten, die an einem rezidivierenden bzw. persistierenden HPT postoperativ litten, mußte der Tumor wieder entfernt werden, und erneut eigenes, zuvor kryokonserviertes Gewebe transplantiert werden.

Bei den Patienten mit rezidivierendem bzw. persistierendem Hypoparathyreoidismus postoperativ mußte ebenfalls eigenes, kryokonserviertes Gewebe transplantiert werden.

Der persistierende postoperative Hypoparathyreoidismus ist als gravierende Komplikation anzusehen. Die typische klinische Symptomatik ist durch gesteigerte neuromuskuläre Erregbarkeit gekennzeichnet. Sie äußert sich vor allem in Karpopedalspasmen (Tetanie), Konvulsionen und Parästhesien [Ziegler, 1987].

Bei etwa einem Viertel aller Patienten kommt es nicht zu diesen Beschwerden, hier besteht die Gefahr einer Verkennung der Erkrankung [Ziegler, 1987]. Organische Spätfolgen eines solchen unbehandelten Hypoparathyreoidismus sind Kardiomyopathie [Weise et al., 1989], Katarakt, Basalganglienverkalkung, Haarausfall, schuppige Haut, im Kindesalter zusätzlich Zahnanomalien, Skelettdeformierungen mit Minderwuchs und geistige Retardierung [Wagner, 1991].

1.2 Historischer Überblick der Klinik des Hyperparathyreoidismus

1862 Erste Beschreibung der Nebenschilddrüse nach Autopsie eines indischen Rhinozeros durch Sir Richard Owen (s. Abb. 2) [Owen, 1862]

1862 Vermutlich erste makroskopische Erkennung der Nebenschilddrüsen beim Menschen durch Virchow und Remak [Virchow, 1863]

1879/80 Erste systematische makroskopische und mikroskopische Beschreibung der Nebenschilddrüsen durch Ivar Sandström [Sandström, 1879]

1879 Erstmaliger Bericht über tetanische Krämpfe nach totaler Parathyreoidektomie von Wölfler [Wölfler, 1879]

1890 Eugene Gley u.a. beginnen in Paris über die Funktion der Nebenschilddrüsen nachzudenken. Gley entdeckt Sandströms Manuskript wieder und macht es bekannt [Gley, 1891]

1900 Loeb berichtet, dass Kalzium Muskelkrämpfe verhindern kann [Loeb, 1900]

1903 Der Tübinger Pathologe Max Askanazy stellt einen ersten Zusammenhang zwischen einem Nebenschilddrüsentumor und der „Ostitis fibrosa cystica“ her [Askanazy, 1903]

1909 Untersuchung biochemischer und pathophysiologischer Zusammenhänge des Hyperparathyreoidismus durch Mac Callum und Voegtlin [Mac Callum and Voegtlin, 1909]

1915 Schlagenhaufer erkennt, dass EK-Adenome eine „Ostitis deformans“ bedingen, und nicht umgekehrt. Er bezeichnet die EK-Erkrankung als primären HPT [Schlagenhaufer, 1915]

1925 Erste Entfernung eines Nebenschilddrüsen-Tumors durch Parathyreoidektomie - ausgeführt von Felix Mandl; (Publikation erst 1933) [Mandl, 1933]

1926 Erste Parathyreoidea-Autotransplantation beim Menschen durch Frank Lahey [Lahey, 1926]

1935 Pappenheimer und Wilens beschreiben erstmalig den sekundären Hyperparathyreoidismus [Pappenheimer and Wilens, 1935]

1950 Blumenthal und Walsh gelingt erstmalig die Kältekonservierung von Nebenschilddrüsengewebe [Blumenthal and Walsh, 1950]

1959 Aurbach, Rasmussen und Craig stellen hochgereinigtes bovines Parathormon her [Aurbach, 1959; Chase and Aurbach, 1968]

1960 Stanbury u.a. führen die erste subtotale Parathyreoidektomie bei sHPT durch [Stanbury et al., 1960]

1963 Berson und Yalow entwickeln einen Radioimmunoassay zum Nachweis von

Parathormon [Berson and Yalow, 1963]

1968 Berson und Yalow weisen die Heterogenität des PTH im peripheren Blut nach [Berson and Yalow, 1968]

1968 Chase und Aurbach erkennen die Wirkung des Parathormons an Niere und Knochen mittels cAMP [Chase and Aurbach, 1968]

1973 Wells u.a. berichten über autolog transplantiertes EK-Gewebe, das Parathormon produziert [Wells et al., 1975]

1974 Wells u.a. veröffentlichen, dass EK-Allotransplantate unter immunsuppressiver Therapie wachsen und funktionieren [Wells et al., 1975]

1975 Erste Parathyreoidea-Autotransplantation beim Menschen mit kryokonserviertem Gewebe durch Wells u.a; (Veröffentlichung zwei Jahre später) [Wells et al., 1977]

1978 Aufklärung der vollständigen AS-Sequenz des PTH durch Keutmann u.a. [Keutmann et al., 1978]

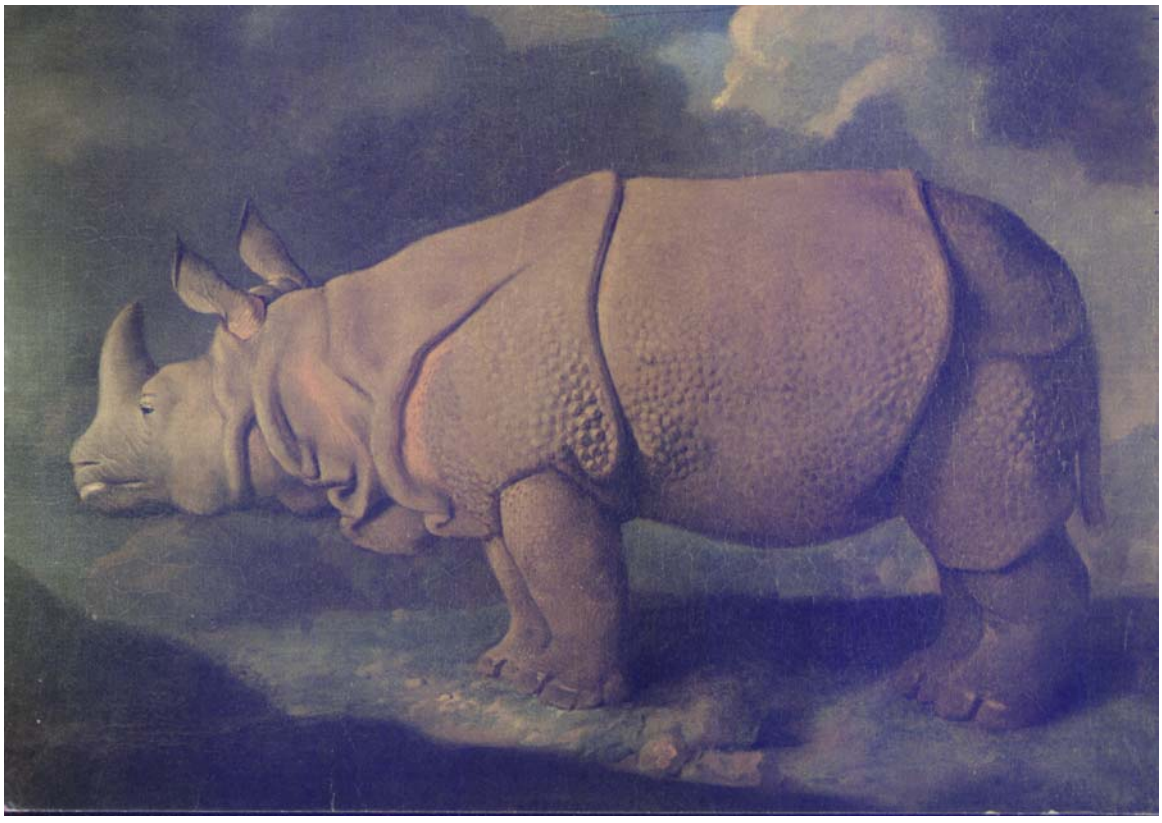


Abb. 2: Rhinoceros unicornis. Sir R. Owen entdeckte an diesem Rhinozeros erstmalig die Nebenschilddrüsen im Jahre 1850 (Veröffentlichung 1862)

1.3 Fragestellung/ Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein Modell neu zu entwickeln und etablieren, welches erlaubt, die Angiogenese bei der Transplantation von frischem Nebenschilddrüsengewebe *in vivo* über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Es wurde Gewebe von Patienten mit sHPT transplantiert, da diese Patienten in der Klinik am ehesten eine Problemgruppe darstellen.
Zu diesem Zweck transplantierten wir frisches, menschliches Nebenschilddrüsengewebe von Patienten mit sHPT in die zuvor präparierte Rückenhautkammer von Nacktmäusen.
Innerhalb dieses Modells sollte die simultane Analyse der Angiogenese mit Hilfe der Intravitalmikroskopie und der Funktion des transplantierten Gewebes mit Hilfe der humanen PTH-Bestimmung über einen längeren Zeitraum ermöglicht werden.
Neben einer histomorphologischen Charakterisierung des Modells wurde die Expression des Wachstumsfaktors VEGF, eines wesentlichen Angiogenese induzierenden Faktors untersucht.
Des Weiteren sollte der Zusammenhang zwischen Angiogenese-Parametern und der Transplantat-Funktion untersucht werden.

Folgende Fragen sind daher Inhalt der vorliegenden Studie:
1) Wie sieht eine klinisch-statistische Erhebung der postoperativen Komplikationsrate am Beispiel des Krankenhaus Martha-Maria aus?
2) Ist es möglich, mit der Technik der Intravitalmikroskopie am Modell transparenter Rückenhautkammern transplantiertes Nebenschilddrüsengewebe zu beobachten?
3) Qualitative Analyse der Mikrozirkulation:
a) Wann gibt es die ersten Anzeichen angiogenetischer Gefäße?
b) Wie verhalten sich die Transplantate über die Zeit hinweg bezüglich Transplantatfläche und neu einwachsender Gefäße?
4) Quantitative Analyse der Mikrozirkulation:
a) Wie verändert sich die funktionelle Gefäßdichte der angiogenetischen Gefäße im Transplantat?
b) Wie verhalten sich die Gefäßdurchmesser der angiogenetischen Gefäße im Transplantat?
c) Wie verhält sich die Erythrozytenfließgeschwindigkeit der angiogenetischen Gefäße im Transplantat?
d) Wie verhält sich die endokrine Funktion der Transplantate?
5) Gibt es eine Korrelation zwischen der endokrinen Funktion und der angiogenetischen Aktivität des transplantierten Gewebes?
6) Kommt VEGF als wesentlicher Induktor der Angiogenese in Frage?

7) Stimmen die histomorphologischen Ergebnisse mit den intravitalmikroskopischen Befunden überein?

2 Material und Methoden

Die Versuche waren von der Regierung Oberbayern unter dem Aktenzeichen
AZ: 209.1/211-2531-105/02 im Einverständnis mit dem Institut für Chirurgische Forschung genehmigt.

2.1 Klinik der Nebenschilddrüsentransplantation

Für die Erhebung der klinischen Daten des Hyperparathyreoidismus am Beispiel des Krankenhaus Martha-Maria wurden sämtliche Patienten, die in den Jahren 1982-1999 im Krankenhaus Martha-Maria an einem HPT operiert worden sind, aus dem Patientenarchiv in die Statistik aufgenommen. Anhand dieser Daten wurden anschließend die postoperativen Komplikationsraten am Beispiel des Krankenhauses Martha-Maria ermittelt und mit Komplikationsraten anderer Literaturangaben verglichen.

2.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden ausschließlich CD-1 nu BR Nacktmäuse mit einem Körpergewicht von 25-35g verwendet. Diese Mäuse waren athym und damit immuninkompetent, so dass keine Abstoßungsreaktion des humanen transplantierten Gewebes auftreten konnte.
Die Transplantation des Fremdmaterials war so ohne Immunsuppression möglich.
Die athymen Nacktmäuse wurden über Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen, und ab einem Alter von mindestens 6 Wochen und 25g Körpergewicht zur Implantation der Rückenhautkammer zugelassen.
Nach Präparation der Rückenhautkammer wurden die Tiere in einzelnen Käfigen bei 24°C und 50% Luftfeuchtigkeit gehalten, und hatten freien Zugang zu Leitungswasser und Nahrung. Alle Tiere erhielten standardisiertes Trockenfutter (Ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).
Zwei Tage nach Implantation der Rückenhautkammer wurde das Nebenschilddrüsengewebe transplantiert. Im Anschluss daran wurden die Tiere im Inkubator 7510 (Draeger-Werk, Lübeck, Deutschland) bei 36°C und 60% Luftfeuchtigkeit gehalten, da das Nebenschilddrüsengewebe zum Anwachsen annähernd Körpertemperatur benötigte. Durch die Haltung im Inkubator wurde somit in der Kammerpräparation nahezu ein Körpertemperatur ähnliches Milieu gewährleistet. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung.

2.3 Modell

2.3.1 Gewinnung und Aufbereitung des Nebenschilddrüsengewebes

Für die Transplantation wurde ausschließlich frisch explantiertes Nebenschilddrüsengewebe von Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus (Krankenhaus Martha-Maria, München-Solln) verwendet.

Das Gewebe wurde mit Einverständnis der Patienten direkt aus dem Operationssaal in VLE (very low endotoxine)-RPMI 1640 Medium (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) in das Labor des Instituts für Chirurgische Forschung (ICF) gebracht (s. Abb. 3).

Der größte Teil des Gewebes wurde zur routinemäßigen Aufbewahrung in Stickstoff (Cryotechnik Messer, Düsseldorf, Deutschland) kryokonserviert, so dass den Patienten im Falle einer Transplantat-Dysfunktion erneut autologes Gewebe transplantiert werden konnte.

Das sofortige Einfrieren erfolgte in zwei Schritten:

Das Röhrchen mit dem Gewebe und dem Einfriermedium (80% RPMI-Medium, 10% Kälberserum, 10% Dimethylsulfoxid) wurde 15 Minuten im Styroporträger in die Gasphase des Stickstofftanks (-120°C bis -150°C) gegeben, und anschließend in speziellen Gefrierkammern in der flüssigen Stickstoffphase (-196°C) gelagert. Bei Bedarf ist es so jederzeit möglich, das eingefrorene Gewebe wieder aufzutauen und erneut zu transplantieren.

Ein kleiner Teil des Gewebes wurde unter sterilen Bedingungen unter einem „laminar air flow“ (CEAG Envirco, Dortmund, Deutschland) in 4mm³ große Stückchen geschnitten (s. Abb. 4) und dann in die zwei Tage zuvor präparierte Rückenhautkammer bei den oben genannten Nacktmäusen transplantiert.

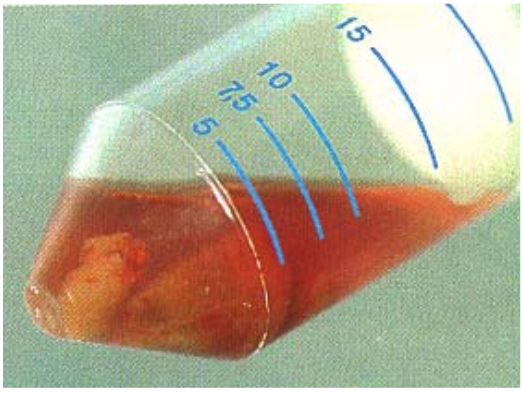


Abb. 3: Nebenschilddrüsengewebe im Nährmedium RPMI

Abb. 4: Zerschneiden des Gewebes in der Petrischale unter dem laminar air flow

Für eine weitere Versuchsgruppe, die als Kontrolle diente, wurde das Gewebe vor Transplantation in die Kammer für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 56°C hitzebehandelt. Das Protein sollte so denaturiert und biologisch inaktiviert werden. Das Gewebe stammte ebenfalls von Patienten mit sHPT, und wurde, wie bei der ersten Gruppe vor Transplantation in 4mm³ große Stückchen geschnitten. Es wurde darauf geachtet, dass nur das umkapselte Epithelgewebe der Nebenschilddrüsen, und kein anderes Gewebe, wie beispielsweise Fett- oder Bindegewebe transplantiert wurde.

2.3.2 Präparation der Rückenhautkammer

Als Modell bei diesen Versuchen wurde die transparente Rückenhautkammer der Maus (s. Abb. 5/6) gewählt, da so eine kontinuierliche Beobachtung des transplantierten Gewebes über einen längeren Zeitraum möglich war.

Die Rückenhautkammer besteht aus zwei symmetrischen Titanrahmen (s. Abb. 5), die chirurgisch in der dorsalen Haut der Maus fixiert wurden (s. 2.3.2.1.) [Lehr et al., 1993a], [Lehr et al., 1993b]. Die Titanrahmen waren in ihrer Größe genau der Körpergröße einer Maus angepasst. Auf einer dieser symmetrischen Kammerhälften befindet sich zentral ein Beobachtungsfenster.

Das Gewebe der Rückenhaut dieser Tiere besteht aus quergestreifter Skelettmuskulatur, Subkutangewebe und Haut. An der Stelle des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer wurde ein Stück Rückenhaut entfernt, so dass man durch das Fenster auf die gegenüberliegende quergestreifte Skelettmuskulatur schauen konnte. Die Skelettmuskulatur bot eine optimale Grundlage für die Implantation von Nebenschilddrüsengewebe. Mit Hilfe dieses Modells war es möglich mehrmalige intravitalmikroskopische (IVM) Beobachtungen des transplantierten Gewebes am wachen Versuchstier durchzuführen.

Sämtliche vaskulären Abschnitte der Rückenhautmuskulatur und später des transplantierten Gewebes konnten so mit Hilfe der Fluoreszenz-Epi-Illuminations-Mikroskopie dargestellt und im zeitlichen Verlauf beobachtet werden.

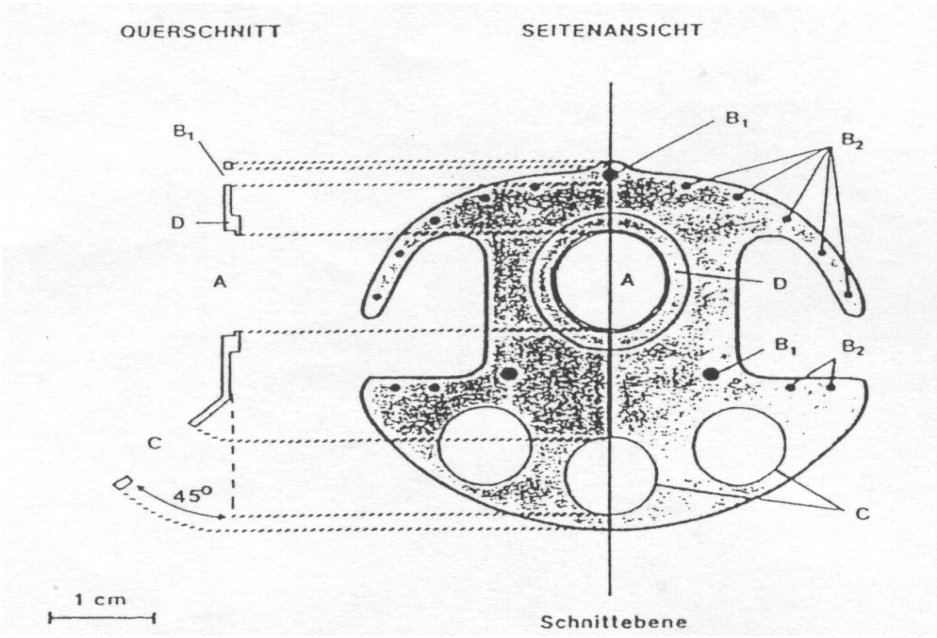


Abb. 5 nach A. Götz [Götz, 1987]: Skizze einer Rückenhautkammerhälfte; Das Modell setzt *sich aus durch Schrauben verbundene spiegelbildlich konstruierte Titanrahmen zusammen. A=Beobachtungsfenster;B1=Bohrung für Verbindungsschraube;B2=Bohrung für Fixationsfäden;C=Materialaussparungen zur Reduktion des Kammergewichtes; D=Kammerring zur Fixation des Deckglases*

Abb. 6: Athyme Nacktmaus mit Rückenhautkammer

2.3.2.1 Chirurgische Durchführung

Die Tiere wurden vor der chirurgischen Implantation der Rückenhautkammer mit Ketamin (75mg/kg i.m., Ketavet, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (25 mg/kg i.m., Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Anschließend lagen die Tiere während der gesamten operativen Kammerimplantation auf einer Wärmeplatte, um nicht auszukühlen.

