

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

**Etablierung des Modells
„Ratte-anti-Schwein“
zur xenogenen Transplantation
mikroverkapselter Langerhans-Inseln**

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

**vorgelegt von
Susanne Breuer
aus Chemnitz**

Würzburg, November 2004

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

Korreferent: Prof. Dr. med. A. Thiede

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2005

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Fragestellungen	5
3. Material und Methoden	6
3.1. Isolierung von Langerhans-Inseln aus dem porzinen Pankreas.....	6
3.2. Mikroverkapselung von porzinen Langerhans-Inseln.....	6
3.3. Versuchstiere, Haltung.....	7
3.4. Diabetes-Induktion.....	7
3.5. Operationstechniken.....	7
3.6. Postoperative Inspektion der Empfänger.....	10
3.7. Glukose-Toleranztest.....	10
3.8. Organentnahmen.....	10
3.9. Anfertigung histologischer Präparate.....	11
3.9.1. Gefrierschnitte.....	11
3.9.2. Paraffinschnitte.....	11
3.10. Histologische Untersuchungen.....	11
3.10.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	11
3.10.2. Färbung nach Masson Trichrome Goldner.....	12
3.10.3. Immunhistochemische Färbungen.....	12
3.10.4. Immunhistochemische Insulinfärbung.....	13
3.11. Auswertung der histologischen Färbungen.....	14
3.12. Statistische Methoden.....	14
4. Ergebnisse	15
4.1. <i>In-Vitro</i> -Funktion porziner Langerhans-Inseln: Dynamische Insulinfreisetzung nach Glukosestimulation.....	15
4.2. Viabilität der porzinen Langerhans-Inseln nach der Mikroverkapselung.....	15
4.3. Zerstörung von β -Zellen durch Streptozotozin.....	16
4.4. Überlebenszeiten nach Transplantation.....	17
4.5. Oraler Glukose-Toleranztest.....	20
4.6. Organentnahme (Makroskopie, Histologie, Histochemie).....	22
4.6.1. Makroskopische Untersuchungen.....	22
4.6.2. Histologische und histochemische Untersuchungen.....	25
4.7. Implantation von Leerkapseln.....	29

5. Diskussion.....	31
5.1. Porzine Langerhans-Inseln in der Therapie des Diabetes mellitus.....	31
5.2. Alternativen in der Therapie des Diabetes mellitus.....	31
5.3. Mikroverkapselung porziner Langerhans-Inseln.....	32
5.4. Schwierigkeiten bei der Isolierung porziner Langerhans-Inseln.....	33
5.5. Verbesserung der Transplantationsergebnisse.....	33
5.6. Mögliche Ursachen des Transplantatversagens.....	35
5.7. Langzeitfunktion nach Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln.....	37
5.8. Ausblick.....	38
6. Zusammenfassung.....	39
7. Literaturverzeichnis.....	42
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungen

BSA	<i>bovine serum albumin</i>
DAB	3,3-Diaminobenzidin
FDA/PI	Fluoreszein-Diacetat/Propidiumjodid
GIP	Gastrointestinales Peptid
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
ICA	<i>islet cell antibodies</i>
ICSA	<i>islet cell surface antibodies</i>
IDDM	<i>insulin dependent diabetes mellitus</i>
IEQ	Inseläquivalent (Insel mit einem mittleren Durchmesser von 150µm)
Ig	Immunglobulin
KD	Kilo Dalton
min	Minuten
NIDDM	<i>non insulin dependent diabetes mellitus</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PERV	Porzine endogene Retroviren
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
STZ	Streptozotozin (Betazell-Zellgift)
TRIS-NaCl	Tris gepufferte Natriumchloridlösung
WU	Wistar Unilever (Rattenstamm)
xITX	xenogene Insel-Transplantation

1. Einleitung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung des Modells „Ratte-anti-Schwein“ zur xenogenen Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln mit dem langfristigen Ziel, den Diabetes mellitus zu therapieren.

Unter dem Begriff Diabetes mellitus versteht man verschiedene Formen der Störung des Glukosestoffwechsels. Sie sind durch eine dauerhafte Erhöhung der Blutzuckerkonzentration aufgrund des Unvermögens des Organismus, zugeführte Kohlenhydrate zeitgerecht zu verwerten, gekennzeichnet. Ursachen sind ein absoluter Insulinmangel (Typ I Diabetes, IDDM = „*insulin dependent diabetes mellitus*“ oder jugendlicher Diabetes) oder relativer Insulinmangel (Typ II Diabetes, NIDDM = „*non insulin dependent diabetes mellitus*“ oder Altersdiabetes).

Neben genetischen Faktoren (HLA-DR, -DP und -DQ Mutationen, Chromosom 6) spielen auch virale und bakterielle Prozesse bei der Manifestation des IDDM eine Rolle [1-5]. Sie führen zu entzündlichen Vorgängen in den β -Zellen, die über Monate bis Jahre verlaufen und zu deren fortschreitender Zerstörung führen. Erst wenn die Anzahl der β -Zellen infolge der Zerstörung durch den Autoimmunprozess um ca. 80% abgenommen hat, macht sich der daraus resultierende Insulinmangel auch klinisch mit Anstieg des Nüchternblutzuckers und der postprandialen Blutzuckerwerte bemerkbar. Ausdruck des immunologischen Geschehens sind nachweisbare Autoantikörper gegen Inselzellen (ICA = „*islet-cell antibodies*“ und ICSA = „*islet-cell surface antibodies*“), gegen das körpereigene Insulin und/oder gegen das 64-kD-Inselzellprotein, die Glutamat-Decarboxylase.

Die Insulintherapie ermöglicht das Überleben von Typ I Diabetikern. Jedoch kann sie das Auftreten von Spätkomplikationen, wie Mikroangiopathie [6-8], Retinopathien [9], Nephropathien [10,11] und Neuropathien [12-14] oft nicht verhindern. Die diabetischen Spätkomplikationen schränken die Lebensqualität vieler Diabetiker zum Teil erheblich ein, und verursachen hohe Kosten für unser Gesundheitssystem. Die beste Prophylaxe diabetischer Spätkomplikationen stellen die strikte Blutzuckerkontrolle und die intensivierete Insulintherapie dar. Jedoch ist zu erwähnen, dass dabei auch die Gefahr von hypoglykämischen Episoden besteht [15].

Theoretisch ergeben sich daher zwei Wege, die Blutzuckerwerte feiner zu regulieren,

1. mittels Transplantation des gesamten vaskularisierten Pankreas und
2. mittels Transplantation isolierter Langerhans-Inseln.

Die Transplantation des gesamten Pankreas ist zur Zeit die Methode der Wahl im Spätstadium des IDDM, vor allem, wenn als Folge des Diabetes ein Nierenversagen zugleich auch eine Nierentransplantation erforderlich macht. Bis 1998 wurden weltweit mehr als 10.000 Pankreastransplantationen mit einer 1-Jahresüberlebensrate von 93% durchgeführt, wobei in 88% der Fälle simultan eine allogene Niere mit transplantiert wurde [16]. Die kombinierte Transplantation von Niere und Pankreas bedingt jedoch eine lebenslange Immunsuppression des Patienten, bestehend aus Cyclosporin A, Azathioprin und Glukokortikoiden.

Eine alternative Transplantationsmethode stellt die freie Verpflanzung isolierter humaner Langerhans-Inseln dar. Die erste erfolgreiche experimentelle Isolierung von Langerhans-Inseln gelang Moskalewski [17] im Jahre 1965. Die humanen Inselzellen werden unter Ultraschallkontrolle überwiegend in die Pfortader infundiert. Von dort gelangen sie mit dem Blutstrom in die Leberkapillaren, wo sie „per diffusionem“ versorgt werden. So können die Inselzellen Signale zur Steuerung der Insulinausschüttung empfangen und Insulin kontrolliert in die Blutbahn abgeben. Die anfänglichen Ergebnisse der allogenen Inselzell-Transplantationen waren jedoch unbefriedigend. Nach 12 Monaten waren nur 8% aller Patienten von exogenem Insulin unabhängig. Ursachen für die unbefriedigenden klinischen Resultate sind vor allem die ausgeprägte Empfindlichkeit des Transplantates gegenüber Abstossungsreaktionen, wofür neben ortsständigen Makrophagen auch pankreasspezifische Allo-Antigene verantwortlich sind [18-20] und das durch den Langzeitdiabetes (Mikroangiopathie) vorgeschädigte Gefässbett.

In den letzten Jahren konnten jedoch grosse Fortschritte in der der Inselzell-Transplantation gemacht werden. Shapiro et al. stellten das „Edmonton-Protokoll“ mit einer Glukokortikoidfreien Immunsuppression vor [21]. Damit konnte bei mehr als 80 % der allogenen transplantierten Patienten eine Insulin-Unabhängigkeit von über einem Jahr erreicht werden. Somit stellt die Transplantation von Langerhans-Inseln heute eine attraktive Alternative zur Pankreastransplantation dar. Das grösste Problem dabei ist jedoch die mangelnde Verfügbarkeit von Spenderorganen, die zu einer gravierenden Einschränkung der medizinisch möglichen Trans-

plantationen führt. So stellte sich die Frage, ob nicht-menschliche Spenderorgane ebenso erfolgreich für die Transplantation von Langerhans-Inseln eingesetzt werden können. Zunächst hatte man die dem Menschen immungenetisch nahestehenden Menschenaffen (Schimpansen) und weitere zu dieser Familie zählende Primaten (Paviane und Rhesusaffen) als Organspender in Betracht gezogen. Gegen Primaten als potentielle Organspender sprechen jedoch: ihr geringes natürliches Vorkommen, hohe Kosten für Züchtung und Haltung, die Gefahr der Übertragung unbekannter Pathogene und wachsende ethische Vorbehalte in der Bevölkerung.

Alternativ zu den Affen wird die Verwendung von Nutztieren (Schwein, Rind, Schaf) als xenogene Organspender weltweit intensiv diskutiert und experimentell geprüft. Neben der Fleischproduktion ist die Organspende eine weitere Nutzform. Unter den drei oben genannten Spezies bietet sich das Schwein besonders an, denn es ist, wie der Mensch, ein Omnivor und ihm physiologisch sehr ähnlich [22]; es ist in ausreichender Anzahl und zu vertretbaren Kosten zu züchten und zu halten; Spenderorgane können in jeder beliebigen Grösse, d.h. für jedes Empfängeralter, bereitgestellt werden, und das Schweineinsulin ist mit dem Humaninsulin bis auf eine Aminosäure an Position 30 der B-Kette (Alanin an Stelle von Threonin) identisch.

Ein nach wie vor bestehendes Problem der Transplantation auch von porcinen Langerhans-Inseln ist die grosse Gefahr der Transplantat-Abstossung. Diese kann mit dem Einsatz von Immunsuppressiva vermindert werden. Sie ist allerdings mit erheblichen Nebenwirkungen für die Patienten verbunden, besonders wenn sie über einen längeren Zeitraum appliziert wird. Darüber hinaus sind viele Immunsuppressiva, z.B. Glukokortikoide und Cyclosporin A diabetogen [23], und somit für die immunsuppressive Therapie nach Inselzell-Transplantationen ungeeignet.

Eine attraktive Lösung dieses Problems ist die Immunisolation von Langerhans-Inseln durch Mikroverkapselung. Das Material der Mikro kapseln erlaubt die Passage von niedermolekularen Stoffen, wie Nährstoffen und Sauerstoff, nicht jedoch von höhermolekularen Stoffen wie Immunglobulinen und Cytokinen. So besteht die Möglichkeit, das Transplantat auch ohne Immunsuppression vor der Abstossung zu schützen.

Eine allgemein übliche Methode der Immunisolation ist die Mikroverkapselung mit Alginate, welche ursprünglich von Lim und Sun [24] beschrieben wurde. Während der letzten Jahre

wurden bedeutende Fortschritte in dieser Technologie gemacht. Erste Heilversuche am Menschen wurden begonnen und zeigten vorübergehendes aber relevantes Überleben nach Alotransplantation von verkapselten Nebenschilddrüsenzellen [25] und Langerhans-Inseln [26]. Ebenso erlaubt die Mikroverkapselung ein verlängertes Überleben von xenotransplantierten Langerhans-Inseln bei induziert- und autoimmundiabetischen Nagetieren [27], Hunden [26] und Affen [28]. Jain et al. benutzten zur Immunisolation adulter porziner Langerhans-Inseln aus Agarose/Kollagen bestehende Makrokapseln im Ratten-Modell [29].

Nachdem es uns in den vergangenen Jahren gelungen ist, die Isolierung porziner Langerhans-Inseln zu optimieren [30], bestand das Hauptziel dieser Arbeit in der Etablierung des experimentellen Transplantationsmodells „*Ratte-anti-Schwein*“, d.h. der xenogenen Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln in diabetische Wistar-Ratten zur Therapie eines chemischen, mittels Streptozotozin (STZ) induzierten Diabetes mellitus.

2. Fragestellungen

1. Reagieren porcine Langerhans-Inseln im *In-Vitro*-Versuch auf Glukosestimulation, und welchen Einfluss haben definierte Bedingungen auf die *In-Vitro*-Kultur? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.1. und 4.2.
2. Eignet sich das Streptozotozin in unserem Modell zur sicheren Diabetes-Induktion? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.3.
3. Führt die Transplantation mikroverkapselter porciner Langerhans-Inseln ohne Immunsuppression zur Normoglykämie und, wenn ja, für welchen Zeitraum? Reagieren erfolgreich transplantierte Wistar Ratten im oralen Glukosetoleranztest mit physiologischer Blutzuckerregulation? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.4. und 4.5.
4. Welche Gründe kommen für ein Transplantatversagen in Frage? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.6.
5. Führt das zur Mikroverkapselung porciner Langerhans-Inseln verwendete Alginat zu einer immunologischen Reaktion im Empfänger, und ist es dadurch mitverantwortlich für das Transplantatversagen? Vergleiche dazu Ergebniskapitel 4.7.

3. Material und Methoden

3.1. Isolierung von Langerhans-Inseln aus dem porzinen Pankreas

Die Isolierung porziner Langerhans-Inseln erfolgte mittels Liberase^{PI} (Roche Diagnostics, Mannheim) nach der modifizierten Methode von C. Ricordi [31] und A. Heiser [32] aus hirntoten Hybridschweinen (Alter: 4-6 Monate bzw. 2-3 Jahre). Die isolierten porzinen Langerhans-Inseln wurden für 24 Stunden in Ham's-F12 Medium (Cell Concepts, Umkirch) und 5% fötalem Kälberserum (Kraeber GmbH & Co, Wedel) bei 24°C und 6% CO₂ im Brutschrank kultiviert, bevor sie mikroverkapselt wurden. Auf eine ausführliche Darstellung der technisch anspruchsvollen Isolierungstechnik wird hier verzichtet; sie findet sich bei Krickhahn et. al. [30] und ist die methodisch-technische Grundlage für diese Arbeit.

3.2. Mikroverkapselung von porzinen Langerhans-Inseln

Die Verkapselung der porzinen Langerhans-Inseln erfolgte nach der Methode von Zekorn et. al. [33] mit hochreinem kommerziellem Barium-Alginat (Pronova Biomedical, Oslo, Norwegen). Die Mikrokapseln enthielten zwischen 5 und 11 vitale intakte und/oder fragmentierte Inseläquivalente (IEQ), bzw. einzelne Inselzellen und hatten einen Hauptdurchmesser von 350-500 µm [Abb. 1].

