

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik

Chirurgische Klinik I

der Universität Würzburg

(Direktor: Professor Dr. med. Prof. h. c. A. Thiede)

**Entwicklung einer mikroskopierbaren Perfusions-
Kulturkammer für die Kultivierung, die *In-Vitro*-
Vitalitäts- und die Funktionsdiagnostik von endokrinen
Zellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Alexander Georg Kerscher

aus Würzburg

Würzburg, Juli 2006

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

Koreferent: Professor Dr. med. Prof. h. c. A. Thiede

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

31.10.2006

Der Promovend ist Arzt

Meiner lieben Schwester

Abkürzungsverzeichnis und Definitionen

CPS	Counts Per Second
DTZ	Dithizon
PI	Propidiumjodid
FDA	Fluoreszeindiacetat
FCS	Fetal Calf Serum
PS	Porzines Serum
HRP	Horse Raddisch Peroxidase
RIA	Radio-Immuno-Assay
IEQ	Insel-Äquivalent(e)
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent Assay
RS	Rattenserum
PTH	Parathormon
ABTS	Farbstoff (2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid])

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Fragen	7
3. Material und Methoden	8
3.1. Untersuchungsmaterial.....	8
3.1.1. Isolierung und Reinigung der Langerhans-Inseln	8
3.1.2. Berechnung der Inseläquivalente	8
3.1.3. Mikroverkapselung der Langerhans-Inseln.....	9
3.2. Nachweismethoden	9
3.2.1. FDA-PI-Färbung	9
3.2.2. Zinquin-Färbung.....	10
3.2.3. Dithizon-Färbung	10
3.2.4. Glukose- und Elektrolytbestimmungen.....	11
3.2.5. Insulinbestimmungen	11
3.2.5.1. EASIA-Kit von BioSource.....	11
3.2.5.2. Selbst entwickelter ELISA	11
3.2.6. Parathormonbestimmung.....	12
3.3. Konstruktion der Kulturkammern	12
3.3.1. Werkstoffe und Herstellung	13
3.3.2. Zubehör	13
3.3.3. Verwendete Kammern.....	15
3.3.3.1. <i>Gradient-Culture-Container</i> von Minucells	15
3.3.3.2. <i>Würzburger Kammer V1_A</i>	15
3.3.3.3. <i>Würzburger Kammer V2_A</i>	16
3.3.3.4. <i>Würzburger Kammer V3_{SMT}</i>	16
3.3.3.5. <i>Würzburger Kammer V4_{SMT}</i>	16
3.3.3.6. <i>Würzburger Kammer V5_{SM}</i>	17
3.3.3.7. <i>Würzburger Kammer V6_{SMTE}</i>	17
3.4. Kultivierung der Langerhans-Inseln	18
3.4.1. Kultivierung in der Zellkulturflasche	18
3.4.2. Aufbau der Perfusionskultur	18
3.5. Versuche zur Kammerkinetik	19
3.5.1. Kinetik der Kammer V5 _{SM}	20
3.5.2. Kinetik der Kammer V6 _{SMTE}	20
3.6. Perifusion als In-Vitro-Funktionstest.....	21
3.6.1. Perifusion mit der Apparatur <i>Suprafusion</i> [®] der Fa. Brandel.....	21
3.6.2. Perifusion mit der <i>Würzburger Kammer</i>	22
3.6.3. Perifusion von humanen Nebenschilddrüsen	22
3.7. Lichtmikroskopische Analysen mit der Würzburger Kammer	22
3.7.1. Auflichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie	23
3.7.2. Durchlichtmikroskopie.....	23
3.7.3. 3-Dimensionale Rekonstruktion einer Alginat-Mikrokapsel	23
3.8. Statistische Auswertung	24
3.9. Internet- und Literaturrecherche, Literaturverwaltung.....	24
3.10. Fotodokumentation	24
4. Ergebnisse	25
4.1. Untersuchungen zu Zellkultur und Funktionsdiagnostik von Langerhans-Inseln ...	25
4.1.1. Einfluss des Serums im Medium auf die Vitalität.....	25

4.1.2.	Funktionsprüfung mit der Apparatur <i>Suprafusion</i> ® von Brandel.....	29
4.2.	Entwicklung eines Perfusionskultur-Systems Würzburger Kammer.....	34
4.2.1.	Perfusionskultur mit dem <i>Gradient-Culture-Container</i> ® von Minucells.....	35
4.2.2.	Zubehör zum System der <i>Würzburger Kammer</i>	35
4.2.3.	<i>Würzburger Kammer V1_A</i>	37
4.2.4.	<i>Würzburger Kammer V2_A</i>	38
4.2.5.	<i>Würzburger Kammer V3_{SMT}</i>	39
4.2.6.	<i>Würzburger Kammer V4_{SMT}</i>	40
4.2.7.	<i>Würzburger Kammer V5_{SM}</i>	41
4.2.8.	<i>Würzburger Kammer V6_{SMTE}</i>	42
4.2.9.	Temperaturregulation von <i>V3_{SMT}</i> , <i>V4_{SMT}</i> und <i>V6_{SMTE}</i>	45
4.3.	Kultivierung von Zellen und Geweben mit der <i>Würzburger Kammer</i>	47
4.4.	Perifusion mit der <i>Würzburger Kammer</i>	50
4.4.1.	Grundlagen.....	50
4.4.1.1.	Kinetik der Kammern <i>V5_{SM}</i> und <i>V6_{SMTE}</i>	50
4.4.1.2.	Reaktionszeit <i>TR₀</i> und <i>TR₈₀</i> in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit.....	53
4.4.1.3.	Reaktionszeit <i>TR₀</i> und <i>TR₈₀</i> in Abhängigkeit vom Kammervolumen.....	55
4.4.1.4.	Verteilung von einströmendem Medium in der Kammer <i>V6_{SMTE}</i>	57
4.4.2.	Ergebnisse von verschiedenen Anwendungen der <i>Würzburger Kammer</i>	57
4.4.2.1.	<i>In-Vitro</i> -Funktion isolierter Langerhans-Inseln nach 5tägiger Perfusionskultur in der <i>Würzburger Kammer</i>	57
4.4.2.2.	Variation der Glukosekonzentration.....	59
4.4.2.3.	<i>In-Vitro</i> -Funktion der Nebenschilddrüsen in der <i>Würzburger Kammer</i>	61
4.5.	Mikroskopieren mit der <i>Würzburger Kammer</i>	62
4.6.	Eigenentwicklung eines Insulin-ELISA.....	65
5.	Diskussion	68
5.1.	Untersuchungen zur Zellkultur der Langerhans-Inseln.....	68
5.2.	Untersuchungen zur Perifusion der Langerhans-Inseln.....	71
5.3.	Mikroskopie der Langerhans-Inseln in Zellkultur.....	73
5.4.	Die Perfusionskultur als Konzept für die Kombination von Zellkultur und Diagnostik.....	73
5.5.	Entwicklung der <i>Würzburger Kammer</i>	75
5.6.	Kultur, Perifusion und Mikroskopie mit der <i>Würzburger Kammer</i>	79
5.7.	Kostengünstige Eigenentwicklung eines Insulin-ELISA.....	82
6.	Zusammenfassung	83
7.	Literaturverzeichnis	85

Anhang

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Störung des Glukosestoffwechsels mit relativem oder absolutem Insulinmangel, und er ist die häufigste Endokrinopathie überhaupt. Unterschieden wird zwischen dem Typ I (*insulin dependent diabetes mellitus*, IDDM, insulinabhängiger Diabetes mellitus), dem Typ II (*non-insulin-dependent diabetes mellitus*, NIDDM, insulinunabhängiger Diabetes mellitus) und anderen spezifischen Typen (genetische Defekte in der β -Zellfunktion oder der Insulinwirkung, etc.). Der Diabetes mellitus Typ I manifestiert sich typischerweise im Jugendalter und beruht auf einer Autoimmunität, die mit irreversibler Zerstörung der β -Zellen in den Langerhans-Inseln einhergeht. Diese durch genetische Faktoren begünstigte Entzündung wird meist durch Autoantikörper wie Inselzellantikörper (ICA), Insulinautoantikörper (IA) oder Antikörper gegen die Glutamat-Decarboxylase und Tyrosinphosphatase IA-2 ausgelöst, begleitet von einer Infiltration der Langerhans-Inseln mit autoreaktiven T-Lymphozyten [1-4]. Der Diabetes mellitus Typ II hingegen beruht auf einer gestörten Insulinfreisetzung und einer verminderten Insulinwirkung bei erhaltenen Langerhans-Inseln, betrifft vorwiegend ältere Menschen und ist als typische „Wohlstandskrankheit“ häufig mit dem metabolischen Syndrom assoziiert. Ein absoluter Mangel an Insulin besteht also nur beim Typ I Diabetes. Dieser Mangel muss lebenslang durch Substitution des Insulins ausgeglichen werden.

Die erste exakte Beschreibung der Symptome eines Diabetes mellitus Typ I stammt von Aretaeus von Kappadozien und liegt fast zwei Jahrtausende zurück. Die Pathophysiologie jedoch blieb bis ins letzte Jahrhundert unbekannt. Erste zufällige Entdeckungen hierzu wurden nicht richtig gedeutet und gerieten in Vergessenheit. 1869 entdeckte Langerhans die später nach ihm benannten Zellansammlungen im Pankreas, ohne sich jedoch über deren Funktion klar zu werden. Erst 1921, als Bennet und Best das Insulin aus der Bauchspeicheldrüse isolieren und Anfang 1922 einen im hyperosmolaren Koma liegenden Patienten durch Insulininjektionen retten konnten, erkannten sie, dass die Therapie des Diabetes mellitus Typ I durch die Substitution mit Insulin möglich ist. Die Ehrung der beiden Forscher bereits 1923 mit dem Nobelpreis für Medizin unterstreicht die enorme Bedeutung, welche die Entdeckung hatte – bis heute, denn noch immer gilt für Patienten mit Typ I Diabetes dasselbe Prinzip: Messen und Spritzen. Von Beginn der Erkrankung an muss der Blutzucker engmaschig kontrolliert, Insulin substituiert und eine komplizierte Diät eingehalten werden. Die Patienten sind in ihrer Lebensqualität stark eingeschränkt,

und auch mehrmals tägliche Kontrollen des Blutzuckers mit genau angepasster Dosierung des Insulins können Folgekrankheiten nur hinauszögern. Diese Sekundärkomplikationen sind Mikro- und Makroangiopathien [5,6], die Neuropathie [7], die Nephropathie [8,9] und die diabetische Retinopathie. Sie bestimmen auch heute noch das Schicksal eines Diabetikers. Ursache für diese Schäden sind nicht-enzymatische Glykosylierungen von Proteinen durch Glukose in einer irreversiblen Reaktion, die Proteine funktionsunfähig macht oder zu deren verkürzter Lebensdauer führt [10]. Diese so genannte „Glycierung“ von Proteinen hängt von der Dauer und der Höhe der Glukoseexposition ab – tatsächlich kommt es bislang auch unter intensivierter Therapie unweigerlich zu hyperglykämischen Exkursionen mit stark erhöhter Glukoseexposition [11].

Eine optimale Therapie des Diabetes mellitus Typ I muss also Sekundärkomplikationen sicher verhindern und trotzdem die Lebensqualität des Patienten erhalten – bei vertretbarem medizinischem und finanziellem Aufwand. Beim Typ I Diabetiker gibt es bislang zum Ausgleich des endogenen Insulinmangels nur wenige Alternativen zum Messen und Spritzen. Eine klinische Alternative ist die Substitution von Insulin über implantierte Insulinpumpen, die so genannte *continuous subcutaneous insulin infusion* (CSII) die auch schlicht als *pump therapy* bezeichnet wird. Hier wird subkutan über eine portable Pumpe Insulin appliziert und somit ein basaler Insulinspiegel im Blut garantiert. Zu den Mahlzeiten müssen die Patienten jedoch weiterhin Blutzucker messen und Insulin spritzen [12]. Eine vollautomatische Lösung mit implantierter kontinuierlicher Glukosemessung und angepasster Insulininfusion über eine implantierte Pumpe ist momentan noch ein theoretisches Konzept [13]. Im Erprobungsstadium befindet sich die inhalative Applikation von Insulin. Sie befreit die Patienten zwar vom subkutanen Spritzen des Insulins, die vom Körper aufgenommene Dosis ist aber unsicher und auch hier muss weiterhin der Blutzucker gemessen werden [14]. Ein attraktiver Ansatz ist die Transplantation insulinproduzierenden Gewebes. Hier existieren mehrere Alternativen:

- die Transplantation des gesamten vaskularisierten Pankreas,
- die Transplantation von isolierten humanen oder xenogenen Langerhans-Inseln,
- die Transplantation von verkapselten isolierten Langerhans-Inseln
- und die Transplantation von β -Zellen, die durch *tissue engineering* aus Stammzellen oder anderen Vorläuferzellen gezüchtet werden.

Weltweit wurden von 1978 bis Ende 2004 insgesamt mehr als 23.000 Pankreastransplantationen durchgeführt [15]. In speziellen Zentren liegt die 1-Jahres-Funktionsrate bei simul-

taner Nierentransplantation mittlerweile bei etwa 90%. Grundsätzlich besteht heutzutage die Indikation zur isolierten Pankreastransplantation bei jedem Typ I Diabetiker mit einem trotz aller konservativen Therapiemaßnahmen extrem instabilen Diabetes; da jedoch nach einer Transplantation eine lebenslange Immunsuppression notwendig ist, müssen die Nebenwirkungen einer solchen immunsuppressiven Therapie gegen die Langzeitfolgen des Diabetes abgewogen werden [16]. Zu bedenken sind auch die hohen Kosten der Transplantation und der Nachsorge. Aufgrund der Häufigkeit des Typ I Diabetes kommt der Mangel an Spenderorganen als limitierender Faktor hinzu.

Da die exokrine Funktion des Pankreas leicht medikamentös zu substituieren ist, und nach einer Pankreasvolltransplantation das Pankreassekret aufwändig und komplikationsreich in die Blase oder den Darm drainiert werden muss, ist der Ansatz, isolierte humane Langerhans-Inseln zu transplantieren, konsequenter. Hier wird gezielt die gestörte endokrine Funktion des Pankreas ersetzt. Nach Angaben des Internationalen Transplantationsregisters wurden von 1990 bis 2004 weltweit insgesamt 941 allogene Inseltransplantationen bei Patienten mit Diabetes Typ I durchgeführt. Das 1-Jahres-Transplantatüberleben konnte in den erfahrenen Zentren auf zuletzt 79% gesteigert werden, jedoch bleiben nur 10% aller Patienten länger als fünf Jahre insulinunabhängig [17]. Auch bei dieser Therapieform ist eine lebenslange Immunsuppression notwendig, und für die breite klinische Anwendung ist der Spendermangel limitierend.

Um das Problem des Spendermangels zu umgehen, wurden verschiedene Lösungsansätze geprüft, welche die Verwendung tierischen Gewebes beinhalten (Xenotransplantation). Der zunächst nahe liegende Ansatz, wegen der phylogenetischen engen Verwandtschaft Primaten als Spender zu verwenden (z. B. Orang-Utans, Schimpansen, Paviane), scheidet aus mehreren Gründen aus: So besteht neben der Bedrohung nahezu aller Arten ein erheblicher ethischer Vorbehalt in der Bevölkerung gegen eine solche Nutzung. Ebenso sind, gerade wegen der engen Verwandtschaft, die Gefahren von Krankheitsübertragungen nicht abzuschätzen, man denke an das HI-Virus und an das Hepatitisvirus, welche ursprünglich von Primaten auf den Menschen übertragen wurden. Aufwändig und teuer sind schließlich auch die Zucht und Haltung dieser Tiere.

Ein aus entwicklungsgeschichtlicher Sicht größerer Schritt ist die Verwendung von Nutztieren (Rind, Schaf, Schwein) für die xenogene Inseltransplantation. Von diesen potentiell-

len Spendern erscheint das Schwein gut geeignet, da sich das porcine Insulin lediglich in einer Aminosäure vom humanen Insulin unterscheidet und pharmakologisch mit diesem völlig gleichzusetzen ist. Die Ähnlichkeit der Anatomie und Physiologie des Schweins zum Menschen und die Zugehörigkeit beider zu den Allesfressern lassen eine funktionelle Integration des Transplantats erhoffen. Die Gefahr, dass von Schweinen eine Infektionsgefahr für den Menschen ausgeht, ist gering. Momentan wird eine potentielle Übertragung von porcinen endogenen Retroviren, sog. PERVs diskutiert; aufwändige Studien mit Untersuchung der DNA von Empfängern porciner Langerhans-Inseln erbrachten bisher keinen Nachweis einer *In-Vivo*-Infektion mit PERV beim Menschen [18-22].

Eine andere viel versprechende Möglichkeit den Spendermangel zu umgehen, ist die Gewinnung von β -Zellen oder β -zell-ähnlichen Zellen aus Stammzellen oder anderen Vorläuferzellen. Hier werden so genannte programmierbare Zellen entnommen, *in vitro* zu insulinproduzierenden Zellen differenziert und in den Spender zurück transplantiert. Die Forschung auf diesem Gebiet ist noch jung, und die Methoden befinden sich noch im Experimentalstadium [23]. Abzuwarten bleibt, ob die Autoimmunreaktion, die zum Entstehen des Diabetes mellitus Typ I geführt hat, nicht erneut aktiv wird und das Transplantat abstößt.

Ist mit der Xenotransplantation und insulinproduzierenden Stammzellen das Spenderproblem gelöst, so bleibt noch das Problem der Abstoßung bestehen. Um eine Immunsuppression zu umgehen, kann das Transplantat vor dem Immunsystem des Empfängers durch eine mechanische Barriere für größere Moleküle wie Antikörper und Komplementfaktoren geschützt werden. Dies kann z. B. durch „Verstecken“ der Langerhans-Inseln in einem Verband aus immunologisch privilegierten Sertolizellen (auch Ammenzellen genannt) geschehen. Dieses Konzept ist bereits seit einigen Jahren im Stadium der klinischen Erprobung, wie jedoch 2005 in einer Follow-up-Studie über 4 Jahre zu sehen ist, bleibt es in den Ergebnissen hinter den Erwartungen zurück [24,25].

Der weltweit intensiver verfolgte Weg führt über den Schutz des Transplantats durch die Verkapselung mit Materialien wie z. B. Alginat [26-32]. In eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei diabetischen Ratten nach Transplantation von so verkapselten porcinen Langerhans-Inseln Normoglykämie über einen Zeitraum von über einem Jahr ohne jede Immunsuppression zu erzielen ist [33]. Dieser Ansatz ist sehr Erfolg verspre-

chend, Spenderorgane wären jederzeit in ausreichender Zahl vorhanden, bei vergleichsweise niedrigen Kosten und geringen medizinischen Risiken. Entsprechend wird dieser Weg seit mehr als 20 Jahren erforscht, und es kam bereits zu den ersten klinischen Anwendungen [34]. Auch im eigenen Labor ist heute die Gewinnung von isolierten Langerhans-Inseln aus Schweinen ein etabliertes Verfahren, welches gleich bleibend gute Ergebnisse zur Inselausbeute und Gewebereinheit liefert [35,36].

Schwierig gestaltet sich dagegen heute noch die Kultivierung besonders von porzinen isolierten Langerhans-Inseln. Dies ist allgemein bekannt, und man führt dies auf deren Tendenz zurück, in Kultur leicht zu zerfallen – möglicherweise wegen des Fehlens einer bindegewebigen Kapsel [37]. Die Kultivierung von Langerhans-Inseln ist nicht nur eine Überbrückung der Zeitspanne zwischen Isolierung und Transplantation. Es findet in dieser Zeit eine Aufreinigung [38] statt, ein Erholungsprozess setzt nach dem Trauma der Isolierung ein [39], mögliche Infektionen des Transplantats können entdeckt werden [40], die Immunogenität wird gesenkt [41], und die Zellen werden auf Funktion und Vitalität untersucht. Es werden morphologische und immunologische Untersuchungen vorgenommen, und Kulturbedingungen und die Verkapselung optimiert. Zusammengenommen bildet dies die Grundlage für diese Arbeit und soll dazu führen, dass die Zellen in optimalem Zustand transplantiert werden und durch eine sorgfältige Vorauswahl ein Transplantatversagen vermieden wird.

Von jeder Änderung in der Isolierung, Kultivierung, Verkapselung und Transplantation werden Auswirkungen auf die Parameter Vitalität, Morphologie und Funktion der isolierten Langerhans-Inseln erwartet. Die Bestimmung der Vitalität erfolgt durch spezielle Färbungen, die Morphologie wird ebenfalls mikroskopisch bestimmt und die *In-Vitro*-Funktion der isolierten Langerhans-Inseln wird mittels Perifusion und anschließender Bestimmung von Stoffwechselmetaboliten und ausgeschütteten Hormonen beurteilt. Jede dieser Methoden ist etabliert, zuverlässig und ausgereift, jedoch benötigt jede für sich eine mehr oder weniger umfangreiche Probe aus dem späteren Transplantat, die dann verworfen werden muss. Da die Eigenschaften der einzelnen Isolierung sehr unterschiedlich sein können, sind die erhobenen Daten untereinander nur bedingt vergleichbar, und Fragen müssen mitunter mit einer einzigen Isolierungscharge beantwortet werden. Dadurch entsteht ein hoher Verbrauch an Zellen für diagnostische Zwecke, so dass entweder die

Möglichkeit zur Forschung an den Zellen limitiert wird oder eine suffiziente Transplantation nicht mehr möglich ist.

Wäre es möglich, die gesamte Diagnostik mit kleinen Proben von Langerhans-Inseln durchzuführen, könnte dieses Problem umgangen werden. Hierzu ist eine Verzahnung der drei Bereiche Kultivierung, Vitalitätsdiagnostik und Funktionsprüfung in einem einzigen Kulturbedeälter nötig. Eine solche Technik ist momentan nicht verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wird ein solcher integrierter Kulturbedeälter in mehreren Varianten entwickelt und erprobt.

Zunächst werden die Grundlagen, also die Standardmethoden der Kultivierung von isolierten Langerhans-Inseln in Kulturfaschen, die Vitalitätsdiagnostik mittels Färbung auf dem Objektträger und die Funktionsdiagnostik mittels halbautomatischer Perfusion behandelt. Hierbei wurde insbesondere untersucht, in wieweit die einzelnen Methoden verbessert werden können, und ob noch Potential zur Verbesserung der Vitalität und Funktion von Langerhans-Inseln vor der Transplantation vorhanden ist. Darauf aufbauend wird in mehreren Schritten ein Perfusions-Kultursystem, die so genannte *Würzburger Kammer* entwickelt, mit dem gleichzeitig Gewebekultur, Färbung und *In-Vitro*-Funktionsprüfung möglich ist. Nach grundsätzlichen Überlegungen zur Funktion und Technik dieses Perfusions-Kultursystems wird es im weiteren Verlauf dieser Arbeit in den Prozess der Insel-Isolierung und Transplantation eingebunden. Schließlich wird die Würzburger Kammer auch für die Beantwortung von Fragen zu anderen endokrinen Geweben, wie Nebenschilddrüsen, eingesetzt.

2. Fragen

- Bieten Änderungen von Medium und Zusatzstoffen Möglichkeiten zur Verbesserung der Vitalität und *In-Vitro*-Funktion von isolierten porzinen Langerhans-Inseln in Kultur und ist eine Optimierung der Kultur von Langerhans-Inseln mit den im eigenen Labor genutzten Kultur- und Diagnostikmethoden möglich?
- Welche Anforderungen müssen an ein Kultursystem gestellt werden, damit die Auswirkung unterschiedlicher Einflussgrößen auf die Vitalität und *In-Vitro*-Funktion von porzinen Langerhans-Inseln effektiv überprüft werden kann? Welche Vorteile bietet eine Perfusionskultur? Existieren für die eigenen Untersuchungen bereits marktfertige Produkte?
- Wie sieht die Umsetzung eines solchen Kultursystems aus? – Entwicklung der *Würzburger Kammer*.
- Ist das Mikroskopieren zur Vitalitätskontrolle von isolierten porzinen Langerhans-Inseln in der *Würzburger Kammer* möglich?
- Kann mit der *Würzburger Kammer* eine *In-Vitro*-Funktionsanalyse durchgeführt werden?
- Welche kinetischen Eigenschaften weist die *Würzburger Kammer* auf, und wie führt die Kenntnis über systemische Fehler zu exakteren *In-Vitro*-Funktionsanalysen?
- Können die unterschiedlichen Anforderungen an eine Langzeitkultur und an eine Funktionsanalyse in der *Würzburger Kammer* kombiniert werden? Kann die *Würzburger Kammer* in bestehende Systeme integriert werden, und ist die Entwicklung von Zubehör nötig?
- Welche praktischen Anwendungen sind bisher mit dem Prinzip der *Würzburger Kammer* im eigenen Labor durchgeführt worden?
- Ist damit auch die Beurteilung der Vitalität und Funktion anderer endokriner Gewebe möglich Nebenschilddrüsenzellen vom Menschen?
- Wie können die großen Mengen an anfallenden Proben auf den Gehalt an porzinem Insulin kostengünstig getestet werden? - Etablierung eines ELISA zum spezifischen Nachweis von porzinem Insulin.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten endokrinen Gewebe sind aus Schweinepankreatata isolierte porzine Langerhans-Inseln und humanes Nebenschilddrüsengewebe. Die porzinen Pankreatata wurden während des regulären Schlachtbetriebes zweier Würzburger Schlachthöfe (Metzgerei Hollerbach GmbH, Rimpfing und Südfleisch Holding AG, Würzburg) aus hirntoten Jungtieren (6-7 Monate alt) und Muttertieren (1-2 Jahre) entnommen. Eine Genehmigung nach dem Tierschutzgesetz war für die Gewinnung der Langerhans-Inseln nicht erforderlich. Bei dem Nebenschilddrüsengewebe handelt es sich um kryopräservierte Operationsresektate von Patienten mit primärem oder sekundärem Hyperparathyreoidismus. Alle Untersuchungen am menschlichen Material waren zuvor von der örtlichen Ethikkommission genehmigt worden.

3.1.1. Isolierung und Reinigung der Langerhans-Inseln

Die Isolierung der porzinen Langerhans-Inseln erfolgte mit der halbautomatischen Isolierungstechnik nach Ricordi, modifiziert nach Heiser [42,43]. Zur Desintegration des Pankreas wurde das Enzymgemisch Liberase PI Purified Enzyme Blend (Cat.-No. 1667122, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die Trennung der Langerhans-Inseln von anderen Organbestandteilen erfolgte in einem COBE 2991 Cell Processor (COBE Inc, Lakewood, Colorado, USA), unter Zuhilfenahme von zwei unterschiedlichen Dichtegradienten (Ficoll- und OptiPrep-Dichtegradient). Die so behandelten Langerhans-Inseln wurden im Folgenden mittels einer Färbung mit Dithizon (Diphenylthiocarbazone, Cat.-No. D-5130, Fa. Sigma, Deisenhofen) auf ihre Reinheit und mit FDA-PI-Färbung (siehe 3.2.1.) auf den Vitalitätsgrad überprüft.

3.1.2. Berechnung der Inseläquivalente

Die in den Versuchen verwendete Anzahl an Langerhans-Inseln wird in der Regel als Inseläquivalente (IEQ) angegeben. Ein IEQ entspricht einer Langerhans-Insel mit einem Durchmesser von 150 µm. Um die Anzahl an IEQ in einer Suspension zu bestimmen, werden unter dem Lichtmikroskop aus Stichproben dieser Suspension die Langerhans-Inseln je nach Durchmesser einer von 7 Gruppen zugeteilt. Anschließend wird die Anzahl der Langerhans-Inseln jeder Durchmessergruppe mit dem entsprechenden Umrechnungsfaktor multipliziert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Porzine Langerhans-Inseln werden je nach Größe bestimmten Gruppen zugeordnet. Mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors wird die Anzahl der Inseläquivalente berechnet.

Durchmesser der Langerhans-Inseln (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
≥ 350	15,8

Aus dem Volumenverhältnis der Stichprobe zur gesamten Suspension lässt sich dann die Anzahl an IEQ in der Suspension errechnen. Ist sie bekannt, kann für jedes entnommene Volumen die Anzahl IEQ errechnet werden.

3.1.3. Mikroverkapselung der Langerhans-Inseln

Die Verkapselung der isolierten porzinen Langerhans-Inseln wurde nach dem Vertropfungsverfahren durchgeführt [44]. Eine Suspension aus Langerhans-Inseln und Alginat wird in einer Verkapselungsapparatur (Eigenbau, Fa. Sauer, Würzburg) durch einen kontinuierlichen Luftstrom zu Tröpfchen zerstäubt. Die entstehenden Alginat-Mikrokapseln werden in einer BaCl_2 -Lösung ausgehärtet.

3.2. Nachweismethoden

3.2.1. FDA-PI-Färbung

Um die Vitalität der isolierten Langerhans-Inseln zu testen, wurden sie in einer Doppelfärbung mit Fluoreszeindiacetat (FDA, Cat.-No. F7378, Fa. Sigma, Deisenhofen) und Propidiumiodid (PI, Cat.-No. P4170, Fa. Sigma) angefärbt [45-47]. Das lipidlösliche FDA wird im Zytoplasma der Zelle durch eine Esterase in einen grün fluoreszierenden nicht-lipidlöslichen Farbstoff gespalten und reichert sich so im Zytoplasma ausschließlich vitaler Zellen an. PI färbt die Zellkerne toter Zellen mit einer Rotfluoreszenz, vorausgesetzt deren Morphologie ist noch intakt. Mit dieser Färbung können gleichermaßen native wie mikroverkapselte Langerhans-Inseln gefärbt werden, sowohl auf einem Objektträger als auch in den Kammern der Versionen $V3_{\text{STM}}$, $V4_{\text{STM}}$, $V5_{\text{SM}}$, $V6_{\text{SMTE}}$ (Beschreibung im Kapitel

3.3.3.). Für die Färbung auf dem Objektträger wurde 1 mg FDA in 1 ml Aceton gelöst, im Verhältnis 1:1.000 in das Kulturmedium mit den Langerhans-Inseln gegeben und bei 36 °C für 15 min inkubiert. PI wurde zu 9,0 mM in N,N-Dimethylformamid (Cat.-No.: D4254, Fa. Sigma) gelöst und diese Lösung 1:100 mit den Langerhans-Inseln im Kulturmedium bei 36 °C für 15 min lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden ca. 30 IEQ bzw. 10 Mikrokapseln auf einen Objektträger gegeben. Wurden die Langerhans-Inseln in der Kammer gefärbt, wurde das Kulturmedium mit der oben genannten Aceton-FDA-Lösung im Verhältnis 1.000:1 gemischt und die Kammer damit für ca. 15 min perfundiert.

Die Auswertung erfolgte in beiden Fällen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 50, Fa. Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) mit einem Bandpassfilter von 530 nm bei Anregung der Fluoreszenz mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm. Von den Färbungen wurden regelmäßig digitale und analoge Bilder erstellt (siehe 3.10.) und die Anteile der vitalen und non-vitalen Zellen als Prozentsatz angegeben.

3.2.2. Zinquin-Färbung

Zinquin (Zinquin-Ethyl-Acetat, Fa. EMD Biosciences, San Diego, CA) ist ein neuer fluoreszierender und nicht-toxischer Farbstoff, der intrazelluläres Zn^{2+} in vitalen Zellen darstellt. Insulin wird intrazellulär in Zinkvesikeln gespeichert, die sich mit Zinquin anfärben lassen [48,49].

Eine Zinquin-Alkohol-Lösung wird im Verhältnis 1:1.000 mit HAM's F12 (Cat.-No. 5-31F00-H, Fa. Cell Concept, Umkirch) angesetzt, so dass eine 25 μ M Lösung entsteht. Die zu färbenden Langerhans-Inseln werden mit der Lösung für 30 min unter Lichtabschluß inkubiert, bei einer Temperatur von 36 °C bzw. 24 °C. Die Auswertung erfolgt dann unter dem Fluoreszenzmikroskop. Mit Licht der Wellenlänge 350 nm angeregt, fluoresziert der Farbstoff typischerweise mit Licht einer Wellenlänge von 460 nm.

3.2.3. Dithizon-Färbung

Dithizon (DTZ, Cat. D-5130, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) ist ein ebenfalls Zink-bindender Chelatbildner, der spezifisch β -Zellen aufgrund ihres hohen Gehaltes an Zn^{2+} unter sichtbarem Licht in roter Farbe darstellt. Die Dithizonfärbung ist damit eine einfache Methode, um Langerhans-Inseln von anderen Zellen zu unterscheiden [46,50]. Eine Suspension aus Langerhans-Inseln wird bei 24 bis 36 °C im Verhältnis 1:1 mit

HBSS-Lösung (Hank's Balanced Salt Solution, Cat.-No. 3-02F00-I, Fa. Cell Concept) versetzt, die 0,25 mg/ml Dithizon enthält. Nach 5 min Inkubation werden die gefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop bei sichtbarem Licht beurteilt.

3.2.4. Glukose- und Elektrolytbestimmungen

Zur Kontrolle des Glukose-Gehalts und zur Bestimmung der Elektrolytwerte in den verwendeten Lösungen und Medien wurden Analysen mit einem Blutgasanalysegerät (Radiometer ABL 735, Radiometer Copenhagen GmbH, Willich) durchgeführt. Hierzu wurden die Proben in einer 2 ml-Spritze unter Luftabschluss innerhalb von 2 min nach Entnahme im Gerät nach einer Standardmethode analysiert.

3.2.5. Insulinbestimmungen

Zur Bestimmung des Insulingehalts wurden die Proben innerhalb von 2 h entweder zur sofortigen Analyse bei 8 °C im Kühlschrank aufbewahrt, oder bei -20 °C tief gefroren. Das Grundmedium der Proben entsprach je nach Fragestellung den Medien HBSS oder HAM's F12, die Konzentrationsbestimmung erfolgte in unserem Labor nach dem ELISA-Prinzip. Es wurden zwei verschiedene Assays verwendet, ein EASIA-Kit (INS-EASIA, Cat.-No. 4012500, Fa. Biosource, Europe S.A., Nivelles, Belgien) und ein im eigenen Labor entwickelter ELISA (siehe 3.2.5.2.) zum Nachweis von Insulin.

3.2.5.1. EASIA-Kit von BioSource

Dieser kommerziell erhältliche Kit ist gegen humanes und porcines Insulin gerichtet. Die gebrauchsfertigen Proben wurden bei zwei Wellenlängen (450 nm und 490 nm) gegen einen Referenzfilter (650 nm Wellenlänge) mit Hilfe eines Readers (Thermo Max Microplate Reader, Fa. MWG Biotech, Ebersberg) gemessen. Mittels Computer Software (MickroWin Version 3.0, Fa. Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath) wurde eine Standardkurve aus den im Kit enthaltenen Standards erstellt, die Insulinkonzentration der Proben an ihr errechnet und in $\mu\text{U/ml}$ angegeben. Der Kit wurde auch zur Kontrolle der Werte verwendet, die mit dem selbst entwickelten ELISA gemessen wurden (siehe 3.2.5.2.).

