

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß-
und Kinderchirurgie

Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Entwicklung von zwei Diabetes-Modellen im Grosstier
Schwein und Pilotversuche zur Transplantation
mikroverkapselter allogener Langerhans-Inseln**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Armin Strauß

aus Forchheim

Würzburg, Mai 2009

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

Korreferent: Professor Dr. med. C.-T. Germer

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.8.2009

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Offene Fragen	7
3.	Material und Methoden	8
3.1.	Schweine und ihre Haltung	8
3.1.1.	Eingriffe und Behandlungen vor und nach der Diabetes- Induktion	8
3.1.1.1.	Zentraler Venenkatheter	8
3.1.1.2.	Hickman-Katheter	9
3.1.1.3.	Blutzuckermessung	9
3.1.1.4.	Insulin-Applikation	9
3.1.2.	Diabetes-Modelle	10
3.1.2.1.	Streptozotozin-Modell	10
3.1.2.2.	Pankreatektomie-Modell	10
	Nachsorge nach Pankreatektomie	11
3.1.3.	<i>Real Time Glucose Monitoring</i>	12
3.1.3.1.	Beschreibung des Gerätes	12
3.1.3.2.	Implantation des Sensors im Göttinger Miniaturschwein	12
3.1.4.	Intravenöser Glukosetoleranztest und Hyperglykämischer <i>Clamp</i>	13
3.1.4.1.	Intravenöser Glukosetoleranztest	13
3.1.4.2.	Hyperglykämischer <i>Clamp</i>	13
3.2.	Transplantatgewinnung (Spenderschweine)	14
3.2.1.	Deutsche Landrasse	14
3.2.2.	Göttinger Miniaturschwein	14
3.2.3.	Pankreasentnahme im Schlachthof	15
3.2.4.	Pankreasentnahme im Grosstier-OP	15
3.2.5.	Isolierung, Reinigung und <i>In-Vitro</i> Kultur der Langerhans-Inseln	17
3.2.6.	Mikroverkapselung	18
3.2.7.	Transplantation	18
3.3.	Messungen	19
3.3.1.	Insulin-ELISA	19
3.3.2.	C-Peptid-RIA	19
3.4.	Histologie	20
3.4.1.	Herstellung von Gefrierschnitten	20
3.4.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	20
3.4.3.	Insulin-Färbung	20
3.4.4.	Dithizon-Färbung	21

3.4.5.	FDA/PI-Färbung	21
3.5.	Statistik	22
4.	Ergebnisse	23
4.1.	Etablierung von zwei Diabetes-Modellen	23
4.1.1.	Glukosephysiologie gesunder Göttinger Miniaturschweine	23
4.1.1.1.	Intravenöser Glukosetoleranztest	23
4.1.1.2.	<i>Real Time Glucose Monitoring</i>	24
4.1.1.3.	Spontane Blutzuckerwerte	25
4.1.1.4.	Körpergewicht	25
4.1.1.5.	Pankreashistologie	25
4.1.2.	Glukosephysiologie diabetischer Göttinger Miniaturschweine	26
4.1.2.1.	Streptozotozin-Diabetes	26
	Diabetes-Induktion und Nachsorge	26
	Intravenöser Glukosetoleranztest	27
4.1.2.2.	Diabetes nach Pankreatektomie	28
	Diabetes-Induktion und Nachsorge	28
	Intravenöser Glukosetoleranztest	29
	<i>Real Time Glucose Monitoring</i>	30
	STZ-Diabetische Schweine ohne Insulin-Therapie	30
	STZ-Diabetische Schweine mit Insulin-Therapie	31
	STZ-Diabetische Schweine mit optimierter Insulin-Therapie	32
	Pankreatektomierte Schweine mit Insulin-Therapie	33
	GMS #4	33
	GMS #5	34
	Körpergewicht diabetischer Göttinger Miniaturschweine	35
	Blutzuckerwerte diabetischer Göttinger Miniaturschweine	36
	Pankreas-Histologie in STZ-diabetischen Göttinger Miniaturschweinen	37
4.2.	Isolierung von Langerhans-Inseln nach Pankreatektomie aus Schweinen der Deutschen Landrasse	38
4.2.1.	Intravenöser Glukosetoleranztest in DL-Spenderschweinen	42
4.3.	Allogenen Transplantation in diabetischen Göttinger Miniaturschweinen	44
4.3.1.	Transplantation #1	44
4.3.1.1.	Pankreatektomie, Isolierung, Mikroverkapselung, Transplantation	44
4.3.1.2.	Blutzuckerwerte, <i>Real Time Glucose Monitoring</i> , Glukosetoleranztest	45
4.3.1.3.	Explantation des Transplantates	46

4.3.2.	Transplantation #2	48
4.3.2.1.	Pankreatektomie, Isolierung, Mikroverkapselung, Transplantation	48
4.3.2.2.	Blutzuckerwerte, <i>Real Time Glucose Monitoring</i> , Glukosetoleranztest	49
4.3.2.3.	Explantation des Transplantates	50
5.	Diskussion	51
5.1.	Vergleichende Betrachtung der beiden Diabetes-Modelle	51
5.1.1.	Diabetes-Induktion	51
5.1.2.	Monitoring der diabetischen Stoffwechsellage	53
5.2.	Optimierung der Isolierung porziner Langerhans-Inseln	55
5.3.	Allogene Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln in STZ-diabetischen Empfänger-Tieren	59
5.3.1.	Logistik und Koordination	59
5.3.2.	Transplantatgewinnung	61
5.3.3.	Alginatmikroverkapselung	62
5.3.4.	Transplantation und Transplantationsort	63
5.3.5.	Therapie des experimentellen Diabetes	64
5.3.6.	Explantation der mikroverkapselten Langerhans-Inseln	65
6.	Zusammenfassung	66
7.	Literaturverzeichnis	68
	Danksagung	
	Anhang	
	Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-Diphosphat
A. dest.	Aqua destillata
A. hepatica	Arteria hepatica
ATP	Adenosin-Triphosphat
β-Zelle(n)	Betazelle(n) des endokrinen Pankreas
°C	Grad Celsius
CGMS	<i>Continuous Glucose Monitoring System</i>
cm	Zentimeter
C-Peptid	<i>Connecting Peptide</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
DAB	3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
dL	Deziliter
DL	Deutsche Landrasse (Schweinerasse)
DM	Diabetes mellitus
DM Typ-1	Diabetes mellitus Typ-1 (jugendlicher Diabetes)
DM Typ-2	Diabetes mellitus Typ-2 (Altersdiabetes)
DNS	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EU	Europäische Union
FDA	Fluoreszeindiacetat
g	Gramm
G	<i>Gauge</i>
GAD 65	Glutamat-Decarboxylase 65
GLUT 2	Glukosetransporter 2
GMS	Göttinger Miniaturschwein
h	Stunde(n)
HBSS	<i>Hepes Buffered Salt Solution</i>
H&E-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IAA	Insulin-Autoantikörper
ICA	Inselzell-Autoantikörper
i. c.	intracutan
IE	Internationale Einheit(en)
IEQ	Inseläquivalent(e)
i. m.	intramuskulär
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IVGTT	Intravenöser Glukosetoleranztest

Insel	Kurzform für Langerhans-Insel
ITX	Inselzell-Transplantation
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
o. g.	oben genannt
OP	Operationssaal
OP-Situs	Operationssitus
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Pankreatektomie
PERV	<i>Porcine Endogenous Retrovirus</i>
PI	Propidiumjodid
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RTGM	<i>Real Time Glucose Monitoring</i>
s. c.	subcutan
sec	Sekunde(n)
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
STZ	Streptozotozin
t = 90 _{min}	Neunzig Minuten nach Versuchsbeginn
TX	Transplantation
UW	<i>University of Wisconsin</i>
µU	<i>Micro Unit</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
V. jugularis interna	Vena jugularis interna
Vol %	Volumenprozent
vs.	versus
x g	Vielfaches der Erdanziehung
z. B.	zum Beispiel
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1. Einleitung

Das Wort Diabetes kommt ursprünglich aus dem Griechischen und bedeutet dort Durchfluss. Als Beschreibung eines pathologischen Zustands taucht es erstmals bei dem antiken Arzt Aretaios von Kappadokien (um 81-138 n. Chr.) auf, der den Diabetes als eine „rätselhafte Krankheit“ bezeichnet. Auch bei Aretaios' Zeitgenossen Galen (129-199 n. Chr.) taucht der Diabetes auf; er führt für diese Krankheit noch einige andere beschreibende Bezeichnungen an, wie *hýderos eís amída* „Nachttopfwassersucht“ oder *dípsakos* „Durstkrankheit“. Hiermit beschrieb er schon einige der wichtigsten Symptome. Überraschenderweise enthält das *Corpus Hippocraticum* keine Beschreibung des Diabetes. Der Zusatz *mellitus* (lat. honigsüß) wurde allerdings vermutlich erst von Willis 1674 n. Chr. eingeführt. Kurze Zeit später differenzierte dann Michael Ettmueller (1644-1683 n. Chr.) zwischen dem „Diabetes notha“ (süß schmeckend) und dem „Diabetes vera“ (später insipidus) (v. Engelhart et al. 1989; Gerabeh et al. 2005).

Nach dem Lehrbuch „Innere Medizin“ (Classen et al. 2004) versteht man heute unter Diabetes mellitus (DM) folgendes: *Unter der Bezeichnung Diabetes mellitus werden Stoffwechselveränderungen unterschiedlicher Ursache zusammengefasst. Sie sind durch eine dauerhafte Erhöhung der Blutglukose (Hyperglykämie) – klinisch manifester Diabetes – oder durch eine zeitlich inadäquate Verwertung zugeführter Glukose – gestörte Glukosetoleranz – gekennzeichnet ist. Ursache ist immer ein absoluter oder relativer Insulinmangel.*

Das Peptidhormon Insulin wird in den β -Zellen der Langerhans-Inseln, dem endokrinen Gewebe des Pankreas, gebildet. Nach einer Mahlzeit steigt die Glukosekonzentration im Blut an. Glukose wird dann über den Insulin-unabhängigen Glukosetransporter GLUT 2 in die β -Zellen transportiert. In der Zelle wird die Glukose durch das Enzym Glukokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Über die im Zellinneren ablaufende Glykolyse, sowie über den in den Mitochondrien lokalisierten Zitronensäurezyklus wird die Glukose abgebaut und somit vermehrt ATP aus ADP gebildet. ATP kann dann die ATP-empfindlichen K^+ -Kanäle schliessen, ebenso werden durch den Abfall der ADP-Konzentration K^+ -Kanäle geschlossen. Das Schliessen der K^+ -abhängigen Kanäle depolarisiert die Zellmembran und öffnet dadurch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Das durch diese Kanäle einströmende Ca^{2+} leitet die Verschmelzung der Insulin-haltigen

Vesikeln mit der Zellmembran ein und damit die Insulin-Freisetzung (Aktories et al. 2005; Schmidt et al. 2000).

Nach der Einteilung der WHO unterscheidet man zwei Arten von DM, und zwar den Typ-1 Diabetes und den Typ-2 Diabetes. Die Prävalenz ist stark von geographischen und ethnischen Bedingungen, dem Alter und den Lebensbedingungen der Bevölkerung abhängig. In den westlichen Industrienationen liegt die Prävalenz etwa bei 2,5-8 %, davon entfallen etwa 5-8 % auf den Typ-1 und 85-90 % auf den Typ-2 Diabetes (Classen et al. 2004).

Dem DM Typ-1 liegt eine irreversible Zerstörung der Insulin-produzierenden β -Zellen durch einen Autoimmunprozess zugrunde. 70-80 % aller Fälle manifestieren sich vor dem 35. Lebensjahr. Bei etwa 80 % der Erkrankten sind zum Zeitpunkt der Manifestation verschiedene Autoantikörper als Marker für die Immundestruktion nachweisbar. Hierzu zählt man Inselzell-Autoantikörper (ICA), Insulin-Autoantikörper (IAA), Autoantikörper gegen Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD 65) und Autoantikörper gegen Tyrosinphosphatasen IA-2 und IA-2 β . Ätiologisch geht man von einer genetischen Prädisposition aus (95 % HLA DR3/DR4) sowie von viralen und andersartigen Schädigungen der β -Zellen (Bach 1994; Lendrum et al. 1975; Cudworth et al. 1977; Wilkin et al. 1985).

Beim wesentlich häufigeren DM Typ-2 handelt es sich pathophysiologisch um eine Störung der Insulin-Sekretion auf einen Glukosereiz hin, bzw. um eine Resistenz der Zielzellen gegenüber Insulin (periphere Insulin-Resistenz). Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Abnahme der Anzahl der β -Zellen, vermutlich aufgrund der chronischen Überstimulation. Die Ätiologie ist bislang noch nicht vollständig geklärt, man geht von einer genetischen Prädisposition aus, sowie von begünstigenden exogenen Faktoren wie Bewegungsmangel und Adipositas (Turner et al. 1995; Permutt 1998; Malecki 2005; Buchwald et al. 2009).

Das Ziel jeder Behandlung ist die Normalisierung des Blutzuckerspiegels und damit eine Verhinderung der Folgeerkrankungen. Während dieses bei Patienten mit DM Typ-2 über eine kontrollierte Diät und vermehrte Bewegung oftmals schon zu erreichen ist, muss bei Patienten mit DM Typ-1 immer exogenes Insulin zugeführt werden.

Als Folge des erhöhten Blutzuckerspiegels – häufig trotz optimaler Therapie – entwickeln sich die schweren Folgeerkrankungen, wie Mikro- und Makroangiopathie (Besse et al. 1981; Tooke 1995), Nephropathie (Morgensen et al. 1981), Neuropathie (Clarke et al. 1979; Deckert and Poulsen 1981) und Retinopathie (Davies 1986). Diese bestimmen zum grossen Teil die weitere Krankengeschichte der Patienten. Als Ursache für die Sekundärerkrankungen sieht man die irreversible Glykosylierung von Proteinen durch den erhöhten Blutzuckerspiegel an. Es wurde gezeigt, dass Sekundärerkrankungen umso früher auftreten, je schlechter der Blutzucker eingestellt ist (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993). Im Umkehrschluss kann man sagen, dass die exogene Zufuhr von Insulin nie das von der Natur geschaffene System der auf den jeweilig aktuellen Blutzuckerspiegel angepassten Insulin-Sekretion ersetzen kann. Deshalb ist die Transplantation Insulin-produzierenden Gewebes, welche zurzeit klinisch und experimentell erprobt wird, ein viel versprechender Therapieansatz. Auf diesem Gebiet steht momentan die Transplantation von Pankreatae in Kombination mit einer Nierentransplantation, im Stadium des absoluten Nierenversagens, an erster Stelle (Tyden et al. 1999). Hieraus ergeben sich allerdings auch einige Nachteile:

- (1) Bis eine durch den DM verursachte absolute Niereninsuffizienz auftritt, vergehen 10-25 Jahre, in denen auch die sonstigen Angiopathien fortschreiten. Mit der Transplantation kann zwar die Nephropathie behoben werden, die Neuro- und Retinopathien werden in ihrer Entwicklung aber im günstigsten Fall in einem späten Stadium gehemmt.
- (2) Es besteht die Gefahr des Wiederauftretens des DM.
- (3) Die Patienten müssen ihr Leben lang medikamentös immunsupprimiert werden.
- (4) Es besteht weltweit ein Mangel an geeigneten Organspendern.

Aufgrund dieser gravierenden Faktoren ist die Transplantation beim jungen Diabetiker nahezu ausgeschlossen.

Ein anderer Behandlungsansatz ist die Transplantation isolierter Langerhans-Inseln. Sie hat einige Vorteile im Vergleich zur konventionellen kombinierten Pankreas-/Nierentransplantation:

- (1) Eine Behandlung ist bereits im frühen Stadium der Erkrankung möglich, was die Progression der Folgeerkrankungen bereits in einem frühen Stadium hemmt oder sogar umkehrt.
- (2) Es handelt sich um einen weniger belastenden chirurgischen Eingriff.

(3) Durch die Mikroverkapselung der isolierten Langerhans-Inseln mit immunologisch inertem Material kann man – vielleicht sogar ganz – auf die medikamentöse Immunsuppression verzichten (Lanza et al. 1991, 1995, 1999; Sun et al. 1996 ; Chaillous et al. 1996; Jain et al. 1999; Begemann et al. 1999).

Die Ergebnisse der humanen Inselzell-Transplantation bleiben aber immer noch weit hinter den Erwartungen und den Ergebnissen aus den Kleintiermodellen zurück. Nach Angaben des *International Islet Transplant Registry* (Brendel et al. 2000) wurden zwischen 1974 und 12/2000 weltweit 493 Inselzell-Transplantationen durchgeführt; 2008 waren es insgesamt ca. 1.000 (mündliche Mitteilung Prof. Dr. M. Brendel, Giessen). Eine genauere Analyse der Ergebnisse ergibt folgendes Bild: Nach einem Jahr lebten noch 97 % der Patienten, bei 54 % der Patienten konnte eine Funktion des Transplantates nachgewiesen werden. Nur 20 % der Patienten waren nach einem Jahr Insulin-unabhängig. Die längste Insulin-unabhängige Zeit betrug 6,5 Jahre (Bretzel et al. 2004). Nach fünf Jahren lag die Insulin-Unabhängigkeit jedoch nur noch bei ca. 10 % (Shapiro et al. 2006; Ryan et al. 2001; Srinivasan et al. 2007; Bretzel et al. 2007).

Das Problem des Organspendermangels kann umgangen werden, indem man die Inseln anstatt aus humanem Pankreas aus tierischem Gewebe isoliert. Eine Grundvoraussetzung hierfür ist die annähernde Identität der Aminosäuresequenz zwischen dem humanen und dem tierischen Insulin. Theoretisch läge es nahe, als Organspender die dem Menschen genetisch und physiologisch verwandten Primaten zu nutzen. Diese scheiden jedoch sowohl aus ethischen Gründen als Spendertiere aus, wie auch aufgrund der hohen Zucht- und Haltungskosten, der Bedrohung durch das Aussterben einzelner Arten und der möglichen Übertragung von Infektionserregern vom Primaten auf den Menschen. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Nutztieren, z. B. von Rindern, Schafen und Schweinen. Aus dieser Gruppe ist besonders das Schwein als Spendertier für die Xenotransplantation geeignet: Es ist ebenso wie der Mensch ein Allesfresser, und sein Insulin unterscheidet sich nur an Position 30 der Betakette durch ein Alanin anstelle eines Threonins im humanen Insulin. Vor der rekombinanten Herstellung von humanem Insulin wurden mit der Gewinnung von Insulin aus porzinen Pankreatae schon einmal grosse Erfolge in der Behandlung von Diabetikern erzielt. Nachdem mittlerweile die Isolierung der porzinen Inseln perfektioniert wurde (Krickhahn et al. 2001, 2002), und die grössten Probleme der Mikroverkapselung gelöst sind, kann man nun ein Transplantatüberleben in

ca. 30 % der diabetischen Kleinnager feststellen (Meyer et al. 2001, 2008; Denner et al. 2008). Dies ist zwar schon ein beachtlicher Erfolg, aber er reicht er noch nicht aus, um mit gutem Gewissen mit diesem Konzept in die Therapie von Diabetikern einzusteigen. Ein weiteres Problem bei der klinischen Transplantation besteht darin, dass für ein einziges Transplantat etwa drei Spenderorgane notwendig sind, manchmal jedoch – abhängig von der Qualität des jeweiligen Organs – sogar noch viel mehr Organe. Das heisst, die isolierten Langerhans-Inseln müssten über viele Tage und Wochen kultiviert werden, bis ein ausreichend grosses Transplantat verfügbar ist. Die *in vitro* Kultur vor Transplantation bedingt aber zumeist unerwünschte Zellzahlverluste durch Apoptose (Andersson 1976). Auch die Kryokonservierung von Langerhans-Inseln ist noch nicht so ausgereift, um grössere Zeitfenster ohne Zellzahlverluste bis zur Transplantation zu überstehen (Rajotte 1999; Lakey et al. 1996).

Somit ist die Transplantation isolierter Langerhans-Inseln noch lange kein Standardverfahren in der Therapie des DM Typ-1, und schon gar nicht die xenogene Transplantation, jene also, bei der vom Schwein stammende (porzine) Inseln verwendet werden. Weshalb auch erst sehr selten porzine mikroverkapselte Langerhans-Inseln in Menschen übertragen wurden (Sykes M and Cozzi E 2006; Elliott et al. 2007; Valdés-González 2007).

Zudem wurde von der Parlamentarischen Versammlung des Europarates einstimmig der Beschluss gefasst, dem Ministerrat ein „Moratorium für Xenotransplantationen am Menschen“ zu empfehlen. Die Versammlung begründet ihre Empfehlung vor allem damit, dass durch Xenotransplantate krankheitserregende tierische Retroviren und Prionen, die das menschliche Immunsystem nicht bekämpfen kann, auf die Empfänger übertragen würden, was durch die Übertragung auf weitere Menschen im Umfeld des transplantierten Patienten zu unkontrollierbaren Pandemien führen könnte. Solche Übertragungsmöglichkeiten werden derzeit *in vitro* und *in vivo* intensiv untersucht (Patience et al. 1997; Denner et al. 2008; Wilson 2008; Denner 2008; Magre et al. 2003; Hering et al 2001).

Trotz dieser noch nicht in allen Einzelheiten gelösten Probleme erschien es uns gerechtfertigt, die technischen Abläufe im Zusammenhang mit der Inselzell-Transplantation in einem Grosstiermodell, hier *Schwein-auf-Schwein*, zu erproben und Erfahrungen auf diesem Gebiet zu erlangen; die Verwendung von diabetisierten nicht-

humanen Primaten – der eigentliche präklinische Schritt – wäre zum jetzigen Zeitpunkt ethisch jedoch nicht gerechtfertigt. Der spezielle Fokus lag also auf der Diabetisierung von Schweinen, der Koordination aller Abläufe, von der Organgewinnung bis zur Transplantation, mit der sich daran anschließenden Nachsorge.

In der Literatur sind verschiedene autologe Inselzell-Transplantationen (Morsiani et al. 2002) allogene Inselzell-Transplantationen (Kumagai et al. 2002; Morsiani et al. 2002; Kin et al. 2005) und xenogene Inselzell-Transplantationen (Dufrane and Gianello 2008; Edamura et al. 2003; Rood et al. 2006) in Schweinen, Hunden und Primaten beschrieben. Die verwendeten diabetischen Empfänger, seien sie pankreatektomiert (Edamura et al. 2003; Kumagai et al. 2002; Morsiani et al. 2002; Kin et al. 2005; Kobayashi et al. 2004) oder mittels Streptozotocin (STZ) diabetisiert worden (Dufrane and Gianello 2008; Grüssner et al. 1993; Gäbel et al. 1985) unterschieden sich in ihrem Langzeitüberleben gravierend; gleiches gilt auch für die verwendeten Transplantate (Larson and Rolin 2004). Neben isolierten adulten Inselzellen (Dufrane and Gianello 2008) wurden auch Langerhans-Inseln aus neugeborenen Schweinen (Kin et al. 2005) oder Schweineföten (Dufrane and Gianello 2008) verwendet; ebenso speziell veränderte Insulin-produzierende Zelllinien (Okitsu et al. 2004). Neben diesen Unterschieden hinsichtlich des diabetischen Modells und der Transplantate, ist auch der Transplantationsort für die Inseln Gegenstand intensiver Analysen. In der Literatur werden folgende Transplantationsorte beschrieben: das Pfortadersystem der Leber und die Nierenkapsel (Rajab et al. 2008), das Unterhautgewebe und das Omentum (van der Windt et al. 2008). Weitere Variablen im Ablauf der Transplantation sind (1) die Versorgung der Empfänger nach der Transplantation, (2) das Schema der medikamentösen Immunsuppression und (3) die Tests zur Evaluierung der post-diabetischen Stoffwechsellage. Mit anderen Worten, die Literatur-Analyse zeigt, dass bis jetzt kein gültiges Protokoll existiert, wonach porcine Langerhans-Inseln – mikroverkapselt oder unverkapselt – im vergleichsweise einfach zu handhabenden Grosstiermodell *Schwein* mit Erfolg transplantiert werden könnten. Allerdings wurden in den vergangenen Jahren mehrere Arbeiten zur Transplantation von porcinen Langerhans-Inseln in nicht-humane Primaten publiziert: Dabei wurden Normoglykämie erzielt bzw. porcines C-Peptid nachgewiesen. Mikroverkapselte Inseln überlebten auch ohne Immunsuppression, während unverkapselte Inseln mit einem ausgeklügelten Schema zur Immunsuppression vor Abstossung geschützt werden mussten (Sun et al. 1996; Hering et al. 2006; Cardona et al. 2006; Dufrane et al. 2006).

2. Offene Fragen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, in einem gut etablierbaren Grosstiermodell weitere essentielle Voraussetzungen zur späteren klinischen xenogenen Inselzell-Transplantation *Schwein-auf-Mensch* zu evaluieren. Aus ethischen Gründen vor allem sollten diese zunächst im Grosstiermodell *Schwein-auf-Schwein* untersucht werden. Dabei waren mehrere offene Fragen zu untersuchen:

1. Die wenigen und sehr variierenden Angaben aus der Literatur zur Glukosephysiologie von Miniaturschweinen waren mit grosser Vorsicht zu betrachten, da es sich in den allermeisten Fällen um eng verwandte Tiere, nicht aber um etablierte Inzuchten handelt. Hierzu sind auch die Göttinger Miniaturschweine aus der eigenen Zucht zu zählen. So sollten die Blutzucker-, Insulin- und C-Peptidwerte in normalen, d. h. unbehandelten GMS und in diabetischen GMS (STZ-diabetisch und nach Pankreatektomie) vergleichend untersucht werden.
2. Mittels der Pankreatektomie im Grosstier-OP sollten Spenderorgane für die Inselzell-Isolierung ohne jegliche warme Ischämie gewonnen werden. Damit verband sich die begründete Erwartung, dass Langerhans-Inseln, die aus solchen Organen gewonnen werden, eine signifikant höhere Vitalität besitzen, als jene, die parallel dazu auch weiterhin aus Schlachthofpankreatata isoliert werden sollten.
3. Die im Zusammenhang mit der klinischen xenogenen Inselzell-Transplantation zu erwartenden multiplen logistischen Abläufe, einschliesslich der zahlreichen Mitarbeiter, die für die unterschiedlichen Arbeitsschritte verantwortlich sein würden (z. B. für die Pankreatektomie im Grosstier-OP, die Isolierung der Langerhans-Inseln, die Mikroverkapselung der Inseln, die Transplantation und Nachsorge der Empfängertiere) mussten erprobt, koordiniert und vielfach trainiert werden. Hierfür waren mehrere Pilottransplantationen im experimentellen, allogenen Transplantationsmodell *Schwein-auf-Schwein* geplant. Da das Team über keine diesbezüglichen Erfahrungen zum Gesamt Ablauf verfügte, war völlig unklar, welche Arbeitsschritte besonders fehler- oder störanfällig sein würden.

3. Material und Methoden

3.1. Schweine und ihre Haltung

Für beide diabetischen Modelle (s. u.) wurden Göttinger Miniaturschweine (GMS) verwendet. Bei ihnen handelt es sich um speziell für die Forschung gezüchtete 1-1,5 Jahre alte Tiere mit einem Gewicht von 22-35 kg (örtlicher Züchter). Die Tiere wurden bei konstanter Raumtemperatur von 15-20 °C, 60 %iger Luftfeuchtigkeit und einem 12-Stunden wählenden Tag/Nacht-Rhythmus in einem mit Stroh ausgelegten Stall im Grosstierhaus des Klinikums der Universität Würzburg gehalten. Gefüttert wurden die GMS zwischen 7 und 9 Uhr morgens mit Spezial-Trockenfutter (Altromin; Lage) und Trinkwasser *ad libitum*. Alle Eingriffe an den GMS erfolgten im Rahmen genehmigter Tierversuchsvorhaben durch die Regierung von Unterfranken.