Die Haut wurde vor der Operation mit 70%-igem Alkohol gereinigt.

Die dorsale Rückenhaut wurde angehoben, und die sich aus zwei symmetrischen Titanrahmen zusammensetzende Rückenhautkammer (Gewicht: 4,5g, Abb. 5) wurde unter Gegenlichtkontrolle kaudal der entlang der Schulterbasis verlaufenden Versorgungsgefäße implantiert [Götz, 1987].

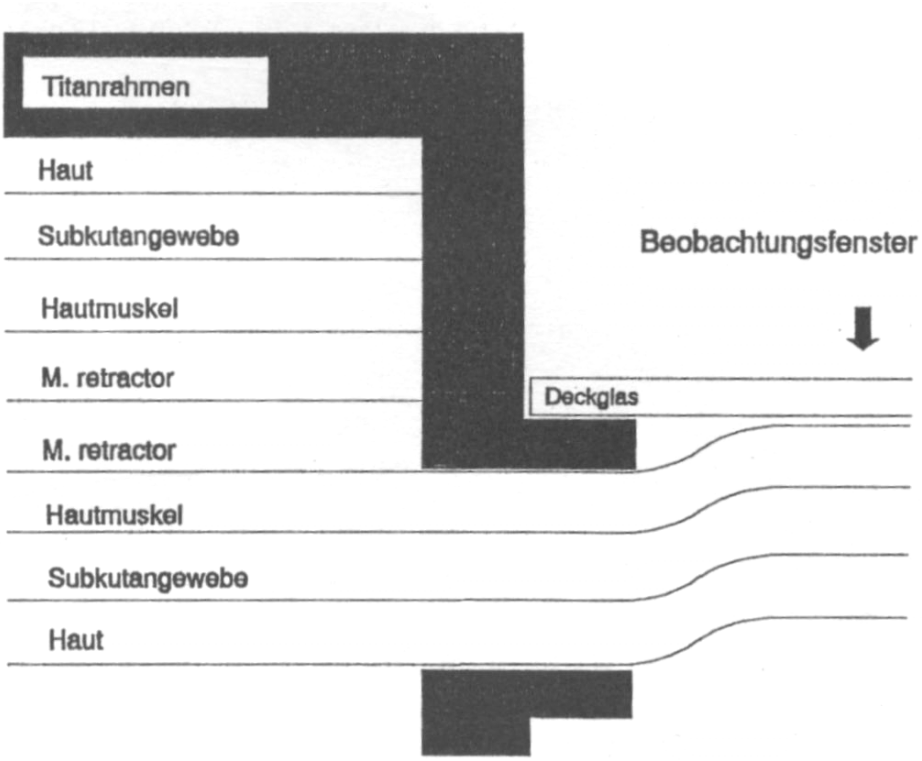


Abb. 7 nach A. Götz [Götz, 1987]: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch die Rückenhaut (links) und Rückenhautkammerpräparation mit den einzelnen Gewebeschichten

Im kreisrunden Bereich des Beobachtungsfensters der Kammer wurde in einem Durchmesser von 15 mm die dem Fenster zugewandte Cutis, Subcutis mit Hautmuskel, sowie die beiden Schichten des Musculus retractor entfernt, und die verbleibenden Gewebeschichten mit einem

wiederentfernbaren Deckglas geschützt. Das Glas wurde mittels eines Sprengringes im Titanrahmen fixiert, so dass die gegenüberliegende Hautmuskulatur und Subcutis der intravitalmikroskopischen Beobachtung zugängig war (s. Abb. 6). Auf diese Weise war es jederzeit möglich, durch Abnehmen des Deckglases freien Zugang zur Präparation zu erhalten. Die Kammer wurde anschließend mit ihren Bohrungen mit 5.0 Seidenfäden (Ethibond 5-0; Ethicon GmbH, Norderstedt, FRG) an der Hautfalte fixiert.
Bei der Präparation wurden Mikrohämorrhagien durch Traumatisierung sorgfältig vermieden.
Die Tiere tolerierten die Kammer gut und zeigten keine Zeichen von Unbehagen. Auch ihre Schlaf- und Fressgewohnheiten waren unbeeinträchtigt.

2.3.3 Transplantation des Nebenschilddrüsengewebes

Zwei Tage nach der Kammerimplantation wurde das Nebenschilddrüsengewebe nach sterilem Öffnen des Deckglases unter mikroskopischer Kontrolle (Wild Heerbrugg, Schweiz) auf den quergestreiften Rückenhautmuskel der Kammer gebettet. Das Deckglas wurde anschließend wieder verschlossen, um so das Gewebe zu schützen.
Durch das Deckglas hindurch war nun eine wiederholte Beobachtung des transplantierten Gewebes möglich.
Pro Kammerpräparation wurde jeweils ein 4mm³ großes Stück transplantiert, was sich als optimal für die Versuche herausstellte.
Für die Transplantation des Gewebes, ebenso für die weiteren mikrozirkulatorischen Beobachtungen wurden die Tiere in Plexiglasröhren (Effenberger, München, Deutschland) immobilisiert. Für diesen Vorgang benötigten die Tiere keine Narkose.
Ein zweitägiger Abstand zwischen Kammerpräparation und Gewebetransplantation wurde streng eingehalten, um den Einfluss von chirurgischem Trauma und Narkose auf die Mikrozirkulation auszuschließen.
Tiere, die zum Zeitpunkt der Gewebetransplantation Ödeme oder entzündliche Reaktionen innerhalb der Kammer aufwiesen, wurden aus dem Versuch ausgeschlossen.
Bei der Transplantation des Gewebes konnte man davon ausgehen, daß nur Nebenschilddrüsengewebe und kein Fett-/ Bindegewebe in die Kammer eingebracht wurde, da das Epithelgewebe der Nebenschilddrüsen von einer Organkapsel umgeben ist.

2.4 Experimentelles Protokoll

Nach Implantation des Gewebes und sterilem Verschließen des Deckglases folgte ein

Beobachtungszeitraum von insgesamt 19 Tagen. In dieser Zeit waren die Tiere im Inkubator bei 36°C und 60% Luftfeuchtigkeit untergebracht, da für ein Anwachsen des Gewebes eine erhöhte Umgebungstemperatur unabdingbar war. Die Tiere hatten auch in dieser Zeit unbegrenzt Zugang zu Nahrung und Wasser, und zeigten kein verändertes Fress-/ Sozialverhalten auf. An jedem dieser 19 Tage wurde die Kammer und das transplantierte Gewebe makroskopisch kontrolliert, so dass Tiere mit entzündetem Gewebe rechtzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen werden konnten. Zusätzlich wurden die Tiere bei ihrem Verhalten beobachtet, um Auffälligkeiten frühzeitig zu erkennen.
Die Versuche erfolgten nach folgendem Zeitschema:

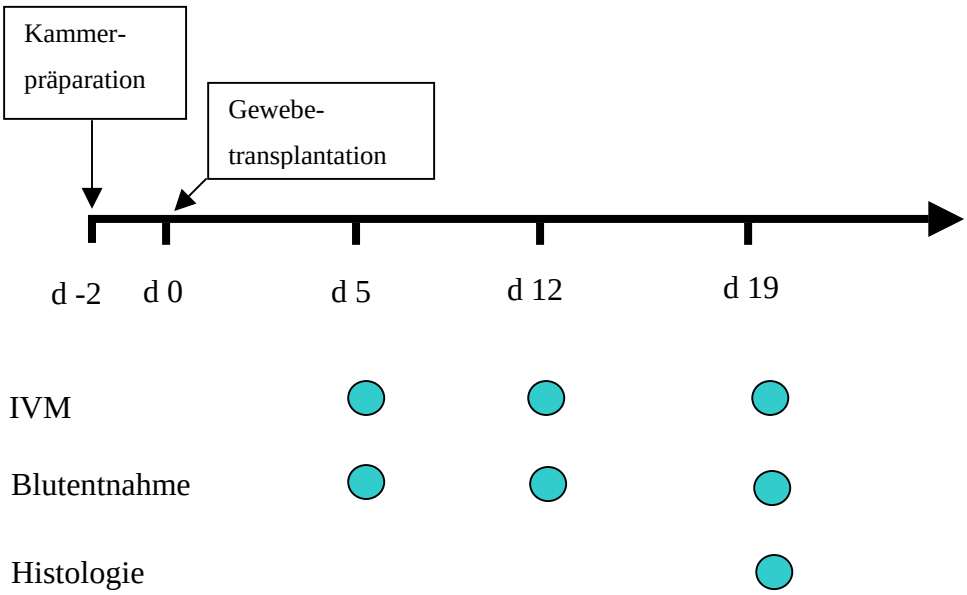


Abb. 8: Zeitschema der Versuche

An Tag –2 erfolgte die Kammerpräparation, an Tag 0 die Gewebetransplantation.
Jeweils an den Tagen 5, 12 und 19 wurde eine intravitalmikroskopische Untersuchung und eine Blutentnahme durchgeführt.
Eine Histologie wurde an Tag 19 post mortem angefertigt.

2.5 Versuchsgruppen

Für die Untersuchungen wurden die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt:
Die eine Gruppe (Transplantatgruppe = PTX) erhielt frisches Nebenschilddrüsengewebe von Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus (n = 8).
Die zweite Gruppe diente als Kontrolle (Kontrollgruppe). Die Tiere aus dieser Gruppe erhielten ebenfalls frisches Nebenschilddrüsengewebe, allerdings nach einer Hitzebehandlung bei 56°C über 30 Minuten im Wasserbad (s. 2.3.1.) (n = 7).

2.6 Untersuchungstechniken

2.6.1 Mikrohämodynamik

Um die Mikrohämodynamik des transplantierten Gewebes über einen längeren Zeitraum beobachten zu können, wurde die Mikrozirkulation mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dadurch war es möglich, die Angiogenese des transplantierten Gewebes quantitativ zu erfassen.
Der Vorteil dieser Untersuchungsmethode gegenüber anderen Methoden ist die Beurteilung sämtlicher Segmente der Mikrozirkulation mit der Möglichkeit zur quantitativen Analyse verschiedener mikrohämodynamischer Parameter [Endrich et al., 1980], [Menger et al., 1992].

2.6.1.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Vor Beginn der Untersuchung wurde den Tieren der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC-) markiertes Dextran (MW 500000; 0,05-0,1 ml einer 5%- Lösung in 0.9% NaCl; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) intravenös über die Schwanzvene gespritzt, um den Blutfluss in den Gefäßen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.
Der Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran färbt das Blutplasma und gibt Hintergrund. Dies ermöglicht eine quantitative Darstellung des Fliessverhaltens des Blutes.
Der injizierte Fluoreszenzfarbstoff flutet über die terminalen Arteriolen an und fließt nach Passage des Kapillarbettes über postkapilläre Venolen und Sammelvenolen wieder aus dem Bereich des Kammergewebes in das venöse Gefäßsystem. Nachdem der Fluoreszenzfarbstoff die Gefäße des Kammergewebes erreicht hat, ist es mit Hilfe der Auflicht-Fluoreszenz – Mikroskopie möglich, das gesamte mikrovaskuläre Gefäßsystem des Kammergewebes intravitalmikroskopisch zu untersuchen. Die durchflossenen Gefäße können so über einen längeren Zeitraum dargestellt werden, wobei es sich empfiehlt, die Auflicht-Fluoreszenz-

Zeiten so kurz wie möglich zu halten, um eine Gewebeschädigung des transplantierten Gewebes zu verhindern.

Die Versuche wurden jeweils an den Tagen 5, 12 und 19 nach Gewebetransplantation vorgenommen (s. Abb. 8).

Die wachen Tiere wurden zur Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop wie schon bei der Gewebetransplantation in einer Plexiglasröhre fixiert, welche wiederum auf einer Plexiglasbühne (Effenberger, München, Deutschland) so befestigt war, dass die Kammer mit dem Deckglas nach oben trotz Bewegungen des wachen Tieres unter dem Objektiv des Mikroskops immobilisiert war. Diese Bühne wurde auf einem Mikroskoptisch so plaziert, dass man durch Verschieben des Tisches das gesamte Gewebe mikroskopisch begutachten konnte. Das mikrovaskuläre Netzwerk des transplantierten Gewebes konnte so wiederholt intravitalmikroskopisch beurteilt werden (s. Abb. 9).

Zusätzlich wurde eine Übersichtsaufnahme des gesamten Gewebes in geringerer Vergrößerung mit einem 4-fachen Leitz-Objektiv (Leitz, GmbH, Wetzlar, Deutschland) angefertigt.

Die IVM-Untersuchungen des FITC-markierten Plasmas erfolgten mittels eines Leitz Orthoplan Stereomikroskop (Leitz, München, Deutschland) durch Epi-Illumination mit einer 100 W Quecksilber (XBO)- Lampe und einem Ploemopak-Illuminator System mit einem Leitz $I^{2/3}$ - Blaufilter (459-490 nm).

Außer für die Übersichtsaufnahmen mit einem 4-fachen Leitz-Objektiv wurde für die Auswertung der IVM-Parameter ein Leitz-Objektiv mit 20-facher Vergrößerung (Leitz, GmbH, Wetzlar, Deutschland) eingesetzt.

Jeweils 6 ROIs (regions of interest) pro Tier wurden in dem transplantierten Gewebe ausgewählt, und mit Hilfe einer Video-Kamera (C 2400-08; Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) visualisiert.

Für die später folgende Auswertung wurden die IVM-Aufnahmen auf ein S-VHS Videoband mit einem 3/4 Zoll Videorecorder (Sony-U-matic, VO-5800-PS; Sony GmbH, München, Deutschland) aufgezeichnet. Die Aufzeichnung pro Region betrug jeweils 30 Sekunden.

Insgesamt betrug die Untersuchungsdauer pro Tier und Versuchszeitpunkt circa 30 Minuten.

Die Auswertung erfolgte off-line durch ein Bildanalysesystem (Cap Image; Zeintl, Heidelberg, Deutschland) [Klyscz et al., 1997]. Sie ermöglichte die Messung der Parameter funktionelle Gefäßdichte (fvd), Erythrozytenfliessgeschwindigkeit (V_{RBC}) und Gefäßdurchmesser (d).

Die Feinfokussierung der IVM-Aufnahmen erfolgte über einen Makro-/ Mikroantrieb. Ein

massives Bohrmaschinenuntergestell ermöglichte erschütterungsfreie Arbeitsbedingungen [Vajkoczy, 1996].

Zusätzlich zu den intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde noch mittels Durchlicht die gesamte Kammerpräparation visualisiert und auf Video aufgezeichnet, um die Transplantatgröße planimetrisch erfassen zu können.

Mittels dieser Technik konnten die Gefäße und deren Wachstum durch das anflutende FITC über einen 19 tägigen Versuchszeitraum visuell dargestellt werden und mit Hilfe der oben genannten Messparameter quantifiziert werden.

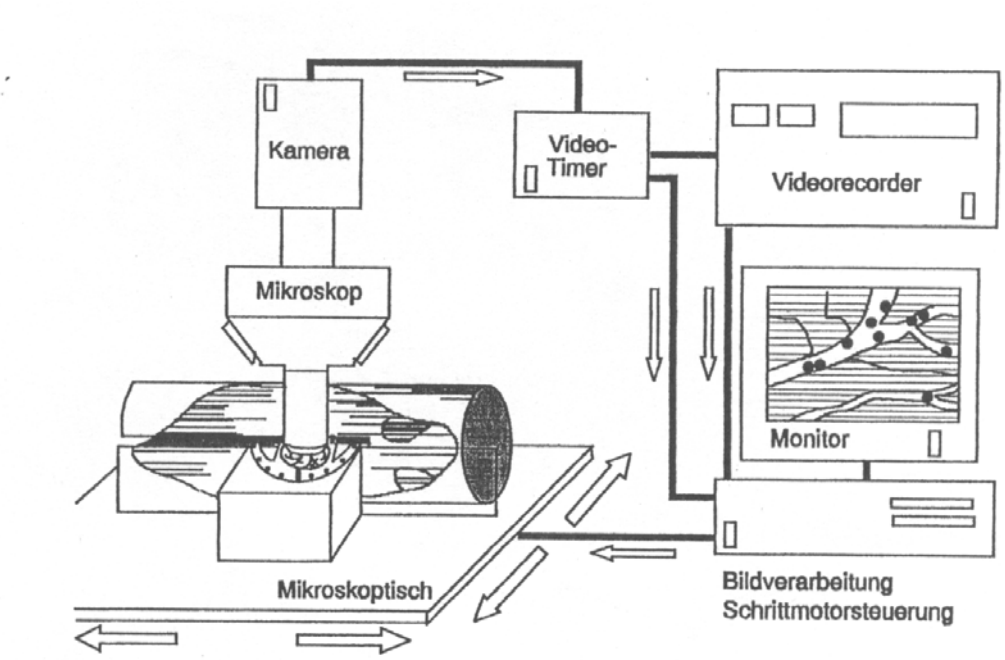


Abb. 9 nach P. Vajkoczy [Menger and Lehr, 1993]: Schematische Darstellung des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes mit beweglichem Mikroskoptisch, lichtempfindlicher *CCD-Kamera und Computer- assistierter Bildverarbeitung zur quantitativen Analyse der mikrohämodynamischen Parameter*.

Die durch das Mikroskop sichtbaren Bilder der Rückenhautkammer werden mittels einer Kamera auf einen Monitor übertragen und mit Videorekorder aufgezeichnet.

2.6.2 Mikrohämodynamische Parameter und Fläche des Transplantates

Als mikrohämodynamische Parameter bei der intravitalen Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie des Nebenschilddrüsengewebes dienten zur Erfassung des mikrovaskulären Netzwerkes des transplantierten Gewebes neben der Fläche des transplantierten Gewebes [mm²] als einzigen nicht dynamischen Parameter:

Die funktionelle Gefäßdichte (= die Länge der von Erythrozyten durchflossenen Gefäße pro Fläche) [cm^{-1}]

Die jeweiligen Gefäßdurchmesser [µm]

Die Erythrozytenfliessgeschwindigkeiten [mm/sec].

Die quantitative Auswertung dieser Parameter erfolgte nach Beendigung der Intravitalmikroskopie anhand der Videobandaufzeichnungen mittels eines computerassistierten Bildverarbeitungssystems („computer assisted microcirculation analysis system“-CAMAS) [Klyscz et al., 1997].

2.6.2.1 Messung der Fläche des transplantierten Nebenschilddrüsengewebes

Für die Bestimmung der Fläche des transplantierten Gewebes [mm²] wurde zunächst mittels Durchlicht eine Übersichtsaufnahme angefertigt. Die Auswertung erfolgte anschließend planimetrisch mittels CAMAS (s. Abb. 10).

2.6.2.2 Messung der funktionellen Gefäßdichte

Für die Bestimmung der funktionellen Gefäßdichten [cm^{-1}] wurden ebenfalls die IVM-Aufnahmen auf Video aufgezeichnet und anschließend mittels CAMAS ausgewertet.

Die funktionelle Gefäßdichte (fvd = functional vessel density) ist definiert als pytagoräisch ermittelte Länge der mit Erythrozyten perfundierten Gefäße bezogen auf den Meßrahmen (s. Abb. 11).

Die Messung der fvd im Verlauf über mehrere Tage ist ein zentraler Parameter zur Beurteilung der Gefäßneubildungen. Gefäße, die zwar mit Plasma perfundiert waren, bei denen aber der Blutfluß stagnierte, fanden keine Berücksichtigung.

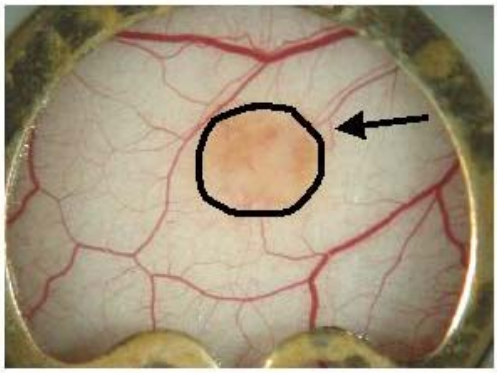
2.6.2.3 Messung der Gefäßdurchmesser

Die Auswertung der Gefäßdurchmesser erfolgte ebenso wie bei der fvd mittels Videoband der IVM-Aufnahmen computerassisitiert (s. Abb. 11).

2.6.2.4 Messung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die Bestimmung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (V_{RBC}) erfolgte mittels „line-shift-Methode“.

Hierbei wurde die Geschwindigkeit des Erythrozytenflusses im Gefäß Computer- assistiert ermittelt, indem die Zeit gemessen wurde, die die Erythrozyten für eine zuvor bestimmte Strecke innerhalb des Gefäßes benötigten.