3.2.5.2. Selbst entwickelter ELISA

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein eigener ELISA zum Nachweis von porcinem Insulin entwickelt. Als Träger diente eine 96-Well-Microplate. Diese wird für 1 h mit dem Anti-

körper „Anti-human-Insulin mAb IN-05“ (Cat.-No. T1321, Fa. Dianova/BMA, Hamburg) beschichtet. Zur Blockierung weiterer Adhäsionsstellen für Proteine an der Trägerwand wird 1 h mit Rinderproteinlösung PBS (Lot 104381-001, Fa. OXOID/Fisher Scientific International, Inc., UK) inkubiert. Es erfolgt nun der Kontakt mit der zu bestimmenden insulinhaltigen Lösung für 2 h. Danach erfolgt die Detektion mit dem Antikörper „Guinea-pig-anti-porcine-insulin“ (Lot 020, Code No. A0564, Fa. DAKO, Glostrup, DK) und dem Sekundärantikörper Anti-guinea-pig-IgG (Fa. DAKO), welcher mit *horse-raddish-peroxidase* (HRP) konjugiert ist, für jeweils 1 h. Zwischen den Schritten wird jeweils für 10 min mit PBS-Lösung gewaschen, um nicht gebundene Bestandteile zu entfernen. Im letzten Schritt wird durch die HRP der Farbstoff ABTS (Cat.-Nr. 40K0650, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in eine fluoreszierende Form umgesetzt, die schließlich nach 5 min im Plate-Reader (Thermo Max Microplate Reader, Fa. MWG Biotech, Ebersberg) mit Licht einer Wellenlänge von 540 nm ausgemessen wird. Es wird dann mittels Computersoftware (MikroWin Version 3.0, Fa. Mikrotek) eine genäherte Standardkurve errechnet (zumeist mit sigmoidem Kurvenverlauf), die Insulinkonzentration der Proben an dieser ermittelt und in $\mu\text{U/ml}$ angegeben.

3.2.6. Parathormonbestimmung

Die Gewebeproben aus Versuchen mit Nebenschilddrüsen, in denen Parathormon bestimmt werden sollte, wurden nach ihrer Entnahme umgehend bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. In gefrorenem Zustand wurden die Proben in das Gastroenterologische Labor der Medizinischen Universitätsklinik der Universität Würzburg (Direktor Prof. Dr. G. Ertl) transportiert, wo die Parathormonbestimmung mittels RIA vorgenommen wurde. Die Ausgabe der Werte erfolgte in CPS (*counts per second*) und als Angabe der Konzentration (ng/l). Werte über den Konzentrationen, die im menschlichen Organismus vorkommen, wurden durch Extrapolation anhand der CPS-Werte in Parathormonkonzentration umgerechnet.

3.3. Konstruktion der Kulturkammern

Außer dem *Gradient-Culture-Container* (Minucells und Minutissue, Vertriebs-GmbH, D-Bad Abbach) wurden sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Kulturkammern in Eigenarbeit entwickelt und, sofern sie aus Acrylglas bestanden, auch im eigenen Labor hergestellt. Die im Verlauf der Arbeit entwickelten und modifizierten Kammern umfassen 6 Versionen (V). Diese Versionen sind nach der zeitlichen Reihenfolge ihrer Entwicklung nummeriert (V1 bis V6) und erhalten eine Indizierung, die die wesentlichen Merkmale wie Material

und Funktion kennzeichnet (A = Acrylglas, S = Edelstahl, M = mikroskopierbar, T = integrierte Temperatursteuerung, E = Elevator). Sie sind in Tabelle 2 dargestellt. Wenn nicht eine Kammerversion im Speziellen gemeint ist, wird der Eigenname *Würzburger Kammer* verwendet. Im Folgenden werden die technischen Informationen zu den Kammern V1 bis V6 gegeben.

3.3.1. Werkstoffe und Herstellung

Die Kammern V1_E bis V3_E ohne Temperatursteuerung wurden aus Acrylglas (Fa. Glaskeil, Würzburg, Verschnittmaterial, Spezifizierung nicht möglich) als einem leicht und exakt zu bearbeitendem Werkstoff in Eigenleistung gefertigt. Die Kammern V4_{SMT}, V5_{SM} und V6_{SMT E} wurden von den Feinmechanikern C. Schlosser (Würzburg) und F. Sauer (Würzburg) als Einzelstücke bzw. in Kleinserien aus korrosionsbeständigem und rostfreiem Edelstahl gefertigt.

Tabelle 2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kulturkammern und ihrer Spezifitäten.

Version	Material	Konstruktionsmerkmale	Hersteller
V1 _A	Acrylglas		A. Kerscher
V2 _A	Acrylglas	Dritter Zugang für Entlüftung	A. Kerscher
V3 _{SMT}	Edelstahl	Temperatursensor eingebaut, Auflichtmikroskopie	F. Sauer
V4 _{SMT}	Edelstahl	Detailverbesserungen	F. Sauer
V5 _{SM}	Edelstahl	Durchlichtmikroskopie, kleines Volumen	C. Schlosser
V6 _{SMT E}	Edelstahl	Variables Volumen, Auflichtmikroskopie	F. Sauer

Zur Bearbeitung des Acryls wurden Holzbohrer verschiedener Stärken mit niedriger Drehzahl unter Kühlung eingesetzt. Die Bearbeitung erfolgte an einem Frästisch. Der Zuschnitt der Grundformen aus den Acrylglasblöcken erfolgte mit einer Gehrungssäge.

3.3.2. Zubehör

Die folgenden Vorrichtungen wurden im Zuge der Entwicklung der Kammern entworfen und hergestellt oder hierfür erworben und beim Betrieb der Kammern verwendet.

Pumpen und Schläuche. Zum Transport des Mediums durch die Kammern wurden Infusionspumpen und Schlauch-Rollenpumpen verwendet. Mit Infusomaten® (Fa. B. Braun Melsungen GmbH) unterschiedlicher Modellreihen waren durch Einsatz von 50 ml-Perfusor-Spritzen (Fa. B. Braun) Flussraten des Mediums von 0,1 bis 200 ml/h einstellbar. Bei Einsatz einer Rollen-Schlauchpumpe von Ismatec (Modell MCP Standard, Fa. Ismatec Laboriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld) waren je nach verwendetem Pumpenschlauch Flußraten von unter 1 µl/min bis 60 ml/h möglich. Diese Pumpen wurden bei den Versuchen mit einem 8-Kanal-Pumpenkopf verwendet, als Schläuche kamen Tygon-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,13 mm (Best. Nr. SC0188, Fa. Ismatec) zum Einsatz. Für die Zu- und Ableitung wurden Schläuche aus dem aktuellen Infusionsprogramm von B. Braun verwendet, als Adapter zum Schlauchprogramm von Ismatec wurden Spritzenkanülen des Typs 28G mit 14 mm Länge modifiziert. Zum Gasaustausch wurden semipermeable Schläuche von Minucells verwendet (Best. Nr. 1306, Minucells and Minutissue Vertriebs-GmbH).

Membran und Halterung. Als Membranhalter wurde bei der Kammerversion V1_A das Original-Clip-System von Minucells verwendet, ab Version 2 wurde die Membran direkt in eine in der Kammer integrierte Halterung gesetzt. Als Membran wurde ein monofiles Nylonnetz (Fa. Sigma) mit einer Maschenweite von 20 µm verwendet.

Wasserbad und Heizplatte. Außerhalb des Inkubators wurde ein Wasserbad (WTE var 3185, Fa. Assistant, München) eingesetzt, an dessen Pumpenausgänge je nach Bedarf eine speziell für die Kammern V4_{SMT} und V5_{SM} entwickelte Heizplatte angeschlossen wurde. Aufgebaut ist diese Heizplatte aus Aluminiumprofilen (Rechteckprofil, 5 x 2 cm, Materialdicke 2 mm, Baufachmarkt Obi, Würzburg). Die Heizplatte wird in ein modifiziertes Perifusionsgerät (Suprafusion System SF-06, Fa. Brandel, U.S.A.) eingepasst. Die Temperatur der Heizplatte war stufenlos von Raumtemperatur bis über 50 °C einstellbar.

Abtropfsystem. Das Perifusionssystem *Suprafusion SF-06*® (Fa. Brandel) wurde so modifiziert, dass bis zu 8 Proben parallel aufgefangen werden konnten. Dabei konnten Probenhalter beliebiger Art verwendet werden, wie z. B. ELISA-Plates.

Temperatursteuerung. Die Temperatursteuerung für die Kammern aus Edelstahl ist ein mikroprozessorgesteuerter Regelkreis, dessen zentrale Elemente ein Temperatursensor, ein

Heiz-/Kühlelement (Peltierelement TEC1-1703, Fa. Conrad Elektronik, Hirschau) und ein Mikroprozessor (C-control Basic 1.0, Fa. Conrad Elektronik) sind. Desweiteren wurde eine Hauptplatine (C-control Applicationboard, Fa. Conrad Elektronik), ein Relaisboard (C-control Relaisplatine, Fa. Conrad Elektronik) sowie ein Temperatursensor (Temperaturfühler DS18S20, Fa. Conrad Elektronik) und ein Steuercomputer (Windows PC) verwendet. Die Lötarbeiten und der Aufbau der Steuereinheit wurden in Eigenleistung ausgeführt. Als Stromquelle für das Heizelement diente ein Bleiakкумуляtor, da die notwendigen hohen Ströme bei niedriger Spannung alternativ nur von Spezialnetzteilen zur Verfügung gestellt werden können. Die Steuerung des Regelkreises wird von einem Windows-Rechner übernommen, das dazugehörige Steuerprogramm wurde in Eigenleistung in der Programmiersprache VisualBasic® (Professional Edition Version 5, Microsoft™, Redmond, U.S.A.) geschrieben.

3.3.3. Verwendete Kammern

3.3.3.1. *Gradient-Culture-Container* von Minucells

Frühe Versuche mit mikroverkapselten Langerhans-Inseln in einer Perfusionskultur wurden in dem *Gradient-Culture-Container* (Minucells and Minutissue Vertriebs-GmbH) durchgeführt. Es wurde das zugehörige Schlauchsystem und Clipsystem für den Einsatz von Trägermembranen verwendet. Die Versuche fanden im Inkubator (US Autoflow 4000-Series, Fa. Nuair, Plymouth, U.S.A.) bei 24 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ statt.

3.3.3.2. *Würzburger Kammer V1_A*

Die Version V1_A (Abbildung 11 im Ergebnisteil) der Kulturkammern ist aus Acrylglas und besteht aus zwei Bauteilen. Die Außenmaße der Kammer betragen ca. 3,5 cm x 5,4 cm. Die Fixierung der Ober- und Unterplatte erfolgt durch 2 handelsübliche Rändelschrauben M3 mit geschnittenem Gewinde (Baufachmarkt Obi), die Abdichtung des Innenraums mit den Zellen erfolgt durch zwei O-Gummiringe mit Außendurchmesser 12 mm (Baufachmarkt Obi). Die Bearbeitung des Acrylglas wurde mit Holzwerkzeug durchgeführt. Die Zellen liegen lose im oberen Teil der Kammer auf einem Membranhalter (Clipsystem, Fa. Minucells und Minutissue), der mit einem passend zugeschnittenen Nylonnetz mit einer Maschenweite von 20 µm bestückt ist. Die Zu- und Ableitungen werden abgedichtet durch den Silikongummi vom Stempel einer Spritze (Spritze für subcutane Applikation 28G, B. Braun) mit 3,5 mm Durchmesser. Die Verbindung des Schlauchsystems mit der Kammer erfolgt über die Punktion der Gummidichtung mit einer Kanüle (28G, 14 mm Länge). Das

Schlauchsystem ist eine Kombination aus dem Infusionssystem von B. Braun und semi-permeablen Schläuchen von Minucells (siehe 3.3.2.).

3.3.3.3. Würzburger Kammer V2_A

Die Version 2 besteht ebenfalls aus Acrylglas und entspricht der V1_A, besitzt jedoch eine dritte Öffnung zur Entlüftung am oberen Ende. Diese Öffnung ist analog zu den beiden anderen Öffnungen wie unter 3.3.3.2. beschrieben. Fixiert werden die beiden Bauteile durch zwei diagonal angeordnete Rändelschrauben, in diesem Fall mit Gegenzughülse M3. Die Kammer wird abgedichtet durch einen einzelnen Gummiring (wie oben), der gleichzeitig ein als Membran verwendetes Nylonnetz (siehe 3.3.2.) fixiert. Ein Clipsystem wurde nicht benutzt.

3.3.3.4. Würzburger Kammer V3_{SMT}

Die Version 3 wurde aus Edelstahl gefertigt, kann mikroskopiert werden und besitzt einen integrierten Temperatursensor. Sie besteht aus einem Deckel mit einer Öffnung nach oben (8 mm Durchmesser) und zwei Zuleitungen, sowie einem Grundteil mit einem Ablauf und einer seitlichen Bohrung von 3 mm Durchmesser durch die die Kabel des Temperatursensors herausgeführt werden. Die Öffnung ist mit einem Deckglas verschlossen (10 mm Durchmesser, Cat. No. C9802, Fa. Sigma-Aldrich), welches mit Silikonkleber von außen auf die Kammer geklebt ist. Die Anschlüsse bestehen aus 3 in das Gehäuse gepressten, modifizierten Metallhülsen von Venenverweilkanülen (14G, Fa. B. Braun). Zwischen dem Deckel und dem Grundteil befinden sich zwei Gummidichtungen (rechteckiger Querschnitt, 4 mm Höhe, 12 mm Außendurchmesser, Bauchfachmarkt Obi und O-Gummiring, 2 mm stark mit Außendurchmesser 12 mm, Baufachmarkt Obi) die gleichzeitig das Nylonnetz für die Zellen gegen den Deckel fixiert und die Kammer abdichtet. Im unteren Teil der Kammer ist der Temperatursensor (Fa. Conrad Elektronik, siehe 3.3.2.) mit Silikonkleber fixiert, die elektrischen Leitungen sind isolierte Kupferlitzen (1,5 mm Durchmesser, handelsüblich). Die Kammerteile werden mit zwei M2-Schrauben aus Edelstahl zusammengeschraubt.

3.3.3.5. Würzburger Kammer V4_{SMT}

Die *Würzburger Kammer V4_{SMT}* ist aus Edelstahl. Verwendet wurden die gleichen Komponenten wie bei der Kammer V3_{SMT}, jedoch liegt das Nylonnetz auf einem integrierten

Sockel auf dem unteren Teil der Kammer und ist durch einen Gummiring (10 mm Außendurchmesser, 2 mm stark, Baufachmarkt Obi) gegen den Deckel fixiert und abgedichtet.

3.3.3.6. Würzburger Kammer V5_{SM}

Bei dieser Version aus Edelstahl ist die Membran, auf der die Zellen liegen, ebenfalls direkt zwischen den Deckel und das Bodenteil der Kammer mit einem Gummiring fixiert. Durch eine mittig im Deckel, genauso wie im Bodenteil befindliche durchgehende 6mm-Bohrung entsteht das Lumen der Kammer. Sie wird nach oben und unten durch silikonverklebte Deckgläser (10 mm Durchmesser, Fa. Sigma-Aldrich) abgedichtet. Ein integrierter Temperatursensor ist nicht vorgesehen.

3.3.3.7. Würzburger Kammer V6_{SMTE}

Die Version 6, ebenfalls aus Edelstahl, besteht aus den vier Teilen Deckel, Körper, Bodenplatte und beweglicher Kolben. Es werden keine Dichtungsteile eingesetzt, Passgenauigkeit der Bauteile und Silikonpaste sorgen für Dichtigkeit. Deckel und Körper werden durch 3 Metallschrauben M2 zusammengehalten. Durch beide geht eine 10 mm Bohrung hindurch. Sie bildet das Lumen der Kammer und ist von oben mit einem Deckglas (Fa. Sigma-Aldrich) von 14 mm Durchmesser und von unten durch den in der Bohrung befindlichen Kolben begrenzt. Unter dem Körper befindet sich die Bodenplatte, die mit 2 Schrauben M2 fixiert ist. Der Kolben ist über eine Rändelschraube M2 mit der Bodenplatte verbunden. Durch Drehung der Rändelschraube im Uhrzeigersinn wird der Kolben in Richtung Bodenplatte gezogen, durch Drehung gegen den Uhrzeigersinn wird der Kolben angehoben und das Volumen der Kammer somit vergrößert oder verkleinert. Im Deckel befindet sich ein Anschluss aus einer eingepressten Kanüle (14G, Fa. B. Braun). Außen am Körper befinden sich zwei gegenüberliegende abgeschrägte Flächen, an denen Peltierelemente zur Temperaturregulation angebracht werden können. Am Unterrand des Körpers befindet sich eine Bohrung von 5 mm Durchmesser in das Innere, die die Schläuche für die Mediumzuführung und -ableitung, sowie elektrische Leitungen aufnimmt und von unten an den Kolben heranführt. Das Medium wird durch eine von zwei Kanülenhülsen (28G, Fa. B. Braun) durch den Kolben hindurch in die Kammer und durch die andere Kanüle wieder hinausgeleitet. Auf dem Kolben in der Kammer wird eine Membran mit einem Plastikring (10 mm Durchmesser, Clip-System der Fa. Minucells und Minutissue) eingeklemmt oder alternativ mit Silikonpaste fixiert. Die verwendeten Schläuche sind Tygonschläuche (Fa. Ismatec, siehe 3.3.2.) mit einem Durchmesser von 0,12 mm.

3.4. Kultivierung der Langerhans-Inseln

Zwischen der Isolierung und der Transplantation werden die Langerhans-Inseln üblicherweise für mehrere Tage in Zellkultur gehalten. Dies geschieht im Rahmen dieser Arbeit einerseits als gewöhnliche Zellkultur in Zellkulturflaschen in einem Inkubator und andererseits als Perifusionskultur in den Kammern V1 bis V6. Diese Perifusionskulturen wurden sowohl im Brutschrank, als auch unter Laborbedingungen ohne Brutschrank durchgeführt. Das verwendete Grundmedium war HAM's F12, Zusätze waren porzines Serum (PS, Cat. No. S-PNS03-I, Fa. Cell Concept), fetales Kälberserum (FCS, Cat. No. S-EUR01-I, Fa. Cell Concept) und Rattenserum (RS, N-29600, Fa. Harlan/Winkelmann, 33178 Borcheln) in unterschiedlichen Konzentrationen.

3.4.1. Kultivierung in der Zellkulturflasche

Die Inseln wurden in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe (100 ml, 50 ml, 20 ml, Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen) im Inkubator (US Autoflow 4000Series, Fa. Nuaire, Plymouth, U.S.A.) bei 24 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Standardmäßig wurde jeden zweiten Tag eine Hälfte des Mediums gewechselt.

3.4.2. Aufbau der Perfusionskultur

Die Perfusionskultur im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl in einem Inkubator, als auch außerhalb eines Inkubators unter Laborbedingungen durchgeführt. Als Perfusionskultur wird im Rahmen dieser Arbeit eine Zellkultur in einem speziellen Behälter bezeichnet, bei der Medium permanent die Zellen umspült. Im Gegensatz dazu wird für die *In-Vitro*-Funktionsdiagnostik ausschließlich die Bezeichnung Perifusion verwendet. Die Kammern V1 und V2 wurden ausschließlich für Perfusionskulturen im Inkubator verwendet. In diesem Fall befanden sich der Vorratsbehälter für das Kulturmedium und die Pumpe außerhalb des Inkubators, die Zuleitung erfolgte durch eine Öffnung in der Seitenwand des Inkubators. Es wurden Infusionspumpen und Rollenschlauchpumpen wie unter 3.3.2. beschrieben eingesetzt. Das Schlauchsystem bestand außerhalb des Inkubators aus gasdichten Infusionsschläuchen (Standard-Infusionssystem der Fa. B. Braun) und innerhalb des Inkubators aus einem 40 cm langen semipermeablen Schlauch (Cat. No. 1006, Fa. Minucells und Minutissue) zur Oxygenierung und Temperaturadaptation des Mediums, sowie zum Einstellen des pH-Wertes bei CO₂-basierten Puffersystemen. Nach dem Durchlauf durch die Kammer wurde das Medium in Auffangbehältern im Inneren des Inkubators aufgefangen.

Wurde eine Perfusionskultur unter Laborbedingungen ohne Inkubator durchgeführt, so musste ein Medium verwendet werden, das nicht auf einem CO₂-Puffersystem basiert. Zum Schutz vor Kontamination wurden die Mediumflaschen über Bakterienfilter belüftet und standen darüber mit der Umgebungsluft in Austausch. Die Kammer befand sich je nach Wärmeleitfähigkeit des Baumaterials (Acryl oder Edelstahl) auf einer Wärmeplatte oder in einem Wasserbad mit der gewünschten Temperatur. Das fraktionierte Auffangen der Proben nach der Kammer erfolgte auf dem Probenschlitten des modifizierten *Suprafusion*® der Fa. Brandel.

Vorbereitung. Die Kammern der Versionen V1 bis V3 aus Acryl können materialbedingt nicht mit Alkohol desinfiziert werden. Aus diesem Grund wurde Octenisept (Fa. Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt), eine alkoholfreie Desinfektionslösung auf Wasserbasis verwendet. Kammern, Schläuche und sämtliches Zubehör wie Schrauben und Werkzeug (Schraubenschlüssel) wurden über 1 h in ein Bad aus Octenisept gelegt, anschließend unter sterilen Kautelen in der Werkbank zusammengesetzt und nach Aufbau der Versuchsanordnung weitere 20 min mit Octenisept perfundiert. Anschließend wurden über 1 h das Schlauchsystem und die Kammer mit NaCl-Lösung durchgespült, um Reste des Desinfektionsmittels auszuwaschen. Als letzter Schritt wurde für 20 min mit dem jeweils für die nachfolgenden Versuche verwendeten Kulturmedium gespült.

Einsetzen der Zellen. Nach der Desinfektion der Kammer wurden die zu kultivierenden Langerhans-Inseln nach einer Kulturphase von ca. 12 h in Kulturflaschen im Inkubator von oben mit einer großlumigen Kanüle (native Langerhans-Inseln: 21G, verkapselte Langerhans-Inseln: mindestens 14G) über den Dichtungsgummi in die Kammern gespritzt und auf der Membran abgelegt. So war ein weiteres Öffnen zum Einsetzen der Inseln in die Kammer nicht nötig.

3.5. Versuche zur Kammerkinetik

Für die Versuche zur Kammerkinetik wurde im zeitlichen Verlauf dargestellt, wie ein neu in die Kammer eingebrachtes Medium „b“ das in der Kammer vorhandene Medium „a“ verdrängt. Dies wurde durch die Verdünnung einer blauen Flüssigkeit (Trypanblaulösung, 1 Teil auf 5 Teile Aqua dest., Medium „a“) durch eine klare (H₂O, Medium „b“) simuliert.

3.5.1. Kinetik der Kammer V5_{SM}

Für den Versuchsaufbau wurden eine Rollenschlauchpumpe, das für Perfusionen übliche Schlauchsystem (Fa. B. Braun), 4 Kammern der Version V5_{SM} mit und ohne Nylonnetz aber ohne Zellen, der automatische Probenschlitten mit 4 Reihen á 20 - 25 Probenröhrchen die automatische Abtropfvorrichtung (Kapitel 3.3.2.) und die beiden Lösungen verwendet. Variiert wurde die Geschwindigkeit des durchfließenden Mediums mit 2, 3, 4 und 5 ml/h. Die Kammer und das Schlauchsystem wurden vollständig mit Aqua dest. gefüllt, dann wurde das Medium auf die Trypanblau-Lösung umgehängt und sofort die Probenahme gestartet. Die Probennahme erfolgte in den einzelnen Versuchsdurchläufen in 20 bzw. 30 sek Abständen, bis die Lösung optisch völlig klar erschien. Für die Konzentrationsbestimmung des Trypanblaus wurden jeweils 50 µl aus den Röhrchen auf eine 96-Microplate pipettiert und im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen. Waren die Probenvolumina kleiner als 50 µm, wurden die Proben aus den 4 Kammern zusammengegeben und davon jeweils 50 µl auf die 96-Microplate pipettiert. Der Wert für die Konzentration der unverdünnten Trypanblau-Lösung wurde als 100% gesetzt und die übrigen Messwerte relativ zu diesem angegeben.

Für weitere Versuche wurden nur die Verdünnungsverhältnisse innerhalb der Kammer betrachtet und das Schlauchsystem vor und nach der Kammer weggelassen. Das Medium wurde nun direkt in die Kammer gepumpt bzw. direkt danach aufgefangen. Die Versuche wurden sowohl mit als auch ohne die Trägermembran aus Nylon durchgeführt.

3.5.2. Kinetik der Kammer V6_{SMTE}

Die Kammer V6_{SMTE} wurde nicht mit Inseln besetzt, und als Membran diente ein Nylonnetz. Zur Verbesserung der zeitlichen Auflösung wurde in diesem Fall die Konzentrationsänderung kontinuierlich mit einem Spektrometer gemessen, da durch das kleinere Volumen der Kammer V6_{SMTE} ein deutlich schnellerer Austausch der Medien zu erwarten war. Es wurde an den Abfluss der Kammer eine in Eigenleistung angefertigte Küvette angeschlossen, die das aus der Kammer fließende Medium durch den Strahlengang des Spektrometers leitete. Sie basiert auf einer handelsüblichen Küvette für Spektrometer, bei der das Volumen im Fenster auf 0,15 µl verkleinert wurde. Über eine Zu- und eine Ableitung wird das Medium direkt durch dieses Fenster geleitet. Im Strahlengang des Spektrometers platziert, kann die Absorption des durch die Küvette fließenden Mediums kontinuierlich gemessen werden.

Die Absorptionswerte wurden im 5 sek Intervallen aufgezeichnet. Aus mehreren Messreihen wurde jeweils für die untersuchten Pumpgeschwindigkeiten die Reaktionszeit TR_0 (*time of reaction* 0%) ermittelt, also die Zeit, bei der die früheste Änderung der Absorption zu registrieren war. Sie entspricht der Reaktionszeit des Systems nach der beim Wechsel eines Mediums zum ersten Mal neues Medium „b“ wieder aus der Kammer austritt und in der Küvette nachzuweisen ist. Der zweite untersuchte Wert war die TR_{80} (*time of reaction* 80%). Sie entspricht der Zeit, in der in der Kammer 80% des alten Mediums durch neues ersetzt wurde. Die beiden Werte TR_0 und TR_{80} sind ein Kriterium für die Reaktionsschnelligkeit und damit für die Genauigkeit der untersuchten Kammern. Auf dieser Grundlage wurden die Kammern bezüglich ihrer Genauigkeit miteinander verglichen.

3.6. Perifusion als *In-Vitro*-Funktionstest

Für die Analyse der *In-Vitro*-Funktion der isolierten Langerhans-Inseln wurden in dieser Arbeit Perfusionen mit dem halbautomatischen Perfusionsgerät *Suprafusion*® der Fa. Brandel und mit Kammern der Versionen V1 bis V6 durchgeführt.

3.6.1. Perifusion mit der Apparatur *Suprafusion*® der Fa. Brandel

Bei der Perifusion in der Apparatur *Suprafusion*® der Fa. Brandel wurden isolierte Langerhans-Inseln Glukose-Lösungen unterschiedlicher Konzentration ausgesetzt und anschließend wurde die resultierende Insulinausschüttung bestimmt. Verwendet wurde eine Basislösung HBSS (Cat.-No. H9269, Fa. Sigma-Aldrich,) mit 50 mg/dl Glukose und eine glukosereiche Lösung mit 300 mg/dl Glukose als Sekretionsreiz. Die Perifusion mit dem *Suprafusions*gerät besteht aus 3 Phasen. In der ersten Phase werden die Langerhans-Inseln für 50 min mit der Basis-Lösung perfundiert, in der zweiten Phase für 60 min mit der glukosereichen Lösung stimuliert. In der dritten Phase werden die Langerhans-Inseln für 60 min wieder mit der Basislösung perfundiert.

In bestimmten zeitlichen Abständen (nach 2,5 min, 5 min und 10 min) werden die Proben in Eppendorfgefäßen (Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) aufgefangen, bei -30 °C tief gefroren und zu einem späteren Zeitpunkt mit einem der beiden Insulin-ELISA ausgewertet. Die gemessenen Werte wurden als absolute Konzentration von Insulin im Medium in ng/ml oder auf die eingesetzte Menge an Inseläquivalenten in ng Insulin/IEQ umgerechnet und gegen die Zeit als Funktion aufgetragen.

Für den Vergleich von Sekretionskurven verschiedener Versuche untereinander wurden die Kurven normiert. Hierfür wurde zuerst für jede einzelne Kurve ein Mittelwert über die Basissekretionswerte, also die Werte ohne Stimulation, gebildet. Das Verhältnis jedes einzelnen Sekretionswertes einer Kurve zu diesem Mittelwert ergab eine dimensionslose Zahl, die gegen die Zeit aufgetragen wurde. Auf diese Weise entstand für jeden einzelnen Versuch eine Normkurve mit Werten in der Größenordnung von 1, wobei die Form der Kurve nicht verändert wurde. Es wurden sodann mehrere solcher Normkurven im gleichen Diagramm unter Angabe der Standardabweichungen dargestellt und in Bezug auf den Zeitpunkt eines Insulinpeaks und auf die einzelnen Sekretionsphase miteinander verglichen. Da die Form der Kurven nicht verändert wurde, konnte auch der Stimulationsindex über diese Normkurven ermittelt werden.

3.6.2. Perifusion mit der Würzburger Kammer

Die Perifusion von verkapselten und unverkapselten porzinen Langerhans-Inseln mit der *Würzburger Kammer* wurde im Rahmen dieser Arbeit mit allen Versionen von V1 bis V6 durchgeführt. Der Aufbau einer solchen Versuchsanordnung ist in Abbildung 22 im Ergebnisteil dargestellt. Der Aufbau einer Perifusion mit den Kammern V1 bis V6 ist analog zu 3.4.2.. Verwendet wurden die gleichen Glukoselösungen wie bei der Perifusion von Langerhans-Inseln mit der *Suprafusion*® der Fa. Brandel, jedoch sowohl bei 37 °C als auch bei 24 °C. Die Proben wurden in den gleichen zeitlichen Abständen aufgefangen. Die Analyse der Werte und deren Aufbereitung erfolgte analog zu 3.6.1..

3.6.3. Perifusion von humanen Nebenschilddrüsen

Die Perifusion von humanem Nebenschilddrüsenengewebe erfolgte in den Kammern V3_{SMT} und V4_{SMT} mit dem gleichen Versuchsaufbau wie bei einer Perifusionskultur (siehe Kapitel 3.4.2.). Zunächst erfolgte eine Perifusion der Nebenschilddrüsen über 60 min bei 37 °C mit HBSS und 2,1 mmol/l Ca²⁺. Anschließend wurde der Calciumgehalt für 60 min auf 0,42 mmol/l Ca²⁺ reduziert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Alle 10 min wurden Proben aufgefangen und bei -30 °C eingefroren. Die Analyse auf den Parathormongehalt erfolgte mittels RIA (Medizinische Klinik I, Prof. Dr. B. Allolio).

3.7. Lichtmikroskopische Analysen mit der Würzburger Kammer

Die Färbetechniken mit FDA und PI, sowie Zinquin oder Dithizon wurden wie in Kapitel 3.2. beschrieben durchgeführt. Die Kammern konnten während des Mikroskopiervorgangs

im Versuchsaufbau der Perfusionskultur integriert bleiben oder von dessen Schlauchsystem getrennt werden. Mit den Kammern der Versionen V1_A und V2_A ist die Mikroskopie nicht möglich. Die Dokumentation der Bilder erfolgte wie unter Kapitel 3.10. beschrieben.

3.7.1. Auflichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Auflichtmikroskopie befinden sich Objektiv und Lichtquelle auf derselben Seite des Objektes, das einfallende Licht wird vom Objekt reflektiert. Diese Art der Mikroskopie ist mit den Versionen V3_{SMT}, V4_{SMT}, V5_{SM} und V6_{SMTE} möglich. Verwendet wurde das Lichtmikroskop Olympus BX50 (Fa. Olympus, Hamburg), als Lichtquelle diente eine externe Beleuchtung (handelsübliche Glühlampe) wenn sichtbares Licht verwendet wurde, oder eine interne Quecksilberdampf Lampe für die Fluoreszenzmikroskopie. Hier wurde das ultraviolette Licht der Quecksilberdampf Lampe mit dem internen Filter „WB“ des Olympus BX50 sichtbar gemacht.

3.7.2. Durchlichtmikroskopie

Bei der Durchlichtmikroskopie geht der Strahlengang durch die Objektebene hindurch, es ist somit eine zweite Öffnung in der Kammer nötig. Diese Mikroskopiertechnik wurde ausschließlich mit der Kammer V5_{SM} durchgeführt. Als Lichtquelle diente die interne Glühlampe des Mikroskops.

3.7.3. 3-Dimensionale Rekonstruktion einer Alginat-Mikrokapsel

Zum Erstellen einer 3-dimensionalen Rekonstruktion einer mit Langerhans-Inseln bzw. Inselzellen gefüllten Alginat-Mikrokapsel wurden einzelne unter dem Mikroskop fotografierte Bildebenen am Computer zusammengefügt. Die Langerhans-Inseln wurden mit FDA und PI und zum Teil auch mit Zinquin gefärbt und das Mikroskop Olympus BX50 verwendet. Von einer Kapsel, die sich in einer Kammer V6_{SMTE} unter dem Mikroskop befand, wurde durch schrittweise Änderung der Fokussierebene mit einer definierten Schrittweite eine Bildserie von ca. 100 Ebenen dieser Kapsel angefertigt. Die Schrittweite der Fokussierebenen liegt dabei deutlich unter dem Durchmesser des abzubildenden Gewebestückes innerhalb der Kapsel, typischerweise bei 5 µm. Die so gewonnenen Bilder werden durch eine digitale Weiterverarbeitung (PhotoPaint™, Corel GraphicsSuite12™, Corel Corporation, Ottawa, Canada) von Artefakten befreit und mit Amira™ (Zuse Institut Berlin, Dept. Scientific Visualisation, Berlin) zu einem Datensatz verarbeitet, der auf dem Bildschirm in Echtzeit als 3-dimensionales Abbild der Alginatkapsel betrachtet werden kann.

3.8. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) angegeben. Signifikanzen für verschiedene Ergebnisse wurden mit Hilfe des Student-t-Test für ungepaarte Stichproben geprüft. Ergebnisse waren statistisch signifikant, wenn sich für sie ein $p < 0,05$ ergab.

3.9. Internet- und Literaturrecherche, Literaturverwaltung

Bei der Recherche im Internet wurden die Suchmaschinen „Google“ und „Metacrawler“ benutzt. Metacrawler (www.metacrawler.de) fasst automatisch die Ergebnisse aus ca. 17 internationalen Suchmaschinen, sowie 12 deutschen Suchmaschinen zusammen. Bei der Literaturrecherche wurde auf die Seite www.pubmed.org zugegriffen. Die Recherche dieser Seite erstreckt sich auf Datenbanken von Medscape, DIMDI, NLM Pubmed, MEDLINE, und the Cochrane Library. Die Literaturquellen wurden mit *Reference Manager*TM (Version 10, Thomson Corporation, Carlsbad, CA, USA) verwaltet.

3.10. Fotodokumentation

Die fotografische Dokumentation der Daten wurde auf mehrere Arten durchgeführt. An einem Mikroskop (Olympus BX50, Fa. Olympus) mit einer Kamera des Typs Olympus PM-C35 (Fa. Olympus) unter Zuhilfenahme einer Olympus PM 20 Belichtungsautomatik (Fa. Olympus). Als Filmmaterial wurden Farbdiafilme des Typs Fujichrome 64 Professional T verwendet. Am gleichen Mikroskop kam auch eine digitale Kamera ColorView12 (Fa. SIS, Stuttgart) zum Erstellen hoch auflösender digitaler Bilder zum Einsatz. Weitere Abbildungen wurden mit Kameras der Hersteller Canon (Modell Ixus V) und Kyocera (Modell Finecam S3L) erstellt.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden Ergebnisse dargestellt, die zeigen, dass Verbesserungen an der *In-Vitro*-Kultur und Funktionsdiagnostik von isolierten Langerhans-Inseln möglich sind. Der Weg dahin führt über die Entwicklung und Etablierung einer Perifusionskultur in speziellen Kulturkammern als Ersatz für die Kultivierung in Zellkulturflaschen. Es werden die Entwicklungsschritte, Funktionen und die Anwendungsmöglichkeiten der einzelnen Perfusionskultur-Kammern aufgezeigt und schließlich ihre Anwendung auf die Untersuchung anderer endokriner Zellen erweitert. Zuletzt wird die Entwicklung eines eigenen ELISA zur Messung von porcinem Insulin beschrieben.