3.1.1. Eingriffe und Behandlungen vor und nach der Diabetes-Induktion

3.1.1.1. Zentraler Venekatheter

Für verschiedene Interventionen im Verlauf der Experimente war die Anlage eines Zentralen Venenkatheters (ZVK) notwendig (**Abbildung 1**). Hierfür wurden die GMS mit 0,1-0,2 mg/kg Dormicum (Roche Pharma AG; Grenzach-Wyhlen) und 4-8 mg/kg Ketamin (Ratiopharm GmbH; Ulm) intramuskulär (i. m.) sediert. Nach Lagerung auf den Rücken wurde der rechte Vorderfuss kaudalwärts gezogen und der Kopf überstreckt. Es erfolgte der Einstich mit der Spritzenkanüle unter kontinuierlichem Sog senkrecht in der Mitte einer Verbindungslinie zwischen Jugulum und Oberkante Schulter. Nach sicherer Punktion der V. jugularis interna wurde mittels Seldinger-Technik der Katheter gelegt. Nach Kontrolle seiner Lage durch Aspiration und Spülen, wurde der Katheter mit zwei Stichen an der Eintrittsstelle fixiert.

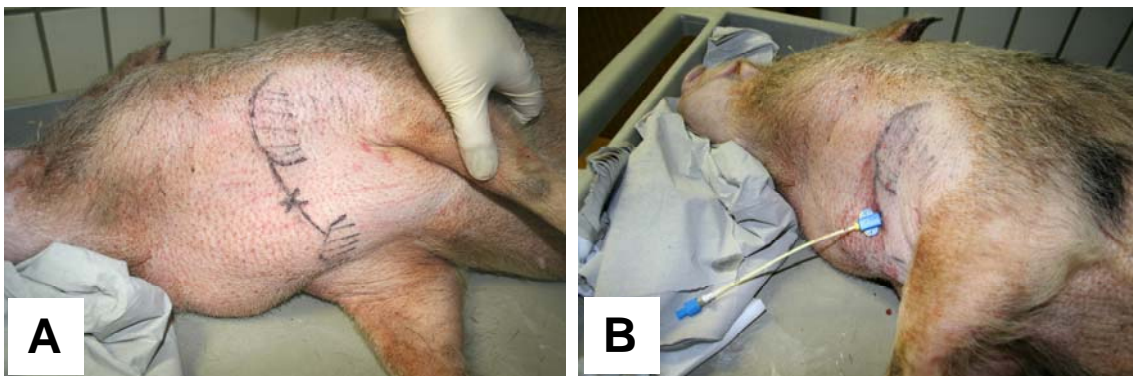


Abb. 1: (A) Der Mittelpunkt der Verbindungslinie zwischen Oberkante Schulter und Jugulum ist mit einem Kreuz markiert. (B) Zustand nach dem Legen des Zentralen Venenkatheters in Seldinger-Technik.

3.1.1.2. Hickman-Katheter

Beim Hickman-Katheter (**Abbildung 2**) handelt es sich um einen grosslumigen Dauerve-
nenkatheter, der wegen seines grossen Durchmessers und zur Vermeidung von Infektionen
operativ gelegt werden muss. Über einen ca. 5 cm langen Einschnitt am Hals wurde die V.
jugularis interna dargestellt und freipräpariert. Nach Anschlingen der Vene wurde diese in
Längsrichtung eingeschnitten, der Katheter in die Vene geschoben, bis er in der V. cava
superior lag. Er wurde mittels einer Tabakbeutelnaht fixiert. Über einen subkutanen Tunnel,
welcher stumpf freipräpariert wurde, wurde der Katheter an der Halsrückseite ausgeleitet.
Danach erfolgte der schichtweise Wundverschluss. Der Katheter wurde sodann in einer
sterilen Kompresse verpackt und mit Heparinlösung geblockt.



Abb. 2: GMS mit dem Hickman-Katheter an der rechten und dem *Real Time Glucose Monitoring* (RTGM) Messgerät an der linken Körperseite.

3.1.1.3. Blutzuckermessung

Für alle Blutzuckermessungen wurde nach Desinfektion, mittels Lanzettenpunktion, Kapil-
larblut aus dem Ohr gewonnen. Der erste Tropfen wurde verworfen, der zweite sodann auf
das Messfeld des Blutzucker-Messgerätes (Ascensia Contour[®] Blutzuckermessgerät, Bayer
Health Care; Mishawaka, USA) aufgetragen.

3.1.1.4. Insulin-Applikation

Je nach Grösse der diabetischen GMS und Höhe ihres Blutzuckerspiegels wurde Insulin
mittels eines handelsüblichen Insulin-Pens verabreicht. Die Applikation erfolgte subcutan
(s. c.) ins Fettgewebe hinter dem Ohr; hier ist die Haut besonders dünn und deshalb gut zu
punktieren. Bei den verwendeten Insulinen handelte es sich um (a) das Insulin-Analogon
Insulin glargin mit zwei veränderten Aminosäuren, und daraus folgend einem verlängerten
Wirkungsprofil von über 24 Stunden (Lantus[®], FertigPen Solo Star, Sanofi-Aventis

Deutschland GmbH; Frankfurt), (b) das Insulin-Analogon Insulin aspart mit ebenfalls zwei veränderten Aminosäuren, wodurch ein besonders rascher Wirkungseintritt innerhalb von 15 Minuten erfolgt (NovoRapid[®], Flex Pen[®], Novo Nordisk Pharma GmbH; Mainz), (c) das Altinsulin (Insuman[®], Aventis Pharma; Frankfurt) und (d) ein Kombinationsinsulin, bestehend aus 30 % Insulin aspart und 70 % Intermediärinsulin mit einem verlängerten Wirkungsprofil bis zu 20 Stunden (NovoMix[®], 30 Flex Pen[®], Novo Nordisk).

3.1.2. Diabetes-Modelle

3.1.2.1. Steptozotozin-Modell

Zur Diabetes-Induktion erhielten die sedierten GMS 150 mg/kg STZ (Sigma; Taufkirchen) über den ZVK (s. o.). Das frisch angesetzte STZ in Citratpuffer (Lösung D s. u.) wurde stets unmittelbar nach der Fertigstellung appliziert. Durch die rasch einsetzende spezifische Zerstörung der Betazellen in den Langerhans-Inseln wird Insulin freigesetzt, und es besteht die Gefahr, dass die GMS in den Zustand der Hypoglykämie geraten. Um dies zu vermeiden, wurde nach STZ-Applikation eine Glukoseinfusion (G-5[®] 500 mL/Tier über 2 Stunden; Braun; Melsungen) gegeben und in den darauf folgenden Stunden der Blutzucker engmaschig gemessen. Der Citratpuffer wurde wie folgt hergestellt: 6,3 mL Stammlösung A (2,1 g Citronensäure + 10 mL H₂O) wurden mit 8,2 mL Stammlösung B (2,94 g Tri-Natriumzitat-Dihydrat + 10 mL H₂O) vermischt und diese Stammlösung C sodann 1:10 mit 0,9 %iger NaCl verdünnt. In der so vorbereiteten Lösung D wurde das STZ gelöst und stets frisch verwendet.

3.1.2.2. Pankreatektomie-Modell

Die GMS wurden für den Transport vom Grosstierhaus zum Grosstier-OP mit 3 mL/25 kg i. m. Stresnil VET[®] (Janssen Cilag; Neuss) sediert; nach dem Legen einer intravenösen Kanüle erfolgte die Narkose-Einleitung mit 300-500 mg Trapanal[®] (Nycomed Deutschland; Konstanz), die endotracheale Intubation und kontrollierte Beatmung unter Aufrechterhaltung der Narkose mit Luft/Sauerstoff und Isofluran. Pulsoximetrische Sättigung und die endexpiratorische CO₂-Messung wurden in einem Narkoseprotokoll dokumentiert. Bei den narkotisierten GMS wurde das Abdomen durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Der Pankreasschwanz wurde vom Querkolon scharf abgetrennt und sodann bis etwa zur Mittellinie retroperitoneal freigelegt. Der Pankreaskopf wurde vom Duodenum getrennt, daher war die Erhaltung der A. pancreaticoduodenalis bedeutsam. Der Pankreasgang wurde freigelegt und durchgetrennt. Am Ende der Operation (**Abbildung 3**) folgten die sorgfältige

Blutstillung und die Kontrolle der Organe Darm, Magen und Leber. Zur Prophylaxe septischer Komplikationen wurde einmalig eine Antibiotikaprophylaxe durchgeführt (1,5 g Cefuroxim i. v.; Hexal; Holzkirchen). Die Milz wurde bei diesem Eingriff erhalten. Der Gallengang und der Pankreasgang haben bei den GMS getrennte Einmündungen.

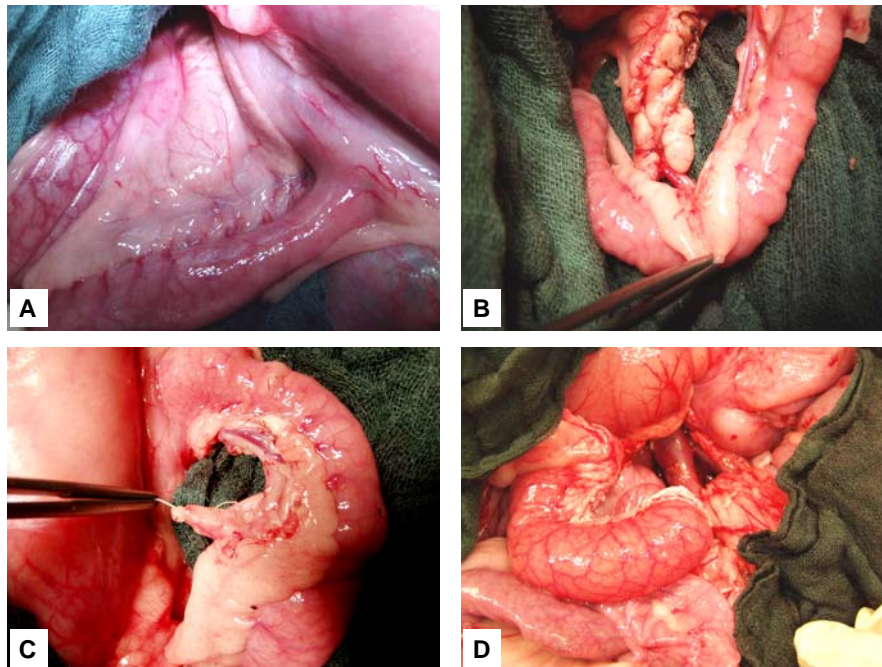


Abb. 3: Pankreatektomie in GMS zwecks Diabetes-Induktion. (A) Duodenum mit Pankreaskopf vor Präparation; (B) Darstellung des D. pancreaticus am Übergang zum Duodenum; (C) Verschluss des D. pancreaticus nach Absetzen des Pankreas; (D) OP-Situs nach Pankreatektomie.

Nachsorge nach Pankreatektomie

Die GMS erholten sich unter einer Rotlichtlampe von der Operation. Danach wurden die GMS in die Intensivhaltung überführt und ihr Allgemeinzustand (Wundheilung, Glykämie, Gewicht, Appetit, Mobilität) täglich engmaschig überprüft. Ab dem 2. post-operativen Tag wurde mit der Insulin-Substitutionstherapie begonnen. Die Dosierung richtete sich dabei nach folgendem Schema: Insulin-Bedarf (0,5-0,7 IE/kg) oder IE ((Blutglukosewert – 150)/5). Zwei Drittel der Dosis wurden morgens, ein Drittel der Dosis abends appliziert; sie bestand aus NovoMix® (s. u.). Eine ausreichende Schmerztherapie wurde mittels i. m. Injektionen von 1-2 mg Tramal/kg Körpergewicht (Ratiopharm; Ulm/Donautal) und 1 g/25 kg Novalgin® (Aventis Pharma) durchgeführt. Substitution der Pankreasenzyme nach Pankreatektomie erfolgte mit Kreon 25.000® (Solvay Arzneimittel; Hannover) vor jeder Mahlzeit. Die GMS wurden ab dem 2. post-operativen Tag zunächst mit flüssiger Kost (Altromin in Wasser) und anschliessend, nach dem ersten Stuhlgang, mit normaler Kost (Altromin) gefüttert. Während der ersten 5-7 post-operativen Tage erfolgte die Flüssigkeit-

Substitution (Sterofundin[®], Braun; Melsungen, 1.000 mL/Tag und Glukose 5 % (Braun, 1.000 mL/Tag) über den Hickman-Katheter. Die Darmperistaltik wurde mittels Paspertin[®] (Ratiopharm GmbH; Ulm, 0,1 mg/kg i. m., maximal 0,5 mg/kg/Tag) und bei Bedarf mit Neostigmin[®] (Delta Select GmbH; Dreieich, 0,5-1 mg/Tag i. m.) stimuliert.

3.1.3. Real Time Glucose Monitoring

3.1.3.1. Beschreibung des Gerätes

Das so genannte *Real Time Glucose Monitoring* (RTGM) wurde mit Hilfe des *Continuous Glucose Monitoring System*[®] (CGMS; Medtronic GmbH; Düsseldorf) durchgeführt. Dieses Gerät misst über eine subkutan implantierte Elektrode, die mit dem Messgerät verbunden ist, kontinuierlich die interstitielle Glukosekonzentration und speichert die Werte. Über eine von der Firma mitgelieferte *MiniMed Com Station* können die gespeicherten Werte auf einen handelsüblichen Personal Computer transferiert und ausgewertet werden. Die Sensorfunktion des Gerätes beruht auf einer Oxidasereaktion mit Glukose im Interstitium und verhält sich proportional zu dieser. Die Glukosekonzentration wird alle 10 Sekunden bestimmt und alle 5 Minuten gespeichert. Pro Tag werden zur Kalibrierung 3-4 konventionelle Blutzuckerwerte gemessen und ins Gerät eingelesen.

3.1.3.2. Implantation des Sensors im Göttinger Miniaturschwein

Die GMS wurden mit Dormicum und Ketanest (s. o.) sediert. Anschliessend wurde der Sensor in das subkutane Fettgewebe hinter dem Ohr eingepflanzt und fixiert (**Abbildung 4**). Das Messgerät selbst wurde mit einem Gurtsystem auf dem Rücken des Tieres fixiert. Die GMS tolerierten das CGMS – nach einigem Training – durchweg gut. Alle weiteren Kalibrierungen wurden ohne Sedierung durchgeführt.

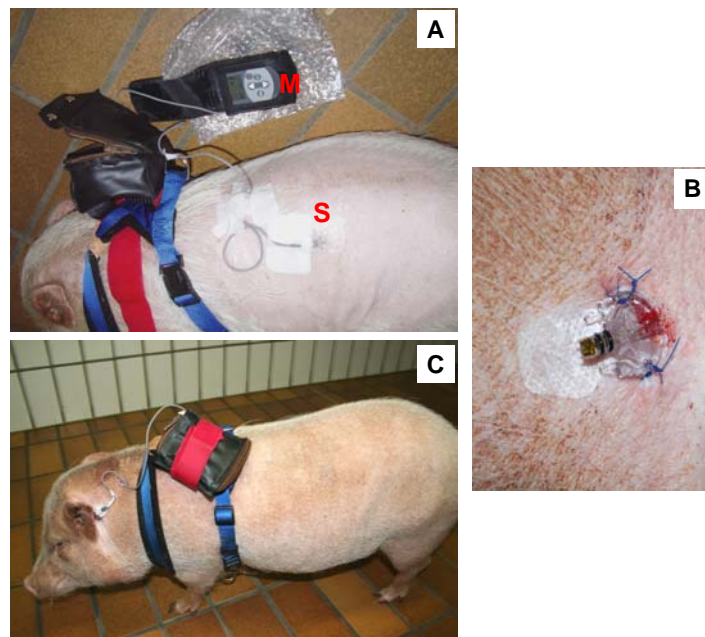


Abb. 4: *Real Time Glucose Monitoring* (RTGM) im GMS. (A) Fertig implantierter Sensor (**S**), der mit dem Messgerät (**M**) verbunden ist; (B) implantierter Sensor in Nahaufnahme; (C) GMS mit dem CGMS während der kontinuierlichen Messungen (hier liegt der Sensor hinter dem linken Ohr).

3.1.4. Intravenöser Glukosetoleranztest und Hyperglykämischer *Clamp*

3.1.4.1. Intravenöser Glukosetoleranztest

Nach Einleitung der Narkose wurde, wie oben beschrieben, ein dreilumiger ZVK gelegt. Anschliessend wurde das GMS druckfrei auf der Seite gelagert. Zu den Zeitpunkten -20, -10, 0, 1, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 91, 93, 95, 97, 100, 110 Minuten wurden je 10 mL Vollblut zur Serumgewinnung abgenommen (S-Monovette[®], Sarstedt; Nümbrecht) und der Blutzuckerspiegel kapillar bestimmt. Das Blut wurde unverzüglich gekühlt, bei 2.000 x g und 5 °C für 10 Minuten zentrifugiert, portioniert und bei -20 °C tief gefroren, um später C-Peptid zu messen. Im Rahmen des intravenösen Glukosetoleranztests (IVGTT) erhielten die GMS zum Zeitpunkt t_0 einen Glukosebolus i. v. von 0,5 g/kg Körpergewicht. Der Blutzuckerspiegel betrug zu diesem Zeitpunkt ca. 600 mg/dL und veränderte sich kontinuierlich, abhängig von der Glukosetoleranz.

3.1.4.2. Hyperglykämischer *Clamp*

Dieser erfolgte zwischen der 60. und 110. Minute des IVGTT: In dieser Zeit wird mittels kontinuierlicher Glukoseinfusion ein dauerhaft hyperglykämischer Zustand erreicht (>500 mg/dL). Mittels des dann folgenden Argininbolus sollte die maximale Insulin-Ausschüttung der Langerhans-Inseln erzielt werden. Die maximale Ausschüttung gilt als Pa-

parameter für die absolute Inselmasse. Der Argininbolus muss stets während der maximalen Stimulation der Insulin-Sekretion durch eine kontinuierliche Glukose-Infusion erfolgen. Abhängig vom jeweiligen Schwein (diabetisch vs. nicht diabetisch) wurden zwei unterschiedliche Protokolle angewendet:

- (a) Normoglykämische GMS: Zum Zeitpunkt $t=60_{\text{min}}$ erhielten die GMS erneut einen Glukosebolus von 0,6 g/kg KG und nachfolgend folgend eine Glukoseinfusion von 2 g/kg KG pro Stunde. So sollte der Blutzuckerspiegel kontinuierlicher über 500 mg/dL gehalten und die maximale Insulinausschüttung erreicht werden. Zum Zeitpunkt $t=90_{\text{min}}$ erhielten die GMS dann einen Argininbolus (67 mg/kg KG).
- (b) Diabetische GMS: Hier erhielten die GMS zum Zeitpunkt $t=60_{\text{min}}$ den Argininbolus (67 mg/kg KG). Auf die zusätzliche Gabe von Glukose wurde wegen des ausreichend hohen Blutzuckerspiegels verzichtet. Blutentnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten 60, 61, 63, 65, 67, 70, 80 und 90 Minuten. Danach wurde der Test beendet und die GMS erhielten Insulin-Injektionen zur Normalisierung ihres Blutzuckerspiegels.

3.2. Transplantatgewinnung (Spenderschweine)

3.2.1. Deutsche Landrasse

(a) Als Spenderschweine für die Isolierung von Langerhans-Inseln für experimentelle Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit – nicht jedoch Transplantationen *in vivo* – wurden verwendet: (I) hirntote Schweine der Deutschen Landrasse (weiblich, 100-200 kg, 1-2 Jahre alt) vom Schlachthof „Südfleisch“ in Würzburg (**Pankreas-Entnahme im Schlachthof**), und (II) hirntote Schweine der Deutschen Landrasse (weiblich, 100-110 kg, 6-7 Monate alt) aus privater Zucht, nach biologisch-dynamischer Fütterung (**Pankreas-Entnahme im Schlachthof**).

(b) Als Spenderschweine für die Isolierung und zum Zweck der Transplantation *in vivo* wurden verwendet: (I) Schweine der Deutschen Landrasse (weiblich/männlich, 100-200 kg, 1-2 Jahre alt) (**Pankreatektomie im Grosstier-OP**: in Tabelle 1 als „Mariensee“ und „Reichert“ deklariert).

3.2.2. Göttinger Miniaturschwein

Verwendet wurden GMS (weiblich, 25-35 kg, 1-2 Jahre alt) aus privater Zucht (**Pankreatektomie im Grosstier-OP**).

3.2.3. Pankreasentnahme im Schlachthof

Die Organentnahme im Schlachthof bedingt ca. 15-30 Minuten warme Ischämie des Pankreas; bei der Pankreatektomie im Grosstier-OP entfällt diese. Für alle Eingriffe an lebenden, narkotisierten Schweinen lag eine entsprechende Genehmigung der Regierung von Unterfranken vor. Die Schweine wurden mittels Elektroschock betäubt, mit einem Kehlschnitt getötet, durch ein 60 °C warmes Wasserbad gezogen, mit einem Gasbrenner abgeflammt und enthaart, der Schlachtkörper sodann mit einem medianen Bauchschnitt eröffnet und der Magen-Darm-Trakt, inklusive Milz und Pankreas, entnommen. In einer *back table* Präparation wurde die Milz aufgesucht, der dort anliegende Pankreasschwanz identifiziert, freigelegt, von umgebendem Fett- und Bindegewebe freipräpariert und vom übrigen Pankreasgewebe abgetrennt. Ein Teil des Pankreas corpus diente der späteren immunhistochemischen Analyse. Die warme Ischämie betrug 15-30 Minuten, das Gewebe wurde in einer Plastiktüte mit 300 mL steriler HBSS-Lösung (Cell Concepts; Umkirch), welche mit 25 mM Kaliumdihydrogenphosphat (Sigma) versetzt war, auf Eis gelagert ins Labor transportiert. Die kalte Ischämiezeit betrug 60-120 Minuten; im Labor erfolgte die endgültige Präparation des Organs unter sterilen Bedingungen: Das Pankreas wurde hierfür in eine eisgekühlte Nierenschale gelegt; mesenteriales Fett, Bindegewebe, Gefäße und Lymphknoten wurden entfernt. Sodann wurde der D. pancreaticus major mit einer 18-23 G Braunüle (Cavafix; Braun) kanüliert und gewogen. Die verwendeten Organteile hatten je nach Rasse ein mittleres Gewicht zwischen 50 und 135 g.

3.2.4. Pankreasentnahme im Grosstier-OP

Ziel der Pankreatektomie (**Abbildung 5**) ist es, das Organ freizulegen, ohne seine Gefäßversorgung zu unterbrechen. Analog zur Pankreatektomie wurden die Schweine präoperativ vorbereitet und narkotisiert. Die intra-operative Narkose erfolgte mit 2 Vol % Isofluran (DeltaSelect; Dreieich) sowie einer kontinuierlichen Gabe von 2 mg/h Fentanyl (Hexal; Holzkirchen). Als nächstes wurde die A. carotis communis dargestellt und so ein arterieller Zugang zur kontinuierlichen Blutdruckmessung gelegt. Nach dem Rasieren des Abdomens wurde das Operationsfeld mit Dibromol[®]-Tinktur (Trommsdorff Arzneimittel; Alsdorf) desinfiziert und steril abgedeckt. Zunächst wurde eine quere Oberbauchlaparotomie durchgeführt, mit schichtweiser Durchtrennung von Haut, Muskulatur und Peritoneum parietalis. Für die Explantation (im Gegensatz zur Pankreatektomie zwecks Diabetes-Induktion) wurde die quere Oberbauchlaparotomie vom Scheitelpunkt aus durch eine mediane Längslaparotomie nach kaudal erweitert.

Sodann werden nacheinander die Milzgefäße zum Hilus hin dargestellt und ligiert, wobei die Ligatur der A. und V. lienalis separat erfolgen, und die Milz entnommen. Dann wird der Pankreasschwanz aufgesucht, das darüber liegende Peritoneum durchtrennt und unter Schonung der Gefäßversorgung der Schwanz so weit wie möglich mobilisiert. Im Weiteren wird die A. gastrica sinister ligiert und durchtrennt. Sodann wird der Pankreaskopf vom Duodenum abgesetzt. Hierfür wird das Peritoneum viszeral durchtrennt und ebenso die zum Duodenum ziehenden Gefäße entlang der A. pancreaticoduodenale. Der D. pancreaticus wird angeschlungen, um ihn bei der späteren Entnahme wiederzufinden. Nach der weitgehenden Freilegung des Pankreas wird die Aorta subdiaphragmal freipräpariert und oberhalb des Truncus coeliacus angeschlungen. Ebenso wird die V. portae aufgesucht, dargestellt und angeschlungen. Im nächsten Schritt wird die kaudale Bauchaorta dargestellt und angeschlungen. Es folgt die Gabe von 10.000 IE Heparin. Nach Vorbereitung und Entlüftung des Perfusionssystems wird die Aorta proximal der Bifurkation ligiert. Es wird nachfolgend eine Ligatur proximal angeschlungen und ein etwa 5 mm langer Längsschnitt in die Aorta gemacht. Über diese Inzision wird der Katheter des Perfusionssystems eingebracht und mittels Ligatur fixiert. Zur Sicherung des Katheters wird noch eine zweite Ligatur angebracht.

Nun wird mit kalter NaCl-Lösung der Bauchraum gekühlt. Nach etwa 3 Minuten wird die Kühllösung abgesaugt, die proximale Aorta aufgesucht und ausgeklemmt; sofort danach wird die V. portae ligiert und etwa zu einem Drittel aufgeschnitten, im gleichen Moment wird die Perfusion mit *University of Wisconsin* (UW)-Lösung über den Katheter in der distalen Aorta begonnen (insgesamt 2 – 2,5 L). Im Weiteren erfolgt die kontinuierliche Kühlung des Bauchraums mit kalter Lösung. Wenn die UW-Lösung im Darm und Pankreas ankommt, verfärbt dieser sich weisslich. Nach etwa 10 Minuten ist das Pankreas gut perfundiert und gekühlt, es wird nun grob von den noch haltenden Strukturen freipräpariert. Als letztes wird der D. pancreaticus durchtrennt. Das so entnommene Pankreas wird nun auf einem Eisbett von Faszien, Gefässen, Fett und Lymphknoten befreit (*back table* Präparation). Aus dem so gewonnenen Organ werden anschliessend im Labor die Langerhans-Inseln isoliert.