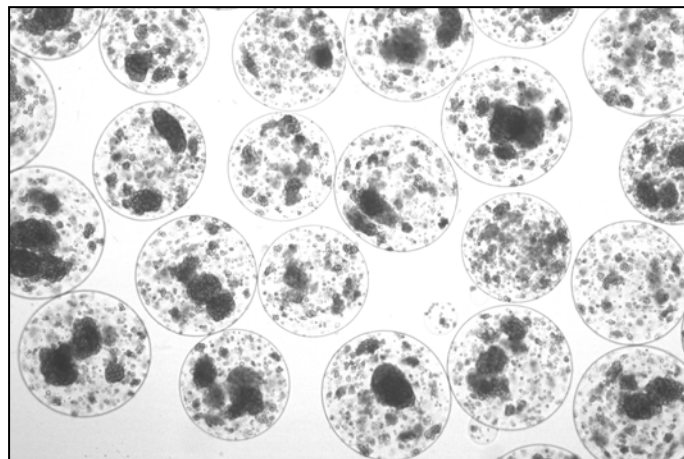


Abb. 1: In Barium-Alginat mikroverkapselte porzine Langerhans-Inseln, Inselfragmente und Einzelzellen; Kapseldurchmesser 350-500µm.

3.3. Versuchstiere, Haltung

Für die Transplantationsexperimente wurden Wistar Unilever (WU) Auszuchttratten (Harlan Winkelmann GmbH, Borchem) verwendet. Die 250-400 g schweren, 8-12 Wochen alten, männlichen Ratten wurden in Lamina-Air-Flow Schränken (Scanbur, Koge, Dänemark) in Makrolon[®] Käfigen mit Einstreu gehalten und mit Altromin[®] Pressfutter und Wasser ad libitum ernährt. Alle Versuche beruhten auf der „Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchsvorhaben“ durch die Regierung von Unterfranken.

3.4. Diabetes-Induktion

Die Wistar Ratten wurden mittels Streptozotozin (N-[Methylnitrosocarbamoyl]-D-Glucosamine; STZ; Sigma-Aldrich Chemie; München), diabetisiert (50 mg/kg Körpergewicht, i.v.). Unmittelbar vor und an den folgenden Tagen nach Diabetes-Induktion wurde aus der Schwanzspitze ein Tropfen Blut gewonnen und der Blutzuckerspiegel bestimmt (Glucometer 054880, Pharma-Zentral-Nr. 3973648, Bayer Diagnostics, München). Nur Tiere mit einem Blutzuckerspiegel von mehr als 300 mg/dl an mindestens 3 aufeinander folgenden Tagen nach STZ-Injektion galten als diabetisch und wurden transplantiert.

3.5. Operationstechniken

Alle Transplantationen erfolgten unter Forene[®] (Isofluran, 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether; Zul.-Nr. 2594.00.00; Abbott GmbH, Wiesbaden) Inhalationsnarkose, da sich so die optimale Narkosetiefe während der Operation sicher steuern liess. Operiert wurde unter keimarmen Bedingungen unter dem Operationsmikroskop (Codman, Typ Mentor C III, Leitz Wild, Typ m 650, Herbruggen, Schweiz) in 6-10facher Vergrößerung. Nach Narkoseeinleitung wurde das Abdomen der Ratten rasiert und gründlich desinfiziert. Nach medianer Laparotomie wurde der die linke Niere bedeckende Darmanteil vor die Abdominalhöhle gehoben und in NaCl(0,9%)-getränkte Kompressen gehüllt, um ein Austrocknen der Darmschlingen zu vermeiden. Die Mobilisation und Verlagerung der linken Niere vor die Abdominalhöhle erfolgte mit NaCl(0,9%)-getränkten Wattestäbchen. Nach Inzision der Nierenkapsel am unteren Nierenpol mit der Spitze einer Venenverweilkanüle (Venflon TM Pro, 22GA 0,98IN, 0,9 x 25 mm, Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden), wurde anschliessend, unter leichtem Anheben der Nierenkapsel mit einer Pinzette, die weiche Plastikhülle der Venenverweilkanüle sehr vorsichtig 1,5-2,0 cm unter die Nierenkapsel in Richtung oberen Nierenpol vorgeschoben. Unter die linke Nierenkapsel wurde so ca. $\frac{1}{4}$ der Transplantatmenge, entsprechend 2.000-

3.000 Mikrokapselfn, transplantiert [Abb. 2-4]. Danach wurden die linke Niere und die Darm-schlingen wieder in das Abdomen zurfickverlagert. Sodann wurden ca. $\frac{3}{4}$ der Transplantat-menge, entsprechend 6.000-9.000 Mikrokapselfn, in die freie Bauchh6hle transplantiert, wobei stets darauf geachtet wurde, dass sich die Kapselfn in der Bauchh6hle gleichm6ssig verteilen. Mit unverkapselten Langerhans-Inseln wurde entsprechend verfahren. Der Verschluss des Abdomens erfolgte in zweischichtiger fortlaufender Nahttechnik. Postoperativ erhielten die Tiere einmalig Tramal[®] (Tramalhydrochlorid, Grfienthal GmbH, Aachen) in einer Dosis von 0,2 ml (0,5 ml Tramal/ml Aqua ad injectabilia) i.m. zur Schmerzlinderung. Zu keinem Zeit-punkt vor oder nach der Transplantation erhielten die Tiere eine immunsuppressive oder an-dersgeartete Medikation.

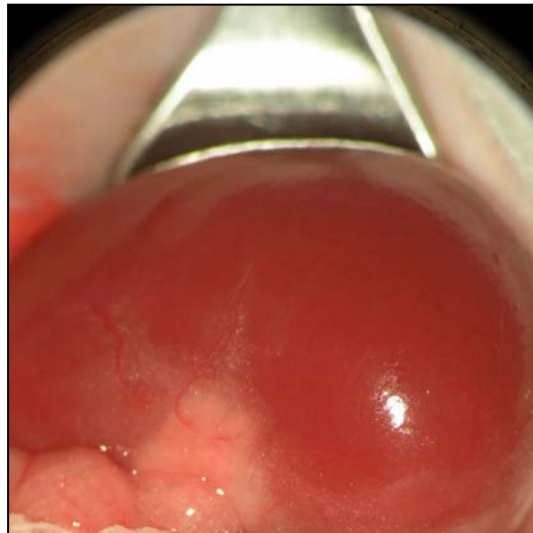


Abb. 2: Linke Niere einer Wistar Ratte vor Transplantation der mikroverkapselten Langerhans-Inseln (freundlicherweise fberlassen von Dr. V. Moskalenko).



Abb. 3: Plastikhülle der Venenverweilkanüle unter der linken Nierenkapsel (freundlicherweise überlassen von Dr. V. Moskalenko).

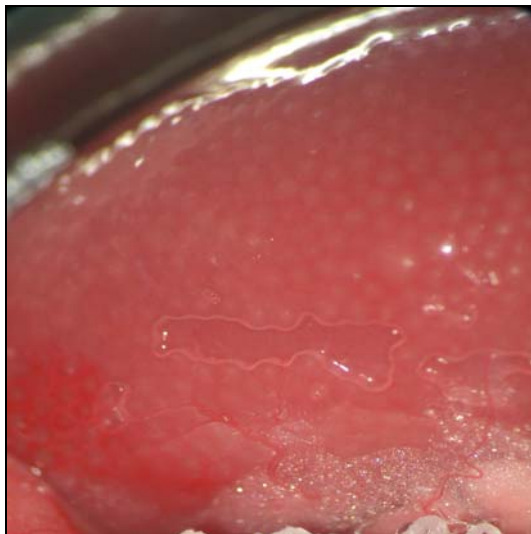


Abb. 4: Mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln unter der linken Nierenkapsel (freundlicherweise überlassen von Dr. V. Moskalenko).

3.6. Postoperative Inspektion der Empfänger

Nach Transplantation wurden die Tiere täglich visitiert. Mit Hilfe eines Bewertungsbogens wurden Fressverhalten, Bewegung und Reaktionsfähigkeit beurteilt. Das Gewicht wurde täglich protokolliert. In den ersten 10 bis 25 Tagen nach Transplantation wurden die Blutzuckerwerte täglich, bzw. alle 2-3 Tage, später dann wöchentlich gemessen.

3.7. Glukose-Toleranztest

Um physiologische Werte zur Glukose-Toleranz von Ratten zu erhalten, wurde ein entsprechender Test zunächst an mehreren unbehandelten Wistar Ratten durchgeführt. Vor Beginn der eigentlichen Untersuchung wurde sodann der Nüchtern-Blutzuckerspiegel der diabetischen als auch der transplantierten Tiere bestimmt. Danach erhielten diese je 1,0 g Glukose in 2 ml Leitungswasser per os. In Abständen von 10, 30, 50, 70, 90, 110 und 130 min erfolgten dann die vergleichenden Messungen der Blutzuckerwerte.

3.8. Organentnahmen

Nach Narkoseeinleitung, Rasur und gründlicher Desinfektion des Abdomens erfolgte die mediane Laparotomie im Bereich der alten Narbe. Das Abdomen insgesamt, wie auch im einzelnen Leber, Milz, Pankreas, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Omentum, Mesenterium und beide Nieren wurden auf mögliche postoperative Veränderungen durch den Primäreingriff sorgfältig makroskopisch inspiziert. Sodann wurde das Peritoneum nach mikroverkapselten Langerhans-Inseln abgesucht. Sofern erkennbar, wurde ihre Position im Abdomen photographisch dokumentiert (Kamera vom Typ Olympus PM-C35 mit PM 20 Belichtungsautomatik; Farbdiafilme Fujichrome 64 Professional T). Mit den Mikro kapseln unter der linken Niere wurde entsprechend verfahren. Frei in der Bauchhöhle liegende Mikro kapseln wurden mittels Lavage mit NaCl (0,9%) explantiert und als Vitalpräparate in 10-40 facher Vergrößerung photographisch dokumentiert. Von den o.g. Organen wurden Proben - mit und ohne anhaftende Mikro kapseln - für die konventionelle Histologie (Paraffinpräparate) als auch die Immunhistochemie (Gefrierpräparate) gewonnen.

3.9. Anfertigung histologischer Präparate

Um mögliche Organveränderungen als Folge der Transplantation, wie auch Veränderungen an den Transplantaten selbst zu beurteilen, wurden von Empfänger- und Spendergeweben Paraffin- und Gefrierschnitte angefertigt.

3.9.1. Gefrierschnitte

Für die Anfertigung der Gefrierschnitte wurde ein Teil der Organe in Blöckchen von je 0,5 cm Kantenlänge zerteilt und mit Einfriermedium (Tissue Tek, Firma Sakura, Sakura Finetek, USA) in Einfrierröhrchen (Firma Brand GmbH, Wertheim) überführt, für 2-3 min inkubiert und anschliessend in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren. Ihre weitere Lagerung erfolgte bei -80°C. Mit Hilfe eines Kryostaten (Frigocut-N-2800, Firma Reichert Jung, Vertrieb durch Firma Leica, Bensheim) wurden bei -20°C 5 µm dicke Gefrierschnitte sowohl für die konventionelle Histologie als auch für die immunhistochemischen Analysen angefertigt.

3.9.2. Paraffinschnitte

Zusätzlich zu den Gefrierschnitten wurde der verbleibende Teil der explantierten Organe in 3%igem Formalin fixiert und später in Paraffinblöcke gegossen. Aus diesen wurden am Mikrotom (Histoslide 2000 R, Jung; Leica, Nussloch) 1 µm dicke Schnitte angefertigt.

3.10. Histologische Untersuchungen

3.10.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach Azetonfixierung der Gefrierschnitte für 5 min, erfolgte für 30 sec die Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (Firma Merck, Darmstadt). Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gebläut und anschliessend mit Aqua dest. gespült. Die Gegenfärbung erfolgte 10 min mit einer 1%igen Eosinlösung (Firma Merck, Darmstadt). Nach kurzem Spülen mit Leitungswasser und Aqua dest. wurden die Schnitte mit Alkohol (4x je 1 min aufsteigende Alkoholreihe) und anschliessend mit Xylol (2x je 20 min; Firma Merck, Darmstadt) entwässert. Die Einbettung erfolgte konventionell mit dem Schnellbettmedium Pertex (Firma Merck GmbH, Burgdorf).

3.10.2. Färbung nach Masson Trichrome Goldner

Zunächst erfolgte das Entparaffinieren der Schnitte mit Xylol (2x je 10 min) und absteigender Alkoholreihe (5x je 5 min). Danach wurden die Schnitte mit Aqua dest. 5 min gewaschen. Von den fertigen Färbelösungen wurden von Lösung A und B je 6 Tropfen für 10 min aufgetragen. Anschliessend wurden die Färbelösungen von den Präparaten abgegossen und die Lösung C für 4 min aufgebracht. Danach wurden die Schnitte 3-4 sec mit Aqua dest. gewaschen. Anschliessend wurden 10 Tropfen der Lösung D für 4 min aufgetragen und die Schnitte erneut mit Aqua dest. gewaschen. Für 5 min wurden dann 10 Tropfen von Lösung E aufgetragen und die Schnitte wiederum 1 min mit Aqua dest. gewaschen. Es folgte das Entwässern der Schnitte mit aufsteigender Alkoholreihe und Xylol, sowie das Eindecken wie oben beschrieben.

3.10.3. Immunhistochemische Färbungen

Zunächst erfolgte das Entparaffinieren der Schnitte mit Xylol (2x je 10 min) und absteigender Alkoholreihe (5x je 5 min). Danach wurden die Schnitte mit Aqua dest. und TRIS-Puffer (TRIS- (hydroxymethyl)-amminomethan, Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe) 3x je 5 min gewaschen. Tabelle 1 zeigt die in der Immunhistochemie eingesetzten monoklonalen Antikörper. Alle Antikörper wurden mit TRIS-NaCl-0,5% BSA (Albumin bovine microbiological, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), wie in Tab. 1 dargestellt, verdünnt.

Tab. 1: Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten monoklonalen Antikörper.

Antikörper	Cluster	Spezifität	Herkunft	Verdünnung
HIS 48	HIS48	Granulozyten	Serotec, Deutschland	1:20
ED 1	ED1	Makrophagen	Serotec, Deutschland	1:1000
MRC-Ox 8	CD8	Zytotoxische T-Lymphozyten	Serotec, Deutschland	1:1000
W3/25	CD4	Helfer T-Lymphozyten	Serotec, Deutschland	1:1000
10/78	NK-RP1	Natürliche Killerzellen	Serotec, Deutschland	1µl/ml

Je 100 µl Primär-Antikörper wurden auf die Schnitte aufgetragen, diese in einer trockenen Kammer 60 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschliessend mit TRIS-NaCl-Puffer pH 7,4 gewaschen. Als Sekundär-Antikörper wurde ein Rabbit-anti-Mouse Antikörper (Firma Dako, Dänemark), als Tertiärantikörper ein Goat-anti-Rabbit IgG (H+L) Antikörper (Firma Dianova, Hamburg) verwendet. Beide Antikörper wurden mit 1.200 µl Ratten-Serum und 2.800 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Dako Diagnostika GmbH, Hamburg), pH 7,4 verdünnt. Davon wurden je 100 µl pro Schnitt aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer pH 7,4 gewaschen. Zwei Tropfen DAB-Reagenz (3,3-Diaminobenzidine·4HCl; Serva Feinbiochemica GmbH + Co, Heidelberg) und ein Tropfen H₂O₂ wurden gut gemischt und ein Tropfen je Präparat aufgetragen. Die Inkubation mit DAB-Reagenz erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle für etwa 10 min; anschliessend wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest. gespült. Danach erfolgte die Hämalaun-Färbung nach Mayer, wässrig (2 min) und das Bläuen der Schnitte unter fliessendem Leitungswasser (10 min). Kurzes Spülen der Schnitte mit Aqua dest. und Entwässern mit aufsteigender Alkoholreihe und Xylol wie oben beschrieben. Das Eindecken erfolgte hier mit Entellan (Firma Merck, Darmstadt).