4.1. Untersuchungen zu Zellkultur und Funktionsdiagnostik von Langerhans-Inseln

Wie frühere Versuche aus dem eigenen Labor und auch Beispiele aus der Literatur zeigen, sinkt die Vitalität der isolierten porcinen Langerhans-Inseln, je länger ihre *In-Vitro*-Kultur andauert. Vitalität und Funktion von Langerhans-Inseln hängen ab von Kulturmedium, Temperatur [51] und Zusätzen wie Nikotinamid [52] und Serum.

4.1.1. Einfluss des Serums im Medium auf die Vitalität

Ausgehend von diesen Erkenntnissen aus 4.1. sollte herausgefunden werden, ob mit Änderungen der Zusammensetzung des Mediums eine Verbesserung der Vitalität von isolierten porcinen Langerhans-Inseln möglich ist. Serum ist ein wesentlicher Bestandteil eines Kulturmediums und enthält Hormone und Wachstumsfaktoren, zahlreiche zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer und Neutralisationssysteme. Änderungen der Art oder Konzentration des Serumzusatzes im Medium haben einen großen Effekt auf die Vitalität der kultivierten Zellen. Hier wurde untersucht, wie sich verschiedene Serumzusätze im Grundmedium HAM's F12 auf die Vitalität der isolierten, unverkapselten porcinen Langerhans-Inseln auswirken. Verwendet wurde porcines Serum (PS), fetales Kälberserum (FCS) und Rattenserum (RS) und diese jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen.

Zunächst wurde der Effekt unterschiedlicher Serumzusätze auf die Vitalität der isolierten, unverkapselten Langerhans-Inseln am 1. und 3. Tag der Zellkultur untersucht. Verwendet wurde jeweils HAM's F12 mit 5% FCS (entspricht dem Standardmedium), 10% PS oder

20% PS. Es wurde aus 11 Kulturen die durchschnittliche Vitalität der Langerhans-Inseln zu Beginn der Kultur und nach 3 Tagen ermittelt, in Prozent angegeben und in Abbildung 1 für jeden Serumzusatz getrennt dargestellt.

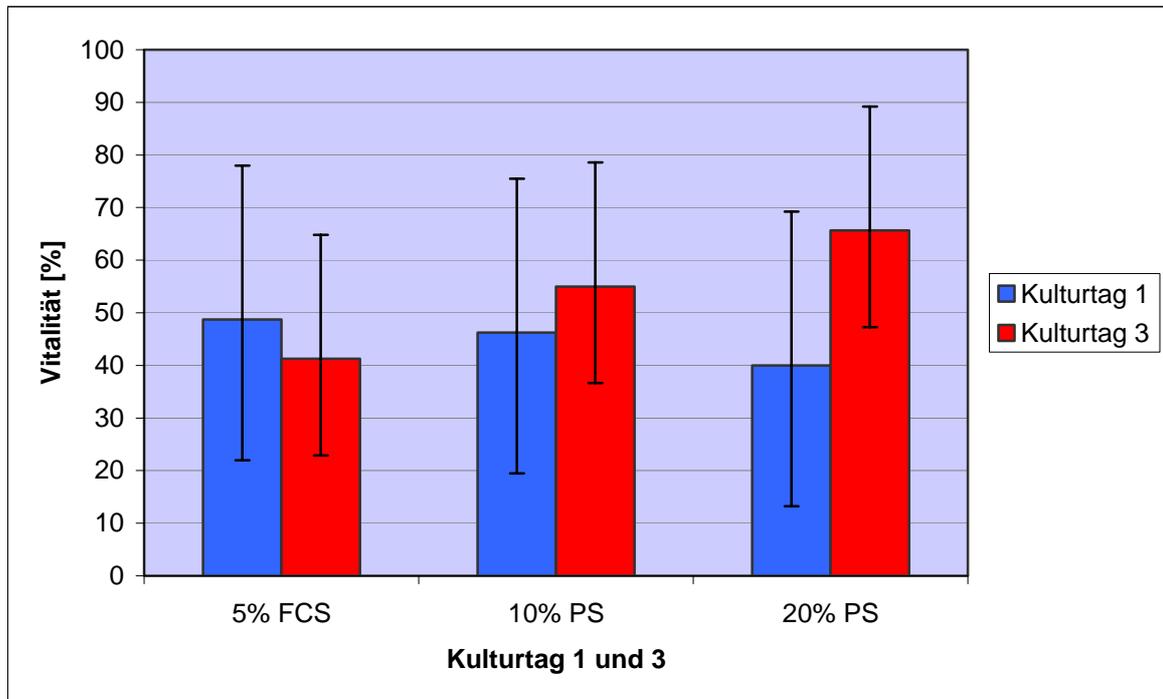


Abbildung 1: Werden isolierte porzine Langerhans-Inseln in HAM's F12 mit porzinem Serum kultiviert, steigt die Vitalität bis zum 3. Kulturtag an (n=4 bei 10% PS und n=3 bei 20% PS). Im Gegensatz dazu sinkt die Vitalität bei der Kultivierung mit dem Standardmedium HAM's F12 und 5% FCS (n=4).

Es zeigt sich, dass nach 3 Tagen Kultivierung im Standardmedium die Vitalität von Langerhans-Inseln tendenziell zurückgeht, während sie beim Zusatz von porzinem Serum zunimmt (nicht signifikant).

Da diese Daten zunächst mit unterschiedlichen Isolierungen und voneinander unabhängigen Kulturen gewonnen wurden, sollten nun Langerhans-Inseln der gleichen Isolierungen direkt miteinander verglichen werden. Um die Ergebnisse untereinander vergleichbar zu machen, wurden Langerhans-Inseln parallel mit Standardmedium HAM's F12 mit 5% FCS kultiviert und deren Vitalität als Referenzwert genommen. Die Vitalität dieser Referenzkultur wurde mit dem Wert 1 gleichgesetzt und die Vitalität der Inseln aus den modifizierten Medien relativ zu diesem angegeben. Sind also die Inseln in einer Zellkulturflasche

doppelt so vital wie die Referenz, so ergibt sich für deren relative Vitalität der Wert „2“. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt.

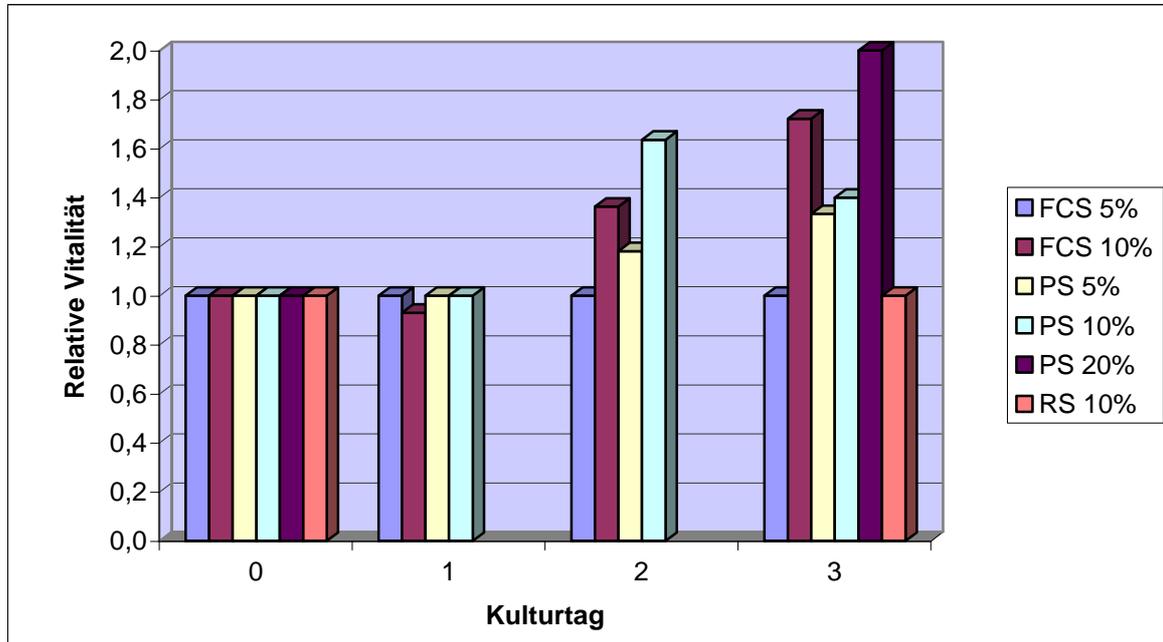


Abbildung 2: In mehreren Versuchen wurden Vitalitätswerte von porzinen Langerhans-Inseln, die in Medien mit verschiedenen Serumzusätzen kultiviert wurden, direkt mit der Vitalität von Langerhans-Inseln im Standardmedium verglichen. Bis zum 3. Kulturtag ist das Standardmedium nahezu allen anderen getesteten Medien unterlegen.

Es zeigt sich, dass bis zum 3. Tag porzine Langerhans-Inseln im Standardmedium eine deutlich niedrigere Vitalität aufweisen als in den modifizierten Medien. Die Verwendung von höher konzentriertem Serum ist von Vorteil für die Vitalität der Langerhans-Inseln, insbesondere 20% porzines Serum führen zu einer Steigerung der Vitalität von nahezu 100% gegenüber dem Standardmedium mit 5% FCS. Die Verwendung von 10% Rattenserum steigert die Vitalität im Vergleich zum Standardmedium nicht.

Die Unterschiede in der Vitalität sind umso größer, je länger die Exposition der Zellen im jeweiligen Medium andauert. Um eine Aussage über die Änderungen der Vitalität ab dem 3. Kulturtag zu machen, wurden Zellkulturflaschen mit vier verschiedenen Serumzusätzen angesetzt und über 11 Tage beobachtet. Eine Zellkultur enthielt das Standardmedium, die anderen HAM's F12 mit 10% FCS, sowie 5% PS oder 10% PS.

In regelmäßigen Abständen wurde die Vitalität der Langerhans-Inseln stichprobenartig unter dem Mikroskop bestimmt und in Prozent angegeben.

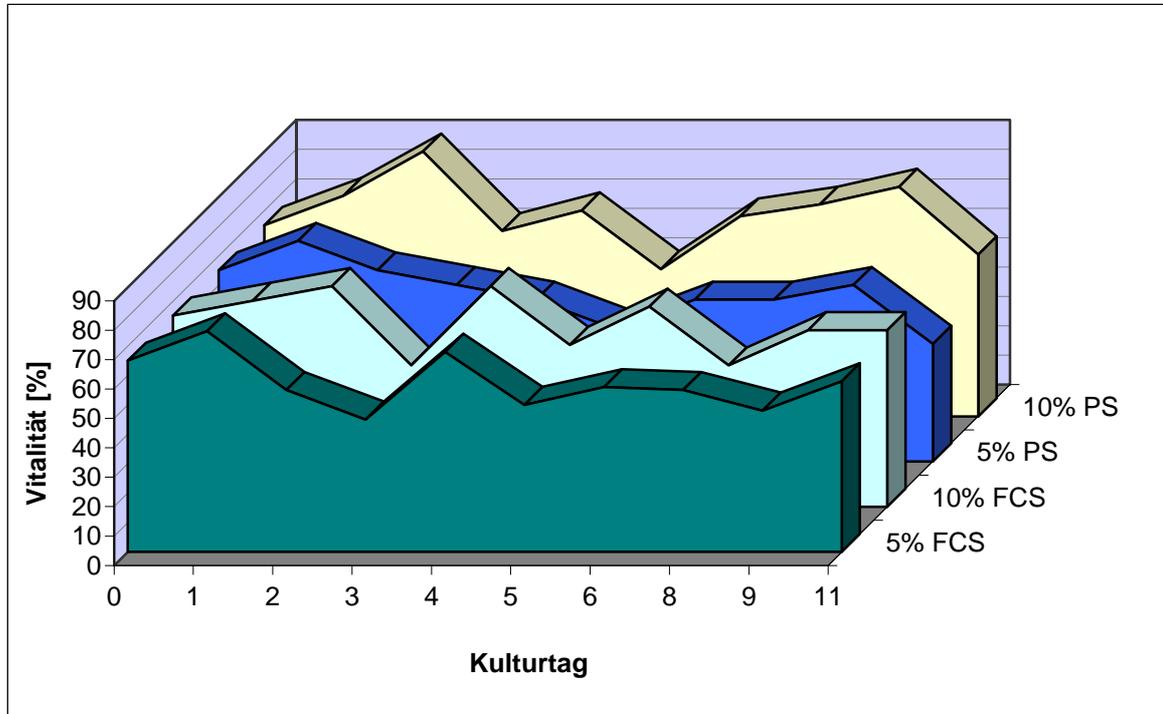


Abbildung 3: Über einen Zeitraum von 11 Tagen wurde die Vitalität von porzinen Langerhans-Inseln aus vier verschiedenen Kulturmedien miteinander verglichen. Die Vitalität von Inseln aus dem Standardmedium HAM's F12 mit 5% FCS liegt während des gesamten Zeitraums unter der Vitalität der Inseln aus den anderen Medien. Durch die Mediumswechsel werden Schwankungen in der Vitalität verursacht.

Die Abbildung 3 zeigt, dass insbesondere in den ersten 3-4 Tagen der Zusatz von 10% Serum eine Steigerung der Vitalität der Langerhans-Inseln im Vergleich zu 5% Serum bewirkt, unabhängig davon, ob porzines oder fetales Kälberserum verwendet wird. Des Weiteren wirkt sich der Zusatz von 10% PS wie zuvor gesehen positiv auf die Vitalität aus. Insgesamt fällt jedoch bei allen Medien die niedrige Vitalität von 50 bis 60% nach einer Kulturdauer von 11 Tagen auf. Die Vitalität weist Schwankungen auf, die im zeitlichen Zusammenhang mit dem Wechsel des Mediums stehen. Auch in diesem Versuch kann keine Aussage über den Anteil der überlebenden Zellen in der Zellkultur gemacht werden, da für die Färbungen bis zum 11. Kulturtag sämtliche Zellen aus dieser Isolierung aufgebraucht wurden.

Um den Zugewinn an Vitalität im Vergleich zum Standardmedium mit 5% FCS zu verdeutlichen, wurde die Vitalität der Langerhans-Inseln aus der Zellkultur A (Standardmedium) als Referenz verwendet, dem Wert 1 gleichgesetzt und die Vitalitätswerte aus den anderen Zellkulturen relativ dazu angegeben (Abbildung 4). Mittels dieser Darstellung konnten auch die Schwankungen der Vitalität als Folge des Mediumswechsels eliminiert werden.

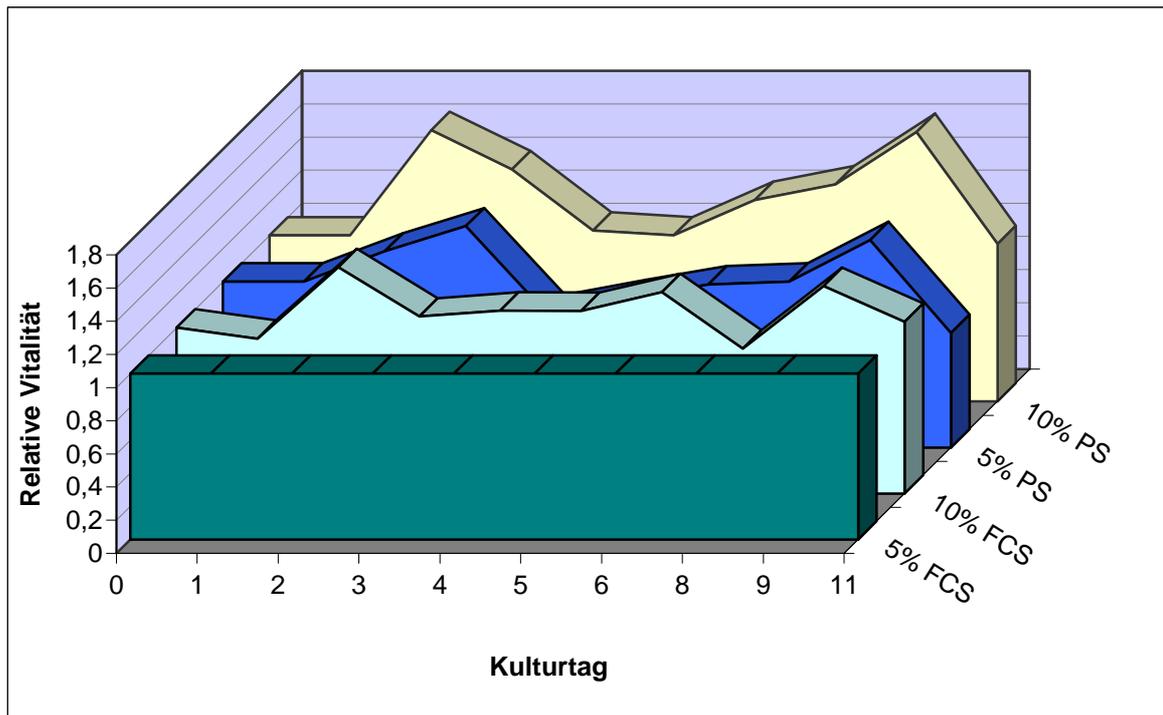


Abbildung 4: In diesem Diagramm werden die Ergebnisse direkt mit der Vitalität der Langerhans-Inseln aus dem Standardmedium verglichen. Hier wird besonders deutlich, dass ein höher konzentrierter Serumzusatz, und insbesondere die Verwendung von porzinem Serum, eine bessere Vitalität ergeben.

Hier wird deutlich, dass das Standardmedium den anderen Serumzusätzen unterlegen ist. Ebenso zeigt sich, dass im Vergleich mit 5% FCS höhere Serumkonzentrationen, insbesondere des porzinen Serums, bessere Vitalitäten im Zeitraum zwischen dem 2. und 4. Kulturtag erbringen. Auch nach dem 4. Kulturtag bringt der Zusatz von 10% PS einen Vitalitätszuwachs.

4.1.2. Funktionsprüfung mit der Apparatur *Suprafusion*® von Brandel

Zur Beurteilung der *In-Vitro*-Funktion isolierter porziner Inseln wurde die Perifusion mit der *Suprafusion*® von Brandel durchgeführt. Hierbei sollte ausschließlich die Form der

Ausschüttungskurve in Bezug auf Stimulationsindex, Zeitpunkt und Ausprägung eines Peaks, und Plateauphase beurteilt werden. Ausgewertet wurden retrospektiv technisch einwandfreie Perfusionen aus dem Jahr 1999. Um die Insulin-Ausschüttungskurven miteinander vergleichen zu können, wurden die Kurven normiert (siehe Kapitel 3.6.), wobei die Form der Kurven nicht verändert wurde. Die Perfusionen wurden nach Art der Spendertiere (Jungtier oder Muttertier) und nach dem Perfusionszeitpunkt (24 h, 48 h oder 72 h nach Isolierung) in 4 Gruppen eingeteilt.

In der ersten Gruppe, den isolierten Inseln von Jungtieren, war nach einer Kultivierungszeit von 24 h ein Peak in der Insulin-Ausschüttungskurve angedeutet (Abbildung 5). Dieser beginnt bei 12,5 min nach Stimulation jedoch verzögert. Ein Plateau ist nicht zu erkennen, folglich ist der Stimulationsindex kleiner 1 (siehe Abbildung 9) und die durchschnittliche Konzentration des ausgeschütteten Insulins ist mit 18,3 U/ μ l vergleichsweise niedrig (siehe Abbildung 10).

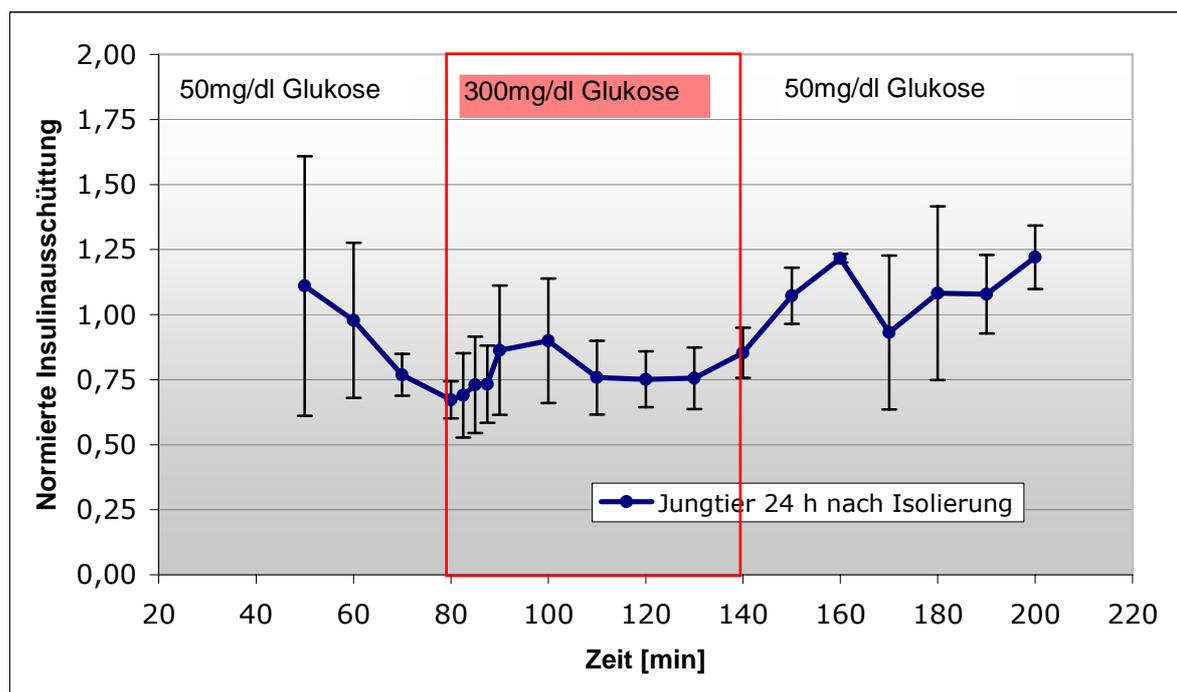


Abbildung 5: Die Perfusion isolierter porziner Inseln von Jungtieren (n=4) mit Glukoselösung nach 24 h Kultivierung zeigt eine deutliche Reaktion auf den Reiz mit 300 mg/dl Glukose, eine typische Plateauphase fehlt jedoch.

Bei der zweiten Gruppe, den isolierten Inseln von Jungtieren, die über 48 h kultiviert wurden, fällt der Peak in der Insulin-Ausschüttungskurve bei Stimulation mit Glukoselö-

sung weg. Stattdessen reagieren die Langerhans-Inseln paradox mit einer deutlichen Supprimierung der Insulinausschüttung unter das Niveau der basalen Sekretion. Wiederum fehlt die Plateauphase (Abbildung 6). Folglich ist auch hier der Stimulationsindex unter 1 (Abbildung 9). Die durchschnittliche Insulinkonzentration während der Perifusion ist mit $106 \text{ U}/\mu\text{l}$ vergleichsweise hoch (Abbildung 10).

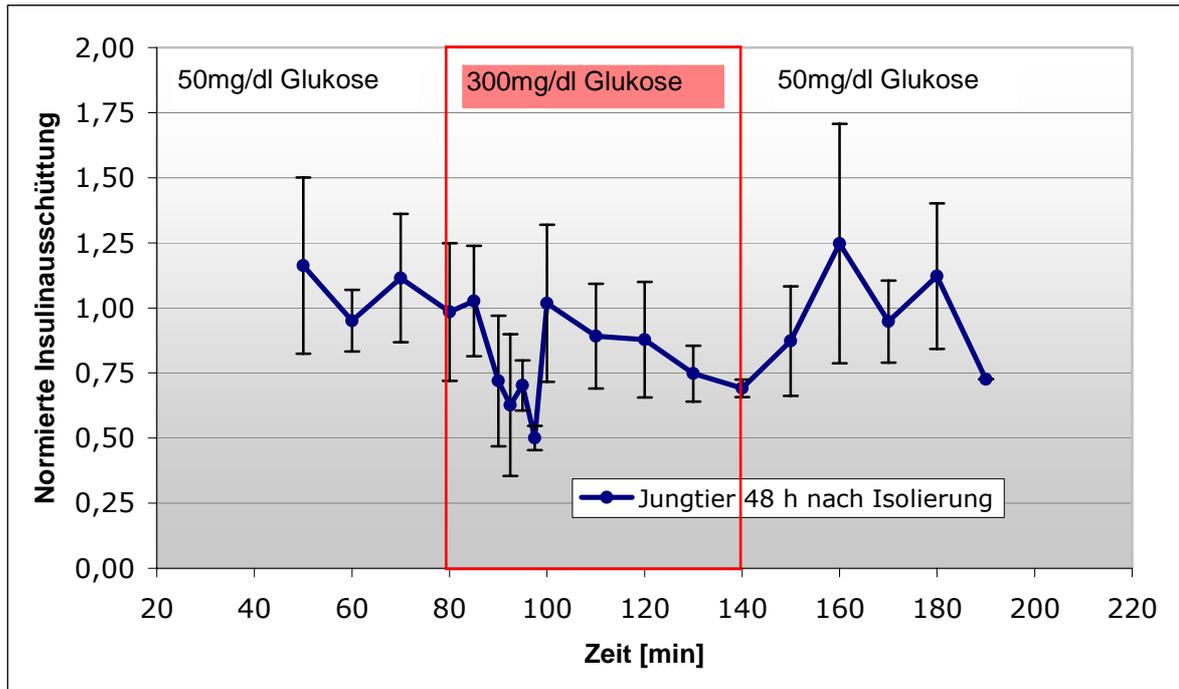


Abbildung 6: Nach 48stündiger Kultivierung fällt der Insulinpeak als Antwort auf den Glukosereiz weg. Die Plateauphase ist ebenfalls nicht ausgebildet (n=3).

In der dritten Gruppe, den isolierten Inseln von Muttertieren nach einer Kultivierungszeit von 48 h, zeigt sich wie in der zweiten Gruppe ein Peak-Verlust, eine deutliche Supprimierung der Insulinausschüttung und ein Fehlen der Plateauphase (Abbildung 7). Auch hier liegt der Stimulationsindex unter 1 (Abbildung 9). Die Konzentration des ausgeschütteten Insulins beträgt durchschnittlich $76 \text{ U}/\mu\text{l}$ (Abbildung 10).

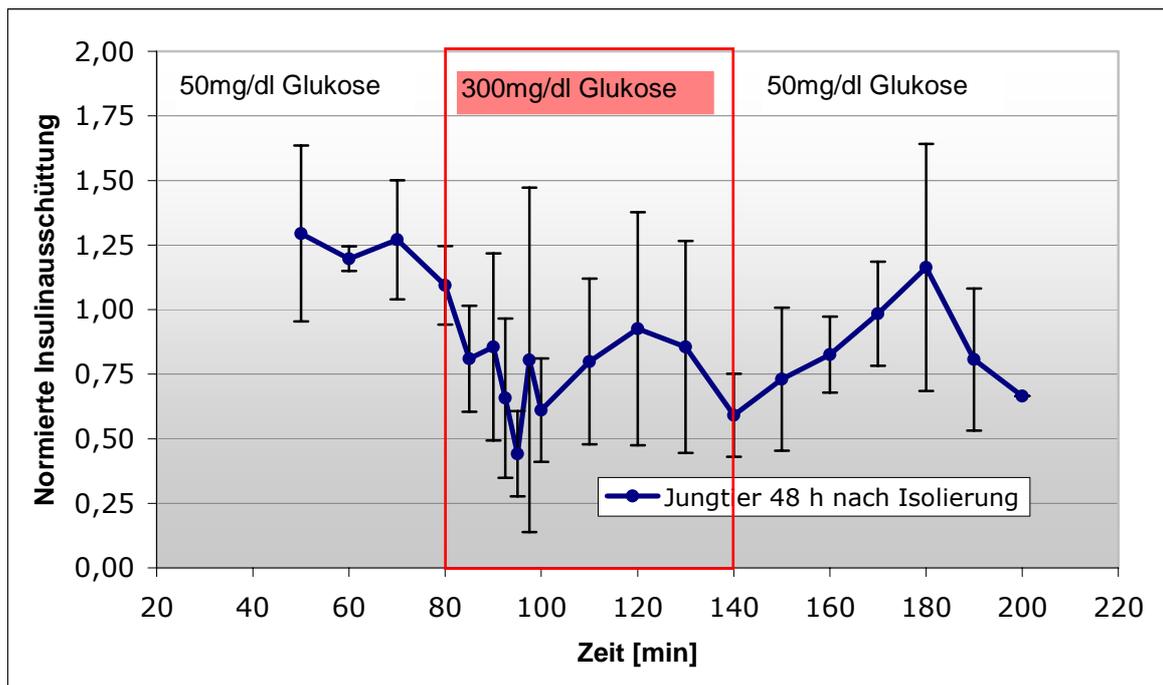


Abbildung 7: Isolierte Inseln von Muttertieren (n=4) zeigen wie die Inseln von Jungtieren nach 48 h in Kultur eine paradoxe Reaktion auf Glukoseexposition. Erst nach Beendigung der Glukoseexposition steigt die Insulinsekretion wieder auf das Niveau der basalen Insulinsekretion an.

Die vierte Gruppe besteht aus mikroverkapselten Inseln von Muttertieren. Abbildung 8 zeigt eine Perfusion 72 h nach Isolierung und 24 h nach Verkapselung. Zu diesem Zeitpunkt fällt die Supprimierung der Insulinausschüttung auf einen Glukosereiz geringer aus als bei den anderen 3 Gruppen. Ein regelrechter Peak ist jedoch auch hier nicht zu erkennen, die Plateauphase ist vorhanden, aber nur sehr schwach ausgebildet. Eine deutliche Verzögerung der Reaktion auf den Reiz mit 300 mg/dl Glukose, als möglichen Hinweis auf verlangsamte Diffusionsvorgänge innerhalb der Mikrokapsel, ist nicht zu erkennen. Durch die wieder vorhandene Plateauphase steigt der Stimulationsindex über 1 (Abbildung 9). Die durchschnittliche Insulinkonzentration im Überstand ist mit nur 5,9 U/ μ l sehr gering.

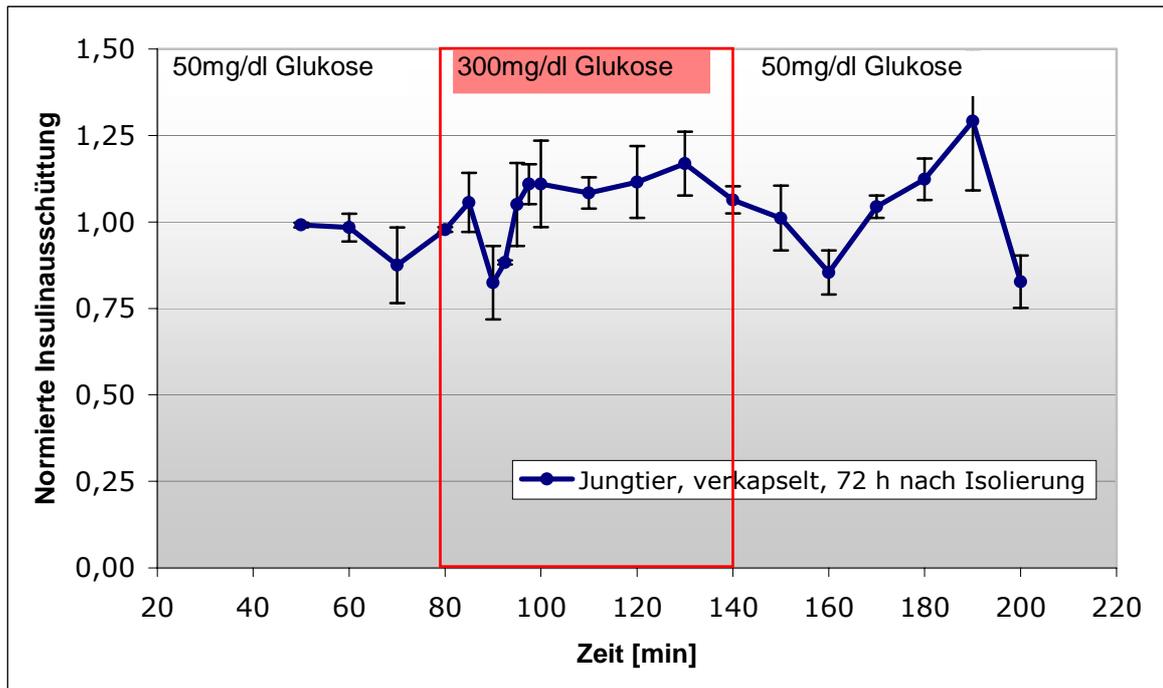


Abbildung 8: Die Perfusion von mikroverkapselten isolierten porcinen Inseln von Muttertieren (n=2) 72 h nach Isolierung und 24 h nach Verkapselung zeigt weiterhin eine Suppression auf den Reiz mit 300 mg/dl Glukose. Jedoch hat sich im Vergleich zu den vorherigen Versuchen bereits wieder ein Plateau ausgebildet. Der Stimulationsindex ist über 1.

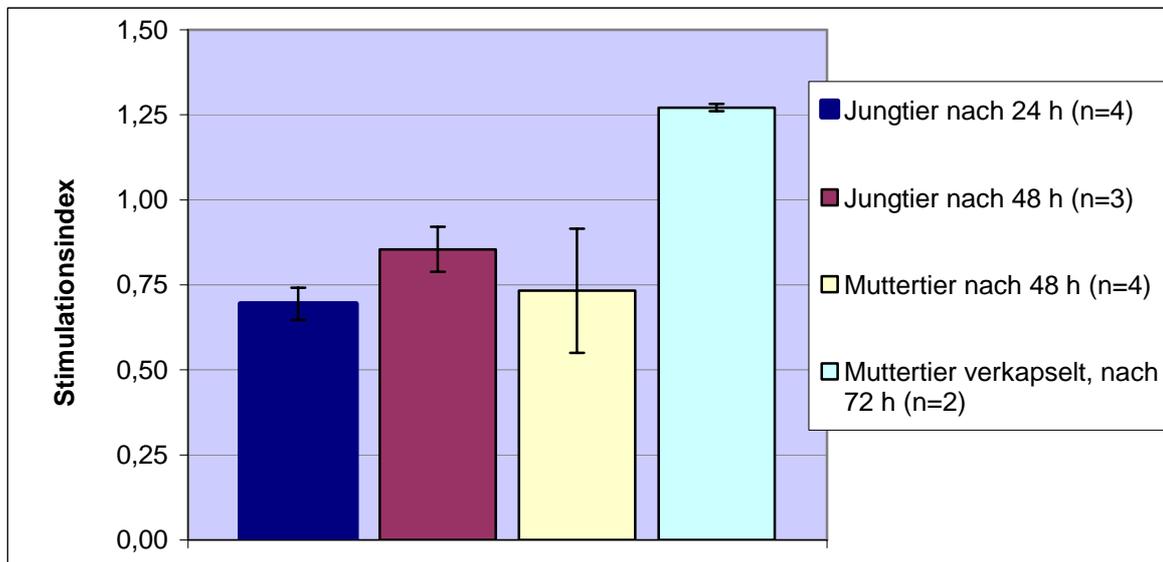


Abbildung 9: Die durchschnittlichen Stimulationsindizes aus den vorhergehenden Versuchen zeigen, dass erst nach 72 h Kultivierung der Stimulationsindex über 1 steigt, also nach Stimulation mehr Insulin ausgeschüttet wird als ohne Stimulation mit Glukose.