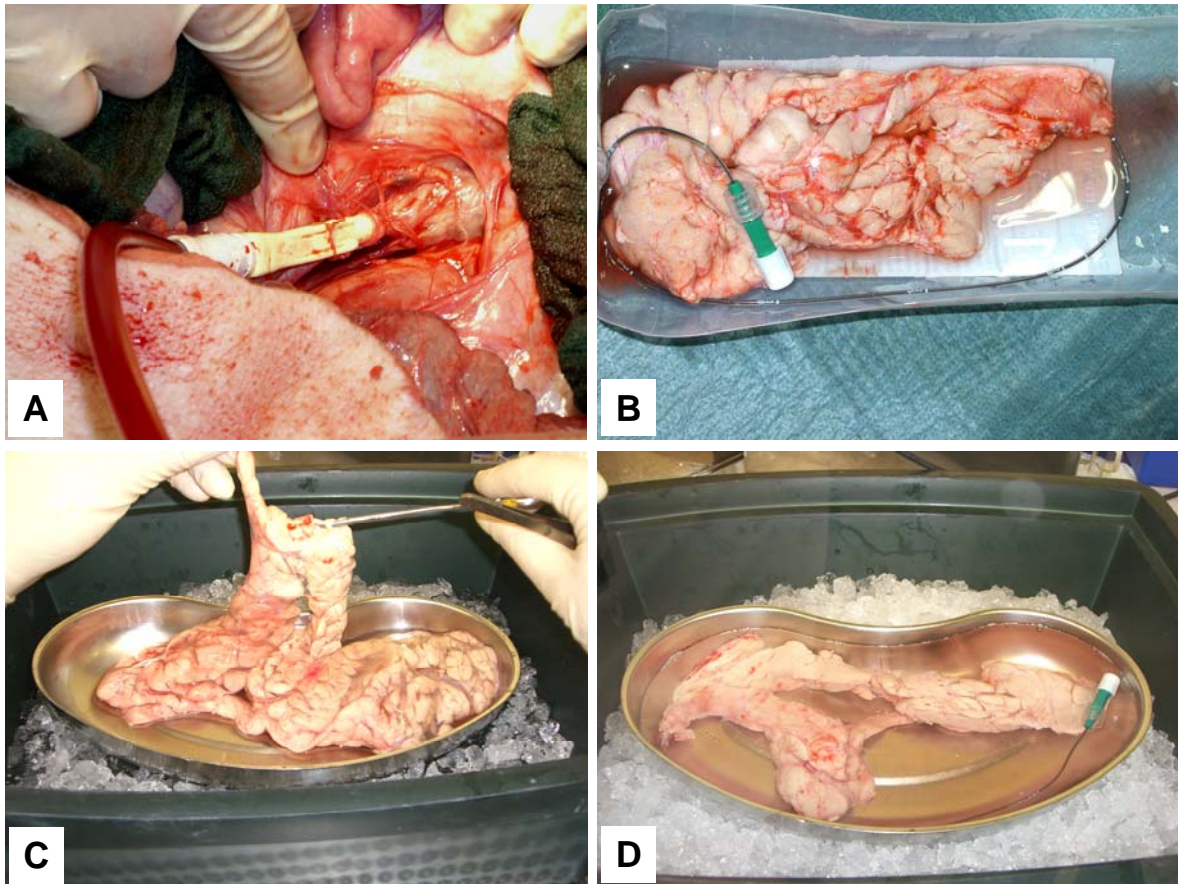


Abb. 5: Pankreasentnahme aus Schweinen der Deutschen Landrasse zur Isolierung von Langerhans-Inseln. (A) In die distale Aorta eingeführtes Perfusionssystem; dieses ist vor der eigentlichen Perfusion noch retrograd mit Blut gefüllt; (B) das bereits explantierte Pankreas nach der Perfusion; das Organ ist blutleer und erscheint daher weisslich (siehe Kopfbereich); (C) *back table* Präparation des explantierten Pankreas (Entfernung von Gefässen, Fett und Lymphknoten); (D) Pankreas vor dem Transport ins Labor, wo sodann die Langerhans-Inseln isoliert werden; der Pankreasgang, über den die Enzymlyösung in das Organ injiziert wird, ist bereits kanüliert.

3.2.5. Isolierung, Reinigung und *in vitro* Kultur der Langerhans-Inseln

Die Isolierung der porzinen Langerhans-Inseln erfolgte mit der halbautomatischen Isolierungstechnik nach Ricordi et al. (1990), modifiziert nach Heiser et al. (1994). Weitere Grundlagen für die vorliegende Dissertation bildeten Methoden und Techniken von Krickhahn et al. (2001, 2002) aus der eigenen Abteilung.

3.2.6. Mikroverkapselung

Für die erste Transplantation von Langerhans-Inseln im diabetischen Schwein wurden diese extern bei der Firma CellMed (Alzenau) nach einem dort entwickelten Verfahren (Roth 2005) doppelt in Alginate mikroverkapselt. Für die zweite Transplantation wurden die Langerhans-Inseln im hiesigen Labor nach einem Standardverfahren (Graf und Bothe 1984; Klöck et al. 1994) mit Alginate einfach mikroverkapselt (**Abbildung 6**).

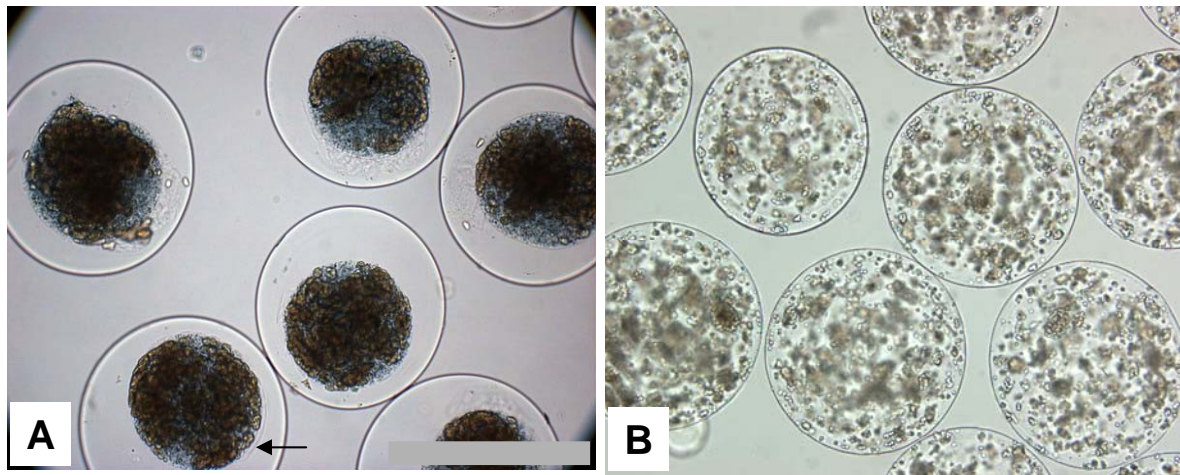


Abb. 6: Mikroverkapselung der isolierten Langerhans-Inseln mit hochreinem Alginat. (A) Doppelt mikroverkapselte Langerhans-Inseln (mit freundlicher Genehmigung der Firma CellMed in Alzenau (s. Roth 2005); der Pfeil markiert den „Rand“ der Einfachkapsel. (B) Einfach mikroverkapselte Langerhans-Inseln aus dem eigenen Labor. Kapseldurchmesser jeweils ca. 500 μ .

3.2.7. Transplantation

In der ersten Transplantation (Transplantation #1) wurde der grösste Teil der Inseln in das Omentum transplantiert. Als weiteren Transplantationsort (Transplantation #2) testeten wir die freie Bauchhöhle und den Raum zwischen Leber und Zwerchfell. Vor der Transplantation wurde das diabetische Empfängerschwein in Isoflurannarkose intubiert. Nach Lagerung auf den Rücken, Rasur und Desinfektion des Abdomens erfolgte eine etwa 7 cm lange mediane Laparotomie. Durch diesen Zugang wurden die Langerhans-Inseln über einen Katheter in die Bauchhöhle eingebracht. Beim Einbringen wurde besondere Sorgfalt auf die gleichmässige Verteilung der Inseln gelegt und darauf geachtet, dass durch den Katheter keine iatrogenen Verletzungen erfolgten. Nach Transplantation der Inseln erfolgte der schichtweise Verschluss der Bauchhöhle. Post-operativ wurden die Transplantatempfänger pulsoxymetrisch bis zum vollständigen Ausschleichen der Narkose überwacht. In den ersten 24 Stunden wurden regelmässige Blutzuckerkontrollen durchgeführt, um einer eventuell auftretenden Hypoglykämie mittels Glukosegaben entgegenwirken zu können.

Tab. 1: Zusammenstellung der Isolierungen von Langerhans-Inseln aus dem porzinen Pankreas mit dem Ziel der allogenen Transplantation.

	Spender-schweine	Mikro-verkapselung	Trans-plantat IEQ	Empfängerschwein, Diabetesinduktion	Transplantationsort
TX #1	DL „Mariensee“ N=4	Alginat doppelt	858.860	STZ-GMS	Omentum Freie Bauchhöhle
TX #2	DL „Reichert“ N=3 GMS N=1	Alginat einfach	425.713	STZ-GMS	Freie Bauchhöhle
TX #3	DL „Mariensee“ N=4 „Reichert“ N=1	n. t.	n. t.	PE-GMS	n. t.

Abkürzungen: IEQ: Inseläquivalent(e); TX: Transplantation; DL: Deutsche Landrasse; STZ: Streptozotocin; GMS: Göttinger Miniaturschwein; PE: Pankreatektomie; n: Anzahl der Versuche; n.t.: nicht getestet.

3.3. Messungen

3.3.1. Insulin-ELISA

Dieser kommerziell erhältliche ELISA Kit (Biosource; Nivelles, Belgien) ist gegen humanes und porzines Insulin gerichtet. Die gebrauchsfertigen Proben wurden bei zwei Wellenlängen (450 nm und 490 nm) gegen einen Referenzfilter (650 nm) mit Hilfe eines ELISA-Readers (Thermo Max Microplate Reader, MWG Biotech; Ebersberg) gemessen. Mittels Computer-Software wurde eine lineare Standardkurve aus den im Kit enthaltenen Standards erstellt, die Insulin-Konzentration der Proben mittels dieser errechnet und in $\mu\text{U/mL}$ angegeben.

3.3.2. C-Peptid-RIA

Es wurde der RIA-Kit (PCP-22K) verwendet (Linco Research; Missouri, USA), bei dem die C-Peptid-haltigen Proben mit Hilfe von Radioaktivität bestimmt werden. Die resultierende Radioaktivität wurde mit einem Gamma-Counter der (Berthold; Bad Wildbad) in *counts per minute* (cpm) gemessen. Mittels einer Standardkurve wurde das C-Peptid in ng/mL berechnet.

3.4. Histologie

3.4.1. Herstellung von Gefrierschnitten

Das Gewebestück für die Anfertigung histologischer Präparate wurde von Fett, Bindegewebe, Gefässen und Lymphknoten befreit und in Blöckchen von 0,5 cm Kantenlänge zerteilt. Die Pankreasblöcke wurden mit Einfriermedium (Tissue Tek, Sakura Finetek; Zeeterwoude, NL) in Einfrierröhrchen (Brand GmbH; Wertheim) überführt, für 2 Minuten inkubiert und anschliessend in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C. Mit Hilfe eines Kryostaten (Leica Microsystems; Wetzlar) wurden bei -20 °C 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt.

3.4.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) ist geeignet, um die Morphologie eines Gewebes und ihre pathologischen Veränderungen zu beurteilen. H&E-Färbungen wurden stets parallel zu den histochemischen Färbungen erstellt. Nach Acetonfixierung der Gefrierschnitte bei 4 °C (J. T. Backer; Deventer, NL) für 5 Minuten, erfolgte für 7-10 Minuten die Kernfärbung mit 1 % wässriger Hämalaun-Lösung nach Mayer (Merck; Darmstadt). Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gebläut und anschliessend mit Aqua destillata (A. dest.) mehrfach gespült. Die Cytoplasma-Kontrast-Färbung gegen den gefärbten Kern erfolgte für 1-3 Minuten mit 0,5 % wässriger Eosin-Lösung (Merck). Mit dem Zusatz von einem Tropfen Eisessig auf 100 mL Farblösung konnte durch Abbruch des alkalischen Bläuens die Kontrastbildung erleichtert werden, so dass Cytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot gefärbt wurden. Anschliessend wurde ausreichend mit A. dest. gespült. Nach beendeter Färbung wurden die Schnitte über die absolute Alkoholreihe (4x je 1 Minute) und anschliessend mit Xylol (Merck) entwässert. Die Einbettung erfolgte konventionell mit dem Schnelleinbettmedium Pertex (Medite GmbH; Burgdorf). Mit der H&E-Färbung wurden die Pankreata zunächst voruntersucht, um sicherzustellen, dass nur hochwertiges Gefriermaterial in der dann folgenden Immunhistochemie verwendet wurde.

3.4.3. Insulin-Färbung

Zum Nachweis Insulin-positiver Zellen wurde an Gefrierschnitten eine Färbung auf intrazelluläres Insulin durchgeführt. Die Schnitte wurden zunächst für 15 Minuten luftgetrocknet. Anschliessend wurde die endogene Peroxidase mit einem Gemisch aus H₂O₂ und Methanol (3 mL 30 % H₂O₂ in 200 mL Methanol) blockiert. Es folgten drei Waschschritte á 5

Minuten mit PBS-Puffer (pH 7,3), danach die 10-minütige Blockierung unspezifischer Reaktionen durch den Protein Block (BioGenex; San Ramon, USA) bei Raumtemperatur. Sodann erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Meerschweinchen-anti-Schwein-Antiserum, Dako; Hamburg, Verdünnung 1:75 mit Dako-Antikörper-Verdünnungsmedium) gegen Insulin bei 4 °C in einer feuchten Kammer über 12 Stunden. Es folgte 3x Waschen mit PBS, dann die Zugabe des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers (polyklonaler Kaninchen-anti-Meerschweinchen Ig/HRP, Dako; 1:100 verdünnt) und erneutes Waschen (3x) mit PBS; dann erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle für ca. 3 Minuten die Inkubation mit dem DAB-Reagenz (HK130-5KE, BioGenex; San Ramon, USA). Anschliessend wurden die Schnitte kurz (ca. 20 Sekunden) mit A. dest. gespült und es erfolgte die Hämalanfärbung, wie oben beschrieben.

3.4.4. Dithizon-Färbung

Zur Unterscheidung der Langerhans-Inseln von den exokrinen Gewebebestandteilen wurde die zinkspezifische Dithizonfärbung verwendet. Dazu werden 10 mg Dithizon (Sigma) in 1 mL Dimethyl-Sulfoxyd (Sigma) gelöst. Dann werden 9 mL HBSS dazu pipettiert und alles durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Pro Schnitt wurden je 100 µL fertige Dithizonlösung pipettiert und die sofort eintretende Färbung des Gefrierschnitts lichtmikroskopisch beurteilt. Die zinkhaltigen Betazellen wurden rot gefärbt, die Azinuszellen blieben ungefärbt.

3.4.5. FDA/PI-Färbung

Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe von Fluoreszeindiacetat (FDA) und Propidiumjodid (PI) durch das Vorhandensein von cytoplasmatischen Esterasen direkt bestimmt. Das Verhältnis von vitalen und avitalen porzinen Langerhans-Inseln kann sichtbar gemacht werden aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens von vitalem und avitalem Gewebe gegenüber dem FDA. FDA passiert die intakte Zellmembran, wird in der vitalen Zelle aktiv angereichert von vorhandenen Esterasen hydrolytisch gespalten und zu einem grünen Farbstoff verstoffwechselt. PI ist ein DNS-Fluorochrom, kann nur avitale Membranen passiv durchdringen, reagiert dort mit den Nukleinsäuren und ergibt einen rot fluoreszierenden Farbstoff. Dazu wurde 1 mg FDA (Sigma) mit 1 mL Aceton frisch angesetzt. Dann wurden 1,5 µL der Aceton/FDA-Lösung zu 1 mL Zellsuspension hinzugegeben und alles für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Kurz vor Aufbringen der Probe auf den Objektträger wurden zu diesem Gemisch ca. 10 µL PI-Farbstoff (Sigma) gegeben. Die Probe wurde sofort anschliessend unter dem Fluoreszenzmikroskop (BX50, Olympus; Hamburg) bei 488 nm

Wellenlänge betrachtet und die Fluoreszenz mit einem 530 ± 20 nm Bandpassfilter sichtbar gemacht. Anhand der Anzahl der rot und grün gefärbten Zellen wurde das Verhältnis von vitalem und avitalem Gewebe geschätzt und so die Vitalität der zu transplantierenden Zellen aus der Quersumme der betrachteten Langerhans-Inseln bestimmt und dokumentiert.

3.5. Statistik

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.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung von zwei Diabetes-Modellen

In der ersten experimentellen Phase wurden zwei unterschiedliche Diabetes-Modelle im Grosstier *Schwein*, hier im Göttinger Miniaturschwein, etabliert. Kontrolltiere waren normoglykämische GMS, deren Glukosephysiologie als Referenz für die diabetischen Tiere diente.

4.1.1. Glukosephysiologie gesunder Göttinger Miniaturschweine

4.1.1.1. Intravenöser Glukosetoleranztest

Der intravenöse Glukosetoleranztest wurde bei drei gesunden erwachsenen, weiblichen GMS durchgeführt. **Abbildung 7** zeigt, dass alle drei untersuchten GMS eine gute Glukosetoleranz zeigen und 60 Minuten nach dem Glukosebolus Blutzuckerwerte unter 126 mg/dL besitzen. Sofort nach der Glukosegabe steigen die C-Peptidwerte signifikant an und erreichen ca. 10 Minuten nach der Gabe ein Plateau. Der rechte Teil der Abbildung dokumentiert, dass die C-Peptidausschüttung durch eine kontinuierliche Glukosegabe (Hyperglykämischer *Clamp*) nochmals gesteigert werden kann und über einen langen Zeitraum auf einem kontinuierlich hohen Niveau verharrt. Die Gabe des Argininbolus zum Zeitpunkt $t=90_{\text{min}}$ induziert eine maximale Insulin- und damit auch C-Peptidausschüttung.

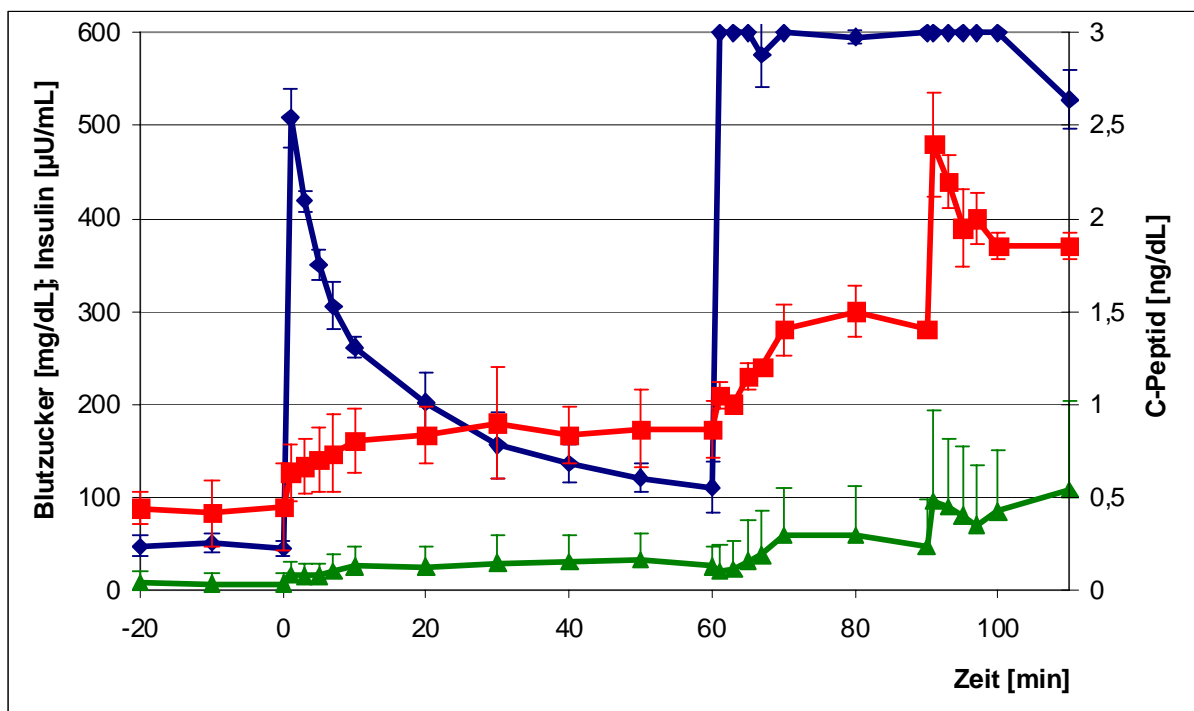


Abb. 7: Intravenöser Glukosetoleranztest (0-60. Minute) normoglykämischer GMS mit anschließendem Hyperglykämischem *Clamp* (61.-110. Minute) und Argininbolus (90. Minute); n=3.

4.1.1.2. *Real Time Glucose Monitoring*

Je nachdem, wie lange das *Continuous Glucose Monitoring System* (CGMS) vom Schwein toleriert wurde (s. Material und Methoden), wurden Messungen der interstitiellen Glukosekonzentration zwischen 48 und 120 Stunden durchgeführt. Innerhalb von 24 Stunden wurden zusätzlich 3-4 konventionelle Blutzuckermessungen vorgenommen und im System gespeichert. Die interstitiellen Glukosewerte des CGMS wurden mit den konventionellen Werten verglichen. Nur Messungen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,95 wurden verwendet.

Zunächst wurden mehrere Implantationsorte für die subkutane Elektrode getestet, da hierzu mit dem GMS keine Erfahrungen vorlagen: auf der Flanke, im Nacken und hinter dem Ohr. Es zeigte sich, dass die Elektrode hinter dem Ohr am längsten verweilte. Hier ist die Haut des GMS dünner; zudem kann das Tier sich die Elektrode nur schwer abstreifen. Das Messgerät wurde mit dem mitgelieferten Bauchgurt am GMS befestigt (s. Material und Methoden). Zudem wurde über dem Bauchgurt ein Baumwollstoff befestigt, um das Gerät vor Beschädigungen zu schützen und ein Abstreifen zu verhindern.

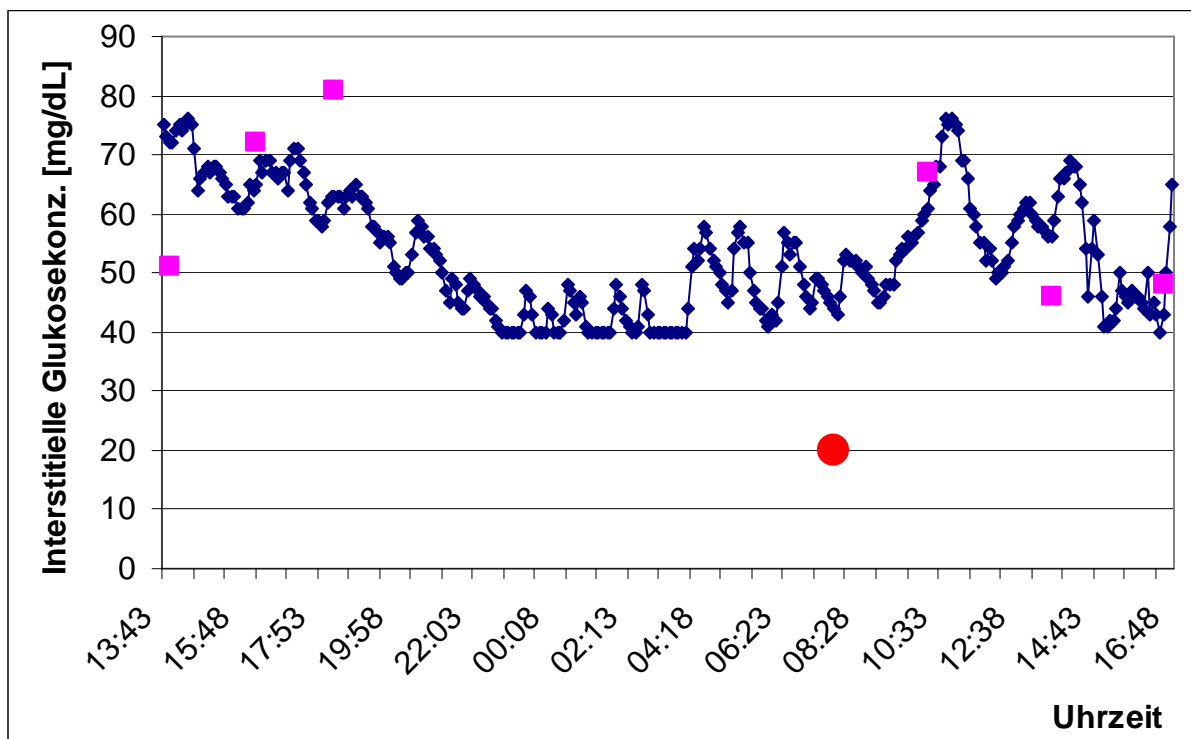


Abb. 8: *Real Time Glucose Monitoring* in einem normoglykämischen GMS über 27 Stunden. Lila Vierecke: konventionelle Blutzuckermessungen; roter Kreis: Fütterung mit Trockenfutter.

Bei allen drei normoglykämischen GMS wurde das RTGM durchgeführt. **Abbildung 8** zeigt exemplarisch, dass GMS einen deutlich niedrigeren Blutzuckerspiegel besitzen als Menschen. Nüchtern beträgt er ca. 50 mg/dl. Nach der Futteraufnahme steigt er deutlich an, überschreitet aber nicht den oberen Grenzwert von 126 mg/dl und sinkt dann innerhalb kurzer Zeit wieder ab. Bei allen drei normoglykämischen GMS wurden mit dem CGMS verlässliche Daten erzielt. Die Abbildung zeigt die exemplarische Messung über 27 Stunden in einem der drei Tiere.

4.1.1.3. Spontane Blutzuckerwerte

Parallel zum RTGM wurden Blutzuckerwerte spontan konventionell gemessen. Diese lagen nie über 126 mg/dL. Bei 20 Messungen an unterschiedlichen Tagen ergaben sich für die drei Tiere Blutzuckerwerte von durchschnittlich $61,15 \pm 13,8$ mg/dL.

4.1.1.4. Körpergewicht

Das Körpergewicht der nicht-diabetischen Tiere blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum zwischen 35 und 55 kg konstant (s. unten).

4.1.1.5. Pankreashistologie

Nach dem Ende der Blutzuckermessungen wurde das Pankreas der drei GMS auf die Anzahl ihrer Insulin-produzierenden Langerhans-Inseln immunhistochemisch untersucht. In allen drei Pankreatae wurden gut ausgebildete Langerhans-Inseln mit starker Farbreaktion auf Insulin gefunden. Allerdings variierte die Anzahl der Langerhans-Inseln von Schwein zu Schwein sehr stark. **Abbildung 9** zeigt exemplarisch Insulin-positive Langerhans-Inseln in einem der drei normoglykämischen GMS.

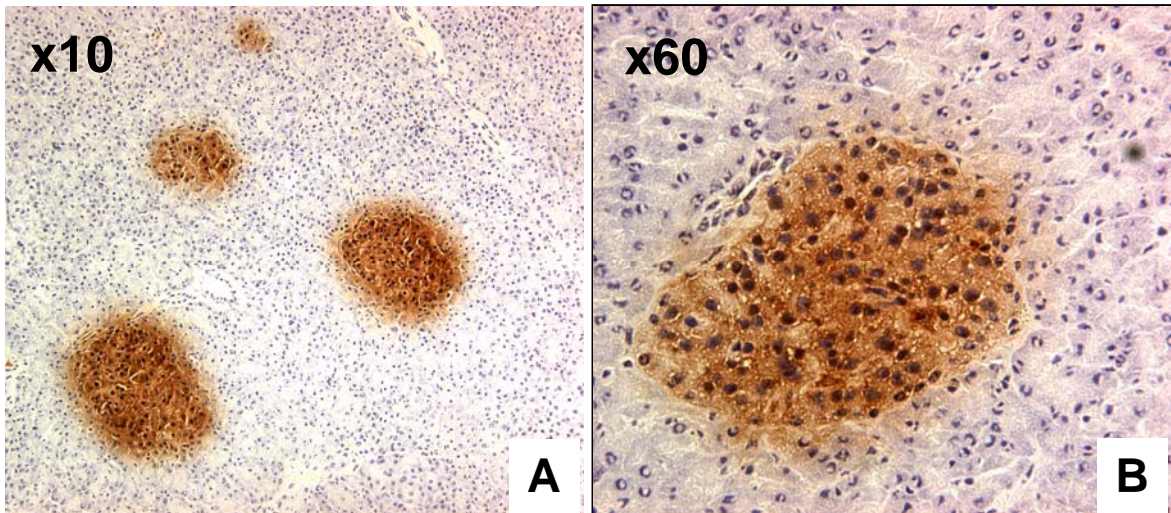


Abb. 9: Immunhistochemie des Pankreas eines normoglykämischen GMS (A) in 10- und (B) in 60-facher Vergrößerung. Färbung mit dem anti-Insulin-Antikörper (s. Material und Methoden). Das Pankreas zeigt gut ausgebildete, Insulin-positive, grosse und kleine Langerhans-Inseln.

4.1.2. Glukosephysiologie diabetischer Göttinger Miniatur Schweine

Diabetisch waren alle GMS, die, dem humanen Diabetes vergleichbar, einen Blutzuckerwert (nüchtern) über 126 mg/dL oder einen spontanen Blutzuckerwert von >200 mg/dL zeigten. Im IVGTT waren alle GMS diabetisch, wenn sie Blutzuckerwerte von >200 mg/dL zum Zeitpunkt $t=60_{\text{min}}$ nach Glukosebolus sowie C-Peptidwerte (nüchtern) <0,4 ng/mL aufwiesen.

