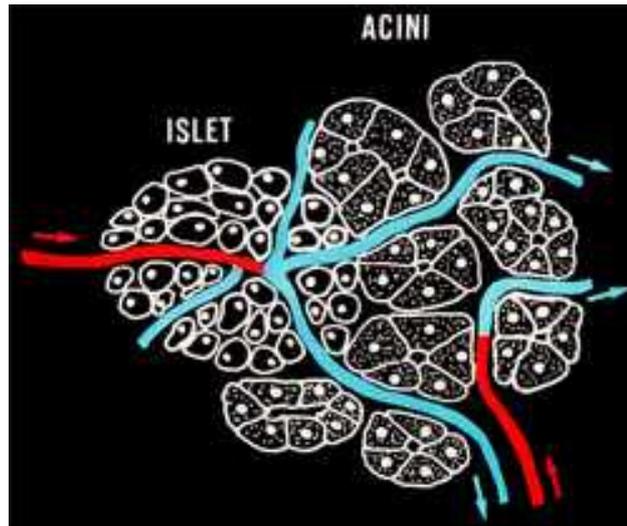


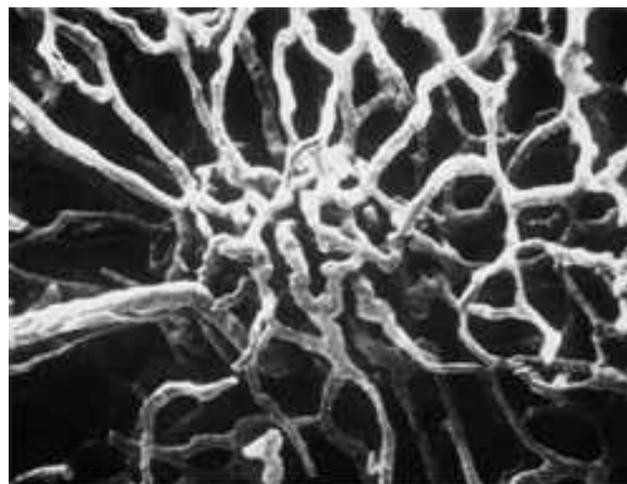
## 1. Einleitung

Im Jahr 1869 entdeckte der 22-jährige Doktorand Paul Langerhans das nach ihm benannte anatomische Korrelat für die aus dem Altertum herrührende Krankheitsbezeichnung *Diabetes mellitus*. Allerdings ahnten zu dieser Zeit weder er noch sein Doktorvater Rudolf Virchow, dass er die Struktur gefunden hatte, deren Defekt oder Insuffizienz sich im symptomatischen Bild der Typ 1 bzw. Typ 2 Diabetiker widerspiegelt [1]. 1889 entfernte Oskar Minkowski die Bauchspeicheldrüse eines Hundes und induzierte damit unerwartet den ersten iatrogen bedingten Diabetes mellitus. Daraus schloss er auf den antidiabetischen Substanzgehalt des Pankreas. Die Suche nach dieser Substanz gestaltete sich aber schwierig. Erst 1921 gelang die Isolierung des Insulins durch den kanadischen Biochemiker Frederick Grant Banting (1891–1941, Nobelpreis 1923) und seinen Schüler Charles Herbert Best [5]. Seit der Franzose Gustave Edouard Laguesse 1893 seine Theorien über die von ihm vermutete Sekretion der Zellgruppen veröffentlichte, ist für diese Zellgruppe der noch heute in der medizinischen Welt gebräuchliche Namen *Ilots de Langerhans* bekannt [1].

Die Langerhans-Inseln sind das für die Glukosehomöostase verantwortliche endokrine Organ. Die meisten Langerhans-Inseln haben eine Grösse von 70 bis 400  $\mu\text{m}$ . Die Inseln setzen sich hauptsächlich aus 4 Zelltypen zusammen: Die Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen bilden mit ca. 65% die überwiegende Mehrzahl. Die Glukagon-produzierenden  $\alpha$ -Zellen zählen anteilig ca. 20%. Hinzu kommen Somatostatin-produzierende  $\delta$ -Zellen zu 5-10% und die 3-5% PP-Zellen, die das pankreatische Polypeptid sezernieren. In absoluten Zahlen sind bis zu 6.000  $\beta$ -Zellen in einer Langerhans-Insel (im Folgenden auch Insel genannt) enthalten [74]. Die Anordnung der Zellen innerhalb einer Insel unterliegt einer festgelegten Ordnung und weist tierartige Unterschiede auf. Bei Nagetieren bilden die  $\beta$ -Zellen einen Kern, der von den anderen Zellen umgeben ist. Humane neonatale Inseln weisen zunächst genau diese Anordnung auf, verlieren sie aber im Verlauf der Entwicklung teilweise wieder. Es verbleiben aber grosse zusammenhängende  $\beta$ -Zellareale mit Kontakten zwischen den  $\beta$ -Zellen und zu anderen Zelltypen [75]. Der Blutfluss innerhalb der Insel ist vom Zentrum auf die Peripherie ausgerichtet (*Abb. 1, Abb. 2*). Somit werden zunächst die zentrurnahen  $\beta$ -Zellen, dann erst die Mantelzellen erreicht. Folglich können hohe Insulinkonzentrationen im Zentrum der Insel die peripheren  $\alpha$ - und  $\delta$ -Zellen hemmen. Diese wiederum haben aber, außer auf parakrinem Weg, nur die Möglichkeit, die  $\beta$ -Zellen durch eine systemische Verdünnung im Blut zu beeinflussen [76].



**Abb. 1:** Schema der Durchblutung der Langerhans-Inseln. Aus Arteriolen (rot) wird Blut vom endokrinen in den exokrinen Teil des Pankreas geführt. Quelle: Endokrinologie-Modul, Prof. Spinass, Universität Zürich.



**Abb. 2:** Gefäß-Ausguss einer Langerhans-Insel (Mitte) mit der zuführenden Arteriolen von links und dem blutabführenden Portalsystem. Quelle: Endokrinologie-Modul, Prof. Spinass, Universität Zürich.

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Kohlenhydratstoffwechselstörung. Ausgehend von der Therapie der Erkrankung, mit oder ohne Insulin, entwickelten sich die Begriffe IDDM (*insulin-dependent diabetes mellitus*) und NIDDM (*non-insulin dependent diabetes mellitus*) als Synonyme für Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus [5]. Bei dieser Erkrankung ist der Blutglukosespiegel durch einen absoluten oder relativen Insulinmangel chronisch erhöht. Ätiologisch muss der Diabetes mellitus als eine multifaktorielle Erkrankung betrachtet werden. Die *American Diabetes Association* (ADA) trug 1997 dieser Erkenntnis

Rechnung und gliedert sie seitdem in vier Hauptgruppen: Gruppe I beinhaltet den Typ 1 Diabetes, der autoimmunologisch oder idiopathisch verursacht wird [5]. Diese bereits häufig schon im Jugendalter auftretende Form führt durch zytoplasmatische Autoantikörper gegen Inselzellen (ICA, *islet cell antibodies*), gegen Insulin (IAA, *insulin autoantibodies*) oder gegen inselzelleigenes Protein, die Glutamatdecarboxylase (GADA, *glutamic acid decarboxylase antibodies*) bzw. die Tyrosinphosphatase (IA-2), durch eine Betazelldestruktion zu einem absoluten Insulinmangel [10, 12, 13]. Dieser kann nur durch exogene Insulinzufuhr behandelt werden. Ätiopathogenetisch für die Gruppe I werden genetische Faktoren (HLA Typ DR3 und DR4, die gesunde Personen nur zu 6% aufweisen), virale Infekte [14, 15] (Protein P2C von Coxsackie B4 Viren ähnelt der GAD (*glutamic acid decarboxylase*), was zu einer molekularen Mimikrie führt [20]) und Nahrungsbestandteile (in der Kuhmilch enthaltenes Beta-Casein entspricht der Struktur vom GLUT-2 Transporter der Betazelle [21]) verantwortlich gemacht. Zur Gruppe II wird der Typ 2 Diabetes gerechnet, der aus einer Insulinresistenz heraus zu einem relativen Insulinmangel führt [5, 11]. Als Insulinresistenz wird hierbei eine Verminderung der Insulinwirkung bezeichnet, die unter anderem durch eine unzureichend gedrosselte postprandiale Glukosefreisetzung aus der Leber gekennzeichnet ist. Durch die verminderte Insulinwirkung (periphere Insulinresistenz) wird Glukose nicht in ausreichender Menge in die insulinabhängigen Gewebe aufgenommen [11, 16, 17]. Anfangs wird die daraus resultierende Hyperglykämie noch mit einer kompensatorisch gesteigerten Insulinausschüttung beantwortet. Im Verlauf der Erkrankung erschöpfen sich die Inselzellen, und es kommt zu typischen Veränderungen im Sekretionsprofil. Die Phase 1 zeigt eine nahezu komplette Auslöschung. Die Phase 2 ist verzögert und vermindert [11, 18, 19]. Die Inzidenz dieses Erkrankungstyps nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Neben genetischen Faktoren werden begünstigend exogene Faktoren wie z. B. Bewegungsmangel und Adipositas für die klinische Manifestation verantwortlich gemacht. Die erste Therapiemaßnahme stellt hier eine angemessene Diät und eine geänderte Lebensführung dar. Die dritte Gruppe fasst seltener Ursachen wie genetische Defekte der Betazellfunktion und Insulinwirkung, exokrine Pankreaserkrankungen, Endokrinopathien, medikamentös toxisch induzierte Formen und Infektionen zusammen. Die Gruppe IV beschreibt den transienten Gestationsdiabetes [5].

Um die Sekundärkomplikationen des Diabetes, wie Mikro- und Makroangiopathie [22, 23], Retinopathie [24], Nephropathie [25] und Neuropathie [26, 27] zu vermindern, besteht die Therapie des Diabetes in der Normalisierung des Blutzuckers. Hierzu stehen unter-

schiedlich schnell wirksame Insuline und Insulinanaloga zur Verfügung. Durch die Ausschaltung transienter Hyperglykämien könnte die nicht-enzymatische Glykosilierung von Proteinen, die als Hauptursache für die Sekundärschäden angesehen werden, verhindert werden [29]. Da bisher, trotz moderner Insulinpräparate und intensivierter Insulintherapie, eine kontinuierliche Kontrolle des Blutglukosespiegels, und damit die Vermeidung von diabetischen Komplikationen, nur bedingt gelingt, wird weltweit nach Alternativen zur Substitution mit exogenem Insulin gesucht. Die größten Anstrengungen konzentrieren sich hierbei auf den zelltherapeutischen Ersatz der zerstörten Inselzellen mit intakten isolierten Langerhans-Inseln oder *in vitro* differenzierten Stammzellen. Diese müssten entsprechend ihrer Überlebenszeit substituiert werden. Klinisch schon jetzt praktiziert wird die Pankreas- transplantation, die zumeist in Kombination mit einer Nierentransplantation im Stadium des chronischen Nierenversagens mit guten Erfolgen durchgeführt wird [30]. Während das operative Vorgehen die Nephropathie und den Lipidstoffwechsel noch günstig beeinflusst, konnte keine Verbesserung bei bestehender Retinopathie und autonomer Neuropathie gezeigt werden [34]. Eine Therapieoption für den jungen Typ I Diabetiker stellt dies nur in Ausnahmefällen dar. Neben den operativen Risiken und der lebenslangen Immunsuppression wird die breite Anwendung dieser Methode durch den Spenderorganmangel limitiert. Das Problem des Spendermangels kann mit der Verwendung von Nutztieren mittels Xenotransplantation umgangen werden. Darunter versteht man die Transplantation von lebenden Zellen, Geweben und Organen von einer Spezies auf eine andere Spezies (z. B. *Schwein-auf-Mensch*). Eine viel versprechende Alternative dazu stellt die Transplantation isolierter Langerhans-Inseln dar. Insbesondere das Schwein wird heute als Spendertier favorisiert [79-81]. Das porcine Insulin unterscheidet sich von humanem Insulin in nur einer Aminosäure und wurde vor der Zeit der rekombinanten Insuline schon sehr erfolgreich bei Diabetikern eingesetzt.

Moskalewski gelang es 1965 als erstem, mit der Kollagenasetechnik eine Bauchspeicheldrüse enzymatisch zu „verdauen“ und die freien Inseln mikroskopisch herauszupicken. Aufgrund der funktionellen Trennung des exokrinen und des endokrinen Systems im Pankreas ist es möglich, die Langerhans-Inseln, bestehend aus den o. g. 4 Zelltypen, intakt zu isolieren [73]. Isolierte Langerhans-Inseln bieten den Vorteil, dass ihr Insulinsekretionsverhalten in Perifusionsversuchen dem des gesamten perifundierten Organs nahezu gleicht [8, 9]. Seitdem 1981 von Horaguchi und Merrell [6] eine Standardmethode für die Isolierung von Inselzellen aus dem Pankreas entwickelt wurde, standen nun isolierte Langer-

hans-Inseln in ausreichender Zahl zur Verfügung. Eine entscheidende Weiterentwicklung und Automatisierung der Methode gelang Camillo Ricordi [50-52]. Mit seiner verbesserten Technik gelang es in den letzten Jahren, Langerhans-Inseln sowohl aus humanen Spendern [53-56], als auch aus Säugetieren, insbesondere aus dem Schwein [55-66] und aus Nagern, noch erfolgreicher als bisher zu isolieren. Tierexperimente haben gezeigt, dass isolierte Langerhans-Inseln die diabetische Stoffwechsellage korrigieren und Sekundärkomplikationen verhindern können [35-37]. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Vollorgantransplantation liegt (1) im minimal invasiven operativen Zugangsweg und (2) in der Möglichkeit der Immunogenitäts-Senkung durch Änderung der Kultivierungsbedingungen *in vitro* [38, 39] bzw. durch Verkapselung des Transplantates mit biokompatiblen Membranen/Materialien [40-46]. Obgleich das Risiko der Übertragung von artfremden Pathogenen durch eine Xenotransplantation grundsätzlich gegeben ist, konnten Übertragungen auf den Menschen bisher nicht nachgewiesen werden. Insbesondere konnte sie für das Leukämie-assoziierte porcine endogene Retrovirus (PERV) ausgeschlossen werden [82, 83, 88-90, 92]. PERV, dessen genetischer Code permanent im porcinen Genom integriert ist, kann Zellen anderer Organismen *in vitro* infizieren [85]. Neuere Untersuchungen belegen, dass eine Infektion durch xenoreaktive Antikörper im Organismus verhindert wird [88]. Die experimentelle Übertragung auf menschliche Zellen *in vitro* [84-86] und auf xenogen transplantierte diabetische Mäuse *in vivo* [86, 87, 93] sind jedoch widersprüchlich und lassen den Schluss zu, dass im Experiment die Infektion auf einen immunsupprimierten Empfänger-Organismus zurückzuführen ist [89].

Der bisherige entscheidende Nachteil der Inselzell-Transplantation mit humanen Langerhans-Inseln bestand in der nur etwa 10%igen Einjahresfunktionsrate, gegenüber 65-80% nach Transplantation des gesamten Pankreas (Vollorgan-Transplantation) [31-33]. Trotz erfolgreicher Versuche in diversen Tiermodellen war also der klinische Erfolg bisher nur sehr gering. Eine neue Untersuchung, das so genannte *Edmonton Protocol*, zeigt mit einem verbesserten immunsupprimierten Regime demgegenüber eine überraschend hohe Einjahresfunktionsrate nach der Transplantation isolierter Langerhans-Inseln von 85% [47-49].

Mehrere Arbeitsgruppen [7-9] entwickelten ab 1970 Systeme, um die Freisetzungskinetik des Insulins zu untersuchen. Am Modell einer neuartig miniaturisierten Mikroperifusionskammer, der so genannten *Würzburger Kammer* [4], soll in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Funktionsdiagnostik der Alginate-mikroverkapselten porcinen Inselzellen ge-

legt werden. Dadurch soll ein besseres Verständnis für die Inselzellphysiologie geschaffen werden, so dass eine weitere Qualitätsoptimierung im Zuge der xenogenen Inselzell-Transplantation erreicht werden kann. Aus physiologischen, diabetologischen und qualitätsbezogenen Gesichtspunkten erfordert das Vorgehen bei der Isolierung und Transplantation nicht nur die Aussage, dass die Langerhans-Inseln Insulin enthalten, ausschütten und produzieren. Mit Sicherheit muss auch vor der Transplantation gewährleistet sein, dass das Xenotransplantat in einer der humanen Langerhans-Insel, qualitativ und quantitativ entsprechenden Art auf Nährstoffe, Hormone und Neuromediatoren reagieren kann. Insbesondere vor einer Transplantation in einen humanen diabetogenen Organismus muss dies belegt werden können. Das Verhalten des Xenotransplantates sollte in physiologischen Situationen (z. B. Nahrungsaufnahme) und patophysiologischen Situationen (z. B. Stress) eine effektive metabolische Regulation gewährleisten, die mit der natürlichen Reaktion im Körper korrespondiert. Trotz der bislang mehr als 830 klinischen Inseltransplantationen sind besonders die Erkenntnisse zur dynamischen Insulinausschüttung isolierter Langerhans-Inseln immer noch bruchstückhaft und auch widersprüchlich [57, 58, 69-73]; dies ist langfristig einer erfolgreichen Transplantation und der Deutung der Ergebnisse abträglich.

## 2. Fragestellung

- 2.1. Wie wirkt sich der ‚natürliche‘ Glukosegehalt im Kulturmedium auf das Aktivitätsniveau der porzinen Langerhans-Inseln aus? Ändert sich die sezernierte Insulinmenge, wenn Ham’s F12 (Glukose hoch konzentriert) oder KRBB (Glukose niedrig konzentriert) für die Perifusion verwendet werden?
- 2.2. Welche Unterschiede gibt es zwischen Hams’F12 und KRBB, wenn die Inseln zusätzlich mit Glukose stimuliert werden? Besteht ein Einfluss auf die Stimulierbarkeit, die Insulinsekretion und die *Time To Peak* mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln? Sind die Inseln in einer hyperglykämischen Umgebung durch zusätzliche Glukose noch stärker stimulierbar?
- 2.3. Welchen Effekt haben unterschiedliche IEQ-Zahlen auf die Insulinausschüttung? Steigt bei zunehmender IEQ-Zahl auch die sezernierte Insulinmenge? Setzt die einzelne Langerhans-Insel stets gleich viel Insulin frei?
- 2.4. Weisen mikroverkapselte porzine Langerhans-Inseln im Vergleich zu unverkapselten Inseln ein verändertes Ausschüttungsprofil auf? Verringert oder verzögert die Mikroverkapselung die Insulinausschüttung?
- 2.5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Insel-Vitalität und der Stimulierbarkeit mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln? Wie korrelieren die Insulinsekretion und die *Time To Peak* mit der Vitalität? Erlaubt der Vitalitäts-Status der Langerhans-Insel eine Vorhersage über ihre Funktionalität *in vitro*?
- 2.6. Welchen Einfluss haben unterschiedliche Mediatoren, Nährstoffe, Hormone und Neuromediatoren auf die Kinetik der Insulinsekretion der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln? Zeigt sich ein stoffspezifisches Sekretionsprofil? Gibt es Unterschiede in der Stimulation unter normoglykämischen (KRBB) und hyperglykämischen (Ham’s F12) Kulturbedingungen?
- 2.7. Wie wirken sich unterschiedliche Konzentrationen von Glukose und Arginin auf das Sekretionsprofil aus? Gibt es Konzentrations-abhängige Unterschiede bei Stimulation unter normoglykämischen (KRBB) und hyperglykämischen (Ham’s F12) Kulturbedingungen? Gibt es Grenzen der Stimulierbarkeit?
- 2.8. Wie verändert sich bei einer mehrtägigen Langzeit-Perifusion im Kammer-system die Ausschüttungskinetik und die Stimulierbarkeit mikroverkapselter porziner Langerhans-Insel?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Untersuchungsmaterial**

Für die Funktionsdiagnostik porziner Langerhans-Inseln wurden Spender-Schweine der Kreuzung Deutsche Landrasse x Piétrain (DL x PI), so genannte ausgemusterte Zuchtsauen (ZS) und Hybridschweine (HY) untersucht. Die Zuchtsauen waren weibliche Schweine im Alter von 1-2 Jahren mit einem Gewicht von 150-200 kg. Die Hybridschweine waren weibliche Jungtiere im Alter von 6-7 Monaten mit einem Gewicht von 100-110 kg. Alle Schweine stammten von verschiedenen Züchtern aus dem Würzburger Umland. Im Rahmen des Schlachtvorganges wurden die Pankreata von der Fa. Südfleisch, Würzburg, und der Fa. Hollerbach, Rimpfing, für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.

#### **3.2. Isolierung porziner Langerhans-Inseln**

Unter Anwendung der halb-automatischen Isolierungstechnik nach Ricordi [52] wurden die porzinen Langerhans-Inseln, modifiziert nach Heiser [3], isoliert. Weitere Grundlagen für die vorliegende Arbeit waren die Techniken der Arbeit von M. Krickhahn et al. [81].

##### **3.2.1. Präparation der Pankreata**

Alle porzinen Spender-Pankreata wurden im Rahmen des Schlachtvorganges aus hirntoten Tieren entnommen. Es folgte die sterile Präparation der Organe auf Eis im Labor (Entfernung von Bindegewebe, mesenterialem Fettgewebe, Gefäßen, Lymphknoten). Danach wurde der Ductus pancreaticus major zur Injektion der Enzymlösung mit einer 18-23G Braunüle kanüliert.

##### **3.2.2. Aufbau der Isolierungsapparatur**

Für die Isolierung wurde eine Edelstahlkammer verwendet. Sterile HBSS-Lösung (mit 25 mM HEPES Puffer) wurde über einen Schlauch in die Verdauungskammer gepumpt (Fa. Ismatec MCP, Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mondfeld). Die Ausflussöffnung der Kammer war mit einem Stahlsieb von 0,54 mm Maschenweite gesichert (Einzelheiten: siehe [81]).

##### **3.2.3. Pankreasdesintegration**

Die Pankreasdesintegration gliederte sich in eine Rezirkulations- und eine Elutionsphase. In der Rezirkulationsphase wurde in das Organ die in HBSS gelöste LiberasePI (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) injiziert. Sodann wurde das Pankreas zerteilt und im geschlosse-

nen System von der Enzymlösung umspült. Sobald mit der Dithizonfärbung die erste freie Langerhans-Insel sichtbar war, wurde der Gewebebrei eluiert: Dazu wurde das System geöffnet, gefiltert, und verdautes Gewebe in einem Auffanggefäß gesammelt und auf Eis gekühlt.

#### **3.2.4. Reinigung und Kultur der Langerhans-Inseln**

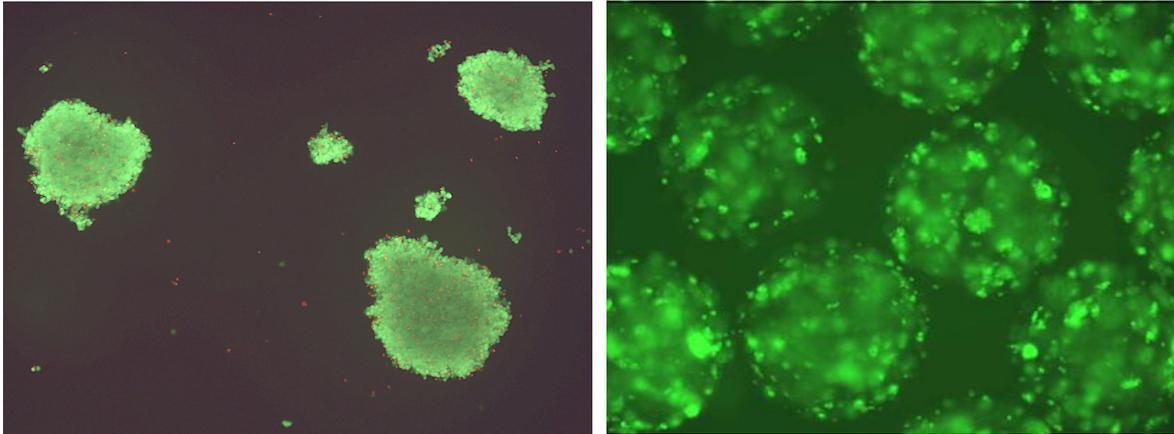
Die Trennung der Langerhans-Inseln vom exokrinen Gewebe (Reinigung) erfolgte mit dem diskontinuierlichen OptiPrep-Dichtegradienten im COBE 2991 Cell Processor (COBE Laboratories Inc., Lakewood, USA) [81]. Die Reinheit der Inseln wurde mit der Dithizonfärbung kontrolliert. Je 500 ml Kulturmedium Ham's F12 (Fa. Cell Concepts, Taufkirchen) wurden 5 ml Penicillin/Streptomycin, Amphotericin B, L-Glutamin und 5% inaktiviertes FCS (alle Fa. Cell Concepts) zugesetzt. Die Kultivierung der Inseln erfolgte für ca. 24 h im Brutschrank (Fa. Zapf, Saalstedt) bei 24°C, mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>.

#### **3.3. Mikroverkapselung der Langerhans-Inseln mit Alginat**

Nach der Reinigung und ein- bis mehrtägigen *In-Vitro*-Kultur erfolgte die Mikroverkapselung (Fa. Steinau, Berlin) der porzinen Langerhans-Inseln nach der Methode von Zekorn et. al. [78] mit hochreinem Bariumalginat (Fa. Pronova, Oslo, Norwegen). Jede Kapsel von 300-600 µm Durchmesser (**Abb. 3**) enthielt ca. 5-12 Inseläquivalente (IEQ). Ein IEQ entspricht einer mittelgroßen porzinen Insel mit einem Durchmesser von 150 µm.

#### **3.4. Vitalitätsfärbung der Langerhans-Inseln**

Die Vitalität der Langerhans-Inseln wurde mittels Doppelfärbung mit Fluoreszein-Diacetat (FDA, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) und Propidium-Jodid (PI, Fa. Sigma-Aldrich) geprüft [2, 3]. Mit dem Fluoreszenzmikroskop BX50 (Fa. Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg) wurden die Zellen bei 488 nm Wellenlänge betrachtet. Die Fluoreszenzfärbung wurde unter einem 530±20 nm Bandpass-Filter beurteilt. Die Fotodokumentation erfolgte mit der Digitalkamera ColorView 12 (Fa. Soft Imaging System SIS, Münster) unter Verwendung der Bildarstellungs-Software Analy-SIS® Version 3.2 (Fa. Soft Imaging System SIS).



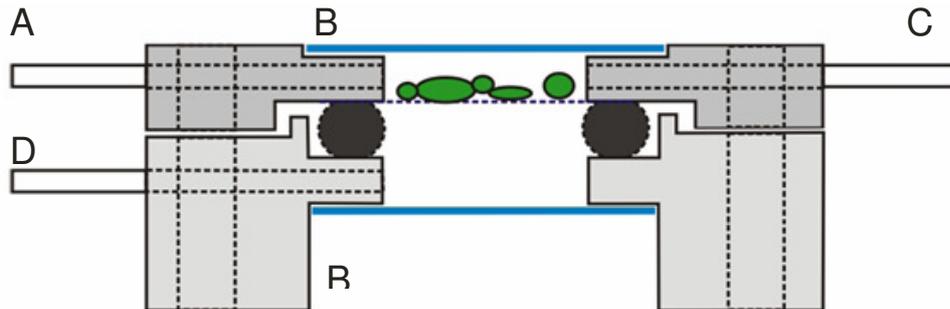
**Abb. 3:** Links unverkapselte Langerhans-Inseln nach Isolierung. Die vitalen Anteile (grün) grenzen sich deutlich von vereinzelt avitalen (rot) Fragmenten ab. Rechts mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln (FDA/PI-Färbung). Der Kapseldurchmesser beträgt ca. 400-600  $\mu\text{m}$ . Neben den stark grün gefärbten Inselzell-Clustern sind auch weitere Zellfragmente des endokrinen Pankreas verkapselt. Bilder mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. K. Ulrichs, Zentrum für Operative Medizin, Chirurgische Klinik I, ETI, Würzburg.

### 3.5. *In-Vitro*-Funktionsdiagnostik von Langerhans-Inseln

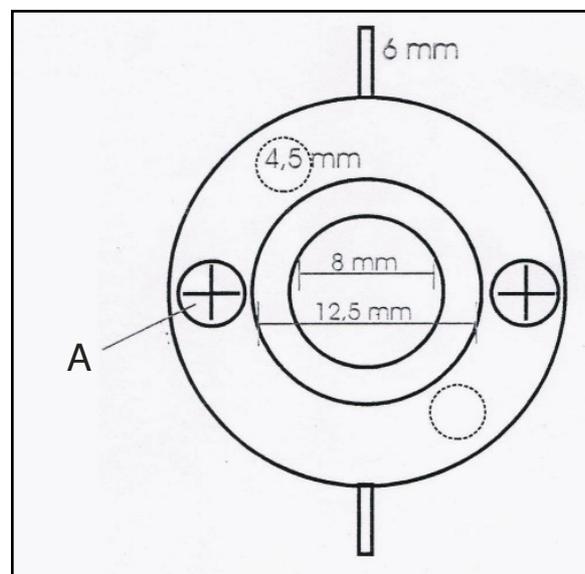
Zur Analyse der *In-Vitro*-Funktion der isolierten Langerhans-Inseln wurde das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Perifusionssystem *Würzburger Kammer* verwendet. Zellen und Gewebe erfordern eine differenzierte *In-Vitro*-Untersuchung, bevor sie transplantiert werden. Um die Kulturbedingungen isolierter Inselzellen außerhalb der Bauchspeicheldrüse zu optimieren, und um sie einer exakten Funktionsdiagnostik zu unterziehen, wurde im Rahmen der Promotion von Herrn Dr. A. G. Kerscher ein miniaturisiertes Mikroperifusionssystem entwickelt, das ausgiebig erprobt und stetig weiter verbessert wurde [4]. Zielsetzung war der Aufbau eines halbautomatisierten Perifusionssystems, das auch für mikroskopische Analysen und diverse Färbetechniken zugänglich ist. Weitere Kriterien waren eine einfache Handhabung, seine Wiederverwendbarkeit und seine Eignung für Langzeitkulturen. Die Kammer sollte auch bei laufendem Betrieb wiederholte mikroskopische Inspektionen ermöglichen. Dies würde die Beurteilung von Vitalität und Struktur der perfundierten Inseln im Versuchsablauf sehr erleichtern. Auf Basis des von Dr. A. G. Kerscher entwickelten Kammermodells V5<sub>SM</sub> (S=Edelstahl, M=mikroskopierbar) wurde in Zusammenarbeit mit F. Sauer (Physiologisches Institut, Universität Würzburg) eine verbesserte Version mit Modifikationen am Dichtungssystem der Kammer angefertigt. Das Modell erlaubt den gleichzeitigen Betrieb von bis zu 8 Kammern, bestückt mit unterschiedlichen Medien und Stimulantien. Es ermöglicht die genaue Analyse der Inselphysiologie über Stunden, Tage oder sogar mehrere Wochen [4].

### 3.5.1. Aufbau der Mikroperifusionskammer

Das Herzstück des Perifusionssystems ist eine runde rost- und säurebeständige Edelstahlkammer (Material der Gruppe 1.4301 X5CrNi18 10, Fa. Reinhard Stahlhandel, Würzburg) mit einem Durchmesser von 27 mm und einem Innenvolumen von 0,25 ml (*Abb. 4-7*). Die Kammer kann sterilisiert und wieder verwendet werden. Zudem ist sie frei transportierbar und von Zellinkubatoren unabhängig.



*Abb. 4:* Die Würzburger Kammer V5<sub>SM</sub> im Querschnitt im geschlossenen Zustand. Die Deckgläser (blau) liegen jeweils einem Auflagerahmen B in Deck- und Bodenplatte auf, so dass Auflicht- und Durchlichtmikroskopie möglich sind. Auf einem Nylonnetz (schwarz gestrichelte Linie) das einem Gummiring (schwarz) aufliegt, liegen die Inselzellen (grün). Der Zufluss A steht über das Nylonnetz mit dem Abfluss D in Verbindung. Über einen weiteren Zugang C kann die Kammer V5<sub>SM</sub> z. B. entlüftet werden. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Kerscher, Nürnberg.



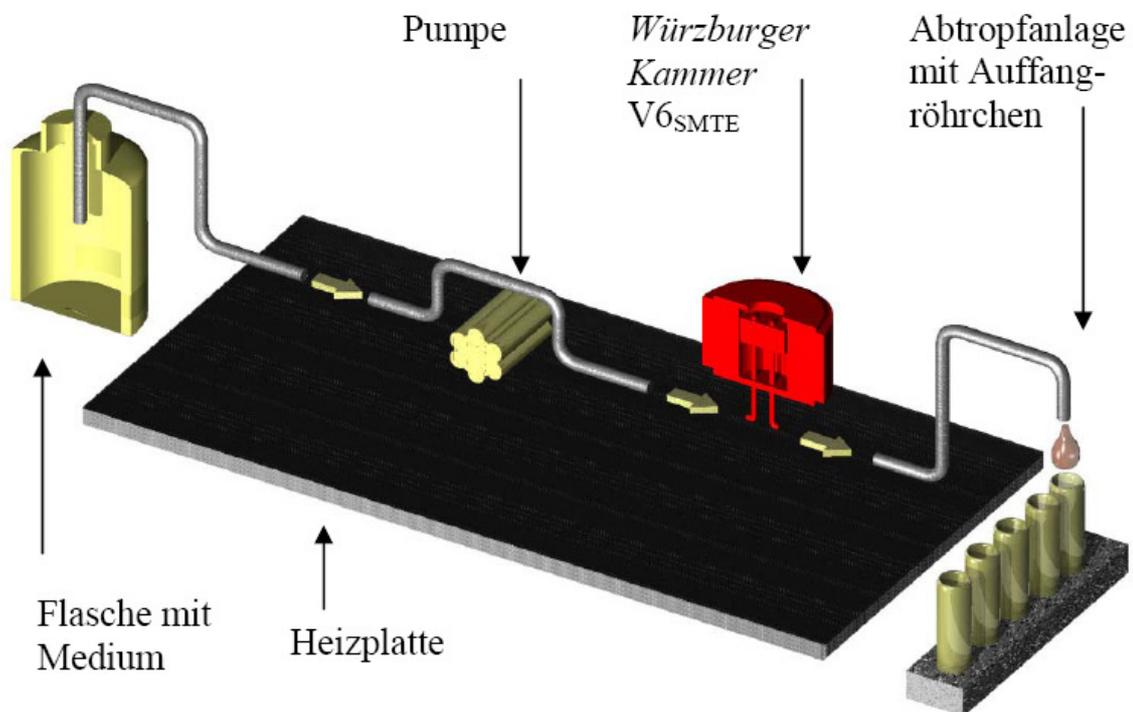
*Abb. 5:* Bemessungsplan der Perifusionskammer V5<sub>SM</sub> in der Aufsicht. Abgebildet ist die Deckplatte. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Kerscher, Nürnberg.

Sie ist mit einem Zufluss (*Abb. 4, A*) in der Deckplatte und einem Abfluss (*Abb. 4, D*) in der Bodenplatte ausgerüstet. Zudem verfügt sie über einen dritten Zugang in der Deckplatte (*Abb. 4, C*), der dem Zugang gegenüberliegt. Über diesen kann das System befüllt und entlüftet werden. Der ursprünglich von Dr. A. Kerscher verwendete Verschlussmechanismus mit zwei gegenüberliegenden Schrauben (*Abb. 5, A*), wurde wegen mangelhafter Abdichtung in einen Dreipunkteverschluss geändert. Die 3 Bohrungen lagen dabei vom Zentrum aus im Abstand von jeweils 120 Grad. Alle weiteren Spezifikationen und Bemessungen entsprachen der ursprünglichen Kammer V5<sub>SM</sub>. Die Deck- und Bodenplatten können mit drei Schraubverbindungen (A4-Schrauben, Fa. Hummer und Rieß, Nürnberg) miteinander fixiert werden. Ein handelsüblicher O-Ring aus Gummi mit einem Aussendurchmesser von 12 mm (Fa. Obi, Baufachmarkt) liegt der Bodenplatte auf und sorgt für die Abdichtung der beiden Metallplatten. Dem Ring wurde ein rundes engmaschiges Nylonnetz mit einer Maschenweite von 20 µm und einem Gesamtdurchmesser von ca. 20 mm aufgelagert, das dafür mit einer Schere passend zugeschnitten wurde; auf diesem Netz liegen die Zellen während des Versuchs. Über die Maschengröße kann die Auflagefläche für die Zellen reguliert werden. Die Langerhans-Inseln befinden sich somit zwischen dem Nylonnetz, das dem Gummiring aufliegt, und der Deckplatte der Kammer. In die Deck- und Bodenplatten ist jeweils ein rundes Deckglas von 20 mm Durchmesser (Fa. VWR International GmbH, Nürnberg) eingelassen. Mit hochviskösem Silikonkleber (Fa. GE Bayer Silicones, Leverkusen) erfolgt die Befestigung der Deckgläser auf einem dafür vorgesehenen runden Auflagerahmen (*Abb. 4, B*). Durch die Deckgläser kann man auch während des Versuchs in die Kammer schauen.

### **3.5.2. Aufbau des Mikroperifusionssystems**

Die Kammer hat einen Zu- und einen Abfluss, über den Medien zu- und abgeleitet werden (*Abb. 6*). Der Zufluss gliedert sich, von der Kammer aus beginnend, in (1) eine Verbindungsleitung, (2) einen Pumpenschlauch und (3) eine weitere Verbindungsleitung. Der Kammerzufluss (*Abb. 4, A*) ist über eine sterile Verbindungsleitung (Fa. Impromediform GmbH, Lüdenscheid) (*Abb. 7, A*) mit einem Pumpenschlauch (Fa. Ismatec, Wertheim-Mondfeld) (*Abb. 7, B*) verbunden. Dem Pumpenschlauch wird über eine Verbindungsleitung Medium zugeleitet. Das Ende der Verbindungsleitung wird luftdicht durch einen Deckel geführt, der ein passendes Plastikröhrchen mit dem gewünschten Medium darin verschliessen kann. Auf das Abflussstück der Kammer (*Abb. 4, B*) wird eine Verbindungsleitung aufgesteckt, die das Eluat der Kammer in Plastikröhrchen ableitet (*Abb. 6, Abb. 7*).