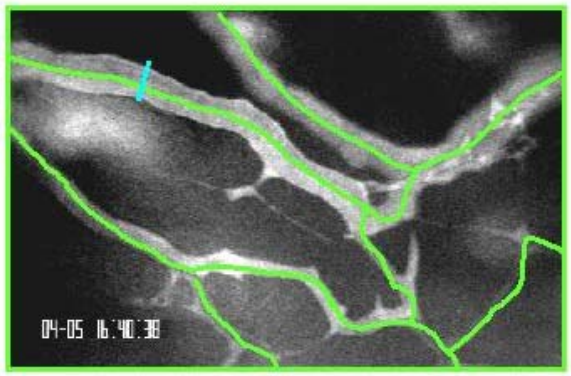


Abb. 11: Transplantatfläche [mm²]

Abb. 12: Gefäße mit FITC-Dextran i.v.:Funktionelle Gefäßdichte (fvd) [cm]
Durchmesser (d) [µm]

Anhand eines derartigen Standbildes wurden fvd (Länge der Gefäße bezogen auf den Messrahmen) und d, wie in der Abb. zu sehen, bestimmt.

2.6.3 Endokrine Transplantatfunktion

Neben den intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Angiogenese sollte zusätzlich die endokrine Funktion des transplantierten Gewebes mittels Messung von humanspezifischem PTH im Serum überprüft werden. Es war dabei wichtig, dass nur humanspezifisches PTH erfasst wurde, da nur das humanspezifische PTH für die Funktion des transplantierten, menschlichen Gewebes aussagekräftig ist.

Dazu wurde mittels eines Spezies-spezifischen ELISA das *humane* intakte PTH (iPTH) und nicht das PTH related Peptide (PTHrP), welches von Tumoren exprimiert wird, oder ein PTH-Fragment gemessen. Früher besaß die Messung der PTH-Fragmente diagnostische Bedeutung, weil sich diese unwirksamen Fragmente im Blut länger nachweisen lassen als das intakte Hormon selbst. Nachdem jedoch in den letzten Jahren verlässliche Meßsysteme für

das iPTH mit hoher Empfindlichkeit entwickelt wurden [Blind et al., 1987], ist das Messverfahren für das iPTH heute das Verfahren der Wahl für die Messung der endokrinen Funktion von Nebenschilddrüsengewebe.

2.6.3.1 Messung des iPTH

Zur Bestimmung des iPTH wurde zusätzlich zur Intravitalmikroskopie an den Tagen 5, 12 und 19 Blut aus dem retrobulbären Plexus abgenommen. Die Tiere wurden dazu in eine Narkose aus Ketamin (75mg/kg i.m., Ketavet; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (25mg/kg i.m., Rompun; Bayer, Leverkusen, Deutschland) versetzt. Die Plexuspunktion erfolgte mit einer heparinisierten 1ml-Spritze (Becton Dickinson Plastipack, Heidelberg, Deutschland) und einer Sterican-Kanüle (Gr. 20, Braun, Melsungen, Deutschland). Es wurde pro Tier und Versuch ein Blutvolumen von jeweils 100 µl abgenommen und direkt im Anschluss zentrifugiert (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Nach Zentrifugieren des Blutes wurde das Plasma bei -20°C tiefgefroren. Die Tiere tolerierten den Blutverlust gut, und zeigten keine Beeinträchtigung des Visus durch die Plexuspunktion.

An Tag 19 wurde die Blutentnahme nach der Intravitalmikroskopie intrakardial durchgeführt, bevor die Tiere geopfert wurden.

Nach Beendigung der Versuchsreihe wurde das humanspezifische iPTH mit einem ELISA (Diagnostics Systems Laboratories Inc., Active TM PTH-intact, DSL-10-8000, Sinsheim, Deutschland) bestimmt und mittels eines ELISA-readers (Ear 400 AT, Fa. TECAN, SLT-Labinstruments, Crailsheim, Deutschland) ausgewertet.

Der verwendetete ELISA ist ein enzymatischer „two-step-sandwich“- Immunoassay, der nach folgendem Prinzip ablief:

Standards, Kontrollen und die zu untersuchenden Blutproben wurden mit jeweis 100 µl Biotin-Anti-PTH-Antikörper (in Proteinpuffer und Konservierungsmittel) in dafür vorgesehene Vertiefungen (96 Stück) von Mikrotiterplatten inkubiert. Diese sind mit einem affinitätsgereinigten anti-humanen Antikörper (Ziege) beschichtet, der den n-terminalen Bereich (1-34) des PTH erfasst.

Nach Inkubation für 2,5 Stunden auf einem Horizontalschüttler (IKA-Vibrax, Janke und Kunkel, Staufen, Deutschland) mit 500 rpm (rounds per minute) bei Raumtemperatur, 5-fachem Waschen und Trocknen (das Waschkonzentrat enthält Kochsalzlösung mit einem nichtionischen Detergenz) wurde in jede Vertiefung 100 µl Streptavidin markierte Meerettich-Peroxidase (HRP) pipettiert und erneut auf einem Horizontalschüttler mit 500 rpm

für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, 5-fach gewaschen und auf Fließpapier getrocknet.
Anschließend wurde je 100 µl Tetra-Methylbenzidin (TMB, in Zitratpuffer mit Hydrogenperoxid) mittels halbautomatischem Dispenser zugegeben, auf dem Horizontalschüttler für 10-15 Minuten inkubiert und die Farbreaktion durch Schwefelsäure gestoppt.
Die Extinktion wurde durch Messung zweifacher Wellenlänge (450 und 620 nm) mittels eines ELISA-readers (Ear 400 AT, SLT-Labinstruments, Crailsheim, Deutschland) innerhalb von 30 Minuten bestimmt.
Die Standardlösungen enthalten iPTH in Humanserum und ein nicht-quecksilberhaltiges Konservierungsmittel.
Der Standardbereich bewegte sich zwischen 0 und 2000 pg/ml.
Zusätzlich zu den Standardlösungen wurden noch zwei Kontrollen mitbestimmt, eine Kontrolle mit niedriger und eine Kontrolle mit hoher PTH-Konzentration im Serum.

2.6.3.2 Messung der Kalziumkonzentration

Zusätzlich sollte als weiterer funktioneller Messparameter die Kalziumkonzentration im Blut bestimmt werden, um ausfindig zu machen, ob die *humanen* PTH-Spiegel einen Einfluss auf die Kalziumkonzentration hatten.
Anhand der wie unter 2.6.3.1. gewonnenen Blutproben wurde ebenfalls nach Beendigung der Versuchsreihe die Kalziumkonzentration im Plasma mittels eines kolorimetrischen Assays (Sigma, cat. No. 587, Deisenhofen, Deutschland) bestimmt und mittels eines Spektrophotometers DU 7500 (Beckman Instruments, München, Deutschland) ausgewertet.
Der kolorimetrische Assay funktioniert nach folgendem Prinzip:
Die Reaktion von Kalzium mit o-Kresolphthalein ergibt einen roten Farbkomplex im alkalischen Medium mit einem Absorptionsmaximum bei 575 nm. Die bei 575 nm gemessene Farbintensität ist der Kalziumkonzentration in den Proben direkt proportional.
Das Kalziumreagenz von Sigma Diagnostics enthält o-Kresophthalein.
Das noch zusätzlich im Reagenz vorliegende 8-Hydroxyquinolin verhindert Störungen durch Magnesiumionen.
In jedes Röhrchen für Leerwert, Standard, Kontrollen und Proben wurde nach Angabe des Herstellers jeweils 1,0 ml Kalzium-Reagenz-Arbeitslösung pipettiert, 10 µl destilliertes Wasser, Standard, Kontrollen und Proben in die entsprechend beschrifteten Probenröhrchen zugegeben und vorsichtig gemischt.
Mindestens 3 Minuten nach Zugabe der Probe wurde die Absorption (A) aller Röhrchen bei

575 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers DU 7500 (Beckman Instruments, München, Deutschland) gemessen.
Durch Subtraktion des Leerwertes von den Absorptionswerten für Standard, Kontrollen und Proben erhält man die von der Kalziumkonzentration abhängige Absorptionsänderung.
Die Kalziumkonzentration in den Proben wurden dann wie folgt berechnet:
Kalziumkonzentration (mg/dl) der Probe = Δ A Probe/Δ A Standard.

2.6.4 Nachweis von VEGF

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression des Wachstumsfaktors VEGF des transplantierten Gewebes und der Funktion des Transplantates zu untersuchen, führten wir eine Western Blot-Analyse durch.
Dazu wurde in einem unabhängigen Experiment das transplantierte Gewebe aus Transplantatgruppe und Kontrollgruppe an Tag 5 nach Transplantation entfernt. Die Tiere wurden dazu durch eine Überdosis Pentobarbital (Nembutal, Sanofia-Leva, Hannover, Deutschland) getötet.
Um die Expression des vaskulären Wachstumsfaktors VEGF zu untersuchen, wurde die Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen den rekombinanten, humanen Wachstumsfaktor VEGF 165 (Sigma, cat. No. V6627, Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt.
Nach der Gewebe-Homogenisation wurde der Proteingehalt kolorimetrisch bestimmt [Bradford, 1976].
Das homogenisierte Gewebe durchlief ein 10% Polyacryl-Amid Gel bei 125 V. Das isolierte Protein wurde dann auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Die Blots wurden mit PBS/0,05 Tween geblockt, welches 1% „nonfat dried milk“ enthält, und dann über Nacht mit dem Haupt-Antikörper (1µg/ml) versetzt. Für eine Stunde wurden dann die Blots Peroxidase-markierten Antikörpern ausgesetzt (Santa Cruz Biotechnology Inc., cat. No sc-2350, Delaware, U.S.A) und anschließend einmal gewaschen.
Der gebundene Antikörper wurde durch Chemiluminescence (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, U.S.A.) sichtbar gemacht.

2.7 Histologische Untersuchungen

2.7.1 Histologie

Mit Hilfe der Histologie war es zusätzlich möglich, die Morphologie des transplantierten Gewebes zu untersuchen.

An Tag 19 wurde nach Tötung des Tieres und Abnahme der Kammer ein quadratisches Stück des transplantierten Gewebes in 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert und bei Raumtemperatur für ungefähr 48 Stunden aufbewahrt. Das fixierte Gewebe wurde nach Wässerung in Paraffin eingebettet und 3µm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend erfolgte die Färbung mit Hämatoxilin-Eosin.

2.7.2 Immunhistochemie

Um die Gefäße im Transplantat besser darstellen zu können, wurde der Endothelmarker „von Willebrand Faktor“ (vWF) mittels Immunhistochemie dargestellt. Das Gewebe wurde hierzu, genau wie unter 2.7.1. beschrieben, post mortem an Tag 19 entfernt, in Paraffin gebettet und vor der Anfärbung entparaffiniert.

Die immunhistochemischen Analysen von vWF erfolgten mittels polyklonalem „rabbit anti human“-Antikörper (Fa. DAKO, A 0082, Hamburg, Deutschland).

Zunächst wurde mit Methanol + H_2O_2 die endogene Peroxidase geblockt. Anschließend wurde mit Pronase E (0,1 %) zum Andauen des Gewebes inkubiert. Auf den Schnitt wurde dann Normalserum aus dem ABC-Komplex anti-rabbit gegeben (Elite Kit, rabbit IgG, Fa. Vectastain, Burlingame, U.S.A.).

Im Anschluß daran wurde der vWF-Antikörper über 45 Minuten lang in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen. Es folgte der zweite Antikörper aus dem o.g. ABC-Kit in einer Verdünnung von 1:200 (Vectastain, U.S.A), und anschließend der Avitin-Biotin-Komplex.

Zur Farbentwicklung wurde Chromogen aufgetragenen. Zuletzt wurden die Schnitte kurz in Hämalaun getaucht und danach 10 Minuten in fließendem Wasser gebläut, um die Kerne abgrenzen zu können.

Zwischen jedem dieser Schritte wurde mit PBS Tween gespült - außer nach dem Auftragen des Normalserums.

2.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Einzelwerte oder in ihrer Gesamtheit als Mittelwert (± Standardfehler des Mittelwertes (MW ± SEM)) dargestellt. Die Daten wurden nichtparametrisch mittels Intragruppenvergleich (Wilcoxon signed rank test) und Intergruppenvergleich (Kruskal-Wallis-analysis of variance on ranks) mit post hoc-Analyse nach Student-Newman-Keuls statistisch analysiert (Sigma Stat; Jandel Corp., San Rafael, U.S.A.). Bei Signifikanz ist dies bei der jeweiligen Abbildung vermerkt.
Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Klinik der Nebenschilddrüsentransplantation

Von den insgesamt 2675 durchgeführten Operationen waren 1935 Operationen wegen eines pHPT und 740 Operationen wegen eines s/t HPT.

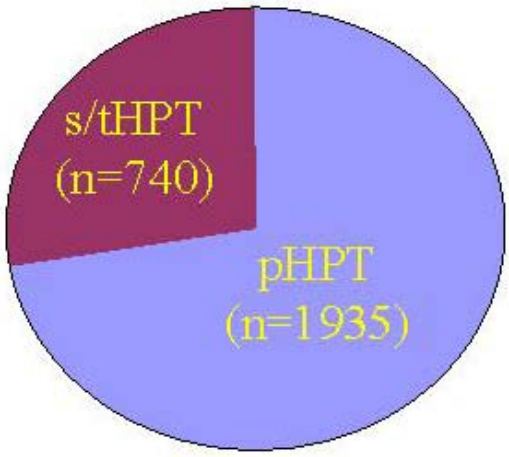


Abb. 12: Patientenkollektiv des Krankenhauses Martha-Maria mit Hyperparathyreoidismus von 1982-2000. Von insgesamt 2675 Patienten, die in diesem Zeitraum an einem HPT operiert worden sind, hatten 740 Patienten einen s/t HPT und 1935 Patienten einen pHPT.

Von diesen 2675 Patienten litten postoperativ 10,5 % an einem rezidivierenden bzw. persistierenden HPT, und 0,9 % postoperativ an einem rezidivierenden bzw. persistierenden Hypoparathyreoidismus.
Die Ursache dieser Transplantatdysfunktionen ist bis heute noch weitgehend unklar und bedarf nach wie vor weiterführender Untersuchungen.

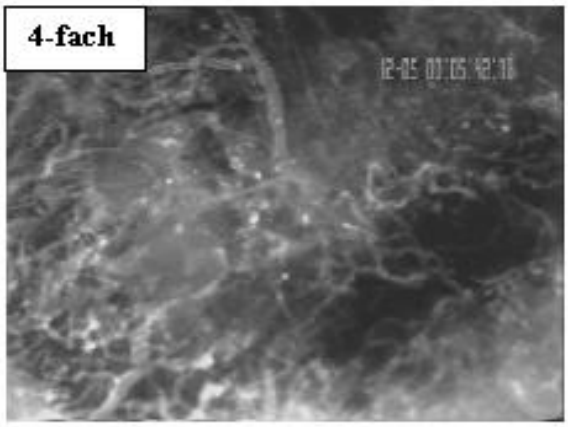
3.2 Angiogenese der Nebenschilddrüsen-Transplantate

Die für die Versuche verwendeten Tiere tolerierten die Haltung im Inkubator und die Rückenhautkammer gut, und wiesen keine Gewichtsabnahme bzw. gestörtes Fress-/ Sozialverhalten auf.
Trotz der schlechten Abwehrlage der Tiere im Vergleich zu immunkompetenten Tieren

wurde die Implantation des Gewebes und die Haltung der Tiere im Inkubator meist ohne entzündliche Reaktionen überstanden.

Ziel der Auswertung der mikrohämodynamischen Parameter mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie war die Quantifizierung der Angiogenese bzw. der Revaskularisierung des transplantierten Nebenschilddrüsengewebes. Nach intravenöser Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran dauerte es ca. 2-5 Sekunden (sec), bis sich der Farbstoff verteilt hatte, so daß eine Visualisierung des gesamten mikrovaskulären Gefäßsystems in der Rückenhautkammer möglich war.

In den verschiedenen Fokusebenen konnte je nach Fokustiefe entweder das gesamte kapilläre Netzwerk des quergestreiften Muskelgewebes der Rückenhaut, oder in der höher gelegenen Fokusebene das mikrovaskuläre Netzwerk des transplantierten Gewebes dargestellt werden (Abb. 13/14).



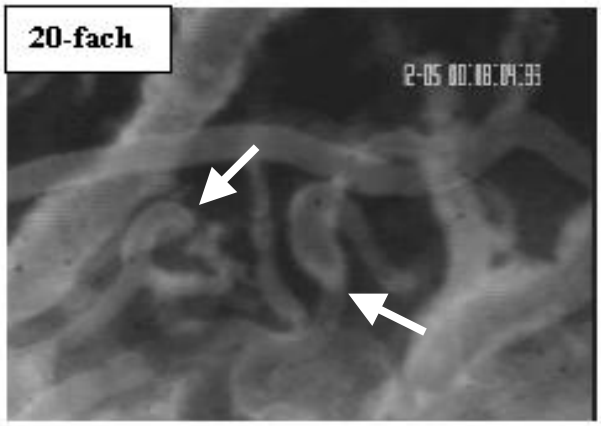


Abb. 13: IVM-Übersichtsaufnahme des transplantierten Nebenschilddrüsengewebes mit 4-fachem Objektiv. Das durch FITC leuchtende Plasma ermöglicht die Visualisierung der neuen Gefäße.

Abb. 14: IVM-Aufnahme mit 20-fachem Objektiv zur Auswertung der mikrohämodynamischen Parameter. Typisches Bild angiogenetischer Gefäße mit Kalibersprüngen und Gefäßwindungen (sog.coilings) (s.→)

Die jeweils angefertigte Übersichtsaufnahme (Abb. 13) zeigte das gesamte mikrovaskuläre Netzwerk des transplantierten Gewebes im Überblick.
Die folgende höhere Vergrößerung ermöglichte die genaue Darstellung einzelner Segmente (Abb. 14) zur quantitativen Analyse der verschiedenen mikrohämodynamischen Parameter.
Die Kapillaren des Rückenhautmuskels hatten einen gleichmäßigen, strickleiterartigen Charakter und unterschieden sich rein optisch von den neu entstandenen Gefäßen .
Wie mit den Pfeilen in Abb. 14 gekennzeichnet, konnte man typische Zeichen neuer, angiogenetischer Gefäße am Rande und innerhalb des transplantierten Gewebes erkennen:
Die neuen Gefäße wiesen im Gegensatz zu den Kapillaren des Rückenhautmuskels Kalibersprünge und starke Gefäßwindungen („coilings“) auf.

3.2.1 Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie

Die ersten Zeichen der Angiogenese waren in der Transplantatgruppe (PTX) an Tag 5 zu erkennen.
Auf den folgenden Abbildungen sind die intravitalmikroskopischen Aufnahmen an den Tagen 5, 12 und 19 dargestellt. Es wurden jeweils Kontrollgruppe und PTX gegenübergestellt.
An Tag 19 war das Gewebe der Kontrollgruppe nicht mehr abgrenzbar, und damit intravitalmikroskopisch nicht mehr zu erfassen.
An Tag 5 waren in der Kontrollgruppe keine Gefäße erkennbar. Man sah lediglich am Rand des transplantierten Gewebes nicht perfundierte, mittransplantierte Gefäße (s. Abb. 15).
Im Gegensatz dazu konnte man an Tag 5 in der Transplantatgruppe vom Rand her neu einwachsende Gefäße erkennen. Die mittransplantierten, schwarzen, nicht durchflossenen Gefäße dienten hierbei wahrscheinlich als Schienen für die neu einwachsenden Gefäße (s. Abb. 16).