4.1.2.1. Streptozotozin-Diabetes

Diabetes-Induktion und Nachsorge

Alle 5 GMS wurden nach Applikation von STZ diabetisch; **Abbildung 10** zeigt das Ergebnis für 3/5 Tieren: Ein GMS war für 5 Tage diabetisch, bevor es mit exogenen Insulin-Gaben therapiert wurden, zwei GMS wurden bereits nach 24 Stunden mit Insulin substituiert. In allen 5 GMS induzierte die STZ-Injektion innerhalb von 24 Stunden den gewünschten diabetischen Effekt. Die GMS konnten ohne medizinische Komplikationen über einen längeren Zeitraum gehalten werden. Das Messen des Blutzuckers und die Applikation des Insulins gelangen immer dann gut, wenn die Tiere mit Futter abgelenkt wurden und sich somit relativ ruhig verhielten.

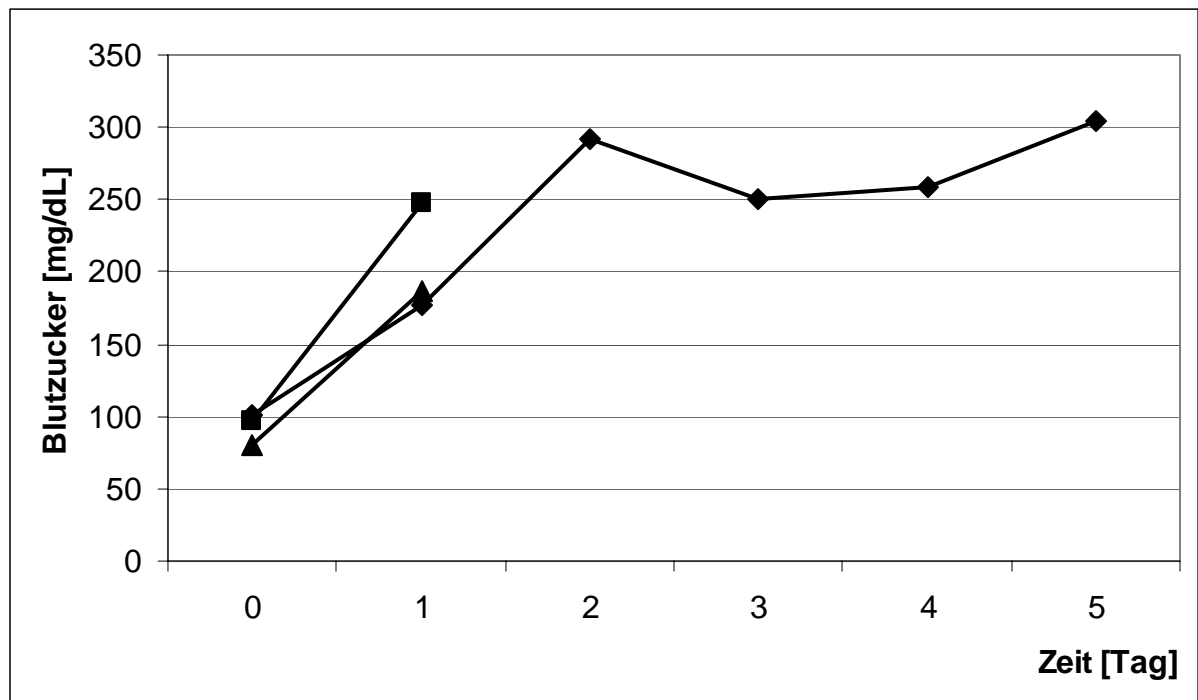


Abb. 10: Blutzuckerwerte in drei GMS nach Injektion des Betazellgiftes Streptozotozin. Alle drei GMS werden innerhalb von 24 Stunden irreversibel diabetisch. Dies gilt auch für die zwei nicht vollständig dokumentierten Tiere, die im Gegensatz zum dritten GMS bereits nach 24 Stunden mit Insulin therapiert wurden.

Intravenöser Glukosetoleranztest

Abbildung 11 zeigt den IVGTT in drei STZ-diabetischen GMS: Alle drei Tiere zeigen das erwartete typische Blutzuckerprofil mit nur langsam sinkenden Blutzuckerwerten von 600 mg/dL ($t=0$) auf 300 mg/dL ($t=60_{\text{min}}$) nach dem Glukosebolus zum Zeitpunkt $t=0$. Die Arginingabe zum Zeitpunkt $t=60_{\text{min}}$ vermag den Blutzucker nicht weiter zu senken; die C-Peptidwerte – zwischen 0,2 und 0,3 ng/mL –, steigen kurzfristigen auf 0,4 ng/mL an.

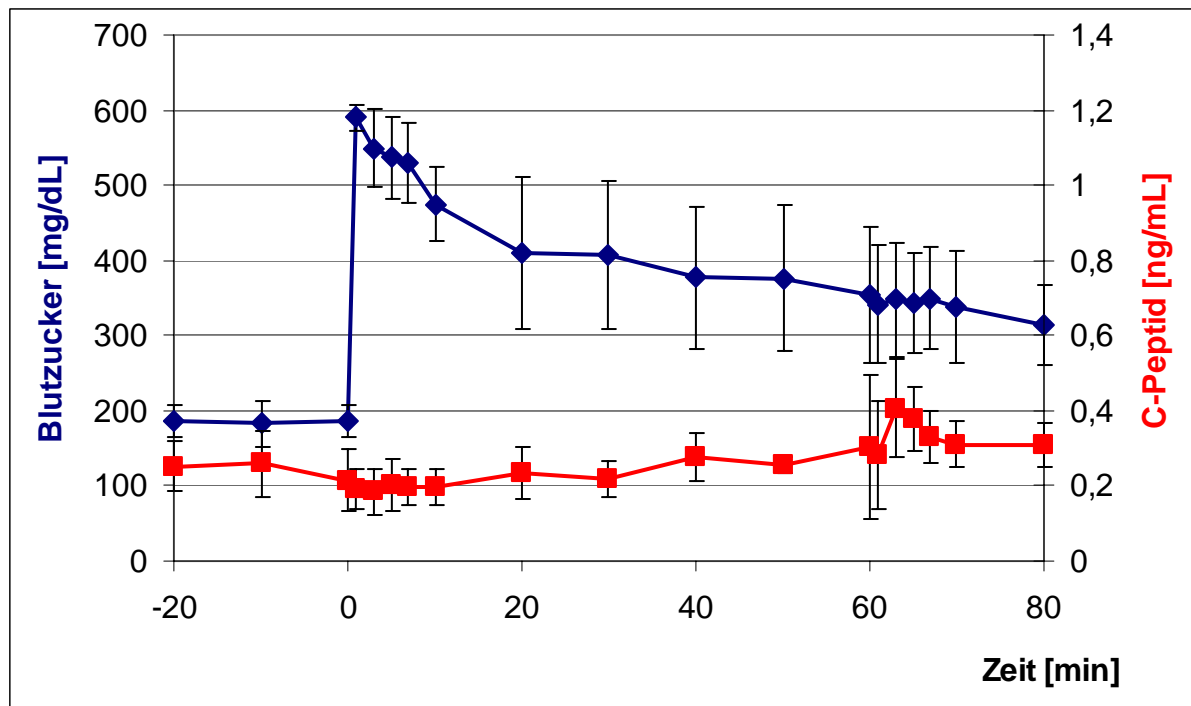


Abb. 11: Intravenöser Glukosetoleranztest 25 Tage nach Diabetes-Induktion mittels Streptozotocin in GMS (n=3); Glukosebolus zum Zeitpunkt t=0, Argininbolus zum Zeitpunkt t=60_{min}.

4.1.2.2. Diabetes nach Pankreatektomie

Diabetes-Induktion und Nachsorge

Bei n=5 GMS wurde der Diabetes mittels Pankreatektomie induziert. Alle 5 Tiere waren unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff diabetisch und zeigten Blutzuckerwerte >400 mg/dL. Bei den ersten drei Tieren erfolgte postoperativ lediglich die Behandlung der hohen Blutzuckerwerte mit Insulin. Sie wurden innerhalb von 4-6 Tagen aus dem Versuch genommen: wegen eines paralytischen Ileus (n=2) und eines mechanischen Ileus (n=1). Wegen dieser negativen Erfahrungen entwickelten wir für die GMS #4 und #5 eine intensivierte Nachsorge: Diese GMS erhielten die ersten 14 Tage post-operativ täglich 1 L Sterofundin *per infusionem*, 2 g Novalgin und 20 mg Paspertin. Zusätzlich zu den täglich mehrmaligen Untersuchungen (Allgemeinzustand, Vitalität, Blutzuckerspiegel, Darmgeräusche) wurden weitere Massnahmen durchgeführt: die Gaben von Insulin oder G-40, K⁺, Neostigmin, Tramal, Antibiotika und „Krankengymnastik“. Der Festnahrung wurden Pankreasenzyme beigemischt. Während dieser intensiven Nachsorge wurden alle o. g. Massnahmen problemlos über den Hickman-Katheter durchgeführt. Die Pankreasenzyme wurden in einen Apfel hineingedrückt und als kombiniertes Apfel/Enzym-Präparat verabreicht. Wie bereits oben beschrieben, konnten auch diese GMS bei allen anstehenden Mes-

sungen mit Futter abgelenkt und ruhig gehalten werden. Unter dieser intensiven Nachsorge nahmen die GMS am 4. bzw. 7. post-operativen Tag erstmals eigenständig feste Nahrung auf und setzten am 6. bzw. 8. post-operativen Tag erstmals Kot ab. Innerhalb von 20 Tagen nach der Operation zeigten die GMS einen guten Allgemeinzustand und bewegten sich frei und ohne Komplikationen. In der dann folgenden Zeit erhielten sie täglich exogenes Insulin und exogene Pankreasenzyme. Mit diesem Protokoll (genaue Darstellung: siehe Anhang) wurden beide GMS für 28 Tage gehalten – bei sehr gutem Allgemeinzustand und ohne Komplikation.

Für die täglichen Kontrollen, die Fütterung, das Messen der Blutzuckerwerte und die Insulin-Applikationen wurden 2x täglich 30-45 Minuten benötigt, für die intensive Nachsorge nach Pankreatektomie darüber hinaus noch einmal 60-120 Minuten.

Intravenöser Glukosetoleranztest

Auch bei den beiden pankreatektomierten GMS #4 und #5 wurde 25 bzw. 27 Tage post-operativ ein IVGTT durchgeführt. **Abbildung 12** dokumentiert das Ergebnis: Anstieg von 400 mg/dL (das ist der Ausgangswert) auf 600 mg/dL unmittelbar nach Gabe des Glukosebolus zum Zeitpunkt $t=0$, und anschliessend Abfall der Blutzuckerwerte auf 450 mg/dL bis zum Zeitpunkt $t=60_{\text{min}}$. Die C-Peptidwerte liegen im Schnitt bei 0,1 ng/mL und steigen zu keinem Zeitpunkt über 0,2 ng/mL. Die Reaktion auf den Glukose- und Argininbolus ist erwartungsgemäss negativ.

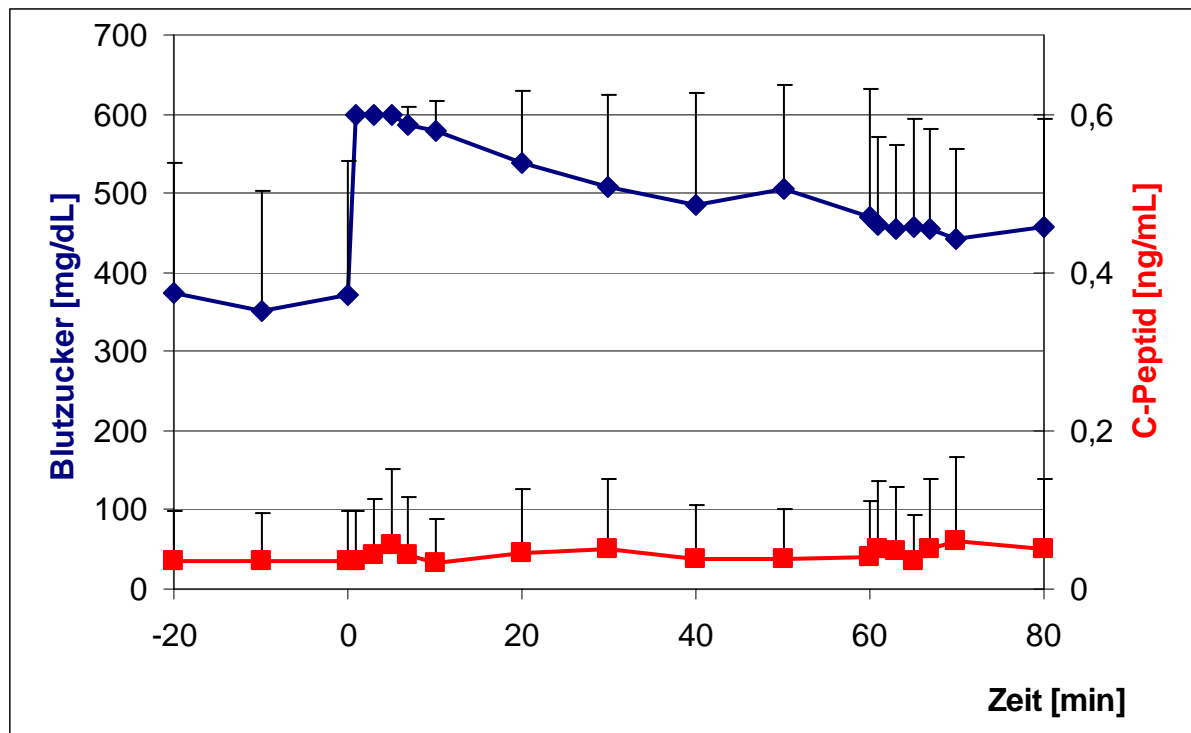


Abb. 12: Intravenöser Glukosetoleranztest 25 Tage nach Diabetes-Induktion mittels Pankreatektomie in GMS (n=3); Glukosebolus zum Zeitpunkt t=0, Argininbolus zum Zeitpunkt t=60_{min}.

Real Time Glucose Monitoring

STZ-Diabetische Schweine ohne Insulin-Therapie

Das RTGM in diabetischen GMS erfolgte zu ganz unterschiedlichen Zeitpunkten nach Diabetes-Induktion. Bei jenen GMS, die keine Insulin-Therapie erhielten, verschlechterte sich der Allgemeinzustand so schnell, dass nur an einem einzigen Tier eine kontinuierliche Messung vorgenommen werden konnte, und zwar am ersten Tag nach STZ-Applikation. Alle übrigen GMS wurden mit Insulin behandelt und standen für die Ausgangsmessung nicht mehr zur Verfügung. **Abbildung 13.** zeigt, dass die interstitielle Glukosekonzentration bereits einen Tag nach dem Insel-schädigenden Eingriff ansteigt und sich auf einem hohen Niveau um 300 mg/dL einpendelt. Die ca. 230 mg/dL Ausgangswert sind bereits eine Folge des seit 24 Stunden wirkenden Betazellgiftes. Es ist gut zu erkennen, dass die konventionell erhobenen Blutzuckerwerte (lila Vierecke) gut mit den interstitiellen Glukosekonzentrationen korrelieren. Ebenso ist nach jeder Fütterung (rote Kreise) ein Anstieg der interstitiellen Werte erkennbar, was, wie erwartet, für die gestörte Glukosetoleranz dieses Tieres spricht.

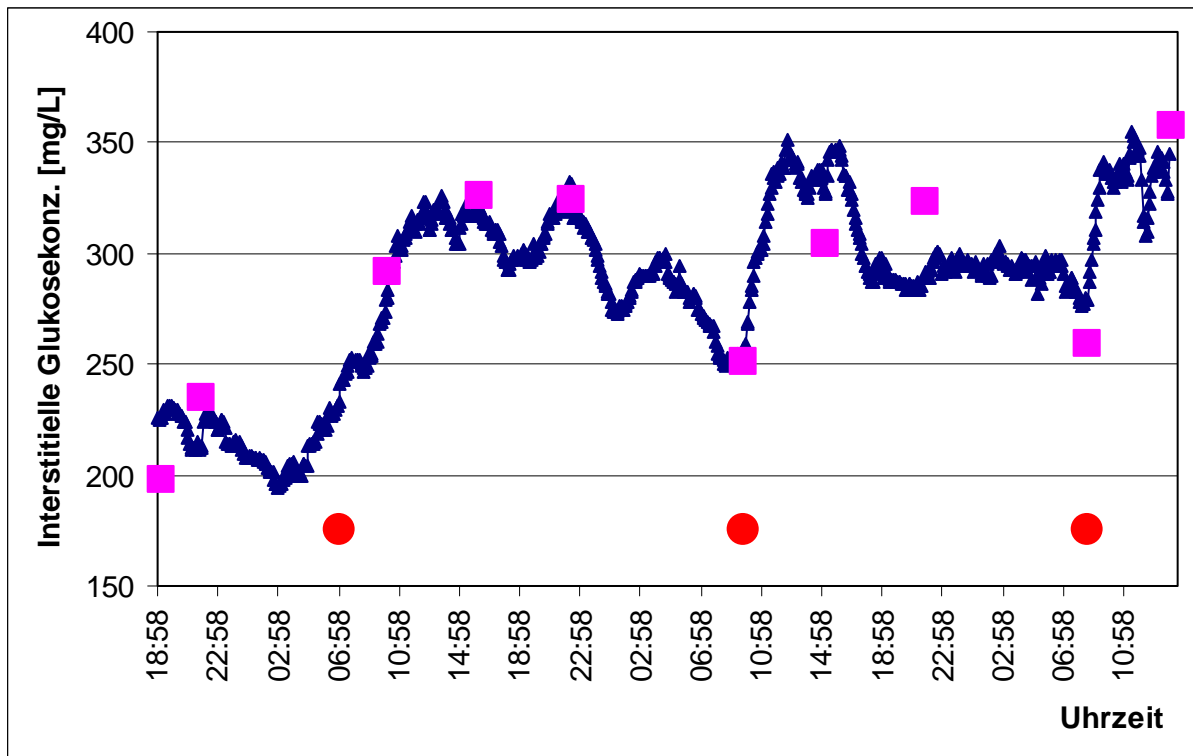


Abb. 13: *Real Time Glucose Monitoring* (RTGM) über 67 Stunden bei einem STZ-diabetischen GMS, das nicht mit Insulin therapiert wurde. Der Messbeginn erfolgte ca. 24 Stunden nach STZ-Applikation. Blaue Dreiecke: interstitielle Glukosekonzentration; lila Vierecke: konventionell gemessene Blutzuckerwerte; rote Kreise: Fütterung mit Trockenfutter.

STZ-Diabetische Schweine mit Insulin-Therapie

Bei jenen STZ-diabetischen GMS, die mit Insulin behandelt wurden, waren grosse Schwankungen im RTGM über die gesamte Messzeit von 94 Stunden erkennbar. Die Schwankungen bewegten sich zwischen 40 und 400 mg/dL. **Abbildung 14** dokumentiert diese kontinuierliche Messung über 94 Stunden eines STZ-diabetischen GMS unter Insulintherapie. Gut erkennbar ist, wie das GMS jeweils mit einem starken Anstieg der Glukosekonzentration auf die Fütterung (rote Kreise) reagiert sowie mit einem mehr oder minder starken Abfall der Glukosekonzentration auf die Applikation von Insulin. Deutlich erkennbar ist auch das unterschiedlich Wirkungsprofil beider Insuline (dunkelgrüne Dreiecke = Alt-Insulin, schnelles Wirkungsprofil; orange Dreiecke = Lantus-Insulin, verzögertes Wirkungsprofil). Besondere Probleme bestanden (a) in der nicht vorhandenen *Compliance* der GMS sowie (b) den wiederholt auftretenden deutlichen Blutzucker-Senkungen.

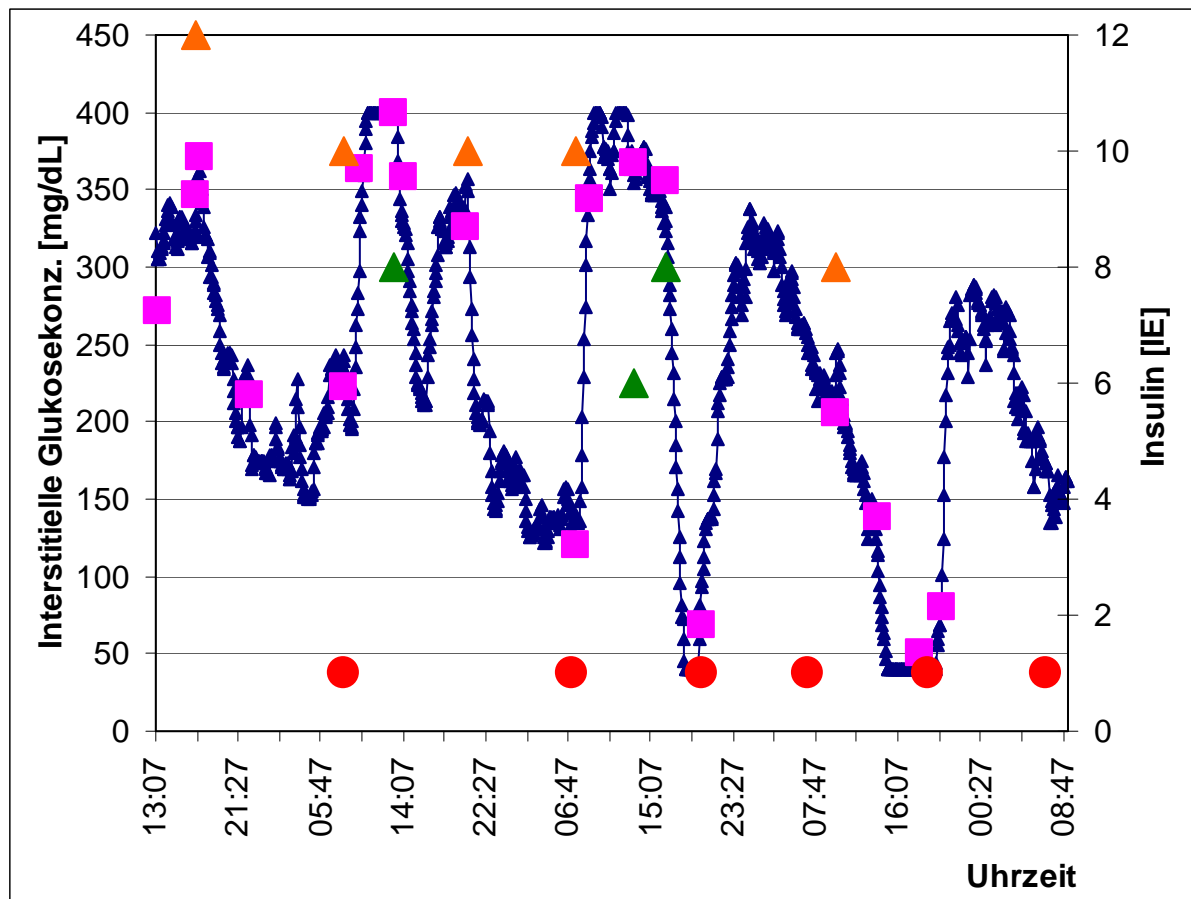


Abb. 14: *Real Time Glucose Monitoring* über 94 Stunden bei einem STZ-diabetischen GMS, das mit Lantus-Insulin (orange Dreiecke) und Alt-Insulin (dunkelgrüne Dreiecke) therapiert wurde. Lila Vierecke: konventionell gemessene Blutzuckerwerte. Rote Kreise: Fütterung mit Trockenfutter.

STZ-Diabetische Schweine mit optimierter Insulin-Therapie

Ausgehend von den Erfahrungen, die wir hinsichtlich Fütterung und Insulin-Therapie mit den STZ-diabetischen GMS gemacht hatten, wurde die Insulin-Therapie wie folgt verändert: Jetzt erfolgte nur eine Fütterung pro Tag sowie eine zweimalig Applikation des Insulins pro Tag nach folgendem Schema: Morgens zur Fütterung wurde das Kombinations-Insulin Novomix® verabreicht, bestehend aus einem kurzfristig und einem langfristig wirkenden Insulin, und abends das langfristig wirkende Lantus-Insulin. Dieses veränderte Applikationsschema resultierte in Glukosekonzentrationen unter 200 mg/dL. **Abbildung 15** zeigt das Ergebnis dieser optimierten Therapie an einem STZ-diabetischen GMS mit dem RTGM.

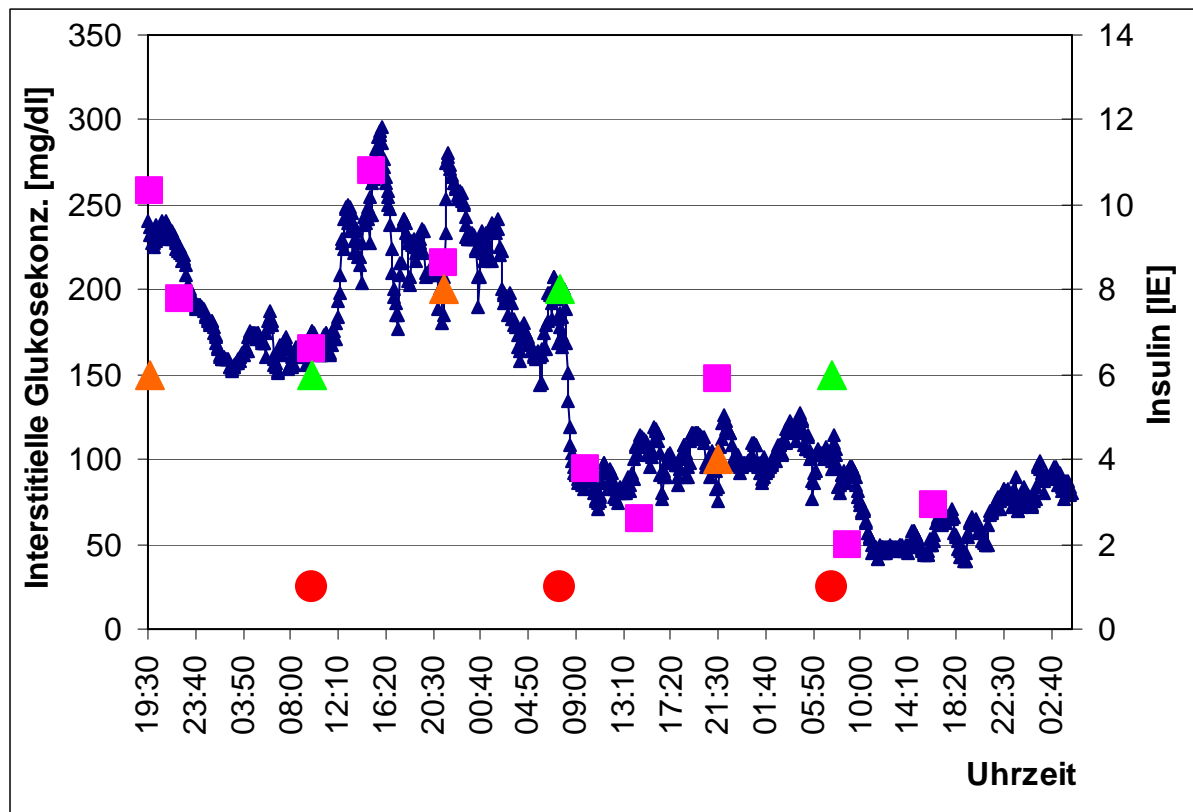


Abb. 15: *Real Time Glucose Monitoring* über 81 Stunden bei einem STZ-diabetischen GMS unter optimierter Insulin-Therapie: Gabe von Lantus-Insulin (orange Dreiecke), Novomix®-Insulin (hell grüne Dreiecke). Lila Vierecke: konventionell gemessene Blutglukosewerte. Rote Kreise: Fütterung mit Trockenfutter.