Die dritte Öffnung der Perifusionskammer (*Abb. 4, C*) wird mit einer kurzen Verbindungsleitung bestückt, an deren Ende sich ein Gummipfropfen befindet. Über diesen lässt sich das Leitungssystem entlüften. Der Pumpenkopf (ISM 724, Fa. Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) mit 8 Rollen wird von einer peristaltischen Pumpe (ISM 404B, Fa. Ismatec) angetrieben (*Abb. 6, Abb. 7, C*). Im Inneren der Kammer ruhen die Zellen auf einer Trägervorrichtung und werden von Kulturmedium gleichmäßig umströmt. Über ein Hezelement (*Abb. 6, Abb. 7, E*), auf dem die Kammern ruhen, lässt sich die Temperatur des Kulturmediums regulieren. Das Hezelement wird von Wasser durchströmt, das von einem Heizwärmer (WTE var 3185/4, Fa. Assistent, Sondheim) temperiert wird (*Abb. 7, D*).



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Aufbaus des Mikroperifusionssystems. Das Eluat der Perifusionskammer (rot) wird über einen Schlauch in Auffangröhrchen weitergeleitet. Eine der Kammer vorgeschaltete Pumpe fördert das Medium (Kultur- oder Stimulationsmedium) über einen Schlauch in die Kammer. Die Perifusionskammer ruht auf einer Heizplatte. Im Gegensatz zu der hier skizzierten Kammer  $V6_{SMTE}$  wurde eine modifizierte Kammer auf Basis der Kammer  $V5_{SM}$  verwendet (vgl. Kapitel 3.5.1.). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Kerscher, Nürnberg.

### 3.5.3. Einbringen der Zellen in die Perifusionskammer

Um die gewünschte Anzahl Langerhans-Inseln in die einzelnen Perifusionskammern zu überführen, wurde eine bedienungsfreundliche Technik gesucht, die eine möglichst geringe Abweichung von der benötigten Inselzahl/Kapselzahl in der Kammer gewährleistet. Weiter waren eine kurze Transferzeit (von der Zellkulturflasche in die Perifusionskammer) und ein möglichst geringer Zellstress während des Transfers zu fordern.



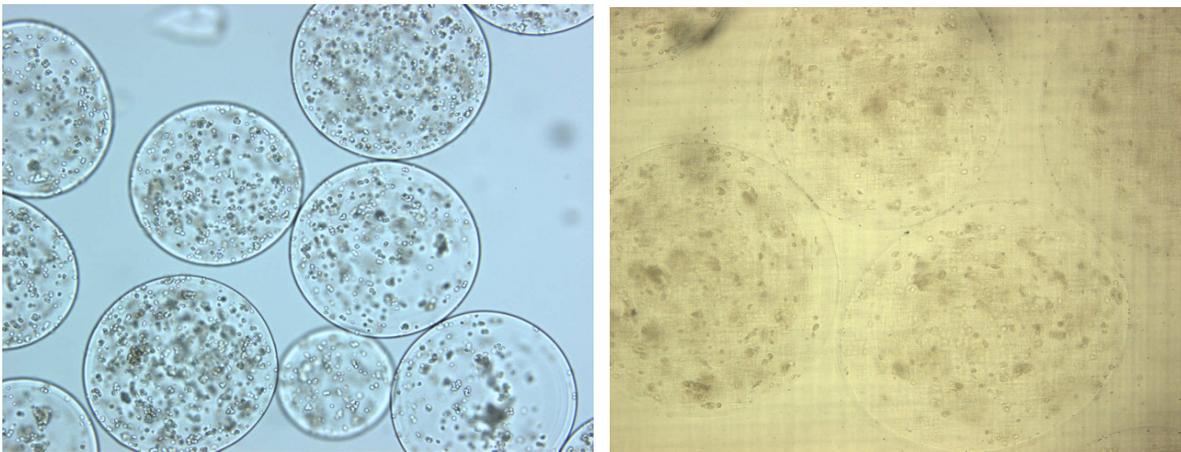
**Abb. 7:** Aufbau des Mikroperfusionssystems. Die Verbindungsleitung A ist über den Pumpenschlauch B mit der Pumpe C verbunden. Die Perifusionskammern (n=6) ruhen auf dem Heizelement E, das von dem Heizwärmer D gesteuert wird. Bereitgestellt von H. Bergauer, Zentrum für Operative Medizin, Chirurgische Klinik I, Würzburg.

Ein hohes Mass an Zellintegrität sollte bewahrt und präzise Messwerte garantiert werden. Die *in vitro* kultivierten sterilen verkapselten Inseln wurden noch in den Kulturflaschen sedimentiert (durch Aufrechtstellen der Flaschen). Sie wurden vorsichtig in eine 10 ml Pipette aufgenommen, die Pipette senkrecht gestellt, so dass sich von der Pipettenspitze aus ein Kapselsediment bildete. Die Kapseln wurden dann vorsichtig und mit wenig Medium in ein 1,5 ml Eppendorf Cap überführt. In einem kleinen Volumen wurde die Kapselanzahl lichtmikroskopisch bestimmt. Im folgenden Schritt wurde das Volumen mit der gewünschten Kapselzahl mittels einer Insulinspritze (ohne Injektionsnadel) aus dem Eppendorf Cap entnommen und in die Perifusionskammer überführt. In der Regel wurden 150-200 Kapseln pro Kammer verwendet. Da die Kapseln trotz unterschiedlicher Grössen im Sediment gleich verteilt sind, darf man von einem identischen  $\beta$ -Zellvolumen/Kammer ausgehen. Vorversuche hatten Abweichungen von nur 1% gezeigt. Nachdem die Kapseln in die Perifusionskammer überführt waren, wurden sie mit 2 Tropfen Kulturmedium überschichtet, um ihr Austrocknen zu verhindern. Ein rundes Nylonnetz (Durchmesser 20 mm) wurde mit einer Pinzette über die Kapseln gelegt. Dieses verhindert das Ausschwemmen

der Kapseln aus der Kammer über die Zu- und Abflussstutzen. Anschliessend wurde die Deckplatte mit der Bodenplatte (dazwischen der R-Ring zur Abdichtung) an drei Punkten verschraubt.

### 3.6. *In-Vitro*-Funktionsanalysen

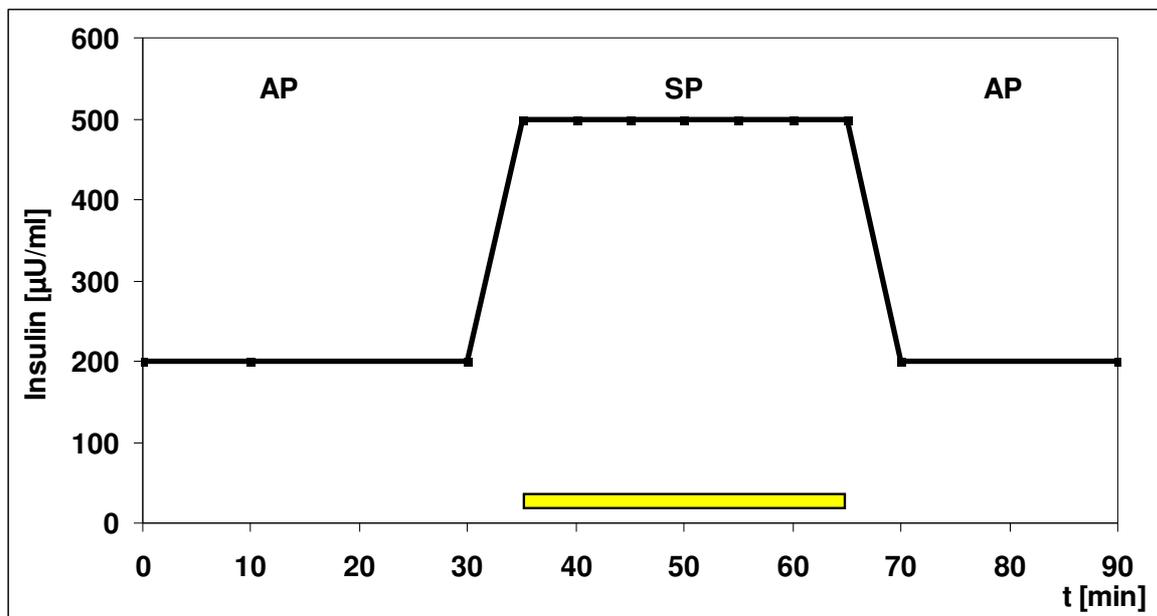
Für alle Funktionsanalysen der isolierten Inseln *in vitro* wurde die oben beschriebene *Würzburger Kammer* verwendet. Die Langerhans-Inseln waren entweder verkapselt (**Abb. 8 links**) oder unverkapselt. In den Kammern wurden die Inseln/Kapseln kontinuierlich von Medium umspült (**Abb. 8 rechts**), wobei das aus der Kammer strömende Medium in Probenröhrchen für die späteren Insulinmessungen aufgefangen wurde. Anschliessend wurde der Insulingehalt im Kulturmedium gemessen. Nachdem die zuvor geforderte Zell- oder Kapselzahl in die Perifusionskammern eingebracht war, wurde die Kammer an die Perifusionsanlage angeschlossen. Mit einer konstanten Pumpgeschwindigkeit von 0,147 ml/min wurde Medium durch die Kammern gepumpt. Die Inselzellen wurden nach Kurzzeitperifusion, Mehrfachperifusion oder Langzeitperifusion funktionell getestet.



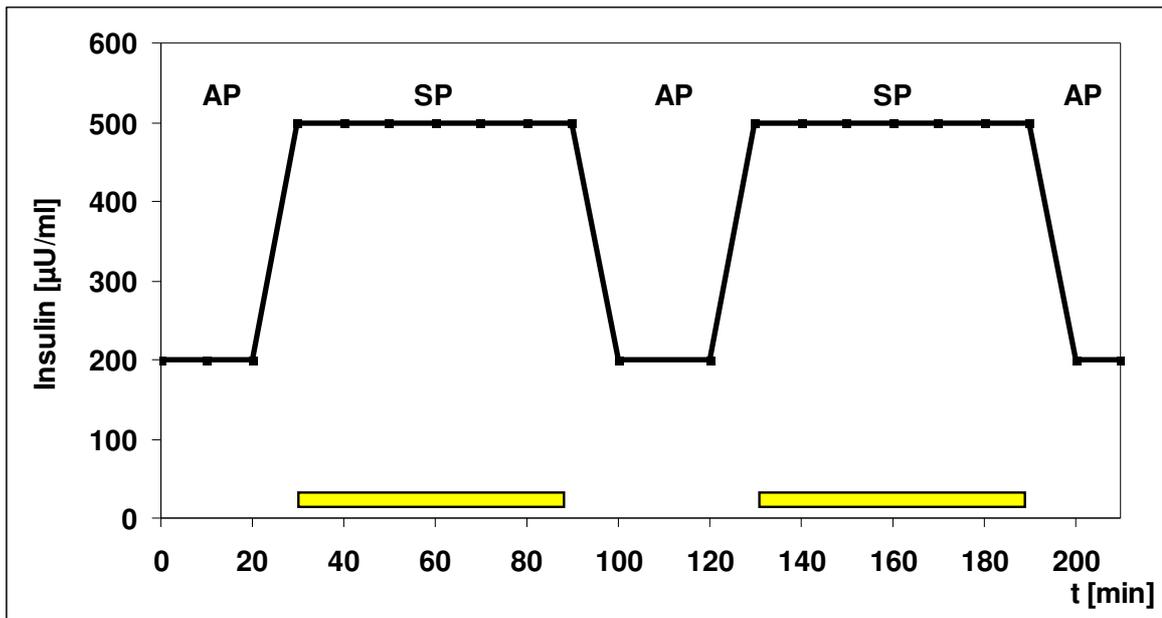
**Abb. 8:** Links eine durchlichtmikroskopische Aufnahme von Alginat-mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln auf einem Objektträger. Neben intakten Langerhans-Inseln sind auch endokrine Zellfragmente intrakapsulär erkennbar. Der Kapseldurchmesser beträgt 400-600  $\mu\text{m}$ . Die Vergrößerung ist 40-fach. Rechts: durchlichtmikroskopische Aufnahme von Alginat-mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln in der Perifusionskammer (Kapitel 3.5.1.). Die Aufnahme erfolgte bei verschlossener Kammer während der Perifusion (durch das Deckgläschen in der Deckplatte mikroskopiert), daher die etwas unscharfe Darstellung (vgl. Abb. 4). Die verkapselten Langerhans-Inseln liegen auf einem Nylonnetz und werden von Zellkulturmedium umströmt. Kapseldurchmesser 400-600  $\mu\text{m}$ , Vergrößerung 50-fach.

Bei der Kurzzeitperifusion (Dauer 70-160 min) wurden die Inselzellen einmalig einem definierten Stimulus (Dauer 30-40 min) ausgesetzt (**Abb. 9**). Bei der Mehrfachperifusion wurden die Inselzellen mindestens 2 x im Abstand von 20-70 min stimuliert (**Abb. 10**). Bei

der Langzeitperifusion (Dauer 70-315 min) wurden dieselben Zellen in einem Zeitraum von 2-11 Tagen wiederholt entsprechend *Abb. 9* stimuliert. In der Phase zwischen den Stimulationen wurden die Zellen in der Kammer mit Ham's F12 (Flussrate 1 ml/h) und 37°C kultiviert. Stets folgte nach Einbringen der Zellen in die Kammer eine Adaptationsphase (AP), die sich je nach Versuch über 10 bis 80 min erstreckte. Während der AP wurden die Zellen von Kulturmedium (Basalmedium) umflossen. Auf die AP folgte die Stimulationsphase (SP). Hier wurden sie mit verschiedenen Substanzen stimuliert, die dem Basalmedium beigemischt waren. Anschliessend folgte wieder eine AP. Während bei der Kurzzeitperifusion der Versuch hier endete, erfolgte bei der Mehrfachperifusion eine weitere SP. Der Ablauf der Langzeitperifusion entsprach jenem der Kurzzeitperifusion mit Wiederholung der Perifusion an aufeinander folgenden Tagen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte zwischen den Perifusionen im Brutschrank bei 24°C im Kulturmedium (Ham's F12 bzw. KRBB). In der AP und SP wurde den Perifusionskammern in definierten Zeitabständen Proben entnommen. Die Sammelintervalle betrugen in der AP 10 bis 50 min, in der SP wurden die Intervalle auf 2 bis 20 min verkürzt. Die Proben wurde jeweils in 5 ml fassenden Plastikröhrchen (Cat.-No. 55.525, Fa. Sarstedt AG) aufgefangen, mit Plastikstopfen (Cat.-No. 68.806.507, Fa. Sarstedt AG) verschlossen und bei -20°C tief gefroren; später wurde ihr Insulingehalt mit dem ELISA bestimmt.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung einer Kurzzeitperifusion mit *Adaptationsphase (AP)* und *Stimulationsphase (SP, gelber Balken)*. Die Kurvenpunkte geben die Probennahme wieder. Die Y-Achse entspricht der gemessenen Insulinkonzentration [µU/ml]. Die X-Achse dokumentiert den Zeitpunkt der Probennahme.



**Abb. 10:** Schematische Darstellung einer Mehrfachperfusion. Auf eine Kurzzeitperfusion nach dem Schema in **Abb. 9** folgt eine weitere Stimulationsphase (SP).

### 3.6.1. Basalmedien

Als Basalmedien wurde einmal modifizierte Ham's F12 Lösung (Cat.-No. M-L1404-I, Fa. CellConcepts) mit 180,2 mg/dl Glukose verwendet, ein anderes mal KRBB mit 54 mg/dl Glukose. Die Kulturmedien setzten sich wie folgt zusammen (**Tab. 1**):

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Kulturmedien KRBB und Ham's F12.

Zusammensetzung KRBB	Konzentration	Zusammensetzung Ham's F12	Konzentration
CaCl <sub>2</sub>	2.4 mM	Ham's F12 Kulturmedium	----
NaCl	120 mM	Hepes	25 mM
MgSO <sub>4</sub> -heptahydrat	1.2 mM	Fetal Calf Serum (FCS)	100 ml/l
KCl	5.4 mM	Penicillin/Streptomycin	10 ml/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM	Amphotericin B	10 ml/l
HEPES	20 mM	L-Glutamin	10 ml/l
BSA	0.1%	Nicotinamid (NAD)	50 mM
Glukose	3 mM	Glukose*	9.9 mM

Die Lösung wurde steril gefiltert (Cat.-No. S4654, Firma PALL Life Sciences, Dreieich) und ihr pH-Wert auf 7,4 eingestellt. \* Bereits im Ham's F12 Kulturmedium enthalten.

Mit beiden Basalmedien wurden identische Stimulationsversuche durchgeführt, unter Zusatz der in **Tab. 2** genannten 8 Mediatoren. Um die Stimulationsfähigkeit der Zellen in Basalmedien mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen genauer zu erkunden, wurden

auch direkt vergleichende Perfusionen mit Ham's F12 (Glukose 180,2 mg/dl), KRBB (Glukose 54 mg/dl) und einem dritten Kulturmedium, Hanks BSS (Cat.-No. B-L0200-I, Fa. CellConcepts; Glukose 100 mg/dl) durchgeführt. Die vergleichenden Untersuchungen erstreckten sich einerseits auf die Insulinsekretion in unstimulierten Phasen, andererseits auf die Insulinsekretion während eines Glukosestimulus. Mit Ham's F12 wurden mikroverkapselte porzine Langerhans-Inseln hinsichtlich ihrer Funktionalität im diabetogenen bzw. hyperglykämischen Milieu untersucht. Da die Zellen nach Transplantation diesem direkt ausgesetzt sind, erschien es sinnvoll, die  $\beta$ -Zellen unter diesen Bedingungen zu untersuchen. Die Versuche mit dem in vielen Publikationen beschriebenen KRBB sollten die Aussagen der Kurven unter Glukosebelastung zusätzlich validieren.

### **3.6.2. Stimulationsmedien**

Die acht verwendeten Stimulationsmedien wurden in vier Untergruppen eingeteilt (**Tab. 2**). Die erste Gruppe entsprach (a) nutritiven Faktoren, die auf die Langerhans-Inseln im Rahmen des Energiestoffwechsels und verschiedener Feedback-Mechanismen Einfluss ausüben. Die zweite Gruppe (b) schloss Mediatoren des sympathischen Nervensystems ein. Die dritte Gruppe (c) untersuchte das hormonale Ansprechverhalten mittels Glukagon. Die vierte Gruppe (d) setzte sich mit dem elektrochemischen Ansprechverhalten der Kanalphysiologie der Langerhans-Inseln auseinander. Für die Herstellung der Stimulationsmedien wurden in dem jeweiligen Basalmedium, Ham's F12 oder KRBB, gelöst. Da für die Stimulationsversuche vornehmlich verkapselte Langerhans-Inseln untersucht wurden, lag ein besonderer Schwerpunkt auf dem möglichen Einfluss der Mikroverkapselung auf das Ansprechverhalten. Mit den Stimulationsmedien in unterschiedlichen Konzentrationen sollten das Ansprechverhalten der Zellen und ihre maximale Stimulierbarkeit genauer untersucht werden. **Tab. 2** zeigt die genaue Zusammensetzung der Stimulationsmedien.

**Tabelle 2:** Die Stimulationsmedien, geordnet nach Reaktionsgruppen.

<b>Stimulantien</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Nutritive Faktoren</b>	
<b>Glukose (Gluk)</b>	<b>16,6 mmol/l 33,2 mmol/l</b>
<b>L-Arginin (Arg)</b>	<b>5 mmol/l 10 mmol/l 20 mmol/l 40 mmol/l</b>
<b>D-(-)-<math>\beta</math>-OH-Butyrat (Bs)</b>	<b>10 mmol/l</b>
<b>Neuromediatoren</b>	
<b>L-Phenylephrin (Pe)</b>	<b>100 <math>\mu</math>mol/l</b>
<b>Carbamylcholinchlorid (Cmc)</b>	<b>500 mmol/l</b>
<b>Clonidin (Clo)</b>	<b>50 <math>\mu</math>mol/l</b>
<b>Hormon</b>	
<b>Glukagon (Glg)</b>	<b>2 <math>\mu</math>mol/l</b>
<b>Sulfonylharnstoff</b>	
<b>Tolbutamid (Tb)*</b>	<b>100 <math>\mu</math>mol/l</b>
<b>Tolbutamid plus Glukose (Tb+Gluk)**</b>	<b>100 <math>\mu</math>mol/l 16,6 mmol/l</b>

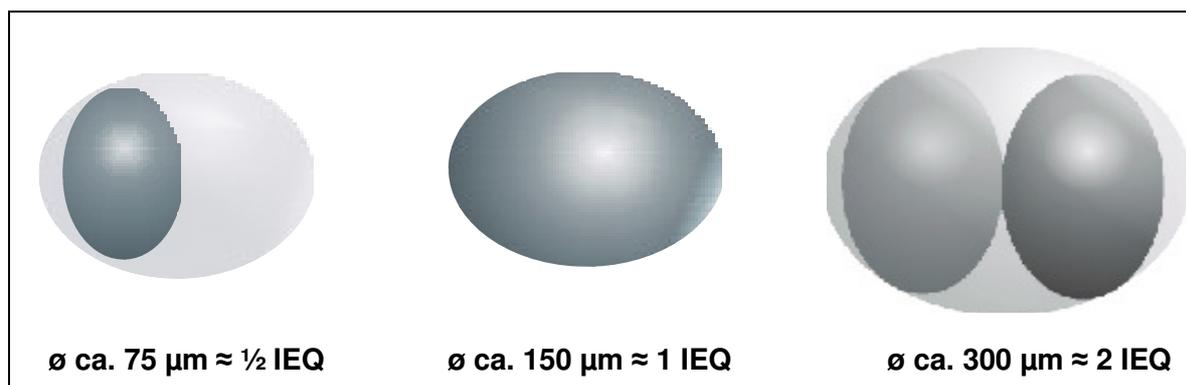
Die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von (D-+)-Glukose, Cat.-No. G-6152, Fa. Sigma-Aldrich), soll es ermöglichen, Aussagen über die Konzentrationsabhängige Stimulierbarkeit der Inseln zu treffen. Die Stimulantien Arginin (L-Arginin, Cat.-No. A-8094, Fa. Sigma-Aldrich) und  $\beta$ -Hydroxy-Buttersäure (DL- $\beta$ -OH-Buttersäure-NaCl, Cat.-No. H-6501, Fa. Sigma-Aldrich) komplettieren die Gruppe der nutritiven Faktoren, bestehend aus Kohlenhydraten (Glukose), Eiweiss (Arginin) und Fett ( $\beta$ -Hydroxy-Buttersäure). Das Ansprechverhalten durch die parasympatische Steuerung wurde mittels Carbamylcholin (Carbamylcholin Chlorid (Carbachol), Cat.-No. C-4382, Fa. Sigma-Aldrich), einem mACh-Agonist, ermittelt, die sympatische Steuerung mittels Phenylephrine (L-Phenylephrine, Cat.-No. P-6126, Fa. Sigma-Aldrich), einem  $\alpha_1$ -Agonist, und Clonidin (Clonidin, Cat.-No. C-7897, Fa. Sigma-Aldrich), einem  $\alpha_2$ -Agonist. Die endokrine Funktion nach Isolierung und Mikroverkapselung soll mit Glukagon-Stimulation (Glukagon, Cat.-No. G-3157, Fa. Sigma-Aldrich) nachgewiesen werden; ebenso die Kanal-

Physiologie des auswärts gerichteten K-Kanals, dessen SUR1 Komponente durch Tolbutamid (Tolbutamid, Cat.-No. T-0891, Fa. Sigma-Aldrich) blockiert wird. Dadurch wird die  $\beta$ -Zelle depolarisiert und setzt am Ende einer Kaskade Insulin frei. Die Temperatur aller Perifusionsmedien (Basalmedien und Stimulationsmedien) lag entweder bei 37 oder 25°C.

### 3.7. Messdaten und ihre Auswertung

#### 3.7.1. Berechnung der Inseläquivalente

Um eine vergleichbare quantitative Aussage über die Funktion der porzinen Langerhans-Inseln zu treffen, war es nötig, die Zellbeladung bzw. Kapselbeladung der Kammern zu quantifizieren. Ohne ein derartiges Vorgehen wären ausschliesslich qualitative Aussagen zu treffen, die einer genaueren Analyse entgegengestanden hätten. Um die Anzahl der Langerhans-Inseln nach Dichtegradienten-Zentrifugation zu berechnen, wurde ein Dreifach-Ansatz vorgenommen. Für die mathematische Berechnung wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Inselsuspension mit 10  $\mu\text{l}$  Dithizon in einer 24-Lochplatte gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Gezählt wurden ausschliesslich Langerhans-Inseln mit einem Durchmesser  $\geq 50\mu\text{m}$ , die frei von exokrinem Gewebe waren. Um die unterschiedlichen Grössen der isolierten Inseln innerhalb einer einzigen sowie zwischen verschiedenen Isolierungen zu vergleichen, wurden die Inseln in Inseläquivalente (IEQ) umgerechnet: Ein IEQ entspricht einem Inseldurchmesser von 150  $\mu\text{m}$  [52].



**Abb. 11:** Schematische Darstellung der Anzahl der Inseläquivalente anhand des lichtmikroskopisch ermittelten Durchmessers der Langerhans-Inseln.

Anhand des mikroskopisch ermittelten Durchmessers wurden die Langerhans-Inseln einer der folgenden Grössengruppen zugeteilt: 50-99 µm, 100-149 µm, 150-199 µm, 200-249 µm, 250-299 µm, 300-349 µm und  $\geq 350$  µm. Die Anzahl in jeder Durchmessergruppe wurde mit dem entsprechenden Umrechnungsfaktor multipliziert (**Tab. 3**).

**Tabelle 3:** Darstellung der Umrechnungsfaktoren für die unterschiedlichen Durchmesser der Langerhans-Inseln.

Durchmesser der Langerhans-Insel [µm]	Umrechnungsfaktor
50-99	0,16
100-149	0,66
150-199	1,7
200-249	3,5
250-299	6,3
300-349	10,4
$\geq 350$	15,8

Die Gesamtzahl der gewonnenen IEQ wurde mit **Formel 1** errechnet. Teilt man die IEQ gesamt durch das Organgewicht vor der Isolierung, so erhält man die IEQ/g Organ, womit unterschiedliche Isolierungsergebnisse quantitativ gut vergleichbar werden.

$$\text{IEQ}_{\text{gesamt}} = \frac{P_1 + P_2 + P_3}{V_p} \times V_g$$

Dabei entspricht	
$\text{IEQ}_{\text{gesamt}}$	
$P_1 - P_3$	Anzahl IEQ in der Präparation
$V_p$	Volumen der Proben in ml
$V_g$	Volumen der Gewebesuspension in ml

**Formel 1:** Mathematisches Schema zur Berechnung der IEQ-Zahl in einer Isolierung.

Wurden für die Experimente unverkapselte Langerhans-Inseln verwendet, erfolgte die Kalkulation der entnommenen Zellen ( $IEQ_{\text{Probe}}$ ) aus der Kulturflasche mittels einfachem Dreisatz, bei dem eine zumindest kurzfristige Gleichverteilung der durchmischten Inseln im Kulturmedium vorausgesetzt wurde.

$$IEQ_{\text{Probe}} = \frac{IEQ_{\text{gesamt}}}{V_{\text{gesamt}}} \times V_{\text{Probe}}$$

**Dabei entspricht**

$IEQ_{\text{gesamt}}$	<b>Gesamt IEQ der Präparation im Kulturmedium</b>
$V_{\text{gesamt}}$	<b>Volumen des Kulturmediums in ml</b>
$V_{\text{Probe}}$	<b>Volumen der entnommenen Probe in ml</b>

**Formel 2:** Mathematisches Schema zur Berechnung der IEQ-Zahl in einer verwendeten Probe.

Ausgehend von der IEQ-Zahl der Präparation ( $IEQ_{\text{gesamt}}$ ) erfolgte bei der Verkapselung der isolierten Langerhans-Inseln eine weitergehende Kalkulation, um die Anzahl der in der Kapsel eingeschlossenen Langerhans-Inseln zu ermitteln.

### 3.7.2. Reinheit und Ausbeute der Langerhans-Inseln

Die Reinheit der Inselpräparationen nach der Dichtegradienten-Zentrifugation bezeichnet den Anteil des endokrinen Gewebes an der Gewebesuspension. Der Anteil an reinen Inseln wird in Prozent ausgedrückt und lichtmikroskopisch nach Dithizon-Färbung beurteilt. Um die Ausbeute der Inseln zu bestimmen, wurde das Verhältnis IEQ/g nach der Desintegration mit IEQ/g nach der Dichtegradienten-Zentrifugation prozentual ausgedrückt.

### 3.7.3. Insulinbestimmung

Die quantitative Insulinmessung wurde mittels eines selbst angefertigten ELISA durchgeführt. Der ELISA ist spezifisch für humanes Insulin, wobei eine Kreuzreaktivität von

100% zu porzinem und bovinem Insulin besteht. Eine Kreuzreaktivität mit humanem oder porzinem Proinsulin wird ausgeschlossen. Als Standards (0, 7, 13, 33, 91, 230  $\mu\text{IU/ml}$ ) und Kontrollen ( $16,5 \pm 4,1$   $\mu\text{IU/ml}$   $52,9 \pm 13,2$   $\mu\text{IU/ml}$ ) wurden Produkte aus einem handelsüblichen ELISA (Human Insulin EASIA, Fa. Biosource International, Camarillo, USA) verwendet. Die Beschichtung der 96-Loch ELISA-Platte (Cat.-No. NUNC442404, NUNC-IMMUNO-Plate, Maxisopr F96, Fa. Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) erfolgte durch einen monoklonalen Maus-anti-human Insulin Antikörper IN-05 (Cat.-No. T-1321, Fa. BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz), der mit einer Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  in 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  Puffer (Cat.-No. 106329, Fa. Merck KGaA, Darmstadt) gelöst wird, der zuvor auf pH 9,6 eingestellt wurde. Nach einstündiger Inkubation wurde die Platte zunächst mit einer Waschlösung aus PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, Cat.-No. BR0014G, Fa. Oxoid Limited, Hampshire, England) und 0,05%igem TWEEN 20 (Polyoxyethylensorbitmonolaurat, Fa. Sigma-Aldrich) gewaschen. Danach wurde mit einer Lösung aus PBS-Puffer, 0,05%igem Tween 20 und 1%igem BSA (Bovines Serum Albumin, Cat.-No. 11925, Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), kurz PBS/BSA/TWEEN, die Platte für eine Stunde blockiert. Nach dem Waschen wurden die aus der Perifusion gewonnenen Proben mit einer bedarfsgerechten Verdünnung, die Standards, Kontrollen und der Hintergrund in Form des Grundmediums in die 96-Loch ELISA-Platte pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Platte wie oben beschrieben gewaschen. Als Primärantikörper wurde sodann ein polyklonaler Meerschweinchen-anti-Insulin Antikörper (Polyclonal Guinea Pig Anti-Insulin, Cat.-No. A0564, Fa. DAKO Corporation, Carpinteria, USA), in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  in PBS/BSA/TWEEN, einpipettiert und für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Platte wiederum gewaschen und der Peroxidase-konjugierte anti-Meerschweinchen IgG Sekundärantikörper (Peroxidase conjugated Affinity Purified anti-Guinea Pig IgG, Cat.-No. 606-103-129, Fa. Rockland, Gilbertsville, USA), in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/10\text{ml}$  in PBS/BSA/TWEEN, einpipettiert und für eine Stunde inkubiert. Nach nochmaligem Waschen der Platte wurde die Farbstoffentwicklung durch hinzugesetztes ABTS (2,2' Azino-bis-(3-ethylenbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Cat.-No. A-1888, Fa. Sigma-Aldrich), das in 0,1 M Citratpuffer (Citronensäure-Monohydrat, Cat.-No. 100244, Fa. Merck KGaA) mit pH 4,35 und 1:10.000 verdünnt in Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$  30%ige Stammlösung, Cat.-No. 31642, Fa. Sigma-Aldrich) vorliegt, erreicht. Die Absorption wurde bei 405 nm Wellenlänge mit Hilfe eines Readers (MRX Microplate Reader, Fa. Dynatech Medical Products Limited, Guernsey, Great Britain) gemessen. Mittels Computer Software (Bio Linx<sup>TM</sup> Version 2.21, Fa. Dynatech Laboratories Incorporated,

Chantilly, USA) wurde eine Standardkurve erstellt, mit der die Extinktionswerte des Readers in eine Stoffkonzentration (Einheit:  $\mu\text{U/ml}$ ) umgerechnet wurden.

#### **3.7.4. Faktoren bei der Analyse des Insulin-Ausschüttungsprofils**

Um die Funktion der Langerhans-Inseln zu analysieren, wurden die gemessenen Insulinkonzentrationen in ein Koordinatensystem eingetragen. Die x-Achse gab die Zeit der Probeentnahme wieder. Die y-Achse entsprach der gemessenen Insulinkonzentration. Hieraus ergab sich ein graphisch anschauliches Sekretionsprofil über die Zeit der Perifusion. Da aufgrund verschiedener Einflussgrößen (Organgewicht, Alter des Spendertiers, Funktionalität der  $\beta$ -Zellen) ein exakt gleiches Profil bei Versuchen mit unselektierten Langerhans-Inseln von verschiedenen Spendertieren nicht zu erwarten war, mussten zur Analyse der Funktion und Reaktion der Langerhans-Inseln zusätzliche Faktoren herangezogen werden. Diese führten nicht nur zu einer besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Perifusionsergebnisse unterschiedlicher Isolierungen, sondern zu einer detaillierteren Analyse des einzelnen Versuches. Ein Mittelwert, gebildet aus den Profilen unterschiedlicher Inselzellisolierungen, aufgetragen über die Zeit, ergab in Vorversuchen nur eine unzureichende Aussagekraft. Ursächlich war hier, dass ein ursprünglich deutliches Profil in der Insulinausschüttung nach Stimulation aufgrund von zeitlichen Verzögerungen, Verschiebung oder Versagen anderer Isolierungen, verloren geht. Hierdurch würde die Aussagekraft vermindert und das Ergebnis verfälscht. Für die Analyse der Kurven wurde deshalb folgendes Vorgehen gewählt: Um Kurven vergleichbar zu machen, die die Insulinausschüttung unterschiedlich vieler Zellen widerspiegeln, wurde für alle Konzentrationen neben den Absolutwerten ( $c_{\text{abs}}$ ), die Konzentrationen auch als Absolutkonzentration pro vorhandenem IEQ ( $c/\text{IEQ}$ ) bestimmt. Dieser Wert gibt die von einem Inselzelläquivalent ausgeschüttete Insulinmenge über einen bestimmten Zeitraum wieder. Der Vergleich zwischen Perifusionskammern, die mit einer unterschiedlichen IEQ-Zahl befüllt sind, wurde dadurch möglich. Bei sämtlichen gemessenen Konzentrationen wurde der Basalwert, also die Insulinkonzentration der zugehörigen unstimulierten Langerhans-Inseln (Kontrollkammer), vom Wert nach Stimulation abgezogen. Dieser Wert gibt die relative Konzentration ( $c_{\text{rel}}$ ) an und ist mit anderen Isolierungen vergleichbar. Die Konzentrationen jedes Einzelwertes lagen so in vier Formen vor (*Tabelle 4*).

**Tabelle 4:** Unterschiedliche Konzentrationsangaben des in der Mikroperifusion ausgeschütteten Insulins.

$c_{\text{abs}}$	<b>Insulinkonzentration in der stimulierten Probe</b>
$c_{\text{abs}}/\text{IEQ}$	<b>Insulinkonzentration in der stimulierten Probe, geteilt durch die Anzahl der Inseläquivalente (IEQ) aus der Perifusionskammer, von der die Probe stammt</b>
$c_{\text{rel}}$	<b>relative Insulinkonzentration: Insulinkonzentration in der stimulierten Probe, abzüglich des Kontrollwerts der unstimulierten Probe</b>
$c_{\text{rel}}/\text{IEQ}$	<b>relative Insulinkonzentration in der stimulierten Probe, geteilt durch die IEQ-Zahl in der Perifusionskammer, von der die Probe stammt</b>

Ausgehend vom Sekretionsprofil des Insulins, das, ausgedrückt als relative Insulinkonzentration über die Zeit, aufgetragen wurde, wurden die Flächen unter der Kurve (AUC, Abk. für engl. *Area under the curve*) bestimmt. Hierzu wurde die Fläche unter jedem gemessenen Konzentrationspunkt bis zu dem vorangegangenen ermittelt. Grundlage für die Auswertungen bilden keine Einzelpunkte, sondern die Flächen unter den Kurven. Die Berechnung erfolgt über die Trapezregel (**Formel 3**):

$$\sum_{i=1}^{n-1} (x_{i+1} - x_i) \times \frac{(y_{i+1} + y_i)}{2}$$

**Formel 3:** Berechnung der *area under the curve* (AUC) im Intervall (Trapezregel).

Um verlässliche Ergebnisse zu gewährleisten, wurde zur Kontrolle eine präzisere mathematische Methode benutzt. Aus einem Datensatz wurde mit der Software Mathematika 3.0 eine Näherungsfunktion erstellt. Durch Integration dieser Funktion wurde die Fläche unter der Kurve präzise berechnet. Unterschiede zwischen der Trapezregel und der Integration lagen unter 0,1%. Da in der Analyse der Kurven die Kinetik der Insulinsekretion im Mittelpunkt steht, wurden die Flächen unter den Kurven getrennt nach AUC A-E und AUC<sub>gesamt</sub> berechnet und miteinander verglichen (**Tab. 5**). Für AUC<sub>gesamt</sub> und AUC B wurden zusätzlich Indices AUC<sub>gesamt rel</sub> und AUC B<sub>rel</sub> gebildet. Diese wurden als Quotient aus AUC<sub>ge-</sub>

samt bzw. AUC B und dem zugrunde liegenden Zeitintervall der jeweiligen Phase gebildet und beziffern die Insulinausschüttung pro Zeit.

