

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg**

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

---

**Funktionsdiagnostik von Inselzellen des  
Schweins mit einer miniaturisierten  
Mikroperifusionskammer**

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

**vorgelegt von  
Stefan Schlosser  
aus Pleinfeld**

**Würzburg, Mai 2007**

Referentin: Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs  
Korreferent: Professor Dr. med. Prof. h. c. A. Thiede  
Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.08.07

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
3.1.	Untersuchungsmaterial	8
3.2.	Isolierung porziner Langerhans-Inseln	8
3.2.1.	Präparation der Pankreata	8
3.2.2.	Aufbau der Isolierungsapparatur	8
3.2.3.	Pankreasdesintegration	8
3.2.4.	Reinigung und Kultur der Langerhans-Inseln	9
3.3.	Mikroverkapselung der Langerhans-Inseln mit Alginat	9
3.4.	Vitalitätsfärbung der Langerhans-Inseln	9
3.5.	<i>In-Vitro</i> -Funktionsdiagnostik von Langerhans-Inseln	10
3.5.1.	Aufbau der Mikroperifusionskammer	11
3.5.2.	Aufbau des Mikroperifusionssystems	12
3.5.3.	Einbringen der Zellen in die Perifusionskammer	13
3.6.	<i>In-Vitro</i> -Funktionsanalysen	15
3.6.1.	Basalmedien	17
3.6.2.	Stimulationsmedien	18
3.7.	Messdaten und ihre Auswertung	20
3.7.1.	Berechnung der Inseläquivalente	20
3.7.2.	Reinheit und Ausbeute der Langerhans-Inseln	22
3.7.3.	Insulinbestimmung	22
3.7.4.	Faktoren bei der Analyse des Insulin-Ausschüttungsprofils	24
3.8.	Fotodokumentation	27
3.9.	Statistische Auswertung	27
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
4.1.	Einfluss unterschiedlicher Zellkulturmedien auf die Insulin-Ausschüttung	28
4.1.1.	Ham's F12 und KRBB ohne Glukose-Zusatz	28
4.1.2.	Ham's F12 und KRBB mit Glukose-Zusatz	30
4.2.	Einfluss der IEQ-Zahl auf die Insulin-Ausschüttung	32
4.3.	Einfluss der Mikroverkapselung auf die Insulin-Ausschüttung	34

4.4.	Einfluss der Insel-Vitalität auf die Insulin-Ausschüttung	37
4.5.	Einfluss diverser Mediatoren auf die Insulin-Ausschüttung	38
4.5.1.	Einfluss der Mediatoren im normoglykämischen Milieu (KRBB)	39
4.5.2.	Einfluss der Mediatoren im hyperglykämischen Milieu (Ham's F12)	41
4.6.	Einfluss der Mediator-Konzentration auf die Insulin-Ausschüttung	52
4.6.1.	Einfluss der Mediator-Konzentration im normoglykämischen Milieu (KRBB)	52
4.6.1.1.	Glukose	52
4.6.1.2.	Arginin	53
4.6.2.	Einfluss der Mediator-Konzentration im hyperglykämischen Milieu (Ham's F12)	54
4.6.2.1.	Glukose	54
4.6.2.2.	Arginin	55
4.7.	Einfluss der Kulturdauer auf die Insulin-Ausschüttung	56
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
5.1.	Insulinsekretion mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln im normoglykämischen und hyperglykämischen Milieu	59
5.1.1.	Insulinsekretion ohne Glukose-Stimulation	59
5.1.2.	Insulinsekretion mit Glukose-Stimulation	59
5.2.	Einfluss der IEQ-Zahl auf die Insulinsekretion	60
5.3.	Einfluss der Mikroverkapselung auf die Insulinsekretion	62
5.4.	Bedeutung der Vitalität für die Inselfunktion	63
5.4.1.	Einflussfaktoren auf Vitalität und Insulinsekretion	64
5.5.	Einfluss diverser Mediatoren auf die Insulinsekretion	67
5.6.	Einfluss der Mediator-Konzentration auf die Insulinsekretion	71
5.7.	Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Insulinsekretion	73
<b>6.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
	<b>Anhang</b>	
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Curriculum Vitae</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -Zellen	Glukagon-produzierende Zellen des endokrinen Pankreas
$\beta$ -Zellen	Insulin-produzierende Zellen des endokrinen Pankreas
$\delta$ -Zellen	Somatostatin-produzierende Zellen des endokrinen Pankreas
$\mu$ U	Mikro-Unit (Insulineinheiten)
ABTS	2,2' Azino-bis-(3-ethylenbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AP	Adaptationsphase
Arg	L-Arginin
AUC	<i>Area under the curve</i>
AUC <sub>gesamt</sub>	Gesamtfläche unter der Kurve = Gesamte Isulinausschüttung während der Perifusion
AUC <sub>gesamt rel</sub>	Gesamtfläche unter der Kurve, geteilt durch die Perifusionsdauer
AUC A	Fläche unter der Kurve vor der ersten Stimulation
AUC B	Fläche unter der Kurve in während der ersten Stimulation
AUC B <sub>rel</sub>	Fläche unter der Kurve während der ersten Stimulation, geteilt durch die Stimulationsdauer
AUC C	Fläche unter der Kurve nach der ersten Stimulation
AUC D	Fläche unter der Kurve während einer zweiten Stimulation
AUC E	Fläche unter der Kurve nach einer zweiten Stimulation
Bs	DL- $\beta$ -OH-Buttersäure-NaCl
BSA	Bovines Serum Albumin
c <sub>abs</sub>	absolute Insulinkonzentration
c <sub>abs</sub> /IEQ	absolute Insulinkonzentration geteilt durch die Anzahl der Inseläquivalente
c <sub>max</sub>	maximale Insulinkonzentration