Pankreatektomierte Schweine mit Insulin-Therapie

GMS #4

Abbildung 16 dokumentiert das RTGM eines pankreatektomierten GMS unter Insulin-Therapie. Dieses Tier wurde, abhängig vom aktuellen Blutzuckerwert, nur mit dem langfristig wirkenden Lantus-Insulin behandelt. Zudem wurde das Tier wegen länger anhaltender Hypoglykämien mehrmals pro Tag gefüttert. In der Graphik enden die Messungen aus gerätetechnischen Gründen bei 40 mg/dL, die tatsächlichen Werte dürften phasenweise deutlich darunter gelegen haben. Gut erkennbar sind die starken Schwankungen der interstitiellen Glukosekonzentration nach einer Intervention, sei es die Reaktion auf 12 IE Lantus-Insulin (starker Abfall der Glukosekonzentration), sei es die Reaktion auf die Fütterung (starker Anstieg der Glukosekonzentration).

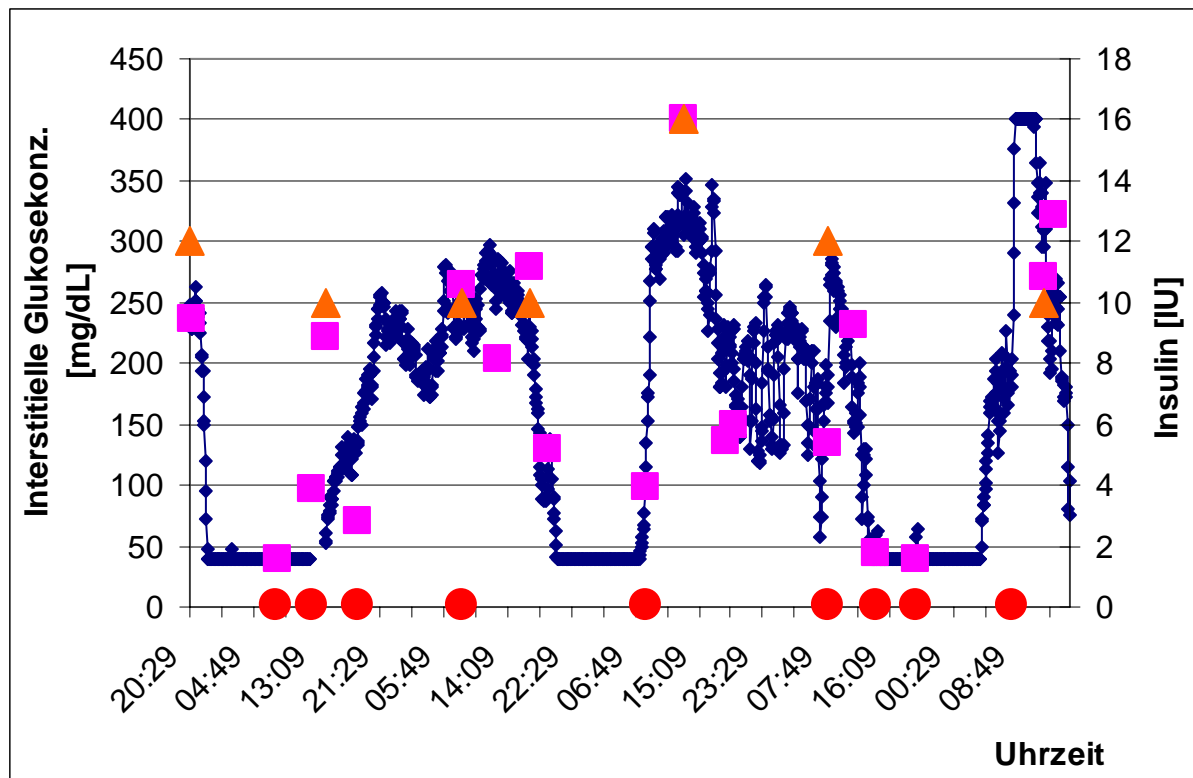


Abb. 16: *Real Time Glucose Monitoring* über 115 Stunden bei dem pankreatektomierten GMS #4 unter Insulin-Therapie. Orange Dreiecke: Lantus-Insulin. Lila Vierecke: konventionell gemessene Blutglukosewerte. Rote Kreise: Fütterung mit Trockenfutter.

GMS #5

Abbildung 17 zeigt das zweite pankreatektomierte Schwein, GMS #5; bei diesem Tier wurde eine weniger intensivierete Insulin-Therapie angewandt. Das Tier erhielt jeweils zur Fütterung (einmal täglich morgens) 14 IE Novomix®-Insulin. Damit wurden grössere Schwankungen und länger andauernde Hypoglykämien weitgehend vermieden. Die interstitielle Glukosekonzentration blieb bei diesem Schema auf mittelhohen Werten weitgehend konstant. Der starke Glukoseabfall nach Gabe der Insulindosis zum Zeitpunkt der morgendlichen Fütterung, dürfte auf eine verzögerte Nahrungsaufnahme zurückzuführen sein.

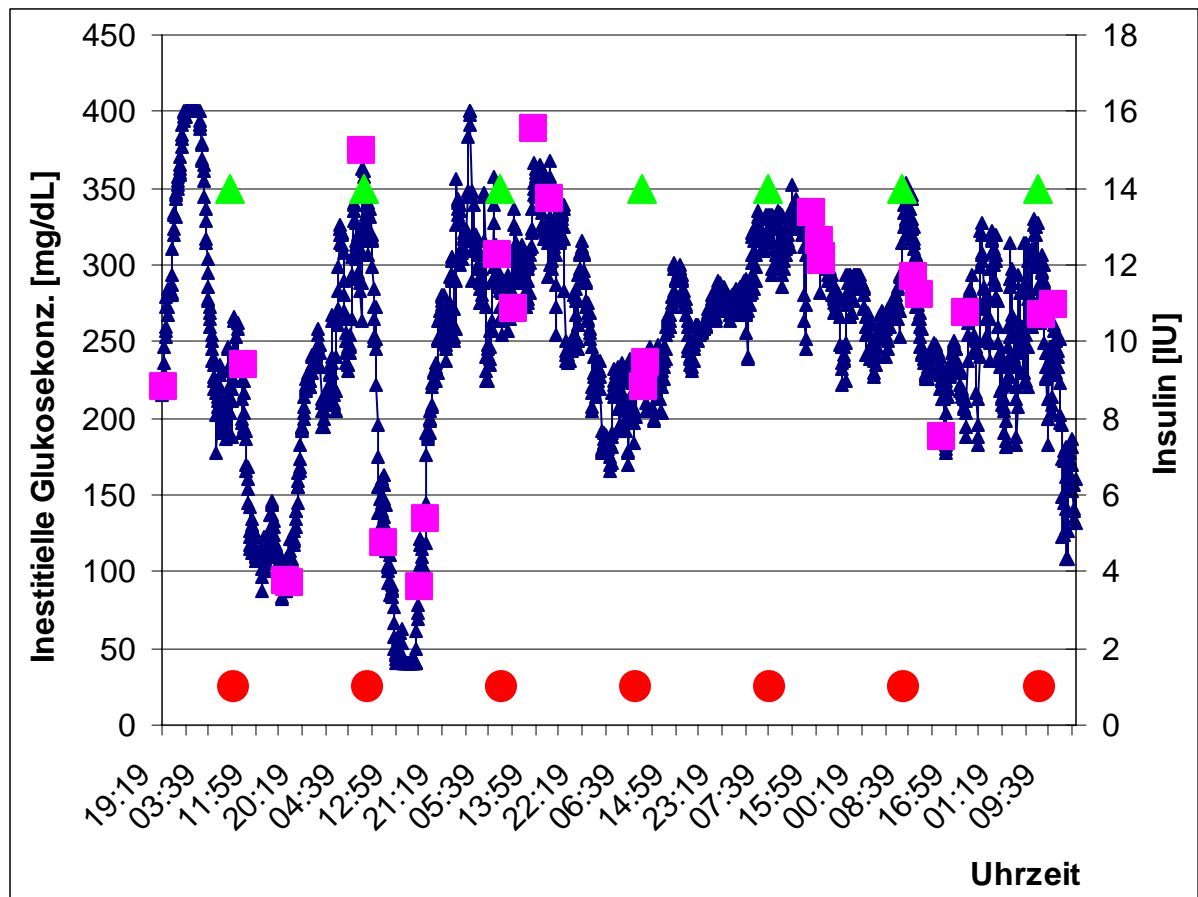


Abb. 17: *Real Time Glucose Monitoring* über 94 Stunden bei dem pankreatektomierten GMS #5 unter Insulin-Therapie. Hellgrüne Dreiecke: Novomix®-Insulin; lila Vierecke: konventionell gemessene Blutglukosewerte. Rote Kreise: Fütterung mit Trockenfutter.

Körpergewicht diabetischer Göttinger Miniaturschweine

Vergleichende Messungen des Körpergewichts erfolgten lediglich über einen Zeitraum von 24 Tagen (**Abbildung 18**). Regelmässige Messungen des Körpergewichts, wie in der Abbildung dokumentiert, konnten aus logistischen Gründen nicht über die gesamte Beobachtungszeit und nicht für alle Tiere durchgehalten werden; daher erfolgten nach den 24 Tagen vergleichender Messungen lediglich sporadische Messungen, die hier nicht dokumentiert werden. Während die nicht-diabetischen, normoglykämischen Schweine im Verlauf von 24 Tagen ihr Ausgangsgewicht konstant hielten, verloren die diabetischen Schweine – erwartungsgemäss – kontinuierlich an Körpergewicht. Das in der Abbildung aufgeführte STZ-diabetische GMS verlor 6,95 % seines Ausgangsgewichtes innerhalb von 24 Tagen, das pankreatektomierte Tier verlor erheblich mehr, nämlich 13,38 %. Die Abbildung dokumentiert diesen Befund für alle drei experimentellen Gruppen und für 24 Tage (normoglykämische GMS (n=3); STZ-diabetisches GMS (n=1); pankreatektomiertes GMS (n=1)).

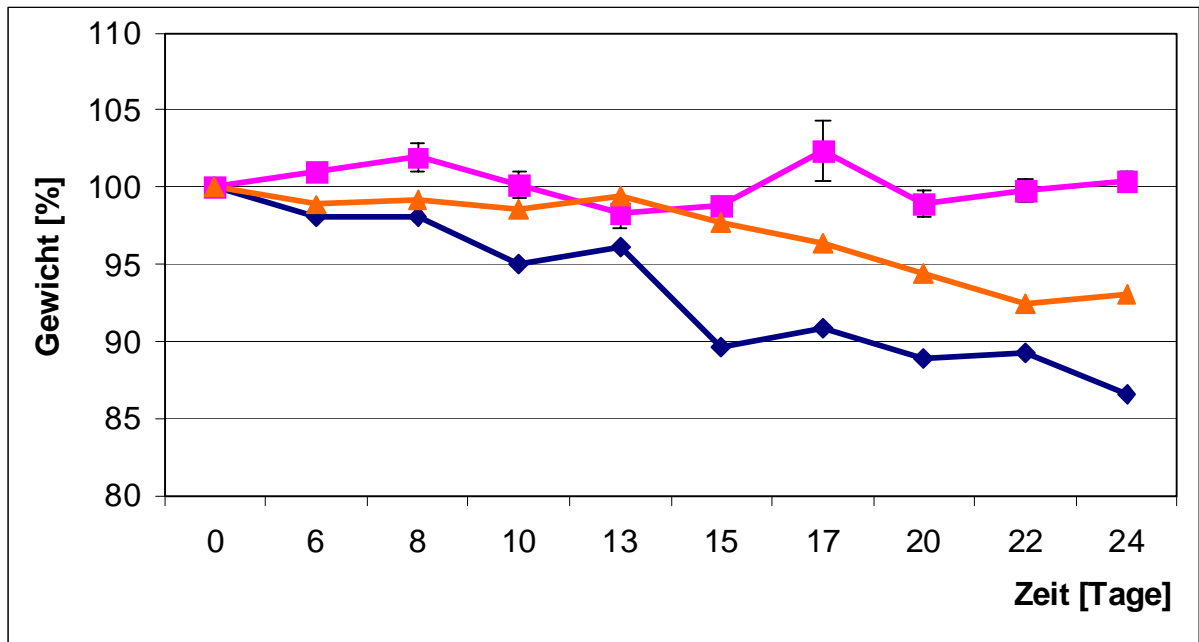


Abb. 18: Gewichtverlauf normoglykämischer (lila Kurve), STZ-diabetischer (orange Kurve) und pankreatektomierter (dunkelblaue Kurve) GMS über 24 Tage.

Blutzuckerwerte diabetischer Göttinger Miniaturschweine

Da das RTGM lediglich über kurze Zeiträume – hier maximal 1 Woche – erfolgreich anwendbar ist, die experimentelle Phase aber bis zu 28 Tagen andauerte, mussten bei allen diabetischen Tieren die Blutzuckerwerte – zur Festlegung der Insulin-Therapie – sporadisch bestimmt werden. Sporadische Messungen erfolgten mindestens alle 48 Stunden, häufig sogar alle 12 Stunden. Je nach Intensität der Insulin-Therapie lag der morgendliche (00:00-14:00 Uhr) Nüchternblutzuckerwert im Mittel bei 228 ± 77 mg/dL (STZ-diabetische GMS) und 234 ± 105 mg/dL (pankreatektomierte GMS); die abendlichen Werte (14:00-00:00) lagen bei 271 ± 101 mg/dL (STZ-diabetisch) und 192 ± 98 mg/dL (pankreatektomiert). **Abbildung 19** dokumentiert dieses Ergebnis.

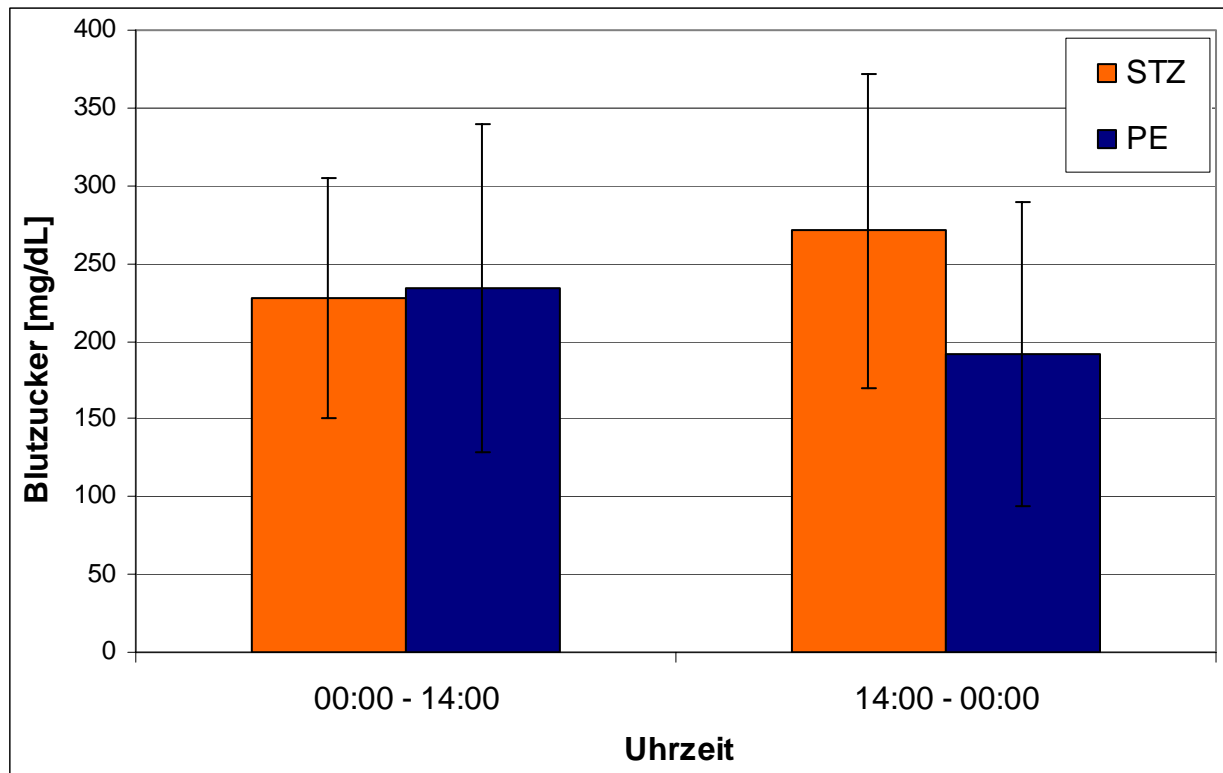


Abb. 19: Spontan gemessene morgendliche und abendliche Blutzuckerwerte in STZ-diabetischen GMS (rote Säulen) und pankreatektomierten GMS (blaue Säulen). Morgendliche Messungen: n=134 (STZ) und n=81 (pankreatektomiert); abendliche Messungen: n=95 (STZ) und n=51 (pankreatektomiert); STZ morgens vs. abends: $p < 0,005$; pankreatektomiert morgens vs. abends: nicht signifikant.

Pankreas-Histologie in STZ-diabetischen Göttinger Miniaturschweinen

Am Ende der Versuche wurden die Pankreatae der STZ-diabetischen Göttinger Miniaturschweine entnommen, zu Gefrierschnitten verarbeitet und immunhistochemisch mit einer anti-Insulin-Färbung analysiert. Die STZ-diabetischen Pankreatae enthalten keine intakten Langerhans-Inseln mehr – vergleichbar den Pankreatae der normoglykämischen Kontrolltiere (s. **Abbildung 9**); die anti-Insulin-Färbung ist negativ. In grösserer Vergrößerung sind sehr selten lediglich Reste von Langerhans-Inseln erkennbar, die aber keine intakten Betazellen enthalten. Dies gilt für alle 5 STZ-behandelten Schweine. Die **Abbildung 20** zeigt beispielhaft das Ergebnis für ein Tier.

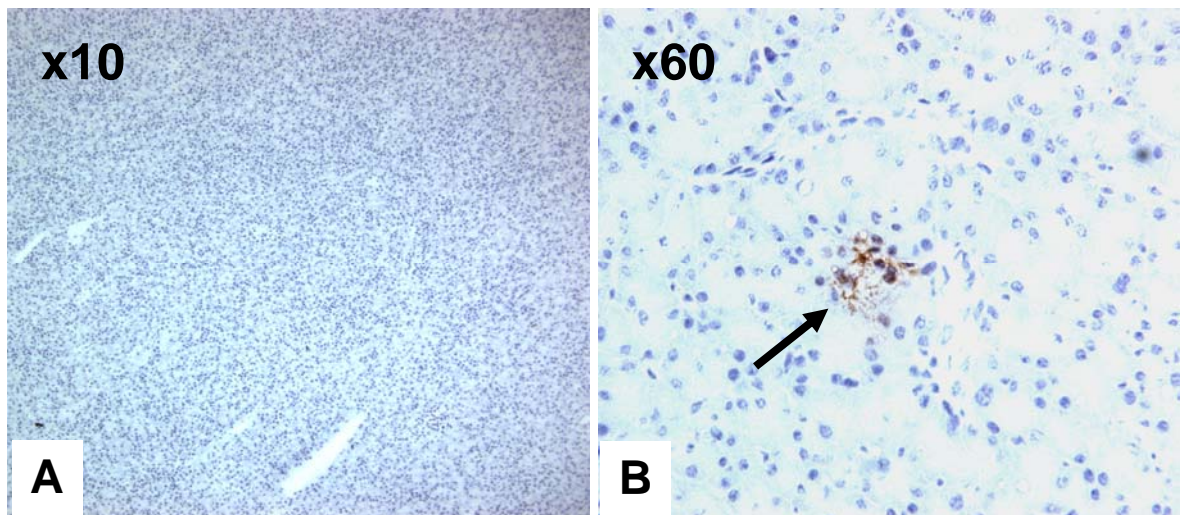


Abb. 20: Immunhistochemische Färbung eines Pankreas aus einem STZ-behandelten GMS nach Beendigung des Versuchs. Anti-Insulin-Färbung. (A) Die STZ-Behandlung hat nahezu alle Langerhans-Inseln irreversibel zerstört. (B) Es sind selten Reste von Insulin-positiven Betazellen, aber keine intakten Langerhans-Inseln, erkennbar.

4.2. Isolierung von Langerhans-Inseln nach Pankreatektomie aus Schweinen der deutschen Landrasse

Wie aus **Abbildung 21** ersichtlich ist, wurde in den vergangenen 7 Jahren die Vitalität der aus hirntoten Schweinen der Deutschen Landrasse enzymatisch isolierten porzinen Langerhans-Inseln im eigenen Labor kontinuierlich gesteigert. Allerdings sind Ergebnisse mit ca. 20 % avitalen Langerhans-Inseln auch 2007 – im Hinblick auf deren spätere Transplantation – nicht zufriedenstellend. Ursache für die mangelnde Vitalität ist vermutlich die durch den Experimentator nicht beeinflussbare warme Ischämiezeit von ca. 20-30 Minuten bei der Gewinnung der Spenderorgane aus hirntoten Schweinen während des Schlachtprozesses. Unsere Hypothese ist, dass die Vitalität durch Verkürzen der warmen Ischämiezeit signifikant verbessert werden kann. Die mittels Pankreatektomie gewonnenen Spenderorgane sollten nach Möglichkeit keine warme Ischämie und zusätzlich eine stark verkürzte kalte Ischämie (bisher 120-180 Minuten) haben.

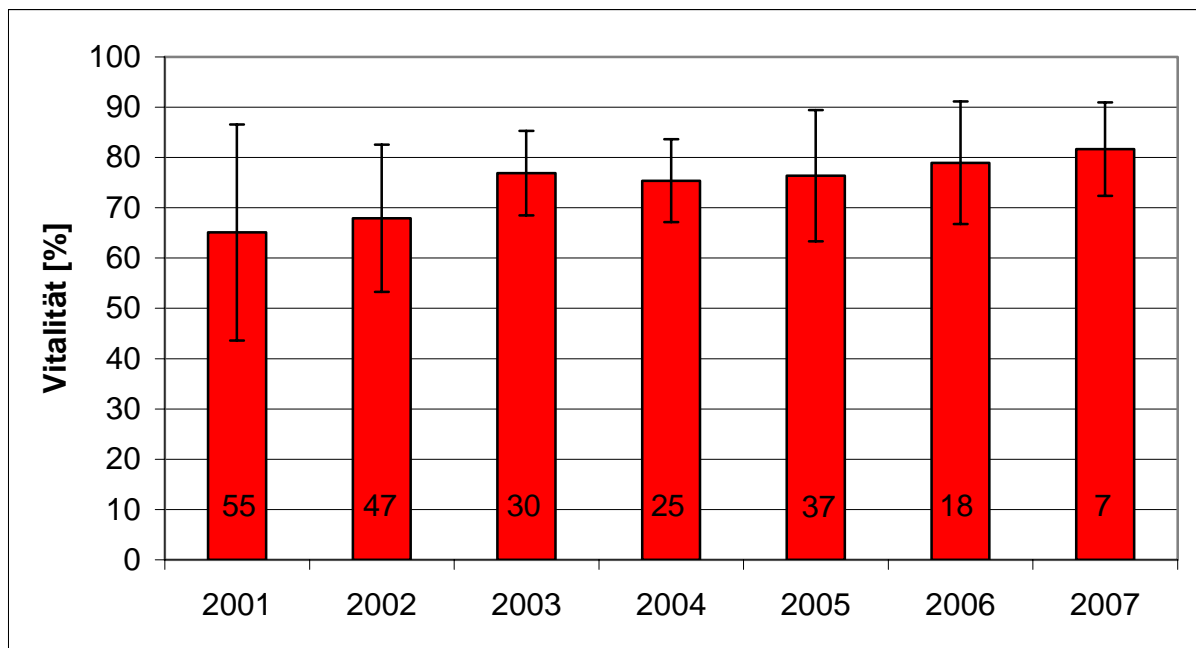


Abb. 21: Prozentualer Anteil vitaler Langerhans-Inseln an der Gesamtausbeute nach enzymatischen Isolierung aus dem Pankreas hirntoter Schweine der Deutschen Landrasse (DL) (Vitalfärbung mit FDA/PI). Alle Isolierungen erfolgten in der Experimentellen Transplantations-Immunologie in den Jahren 2001-2007. Der Autor hat sich von 2006 bis 2007 an den Isolierungen aktiv beteiligt. Die Vitalität kann wegen der 20-30-minütigen warmen Ischämiezeit der Pankreata und der damit verbundenen partiellen Autolyse 100 % nicht erreichen. Die Zahlen in den Säulen geben die Gesamtzahl der Isolierungen/Jahr an.

Insgesamt wurden für die hiesige Arbeit 26 porcine DL-Pankreatae – ohne warme Ischämiezeit – durch operative Explantation mit retrograder Perfusion der Organe (s. Material und Methoden) gewonnen. Die kalte Ischämiezeit betrug hier 30-45 Minuten, da der Grosstier-OP und das Isolierungslabor nur wenige hundert Meter voneinander entfernt lagen. Aus allen 26 Organen wurden anschliessend intakte Langerhans-Inseln enzymatisch isoliert. Mittels dieser aufwändigeren Form der Pankreasgewinnung wurden die Parameter *Ausbeute*, *Reinheit* und *Vitalität* vergleichend untersucht (**Abbildung 22**).

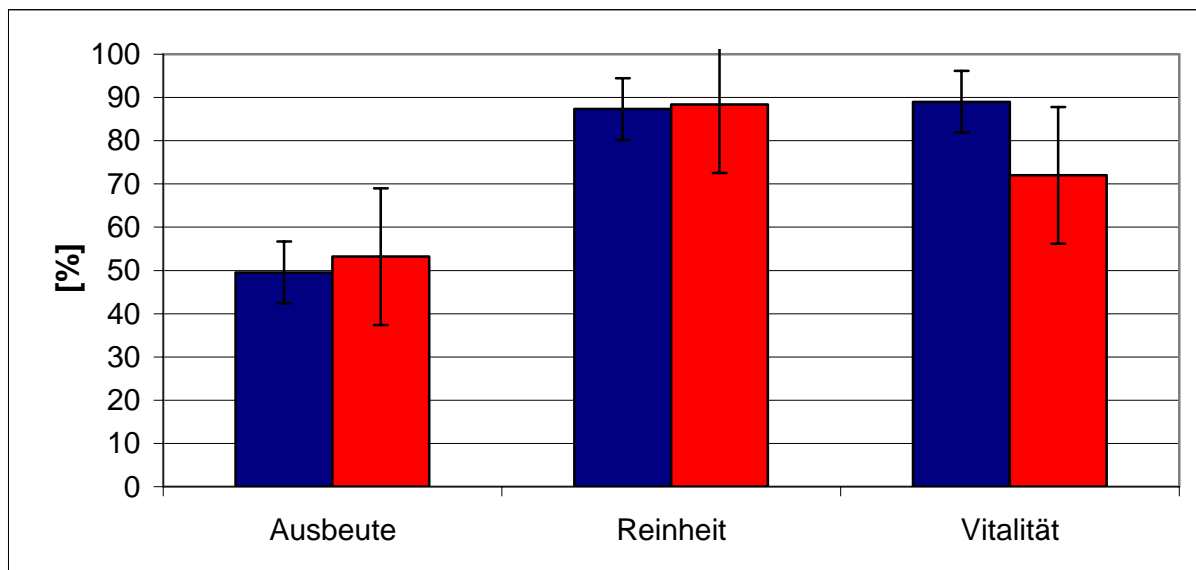


Abb. 22: Vergleichende Darstellung der Parameter *Ausbeute*, *Reinheit* und *Vitalität* von enzymatisch isolierten intakten Langerhans-Inseln aus DL-Pankreatae nach Pankreatektomie (blaue Säulen, n=26, keine warme Ischämiezeit, kalte Ischämiezeit 30-45 Minuten) und aus den Pankreatae hirntoter DL-Schlachtschweine (rote Säulen; n=219, Mittelwert der Jahre 2001-2007 in **Abbildung 21**, warme Ischämiezeit 20-30 Minuten, kalte Ischämiezeit 120-180 Minuten). Ausbeute und Reinheit nicht signifikant verschieden; Vitalität in beiden Gruppen signifikant verschieden ($p < 0,0005$).

Während sich Ausbeute und Reinheit in beiden Gruppen nicht voneinander unterscheiden, ist die Vitalität der Langerhans-Inseln in der Pankreatektomiegruppe mit fast 90 % im Mittel signifikant höher ($p < 0,0005$) als in der Gruppe der Schlachthofpankreatae. In Einzelfällen betrug sie sogar 99 % (mikroskopische Auswertung durch zwei Personen unabhängig voneinander).