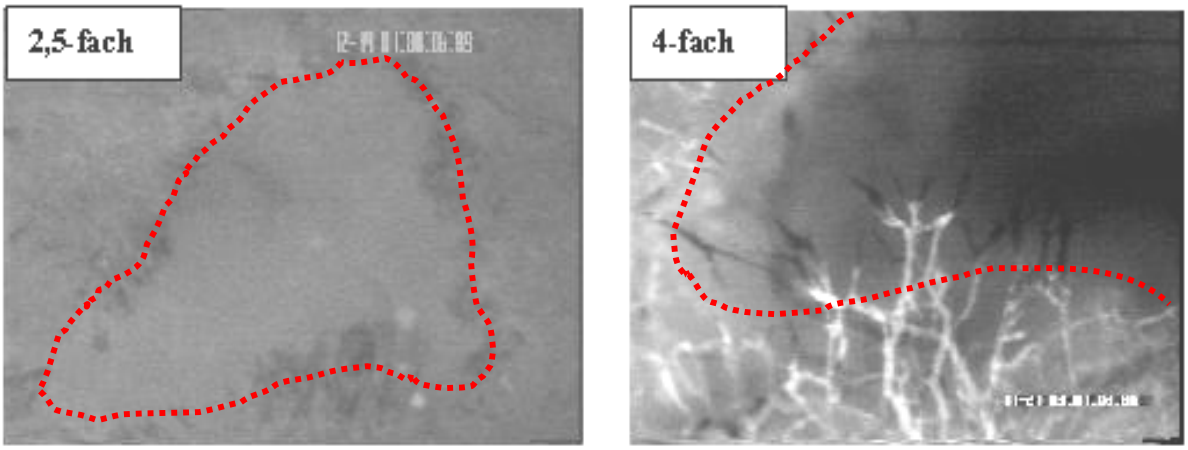


Abb. 15: Intravitalmikroskopie aus der Kontrollgruppe an Tag 5. Es waren keine neu einwachsenden Gefäße vorhanden. Lediglich am Rand des Gewebes waren nicht perfundierte Spendergefäße zu sehen.

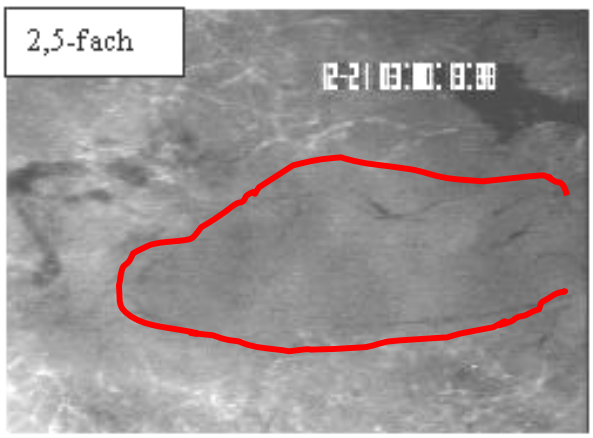
Abb. 16: Intravitalmikroskopische Aufnahme aus der Transplantatgruppe an Tag 5 Vom Rand her wuchsen neue Gefäße in das Transplantat ein.

An Tag 12 ließ sich am Rand des Gewebes aus der Kontrollgruppe eine unspezifische Gefäßreaktion erkennen. Es ist nicht klar ob es sich um eine Entzündungsreaktion handelt, oder was der Stimulus für die neu einwachsenden Gefäße war. Zentral im Gewebe waren jedoch keine neu eingewachsenen Gefäße zu sehen (s. Abb. 17). Im Gegensatz dazu war das gesamte Gewebe der PTX von Gefäßen durchwachsen (s. Abb. 18). Das Gewebe der PTX wies somit an Tag 12 eine hohe Gefäßdichte auf, ebenso wie an Tag 19. Auch hier waren in dem gesamten transplantierten Gewebe viele Gefäße (s. Abb. 19) zu finden. Wie bereits erwähnt, ist hier die Kontrollgruppe an Tag 19 nicht mit abgebildet, da sich zu diesem Zeitpunkt das Gewebe nicht mehr von der Umgebung abgrenzen ließ.

In der Transplantatgruppe waren somit die ersten Angiogenesezeichen an Tag 5 zu sehen, mit einer steigenden Tendenz bis zum Tag 19.

In der Kontrollgruppe waren an Tag 5 keine Gefäßneubildungen sichtbar, an Tag 12 unspezifische Reaktionen in der Umgebung des transplantierten Gewebes und an Tag 19 war das Gewebe resorbiert. Lediglich ein Teil der Tiere aus der Kontrollgruppe wies ebenfalls ab Tag 12 Gefäße im Gewebe auf. Bei diesen Tieren war das transplantierte Gewebe nach der

Hitzebehandlung durch Fettgewebe ersetzt worden (s. Abb. 24).



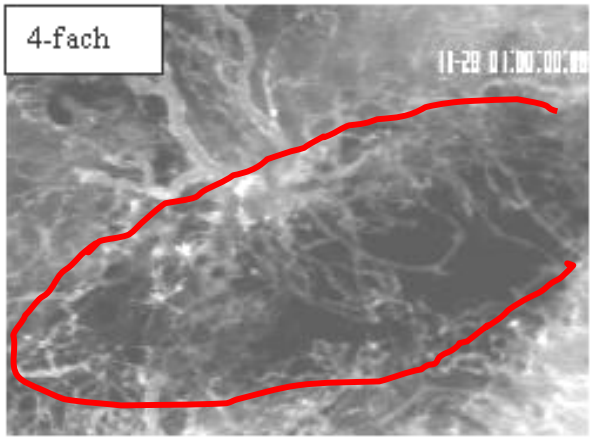


Abb. 17: Intravitalmikroskopie aus der Kontrollgruppe an Tag 12. Unspezifische Gefäßreaktion am Rand des transplantierten Gewebes. In das Transplantatgewebe waren keine Gefäße eingewachsen.

Abb. 18: Intravitalmikroskopie aus der Transplantatgruppe an Tag 12. Im ganzen Transplantat war ein hoher Gefäßreichtum zu erkennen.

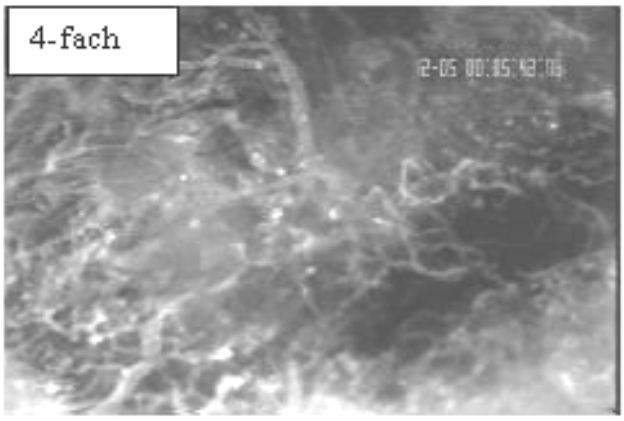
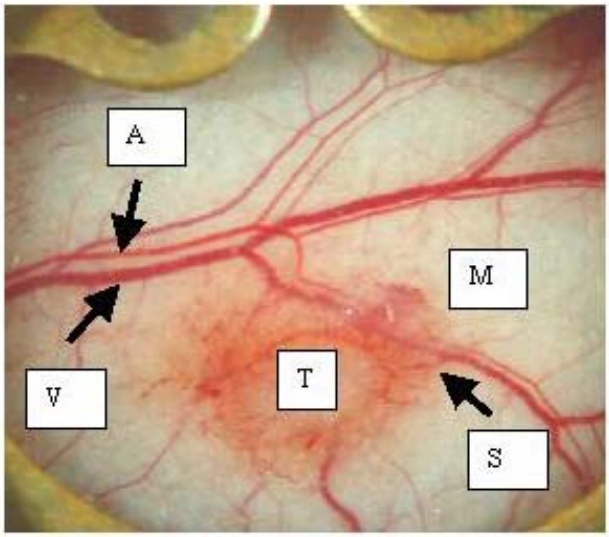


Abb. 19: Intravitalmikroskopie aus der Transplantatgruppe an Tag 19. Hoher Gefäßreichtum im gesamten Transplantat. Das Gewebe in der Kontrollgruppe war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr abgrenzbar.

3.2.2 Fläche des transplantierten Gewebes

Nach jeder Intravitalmikroskopie erfolgte noch eine Durchlichtaufnahme, um später die Größe des transplantierten Gewebes zu ermitteln.



A: Arteriole
V: Venole
T: Transplantat
S: Sprout
M: Muskel

Abb. 20: Makroskopische Aufnahme des transplantierten Nebenschilddrüsengewebes auf den Rückenhautmuskel (PTX-Gruppe). Durch die Kammerpräparation ziehen Arteriolen und Venolen. Von diesen ursprünglichen Gefäßen ausgehend bilden sich zunächst Angiogenese-typische sprouts (s. Beschriftung).

Anhand der Übersichtsaufnahmen war es möglich zu vergleichen, ob sich die Fläche des transplantierten Gewebes eines Tieres über den Versuchszeitraum hinweg veränderte.
Man erkennt auf Abb. 21 und anhand des Graphen (Abb. 22), dass die Fläche des transplantierten Gewebes in der Transplantatgruppe (PTX) über den gesamten Versuchszeitraum hinweg annähernd gleich blieb, während sie in der Kontrollgruppe von Tag 5 bis Tag 19 stetig abnahm. Bei einigen Tieren aus der Kontrollgruppe war an Tag 19 das Gewebe bereits nicht mehr abgrenzbar.
An Tag 5 war außerdem ein signifikanter Flächenunterschied zwischen dem Gewebe aus der Transplantatgruppe und der Kontrollgruppe zu erkennen (s. Abb. 22).

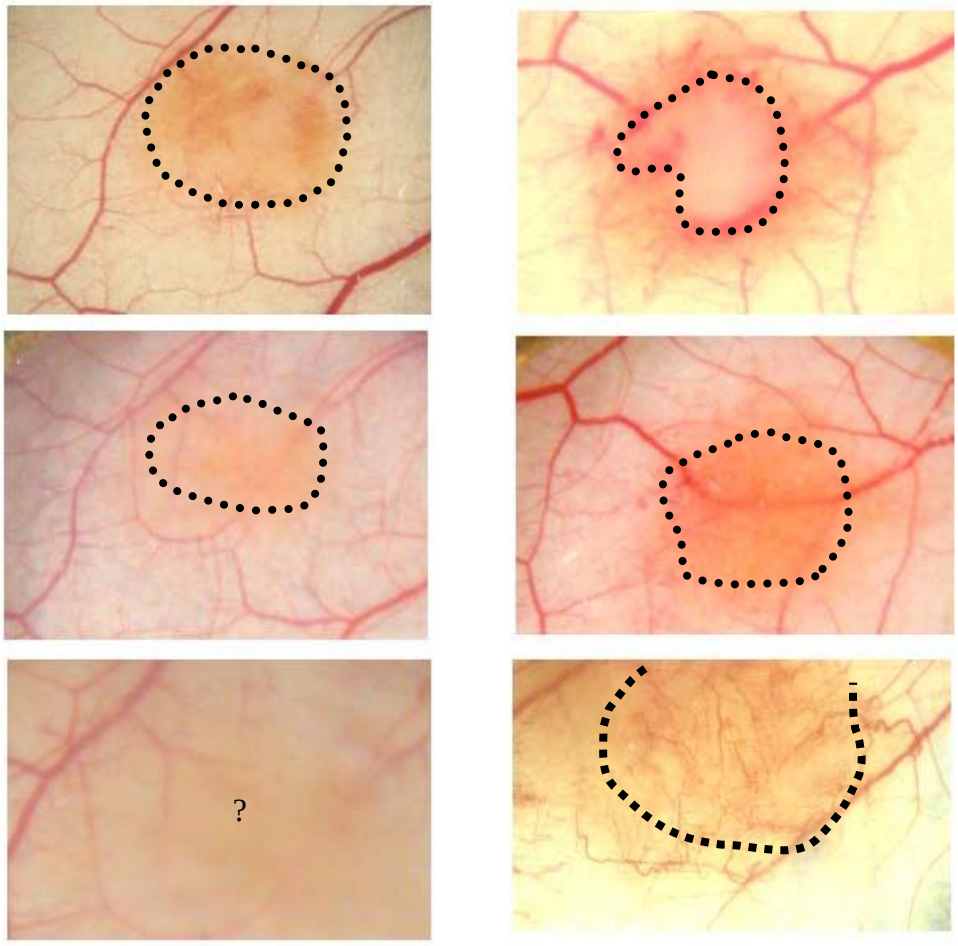


Abb. 21: Makroskopische Aufnahmen
Kontrollgruppe (links) vs. PTX (rechts) von Tag 5 (oben) bis Tag 19 (unten).
Während das Gewebe in der Kontrolle resorbiert wurde, blieb es in der PTX nahezu gleichgroß.

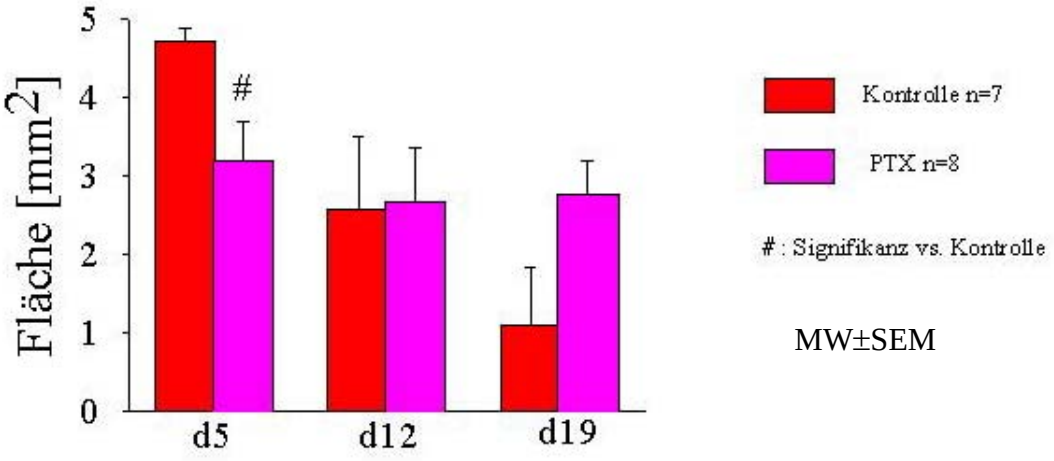


Abb. 22: Fläche des transplantierten Gewebes. In der Transplantatgruppe blieb die Fläche über den gesamten Versuchszeitraum annähernd gleich. In der Kontrollgruppe nahm die Fläche des Gewebes von Tag 5 bis Tag 12 stetig ab.

3.2.3 Funktionelle Gefäßdichte

Durch die Auswertung der funktionellen Gefäßdichte wurden die neu einwachsenden Gefäße quantifiziert, so dass eine Aussage über die Angiogenese gemacht werden konnte.

Man erkennt auf Abb. 23, dass bei allen Tieren aus der Kontrollgruppe an Tag 5 keine Gefäße nachweisbar waren, während bei zwei Tieren aus der Transplantatgruppe bereits an Tag 5 Gefäße erkennbar waren. In der Transplantatgruppe sieht man an den darauf folgenden Versuchstagen signifikant ansteigende Gefäßdichten gegenüber den Werten an Tag 5.

Im Gegensatz dazu gab es bei den Tieren aus der Kontrollgruppe zwei verschiedene Ergebnisse. Bei dem einen Teil der Tiere (n=3) waren, wie ursprünglich erwartet, auch an den Versuchstagen 12 und 19 keine Gefäßdichten nachweisbar.

Bei dem anderen Teil der Tiere (n=4) waren die Gefäßdichten jedoch vergleichbar hoch mit den Gefäßdichten der Tiere aus der Transplantatgruppe (s. Abb. 24).

Bei den Tieren, die in Abb. 23 mit Pfeilen markiert sind, handelt es sich um Tiere aus der Transplantatgruppe, bei denen an Tag 5 PTH nachweisbar war, jedoch nicht mehr an den Tagen 12 und 19.

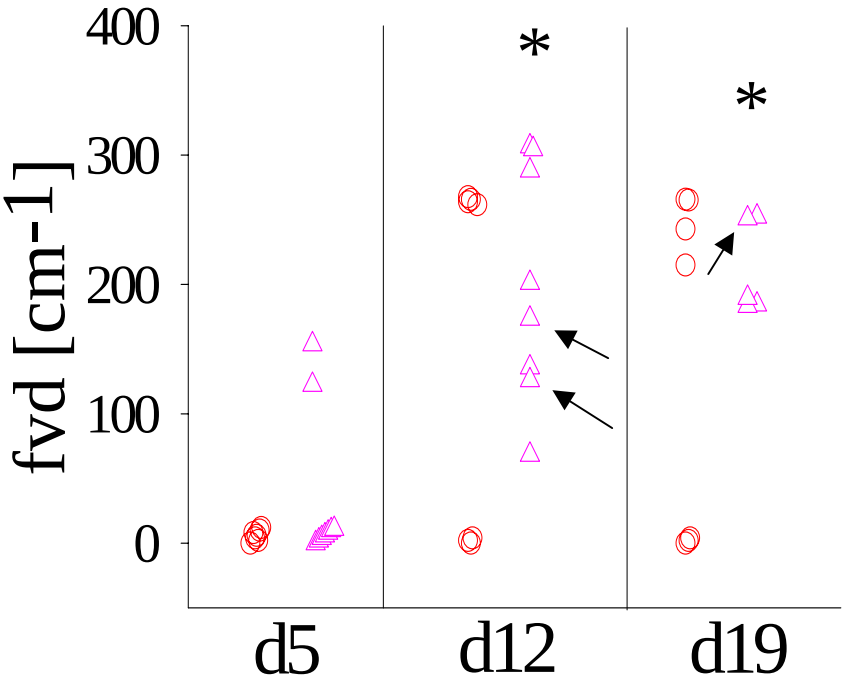


Abb. 23: Funktionelle Gefäßdichte in Einzelwertdarstellung aufgetragen an den jeweiligen Versuchstagen.

O: Kontrolle

Δ: PTX

**: Signifikanz vs. d 5*

⇒: Tiere aus der Transplantatgruppe, bei denen nur an Tag 5 PTH nachweisbar war

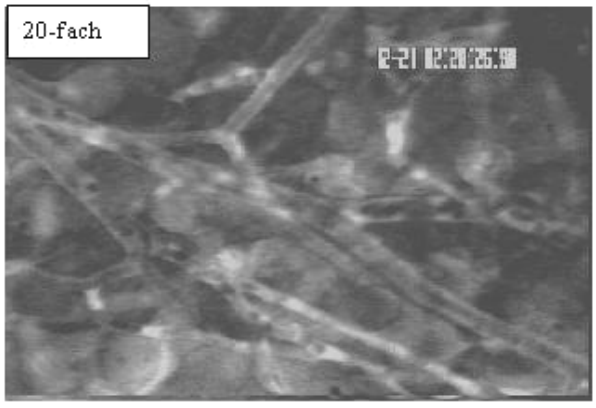


Abb. 24: Intravitalmikroskopie von Tag 12 aus der Kontrollgruppe. Zwischen den Gefäßen sind Fettvakuolen sichtbar, die auf eine Fettgewebedegeneration schliessen lassen.

In der IVM (s. Abb. 24) der Tiere aus der Kontrollgruppe, bei denen die Gefäßdichten vergleichbar zu den Gefäßdichten der Tiere aus der Transplantatgruppe waren, zeigten sich zwischen den Gefäßen wabige Strukturen, die auf Fettvakuolen hindeuteten.
Bei diesen Tieren war das Gewebe durch Fettgewebe ersetzt worden.

3.2.4 Gefäßdurchmesser

Wie auf Abb. 25 zu sehen, gab es keine signifikanten Veränderungen der Gefäßdurchmesser über den gesamten Versuchszeitraum hinweg.
An Tag 5 konnten in der Kontrollgruppe keine Gefäßdurchmesser bestimmt werden, da, wie aus Abb. 23 ersichtlich, zu diesem Zeitpunkt bei keinem der Tiere aus der Kontrollgruppe Gefäße in das Gewebe eingewachsen waren.
Wenn keine funktionelle Gefäßdichte vorhanden war, sind somit auch keine Durchmesser bestimmbar gewesen.

3.2.5 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Ähnlich wie bei den gezeigten Gefäßdurchmessern ist auch bei den Erythrozytenfließgeschwindigkeiten kein signifikanter Unterschied im Verlauf des Versuchszeitraumes zu beobachten gewesen (s. Abb. 26). Auch hier konnte die Geschwindigkeit an Tag 5 in der Kontrollgruppe nicht ausgewertet werden, da noch keine Gefäße zu diesem Zeitpunkt erkennbar waren.
Es konnten auch hier nur Erythrozytenfließgeschwindigkeiten bestimmt werden, wenn eine Gefäßdichte nachweisbar war.