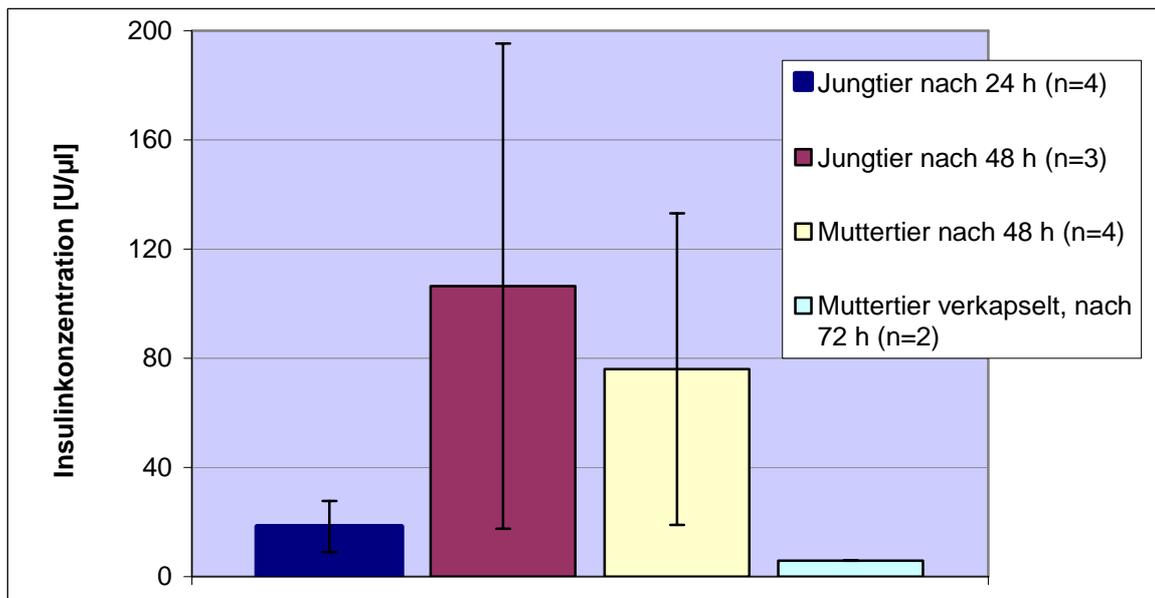


Abbildung 10: Sehr unterschiedlich sind die mittleren Konzentrationen des während einer Perfusion ins Medium abgegebenen Insulins aus den vier Gruppen. Die höchsten Werte finden sich nach einer Kulturzeit von 48 h, unabhängig von der Art des Spendertiers. Mikroverkapselte isolierte Inseln vom Muttertier zeigen mit 5,9 U/μl die niedrigste mittlere Insulinausschüttung.

4.2. Entwicklung eines Perfusionskultur-Systems *Würzburger Kammer*

Erklärtes Ziel dieser Arbeit war zur Verbesserung der Kulturbedingungen für isolierte Langerhans-Inseln die Entwicklung eines Perfusionskultur-System, das geeignet ist, um Gewebe zu kultivieren, und das gleichzeitig *In-Vitro*-Funktionsdiagnostik durch Perfusion und Vitalitätskontrollen durch Mikroskopieren ermöglicht.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit entstanden sechs Versionen von Perfusionskultur-Kammern, die auf den Erfahrungen mit den vorhergehenden Versionen basieren und unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die Versionen sind, wie bereits oben erwähnt, in der Reihenfolge der Entwicklung nummeriert (V1 bis V6) und erhalten eine Indizierung zur Kennzeichnung der wesentlichen Merkmale wie Material und Funktion (A = Acrylglas, S = Edelstahl, M = mikroskopierbar, T = Temperatursteuerung, E = Elevator). In ihrer Gesamtheit stellen die einzelnen Versionen und das entwickelte Zubehör ein System dar, das als *Würzburger Kammer* bezeichnet wird.

4.2.1. Perfusionskultur mit dem *Gradient-Culture-Container*® von Minucells

Vor der Entwicklung der *Würzburger Kammer* wurde in einer Reihe von Vorversuchen mit dem *Gradient-Culture-Container*® von Minucells gezeigt, dass das Prinzip der Perfusionskultur auf isolierte porzine Langerhans-Inseln anwendbar ist.

Für den Betrieb des *Gradient-Culture-Container*® als Perfusionskultur-Kammer wurde eine permeable Membran verwendet. Die Anschlüsse wurden so verändert, dass das Medium durch die Langerhans-Inseln auf der Membran hindurch floss. Alle aus der Kultur in Zellkulturflaschen übertragbaren Parameter wurden beibehalten: Als Medium wurde das Standardmedium HAM's F12 mit 5% FCS verwendet, die Container wurden im Brutschrank bei 24 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ betrieben.

Versuche zur Kultivierung von isolierten porzinen Langerhans-Inseln in einer Perfusionskultur im *Gradient-Culture-Container*® über mehr als 24 h ergaben in der Vitalitätsfärbung eine gute Vitalität, vergleichbar mit den Ergebnissen aus parallelen Zellkulturen in Zellkulturflaschen. Nachteilig erwies sich, dass die Vitalitätsdiagnostik durch Mikroskopie mit dem *Gradient-Culture-Container*® bauartbedingt nicht möglich ist, und Zellen nur durch einen Abbruch der Kultur entnommen werden konnten. Die Funktionsdiagnostik mittels Perifusion ist mit dem *Gradient-Culture-Container*® wegen des zu großen Volumens von Kammer, Schläuchen und Anschlüssen nicht durchführbar. Diese Ergebnisse werden hier nicht dokumentiert.

4.2.2. Zubehör zum System der *Würzburger Kammer*

Mit der *Würzburger Kammer* wurde das Konzept der Perifusionskultur an die Bedürfnisse im eigenen Labor für die Kultivierung von isolierten nativen und verkapselten porzinen Langerhans-Inseln angepasst. Im Zuge der Neuerungen und Veränderungen, die am Kultursystem vorgenommen wurden, konnte bestehendes Zubehör wie Mediumflaschen, Brutschrank, Wasserbad, und der Perifusionsautomat *Suprafusion*® der Fa. Brandel etc. nicht mehr in der ursprünglichen Form eingesetzt werden. Auch Zubehör des *Gradient-Culture-Container*®, wie dessen Schlauchsysteme, Einsätze, Konnektoren, Entlüftungssysteme etc. konnten durch die fortschreitende Miniaturisierung und Spezialisierung des neuen Systems nicht mehr verwendet werden. Hier soll kurz auf die wesentlichen Neuentwicklungen eingegangen werden, die für den Einsatz der *Würzburger Kammer* unabdingbar waren.

Membran Als Auflage für die kultivierten Langerhans-Inseln wurde ein Nylonnetz gewählt, das beständig gegen Lösungsmittel und biologisch inert ist. Die Maschenweite beträgt 10 μm , so dass das Netz keinen nennenswerten Strömungswiderstand für das Medium darstellt und gleichzeitig sämtliche Kapseln und auch native Inseln im Strom zurückgehalten werden. Zellfragmente, Stoffwechselprodukte und einzelne Zellen werden ausgeschwemmt.

Abtropfanlage Um die Proben in jeder Art von Probengefäß auffangen zu können (Eppendorf-Caps, FACS-Röhrchen, Falcon-Röhrchen (15 ml und 50 ml), ELISA-Platte mit 96 Vertiefungen), wurde das Abtropfsystem der Perifusionsanlage *Suprafusion*® modifiziert. Es konnten nun die Ableitungen aus bis zu 8 Kulturkammern so justiert werden, dass die Tropfen exakt in Probengefäße jeder Dimension fielen.

Wasserbad und Heizplatte Um kurze Zu- und Ableitungen zu den einzelnen Kammern zu garantieren, wurden sämtliche Baugruppen des Versuchsaufbaus in enger räumlicher Beziehung zueinander gestellt. Hierfür wurde eine Heizplatte konstruiert, die direkt über dem Probenschlitten der Perifusionsanlage *Suprafusion*® montiert werden konnte. Auf ihr fanden 8 Kammern der Versionen V3, V4 oder V5 Platz. Die Kulturkammern konnten so über die gesamte Versuchsdauer während Perifusionskultur und Perifusion an Ort und Stelle belassen und die Temperatur beliebig oberhalb der Raumtemperatur reguliert werden (siehe auch Abbildung 22 und Abbildung 23).

Timerprogramm zur Probennahme Während der experimentellen Phase wurden die zeitlichen Abstände der Probennahme im Versuchsablauf der Perifusion häufig geändert. Zur Erleichterung wurde ein Programm auf dem PC erstellt, das nach dem Start der Perifusion über ein Alarmsignal rechtzeitig an ein manuelles Vorschieben des Probenschlittens erinnert. Treten im Versuchsverlauf Abweichungen von den vorgeschriebenen Zeitintervallen auf, werden die Soll-Zeiten durch die Ist-Zeiten in einer Excel™-Tabelle ersetzt und beim Erstellen eines Diagramms berücksichtigt.

Konnektoren Zum Verbinden von Schläuchen mit geringem Durchmesser wurden Steckverbindungen aus Kanülen erstellt. Durch Verklebung unterschiedlicher Kanülengrößen wurden Reduktionshülsen zum Verbinden unterschiedlicher Schlauchdurchmesser angefertigt.

Blasenfänger Um zu verhindern, dass Gasblasen im Medium in die Perfusionskulturkammern gelangten, wurde ein Portsystem in das Schlauchsystem integriert. In diesem Portsystem konnten die Gasblasen in ein kleines über Niveau liegendes Volumen aufsteigen, wurden gefangen und das blasenfreie Medium wurde unten weitertransportiert.

4.2.3. Würzburger Kammer V1_A

Im Folgenden werden die Anforderungen an die Konstruktion der einzelnen Versionen der *Würzburger Kammer*, deren Umsetzung und die im Betrieb gewonnenen Erkenntnisse beschrieben.

Anforderungen Nach den Erkenntnissen mit dem *Gradient-Culture-Container*® von Minucells, sollten für die Eigenkonstruktion einer Perfusionskulturkammer zunächst folgende Punkte umgesetzt werden: Verwendung eines leicht zu bearbeitenden Materials, Reduktion des Kammervolumens und des Schlauchvolumens für genauere Perifusionen und Einsatz eines Nylonnetzes anstelle einer Membran als Unterlage für die Zellen.

Konstruktion (Abbildung 11) Die Kammer besteht aus Acrylglas, das gut zu bearbeiten ist, und besteht aus zwei Teilen. Der Innenraum der Kammer entsteht durch Bohrungen im oberen und unteren Teil. Durch die konische Form der Bohrungen konnte das Volumen in der Kammer auf etwa 0,35 ml verringert werden im Vergleich zu 0,45 ml des *Gradient-Culture-Container*®. Im Innenraum ist ein Membranhalter aus dem System des *Gradient-Culture-Container*® zwischen zwei O-Gummiringen fixiert, die gleichzeitig die Kammer nach außen abdichten. Eingesetzt in den Membranhalter ist ein zugeschnittenes Nylonnetz mit einer Maschenweite von 20 µm, auf dem sich während des Betriebs die Zellen befinden. Da das Medium von oben durch das Netz in den unteren Teil der Kammer fließt, können die Zellen nicht fortgeschwemmt werden. Die beiden Zu- und Ableitungen sind als Portsystem aufgebaut und werden durch Gummimembranen abgedichtet. Zum Anschluss an das Schlauchsystem wird das Portsystem von außen über Kanülen punktiert.

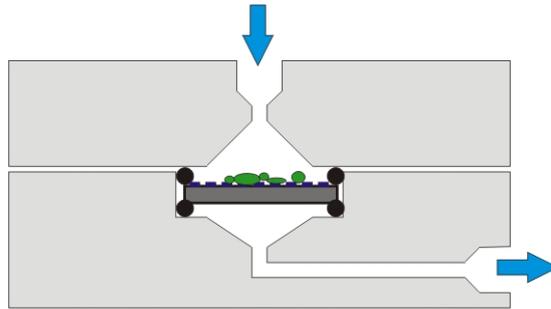


Abbildung 11: Schema der *Würzburger Kammer V1_A* aus Acrylglas. Die Zellen (grün) liegen im oberen Teil der Kulturkammer auf dem Membranträger (dunkelgrau) mit dem Nylonnetz (gepunktete Linie). Das Medium (blauer Pfeil) bewegt sich von oben nach unten durch die Kammer.

4.2.4. *Würzburger Kammer V2_A*

Anforderungen Weitere Verringerung des Kammervolumens und Abkehr vom Clipsystem von Minucells. Schaffung von Möglichkeiten zur Entfernung von Gasblasen in der Kammer und zum unkomplizierten Befüllen der Kammer mit Langerhans-Inseln und Mikrokapselfn.

Konstruktion (Abbildung 12) Die zweite Version *V2_A* der *Würzburger Kammer* besteht ebenfalls aus Acrylglas und ist ähnlich wie die Kammer *V1_A* aufgebaut. Das Volumen wurde weiter auf 0,3 ml verringert, statt des Clipsystems als Membranhalterung wurde das Nylonnetz direkt mit einem einzigen Gummiring gegen den Boden der Kammer fixiert. Abgedichtet wurde die Kammer allein durch den Gummiring. Der Weg des Mediums ist der gleiche wie in der Kammer *V1_A*, jedoch mündet über eine schräge seitliche Bohrung ein weiterer Zugang in den oberen Teil der Kammer. Dieser ist wie die anderen Zugänge durch ein Portsystm abgedichtet. Darüber können sowohl Gasblasen entfernt werden, als auch mit einer großlumigen Kanüle die Langerhans-Inseln oder Mikrokapselfn direkt in die geschlossene Kammer eingebracht werden.

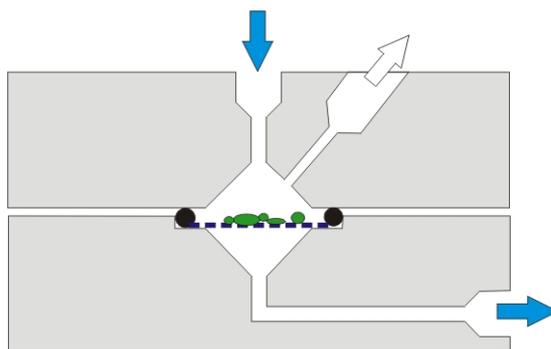


Abbildung 12: Schema der *Würzburger Kammer V2E*. Es wurde ein zusätzlicher Zugang zum oberen Teil der Kammer zum Entfernen von Luftblasen geschaffen (weißer Pfeil).

4.2.5. *Würzburger Kammer V3_{SMT}*

Anforderungen: Größere Haltbarkeit und Sterilisierbarkeit, Wärmeleitfähigkeit für den Einsatz außerhalb eines Inkubators. Mikroskopierbarkeit und Blasenfänger im zuführenden Schlauchsystem.

Konstruktion (Abbildung 13) Die Kammer *V3_{SMT}* ist aus Edelstahl gefertigt und besteht aus 2 Teilen. Im oberen Teil der Kammer befinden sich eine Zuleitung und ein Zugang zum Entlüften. Zwischen dem Deckel und dem Grundteil wird zwischen zwei Gummidichtungen das Nylonnetz fixiert. Das Medium fließt wie bei den vorherigen Kammern von oben durch das Nylonnetz in den unteren Teil der Kammer in den im Boden befindlichen Ablauf. Direkt unter dem Nylonnetz ist der Temperatursensor platziert, der durch Silikonkleber sowohl fixiert als auch gegen die Metallwand isoliert ist. Somit wird die Temperatur direkt unterhalb der Zellen gemessen. Die Anschlüsse für den Sensor werden seitlich aus der Kammer gleitet und sind gegen das Kammerlumen mit Silikonkleber abgedichtet. Der Temperatursensor ist an das Regel-Mess-System angeschlossen, wie in 4.2.9. beschrieben. Das Peltierelement zum Beheizen der Kammer ist mit Wärmeleitpaste am Boden der Kammer angebracht. Durch das Deckglas können die in der Kammer befindlichen Zellen von oben beobachtet werden, wodurch Auflichtmikroskopie möglich ist. Der Fokussierabstand beträgt ca. 3 mm und ermöglicht mit dem Mikroskop Olympus BX50 eine maximal 50fache Vergrößerung.

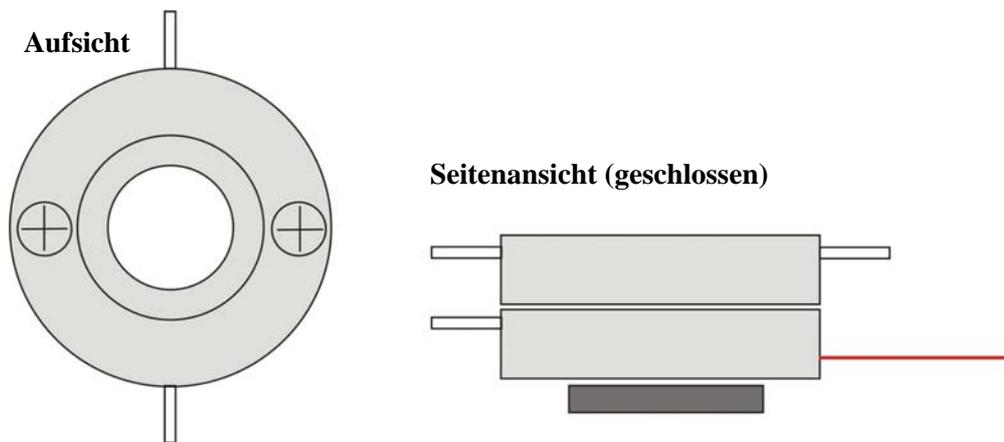
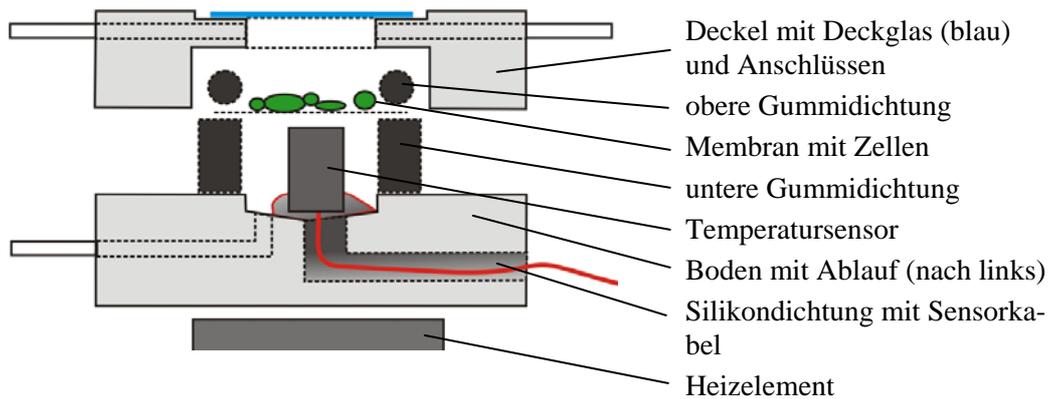


Abbildung 13: Die Würzburger Kammer V3_{SMT} ist aus Edelstahl, hat ein Deckglas (blau) und 2 Zuläufe im Deckel, sowie einen Ablauf und einen integrierten Temperatursensor im unteren Teil, der die Temperatur direkt an den Zellen misst. Die Kabel werden durch eine separate, von Silikon abgedichtete Öffnung im unteren Teil geführt. Das Heizelement befindet sich unter der Kammer.

4.2.6. Würzburger Kammer V4_{SMT}

Anforderungen Geringerer Fokussierabstand für höhere Vergrößerungen beim Mikroskopieren. Verringerung des Volumens, bessere Fixierung des Nylonnetzes.

Konstruktion (Abbildung 14) Da bei der Kammer V3_{SMT} einige Probleme mit der Dichtung und der Fixierung des Nylonnetzes auftraten, wurde bei der Version V4_{SMT} ein Sockel in den Boden integriert, auf dem ein kleinerer Gummiring platziert wurde, der das Nylonnetz an den Deckel der Kammer presst. Der Temperatursensor konnte so im Vergleich zur Kammer V3_{SMT} tiefer in die Kammer versenkt werden. Auf diese Weise wurden technische Probleme mit der Stabilität und der Dichtigkeit gelöst. Durch Weglassen des zweiten Gummiringes und Verringern der Deckelhöhe lagen die Zellen nun näher am Deckglas, so

dass die maximale Vergrößerung bei der Auflichtmikroskopie mit dem Olympus BX50 100fach betrug. Das Volumen der Kammer wurde im Vergleich zu Kammer V3_{SMT} wieder auf unter 0,3 ml reduziert.

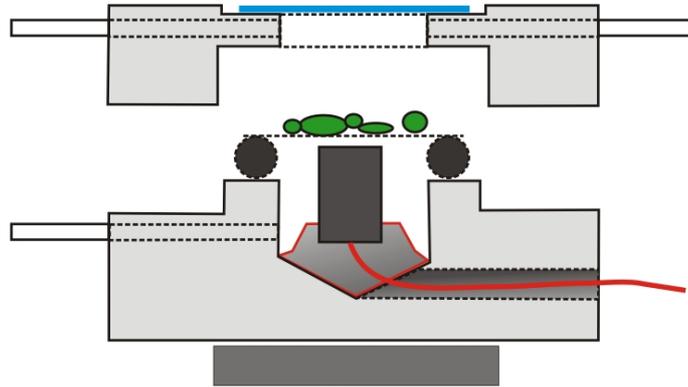


Abbildung 14: Querschnittszeichnung der geöffneten *Würzburger Kammer* V4_{SMT}. Bei dieser Version wurden die Zellen näher am Deckglas gelagert, das Nylonnetz war zwischen einem Gummiring, der auf einem Sockel saß, gegen den Deckel fixiert und die Kammer damit abgedichtet.

4.2.7. *Würzburger Kammer* V5_{SM}

Anforderungen Durchlichtmikroskopie, Verkleinerung des Volumens und der Außenmaße, Einsatz auf der Wärmeplatte.

Konstruktion (Abbildung 15) Die *Würzburger Kammer* V5_{SM} besteht wie die vorherigen aus zwei Teilen mit 2 Zugängen im oberen Teil der Kammer und einem Ablauf seitlich im unteren Teil. Von oben und unten sind mit Silikonkleber zwei Deckgläser angebracht. Ein Temperatursensor ist nicht integriert, so dass sich eine freie Durchsicht durch die Kammer ergibt. Das Nylonnetz wird von einem Gummiring direkt an den Deckel der Kammer fixiert und abgedichtet. Das Volumen der Kammer ist auf 0,25 ml verringert, wobei der Teil über dem Nylonnetz ca. 30% ausmacht. Der geringe Abstand zum oberen Deckglas ermöglicht mit dieser Kammer Auflicht- und Durchlichtmikroskopien mit einer 200fachen Vergrößerung.

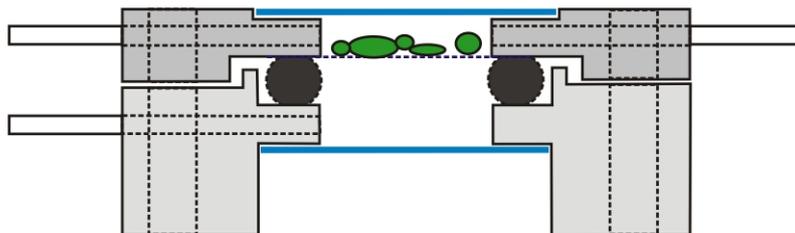


Abbildung 15: Zu sehen ist die *Würzburger Kammer V5_{SM}* im Querschnitt im geschlossenen Zustand. Durch Deckgläser (blau) sowohl im Boden als auch im Deckel kann mit dieser Kammer Auflicht- und Durchlichtmikroskopie betrieben werden. Das Volumen der Kammer konnte nochmals reduziert werden. Ein Temperatursensor ist nicht vorgesehen.

4.2.8. *Würzburger Kammer V6_{SMTE}*

Anforderungen Öffnung der Kammer während des Betriebes ohne Zellverlust. Variable Größe der Kammervolumens für optimale Perfusion einerseits und optimale Bedingungen für die Perfusionskultur andererseits. Mikroskopie bis zur maximalen Vergrößerung. Temperatursteuerung und Erhöhung der Heizleistung. Keine Dichtungselemente wie Gummiringe etc.. Membranträger soll austauschbar sein.

Konstruktion (Abbildung 16-18) Das wesentliche Merkmal dieser Version ist das variable Kammervolumen, das durch Heben und Senken eines Kolbens verändert werden kann. Die Zellen liegen auf einem Nylonnetz oder einer Membran, die oben auf dem Kolben eingespannt ist und können von oben durch ein Deckglas eingesehen werden. Das Medium wird durch den Kolben zugeführt und mittels einer dünnen Kanüle durch die Membran hindurch in das obere Kammervolumen geleitet. Dort umspült es die Zellen und fließt durch die Membran in eine konische Vertiefung im Kolben, an deren Grund sich der Abfluss befindet. Um eine möglichst große Sicherheit vor Austrocknung durch Gasblasen zu gewährleisten, kann der Kolben in „Perfusionskultur-Konfiguration“ in eine tiefe Position gebracht werden. Die Kammer hat dann ein Volumen von 0,4 bis 0,8 ml. In dieser Stellung kann auch der Deckel abgenommen werden, ohne dass Luft an die Zellen gelangt. Die Zellen oder Gewebe können manipuliert werden, ohne dass die Kultur unterbrochen wäre. Für eine Funktionsprüfung mittels Perfusion oder Vitalitätsdiagnostik durch Mikroskopie, wird der Kolben in die maximal hohe Position direkt unter das Deckglas gefahren. Das Kammervolumen beträgt dann nur ca. 0,13 ml, die Zellen können, falls dies erforderlich ist, sogar bis an das Deckglas gedrückt werden. Vergrößerungen bis zu 400fach sind dann möglich. Im Kolben ist je nach Ausführung ein Temperatursensor angebracht. Seitlich an der Kammer werden 2 Peltierelemente befestigt, so dass auch hier eine Temperaturregula-

tion unabhängig von einem Inkubator oder einem Wasserbad möglich ist. Durch die Austauschbarkeit und relativ freie Gestaltungsmöglichkeit des Kolbens (lediglich der Durchmesser ist vorgegeben) kann für spezielle Fragen z. B. ein Einsatz mit Hohlfasern oder eine pH-Messsonde eingesetzt werden.

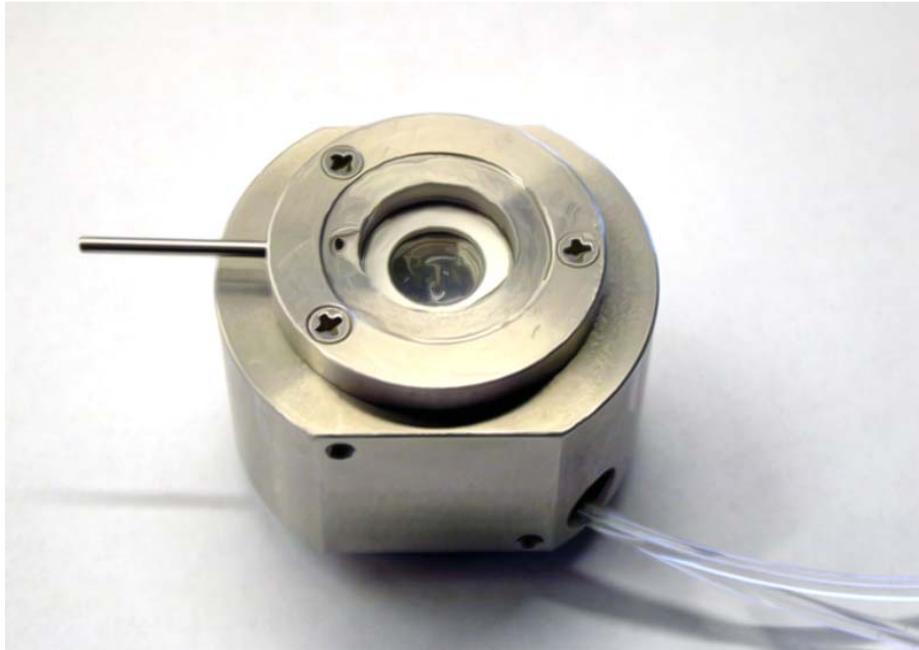


Abbildung 16: Die *Würzburger Kammer V6_{SMT E}* in Aufsicht fotografiert. Durch das Deckglas kann in die Kammer eingesehen werden. Links befindet sich der Zugang zum Entfernen von Luftblasen, die Zu- und Ableitung für das Medium werden rechts unten aus der *Würzburger Kammer* geführt.

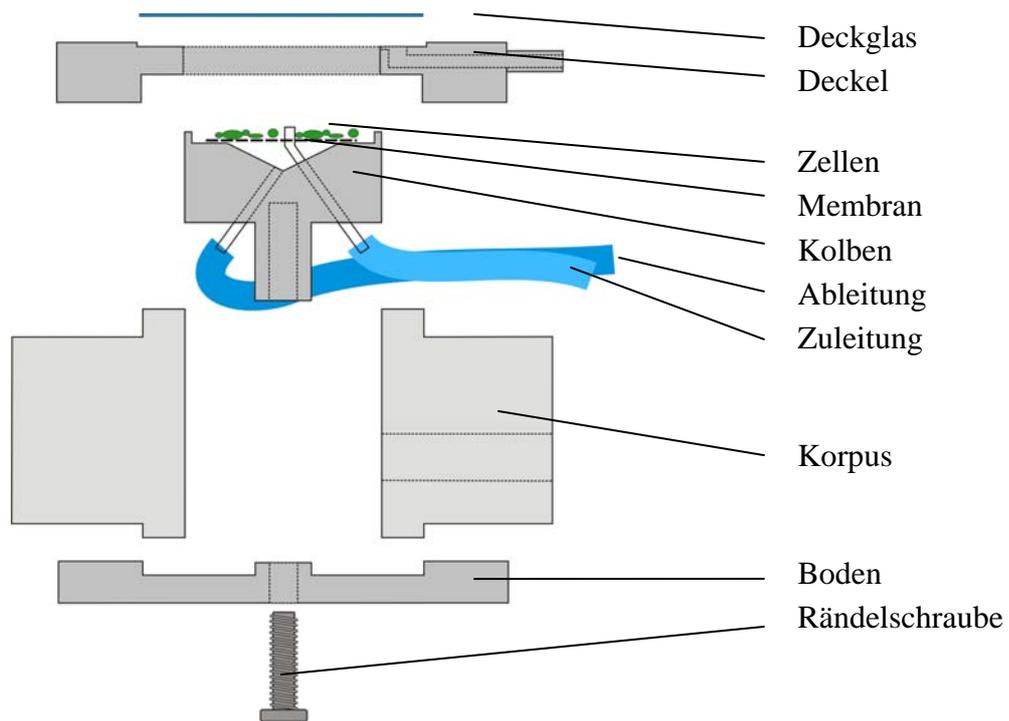


Abbildung 17: Explosionszeichnung der *Würzburger Kammer* V6_{SMT E}. Zu sehen sind die einzelnen Bauteile Deckel, Korpus, Boden mit Rändelschraube zur Höhenverstellung, Kolben in der Mitte mit den darauf platzierten Zellen auf einer Membran und die Zu- und Ableitung für das Medium.

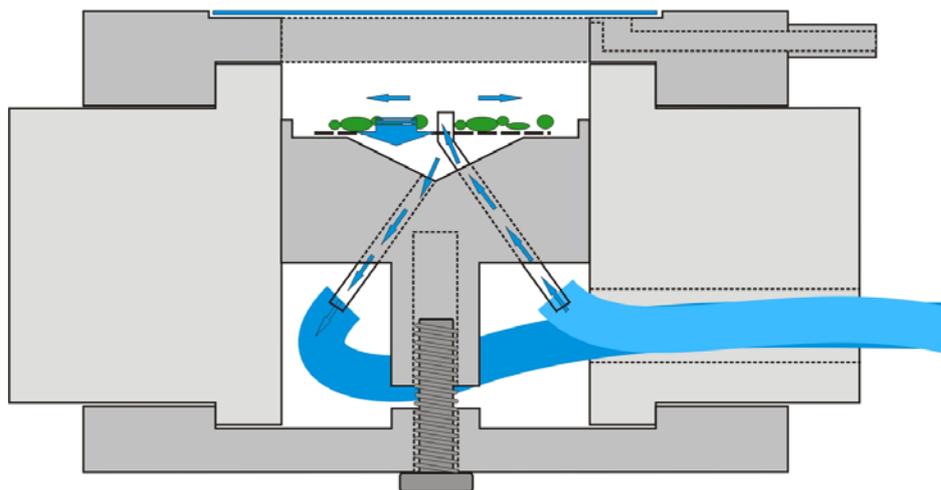


Abbildung 18: Querschnitt der zusammengesetzten Kammer V6_{SMT E}. Eingezeichnet ist der Weg des Mediums durch die Kammer (blaue Pfeile).

4.2.9. Temperaturregulation von V3_{SMT}, V4_{SMT} und V6_{SMT}

Die wichtigste Anforderung an die Temperaturregelung für die *Würzburger Kammer* war die hohe Genauigkeit innerhalb des gesamten physiologischen Temperaturbereichs. Es wurde ein typischer Regelkreis entworfen, wie er in den meisten biologischen Systemen vorkommt. Abbildung 19 zeigt einen solchen allgemeinen Regelkreis und seine Anpassung an die *Würzburger Kammer* der Versionen V3_{SMT}, V4_{SMT} und V6_{SMT}:

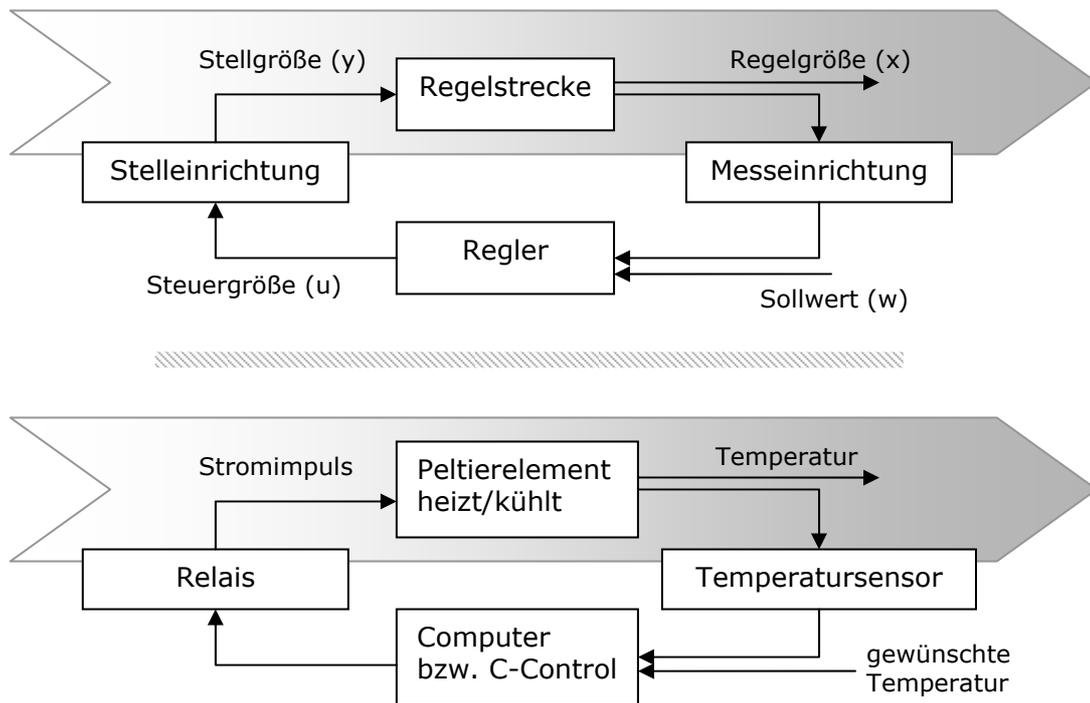


Abbildung 19: Das obere Bild zeigt den Aufbau eines typischen Regelkreises, im unteren Bild ist die Umsetzung für die Temperatursteuerung innerhalb der *Würzburger Kammer* dargestellt.