**Tabelle 5:** Darstellung der unterschiedlichen AUC-Formen.

<b>AUC A</b>	<b>Fläche unter der Kurve vor der ersten Stimulation</b>
<b>AUC B</b>	<b>Fläche unter der Kurve während der ersten Stimulation</b>
<b>AUC B<sub>rel</sub></b>	<b>Fläche unter der Kurve während der ersten Stimulation geteilt durch Stimulationsdauer</b>
<b>AUC C</b>	<b>Fläche unter der Kurve nach der ersten Stimulation</b>
<b>AUC D</b>	<b>Bei Mehrfachstimulation: Fläche unter der Kurve während der zweiten Stimulation</b>
<b>AUC E</b>	<b>Bei Mehrfachstimulation: Fläche unter der Kurve nach der zweiten Stimulation</b>
<b>AUC<sub>gesamt</sub></b>	<b>Gesamtfläche unter der Kurve = Gesamtinsulinausschüttung bei Perifusion</b>
<b>AUC<sub>gesamt rel</sub></b>	<b>Gesamtfläche unter der Kurve, geteilt durch die Perifusionsdauer</b>

Für jedes Stimulationsprofil wurde ein Stimulationsindex (SI) gemäß **Formel 4** errechnet. Die grösste gemessene Insulinkonzentration  $c_{\max}$  (stimulierte Kammer) in der Zeitphase der Stimulation wird durch den Mittelwert aller Konzentrationen (der unstimulierte Kontrollkammer) geteilt.

$$SI = \frac{c_{\max}}{c(\text{Mittelwert Kontrolle})}$$

**Formel 4:** Mathematische Formel zur Berechnung des Stimulationsindex SI.

Da davon auszugehen war, dass das Alter der Langerhans-Inseln nach Isolierung einen Einfluss auf die Funktionalität und die Stimulierbarkeit hat, wurden jeweils nur gleich alte Inseln miteinander verglichen und das entsprechende Alter der Langerhans-Inseln nach Isolierung der jeweiligen Perifusion zugeordnet.

### **3.8. Fotodokumentation**

Die Fotodokumentation erfolgte mit der Digitalkamera ColorView 12 (Fa. Soft Imaging System SIS, Münster) unter Verwendung der Bilddarstellungs-Software analySIS<sup>®</sup> Version 3.2 (Fa. Soft Imaging System SIS). Das Bildmaterial wurde digital im JPEG-Format gespeichert. Der interne Vergrößerungsfaktor betrug 2,5. Weitere Abbildungen wurden mit einer Kamera des Herstellers Sony (Modell Ixus V) angefertigt.

### **3.9. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und graphische Aufbearbeitung der Ergebnisse wurde mit der Software SPSS Version 13.0.1, Microsoft<sup>®</sup> Excel/Word 2002 durchgeführt. Die methodische Beratung erfolgte durch Herrn Dr. Leising (Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung IZKF, Universität Würzburg). Da sich bei Analyse der Daten herausstellte, dass keine Normalverteilung der Messwert vorlag, wurde die Entscheidung gegen eine parametrische Varianzanalyse getroffen. Im verteilungsfreien Verfahren wurden die Ergebnisse durch eine Ranganalyse im nonparametrischen Mann-Whitney-Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben analysiert. Parameterfreie statistische Methoden sind mathematische Prozeduren zum Testen statistischer Hypothesen. Anders als parametrische statistische Tests machen sie keine Annahmen über die Wahrscheinlichkeitsverteilung der untersuchten Variablen. Die Proben im Test entsprachen dabei einer Perifusionskammer, aus der eine Stichprobe zum Zeitpunkt t gezogen wurde. Den statistischen Berechnungen liegen unterschiedlich grosse Zahlen an Datenpunkten zugrunde. Dies wurde im Ergebniskapitel für den Einzelfall vermerkt. In den Sekretionsgrafiken sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte angegeben. Die Ergebnisse waren statistisch signifikant, wenn  $p < 0,05$  war.

## 4. Ergebnisse

Die nachfolgenden Ergebnisse wurden auf der Grundlage von 285 Einzelperfusionen mit unstimulierten und stimulierten, mit unverkapselten und mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln erarbeitet. Neben dem routinemässigen Qualitätsmanagement vor, während und nach der Isolierung und der Verkapselung, wurden für die Auswahl der Spendertiere und Langerhans-Inseln keine besonderen Auswahlkriterien angelegt. Eine definierte Anzahl Inseläquivalente (IEQ) wurde stets nach dem Zufallsprinzip auf die Perifusionskammern verteilt. Die Vitalität der IEQ, die aus hirntoten Schweinen mit einer 20-30-minütigen warmen Ischämie isoliert wurden, lag in der Regel bei 80-85%.

### 4.1. Einfluss unterschiedlicher Zellkulturmedien auf die Insulin-Ausschüttung

#### 4.1.1. Ham's F12 und KRBB ohne Glukose-Zusatz

Um den Einfluss der gebräuchlichsten Zellkulturmedien auf die Insulinausschüttung der Langerhans-Inseln *in vitro* zu erfassen, wurden zunächst vergleichende Perfusionen mit Ham's F12 und KRBB durchgeführt. Diese erfolgten ohne zusätzliche Stimuli. Ziel war es, die basale Insulinsekretion in beiden Medien zu ermitteln, da in der Literatur sehr unterschiedliche Medien – unmodifiziert und modifiziert – verwendet werden, ohne jedoch die genauen Auswirkungen auf das Ergebnis der Perfusion zu kennen. Der wichtigste Unterschied dieser beiden Medien besteht in ihrer unterschiedlichen Glukosegrundkonzentration. Da zu erwarten ist, dass die porzinen Langerhans-Inseln auf einen Glukosereiz mit Insulinfreisetzung reagieren, war davon auszugehen, dass die Glukose im Ham's F12 die Perfusion im Sinne einer Stimulation beeinflusst.

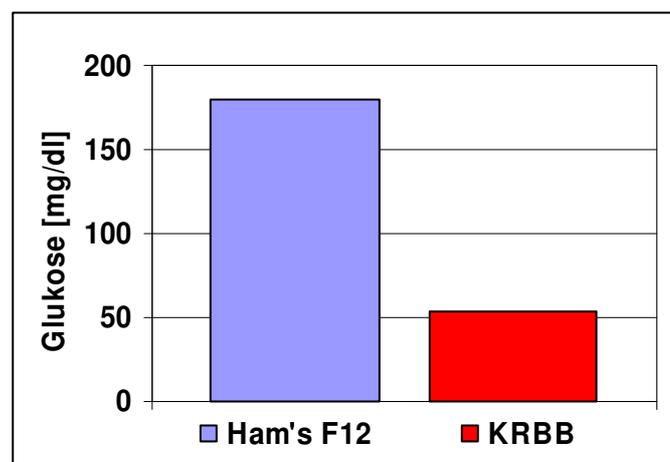
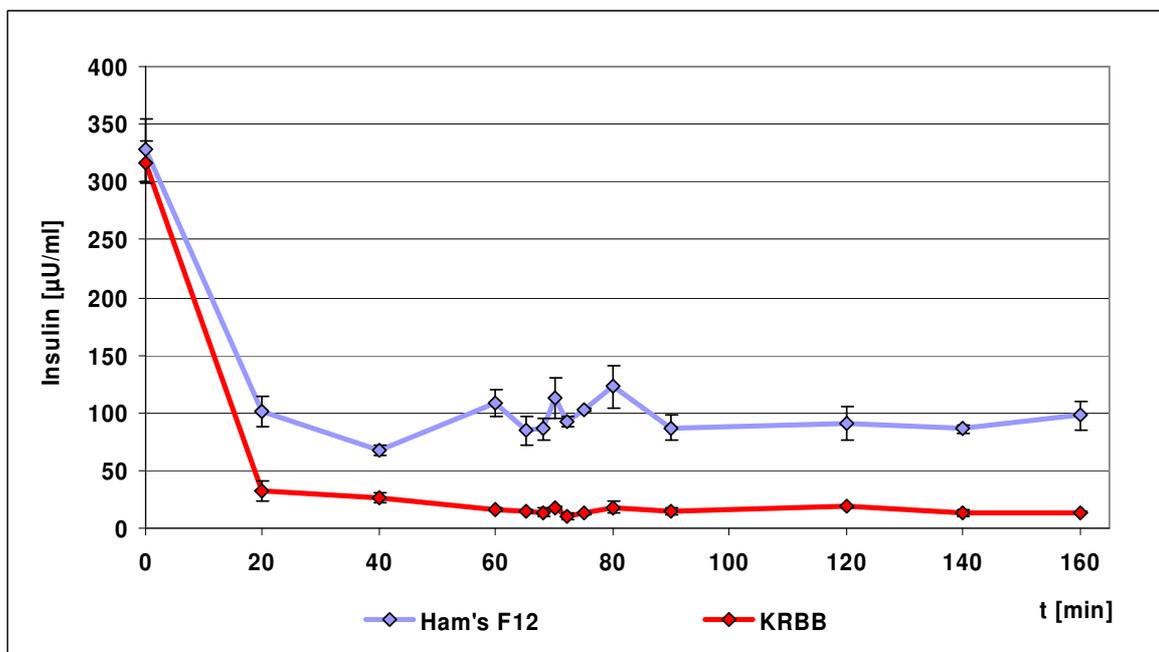


Abb. 12: Glukosegrundkonzentration in den für die Kultur der Langerhans-Inseln gebräuchlichen Medien Ham's F12 und KRBB.

Im Ham's F12 beträgt der Glukosegehalt laut Hersteller 180 mg/dl (10 mM), im KRBB 54,05 mg/dl (3 mM). Der Normalwert von Glukose im Nüchternzustand liegt im gesunden Menschen zwischen 70 und 110 mg/dl. Ein Wert über 110 mg/dl wird nach ausgiebigen Mahlzeiten erreicht. Dieser sinkt dann bei Stoffwechselgesunden schnell wieder auf unter 100 mg/dl. Ein Diabetiker hingegen weist Nüchternblutzuckerwerte von über 126 mg/dl (7 mM) auf. Bei Werten unter 50 mg/dl handelt es sich um eine Hypoglykämie.

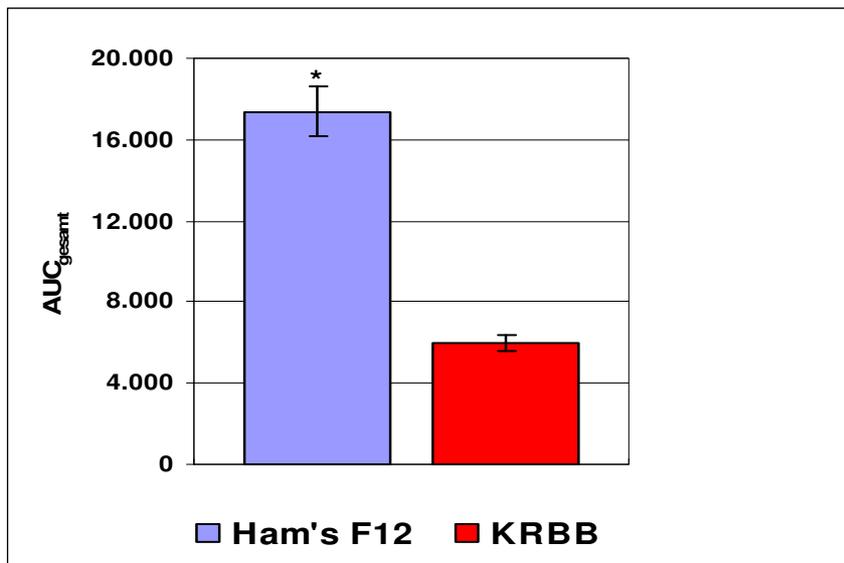
Die beiden Medien entsprechen somit unterschiedlichen physiologischen Grundzuständen im Organismus. Ham's F12 stellt für die Zellen somit schon in der Adaptationsphase eine hyperglykämische Umgebung dar, und somit einen Stressfaktor, auf welchen die Langerhans-Inseln mit einer gesteigerten Insulinfreisetzung reagieren dürften. Der Glukosegehalt des KRBB liegt im unteren Normalbereich und entspricht einem normoglykämischen Milieu im Gesunden.

**Abbildung 13** zeigt, dass die Inseln in Ham's F12 deutlich stärker stimuliert werden und folglich mehr Insulin freisetzen. Der Mittelwert der Insulinsekretion in Ham's F12 beträgt nach einer 160-minütigen Perifusion pro Messung  $113 \pm 18 \mu\text{U/ml}$  ( $n=4$ ). In KRBB wird bei Verwendung identischer Inseln nur ein Mittelwert von  $38 \pm 6,8 \mu\text{U/ml}$  erreicht ( $n=4$ ).



**Abb. 13:** Perifusion von porzinen Langerhans-Inseln in Ham's F12 und KRBB (jeweils ohne Glukose-Zusatz). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert (MW) von vier Einzelversuchen ( $n=4$ )  $\pm$  Standardabweichungen (SA). Die Messung erfolgte kontinuierlich über 160 Minuten.

Betrachtet man die Gesamtmenge des freigesetzten Insulins (**Abb. 14**), so wird in Ham's F12 über den gesamten Messzeitraum die dreifache Insulinmenge, verglichen mit KRBB, sezerniert. Die statistische Auswertung für nonparametrische Daten bestätigt für die Insulingesamtsekretion ( $AUC_{\text{gesamt}}$ ) einen signifikanten Unterschied ( $p=0,000$ ) zwischen beiden Medien (vgl. Tab. 6).



**Abb. 14:** Perifusion von porzinen Langerhans-Inseln in Ham's F12 und KRBB (jeweils ohne Glukose-Zusatz). Dargestellt ist das während der Dauer einer Perifusion freigesetzte Gesamtinsulin in Ham's F12 und KRBB.  $MW \pm SA$  ( $n=4$ ).  $*p=0,000$  s. (vgl. Tab. 6).

#### 4.1.2. Ham's F12 und KRBB mit Glukose-Zusatz

Es wurde separat untersucht, wie sich Ham's F12 und KRBB, nun mit Glukose-Zusatz, auf das Aktivierungsniveau der Inseln auswirken. In jeweils 4 Perifusionen wurden die Inseln 30 Minuten mit 300 mg/dl Glukose stimuliert und die Ausschüttungskinetik (SI und *Time To Peak* (TTP)) ermittelt. Das zugehörige Ausschüttungsprofil ist in **Abb. 15** dargestellt. Danach weisen Inseln in Ham's F12 die grössere Stimulierbarkeit auf; tatsächlich jedoch muss hier das gegenüber KRBB erhöhte Ausgangsniveau der Basalsekretion (vgl. Abb. 13) berücksichtigt werden. Berichtigt ergibt sich daraus für Ham's F12 ein SI von  $3,54 \pm 0,78$  und für KRBB ein SI von  $4,97 \pm 0,63$  (**Abb. 16**). Das Verhältnis der SI von Ham's F12 und KRBB beträgt somit 1:1,4. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ( $p=0,000$ ) (vgl. Tab. 7).

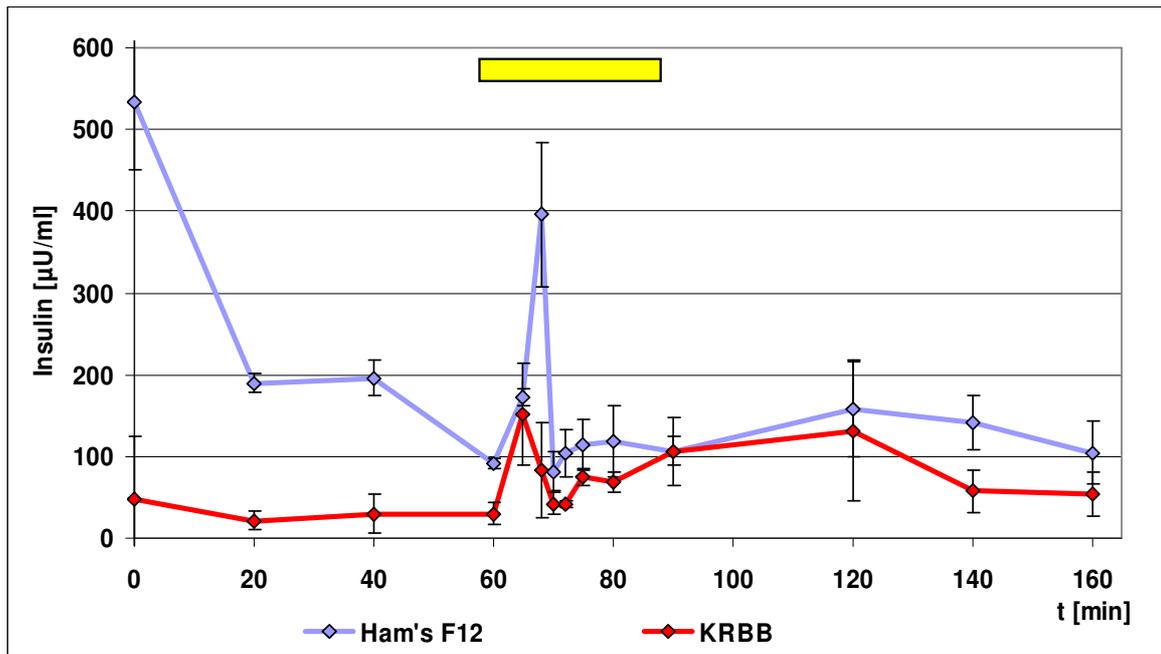


Abb. 15: Vergleich der Insulinfreisetzung aus porzinen Langerhans-Inseln, die in Ham's F12 und KRBB, jeweils mit dem bekannten Glukose-Zusatz, kultiviert wurden: Nach 60 Minuten erfolgte die Stimulation mit 300 mg/dl Glukose für 30 Minuten (gelber Balken). Jeder Datenpunkt entspricht dem MW±SA aus n=4 Versuchen.

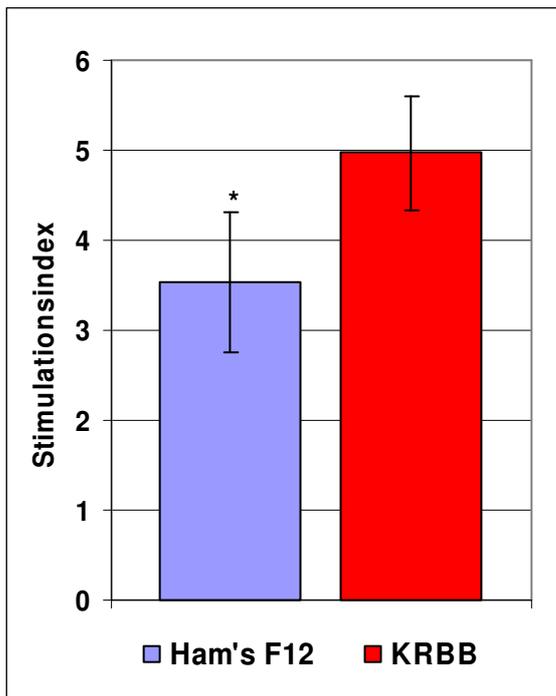


Abb. 16: Stimationsindex von porzinen Langerhans-Inseln in Ham's F12 und KRBB mit Glukose-Zusatz. MW±SA (n=4). \*p=0,000 s. (vgl. Tab. 7).

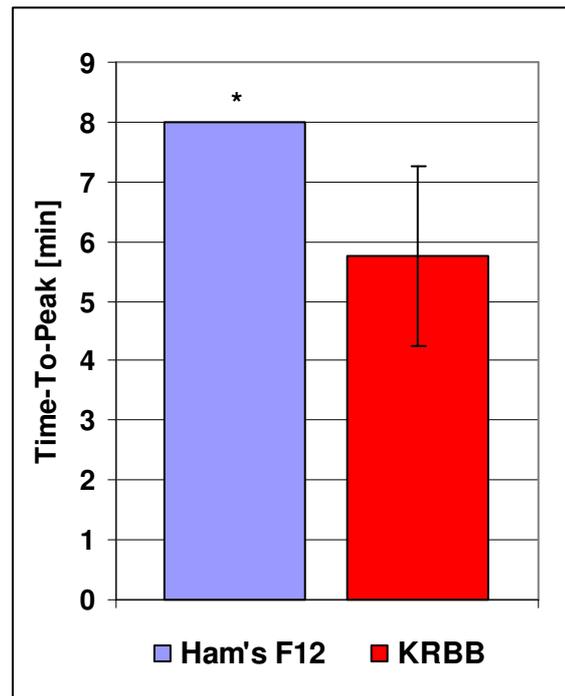
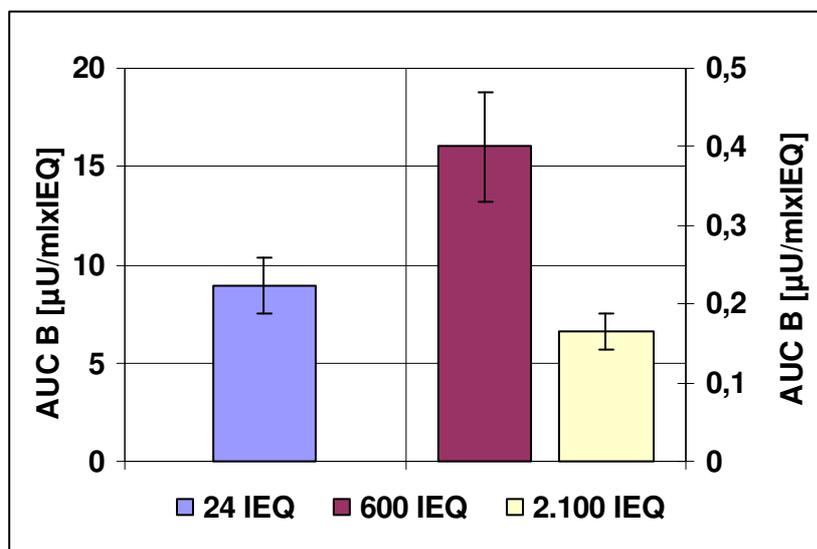


Abb. 17: Time To Peak von porzinen Langerhans-Inseln in Ham's F12 und KRBB mit Glukose-Zusatz. MW±SA (n=4). \*p=0,1 n. s. (vgl. Tab. 7).

Für die TTP besteht zwischen beiden Gruppen mit 8 und  $5,75 \pm 1,5$  Minuten kein statistisch signifikanter Unterschied (**Abb. 17**). Die Neigung zu einer verlängerten TTP bei Kultur der Inseln in Ham's F12 ist jedoch deutlich erkennbar.

#### 4.2. Einfluss der IEQ-Zahl auf die Insulin-Ausschüttung

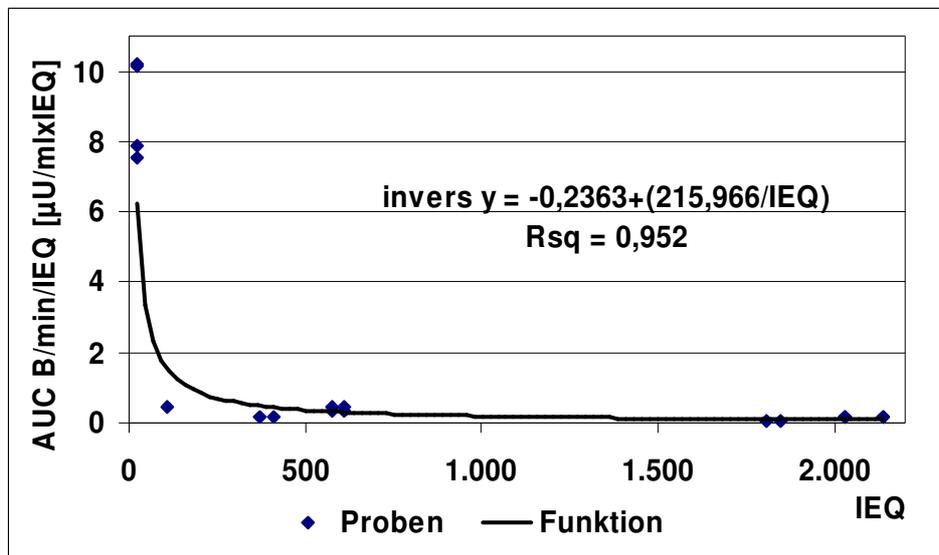
Ziel dieses Versuchs war es, den Einfluss unterschiedlicher IEQ-Zahlen auf die Insulin-Ausschüttung – bei konstantem Kammervolumen – zu bestimmen. Wünschenswert wäre es, über die so ermittelten Werte Rückschlüsse auf das notwendige Transplantatvolumen *in vivo* zu ziehen. Langerhans-Inseln aus zwei unterschiedlichen Isolierungen wurden mit 300 mg/dl Glukose stimuliert. Während der Stimulationsphase wurden 7-9 Bestimmungen der Insulinkonzentration durchgeführt (d. h. Kulturüberstände gewonnen, deren Insulingehalt später mit dem entsprechenden ELISA bestimmt wurde). Aus den Einzelwerten wurden die AUC B-Werte (vgl. Tab. 5) für jede Perifusion ermittelt. **Abbildung 18** zeigt Mittelwert und Standardabweichungen aus 4 gleichartigen Perifusionen. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Werte zu erhalten, wurden die AUC B-Werte durch die Dauer der Stimulation und die Anzahl der IEQ in der Perifusionskammer geteilt.



**Abb. 18:** Insulinfreisetzung aus porzinen Langerhans-Inseln nach Stimulation mit Glukose. Drei Perifusionskammern wurden mit 24, 600 und 2.100 IEQ gefüllt. Dargestellt ist die ausgeschüttete Insulinmenge pro IEQ und Minute während der (ersten) Stimulation (vgl. Tab. 5), die hier als *Area under the curve B* (AUC B) angegeben ist. MW $\pm$ SA (n=4).

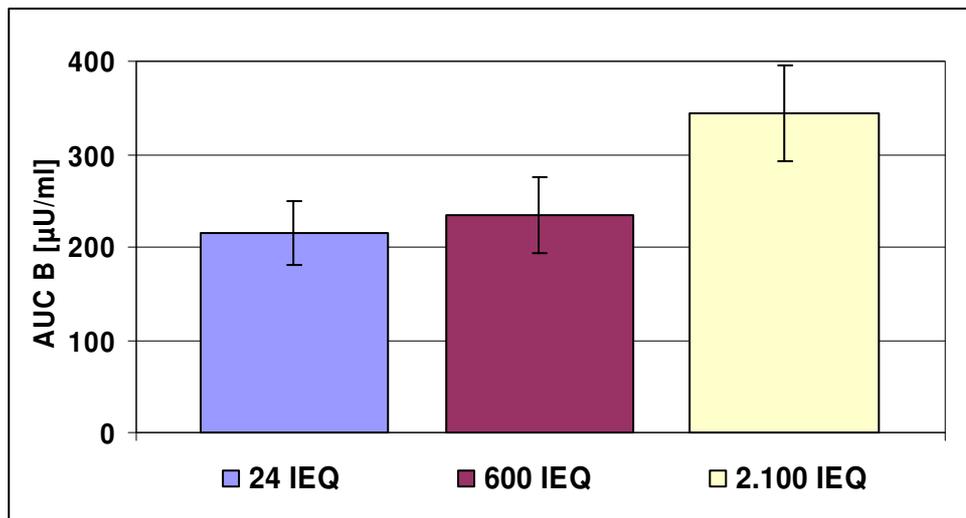
Betrachtet man **Abb. 18** genauer, so ist erkennbar, dass ein IEQ in der Kammer mit 24 Inseln bis zu 70 mal mehr Insulin freisetzt als ein IEQ in den Kammern mit den höheren Insel-Zahlen: Während ein „IEQ-24“ pro Minute im Mittel  $8,94 \pm 2,63 \mu\text{U/ml}$  Insulin sezerniert, sezerniert ein „IEQ-600“ im Mittel nur noch  $0,40 \pm 0,13 \mu\text{U/ml}$  und ein „IEQ-2.100“ nur noch  $0,16 \pm 0,03 \mu\text{U/ml}$  Insulin.

Die graphische Darstellung der Messergebnisse in **Abb. 19** ermöglicht die mathematische Berechnung der IEQ-Funktion in Abhängigkeit von der IEQ-Zahl. Als numerisches Gütekriterium der Funktion dient der Nash-Sutcliffe Koeffizient  $R_{sq}$ , der analog dem Korrelationskoeffizienten (Bestimmtheitsmaß)  $r^2$  in der Statistik einen Hinweis über die durch das Modell erklärte Varianz der Insulinfreisetzung pro Minute und IEQ liefert.  $R_{sq}$  strebt bei perfekter Übereinstimmung gegen 1.0, kann aber bei schlechter Übereinstimmung auch Werte bis -1.0 annehmen. Allerdings muss man berücksichtigen, dass die Empfindlichkeit von  $R_{sq}$  auch von der Gesamtvarianz der zuvor gemessenen Insulinkonzentrationen abhängt (vgl. Abb. 18). Mathematisch lässt sich in Abhängigkeit von der IEQ-Zahl mit der Funktion (f) invers  $y = -0,2363 + (215,966/\text{IEQ})$  die nach Glukosestimulation zu erwartende Insulinfreisetzung pro Minute und IEQ berechnen. Der Nash-Sutcliffe Koeffizient  $R_{sq}$  erreichte bei dieser Funktion einen Wert von 0,952.



**Abb. 19:** Einfluss unterschiedlicher IEQ-Zahlen auf die Insulin-Ausschüttung pro IEQ und Minute.

Vergleicht man die von den verschiedenen IEQ sezernierte Gesamtinsulinmenge AUC B während der ersten Stimulationsphase (*Abb. 20*), so zeigt sich, dass zwischen 24 und 600 IEQ kein signifikanter Unterschied besteht. Bei nahezu 100-fach höherer IEQ-Zahl von 2.100 wurden aufgrund der verminderten Insulinfreisetzung pro IEQ (vgl. *Abb. 18*) lediglich 60% mehr Insulin sezerniert als von den 24 IEQ.

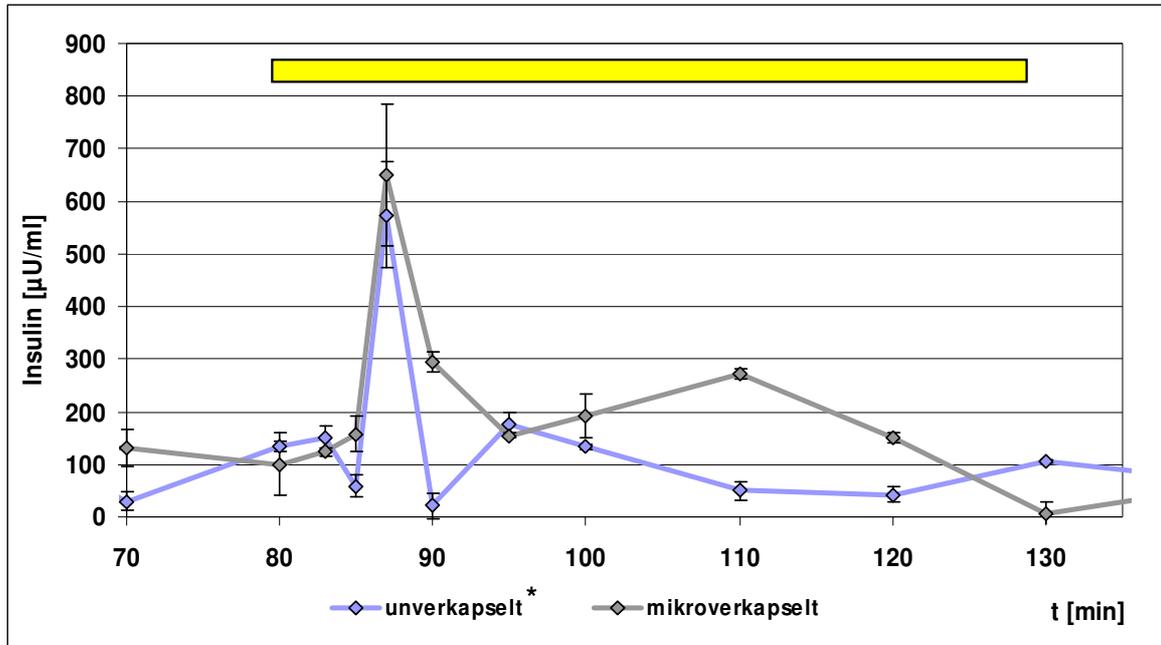


*Abb. 20:* Sezernierte Gesamtinsulinmenge der *Area under the curve B* (AUC B) während der ersten Stimulationsphase, dargestellt für die drei unterschiedlich gefüllten Perifusionskammern. MW±SA (n=4).

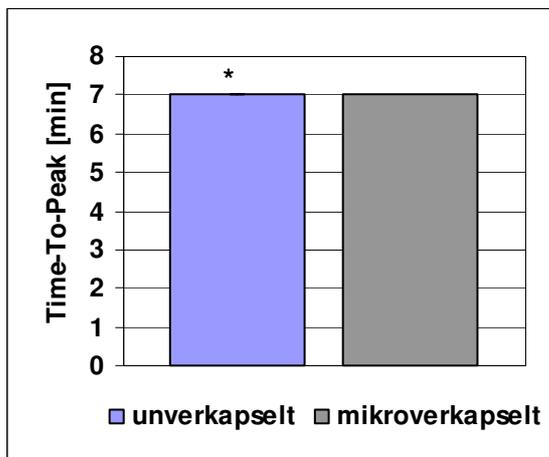
#### 4.3. Einfluss der Mikroverkapselung auf die Insulin-Ausschüttung

Um den Einfluss der Mikroverkapselung auf die Freisetzungskinetik der Inseln auszuschliessen, wurden Perfusionen mit Alginat-mikroverkapselten und unverkapselten IEQ durchgeführt. Die Frage war, ob es nach der Stimulation der mikroverkapselten IEQ mit 300 mg/dl Glukose zu einer verzögerten Insulin-Ausschüttung, gemessen als *Time To Peak* (TTP), kommt. Da die Alginat-Mikrokapsel trotz guter Semipermeabilität eine Barriere bildet und so die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen erschweren oder verzögern kann, wurde die TTP untersucht. Zusätzlich wurden die Gesamtinsulin-Ausschüttung ( $AUC_{gesamt}$ ) und der SI bestimmt und miteinander verglichen. Auf die 80-minütige Adaptionsphase folgte die 50-minütige erste Stimulationsphase, dann nochmals eine 75-minütige Adaptionsphase. Als Basalmedien dienten Ham's F12 (n=6) und KRBB (n=6), denen für die Dauer der Stimulation 300 mg/dl Glukose zugesetzt wurden. Der Insulingehalt an den 17 Messpunkten (Kulturüberstände) wurde mittels ELISA bestimmt und in µU/ml ausgedrückt. Für die statistische Berechnung wurden 6 Perfusionen mit den Inseln

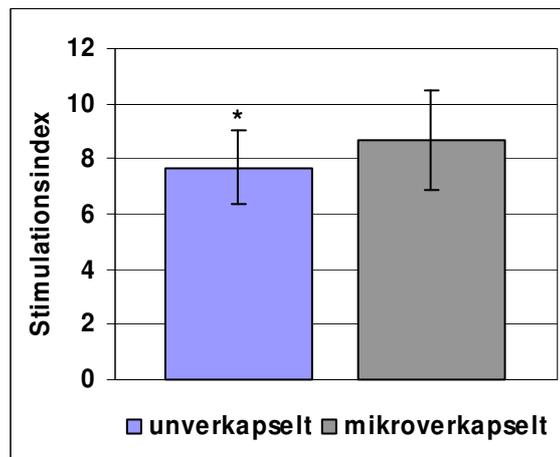
von 2 Isolierungen durchgeführt; ihr Mittelwert diente für die Darstellung der Perifusionskurve. In **Abb. 21** werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die mit Ham's F12 erhobenen Daten dargestellt (Ausschnitt mit 11 Messpunkten). Die Kurve dokumentiert die dynamische Insulin-Ausschüttung von mikroverkapselten und unverkapselten Inseln während der (ersten) Stimulationsphase von der 80. bis zur 130. Minute.



**Abb. 21:** Insulinfreisetzung aus mikroverkapselten und unverkapselten porzinen Langerhans-Inseln in Ham's F12 nach Stimulation mit 300 mg/dl Glukose von der 80. bis zur 130. Minute (gelber Balken). Die Insulinkonzentrationen in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA ermittelt und sind in  $\mu\text{U/ml}$  ausgedrückt.  $\text{MW}\pm\text{SA}$  ( $n=6$ ). \* $p=0,240$  n. s. (vgl. Tab. 8, Abb. 21').



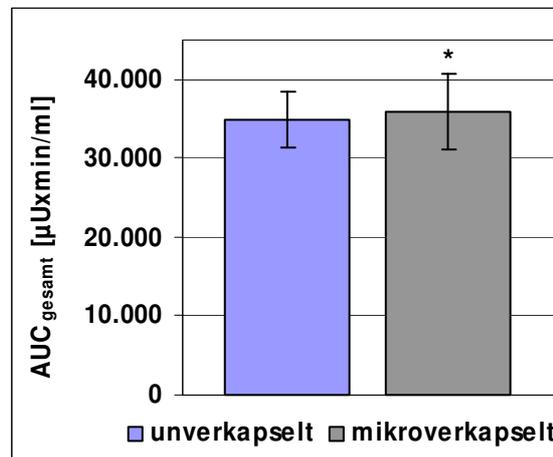
**Abb. 22:** TTP von unverkapselten und mikroverkapselten Inseln in Ham's F12 nach Stimulation mit 300 mg/dl Glukose.  $\text{MW}\pm\text{SA}$  ( $n=6$ ). \* $p=0,589$  n. s. (vgl. Tab. 8).



**Abb. 23:** SI von unverkapselten und mikroverkapselten Inseln in Ham's F12 nach Stimulation mit 300 mg/dl Glukose.  $\text{MW}\pm\text{SA}$  ( $n=6$ ). \* $p=0,699$  n. s. (vgl. Tab. 8).