$c_{rel}$	relative Insulinkonzentration: Insulinkonzentration in der Probe ( $c_{abs}$ ) abzüglich der Insulinkonzentration der Kontrolle
$c_{rel}/IEQ$	relative Insulinkonzentration geteilt durch die Anzahl der Inseläquivalente
$CaCl_2$	Calciumchlorid
Clo	Clonidin
Cmc	Carbamylcholin Chlorid
d	Tag
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
f	Funktion
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FDA-Pi	Fluoreszein-Diacetat-Propidiumjodid (Vitalfärbung)
GAD	<i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>
GADA	<i>Glutamic Acid Decarboxylase Antibody</i>
Glg	Glukagon
Gluk	D-(+)-Glucose
Ham's F12	Zellkulturmedium
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
Hy	Hybridschwein
IA-2	Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatase
IAA	<i>Insulin Autoantibody</i>
ICA	<i>Islet Cell Antibody</i>
IEQ	Inseläquivalent (ein IEQ entspricht einer Langerhans-Insel mit einem Durchmesser von 150 $\mu$ m)
$IEQ_{gesamt}$	Gesamtzahl der IEQ in der Kultur
IDDM	<i>Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>

KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KRBB	<i>Krebs Ringer Bicarbonate Buffer</i>
LDS	<i>Low Density Solution</i>
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
mM	Millimol
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
NIDDM	<i>Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>
n. s.	nicht signifikant
n. t.	nicht getestet
p	Signifikanzniveau
P <sub>x</sub>	Anzahl (x) von IE <sub>x</sub> in der Präparation
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>
Pe	L-Phenylephrine
Peakwert	höchste Insulinkonzentration in der Stimulationsphase
PERV	Porzines Endogenes Retrovirus
PP-Zellen	Pankreatisches Polypeptid-produzierende Zellen des endokrinen Pankreas
r <sup>2</sup>	statistisches Bestimmtheitsmaß
R-Ring	Gummiring zwischen Deck- und Bodenplatte der Perifusionskammer
Rsq	Nash-Sutcliffe Koeffizient

s.	signifikant
SA	Standardabweichung
SI	Stimulationsindex
SP	Stimulationsphase
t	Zeit
Tb	Tolbutamid
TTP	<i>Time-To-Peak</i>
TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitmonolaurat
V <sub>5SM</sub>	Würzburger Kammer aus Edelstahl(S)/mikroskopierbar(M)
V <sub>g</sub>	Volumen der Gewebesuspension in ml
V <sub>gesamt</sub>	Volumen des Kulturmediums in ml
V <sub>p</sub>	Volumen der Proben in ml
WS	<i>Working Solution</i>
ZS	Zuchtsau