Eine weitere Beobachtung in der Pankreatektomiegruppe war, dass der pH-Wert der enzymatischen Isolierungslösung in der gesamten Phase der ca. 20-minütigen Rezirkulation stabil über 7,3 blieb. In etwa jeder zweiten Isolierung mit Schlachthofpankreatae beobachten wir einen schnellen Abfall des pH-Wertes auf Werte unter 7,1 (nicht dokumentiert). Dieser korreliert mit dem Verlust der Vitalität der isolierten Langerhans-Inseln, welcher bis zu 100 % betragen kann.

In ca. 5 % aller Fälle traten bei der Isolierung von Langerhans-Inseln aus Schlachthofpankreatae, unter den dortigen halbsterilen Bedingungen, bakterielle Kontaminationen in der Inselzell-Kultur auf. Diese fallen für alle weiteren zellbiologischen Untersuchungen aus. Bei Pankreatae, die durch Pankreatektomie im Grosstier-OP unter hygienisch ein-

wandfreien Bedingungen gewonnen wurden, zeigten die Langerhans-Inseln keine einzige Kontamination.

Neben der Vitalität der Langerhans-Inseln ist die aus einem einzigen Organ isolierbare Anzahl (Masse) ein wichtiger Faktor für den späteren Transplantationserfolg. Pankreatae, die im Schlachthof *geerntet* wurden, wurden vor der Isolierung histologisch auf Anzahl, Grösse und Integrität der zu isolierenden Langerhans-Inseln untersucht. Es werden nur solche Organe verwendet, die viele grosse Langerhans-Inseln aufweisen. Bei der Pankreatektomie wird jedes Spendertier, sofern es gesund ist und die erwünschte Körpergrösse besitzt, zur Organgewinnung genutzt. Da Pankreasbiopsien am lebenden Tier noch nicht möglich sind, werden hier auch Organe verwendet, die sich möglicherweise nicht oder nur begrenzt zur Gewinnung von Langerhans-Inseln eignen. **Abbildung 23** zeigt die Gesamtzahl der Langerhans-Inseln als auch die Anzahl der isolierten Langerhans-Inseln pro Gramm Organ in den beiden Versuchsgruppen. In beiden Fällen liegt die Anzahl der Langerhans-Inseln, die nach Pankreatektomie im Grosstier-OP isoliert werden signifikant ($p < 0,0005$) unter jener, die aus Schlachthofpankreatae gewonnen werden.

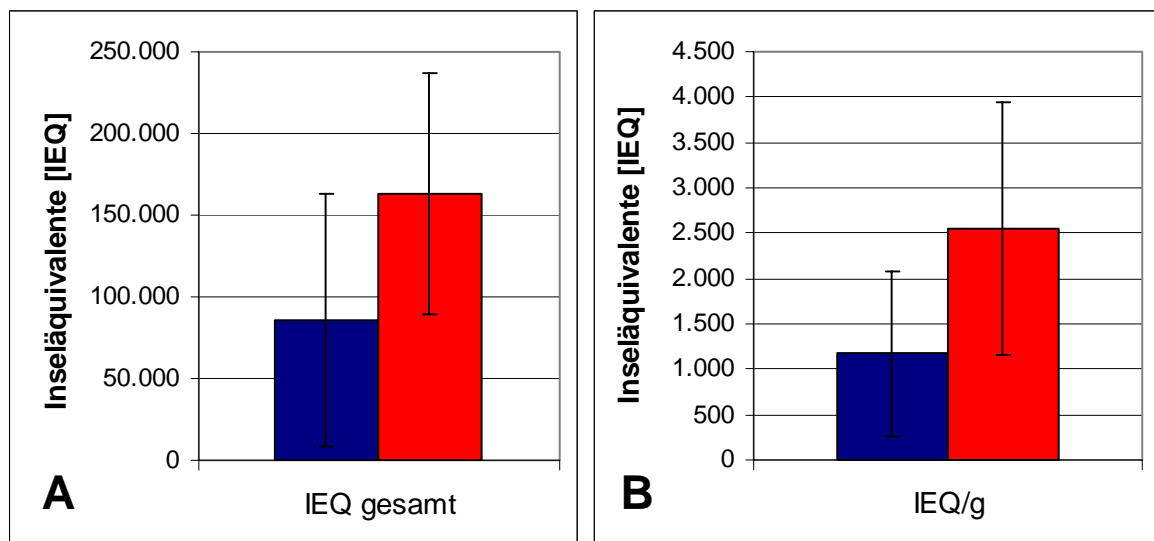


Abb. 23: Anzahl der enzymatisch isolierten Langerhans-Inseln aus Pankreatae von DL-Schweinen; (A) Gesamtzahl der isolierten IEQ (IEQ gesamt) und (B) der IEQ pro Gramm Organ (IEQ/g) für beide Versuchsgruppen. Blaue Säule: Spenderorgane nach Pankreatektomie im Grosstier-OP und ohne warme Ischämiezeit (n=26); rote Säule: Spenderorgane aus dem Schlachthof mit warmer Ischämiezeit (n=219); Signifikanz blau vs. rot in beiden Abbildungen $p < 0,0005$; ein IEQ entspricht einer Langerhans-Inseln mit 150 μm Durchmesser.

4.2.1. Intravenöser Glukosetoleranztest in DL-Spenderschweinen

Aufgrund vielfacher Beobachtungen mit den Schlachthofpankreatae, die darauf hinweisen, dass DL-Schweine gleicher Herkunft, gleichen Alters, Geschlechts und Gewichts Pankreatae sehr unterschiedlicher Qualität (Grösse und Anzahl der Langerhans-Inseln) aufweisen, wurde bei 5 gesunden DL-Spenderschweinen vor Pankreatektomie der intravenöse Glukosetoleranztest durchgeführt. Die **Abbildungen 24-26** zeigen den IVGTT bei 3/5 Spenderschweinen. Bestimmt wurden Blutzucker sowie Insulin und C-Peptid im Serum der DL-Schweine. Alle 3 Tiere zeigen sehr unterschiedliche Verläufe: Das Schwein in **Abbildung 24** zeigt eine sehr gute Glukosetoleranz, gekennzeichnet durch den starken Anstieg des C-Peptids nach dem ersten Glukosebolus, und den schnellen Abfall des Blutzuckers auf Normalwerte bereits nach 40 Minuten. Es folgt der starke Anstieg des C-Peptids während des Hyperglykämischen *Clamp* und erneut nach dem Argininbolus zum Zeitpunkt $t = 90_{\text{min}}$.

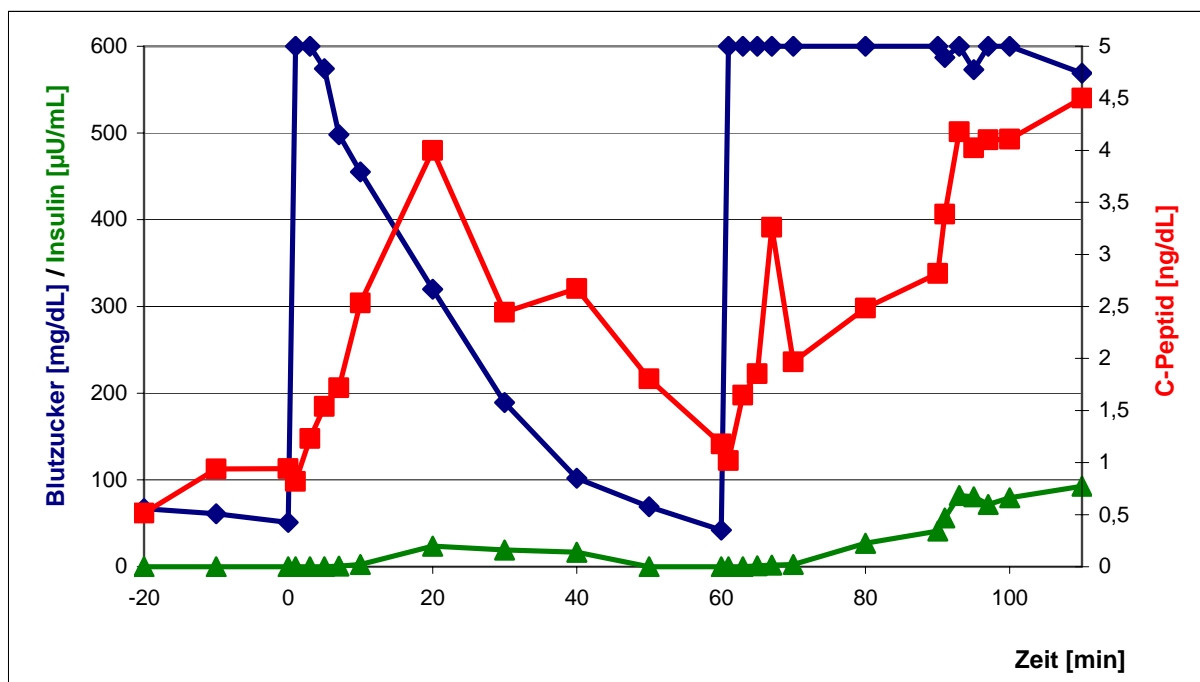


Abb. 24: Intravenöser Glukosetoleranztest (0-60. Minute) mit nachfolgendem Hyperglykämischen *Clamp* (61.-110. Minute) in einem normoglykämischen DL-Spenderschwein.

Das DL-Spenderschwein in **Abbildung 25** dagegen zeigt eine gestörte Glukosetoleranz, dokumentiert durch die Nicht-Erreichen normaler Blutzuckerwerte nach 60 Minuten sowie des Fehlen des schnellen Anstiegs des C-Peptids nach Glukosestimulation. Ein langsamer Anstieg des C-Peptids hingegen ist vorhanden, das am Ende Werte von 6 ng/mL erreicht.

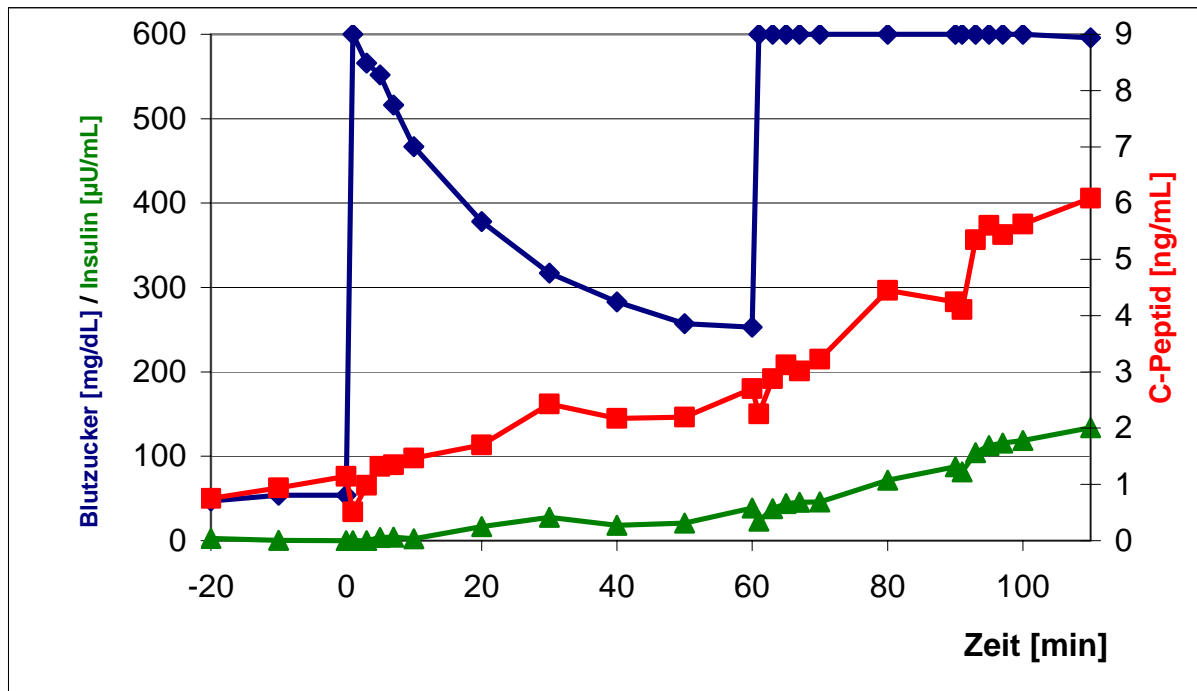


Abb. 25: Intravenöser Glukosetoleranztest (0-60. Minute) mit nachfolgendem Hyperglykämischem Clamp (61.-110. Minute) in einem normoglykämischen DL-Spenderschwein.

Das dritte Spenderschwein in **Abbildung 26** zeigt ebenfalls eine gestörte Glukosetoleranz (Nicht-Erreichen normaler Blutzuckerwerte nach 60 Minuten) sowie einen deutlich verringerten Anstieg des C-Peptids, sowohl nach Glukose- als auch Argininstimulation.

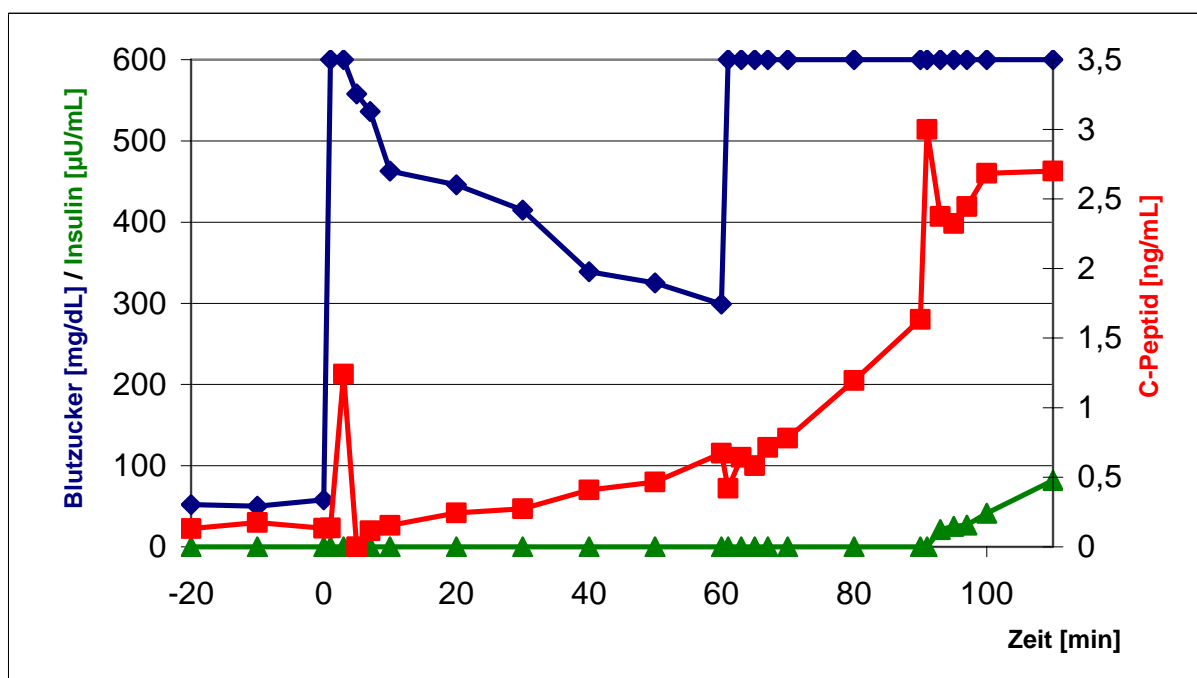


Abb. 26: Intravenöser Glukosetoleranztest (0-60. Minute) mit nachfolgendem Hyperglykämischem Clamp (61.-110. Minute) in einem normoglykämischen DL-Spenderschwein.

4.3. Allogene Transplantationen in diabetischen Göttinger Miniatschweinen

Der letzte Teil der Arbeit bestand darin, Pilotversuche zur Transplantation isolierter, mikroverkapselter Langerhans-Inseln in diabetischen GMS vorzunehmen, um deren Funktion im Grosstier *Schwein* zu evaluieren. Ein weiterer Untersuchungsparameter waren die Analyse und das Zusammenspiels der verschiedenen beteiligten „Bausteine“: der Pankreas-Entnahme im Grosstier-OP, der Isolierung der Langerhans-Inseln im Labor, ihrer Mikroverkapselung bei einer auswärtigen Firma und im eigenen Labor, die eigentliche Transplantation und das Management der Tiere nach der Transplantation. Das bedeutete, die verschiedenen Teams zu organisieren, die zeitlichen Arbeitsabläufe zu koordinieren und die Daten dieses Zusammenspiels anschliessend auszuwerten.

4.3.1. Transplantation #1

4.3.1.1. Pankreatektomie, Isolierung, Mikroverkapselung, Transplantation

Der erste Empfänger war ein STZ-diabetisches, weibliches GMS mit einem Körpergewicht von 32,5 kg. Vor Transplantation wurde bei diesem Tier der IVGTT durchgeführt (s. o.) und das RTGM (nicht dokumentiert), um die diabetische Stoffwechsellage zu bestätigen. Es wurden ca. 30.000 IEQ/kg Körpergewicht für die Transplantation angestrebt, ein Wert der sich aus der experimentellen Inselzell-Transplantation mit nicht-humanen Primaten ableitet (Sun et al. 1996; Cardona et al. 2006). Da aus langjährigen Versuchen bekannt war, dass ein einzelnes Pankreas die geforderte Anzahl Langerhans-Inseln nicht hergeben würde, beschlossen wir, eine Serie von 4 Explantationen mit anschliessender Isolierung an 4 aufeinanderfolgenden Tagen vorzunehmen. **Abbildung 27** zeigt die zeitlichen Abläufe bis zur Transplantation. Spenderschweine waren weibliche DL-Schweine (1-2 Jahre alt; 100-200 kg Körpergewicht). Die Pankreatektomie erfolgte im Grosstier-OP des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) der Universität Würzburg, die Isolierungen in den Laboratorien der Experimentellen Transplantations-Immunologie in der Chirurgischen Klinik I im Zentrum für Operative Medizin. Die 4 Entnahmen und die 4 Isolierungen verliefen insgesamt technisch fehlerlos. Die Langerhans-Inseln wurden unmittelbar nach Isolierung und Reinigung *in vitro* kultiviert (s. Material und Methoden). Die Mikroverkapselung dieser Langerhans-Inseln erfolgte durch die Firma CellMed in Alzenau. Die Inseln wurden zunächst einfach und dann doppelt verkapselt – mit einem medizinisch zugelassenen Alginat (Klöck et al. 1994). Am 9. Tag nach Beginn dieses Versuches wurden 873.000 doppelt mikroverkapselte Langerhans-Inseln (IEQ) (a) frei in die Bauchhöhle und (b) in das Omentum des STZ-diabetischen GMS transplantiert. Die Vitalität der Langerhans-

Inseln betrug vor der Mikroverkapselung über 90 %, nach Mikroverkapselung und vor Transplantation nur noch 40 %. Die Transplantation erfolgte durch einen 7 cm langen medianen Bauchschnitt am narkotisierten GMS. Etwa 50 % der mikroverkapselten Langerhans-Inseln wurden frei in die Bauchhöhle und ca. 50 % in das Omentum transplantiert. Nach der Transplantation traten keine narkose- oder operationsbedingten Komplikationen auf.

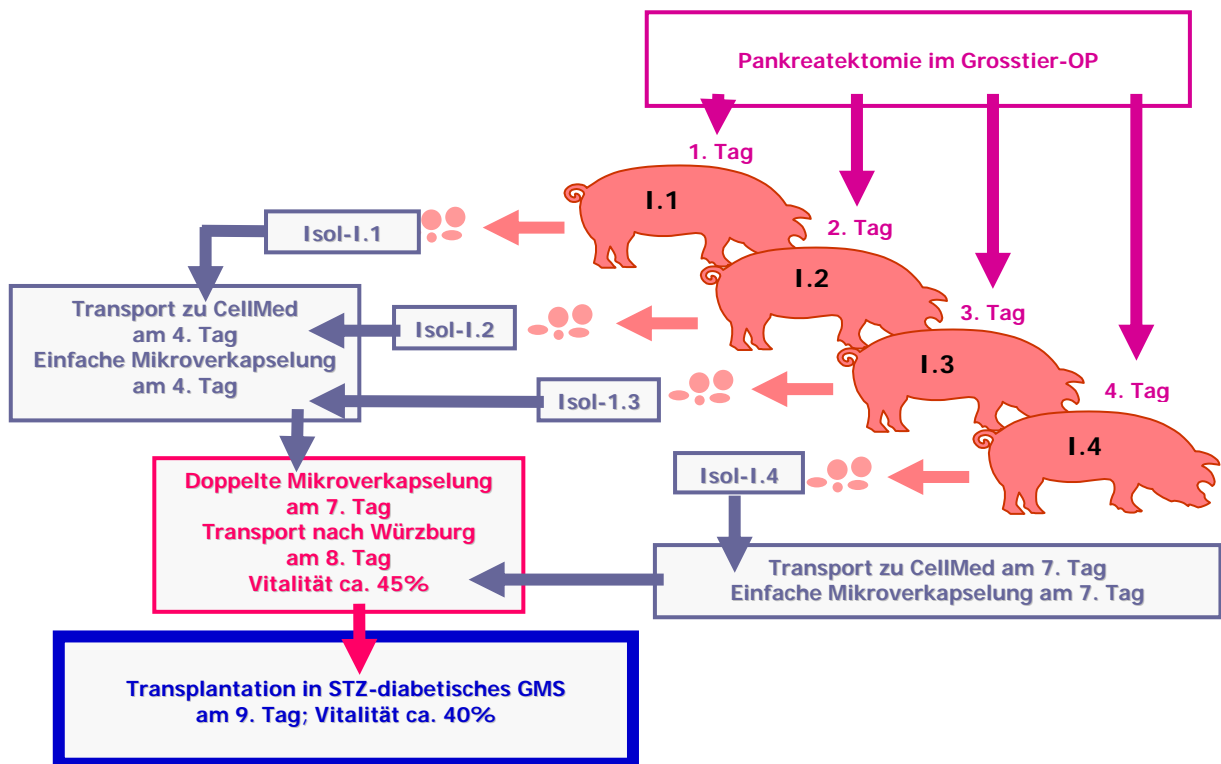


Abb. 27: Transplantation #1. Zeitlicher Ablauf der verschiedenen Arbeitsschritte bis zur Transplantation doppelt mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln in ein STZ-diabetisches GMS (Einzelheiten s. Text).

4.3.1.2. Blutzuckerwerte, *Real Time Glucose Monitoring*, Glukosetoleranztest

Die über die Beobachtungszeit von 45 Tagen gemessenen Blutzuckerwerte unterscheiden sich nicht von jenen, die vor der Transplantation gemessen wurden (nicht dokumentiert). Auch die täglich verabreichte Insulin-Dosis blieb nach Transplantation unverändert. Auch im RTGM war kein Unterschied zu den Werten vor Transplantation festzustellen (nicht dokumentiert). Im Glukosetoleranztest zeigten sich im Verlauf des Blutzuckerprofils keine Unterschiede. Allerdings waren die C-Peptidwerte nach Transplantation höher und stiegen nach Glukose- und Argininstimulation deutlich an (vergl. **Abbildung 28** mit **Abbildung 29**). Der absolute C-Peptidwert lag mit 0,5 ng/mL nach 80 Minuten knapp über dem Grenzwert von 0,4 ng/mL.

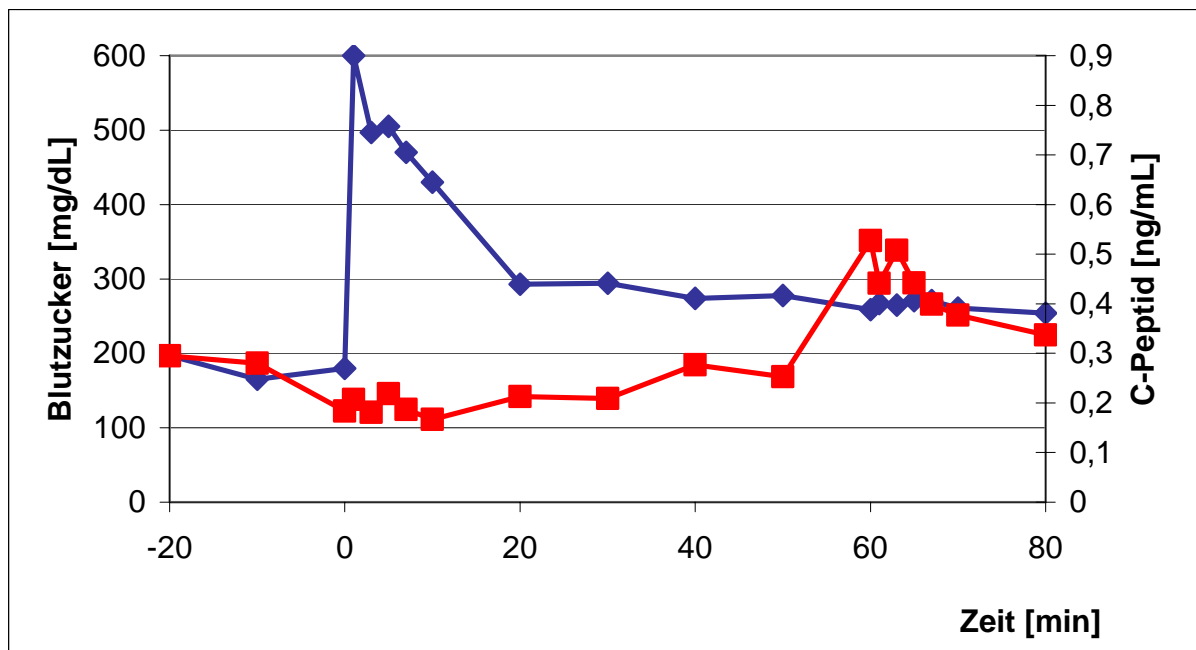


Abb. 28: Intravenöser Glukosetoleranztest des GMS vor Transplantation #1. Dargestellt sind die Blutzucker- und C-Peptidwerte.

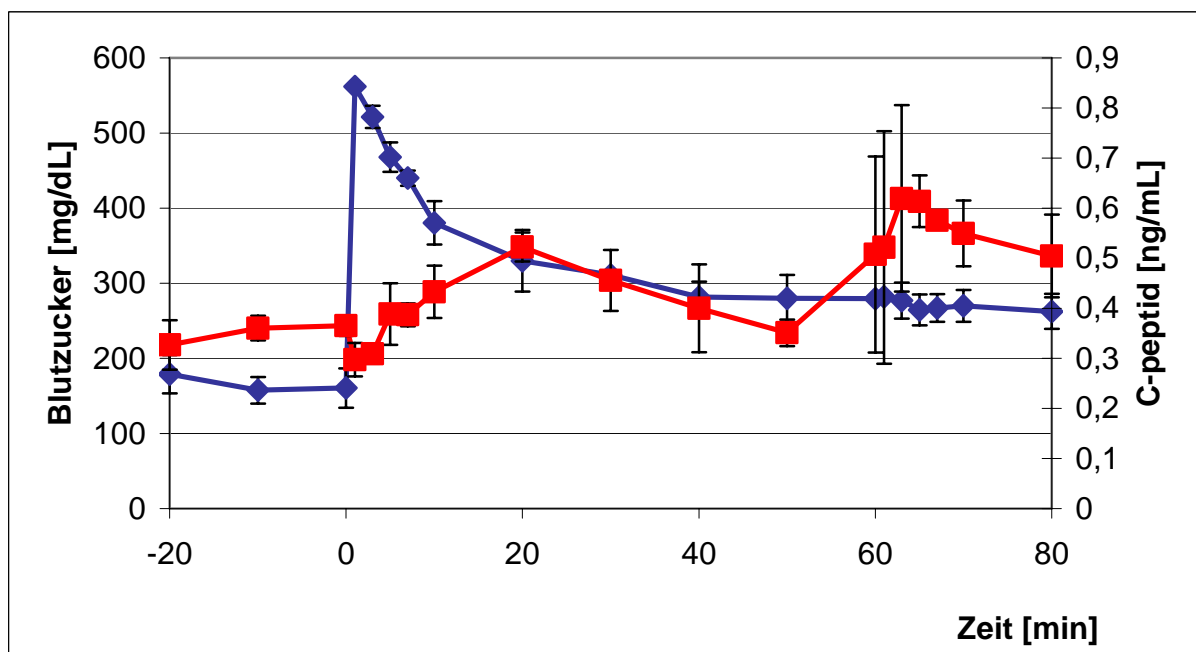


Abb. 29: Intravenöser Glukosetoleranztest des GMS nach Transplantation #1. Dargestellt sind die Blutzucker- und C-Peptidwerte.