3.10.4. Immunhistochemische Insulinfärbung

Nachdem die Schnitte 15 min luftgetrocknet wurden, erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxydase mit 200 ml Methanol + 30%igem H₂O₂ (30 min). Anschliessend wurden die Schnitte mit PBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Danach wurden unspezifische Reaktionen durch Protein Block (BioGenex, San Ramon, USA) bei RT blockiert. Danach wurden je 100 µl des Primär-Antikörpers (Meerschweinchen-anti-Schwein Antiserum; Firma Dako, Hamburg), in einer 1:50 Verdünnung, mit Dako-Antikörper-Verdünnungsmedium (Kat. Nr. S 3022) aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden dann mit PBS gewaschen. Danach erfolgte das Auftragen des Sekundär-Antikörpers, eines Ziege-anti-Meerschweinchen IgM (H+L) (Firma Dianova, Hamburg), 1:1.000 verdünnt. Die Inkubation der Schnitte erfolgte für 30 min bei RT. Anschliessend wurden die Schnitte mit PBS gewaschen. Das DAB-Reagenz (Liquid DAB Substrate, BioGenex, San Ramon) wurde aufgetragen, und die Inkubation erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle für etwa 3 min. Danach wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest. gespült, mit Hämalaun-Färbung gegengefärbt und 10 min unter fliessendem Leitungswasser gebläut. Es folgten

das kurze Spülen der Schnitte mit Aqua dest. und das Entwässern mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol wie oben beschrieben. Das Eindecken erfolgte mit Entellan.

3.11. Auswertung der histologischen Färbungen

Die lichtmikroskopische Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Schnittpräparate erfolgte an einem BX 50 Lichtmikroskop der Firma Olympus, Hamburg, bei 10-40 facher Vergrößerung. Der interne Vergrößerungsfaktor betrug 2,5. Die lichtmikroskopischen Ergebnisse wurden mit einer Kamera vom Typ Olympus PM-C35 unter Zuhilfenahme einer Olympus PM 20 Belichtungsautomatik dokumentiert. Als Filmmaterial dienten Farbdiafilme des Typs Fujichrome 64 Professional T.

3.12. Statistische Methoden

Die Daten aller untersuchten Parameter wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 5.0 erfasst und als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student-t-Test für unabhängige Daten geprüft und für statistisch signifikant befunden, wenn $p < 0,05$ war.

4. Ergebnisse

4.1. *In-Vitro*-Funktion porciner Langerhans-Inseln: Dynamische Insulinfreisetzung nach Glukosestimulation

In einer kürzlich abgeschlossenen *In-Vitro*-Funktionsanalyse porciner Langerhans-Inseln aus der eigenen Arbeitsgruppe [30] konnte gezeigt werden, dass die Inseln nach Stimulation mit niedrigen und hohen Glukosekonzentrationen Insulin reguliert freisetzen. Die Menge des freigesetzten Insulins war abhängig von der Menge der porcinen Langerhans-Inseln im System; sie war unabhängig davon, ob die Inseln bei 24°C oder 37°C kurzfristig kultiviert wurden; allerdings wirkte sich eine Langzeitkultur der Inseln über 12 Tage unter allgemein üblichen Kulturbedingungen nachteilig auf die Inselfunktion aus und führte letztlich zu ihrem nahezu vollständigen Funktionsverlust. Mittels Zugabe von 50 mM Nicotinamid zum Kulturmedium, – Nicotinamid ist bekannt für seine Fähigkeit, Zellschäden zu reparieren [34], – konnte die Inselfunktion zum grössten Teil restauriert werden. Als Konsequenz aus diesen Versuchen wurden die porcinen Langerhans-Inseln nach der Isolierung für 1-2 Tage steril in Nicotinamid-haltigem Kulturmedium bei 24°C kultiviert, bevor sie sodann mikroverkapselt und erneut für 24 Stunden in selbigem Medium kultiviert wurden.

4.2. Viabilität der porcinen Langerhans-Inseln nach der Mikroverkapselung

Nach der in 4.1. beschriebenen Kultivierung standen die porcinen Langerhans-Inseln – siehe alle folgenden Kapitel – als xenogene Transplantate zur Verfügung. Unmittelbar vor der Transplantation erfolgte eine weitere Vitalitätsprüfung der mikroverkapselten Inseln. Nur wenn diese mit der FDA/PI-Färbung mehr als 80% Vitalität zeigten, wurde das Transplantat für den folgenden *In-Vivo*-Versuch verwendet. Abbildung 5 zeigt vitale mikroverkapselte Langerhans-Inseln nach FDA/PI-Färbung und im Durchlicht.

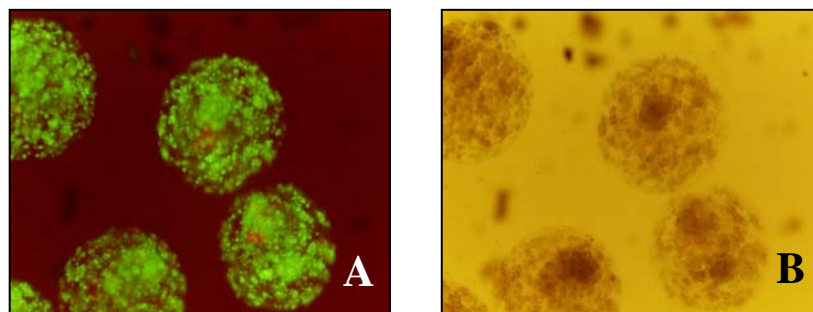


Abb. 5: Mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln nach FDA/PI-Färbung (A) und im Durchlicht (B). Es sind nur sehr wenige rot gefärbte, d.h. tote Zellen in (A) zu erkennen.

4.3. Zerstörung von β -Zellen durch Streptozotozin

Im Zusammenhang mit der Diabetes-Induktion mittels STZ stellte sich die Frage, ob es in den Wistar Ratten zur spontanen Regeneration der zerstörten Langerhans-Inseln kommen kann und die Tiere in der Folge wieder normoglykämisch werden. Deshalb wurde der Blutzucker in STZ-behandelten, nicht transplantierten Tieren in 3 Fällen über 7 Tage nach intravenöser Applikation des STZ täglich gemessen. Abbildung 6 zeigt, dass bei keinem der Tiere Normoglykämie im Verlauf der 7 Tage wiederkehrte. Zudem zeigten alle drei Tiere eine kontinuierliche Gewichtsabnahme, Polyurie und Polydipsie. Ein viertes STZ-behandeltes Tier wurde bis zum 75. Tag beobachtet, auch hier wurde keine Rückkehr zu normalen Blutzuckerwerten gemessen (nicht dokumentiert).

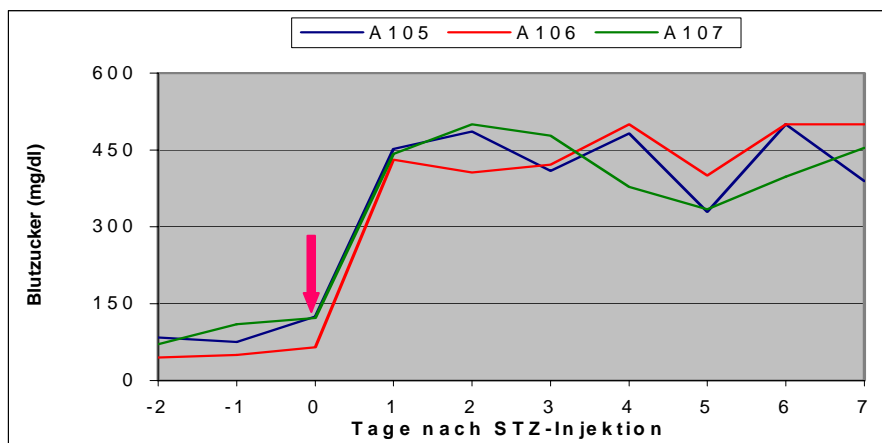


Abb. 6: Blutzuckerkurven von 3 STZ-behandelten Wistar Ratten. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der STZ-Injektion am Tag 0 an.

Zusätzlich wurden die Pankreata dieser Tiere immunhistochemisch auf residuale β -Zellen untersucht. Abbildung 7 zeigt, dass zum Zeitpunkt der Explantation am Tag +7 keine Insulin-positiven Zellen im Pankreasgewebe nachweisbar sind.

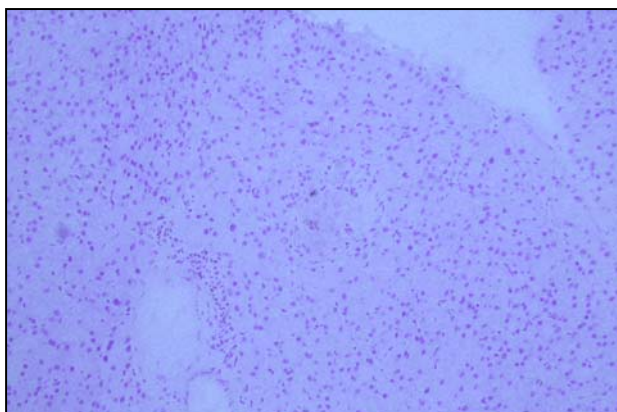


Abb. 7: Pankreas einer STZ-behandelten Wistar Ratte am Tag +7 nach Explantation des Pankreas. Mit dem Anti-Insulin-Antikörper sind keine Insulin-positiven Zellen Pankreas sichtbar.

4.4. Überlebenszeiten nach Transplantation

Alle STZ-diabetischen potentiellen Transplantat-Empfänger zeigten klinische Zeichen des Diabetes mellitus, wie Polyurie, Polydipsie und Gewichtsverlust. Bei den meisten Tieren (>85%) konnten mittels Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln Normoglykämien unterschiedlicher Dauer erreicht werden.

Nach erfolgreicher Transplantation der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln zeigten sich bei der täglichen Blutzuckermessung physiologische Werte. Weiterhin kam es zu einer stetigen Gewichtszunahme bei den Empfängern. Polyurie und Polydipsie wurden nicht mehr beobachtet. Somit unterschieden sich die erfolgreich transplantierten Tiere kaum von gesunden Kontrolltieren. Mit dem Verlust der Transplantatfunktion wurde jedoch ein Anstieg der Blutzuckerwerte beobachtet. Zudem kam es zum Stagnieren der Gewichtszunahme bzw. zur Gewichtsabnahme. Die Tiere zeigten wieder alle klinischen Symptome des Diabetes mellitus.

Bei anderen Tieren wiederum wurde Normoglykämie nach Transplantation nicht erreicht. Aufgrund dieser variierenden Ergebnisse wurden die Empfänger in 3 Gruppen unterteilt.

Die erste Gruppe (n=22) zeigte eine primäre Non-Funktion des Transplantates. Es konnte zu keinem Zeitpunkt nach Transplantation eine Normoglykämie erreicht werden. Alle typischen Symptome des Diabetes mellitus blieben auch nach der Transplantation erhalten. Abbildung 8 zeigt ein typisches Beispiel einer primären Non-Funktion. Wie aus dem Diagramm ersichtlich ist, kam es nach erfolgter Transplantation der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln zwar zu einem kurzfristigen Absinken der Blutzuckerwerte, Normoglykämie wurde jedoch zu keiner Zeit erreicht.

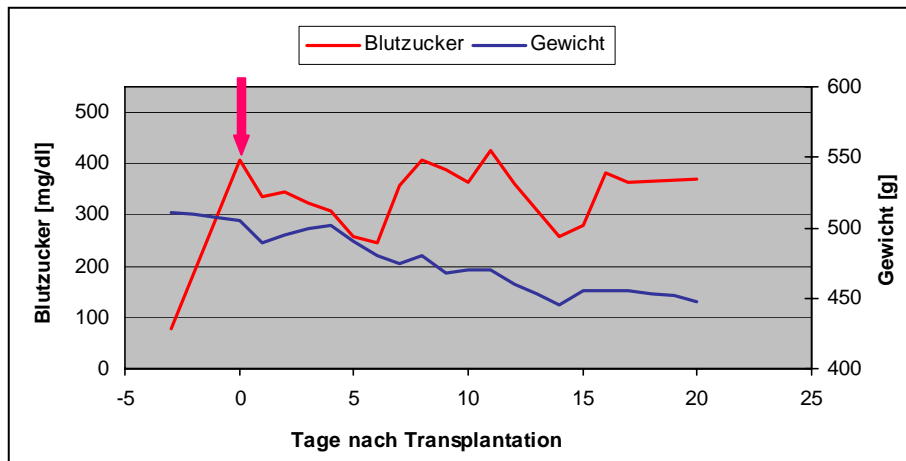
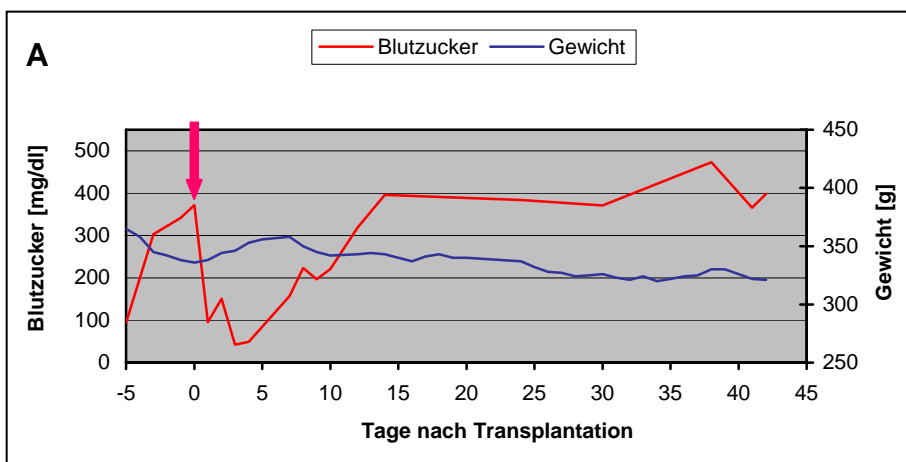


Abb. 8: Blutzucker- und Gewichtskurve einer transplantierten Wistar Ratte mit primärer Non-Funktion des Transplantates. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Transplantation an.

Bei der zweiten Gruppe (n=35) zeigte sich lediglich eine Kurzzeitfunktion des Transplantates. Bis zu 20 Tage nach Transplantation waren diese Tiere normoglykämisch und nahmen an Gewicht zu. Polyurie und Polydipsie wurden in dieser Zeit nicht festgestellt. Nach Versagen der Transplantatfunktion kam es zu einem deutlichen Anstieg der Blutzuckerwerte und zu einer Gewichtsabnahme. Abbildung 9 zeigt zwei typische Beispiele für eine Transplantat-Kurzzeitfunktion. Wie aus beiden Diagrammen ersichtlich ist, kam es nach Transplantation der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln bei den Tieren zur Normoglykämie für wenige Tage. Mit dem Verlust der Transplantat-Funktion wurden jedoch wieder hyperglykämische Blutzuckerwerte gemessen.