In beiden Gruppen vergehen bis zum *Time To Peak* während der Stimulation 7 Minuten (**Abb. 22**). Dabei ist die Insulin-Ausschüttung der unverkapselten Inseln 7,7-fach ( $\pm 1,3$ ) gegenüber der unstimulierten Kontrolle (nicht dokumentiert), die der mikroverkapselten Inseln hingegen 8,7-fach ( $\pm 1,8$ ) erhöht (nicht signifikant) (**Abb. 23**).

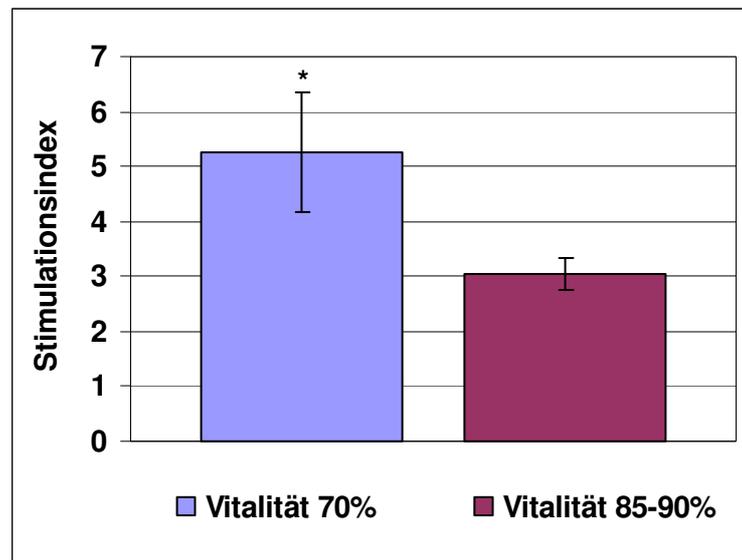
Betrachtet man zusätzlich das Gesamtprofil der Perifusionskurve in **Abb. 21**, so verläuft sie in beiden Gruppen sehr gleichförmig. Die  $AUC_{\text{gesamt}}$  für beide Gruppen ergibt nahezu gleiche Mengen an freigesetztem Insulin. Mit  $35.882 \pm 4.818 \mu\text{U/ml} \times \text{min}$  setzen die mikroverkapselten Inseln, verglichen mit den unverkapselten Inseln ( $34.910 \pm 3.635 \mu\text{U/ml} \times \text{min}$ ) kaum mehr Insulin frei (**Abb. 24**). Für keinen der untersuchten Funktionsparameter, SI,  $AUC_{\text{gesamt}}$  und TTP konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden.



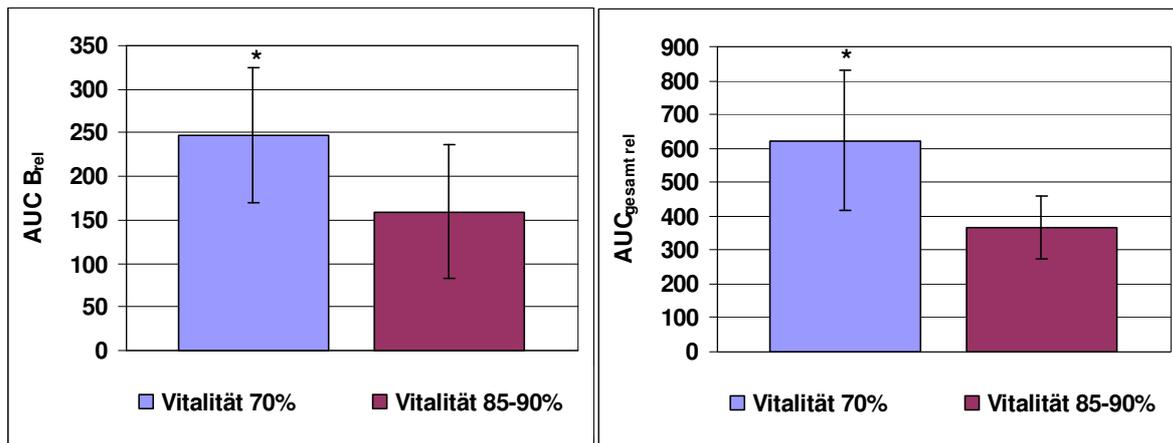
**Abb. 24:** Gesamtinsulinsekretion von mikroverkapselten und unverkapselten Inseln in Ham's F12 nach Stimulation mit 300 mg/dl Glukose. Die Insulinmenge ist als  $\mu\text{U} \times \text{min/ml}$  angegeben.  $MW \pm SA$  ( $n=6$ ).  $*p=0,240$  n. s. (vgl. Tab.8).

#### 4.4. Einfluss der Insel-Vitalität auf die Insulin-Ausschüttung

Zur Kontrolle der Qualität nach Isolierung und Mikroverkapselung wurde u. a. die Vitalität der porzinen Langerhans-Inseln mit FDA/PI bestimmt. Auch unmittelbar vor Transplantation ist diese Messung üblich. Wie weit jedoch Informationen hieraus Rückschlüsse auf die eigentliche Transplantat-Funktion *in vivo* zulassen, ist derzeit noch unklar. Im Hinblick auf die Prozess- und Transplantat-Optimierung stellte sich also die Frage, ob die Vitalität mit den diversen Zellfunktions-Parametern, AUC B, AUC<sub>gesamt</sub> und SI, korreliert. Das übliche Verständnis ist, dass eine höhere Vitalität mit einer besseren Funktionalität der Inseln einhergeht. Nach 21 Stimulationsversuchen mit 300 mg/dl Glukose in Ham's F12 Medium konnte lediglich für den Stimulationsindex SI eine (negative) Korrelation von -0,609 mit der Insel-Vitalität ermittelt werden ( $p=0,000$ , vgl. Tab. 9): Bei 70%iger Vitalität der Inseln wurde, entsprechend **Abb. 25**, ein mittlerer SI von  $5,24 \pm 1,09$  ermittelt; bei 85-90%iger Vitalität dagegen betrug der mittlere SI nur  $3,05 \pm 0,299$ . Vergleiche hierzu auch die Perfusionsdaten in der **Abb. 25'** im Anhang. Sie zeigt exemplarisch, dass Inseln mit höherer Vitalität aufgrund ihrer höheren Basalsekretion gemäss Formel 4 einen geringeren Quotienten, d. h. geringeren SI aufweisen. Im Gegensatz zum SI korrelierten weder die Insulinsekretion während der Stimulationsphase (AUC B<sub>rel.</sub>) noch die Gesamtinsulinsekretion (AUC<sub>gesamt rel.</sub>) mit der Inselzell-Vitalität (vgl. Tab. 9).



**Abb. 25a:** Insulin-Ausschüttung von mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit 70%iger (n=14) und 85-90%iger (n=7) Vitalität nach Isolierung. Ermittelt wurde der Stimulationsindex nach Zugabe von 300 mg/dl Glukose zum Ham's F12 Medium. MW $\pm$ SA. \* $p=0,000$  s. (vgl. Tab. 9).



**Abb. 25b:** Insulin-Ausschüttung von mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit 70%iger (n=14) und 85-90%iger (n=7) Vitalität nach Isolierung. Ermittelt wurde die AUC B<sub>rel</sub>, die Insulinausschüttung/min während der Stimulationsphase mit 300 mg/dl Glukose in Ham's F12 Medium. MW±SA. \*p=0,950 n. s. (vgl. Tab. 9).

**Abb. 25c:** Insulin-Ausschüttung von mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit 70%iger (n=14) und 85-90%iger (n=7) Vitalität nach Isolierung. Ermittelt wurde die AUC<sub>gesamt\_rel</sub>, die Insulinausschüttung/min über die gesamte Perifusionsdauer. Stimulation mit 300 mg/dl Glukose in Ham's F12 Medium. MW±SA. \*p=0,233 n. s. (vgl. Tab. 9).

#### 4.5. Einfluss diverser Mediatoren auf die Insulin-Ausschüttung

Um die Stimulierbarkeit und Insulinsekretion der porzinen Langerhans-Inseln in normoglykämischer (KRBB) und hyperglykämischer (Ham's F12) Umgebung genauer zu analysieren, wurden beiden Medien nutritive Faktoren, Neuromediatoren, ein Hormon und ein Sulfonylharnstoff beigefügt (**Tab. 10**) und die Insulinausschüttung der verkapselten porzinen Langerhans-Inseln gemessen. Das Ziel bestand darin, mögliche Unterschiede im Sekretionsprofil und ggf. Verzögerungen der Insulinssekretion durch die genannten Mediatoren herauszufinden. Als Referenz diente die Stimulation der Inseln mit 300 mg/dl Glukose in KRBB, bzw. in Ham's F12.

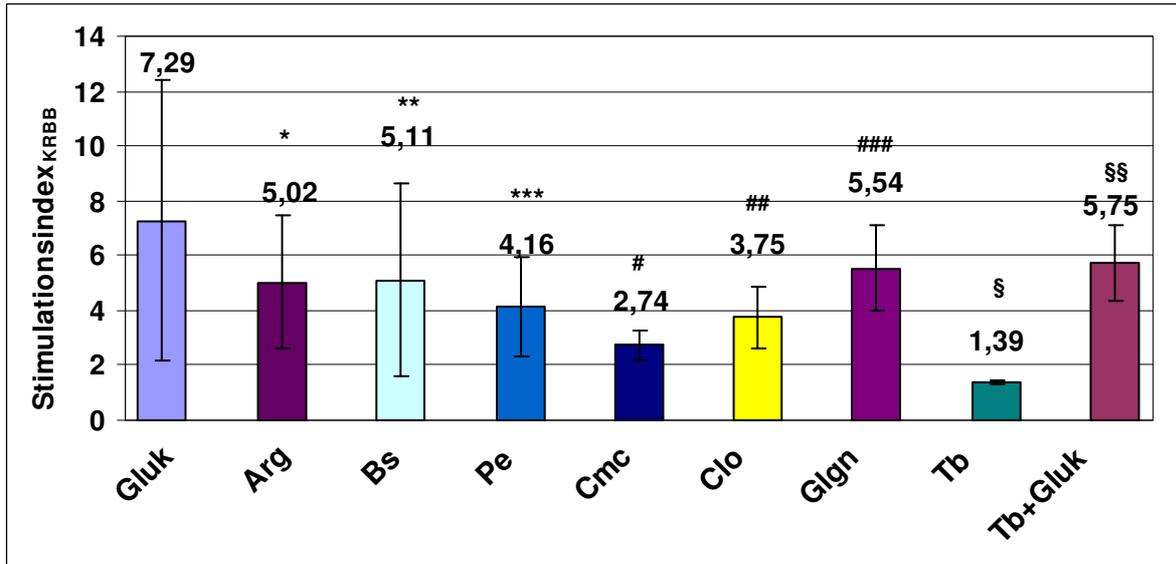
**Tabelle 10:** Liste der untersuchten Mediatoren mit Angabe ihrer Konzentration und der jeweiligen Anzahl der Versuche.

Stimulantien	Konzentration	Anzahl der Versuche mit KRBB	Anzahl der Versuche mit Ham's F12
<b>Nutritive Faktoren</b>			
Glukose (Gluk)	300 mg/dl (16,6 mmol/l)	20	32
L-Arginin (Arg)	20 mmol/l	6	12
D-(-)- $\beta$ -OH-Butyrat (Bs)	10 mmol/l	6	6
<b>Neuromediatoren</b>			
L-Phenylephrin (Pe)	100 $\mu$ mol/l	6	6
Carbamylcholinchlorid (Cmc)	500 mmol/l	3	7
Clonidin (Clo)	50 $\mu$ mol/l	5	5
<b>Hormon</b>			
Glukagon (Glg)	2 $\mu$ mol/l	5	6
<b>Sulfonylharnstoff</b>			
Tolbutamid (Tb)*	100 $\mu$ mol/l	2*	2*
Tolbutamid plus Glukose (Tb+Gluk)**	100 $\mu$ mol/l 300 mg/dl	7	2

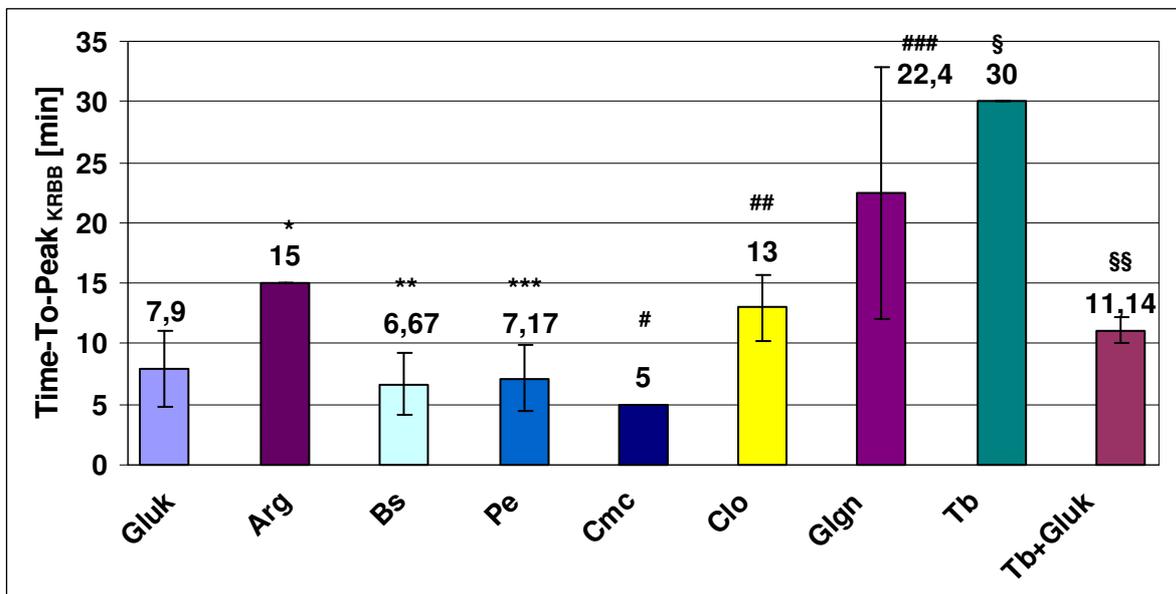
\* statistisch nicht erfasst; \*\* Erläuterungen zum Glukose-Zusatz: vgl. Kapitel 3.6.2.

#### 4.5.1. Einfluss der Mediatoren im normoglykämischen Milieu (KRBB)

Um einen aussagekräftigen Vergleich zwischen den Mediatoren zu ermöglichen, wurden der Stimulationsindex und die *Time To Peak* gemessen. Für diesen Vergleich in KRBB (entspricht einem normoglykämischen Milieu) wurden insgesamt 54 Einzelperfusionen mit mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln bei 37°C durchgeführt. Die Anzahl der Mediator-spezifischen Versuche zeigt **Tab. 10**. Berücksichtigt werden muss aber, dass Inseln aus unterschiedlichen Isolierungen verwendet wurden. Deren Vitalität lag stets zwischen 70% und 80%. Ausgehend von methodisch-technisch gleichwertigen Perfusionen, wurden für die o. g. Mediatoren die in **Abb. 26** dokumentierten Stimulationsindices ermittelt; diese sind – gemessen am SI für Glukose – statistisch nicht signifikant (vgl. Tab. 11). Für die *Time To Peak* gelten die in **Abb. 27** dokumentierten Werte. Hier wurde die TTP der einzelnen Mediatoren mit der TTP von Glukose ( $7,9 \pm 3,1$ ) verglichen: Arg  $15 \pm 0$  ( $p=0,000$ , signifikant, s.), Bs  $6,67 \pm 2,58$  ( $p=0,421$ , nicht signifikant, n. s.), Pe  $7,17 \pm 2,79$  ( $p=0,700$ , n. s.), Cmc  $5 \pm 0$  ( $p=0,196$ , n. s.), Clo  $13 \pm 2,74$  ( $p=0,012$ , s.), Glgn  $22,4 \pm 10$  ( $p=0,003$ , s.) und Tb  $11,14 \pm 1,07$  ( $p=0,031$ , s.) (vgl. Tab. 12).



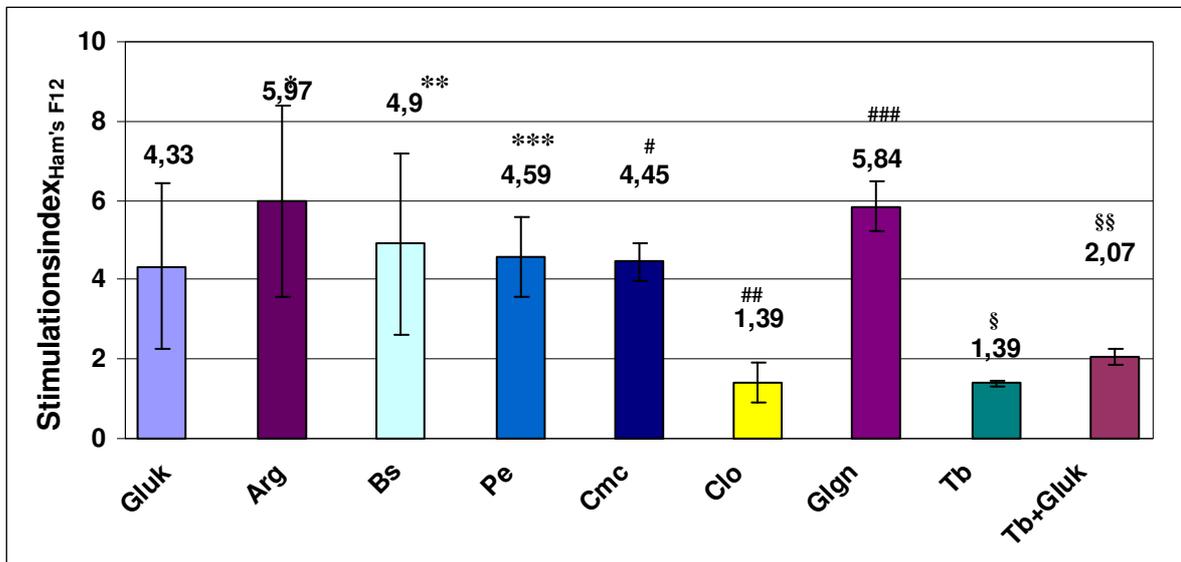
**Abb. 26:** Stimulationsindex (SI) der Insulinausschüttung mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln, die in KRBB mit unterschiedlichen Mediatoren stimuliert wurden: Glukose (Gluk; n=20), Arginin (Arg; n=6),  $\beta$ -OH-Buttersäure (Bs; n=6), Phenylephrin (Pe; n=6), Carbamylcholin (Cmc; n=3), Clonidin (Clo; n=5), Glukagon (Gln; n=5), Tolbutamid (Tb; n=2) und Tolbutamid plus Glukose (Tb+Gluk; n=7). Der SI wurde aus dem Quotient von maximaler Konzentration während Stimulationsphase und dem Mittelwert der unstimulierten Kontrolle gebildet. MW±SA. \*p=0,882 n. s., \*\*p=0,976 n. s., \*\*\*p=0,700 n. s., #p=0,763 n. s., ##p=0,869 n. s., ###p=0,303 n. s., §p=nicht berechnet, §§p=0,766 n. s (vgl. Tab. 11).



**Abb. 27:** Time To Peak (TTP) der Insulinausschüttung mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln, die in KRBB mit unterschiedlichen Mediatoren stimuliert wurden: Glukose (Gluk; n=20), Arginin (Arg; n=6) und  $\beta$ -OH-Buttersäure (Bs; n=6), Phenylephrin (Pe; n=6), Carbamylcholin (Cmc; n=3), Clonidin (Clo; n=5), Glukagon (Gln; n=5), Tolbutamid (Tb; n=2) und Tolbutamid plus Glukose (Tb+Gluk; n=7). Die TTP ist die Zeitspanne vom Stimulationsbeginn bis zum Erreichen der maximalen Insulin-Konzentration. MW±SA. \*p=0,000 s., \*\*p=0,421 n. s., \*\*\*p=0,700 n. s., #p=0,196 n. s., ##p=0,012 s., ###p=0,003 s., §p= nicht berechnet, §§p=0,031 s. (vgl. Tab. 12).

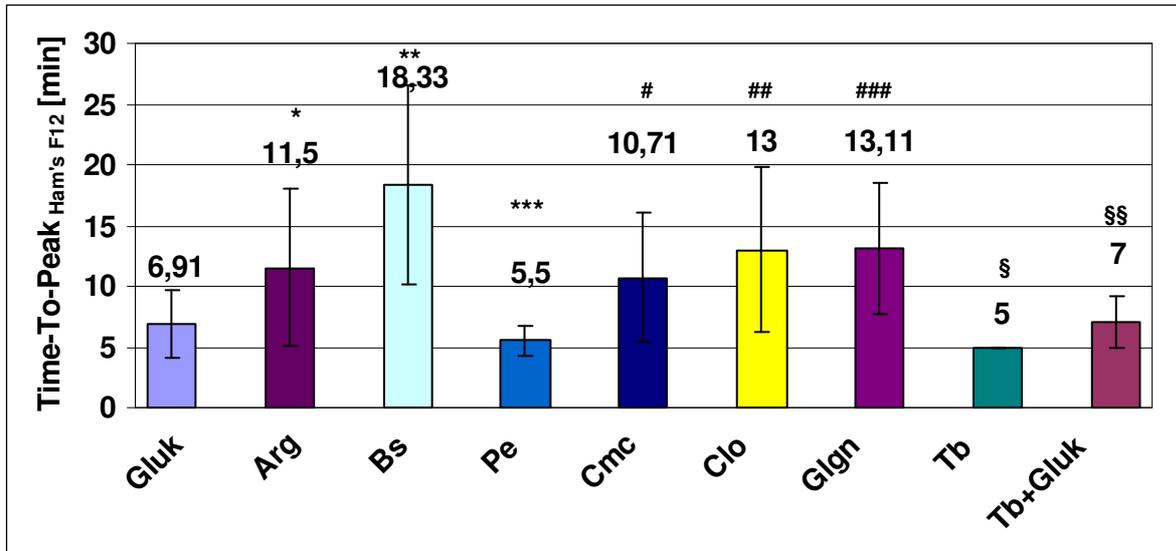
#### 4.5.2. Einfluss der Mediatoren im hyperglykämischen Milieu (Ham's F12)

Im hyperglykämischen Milieu wurden insgesamt 76 Einzelperfusionen bei 37°C durchgeführt. Die Vitalität der Zellen betrug zwischen 70 und 80%. Die Stimationsindices (SI) für die Insulinausschüttung der porzinen Langerhans-Inseln unter Verwendung der o. g. Mediatoren, diesmal in Ham's F12, sind in **Abb. 28** dokumentiert (vgl. Tab. 13): Arg 5,97±2,42 (p=0,026, s. bezogen auf den SI von Glukose), Bs 4,9±2,27 (p=0,653, n. s.), Pe 4,59±1 (p=0,297, n. s.), Clon 1,39±0,51 (p=0,000, s.), Glgn 5,84±0,63 (p=0,041, s.), Tb 1,39±0,08 (statistisch nicht erfasst) und Tb+Gluk 2,07±0,21 (p=0,071, n. s.). Während der SI von Arginin und Glukagon gegenüber Glukose ansteigt, fällt er bei Tolbutamid (n. s.) und Clonidin ab.

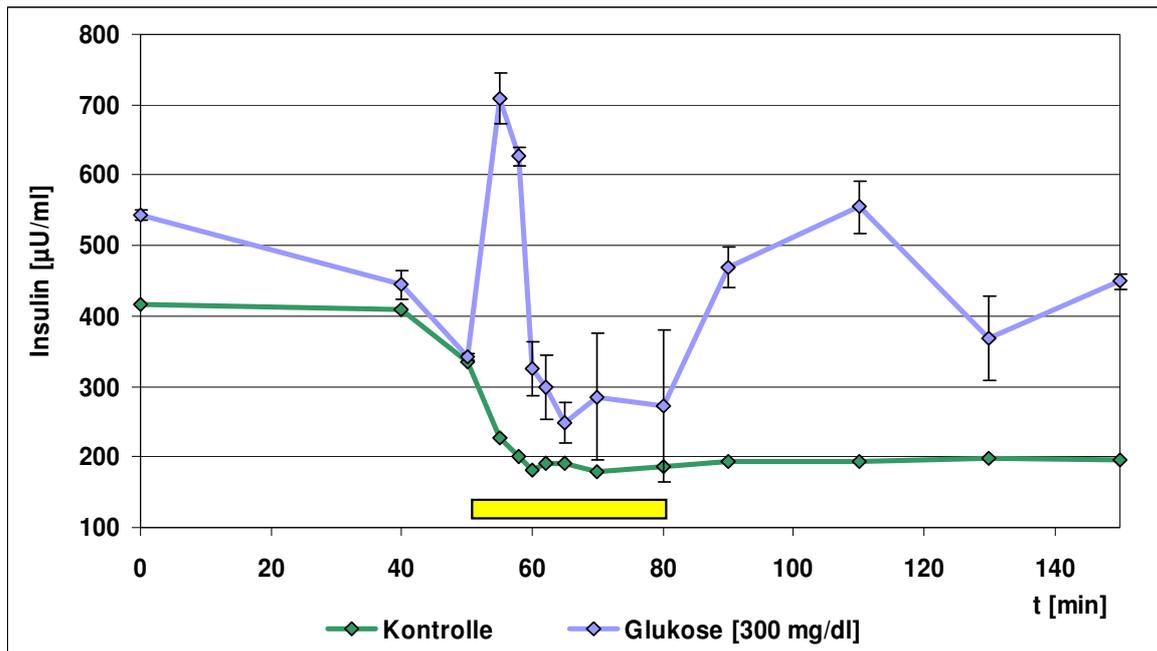


**Abb. 28:** Stimationsindex (SI) der Insulinausschüttung mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln, die in Ham's F12 mit unterschiedlichen Mediatoren stimuliert wurden: Glukose (Gluk; n=32), Arginin (Arg; n=12),  $\beta$ -OH-Buttersäure (Bs; n=6), Phenylephrin (Pe; n=6), Carbamylcholin (Cmc; n=7), Clonidin (Clo; n=5), Glukagon (Glgn; n=6), Tolbutamid (Tb; n=2) und Tolbutamid plus Glukose (Tb+Gluk; n=2). Der SI wurde aus dem Quotient von maximaler Konzentration während Stimulationsphase und dem Mittelwert der unstimulierten Kontrolle gebildet. MW±SA. \*p=0,026 s., \*\*p=0,653 n. s., \*\*\*p=0,297 n. s., #p=0,761 n. s., ##p=0,000 s., ###p=0,041 s., §p= nicht berechnet, §§p= 0,071 n. s. (vgl. Tab. 13).

Die Werte für die *Time To Peak* (TTP) sind in **Abb. 29** dargestellt (vgl. Tab. 14). Vergleichswert ist wiederum die TTP von Glukose (6,91±2,76): Arg 11,5±6,46 (p=0,004, s.), Bs 18,33±8,16 (p=0,002, s.), Pe 5,5±1,22 (p=0,316, n. s.), Cmc 10,71±5,34 (p=0,113, n. s.), Clo 13±6,8 (p=0,041, s.), Glgn 13,11±5,47 (p=0,003, s.), Tb 5±0 (statistisch nicht erfasst) und Tb+Gluk 7±2,12 (p=0,913, n. s.).

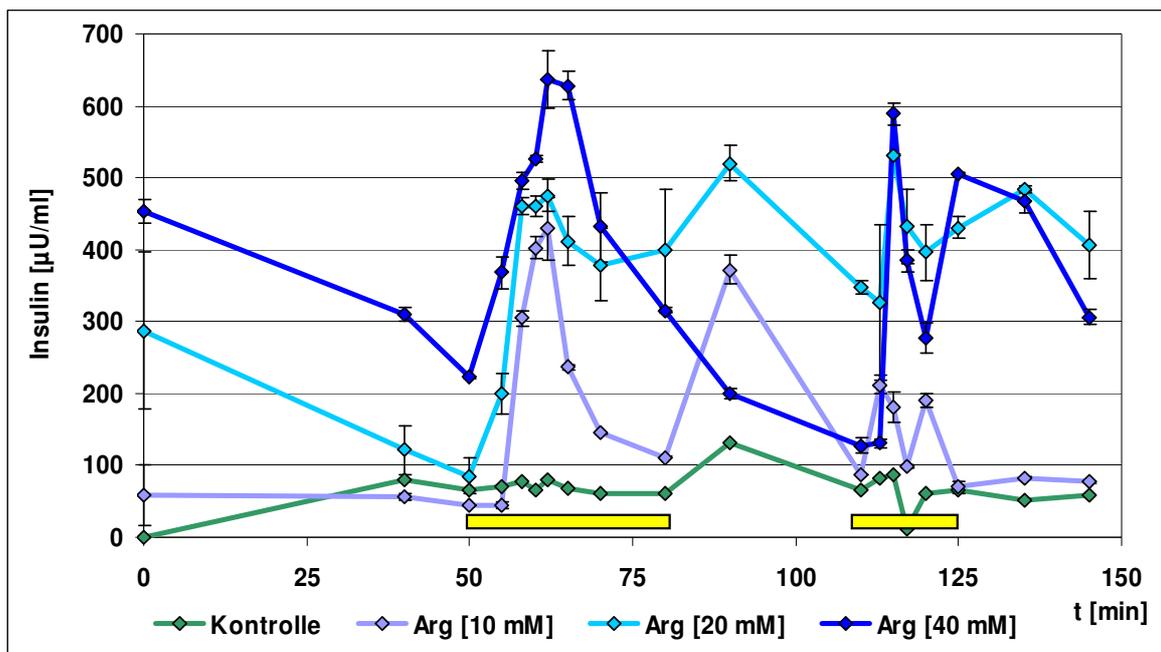


**Abb. 29:** Time To Peak (TTP) der Insulinausschüttung mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln, die in Ham's F12 mit unterschiedlichen Mediatoren stimuliert wurden: Glukose (Gluk; n=32), Arginin (Arg; n=12),  $\beta$ -OH-Buttersäure (Bs; n=6), Phenylephrin (Pe; n=6), Carbamylcholin (Cmc; n=7), Clonidin (Clo; n=5), Glukagon (Gln; n=6), Tolbutamid (Tb; n=2) und Tolbutamid plus Glukose (Tb+Gluk; n=2). Die TTP ist die Zeitspanne vom Stimulationsbeginn bis zum Erreichen der maximalen Insulin-Konzentration. MW $\pm$ SA. \*p=0,004 s., \*\*p=0,002 s., \*\*\*p=0,316 n. s., #p=0,133 n. s., ##p=0,041 s., ###p=0,003 s., §p= nicht berechnet, §§p= 0,9131 n. s. (vgl. Tab. 14).

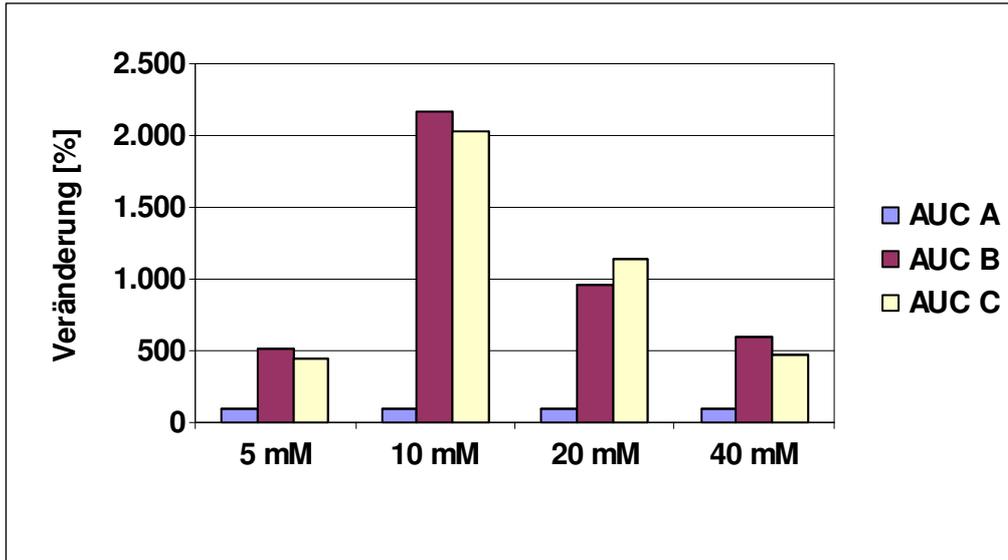


**Abb. 30:** Perfusion von porzinen mikroverkapselten Langerhans-Inseln in Ham's F12 Medium, dem von Minute 50 bis Minute 80 (gelber Balken) 300 mg/dl Glukose zugesetzt wurde. Die Kontrolle besteht aus Ham's F12 ohne Glukose-Zusatz. Verwendet wurden Inseln des gleichen Spenderschweins am Tag +3 nach Isolierung. Glukose MW $\pm$ SA (n=3); Kontrolle (n=1).

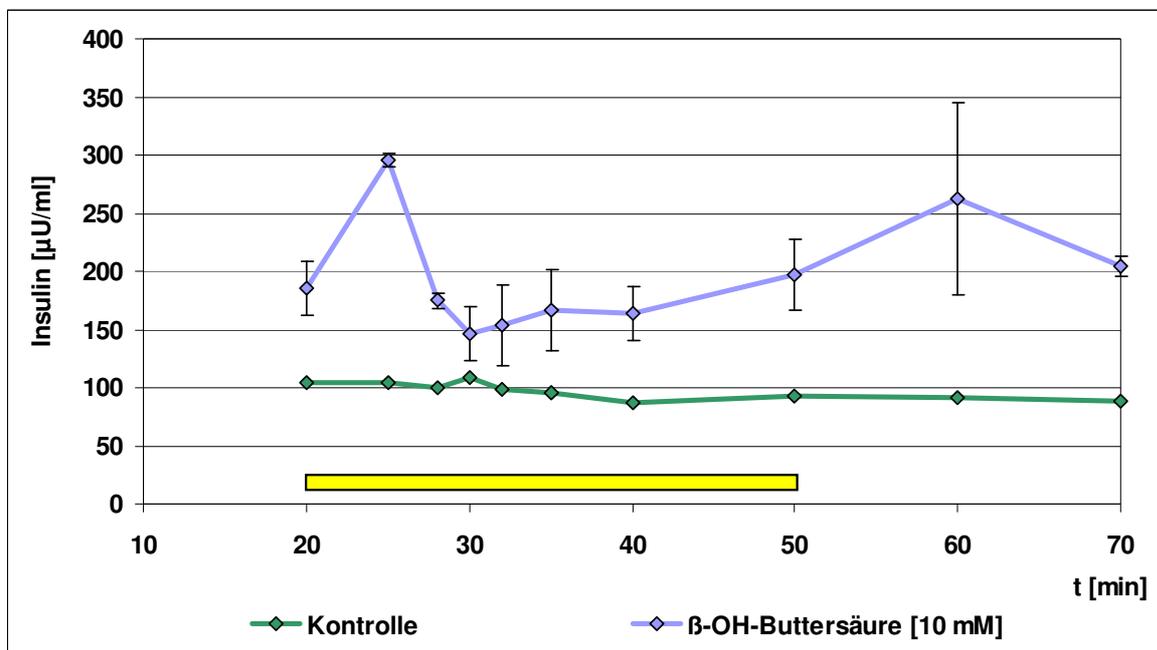
Es folgen Perifusionskurven, die den o. g. Auswertungen zugrunde liegen. **Abb. 30** zeigt das typische Perifusionsprofil einer Glukose-Stimulation in Ham's F12. Wird dem Grundmedium Ham's F12 die Aminosäure L-Arginin zugesetzt, ist eine konzentrationsabhängige Steigerung der Insulin-Ausschüttung messbar (**Abb. 31**). Der SI von Arginin entspricht bei Normoglykämie dem von Glukose (vgl. Abb. 26). Im hyperglykämischen Milieu des Ham's F12 erhöht sich der SI von Arginin gegenüber Glukose um den Faktor 1,38 (nicht dokumentiert). Die TTP von Arginin ist gegenüber der TTP von Glukose um das 1,7-fache verlängert, weist jedoch zur TTP unter Normoglykämie keinen Unterschied auf (nicht dokumentiert). Wenn mit 10 mM Arginin stimuliert wird, ist das Sekretionsprofil biphasisch und erst bei 40 mM Arginin als solches nicht mehr erkennbar. Betrachtet man die Sekretionsleistungen in den Perifusionsphasen AUC B und AUC C in Relation zu AUC A (**Abb. 32**) wird deutlich, dass der Stimulationseffekt über AUC B hinaus bis AUC C anhält.



**Abb. 31:** Perifusion von porzinen mikroverkapselten Langerhans-Inseln in Ham's F12 Medium, dem von Minute 50 bis Minute 80 und von Minute 110 bis Minute 125 Arginin unterschiedlicher Konzentrationen (10, 20, 40 mM) zugesetzt wurde (gelbe Balken). Die Inseln wurden also zweifach stimuliert. Verwendet wurden Inseln eines Spenderschweins am Tag +3 nach Isolierung. Arginin MW±SA (n=3 pro Konzentration); Kontrolle (n=1).

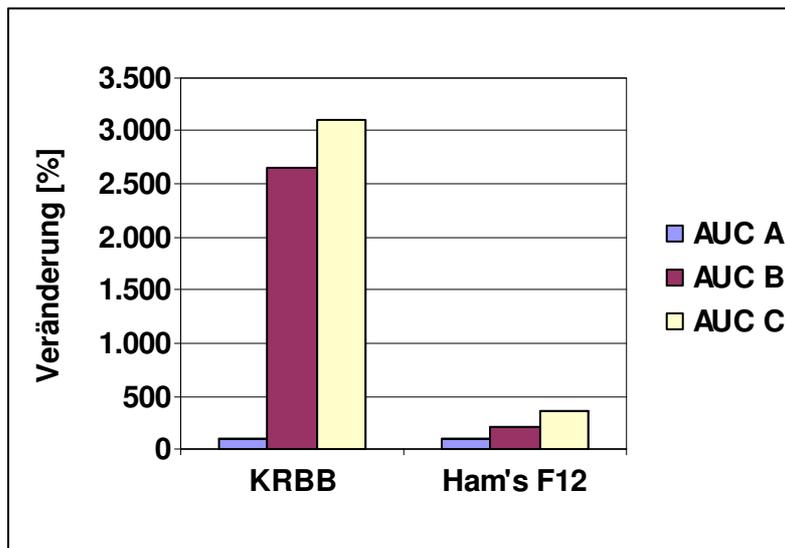


**Abb. 32:** Änderung der Insulinsekretion/min während (AUC B) und nach (AUC C) der ersten Stimulation der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit Arginin in unterschiedlichen Konzentrationen (5 mM (n=8); 10 mM (n=8); 20 mM (n=12); 40 mM (n=10)). Als Grundmedium diente Ham's F12. Die den AUC zugrunde liegenden Perifusionszeiten betragen 60 Minuten (AUC A), 30 Minuten (AUC B) und 30 Minuten (AUC C). Verwendet wurden Inseln unterschiedlicher Isolierungen. Dargestellt sind hier die Mittelwerte der entsprechenden Versuche auf der Basis von AUC A = 100% (= Insulinsekretion vor Stimulation/min).