Auch diese integrierte Temperaturregelung wurde in Eigenleistung erstellt. Das verwendete Heizelement ist ein Peltierelement. Dieses Bauteil ist kompakt, stromgetrieben und hat eine hohe Leistung. Durch Umpolung der anliegenden Spannung kann das Peltierelement heizen oder kühlen. Da das Peltierelement zwischen der oberen und der unteren Kontaktplatte bei Stromaufnahme eine Temperaturdifferenz von 40 °C aufbaut, kann die Kühlleistung des Peltierelements durch eine verbesserte Wärmeableitung auf der anderen Platte (z. B. durch Kühlkörper) gesteigert werden.

Ein geeigneter Temperatursensor musste kleine Abmessungen und hohe Genauigkeit besitzen. Verwendet wurde ein Sensor aus einem sehr umfangreichen und flexiblen Bau-

kastensystem für Mess- und Steuereinrichtungen der Fa. Conrad. Als Steuercomputer kam die C-Control-Unit zum Einsatz, ein programmierbarer Mikroprozessor, der ebenfalls diesem System entnommen ist. Die C-Control-Unit wurde in der Programmiersprache Basic programmiert und so für die Anwendung in der *Würzburger Kammer* optimiert. Das System ist auf die gleichzeitige Steuerung von 8 Kammern ausgelegt. Die Auslesung der Temperatursensoren und die Ansteuerung der Peltierelemente erfolgen getaktet, wobei die einzelnen Kammern nacheinander innerhalb von 6 sek jeweils einmal angesteuert werden. Die Programmroutine ergibt sich wie in Abbildung 20 dargestellt.

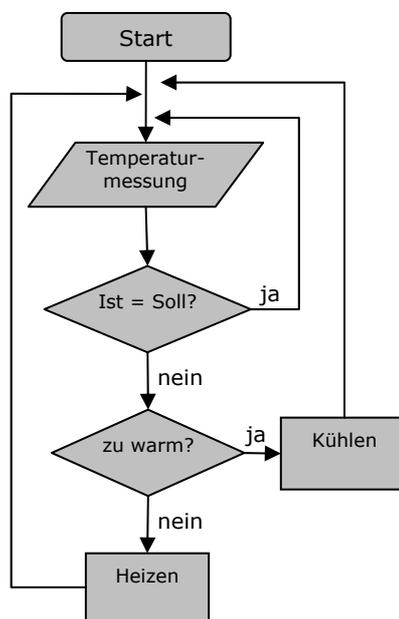


Abbildung 20: Das dem Steuerprogramm zugrunde liegende Flussdiagramm ist für die Steuerung eines einfachen Regelkreises typisch.

Mit diesem System zur Temperaturregelung lässt sich die *Würzburger Kammer* unabhängig von der Außentemperatur in einem Bereich von unter 10 °C bis über 40 °C bei einer Genauigkeit von +/- 0,125 °C steuern. Dies ist unabhängig von einem Brutschrank oder einem Wasserbad möglich. In Versuchen erwies sich der Regelkreis stabil und mit einer typischen Einschwingung vor dem endgültigen Erreichen des Sollwertes (Abbildung 21).

Die mittlere Stromaufnahme eines solchen Peltierelements beträgt trotz der niedrigen Spannung von 2,2 Volt ca. 2 Ampère. Um die Verwendung teurer Spezialnetzteile zu vermeiden, die bei niedrigen Voltzahlen derart hohe Ströme liefern können, wurde ein

Bleiakkumulator verwendet. Dieser ermöglicht durch seine kleinen Abmessungen eine hohe Mobilität des gesamten Systems, obwohl er eine hohe Kapazität besitzt (ca. 24 h Einsatzzeit bei der Verwendung von 4 Kammern, auf 22,4 °C reguliert bei einer Raumtemperatur von 21 °C).

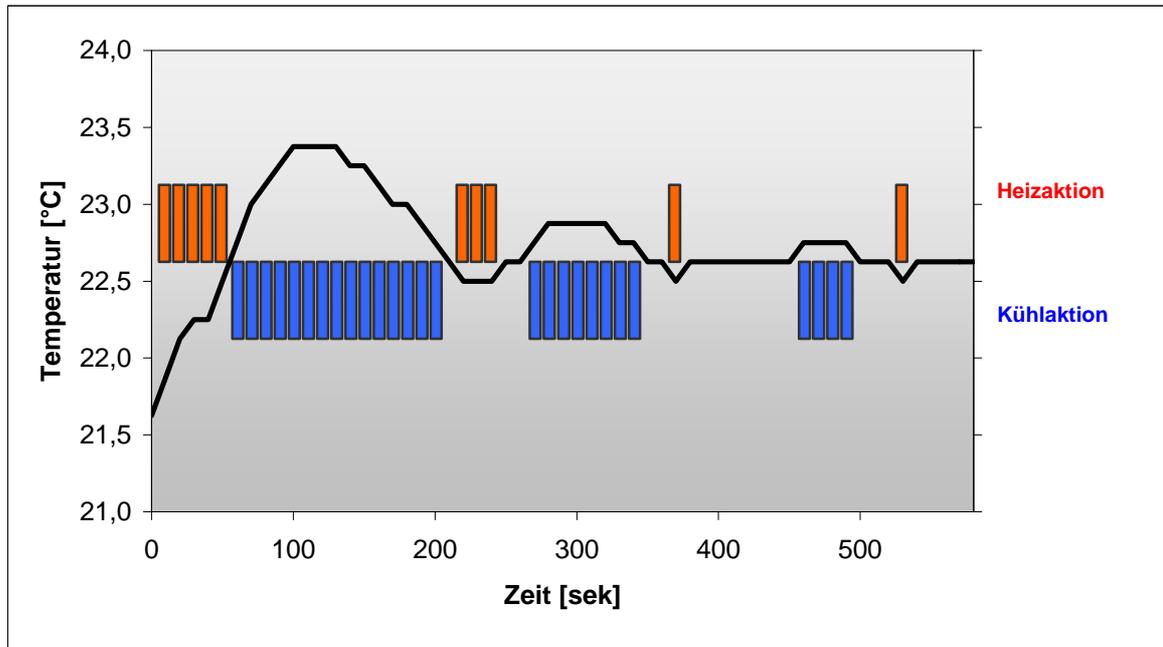


Abbildung 21: Dargestellt ist die typische Einschwingung der Temperatur in der *Würzburger Kammer* bei Änderung des Sollwertes auf 22,6 °C bei einer Raumtemperatur von 24,0 °C. Die Heiz- bzw. Kühlaktionen werden durch blaue (Kühlen) und rote (Heizen) Balken angezeigt.

Um einen Temperaturverlauf mit mehreren Solltemperaturen über Tage hinweg vorzugeben, wurde ein weiteres Programm erstellt. Es bedient sich derselben Steuerroutine, und es können damit bis zu 8 Kammern gleichzeitig über einen beliebigen Zeitraum temperiert werden. Der tatsächlich gemessene Temperaturverlauf wird zur Kontrolle in einer Datentabelle gespeichert. In diesem Programm werden weiterhin die Heiz- und Kühlaktionen der einzelnen Peltierelemente und die Batteriespannung sowie die Umgebungstemperatur überwacht.

4.3. Kultivierung von Zellen und Geweben mit der *Würzburger Kammer*

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei neue Kulturmethode mit der *Würzburger Kammer* etabliert werden. In einem Fall befand sich die Kammer mit allen Komponenten, mit Ausnahme der Pumpe, innerhalb eines Inkubators, im zweiten Fall war sie außerhalb eines Inkubators einsetzbar.

Die Würzburger Kammer im Inkubator

Durch die Platzierung der *Würzburger Kammer* in einem Inkubator ergaben sich einige Vorteile. Die Verwendung von semipermeablen Schläuchen ermöglichte den Gasaustausch zwischen Brutschrank und Medium im Schlauch, so dass der pH-Wert in der Kammer stabilisiert war und ein ausreichender Sauerstoffpartialdruck im Medium vorherrschte. Ebenso konnte die Temperatur konstant gehalten werden. Ein weiterer Vorteil war die verringerte Gefahr einer Kontamination des Kultursystems von außen durch den semisterilen Innenraum des Inkubators. Für diese Art der Perifusionskultur wurden Kammern der Versionen V1_A und V2_A verwendet. Nachteilig bei dieser Methode waren die fehlende Mobilität und fehlende Flexibilität in der Temperatureinstellung, denn alle gleichzeitig im Inkubator befindlichen Kammern können nur bei dem momentan vorherrschenden Wert für Temperatur und Gaspartialdrücken betrieben werden. Separate Einstellungen für einzelne Kammern sind nicht möglich.

Die Würzburger Kammer im Betrieb unter Laborbedingungen

Es konnte gezeigt werden, dass eine Perfusionskultur von isolierten porzinen Langerhans-Inseln unabhängig von einem Inkubator durchführbar ist. Für die Verwendung der *Würzburger Kammer* außerhalb eines Inkubators wurde eine Möglichkeit zur Temperaturregelung in Form einer integrierten Temperaturregelung entwickelt, wie unter 4.2.9. beschrieben. Verwendet wurden Kammern der Versionen V3_{ST} bis V6_{SMTE}. Als Gewebe wurden native und verkapselte isolierte porzine Langerhans-Inseln und humane Nebenschilddrüsen eingesetzt. Der Aufbau einer solchen Perfusionskultur ist schematisch in Abbildung 22 zu sehen.

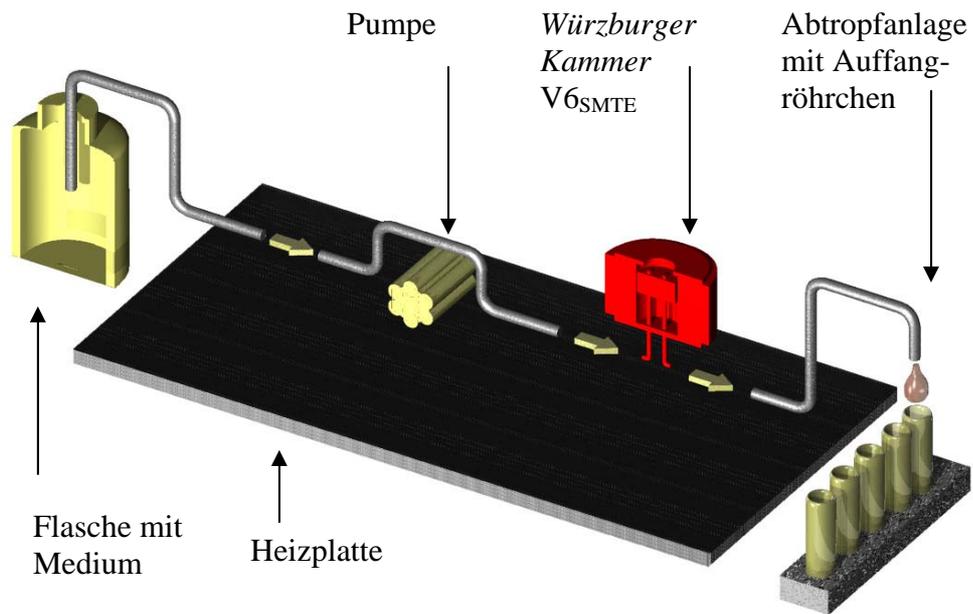


Abbildung 22: Die Abbildung zeigt den Aufbau einer Perfusionskultur mit der Mediumflasche, einer Schlauchrollenpumpe, der *Würzburger Kammer* (hier Version V6_{SMTE}) auf der Heizplatte und der Abtropfanlage.

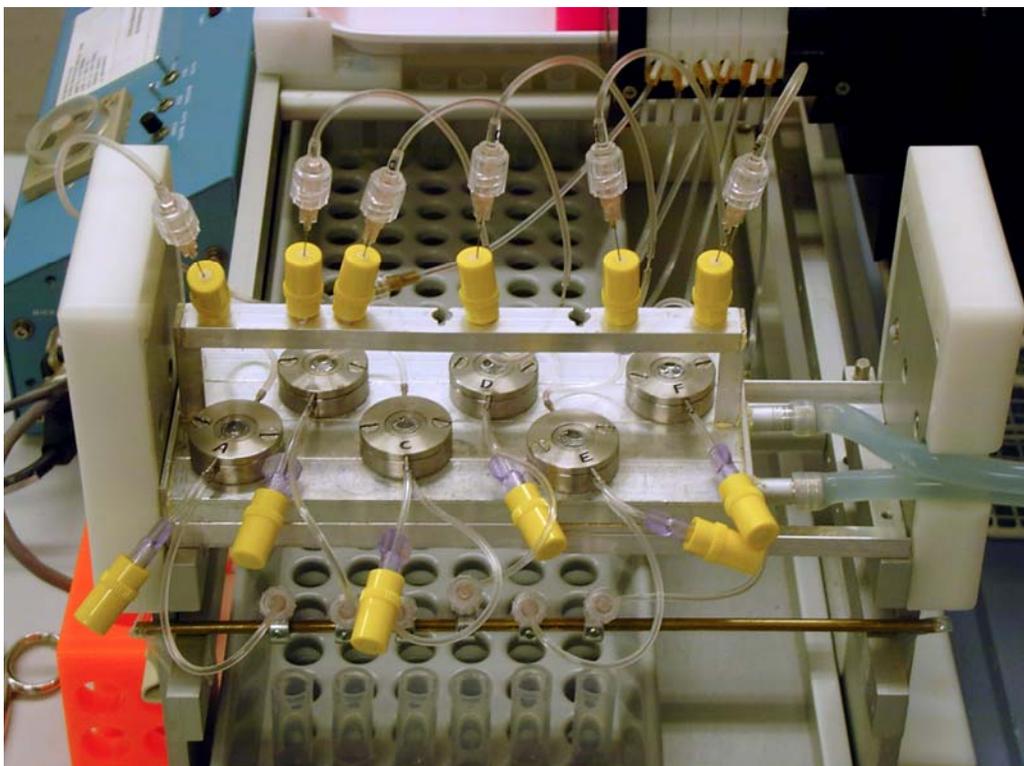


Abbildung 23: Zu sehen sind 6 Kammern der Version V5_{SM} während einer Perifusion. Die Kammern liegen auf der Wärmeplatte, angeschnitten im oberen Bereich des Bildes zu sehen ist die 8-Kanal-Schlauchrollenpumpe. Die Abtropfanlage ist im Vordergrund unterhalb der Wärmeplatte angebracht, der Probenschlitten befindet sich unterhalb von ihr.

4.4. Perifusion mit der Würzburger Kammer

4.4.1. Grundlagen

Während der Perifusion führt ein Stimulus zu einer Ausschüttung von Stoffen in das Medium. Das Medium wird fraktioniert aufgefangen und auf bestimmte Inhaltsstoffe untersucht. Je exakter die Menge des ausgeschütteten Stoffes gemessen und zeitlich zugeordnet werden kann, desto genauer ist die Aussage über die Funktion der perifundierten Zellen. In diesem Kapitel wurde zum einen untersucht, welche Verzögerungen und Ungenauigkeiten konstruktionsbedingt durch die *Würzburger Kammer* in den Versionen $V5_{SM}$ und $V6_{SMTE}$ als Perifusionssystem entstehen und zum anderen wie homogen die Zellen und Gewebe von Medium in den Kammern umströmt werden. Da der Zeitpunkt der Ausschüttung eines Stoffes innerhalb der Kammer nicht bekannt ist, kann auch die Zeit nicht bestimmt werden, die dieser Stoff bis zum Austritt aus der Kammer am Ablauf benötigt. Stattdessen wird die Zeit bestimmt, innerhalb welcher der größte Teil des Volumens in der Kammer ausgetauscht werden kann. Dabei wird davon ausgegangen, dass ein innerhalb der Kammer ausgeschütteter Stoff in dieser Zeit komplett ausgewaschen wurde. So kann über den Zeitpunkt der Konzentrationsänderung eines Stoffes am Ablauf der Kammer auf den Sekretionszeitpunkt eines Stoffes rückgeschlossen werden. Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit der Kammern wurden die zwei Werte TR_0 und TR_{80} bestimmt. TR_0 ist die Zeit, nach der beim Austausch eines Mediums gegen ein anderes frühestens eine Konzentrationsänderung am ableitenden Schlauchsystem registriert werden kann. TR_{80} ist die Zeit, bei der 80% des vorher in der Kammer befindlichen Mediums durch das neue ausgetauscht ist.

4.4.1.1. Kinetik der Kammern $V5_{SM}$ und $V6_{SMTE}$

Vor der Bestimmung der Werte TR_0 und TR_{80} wurde der Verlauf der Konzentration über den gesamten Zeitraum aufgezeichnet, in dem ein Medium gegen das andere in der Kammer ausgetauscht wird. Hierfür wurde der Austausch von Trypanblau-Lösung gegen klare Lösung in den Kammern $V5_{SM}$ und $V6_{SMTE}$ gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Dabei enthielten die Kammern keine Zellen. Die Konzentration der Trypanblau-Lösung wurde mittels Absorptionsmessung bestimmt. Hierfür wurde eine eigens präparierte, sehr schnell reagierende Küvette verwendet, über die das Medium vom Ablauf der Kammer direkt durch einen Spektrometer geleitet wurde (Abbildung 24). Mit dieser Vorrichtung

war ein praktisch verzögerungsfreies Messen möglich; der Einfluss des Messinstrumentes auf die gemessenen Zeiten betrug weniger als 1 sek und konnte vernachlässigt werden.

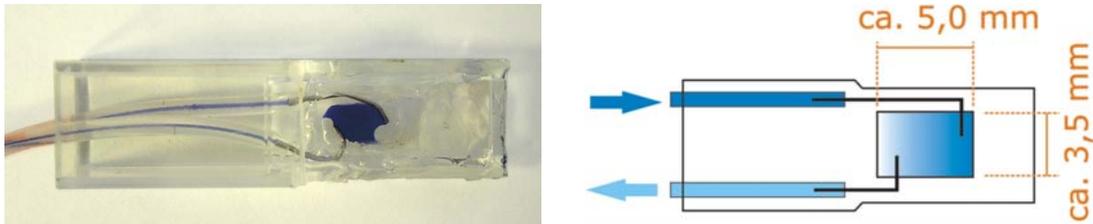


Abbildung 24: Links. Fotografie der verwendeten Küvette. Rechts. Schematische Abbildung des Aufbaus mit Zu- und Abfluss für das Medium und mit dem Fenster, welches im Strahlengang des Spektrometers platziert wird. Der Strahlengang verläuft hier senkrecht zur Papierebene.

Zuerst wurde der ungehinderte Austausch in der Kammer $V5_{SM}$ ohne eingesetzte Membran aufgezeichnet (Abbildung 25). Es zeigt sich ein steiler Anstieg im ersten Abschnitt der Kurve, in dem der Austausch schnell stattfindet und im weiteren Verlauf eine asymptotische Annäherung an den Wert von 100%, der dem vollständigen Austausch des vorhandenen durch das neue Medium in der Kammer entspricht. Theoretisch wird dieser nie erreicht.

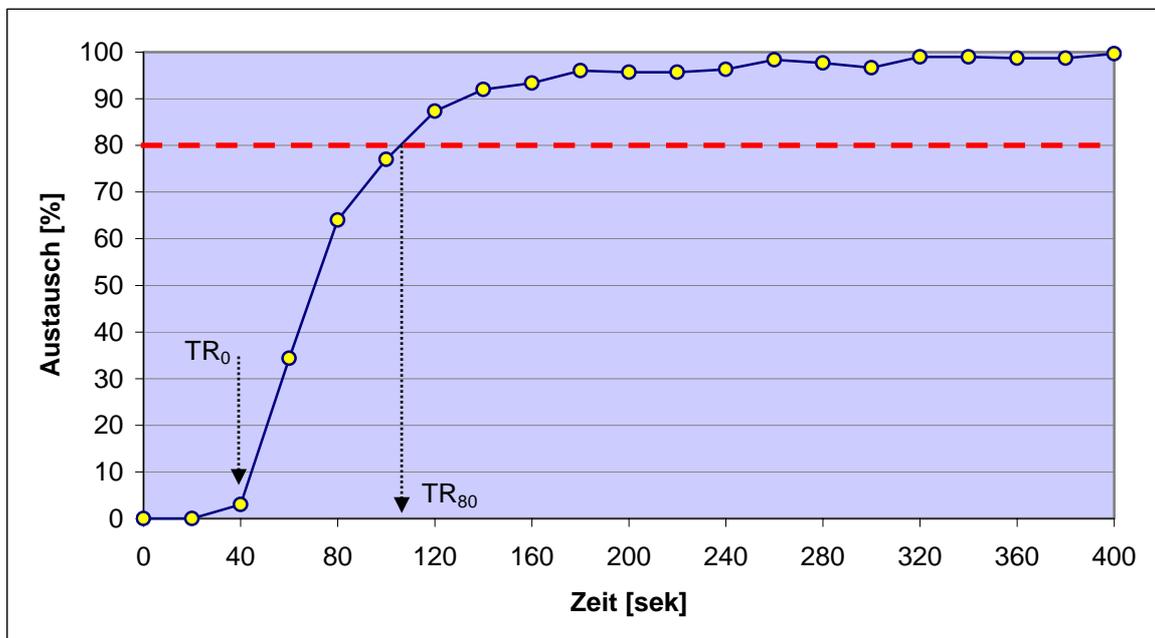


Abbildung 25: Austausch von einem Medium gegen ein anderes innerhalb der Kammer $V5_{SM}$. Es befinden sich keine Zellen und keine Membran in der Kammer, die Pumpgeschwindigkeit beträgt $2,5 \mu\text{l/sek}$.

Die erste Änderung in der Konzentration des abfließenden Mediums, also TR_0 , wird nach 40 sek registriert. Zu 80 % ist der Austausch nach ca. 110 sek abgeschlossen, dann ist TR_{80} erreicht. Nach 400 sek ist zum ersten Mal photometrisch nur noch neues Medium nachweisbar.

In einem zweiten Versuch wurde ein Nylonnetz als Membran in die Kammer V_{5SM} eingelegt, wie es in den Versuchen zur *In-Vitro*-Funktionsdiagnostik verwendet wird. Anschließend wurden die Kurven für 4 verschiedene Pumpgeschwindigkeiten von 2 $\mu\text{l}/\text{sek}$ bis 5 $\mu\text{l}/\text{sek}$ gemessen (Abbildung 26). Klar erkennbar ist, dass TR_{80} umso kleiner ist, je höher die Pumpgeschwindigkeit ist. Der Austausch findet also schneller statt. Verglichen mit Abbildung 25 sind die Kurven an ihrem Anfang und Ende deutlich deformiert. Ebenso ist TR_{80} selbst bei einer Pumpgeschwindigkeit von 3 $\mu\text{l}/\text{sek}$ mit 270 sek nahezu 2 $\frac{1}{2}$ mal so groß wie bei der Kammer V_{5SM} ohne Netz. Der Einsatz eines Netzes stört also den Austausch der Medien und verlängert die Reaktionszeit der Kammer.

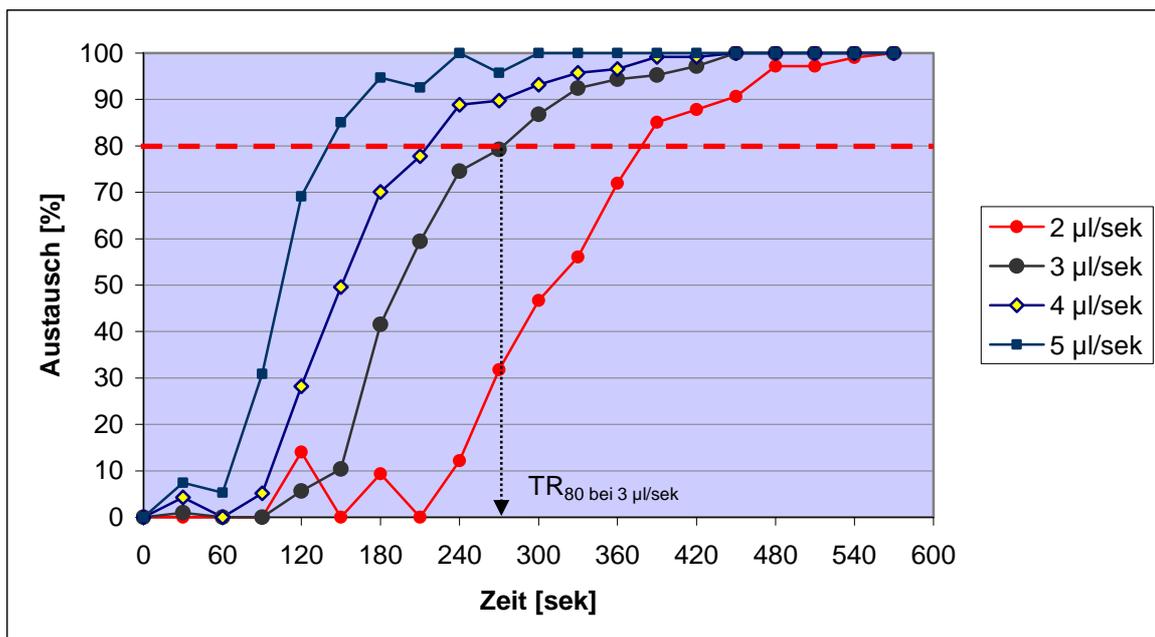


Abbildung 26: Bei diesem Versuch befand sich eine Membran in der Kammer V_{5SM} . Zu 4 verschiedenen Pumpgeschwindigkeiten wurde das in der Kammer V_{5SM} ausgetauschte Medium in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Je geringer die Pumpgeschwindigkeit ist, desto langsamer tauscht sich das Medium innerhalb der Kammer aus.

4.4.1.2. Reaktionszeit TR_0 und TR_{80} in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit

In diesem Versuch sollte die zuvor beobachtete Abhängigkeit von TR_0 und TR_{80} von der Flussgeschwindigkeit weiter untersucht werden. Die Kammer V_{6SMTE} wurde in Perifusionskonfiguration, also mit dem niedrigsten möglichen Volumen von etwa $130 \mu\text{l}$, mit Flussgeschwindigkeiten von $1 \mu\text{l}/\text{sek}$, $2 \mu\text{l}/\text{sek}$, $3 \mu\text{l}/\text{sek}$ und $4 \mu\text{l}/\text{sek}$ perfundiert und die Austauschkurven bestimmt (Abbildung 27). Wie bei der Kammer V_{5SM} im Kapitel 4.4.1.1. gesehen, sind auch bei der Kammer V_{6SMTE} die Werte TR_0 und TR_{80} von der Flußgeschwindigkeit abhängig. Beide Werte sind umso kleiner, je größer die Flußgeschwindigkeit ist. Da in der Kammer V_{6SMTE} bei diesen Versuchen eine Membran integriert war, sind auch hier die aus Kapitel 4.4.1.1. bekannten Deformationen der Austauschkurve zu sehen.

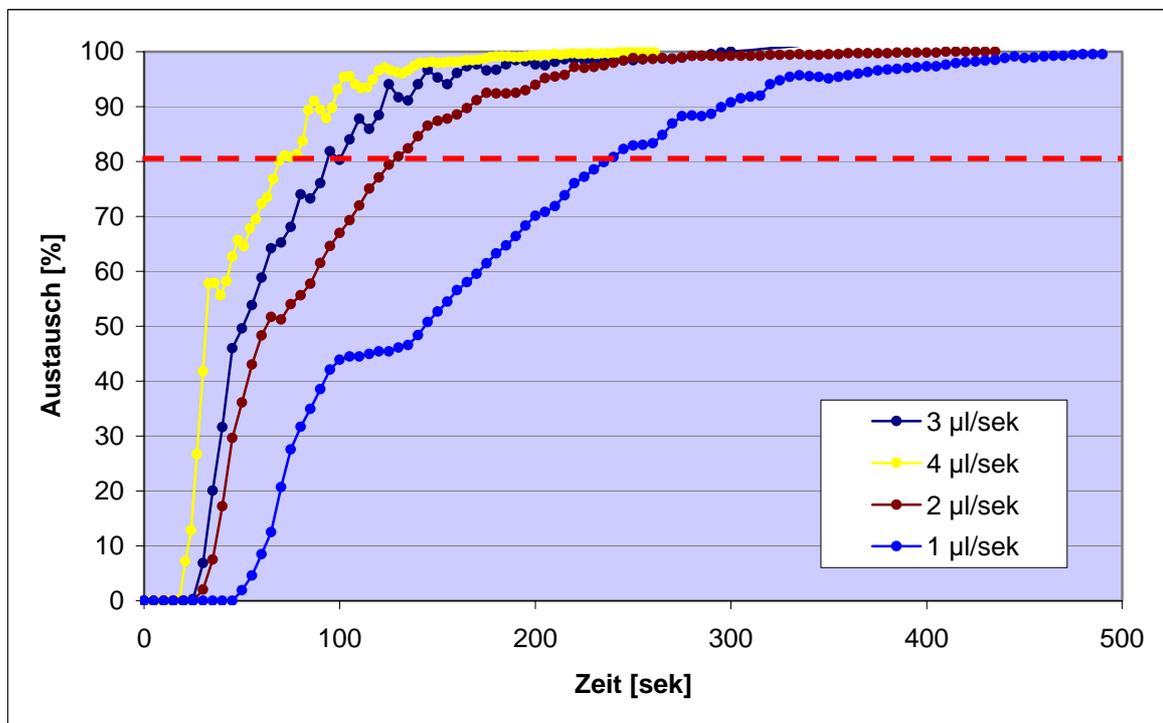


Abbildung 27: Dargestellt ist der Austausch von Medium innerhalb der Kammer V_{6SMTE} in Perifusionskonfiguration für Flussgeschwindigkeiten von 1 bis $4 \mu\text{l}/\text{sek}$. Deutlich ist die Abhängigkeit der Austauschgeschwindigkeit von der Flussgeschwindigkeit zu erkennen.

Um nun die Abhängigkeit von TR_0 und TR_{80} von der Flussgeschwindigkeit zu objektivieren, wurden die jeweils für die vier unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten gemessenen Reaktionszeitwerte gegen die Flussgeschwindigkeit aufgetragen (Abbildung 28).

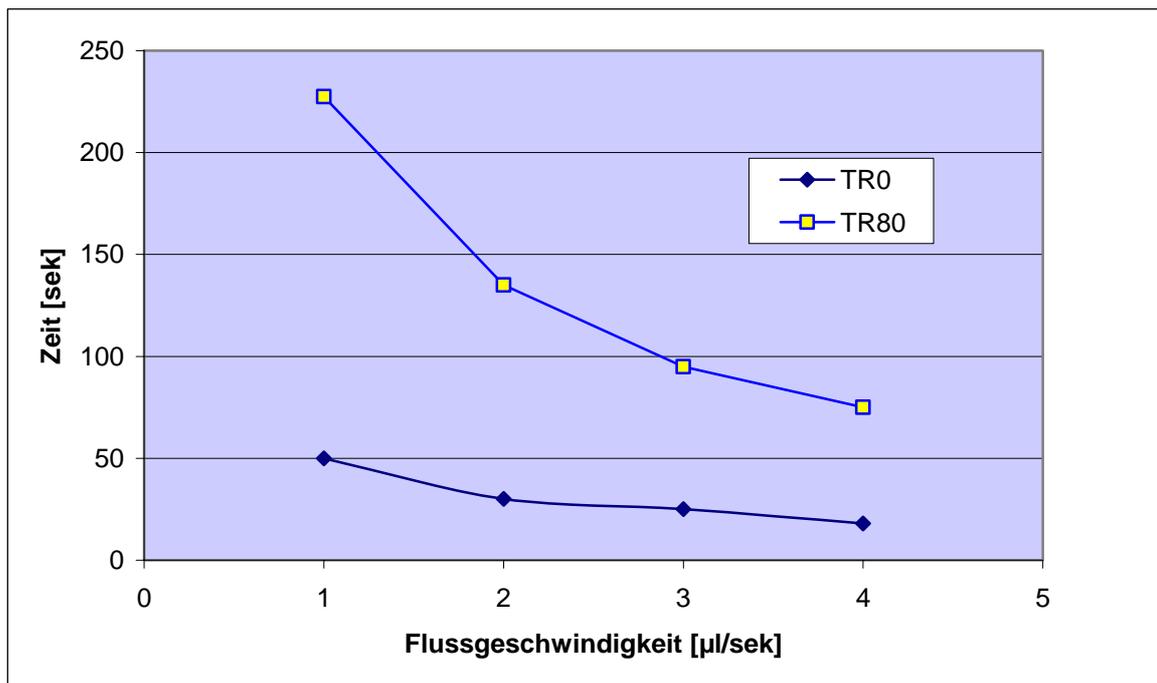


Abbildung 28: Abhängigkeit von TR_0 und TR_{80} von der Flussgeschwindigkeit. Die Zeit für den Austausch des Mediums innerhalb der Kammer nimmt mit kleiner werdender Flussgeschwindigkeit überproportional zu.

Es zeigt sich, dass die Zeit für den Austausch des Mediums innerhalb der Kammer mit kleiner werdender Flussgeschwindigkeit überproportional zunimmt. Andererseits führt eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit jenseits von 4 µl/sek nur zu einer geringen Verkürzung der Zeit für TR_{80} , wie im hinteren Bereich der Kurve zu sehen ist.

Da sich mit Erhöhung der Flussgeschwindigkeit auch mehr Medium durch die Kammer bewegt, soll nun der Zusammenhang von TR_{80} und dem Volumen von durchgeflossenem Medium dargestellt werden. In Abbildung 29 im linken Diagramm zeigt sich für das Erreichen von kleinen Werten für TR_{80} ein notwendiger großer Verbrauch an durchfließendem Medium.