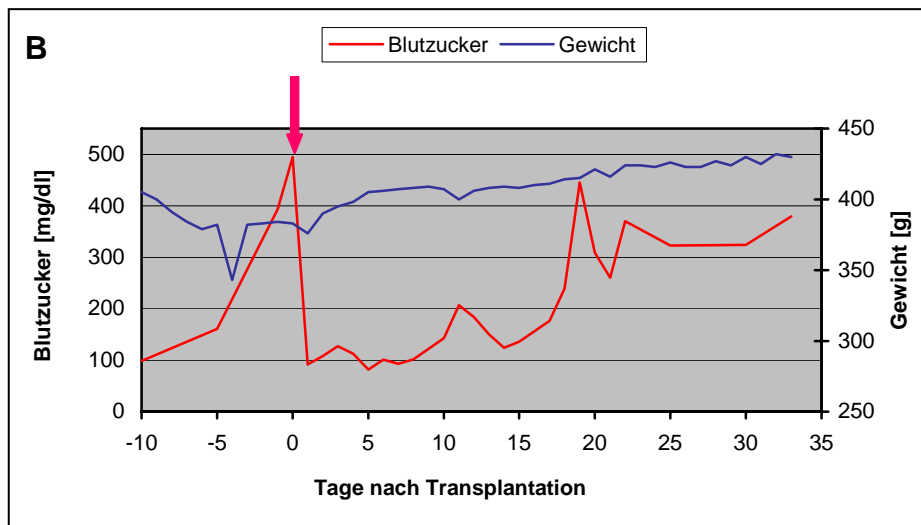
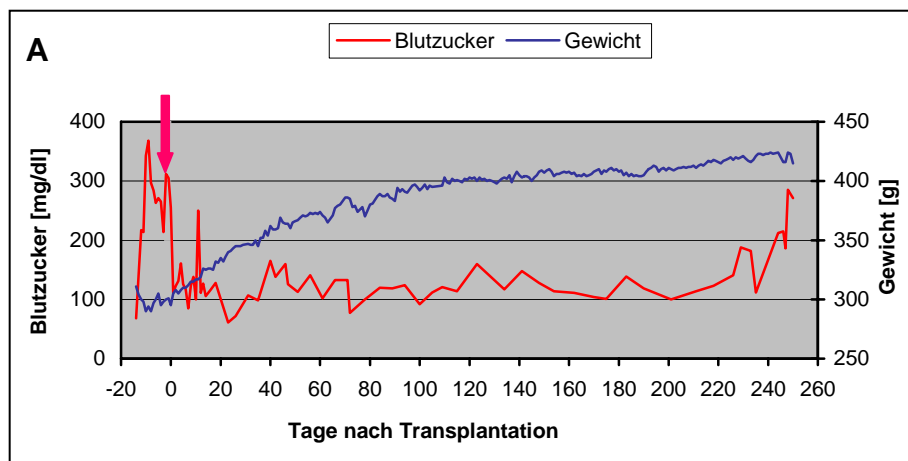


Abb. 9: Typische Blutzucker- und Gewichtskurven von zwei Wistar Ratten (A, B) mit Transplantat-Kurzzeitfunktion. Der Pfeil zeigt jeweils den Zeitpunkt der Transplantation an.

Die dritte Gruppe (n=15) zeigte eine Langzeitfunktion der Transplantate. Diese dauerte mehr als 20 Tage an. Bei einigen Tieren betrug die Transplantat-Funktion sogar mehr als 500 Tage. Die Abbildung 10 zeigt zwei typische Beispiele für Transplantat-Langzeitfunktion.



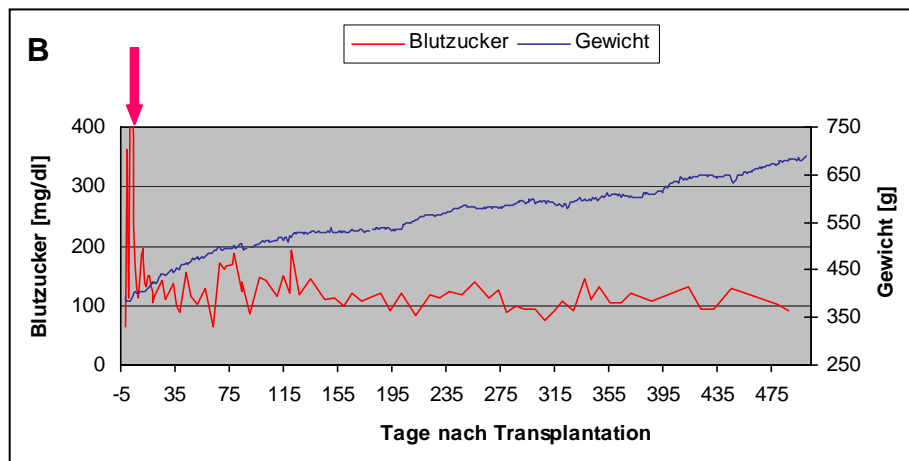


Abb. 10: Typische Blutzucker- und Gewichtskurven von zwei Wistar Ratten (A, B) mit Transplantat-Langzeitfunktion. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Transplantation an.

Um zu sehen, wie sich die Mikroverkapselung der porzinen Langerhans-Inseln auf die Dauer der Transplantatfunktion auswirkt, wurden Wistar Ratten mit einer vergleichbaren Anzahl unverkapselter porziner Langerhans-Inseln identisch transplantiert. Bei diesen wurde keine, bzw. eine lediglich zwei Tage andauernde Normoglykämie nach Transplantation erreicht [Abb. 11].

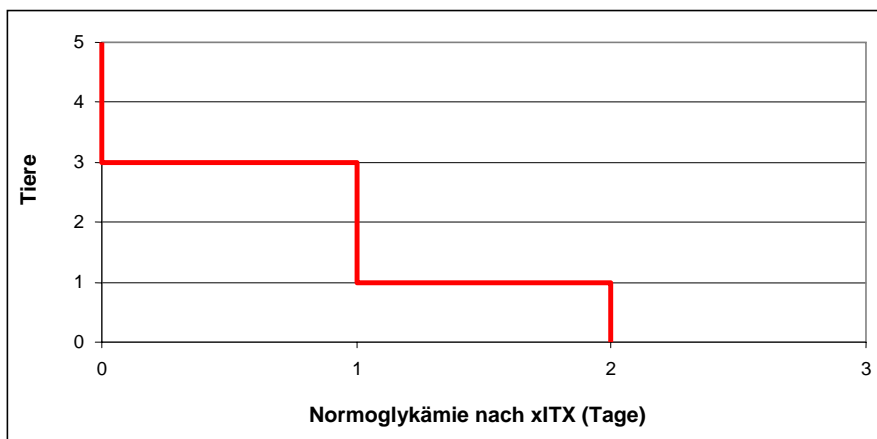


Abb. 11: Darstellung der Funktionen unverkapselter porziner Langerhans-Inseln nach Transplantation.

4.5. Orale Glukose-Toleranztest

Beim oralen Glukose-Toleranztest wurden gesunde Kontrolltiere, STZ-diabetische und transplantierte nicht-diabetische Tiere miteinander verglichen. Bei den unbehandelten Kontrolltieren und bei den transplantierten Tieren erfolgte unter Glukosebelastung eine regelrechte Regulation des Blutzuckerspiegels. Bei den STZ-diabetischen Tieren blieb der Blutzuckerspiegel

zu jedem Messzeitpunkt im hyperglykämischen Bereich. Abbildung 12 zeigt regelrechte Blutzuckerregulationen nach oraler Glukosebelastung bei einem gesunden Kontrolltier und bei vier transplantierten Tieren.

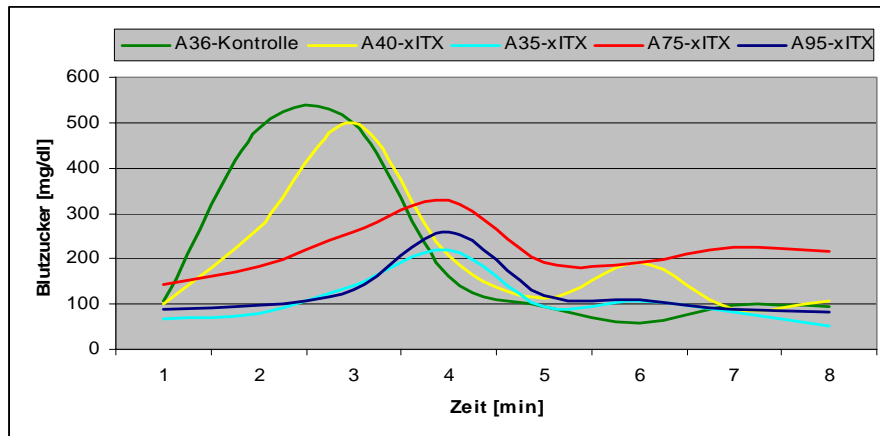


Abb. 12: Blutzuckerkurven nach oraler Glukosebelastung bei einem unbehandelten Kontrolltier (A 36) und bei den vier transplantierten Tieren, A 35, A 40, A 75 und A 95.

Zum Vergleich zeigt Abbildung 13 die Blutzuckerwerte nach oraler Glukosebelastung bei einem STZ-diabetischen Tier. Hier ist erkennbar, dass die Blutzuckerwerte zu jedem Messzeitpunkt hyperglykämisch bleiben.

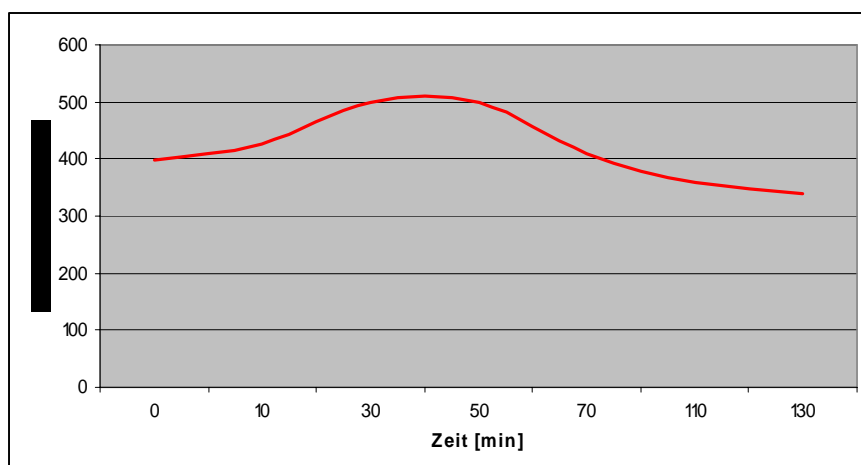


Abb. 13: Blutzuckerwerte eines STZ-diabetischen Tieres nach oraler Glukosebelastung.

4.6. Organentnahme (Makroskopie, Histologie, Histochemie)

4.6.1. Makroskopische Untersuchungen

Allen transplantierten Wistar Ratten wurden nach Versagen der Transplantatfunktion die Organe, wie oben beschrieben, zur weiteren Untersuchung entnommen. Bei geöffnetem Abdomens wurden zunächst alle Organe makroskopisch inspiziert und ihr Zustand photographisch dokumentiert. Die Organe zeigten keine Verfärbungen, Lageveränderungen oder Tumoren. Die mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln wurden sowohl unter der linken Nierenkapsel als auch im Abdomen unversehrt vorgefunden. Im Bereich des Abdomens waren die Mikrokapseln miteinander verwachsen und an verschiedenen Organen, wie Leber, Pankreas, Dickdarm, Zwerchfell und Milz festgewachsen. Weiterhin konnte eine intensive Neovaskularisation um die Mikrokapseln herum festgestellt werden. Die Abbildungen 14 bis 19 dokumentieren diesen Zustand zum Zeitpunkt der Explantation.

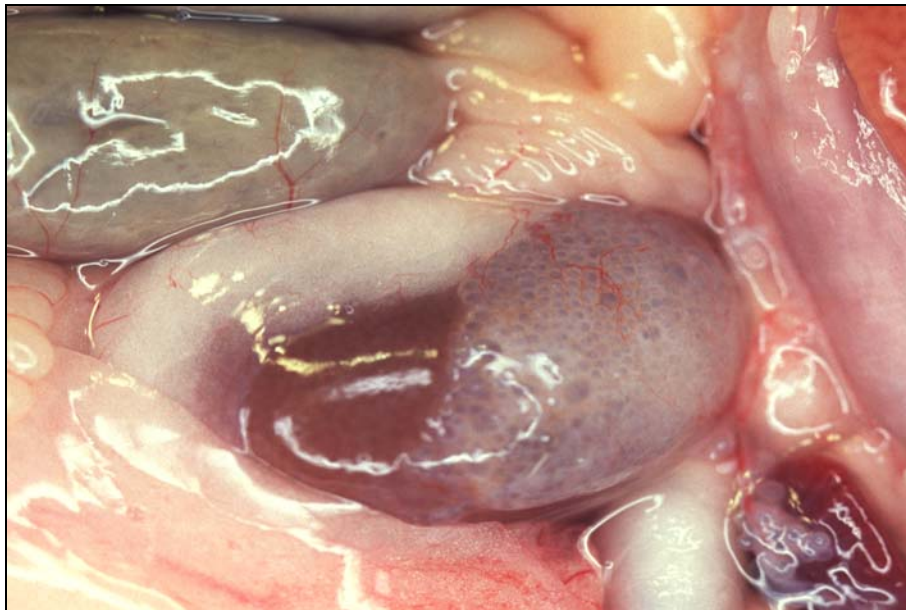


Abb. 14: Mikroverkapselte porzine Langerhans-Inseln unter der linken Nierenkapsel einer Wistar Ratte 40 Tage nach Transplantation. Es ist eine ausgeprägte Fibrosierung um die Mikrokapseln sichtbar. Weiterhin sind Gefäßeinsprossungen in das Transplantat hinein erkennbar.



Abb. 15: Mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln am Omentum der Wistar Ratte 40 Tage nach Transplantation. Die Mikrokapselformen sind festgewachsen und zeigen Neovaskularisationen.



Abb. 16: Mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln an der Milz der Wistar Ratte 40 Tage nach Transplantation. Die Kapseln sind an der Milz festgewachsen.

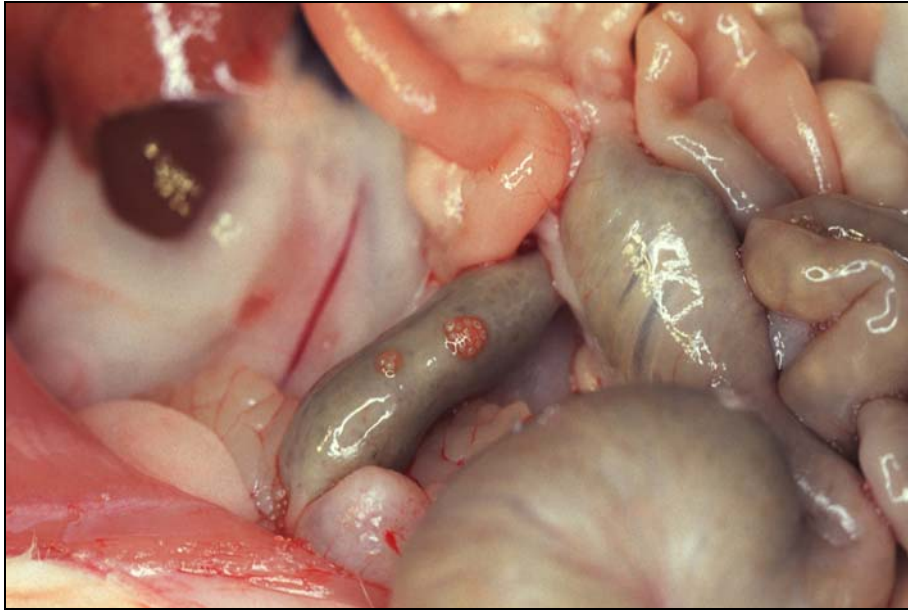


Abb. 17: Mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln am Darm der Wistar Ratte 40 Tage nach Transplantation. Auch hier sind die Kapseln als Cluster am Darm festgewachsen.