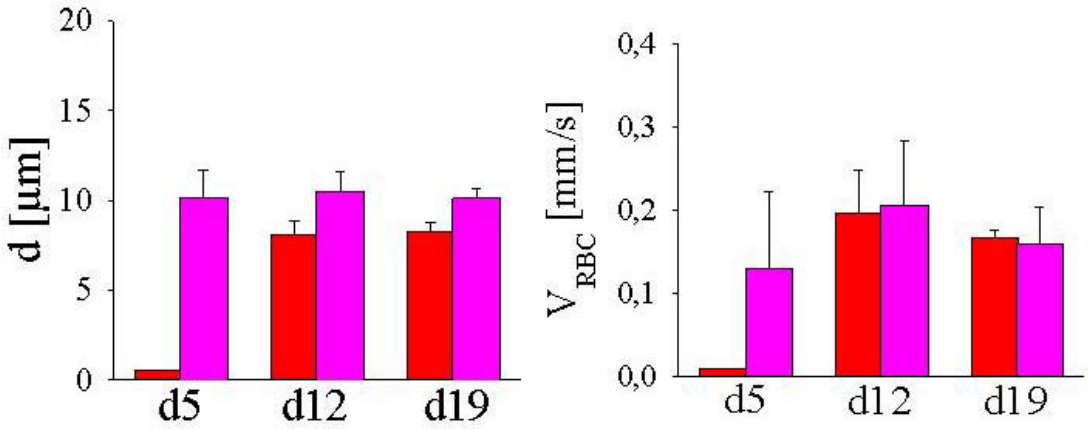


Abb. 25 und Abb. 26:

Kontrolle (d5:n=0;d12:n=4;d19:n=4)

PTX (d5:n=2;d12:n=7;d19:n=5)

Abb. 25: Darstellung der Durchmesser an den entsprechenden Versuchstagen

Abb. 26: Darstellung der Erythrozytenfliessgeschwindigkeit an den entsprechenden Versuchstagen

MW±SEM

3.3 Endokrine Transplantatfunktion

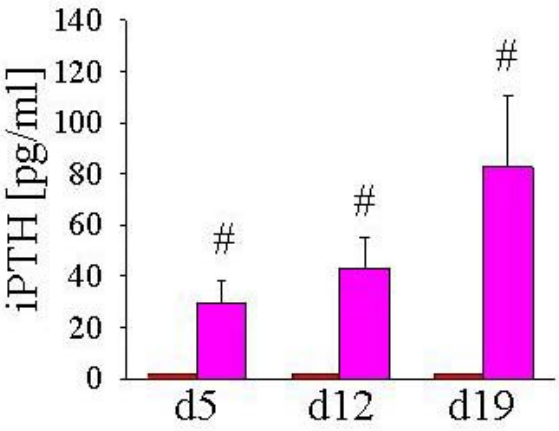
3.3.1 Bestimmung des iPTH

Die Auswertung des humanen iPTH mittels ELISA hat ergeben, daß die iPTH-Spiegel in der Transplantagruppe über den gesamten Versuchszeitraum signifikant angestiegen sind.
In der Kontrollgruppe waren dagegen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg keine iPTH-Spiegel nachweisbar (s. Abb. 27).

3.3.2 Bestimmung der Kalziumkonzentration

Wie aus der Abb. 28 ersichtlich, blieben die Kalziumspiegel an Tag 5 und Tag 12 sowohl in der Transplantatgruppe, als auch in der Kontrollgruppe nahezu konstant. Am letzten Versuchstag zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied der Kalziumkonzentration zum

vorherigen Meßzeitpunkt in der Transplantatgruppe und in der Kontrollgruppe.

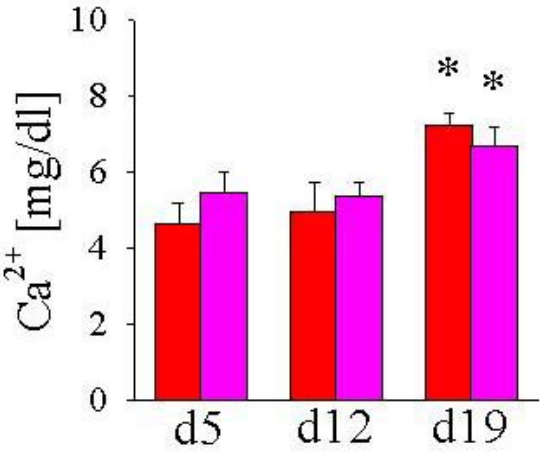


Kontrolle n=7

PTX n=8

 # Signifikanz vs. Kontrolle

MW±SEM



Kontrolle n≥5

PTX n≥7

∗ Signifikanz vs. früherer Meßzeitpkt.

MW±SEM

Abb. 27:Parathormonspiegel [pg/ml] an den jeweiligen Versuchstagen

Abb. 28: Kalziumspiegel [mg/dl] an den jeweiligen Versuchstagen

3.3.3 Korrelation zwischen Angiogenese (fvd) und Transplantatfunktion (iPTH)

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Angiogenese und der Funktion des transplantierten Gewebes zu untersuchen, haben wir die Werte der funktionellen Gefäßdichte mit den Parathormonspiegeln korreliert.

Wie aus der Abb. 29 hervorgeht, konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang festellen.

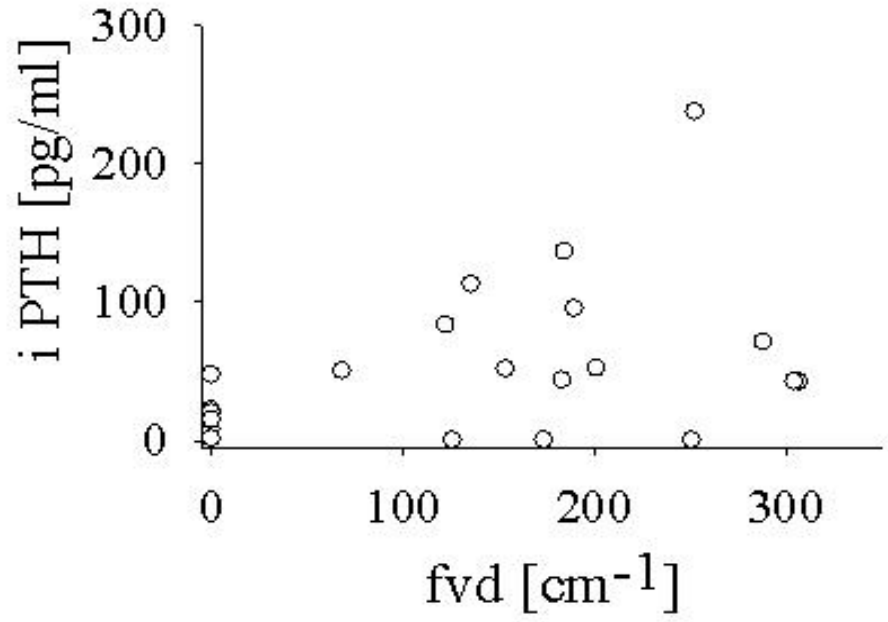


Abb. 29: Parathormonwerte aufgetragen gegen die funktionelle Gefäßdichte
Spearman Korrelation 0,37; p=0,088; keine Signifikanz

3.4 Expression des angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Funktion des transplantierten Gewebes anhand der gemessenen PTH-Spiegel und der Expression des Wachstumsfaktors VEGF zu untersuchen wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt.
Diese Analyse hat ergeben, dass bei den Tieren aus der Kontrollgruppe, die keine Parathormonspiegel aufwiesen, auch kein Tier den Wachstumsfaktor VEGF exprimierte. Die Tiere, die niedrige Parathormonspiegel aufwiesen, hatten auch eine geringe VEGF-Expression. Eine hohe VEGF-Expression wurde nur bei den Tieren, bei denen hohe Parathormonspiegel auftraten, nachgewiesen. (s. Abb. 30)

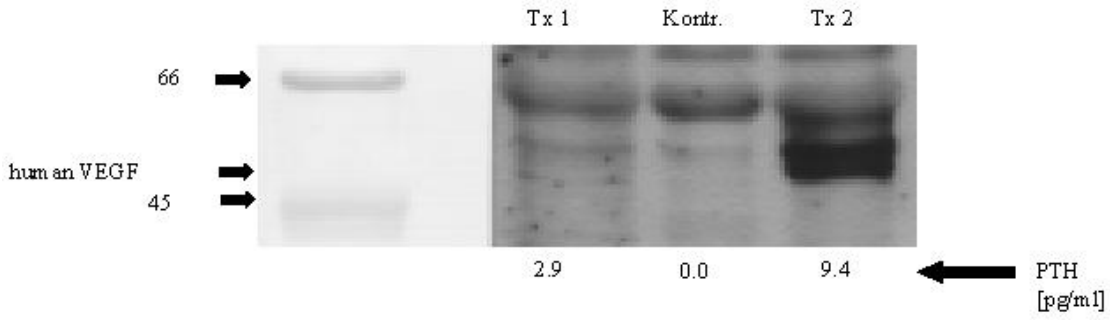


Abb. 30: Western Blot-Analyse zur Bestimmung der VEGF-Expression in k Dalton.
Unten aufgetragen die jeweiligen iPTH-Spiegel [pg/ml]
Tx1: Transplantat 1
Kontr.: Kontrolle
Tx 2: Transplantat 2
Die linke Bande zeigt die kDa der Western Blot-Analyse an. Die VEGF-Expression liegt somit bei 47 kDa.

3.5 Histologie

3.5.1 Konventionelle Histologie

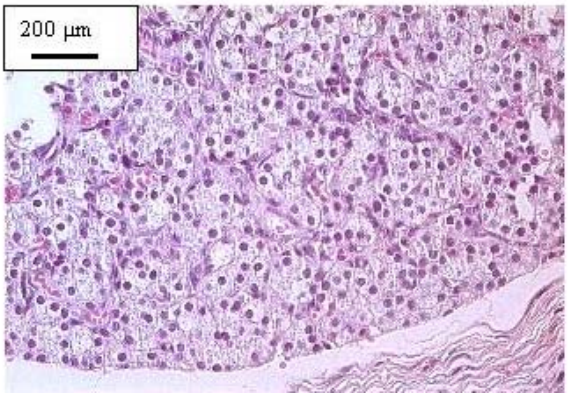
In Abb. 31 ist eine Histologie von Tag 19 aus der Transplantatgruppe dargestellt. Man erkennt das typische Epithelgewebe der menschlichen Nebenschilddrüse. Die Zellkerne sind von einem prallen Zytoplasmasaum umgeben. Auf den ersten Blick ist der Zellverband scheinbar einheitlich, dennoch findet man verschiedene Zelltypen:
Helle Hauptzellen (Glykogeneinlagerung), dunkle Hauptzellen und oxyphile Zellen.
Des Weiteren findet man vereinzelt Fettzellen und zahlreiche Gefäße, wie es typisch für endokrine Organe ist.
Im Gegensatz dazu sieht man in Abb. 32, dass bei den Tieren der Kontrollgruppe, bei denen keine Gefäßneubildung nachweisbar war, zwar die Zellkerne nach wie vor gut zu sehen sind, aber der Zytoplasmasaum um die Zellkerne herum nur noch sehr gering ausgeprägt bzw. gar nicht mehr vorhanden ist. Man erkennt Zelldetritus, was für die Avitalität des Gewebes aus der Kontrollgruppe spricht. Dieses morphologische Ergebnis stimmt damit überein, dass bei diesen Tieren sowohl keine Gefäßneubildung, als auch keine Parathormonspiegel

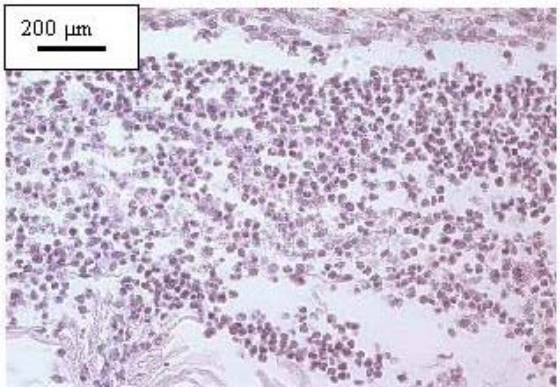
nachweisbar gewesen sind.

Bei dem anderen Teil der Tiere aus der Kontrollgruppe, bei denen eine hohe Gefäßdichte nachweisbar war, fanden wir eine Fettgewebedegeneration des transplantierten Gewebes nach Hitzebehandlung als Ausdruck einer subtotalen Zellschädigung.

Die Fettgewebedegeneration bei diesen Tieren war nicht nur intravitalmikroskopisch (s. Abb. 24 unter 3.2.3.) zu erkennen, sondern auch histologisch (s. Abb. 33).

Abbildung 33 zeigt histologisch, dass nahezu das gesamte Nebenschilddrüsengewebe von Fettzellen durchwachsen ist.





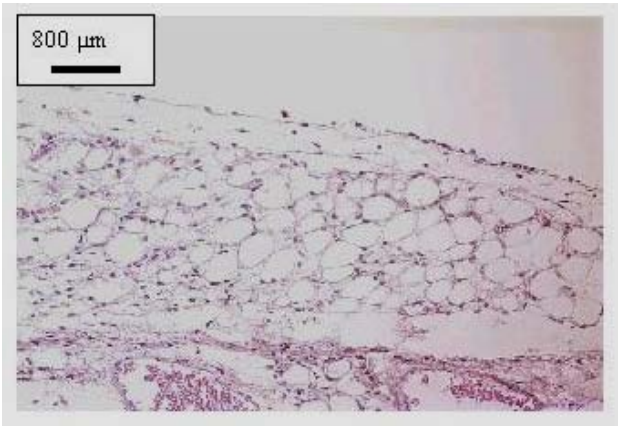


Abb. 31: PTX: Zellkerne mit prallem Zytoplasmasaum, wie man sie bei normalem Nebenschilddrüsengewebe sieht.

Abb. 32: Kontrolle: Zelldetritus. Es sind nach der Hitzeinaktivierung nur noch Zellkerne ohne Zytoplasmasaum vorhanden. Dieses Bild spricht für funktionsunfähiges Gewebe.

Abb. 33: Kontrolle: Fettgewebedegeneration. Hier hat sich das Gewebe in Fett umgewanelt

3.5.2 Immunhistochemie

Um den Gefäßreichtum im vitalen Nebenschilddrüsengewebe aus der Transplantatgruppe besser darstellen zu können, wurde, wie unter 2.7.2. beschrieben, eine immunhistochemische Untersuchung mittels vWF durchgeführt.

Auf den Abb. 34 und 35 ist sichtbar, dass das gesamte Gewebe einen hohen Gefäßanteil aufweist.

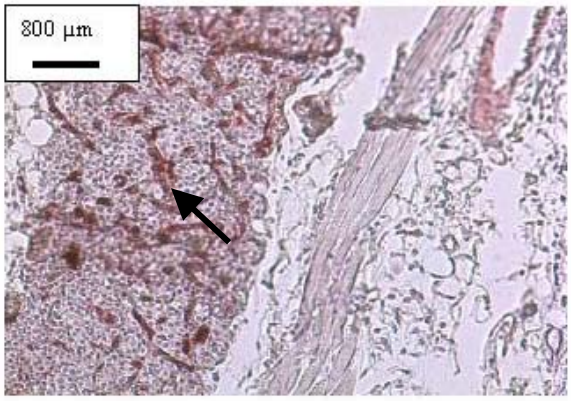


Abb. 34: Unterhautfettgewebe und Rückenhautmuskulatur (re unterer Bildrand) mit aufliegendem Nebenschilddrüsengewebe. Gefäße mit vWF angefärbt (←)

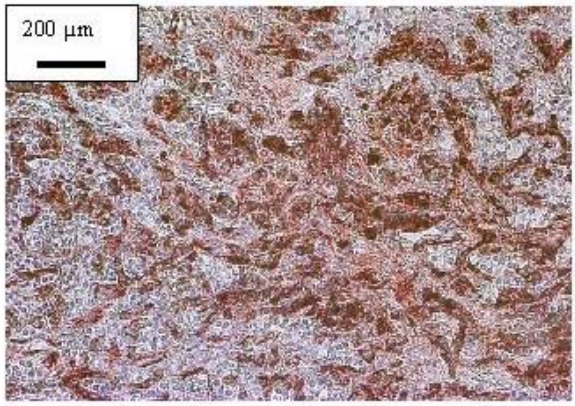


Abb. 35: Vergrößerte Darstellung des Nebenschilddrüsengewebes mit vWF

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Klinik der Nebenschilddrüsentransplantation

Die Angaben in der Literatur zum Thema Transplantatdysfunktionen sind unterschiedlich und und unterscheiden sich von der Auswertung der Akten des Krankenhauses Martha-Maria:

Tab.1: Transplantatdysfunkionen anhand einer Studie des Krh. Martha Maria und anhand von Literaturangaben

	Krankenhaus Martha-Maria	Literatur
Rezidivierender/ persistierender HPT	**10,5 %**	**30,6 %** [Hargrove et al., 1999]
Rezidivierender/ Persisitierender Hypoparathyreoid.	**0,9 %**	**15-30** % [Herrera et al., 1992]

Die Ursache dieser Transplantatdysfunktionen ist bis heute noch weitgehend unklar.
Ein vorübergehender Kalziumabfall postoperativ in einen hypokalzämischen Bereich nach Parathyreoidektomie und Autotransplantation ist normal und erfordert ab dem Operationstag eine Therapie mit Kalzium. Die Dauer der substitutionsbedürftigen Hypokalzämie hängt vom Anwachsen des Autotransplantates ab, da das Transplantat erst nach dem Anwachsen ausreichende Mengen von PTH freisetzt [Ziegler, 1991].
Denn nur durch Anwachsen des Gewebes kann eine ausreichende Sauerstoff- und

Nährstoffversorgung gewährleistet werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß die Angiogenese eine bedeutende Rolle bei der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des transplantierten Gewebes spielt, und damit für die Erhaltung und Funktion des transplantierten Gewebes mitverantwortlich ist.

Bei Patienten mit o.g. Transplantatversagen, die an einem permanenten postoperativen Hypoparathyreoidismus litten, konnte durch die Kryokonservierung zwar Gewebe nachtransplantiert werden, teils führte dies jedoch ebenfalls zu keinem Erfolg.

Um diesen Patienten zu helfen, verblieb lediglich die Idee der Allotransplantation. Da, wie bereits in der Einleitung erwähnt, eine Immunsuppression in diesem Zusammenhang zu nebenwirkungsreich wäre, entstanden neue Ansätze zur Mikroenkapsulierung. Ziel war hierbei die Nebenschilddrüsen-Allotransplantation ohne Immunsuppression.

Nachdem 1989 Fu und Sun über die erste erfolgreiche Allotransplantation im Tierversuch mittels „Alginat-Mikroenkapsulierung“ berichteten, wurde dieses Verfahren der Mikroenkapsulierung kontinuierlich weiterentwickelt. Zunächst überlebten so in zahlreichen Langzeittierversuchen syn- und transgen transplantierte, kultivierte Nebenschilddrüsen-Gewebepartikel [Hasse et al., 1996; Hasse et al., 1997a; Hasse et al., 1997b; Hasse et al., 1997c].

1994 erfolgte der erste Bericht über eine erfolgreiche Allotransplantation von kultivierten Nebenschilddrüsen-Einzelzellen bei Patienten mit hormoneller Aktivität der Transplantate ohne Immunsuppression [Tolloczko et al., 1994].

1995 folgte die erste Allotransplantation von Nebenschilddrüsen-Einzelzellen nach Reduktion ihrer MHC 1- und 2 Antigene mit Transplantatfunktion über 12 Wochen und 1997 die erste klinische Allotransplantation von kultiviertem und mikroenkapsulierten Nebenschilddrüsen-Gewebepartikeln mit Transplantatfunktion über 12 Wochen [Hasse et al., 1998].

Ob sich dieses Prinzip klinisch durchsetzen kann, ist noch fraglich, da die Transplantate derzeit langfristig nicht ihre Funktion aufnahmen.

Es bleibt somit nach wie vor Forschungsbedarf, um einem postoperativen Hypoparathyreoidismus vorzubeugen.

Das vorliegende Modell verfolgte daher das Ziel, durch ein genaueres Verständnis der Angiogenese in Zukunft bessere klinische Erfolge bei Patienten mit postoperativem Hypoparathyreoidismus zu erlangen.

4.2 Modell der Rückenhautkammer und der Intravitalmikroskopie

Es gibt nur wenige Modelle, bei denen in vivo mikrozirkulatorische Parameter visualisiert werden können und bei denen mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungen die Darstellung des dynamischen Verlaufs von Angiogenese und Revaskularisierung möglich ist. Dazu zählen das Ohr der haarlosen Maus zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Hautmikrozirkulation [Barker et al., 1989] und die Rückenhautkammerpräparation [Lehr et al., 1993b].