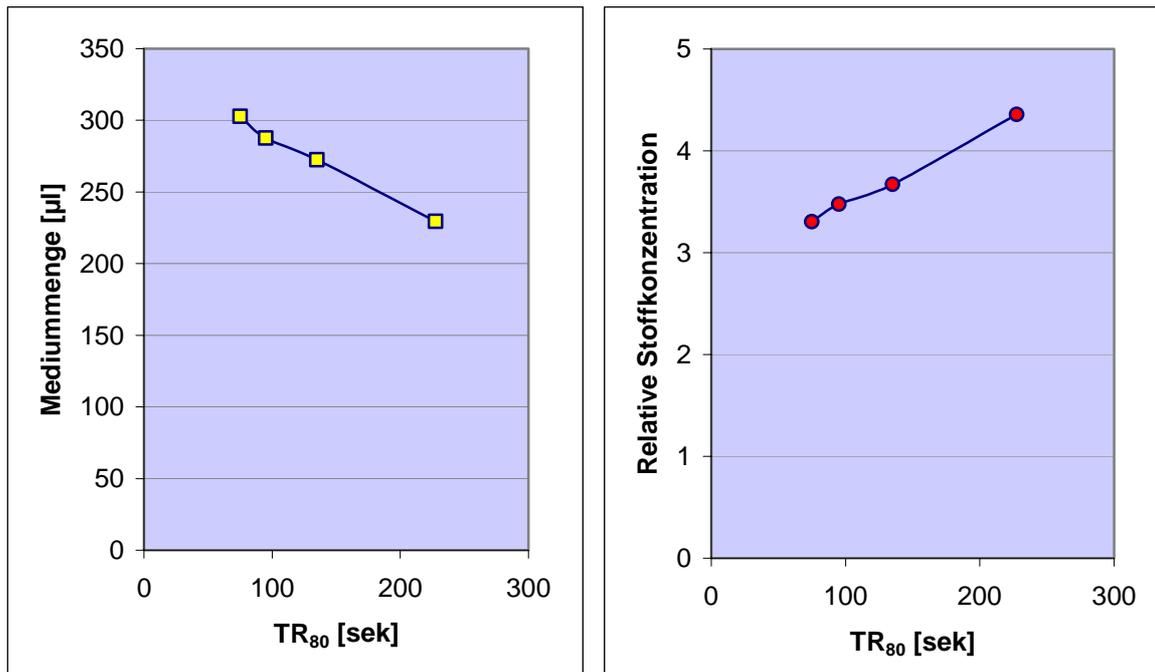


Abbildung 29: Links. Je kürzer die Zeit für TR₈₀ gewählt wird, desto mehr Medium muss dafür durch die Kammer gepumpt werden. **Rechts.** Je geringer die Zeit für TR₈₀, desto geringer ist auch die Konzentration des nachzuweisenden Stoffes, der von den Zellen in der Kammer ausgeschüttet wird.

Je höher die Flussgeschwindigkeit des Mediums ist, desto stärker wird der von den Zellen innerhalb der Kammer produzierte Stoff (z. B. Insulin) vom durchfließenden Medium verdünnt. Wie die Abbildung 29 auf der rechten Seite zeigt, wird eine Verkürzung der Zeit für TR₈₀ mit einer starken Verdünnung und damit einer niedrigen Konzentration des nachzuweisenden Stoffes erkauft. Im Extremfall liegt die Konzentration dieses Stoffes im Überstand unterhalb der Nachweisgrenze eines ELISA.

4.4.1.3. Reaktionszeit TR₀ und TR₈₀ in Abhängigkeit vom Kammervolumen

Mit der Kammer V_{6SMTE} besteht die Möglichkeit, isoliert den Einfluss des Kammervolumens auf die Austauschgeschwindigkeit zu untersuchen. Hierzu wird lediglich die Kolbenhöhe verstellt und damit das Kammervolumen variiert. Untersucht wurde das geringste einstellbare Volumen der Kammer V_{6SMTE} von 0,13 µl, das auch für Perfusionen verwendet wird, und ein für die Kultivierung von Zellen geeignetes Volumen von etwa 0,48 µl, was einer Mittelstellung des Kolbens entspricht. Die Werte sollten mit dem *Gradient-Culture-Container*® als Beispiel für eine Kammer, die ausschließlich für die Kultivierung

von Zellen konzipiert ist, verglichen werden. Der *Gradient-Culture-Container*[®] besitzt ein vergleichsweise großes Volumen von ca. 0,48 ml, das für die Kultivierung von Vorteil ist.

Wie Abbildung 30 zeigt, verlängert sich die Zeit TR_{80} etwa um den Faktor, um den das Volumen zugenommen hat. Bei gleicher Flussgeschwindigkeit zeigt sich bei dem *Gradient-Culture-Container*[®] und bei der Kammer $V6_{SMTE}$ in Kulturkonfiguration eine um das vierfache verlängerte TR_{80} im Vergleich zur Kammer $V6_{SMTE}$ in Perifusionskonfiguration. Auch die Zeit TR_0 ist umso länger, je größer das Volumen in der Kammer ist.

Übertragen auf die vorhergehenden Ergebnisse bedeutet dies, dass bei einem kleinen Volumen in der Kammer bei gleicher TR_{80} auch die Konzentration des nachzuweisenden Stoffes höher ist. Dies bedeutet, dass durch ein kleineres Volumen die aus Abbildung 28, rechts, bekannte Kurve abgeflacht wird.

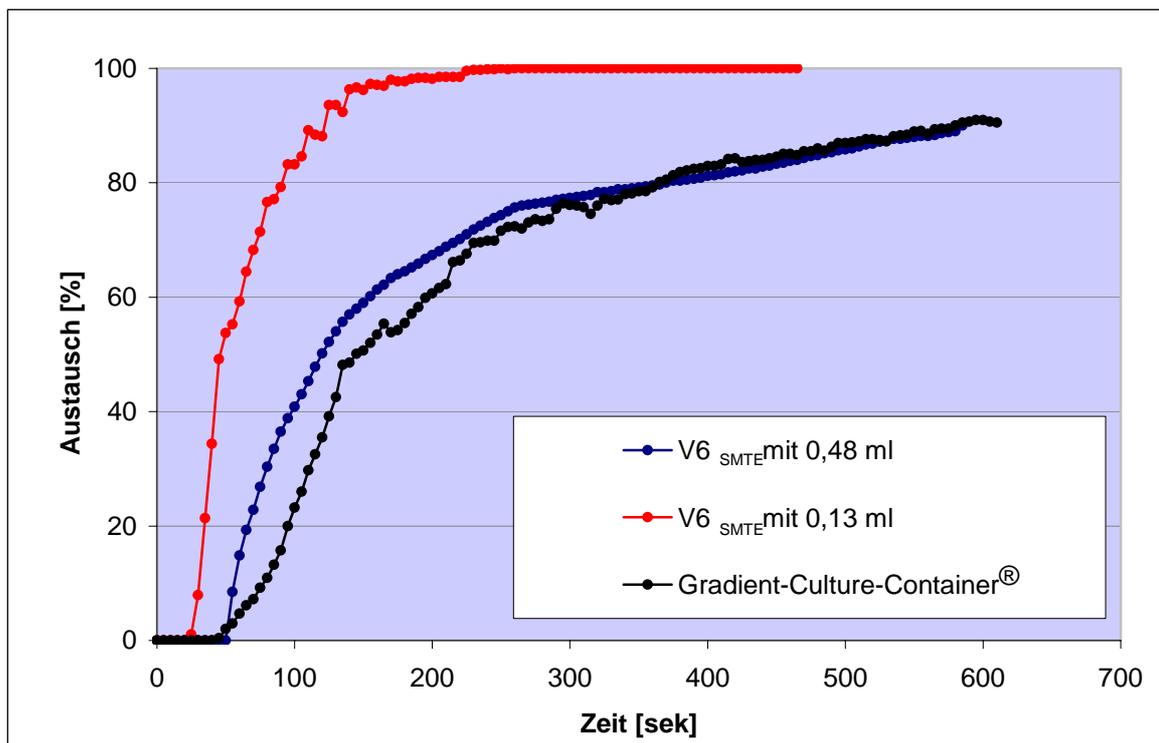


Abbildung 30: Ein kleines Kammervolumen führt zu niedrigen Werten für TR_{80} . Entsprechend dem vergrößerten Volumen steigt auch bei der Kammer $V6_{SMTE}$ in Kulturkonfiguration mit 0,48 ml Volumen TR_{80} auf einen deutlich höheren Wert an. Die Werte sind dann mit jenen des *Gradient-Culture-Container*[®] von Minucells vergleichbar.

4.4.1.4. Verteilung von einströmendem Medium in der Kammer V6_{SMTE}

In den vorhergehenden Versuchen wurde das Medium am Ablauf der Kammer untersucht. Nun sollte das Verhalten neu eingebrachten Mediums direkt in der Kammer V6_{SMTE} beobachtet und die Frage beantwortet werden, ob in die Kammer einströmendes Medium die Zellen und Gewebe sofort und gleichmäßig erreicht.

In einem Versuch mit blauer Lösung zeigte sich, dass sich die einströmende Flüssigkeit homogen von der zentralen Einlasskanüle weg ausbreitet. Bereits nach dem Einstrom von 50 µl neuen Mediums ist die gesamte Membran mit neuem Medium überdeckt (Abbildung 31). Sind auf der Membran Zellen platziert, werden diese optimal von einströmendem Medium erreicht und umströmt.

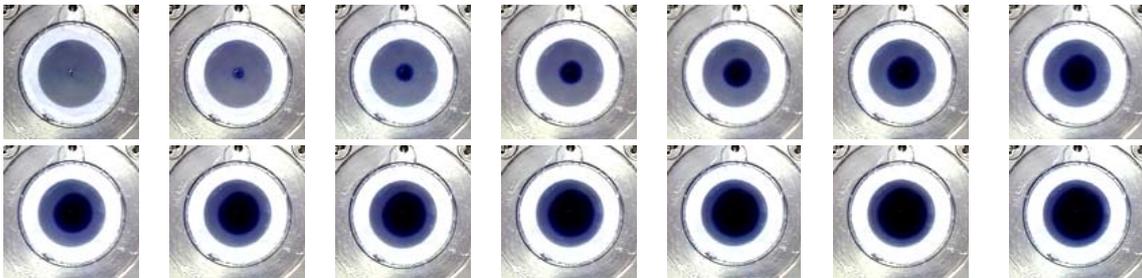


Abbildung 31: Gezeigt werden 14 in Folge aufgenommene Einzelbilder vom jeweils gleichen Ausschnitt einer Aufsicht auf das Deckglas der Kammer V6_{SMTE}. Zu sehen ist die homogene Verteilung einer blauen Flüssigkeit, die über den Einlass der Kammer zugeführt wird und dabei in der Kammer vorhandenes, klares Medium verdrängt. Bis zur Aufnahme des letzten Bildes wurden 50 µl blaue Lösung in die Kammer gepumpt.

4.4.2. Ergebnisse von verschiedenen Anwendungen der Würzburger Kammer

Während der Entwicklungsphase der *Würzburger Kammer* wurden die einzelnen Versionen für Kultivierung, Perifusion und zum Mikroskopieren eingesetzt. In diesem Kapitel werden ausgewählte Ergebnisse vorgestellt, die mit der *Würzburger Kammer* erarbeitet wurden.

4.4.2.1. *In-Vitro*-Funktion isolierter Langerhans-Inseln nach 5tägiger Perfusionskultur in der Würzburger Kammer

In diesem Versuch sollte gezeigt werden, dass die *Würzburger Kammer* für länger dauernde Kultivierungen und für Perifusionen geeignet ist. Hierzu wurden isolierte porcine Langerhans-Inseln in der *Würzburger Kammer* V5_{SM} für 5 Tage außerhalb eines Inkuba-

tors kultiviert. Parallel dazu erfolgte die Kultivierung von Langerhans-Inseln derselben Isolierung konventionell in Zellkulturflaschen im Inkubator nach dem Standardprotokoll. Am 1. und 5. Tag erfolgte die Vitalitätsbestimmung durch Färbung. Es zeigte sich, dass die Vitalität nach drei Tagen Perifusionskultur vergleichbar mit jener von Langerhans-Inseln in der Zellkulturflasche ist.

Zu Beginn und nach 5 Tagen wurde eine Funktionsprüfung der Langerhans-Inseln aus der *Würzburger Kammer* und aus der Zellkulturflasche durchgeführt. Es zeigte sich sowohl am 1. als auch am 5. Tag eine vergleichbare Insulin-Ausschüttungskurve beider Kultursysteme. Bei allen Perifusionen reagieren die Langerhans-Inseln mit einer deutlichen Suppression der Insulinsekretion auf den Glukosereiz. Gut zu sehen ist die exakte zeitliche Reaktion auf den einsetzenden Glukosereiz. Im Vergleich zu vielen vorhergehenden Perifusionen, die mit dem Perifusionsapparat *Suprafusion®* gewonnen wurden, ist hier ein Peak zu erkennen. Nach Wegfallen des Glukosereizes steigt die Insulinausschüttung wieder deutlich an. Da die Insulin-Ausschüttungskurven der Langerhans-Inseln nach 5 Tagen Perifusionskultur in der *Würzburger Kammer* und nach 5 Tagen in der Zellkulturflasche übereinstimmen, kann eine Perifusionskultur in der *Würzburger Kammer* die Kultivierung von Langerhans-Inseln in der Zellkulturflasche ersetzen (Abbildung 32).

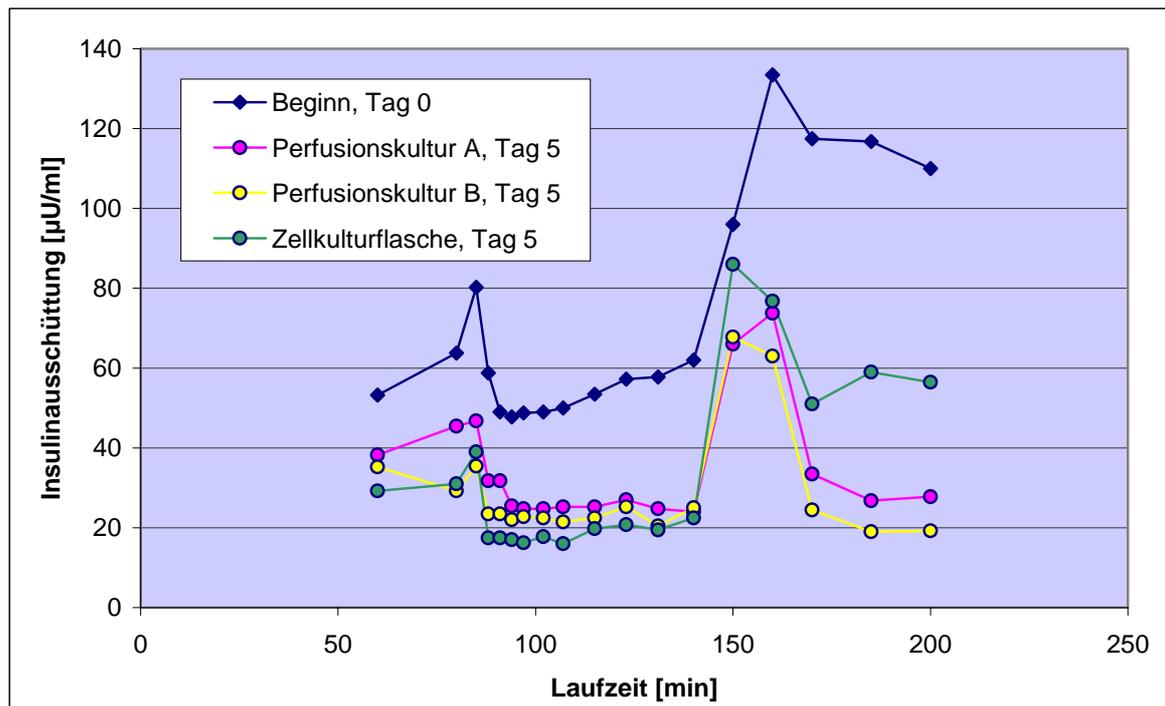


Abbildung 32: Werden isolierte Langerhans-Inseln über 5 Tagen kultiviert, sinkt das Niveau der Insulinausschüttung, die Form der Ausschüttungskurve und der Stimulationsindex bleiben aber nahezu unverändert. Langerhans-Inseln zeigen nach 5tägiger Perfusionskultur in der *Würzburger Kammer* eine fast identische Ausschüttungskurve, wie Inseln, die über 5 Tage in Zellkulturflaschen kultiviert wurden.

Für die konventionelle Zellkultur musste, verglichen mit der für die Perfusionskultur benötigten Menge, das vierfache an Langerhans-Inseln eingesetzt werden, da für Vitalitätsfärbung und *In-Vitro*-Funktionsprüfung entnommene Langerhans-Inseln verworfen werden müssen.

4.4.2.2. Variation der Glukosekonzentration

In Versuchen mit der Perifusionsanlage *Suprafusion*® wurde in bisherigen Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe als Grundmedium HBSS verwendet, das einem Grundgehalt von 140 mg/dl Glukose entspricht. Dieses wurde mit weiteren 50 mg/dl Glukose versetzt. Für die Stimulation wurde das Grundmedium mit 300 mg/dl Glukose versetzt. So ergab sich für die Perifusionslösungen eine Glukosekonzentration von insgesamt 190 mg/dl bzw. 440 mg/dl. Um eine Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus der Literatur zu gewährleisten, sollten Perifusionslösungen mit den üblichen 50 mg/dl bzw. 300 mg/dl Glukose verwendet werden. Um die Relevanz zu überprüfen, die ein solcher Umstieg auf die zukünftigen Ergebnisse haben würde, wurden zwei parallele Perifusionen mit den bisherigen HBSS-

Lösungen und mit Dulbecco's Medium mit 50 mg/dl bzw. 300 mg/dl durchgeführt. Die hier verwendeten Medien Dulbecco's und HBSS stimmen in der Zusammensetzung der wichtigsten Inhaltsstoffe mit Ausnahme der Glukosekonzentration überein. Es zeigten sich zwei gleichartige Kurvenverläufe für die Insulinausschüttung, lediglich die Höhe der Insulinkonzentration war bei der stärkeren Stimulation mit HBSS und insgesamt 440 mg/dl Glukose mit 0,375 μ U/ml deutlich höher als bei der Stimulation mit 300 mg/dl und 0,268 μ U/ml (Abbildung 33). Eine Abweichung von dem in der Literatur üblichen Protokoll mit Werten von 50 mg/dl bzw. 300 mg/dl Glukose führt also zu anderen Ergebnissen in der Höhe der Insulinausschüttung. Daher muss für eine Vergleichbarkeit der Umstieg auf Stimulationslösungen mit den üblichen Werten gefordert werden.

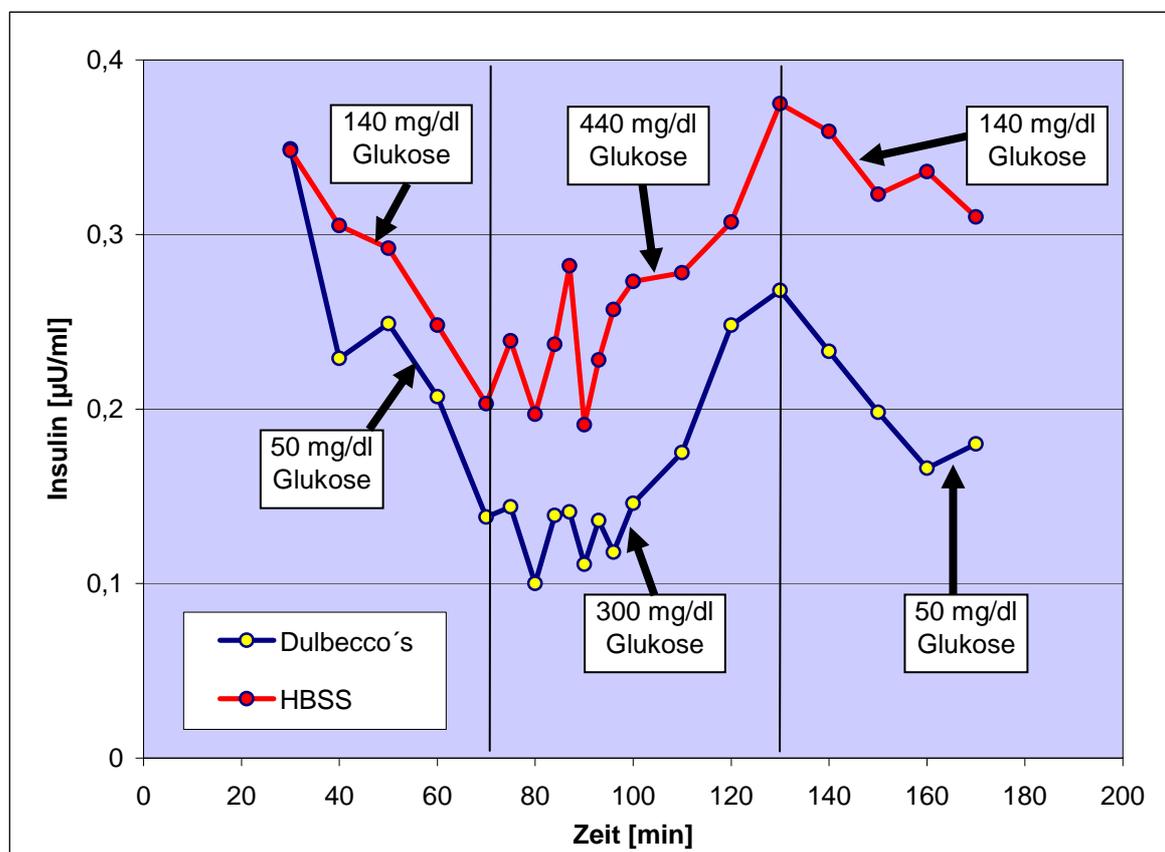


Abbildung 33: Bei der Verwendung einer Perifusionslösung mit 190 mg/dl bzw. 440 mg/dl Glukose (HBSS) ist die ausgeschüttete Insulinkonzentration deutlich höher als bei einer Perifusionslösung mit in der Literatur üblichen 50 mg/dl bzw. 300 mg/dl Glukose.

Wegen der in den vorhergehenden Versuchen häufig beobachteten paradoxen Reaktion der Langerhans-Inseln mit Suppression der Ausschüttung von Insulin auf den Glukosereiz von 300 mg/dl, sollte untersucht werden, wie sich Glukosekonzentrationen von 150 mg/dl, 300

mg/dl oder 500 mg/dl auf die Form der Insulin-Ausschüttungskurve auswirken. Es zeigt sich, dass die Grundform und die zeitliche Zuordnung der Kurvencharakteristika durch die Höhe der Glukosekonzentration nicht beeinflusst werden. Stattdessen ändert sich lediglich das Niveau der ausgeschütteten Insulinmenge (Abbildung 34). Je weniger Glukose eingesetzt wird, desto niedriger ist das Sekretionsniveau.

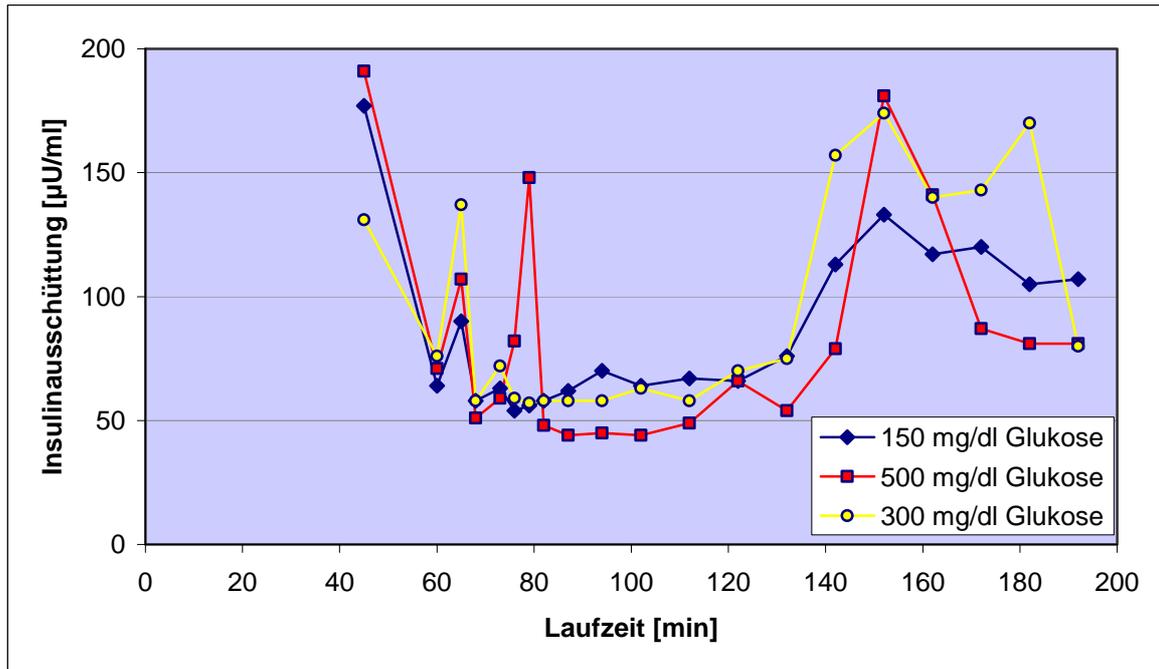


Abbildung 34: Die Perifusion von Langerhans-Inseln mit unterschiedlich hohen Glukosekonzentrationen verändert die Form der Insulin-Ausschüttungskurve nicht wesentlich. Lediglich das Sekretionsniveau ändert sich.

4.4.2.3. *In-Vitro*-Funktion der Nebenschilddrüsen in der Würzburger Kammer

Es sollte untersucht werden, ob in der *Würzburger Kammer* auch andere Gewebe als isolierte Langerhans-Inseln verwendet werden können. In mehreren Versuchen wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. med. W. Moskalenko humane Nebenschilddrüsen und Nebenschilddrüsen von Ratten in der *Würzburger Kammer* Funktionstests *in-vitro* unterzogen und dabei über 2 Tage in Perfusionskultur gehalten. Beispielhaft ist in Abbildung 35 eine regelrechte PTH-Ausschüttungskurve auf einen Ca^{2+} -Reiz zu sehen. Sie zeigt, dass die *Würzburger Kammer* (hier $V4_{SM}$) auch für einen *In-Vitro*-Funktionstest eines anderen endokrinen Gewebes wie Nebenschilddrüsen mit Erfolg eingesetzt werden kann.

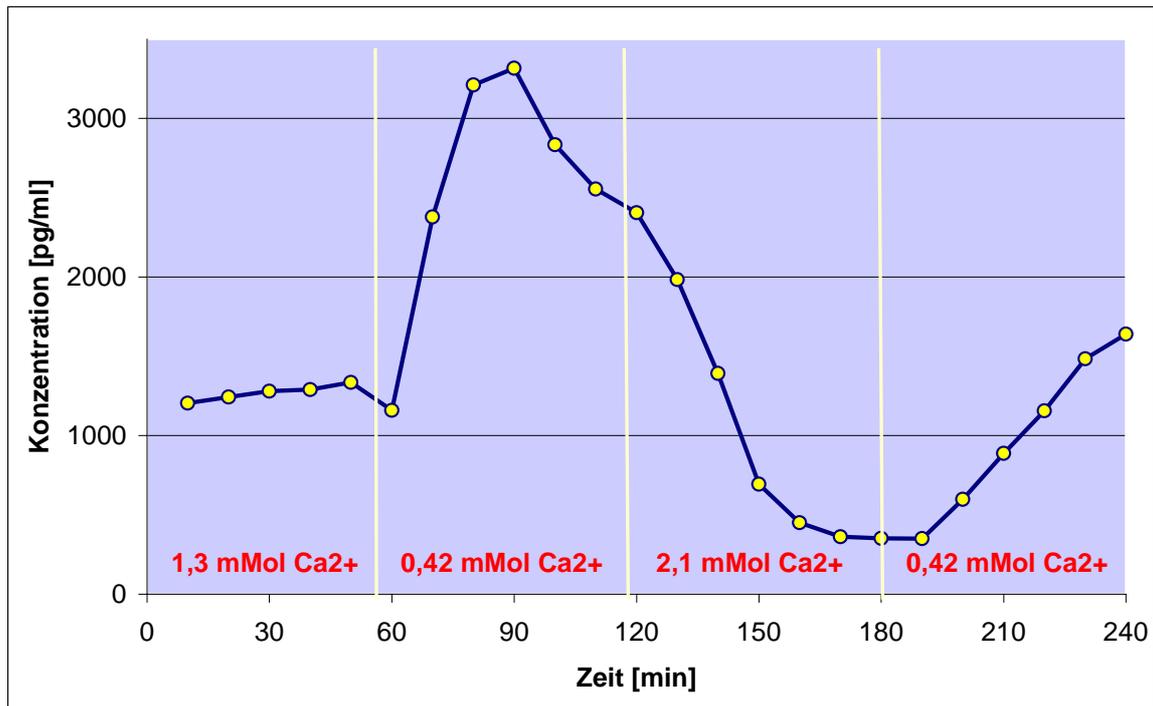


Abbildung 35: Erfolgreiche Anwendung der *Würzburger Kammer* für die *In-Vitro*-Funktionsprüfung von humanem Nebenschilddrüsengewebe: dynamische PTH-Ausschüttung *in vitro* als Folge erniedrigter bzw. erhöhter Ca²⁺-Konzentration im Perifusionsmedium.

4.5. Mikroskopieren mit der *Würzburger Kammer*

Je nach Entwicklungsstand und Verwendungszweck der einzelnen Versionen *der Würzburger Kammer* ergeben sich unterschiedliche Möglichkeiten für die Mikroskopie von Zellen und Geweben in der Kammer. Eine Übersicht über die einzelnen Versionen der *Würzburger Kammer*, jeweils unter Abgabe der maximalen Vergrößerung, gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Aufgeführt sind die mit den jeweiligen Kammern möglichen Mikroskopiertechniken und die jeweilige mit dem Olympus BX50 und zugehörigen Optiken maximal mögliche Vergrößerungen.

Kammer	V1 _A	V2 _A	V3 _{SMT}	V4 _{SMT}	V5 _{SM}	V6 _{SMT E}
Auflicht	-	-	50x	100x	200x	400x
Durchlicht	-	-	-	-	200x	-
Fluoreszenz	-	-	50x	100x	-	400x
3-D-Rekonstruktion	-	-	-	-	-	400x

Auflichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Für diese Mikroskopiertechniken sind die *Würzburger Kammern* V3_{SMT}, V4_{SMT}, V5_{SM} und V6_{SMT} ausgelegt. Das für die Perfusionskultur verwendete Medium wird mit der Färbelösung angereichert und die Zellen damit in der Kammer perfundiert. Anschließend wird die Kammer aus dem System gelöst und unter dem Mikroskop platziert. Die Vergrößerung ist limitiert durch den Fokussierabstand, der vom verwendeten Objektiv und von den Abmessungen der Kammer abhängt. Die maximale Vergrößerung ist mit den technischen Gegebenheiten im eigenen Labor 400fach und nur mit der Kammer V6_{SMT} zu erreichen.

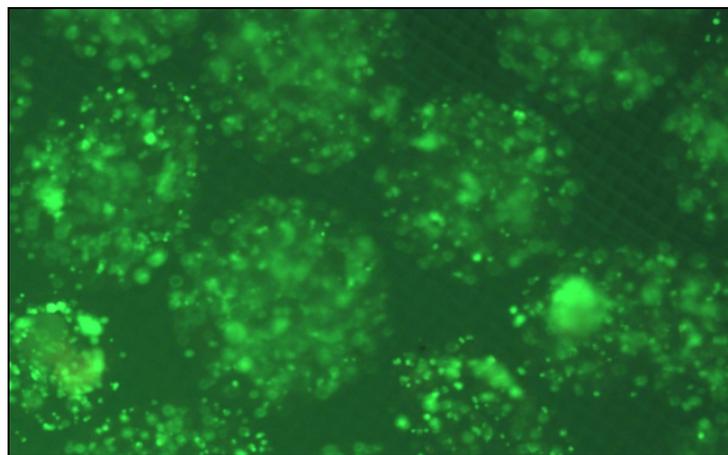


Abbildung 36: Mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln in der Kammer V5_{SM}, mit FDA-PI gefärbt. Vergrößerung 50fach.

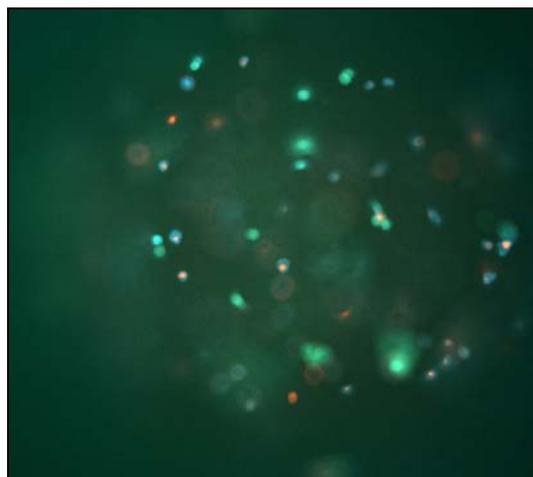


Abbildung 37: Zinquin-Färbung von Inselzellen (vorwiegend als Einzelzellen) in einer Mikrokap- sel in der Kammer V6_{SMT}. Vergrößerung 200fach.

Nach dem Färben und dem Mikroskopieren kann die Kultur fortgesetzt werden, die Zellen gehen dabei nicht verloren. Es konnte gezeigt werden, dass Langerhans-Inseln durch den Vorgang des Färbens in der *Würzburger Kammer* keinen Vitalitätsverlust erleiden (nicht dokumentiert).

Durchlichtmikroskopie

Die Durchlichtmikroskopie liefert beim Mikroskopieren ohne die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen bessere Bilder als die Auflichtmikroskopie. Durchlichtmikroskopie ist jedoch nur mit der Kammer $V5_{SM}$ möglich, da diese als einzige Kammer zwei Fenster im Strahlengang besitzt. Mit dieser Version erstellte Bilder zeigt Abbildung 38.

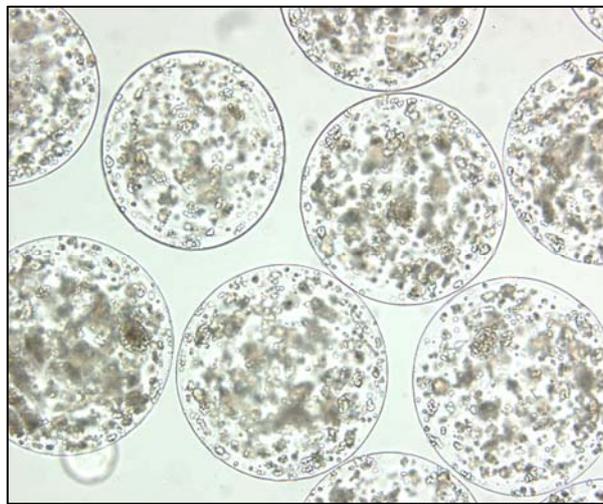


Abbildung 38: Alginat-Mikrokapseln mit porzinen Langerhans-Inseln in der *Würzburger Kammer* $V5_{SM}$, aufgenommen unter dem Mikroskop in Durchlichttechnik. Vergrößerung 50fach.

3-Dimensionale Rekonstruktion

Die 3-dimensionale Rekonstruktion erstellt im Computer das 3-dimensionales Abbild einer Alginat-Mikrokapsel mit den in ihr enthaltenen Zellen. Es werden zunächst durch Fluoreszenzmikroskopie digitale Schnittbilder der mit FDA-PI-gefärbten Mikrokapsel in 400facher Vergrößerung mit einer Schrittweite von $5\ \mu\text{m}$ in der *Würzburger Kammer* $V6_{SMTE}$ angefertigt. Für die Rekonstruktion wurden die Bilder zur Nachbearbeitung am Computer in ihre Grundfarben Grün, Blau, Rot aufgespaltet. Auf diese Weise wurden vitale Zellen (mit FDA grün gefärbt) getrennt von non-vitalen Zellen (mit PI rot gefärbt) dargestellt. Die Hintergrundinformation der Bilder wurde verworfen. Auf diese Weise kann Streulicht von Zellen, die ober- oder unterhalb der Fokussierebene liegen, eliminiert

werden. Mit dem Programm Amira wurden die einzelnen Schnittbilder wieder zu einer virtuellen Alginat-Mikrokapsel zusammengesetzt (Abbildung 39). Die Kapsel kann in Echtzeit um jede Raumachse gedreht werden.