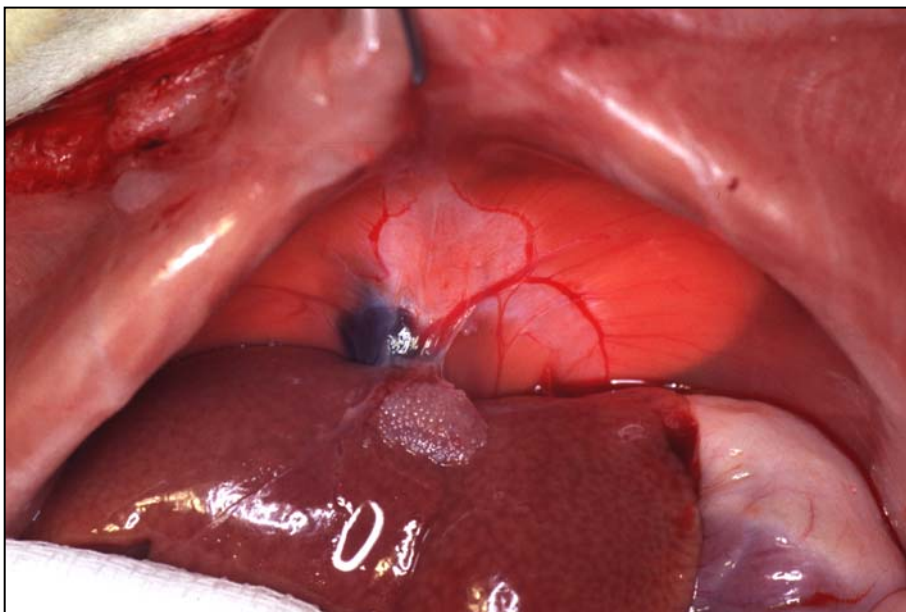


Abb. 18: Mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln zwischen Leber und Diaphragma einer Wistar Ratte 300 Tage nach Transplantation. Die Mikro kapseln sind mit der Leber verwachsen und haben Gefässanschluss. (Das dunkle Areal links oberhalb der Kapseln ist ein Hämatom).

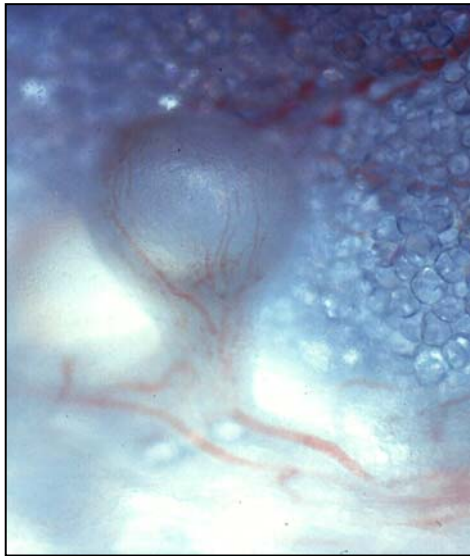


Abb. 19: Eine einzelne Mikro kapsel mit porzinen Langerhans-Inseln vom Omentum majus einer Wistar Ratte 250 Tage nach Transplantation. Deutlich sichtbare Neovaskularisation.

4.6.2. Histologische und histochemische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen sollten Veränderungen, die postoperativ an und in der unmittelbaren Umgebung der mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln auftraten, sichtbar machen. An allen Transplantationsorten hatten sich stark ausgeprägte Fibrosierungen um die Kapseln herum gebildet [Abb. 20A und B].



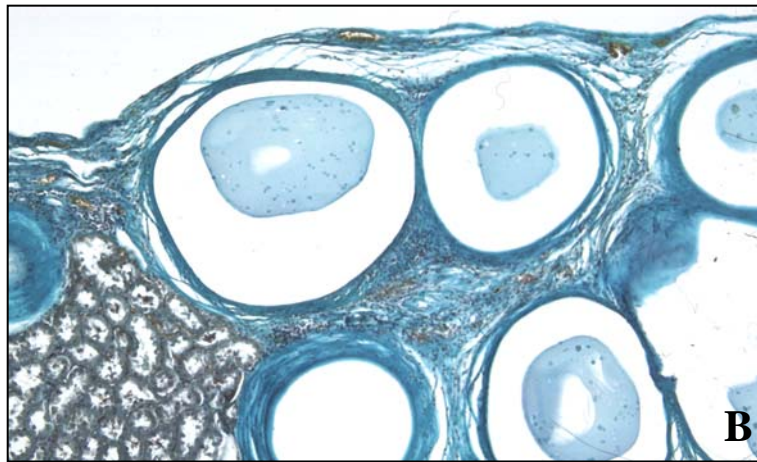


Abb. 20: Mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln in HE-Färbung **(A)** und in Trichrom-Goldner-Färbung **(B)**. Die Mikroverkapseln befinden sich am Dünndarm **(A)** und unter der linken Nierenkapsel **(B)**. Es ist jeweils eine deutlich ausgeprägte Fibrose um die Mikroverkapseln sichtbar.

Weiterhin wurden bei der histologischen Untersuchung der Präparate deutliche Infiltrationen von T-Zellen (CD4+, CD8+), Makrophagen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Fibroblasten im interkapsulären Spalt sichtbar [Abb. 21 und 22].

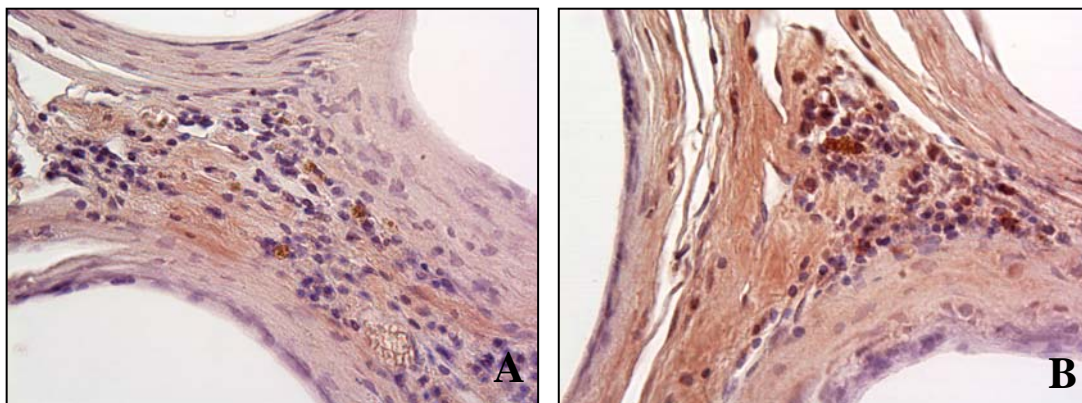


Abb. 21: Explantierte Mikroverkapseln. **(A)** CD4+ und **(B)** CD8+ T-Zellen im interkapsulären Spalt.

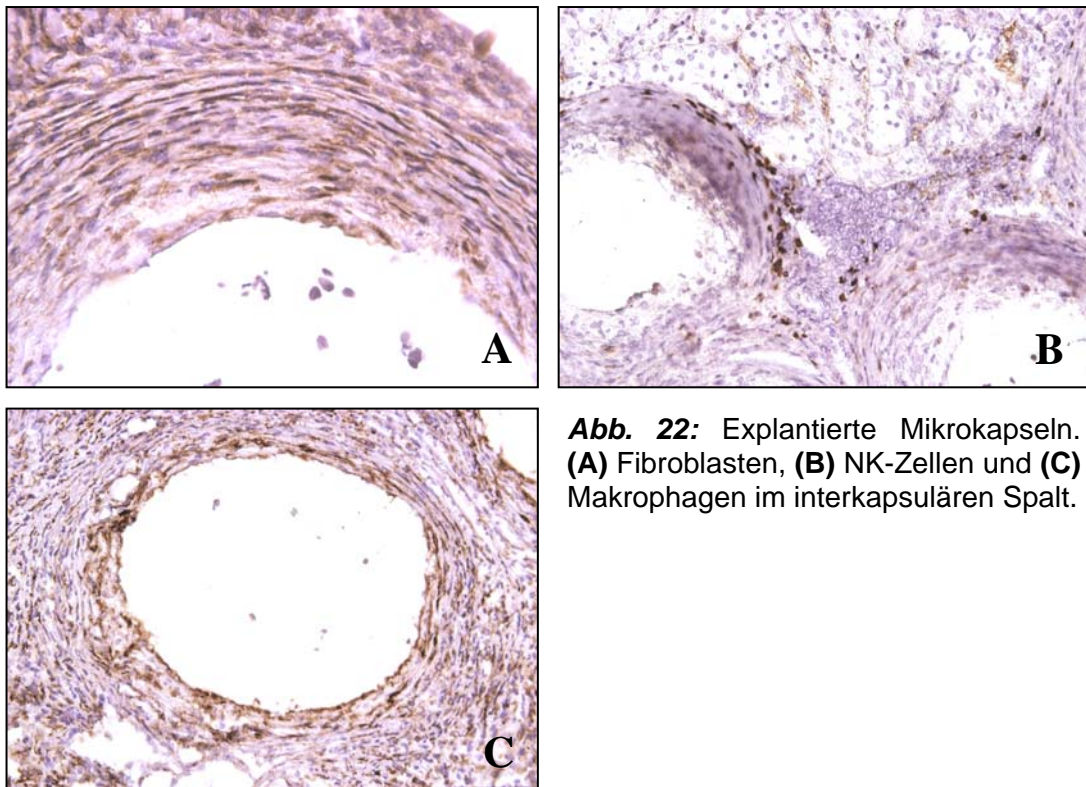


Abb. 22: Explantierte Mikrokapselfn. **(A)** Fibroblasten, **(B)** NK-Zellen und **(C)** Makrophagen im interkapsulären Spalt.

Als weitere histologische Untersuchung wurde die Insulinfärbung an den explantierten Pankreata der Wistar Ratten durchgeführt. Mittels dieser Untersuchung sollte geklärt werden, ob sich Insulin-positive Zellen im Pankreasgewebe der ehemals STZ-behandelten und dann transplantierten Tiere nachweisen lassen. Diese Untersuchung konzentrierte sich vor allem auf Tiere, bei denen sich eine Langzeit-Funktion der Transplantate gezeigt hatte. Abbildung 23 zeigt eine geringe Anzahl Insulin-positiver Zellen in einer Ratte, die 238 Tage nach xenogener Transplantation mikroverkapselter Langerhans-Inseln normoglykämisch war.

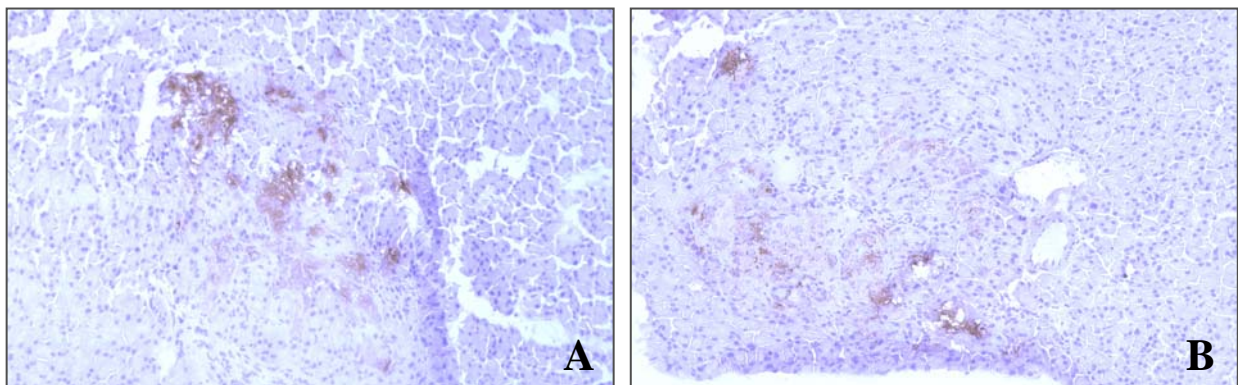


Abb. 23: Insulinfärbung am Pankreas einer ehemals STZ-behandelten Wistar Ratte, die nach Transplantation mikroverkapselter porziner langerhans-Inseln 238 Tage normoglykämisch war. Sichtbar sind wenige Insulinpositive Zellen. Vergrößerung: 105x

Zum Vergleich wurde die Insulinfärbung auch am Pankreas unbehandelter Kontrolltiere durchgeführt [Abb. 24]. Das Pankreas dieser Ratten zeigte erwartungsgemäss zahlreiche sehr gut ausgebildete grössere und kleinere Langerhans-Inseln mit einer starken Insulin-Färbung der Betazellen.

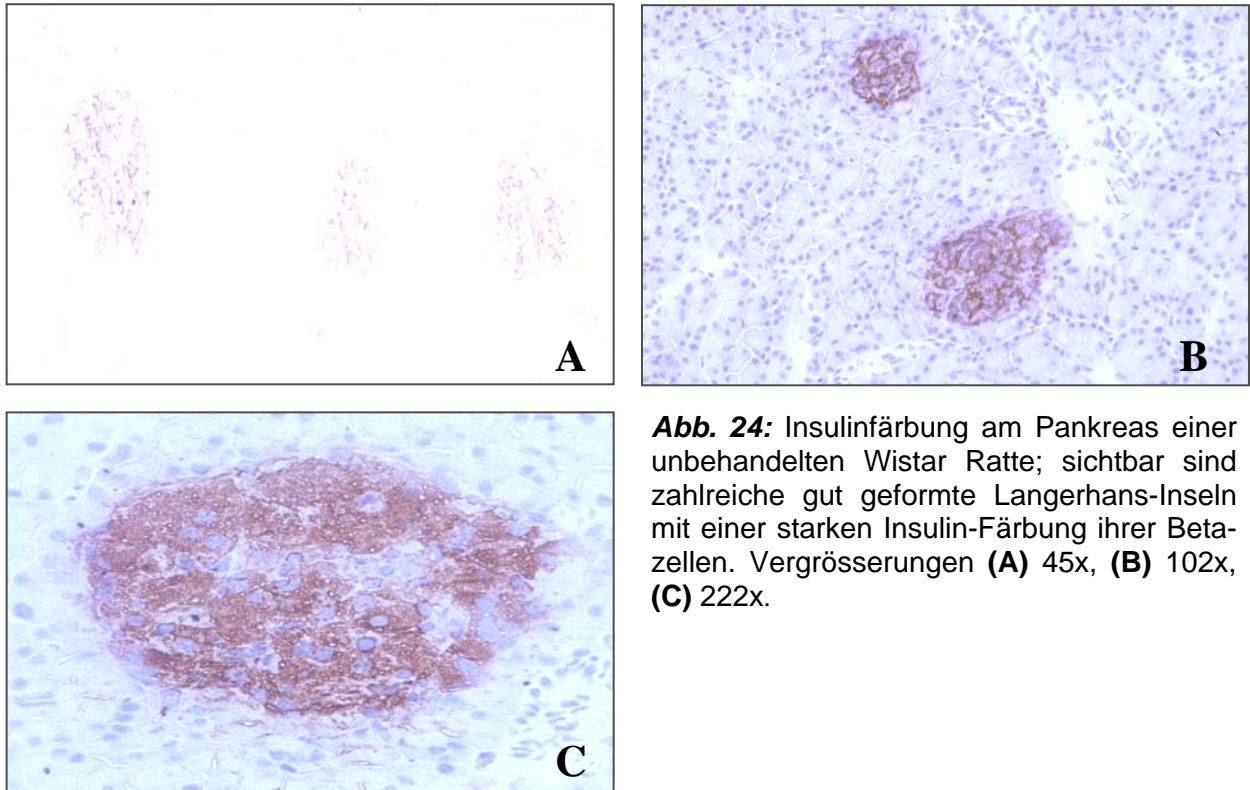


Abb. 24: Insulinfärbung am Pankreas einer unbehandelten Wistar Ratte; sichtbar sind zahlreiche gut geformte Langerhans-Inseln mit einer starken Insulin-Färbung ihrer Betazellen. Vergrösserungen (A) 45x, (B) 102x, (C) 222x.