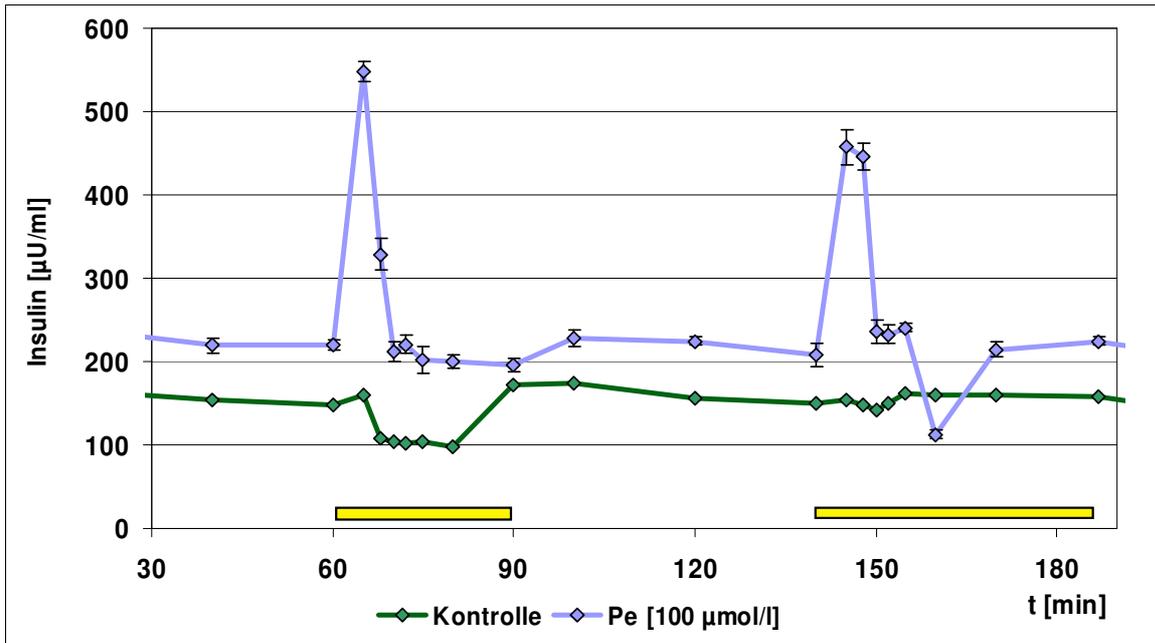
**Abb. 33:** Perfusion von mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln in Ham's F12, dem in der Stimulationsphase (gelber Balken) 10 mM DL-β-Hydroxybutyrat zugesetzt wurde. Grün dargestellt ist die Kontrolle mit unstimulierten Inseln. Verwendet wurden Inseln des gleichen Spenderschweins am Tag +3 nach Isolierung. DL-β-Hydroxybutyrat MW±SA (n=6); Kontrolle (n=1).

Die Insulinausschüttung unter Stimulation mit dem Ketonkörper DL- $\beta$ -Hydroxybutyrat zeigte bei Normo- (KRBB) und Hyperglykämie (Ham's F12) für die Funktionsparameter SI und TTP Ergebnisse, die denen von Glukose entsprachen (vgl. Abb. 26-29). Neben dem *First Peak* ist in **Abb. 33** deutlich eine so genannte *Second Phase* erkennbar. **Abbildung 34** zeigt die unter Stimulation in KRBB mit DL- $\beta$ -Hydroxybutyrat überproportionale Zunahme der Insulinsekretion während der Phase AUC B und AUC C. Bei Stimulation in Ham's F12 war diese Zunahme der Insulinsekretion auf der Basis der Phase AUC A (entspricht 100%) sehr viel geringer ausgeprägt.

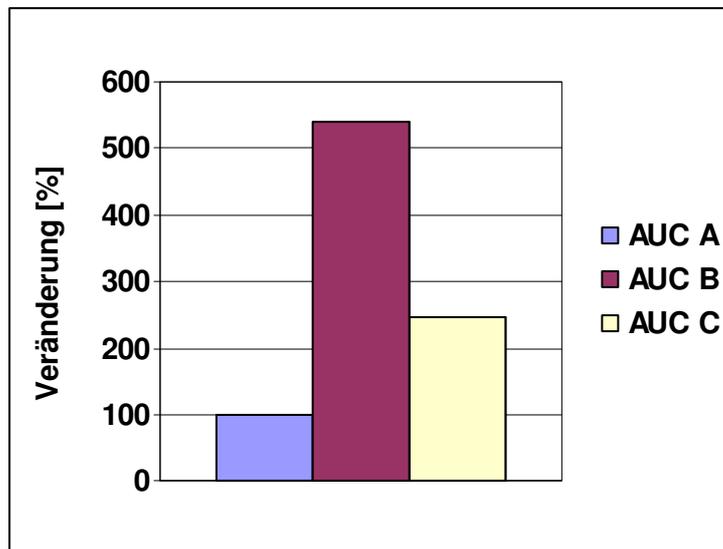


**Abb. 34:** Änderung der Insulinsekretion/min während (AUC B) und nach (AUC C) der Stimulation der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit 10 mM DL- $\beta$ -Hydroxybutyrat (n=6). Die den AUC zugrunde liegenden Perifusionszeiten betragen 20 Minuten (AUC A), 30 Minuten (AUC B) und 20 Minuten (AUC C). Verwendet wurden Inseln unterschiedlicher Isolierungen. Dargestellt sind die Mittelwerte der entsprechenden Versuche auf der Basis von AUC A = 100% (= Insulinsekretion vor Stimulation/min).

Stimulation der Langerhans-Inseln mit dem Neuromediator und  $\alpha$ 1-Agonist (R)-(-)-Phenylephrin Hydrochlorid (100  $\mu$ mol/l) wich in Art und Umfang nicht vom SI und der TTP der entsprechenden Werte für Glukose ab. Dies galt für beide Medien, KRBB und Ham's F12. Exemplarisch ist dies für Ham's F12 in **Abb. 35** und **Abb. 36** dargestellt. Während das Sekretionsprofil einen eindeutigen *First Peak* zeigt, war die *Second Phase* (nicht zu verwechseln mit dem (*Second Peak*) kaum sichtbar. Die Inseln sind kürzester Zeit ein zweites mal stimulierbar.

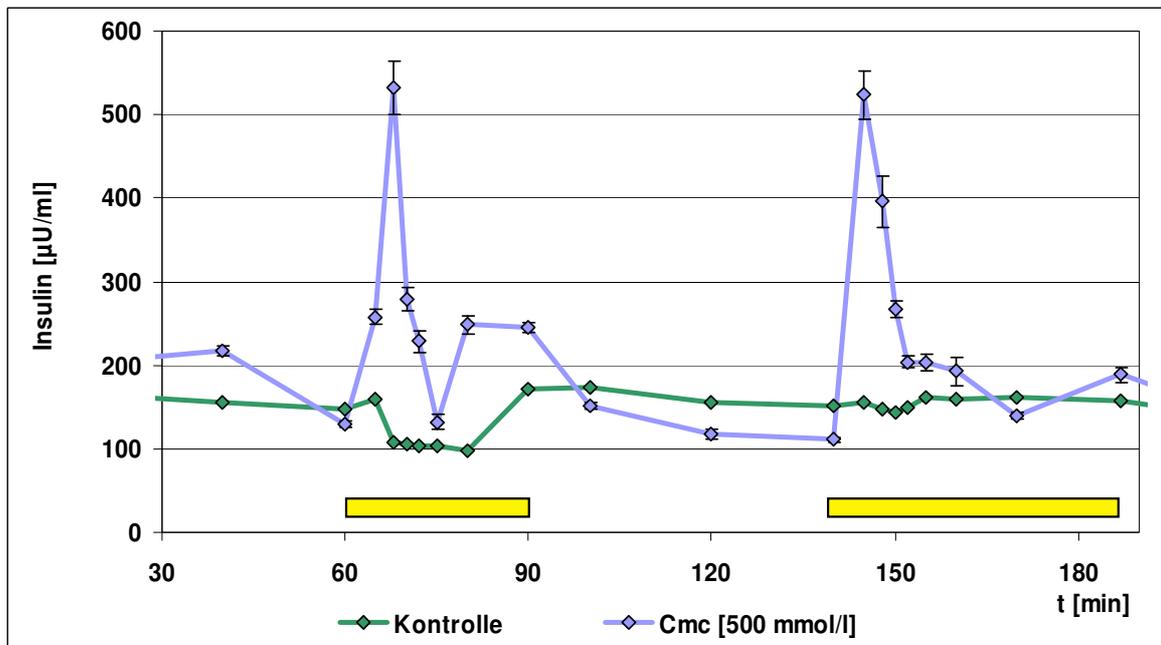


**Abb. 35:** Perfusion von mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln in Ham's F12, dem in den beiden Stimulationsphasen (gelbe Balken) 100 µmol/l (*R*)-(-)-Phenylephrin Hydrochlorid zugesetzt wurde. Grün dargestellt ist die Kontrolle mit unstimulierten Inseln. Verwendet wurden Inseln des gleichen Spenderschweins am Tag +3 nach Isolierung. (*R*)-(-)-Phenylephrin Hydrochlorid MW±SA (n=3); Kontrolle (n=1).

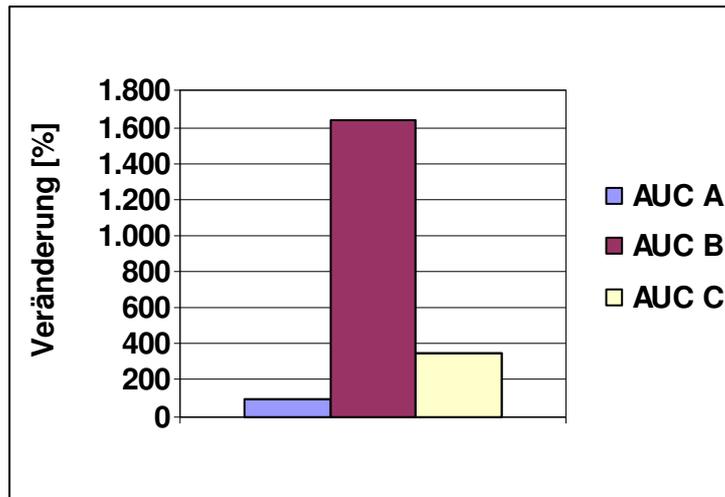


**Abb. 36:** Änderung der relativen Insulinsekretion/min während (AUC B) und nach (AUC C) der Stimulation der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit 100 µmol/l (*R*)-(-)-Phenylephrin Hydrochlorid (n=6). Die den AUC zugrunde liegenden Perifusionszeiten betragen 60 Minuten (AUC A), 30 Minuten (AUC B) und 45 Minuten (AUC C). Berechnet wurde nur die Perifusionsphase von Minute 1 bis Minute 135. AUC D, also die 2. Stimulationsphase geht in diese Berechnung nicht ein. Angegeben sind die MW (n=3) auf Basis AUC A=100% (= Insulinsekretion vor Stimulation/min).

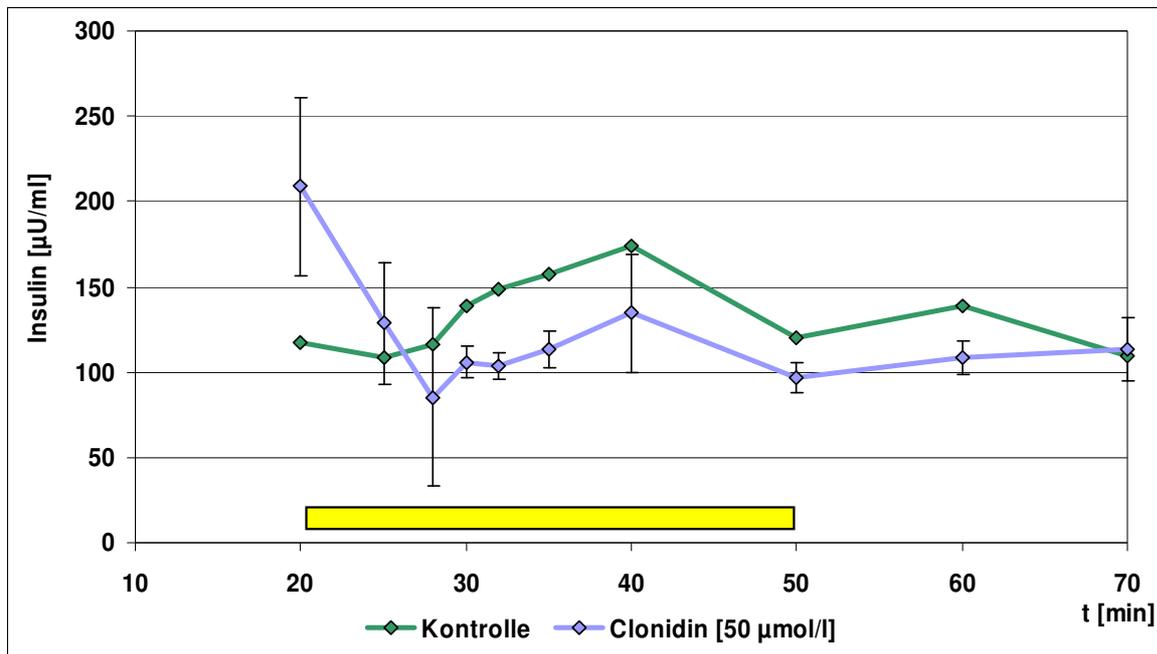
Die Untersuchung des muskarinischen Rezeptors der Langerhans-Inseln mit dem mACh-Agonist Carbamylcholin (500 mmol/l) ist in **Abb. 37** exemplarisch für Ham's F12 gezeigt. Es kommt zu einer schnellen Stimulation innerhalb von 5-10 Minuten, die auch bei Wiederholung identisch ausfällt. **Abbildung 38** belegt graphisch, dass während der Stimulation in Ham's F12 die Insulinsekretion pro Zeiteinheit um mehr als 800% gesteigert wird.



**Abb. 37:** Perifusion von mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln in Ham's F12, dem in den beiden Stimulationsphasen (gelbe Balken) 500 mmol/l Carbamylcholin zugesetzt wurde. Grün dargestellt ist die Kontrolle mit unstimulierten Inseln. Verwendet wurden Inseln des gleichen Spender-schweins am Tag +3 nach Isolierung. Carbamylcholin MW±SA (n=7); Kontrolle (n=1).

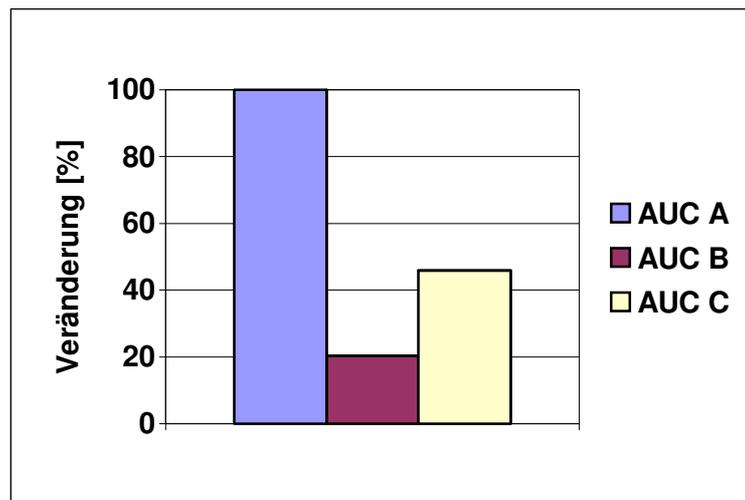


**Abb. 38:** Änderung der relativen Insulinsekretion/min während (AUC B) und nach (AUC C) der Stimulation der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit  $500\mu\text{mol/l}$  Carbamylcholin ( $n=3$ ). Die den AUC zugrunde liegenden Perifusionszeiten betragen 60 Minuten (AUC A), 30 Minuten (AUC B) und 45 Minuten (AUC C). Berechnet wurde nur die Perifusionsphase von Minute 1 bis Minute 135. AUC D, also die 2. Stimationsphase geht in diese Berechnung nicht ein. Angegeben sind die MW ( $n=3$ ) auf Basis AUC A = 100% (= Insulinsekretion vor Stimulation/min).



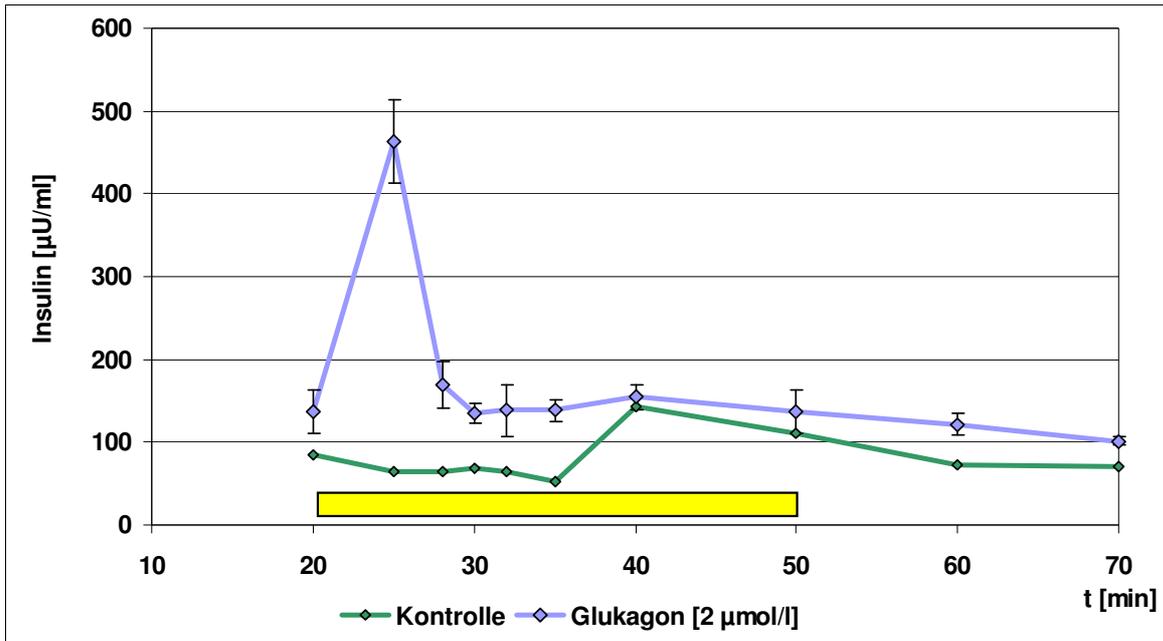
**Abb. 39:** Perifusion von mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln in Ham's F12, dem in der Stimationsphase (gelber Balken)  $50\mu\text{mol/l}$  Clonidin zugesetzt wurde. Grün dargestellt ist die Kontrolle mit unstimulierten Inseln. Verwendet wurden Inseln des gleichen Spenderschweins am Tag +3 nach Isolierung. Clonidin MW $\pm$ SA ( $n=5$ ); Kontrolle ( $n=1$ ).

Die Stimulation mit dem  $\alpha_2$ -Agonist Clonidin zeigte in unseren Versuchen nur unter hyperglykämischen Bedingungen (Ham's F12) eine Suppression der Insulinsekretion während der Stimulationsphase (*Abb. 39, Abb. 40*). Der SI von Clonidin betrug  $1,39 \pm 0,51$ , das sind lediglich 32% des SI für Glukose (vgl. *Abb. 28*). Unter normoglykämischen Bedingungen (KRBB) betrug der Wert  $3,75 \pm 1,12$  (vgl. *Abb. 26*). In beiden Medien war die TTP von Clonidin gegenüber jener von Glukose verlängert: in KRBB um den Faktor 1,65, in Ham's F12 um den Faktor 1,88.

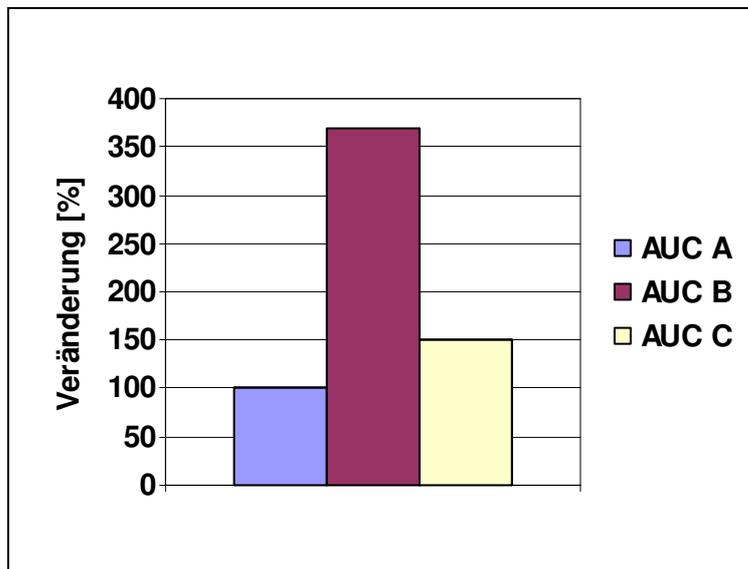


**Abb. 40:** Änderung der relativen Insulinsekretion/min während (AUC B) und nach (AUC C) der Stimulation der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit  $50 \mu\text{mol/l}$  Clonidin ( $n=5$ ). Die den AUC zugrunde liegenden Perifusionszeiten betragen 20 Minuten (AUC A), 30 Minuten (AUC B) und 20 Minuten (AUC C). Verwendet wurden Inseln desselben Spenderschweins. Dargestellt sind lediglich die Mittelwerte der entsprechenden Versuche auf der Basis von AUC A=100% (= Insulinsekretion vor Stimulation/min).

Nach Zugabe von Glukagon unter hyperglykämischen Bedingungen (Ham's F12) betrug die TTP  $22,4 \pm 10$  Minuten und war um den Faktor 2,83 gegenüber der TTP von Glukose verzögert. Im Vergleich zur TTP in KRBB stieg sie sogar um den Faktor 4. In KRBB stieg der SI unter Glukagon signifikant auf  $5,84 \pm 0,63$ , also um den Faktor 1,35 verglichen mit dem SI von Glukose in diesem Medium. Das Perifusionsprofil von Glukagon in Ham's F12 zeigt in *Abb. 41* einen monophasischen Verlauf. Die relative Insulinausschüttung steigt um mehr als 500% an (*Abb. 42*). Nach Stimulation erreichte die Insulinsekretion in AUC C erneut ihre Ausgangswerte aus AUC A.

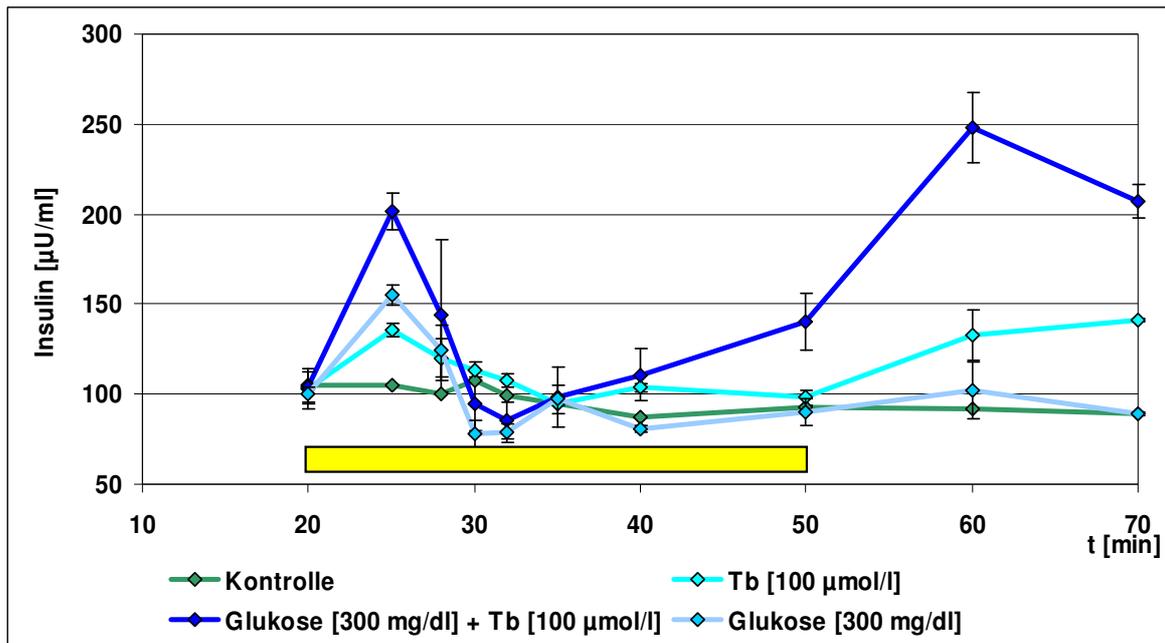


**Abb. 41:** Perifusion von porzinen Langerhans-Inseln mit 2 µmol/l Glukagon Als Grundmedium diente Ham's F12. Verwendet wurden Zellen des gleichen Spendertiers am Tag 3 nach Isolierung (n=6). Angegeben in MW±SA.



**Abb. 42:** Änderung der relativen Insulinsekretion/min während (AUC B) und nach (AUC C) der Stimulation der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit 2 µmol/l Glukagon (n=6). Die den AUC zugrunde liegenden Perifusionszeiten betragen 20 Minuten (AUC A), 30 Minuten (AUC B) und 20 Minuten (AUC C). Verwendet wurden Inseln desselben Spenderschweins. Dargestellt sind lediglich die Mittelwerte der entsprechenden Versuche auf der Basis von AUC A=100% (= Insulinsekretion vor Stimulation/min).

Werden unter hyperglykämischen Bedingungen (Ham's F12) 300 mg/dl Glukose den Langerhans-Inseln zugesetzt, wird ein SI von  $1,59 \pm 0,12$  erzielt (der viel höhere SI für Glukose in Abb. 28 wurde aus vielen Versuchen gemittelt), unter identischen Bedingung für Tolbutamid (100  $\mu\text{mol}$ ) ein vergleichbarer SI von  $1,39 \pm 0,08$  (**Abb. 43**). Kombiniert man beide Mediatoren steigt der SI auf  $2,07 \pm 0,21$  und ist erwartungsgemäss gegenüber dem SI von Glukose um 30% erhöht.



**Abb. 43:** Perifusion von mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln in Ham's F12, dem in der Stimulationsphase (gelber Balken) 300 mg/dl Glukose (n=2), 100  $\mu\text{mol}$  Tolbutamid TB (n=2) und die Kombination beider Substanzen (n=2) zugesetzt wurde. Grün dargestellt ist die Kontrolle mit unstimulierten Inseln. Verwendet wurden Inseln des gleichen Spenderschweins am Tag +3 nach Isolierung. Glukose  $\text{MW} \pm \text{SA}$  (n=2); Tolbutamid  $\text{MW} \pm \text{SA}$  (n=2); Glukose + Tolbutamid  $\text{MW} \pm \text{SA}$  (n=2); Kontrolle (n=1).

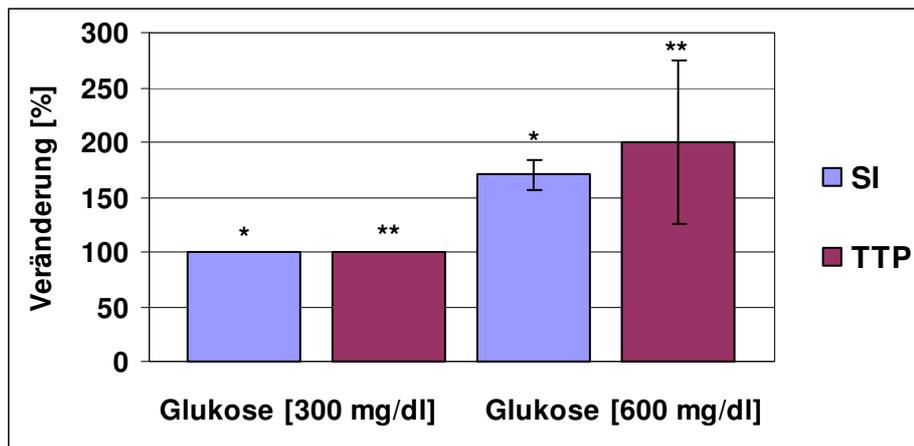
#### 4.6. Einfluss der Mediator-Konzentration auf die Insulin-Ausschüttung

Um den Einfluss der Mediator-Konzentration auf die Insulinsekretion mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln genauer zu beurteilen, wurden Glukose und Arginin in normoglykämischem (KRBB) und hyperglykämischem (Ham's F12) Medium genauer analysiert. Ziel war es, die Grenzen der Stimulierbarkeit (Belastbarkeit) der Inseln zu finden, um so die Effizienz eines Transplantates beurteilen zu können.

##### 4.6.1. Einfluss der Mediator-Konzentration im normoglykämischen Milieu (KRBB)

###### 4.6.1.1. Glukose

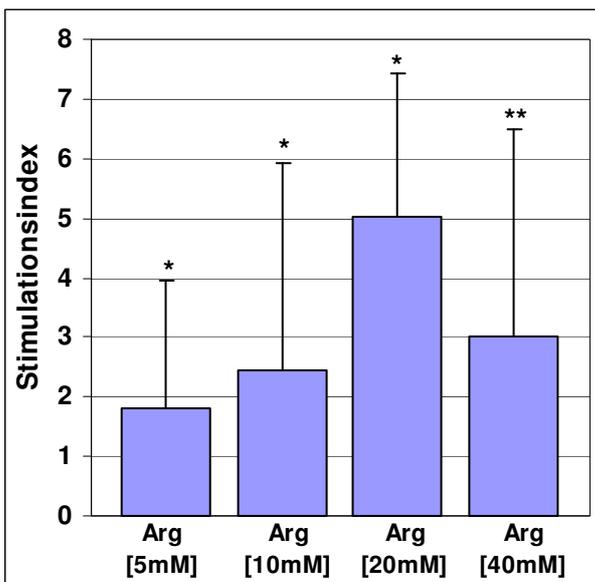
Zunächst wurde im normoglykämischen Milieu perfundiert. Dem KRBB als Grundmedium (Glukosekonzentration 54 mg/dl) wurden in der Stimulationsphase 300 mg/dl und 600 mg/dl Glukose zugesetzt. Mit mikroverkapselten porzinen Inseln aus 7 Isolierungen wurden in diesem Milieu insgesamt 15 Perfusionen bei 37°C durchgeführt. Die Vitalität der Inseln betrug 70-80%. **Abbildung 44** dokumentiert die prozentuale Veränderung des SI und der TTP für die höhere der beiden Glukose-Konzentrationen: Der SI steigt um 70% auf 170% ( $p=0,0249$ ; s.), die TTP ( $p=0,0049$ ; s.) verdoppelt sich (vgl. Tab. 15). Wegen der grösseren Schwankungen von SI und TTP – von Isolierung zu Isolierung – wurde das Ergebnis relativ (zu 300 mg/dl) dargestellt.



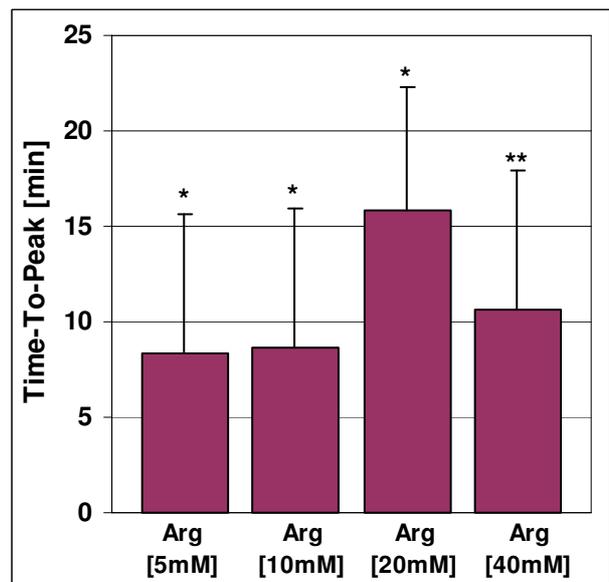
**Abb. 44:** Relativer Stimulationsindex (SI) und *Time To Peak* (TTP) (min) während der Stimulation mikroverkapselter, porziner Langerhans-Inseln mit 600 mg/dl Glukose in KRBB (300 mg/dl Glukose dient als Basiswert). Glukose 300 mg/dl ( $n=9$ ); Glukose 600 mg/dl  $MW\pm SA$ . ( $n=6$ ). \* $p=0,0249$  s., \*\* $p=0,049$  s., (vgl. Tab. 15).

#### 4.6.1.2. Arginin

Es folgte die konzentrationsabhängige Untersuchung mit Arginin (5, 10, 20 und 40 mM) in KRBB. Dazu wurden 15 Perfusionen bei 37°C durchgeführt mit Inseln, deren Vitalität 70-80% betrug. **Abbildung 45a/b** dokumentiert das Ergebnis der Stimulation mit Arginin, den SI und die TTP (vgl. Tab. 16). Während für den SI bei 5 mM ( $1,81 \pm 0,17$ ;  $p=0,045$  s.), 10 mM ( $2,44 \pm 0,63$ ;  $p=0,045$  s.) und 20 mM ( $5,01 \pm 2,43$ ;  $p=0,045$  s.) signifikante Unterschiede ermittelt wurden, war das Ergebnis für die Stimulation mit 40 mM ( $3,01 \pm 0,68$ ;  $p=0,197$  n. s.) nicht signifikant von der Stimulation mit 20 mM. Somit errechnet sich für die signifikanten SI ein Verhältnis von 1 (5 mM) : 1,35 (10 mM) : 2,82 (20 mM). Die TTP war nach Stimulation mit 20 mM Arginin gegenüber jener mit 5 und 10 mM um 90% ( $p=0,045$ ) signifikant verlängert. Der Absolutwert für die TTP und 20 mM Arginin betrug  $15,8 \pm 2,04$  Minuten gegenüber  $8,33 \pm 7,28$  Minuten für die 5 mM Arginin. Die TTP für 40 mM Arginin (MW  $10,66 \pm 2,31$ ) scheint sich gegenüber der TTP für 20 mM zu verkürzen; dies ist jedoch nicht signifikant (vgl. Tab. 16).



**Abb. 45a:** Stimulationsindex der Insulin-Ausschüttung für Arginin-stimulierte mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln in KRBB: Arginin MW $\pm$ SA 5 mM (n=3), 10 mM (n=3), 20 mM (n=6) und 40 mM (n=3). \* $p=0,049$  s., \*\* $p=0,197$  n. s., (vgl. Tab. 16).



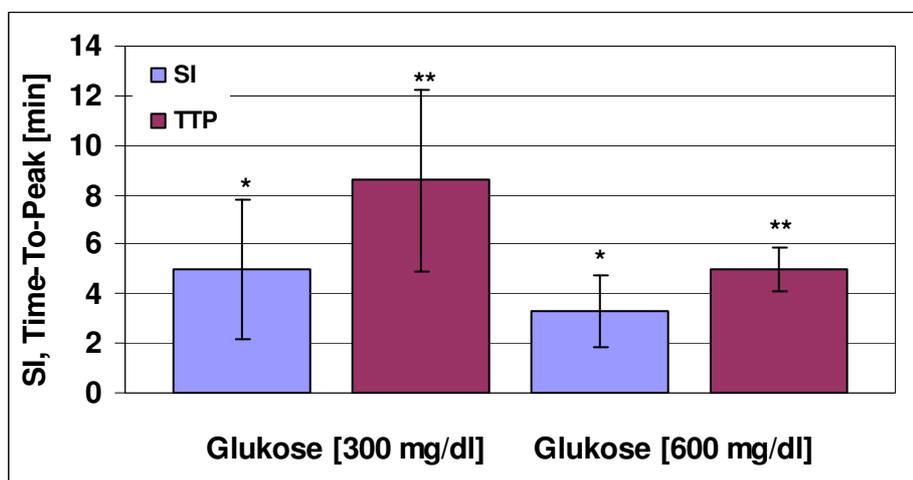
**Abb. 45b:** Time To Peak der Insulin-Ausschüttung für Arginin-stimulierte mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln in KRBB: Arginin MW $\pm$ SA 5 mM (n=3), 10 mM (n=3), 20 mM (n=6) und 40 mM (n=3). \* $p=0,045$  s., \*\* $p=0,1$  n. s., (vgl. Tab. 16).

## 4.6.2. Einfluss der Mediator-Konzentration im hyperglykämischen Milieu (Ham's F12)

### 4.6.2.1. Glukose

Die o. g. Versuche sollten im hyperglykämischen Milieu des Ham's F12 – zunächst mit Glukose – wiederholt werden. So liegt schon in der Adaptationsphase der Wert für die Glukosekonzentration gegenüber jener in KRBB um 130 mg/dl höher, und zwar bei 180 mg/dl). Wiederum wurden die mikroverkapselten Inseln 300 mg/dl (n=53) und 600 mg/dl (n=17) Glukose stimuliert. Die absoluten Glukosekonzentrationen betragen somit 480 mg/dl (26,67 mM) und 780 mg/dl (43,33 mM). In diesem Versuchsansatz wurden insgesamt 70 Perfusionen bei 37°C durchgeführt (Insel-Vitalität 70-80%).