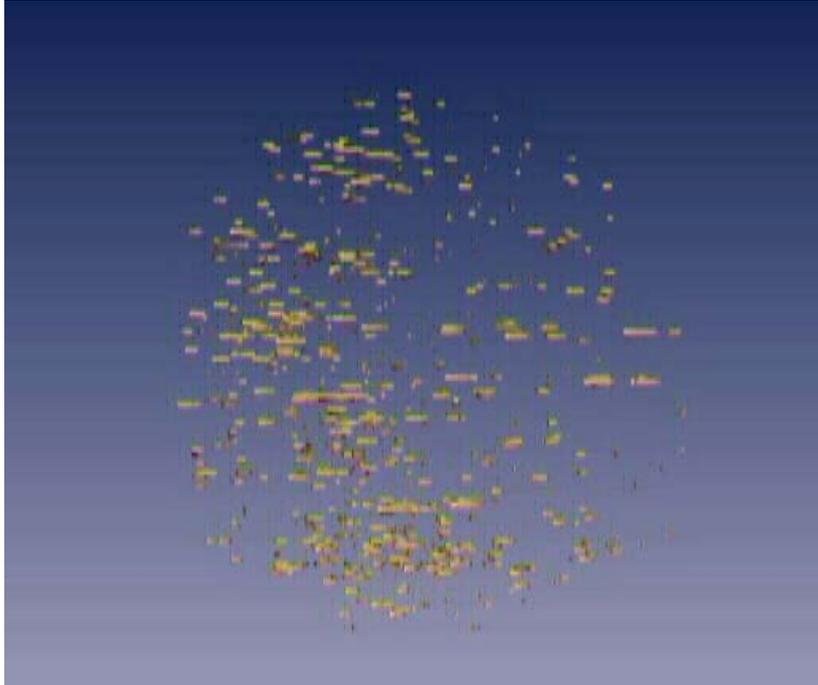


Abbildung 39: Die Abbildung zeigt die 3-dimensionale Rekonstruktion einer Alginat-Mikrokapsel mit porzinen Langerhans-Inseln (zumeist Einzelzellen, hier werden nur vitale Zellen dargestellt). Die Kapsel selbst und die avitalen Zellen sind in der Rekonstruktion herausgerechnet und nicht zu sehen. Der Bildausschnitt entspricht in etwa 700 μm .

4.6. Eigenentwicklung eines Insulin-ELISA

Die Eigenentwicklung eines ELISA zum Nachweis von porzinem Insulin wurde mit einem polyklonalem Antikörper für das Coating, einem monoklonalem Primärantikörper und einem konjugiertem Sekundärantikörper mit HRP konzipiert (Abbildung 40). Der Insulinnachweis fand in 6 Schritten statt. Nach dem Coating der proteinbindenden 96-Microplate mit einem polyklonalem Anti-Insulin-Antikörper wurden mit PBS die freien Stellen auf der 96-Microplate blockiert. Im dritten Schritt erfolgte die Zugabe des nachzuweisenden Insulins, das mit dem Coating-Antikörper in Bindung ging. Als Primärantikörper für die Detektion des gebundenen Insulins wurde ein monoklonaler Antikörper gegen porcines Insulin verwendet. Im fünften Schritt wurde ein mit HRP konjugierter Antikörper zum Nachweis des F_c -Teils des Primärantikörpers eingesetzt. Nach Bindung dieses Sekundärantikörpers wurde über die HRP in einem sechsten Schritt der Farbstoff ABTS aktiviert und die Lochplatte im ELISA-Reader ausgelesen. Eine Stopplösung wurde nicht eingesetzt,

stattdessen fand die Auswertung innerhalb der ersten 15 min statt. Die bei den Messungen mitgeführten Standards waren stets die gleichen (7 $\mu\text{U/ml}$, 13 $\mu\text{U/ml}$, 33 $\mu\text{U/ml}$, 91 $\mu\text{U/ml}$, 230 $\mu\text{U/ml}$). Sie wurden aus einer Charge des kommerziellen EASIA-Kits von BioSource entnommen. Regelmäßig konnte eine sigmoide Eichkurve durch sämtliche Einzelwerte der Standards gelegt werden (Abbildung 41). Die geeigneten Konzentrationen der Antikörper wurden in Vorversuchen in Testreihen ermittelt.

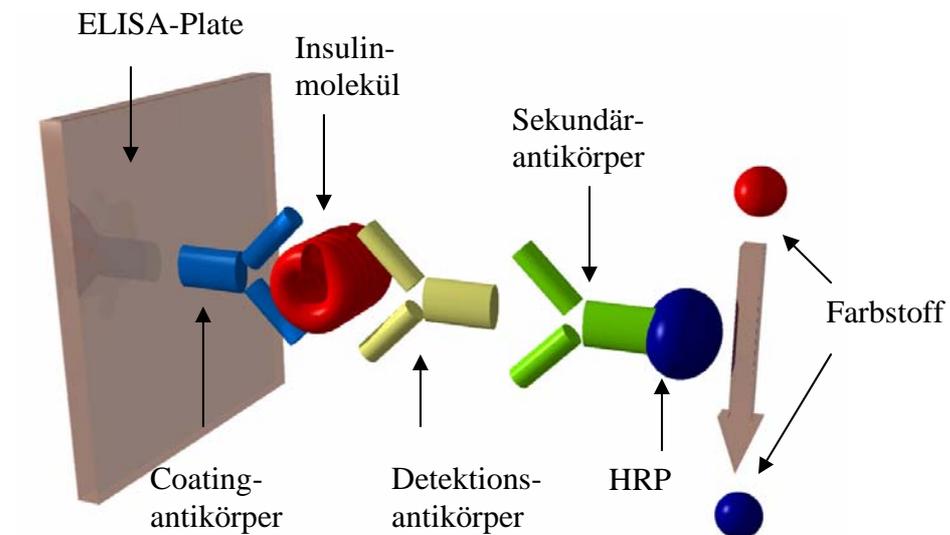


Abbildung 40: Schema des selbst entwickelten ELISA. Zu sehen ist der Coating-Antikörper und daran gebundenes Insulin. An einer anderen Bindungsstelle des Insulins bindet der Primärantikörper, dessen Fc-Teil vom Sekundärantikörper detektiert wird. Der Sekundärantikörper ist mit HRP konjugiert, die wiederum den Farbstoff ABTS umsetzt. Die Extinktion des Farbstoffes wird im ELISA-Reader gemessen.

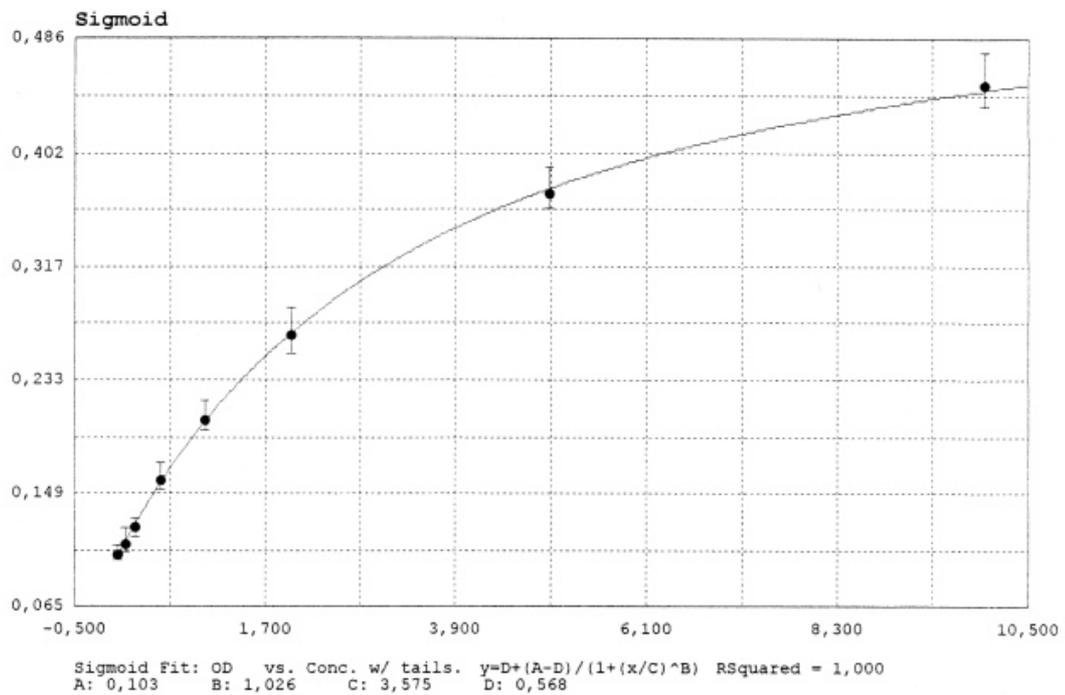


Abbildung 41: Regelmäßig konnte eine sigmoide Eichkurve erstellt werden, die sämtliche Werte der verwendeten Standards einschloss (hier ein Screenshot aus dem Programm MikroWin, die Extinktionswerte der Standards sind auf der Ordinate eingetragen, die zugehörigen Konzentrationen in ng/ml auf der Abszisse). Die Standards wurden aus dem EASIA-Kit von BioSource entnommen, um Schwankungen zu vermeiden (siehe Material und Methoden).

5. Diskussion

Von den Eckpunkten der Inselzelltransplantation sind die Techniken der Isolierung, Verkapselung und Transplantation weitgehend ausgereift, auch im eigenen Labor etabliert und erreichen einen im internationalen Vergleich hohen Standard. Nach wie vor erweisen sich aber die Kultivierung und umfassende Bestimmung der Vitalität und Funktion, insbesondere der porzinen Langerhans-Inseln als schwierig, da die Physiologie dieser „Miniorgane“ sehr komplex ist und von vielen Faktoren beeinflusst wird.

5.1. Untersuchungen zur Zellkultur der Langerhans-Inseln

Auf dem Weg von der Inselzellisolierung bis zur Transplantation ist während der Kultivierung der Langerhans-Inseln der Zeitpunkt für die Vitalitätsprüfung mittels Mikroskopie und für die Funktionsprüfung mittels Perifusion gegeben. Auf die Kultivierung von Langerhans-Inseln wird jedoch noch aus vielen anderen Gründen Augenmerk gelegt. So tritt in der Zellkultur eine Erholung vom Stress der Prozedur der Isolierung und Verkapselung ein [39], es sinkt die Immunogenität der Inselzellen [41], Spender-Leukozyten werden inaktiviert [53], und das Transplantat wird durch Ablösung exokrinen Gewebes angereichert [38]. Ein weiterer Vorteil ist das frühzeitige Aufdecken von Kontaminationen. Diese treten während der Organgewinnung oder des Isolierungsprozesses auf und werden in der Kultivierung offensichtlich [40].

Daher wird seit Jahren auf dem Gebiet der Kultivierungsmethodik von isolierten Langerhans-Inseln ausgiebig geforscht. Dennoch ist aus den Einzelergebnissen zur Verbesserung der Kulturbedingungen ein Standardverfahren nicht abzuleiten [54-56]. Die weithin untersuchten Standardmedien sind für die Kultivierung proliferierender Zellen in Zellkulturflaschen entwickelt worden, nicht für ausdifferenzierte und teilungsunfähige Gewebe [57]. Es zeigte sich, dass für Langerhans-Inseln unterschiedlicher Spezies jeweils andere Medien erforderlich sind [58]. Die besten Ergebnisse für porzine Langerhans-Inseln wurden mit den kommerziell erhältlichen Medien HAM's F12 und TCM 199 erzielt [55]. Die Unterschiede hingen unter anderem von der Dauer der Kultivierung mit einem bestimmten Medium ab [59] und wurden auf einzelne Inhaltsstoffe wie Pyruvat [60] oder Nicotinamid [52] zurückgeführt. Letzteres konnte bereits in früheren Versuchen im eigenen Labor bestätigt werden [unveröffentlichte Daten].

Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Kultivierung der isolierten porzinen Langerhans-Inseln optimiert werden kann. Ausgehend vom Standardmedium HAM's F12 mit 5% FCS wurde die Auswirkung verschiedener Serumzusätzen auf die bisher unzureichende Vitalität der Zellen untersucht. Die Zusammensetzung von FCS ist sehr komplex, es enthält Hormone, Wachstumsfaktoren, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren, zahlreiche zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer und Neutralisationssysteme wie Albumin oder Immunglobuline [57]. Diese Inhaltsstoffe liegen in zumeist unbekannter Konzentration vor und haben große Auswirkungen auf Vitalität und Funktion der Zellkulturen. Um die Kulturbedingungen besser zu kontrollieren, wurde in der Vergangenheit serumfreies Medium verwendet und die relevanten Inhaltsstoffe eines Serums gezielt ergänzt [51]. Da in diesen Versuchen jedoch keine Verbesserung der Vitalität erreicht werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit natives Serum verwendet und Konzentration sowie Art des Mediums variiert.

Bei unseren Versuchen wurde offensichtlich, dass das bisher verwendete Standardmedium HAM's F12 mit 5% FCS nicht das optimale Medium für die Kultur porziner Langerhans-Inseln ist. Vergleicht man von Isolierungen (n=11) die durchschnittliche Vitalität direkt nach der Isolierung der Langerhans-Inseln mit der Vitalität nach dreitägiger Zellkultur, so zeigt sich bei der Verwendung des Standardmediums ein Absinken der Vitalität um 7,5% Prozent. Wird hingegen porcines Serum verwendet, steigt die Vitalität um 8,7% bei 5% PS und um 25,6% bei 10% PS an (nicht signifikant). Dieser tendenziell positive Einfluss des porcinen Serums verglichen mit fetalem Kälberserum sollte in weiteren Versuchen im direkten Vergleich verifiziert werden. Problematisch war bei der Auswertung der einzelnen Versuche, dass unterschiedliche Isolierungen verwendet wurden, die alle eine unterschiedliche Ausgangsvitalität und -qualität aufwiesen. Um die Einzelergebnisse dennoch vergleichbar zu machen, wurden nicht die absoluten Vitalitätswerte in Prozent miteinander verglichen, sondern der Faktor, um den die Vitalität der untersuchten Langerhans-Inseln besser oder schlechter war, als eine Zellkultur aus der gleichen Isolierung mit Standardmedium.

Es zeigte sich, dass die Vitalität von isolierten Langerhans-Inseln nach dreitägiger Zellkultur umso höher war, je größer der Anteil des Serums am Medium war. So war bei der Verwendung von 10% FCS bereits eine 1,7fache Verbesserung der Vitalität gegenüber dem Standardmedium erreicht. Noch deutlicher war der Vorteil bei der Verwendung von

porzinem Serum; hier konnte bei einem Zusatz von 20% PS eine Verbesserung der Vitalität nahezu um das 5fache erreicht werden. Von Interesse war ebenso, wie sich die Langerhans-Inseln bei Zusatz von Rattenserum verhielten, da sie in Ratten transplantiert werden sollten. Hier gab es bei Verwendung von 10%igem Rattenserum keinen positiven oder negativen Effekt im Vergleich zum Standardmedium.

Da die Ergebnisse umso eindeutiger wurden, je länger die Kultur andauerte, wurde die Vitalität über einen Zeitraum von 11 Tagen beobachtet. Bei diesem Versuch wurden 4 Zellkulturflaschen mit Langerhans-Inseln aus der selben Isolierung bestückt und in Standardmedium, sowie in HAM's F12 mit 10% FCS, 5% PS und 10% PS kultiviert. Auch hier zeigte sich die deutlich bessere Vitalität nach drei bis vier Tagen, wenn eine höhere Serumkonzentration verwendet wurde bzw. bei der Verwendung von porzinem Serum. Im weiteren Verlauf ab dem 5. Tag sanken die Vitalitätswerte aller Zellkulturen bis zum 11. Tag jedoch wieder unter 60% ab.

Durch den 2tägigen Wechsel des Mediums wurden die Zellen einem starken Stress ausgesetzt, was an den Schwankungen der Vitalität in Abbildung 3 mit auf den Mediumwechsel folgender abfallender Vitalität zu sehen ist. Versuche im Rahmen dieser Arbeit hatten gezeigt, dass porzine Langerhans-Inseln fragmentieren und bis zu 50% ihrer Vitalität verlieren, wenn Standardprotokolle für Mediumwechsel mit Zentrifugation und Waschen der Zellen verwendet werden. Das Protokoll wurde daraufhin umgestaltet, dennoch gehen dabei vitale Zellen verloren. Die Menge des Zellverlustes konnte in diesem Fall jedoch nicht bestimmt werden, so dass in diesem Versuch keine Aussage über das Verhältnis von anfänglicher Zellzahl zu verbleibender Zellzahl am Ende des Versuches gemacht werden konnte. Tatsache war, dass nach 11 Tagen Kultivierung in der Zellkulturflasche mit täglicher Entnahme von Inseln zur Vitalitätsdiagnostik sämtliche Zellen in den Flaschen aufgebraucht waren. Da Vitalitäts- und Funktionsdiagnostik direkt in den Zellkulturflaschen nicht möglich ist, gehen die Inseln bei der Diagnostik für die weitere Kultivierung und die Transplantation verloren. Die Ausgangsmenge der Inseln kann aber nicht unbegrenzt erhöht werden. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, eine Alternative zu finden, bei der eine Kultur mit kleinsten Mengen an Zellmaterial und Vitalitäts- und Funktionsdiagnostik ohne größere Zellverluste durchgeführt werden kann.

5.2. Untersuchungen zur Perifusion der Langerhans-Inseln

Zur Bestimmung der *In-Vitro*-Funktion von isolierten Langerhans-Inseln kann die Insulinausschüttung der Inseln auf Glukosereize entweder mittels statischer Inkubation oder dynamischer Perifusion gemessen werden. Anstelle von Glukose ist auch die Stimulation mit Aminosäuren, Fettsäuren, Glukagon oder Adrenalin und einigen anderen Stoffen möglich [61-63]. Bei der statischen Inkubation wird der Stimulationsindex bestimmt und als Maß für die Funktion der Inseln verwendet. Der Stimulationsindex ist lediglich ein Verhältnis von basaler Insulinausschüttung und Insulinausschüttung auf Glukosereiz. Die aufwändigere Perifusion liefert bei gesunden Langerhans-Inseln einen typischen biphasischen Verlauf der Insulinausschüttung auf einen Glukosereiz [60] und gibt daher deutlich mehr Informationen über die Funktion der Inseln. Eine intakte Sekretionskurve gilt als Zeichen einer intakten Funktion [64], dabei geht eine hohe Vitalität der Zellen nicht zwangsläufig mit einer optimalen Funktion einher [59]. Ist die Funktion der Langerhans-Inseln gestört, etwa durch Einflüsse während der Isolierung, Kultivierung und Verkapselung, ändern sich Intensität und Kurvenverlauf der Insulinsekretion. Die Perifusion liefert also im Vergleich zur statischen Inkubation mehr Informationen und kann somit als Maß für die Qualität einer Isolierung herangezogen werden [61,65-67].

Die Perifusion von porzinen Langerhans-Inseln ist offensichtlich problematischer als die von humanen oder Langerhans-Inseln anderer Arten. In der Literatur finden sich Hinweise, dass isolierte porzine Langerhans-Inseln sehr empfindlich auf verschiedenste Einflüsse wie Isolierung, Wechsel des Mediums oder Kryopräservierung mit Änderung der Ausschüttungskurve von Insulin reagieren [66]. Auch bei früheren Arbeiten aus dem eigenen Labor war es schwierig, reproduzierbare, typisch biphasische Kurvenverläufe während einer Perifusion zu erreichen. Selbst wenn Langerhans-Inseln aus derselben Isolierungen simultan in den einzelnen Kanälen des Perifusionsgerätes *Suprafusion*® unter exakt gleichen Bedingungen perfundiert wurden, waren die Kurvenverläufe sehr unterschiedlich. Die Frage war also, was der Grund für diese Unterschiede ist und ob mit dem *Suprafusion*® auf diese Art Aussagen zur Funktion von porzinen Langerhans-Inseln gemacht werden können.

Um methodische Probleme bei der Perifusion zu identifizieren, wurden, sämtliche Perifusionen exakt nach dem gleichen Protokoll mit der Perifusionsapparatur *Suprafusion*® von Brandel durchgeführt. Bei der Auswertung wurden die Langerhans-Inseln vier Gruppen

zugewiesen, um den Unterschieden der Isolierungen gerecht zu werden und um mögliche Einflüsse von Spendertier oder Perifusionszeitpunkt auf die Ergebnisse zu verhindern. Die Zuordnungskriterien waren Art der Spendertiere (Jungtier oder Muttertier), die Kulturdauer zum Zeitpunkt der Perifusion (24 h, 48 h und 72 h) und ob die Langerhans-Inseln mikroverkapselt vorlagen. Innerhalb der vier Gruppen konnten die Insulin-Ausschüttungskurven miteinander verglichen werden, jedoch auch hier zeigten sich deutlich unterschiedliche Kurvenverläufe. Den Gruppen mit 24 h und 48 h Kultivierungszeit ist ein Ausbleiben der Plateauphase gemeinsam und eine paradoxe Supprimierung der Ausschüttung von Insulin auf den fortbestehenden Glukosereiz. Dies drückt sich in einem Stimulationsindex kleiner 1 aus. Fällt der Glukosereiz nach 60 min weg, nähert sich die Insulinausschüttung wieder dem Basissekretionswert. Erst bei der vierten Gruppe von Inseln, die nach 72 h Kultivierungszeit und nach Verkapselung perifundiert wurde, steigt der Stimulationsindex erstmals wieder über 1 und es bildet sich eine diskrete Plateauphase aus. Ein regelrechter Peak findet sich zu keinem Zeitpunkt. Auch Davalli et al. beschreiben das Phänomen der paradoxen Reaktion auf einen Glukosereiz [55]. Diese abnorme Reaktion normalisiert sich, je länger die Kultivierung nach der Isolierung andauert. Auch eine Plateauphase bildet sich dann wieder aus.

Sollen jedoch diskretere Unterschiede in den Insulin-Ausschüttungskurven untersucht werden, verursacht etwa durch die Auswirkungen unterschiedlicher Kulturbedingungen, sind die mit dem *Suprafusion*® von Brandel gewonnenen Ergebnisse nur bedingt verwendbar. Die mangelnde Reproduzierbarkeit einzelner Kurven mit dieser Methode kann mehrere Gründe haben. Das Einbringen der Langerhans-Inseln zwischen zwei Cellulosemembranen in einem Stecksystem setzt die Zellen einem hohen mechanischen Stress aus. Weiterhin ist während der Perifusion nicht kontrollierbar, ob sich Luftblasen in der Membran festgesetzt haben. Die Vitalität der Zellen ist nach Abschluss der Perifusion nicht kontrollierbar, da die Zellen nicht wieder zu gewinnen sind. Da mit der vorhandenen Methode der *In-Vitro*-Funktionsdiagnostik in der *Suprafusion*® für isolierte porzine Langerhans-Inseln keine ausreichenden Daten gewonnen werden konnten, sollte ein Ziel dieser Arbeit die Entwicklung einer Methode zur einfachen, reproduzierbaren und zellsparenden Funktionsprüfung von isolierten porzinen Langerhans-Inseln sein.

5.3. Mikroskopie der Langerhans-Inseln in Zellkultur

Die Mikroskopie von isolierten Langerhans-Inseln auf einem Objektträger ist unkompliziert und liefert hervorragende Ergebnisse. Nachteile sind jedoch, dass die Zellen für weitere Diagnostik, Kultivierung und Transplantation verloren gehen. Unklar ist auch, ob die Zellen durch mechanischen Stress oder durch das Umsetzen in die Färbelösung und die Temperaturschwankungen Schaden nehmen. Da die Vitalitätsdiagnostik mittels FDA-PI-Färbung eine nicht unerhebliche Menge an Zellen verbraucht, soll mit dieser Arbeit eine Methode zum Darstellen der Vitalität von Langerhans-Inseln direkt in der Kultur erarbeitet werden. Die untersuchten Zellen sollen nicht umgesetzt werden und in der Kultur weiterverwendet werden können.

5.4. Die Perfusionskultur als Konzept für die Kombination von Zellkultur und Diagnostik

Die Erkenntnisse aus den vorherigen Versuchen zeigten, dass eine Methode benötigt wurde, mit der unter Einsatz von möglichst wenigen Langerhans-Inseln Ergebnisse aus Kultivierung, Vitalitäts- und *In-Vitro*-Funktionsdiagnostik gewonnen werden. Damit keine Zellen für Analysen verloren gehen, muss die Vitalitäts- und *In-Vitro*-Funktionsprüfung in das Kultursystem integriert sein. Da eine suffiziente *In-Vitro*-Funktionsdiagnostik nur durch Perifusion der Langerhans-Inseln zu realisieren ist, bot sich der Umstieg von der Kultivierung in der Zellkulturflasche auf eine Perfusionskultur der isolierten Langerhans-Inseln an. Wird weiterhin eine Möglichkeit zum Mikroskopieren in das Perfusionskultursystem integriert, so gehen für diagnostische Zwecke keine Zellen verloren.

In neuerer Zeit werden aufgrund neuer Anforderungen an die Zellkultur durch das *tissue engineering* auf die jeweiligen Gewebearten und Fragestellungen exakt zugeschnittene Lösungen für Kultursysteme entwickelt. Die herkömmliche statische Zellkultur in Kulturflaschen wird meist nur für die Phase der Zellvermehrung benutzt. Für die Phase der Differenzierung und die Phase, in der die Gewebe ihre Funktion aufnehmen, werden perfundierte Kultursysteme bevorzugt. Auch isolierte Langerhans-Inseln stellen kleine Organe dar, bestehend aus ausdifferenzierten Zellen, die sich in Kultur nicht mehr teilen, sondern ihren Funktionszustand und ihre Morphologie behalten. Die Perfusionskultur kommt unter den derzeit genutzten Kultivierungsmethoden dem Prinzip der Versorgung der Zellen im lebenden Organismus am nächsten, also der Versorgung über den permanen-

ten Antransport frischen Mediums mit Nährstoffen und Sauerstoff und Abtransport des verbrauchten Mediums mit den Stoffwechselprodukten [68-70].

Der Mediumwechsel mit mechanischem Stress für die Zellen und abruptem Wechsel von verbrauchtem zu frischem Medium entfällt, stattdessen wird ein konstantes Milieu aufrechterhalten. Eine konstante, exakt definierbare Bereitstellung der Nährstoffe und der Abtransport von Stoffwechselmetaboliten wird gewährleistet, eine einfache Analyse des Überstandes durch ist durch fraktioniertes Auffangen möglich. Die Gefahr einer Kontamination ist durch den Verdünnungseffekt des bewegten Mediums in der Kammer verringert.

Es stellt sich nun die Frage nach der Verfügbarkeit eines solchen Systems. Über Recherche in der Literatur und am Markt wurden zwar einige im Ansatz verwendbare Systeme entdeckt, jedoch kein in allen wesentlichen Punkten passendes Kultur- und Analysesystem. Technisch ausgereift und den Anforderungen am ehesten gerecht erwies sich der *Gradient-Culture-Container*® von Minucells. Dieses Produkt ist in ein System von Zubehör integriert und existiert seit einigen Jahren auf dem Markt, auch findet sich umfangreiche Literatur zu Versuchen mit diesem System. Ursprünglich wird dieses System für das *tissue engineering* von hochdifferenzierten Zellen und Geweben wie Nierenepithelien eingesetzt, um ein physiologisches Umfeld zu bieten.

Im eigenen Labor konnte nicht auf Erfahrungen mit einer Perifusionskultur und Langerhans-Inseln zurückgegriffen werden. Auch in der Literatur sind keine Informationen über eine Perifusionskultur mit porzinen Langerhans-Inseln zu finden. Deshalb sollten vorab Erkenntnisse mit dem *Gradient-Culture-Container*® von Minucells gewonnen werden. Die Kammer ist für die Durchführung von Gradientenkulturen konzipiert und wurde in den eigenen Versuchen für die Durchführung von Perfusionskulturen modifiziert. In diesen Vorversuchen wurden isolierte porzine Langerhans-Inseln im *Gradient-Culture-Container*® über mehr als 24 h kultiviert und anschließend Vitalitätsfärbungen durchgeführt. Die Vitalität der Langerhans-Inseln war befriedigend und die Perfusionskultur von Langerhans-Inseln zeigte sich generell durchführbar. Schwierigkeiten ergaben sich, da die Komponenten des zugehörigen Systems wie Schlauchdurchmesser und Anschlüsse, aber auch die Kammer selbst zu groß dimensioniert waren. Die Langerhans-Inseln konnten nicht fixiert werden und wurden weggeschwemmt. Die Kammer war nicht einsehbar und Luftblasen in der Kammer nur schwer entfernbar.

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Perfusionskulturkammern sind Eigenentwicklungen und stellen absolute Neuheiten dar.

5.5. Entwicklung der Würzburger Kammer

Mit den Erkenntnissen aus den Vorversuchen sollte nun eine erste Version der *Würzburger Kammer* entworfen werden. Als Material für die Kammern wurde Acryl gewählt. Dessen Vorteile sind der geringe Preis, die biologische Inertheit, die Transparenz und die gute Verarbeitbarkeit. So konnten die Versionen V1_A und V2_A in Eigenleistung hergestellt werden. Nachteile sind die geringe Beständigkeit gegen Lösungsmittel wie Alkohol und Aceton und die geringe Hitzebeständigkeit, was eine Desinfektion erschwert und die Dampfsterilisation verbietet. Acryl ist außerdem ein schlechter Wärmeleiter, so dass eine in die Kammern integrierte Temperatursteuerung nicht umzusetzen war.

Erste Perfusionskulturen mussten noch in einem Inkubator durchgeführt werden, da eine Sterilität des Systems noch nicht bewiesen war, und die Ergebnisse durch Temperaturschwankungen nicht beeinflusst werden sollten. Wie auch bei Minuth et. al. wurde ein semipermeabler Schlauch vor den Kammern eingesetzt, so dass sich die Gaspartialdrücke des Mediums an die des Inkubators angleichen konnten und der pH-Wert über CO₂-Puffersysteme wie in einer Zellkulturflasche konstant gehalten wurde [69]. Nach einigen Versuchen traten Risse an der Oberfläche der Kammern aus Acrylglas auf, so dass für die weiteren Kammerversionen Edelstahl verwendet wurde, das eine größere Robustheit, Beständigkeit gegen Lösungsmittel und Eigenschaften wie Wärmeleitfähigkeit besitzt. Durch den Umstieg auf Edelstahl ergaben sich wesentliche Freiheiten für die Konstruktion der Kammern. Edelstahl ist nur mit speziellen Werkzeugen zu bearbeiten, so dass ab der Version V3_{SMT} der *Würzburger Kammer* die Fertigung von einem Feinmechaniker übernommen wurde.

Der nächste Schritt war eine Perfusionskultur außerhalb eines Inkubators. Hierfür musste jedoch die Temperatur in der Kammer geregelt werden, was mit der *Würzburger Kammer* durch eine Heizplatte oder über eine integrierte Temperatursteuerung möglich ist. Eine solche Heizplatte wurde in Eigenleistung erstellt und bietet die Möglichkeit, die Temperatur von bis zu 8 Kammern der Version V3 bis V5 zu regulieren. Die integrierte Temperatursteuerung der Kammern V3_{SMT}, V4_{SMT} und V6_{SMT} ist computergesteuert und reguliert über batteriebetriebene Peltierelemente und über Sensoren im Inneren der Kammern die

Temperatur. Auf diese Weise kann jede gewünschte Temperatur mit einer Genauigkeit von $\pm 0,125$ °C eingestellt werden und der Einfluss der Temperatur auf die Kultivierung von Langerhans-Inseln untersucht werden. Eine für diese Arbeit in Eigenleistung programmierte Steuersoftware erlaubt die unabhängige Steuerung der Temperatur von bis zu 8 Kammern, wobei auch Temperaturverläufe vorgegeben werden können. Die Steuersoftware ist sowohl auf einem mobilen Mikroprozessor als auch mit grafischer Oberfläche auf einem PC installierbar.

Für die Durchführung einer Perfusionskultur außerhalb eines Inkubators musste das System geschlossen sein um Kontaminationen zu vermeiden. Dies wird durch die Verwendung von Mediumflaschen mit Bakterienfiltern an der Entlüftung und durch dichte Steckverbindungen zwischen den einzelnen Baugruppen erreicht. Durch die Verwendung von Portsystemen konnte die Kammer mitsamt Zu- und Abfluss stets problemlos z. B. für eine Färbung aus dem System herausgenommen werden. Die Gefahr des Austrocknens der Kammer durch sich sammelnde Luftblasen konnte durch das Portsystem als Luftblasenfänger verringert werden. Bei der *Würzburger Kammer* V6_{SMTE} ist außerdem durch das deutlich größere Volumen in Perfusionskulturkonfiguration die Gefahr des Austrocknens geringer. Wenn sich dennoch Gasblasen innerhalb der Kammer befanden, konnten diese durch einen zusätzlichen Zugang im oberen Bereich der Kammern durch Abziehen mit einer Spritze entfernt werden.

Bei den Versionen V1 bis V5 der *Würzburger Kammer* war stets das Einsetzen der Zellen und Gewebe in die Kammer technisch anspruchsvoll. Dies sollte bei der Kammer V6_{SMTE} vereinfacht werden. Hier ist der Deckel der Kammer so abnehmbar, dass die Zellen auf der Membran wie am Boden eines Topfes mit Medium bedeckt bleiben. So kann Material hinzugefügt oder entnommen werden, ohne dass die Kultur gefährdet wäre.

Um die *Würzburger Kammer* so zu konstruieren, dass eine Perifusion zur Funktionsdiagnostik möglich ist, waren einige theoretische Überlegungen und Vorversuche nötig. Bei der Perifusion wird die Ausschüttung einer Substanz auf einen spezifischen Stimulus bestimmt. Die Konzentration dieser Substanz ist am Ort der Ausschüttung, also direkt bei den Zellen innerhalb der Kammer am höchsten und nimmt bis in die peripheren Bereiche der Kammer stetig ab. Die Konzentration innerhalb der Kammer als ein einzelner momentaner Wert kann also während einer Perifusion nicht bestimmt werden. Stattdessen wäscht

das im Fluss befindliche Medium die Substanz stetig aus der Kammer und es findet die Bestimmung der Menge an ausgeschütteter Substanz pro Zeitintervall statt. Durch Verkürzen der Zeitintervalle nähert man sich dem tatsächlichen Wert der momentan ausgeschütteten Substanzmenge an. Werden diese Werte gegen die Zeit aufgetragen, ergibt sich die typische Insulin-Ausschüttungskurve. Die Auflösung der Ausschüttungskurve wird umso feiner, je kürzer die Zeitintervalle sind und je schneller und vollständiger das Auswaschen der Substanz erfolgt. Die Verkürzung der Zeitintervalle wird durch die maximale Anzahl der bestimmaren Proben limitiert, das Auswaschen wird von der Flussgeschwindigkeit des Mediums und der Kammerform bestimmt. Als Maß dafür, wie schnell das Medium in einer Kammer ausgewaschen wird, wurden die Reaktionszeiten TR_0 und TR_{80} eingeführt. TR_0 entspricht der Zeit, bei der eine erste Konzentrationsänderung am Ablauf der Kammer registriert wird. TR_0 ist also die Verzögerung innerhalb des Systems der *Würzburger Kammer*, wenn ein neues Medium in diese eingeleitet wird. TR_{80} ist die Zeit, nach der 80% des Kammerinhaltes ausgewaschen sind.