Insulinfärbungen wurden ebenso an explantierten Transplantaten durchgeführt. Diese erfolgten in aller Regel nach einer längeren normoglykämischen Phase (Langzeit-Funktion), der eine längere Phase der Transplantat-Dysfunktion mit wieder einsetzender Hyperglykämie folgte. Transplantat- bzw. Organentnahmen während der normoglykämischen Phase wurden hier noch nicht durchgeführt. Die Abbildung 25 zeigt mikroverkapselte porzine Langerhans-Inseln unter der linken Nierenkapsel einer Wistar Ratten. Es ist nur noch sehr wenig bzw. kein Insulin-positives Material in den Mikrokapseln sichtbar.

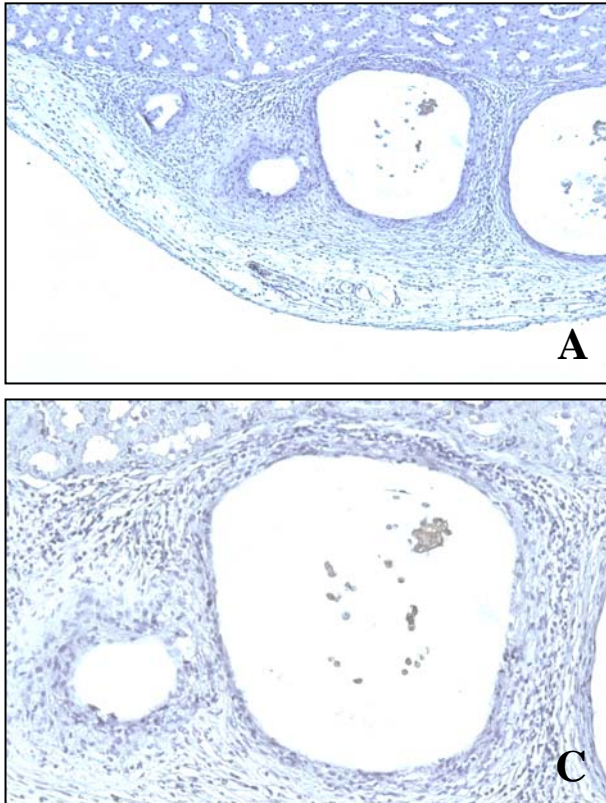


Abb. 25: Insulinfärbung an mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln, die aus der linken Nierenkapsel 24 Tage (B) nach erfolgreicher Transplantation explantiert wurden. Vergrößerung: (A) 103x, (B) und (C) 340x.

4.7. Implantation von Leerkapseln

Es stellte sich die Frage, ob Entzündungsreaktionen und die damit verbundene Fibrosebildung um die Mikrokapseln auch bei leeren Alginat-Mikrokapseln erfolgt. Deshalb wurden bei sechs Wistar Ratten in der gleichen Weise – wie die mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln – leere Alginat-Mikrokapseln implantiert. Nach jeweils 14, 21, 50, 150, 200 und 250 Tagen erfolgte dann die Entnahme der Mikrokapseln und deren makroskopische und mikroskopische Beurteilung. Schon bei der makroskopischen Betrachtung des eröffneten Abdomens konnte man erkennen, dass die Leerkapseln im Gegensatz zu den Mikrokapseln mit porzinen Langerhans-Inseln nicht oder nur teilweise mit den abdominalen Organen verwachsen waren. Dies galt für alle oben genannten Beobachtungszeiten. Weiterhin konnten keine oder nur geringe Verwachsungen zwischen den einzelnen Mikrokapseln festgestellt werden. Mikroskopisch war keine, bzw. nur eine sehr gering ausgeprägte Fibrosierung um die Mikrokapseln zu erkennen. Neovaskularisationen im Bereich der Leerkapseln wurden ebenfalls nicht beobachtet. Abbildung 26 zeigt die Vitalmikroskopie von zwei Leerkapseln aus der Bauchhöhle einer Wistar Ratte, unmittelbar nach Lavage aus der Bauchhöhle am Tag +50. Den leeren Mikrokapseln haften nur wenige Zellen an der Kapselaussenseite an; sie sind je-

doch nicht fibrosiert. Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung 27 eine Mikrokapsel, die porzine Langerhans-Inseln enthält bzw. enthielt, ebenfalls nach Lavage der Bauchhöhle. Hier ist deutlich eine massive Fibrose der Mikrokapsel zu erkennen.

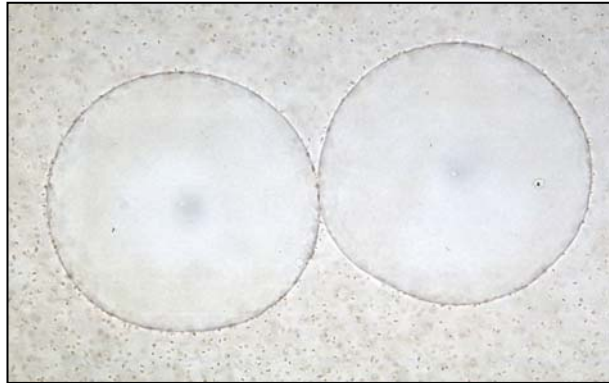


Abb. 26: Leere Alginat-Mikrokapseln aus der Bauchhöhle einer Wistar Ratte. Vitalmikroskopie unmittelbar nach Lavage aus der Bauchhöhle am Tag +50. Es sind nur wenige Zellen an der Oberfläche der Mikrokapseln erkennbar.

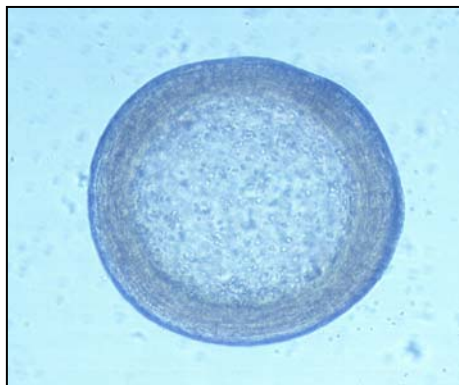


Abb. 27: Aus der Bauchhöhle einer Wistar Ratte explantierte Mikrokapsel, die porzine Langerhans-Inseln enthält bzw. enthielt. Vitalmikroskopie unmittelbar nach Lavage aus der Bauchhöhle (Tag +75). Es ist eine deutliche Fibrose um die Mikrokapsel erkennbar.

5. Diskussion

Neben der Transplantation des vaskularisierten Pankreas, stellt die Inselzell-Transplantation eine bedeutende Möglichkeit der Therapie des Typ I Diabetes mellitus dar. Tierexperimentell wurde nachgewiesen, dass nach intraportaler Transplantation syngener Inselzellen in STZ-diabetische Ratten eine lebenslange Normoglykämie erreicht werden kann [35, 36]. Inzwischen werden allogene Inselzell-Transplantationen auch am Menschen mit zunehmendem Erfolg durchgeführt. Shapiro und Kollegen publizierten, dass unter einer Steroid-freien Immunsuppression und einer angemessenen Anzahl transplantierte Inseln die Insulinunabhängigkeit nach isolierter Inselzell-Transplantation bei nicht urämischen Typ I Diabetikern zur Regel wird [21]. Mit einer 70-80% 1-Jahres-Funktionsrate erreicht die Inselzell-Transplantation die Ergebnisse der übrigen Organe und überwindet somit ihren bisherigen experimentellen Status.

Ein gravierendes Problem der allogenen Inselzell-Transplantation ist jedoch der Mangel an menschlichen Spenderorganen. Deshalb ist die Transplantation tierischen Gewebes eine attraktive Alternative.

5.1. Porzine Langerhans-Inseln in der Therapie des Diabetes mellitus

Für Transplantationen von tierischen Geweben werden weltweit Schweine als Spenderspezies favorisiert. Gründe dafür sind vor allem die dem Menschen vergleichbare Organgröße und Physiologie, geringe Kosten für Zucht und Haltung und gute Verträglichkeit des Schweineinsulins. Es ist absehbar, dass sich die Inselzell-Transplantation in der Zukunft zu einem „Routinerverfahren“ in der Therapie des Diabetes mellitus entwickelt. Mit Hilfe von xenogenen Langerhans-Inseln könnte der damit verbundene enorme Bedarf an Langerhans-Inseln abgedeckt werden. Ausgehend von diesen Überlegungen verwendeten wir für unsere Versuche Pankreasgewebe von hirntoten Schweinen, und die Therapie des Typ I Diabetes mittels xenogener Transplantation porziner Langerhans-Inseln stellt ein langfristiges Ziel unserer Forschung dar.

5.2. Alternativen in der Therapie des Diabetes mellitus

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung einer ausreichenden Anzahl Insulin-produzierender Zellen ist ihre Differenzierung aus unterschiedlichen Stammzellen, embryonalen als auch adulten. Experimentelle Arbeiten zeigen, dass es möglich ist, embryonale Stammzellen sowohl

der Maus, als auch des Menschen in Zellkulturen zu expandieren und zu Insulin-produzierenden Betazellen zu differenzieren [37-39]. Werden diese Zellen in diabetische Tiere transplantiert, kann der Blutzucker der Empfängertiere normalisiert werden [38, 39]. Der Nachteil der Therapie mit embryonalen Stammzellen besteht jedoch in den erheblichen ethischen Bedenken gegen Forschung und Therapie mit dieser speziellen Art von Zellen. Ethisch weit weniger problematisch ist die Forschung mit adulten Stammzellen. Beschrieben wurde bereits eine mögliche Zellkulturmethode zur *In-Vitro*-Expansion und Differenzierung humaner Pankreaszellen in Insulin-produzierende Zellen [40]. Tierexperimentell wurde eine Normalisierung der Stoffwechsellage in diabetischen Mäusen durch die Transplantation adulter somatischer Pankreas-Stammzellen beschrieben [41].

Gentechnologische Verfahren bieten sich ebenfalls als alternative Therapieoptionen an. Diese Methoden würden zudem die Probleme der Fremdgewebe- und Fremdzellen-Transplantation umgehen. Es konnten bereits tierexperimentell Zellen der Hypophyse und GIP-sezernierende Zellen des terminalen Ileums der Ratte, sowie Hepatozyten durch gentechnische Transfektion mit dem Insulin/Proinsulingen zur Insulinsekretion angeregt werden [42, 43]. Als Problem der bisherigen experimentellen Versuche wurde jedoch vermerkt, dass die Insulinsekretion nicht stoffwechselbedarfsgerecht erfolgt, was den Weg zu einer klinischen Anwendung der Gentherapie *in vivo* derzeit noch behindert.

5.3. Mikroverkapselung porziner Langerhans-Inseln

Mit der xenogenen Transplantation porziner Langerhans-Inseln sind – wegen der genetischen Entfernung des Schweins vom Menschen bzw. der Ratte – heftigste Abstoßungsreaktionen zu erwarten, welche das Transplantat innerhalb kürzester Zeit zerstören würden. Hier sind die hyperakute, die akute vaskuläre und die akute zellvermittelte Abstoßung zu nennen. Um aber die lebenslange Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten nach der Transplantation zu umgehen, werden die porzinen Langerhans-Inseln mit Barium-Alginaten mikroverkapselt. Die Mikro kapseln erlauben die Diffusion von Stoffen mit niedrigem Molekulargewicht, wie z.B. Glukose und Insulin, verhindern jedoch den Durchtritt von Stoffen mit höherem Molekulargewicht, wie z.B. Immunglobuline, und natürlich die Passage der Zellen des Immunsystems. Es wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen, dass die Insulinsekretion mikroverkapselter Inseln jener unverkapselter Inseln entspricht [30, 44-46]. Es wurde von mehreren Versuchsgruppen beschrieben, dass sowohl nach allogener als auch nach xenogener

Transplantation freier Inselzellen eine Transplantatabstossung nach kurzer Zeit erfolgt. Demgegenüber wurde nach Transplantation mikroverkapselter Langerhans-Inseln ein längeres Transplantatüberleben beobachtet [45, 47, 48]. Diese Ergebnisse konnten in unseren Versuchen bestätigt werden. Wir stellten fest, dass die Mikroverkapselung der porzinen Langerhans-Inseln zu einer erheblichen Funktionsverlängerung der Transplantate führt. Während die Transplantatfunktion der unverkapselten porzinen Langerhans-Inseln nach spätestens zwei Tagen versagte, konnten wir nach Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln eine Transplantatfunktion von bis zu 500 Tagen beobachten. Weiterhin führten wir bei erfolgreich transplantierten Wistar Ratten einen oralen Glukose Toleranz Test durch und verglichen die Werte mit denen von gesunden Kontrolltieren. Auch hier konnte gezeigt werden, dass der Glukosestoffwechsel nach Transplantation mikroverkapselter Langerhans-Inseln eine nahezu physiologische Regulation aufweist.

5.4. Schwierigkeiten bei der Isolierung porziner Langerhans-Inseln

Die Isolierung von porzinen Langerhans-Inseln hat sich als ausserordentlich schwierig erwiesen, da insbesondere die enzymatische Isolierung der Inseln aus dem Pankreas ein erhebliches methodisch-technisches Problem darstellt. Im Gegensatz zu den Langerhans-Inseln anderer Spezies neigen die des Schweins zur Fragmentierung. Somit liegt eine besondere Schwierigkeit unter anderem darin, das Organ enzymatisch zwar so weit zu verdauen, dass ein Herauslösen der Inseln möglich wird, jedoch ohne ihre Architektur zu zerstören. In unserer Arbeitsgruppe beschäftigen wir uns daher intensiv mit der detaillierten histologischen und immunhistologischen Analyse der extrazellulären Matrixproteine im porzinen Pankreas als essentieller Vorbedingung für die Herstellung eines geeigneten Enzymgemisches zur Gewinnung der porzinen Langerhans-Inseln [49]. So konnte auf Grund wachsender Erfahrung in der Technik der Inselisolierung und der Evaluierung diversen Enzymgemische unsere Isolierungsergebnisse ständig verbessert werden. Weltweit beherrschen nur sehr wenige Arbeitsgruppen diese schwierige Technik. Der porzinen Langerhans-Insel werden allein aus diesen Gründen nur sehr geringe Chancen für einen klinischen Einsatz zugestanden – eine Ansicht, die wir keineswegs teilen.

5.5. Verbesserung der Transplantationsergebnisse

Im Verlauf unserer Experimente konnten wir beobachten, dass durch die stetige Verbesserung der Isolierungsergebnisse, wie auch mit wachsender Erfahrung im Bereich der Verkapse-

lungstechnik und schonender Transplantation der Inseln, die Zahl der erfolgreichen Transplantationen stetig anstieg. Abbildung 28 verdeutlicht, dass sich von 1999 bis 2002 die zu Normoglykämie führenden xenogenen Transplantationen porziner Langerhans-Inseln stetig erhöhte. Auch unterscheiden sich die Ergebnisse bezüglich primärer Non-Funktion, Kurz- und Langzeitfunktion der Transplantate. Zu Beginn unserer Versuche im Jahre 1999 verzeichneten wir 87,5% primäre Non-Funktionen und keine Langzeitfunktion nach Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln. Der Hauptgrund dafür lag möglicherweise in der zu geringen Funktionsfähigkeit der Inseln – als Folge der hohen enzymatischen und mechanischen Belastungen während ihrer Isolierung und Reinigung. Dieser hohe Prozentsatz konnte jedoch drastisch gesenkt werden. Im Jahre 2002 verzeichneten wir nur noch 18,2% primäre Non-Funktionen. Bis 2002 konnte insbesondere auch die Anzahl der Transplantate mit Langzeit-Funktion deutlich erhöht werden – auch dies ist ein Erfolg der zunehmenden Isolierungserfahrung und des schonenderen Umganges mit den fragilen Inseln. Nicht erklärbar ist zur Zeit der nahezu gleich bleibende Prozentsatz von Transplantaten mit Kurzzeit-Funktion. Eine Vermutung ist, dass die Immunisolation bei diesen Transplantaten unvollständig war (erste Beobachtungen). Insgesamt aber sind unsere Ergebnisse sehr ermutigend und zeigen, dass das porzine Inselgewebe durchaus eine Alternative zu den allogenen Transplantaten darstellen dürfte.