4.3.1.3. Explantation des Transplantates

Am 45. Tag nach Transplantation wurde das Tier in Narkose getötet und das Transplantat von beiden Transplantationsorten entnommen. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden die inneren Organe makroskopisch inspiziert: Es gab keine sichtbaren Veränderungen. Die ursprünglich frei in den Bauchraum transplantierten mikroverkapselten Langerhans-Inseln

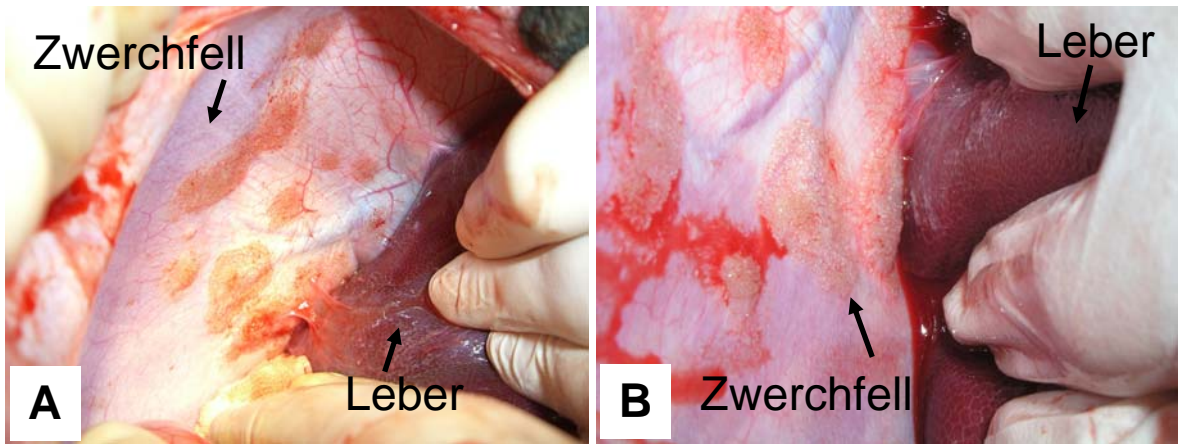


Abb. 30: Situs bei Explantation der mikroverkapselten Langerhans-Inseln. Blick von kaudal auf die abdominale Seite des Zwerchfells. Erkennbar sind in beiden Abbildungen (A) und (B) grosse Gruppen miteinander verwachsener und am Zwerchfell haftender Mikrokapseln.

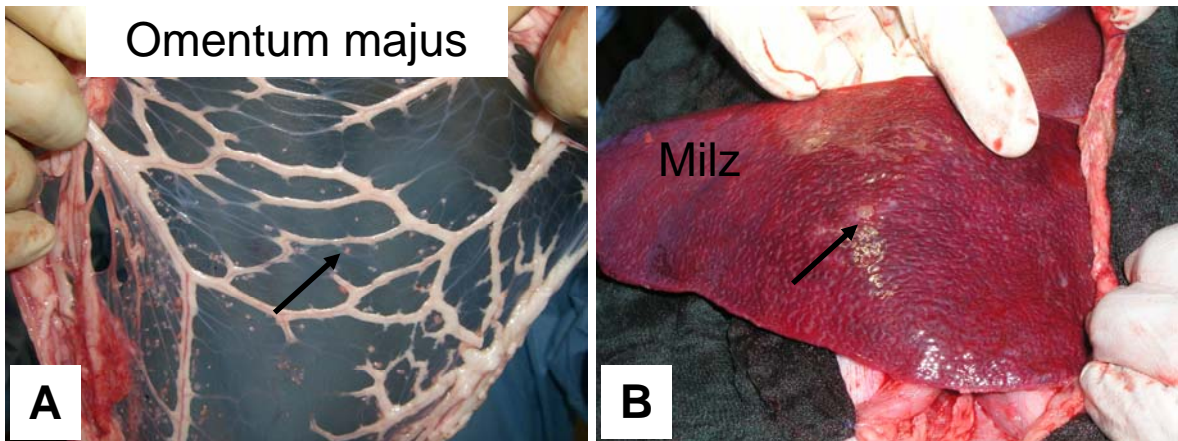


Abb. 31: Situs bei Explantation der mikroverkapselten Langerhans-Inseln; (A) einzelne Mikrokapseln am Omentum haftend; (B) eine kleine Kapselgruppe auf der Milzoberfläche.

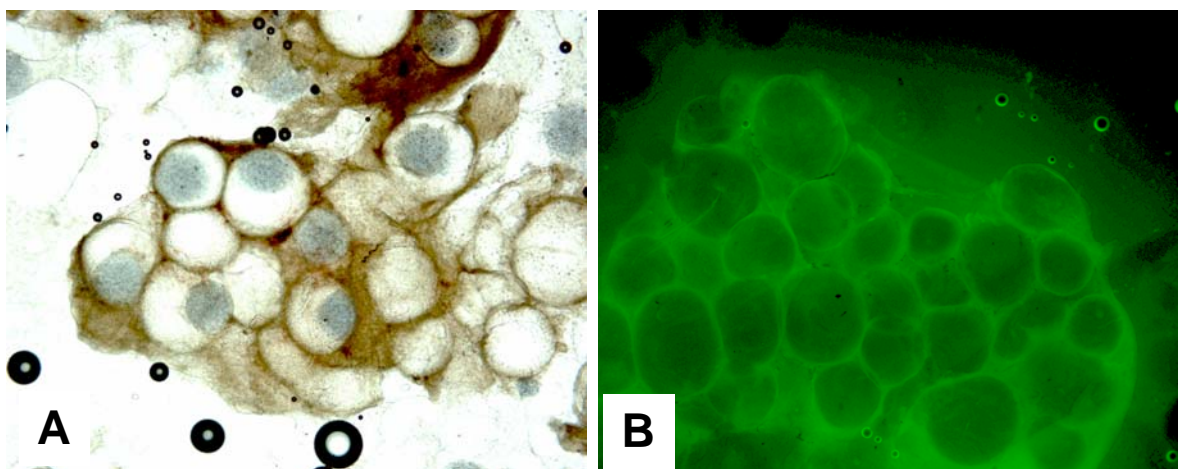


Abb. 32: (A) Lichtmikroskopische Darstellung einer Kapselgruppe aus der Bauchhöhle; gut erkennbar ist die starke Fibrosierung der Kapseln und als graue Elemente die Langerhans-Inseln in der Doppelkapsel; (B) die Langerhans-Inseln in den Mikrokapseln sind nach FDA/PI-Färbung avital.

waren zumeist in grösseren Gruppen miteinander und mit ihrer Umgebung verwachsen, z. B. auf der abdominalen Seite des Zwerchfells (**Abbildung 30**), auf der Milzoberfläche (**Abbildung 31B**) und Leberoberfläche. Die ursprüngliche Struktur des Omentums konnte nicht mehr dargestellt werden. Allerdings fanden sich zahlreiche Mikrokapseln einzeln (nicht in Gruppen) am Omentum haftend (**Abbildung 31A**). Die mikroskopische Inspektion der stark fibrosierten Mikrokapselgruppen (**Abbildung 32A**) ergab, dass die Langerhans-Inseln in den Mikrokapseln nach der FDA/PI-Färbung (**Abbildung 32B**) avital waren.

4.3.2. Transplantation #2

4.3.2.1. Pankreatektomie, Isolierung, Mikroverkapselung, Transplantation

Für die Transplantation #2 wurde wiederum ein STZ-diabetisches GMS als Empfänger verwendet. Bei ihm wurde vor der Transplantation der IVGTT durchgeführt, wie auch das RTGM nach Diabetes-Induktion. Das Transplantat bestand aus 426.000 IEQ mit einer Vitalität von 90-95 % vor Verkapselung, die an 4 aufeinanderfolgenden Tagen aus drei DL-Schweinen und einem GMS mittels Pankreatektomie und anschliessender enzymatischer Isolierung gewonnen wurden. **Abbildung 33** zeigt die zeitlichen Abläufe von Pankreatektomie im Grosstier-OP, Isolierung im eigenen Labor, der einfachen Mikroverkapselung mit hochreinen Alginaten im eigenen Labor und der Transplantation der mikroverkapselten Langerhans-Inseln in das diabetische GMS am 6. Tag wiederum im Grosstier-OP. Während der ersten Pankreatektomie aus einem der DL-Schweine ereignete sich ein ungeklärter Narkosezwischenfall, der die weitere Explantation und Isolierung aus diesem Individuum unmöglich machte. Als Ersatz wurde das GMS II.5 gewählt (s. **Abbildung 33**). Die Vitalität der mikroverkapselten Langerhans-Inseln betrug 90 % zum Zeitpunkt der Transplantation. Auch hier erfolgte die Transplantation durch einen 7 cm langen medianen Bauchschnitt gleichmässig in alle vier Quadranten frei in die Bauchhöhle. Eine Transplantation in das Omentum fand nicht statt.

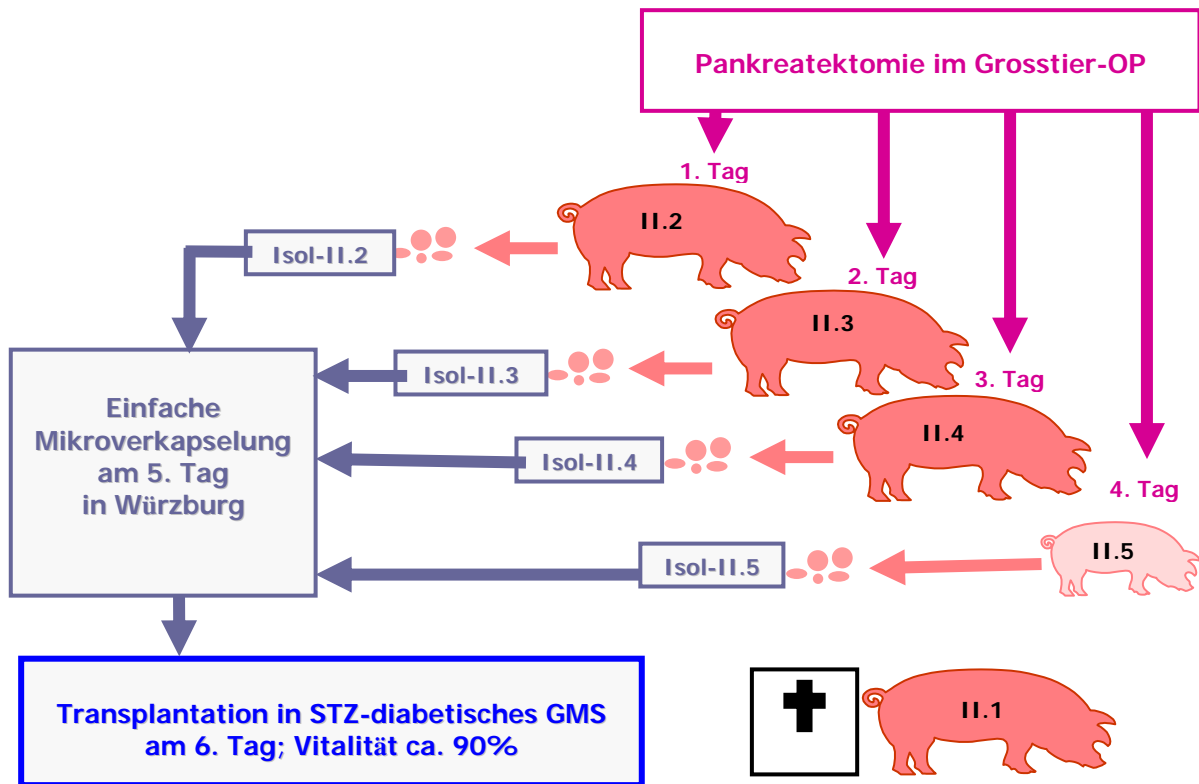


Abb. 33: Transplantation #2. Zeitlicher Ablauf der verschiedenen Arbeitsschritte bis zur Transplantation einfach mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln in ein STZ-diabetisches GMS (Einzelheiten s. Text).

4.3.2.2. Blutzuckerwerte, *Real Time Glucose Monitoring*, Glukosetoleranztest

Die über die Beobachtungszeit von 30 Tagen gemessenen Blutzuckerwerte unterscheiden sich nicht von jenen, die vor der Transplantation gemessen wurden (nicht dokumentiert). Auch hier blieb die täglich verabreichte Insulin-Dosis nach Transplantation unverändert. Auch im RTGM war wieder kein Unterschied zu den Werten vor Transplantation festzustellen (nicht dokumentiert). Im IVGTT konnte zwar ein, im Vergleich zum Glukosetoleranztest vor Transplantation, wesentlich besseres Blutzuckerprofil nachgewiesen werden, welches allerdings noch im diabetischen Bereich verharrt (vergl. **Abbildung 34** mit **Abbildung 35**). Das C-Peptid steigt nach Argininstimulation an, allerdings nicht über Werte von 0,4 ng/dL; beide C-Peptidkurven unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander.

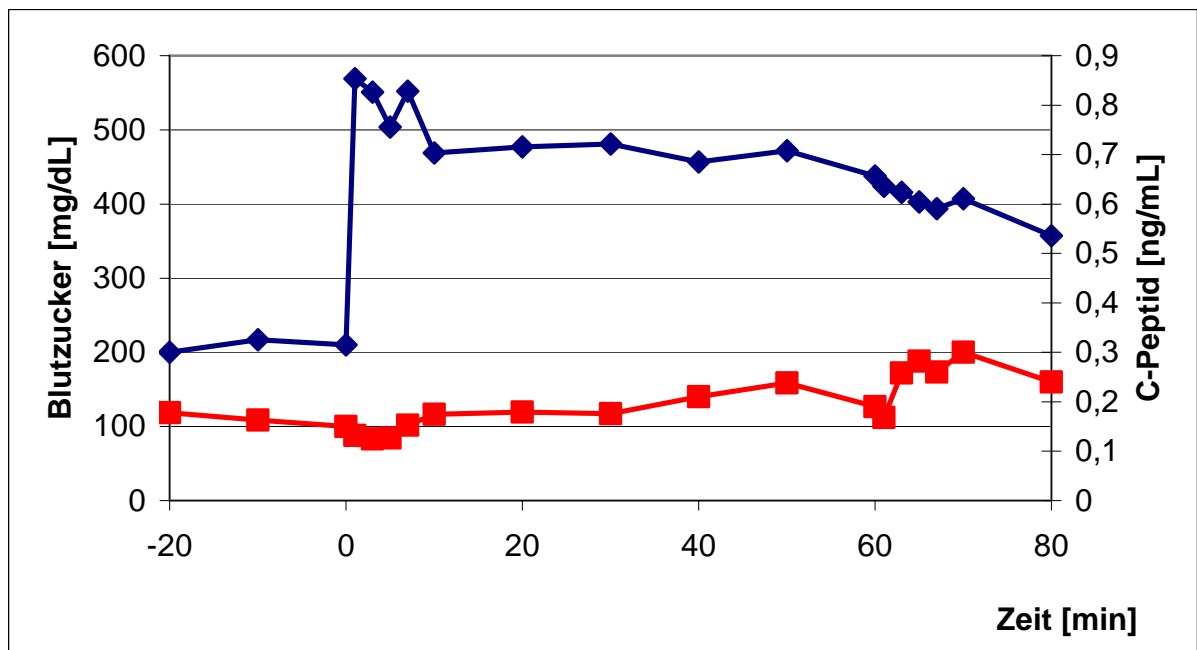


Abb. 34: Intravenöser Glukosetoleranztest des GMS vor Transplantation #2. Dargestellt sind die Blutzucker- und C-Peptidwerte.

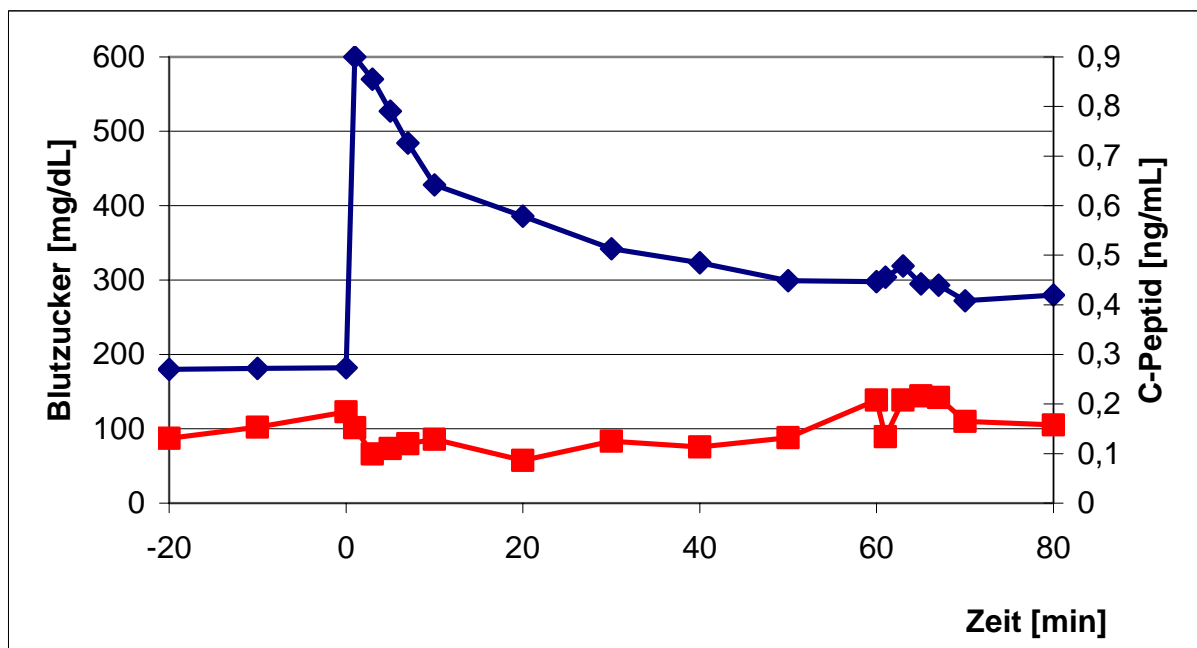


Abb. 35: Intravenöser Glukosetoleranztest des GMS nach Transplantation #2. Dargestellt sind die Blutzucker- und C-Peptidwerte.

4.3.2.3. Explantation des Transplantates

Nach 30 Tagen Beobachtungszeit bei bis dahin gutem Allgemeinzustand, entwickelte das GMS eine Pneumonie und der Versuch musste beendet werden.

5. Diskussion

Unsere Arbeitsgruppe hat in den vergangenen Jahren grosse Fortschritte in der Isolierung, Reinigung, Kultivierung und Transplantation porziner Langerhans-Inseln im Kleintiermodell *Ratte* erzielt (Krickhahn et al 2001, 2002; Meyer et al. 1998, 2001, 2008; Ulrichs et al 1999). Auf diesen Vorarbeiten bauen die hier vorgelegten Experimente auf. Ziel dieser Arbeit waren weitere wichtige Schritte in Richtung Diabetes-Therapie im Grosstiermodell – allerdings noch nicht in nicht-humanen Primaten, sondern im allogenen Modell *Schwein-auf-Schwein*, d. h. Spender der Langerhans-Inseln ist das Schwein, ebenso wie auch der diabetische Empfänger. Hierfür wurden im Schwein zwei unterschiedliche Diabetes-Modelle induziert, (a) der Streptozotozin-Diabetes und (b) der Diabetes mittels Pankreatektomie. Beide Modelle wurden physiologisch detailliert analysiert. Ein weiteres Ergebnis war die Verbesserung der Qualität der Langerhans-Inseln mittels Isolierung aus Spenderorganen ohne warme Ischämie (Pankreatektomie). Im dritten Abschnitt erfolgten zwei Pilot-Transplantationen von mikroverkapselten Langerhans-Inseln in STZ-diabetische Göttinger Miniaturschweine; mittel dieser Transplantationen sollte die Logistik der Diabetes-Induktion, der Transplantatgewinnung und -kultivierung, der Mikroverkapselung und allogenen Transplantation sowie die Nachsorge und das Zusammenspiel dieser arbeits- und zeitaufwändigen Abläufe überprüft wurden.

5.1. Vergleichende Betrachtung der beiden Diabetes-Modelle

Jahrzehntelange Forschungen haben gezeigt, dass sich das Schwein sehr gut für die Simulation medizinischer Vorgänge im Humansystem eignet (Larson and Rolin 2004). Seine dem Menschen vergleichbare Ernährung und Physiologie (Zhang et al. 2000) geben Grund zu der Annahme, dass sich die am Schwein erhobenen Daten auch auf den Menschen übertragen lassen. Untersuchungen in nicht-humanen Menschenaffen bilden sozusagen die letzte Stufe vor dem Schritt in die Klinik; sie sind in dieser Spezies aber auf das Allernötigste zu beschränken – ethische Bedenken, komplexe Haltungsbedingungen, hohe Kosten und die Tatsache, dass es sich um zu schützende Arten handelt, setzen ihnen enge Grenzen.

5.1.1. Diabetes-Induktion

Die beiden Strategien für die Induktion eines Diabetes, chirurgisch mittels Pankreatektomie und chemisch mit dem Betazellgift Streptozotozin, sind bereits für Schweine beschrieben worden (Larson and Rolin 2004; Gäbel et al. 1985; Grüssner et al. 1983; Kobayashi et

al. 2004). Alle hier STZ-behandelten GMS wurden innerhalb von 24 Stunden diabetisch; dies bestätigt Berichte aus der Literatur (Grüssner et al. 1983); somit stand ein erstes Diabetes-Modell für weiterführende Versuche zur Verfügung. Insbesondere bei der Pankreatektomie aber unterschieden sich die Literaturdaten erheblich, zum einen wird beschrieben, dass das Diabetes-Modell *Pankreatektomie* wegen der hohen Mortalität und der kurzer post-operativen Überlebenszeit nicht als Diabetes-Modell geeignet sei (Kobayashi et al. 2004); zum anderen gibt es Veröffentlichungen, die sich gerade der Pankreatektomie als Diabetes-Modell, speziell zur Inselzell-Transplantation, bedienen (Edamura et al. 2003; Kumagai et al. 2002). In den zuletzt genannten kommen post-operative Probleme nicht vor, und ein Langzeitüberleben der diabetischen Schweine scheint problemlos zu verlaufen. Wir können insofern beide Berichte zur Pankreatektomie bestätigen, als (a) auch keines unserer Tiere ohne eine intensive Nachsorge überlebt hätte und (b) nur die intensive medikamentöse Nachsorge das Langzeitüberleben der Tiere – in unserem Fall bis zu 28 Tagen und damit bis zur allogenen Transplantation – sicherte. Nach unseren Erfahrungen sind beide Diabetes-Modelle für den Langzeitgebrauch verwendbar. Allerdings sollte vor Versuchsbeginn das dann letztlich zu verwendende Modell intensiv diskutiert werden: Die pankreatektomierten GMS bieten die Sicherheit, dass sie kein endogenes Insulin, bzw. kein C-Peptid mehr bilden. Für die spätere Beurteilung einer zumeist noch marginalen Transplantatfunktion ist dies ein sehr wichtiger Gesichtspunkt. Bezüglich der Nachteile muss sorgfältig zwischen den Faktoren *Operation*, *Nachsorge* und *Physiologie* unterschieden werden. Zur Operation: Sie stellt einen hohen zeitlichen, technischen, personellen und, draus bedingt, auch einen hohen finanziellen Aufwand dar. Sie setzt ein eingespieltes erfahrenes Operationsteam voraus. Nach der Operation schliesst sich die zeitlich und personell sehr aufwendige Nachsorge an, die ggf. über einen längeren Zeitraum, bis zur Erholung des Tieres von der Operation, täglich mehrfach erfolgen muss. Dies sind zwei essentielle Nachteile gegenüber dem STZ-Modell, das sich schnell induzieren lässt und ohne eine kritische intensivmedizinische Phase in die zeitsparende Nachsorgephase übergeht. Physiologisch gesehen birgt der eigentliche Hauptvorteil, die absolute Ausschaltung der empfangereigenen Insulin-Produktion, allerdings auch erhebliche Nachteile: Hierbei muss wiederum zwischen den operationsbedingten und den physiologisch bedingten Faktoren unterschieden werden. Zum operationsbedingten Nachteil ist zu sagen: Durch den massiven operativen Eingriff wird die gesamte Homöostase des Organismus extrem stark beeinträchtigt, mit der Folge, dass der diabetische Organismus jetzt viel grössere Schwierigkeiten mit der Wundheilung hat und die Restitution der übrigen Körperfunktionen Zeit benö-

tigt. Physiologisch nachteilig zum einen ist das Fehlen des Anti-Insulin-Hormons Glukagon und das Fehlen der für die Verdauung wichtigen exokrinen Pankreasenzyme. Die STZ-diabetischen GMS haben den Vorteil, dass die Induktion des Diabetes nur ein minimaler Eingriff ist (Anlegen des zentralen Venenkatheters), und die anschließende Regenerationsphase nach der Operation entfällt. Die Injektion des STZ ins Tier zerstört selektiv die β -Zellen; somit bleiben die glukagonproduzierenden α -Zellen erhalten, was die Gefahr der Hypoglykämie verringert; auch bleibt die exokrine Pankreasfunktion erhalten, und die Nahrungsaufnahme kann ungestört vonstatten gehen. Der grösste Nachteil des STZ besteht in der nicht sicheren und 100 %igen Zerstörung der β -Zellen, was histologisch durch residuale β -Zellen und ein partielles Ansprechen auf einen Glukose- und Argininbolus im IVGTT in den eigenen Untersuchungen gezeigt wurde.

5.1.2. Monitoring der diabetischen Stoffwechsellage

Intravenöser Glukosetoleranztest

Die hier an den GMS durchgeführten intravenösen Glukosetoleranztests mit anschliessendem Hyperglykämischem *Clamp* sind ein allgemein akzeptiertes Verfahren zur Verifizierung einer Diabetes-Erkrankung (Marcelli-Tourvielle et al. 2006; Rakotoambinina et al. 1997). Auch wir konnten zeigen, dass dieser Test mit der Bestimmung des Blutzuckers, des C-Peptids und des Insulins sehr gut geeignet ist, um einen Diabetes zu identifizieren. Allerdings sollte man die verschiedenen Daten immer vergleichend betrachten. Eine Veränderung der Glukosetoleranz oberhalb der diabetischen Grenzwerte ist nicht verwertbar. **Abbildung 11** und **Abbildung 12** repräsentieren zwei diabetische Blutzuckerprofile, die sich auf den ersten Blick erheblich voneinander unterscheiden; betrachtet man allerdings den Verlauf der C-Peptidkurven, dann befinden sich diese in einem vergleichbaren Bereich und unterscheiden sich keineswegs voneinander. Anders als Blutzucker und C-Peptid kann Insulin im diabetischen Schwein mit den von uns verwendeten Methoden (ELISA) nicht nachgewiesen werden. In nicht-diabetischen Schweinen hingegen zeigt Insulin einen dem C-Peptid vergleichbaren Verlauf im IVGTT. Aus den von uns erarbeiteten Daten lässt sich somit ein Algorithmus zur Interpretation eines IVGTT wie folgt ableiten: Zunächst sollte immer das Blutzuckerprofil betrachtet werden und zwischen einer diabetischen und nicht-diabetischen Stoffwechsellage unterschieden werden. Sodann sollten die C-Peptidwerte betrachtet werden, um eventuell noch vorhandenes, aber nicht ausreichendes, Insulin bzw. C-Peptid, zu verifizieren.