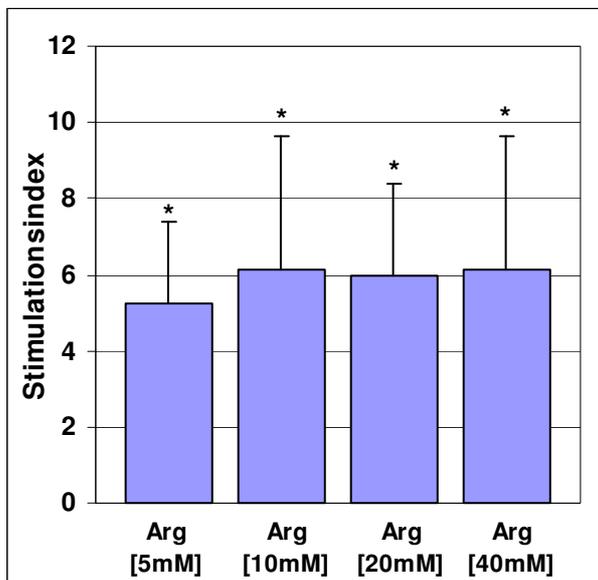
**Abbildung 46** dokumentiert die absolute Veränderung des SI und TTP für beide Konzentrationen (vgl. Tab. 17). Die grösseren Schwankungen der Standardabweichungen sind auf die Verwendung von Inseln aus unterschiedlichen Isolierungen zurückzuführen. Der niedrigere SI für 600 mg/dl Glukose ( $3,31 \pm 1,47$ ) ist gegenüber jenem für 300 mg/dl Glukose ( $4,98 \pm 2,82$ ) statistisch signifikant ( $p=0,039$ ; s.). Nicht signifikant hingegen ist die niedrigere TTP für 600 mg/dl Glukose ( $5 \pm 0,87$ ;  $p=0,058$ ; n. s.) verglichen mit jener für 300 mg/dl Glukose ( $8,57 \pm 1,47$ ).



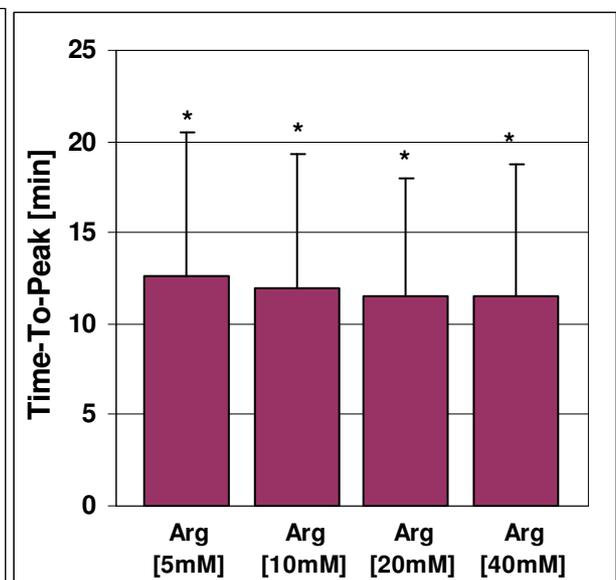
**Abb. 46:** Stimationsindex (SI) und *Time To Peak* (TTP) (min) während der Stimulation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln mit (300 mg/dl und 600 mg/dl) Glukose in Ham's F12. MW±SA; Glukose 300 mg/dl (n=53), Glukose 600 mg/dl (n=17). \* $p=0,039$  s., \*\* $p=0,058$  n. s., (vgl. Tab. 17).

#### 4.6.2.2. Arginin

Es folgten die Versuche mit 5, 10, 20 und 40 mM Arginin in Ham's F12. Es wurden 34 Perfusionen bei 37°C durchgeführt Insel-Vitalität 70-80%. **Abbildung 47** zeigt SI und TTP während der Stimulation. Die höheren Standardabweichungen sind erneut auf die Verwendung von Inseln aus unterschiedlichen Isolierungen zurückzuführen. Kein SI, 5,26±2,15 für 5 mM Arginin, 5,62±2,16 für 10 mM, 5,97±2,42 für 20 mM und 6,15±3,5 für 40 mM zeigte signifikante Unterschiede ( $p=0,89$ , n. s.). Für die TTP konnte weder mit dem Mann-Whitney-Test ( $p=0,975$  n. s.) noch mit dem Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test ( $p=0,5490$ , n. s.) (vgl. Tab. 18). Konzentrations-abhängige Unterschiede errechnet werden. Hier graphisch nicht gezeigt ist der signifikante Unterschied der Insulin-Sekretion pro Minute während der Stimulation (AUC  $B_{rel}$ ) mit 40 mM Arginin, verglichen mit jener mit 5 mM Arginin ( $p=0,0121$ , s.) (vgl. Tab. 18). Diese erhöhte Sekretion beträgt für 40 mM Arginin >300%. Über die gesamte Perifusionsdauer sezernieren die Inseln pro Minute (AUC<sub>gesamt rel</sub>) unter 40 mM Arginin sogar 420% mehr Insulin – verglichen mit den 5 mM Arginin.



**Abb. 47a:** Stimulationsindex (SI) der Insulin-Ausschüttung für Arginin-stimulierte mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln in Ham's F12: Arginin MW±SA 5 mM (n=8), 10 mM (n=4), 20 mM (n=12) und 40 mM (n=10). \* $p=0,89$  n. s., (vgl. Tab. 18).

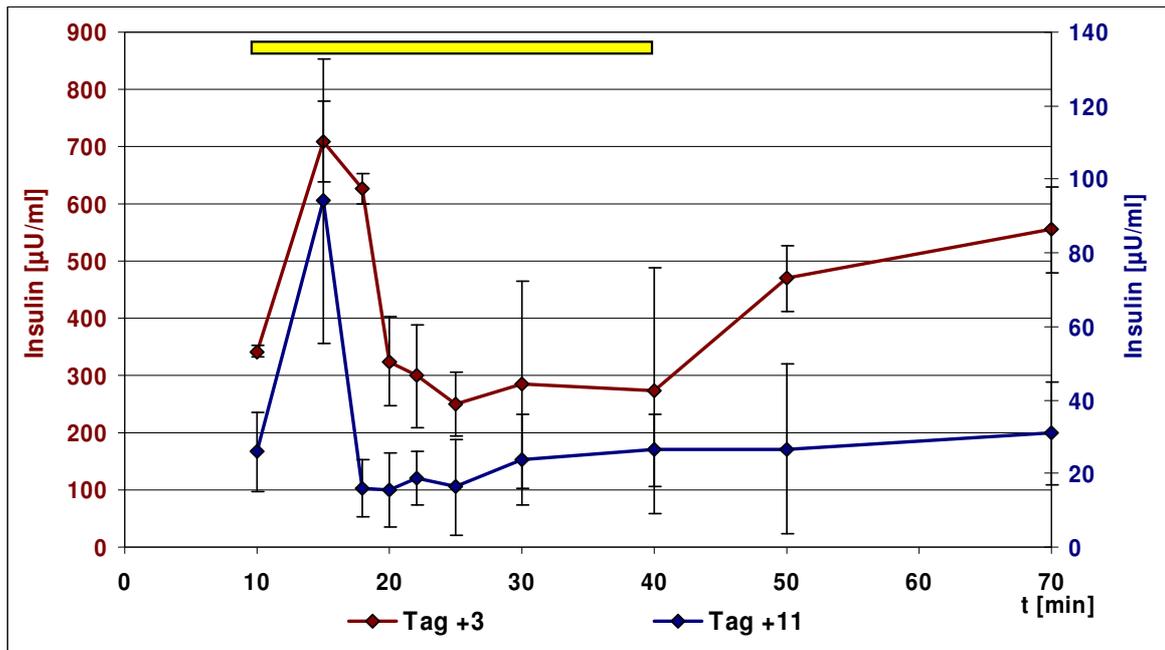


**Abb. 47b:** Time To Peak (TTP) der Insulin-Ausschüttung für Arginin-stimulierte mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln in Ham's F12: Arginin MW±SA 5 mM (n=8), 10 mM (n=4), 20 mM (n=12) und 40 mM (n=10). \* $p=0,975$  n. s. (vgl. Tab. 18).

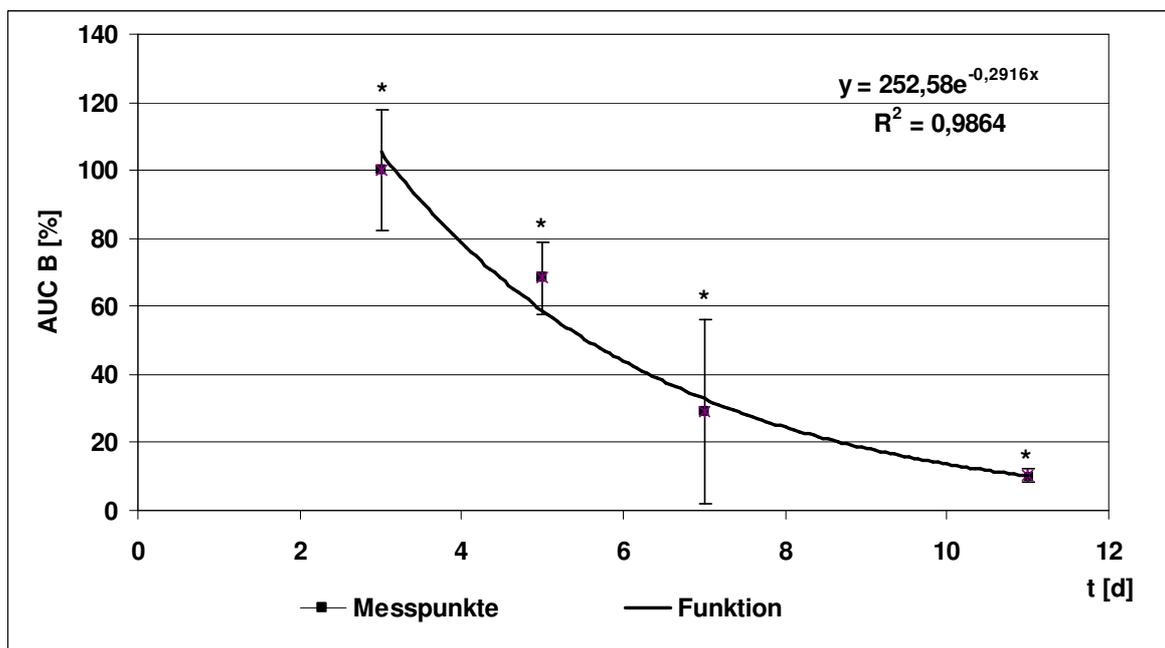
#### 4.7. Einfluss der Kulturdauer auf die Insulin-Ausschüttung

Um die Frage zu beantworten, wie sich während der mehrtägigen Perifusion (Langzeitperifusion) im Kammersystem die Ausschüttungskinetik über die Zeit (AUC B, SI) ändert, wurden mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln aus drei verschiedenen Isolierungen über einen Zeitraum von 11 Tagen untersucht. Um die Ergebnisse der Perifusionen miteinander zu vergleichen, wurden sie mit jenen von Tag +3 in Beziehung gesetzt. (Tag +3 ist der 3. Tag nach der Isolierung und der 1. Tag nach der Mikroverkapselung der Inseln mit Barium-Alginat). Für die Tage +3 und +5 wurden insgesamt 17 Perifusionen durchgeführt und ausgewertet, für die Tage +7 und +11 jedoch insgesamt nur 5 Perifusionen. (Undichte Kammern und Lufteinschlüsse z. B. führten zum unvorhergesehenen Abbruch einer Perifusion/Kultur). Ham's F12 diente als Kulturmedium. Für die Stimulation wurden 300 mg/dl Glukose verwendet, die Perifusionen erfolgten stets bei 37°C, mit einer Flussrate von 0,147 ml/min in der 70-minütigen Stimulationsphase der Tage +3, +5, +7 und +11. In der übrigen Zeit wurde das Medium mit einer Geschwindigkeit von 0,02 ml/min durch die Anlage gepumpt. **Abbildung 48** dokumentiert die Verläufe der Sekretionsprofile kurz vor, während und unmittelbar nach der Glukose-Stimulation für die Tage +3 und +11. Aus Gründen der besseren Übersicht wurden die Profile für die Tage +5 und +7 hier nicht dokumentiert; sie flossen jedoch sowohl in die statistische Auswertung mit ein, als auch in die Darstellungen in **Abb. 49** und **Abb. 50**. Die Kurven für die Tage +5 und +7 liegen zwischen den beiden hier gezeigten Extremen.

**Abbildung 49** zeigt die sezernierte Insulinmenge während der Stimulationsphase, bezogen auf Tag +3 (=100%). Die Standardabweichungen an den jeweiligen Versuchstagen zeigt die Schwankung der Insulinsekretion als Folge der unterschiedlichen Isolierungen. Der Abfall der Sekretion über den gesamten Zeitraum ist statistisch signifikant (vgl Tab. 19): Tag +3:Tag +5; Tag +5:Tag +7; Tag +7:Tag +11,  $p=0,016$ , s.. Innerhalb von zwei Tagen (Tag +3:Tag +5) kommt es zu einem Sekretionsabfall unter Stimulation um 30%. Nach zwei weiteren Tagen (Tag +5:Tag +7) kommt es während der Stimulation nochmals zu einem Sekretionsabfall von 40% auf jetzt nur noch 30% des Ausgangswertes am Tag +3. Am Tag +11 beträgt die in der Stimulationsphase freigesetzte Insulinmenge noch 10,5% vom Ausgangswert am Tag +3. Die mathematisch berechnete Funktion (f)  $y = 252,58e^{-0,2916x}$  drückt diesen Verlust der Insulinantwort über die Zeit [t] graphisch aus. Der Nash-Sutcliffe Koeffizient  $Rsq$  beträgt bei dieser Funktion 0,9864 (bei dem Maximalwert von 1).

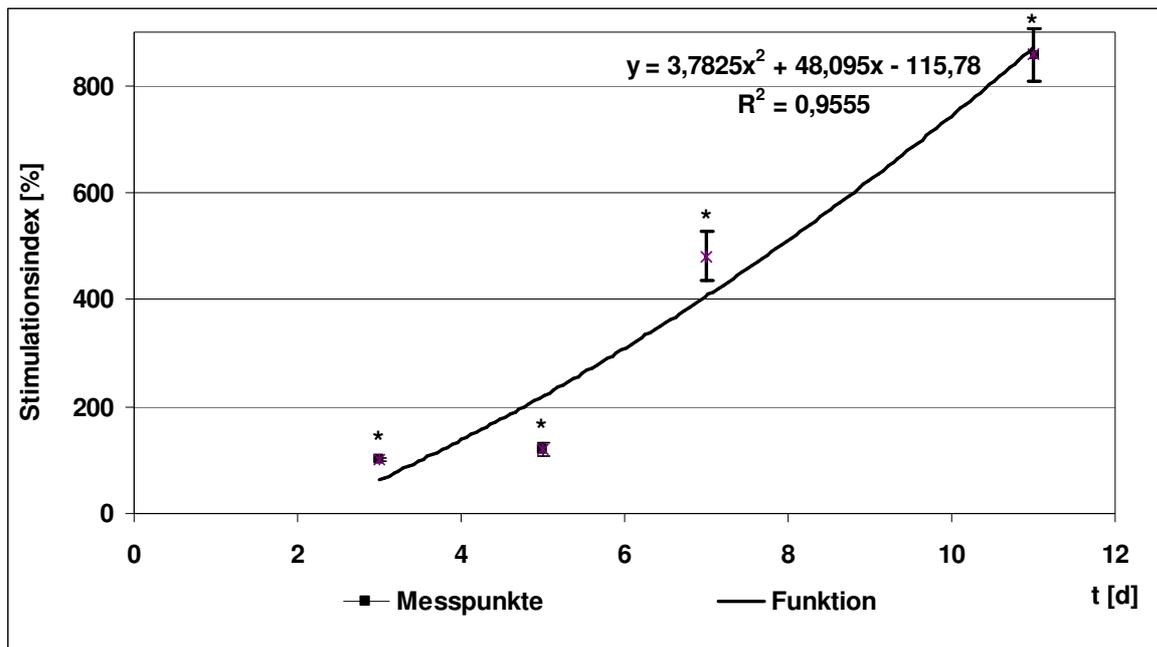


**Abb. 48:** Insulinsekretion mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln nach mehrtägiger *In-Vitro*-Kultur in Ham's F12 und wiederholter 70-minütiger Glukose-Stimulation (300 mg/dl, gelber Balken). Glukose-Stimulationen erfolgten an den Tagen +3, +5, +7, +11. Hier dargestellt sind die Sekretionsprofile an den Tagen +3 und +11. MW±SA; Tag +3 (n=3), Tag +11 (n=3).



**Abb. 49:** Abfall der Insulinsekretion mit zunehmender Kulturdauer. Angegeben ist die AUC B (Glukose-Stimulation, vgl. Abb. 48) an den Tagen +3, +5, +7 und +11. MW±SA. Tag +3 (n=17), Tag +5 (n=17), Tag +7 (n=5), Tag +11 (n=5). \*p=0,016 s. (vgl. Tab. 19).

Während die unter Glukose-Stimulation sezernierte Insulinmenge über die Zeit abnimmt (vgl. Abb. 48 und Abb. 49), steigt im gleichen Zeitraum (Tag +3 bis Tag +11) der Stimulationsindex signifikant an ( $p=0,012$ , s.) (**Abb. 50**). Ausgehend von einem 100%igem SI-Niveau am Tag +3, wird am Tag +11 nach Isolierung mit den gleichen Inseln ein SI von 777% erreicht. **Abbildung 50** zeigt diese Entwicklung. Die Funktion (f)  $y = 3,7825x^2 + 48,095x - 115,78$  drückt mit einem Nash-Sutcliffe Koeffizient  $R^2$  von 0,9555 diese Entwicklung prozentual aus (vgl. Tab. 19).



**Abb. 50:** Prozentualer Anstieg des Stimulationsindex mit zunehmender Kulturdauer. Angegeben ist der jeweilige Wert für die Tage +3, +5, +7 und +11. MW±SA. Tag +3 (n=17), Tag +5 (n=17), Tag +7 (n=5), Tag +11 (n=5). \* $p=0,016$  s. (vgl. Tab. 19).

## **5. Diskussion**

### **5.1. Insulinsekretion mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln im normoglykämischen und hyperglykämischen Milieu**

Laut Angaben der Herstellerfirma ist das hier verwendete Ham's F12 Medium eine Modifikation des komplexeren Ham's F10 Mediums und enthält Aminosäuren, Vitamine und Spurenelemente in optimalen Konzentrationen. Es wurde ursprünglich für die serumfreie Kultur von CHO-Zellen, primären Ratten-Hepatozyten und Prostata-Epithelzellen entwickelt. Differenzierte Untersuchungen mit 10 verschiedenen Zellkulturmedien brachten Holmes et al. 1995 zu der Schlussfolgerung, dass Ham's F12 für die *In-Vitro*-Kultur von porzinen Inseln am besten geeignet sei [69]. CMRL 1066 hingegen favorisierte er für die Kultur humaner Inseln. Ham's F12 ist daher in vielen Arbeitsgruppen heute das Medium der Wahl für die Kultur porziner Inseln.

#### **5.1.1. Insulinsekretion ohne Glukose-Stimulation**

Bei den Untersuchungen zur Auswirkung höherer Glukose-Konzentrationen im Kulturmedium auf die Insulinsekretion zeigte sich, dass bereits in Ham's F12 Medium mit 10 mM Glukose die 3,3-fache Insulinmenge gegenüber dem KRBB Medium mit 3 mM Glukose freigesetzt wird. Ein ähnliches Ergebnis zeigten Untersuchungen von Gouin et al. [108]. Entgegen unseren Versuchen am Tag +3 nach Isolierung folgten ihre Untersuchungen erst nach 7-tägiger Kulturdauer und mit 5,5 und 2,8 mM Glukose im Medium. Auch hier wurde im glukosereicheren Medium 2,6 mal mehr Insulin (MW 185  $\mu$ U/min) sezerniert – allerdings handelte es sich hier um unverkapselte Langerhans-Inseln. Die erhöhte basale Insulinsekretion im glukosereicheren Medium ist somit nicht zeitlich begrenzt, sondern besteht durchaus über eine längere Kulturphase. Brandhorst et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Vitalität porziner Inseln (im Gegensatz zu humanen) nach 8-tägiger Kultur und 200 mg/dl (11,1 mM) Glukose im Kulturmedium mit 83% am höchsten ist [105]. Bei niedrigem Glukosegehalt (100 mg/dl) sank die Vitalität der porzinen Inseln auf 58%, die der humanen Inseln stieg sogar an.

#### **5.1.2. Insulinsekretion mit Glukosestimulation**

Werden die mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit 300 mg/dl (16,6 mM) Glukose stimuliert, so ist das Verhältnis der Stimulationsindices von Ham's F12 (MW  $3,54 \pm 0,78$ ) zu KRBB (MW  $4,97 \pm 0,63$ ) in unseren Untersuchungen 1:1,4. Trotz des hy-

perglykämischen Milieus im Ham's F12 konnte die Insulinsekretion mit 480 mg/dl (26,6 mM) Glukose nochmals deutlich gesteigert werden.

Für die zeitliche Latenz, die *Time To Peak* (TTP), bis zum höchsten Punkt der Insulinsekretion gibt es in beiden Kulturmedien keinen signifikanten Unterschied (MW 5,75-8 Minuten). Goin et al. demonstrieren für die Stimulation von porzinen Inseln mit 22,2 mM Glukose (dieser Stimulus liegt annähernd zwischen unseren Werten von 26,6 mM für Ham's F12 und 12,65 mM für KRBB) mit  $3,6 \pm 0,2$  einen unseren Werten vergleichbaren SI [108]. Auch nach Stimulation humaner Inseln mit 16,7 mM Glukose wurde, bei einer vergleichbar langen TTP von 6 Minuten, und ähnlich wie bei unseren porzinen Inseln, ein SI von 2,8 gezeigt [101]. Die Ergebnisse von Davalli [70], die 1993 unter Verwendung der Medien (alle mit Zusatz von 10% FCS) CMRL 1066, RPMI 1640, RPMI 1640 plus 11 mM Glukose, Ham's F12 und TCM 199, nur für TCM 199 eine Glukose-induzierte Insulinsekretion der unverkapselten porzinen Inseln zeigen konnten (nach 2-tägiger Kulturdauer), sind mit unseren Ergebnissen und denen anderer Forschergruppen nicht erklärbar [69, 100, 105]. Da TCM 199 das einzige Kulturmedien mit Adenosinphosphat- und Xantinzusatz war, schloss er, dass diese Zusätze für die Kultur porziner Inseln wichtig sind [70]. Ebenso vermutete er, dass die relativ hohen Glukose-Konzentrationen in Ham's F12 (10 mM) und RPMI (11 mM) für die porzinen Inseln toxisch seien. Unabhängig von der Toxizität zeigten Brandhorst et al., dass porzine Inseln bei erhöhtem Glukosegehalt im Kulturmedium mit zunehmender Kulturdauer eine reduzierte Insulinsekretion auf den Glukosereiz zeigen [105]. Ein völliges Fehlen der Insulinsekretion nach nur 2-tägiger Kulturzeit lässt sich jedoch mittels dieser Erkenntnisse nicht erklären.

Wir konnten die Hypothese von Holmes et al. klar widerlegen, wonach das mangelnde Ansprechen der Inseln auf die Glukose-Stimulation bei Davalli auf die nur 2-tägige Kulturzeit zurückzuführen sei [69]. Unsere Perifusionsversuche in Ham's F12 zeigen auch am Tag +2 nach Isolierung eine gute Stimulierbarkeit der unverkapselten und mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln.

## **5.2. Einfluss der IEQ-Zahl auf die Insulinsekretion**

Im so genannten *Edmonton Protocol* wurden für das Transplantat  $11.547 \pm 1.604$  IEQ/kg Körpergewicht verwandt [49]. Für ein erfolgreiches Transplantat waren dabei im Mittel drei humane Spenderorgane nötig. Daten des *International Islet Transplant Registry* in

Giessen gehen von ca. 1 Million Inseln pro humanem Pankreas aus [112]. Somit wurden nur etwa 1/3 der insgesamt verfügbaren Langerhans-Inseln aus einem Organ verwendet. Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass für die erfolgreiche xenogene Transplantation porziner Inseln in Mäusen und Ratten, ca. 10-20 mal mehr Gewebe benötigt wird, als für die allogene Transplantation, z. B. humaner oder porziner Inseln [94, 122, 123]. Gründe hierfür werden in der schwierigen Präparation und Isolierung qualitativ hochwertiger porziner Inseln gesehen. Ebenso werden Unterschiede in der Physiologie der porzinen Inseln und ein unterschiedliches Ansprechen auf porzines Insulin in den verwendeten Tiermodellen diskutiert [124]. Es fehlen bisher genauere Untersuchungen zur Dynamik der Insulin-Ausschüttung porziner Inseln. Für unverkapselte Inseln sind die Daten lückenhaft und zu meist ohne genaue Angabe der verwendeten Inselzahl [103, 108]. Für mikroverkapselte Inseln gibt es bisher kaum diesbezügliche Untersuchungen [103].

Auf der Basis eigener Vorversuche zeichnete sich eine Abhängigkeit der Insulinsekretion von der Anzahl IEQ ab. Diese Abhängigkeit wurde jetzt hier erstmals und statistisch signifikant mit der Funktion (f) invers  $y = -0,2363 + (215,966/IEQ)$  beschrieben. Die Funktion drückt eine negative Korrelation von IEQ-Zahl und Insulinsekretion/IEQ aus. Während dieses Ergebnis bei einer geringeren IEQ-Zahl, bis etwa 100, grosse Unterschiede in der sezernierten Insulinmenge erklärt, fällt die Insulinsekretion pro IEQ bei einer Anzahl über 1.000 stark ab. So fällt der Zuwachs an Insulinsekretion bei Erhöhung der IEQ-Zahl über diese Grenze nur sehr gering aus. Dies erklärt, warum bei Perifusionsversuchen mit 1.000 und 3.000 IEQ kaum Unterschiede in der sezernierten Insulinmenge gemessen werden. Die Menge des sezernierten Insulins ist somit vor allem im Bereich bis 1.000 IEQ stark von der Anzahl der Inseln abhängig, während sich ihr Einfluss über 1.000 IEQ kaum auswirkt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich die absolut sezernierte Insulinmenge nach Stimulation von 24 IEQ nicht wesentlich von jener von 600 IEQ unterscheidet. Auch nach Erhöhung auf 2.100 IEQ wurde die sezernierte Insulinmenge, verglichen mit jener von 600 IEQ, nur um 60% gesteigert. Dieser Zusammenhang deutet auf einen negativen Feedbackmechanismus der  $\beta$ -Zellen untereinander hin, da auf alle Inseln die gleiche Glukosekonzentration einwirkt, und die mikroverkapselten Inseln vorbildlich mit Medium perifundiert werden. Da die mikroverkapselten Inseln – schon allein wegen ihrer grösseren Masse – nicht zusammengequetscht werden, wie u. U. die unverkapselten Inseln durch den Perifusionsstrom, ist davon auszugehen, dass an und in allen Zellen dieselbe Glukose-

Konzentration „ankommt“. Daraus kann man folgern, dass das sezernierte porcine Insulin eine parakrine Wirkung in Form eines negativen *Feedbacks* in den benachbarten Inseln auslöst. Eine derartige Wirkung ist auch bei für die *Releasing* Hormone, Melatonin, Serotonin und Histamin bekannt. Eine autokrine Rückkoppelung müsste dagegen eine lineare Abhängigkeit ergeben und kann aufgrund der von uns ermittelten Daten ausgeschlossen werden. Ausser bei dem von uns gezeigten Rückkopplungsmechanismus durch Insulin, ist eine negative Rückkopplung bei hormonalen Regulationen im Körper ein häufig verwandtes Prinzip [125]. Da einerseits die  $\beta$ -Zellen auch im Pankreas voneinander durch A-, D-, PP-Zellen und exokrine Anteile voneinander getrennt sind [125] und andererseits durch obige Versuche der Nachweis gelang, dass wenige Zellen pro IEQ mehr Insulin sezernieren, stellt sich folgende Frage: Ist es für die Transplantation von mikroverkapselten porcinen Inseln vorteilhaft, diese im Empfänger an mehreren Orten zu verteilen und dabei die Inselzahl pro Lokalisation zu reduzieren? Unsere Ergebnisse würden sehr für eine multifokale Transplantation der Inseln sprechen. Wie unsere Perifusionsversuche zeigen, kommt es durch das sezernierte Insulin bei der Perifusion, und vermutlich auch bei der Transplantation, bei einer größeren Anzahl von Inseln zu einer negativen Rückkopplung auf die Insulinsekretion. Für dieses Ergebnis spricht auch, dass Inseln in geringerer Zahl (wegen der geringeren Insulinkonzentration) dieser Rückkopplung nicht ausgesetzt sind und so pro IEQ absolut mehr Insulin freisetzen. Da die räumlich dichte Packung der Inselzellen, wie oben erläutert, in der Natur nicht vorkommt, sollte dieses Prinzip bei der Transplantation berücksichtigt werden. Eine multifokale Verteilung der mikroverkapselten porcinen Inseln im Empfänger würde somit – wenn unsere Hypothese stimmt – zu einer höheren Insulinsekretion bei gleicher IEQ Anzahl führen.

### **5.3. Einfluss der Mikroverkapselung auf die Insulinsekretion**

Um die Gefahr einer *Host versus Graft* Reaktion nach Transplantation zu vermindern, begann unsere Arbeitsgruppe bereits vor vielen Jahren mit der Mikroverkapselung der isolierten porcinen Langerhans-Inseln mit Bariumalginat. Da besonders die isolierten Inseln des Schweins, verglichen mit humanen Inseln, unverkapselt zur Fragmentierung neigen [95], wurden mit der Mikroverkapselung gleichzeitig zwei Probleme gelöst. Ob und wenn ja, in welcher Weise die Mikroverkapselung die Insulinsekretion der porcinen Langerhans-Inseln beeinflusst, wurde bisher nicht wirklich untersucht. Unsere Ergebnisse belegen, dass die Mikroverkapselung keine Diffusionsbarriere darstellt. Die Zeit (TTP), die bis zum Ansprechen der Zellen auf den Glukosereiz vergeht, ist mit jener bei Verwendung unverkap-

selter Inseln – das Gewebe stammt aus ein und derselben Isolierung – identisch. Auch der Stimulationsindex, also die Ansprechbarkeit der Inseln auf den Glukosereiz, zeigte zwischen beiden Gruppen, unverkapselt und mikroverkapselt, keinen signifikanten Unterschied. Da überdies auch für die Gesamtinsulinausschüttung, die  $AUC_{\text{gesamt}}$ , über einen Zeitraum von mehr als 3 Stunden ein identisches Sekretionsprofil bestimmt wurde, ist davon auszugehen, dass das physiologische und biochemische Verhalten der mikroverkapselten Inseln unbeeinflusst bleibt. Unsere Hypothese der Glukose- bzw. Stimulus-Akkumulation innerhalb der Kapsel, die zu einer lokal übersteigerten Reizung beitragen könnte, wurde in unseren Versuchen nicht bestätigt. Unterschiedliche Glukosekonzentrationen hatten auf die Ergebnisse ebenfalls keinen Einfluss.

#### **5.4. Bedeutung der Vitalität für die Inselfunktion**

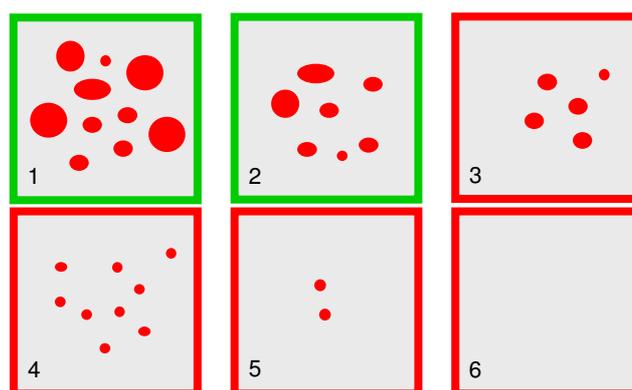
Die aus den Perifusionsversuchen mit mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln gesammelten Erfahrungen zur Evaluation der Inselfunktion haben gezeigt, dass der Stimulationsindex eine wichtige Messgröße für das Aktivierungspotential einer Insel ist. Korreliert man diesen Parameter mit der zuvor bestimmten Inselvitalität (diese lag im Bereich von 70-80%), so zeigte sich völlig unerwartet eine signifikante negative Korrelation zwischen beiden Parametern. Auch für Inseln mit geringerer Vitalität ergibt sich nach unseren Erkenntnissen ein hoher SI. Dieser übertrifft sogar den SI für Inseln mit hoher Vitalität. Ursache hierfür ist die Berechnung des SI als das Verhältnis (Quotient) der maximalen Insulinkonzentration bei Stimulation  $c_{\text{max}}$  und der unstimulierten Basalsekretion. Da die Basalsekretion des Insulins bei geringer Vitalität niedrig ist, erhöht sich der SI (durch Verminderung im Nenner) bei sinkender Vitalität; zudem sinkt die basale Insulinsekretion wesentlich stärker ab als die  $c_{\text{max}}$  bei Stimulation. Kurzzeitig ist somit auch bei Inseln niedrigerer Vitalität mit einer hohen Insulinsekretion aus den Speichern zu rechnen. Diese können allerdings bei mehreren Stimulationen hintereinander nicht mehr aufgefüllt werden (vgl. Kap. 4.7).

Korrelieren die Funktionsparameter ( $AUC_B$ ,  $AUC_{\text{gesamt}}$ ) mit der Inselvitalität, könnte auf das zeitaufwendige Auszählen der Inseln unter dem Mikroskop verzichtet werden. Die Vitalität würde somit einen direkten Rückschluss auf die zu erwartende Insulinsekretion zugelassen. Diese Korrelation liess sich durch unsere Untersuchungen nicht bestätigen. Es muss konstatiert werden, dass die Inselvitalität keine Aussagen über die tatsächliche  $\beta$ -Zellfunktion im Sinne der Insulinsekretionsfähigkeit ( $AUC_B$  und  $AUC_{\text{gesamt}}$ ) zulässt. Un-

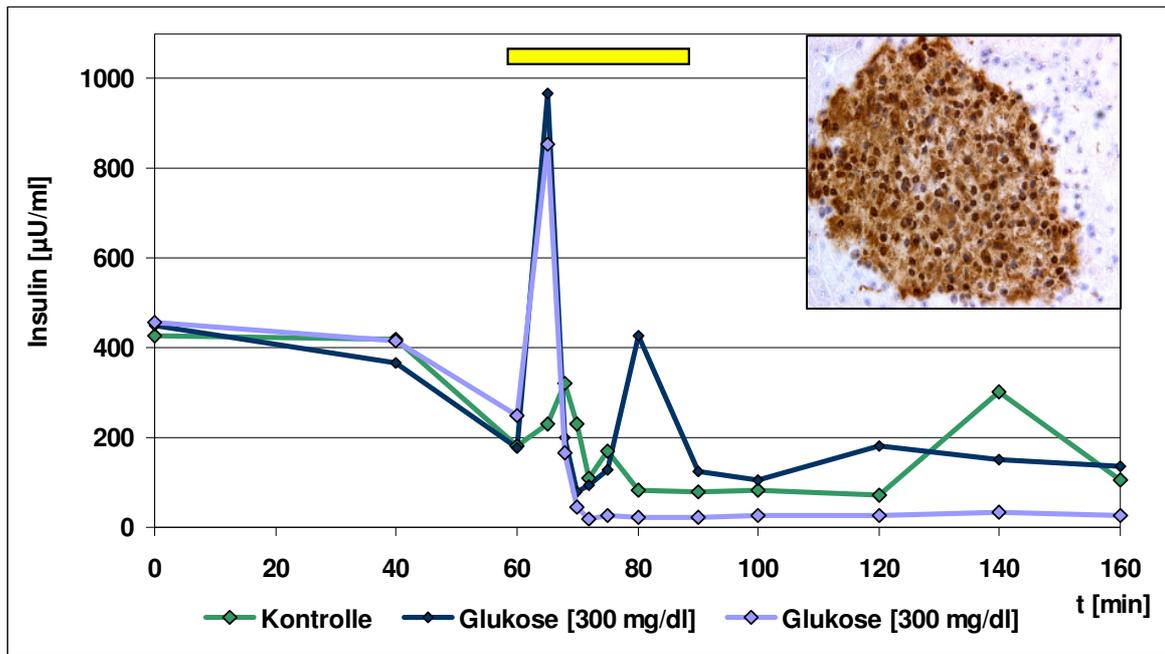
sere Ergebnisse zeigen klar, dass es sowohl bei älteren Inseln am Tag +11 bzw. auch bei frisch isolierten Inseln am Tag +2, trotz guter Vitalität zu einer nur geringen Sekretion kommen kann (vgl. Kap. 4.7). Aufgrund unserer Ergebnisse ist dringend davon abzuraten, die Qualität eines Transplantates allein anhand der Inselvitalität zu definieren. Um eine optimale Inselfunktion *in vivo* zu garantieren, sollte eine Perifusion mit einer Stichprobe IEQ vor der Transplantation durchgeführt werden. Nur so lässt sich eine Aussage zur Qualität des Transplantates machen – diese Qualität wird jedoch nicht ausschliesslich von der Vitalität der Inseln bestimmt. Allerdings, sind die Inselzellen avital, d.h. tot, erlischt selbstverständlich auch ihre Funktion.