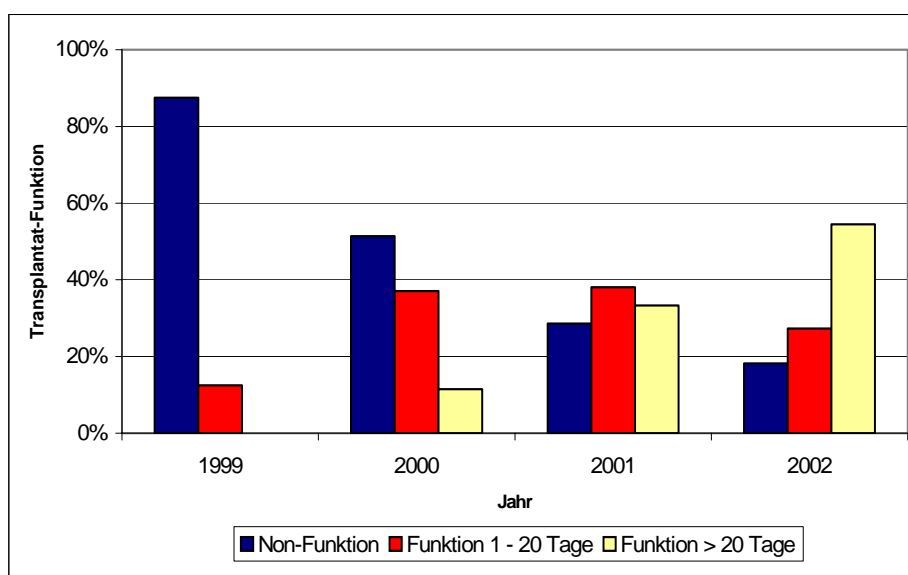


Abb. 28: Darstellung von primärer Non-Funktion, Kurz- und Langzeitfunktion nach Transplantation porziner Langerhans-Inseln im Verlauf von 4 Jahren.

5.6. Mögliche Ursachen des Transplantatversagens

Bei den histologischen Untersuchungen der explantierten Mikrokapseln konnten wir stark ausgeprägte Fibrosebildungen um die Mikrokapseln beobachten. Die Mikrokapseln waren mit Organoberflächen verwachsen und zeigten Gefäßeinsprossungen. Weiterhin konnten wir mittels immunhistologischer Untersuchungen deutliche Infiltrationen von Makrophagen, Granulozyten, CD4+ und CD8+ T-Zellen, NK-Zellen und Fibroblasten im interkapsulären Spalt nachweisen.

Die Ausbildung von Fibrose und die Infiltrationen mit Immunzellen können Ursachen für ein Versagen der Transplantatfunktion sein. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach den möglichen Ursachen der immunologischen Reaktionen auf die Mikrokapseln.

Eine mögliche Ursache ist die unvollständige Verkapselung einiger porziner Langerhans-Inseln, so dass es zum direkten Kontakt zwischen xenogenem Gewebe und dem Immunsystem des Empfängers kommen kann. Der gleiche Mechanismus kommt dann in Betracht, wenn Mikrokapseln bei der Transplantation beschädigt werden, und so porzine Inselzellen aus der Kapsel austreten und eine xenogene Immunreaktion des Empfängers induzieren.

Weiterhin könnte eine unzureichende Biokompatibilität des Verkapselungsmaterials eine unspezifische Fremdkörperreaktion verursachen. Diese induziert eine progressive Fibrosereaktion um die Kapseln und führt zu nachfolgender Nekrose der Inseln [50]. In diesem Zusammenhang spielt die Reinheit des Alginats eine besondere Rolle. Es wurde beschrieben, dass die Kapselfibrose mit zunehmender Unreinheit des Alginats an Stärke zunimmt [51]. Für unsere Transplantationen mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln verwendeten wir jedoch ein hochreines Barium-Alginat, das in löslicher Form eine ausgezeichnete Biokompatibilität *in vitro* aufwies (unveröffentlichte eigene Daten). Diese sehr gute Biokompatibilität bleibt fast vollständig auch über 250 Tage erhalten, nachdem 3-dimensionale, leere Mikrokapseln implantiert wurden. In wie weit die Fibrosierungen eine Folge des unvollständig verkapselten xenogenen Gewebes sind – die Herstellung von Doppelkapseln wird derzeit vorbereitet – oder aber durch aus den Kapseln austretende xenogene Peptide und/oder von Inselzellen produzierten Cytokinen und/oder durch das Insulin verursacht werden, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

In der Literatur wird eine Reihe von Ursachen für ein Versagen der mikroverkapselten Langerhans-Inseln diskutiert. Studien *in vitro* und *in vivo* zeigten, dass die zelluläre Reaktion auf verkapseltes und unverkapseltes Gewebe prinzipiell gleichartig ist, diese jedoch durch die Mikroverkapselung zeitlich verzögert wird. Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass die zelluläre Reaktion auf verkapseltes xenogenes Gewebe von löslichen Faktoren initiiert wird, welche durch die semipermeable Membran diffundieren können [52].

In anderen Studien wurde gezeigt, dass die Langzeit-Transplantatfunktion von der Spezies des Inselndependers abhängt. Je grösser der genetische Unterschied zwischen Spender und Empfänger, desto grösser ist das Ausmass der Fibrosereaktion. Dies gilt als Hinweis darauf, dass eine immunologische Erkennung der Inseln trotz der Kapselmembran erfolgt [53].

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Kapselgrösse. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sich, bei intraperitonealer Transplantation, grössere Kapseln frei in der Bauchhöhle bewegen, während kleinere Kapseln eher an Organen anhaften [54]. Bei Kapseln, die sich frei in der Bauchhöhle bewegen, kann es jedoch durch fehlende Vaskularisierung zu einer Mangelversorgung der Inseln kommen, was sich an zentralen Nekrosen der Inseln manifestiert [55]. Hier scheinen die kleineren Kapseln erheblich vorteilhafter zu sein, da sie durchweg eine ausgezeichnete Vaskularisierung zeigen. Allerdings nimmt man an, dass die kleineren Kapseln, die direkten Kontakt zu den abdominalen Organen haben, eher mit den Akteuren des Immunsystems in Kontakt kommen, was Abstossungsreaktionen (besser wohl: Funktionsverluste) zur Folge haben dürfte [54].

Eine Reihe von Publikationen weist einen Zusammenhang zwischen Transplantationserfolg und Anzahl der transplantierten Inseln nach. Mit steigender Anzahl der transplantierten Inseln lässt sich ein besserer Erfolg bezüglich der Regulierung des Glukosestoffwechsels erzielen [56-59]. Die hohe Rate primärer Non-Funktionen zu Beginn unserer Versuche könnte unter anderem auf eine zu geringe Anzahl funktionstüchtiger Langerhans-Inseln zurückzuführen sein.

5.7. Langzeitfunktion nach Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln

Bei der Langzeit-Funktion mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln muss ausgeschlossen werden, dass die dauerhafte Normoglykämie von regenerierten Pankreas-Inseln verursacht wird. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die Betazellen des Pankreas nach Schädigung durch STZ oder nach partieller Pankreatomie, regenerationsfähig sind [60-62]. Wir beobachteten bei STZ-diabetischen Wistar Ratten auch nach 75 Tagen keine spontane Normalisierung der Blutzuckerwerte, und in keinem der Tiere wurden vor Transplantation restliche Insulin-positive Zellen identifiziert. Allerdings konnten wir bei der Insulinfärbung des Pankreasgewebes ehemals STZ-behandelter Tiere, die nach Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln normoglykämisch geworden waren, einige wenige Insulin-positive Zellen nachweisen. Wir vermuteten aber, dass sie für eine dauerhafte Normalisierung der Blutzuckerwerte nicht ausreichen. Somit lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit sagen, dass die Langzeitfunktion bei den von uns untersuchten Tieren auf die Funktion der Transplantate zurückzuführen ist. Um diese Frage aber sicher beantworten zu können, sollte das Transplantat nach einer begrenzten Zeit und unter Normoglykämie explantiert werden; in unserem Transplantationsmodell ist dies nicht so einfach, da sich zwar die Mikrokapselfn mit der linken Nieren entfernen lassen, nicht aber die diversen Kapselaggregate aus der Bauchhöhle. Bei der Analyse des besten Transplantationsortes, Nierenkapsel versus Bauchhöhle versus andere Orte, sollte die Frage „*originäre Transplantat-Funktion oder Regeneration der eigenen Inseln*“ gezielt bearbeitet werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Alginat-mikroverkapselte porzine Langerhans-Inseln in der Lage sind, in Streptozotocin-diabetischen Ratten Normoglykämie zu induzieren, die in einem Grossteil der Tiere lange anhält. Weitere wichtige Schritte in Richtung klinischer Anwendung wären (a) die Kombination von Mikroverkapselung und milder Immunsuppression, um die Langzeitergebnisse weiter zu verbessern, (b) die Bestätigung unserer Ergebnisse im spontan-diabetischen Modell der BB/OK Ratte, das dem menschlichen Autoimmun-Diabetes eng verwandt ist und (c) die Bestätigung der Ergebnisse in den Kleintiermodellen im präklinischen Grosstiermodell (z.B. *Schwein-auf-Schwein*).

5.8. Ausblick

Auf Grund der sich stetig verbessernden Erfolge der experimentellen Transplantation isolierter porziner Langerhans-Inseln, besteht die begründete Hoffnung, dass mit diesem Transplantat dem Mangel an allogenen Insel-Transplantaten wirkungsvoll begegnet werden kann.

Eine unverändert grosse Hürde vor der Anwendung von Xenotransplantaten am Menschen ist das Problem der immunologischen Abstossung des Transplantates. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass dieses Problem durch Mikroverkapselung der xenogenen Langerhans-Inseln überwindbar ist. So kann auf eine dauerhafte Immunsuppression weitgehend verzichtet werden. Damit hätten auch sehr junge Type I Diabetiker eine Chance von dieser Therapieform zu profitieren.

Jüngsten Verlautbarungen zu Folge wird das Prinzip der Mikroverkapselung für die Immunisolation allogener Inselzell-Transplantate jetzt auch klinisch verwendet. Ergebnisse sind noch nicht bekannt [63]. Es gibt also keinen vernünftigen Grund, porzine Langerhans-Inseln, die sich – wie hier gezeigt – erfolgreich in Barium-Alginat verkapseln lassen, von der klinischen Transplantation auszuschliessen. Eine Ausnahme hiervon macht die biologische Sicherheit. Was sie angeht, so deuten bisherige Forschungsergebnisse darauf hin, dass die so genannten porzinen endogenen Retroviren (PERV) zwar *in vitro* menschliche Zellen infizieren können [64]; *in vivo* jedoch wurden bisher keine Infektionen beobachtet [65]. Mit der Züchtung von Tieren, die keine humantropen Viren freisetzen oder der Entwicklung eines Impfstoffes gegen PERV, könnte die biologische Sicherheit bei der Übertragung porziner Zellen und Gewebe weiter erhöht werden [66]. Aus eigenen, unveröffentlichten Untersuchungen wissen wir bereits, dass die Mikroverkapselung selbst ein wirkungsvoller Schutz ist.

Diese xenogene Transplantation ist auch deshalb klinisch so reizvoll, weil humanes und porzines Insulin bis auf eine Aminosäure kompatibel sind. Insofern ist jede Anstrengung gerechtfertigt, um dieses xenogene Transplantat biologisch und immunologisch so sicher wie möglich und physiologisch so effizient wie möglich zu machen. Nach unseren Erfahrungen erscheint es durchaus möglich, dieses spezielle Transplantat den Erfordernissen der klinischen Transplantation anzupassen, womit eine alternative Therapie des Typ I Diabetes in greifbare Nähe rückt.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung des Modells „Ratte-anti-Schwein“ zur xenogenen Transplantation mikroverkapselter Langerhans-Inseln. Funktionelle und histologische Analysen geben Auskunft über das Schicksal der Inselzell-Transplantate in den diabetischen Ratten.

Isolierung, Kultivierung und die Mikroverkapselung der porzinen Langerhans-Inseln mit hochreinen Alginaten erfolgen in der eigenen Arbeitsgruppe. 8-12 Wochen alte, männliche Wistar Ratten wurden mittels Streptozotozin (STZ) diabetisiert und erhielten mikroverkapselte porzine Langerhans-Inseln unter die linke Nierenkapsel und intraperitoneal. Weder vor noch nach Transplantation erfolgte eine medikamentöse Immunsuppression. Zur Beurteilung des metabolischen Verlaufes wurden nach Transplantation regelmässig Blutzuckerwerte und Gewicht bei den Empfängertieren bestimmt. Zusätzlich erfolgte der orale Glukose-Toleranztest. Zur histologischen und immunhistochemischen Beurteilung wurden Leber, Pankreas, beide Nieren, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Omentum, Mesenterium, sowie intra-peritoneal verbliebene Mikrokapseln explantiert.

In Anlehnung an die in Kapitel 2 gestellten Fragen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. *In-Vitro*-Funktionsanalysen porziner Langerhans Inseln zeigten, dass diese nach Glukosestimulation Insulin reguliert freisetzen. Eine Langzeitkultur der Inseln wirkt sich nachteilig auf die Inselfunktion aus. Durch Zugabe von Nicotinamid zum Kulturmedium kann die Inselfunktion restauriert und somit eine Verbesserung der Inselvitalität erzielt werden. Nach der Isolierung der porzinen Langerhans-Inseln erfolgte deren 1-2 tägige Kultivierung unter sterilen Bedingungen und unter Zusatz von Nicotinamid zum Kulturmedium. Sodann wurden die porzinen Langerhans-Inseln mit hochreinem Barium-Alginat mikroverkapselt und erneut für 24 Stunden steril in selbigem Medium kultiviert. Kurz vor der Transplantation wurde eine weitere Vitalitätsprüfung der mikroverkapselten Langerhans-Inseln durchgeführt. So wurde gewährleistet, dass nur ausreichend vitale Transplantate übertragen wurden.
2. Um die Sicherheit der STZ-Behandlung zur Diabetesinduktion einschätzen zu können, wurde eine Kontrollgruppe von Wistar Ratten mit STZ behandelt und sodann deren Blutzucker- und Gewichtsverläufe über mehrere Tage, in einem Fall sogar bis zu 75 Tagen

dokumentiert. Bei keinem Tier kam es zu einer spontanen Normalisierung der Blutzucker- und Gewichtswerte. Mittels immunhistochemischer Insulinfärbung am Pankreas dieser Tiere wurden keine restliche Insulin-positive Zellen identifiziert. Damit war sichergestellt, dass STZ einen stabilen Diabetes induziert.