Als Untersuchungstechnik zur Erfassung der Mikrozirkulation des transplantierten Nebenschilddrüsengewebes diente in der vorliegenden Studie die intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Dies beinhaltete sowohl die sequentielle Dokumentation der Angiogenese und Revaskularisierung des transplantierten Gewebes, als auch die Analyse des neuformierten mikrovaskulären Netzwerkes. Die Versuche zielten darauf ab, einen dynamischen Verlauf der Angiogenese / Revaskularisierung an ein und demselben Tier über längere Zeit zu erfassen. Die Angiogenese / Revaskularisierung konnte auf diese Weise quantifiziert werden.

Ein weiterer Vorteil dieser Modelle liegt darin, dass die Tiere für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen keine Narkose benötigten, so dass ein Einfluss der Narkose auf die mikrohämodynamischen Parameter wie Gefäßdurchmesser und Erythrozytenfliessgeschwindigkeit vermieden werden konnte [Colantuoni et al., 1982; Messmer et al., 1984; Intaglietta and Messmer, 1983].

Das Ohr der haarlosen Maus ist ein Modell mit geringem Aufwand, welches frei von chirurgischem Trauma und Narkose die Möglichkeit bietet, über einen längeren Versuchszeitraum die Mikrozirkulation der Haut zu beobachten.

Um die Mikrozirkulation von Nebenschilddrüsengewebe zu beobachten ist dieses Modell jedoch ungeeignet.

Das Modell der Rückenhautkammer, welches für die Maus erstmals 1993 von Lehr und Mitarbeitern [Lehr et al., 1993b] beschrieben worden ist, eignete sich hingegen für diese Versuche sehr gut.

Denn das Modell der Rückenhautkammer ermöglichte eine einfache Gewebetransplantation und eine Quantifizierung des dynamischen Verlaufs von Angiogenese und Revaskularisierung des transplantierten Gewebes. Mittels Intravitalmikroskopie war es möglich mikrohämodynamische Parameter (s. 2.6.2) am wachen Versuchstier über einen längeren Zeitraum zu ermitteln.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung von Angiogenese und Revaskularisierung wurde

das Rückenhautkammermodell bereits für verschiedene Gewebe angewandt, so z.B. für Untersuchungen der Milz [Foitzik et al., 1988], des Kolon-Adeno-Karzinoms [Leunig et al., 1992], von Tumoren [Endrich et al., 1982a; Endrich et al., 1982b], Langerhans Inseln [Menger et al., 1990b], von synthetischen bzw. biologischen Implantationsmaterialien [Menger et al., 1990a; Menger et al., 1992], von Fettgewebe [Langer et al., 2002], Ovarialfollikeln [Vollmar et al., 2001] und malignem Gliom [Vajkoczy et al., 1998].

Ein Nachteil war, dass die maximale Beobachtungszeit dieser Kammerpräparationen bei etwa 3-4 Wochen lag, da nach dieser Zeit die Haut an Spannung verlor und die Rückenhautkammer nicht mehr an der richtigen Stelle fixiert war [Funk et al., 1986].

Während unserer Versuche bei der athymen Nacktmaus hatte die Haut bereits nach drei Wochen stark an Spannung verloren, und die Kammern waren teils verzogen, so dass eine intravitalmikroskopische Auswertung an Tag 19 bei einem Teil der Tiere nicht mehr möglich war. Die Haut der athymen Nacktmaus ist besonders dünn, so dass sie der Belastung der Kammer nach dieser Zeit nachgab.

Dennoch war dieser verhältnismäßig lange Beobachtungszeitraum für Untersuchungen der Angiogenese / Revaskularisierung an ein und demselben Tier einzigartig im Vergleich zu vorhergehenden Studien zur Angiogenese und Revaskularisierung von Nebenschilddrüsengewebe.

So beschrieben z.B. Ander et al. 1997 die Revaskularisierung von menschlichem Nebenschilddrüsengewebe nach Transplantation auf die athyme Nacktmaus [Ander et al., 1997], jedoch ohne Rückenhautkammer.

Hier ging der Versuchszeitraum zwar über 12 Wochen, jedoch mußte pro Versuchszeitpunkt ein neues Tier verwendet werden, da derartige histomorphologische Untersuchungen jeweils nur einmal pro Tier post mortem möglich sind. Die Revaskularisierung von normalem, adenomatösem und hyperplastischem Gewebe wurde mittels Licht- und Elektronenmikroskopie, Immunhistochemie und Autoradiographie untersucht.

Der dynamische Verlauf der Angiogenese / Revaskularisierung bei dem selben Tier über längere Zeit hinweg war in dieser *ex vivo* Studie somit nicht ermittelbar.

Bereits 1984 untersuchten Saxe et al. [Saxe, 1984] die Angiogenese von menschlichem Nebenschilddrüsengewebe nach Transplantation in die Iris von Neuseeland-Kaninchen.

Diese Versuche erstreckten sich über einen Zeitraum von 5 Tagen.

Jedoch erfolgte hier die Beobachtung der Angiogenese über den Versuchszeitraum hinweg lediglich makroskopisch. An Tag 5 wurde noch zusätzlich eine Histologie durchgeführt. Ein dynamischer Langzeitverlauf mittels mikrohämodynamischer Parameter war auch hier nicht

möglich. Die *ex vivo* Studien haben zum Einen den Nachteil, dass es bei der Präparation (Fixierung, Einbettung, etc.) des Gewebes zu Veränderungen der kapillaren Durchmesser kommen kann. Zum Anderen ist keine Untersuchung des dynamischen Verlaufs der verschiedenen Mikrozirkulationsparameter über längere Zeit möglich, sondern lediglich eine einmalige Analyse der Mikrozirkulation post mortem.

Mikrohämodynamische Messungen sollten daher nur am wachen Versuchstier und nicht an *ex vivo*-Modellen durchgeführt werden.

Des Weiteren gab es noch *in vitro* Untersuchungen [Carter et al., 1996] zum Thema Angiogenese von menschlichem Nebenschilddrüsengewebe, die aber nur begrenzt auf die physiologischen Bedingungen bei der Transplantation von menschlichem Nebenschilddrüsengewebe übertragbar sind.

Unabhängig von der Transplantation von Nebenschilddrüsengewebe wurde bereits im Jahre 1924 von Sandison ein transparentes Kammermodell am Kaninchenohr entwickelt.

Während jedoch in diesen Kammerpräparationen lediglich Granulationsgewebe [Falkvoll et al., 1984] oder subkutanes Gewebe [Papenfuss et al., 1979] beurteilt werden konnte, erlaubt die Präparation des Rückenhautmuskels beim Rückenhautkammermodell die Beurteilung der Mikrozirkulation der quergestreiften Skelettmuskulatur sowohl in Mäusen [Lehr et al., 1993b], als auch in Ratten [Cardon et al., 1970] und Hamstern [Endrich et al., 1980].

Ausgedehnte Untersuchungen konnten zeigen, dass das Präparationsareal den anatomischen und physiologischen Bedingungen des Gewebes vor Kammerimplantation entspricht. Die Versuchseinschlusskriterien in der vorliegenden Studie entsprachen den von Sewall [Sewell, 1966] geforderten physiologischen Bedingungen. Als Material für die Kammern hat sich Titan bewährt, da es stabil und damit wiederverwendbar ist, biologisch inert ist und eine minimale Temperaturleitfähigkeit garantiert [Vajkoczy, 1996].

Der Vorteil des Kammermodells als Transplantationsort für das Nebenschilddrüsengewebe gegenüber vorherigen Studien wie bei Saxe et al. [Saxe, 1984], die in die Iris von Neuseeland-Kaninchen transplantierten, oder bei Carter et al. [Carter et al., 1996; Carter et al., 2000], die *in vitro* Modelle verwendeten, lag u.a. darin, dass auf Muskelgewebe transplantiert wurde. Es bestand damit ein enger Bezug zur Klinik, wo das Nebenschilddrüsengewebe bei der Autotransplantation in Muskelgewebe eingebettet wird, um dort nach Anwachsen des Gewebes wieder erneut seine Funktion aufzunehmen. Weitere Implantationsorte, die in der Literatur beschrieben wurden, war der M. glutaeus [Schachter et al., 1990; Schachter et al., 1989; Tanaka et al., 1996b; Tanaka et al., 1996a] und der M. spinalis [Ander et al., 1997] von Mäusen. In diesen Studie wurde das Gewebe zwar ebenfalls

realitätsnah in Muskelgewebe eingebettet, war jedoch weiterer Beobachtung nicht mehr zugänglich. Eine Untersuchung des Gewebes nach histomorphologischen Aspekten war nur post mortem einmalig möglich.

Daher ist im Rahmen heutiger technischer Möglichkeiten die intravitale Fluoreszenzmikroskopie eine gut geeignete Untersuchungsmethode zur Beurteilung der Mikrozirkulation von transplantiertem Nebenschilddrüsengewebe, wenngleich diese Methode durch die Dicke des Transplantates und die limitierte dreidimensionale Darstellung eingeschränkt ist.

Die Möglichkeiten zur detaillierten Analyse der Mikrohämodynamik sind mit der Einführung quantitativer, intravitalmikroskopischer Methoden zur Analyse der Mikrozirkulation [Intaglietta and Tompkins, 1971; Intaglietta and Tompkins, 1972; Ley et al., 1987] und deren Kombination mit Videotechniken [Intaglietta et al., 1975] entscheidend verbessert worden.

Zusätzlich zur Untersuchung der Mikrozirkulation, und damit von Angiogenese und Revaskularisierung des transplantierten Gewebes mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie bot das vorliegende Modell die Möglichkeit zur Kombination von *in vivo*- und *ex vivo*-Verfahren.

Die vorliegende Studie erlaubte daher nicht nur die Quantifizierung der Angiogenese am lebenden Tier, sondern liess eine zeitgleiche Untersuchung der Funktion des transplantierten Gewebes mittels PTH-Bestimmung und post mortem eine histomorphologische Begutachtung zu (s. 3.5). Den Einfluß von Wachstumsfaktoren auf die PTH-Ausschüttung prüften wir zusätzlich in einem unabhängigen Experiment post mortem (s. 3.4.).

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie

4.3.1.1 Angiogenese /Revaskularisierung

Die Autotransplantation von Nebenschilddrüsengewebe in der operativen Behandlung eines HPT ist nach wie vor die Methode der Wahl.

Bei den Patienten, bei denen es postoperativ zu Transplantatdysfunktionen kommt, könnte ein besseres Verständnis der Angiogenese von Bedeutung sein.

Das Nebenschilddrüsengewebe wird nach Transplantation zuerst durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Damit das Gewebe jedoch langfristig seine Funktion wieder aufnehmen kann, müssen neue Gefäße einwachsen, da nur so eine adäquate

Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet ist. Des Weiteren sind Gefäße die Voraussetzung für einen Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut. Die Angiogenese ist daher eine Grundvoraussetzung für die Funktionsfähigkeit des Transplantates [Rothmund, 1991].

Folkman et al. beschrieben 1995 allgemein, dass Angiogenese fundamental für die Reproduktion, Entwicklung und Reparatur von Geweben ist. Am Besten ist die Angiogenese im Zusammenhang mit Tumoren erforscht. Jedoch auch im physiologischen Bereich, wie bei der Menstruation, der Entwicklung der Plazenta und der Wundheilung kommt es zur erwünschten Angiogenese [Folkman, 1995], ebenso auch bei der Angiogenese von transplantiertem Nebenschilddrüsengewebe.

Die genauen Mechanismen, die dazu führen, dass die Angiogenese in Gang gesetzt wird, sind noch nicht vollständig geklärt. Wachstumsfaktoren wie VEGF spielen jedoch dabei eine entscheidende Rolle [Carter et al., 2000].

Wann jedoch die VEGF-Expression in Gang gesetzt wird, ist unklar.

In diesem Zusammenhang fanden Carter et al. in vitro heraus, dass Nebenschilddrüseninduzierte Angiogenese VEGF-abhängig ist. Die Schlußfolgerung war, dass menschliches Nebenschilddrüsengewebe in der Lage ist, durch parakrine VEGF-Aktivität Angiogenese zu induzieren [Carter et al., 2000].

Folkman et al. [Folkman, 1995] beschrieben unter anderem, die Hochregulation von VEGF sei die Antwort auf Hypoxie. Auch Stavri et al. [Stavri et al., 1995] fanden heraus, dass Hypoxie die VEGF mRNA massiv stimulierte. Ebenso Shweiki et al. [Shweiki et al., 1992]. Da die Nebenschilddrüsen direkt nach Transplantation nur durch Diffusion versorgt werden, lag nahe, daß es übergangsweise zu hypoxischen Zuständen kommt. Dies könnte zur vermehrten VEGF-Expression und damit zur Angiogenese-Induktion beitragen.

Bei Akino et al. [Akino et al., 2000] heißt es, dass das Parathormon-related Peptid (PTHrP) ein potenter Angiogenese-Faktor sei. PTHrP wird beispielsweise von Tumoren exprimiert. Jedoch handelte es sich bei dem verpflanzten Nebenschilddrüsengewebe um die Expression des intakten PTH (iPTH), und nicht um das Hormon-related Peptid. Diese Studie ist daher für die Angiogense von transplantiertem Nebenschilddrüsengewebe nicht relevant.

In einer weiteren in vitro-Studie von Carter et al. [Carter et al., 1996] wurde in dem verwendeten Kollagen1-Gel ein signifikanter Anstieg neu einwachsender Gefäße bei Zugabe von Nebenschilddrüsengewebe beobachtet. Es wurde keine erhöhte Gefäßdichte in Abhängigkeit von steigenden iPTH- und steigenden Kalziumkonzentrationen festgestellt.

Dies führte u.a. zu der Hypothese, dass Nebenschilddrüsengewebe allein in der Lage ist,

Angiogenese zu stimulieren.

Über die Mechanismen, welche für die Induktion der Angiogenese, die Revaskularisierung der Transplantate und die Umdifferenzierung der neuen Endothelzellen verantwortlich sind, ist somit nach wie vor wenig bekannt.

Es wird allgemein angenommen, dass Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese das Wechselspiel von mindestens zwei extrazellulären Signalen benötigen.

Hierbei scheinen durch lösliche Wachstumsfaktoren stimulierte Endothelzellen durch mechano-chemische Veränderungen der extrazellulären Matrix während der Angiogenese in ihren Ruhephasen, Teilungsphasen und Differenzierungsphasen beeinflusst zu werden [Nicosia and Madri, 1987; Ingber and Folkman, 1989; Ingber, 1991].

Insbesondere die makromolekulare Zusammensetzung der mikrovaskulären extrazellulären Matrix, welche sich parallel zu den wachsenden Mikrogefäßen einer Reihe von dynamischen Veränderungen unterzieht, scheint hierbei von Bedeutung zu sein. So bewirken unterschiedliche Anteile des Makromoleküls Fibronectin in vitro ein unterschiedliches Wachstums- und Ausdifferenzierungsverhalten Wachstumsfaktor stimulierter Endothelzellen [Ingber and Folkman, 1989].

Weiterhin ist es durchaus denkbar, dass durch die extrazelluläre Matrix ein dreidimensionales Gerüst ausgebildet wird, welches die Angiogenese moduliert und in „richtige Bahnen lenkt“, und somit für den Wiederaufbau der Angioarchitektur verantwortlich ist [Ingber and Folkman, 1989].

In der vorliegenden Studie waren in der Transplantatgruppe die ersten angiogenetischen Gefäße an Tag 5 zu erkennen. Die Gefäße wiesen dabei die typischen Zeichen der Angiogenese auf: Kalibersprünge, coilings, sprouts (s. Abb. 14). Interessant war, dass die mittransplantierten Spendergefäße wahrscheinlich für die neu einwachsenden Gefäße als Schienen dienten (s. Abb. 16). Im weiteren Versuchsverlauf konnten wir ansteigende Gefäßdichten messen. Zu einem vergleichbaren Resultat kamen auch Ander et al. [Ander et al., 1997], es konnte jedoch im Vergleich zu der vorliegenden Studie kein Langzeitversuch am selben Tier vorgenommen werden, da die immunhistochemische Darstellung der Gefäße lediglich post mortem möglich war. Die Ergebnisse von Ander et al. zeigten ebenfalls ein Einwachsen von Empfängergefäßen in das Transplantat nach Tx von menschlichem Nebenschilddrüsengewebe auf Nacktmäuse. Nach einer Woche waren immunhistochemisch zahlreiche Gefäßsprosse in der Peripherie des Transplantates zu sehen und man konnte eine Endothelzell- und Fibroblastenproliferation beobachten. Es wurden u.a. menschliche Endothelzellen und Maus-Endothelzellen mittels Immunhistochemie dargestellt. Interessant

war hierbei, dass die Gefäße, die anfangs in der Peripherie des Transplantates innerhalb der ersten Woche zu sehen waren, mit menschlichen Endothelzellen ausgekleidet waren, während die Endothelzellen, die nach einer Woche innerhalb des gesamten Transplantates entdeckt wurden, Maus-Endothelzellen waren. In der Studie hieß es, man hätte keinen Beweis dafür, dass eine Fusion zwischen den mittransplantierten, menschlichen Gefäßen und den neu einwachsenden Maus-Gefäßen stattfinden würde, die neu einwachsenden Gefäße wären jedoch oft in der Nähe der menschlichen, übriggebliebenen Gefäße. Die Vermutung, dass die mittransplantierten menschlichen Gefäße als Schienen für die neu einwachsenden Maus-Gefäße dienten, ging somit aus beiden Studien hervor, ein Beweis war jedoch nicht möglich.
Die Intravitalmikroskopie (s. Abb. 16) unserer Studie zeigte ebenfalls anfangs die mittransplantierten, intravitalmikroskopisch undurchflossenen Gefäße und die daran direkt anschließenden neu einwachsenden Gefäße.
Die mittransplantierten Spendergefäße könnten demnach ebenfalls einen Stimulus für das neue Einwachsen von Gefäßen darstellen.
In diesem Zusammenhang wäre es interesant zu wissen, ob es in Zukunft möglich wäre, nur zu Beginn der Transplantation von körperfremdem Nebenschilddrüsengewebe eine Immunsuppression durchzuführen und sobald die neu eingewachsenen Gefäße von empfängereigenen Endothelzellen ausgekleidet sind, die Immunsuppression wieder abzusetzen.
Denn das Endothel der mikrovaskulären Strombahn eines Transplantates gilt als das primäre Ziel in der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem des Empfängerorganismus [Jooste et al., 1981; Forbes et al., 1983].
Die Interaktion zytotoxischer CD8-positiver T-Lymphozyten mit MHC 1-Antigenen, die Anlagerung zirkulierender präformierter Antikörper mit Aktivierung der Komplementkaskade oder eine direkte Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg mit konsekutiver Adhäsion neutrophiler Granulozyten am Endothel werden als Mechanismus der frühen Transplantatabstoßung diskutiert [Platt et al., 1990; Dalmasso et al., 1991; Vercellotti et al., 1991; Johnston et al., 1992].
Da das Endothel die Hauptangriffsfläche für eine Abstoßungsreaktion darstellt, wäre der Ansatz einer zukünftigen Allotransplantation mit vorübergehender Immunsuppression bis das Gewebe von Gefäßen mit körpereigenem Endothel versorgt wird bei Patienten mit Transplantatversagen sicher interessant.

Das transplantierte Nebenschilddrüsengewebe scheint also in der Lage zu sein Angiogenese

hervorzurufen. Inwieweit jedoch Hypoxie, PTH, Nebenschilddrüsengewebe an sich, die mittransplantierten Spendergefäße oder Wachstumsfakoren dabei eine Rolle spielen, bleibt nicht vollständig geklärt.

4.3.1.2 Auswertung der mikrohämodynamischen Parameter

Am Aussagekräftigsten für die Beurteilung der Angiogenese und Revaskularisierung ist die Bestimmung der funktionellen Gefäßdichte. Sie erlaubte eine Quantifizierung der neu eingewachsenen Gefäße. Ein Durchfokussieren des gesamten Transplantates mit Hilfe des Mikroskops ermöglichte eine dreidimensionale Erfassung des mikrovaskulären Netzwerkes. 6 ROIs wurden jeweils erfasst und computergestützt ausgewertet [Zeintl et al., 1986]. In der Transplantatgruppe der vorliegenden Studie waren an Tag fünf die ersten angiogenetischen Gefäße erkennbar, im weiteren Verlauf kam es zu ansteigenden Gefäßdichten. An Tag fünf waren in der Kontrolle keine Gefäße erkennbar. Hingegen waren ab Tag 12 bei einem Teil der Tiere aus der Kontrollgruppe vergleichbar hohe Gefäßdichten wie in der PTX zu messen. Wir interpretierten diesen Befund dahingehend, dass durch die Hitzebehandlung das Gewebe aus der Kontrollgruppe so stark geschädigt worden ist, dass eine Fettgewebedegeneration stattgefunden hat. Diese Fettgewebedegeneration war sowohl in der IVM, als auch histologisch nachweisbar (s. Abb. 24+33). Funktionell war das Gewebe jedoch vollständig inaktiv.