#### 5.4.1. Einflussfaktoren auf Vitalität und Insulinsekretion

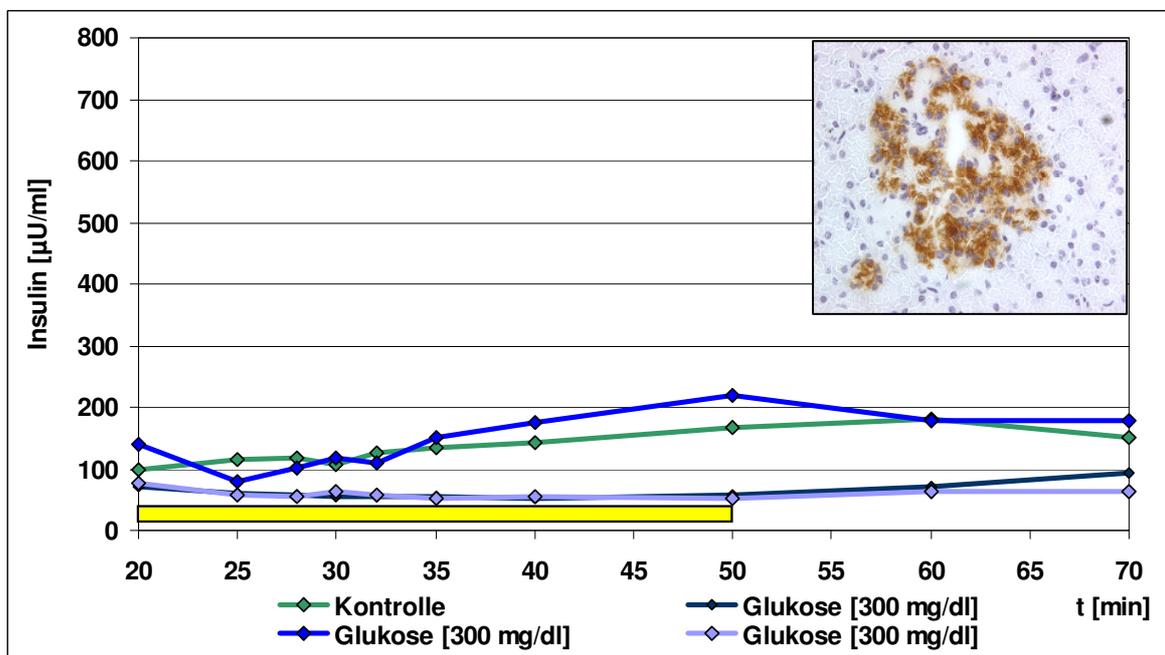
Wegen der genetisch heterogenen Spendertiere aus dem Schlachthaus ist eine gleich bleibende Inselqualität nur zu schwer zu gewährleisten. Trotz ausgefeilter und reproduzierbarer technischer Abläufe im Labor im Rahmen des Isolierungs-Prozesses ist ein limitierender Faktor die Organqualität des Spenders. Bei den sehr unterschiedlichen Aufzucht- und Haltungsmethoden der Tiere, als Produzenten von Biofleisch oder herkömmlichem Fleisch, ist davon auszugehen, dass zumindest ein Teil der Schweine an einem Typ 2 Diabetes erkrankt ist. Dies wurde bisher nie untersucht. Wegen der beträchtlichen Schwankungsbreite hinsichtlich der Anzahl und Form der Langerhans-Inseln kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Tiere erkrankt waren und von diesen pathologische Inselzellen isoliert wurden. **Abbildung 51** zeigt dies schematisch.



**Abb. 51:** Schematische Darstellung der Langerhans-Inseln im Pankreas weiblicher Zuchtsauen der Deutschen Landrasse (ca. 110 kg Körpergewicht, 1-2 Jahre alt; rot wegen Dithizon-Färbung; Gefrierschnitt). Es gibt gravierende Unterschiede hinsichtlich Anzahl und Grösse der Inseln im Spenderorgan. Üblicherweise werden nur aus den grün umrandeten „Pankreata“ Inseln isoliert.



**Abb. 52a:** Perfusion von porzinen mikroverkapselten Langerhans-Inseln in Ham's F12, dem für 30 Minuten 300 mg/dl Glukose zugesetzt wurde (gelber Balken). Verwendet wurden Inseln eines Spenderschweins am Tag +3 nach Isolierung mit 75% Vitalität. Oben rechts: Korrespondierende Insulinfärbung der perfundierten Langerhans-Inseln, hier im Pankreas vor Isolierung. Die Färbung verteilt sich gleichmässig über das gesamte endokrine Gewebe und ist intensiv. (Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. I. Chodnevskaja).



**Abb. 52b:** Perfusion von porzinen mikroverkapselten Langerhans-Inseln in Ham's F12, dem für 30 Minuten 300 mg/dl Glukose zugesetzt wurde (gelber Balken). Verwendet wurden Inseln eines Spenderschweins am Tag +3 nach Isolierung mit 75% Vitalität. Oben rechts: Korrespondierende Insulinfärbung der perfundierten Langerhans-Inseln, hier im Pankreas vor Isolierung. Die Färbung ist unregelmässig mit grossen ungefärbten Bereichen. (Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. I. Chodnevskaja).

Wir haben bereits 2002 Daten veröffentlicht, wonach grosse, runde Langerhans-Inseln in jungen und alten Hybridschweinen prozentual sehr unterschiedlich vorkommen [80, 81]. Hinzu kommt, dass es in wohl geformten Langerhans-Inseln eines Mastschweins grosse Areale geben kann, die Insulin-negativ sind, d. h. offenbar degranuliert sind (**Abb. 52a, Abb. 52b**). Beide Inseltypen stammen von „normalen“, also äusserlich gesunden 110 kg schweren weiblichen Zuchtsauen der Deutschen Landrasse. Trotz vergleichbarer Vitalität zeigen sich deutliche Unterschiede in Bezug auf den Insulingehalt der B-Zellen und die Insulin-Sekretion. Somit wird klar, dass es nicht nur altersabhängige Unterschiede hinsichtlich Inselzahl und Grösse gibt, sondern der Insulingehalt der einzelnen Insel bei Schweinen gleichen Alters und gleicher Rasse stark schwankt. Man darf vermuten, dass dies auf die Haltungs- und Fütterungsbedingungen zurückzuführen ist. Als pathophysiologisches Korrelat eines manifesten Typ 2 Diabetes wären so auch die Abweichungen von Insulin-Sekretionsprofilen erklärbar (**Abb. 52a, Abb. 52b**). Erste interessante Untersuchungen dazu kommen von Kaiser et al. [126]. Diese Autoren beobachten an der Sandratte, einem Wüstenbewohner, dass schon eine 26-tägige hochkalorische Diät zu einer reduzierten  $\beta$ -Zellmasse und abnehmenden Insulinspeichern im Pankreas führt. Dieser Prozess ist zunächst reversibel, führt aber bei längerer Dauer zur Zerstörung der  $\beta$ -Zellen und allen Anzeichen eines manifesten Typ 2 Diabetes. In wie weit ähnliche Prozesse auch für „unser“ Spendertiere, die für die Fleischproduktion mit hochkalorischem Futter gemästet wurden, gilt, ist zur Zeit nicht klar. Die sehr ähnlichen pathophysiologischen Veränderungen an den Langerhans-Inseln in beiden Spezies nähren allerdings den Verdacht, dass auch im Schwein ähnliche Prozesse ablaufen.

Um eine optimale Inselqualität für die Isolierung und spätere Transplantation zu gewährleisten, muss zukünftig ein intensiveres *Screening* der Spendertiere erfolgen, möglichst vor ihrer Tötung. Da aber auch die histologischen Untersuchungen, vor oder nach Isolierung, eine mögliche Zuckererkrankung als Folge der Fütterungsbedingungen nicht ausschliessen können, sollte der Nüchternblutzuckerspiegel gemessen oder ein oraler Glukose-Toleranztest vor Tötung durchgeführt werden. Zudem muss die Genetik der Spendertiere in den Vordergrund rücken, da eine neuere Arbeit an der Maus genetische Faktoren für die Ausprägung der Langerhans-Inseln im Pankreas verantwortlich macht [127]. Andere Forschergruppen, die mit *Specific Pathogen Free Pigs* arbeiten, können zumindest mit identischen Zucht- und Haltungsbedingungen der Tiere systematische Nachteile ausschliessen

[103]. Wegen der eingeschränkten Aussagekraft der Inselvitalität zur Insulin-Sekretion sollte in jedem Fall *prae transplantationem* eine Perifusion erwogen werden.

### 5.5. Der Einfluss diverser Mediatoren auf die Insulinsekretion

In der Literatur finden sich bis dato kaum Versuche über die Stimulierbarkeit von mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln. Die Daten zur Insulinfreisetzung frisch isolierter Inselzellen werden kontrovers diskutiert. Unsere Inseln wurden am Tag +3 nach Isolierung perifundiert. Untersuchungen mit humanen und porzinen Langerhans-Inseln konzentrieren sich bisher nahezu ausschliesslich auf die Stimulierbarkeit mit Glukose. Deshalb legten wir bei unseren Versuchen den Schwerpunkt auch auf die Stimulierbarkeit mit anderen Mediatoren. Versuche zum Einfluss nutritiver Faktoren (Aminosäuren, Fette), Neuromediatoren (Phenylephrin, Carbamylcholin, Clonidin), Hormone (Glukagon) oder Sulfonylharnstoff (Tolbutamid) auf die Insulin-Freisetzung wurden bisher nur in sehr geringer Zahl und unsystematisch durchgeführt [108]. Fraglich ist, ob die Insulinsekretion direkt oder indirekt durch solche Mediatoren beeinflusst wird. Es galt die Prämisse, dass die Inselzellen im menschlichen Organismus nicht ausschliesslich unter dem Einfluss von Glukose stehen [125]. Demzufolge sollten die o. g. Mediatoren hinsichtlich ihrer Wirkung als stimulierende oder inhibierende Mediatoren auf die Insulinsekretion untersucht werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich der Stimulationsindex im normoglykämischen Milieu (KRBB) zwischen den von uns untersuchten Mediatoren nicht wesentlich unterscheidet. Die TTP hingegen war bei Arginin 1,9-fach, bei Clonidin 1,65-fach, bei Glukagon 2,83-fach und bei Tolbutamid 1,44-fach (gegenüber dem Basiswert bei Stimulation mit 300 mg/dl Glukose in KRBB) verlängert. Bei Stimulation im hyperglykämischen Ham's F12 hingegen zeigten sich andere Ergebnisse: Der SI war bei Stimulation mit Arginin 1,38-fach und bei Glukagon 1,35-fach signifikant erhöht, bei Clonidin hingegen um 68% erniedrigt. Mit einer Reduktion des SI um 52% verfehlte Tolbutamid das Signifikanzniveau nur knapp. Wie schon in Kapitel 4.1. beschrieben, war der Mittelwert des SI bei Stimulationsversuchen in Ham's F12 gegenüber KRBB erwartungsgemäss erniedrigt. Die Differenz betrug ca. 10%. Die TTP in Ham's F12 war bei Stimulation mit Arginin 1,66-fach, mit  $\beta$ -OH-Buttersäure 2,65-fach, mit Clonidin 1,88-fach und mit Glukagon 1,9-fach signifikant verlängert. Die TTP der Glukosestimulation war in beiden Gruppen (KRBB, Ham's F12) wie erwartet identisch (vgl. Kapitel 4.1).

Stimulationsversuche mit 16,7 mM Glukose (in KRBB) ergaben für humane Inseln einen SI von 2,8 [101]; bei Gouin et al. zeigte sich mit 20 mM Glukosestimulation (in KRBB) auch für unverkapselte porcine Inseln ein nahezu identischer SI von 3,6 ( $c_{\max}$  261  $\mu$ U/ml, Basalsekretion 72  $\mu$ U/ml) [108]. Die Perifusionskurven zeigten – anders als unsere – jedoch keinen biphasischen Verlauf [108]. Der in unseren Versuchen gemessene SI (in KRBB) betrug nach Stimulation mit 20 mM Glukose  $7,3 \pm 5,1$ . Dies zeigt das gute Ansprechen der mikroverkapselten porcinen Langerhans-Inseln auf den Glukosereiz und ist dem Ansprechen von humanen und unverkapselten porcinen Inseln absolut gleichwertig. Die Schwankungen des SI (2,2-12,4) und der Peakwert  $c_{\max}$  (145-1000  $\mu$ U/ml) in Versuchen mit unterschiedlichen Spendertieren waren, trotz nahezu gleicher Inselvitalität, bemerkenswert. Daraus darf man schliessen, dass unterschiedliche Haltungs- und Fütterungsbedingungen, das Alter und die Genetik der Spendertiere, wie auch Abweichungen in der Kollagenase-Qualität zu solchen Abweichungen führen dürften.

Um dennoch die funktionelle Evaluation mikroverkapselter porciner Langerhans-Inseln im Hinblick auf die spätere Transplantation oder *In-Vitro*-Versuche zu forcieren, schlagen wir folgende Kriterien vor, die wir aus den Erfahrungen mit den hiesigen Perifusionsversuchen ableiten: (1) eine Basalsekretion von mindestens 50  $\mu$ IU/ml, (2) bei Stimulation mit 20 mM Glukose Auftreten eines *First Peak* innerhalb der ersten 10 Minuten, der (3) von einem signifikanten *Second Peak* innerhalb oder nach der Stimulationsphase gefolgt wird. Für die Evaluation der Inselfunktion scheint ein beständiges Sekretionsprofil aussagekräftiger zu sein als die absoluten Peakwerte  $c_{\max}$ . Unsere Versuche haben gezeigt, dass die kurzzeitige Insulinausschüttung nach Stimulation keine hinreichende Aussage über die Insel-Qualität ermöglicht, da auch gealterten Inseln kurzzeitige hohe Insulinmengen ausschütten können (vgl. Kap. 4.7, Abb. 48).

Bei der Analyse eines weiteren nutritiven Faktors, der Aminosäure L-Arginin, zeigte sich die TTP in KRBB gegenüber jener von Glukose verlängert, während der SI dem von Glukose entsprach. Im hyperglykämischen Ham's F12 waren beide Faktoren erhöht bzw. verlängert. Entgegen anderen Ergebnissen, die bei Arginin-Stimulation von monophasischen Sekretionsprofilen berichten [108], zeigte unser Perifusionsprofil mit hochvitalen Inseln einen biphasischen Verlauf. Erst bei einsetzender Alterung der Inseln ging dieses langsam in einen monophasischen Verlauf über (vgl. Kapitel 4.7). Wie unsere Ergebnisse zeigen, kam es auch bei niedrigen Glukose-Konzentrationen in KRBB (3 mM) zu einer Stimulati-

on mit Arginin. Marchetti et al. erzielten eine Stimulation mit Arginin nur dann, wenn das Medium hohe Glukose-Konzentrationen enthielt [58, 109, 110]. Auch bei uns war die absolute Insulinsekretion im glukosereicheren Ham's F12 höher als in KRBB. Betrachtet man aber die SI in beiden Medien, so ist kein signifikanter Unterschied feststellbar. Unter normalen Bedingungen konnten wir bei Stimulation keine starke *time dependent inhibition* beobachten, wie dies von Cerasi et al. berichtet wurde [106, 107]. Darunter versteht er einen starken Abfall der Insulinsekretion direkt nach dem Ende der Stimulation mit Arginin. Bei einer 120-minütigen Perifusion mit einer Adaptationsphase AUC A (60 Minuten) und einer Stimulationsphase Bei Arginin-Stimulation in Ham's F12 war die sezernierte Insulinmenge in der Stimulationsphase AUC B 45 mal höher als in der Adaptationsphase AUC A zuvor. Nach dem Ende der Stimulation war die ausgeschüttete Insulinmenge in AUC C immer noch 20 mal höher als vor der Stimulation (in AUC A). Die typische *time dependent inhibition* war in unseren Versuchen vielmehr ein Charakteristikum alternder bzw. avitaler Inselzellen, die lediglich einen *First Peak* produzierten (vgl. Kapitel 4.7). Möglich ist auch, dass nach den Untersuchungen mit Ratten-Inseln Verallgemeinerungen getroffen wurden, die für porcine Langerhans-Inseln so nicht nachvollziehbar sind.

Über die Wirkung von Ketonkörpern auf die Sekretionsleistung lagen bisher nur Ergebnisse aus Perifusionen von Gouin et al. mit DL- $\beta$ -Hydroxybutyrat vor [108]. Er zeigte bei Stimulation unverkapselter porciner Langerhans-Inseln mit 10 mM DL- $\beta$ -Hydroxybutyrat eine Zunahme der Insulinsekretion. Der von ihm gemessene SI von  $4,3 \pm 0,3$  [108] entspricht sehr gut unseren Ergebnissen mit einem SI von 5,1 für KRBB und 4,9 für Ham's F12. Ausgehend von unseren Ergebnissen in Kapitel 4.6. zeigte sich mit zunehmender Glukose-Konzentration in Ham's F12 eine um das 2,5-fache verzögerte TTP, die in KRBB mit dem geringeren Glukosegehalt nicht messbar war.

Die Stimulation mikroverkapselter porciner Langerhans-Inseln mit dem Neuromediator und  $\alpha 1$ -Agonist (*R*)-(-)-Phenylephrin Hydrochlorid führte zur Steigerung der Insulinsekretion. Sowohl in KRBB als auch in Ham's F12 waren SI und TTP mit den entsprechenden Werten für die Stimulation mit Glukose identisch. Identisch war auch das Ergebnis der Simulation mit 500 mmol/l Carbamylcholin. Entsprechend der cholinergen Steuerung humaner Inselzellen reagierten die mikroverkapselten porcinen Inseln mit einer Steigerung der Insulinsekretion [116, 117].

Stimulationsversuche mit dem Neuromediator und  $\alpha$ 2-Agonist Clonidin ( $50 \mu\text{mol/l}$ ) zeigten bei Gouin et al. einen Einbruch der Insulinsekretion, wenn sie unverkapselte porzine Inseln stimulierten [108]. Der SI sank dann bis auf Werte von  $0,7 \pm 0,1$  [108]. In unseren Versuchen war, unter normoglykämischen Bedingungen, lediglich die TTP gegenüber jener bei Glukosestimulation um das 1,65-fache verlängert. Der SI für Clonidin wich jedoch nicht signifikant vom SI bei Glukosestimulation ab, war im Mittel jedoch leicht erniedrigt. Bei der Betrachtung des Sekretionsprofils fällt auf, dass die Insulinsekretion bei Stimulation einbricht – insbesondere im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollinseln. Obgleich diese Ergebnisse im Einklang mit den Versuchen von Gouin et al. stehen, sind sie jedoch widersprüchlich zu jenen von Gregersen et al. [117]. Diese beobachten für porzine Langerhans-Inseln eine Inhibition der Insulinsekretion ausschliesslich über den  $\alpha$ 1-Rezeptor-vermittelten Aktivierungsweg, nicht jedoch über den  $\alpha$ 2-Rezeptor-vermittelten Aktivierungsweg, den Gouin et al. und wir beschreiben. Da die Stimulation des  $\alpha$ 2-Rezeptors auch bei humanen Langerhans-Inseln zu einer Hemmung der Insulinsekretion führt [118, 119], ist die Reaktion unserer Inseln auf die  $\alpha$ 2-Rezeptor-Aktivierung mit jener humaner Inseln identisch. Wie es zur  $\alpha$ 1-vermittelten Hemmung der Insulin-Ausschüttung von porzinen Inseln bei Gregersen et al. kommen konnte [117], ist ohne weitere detaillierte Untersuchungen nicht nachvollziehbar. Wie mit dem  $\alpha$ 1-Agonist (*R*)-(-)-Phenylephrin Hydrochlorid von uns gezeigt wurde, führt die Stimulation zu einer deutlichen Insulinsekretionssteigerung.

Glukagon ist der direkte Gegenspieler des Insulins und steigt physiologisch bei Blutglukosekonzentration unter  $80 \text{ mg/dl}$  im Körper an. Während Insulin die Glykogen-Synthese fördert, resultiert die physiologische Freisetzung von Glukagon in einem Abbau von Glykogen und damit im Anstieg des Blutglukosegehalts. Untersuchungen zum Sekretionsprofil bei Glukagon-Stimulation von Gouin et al. zeigen ein monophasisches Profil mit einem SI von  $1,7 \pm 0,2$  [108]. In unseren Untersuchungen war der SI sowohl in KRBB als auch in Ham's F12 mit  $5,5$ - $5,8$  deutlich höher. Verglichen mit der Glukose-Stimulation war die TTP bei Stimulation mit Glukagon in KRBB signifikant verlängert, in Ham's F12 insgesamt etwas niedriger, allerdings im Vergleich zur Glukose-Stimulation signifikant verzögert. Aufgrund der deutlichen Verzögerung der Insulin-Ausschüttung ist davon auszugehen, dass sie unter Glukagon über einen anderen Mechanismus getriggert wird, der eine längere Zeitspanne benötigt. Durch eine direkte Rückkopplung auf die  $\beta$ -Zellen verursacht Glukagon eine gesteigerte Insulin-Ausschüttung im Organismus – so auch in der Pe-

rifusion – was zu einem verminderten Glukosegehalt im Blut oder Medium führt. Dies ist ein gutes Beispiel für ein biologisches System im *Steady State* Gleichgewicht. Die hier durchgeführten Stimulationen mikroverkapselter porziner Inseln mit Glukagon zeigen, dass das Hormon Glukagon, neben seinem bisher bekannten Einfluss auf Leber und Fettgewebe [120], die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zelle direkt beeinflusst; das war, nach dem Stand der Literatur, bisher nicht bekannt [120].

Der Mechanismus von Tolbutamid besteht in einer Blockierung des auswärtsgerichteten K-Kanals der Inselzelle, dessen SUR1-Komponente blockiert wird [121]. Bei Stimulation mit dieser Substanz wird somit direkt eine membrangebundene Komponente der porzinen Inselzellen angesprochen. Sowohl im normoglykämischen als auch im hyperglykämischen Milieu gab es eine deutliche Stimulation der Insulinsekretion. In Ham's F12 war die Ausschüttung bei Stimulation mit 300 mg/dl Glukose und Tolbutamid um 30% gegenüber jener bei Stimulation mit Glukose gesteigert. Während mit 300 mg/dl Glukose in Ham's F12 ein SI von 1,59 erzielt wird, wird durch Stimulation mit 100  $\mu$ mol Tolbutamid ein SI von 1,39 provoziert. Der additive Effekt von Glukose und Tolbutamid zeigt sich in einem SI von 2,07. Der in KRBB (SI 5,75) gegenüber Ham's F12 (SI 2,07) deutlich erhöhte SI deutet auf die exzessive Bindung von Tolbutamid an Albumin in Lösung hin. Aufgrund der Bindung von 80-99% des Tolbutamids, kann die in Lösung erhaltene Konzentration in diesen Fällen bei einem Viertel der errechneten liegen [121]. Da KRBB nur 0,1% BSA enthält, Ham's F12 hingegen 10% FCS, darf man vermuten, dass Tolbutamid wegen seiner starken Bindung an FCS in Ham's F12 seine Wirkung nicht voll entfalten kann.

### **5.6. Einfluss der Mediator-Konzentration auf die Insulinsekretion**

Die Konzentrations-abhängige dynamische Insulinantwort auf eine Stimulation ist eine essentielle Vorbedingung für ein erfolgreiches Transplantat. Grundsätzlich gibt es zwei Thesen, um die Konzentrations-abhängige Insulinausschüttung zu erklären: Die erste geht davon aus, dass die Glukose-Konzentration in jeder Einzelzelle das Ausmaß des intrazellulären Signals direkt induziert. Untersuchungen, die Konzentrations-abhängige Veränderungen der elektrischen Zellaktivität und des  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxes feststellten, sprechen für diese These. Zusätzliche Ergebnisse sprechen für eine elektrische Kopplung zwischen den  $\beta$ -Zellen [113]. Die zweite These geht davon aus, dass jede  $\beta$ -Zelle nach einem *All Or None* Modus auf einen gegebenen Glukosereiz reagiert und ihren Insulin-Vorrat entleert. Da die  $\beta$ -Zellen unterschiedliche Reizschwellen haben, reagieren auf höhere Konzentrationen

mehr Zellen. Pipeleers et al. konnten die unterschiedlichen Reizschwellen von  $\beta$ -Zellen belegen [114, 115]. Eine Variante sieht vor, dass verschieden sensitive *Pools* vorliegen, die bei Stimulation mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen entleert werden.

Wir konnten *in vitro* zeigen, dass mikroverkapselte porcine Inseln selektiv auf einen Stimulus reagieren. Im normoglykämischen KRBB (mit 3 mM Glukosegrundgehalt) zeigte sich bei Stimulation mit 36,3 mM Glukose gegenüber 19,6 mM ein signifikanter Anstieg des SI um 70%. Die TTP verlängerte sich um 100%. Untersuchungen von Duvivier et al. zur Langzeitkultur mikroverkapselter porciner Inseln belegen die Korrelation von SI und Stimulus-Konzentration eindeutig [103]

Trotz der unterschiedlichen SI nach Glukose-Stimulation mit 19,6 mM und 36,3 mM in Ham's F12, war die absolute Insulinsekretion in beiden Fälle nahezu identisch. Untersuchungen von Gouin et al. mit porcinen Inselzellen zeigen im Stimulationsintervall (mit 5,5 mM und 11 mM Glukose) einen Anstieg des SI um 24% bei Verwendung von 11 mM [108]. Die Verdopplung der Konzentration auf 22 mM Glukose führt jedoch nur noch zu einer SI Zunahme von 16%. Dies deutet auf eine Sättigungskonzentration hin. Neshet et al. fanden heraus, dass die Sättigungskonzentration von isolierten humanen Inselzellen mit Glukose bei 15-20 mM liegt [106]. Auch die von uns gemessene konstante Insulinsekretion nach Stimulation mit 19,6 bis 36,3 mM Glukose in diesem Intervall deutet auf eine Sättigung hin.

Auch für Arginin zeigte sich *in vitro* eine Konzentrations-abhängige Stimulierung der Inselzellen. Im normoglykämischen KRBB konnte für den Stimulationsbereich zwischen 5, 10 und 20 mM Arginin, eine signifikante Steigerung von SI und TTP gezeigt werden. Die Stimulation mit 40 mM Arginin zeigte bei uns gegenüber den Werten bei 20 mM abfallende SI und TTP Werte. Vermutlich aufgrund der kleineren Versuchszahlen war dieser Unterschied jedoch gegenüber 20 mM Arginin nicht statistisch signifikant. Die maximalen Grenzen der Stimulierbarkeit mit Arginin in KRBB lagen so im Intervall von 20-40 mM.

Bei Stimulation mit Glukose im hyperglykämischen Ham's F12 zeigt sich, dass der SI bei Überschreiten einer Sättigungskonzentration nicht weiter ansteigt sondern sogar wieder abfällt. Bei Stimulation mit 600 mg/dl (43,3 mM) Glukose verringerte sich der SI gegenüber der Stimulation mit 300 mg/dl (26,6 mM) signifikant um 33,5%. Auch die TTP ver-

kürzte sich um 41,6%. Diese eindeutige Tendenz war jedoch nicht statistisch signifikant. Aus den vorliegenden Daten wird klar, dass der SI bei Überschreiten der maximalen Stimulierbarkeit nicht etwa ein Plateau bildet sondern wieder abfällt, während die absolute Insulinsekretion AUC B (wie für die Stimulation mit Glukose in KRBB gezeigt) ein konstantes Niveau beibehält.

Bei der Konzentrations-abhängigen Stimulation mit Arginin wurden in Ham's F12 für den SI und die TTP keine Unterschiede ermittelt. Möglich ist, dass hier durch das Zusammenreffen von zwei Stimuli (Glukose im Grundmedium und Arginin im Stimulationsmedium) die Grenzen der Stimulierbarkeit (SI) *a priori* überschritten waren. (Andererseits müsste dann, wie oben geschildert, bei noch höheren Konzentrationen ein SI-Abfall beobachtet werden; dies war nicht der Fall und ist vorläufig nicht zu erklären.) Da jedoch die AUC B<sub>rel</sub> und AUC<sub>gesamt</sub> im Intervall von 5 mM auf 40 mM um über 300% signifikant ansteigen, ist zu folgern, dass die Stimulation ihr Maximum noch nicht erreicht hatte. Aus diesem Versuch wird deutlich, dass zwischen der Stimulierbarkeit der Zellen (ausgedrückt als SI) und der Sekretionsfähigkeit bei Stimulation (ausgedrückt als AUC B) unterschieden werden müssen. Während der SI nur das Ansprechverhalten auf Stimulation bzw. die Aktivierbarkeit widerspiegelt, trifft man mittels AUC B Aussagen über die Sekretionsleistung der Inselzellen. Aus den vorliegenden Daten zur Konzentrations-abhängigen Glukose- und Arginin-Stimulation wird ersichtlich, dass bei Überschreiten der Stimulierbarkeit SI und TTP abfallen, nachdem sie zuvor Konzentrations-abhängig angestiegen waren.

### **5.7. Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Insulinsekretion**

Die Entwicklung eines idealen Kulturmediums für porzine Inseln ist bis heute nicht geglückt. „Goldstandard“ ist bisher Ham's F12, das sich nach Untersuchungen von Holmes et al. für die Kultivierung porziner Inseln am besten eignet [69]. Auch in unseren Versuchen wurde für die Perifusion und Zellkultur modifiziertes Ham's F12 verwandt (vgl. Kapitel 3.6.1). Obgleich Davalli et al. in ihren Untersuchungen vor einer zu hohen Glukosekonzentration in Ham's F12 warnen [95], wurde bisher kein besseres Medium entwickelt. Neben dem Medium mit allen Nahrungsbestandteilen ist die erfolgreiche Kultur der porzinen Inseln von der ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff abhängig. Diese ist besonders wichtig für die erfolgreiche Langzeit-Perifusion. Unklar ist auch, wie sich die Mikroverkapselung auf die Sauerstoffversorgung der Inseln im Inneren der Kapsel auswirkt. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zunächst zu einer Ausschöpfung aller Energiespei-

cher der Zellen. Nach Dionne et al. zeigt sich dies zunächst in einer verminderten *Second Phase* Insulinfreisetzung [95]. In der Folge fällt die basale Insulinsekretion über die Zeit ab. Unsere eigenen Perfusionen mit mikroverkapselten porzinen Inselzellen zeichnen diese Entwicklung exemplarisch nach. Während in unseren Versuchen ein *First Phase Peak* am Tag +3 und Tag +11 vorhanden ist, bleibt der *Second Phase Peak* am Tag +11 weitgehend aus. Der Stimulationsindex erhöht sich unseren Untersuchungen zufolge in dieser Phase, da bei Stimulation am Tag +11 noch ein hoher *First Phase Peak* sezerniert wird, die Basalsekretion aber abgenommen hat. Während der Kulturdauer von 8 Tagen wurde ein kontinuierlicher Anstieg des SI um das 10-fache des Ausgangswertes beobachtet. Im gleichen Zeitraum fiel die Insulinfreisetzung unter Stimulation um mehr als 80% ab. Die Inselzellen waren wesentlich länger in der Lage, unter Stimulation einen *Peak* zu bilden, als eine ausreichende basale Sekretion an Insulin. Der SI ist somit kein Mass für die Funktionsfähigkeit der Inselzellen, er zeigt lediglich ihre Reaktionsfähigkeit. Als Mass für den Abfall der Inselzellfunktion über die Zeit verwenden wir deshalb die Gesamtinsulinausschüttung (%) während der Stimulation, AUC B. Der Abfall der Insulinausschüttung während der Zellkultur folgt mit den von uns verwendeten Inseln und Kulturbedingungen der Funktion (f)  $y = 252,58e^{-0,2916x}$ . Dabei gibt x den Tag nach Isolierung und y den AUC B Gehalt in Prozent vom Ausgangswert am Tag +3 nach Isolation wider. Demgegenüber stieg der SI im Zeitverlauf gemäss der Funktion (f)  $y = 3,7825x^2 + 48,095x - 115,78$  auf der Basis des Wertes am Tag +3 nach Isolation prozentual an (vgl. Kap. 4.7).

Entgegen unseren Ergebnissen belegen Untersuchungen von Gouin et al. auch zwischen dem 7. und 21. Tag nach Isolierung eine unverändert hohe basale Insulinsekretion. Sie verwenden allerdings unverkapselte Inseln von *SPF*-Schweinen. Für die Stimulation wurde 1/40 der isolierten Inseln eines Pankreas verwendet [108]. Genauere Angaben über die verwendete Inselzellzahl unterbleiben. Legt man die Annahme von 100.000 isolierten IEQ pro Spendertier zugrunde, dies sind ausgehend von unseren Ergebnissen sehr konservative Zahlen, entspricht dies bei einem mittleren IEQ von ca. 10, einer Zellzahl von etwa  $1,0 \times 10^6$  Inselzellen (Ergebnisse laut Isolierungsprotokoll). Die basale Sekretionsleistung betrug mit diesen Zellen am 7. Tag  $72,2 \pm 7,6 \mu\text{U/ml}$  bzw. am 21. Tag  $67,7 \pm 10 \mu\text{U/ml}$ . Das Grundmedium enthielt 2,8 mM Glukose, die während der Stimulation auf 8,3 mM angehoben wurde. Vergleicht man die von Gouin et al. [108] beschriebene Insulinsekretion bei Stimulation von 25.000 IEQ mit 8,3 mM Glukose mit unseren Ergebnissen, so sezernieren am Tag +7 bei Gouin etwa 10x mehr Zellen – wir verwendeten nur 2.160 IEQ – lediglich

die 5-fache Insulinmenge. Dieses Niveau wird bei Gouin et al. entgegen unseren Ergebnissen aber über 2 Wochen beibehalten, wobei sich in diesem Zeitraum weder der maximale Peak (184  $\mu\text{U/ml}$ ) noch der SI signifikant verändert. Da Gouin et al. nicht angeben, ob sie die Messungen mit ein und denselben Inselzellen machten, oder andere Inseln kultiviert und nach 21 Tagen das erste Mal perifundiert wurden, ist nicht auszuschließen, dass die Zellen ihre vorhandenen Speicher leerten ohne jedoch neues Insulin nachzubilden. Diese Vermutung wird durch die dortigen Perifusionen unterstrichen, deren Profile an allen Versuchstagen lediglich einen *First Phase Peak*, aber keinen *Second Phase Peak* aufweisen. Die dortigen Profile entsprechen vom ersten Tag an schematisch unserem Perifusionsprofil am Tag +11 und weisen keine *Second Phase Peaks* auf. Die von uns an den Tagen +3, +5, +7 und +11 verwendeten Inseln wurden an jedem Versuchstag erneut perifundiert und mussten somit stets Insulin nachbilden. Gouin et al. machen dazu in ihrer Arbeit keine Angaben.

Es ist zu vermuten, dass Inselzellen ihre vorhandenen Insulinspeicher wesentlich länger entleeren, als neues Insulin nachbilden können. Für zukünftige Untersuchungen muss demzufolge auf Mehrfachperifusionen der gleichen Inseln zurückgegriffen werden. Nur so erhält man ein repräsentatives Bild. Würde dieses Vorgehen die Ergebnisse von Gouin et al. bestätigen, wäre das Ham's F10 Medium (5,5 mM Glukose, 2% Ultrosor®, Penicillin, Streptomycin, Fungizone) dem von uns verwendeten modifizierten Ham's F12 Medium klar überlegen (bei angenommen gleicher Zellqualität). Während Davalli et al. für Ham's F12 überhaupt keine Glukose-induzierte Insulinsekretion zeigten [95], setzte diese bei Bertuzzi et al. erst nach 10 Tagen ein [104]. Unseren Untersuchungen zufolge waren auch am Isolierungstag selbst Glukose-induzierte Sekretionen der Zellen zu messen. Möglich wäre, dass hier andere Faktoren, wie z. B. das Alter des Spendertiers, die Ischämiezeit des Organs, Verdauungsenzyme oder unterschiedliche Isolierungsschritte die Ergebnisse beeinflussen. Duvivier et al. konnten in statischen Langzeit-Perifusionen die Insulinausschüttung von unverkapselten porzinen Inseln über einen Zeitraum von 3 Monaten belegen [103]. Auch aus dieser Arbeit geht nicht klar hervor, ob die Zellen lediglich einmalig oder zu den unterschiedlichen Zeitpunkten mehrfach stimuliert wurden. Verwendet wurden hier Aliquots von 200  $\mu\text{l}$  Inselsuspension. Wie vielen IEQ (150  $\mu\text{m}$  Durchmesser) das genau entspricht, ist ebenfalls nicht ersichtlich. Innerhalb des Beobachtungszeitraums fällt die Sekretionsleistung bei Stimulation auf 1,7% der Ausgangsleistung ab. Nach 3 Monaten werden mit 5,5 mM Glukosestimulation jedoch noch beachtliche 80  $\mu\text{U/ml}$  Insulin gebil-

det. Der SI beträgt dabei  $1,64 \pm 0,4$ . (Die Zahl der beobachteten Aliquots fiel von  $n=10$  in der ersten Woche auf  $n=3$  nach 3 Monaten ab.) Der statische Versuch ermöglicht leider nicht die Darstellung von Sekretionsprofilen. Sekretionsprofile liefern Duvivier et al. nur für mikroverkapselte Inseln im Beobachtungszeitraum von 3 Wochen. Bei einem Glukosegrundgehalt von 2,8 mM in RPMI 1640 (plus 10% NCS) stimuliert er mit 10 mM Glukose und 5,5 mM Theophyllin zeitgleich über 60 Minuten. Warum er von der Monostimulation mit Glukose abweicht, und ob eine Mehrfachperifusion verwandt wurde, bleibt ungeklärt. Ein breiter *First Phase Peak* wird sowohl nach einer Woche ( $279 \pm 28 \mu\text{U/ml}$ ) als auch nach drei Wochen ( $147 \pm 13 \mu\text{U/ml}$ ) erst nach 20 Minuten gemessen. Dieser bildet über einen Zeitraum von 40 Minuten einen Buckel ohne dass ein klarer *Second Phase Peak* erkennbar ist. Der SI bleibt mit 2,2 bzw. 2,1 konstant. Unsere Insulinsekretion lag auf Glukosereiz mit 26,6 mM am Tag +7 nach Isolierung noch bei einem *Peak* von  $300 \mu\text{U/ml}$  und damit vergleichbar hoch. Bis zum Tag +11 fällt unser *Peak* ( $100 \mu\text{U/ml}$ ) allerdings unter die Werte von Duvivier et al. nach drei Wochen ( $147 \pm 13 \mu\text{U/ml}$ ) ab. Abgesehen von der unterschiedlichen Qualität der Inseln wurde für die Kultur modifiziertes Ham's F10 Medium (mit 2% Ultrosor®, 6 mM Glukose, 1 mM Na-Pyruvat, 2  $\mu\text{mol/ml}$  L-Glutamin, 10 g/ml Penicillin-Streptomycin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Tienam, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Fungizon) verwandt. Die Kultur selbst erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Unklar bleibt, ob die gute Funktionsleistung über die Zeit Folge einer Einmal- oder Mehrfach-Perifusion der Inseln ist.