3. Die Transplantation mikroverkapselter Langerhans-Inseln führte bei Empfängertieren zu Normoglykämien unterschiedlicher Dauer. Bereits 24 Stunden nach erfolgreicher Transplantation zeigten die Empfängertiere in der Regel physiologische Blutzuckerwerte. Die typischen Symptome des Diabetes mellitus, wie Polyurie und Polydipsie wurden nicht mehr beobachtet und es konnte in der folgenden Zeit eine deutliche Gewichtszunahme verzeichnet werden. Bei einigen Empfängertieren kam es nach Transplantation der mikroverkapselten Langerhans-Inseln nicht zur Normoglykämie. Drei Gruppen kristallisierten sich heraus: (a) Empfängertiere mit primärer Non-Funktion des Transplantates, (b) Empfängertiere mit Transplantat-Kurzzeitfunktion (Transplantat-Funktion bis zu 20 Tagen) und (c) Empfängertiere mit Transplantat-Langzeitfunktion (Transplantat-Funktion mehr als 20 Tage und bis zu mehr als 500 Tagen). Im Vergleich dazu wurden auch Wistar Ratten mit unverkapselten porzinen Langerhans-Inseln transplantiert. Hier zeigte sich stets eine fehlende bzw. nur wenige Tage andauernde Transplantatfunktion. Bei erfolgreich transplantierten Empfängertieren mündete die orale Glukosebelastung in einer physiologischen Blutzuckerregulation. Diese unterschied sich nicht von jener gesunder Kontrolltiere.
4. Nach dem Versagen der Transplantatfunktion erfolgten Organentnahmen und makroskopische Inspektionen: Sie zeigten die Unversehrtheit der abdominellen Organe und die Unversehrtheit der transplantierten Mikrokapseln. Die Mikrokapseln waren in nahezu allen Fällen stark kapillarisiert. Die histologischen Untersuchungen der explantierten Mikrokapseln zeigten unterschiedlich stark ausgeprägte Fibrosierungen der Mikrokapseln, sowie Infiltrationen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen und Fibroblasten im interkapsulären Spalt. Insulinfärbungen der Pankreata der Empfängertiere zeigten nur wenige bzw. keine Insulin-positiven Zellen, was einerseits die zuverlässige Wirkung des STZ bestätigt, andererseits für die Wirkung des transplantierten Gewebes spricht.
5. Die Implantation leerer Alginat-Mikrokapseln für bis zu 250 Tage und deren anschließende histologische Untersuchung zeigte, dass hier keine Fibrosierungen und nur ein geringer Besatz mit Empfängerzellen stattfindet – im Gegensatz zu Mikrokapseln, die porzine

Langerhans-Inseln enthalten. Damit konnte gezeigt werden, dass das Kapselmaterial per se biokompatibel ist.

Die Transplantation von Langerhans-Inseln stellt eine attraktive Möglichkeit der Therapie des Typ I Diabetes mellitus dar. Durch Mikoverkapselung des Gewebes kann dieses vom Empfänger-Immunsystem abgeschirmt werden und so kann auf die herkömmliche Immunsuppressiva nach Transplantation verzichtet werden. Die xenogene Transplantation von Langerhans-Inseln des Schweins bietet zudem die Möglichkeit, den gravierenden Mangel an menschlichen Spenderorganen zu überwinden. Die verbesserte Isolierung der porzinen Inseln ist ein wesentlicher Beitrag zu diesem Transplantations-Konzept.

Im experimentellen Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass nach Transplantation mikrokapselter porziner Langerhans-Inseln eine dauerhafte Normalisierung der Blutzuckerwerte möglich ist. Weitere Untersuchungen müssen nun dazu beitragen, die Transplantation der xenogenen Langerhans-Inseln noch effizienter zu machen, damit sich dieses Verfahren in Zukunft zu einer leicht zu handhabenden und sicheren Therapieoption für Typ I Diabetiker entwickeln kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Bottazzo GF, Florin-Christiansen F, Doniach D (1974): Islet-cell antibodies in the diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 7892: 1279-1283
2. Skyler JS (1979): Complications of diabetes mellitus. Relationship to metabolic dysfunction. *Diabetes Care* 2: 499-509
3. Lendrum R, Walker G, Gamble DR (1975): Islet cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset. *Lancet* 7912: 880-883
4. Naji A, Silvers WK, Barker CF (1983): Autoimmunity and type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Transplantation* 36: 355-360
5. Bartens W (1997): Lösen Retroviren Typ-I-Diabetes aus?. *Dtsch Med Wschr* 122: A9
6. Besse J, Billaud L, Battistelli F, Tric P, Lestradet F (1981): Long term study of mortality and vascular complications in juvenile-onset (type I) diabetes. *Diabetes* 30: 175-179
7. Pontiroli AE, Calderara A, Bonisolli L, DePasqua A, Maffi P, Margonato A, Radaelli G, Gallus G, Pozza G (1986): Genetic and metabolic risk factors for the development of microangiopathy complications in type I diabetes mellitus (DM). *Transplant Proc* 18: 1487-1490
8. Tchobroutsky G (1978): Relation between diabetic control and development of microvascular complications. *Diabetologia* 15: 143-152
9. Davies MD (1986): Diabetic retinopathy, diabetes control and blood pressure. *Transplant Proc* 18: 1565-1588
10. Berglund J, Lins LE (1986): Prognosis in diabetic nephropathy: a six year follow up. *Transplant Proc* 18: 1661-1664

11. Morgensen CE, Steffes MW, Deckert T, Sandahl-Christiansen J (1981): Functional and morphological renal manifestations in diabetes mellitus. *Diabetologia* 21: 89-93
12. Deckert T, Poulsen JE (1981): Diabetic neuropathy: Fault or destiny? *Diabetologia* 21: 178-183
13. Clarke BF, Ewing DJ, Campbell IW (1979): Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetologia* 17: 195-212
14. Levy DM, Abraham RM (1986): Improved detection of early diabetic neuropathy using studies of medical plantar nerve. *Transplant Proc* 18: 1588-1590
15. The diabetes control and complications trial research group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86
16. Hering BJ, Brendel MD, Schultz AO, Schultz B, Bretzel RG (1999): International islet transplant registry. Justus-Liebig-Universität, Giessen. Newsletter No. 8: 1-20
17. Moskalewski S (1965): Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol* 5: 342-353
18. Lacy PE, Kostianovsky M (1967): Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39
19. Bretzel RG, Browatzki CC, Schultz A, Brandhorst H, Klitscher D, Bollen CC, Raptis G, Friemann S, Ernst W, Rau WS, Hering BJ (1993): Klinische Inseltransplantation bei Diabetes mellitus. *Diab Stoffw* 2: 378-390
20. Brandhorst D, Brandhorst H, Brendel M, Bretzel RG (1998): Problematik der Inselisolierung aus humanen und porcinen Pankreata zum Zweck der Transplantation beim Menschen. *Zentralbl Chir* 123: 814-822

21. Shapiro JAM, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000): Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343: 230-238
22. Cooper DKC, Ye Y, Rolf Jr LL, Zuhdi N (1991): The pig as potential organ donor for man. In: Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K, White DJG (Eds): *Xenotransplantation. The transplantation of organs and tissues between species*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York; p 481-500
23. Lüllmann H, Mohr K (1999): *Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme-Verlag
24. Lim F, Sun AM (1980): Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210: 908-910
25. Hasse C, Klöck G, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M (1997): Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *Lancet* 350: 1296-1297
26. Soon-Shiong P, Feldmann E, Nelson R, Komtebedde J, Smidsrod O, Skjåk-Bræk G, Espevik T, Heintz R, Lee M (1992): Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets. *Transplantation* 54: 769-774
27. Fritschy WM, de Vos P, Groen H, Klatter FA, Pasma A, Wolters GH, van Schilfgaarde R (1994): The capsular overgrowth on microencapsulated pancreatic islet grafts in streptozotocin and autoimmune diabetic rats. *Transplant Int* 7: 264-271
28. Sun YL, Ma XY, Zhou DB, Vacek I, Sun AM (1996): Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J Clin Invest* 98: 1417-1422
29. Jain K, Asina S, Yang H, Blount ED, Smith BH, Diehl CH, Rubin AL (1999): 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

30. Krickhahn M, Meyer T, Bühler C, Thiede A, Ulrichs K (2001): Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation: Numbers, purity, yield and in vitro function. *Ann Transplant*, 6: 48-54
31. Ricordi C, Finke EH, Lacy PE (1986): Method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. *Diabetes* 35: 649-653
32. Heiser A, Ulrichs K, Müller-Ruchholtz W (1994): Isolation of porcine pancreatic islets: low trypsin activity during the isolation procedure guarantees reproducible high islet yields. *J Clin Lab Anal* 8: 407-411
33. Zekorn T, Horcher A, Siebers U, Schnettler R, Klöck G, Hering B, Zimmermann U, Bretzel RG, Federlin K (1992): Barium-cross-linked alginate beads: a simple, one-step method for successful immunoisolated transplantation of islets of Langerhans. *Acta Diabetol* 29: 99-106
34. Ishaque A, Al-Rubeai M (2002): Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by bcl-2 during hybridoma cell culture. *Apoptosis* 7: 231- 239
35. Federlin K, Bretzel RG, Hering BJ (1991): Pancreatic islet transplantation in diabetes. *Int J Artif Organs* 14: 74-77
36. Federlin KF (1993): Islet transplantation. The connection of experiment and clinic exemplified by the transplantation of islets of Langerhans. *Exp Clin Endocrinol* 101: 334-345
37. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F (2000): Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49: 157-162
38. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R (2001): Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292: 1389-1394

39. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzuckerman M (2001): Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50: 1691-1697
40. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewics K, Song KH, Sharma A, O'Neill JJ (2000): In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Sci USA* 97: 7999-8004
41. Ramiya VK, Marasist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG (2000): Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6: 278-282
42. Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT, Korbitt GS, Rajotte RV, Bryer-Ash M, Boylan MO, Wolfe MM, Kieffer TJ (2000): Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 290: 1959-1962
43. Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW (2000): Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 408: 483-488
44. Ar'Rajab A, Bengmark S, Ahren B (1991): Insulin secretion in streptozotocin-diabetic rats transplanted with immunoisolated islets. *Transplantation* 51: 570-574
45. Tatarkiewicz K, Sitarek E, Sabat M, Orłowski T (1997): Reversal of hyperglycemia in streptozotocin-diabetic mice by xenotransplantation of microencapsulated rat islets. *Ann Transplant* 2: 20-23
46. Zekorn T, Siebers U, Horcher A, Schnettler R, Zimmermann U, Bretzel RG, Federlin K (1992): Alginate coating of islets of Langerhans: in vitro studies on a new method for microencapsulation for immunoisolated transplantation. *Acta Diabetol* 29: 41-45
47. Fan MY, Lum ZP, Fu XW, Levesque L, Tai IT, Sun AM (1990): Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetes* 39: 519-522

48. Zekorn T, Horcher A, Siebers U, Federlin K, Bretzel RG (1999): Synergistic effects of microencapsulation and immunoalteration on islet allograft survival in bioartificial pancreas. *J Mol Med* 77: 193-198
49. Meyer T (2000): Untersuchung der Bindegewebsstruktur und ihrer enzymatischen Digestion im Schweinepankreas als Grundlage für die Verbesserung der Isolierung von Langerhans-Inseln. Inaugural-Dissertation der Medizinische Fakultät der Universität Würzburg
50. Federlin K, Hering BJ, Bretzel RG: Islet transplantation: clinical and experimental. *Horm Metab Res Suppl* 26: 148-151
51. Van Schilfgaarde R, de Vos P (1999): Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. *J Mol Med* 77: 199-205
52. Siebers U, Horcher A, Brandhorst H, Brandhorst D, Federlin K, Bretzel RG, Zekorn T (1998): Time course of the cellular reaction towards microencapsulated xenogeneic islets in the rat. *Transplant Proc*: 494-495
53. Siebers U, Horcher A, Bretzel RG, Federlin K, Zekorn T (1997): Alginate-based microcapsules for immunoprotected islet transplantation. *Ann NY Acad Sci* 31; 831: 304-312
54. De Vos P, de Haan B, Pater J, van Schilfgaarde R (1996): Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation and survival of microencapsulated rat islet allografts. *Transplantation* 62: 893-899
55. De Vos, van Straaten JF, Nieuwenhuizen AG, de Groot M, de Haan BJ, van Schilfgaarde R (1999): Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth? *Diabetes* 48: 1381-1388
56. Ar'Rajab A, Dawidson IJ, Harris RB, Stenementes JT (1994): Effect of the number of islets on the outcome after transplantation in streptozotocin-diabetic rats. *Horm Metab Res* 26: 355-359

57. Beattie GM, Hayek A (1993): Islet cell mass and the longevity of islet grafts in diabetic rats. *Cell Transplant* 2: 119-122
58. Henriksson C, Bergmark J, Claes G (1977): Metabolic response to isologous transplantation of small numbers of isolated islets of Langerhans in the rat. *Eur Surg Res* 9: 411-418
59. Keymeulen B, Teng H, Vetri M, Gorus F, In't P, Pipeleers DG (1992): Effect of donor islet mass on metabolic normalization in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 35: 719-724
60. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schupp GT, Smith FE (1993): A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42: 1715-1720
61. Guz Y, Nasir T, Teitelmann G (2001): Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 142: 4956-4968
62. Finegood DT, Weir GC, Bonner-Weir S (1999): Prior streptozotocin treatment does not inhibit pancreas regeneration after 90% pancreatectomy in rats. *Am J Physiol* 276: E822-827
63. Calafiore R, University of Perugia, Italy (2004): First microencapsulated human islet transplant in a type I diabetic patient (a 10 patient closed pilot trial by the Italian Institute of Health). E-mail message, 3rd June 2004 (www.DiabetesPortal.com)
64. Specke V, Denner J (2003): Porzine endogene Retroviren (PERVs) und Xenotransplantation: Ein Risiko für Rezipient und Gesellschaft? *Dtsch Med Wochenschr* 23: 1301-1306
65. Irrgang M, Sauer IM, Karlas A, Zeilinger K, Gerlach JC, Kurth R, Neuhaus P, Denner J (2003). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): No infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J Clin Virol* 28: 141-154

66. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Xenotransplantation (DAX): 7. Minisymposium Xenotransplantation, Berlin, Juni 2004

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik (Chirurgie I; Zentrum für Operative Medizin), für die Überlassung des Arbeitsplatzes, sowie die finanzielle und technische Unterstützung meiner Arbeit aus Mitteln der Grundausrüstung.

Für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung in allen praktischen und theoretischen Fragen danke ich ganz besonders herzlich Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Chirurgischen Forschung und Experimentellen Transplantations-Immunologie, in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I.

Sehr herzlich danken möchte ich Frau I. Chodnevskaja, die mich bei allen histologischen und immunhistochemischen Arbeiten stets sehr tatkräftig unterstützte; der sehr hohe technische und zeitliche Aufwand der hier vorgestellten Arbeiten bedingte, dass viele der hier präsentierten Ergebnisse gemeinsam mit ihr erarbeitet wurden.

Im Übrigen gilt mein ganz besonderer Dank allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen Chirurgische Forschung und Experimentelle Transplantations-Immunologie, die mir mit praktischer Hilfe und stets freundschaftlich zur Seite standen.

Besonders danken möchte ich auch Herrn Dr. med. C. Bühler, der mich in die mikrochirurgischen Techniken der Transplantation im Kleintiermodell einführte.

Die vorliegende Arbeit entstand mit großzügiger finanzieller Unterstützung durch das IZKF Würzburg, Teilprojekt D3. Dem BMBF und dem Klinikum der Universität Würzburg danke ich an dieser Stelle für die gewährte finanzielle Unterstützung sehr herzlich.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Breuer
Vorname: Christiane Susanne
Geburtsdatum: 18. Januar 1975
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1981-1991 Polytechnische Oberschule Chemnitz

Ausbildung

1992-1995 Ausbildung zur Kinderkrankenschwester, Universität Würzburg

Abitur

1995-1998 Freiberg-Kolleg, Institut zur Erlangung der Hochschulreife

Studium

11/1998-11/2004 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
29.09.2000 Physikum
11.04.2002 I. Staatsexamen
19.09.2003 II. Staatsexamen
09.11.2004 III. Staatsexamen