Anhand der ausgewerteten planimetrisch erfassten Flächen des transplantierten Gewebes als einzigen nicht-mikrohämodynamischen Parameter stellten wir fest, dass das Gewebe aus der Kontrollgruppe an Tag 19 nicht mehr abgrenzbar war, im Gegensatz zum annähernd gleich bleibenden Gewebe aus der Transplantatgruppe.
Es lag die Vermutung nahe, dass das avitale, denaturierte Gewebe aus der Kontrollgruppe im Laufe der Zeit resorbiert wurde. Des Weiteren waren die Flächen der Transplantate aus der Kontrollgruppe an Tag 5 signifikant höher als in der PTX. Wahrscheinlich haben die Zell-zu Zell-Kontakte durch die Hitzebehandlung des Gewebes gelitten, so dass sich das Gewebe nach Implantation in die Kammer durch den Druck des aufliegenden Deckglases mehr ausgebreitet hat.
Sowohl die Gefäßdurchmesser, als auch die Erythrozytenfliessgeschwindigkeit blieben in der vorliegenden Studie in der PTX und in der Kontrolle über den gesamten Versuchszeitraum hinweg nahezu konstant.

4.3.2 Endokrine Funktion

Neben der Quantifizierung der Angiogenese / Revaskularisierung wurde in dieser Studie zeitgleich die Funktion des transplantierten Gewebes mittels iPTH-Bestimmung untersucht, und anschließend ein möglicher Zusammenhang zwischen beiden Parametern analysiert.

Tendentiell stellten wir zwar in der PTX sowohl steigende Gefäßdichte im Laufe der Versuchszeit, als auch steigende PTH-Spiegel fest, beide Parameter waren jedoch nicht positiv korreliert. Diese Tatsache lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine hohe Gefäßdichte, und damit ausgeprägt stattgefundene Angiogenese nicht automatisch eine hohe PTH-Freisetzung nach sich zieht. Ein weiterer Grund der negativen Korrelation lag jedoch auch daran, dass bei zwei Tieren aus der PTX nach Tag 5 die PTH-Produktion versiegte. Bei diesen Tieren wurden somit hohe Gefäßdichten bei nicht nachweisbarem PTH gemessen. Des Weiteren waren an Tag 5 bei 6 Tieren aus der PTX noch keine Gefäße messbar, während jedoch schon PTH-Spiegel bestimmt werden konnten. Diese Begebenheiten tragen nicht zu einer positiven Korrelation bei, wobei klar erkennbar war, dass in der PTX die Gefäßdichten und die PTH-Spiegel im Laufe der Zeit anstiegen.

Die Bestimmung des humanen iPTH war in dieser Studie von enormer Wichtigkeit, da nur durch Nachweis des humanen iPTH gezeigt werden konnte, dass es sich bei den neu eingewachsenen Gefäßen nicht nur einfach um eine unspezifische Entzündungsreaktion handelte, sondern dass es durch die Gefäße möglich war, humanes iPTH von dem endokrin aktiven Gewebe in die Blutbahn freizusetzen. Messungen von humanem iPTH nach Transplantation (TX) von menschlichem Nebenschilddrüsengewebe in Mäuse gibt es bereits in mehreren vorangegangenen Studien, jedoch nicht im Zusammenhang mit Angiogenese.

So stellten Tanaka et al. [Tanaka et al., 1996b], [Tanaka et al., 1996a] eine positive Korrelation zwischen dem transplantierten Volumen und der iPTH-Sekretion fest. Des Weiteren fanden sie heraus, daß kryokonserviertes Gewebe nach TX auf die athyme Nacktmaus funktionsfähig war, allerdings wurde im Vergleich zu frischem Gewebe nur die Hälfte an iPTH exprimiert.

Der Hintergrund der zusätzlich bestimmten Kalzium-Konzentrationen war die Fragestellung, ob sich die Kalziumspiegel mit steigenden PTH- Spiegeln veränderten, ob sie eventuell einen Einfluss auf die PTH-Freisetzung hatten und ob sie in PTX und Kontrolle unterschiedlich waren. Tanaka et al. [Tanaka et al., 1996b] stellten in diesem Zusammenhang fest, dass Mäuse, die nach Transplantation von menschlichem Nebenschilddrüsengewebe in den M. glutaeus eine „low-calcium-diet“ erhielten, eine beschleunigte iPTH-Sekretion aufwiesen.

Schachter et al. [Schachter et al., 1990] beschrieben die iPTH-Sekretion nach

Nebenschilddrüsentransplantation in den M. glutaeus von Mäusen beim pHPT und sHPT über 9-13 Monate. Sie konnten in beiden Gruppen erhöhte Spiegel der Kalziumkonzentration und der 25-hydroxyvitamin D-1α-hydroxylase-Aktivität nachweisen. In dieser Studie scheinen die exprimierten PTH-Spiegel Einfluß auf die Kalziumkonzentration der Maus genommen zu haben.

Der Vorteil dieser Studie liegt in dem langen Beobachtungszeitraum von 9-13 Monaten. Jedoch ist diese Studie nur auf die Funktion des transplantierten Gewebes beschränkt.

In einer weiteren Studie beschrieben Schachter et al. [Schachter et al., 1989] den Unterschied von transplantiertem Adenomgewebe von Patienten mit pHPT im Vergleich zu normalem Gewebe (nach TX auf die Maus). Die iPTH-Spiegel in der Adenomgruppe waren signifikant höher. Nur ein Teil der Tiere mit hohen iPTH-Spiegeln entwickelte hier auch eine Hyperkalzämie.

Im Gegensatz dazu stellten wir fest, dass sich die gemessenen Kalziumkonzentrationen über die Zeit hinweg relativ konstant verhielten - sowohl in der PTX, als auch in der Kontrolle. Das humane iPTH scheint daher keinen Einfluß auf die Kalziumkonzentration gehabt zu haben, da sonst bei den hohen gemessenen iPTH-Spiegeln massive Kalziumkonzentrationsanstiege hätten auftreten müssen.

Lediglich an Tag 19 war in PTX und Kontrolle eine signifikant erhöhte Kalziumkonzentration bestimmt worden. Wahrscheinlich liegt die Ursache dieses Befundes darin, dass die Tiere durch die intrakardiale Blutabnahme an Tag 19 einen Schock erlitten, der für die hohen Kalziumkonzentrationen verantwortlich war. Denn an den Tagen 5 und 12 wurde jeweils der retrobulbäre Plexus punktiert, während an Tag 19 die letzte Blutabnahme intrakardial erfolgte.

Im Vergleich zu den physiologischen Kalziumspiegeln bei der Maus, die zwischen 9 mg/dl und 12 mg/dl liegen, waren die Kalziumspiegel in beiden Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum erniedrigt. Sie lagen zwischen 4.5 mg/dl und 9 mg/dl. Die humanen PTH-Spiegel scheinen daher keinen Einfluß auf die Kalziumspiegel der Maus genommen zu haben. Umgekehrt könnte es jedoch möglich sein, dass die relativ niedrigen Kalziumspiegel einen Einfluss auf die iPTH-Sekretion hatten, denn die humane iPTH-Sekretion ist schließlich u.a. von der Kalziumkonzentration im Blut abhängig.

Luts et al. [Luts and Sundler, 1998] beschrieben in diesem Zusammenhang nach Autotransplantation von Ratten-Nebenschilddrüsen in den renalen subkapsulären Zwischenraum, dass neu einwachsende Nervenfasern, v.a. sympathische Nervenfasern, bevorzugt um die Blutgefäße herum einwachsen. Später folgen sympathische und sensorische

Nervenfasern. Die Nebenschilddrüseninnervation könnte somit für die iPTH-Regulation von Wichtigkeit sein.
Roush et al. [Roush, 1998] ließen vermuten, dass Gefäß- und Nervenwachstum koordiniert sein könnten.
Nach Grunditz et al. [Grunditz et al., 1996] heißt es auch, sympathische, parasympathische und sensorische Nervenfasern seien um die Gefäße und um die endokrinen Zellen herum platziert, was vermuten lässt, dass sie sowohl bei der vaskulären Regulation, als auch bei der Hormonsekretion eine Rolle spielen könnten.

4.3.3 VEGF-Expression

Mit Hinblick auf die Umdifferenzierung der Skelettmuskelkapillaren in der Rückenhautkammerpräparation zu neuen Mikrogefäßen vom fenestrierten Typ im Rahmen der Angiogenese, muß neben der extrazellulären Matrix aus einer Vielzahl potentiell beteiligter Wachstumsfaktoren (s. unten) auch die Beteiligung des Vascular Permeability Factors (VPF)/ Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) diskutiert werden.
Dieser Wachstumsfaktor scheint einzigartig in seinen Eigenschaften zu sein, spezifisch eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, Endothelzellproliferation und Angiogenese vermitteln zu können [Connolly et al., 1989].
Dieses Endothelzellmitogen akkumuliert überwiegend in Blutgefäßen von Geweben mit einer hohen angiogenetischen Aktivität und einem hohen endothelialen Zellumsatz, wie Tumoren [Dvorak et al., 1991] [Kim et al., 1993] oder heilenden Hautwunden [Brown et al., 1992] etc.
In der vorliegenden Studie sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Funktion des transplantierten Gewebes mittels PTH-Bestimmung und der Expression des Wachstumsfaktors VEGF mittels Western-Blot-Analyse überprüft werden. Der in dieser Versuchsreihe ermittelte Zusammenhang beider Parameter liess die Vermutung zu, dass der Wachstumsfaktor VEGF von dem endokrin aktiven Gewebe vermehrt sezerniert wurde, und damit möglicherweise eine bedeutende Rolle für die stattfindende Angiogenese spielte.
Die Möglichkeit zur Beschleunigung und Verbesserung von Angiogenese und Revaskularisierung durch angiogenetische Substanzen könnte für die klinische Nebenschilddrüsentransplantation bei Patienten mit permanentem Hypoparathyreoidismus von hohem Interesse sein.
Bei Carter et al. verhielt es sich ähnlich. Carter et al. [Carter et al., 2000] vermuteten, dass der relativ hohe Erfolg von transplantiertem Nebenschilddrüsengewebe zum Teil darauf zurückgeführt werden könne, dass Nebenschilddrüsengewebe in der Lage sei, Angiogenese mittels VEGF-Exprimierung zu induzieren. Das transplantierte Gewebe revaskularisiere und

reinnerviere spontan. VEGF als potenter angiogenetischer Faktor werde von vielen Tumoren und hypoxischem Gewebe produziert.

Im Umkehrschluß stellte sich die Frage, ob eine VEGF-Inhibition vielleicht zu einem Versiegen der Angiogenese bzw. der PTH-Produktion führen könnte. Diese Fragestellung wäre sicherlich ein interessanter Ansatz für weitere experimentelle Versuche.

Die Inhibition von Wachstumsfaktoren eröffnet ein weiteres großes Gebiet der Forschung in Zusammenhang mit vielen weiteren Fragestellungen.

Wachstumsfaktoren spielen schließlich nicht nur im positiven Zusammenhang bei der erwünschten Angiogenese nach Nebenschilddrüsentransplantation eine Rolle, sondern sie haben ebenfalls einen Effekt auf das Wachstum der Nebenschilddrüsenzellen im Zusammenhang mit Nebenschilddrüsenerkrankungen im Rahmen eines Hyperparathyreoidismus oder im Zusammenhang mit bösartigen Neubildungen von Nebenschilddrüsen. Sadler et al. [Sadler et al., 1996] fanden heraus, dass Wachstumsfaktoren wie TGFα (transforming growth factor α), und IGF (insulin like growth factor) das Zellwachstum signifikant steigerten.

Zimering et al. [Zimering et al., 1990] wiesen dem bFGF (basic fibroblast growth factor) die Ausübung des mitogenen Stimulus bei Patienten mit MEN zu.

Bereits 1986 zeigten Duh et al. [Duh et al., 1986], dass der EGFr (epidermal growth factor receptor) bei einigen Formen von Hyperparathyreoidismus vorkam, und dass er möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung eines HPT spielen könnte.

Bei den oben erwähnten Studien wäre daher eine Inhibition der Wachstumsfaktoren von Bedeutung. Ebenfalls im Zusammenhang bei der Behandlung eines Nebenschilddrüsenkarzinoms. Bei dem zwar seltenen (< 0,1 %), aber möglichen Nebenschilddrüsenkarzinom spielt die Angiogenese, wie bei vermutlich allen bösartigen Neubildungen eine Rolle.

Es gibt bereits Studien, dass die Inhibition Wachstumsfaktor-stimulierter Angiogenese das Tumorwachstum unterdrückt [Kim et al., 1993].

Mit Hilfe des Rückenhautkammermodells und der Möglichkeit der Mikrozirkulationsbeobachtung über einen längeren Zeitraum bietet es sich daher an, Erkrankungen mit unerwünschter Angiogenese mittels Angiogenese-Inhibitoren zu behandeln, und intravitalmikroskopisch zu untersuchen.

Eine Hemmung der Wachstumsfaktoren, und damit eine Hemmung der Angiogenese könnte in diesem Zusammenhang von klinischem Interesse bei der Behandlung von Nebenschilddrüsenkarzinomen sein.

5 Zusammenfassung

Die Autotransplantation von Nebenschilddrüsengewebe ist in der Behandlung des Hyperparathyreoidismus nach wie vor die Methode der Wahl.
Dieses Prinzip ist auch gut etabliert, dennoch gibt es Patienten, bei denen postoperativ eine Nebenschilddrüsenunterfunktion verbleibt.
Ein genaueres Verständnis der Angiogenese bzw. Revaskularisierung nach freier Nebenschilddrüsen-Autotransplantation könnte daher erheblich zur Verbesserung des klinischen Erfolgs beitragen. Denn im Gegensatz zu Herz, Lunge, Leber, Niere, Pankreas etc., die durch den Chirurgen vaskulär anastomosiert werden, kommt der Revaskularisierung der frei transplantierten Nebenschilddrüsen für deren Überleben, aber auch für deren physiologische Funktion eine entscheidende Bedeutung zu.
Zur Mikrozirkulation transplantierter Nebenschilddrüsen gibt es bislang wenig Studien.
Es ist mit dieser Studie gelungen, ein Modell zu entwickeln, welches es uns erlaubte, die Mikrozirkulation von menschlichem, transplantiertem Nebenschilddrüsengewebe wiederholt über einen Versuchszeitraum von 19 Tagen zu beobachten und den dynamischen Verlauf der Angiogenese / Revaskularisierung zu quantifizieren bei simultaner Messung der endokrinen Transplantatfunktion mittels iPTH-Bestimmung. Als Versuchstier diente die athyme Nacktmaus (CD-1 nuBR), der für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen eine dorsale Rückenhautkammer implantiert wurde. Nach Transplantation von menschlichem Nebenschilddrüsengewebe von Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus erfolgten nach Kontrastverstärkung durch FITC-Dextran in vivo intravitalmikroskopische Untersuchungen am wachen Versuchstier, jeweils an den Tagen 5, 12 und 19. Eine Kontrollgruppe erhielt ebenfalls menschliches Nebenschilddrüsengewebe, allerdings nach einer Gewebeinaktivierung durch Hitzebehandlung. Mittels Computer-gestützter Bildverarbeitung wurde die Fläche des mikrovaskulären Netzwerkes, die funktionelle Gefäßdichte, die kapillaren Durchmesser und die Erythrozytenfliessgeschwindigkeit in den mikrovaskulären Abschnitten des transplantierten Nebenschilddrüsengewebes bestimmt. Im Anschluß an die intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfolgte eine histologische und eine immunhistochemische Analyse ex vivo.
Des Weiteren war es mit Hilfe dieses Modells möglich, zeitgleich die Funktion des transplantierten Gewebes mittels iPTH-Bestimmung zu untersuchen, und in einer weiteren Versuchsreihe den Einfluß des Wachstumsfaktors VEGF zu überprüfen.

Es zeigten sich an Tag 5 nach Transplantation des humanen Nebenschilddrüsengewebes intravitalmikroskopisch die ersten einsprossenden Gefäße entlang der nicht perfundierten Spendergefäße mit steigenden Gefäßdichten bis Tag 19. Die histologischen Untersuchungen mittels H&E-Färbung und die Gefäßendothelmarkierung mittels vWF zeigten ebenfalls gut vaskularisiertes endokrines Gewebe. Im Gegensatz dazu waren die Kontroll-Transplantate entweder nekrotisch und teils resorbiert, oder man sah jedoch gut vaskularisiertes Gewebe mit Fettvakuolen, was sich als Fettgewebedegeneration herausstellte als Zeichen einer nicht vollständigen Inaktivierung.

Was die funktionellen Parameter anging, so wiesen alle Tiere nach der Nebenschilddrüsentransplantation im Laufe der Versuchszeit positive humane iPTH-Spiegel auf, im Gegensatz zu den Tieren aus der Kontrollgruppe, bei denen zu keiner Zeit humanes iPTH gemessen werden konnte.

Die Plasma- Kalziumspiegel zeigten keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Western-Blot Analyse für den Wachstumsfaktor VEGF ergab, dass bei den Tieren aus der Kontrollgruppe, die keine iPTH-Spiegel aufwiesen auch kein Wachstumsfaktor exprimiert wurde. Tiere mit geringen iPTH-Spiegeln hatten eine geringe und Tiere mit hoher iPTH-Konzentration hatten eine hohe Wachstumsfaktor-Expression.