## 6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer neuartig miniaturisierten Mikroperifusionskammer die Zellphysiologie von porzinen Langerhans-Inseln nach Isolierung und Mikroverkapselung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die porzinen Inseln nach Art und Umfang der Reaktion auf körpereigene Mediatoren humanen Inseln entsprechen. Zukünftige Forschungsanstrengungen sollten sich auf diese drei Bereiche konzentrieren: 1. Optimierte Auswahl der Spendertiere, 2. Verbesserung der Kulturbedingungen und Überlebensdauer der Inseln, 3. Erprobung einer multifokalen Insel-Transplantation im Empfänger (d.h. weniger IEQ/Ort ergibt bei gleicher Gesamtzahl eine höhere Insulinsekretion). Neben der Auswahl der besten Schweinerasse, sollten standardisierte Aufzucht- und Haltungsbedingungen die Qualität der Inseln vereinheitlichen. Schwankungen der basalen Insulinsekretion würden dadurch vermieden. Da klinisch keine Wildtypen verwendet werden dürfen, müssen *SPF*-Tiere der qualitativen Standardisierung und Prozesskontrolle unterliegen. Die bei Perfusionen gewonnenen Ergebnisse über die Langzeit-Funktion der Inseln in Kultur sind noch ungenügend. Die Kulturbedingungen müssen kontinuierlich verbessert werden. Der Zusatz von Nikotinamid hat hier bereits zur Optimierung beigetragen. Neue Medien, wie das *Pancreatic Islet Medium* (Fa. hCell Technology Inc., Reno, USA), das in unserem Labor derzeit evaluiert wird, zeigt gegenüber der Kultur in Ham's F12 bereits deutliche Vorteile. Aufgrund der momentanen Situation sollte die Kulturzeitzeit vor Insel-Transplantationen nicht länger als nötig ausfallen. Die Inselqualität muss multifaktoriell beurteilt werden. Die Vitalität als einziges Kriterium vor Transplantation ist unzureichend. Für zukünftige Perifusionsversuche sollte eine aktive Oxygenierung des Kulturmediums angestrebt werden. Dies müsste zur Verbesserung der Langzeit-Ergebnisse beitragen. Regelmässige vergleichende Perfusionen sind zukünftig ein sehr geeignetes Mittel zur Evaluation der Prozessqualität auf dem Weg zur klinischen Anwendung xenogener Insel-Transplantate.

## 7. Zusammenfassung

Die Forschung um die Optimierung der Insel-Transplantation nimmt in der Behandlung des Typ I Diabetes eine Vorreiterstellung ein. Nachdem im Zeitraum von drei Jahrzehnten Fortschritte im Bereich der Insel-Isolierung und Immunosuppression gemacht wurden, stehen wir heute am Beginn des klinischen Einsatzes dieser Technik an ausgewählten Patientengruppen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die umfassende Funktionsdiagnostik isolierter porziner mikroverkapselter Inseln. Mit Hilfe einer miniaturisierten Mikroperifusionskammer wurde der Einfluss des Kulturmediums, der IEQ-Zahl sowie der Mikroverkapselung auf die Insulinsekretion untersucht. Zusätzlich wurde die Insel-Vitalität den Perifusions-Parametern gegenübergestellt. Untersucht wurden zudem die dosisabhängige Stimulierbarkeit der Inseln mit Nährstoffen, Hormonen und Neuromediatoren unter normo- und hyperglykämischen Bedingungen und ihre Aktivierbarkeit bei anhaltender *In-Vitro*-Kultur. Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Die Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien hat gravierende Auswirkungen: Ham's F12 Medium (10 mM Glukose) führt gegenüber KRBB (3 mM Glukose) zu einem Anstieg der basalen Insulinausschüttung um den Faktor 3,3. Dieser Unterschied ist über längere Zeiträume konstant und gleicht sich nicht aus.
- (2) Werden porzine Inseln mit Glukose stimuliert, ist die Insulinsekretion qualitativ und quantitativ mit jener humaner Inseln vergleichbar. Ein *First Phase Peak* erfolgt – unabhängig von der Glukose-Konzentration im Medium – innerhalb von 8 Minuten. Im hyperglykämischen Ham's F12 ist die Stimulierbarkeit der Inseln aufgrund der erhöhten Basalsekretion gegenüber KRBB vermindert.
- (3) Die IEQ-Zahl hat einen signifikanten Einfluss auf die Höhe der Insulinsekretion pro IEQ. Es gibt eine negative Korrelation von IEQ-Zahl und Insulinsekretion: Bei niedriger IEQ-Zahl in der Kammer sezernieren die Inseln pro Zeit bis zu 70x mehr Insulin als bei höheren IEQ-Zahlen. Mit 300 mg/dl Glukosestimulation folgt die zu erwartende Insulinfreisetzung pro Minute und IEQ folgender Funktion (f):  $\text{invers } y = -0,2363 + (215,966/\text{IEQ})$ .
- (4) Die Mikroverkapselung der Inseln hat – im Vergleich mit unverkapselten Inseln – keinen Einfluss auf das Sekretionsprofil bei Stimulation, verändert dieses also nicht. Dies betrifft sowohl die Zeitverzögerung bis zum maximalen Peak (der *Time To Peak*, TTP), den Stimulationsindex (SI) und die Gesamtinsulinsekretion im Stimulationsintervall. Auch bei Verwendung verschiedener Medien wurden keine Unterschiede festgestellt.

(5) Weder die Insulinsekretion während der Stimulation noch die Gesamtinsulinsekretion korrelierten mit der Vitalität. Wir gehen davon aus, dass die Vitalität allein keine Aussagen über die Inselfunktion *in vivo* und *in vitro* zulässt. So ist dringend davon abzuraten, die Transplantat-Qualität allein über die Vitalität zu definieren. Die Mikroperifusion ist gemäss unseren Ergebnissen dafür besser geeignet.

(6) Verkapselte Inseln reagieren im normoglykämischen (KRBB) und hyperglykämischen (Ham's F12) Medium auf Nährstoffe, Hormone und Neuromediatoren. Während stoffspezifische Sekretionsprofile nicht erkennbar waren, gab es deutliche Unterschiede in Bezug auf den Stimulationsindex und die Zeit bis zum Sekretionsmaximum TTP. Der  $\alpha$ 2-Agonist Clonidin führte unter Hyperglykämie zu einem Einbruch der Insulinsekretion während der Stimulationsphase. Mit Tolbutamid wurde die SUR1 Komponente der Inseln angesprochen, mit Blockierung des auswärtsgerichteten K-Kanals und gesteigerter Insulinsekretion.

(7) Inseln reagieren bei Normo- und Hyperglykämie mit dosisabhängiger Steigerung der Insulinsekretion auf Glukose und Arginin. Dabei kommt es zu einem Anstieg des Stimulationsindex SI und der *Time To Peak* (TTP). Die maximale Sekretion wird bei Normoglykämie (54 mg/dl Glukose) mit Arginin im Intervall zwischen 20 mM und 40 mM erreicht. Für die Glukosestimulation der Inseln lässt sich das Plateau zwischen 26,6 mM und 43,3 mM eingrenzen. Bei Überschreiten des maximalen Stimulus fallen die Gesamtinsulinsekretion, SI und TTP ab.

(8) Die bisherige Kultur der porzinen Langerhans-Inseln ist bei einem Abfall der Sekretionsleistung um 90% innerhalb von 11 Tagen suboptimal. Bei alternden Inseln ist der Stimulationsindex mit der Vitalität negativ korreliert. Die basale Insulinsekretion nimmt über die Zeit ab. Die *Second Phase* der Insulin-Neuproduktion flacht zunächst ab bevor die ganz verschwindet. Die hiesigen Messungen basieren auf Mehrfachperifusionen der gleichen Inseln und stellen deren Funktion sehr genau dar. Damit sind Literaturberichte kritisch zu sehen, die sehr viel bessere Ergebnisse mit einmaligen Perifusionen zu verschiedenen Zeiten erhielten.

Die hiesigen Ergebnisse tragen insbesondere zum besseren Verständnis der Insel-Physiologie bei. Der Erkenntnisgewinn zu jenen Einflussfaktoren, die Inselfunktion und Insulinsekretion steuern, sollte eine Optimierung der Insel-Transplantation ermöglichen. Weitere Forschung ist besonders zur Kultur der porzinen  $\beta$ -Zellen nötig. Augenmerk gilt besonders auch der multilokalen Transplantation kleinerer Inselmengen; und Spenderschweinen von einheitlicher Qualität mit gleich bleibend guter Insel-Physiologie als Voraussetzung für den späteren Transplantationserfolg.

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 B. Meyer. Hoffnung der Diabetiker, Opfer der Tuberkulose. Berlinische Monatsschrift **6**: 56-60, 1997.
- 2 D. W. R. Gray, P. J. Morris. The use of flouorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. Stain Technol. **62**: 373-381, 1987.
- 3 A. Heiser. Reindarstellung der Langerhans-Inseln aus dem Pankreas von Schweinen und ihre immunbiologische Charakterisierung. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 1994.
- 4 A. Kerscher, S. Schlosser, V. Moskalenko, K. Ulrichs. A new miniaturized perfusion system to test the functional dynamics of endocrine cells and tissues. Cytotherapy **6**: 274, 2004.
- 5 G. Williams, J. C. Pickup. Handbook of Diabetes. 2<sup>nd</sup> Edition, Blackwell Science, p. 2-21, 1999.
- 6 A. Horaguchi, R. C. Merrell. Preparation of viable islet cells from dogs by a new method. Diabetes **30**: 455-458, 1981.
- 7 I. M. Burr, L. Balant, W. Stauffacher, A. E. Renold. Perifusion of rat pancreatic tissue *in vitro*: Substrate modification of theophylline-induced biphasic insulin release. J. Clin. Invest. **49**: 2097-2105, 1970.
- 8 L.-A. Idahl. A microperfusion device for pancreatic islets allowing concomitant recordings of intermediate metabolites and insulin release. Anal. Biochem. **50**: 386-398, 1972.
- 9 P. E. Lacy, M. M. Walker, C. J. Finke. Perifusion of isolated rat islets *in vitro*. Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. Diabetes **21**: 987-998, 1972.
- 10 F. Dotta, G. S. Eisenbarth. Immunopathogenesis of type 1 diabetes in western society. International Textbook of Diabetes Melitus, John Wiley & Sons, Chichester, New York, 2<sup>nd</sup> Edition, Volume 1, p. 97-107, 1997.
- 11 D. J. R. Porte. Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes melitus and its complications. Diabetes Metab. Res. Rev. **17**: 181-188, 2001.
- 12 J. F. Bach. Insulin dependent diabetes melitus as an autoimmune disease. Endocr. Rev. **15**: 516-542, 1994.

- 13 R. Lendrum, G. Walker, D. R. Gamble. Islet cell antibodies in juvenile diabetes melitus of recent onset. *Lancet* **1**: 880-882, 1975.
- 14 G. Schernthaner, J. E. Banatvala, W. Scherbaum, J. Bryant, M. Borkenstein, E. Schober, W. R. Mayr. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses, complement fixing islet-cell antibodies, HLA DR antigens, and C-peptide secretion in insulin dependent diabetes melitus. *Lancet* **2**: 630-632, 1985.
- 15 C. Y. Pak, H. M. Eun, R. G. McArthur, J. W. Yoon. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* **2**: 1-4, 1988.
- 16 R. A. De Fronzo, R. C. Bonnadonna, E. Ferrannini. Pathogenesis of NIDDM. *Diabetes Care* **15**: 318-368, 1992.
- 17 H. Gin, V. Rigalleau. Post-prandial hyperglycemia and diabetes. *Diabetes Metab.* **26**: 265-272, 2000.
- 18 A. J. Garber. The importance of early insulin secretion and its impact on glycaemic regulation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24**: 32-37, 2000.
- 19 S. Del Prato, A. Tiengo. The importance of first-phase insulin secretion: Implications for the therapy. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **17**: 164-174, 2001.
- 20 R. Varela-Calvino, G. Scarbi, S. Arif, M. Peakman. T-cell reactivity to the p2c non-structural protein of a diabetogenic strain of coxsackieviruses B4. *Virology* **274**: 56-64, 2000.
- 21 P. Pozzilli. Prevention of insulin-dependent diabetes melitus 1998. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **14**: 69-84, 1998.
- 22 H. Lestradet, L. Papoz, C. Hellouin de Menibus, F. Levavasseur, J. Besse, L. Billaud, F. Battistelli, P. Tric, F Lestradet. Long term study of mortality and vascular complications in juvenile-onset (type I) diabetes. *Diabetes* **30**: 175-179, 1981.
- 23 J. E. Tooke. Microvascular function in human diabetes. A physiological perspective. *Diabetes* **44**: 721-726, 1995.
- 24 M. D. Davies. Diabetic retinopathy, diabetes control and blood pressure. *Transplant. Proc.* **18**: 1565-1588, 1986.
- 25 C. E. Morgensen, M. W. Steffes, T. Deckert, J. Sandahl-Christiansen. Functional and morphological renal manifestations in diabetes mellitus. *Diabetologia* **21**: 89-93, 1981.
- 26 B. F. Clarke, D. J. Ewing, I. W. Campbell. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetologia* **17**: 195-212, 1979.
- 27 T. Deckert, J. E. Poulsen. Diabetic neuropathy: Fault or destiny? *Diabetologia* **21**: 178-183, 1981.

- 28 J. Seufert, G. P ath. Zelltherapeutische Strategien f ur die Behandlung des Diabetes mellitus Typ 1. Dt.  rzteblatt **23**: A 1604–1611, 2003.
- 29 M. Brownlew, A. Cerami, H. Vlassara. Advanced glycolisation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N. Engl. J. Med. **318**: 1315-1321, 1988.
- 30 G. Tyden, J. Bolmder. G. Solders, C. Brattstrom. A. Tibell, C. Groth. Improved survival in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and end-stage diabetic nephropathy 10 years after combined pancreas and kidney transplantation. Transplantation **67**: 645-648, 1999.
- 31 K. F. Federlin, H. Jahr, R. G. Bretzel. Islet transplantation as treatment of type 1 diabetes: from experimental beginnings to clinical application. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes **109**: 373-383, 2001.
- 32 N. Cretin, L. Buhler, B. Fournier, A. Caulfield, J. Oberholzer, G. Mentha, P. Morel. Human islet allotransplantation: world experience and current status. Dig. Surg. **15**: 656-662, 1998.
- 33 R. J. Stratta. Optimal immunosuppression in pancreas transplantation. Transplant. Proc. **31**: 619–621, 1999.
- 34 R. Langraf. Impact of pancreas transplantation on diabetic secondary complications and quality of life. Diabetologia **39**: 1415-1424, 1996.
- 35 K. F. Federlin, R. G. Bretzel, B. J. Hering. Islet transplantation: clinical and experimental. Horm. Metab. Res. *Suppl.* **26**: 148-51, 1992.
- 36 J. Meliert, B. J. Hering, X. Liu, D. Brandhorst. H. Brandhorst, M. Brendel, E. Ernst, D. Gramberg, R. G. Bretzel, U. T. Hopt. Successful islet auto- and allotransplantation in diabetic pigs. Transplantation **66**: 200-204, 1998.
- 37 C. T. Spadella, S. A. Schellim. C. E. Bacchi. Pancreas transplantation versus islet transplantation versus insulin therapy in the prevention of nephropathy in alloxan-induced diabetic rats. Transplant. Proc. **30**: 327-329, 1998.
- 38 M. Kedinger, K. Haffen. J. Grenier, R. Eloy. *In vitro* culture reduced immunogenicity of pancreatic endocrine islets. Nature **270**: 736-738, 1977.
- 39 P. E. Lacy, J. M. Davie, E. H. Finke. Prolongation of islet allograft survival following *in vitro* culture (24 C) and a single injection of ALS. Science **204**: 312-313, 1979.

- 40 R. P. Lanza, D. H. Butler, K. M. Borland, J. E. Stanik, D. L. Faustman, B. A. Solomon, T. E. Müller, R. G. Rupp, T. Maki, A. P. Monaco. Xenotransplantation of canine, bovine, and porcine islets in diabetic rats without immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 11100-11104, 1991.
- 41 R. P. Lanza, W. M. Kühtreiber, D. Ecker, J. E. Stanik, W. L. Chick. Xenotransplantation of porcine and bovine islets without immunosuppression using uncoated alginate microspheres. *Transplantation* **59**: 1377-1384, 1995.
- 42 Y. L. Sun, X. Ma, D. Zhou, I. Vacek, A. M. Sun. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J. Clin. Invest.* **98**: 1417-1422, 1996.
- 43 L. Chailous, S. Darquy, S. Maugeudre, A. S. Rivereau, G. Reach, P. Sai. Xenografts of porcine islets immunoprotected in hollow fibres reduce the incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* **39**: 523-529, 1996.
- 44 K. Jain, S. Asina, H. Yang, E. D. Blount, B. H. Smith, C. H. Diehl, A. L. Rubin. Glucose control and long-term survival in biobreeding/Worcester rats after intraperitoneal implantation of hydrophilic macrobeads containing porcine islets without immunosuppression. *Transplantation* **68**: 1693-1700, 1999.
- 45 J. F. Begemann, J. M. Pollok, P. M. Kaufmann, D. Kluth, C. E. Broelsch, X. Rogiers. *In vitro* demonstration of survival and secretory function of islets of Langerhans encapsulated with a membrane of tissue-engineered chondrocytes for immunoisolation. *Transplant. Proc.* **31**: 3250-3252, 1999.
- 46 R. P. Lanza, R. Jackson, A. Sullivan, J. Ringeling, C. McGrath, W. Kühtreiber, W. L. Chick. Xenotransplantation of cells using biodegradable microcapsules. *Transplantation* **67**: 1105-1111, 1999.
- 47 A. M. Shapiro, J. R. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbitt, E. Toth, G. L. Warnock, N. M. Kneteman, R. V. Rajotte. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* **343**: 230-238, 2000.
- 48 A. M. Shapiro, E. A. Ryan, J. R. Lakey. Islet cell transplantation. *Lancet* **358** (Suppl): 21, 2001.
- 49 E. A. Ryan, J. R. T. Lakey, R. V. Rajotte, G. S. Korbut, T. Kin, S. Imes, A. Rabonovitch, J. F. Elliot, D. Bigam, N. M. Kneteman, G. L. Warnock, I. Larsen, A. M. J. Shapiro. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* **50**: 710-719, 2001.

- 50 C. Ricordi, C. Socci, A. M. Davalli, C. Staudacher, P. Baro, A. Vertova, I. Sassi, F. Gavazzi, G. Pozza, V. Di Carlo. Isolation of the elusive pig islet. *Surgery* **107**: 688-694, 1990.
- 51 C. Ricordi, C. Socci, A. M. Davalli, C. Staudacher, A. Vertova, P. Baro, I. Sassi, S. Braghi, N. Guizzi, G. Pozza. Application of the automated method to islet isolation in swine. *Transplant. Proc.* **22**: 784-785, 1990.
- 52 C. Ricordi, C. Rastellini. Automated method for pancreatic islet separation. In: C. Ricordi (Ed). *Methods in Cell Transplantation*. R. G. Landes Company, Austin (USA); p. 433-438, 1995.
- 53 F. Pattou, J. Kerr-Conte, C. Hoher, M. C. Vantyghem, J. Petit, J. Lefebvre, C. Proye. Mass isolation of human islets of Langerhans favored by the prior development of a semiautomatic technique in the pig model. *Transplant. Proc.* **27**: 1751-1752, 1995.
- 54 P. R. Johnson, S. A. White, N. J. London. Collagenase and human islet isolation. *Cell Transplant.* **5**: 437-452, 1996.
- 55 D. Brandhorst, H. Brandhorst, M. Brendel, R. G. Bretzel. Problems of islet isolation from the human and porcine pancreas for islet transplantation into men. *Zentralbl. Chir.* **123**: 814-822, 1998.
- 56 D. Brandhorst, H. Brandhorst, B. J. Hering, K. Federlin, R. G. Bretzel. Islet isolation from the pancreas of large mammals and humans: 10 years of experience. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* **103**: 3-14, 1995.
- 57 R. Calafiore, F. Calcinaro, G. Basta, M. Pietropaolo, A. Falomi, M. Piermattei, P. Brunetti. A method for the massive separation of highly purified, adult porcine islets of Langerhans. *Metabolism* **39**: 175-181, 1990.
- 58 P. Marchetti, E. H. Finke, A. Gerasimidi-Vazeou, L. Falqui, D. W. Scharp, P. E. Lacy. Automated large-scale isolation, *in vitro* function and xenotransplantation of porcine islets of Langerhans. *Transplantation* **52**: 209-213, 1991.
- 59 E. Finke, P. Marchetti, L. Falqui, C. Swanson, M. McLearn, B. Olack, D. Scharp, P. Lacy. Large scale isolation, function, and transplantation of islets of Langerhans from the adult pig pancreas. *Transplant. Proc.* **23**: 772-773, 1991.
- 60 T. Yamaguchi, Y. Mullen, Y. Watanabe, Y. Noniura, D. Cass, C. Brunnicardi. Isolation and function of islets from young adult pig pancreas. *Transplant. Proc.* **24**: 1010-1012, 1992.

- 61 P. Toomey, D. R. Chadwick, H. Contractor, P. R. Bell, R. F. James, N. J. London. Porcine islet isolation: prospective comparison of automated and manual methods of pancreatic collagenase digestion. *Br. J. Surg.* **80**: 240-243, 1993.
- 62 P. Marchetti, R. Giannarelli, G. Villani, M. Andreozzi, L. Cruschelli, S. Cosimi, P. Viacava, A. di Carlo, R. Navalesi, G. Bevilacqua. Collagenase distension, two-step sequential filtration, and histopaque gradient purification for consistent isolation of pure pancreatic islets from the market-age (6-month-old) pig. *Transplantation* **57**: 1532-1535, 1994.
- 63 R. Giannarelli, P. Marchetti, G. Villani, A. di Carlo, S. Cosimi, M. Andreozzi, L. Cruschelli, P. Masiello, A. Coppelli, R. Navalesi. Preparation of pure, viable porcine and bovine islets by a simple method. *Transplant. Proc.* **26**: 630-631, 1994.
- 64 G. Vilani, P. Marchetti, R. Giannarelli, L. Cruschelli, M. Andreozzi, S. Cosimi, R. Navalesi. Comparison of different digestion techniques and density gradient purification procedures to prepare viable pancreatic islets from market age pigs. *Transplant. Proc.* **26**: 621-622, 1994.
- 65 L. Bühler, S. Deng, R. Mage, C. Bubloz, A. Rohner, P. Morel. Pig islet isolation: new aspects. *Transplant. Proc.* **26**: 628-629, 1994.
- 66 P. Prevost, E. Rolland, C. Veriot, C. Collier, E. Muscat. Large-scale isolation of porcine pancreatic islets: significant improvement of the process. *Transplant. Proc.* **27**: 3396-3398, 1995.
- 67 M. Miyamoto, K. Inoue, Y. Gu, T. Tun, W. Cui, I. Fujiwara, H. Ohyanagi, H. Hayashi, T. Yamazaki, H. Setoyama, Y. Kawakami, J. Ida, M. Kogire, M. Imamura, H. Iwata, Y. Ikada. Improved large-scale isolation of breeder porcine islets: possibility of harvesting from nonheart-beating donor. *Cell Transplant.* **7**: 397-402, 1998.
- 68 W. Cui, Y. Gu, M. Miyamoto, M. Tanaka, B. Xu, M. Imamura, H. Iwata, Y. Ikada, K. Inoue. Novel method for isolation of adult porcine pancreatic islets with two-stage digestion procedure. *Cell Transplant.* **8**: 391-398, 1999.
- 69 M. A. Holmes, H. A. Clayton, D. R. Chadwick, P. R. Bell, N. J. London, R. F. James. Functional studies of rat, porcine, and human pancreatic islets cultured in ten commercially available media. *Transplantation* **60**: 854-860, 1995.
- 70 A. M. Davalli, F. Bertuzzi, C. Socci, L. Scaglia, F. Gavazzi, M. Freschi, V. DiCarlo, A. E. Pontiroli, G. Pozza. Paradoxical release of insulin by adult pig islets in vitro. Recovery after culture in a defined tissue culture medium. *Transplantation* **56**: 148-154, 1993.

- 71 P. Marchetti, D. W. Scharp, K. Pfiffner, C. J. Swanson, E. H. Finke, B. J. Olack, A. Gerasimidi-Vazeou, M. McLearn, P. E. Lacy. Cryogenic storage of isolated, purified porcine pancreatic islets. *Transplantation* **57**: 340-346, 1994.
- 72 S. Deng, L. Bühler, E. Anderegg, R. Mage, D. Janjic, C. B. Wollheim, A. Rohner, P. Morel. Islet isolation from slaughterhouse pig pancreata: evidence of in vitro and in vivo function. *Transplant. Proc.* **26**: 3396-3398, 1994.
- 73 S. Moskalewski. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comp. Endocr.* **5**: 342-353, 1965.
- 74 W. Kühnel. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 9. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1995.
- 75 P. Meda. Intercellular communication and insulin secretion. In G. R. Zahnd, C. B. Wollheim. *Contributions of physiology to the understanding of diabetes*. Springer-Verlag, Berlin: 24-42, 1997.
- 76 H. P. T. Ammon. Wege der Nachrichtenübermittlung bei der Stimulation der Sekretion von Insulin. *Diab. Stoffw.* **4**: 311-320, 1995.
- 77 Z. A. Latif, J. Noel, R. Alejandro. A simple method of staining fresh and cultured islets. *Transplantation* **45**: 827-830, 1988.
- 78 P. Grohn, G. Klock, J. Schmitt, U. Zimmermann, A. Horcher, R. G. Bretzel, B. J. Hering, D. Brandhorst, H. Brandhorst, T. Zekorn. Large-scale production of Ba(2+)-alginate-coated islets of Langerhans for immunoisolation. *Exp. Clin. Endocrinol.* **102**: 380-387, 1994.
- 79 R. B. Elliott, L. Escobar, P. L. Tan, M. Muzina, S. Zwain, C. Buchanan. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation* **14**:157-61, 2007.
- 80 M. Krickhahn, T. Meyer, C. Buehler, A. Thiede, K. Ulrichs. Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation: numbers, purity, yield and in vitro function. *Ann. Transplant.* **6**: 48-54, 2001.
- 81 M. Krickhahn, C. Buehler, T. Meyer, A. Thiede, K. Ulrichs. The morphology of islets within the porcine donor pancreas determines the isolation result: successful isolation of pancreatic islets can now be achieved from young market pigs. *Cell Transplant.* **11**: 827-38, 2002.

- 82 W. Heineine W, A. Tibell, W. M. Switzer, P. Sandstrom, G. V. Rosales, A. Mathews, O. Korsgren, L. E. Chapman, T. M. Folks, C. G. Groth. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* **352**: 695-699, 1998.
- 83 K. Paradis, G. Langford, Z. Long, W. Heneine, P. Sandstrom, W. M. Switzer, L. E. Chapman, C. Lockey, D. Onions, E. Otto. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* **285**: 1236-1241, 1999.
- 84 C. Patience, Y. Takeuchi, R. A. Weiss. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* **3**: 282-286, 1997.
- 85 J. P. Stoye, P. Le Tissier, Y. Takeuchi, C. Patience, R. A. Weiss. Endogenous retroviruses: a potential problem for xenotransplantation? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **862**: 67-74, 1998.
- 86 L. J. van der Laan, C. Lockey, B. C. Griffeth, F. S. Frasier, C. A. Wilson, D. E. Onions, B. J. Hering, Z. Long, E. Otto, B. E. Torbett, D. R. Salomon. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* **407**: 90-94, 2000.
- 87 Y. M. Deng, B. E. Tuch, W. D. Rawlinson. Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation* **70**: 1010-1016, 2000.
- 88 B. W. McKane, S. Ramachandran, X. C. Xu, B. J. Olack, W. C. Chapman, T. Mohanakumar T. Natural antibodies prevent in vivo transmission of porcine islet-derived endogenous retrovirus to human cells. *Cell Transplant.* **13**: 137-143, 2004.
- 89 U. Martin, S. J. Tacke, A. R. Simon, C. Schroder, K. Wiebe, B. Lapin, A. Haverich, J. Denner, G. Steinhoff. Absence of PERV specific humoral immune response in baboons after transplantation of porcine cells or organs. *Transplant. Int* **15**: 361-8, 2002.
- 90 R. B. Elliott, L. Escobar, O. Garkavenko, M. C. Croxson, B. A. Schroeder, M. McGregor, G. Ferguson, N. Beckman, S. Ferguson. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell Transplant.* **9**: 895-901, 2000.
- 91 K. Edamura, K. Nasu, Y. Iwami, R. Nishimura, H. Ogawa, N. Sasaki, H. Ohgawara. Prevalence of porcine endogenous retrovirus in domestic pigs in Japan and its potential infection in dogs xenotransplanted with porcine pancreatic islet cells. *J. Vet. Med. Sci.* **66**: 129-135, 2004.

- 92 L. R. Bisset, J. Boni, H. Lutz, J. Schupbach. Lack of evidence for PERV expression after apoptosis-mediated horizontal gene transfer between porcine and human cells *Xenotransplantation* **14**: 13-24, 2007.
- 93 M. Goto, A. Maeda, L. Elfman, K. M. Suling, J. C. Wood, C. Patience, C. G. Groth, L. Wennberg. No transmission of porcine endogenous retrovirus after transplantation of adult porcine islets into diabetic nude mice and immunosuppressed rats. *Xenotransplantation* **11**: 340-346, 2004.
- 94 N. Trivedi., J. Hollister-Lock, M. D. Lopez-Avalos, J. J. O'Neil, M. Keegan, S. Bonner-Weir, G. C. Weir. Increase in beta-cell mass in transplanted porcine neonatal pancreatic clusters is due to cell proliferation of beta-cells and differentiation of duct cells. *Endocrinology* **142**: 2115-2122, 2001.
- 95 N. J. M. London, S. M. Swift, H. A. Clayton. Isolation, culture and functional evaluation of islets of Langerhans. *Diab. Metab.* **24**: 200-207, 1998.
- 96 M G. Evans, R. V. Rajotte, G. L. Warnock, N. M. Kneteman. Viability studies on cryopreserved isolated canine islets of Langerhans. *Transplant. Proc.* **21**: 3368-3370, 1989.
- 97 C. Socci, A. M. Davalli, A. Vignali, F. Bertuzzi, P. Maffi, O. Zammarchi, V. Di Carlo, G. Pozza. Evidence of in vivo human islet graft function despite a weak response to in vitro perfusion. *Transplant. Proc.* **24**: 3056-3057, 1992.
- 98 M. P. de Graaff, G. H. Wolters, R. van Schilfhaarde. Endothelial cells in pancreatic islets and the effect of culture. *Transplant. Proc.* **26**: 1171, 1994.
- 99 J. C. Escolar, R. Hoo-Paris, C. Caste, B. C. Sutter. Effect of low temperature on glucose-induced insulin secretion and glucose metabolism in isolated pancreatic islets of the rat. *J. Endocrinol.* **125**: 45-51, 1990.
- 100 D. Brandhorst, H. Brandhorst, B. J. Hering, R. G. Bretzel. Long term survival, morphology and in vitro function of isolated pig islets under different culture conditions. *Transplantation* **67**: 1533-1541, 1997.
- 101 F. Bertuzzi, C. Garancini, C. Socci, R. Nano, M. V. Taglietti, M. Santopinto, V. Di Carlo, A. M. Davalli. Lessons from in vitro perfusion of pancreatic islets isolated from 80 human pancreases. *Cell Transplant.* **8**: 709-712, 1999.
- 102 C. Garavena, P. C. Mathias, S. J. H. Ashcrof. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *J. Endocrinol.* **173**: 73-80, 2002.

- 103 V. Duvivier, S. Darquy, C. Rouault, E. Gouin, J. Honiger, P. Sai, G. Reach. Long-term culture of free or encapsulated islets isolated from specific pathogen-free (SPF) pigs. *Diab. Metab.* **24**: 517-522, 1998.
- 104 F. Bertuzzi, D. Zacchetti, C. Berra, G. Socci, A. E. Pontiorlio, F. Grohovaz. Intercellular  $Ca^{2+}$  waves sustain coordinate insulin secretion in pig islets of Langerhans. *FEBS Letters* **379**: 21-25, 1996.
- 105 E. Brandhorst, D. Brandhorst, D. Lau, B. J. Hering, K. Federlin, R. G. Bretzel. Glucose sensitivity of porcine and human islets in vitro. *J. Mol. Med.* **77**: 90-92, 1999.
- 106 R. Nesher, E. Cerasi. Modeling phasic insulin release. *Diabetes* **51**: 53-58, 2002.
- 107 E. Cerasi, R. Nesher. Assessment of insulin secretion dynamics. In W. L. Clarke, J. Larner, S. L. Pohl. *Methods in Diabetes Research*. John Wiley&Sons, New York: p. 77-90, 1986.
- 108 E. Gouin, A. S. Rivereau, V. Duvivier, S. Darquy, E. Larher, S. You, A. Jestin, G. Reach, P. Sai. Perifusion analysis of insulin secretion from specific pathogen-free large-white pig islets shows satisfactory functional characteristics for xenografts in humans. *Diab. Metab.* **24**: 208-14, 1998.
- 109 P. Marchetti, D. W. Scharp, M. Mclear, R. Gingerich, E. Finke, B. Olack, C. Swanson, R. Giannarelli, R. Navalesi, P. E. Lacy. Pulsatile insulin secretion from isolated human pancreatic islets. *Diabetes* **43**: 827-30, 1994.
- 110 M. Mc Lear, P. Marchetti, E. Finke, A. Gerasimidi-Vazeou, D. W. Scharp, P. E. Lacy. Porcine islet function: effects of arginin, leucin and butyrat. *Transplant. Proc.* **24**: 980-982, 1992.
- 111 C. G. Groth, A. Tibell, L. Wennberg, O. Korsgren. Xenoislet transplantation: experimental and clinical aspects. *J. Mol. Med.* **77**: 153-154, 1999.
- 112 B. Hering, M. Brendel, A. Schultz, B. Schultz, R. Bretzel. *International Islet Transplant Registry Newsletter* **8**. Giessen, Germany, Justus-Liebig University of Giessen, 1999.
- 113 Y. Palti, G. B. David, E. Lachov, Y. H. Mida, R. Schatzberger. Islets of Langerhans generate wavelike electric activity modulated by glucose concentration. *Diabetes* **45**: 595-601, 1996.
- 114 D. G. Pipeleers. Heterogeneity in pancreatic beta-cell population. *Diabetes* **41**: 777-781, 1992.
- 115 D. Pipeleers, R. Kiekens, Z. Ling, A. Wilikens, F. Schuit. Physiologic relevance of heterogeneity in the pancreatic beta-cell population. *Diabetologia* **37**: S57-S64, 1994.

- 116 F. Pfeffer, M. Nauck, A. Reinert, S. Benz, W. Schareck, U. T. Hopt. Influence of the extrinsic nervous system on exocrine pancreatic secretion in the human. *Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd.* **115**: 437-42, 1998.
- 117 H. Gregersen, S. L. Jensen, B. Ahren. An alpha 1-adrenoceptor-sensitive mechanism is responsible for the adrenergic inhibition of insulin secretion in the pig pancreas. *Eur. J. Pharmacol* **200**: 365-367, 1991.
- 118 B. Mukherjee, A. K. Chatterjee, G. S. Bhatia, S. K. Mukherjee. Effect of epinephrine and norepinephrine on immuno-reactive insulin secretion from isolated islets of Langerhans. *Biochem. Pharmacol.* **34**: 985-987, 1985.
- 119 R. J. Lacey, H. C. Cable, R. F. James, N. J. London, J. H. Scarpello, N. G. Morgan. Concentration-dependent effects of adrenaline on the profile of insulin secretion from isolated human islets of Langerhans. *J. Endocrinol.* **138**: 555-563, 1993.
- 120 E. Mutschler, G. Geisslinger, K. Kroemer, M. Schäfer-Korting. Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 8. Auflage: 402-405, 2001.*
- 121 E. Mutschler, G. Geisslinger, K. Kroemer, M. Schäfer-Korting. Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 8. Auflage: 401f u. 415, 2001.*
- 122 A. M. Davalli, Y. Ogawa, L. Scaglia, Y. J. Wu, J. Hollister, S. Bonner-Weir, G. C. Weir. Function, mass, and replication of porcine and rat islets transplanted into diabetic nude mice. *Diabetes* **44**: 104-111, 1995.
- 123 L. Wennberg, Z. Song, W. Bennet, J. Zhang, S. Nava, B. Sundberg, S. Bari, C. G. Groth, O. Korsgren. Diabetic rats transplanted with adult porcine islets and immunosuppressed with cyclosporine A, mycophenolate mofetil, and leflunomide remain normoglycemic for up to 100 days. *Transplantation* **71**: 1024-1033, 2001.
- 124 D. A. MacKenzie, D. A. Hullett, H. W. Sollinger. Xenogeneic Transplantation of porcine islets: An overview. *Transplantation* **76**: 887-891, 2003.
- 125 E. Mutschler, G. Geisslinger, K. Kroemer, M. Schäfer-Korting. Mutschler Arzneimittelwirkungen. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 8. Auflage: 367ff, 399ff, 2001.*
- 126 N. Kaiser, M. Yuli, G. Ückaya, A. Opreescu, M. F. Barthault, C. Kargar, E. Donath, E. Cerasi, A. Ktorza. Dynamic changes in  $\beta$ -cell mass and pancreatic insulin during the evolution of nutrition-dependent diabetes in *psammomys obesus*. *Diabetes* **54**: 138-145, 2005.

127 T. Bock, B. Pakkenberg, K. Buschard. Genetic Background determines the size and structure of the endocrine pancreas. *Diabetes* **54**: 133-137, 2005.