Da die Verzögerung TR_0 durch die Form der Kammer und die Länge und den Durchmesser des Schlauchsystems als so genannter Totraum bedingt ist, muss diese Zeit bei der Erstellung einer Insulinausschüttungskurve berücksichtigt werden. So wird z. B. der Beginn eines Glukosereizes zum Zeitpunkt t bei der Erstellung einer Ausschüttungskurve auf $t + TR_0$ nach hinten verschoben.

In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass TR_0 und TR_{80} von der Flussgeschwindigkeit des Mediums bei der Perifusion abhängen. Diese Abhängigkeit ist indirekt und weist für kleine Flussgeschwindigkeiten einen überproportionalen Anstieg für TR_0 und TR_{80} auf, sowie im Bereich von hohen Flussgeschwindigkeiten nur noch eine geringe Verkürzung für TR_0 und TR_{80} . Daher existiert für jede Kammer ein typischer Bereich, in dem Flussgeschwindigkeit und Reaktionszeiten in einem sinnvollen Verhältnis zueinander stehen. Dieser muss für jede Kammer experimentell bestimmt werden.

Da die Konzentration des vom Gewebe produzierten Stoffes sinkt, je schneller das Medium durch die Kammer fließt, geht eine Verkürzung von TR_{80} durch höhere Pumpgeschwindigkeiten auf Kosten der Konzentration des nachzuweisenden Stoffes. Diese Konzentration darf jedoch nicht unter die Nachweisgrenze verdünnt werden. Dabei ist der

Zusammenhang von TR_{80} und der Konzentration über den untersuchten Bereich weitgehend linear.

Beim Vergleich der Perifusionskonfiguration der Kammer $V6_{SMTE}$ mit der Konfiguration für Perfusionenkulturen und mit dem *Gradient-Culture-Container*® zeigte sich, dass sich TR_{80} um den gleichen Faktor verlängerte, mit dem das Volumen zunahm. Weiterhin zeigte sich, dass der Austausch des Mediums in der Kammer durch das eingesetzte Netz gestört wurde, und sich TR_{80} durch das Netz verdreifachte. Hier ist in Zukunft der Einsatz eines durchlässigeren Trägermaterials zu erwägen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass ein kleines Volumen der Kammer Grundvoraussetzung für exakte Perifusionsergebnisse ist. Aber auch durch hohe Flussgeschwindigkeiten wird die Ausschüttungskurve genauer, die Flussgeschwindigkeit kann jedoch wegen der resultierenden Verdünnung nur bis zur Nachweisgrenze des Stoffes gesteigert werden. Weiterhin kann die Auflösung der Ausschüttungskurve durch Verkürzung der Zeitintervalle für die Probenamen verbessert werden. Sinnvollerweise sollte jedoch TR_{80} deutlich kürzer als die Intervalle sein. In den nach diesen Erkenntnissen erstellten Protokollen für die Perifusion von Langerhans-Inseln wurden daher als kleinste Zeitabstände 2,5 min verwendet.

Als Konsequenz wurde durch Verwendung von kurzen Schläuchen mit einem Innendurchmesser von 0,13 mm und eigens angefertigten Steckverbindungen aus Spritzenkanülen der Totraum im Schlauchsystem verringert. Da für eine gleichmäßige Versorgung der Zellen mit frischem Medium und wegen der Gefahr durch Gasblasen bei einer Perfusionenkultur im Gegensatz zur Perifusion ein großes Volumen in der Kammer zu fordern ist, wurde für die Kammer $V6_{SMTE}$ durch einen beweglichen Kolben ein variables Kammervolumen ermöglicht. Die Kammer $V6_{SMTE}$ ist damit für Perfusionenkulturen wie für *In-Vitro*-Funktionsdiagnostik durch Perifusion gleichermaßen geeignet. Die Zellen in der Kammer müssen dafür nicht umgesetzt werden. Für diese Eigenschaft wurde die *Würzburger Kammer* $V6_{SMTE}$ 2005 beim deutschen Patentamt als Gebrauchsmuster geschützt.

Zur Vitalitätsdiagnostik sollten Zellen und Gewebe in den Kammern liegend unter dem Mikroskop betrachtet werden können. Voraussetzung dafür war der Einbau eines Deckgläschens im oberen Teil der Kammer. Weiterhin wurde die Ebene, auf der die Zellen in

der Kammer lagen, näher in Richtung Deckglas angehoben, um den Fokussierabstand zu verkürzen. Die maximale Vergrößerung unter dem Mikroskop ergibt sich durch den Fokussierabstand des jeweiligen Objektivs. Der Einsatz des 40fach vergrößernden Objektivs war mit dem im Labor zur Verfügung stehenden Mikroskop nur mit der Kammer V6_{SMTE} möglich, da hier die Zellen praktisch bis an das Deckglas angehoben werden können. Für die Auflichtmikroskopie wie bei der Fluoreszenzfärbung mit FDA-PI ist eine Öffnung im oberen Teil der Kammer ausreichend, so dass die Auflichtmikroskopie bei den Kammern V3 bis V6 möglich ist. Für die Durchlichtmikroskopie ist eine zweite lichtdurchlässige Öffnung im Boden der Kammer nötig. Dies wurde bei der Kammer V5_{SM} umgesetzt. Um die Kammern unter das Mikroskop legen zu können, wurden die Portsysteme an Zu- und Ablauf vom Schlauchsystem getrennt. So war weiterhin Sterilität gewährleistet und die Kammern konnten nicht auslaufen.

5.6. Kultur, Perifusion und Mikroskopie mit der Würzburger Kammer

Bei einem Großteil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturen, Perifusionen und mikroskopischen Untersuchungen lag der Schwerpunkt darauf, Weiterentwicklungen und Verbesserungen an der *Würzburger Kammer* zu testen. Erst in einem späteren Schritt nach dem Etablieren der neuen Methoden sollten dann neue Erkenntnisse über Langerhans-Inseln gewonnen werden. Damit die Zellkulturflasche durch die Perfusionkultur ersetzt werden konnte, war es in dieser Arbeit vorrangig, zu zeigen, dass die Perfusionkultur für porcine Langerhans-Inseln gleichermaßen geeignet ist und dass zusätzlich während einer Perfusionkultur mit der *Würzburger Kammer In-Vitro*-Funktionsdiagnostik und Vitalitätsfärbung durchführbar sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die Vitalität von isolierten Langerhans-Inseln nach 5 Tagen in einer Perfusionkultur in der *Würzburger Kammer* zufrieden stellend ist, und die *In-Vitro*-Funktion mit der von Langerhans-Inseln vergleichbar ist, die über den gleichen Zeitraum in Zellkulturflaschen kultiviert wurden. Sowohl die Insulin-Ausschüttungskurve der Zellen direkt nach der Isolierung, als auch die Kurve der Langerhans-Inseln aus der Perfusionkultur und der Zellkultur zeigten die gleichen Charakteristika. Lediglich das Sekretionsniveau lag zu Beginn beider Kulturen deutlich höher als nach 5 Tagen. Somit ist die Perfusionkultur in Bezug auf Vitalität und *In-Vitro*-Funktion eine vollwertige Alternative zur Kultur in Zellkulturflaschen, bietet jedoch die bekannten methodischen Vorteile durch geringen Zellverbrauch und einfache Durchführung der Diagnostik. Bei keinem

Versuch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kontamination in der *Würzburger Kammer* beobachtet. Dies ist sehr wahrscheinlich auf den Verdünnungseffekt durch das permanent bewegte Medium zurückzuführen.

Nachdem die Tauglichkeit der *Würzburger Kammer* für die Kultivierung von isolierten porzinen Langerhans-Inseln bewiesen war, sollte nun herausgefunden werden, ob andere Gewebe, vorzugsweise ebenfalls endokriner Art, in dieser Kammer kultiviert werden können. Im Zuge der Doktorarbeit von Dr. med. W. Moskalenkow wurden humane Nebenschilddrüsenzellen über 2 Tage erfolgreich in der *Würzburger Kammer* kultiviert. Am Ende der Kultivierung wurde in der *Würzburger Kammer* ein *In-Vitro*-Funktionstest durchgeführt. Nach Beendigung des Versuches konnten die Zellen für eine histologische Untersuchung aus der Kammer wieder gewonnen werden.

Auch so genannte *Islet-like cells* (*in-vitro* modifizierte periphere Blutmonozyten [23]) wurden mit der *Würzburger Kammer* perfundiert und kultiviert (nicht dokumentiert).

Ziel einer Perifusion mit der *Würzburger Kammer* war, die Insulinausschüttung der Langerhans-Inseln exakt wiederzugeben und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Wenn mit der *Würzburger Kammer* Perifusionen mit mehreren Kammern gleichzeitig durchgeführt wurden, zeigten sich stets in allen Kammern Insulin-Ausschüttungskurven, die in den wichtigen Charakteristika wie z. B. einem Peak und dessen zeitlicher Zuordnung übereinstimmten. So wurden die einzelnen Versuche gut untereinander vergleichbar. Das häufig beobachtete und oben beschriebene Phänomen der Supprimierung der Insulinausschüttung nach Glukoseexposition und anschließendem sprunghaftem Anstieg der Insulinsekretion nach Beendigung der Exposition tritt z. B. in mehreren Versuchen reproduzierbar auf. Es kann daher von einer paradoxen Insulinausschüttung ausgegangen werden und eine fehlerhafte Perifusion ausgeschlossen werden.

Um herauszufinden, ob diese Supprimierung von der Höhe der Glukosekonzentration bei einer Perifusion abhängig ist, wurde die Glukosekonzentration mit Werten von 150 mg/dl, 300 mg/dl und 500 mg/dl variiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Form der Insulin-Ausschüttungskurve durch die Höhe der Glukosekonzentration nicht wesentlich beeinflusst wird. Allerdings war die Insulinausschüttung bei stärkerem Glukosereiz mit 500 mg/dl deutlich höher, als bei Stimulation mit 300 mg/dl oder 150 mg/dl. In diese Erkenntnisse

fügen sich nahtlos Ergebnisse aus Vorversuchen ein, bei denen gezeigt wurde, dass die Perfusion von Langerhans-Inseln wie bisher im eigenen Labor üblich mit HBSS und 440 mg/dl Glukose, deutlich andere Ergebnisse liefert, als die Verwendung der in der Literatur gebräuchlichen Lösung mit 300 mg/dl. Auch hier konnte gezeigt werden, dass zwar die Form der Insulin-Ausschüttungskurven in den wesentlichen Charakteristika übereinstimmte, das Niveau der Insulinausschüttung bei der Stimulation mit 440 mg/dl jedoch höher lag. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Protokoll für die Perfusion von Langerhans-Inseln auf die Verwendung von Stimulationslösung mit 300 mg/dl umgestellt.

Im Rahmen einer anderen Doktorarbeit wird derzeit der *In-Vitro*-Funktionstest durch Perfusionen mit der *Würzburger Kammer* systematisch weitergeführt. Dabei werden Versuche mit 2 Perfusionen in enger zeitlicher Abfolge durchgeführt und unterschiedliche Stimuli eingesetzt, wie Aminosäuren, Adrenalin und Medikamente.

Nach Perfusionskultur und *In-Vitro*-Funktionstest sollte als dritter wichtiger Anwendungsbereich die Möglichkeit zur Mikroskopie in die *Würzburger Kammer* integriert werden. Die technischen Voraussetzungen dafür waren ab den Versionen V3_{SMT} gegeben, mit der Kammer V6_{SMTE} war eine 400fache Vergrößerung möglich. Dass die Färbung der Langerhans-Inseln innerhalb der *Würzburger Kammer* keine negativen Auswirkungen auf deren Funktion hat, konnte in einem Versuch gezeigt werden, bei dem mit FDA-PI-gefärbte Zellen nach weiteren 5 Tagen Perfusionskultur die gleiche *In-Vitro*-Funktion aufwiesen, wie Langerhans-Inseln, welche zuvor nicht gefärbt wurden. Für diagnostische Zwecke mussten nun keine Zellen mehr aus der Kultur abgezweigt werden.

Erweiterte diagnostische Möglichkeiten ergaben sich durch schrittweises Erstellen von Schnittbildern einer Alginat-Mikrokapsel mit darin enthaltenen Langerhans-Inseln. Diese Schnittbilder wurden durch Nachbearbeitung am Computer in eine 3-dimensionale Rekonstruktion der Mikrokapsel umgerechnet. Die Schnittbilder hatten einen Abstand von ca. 5 µm und wurden für die 400fache Vergrößerung in der *Würzburger Kammer* V6_{SMTE} erstellt. Nach der Rekonstruktion konnte das Abbild auf einem Computer in Echtzeit um alle Achsen gedreht werden und für Analysezwecke eingesetzt werden. Diese Art der Darstellung ermöglicht Aussagen über die Verteilung von Zellen in einer Kapsel. Wird zusätzlich FDA-PI eingesetzt, können Aussagen über die Verteilung von vitalen und

non-vitalen Langerhans-Inseln gemacht werden und so die Versorgungszustände im Inneren einer Mikrokapsel untersucht werden.

5.7. Kostengünstige Eigenentwicklung eines Insulin-ELISA

Zur Analyse der großen Anzahl anfallender Proben aus der *In-Vitro*-Funktionsdiagnostik der porzinen Langerhans-Inseln wurde als Alternative zum kommerziellen ELISA-Kit der Fa. BioSource ein kostengünstiger Insulin-ELISA entwickelt. Die Entwicklungsziele waren die Fähigkeit, porcines Insulin im relevanten Konzentrationsbereich bis über 300 $\mu\text{U/ml}$ zu detektieren, hohe Genauigkeit und Kostenreduktion bei vertretbarem Zeitaufwand.

Der Insulinnachweis fand in 6 Schritten statt. Als Primärantikörper für die Detektion des Insulins sollte wegen der höheren Genauigkeit ein monoklonaler Antikörper verwendet werden. Zum Umsetzen eines Farbstoffes ist dieser Primärantikörper gewöhnlich mit einem Enzym wie HRP konjugiert, da dieser aber nicht zu vertretbaren Preisen in konjugierter Form vorlag, wurde in einem weiteren Schritt ein mit HRP-konjugierter Antikörper zum Nachweis des Fc-Teils des Primärantikörpers eingesetzt. Die Übereinstimmung der Eichkurven mit den Standards war für gewöhnlich hervorragend. Die Kosten für die Durchführung eines ELISA beliefen sich mit der Eigenentwicklung auf etwa ein Drittel der Kosten des EASIA-Kits, bei jedoch etwa doppelt so großem Zeitaufwand für seine Durchführung.

6. Zusammenfassung

Die xenogene Inselzelltransplantation ist ein attraktiver und viel versprechender Ansatz zur Therapie des insulinabhängigen Diabetes mellitus beim Menschen. Voraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation ist eine ausreichende Verfügbarkeit vitaler Inselzellen mit intakter Funktion. Es zeigt sich, dass die Kultivierung von isolierten porzinen Langerhans-Inseln noch kein Standardverfahren darstellt, denn ebenso wie die Funktionsprüfung durch Perfusion weist sie methodische Unzulänglichkeiten auf. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Alternative zum bisherigen Verfahren der Kultivierung zu finden, die Vitalitäts- und Funktionsdiagnostik porziner Langerhans-Inseln aussagekräftiger zu machen, zu vereinfachen und den Zellverbrauch für die Diagnostik zu reduzieren.

1. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Standardmethode zur Kultivierung isolierter porziner Langerhans-Inseln nicht optimal geeignet ist. So konnte nach 3 Tagen Kultivierung durch Austausch eines einzelnen Inhaltsstoffes im Medium die Vitalität der Langerhans-Inseln auf das Doppelte im Vergleich zum Standardmedium gesteigert werden. Ein systematisches Erheben von Daten zur Verbesserung der Kulturmethode erwies sich mit den herkömmlichen Diagnoseverfahren als nicht möglich, da hierfür der Zellverbrauch zu groß war.
2. Eine geeignete Alternative stellte das Prinzip der Perfusionskultur dar, die in einem eigens konzipierten Kulturcontainer durchgeführt wird. Dieses Prinzip wurde im Rahmen der Arbeit als *Würzburger Kammer* in 6 Versionen schrittweise technisch umgesetzt. Die Version V_{6SMTE} vereint durch ein variables Innenvolumen die Anforderungen an Kultivierung und Funktionsdiagnostik und benötigt keinen Inkubator. Sie wurde beim deutschen Patentamt geschützt.
3. Das Kultursystem *Würzburger Kammer* ermöglicht die Kultivierung von Langerhans-Inseln und simultan die Durchführung von Diagnostik mit Mikroskopie und Funktionsprüfung durch Perfusion. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Vitalität darin inkubierter Langerhans-Inseln auch nach 5 Tagen vergleichbar mit der Vitalität von in Zellkulturflaschen kultivierten Langerhans-Inseln ist. Die Funktion der Langerhans-Inseln wurde durch die Perfusionskultur nicht beeinträchtigt.
5. Für die Funktionsdiagnostik durch Perfusion konnten durch theoretische Überlegungen Werte für optimale Flussgeschwindigkeiten und Kammervolumina angegeben werden, die dann experimentell bestätigt wurden. So erbrachte die Funktionsdiagnostik

mit der *Würzburger Kammer* eindeutige Ergebnisse, die im Gegensatz zu der bisherigen Perifusionsmethode reproduzierbar waren. Erstmals konnten im eigenen Labor aus der Literatur bekannte Phänomene wie die paradoxe Insulinausschüttung bei porzinen Langerhans-Inseln beobachtet werden. Die Mikroskopie in der *Würzburger Kammer* lieferte gewohnt aussagekräftige Bilder, ohne dass Zellen verworfen wurden.

6. Überdies konnten andere endokrine Gewebe wie humane Nebenschilddrüsenzellen erfolgreich kultiviert und bezüglich Vitalität und Funktion beurteilt werden.
7. Zur kostengünstigen Analyse der im Rahmen der Arbeit anfallenden Insulinproben wurde ein eigener Insulin-ELISA zum Nachweis porzinen Insulins etabliert.

Mit der *Würzburger Kammer* wurde eine Grundvoraussetzung geschaffen, um zukünftig Fragestellungen zu Kultivierung und *In-Vitro*-Funktion endokriner Zellen – besonders auch vor der dann folgenden Transplantation – systematisch zu beantworten. Als Fernziel kann das Prinzip der Perfusionskultur mit der *Würzburger Kammer* im Sinne des *tissue engineering* eingesetzt werden, um Vorläuferzellen zu Inselzellverbänden zu differenzieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Bach, J. F.: Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr.Rev.* 15: 516-542, 1994
2. Cudworth, A. G., White, G. B., Woodrow, J. C., Gamble, D. R., Lendrum, R., and Bloom, A.: Aetiology of juvenile-onset diabetes. A prospective study. *Lancet* 1: 385-388, 1977
3. Lendrum, R., Walker, G., and Gamble, D. R.: Islet-cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset. *Lancet* 1: 880-882, 1975
4. Wilkin, T., Hoskins, P. J., Armitage, M., Rodier, M., Casey, C., Diaz, J. L., Pyke, D. A., and Leslie, R. D.: Value of insulin autoantibodies as serum markers for insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1: 480-481, 1985
5. Tchobroutsky, G.: Relation of diabetic control to development of microvascular complications. *Diabetologia* 15: 143-152, 1978
6. Lestradet, H., Papoz, L., Hellouin, de Menibus, Levavasseur, F., Besse, J., Billaud, L., Battistelli, F., Tric, P., and Lestradet, F.: Long-term study of mortality and vascular complications in juvenile-onset (type I) diabetes. *Diabetes* 30: 175-179, 1981
7. Clarke, B. F., Ewing, D. J., and Campbell, I. W.: Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetologia* 17: 195-212, 1979
8. Deckert, T. and Poulsen, J. E.: Diabetic nephropathy: fault or destiny? *Diabetologia* 21: 178-183, 1981
9. Mogensen, C. E., Steffes, M. W., Deckert, T., and Christiansen, J. S.: Functional and morphological renal manifestations in diabetes mellitus. *Diabetologia* 21: 89-93, 1981
10. Brownlee, M., Cerami, A., and Vlassara, H.: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N.Engl.J.Med.* 318: 1315-1321, 1988
11. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N.Engl.J.Med.* 329: 977-986, 1993
12. Radermecker, R. P., Hermans, M. P., Legrand, D. A., and Scheen, A. J.: [Continuous subcutaneous insulin infusion with portable pumps]. *Rev.Med.Liege* 60: 329-334, 2005
13. Steil, G. M. and Rebrin, K.: Closed-loop insulin delivery - what lies between where we are and where we are going? *Expert.Opin.Drug Deliv.* 2: 353-362, 2005

14. Hermansen, K.: Waiting to inhale: noninjectable insulin, are we there yet?
Curr.Diab.Rep. 4: 335-341, 2004
15. Gruessner, A. C. and Sutherland, D. E.: Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. *Clin.Transplant.* 19: 433-455, 2005
16. Demartines, N., Marti, H. P., and Clavien, P. A.: [Pancreas transplantation--indications and results updated]. *Ther.Umsch.* 62: 477-479, 2005
17. International Islet Transplant Registry (ITR): University Hospital Giessen :
www.med.uni-giessen.de/itr/, 2004
18. Bach, F. H., Robson, S. C., Winkler, H., Ferran, C., Stuhlmeier, K. M., Wrighton, C. J., and Hancock, W. W.: Barriers to xenotransplantation. *Nat.Med.* 1: 869-873, 1995
19. Paradis, K., Langford, G., Long, Z., Heneine, W., Sandstrom, P., Switzer, W. M., Chapman, L. E., Lockey, C., Onions, D., and Otto, E.: Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 285: 1236-1241, 1999
20. Stoye, J. P. and Coffin, J. M.: The dangers of xenotransplantation. *Nat.Med.* 1: 1100, 1995
21. Heneine, W., Tibell, A., Switzer, W. M., Sandstrom, P., Rosales, G. V., Mathews, A., Korsgren, O., Chapman, L. E., Folks, T. M., and Groth, C. G.: No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 352: 695-699, 1998
22. Weiss, R. A.: Xenografts and retroviruses. *Science* 285: 1221-1222, 1999
23. Ruhnke, M., Ungefroren, H., Nussler, A., Martin, F., Brulport, M., Schormann, W., Hengstler, J. G., Klapper, W., Ulrichs, K., Hutchinson, J. A., Soria, B., Parwaresch, R. M., Heeckt, P., Kremer, B., and Fandrich, F.: Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* 128: 1774-1786, 2005
24. Valdes-Gonzalez, R. A., Dorantes, L. M., Garibay, G. N., Bracho-Blanchet, E., Mendez, A. J., Davila-Perez, R., Elliott, R. B., Teran, L., and White, D. J.: Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *Eur.J.Endocrinol.* 153: 419-427, 2005
25. Halberstadt, C., Emerich, D. F., and Gores, P.: Use of Sertoli cell transplants to provide local immunoprotection for tissue grafts. *Expert.Opin.Biol.Ther.* 4: 813-825, 2004
26. Tyden, G., Bolinder, J., Solders, G., Brattstrom, C., Tibell, A., and Groth, C. G.: 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

27. Begemann, J. F., Pollok, J. M., Kaufmann, P. M., Kluth, D., Broelsch, C. E., and Rogiers, X.: 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
28. Sun, Y., Ma, X., Zhou, D., Vacek, I., and Sun, A. M.: Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J.Clin.Invest* 98: 1417-1422, 1996
29. Chaillous, L., Darquy, S., Maugeudre, S., Rivereau, A. S., Reach, G., and Sai, P.: Xenografts of porcine islets immunoprotected in hollow fibres reduce the incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 39: 523-529, 1996
30. Lanza, R. P., Butler, D. H., Borland, K. M., Staruk, J. E., Faustman, D. L., Solomon, B. A., Muller, T. E., Rupp, R. G., Maki, T., and Monaco, A. P.: Xenotransplantation of canine, bovine, and porcine islets in diabetic rats without immunosuppression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88: 11100-11104, 1991
31. Lanza, R. P., Kuhlreiber, W. M., Ecker, D., Staruk, J. E., and Chick, W. L.: Xenotransplantation of porcine and bovine islets without immunosuppression using uncoated alginate microspheres. *Transplantation* 59: 1377-1384, 1995
32. Lanza, R. P., Jackson, R., Sullivan, A., Ringeling, J., McGrath, C., Kuhlreiber, W., and Chick, W. L.: Xenotransplantation of cells using biodegradable microcapsules. *Transplantation* 67: 1105-1111, 1999
33. Meyer, T., Breuer, S., Bühler, C., Popel, A., Beutner, U., Klöck, G., Thiede, A., and Ulrichs, K.: Cellular and humoral immune reactions in rats with long-term functioning microencapsulated porcine pancreatic islets grafts. VI Congress of the International Xenotransplantation Association, Chicago, IL, USA, 2001
34. Ulrichs, K., Hamelmann, W., Buhler, C., Beutner, U., Meyer, T., Otto, C., Klock, G., and Thiede, A.: [Transplantation of porcine Langerhans islets for therapy of type I diabetes. The way to clinical application]. *Zentralbl.Chir.* 124: 628-635, 1999
35. Krickhahn, M., Buhler, C., Meyer, T., Thiede, A., and Ulrichs, K.: 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: 827-838, 2002

36. Krickhahn, M., Meyer, T., Buhler, C., Thiede, A., and Ulrichs, K.: Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation: numbers, purity, yield and in vitro function. *Ann.Transplant.* 6: 48-54, 2001
37. Yamaguchi, T., Mullen, Y., Watanabe, Y., Nomura, Y., Cass, D., and Brunicardi, C.: Isolation and function of islets from young adult pig pancreas. *Transplant.Proc.* 24: 1010-1012, 1992
38. Weber, C. J., Hardy, M. A., Lerner, R. L., and Reemtsma, K.: Tissue culture isolation and preservation of human cadaveric pancreatic islets. *Surgery* 81: 270-273, 1977
39. Lakey, J. R., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Ao, Z., and Rajotte, R. V.: Effects of pre-cryopreservation culture on human islet recovery and in vitro function. *Transplant.Proc.* 26: 820, 1994
40. Taylor, G. D., Kirkland, T., Lakey, J., Rajotte, R., and Warnock, G. L.: Bacteremia due to transplantation of contaminated cryopreserved pancreatic islets. *Cell Transplant.* 3: 103-106, 1994
41. Dabbs, K. D., Warnock, G. L., Cattral, M. S., and Rajotte, R. V.: Reduced immunosuppression for in vitro cultured, pure canine islets transplanted from single donors. *Transplant.Proc.* 23: 781-782, 1991
42. Ricordi, C., Socci, C., Davalli, A. M., Staudacher, C., Baro, P., Vertova, A., Sassi, I., Gavazzi, F., Pozza, G., and DiCarlo, V: Isolation of the elusive pig islet. *Surgery* 107: 688-694, 1990
43. Heiser, A., Ulrichs, K., and Muller-Ruchholtz, W.: Isolation of porcine pancreatic islets: low trypsin activity during the isolation procedure guarantees reproducible high islet yields. *J.Clin.Lab Anal.* 8: 407-411, 1994
44. Graf, E. F. and Bothe, W: Mikroverkapselung durch Zertropfen. *Pharmazie in unserer Zeit* 13: 71-82, 1984
45. Miyamoto, M., Morimoto, Y., Nozawa, Y., Balamurugan, A. N., Xu, B., and Inoue, K.: Establishment of fluorescein diacetate and ethidium bromide (FDAEB) assay for quality assessment of isolated islets. *Cell Transplant.* 9: 681-686, 2000
46. Latif, Z. A., Noel, J., and Alejandro, R.: A simple method of staining fresh and cultured islets. *Transplantation* 45: 827-830, 1988
47. Gray, D. W. and Morris, P. J.: The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. *Stain.Technol.* 62: 373-381, 1987
48. Coyle, P., Zalewski, P. D., Philcox, J. C., Forbes, I. J., Ward, A. D., Lincoln, S. F., Mahadevan, I., and Rofe, A. M.: Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc. *Biochem.J.* 303: 781-786, 1994

49. Ranaldi, G., Perozzi, G., Truong-Tran, A., Zalewski, P., and Murgia, C.: Intracellular distribution of labile Zn(II) and zinc transporter expression in kidney and MDCK cells. *Am.J.Physiol.Renal Physiol.* 283: F1365-F1375, 2002
50. Shiroy, A., Yoshikawa, M., Yokota, H., Fukui, H., Ishizaka, S., Tatsumi, K., and Takahashi, Y.: Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells* 20: 284-292, 2002
51. Tai, J., Tsang, A., and Tze, W. J.: Effects of serum and medium supplements, pH, and temperature on the viability of cultured porcine islets. *Transplant.Proc.* 26: 818-819, 1994
52. Ohgawara, H., Mochizuki, N., Taira, T., Nishijima, S., Iwasaki, N., Yui, R., Hirata, Y., and Hayakawa, T.: Maintenance of embedded pig pancreatic pseudo-islets in a collagen gel matrix: study of the effect of hydrocortisone, a collagenase inhibitor, and nicotinamide on collagenolysis and the morphogenesis of pancreatic islet-cells in collagen gel matrix. *In Vitro Cell Dev.Biol.* 26: 348-352, 1990
53. Lacy, P. E. and Finke, E. H.: Activation of intraislet lymphoid cells causes destruction of islet cells. *Am.J.Pathol.* 138: 1183-1190, 1991
54. Coppelli, A., Arvia, C., Giannarelli, R., Marchetti, P., Viacava, P., Naccarato, A. G., Lorenzetti, M., Cosimi, S., Cecchetti, P., and Navalesi, R.: Long-term survival and function of isolated bovine pancreatic islets maintained in different culture media. *Acta Diabetol.* 33: 166-168, 1996
55. Davalli, A. M., Bertuzzi, F., Socci, C., Scaglia, L., Gavazzi, F., Berra, C., Ferrari, P., DiCarlo, V., Pontiroli, A. E., and Pozza, G.: In vitro function of adult pig islets: effect of culture in different media. *Transplant.Proc.* 24: 2794-2795, 1992
56. Hamid, M., McCluskey, J. T., McClenaghan, N. H., and Flatt, P. R.: Comparative functional study of clonal insulin-secreting cells cultured in five commercially available tissue culture media. *Cell Transplant.* 10: 153-159, 2001
57. Lindl, T.: *Zell- und Gewebeskultur.* 2000
58. Holmes, M. A., Clayton, H. A., Chadwick, D. R., Bell, P. R., London, N. J., and James, R. F.: Functional studies of rat, porcine, and human pancreatic islets cultured in ten commercially available media. *Transplantation* 60: 854-860, 1995
59. Davalli, A. M., Bertuzzi, F., Socci, C., Scaglia, L., Gavazzi, F., Freschi, M., DiCarlo, V., Pontiroli, A. E., and Pozza, G.: Paradoxical release of insulin by adult pig islets in vitro. Recovery after culture in a defined tissue culture medium. *Transplantation* 56: 148-154, 1993

60. Rastellini, C., Cicalese, L., Zeevi, A., Mattes, C., Stanko, R. T., Starzl, T. E., and Rao, A. S.: Long-term culture of viable human pancreatic islets in pyruvate-rich medium. *Transplant.Proc.* 27: 3383-3384, 1995
61. Csernus, V. J., Hammer, T., Peschke, D., and Peschke, E.: Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell Mol.Life Sci.* 54: 733-743, 1998
62. Ishiyama, N., Ravier, M. A., and Henquin, J. C.: Dual mechanism of the potentiation by glucose of insulin secretion induced by arginine and tolbutamide in mouse islets. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 290: E540-E549, 2006
63. Zawalich, W. S., Yamazaki, H., Zawalich, K. C., and Cline, G.: Comparative effects of amino acids and glucose on insulin secretion from isolated rat or mouse islets. *J.Endocrinol.* 183: 309-319, 2004
64. Rorsman, P., Eliasson, L., Renstrom, E., Gromada, J., Barg, S., and Gopel, S.: The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol.Sci.* 15: 72-77, 2000
65. Lacy, P. E., Walker, M. M., and Fink, C. J.: Perfusion of isolated rat islets in vitro. Participation of the microtubular system in the biphasic release of insulin. *Diabetes* 21: 987-998, 1972
66. London, N. J., Swift, S. M., and Clayton, H. A.: Isolation, culture and functional evaluation of islets of Langerhans. *Diabetes.Metab.* 24: 200-207, 1998
67. McKay, D. B. and Karow, A. M., Jr.: Factors to consider in the assessment of viability of cryopreserved islets of Langerhans. *Cryobiology* 20: 151-160, 1983
68. Minuth W.W.: Improved differentiation of renal tubular epithelium in vitro: Potential for tissue engineering. *Exptl.Nephrol.* 5: 10-17, 1997
69. Minuth, W. W., Strehl, R., and Schumacher, K.: Tissue factory: conceptual design of a modular system for the in vitro generation of functional tissues. *Tissue Eng.* 10: 285-294, 2004
70. Strehl, R., Schumacher, K., de Vries, U., and Minuth, W. W.: Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. *Tissue Eng.* 8: 37-42, 2002

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Experimentelle Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Klinik I der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. K. Ulrichs angefertigt. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großzügige finanzielle Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik, bedanken.

Für die Vergabe des Themas, die konstruktive Betreuung und Unterstützung sowie die aus zahlreichen Diskussionen hervorgegangenen Anregungen bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. K. Ulrichs.

Mein besonderer Dank gilt Frau S. Eber und K. Knoke, Frau Dr. Zwirner-Bayer, sowie Herrn Dr. T. Meyer, Herrn U. Beutner Ph.D. und Herrn F. Sauer. Bei ihnen möchte ich mich für die hervorragende technische und sehr freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Im Übrigen möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantations-Immunologie danken, die mir jederzeit mit ihrer Hilfe unterstützend zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexander Georg Kerscher
Geburtsdatum	07. Oktober 1976
Geburtsort	Würzburg
Familienstand	verheiratet
Eltern	Brigitte Kerscher, geb. Steinhauser Dr. med. Paul Kerscher, Chirurg
Geschwister	Katrin Kerscher, Gymnasiallehrerin

Schulbildung

Toppler-Grundschule Rothenburg o.d.T.
Reichsstadt-Gymnasium Rothenburg o.d.T.
Teilnahme an der Prüfung für Hochbegabte

Hochschulausbildung

Vorklinisches Studium an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
Physikum mit der Note befriedigend (2,66)
Klinisches Studium an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
Erstes Staatsexamen mit der Note gut (2,0)
Zweites Staatsexamen mit der Note gut (1,66)
Praktisches Jahr (Anästhesiologie, Chirurgie, Innere
Medizin)
Drittes Staatsexamen mit der Note sehr gut (1,0)

Berufsausbildung

08/2004-09/2005 Assistenzarzt der Allgemein Chirurgie
am Klinikum Aschaffenburg bei Prof. Dr. med. R. Enge-
mann
seit 11/2005 Assistenzarzt der Allgemein Chirurgie an der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg bei
Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Hohenberger

Präsentationen

„A New Miniaturized Perfusion System to Test the Functional Dynamics of Endocrine Cells and Tissues”, A. Kerscher, W. Moskalenko, K. Ulrichs; 1st International Conference “Strategies in Tissue Engineering”, Wuerzburg, 17-19 June 2004 (oral presentation).

„Ein *In-Vitro*-Kultursystem mit variablem Volumen ermöglicht integrierte Vitalitäts- und Funktionsanalysen und die mikroskopische Betrachtung endokriner Zellen und Gewebe“. A. Kerscher, S. Schlosser, V. Moskalenko, K. Ulrichs; 13. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft DTG, Kiel, 21.-23. Oktober 2004 (Posterpräsentation)

Erlangen, Juli 2006

Handwritten signature of Alexander Kerscher in black ink.