Letztendlich könnte dieses Modell dazu dienen, die Mechanismen, die mit der Angiogense von Nebenschilddrüsentransplantaten und ihrer Notwendigkeit für die Transplantatfunktion zusammenhängen besser zu verstehen, um langfristig den klinischen Erfolg bei der Autotransplantation von Therapie-resistenten Patienten zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

Akino K, Ohtsuru A, Kanda K, Yasuda A, Yamamoto T, Akino Y, Naito S, Kurokawa M, Iwahori N, Yamashita S (2000) Parathyroid hormone-related peptide is a potent tumor angiogenic factor. *Endocrinology 141*: 4313-4316

Ander SJ, Blomkvist LM, Smeds SP, Johansson KJ, Molne JC (1997) Revascularisation of human parathyroid tissue transplanted to athymic mice. *APMIS* 105: 931-940

Askanazy M (1903) Über Ostitis Deformans ohne osteoides Gewebe. *Arb Geb Path Anath Inst zu Tübingen* 4: 398

Aurbach GD (1959) Isolation of parathyroid hormone after extraction with phenol. *J biol Chem* 234: 3179

Barker JH, Hammersen F, Bondar I, Uhl E, Galla TJ, Menger MD, Messmer K (1989) The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. *Plast Reconstr Surg* 83: 948-959

Berson SA, Yalow R (1963) Immunomechanical hetero-Immunoassay of bovine and human parathyroid hormone. *Proc nat Acad Sci* 49: 613

Berson SA, Yalow R (1968) Immunochemical heterogenity of parathyroid hormone in plasma. *J clin Endocrinol* 28: 1037

Blind E, Schmidt-Gayk H, Armbruster FP, Stadler A (1987) Measurement of intact human parathyrin by an extracting two-site immunoradiometric assay. *Clin Chem* 33: 1376-1381

Blumenthal HT, Walsh LB (1950) Survival of guinea pig thyroid and parathyroid autotransplants previously subjected to extremly low temperatures. *Proc Soc exp Biol* 73: 62

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Brown LF, Yeo KT, Berse B, Senger DR, Dvorak HF, Van de Water L (1992) Expression of vascular permeability factor (Vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J exp Med* 176: 1375-1379

Cardon SZ, Oestermeyer CF, Bloch EH (1970) Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res* 2: 67-76

Carter WB, Crowell SL, Boswell CA, Williams SK (1996) Stimulation of angiogenesis by canine parathyroid tissue. *Surgery* 120: 1089-1094

Carter WB, Uy K, Ward MD, Hoying JB (2000) Parathyroid-induced angiogenesis is VEGF-dependent. *Surgery* 128: 458-464

Chase LR, Aurbach GD (1968) Renal adenyl cyclase: Anatomically separate sites for parathyroid hormone and vasopressin. *Science* 159: 545

Colantuoni A, Bertuglia A, Intaglietta M, Gross JF (1982) Microangiodynamics in the artefact free microcirculation. *Int J Microcirc: Clin Exp* 265-266

Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470-1478

Dalmasso AP, Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH (1991) Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* 52: 530-533

Delorme S, Hoffner S (2003) Diagnosis of hyperparathyroidism. *Radiologe* 43: 275-283

Duh QY, Gum ET, Sancho JJ, Levin KE, Raper SE, Clark OH (1986) Epidermal growth factors receptors in parathyroid tumours. *J Surg Res* 40: 569

Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de WL, Senger DR (1991) Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 174: 1275-1278

Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K (1980) Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177: 125-134

Endrich B, Goetz A, Messmer K (1982a) Distribution of microflow and oxygen tension in hamster melanoma. *Int J Microcirc Clin Exp* 1: 81-99

Endrich B, Hammersen F, Gotz A, Messmer K (1982b) Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3. *J Natl Cancer Inst* 68: 475-485

Falkvoll KH, Rofstad EK, Brustad T, Marton P (1984) A transparent chamber for the dorsal skin fold of athymic mice. *Exp Cell Biol* 52: 260-268

Fliser D, Ritz E (1998) Disorders of calcium and phosphate homeostasis. *Internist (Berl)* 39: 825-830

Foitzik T, Funk W, Roth H, Messmer K (1988) Splenic implants:influence of particle size and fibrin fixation on vascularisation and angiarchitecture. *Pediatr Surg Int* 263-268

Folkman J (1995) Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333: 1757-1763

Forbes RD, Guttmann RD, Gomersall M, Hibberd J (1983) A controlled serial ultrastructural tracer study of first-set cardiac allograft rejection in the rat. Evidence that the microvascular endothelium is the primary target of graft destruction. *Am J Pathol* 111: 184-196

Fu XW, Sun AM (1989) Microencapsulated parathyroid cells as a bioartificial parathyroid. *Transplantation* 432-435

Funk W, Endrich B, Messmer K (1986) A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med (Berl)* 186: 259-270

Gley E (1891) Sur les fonctions du corps thyroide. *C R Soc Biol* 43: 841

Götz A (1987) Quantitative Mikrozirkulationsanalyse im amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3. Ludwig-Maximilians- Universität München. Ref Type: Thesis/Dissertation

Grunditz T, Luts L, Sundler F (1996) Innervation of the thyroid and parathyroid glands.Emphasis on neuropeptides. In *The autonomic nervous system*, Burnstock G (ed) pp 181. Harwood Academic Publishers: Amsterdam, The Netherlands

Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364

Hargrove GM, Pasieka JL, Hanley DA, Murphy MB (1999) Short- and long-term outcome of

total parathyroidectomy with immediate autografting versus subtotal parathyroidectomy in patients with end-stage renal disease. *Am J Nephrol* 19: 559-564

Hasse C, Klock G, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M (1997a) Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *Lancet* 350: 1296-1297

Hasse C, Klock G, Zielke A, Schlosser A, Barth P, Zimmermann U, Rothmund M (1996) Transplantation of parathyroid tissue in experimental hypoparathyroidism: in vitro and in vivo function of parathyroid tissue microencapsulated with a novel amitogenic alginate. *Int J Artif Organs* 19: 735-741

Hasse C, Zielke A, Klock G, Barth P, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M (1997b) First successful xenotransplantation of microencapsulated human parathyroid tissue in experimental hypoparathyroidism: long-term function without immunosuppression. *J Microencapsul* 14: 617-626

Hasse C, Zielke A, Klock G, Schlosser A, Barth P, Zimmermann U, Sitter H, Lorenz W, Rothmund M (1998) Amitogenic alginates: key to first clinical application of microencapsulation technology. *World J Surg* 22: 659-665

Hasse C, Zielke A, Klock G, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M (1997c) Isotransplantation of microencapsulated parathyroid tissue in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105: 53-56

Herrera M, Grant C, van Heerden JA, Fitzpatrick LA (1992) Parathyroid autotransplantation. *Arch Surg* 127: 825-829

Ingber D (1991) Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis. *J Cell Biochem* 47: 236-241

Ingber DE, Folkman J (1989) Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol* 109: 317-330

Intaglietta M, Messmer K (1983) Microangiodynamics, peripheral vascular resistance and the normal microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp* 2: 3-10

Intaglietta M, Silverman NR, Tompkins WR (1975) Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television methods. *Microvasc Res* 10: 165-179

Intaglietta M, Tompkins WR (1971) System for the measurement of velocity of microscopic particles in liquids. *IEEE Trans Biomed Eng* 18: 376-379

Intaglietta M, Tompkins WR (1972) On-line measurement of microvascular dimensions by television microscopy. *J Appl Physiol* 32: 546-551

Johnston PS, Wang MW, Lim SM, Wright LJ, White DJ (1992) Discordant xenograft rejection in an antibody-free model. *Transplantation* 54: 573-576

Jooste SV, Colvin RB, Soper WD, Winn HJ (1981) The vascular bed as the primary target in the destruction of skin grafts by antiserum. I. Resistance of freshly placed xenografts of skin to antiserum. *J Exp Med* 154: 1319-1331

Keutmann HT, Sauer MM, Hendy GN, O'Riordan LH, Potts JTJ (1978) Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone. *Biochemistry* 17: 5723-5729

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Philips HS, Ferrara N (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362: 841-844

Klyscz T, Junger M, Jung F, Zeintl H (1997) Cap image-a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168-175

Lahey F (1926) The transplantation of parathyroids in partial thyroidectomy. *Surg Gynecol Obstet* 508-509

Langer S, Sinitsina I, Biberthaler P, Krombach F, Messmer K (2002) Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters. *Ann Plast Surg.* 48: 53-59

Lehr HA, Krober M, Hubner C, Vajkoczy P, Menger MD, Nolte D, Kohlschutter A, Messmer K (1993a) Stimulation of leukocyte/endothelium interaction by oxidized low-density lipoprotein in hairless mice. Involvement of CD11b/CD18 adhesion receptor complex. *Lab Invest* 68: 388-395

Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K (1993b) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-1062

Leunig M, Yuan F, Menger MD, Boucher Y, Goetz AE, Messmer K, Jain RK (1992) Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res* 52: 6553-6560

Ley K, Pries AR, Gaehtgens P (1987) A versatile intravital microscope design. *Int J Microcirc Clin Exp* 6: 161-167

Loeb J (1900) On the different effects of ions upon myogenic and neurogenic rhythmical contractions and upon embryonic and muscular tissue. *Amer J Physiol* 3: 383

Luts L, Sundler F (1998) Autotransplantation of rat parathyroid glands: a study on morphological changes. *Transplantation* 66: 446-453

Mac Callum WG, Voegtlin C (1909) On the relation of tetany of the parathyroid glands and to calcium metabolism. *J exp Med* 11: 118

Mandl F (1933) Zur Technik der Parathyreoidektomie bei Ostitis fibrosa aufgrund neuer Beobachtungen. *Dtsch Z Chir* 240: 362

Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K (1990a) Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg* 38: 139-145

Menger MD, Jager S, Walter P, Hammersen F, Messmer K (1990b) A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. *Int J Microcirc Clin Exp* 9: 103-117

Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14: 519-522

Menger MD, Vajkoczy P, Leiderer R, Jager S, Messmer K (1992) Influence of experimental hyperglycemia on microvascular blood perfusion of pancreatic islet isografts. *J Clin Invest* 90: 1361-1369

Messmer K, Funk W, Endrich B, Zeintl H (1984) The perspectives of new methods in microcirculation research. *Prog Appl Microcirc* 77-90

Möslein, G (2003) Prävention Information Nebenschilddrüsenkrebs. Ref Type: Internet

Communication

Nicosia RF, Madri JA (1987) The microvascular extracellular matrix. Developmental changes during angiogenesis in the aortic ring-plasma clot model. *Am J Pathol* 128: 78-90

Owen R (1862) On the anatomy of the indian rhinoceros. *Trans Zool Soc* 4: 31

Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA (1979) A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18: 311-318

Pappenheimer AM, Wilens SE (1935) Enlargement of the parathyroid glands in renal disease. *Amer J Pathol* 11: 73

Platt JL, Vercellotti GM, Dalmasso AP, Matas AJ, Bolman RM, Najarian JS, Bach FH (1990) Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunol Today* 11: 450-456

Reichel H, Ritz E (1991) Klinik und Diagnostik des sekundären Hyperparathyreoidismus. In *Hyperparathyreoidismus*, Rothmund M (ed) pp 168-179. Stuttgart

Rothmund M (1991) *Hyperparathyreoidismus*.

Rothmund M, Wagner M, Pluntke K (1999) Reoperations for persistent or recurrent hyperparathyroidism. *Chirurg* 70: 1113-1122

Roush W (1998) Receptor links blood vessels, axons. *Science* 279: 2042

Sadler GP, Jones DL, Woodhead JS, Horgan K, Wheeler MH (1996) Effect of growth factors on growth of bovine parathyroid cells in serum-free medium. *World J Surg* 20: 822-828

Sandström J (1879) On a new gland in man and several mammals (glandulae parathyroideae). *Upsala Läk -Fören Förh* 15: 441

Saxe AW (1984) Angiogenesis of human parathyroid tissue. *Surgery* 96: 1138-1143

Schachter P, Buckley N, Oyama H, Christy M, Leight GJ, Lobaugh B (1989) Primary hyperparathyroidism: a new experimental animal model. *Surgery* 106: 997-1001

Schachter P, Christy MD, Leight GSJ, Lobaugh B (1990) Function in athymic nude mice of parathyroid heterografts from patients with primary hyperparathyroidism and secondary hyperparathyroidism. *Surgery* 108: 1040-1046

Schlagenhaufer F (1915) Zwei Fälle von Parathyreoidea-Tumoren. *Wien klin Wschr* 28: 1362

Sewell IA (1966) Studies of the microcirculation using transparent tissue observation chambers inserted in the hamster cheek pouch. *J Anat* 100: 839-856

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845

St.Goar WT (1957) Gastrointestinal symptoms as a clue to the diagnosis of primary hyperparathyroidism, a review of 45 cases. *Ann intern Med* 102

Stanbury WW, Lumb GA, Nicholson WF (1960) Elective subtotal parathyroidectomy for renal hyperparathyroidism. *Lancet* 793

Stavri GT, Hong Y, Zachary IC, Breier G, Baskerville PA, Yla-Herttuala S, Risau W, Martin JF, Erusalimsky JD (1995) Hypoxia and platelet-derived growth factor-BB synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 358: 311-315

Tanaka Y, Funahashi H, Imai T, Seo H, Tominaga Y, Takagi H (1996a) Oxyphil cell function in secondary parathyroid hyperplasia. *Nephron* 73: 580-586

Tanaka Y, Funahashi H, Imai T, Wada M, Tominaga Y, Mishra SK, Takagi H (1996b) Functional and morphometric study of cryopreserved human parathyroid tissue transplanted into nude mice. *World J Surg* 20: 692-699

Tolloczko T, Wozniewicz B, Sawicki A, Nawrot I, Migaj M, Zabitowska T, Gorski A (1994) Cultured parathyroid cell transplantation without immunosuppression in the treatment of surgical hypoparathyroidism. *Transplant Proc* 26: 1901-1902

Vajkoczy, P (1996) Angiogenese und Revaskularisierung transplantierter Langerhans´scher Inseln .Eine experimentelle in vivo Studie am Syrischen Goldhamster und an der Maus. Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München. Ref Type: Thesis/Dissertation

Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD (1998) Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 510-520

Vercellotti GM, Platt JL, Bach FH, Dalmasso AP (1991) Neutrophil adhesion to xenogeneic endothelium via iC3b. *J Immunol* 146: 730-734

Virchow R (1863) Die krankhaften Geschwülste. *Hirschwald, Berlin*

Vollmar B, Laschke MW, Rohan R, Koenig J, Menger MD (2001) In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol* 159: 1661-1670

Wagner PK (1991) Konservierung und Transplantation der Nebenschilddrüsen. In *Hyperparathyreoidismus,* Rothmund M (ed) pp 216. Georg Thieme Verlag Stuttgart: Stuttgart

Weise D, Wuster C, Baldauf G, Schoels WH, Ziegler R (1989) Cardiomyopathy in hypocalcemia. *Dtsch Med Wochenschr* 114: 831-833

Wells et al (1977) the successful transplantation of frozen parathyroid tissue in man. *Surgery* 86-90

Wells SAJ, Gunnells JC, Shelburne JD, Schneider AB, Sherwood LM (1975) Transplantation of the parathyroid glands in man: clinical indications and results. *Surgery* 78: 34-44

Wölfler A (1879) zur chirurgischen Behandlung des Kropfes. *Arch klin Chir* 24: 157

Zeintl H, Tompkins WR, Messmer K, Intaglietta M (1986) Static and dynamic microcirculatory video image analysis applied to clinical investigations. *Prog Appl Microcirc* 1-10

Ziegler R (1987) Kalziumstoffwechsel und seine Störungen. In *Hormon-und Stoffwechselbedingte Erkrankungen in Praxis*, Ziegler R (ed) edition medizin. VCH Verlagsgesellschaft:

Ziegler R (1991) Pathophysiologie des Hyperparathyreoidismus. In *Hyperparathyreoidismus,* Rothmund M (ed) pp 11. Georg Thieme Verlag: Stuttgart

Zimering MB, Brandi ML, de Grange DA (1990) Circulating fibroblast growth factor-like substance in familial multiple endocrine neoplasia type1. *J clin Endocrinol* 70: 149

Danksagung

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit möchte ich mich herzlich bei Allen bedanken, die das Zustandekommen mit ermöglicht haben:

An erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. med. F. Spelsberg, durch den ich nicht nur sehr viel gelernt habe, sondern durch den ich überhaupt zu dieser Arbeit gelangt bin.
Ich danke ihm ganz herzlich für seine immerwährende Unterstützung und seinen freundschaftlichen Beistand zu jeder Zeit! Er hat meinen medizinischen Werdegang erheblich mitgeprägt.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung!
Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer danke ich herzlich für die Überlassung des Themas. Durch seine allzeitige Hilfsbereitschaft und Förderung hatte ich immerwährend das Gefühl gut aufgehoben zu sein.

Herrn PD Dr. med. M. Dellian ein herzliches Dankeschön für das Aufnehmen in seine Arbeitsgruppe und die vielen Ratschläge und Verbesserungsvorschläge!
Ein riesiges Dankeschön geht des Weiteren an Herrn Dr. med. S. Strieth, ohne dessen Betreuung diese Arbeit wahrscheinlich nie fertig geworden wäre ☺. Durch sein Engagement und seine Hilfestellungen war es mir möglich durchzuhalten, wenn es zwischendurch immer mal wieder schwierig wurde...
Ebenfalls danke ich herzlich Herrn Dr. med. M. Eichhorn, der mir immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand und mir mit manchen technischen Problemen half. In diesem Zusammenhang auch danke an Herrn J. Peters bei der Hilfestellung bei der digitalen Datenverarbeitung.

Herrn Dr. med. vet. E. Thein danke ich herzlich für sein Interesse und seinen Rat bezüglich dieser Arbeit, für seine Unterstützung und-nicht zu vergessen-für´s Korrekturlesen.

Besonderer Dank geht auch an Frau A.-M. Allmeling für die äußerst kompetente Unterstützung beim Erlernen der verschiedenen labortechnischen Untersuchungen und ihre

aufmunternden Worte.
Herrn Prof. Dr. med. G. Enders und Frau C. Fahney danke ich für die kompetente Hilfe bei den molekularbiologischen Techniken.

Letztendlich noch ein großes Dankeschön an Herrn Dr. med. S. Krasnici, Frau S. Lüdemann, und allen Institutsmitarbeitern, die an dieser Arbeit mitwirkten!

Mein persönlicher Dank von ganzem Herzen geht natürlich an meine Mutter für ihren uneingeschränkten Beistand, ihre fast immer gute Laune und ihre Geduld u.v.m., was sich definitiv nicht in Worte fassen lässt!
Gewidmet ist diese Arbeit meinen Eltern, insbesondere meinem Vater, dem ich so viel zu verdanken habe, dank seiner großen Persönlichkeit, seiner Weitsicht und Fürsorge-leider hat er mein Medizinstudium nicht mehr erleben dürfen.

Zum Schluß noch ein besonderer Dank an Frau Dr. med. S. Feldmeier, K. Feldmeier und S. Rheinheimer für ihre geniale Freundschaft!
Auch Frau C. Ernst, Frau Dr. A.-M- Hamm und Frau E. Hagemann ein herzlicher Dank für ihren“seelischen“ Beistand und die Unterstützung!

7 Publikationen

Strieth S, v. Johnston V, Eichhorn ME, Enders G, Krasnici S, Thein E, Hammer C, Dellian M: A new animal model to assess angiogenesis and endocrine function of parathyroid heterografts in vivo. *Transplantation* in press

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden außerdem in Form einer Poster-vorstellung auf dem Kongreß „Angiogenesis 2“ im Institut Pasteur in Paris vom 19.-20. Juni 2003 vorgestellt:
v. Johnston V, Strieth S, Eichhorn ME, Enders G, Krasnici S, Thein E, Hammer C, Dellian M: A new model to assess angiogenesis and endocrine function of human parathyroid heterografts transplanted into athymic nude mice in vivo.
(*Institut Pasteur Euroconferences: Angiogenesis 2; Paris 19.-20. Juni 2003).*

Des Weiteren wurden wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit in Form einer Postervorstellung auf der Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie (e.V.) vom 7.-9. Oktober 2004 im Deutschen Herzzentrum in Berlin präsentiert:
v. Johnston V, Strieth S, Eichhorn ME, Enders G, Krasnici S, Thein E, Hammer C, Dellian M: A new model to assess angiogenesis and endocrine function of human parathyroid heterografts transplanted into athymic nude mice in vivo.
(*Deutsches Herzzentrum: Annual meeting-Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie e.V.; Berlin 7.-9. Oktober 2004).*

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Verena von Johnston
Geburtstag und -ort:	22. Juli 1976 in München
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig

Ausbildung und Promotion

1987 – 1993	Gymnasium Pullach in Pullach i. Isartal
1993 – 1996	Albert-Einstein-Gymnasium in Harlaching b. München Abitur im Mai 1996
1997 – heute	Studium der Humanmedizin an der Ludwig -Maximilians-Universität in München
März 2001:	Erstes Staatsexamen
März 2003:	Zweites Staatsexamen
Ende 2004:	Drittes Staatsexamen
Seit 2000	Promotion am Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern, Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer, Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer Experimentelle Forschung zum Thema: „Ein neues Tiermodell zur Analyse von Angiogenese und endokriner Funktion bei Transplantation von humanem Nebenschilddrüsengewebe auf die athyme Nacktmaus in vivo“
Sept. 2001	Teilnahme am Mikrochirurgischen Operationskurs, Chirurgische Universitäts- u. Poliklinik Würzburg,

	Prof. Dr. med. A. Thiede
Juni 2003	Posterpräsentation auf dem Kongress ´Angiogenesis 2´, Institut Pasteur, Paris , „ A new model to assess angiogenesis and endocrine function of human parathyroid heterografts transplanted into athymic nude mice in vivo”
Sept. 2004	Publikation:”A new animal model to assess angiogenesis And endocrine function of parathyroid heterografts in vivo”. *Transplantation* in press
Okt. 2004	Posterpräsentation auf der Jahrestagung der „Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V.“, Deutsches Herzzentrum, Berlin, „A new animal model to assess angiogenesis and endocrine function of human parathyroid heterografts transplanted into athymic nude mice in vivo“

Klinische Erfahrungen

Famulaturen:	
März / April 2000	Chirurgie (6 Wochen), Krh. Martha-Maria München-Solln, Prof. Dr. Dr. med. F. Spelsberg
Aug. 2000	Orthopädie (4 Wochen), Orthopädische Praxis München-Solln Dr. med. W. Lehner
Aug. / Sept. 2001	Anästhesie (2 Wochen), Humboldt-Universität zu Berlin, Prof. Dr. Dr. med. W. J. Kox
Aug. 2002	Orthopädie / Rehabilitationsmedizin (4 Wochen), Weill Cornell University New York, Prof. Dr. W. Nagler
Praktisches Jahr:	
Okt. – Dez. 2003	1. Tertial (1): Chirurgie, Royal North Shore Hospital

	Sydney
Dez. – Feb. 2004	1. Tertial (2): Chirurgie, Universitätsklinikum Großhadern
Feb. – Jun. 2004	2. Tertial: Innere Medizin, Universitätsklinikum Großhadern (Rotationsprogramm: Hämatologie / Onkologie, allg. Innere, Notaufnahme)
Jun. – Okt. 2004	3.Tertial: Dermatologie, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, München

München, Dezember 2004