Real Time Glucose Monitoring

Das von uns angewandte RTGM ist ein für die Diagnostik und Einstellung diabetischer Patienten entwickeltes System. Aus der Literatur sind keine Anwendungen am Grosstier *Schwein* bekannt, weder am normoglykämischen noch am diabetischen Schwein. Die von uns mit dem RTGM erarbeiteten Daten lassen zwei Rückschlüsse zu: Zum Einen ist dieses neue Diagnosesystem auch im Biosystem *Schwein* mit grossem Erfolg anwendbar; hierfür spricht, dass die in unseren Messungen beobachteten Schwankungen stets gut mit dem jeweiligen, die Glukosehomöostase beeinflussenden Ereignis, der Fütterung oder der Insulin-Injektion, korrelieren. Zum Anderen spiegeln die gemessenen Werte die Stoffwechsellage wider und geben damit wertvolle Hinweise auf die aktuelle Glukosetoleranz. Eine Verbesserung der Glukosetoleranz, mit z. B. einem geringeren Anstieg des Blutzuckers nach der Fütterung oder einem postprandial schnellerem Blutzuckerabfall, kann so langfristig gut sichtbar gemacht werden. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zum IVGTT, der immer nur eine zeitlich begrenzte Aufnahme über 120 Minuten bietet, nach einem Glukosebolus.

Spontanblutzucker

Die parallel gemessenen Spontanblutzuckerwerte zeigen lediglich die diabetische Stoffwechsellage der GMS an und sind für die akute Abschätzung des Insulinbedarfs ausschlaggebend. Für die höheren abendlichen Blutzuckerwerte STZ-diabetischer Tiere gibt es mehrere Erklärungen, zum Einen war die Nachbeobachtungszeit STZ-diabetischer GMS länger und deren Blutzuckereinstellungen weniger konsequent als die pankreatektomierter GMS, zum Anderen haben pankreatektomierte GMS neben der gestörten Glukosestoffwechsellage auch eine gestörte bzw. verminderte intestinale Nährstoffaufnahme.

Gewicht

Die kontinuierliche Gewichtabnahme diabetischer Tiere lässt sich aus der gestörten Glukosetoleranz erklären und ist auch in der klinischen Versorgung von Typ-1 Diabetikern bekannt. Die deutlich stärkere Gewichtabnahme in pankreatektomierten GMS lässt sich durch den operativen Eingriff und die anschliessend verminderte Nährstoffaufnahme erklären. Die Kontrollgruppe nimmt im Beobachtungszeitraum nicht an Gewicht zu, was darauf zurückzuführen ist, dass es sich hier um bereits ausgewachsene GMS handelt.

5.2. Optimierung der Isolierung porziner Langerhans-Inseln

Für alle bisherigen *in vitro* Versuche und auch die xenogenen Transplantationen im STZ-diabetischen Kleintier *Ratte* wurden Langerhans-Inseln aus porzinen Pankreata isoliert, die aus hirntoten Schlachtschweinen der Deutschen Landrasse gewonnen wurden (Meyer et al. 2008). Der Schlachtprozess im Schlachthof Würzburg verläuft nach den Richtlinien der Europäischen Union und bedingt durch Brühen und Abflammen des Schlachtkörpers warme Ischämiezeiten von 20-35 Minuten. Diese Zeit verstreicht, bis die Bauchhöhle eröffnet und das Pankreas aus dem Bauchpaket in einer *back table* Präparation gewonnen werden kann. Die halbsterile Präparation des Pankreas und anschliessende Kühlung im Kulturmedium auf Eis erfolgt dann schnell, innerhalb von 2-3 Minuten noch im Schlachthaus. Die kritische Phase sind die ersten 20-30 Minuten vor der Präparation, in der die Autolyse des Organs bereits einsetzt (Nakagawara et al. 1981). Der damit einhergehende Verlust der Viabilität von 10-20 % (Goto et al. 2005; Stadlbauer et al. 2003; Tanioka et al. 1997) ist in vielen experimentellen *in vitro* Untersuchungen vernachlässigbar, nicht aber in den präklinischen und späteren klinischen Untersuchungen. Hier sollte mit der maximal verfügbaren Zellvitalität begonnen werden, und sie ist nur durch Vermeidung der warmen Ischämiezeit zu erzielen, das heisst, durch Gewinnung des Spenderorgans mittels Pankreatektomie. Es folgen dann zwangsläufig eine Reihe von Arbeitsschritten (z. B. die die Inseln mechanisch sehr belastende Isolierung und Reinigung, die anschliessende *in vitro* Kultur bis genügend Langerhans-Inseln für ein Transplantat vorhanden sind, die Mikroverkapselung, die erneute Zellkultur, mikrobiologische und funktionelle Untersuchungen vor Transplantation etc., etc.), die dazu führen, dass das Transplantat nicht zeitnah übertragen werden kann, was stets – und ganz besonders bei den sehr empfindlichen Langerhans-Inseln – mit Viabilitätsverlusten einhergeht.

Belastend hinzu kommt die kalte Ischämiezeit, bedingt durch den Transport des Organs vom Schlachthof ins Labor und die sich anschliessende Feinpräparation des Spenderorgans (Abtrennen von Fett, Lymphknoten, Gefässen); sie beträgt bis zu 120 Minuten. Die hier etablierte Pankreatektomie am GMS wie auch an den grösseren und zum Teil 200 kg Körpergewicht messenden DL-Schweinen hatte den Vorteil, dass die warme Ischämiezeit – sofern nicht anders vermerkt – völlig vermieden, und die kalte Ischämiezeit – wegen der engen räumlichen Nähe von Grosstier-OP und Isolierungslabor auf 30 Minuten verringert werden konnte. Dieser Prozess führte dazu, dass die Viabilität der Langerhans-Inseln, mit den technisch bedingten Ausnahmen, stets über 90 % lag. Dieses Ergebnis wurde fluores-

zenzmikroskopisch mit Hilfe von FDA/PI ermittelt, wobei immer mehrere Personen das Ergebnis unabhängig voneinander dokumentierten. Eine weitere Steigerung der Viabilität dürfte damit kaum möglich sein. Die kontinuierliche Zunahme der Viabilität nach Isolierung in den vergangenen Jahren (Krickhahn et al. 2001, 2002), ist zum Einen durch die stete Verbesserung der Isolierungstechnik und zunehmend grössere Erfahrungen des Isolierungsteams bedingt, zum Anderen durch die immer striktere Auswahl der für die Isolierung verwendeten Spenderorgane mittels histologischer Voruntersuchung. **Abbildung 22** zeigt den Vergleich hinsichtlich Ausbeute, Reinheit und Vitalität der Isolierungen aus Spenderorganen mit und ohne warme Ischämiezeit.

Die vergleichbar hohe Ausbeute und Reinheit der Langerhans-Inseln sind starke Hinweise darauf, dass die technischen Abläufe bei der Isolierung und den sich anschliessenden Arbeitsschritten jeweils unter identischen Bedingungen abliefen, also vergleichbar sind. Da also Ausbeute und Reinheit sich nicht unterscheiden, wohl aber die Vitalität in beiden Isolierungsgruppen signifikant verschieden ist, darf der Rückschluss gezogen werden, dass die Reduktion der warmen Ischämie auf Null die exzellente Viabilität der Langerhans-Inseln bedingt.

Ein weiterer wichtiger Parameter nach der Isolierung der Langerhans-Inseln ist ihre Masse bzw. ihre Anzahl. Hierfür gibt es zwei Messwerte, einerseits die Gesamtzahl der isolierten Langerhans-Inseln (gemessen als IEQ_{gesamt}), andererseits die IEQ pro Gramm Organ. Beide Messwerte sind nach der Isolierung aus Organen ohne warme Ischämiezeit signifikant niedriger als aus Organen mit warmer Ischämiezeit. Da die Veränderung beide Messwerte gleichermassen betrifft, ist nicht von einem Messfehler auszugehen. Die niedrige IEQ-Anzahl aus Organen ohne warme Ischämiezeit lässt sich damit erklären, dass an diesen Organen kein histologisches *pre-screening*, also keine Auswahl des am besten geeigneten Organs vor Isolierung, erfolgte, während dies bei den Organen mit warmer Ischämiezeit die Regel war. Für die Organe nach Pankreatektomie gilt das Motto: *Einem geschenkten Gaul...* während man bei den anderen aus bis zu 5 Spenderorganen auswählen kann und jenes selektiert, das im bereits im Schnittpräparat möglichst viele gut strukturierte Langerhans-Inseln enthält. Im Falle der Pankreatektomie wäre es hilfreich, wenn man anhand einer Biopsie vor der Organentnahme und noch am lebenden Tier feststellen könnte, ob das Spendertier sich für die Entnahme eignet oder nicht. Genetische Marker oder Serummarker, die Hinweise auf die Qualität und Quantität der Langerhans-Inseln im Pankreas geben

könnten, sind aus der Literatur nicht bekannt. Das von uns etablierte histologische *pre-screening* stellt lediglich eine Option für die hirntoten Tiere dar, sofern diese in ausreichender Anzahl und zu vertretbaren Kosten zur Verfügung stehen.

Eine interessante, aber zeit- und arbeitsaufwändige *in vivo* Methode des *pre-screenings* ist der IVGTT am normoglykämischen potentiellen Spenderschwein, kombiniert mit dem histologischen *pre-screening post mortem*. Die in den **Abbildungen 24-26** dargestellten IVGTT wurden alle bei Schweinen vergleichbaren Alters, vergleichbarer Grösse und Herkunft durchgeführt. Deutlich erkennbar ist, dass die Tests sehr unterschiedlich ausfallen; so scheint es zu einer schleichenden Entwicklung einer diabetischen Stoffwechsellage zu kommen. Vergleichbar dem Diabetes mellitus Typ-2 im Menschen kommt es zuerst zu einer Störung der Glukosetoleranz mit noch erhaltener bzw. gesteigerter C-Peptidausschüttung, in dessen Verlauf dann aber die C-Peptidausschüttung, und damit auch Insulin-Sekretion, abnehmen. Wenn nun dem jeweiligen IVGTT spezielle histologische Merkmale zugeordnet werden könnten (wie bereits gesagt, fehlen diese Tests noch), die mit einer hohen IEQ-Anzahl korrelieren, könnte man zukünftig ein Spenderschwein *in vivo* vortesten und anhand des IVGTT-Ergebnisses Rückschlüsse auf die zu erwartende IEQ-Anzahl ziehen. Eine sehr häufige Beobachtung in den Spenderschweinen der Deutschen Landrasse, vor allem wenn sie 1-2 Jahre alt sind und ca. 200 kg wiegen, sind Langerhans-Inseln mit einer „lockeren Textur“ (**Abbildung 36**); ideal aber sind Langerhans-Inseln wie sie **Abbildung 9** zeigt, wie wir sie aber nur in ca. 10 % aller Spendertiere finden. Wir haben immer wieder beobachtet, dass diese Langerhans-Inseln, sofern die viabel sind, *in vitro* und *in vivo* einwandfrei funktionieren. Diese Beobachtung korreliert mit Beobachtungen in der „Fetten Sandratte“ (*Psammomys obesus*), einem Modell zum Typ-2 Diabetes, wo sich die gut strukturierten, kompakten Langerhans-Inseln zu Inseln mit „lockerer Textur“ entwickeln, wenn die Tiere mehrere Wochen mit hochkalorischer Diät gefüttert und am Ende diabetisch werden (El Aoufi et al. 2007; Kaiser et al. 2005; Shafrir et al. 2001, 2006). Diese Langerhans-Inseln ähneln sehr jenen, die wir in vielen DL-Schweinen finden – zumeist ja auch nach einer schnellen hochkalorischen Fütterung, denn die Tiere sollen ja möglichst schnell marktreif und geschlachtet werden. Da sich aber in der Schweinemast niemand für den Typ-2 Diabetes, geschweige denn, Anzahl und Form der Langerhans-Inseln interessiert, und die Tiere dem äusseren Anschein nach gesund sind, ist diese Beobachtung für den Alltag der Schweinezüchter/Schweinemäster uninteressant; für die allogene bzw. xenogene Transplantation von porzinen Langerhans-Inseln hiesse dies, dass die herkömmli-

chen Schweine keine geeigneten Organspender darstellen. Bei der Fette Sandratte ist der Prozess der Inselzellzerstörung und damit der Diabetes-Induktion bis zu einem gewissen Zeitpunkt reversibel; ob dies auch bei den 200 kg wiegenden älteren Spenderschweinen möglich ist, müsste geprüft werden. In jedem Fall wäre es sinnvoll, den IVGTT an einer grösseren Anzahl potentieller Spenderschweine zu testen, um zu erfahren, ob die „lockere Textur“, bzw. die partielle Zerstörung ihrer Langerhans-Inseln, wie wir sie immer wieder beobachten, mit einem Typ-2 Diabetes einhergeht.

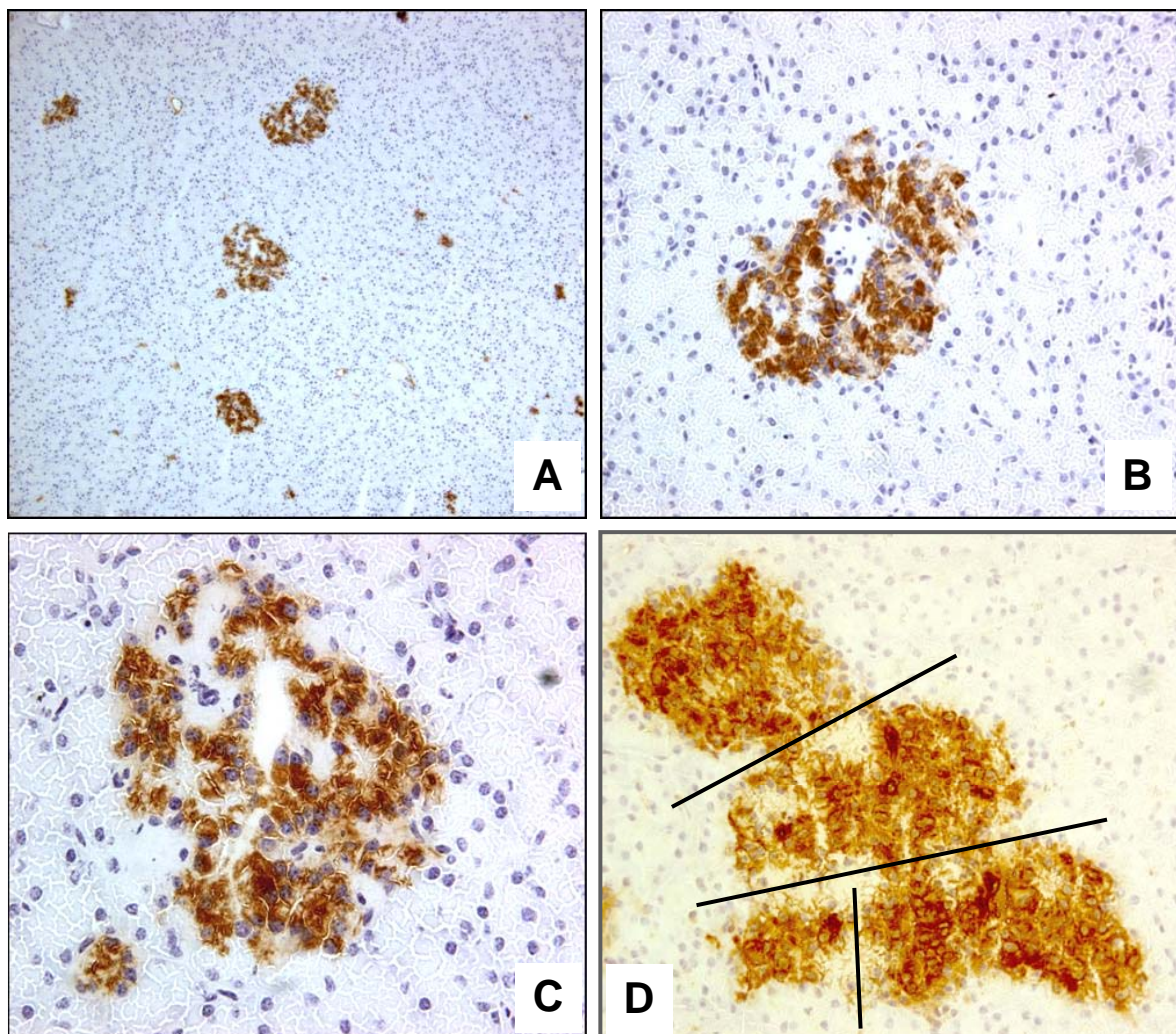


Abb. 36: Langerhans-Inseln im Pankreas von DL-Schweinen (Gefrierschnitte; Anti-Insulin-Färbung). Zunehmend häufiger besitzen porcine Pankreatae Langerhans-Inseln mit einer „lockeren Textur“; diese Inseln fragmentieren während der enzymatischen Isolierung (angedeutet durch die Linien in (D)) und sind für eine Transplantation ungeeignet; zu den möglichen Ursachen dieser Morphologie: s. Text; vergl. dazu auch **Abb. 9**. (A) Übersicht (Vergrößerung x25); (B) und (C) sind Vergrößerungen aus (A) (Vergrößerungen x50 und x100); (D) Langerhans-Insel aus einem anderen Pankreas (Vergrößerung x50).

5.3. Allogene Transplantation mikroverkapselter porziner Langerhans-Inseln in STZ-diabetischen Empfängerschweinen

Die beiden Pilotversuche zur allogenen Transplantation wurden mit dem Ziel durchgeführt, unterschiedliche Aspekte der Transplantation im Grosstier *Schwein* näher zu untersuchen, bzw. möglichst viele Erkenntnisse vor der späteren xenogenen Transplantation *Schwein-auf-Mensch* zu gewinnen. Folgende Aspekte waren näher zu analysieren: die Zusammensetzung und das Zusammenspiel aller am Geschehen beteiligten Mitarbeiter, die Gewinnung ausreichender Langerhans-Inseln für ein allogenes Transplantat, die Mikroverkapselung mit medizinisch zugelassenen Alginaten, die Transplantation als operativer Eingriff und die Wahl des geeigneten Transplantationsortes, die medizinische Versorgung der transplantierten GMS und nicht zuletzt die Therapie des experimentellen Diabetes.

Die Transplantation isolierter Alginat-mikroverkapselter Langerhans-Inseln in ein STZ-diabetisches GMS würde die beiden ersten Teile dieser Arbeit zusammenführen. Wir hatten noch keine allzu grossen Hoffnungen auf einen durchgreifenden Transplantationserfolg – dazu waren die vielfältigen und über viele Tage ineinandergreifenden Arbeitsabläufe gänzlich unerprobt und Fehler sehr wahrscheinlich.

5.3.1. Logistik und Koordination

Die Transplantation isolierter mikroverkapselter Langerhans-Inseln in ein diabetisches Empfängerschwein erfordert einen sehr hohen personellen, zeitlichen und natürlich auch finanziellen Aufwand, wobei der letzte Punkt in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden soll. Man darf annehmen, dass unser Experiment die spätere klinische Situation, den damit verbundenen Personalaufwand und den zeitlichen Aufwand ziemlich genau abbildet. Die Koordination des Teams ist essentiell, und damit einhergehen muss die fehlerlose Kommunikation; Chirurgen müssen sich mit den Naturwissenschaftlern, mit Tierpflegern und dem Laborpersonal abstimmen [die männliche Schreibweise gilt ab jetzt auch für das weibliche Geschlecht]. Eine Person, am besten der Leiter des Isolierungslabors, ein Wissenschaftler, sollte die Gesamt-Koordination übernehmen; er hat den Überblick über das gesamte Geschehen, ist ganztägig vor Ort und kann jederzeit kleinere Probleme selbst lösen, ihre Lösung anordnen und/oder Fragen zum Versuchsablauf beantworten. **Tabelle 2** zeigt wie viele Personen an den einzelnen Arbeitsschritten beteiligt waren und ihre Qualifikation.

Tab. 2: Übersicht über die an den verschiedenen Arbeitsabläufen beteiligten Personen, ihre Qualifikation und den benötigten Zeitaufwand.

Tätigkeit	Anzahl der Personen* Qualifikation	Zeitaufwand
Diabetes-Induktion mit STZ	2 Personen Wissenschaftler/Chirurg (1) Tierpfleger (1)	3 Stunden
Diabetes-Induktion mit PEX	5 Personen Chirurgen (2) OP-Assistent (1) Anästhesisten (2)	6 Stunden
Nachsorge STZ und Nachsorge PEX: Stabile Phase	1 Person Tierpfleger (1)	2 x 30 Minuten/Tag
Nachsorge PEX: Frühphase	1 Person Chirurg (1)	bis zu 4 Stunden/Tag
Pankreasexplantation	6 Personen Chirurgen (2) OP-Assistenten (2) Anästhesisten (2)	5 Stunden
Isolierung (I) und <i>in vitro</i> Kultur (K) von Langerhans- Inseln	3 Personen Wissenschaftler (1) Technische Assistenten (2)	1 Tag (I) 1 Stunde/Tag (K)
Mikroverkapselung (MV), <i>in vitro</i> Kultur (K) und <i>in vitro</i> Testung (T)	2 Personen Wissenschaftler (1) Technischer Assistent (1)	1 Tag (MV) 1 Stunde/Tag (K) 4 Tage (T)
Transplantation	4 Personen Chirurgen (2) Anästhesisten (2)	2 Stunden

STZ: Streptozotocin; PEX: Pankreasexplantation im Grosstier-OP; * die männliche Schreibweise gilt für beide Geschlechter.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente – und hier insbesondere die beiden Transplantationen – gilt: Alle in der Tabelle genannten Abläufe in ihrer gesamten Komplexität wurden fehlerlos und in der vorgegebenen Zeit absolviert (Ausnahme: Narkosezwischenfall, s. u.). Das darf als ein erstes hervorragendes Ergebnis gewertet werden, müsste aber in Vorbereitung auf die klinische Transplantation vielfach intensiv trainiert werden, um die Abläufe in einer *standard operation procedure* zu festigen.

5.3.2. Transplantatgewinnung

Die für die Transplantation erforderliche IEQ-Anzahl lässt sich u. a. aus Literatur von Versuchen mit nicht-humanen Primaten mit ca. 30.000 IEQ/kg Körpergewicht gut schätzen (Cardona et al. 2006; Sun et al. 1996). Für ein GMS von 30 kg Körpergewicht wären das ca. 900.000 IEQ insgesamt – diese Anzahl, das wussten wir, war mit einer einzelnen Isolierung nicht zu erzielen. Wir sahen daher vier 1-2 Jahre alte, 150-200 kg wiegende Spenderschweine vor; aus solchen Tieren hatten wir in der Vergangenheit ca. 250.000 IEQ pro Pankreas mit grosser Regelmässigkeit isoliert (Krickhahn et al. 2001, 2002). Im Idealfall hätten wir also 1.000.000 IEQ erzielt, und damit noch über Reserven verfügt. Die wichtigste Erfahrung aus den Isolierungsversuchen nach Pankreatektomie – mit dem Ziel, ein komplettes Transplantat von hoher Vitalität bereitzustellen – war, dass man mindestens ein Spenderschwein in Reserve vorhalten muss. Ein bislang ungeklärter Narkosezwischenfall in der zweiten Isolierungsserie (s. **Abbildung 33**) wäre für das Gesamtergebnis unbefriedigender verlaufen, hätten wir nicht auf ein GMS als Spenderreserve zurückgreifen können.

Beträchtliche logistische Probleme bereitet der Transport der grossen Tiere aus dem Tierhaus in den Grosstier-OP; ein genügend belastbarer OP-Tisch wurde für diese grossen 200 kg wiegenden Spender extra gefertigt; zudem musste ein genügend langer Tubus für die Beatmung entwickelt werden. Verwendet werden ansonsten das für übergewichtige, bzw. sehr grosse Menschen notwendige Instrumentarium wie auch das entsprechend dimensionierte Plastikmaterial. Derartige Probleme lassen sich dann lösen, wenn man sie vor dem eigentlichen Experiment hinreichend theoretisch bedenkt und dann *in praxi* erprobt. Ein während der OP zusammenbrechender OP-Tisch, weil die Gösse und die Masse der Spender im Vorfeld nicht bedacht wurden, hätte den gesamten Versuch gefährdet.

Für die Isolierung der Langerhans-Inseln eignen sich grössere Tiere in aller Regel besser als kleine, weil ihr *Ductus pancreaticus* einen grösseren Durchmesser besitzt und damit leichter zu kanülieren ist. Eine komplette Isolierung an vier aufeinanderfolgenden Tagen – im Anschluss an die mehrstündige Explantation – erfordert nicht nur eine hervorragende Logistik im Labor sondern erfordert auch von den Mitarbeitern allerhöchste Konzentration und eine hohe Motivation und körperliche Frische, um Müdigkeitsphasen und damit Fehler zu vermeiden. Mit der hier dokumentierten Pilotserie konnten wir zeigen, dass wir im Falle der klinischen Xenotransplantation – auch hier würde man wenigstens 1.000.000 IEQ veranschlagen – mehrere aufeinanderfolgende Isolierungen von höchster Qualität (Reinheit,

Ausbeute, Vitalität und Sterilität) unter den entsprechenden Bedingungen der *good medical practice* erfolgreich durchführen könnten.

5.3.3. Alginatmikroverkapselung

Eine Möglichkeit, um nach der Zell- und Gewebetransplantation die lebenslange Immunsuppression zu umgehen, ist die Mikroverkapselung des Transplantates mit hochreinen, medizinisch zugelassenen Alginaten (Sambanis 2000, 2003; Uludag et al. 2000; Siebers et al. 1997; Clayton et al. 1993). Die von semipermeablen Alginatkapseln umhüllten Langerhans-Inseln werden im Empfänger zunächst *per diffusionem* ernährt, bis nach 7-14 Tagen empfangereigene Kapillaren die Mikrokapsel umspriessen und ihren Inhalt mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Da dieses Prinzip später auch in der Klinik verwendet werden soll, war es sinnvoll, dieses Ziel auch bei der experimentellen Transplantation *Schwein-auf-Schwein* zu verfolgen. Unsere Absicht war es, in Zusammenarbeit mit der Firma Cell-Med, Alzenau, die Langerhans-Inseln doppelt zu verkapseln (s. **Abbildung 6**); die Firma besitzt spezielle Kenntnisse und Erfahrungen mit diesem komplexen Verfahren (Roth 2005) und war bereit, mit uns zu kooperieren. Zu diesem Zweck wurden die Langerhans-Inseln in Kulturmedium gehalten und bei Raumtemperatur mit dem Auto über ca. 110 km transportiert, in Alzenau doppelt verkapselt, dort für 24 Stunden kultiviert, sodann in verkapseltem Zustand nach Würzburg zurückgefahren und bis zur Transplantation erneut kurz kultiviert. Hatten die Langerhans-Inseln vor dem Transport nach Alzenau eine Vitalität von 90-95 %, so lag diese unmittelbar vor der Transplantation bei nur noch 40 %, bedingt durch den 2-maligen Autotransport, die mehrmals unterbrochenen Kultivierungsphasen, und das wohl auch für die Langerhans-Inseln mechanisch belastende Verfahren der Mikroverkapselung; hier werden die Langerhans-Inseln u. a. mit Luftdruck durch mehrere Düsensysteme gepresst. Langerhans-Inseln sind – anders als z. B. Lymphozyten – sehr empfindlich gegenüber mechanischen Einflüssen. Trotz dieses dramatischen Vitalitätsverlustes entschlossen wir uns zur Transplantation, um auch die damit verbundenen Arbeitsabläufe näher zu erproben.

Den dramatischen Vitalitätsverlust, der mit der Doppelverkapselung und dem Transport der Langerhans-Inseln einherging, hatten wir nicht erwartet; er zeigte uns aber – wenn wir die Vitalität erhalten wollten –, dass die Mikroverkapselung im eigenen Labor, also vor Ort, erfolgen müsste. Folglich wurde das Transplantat #2 nach dem im eigenen Labor erprobten Verfahren mit einem kommerziell erhältlichen Alginat mikroverkapselt. Seine Vitalität

betrug zum Zeitpunkt der Transplantation immer noch 90 %, womit bewiesen war, dass lange Transportwege dem Transplantat schaden und unbedingt zu vermeiden sind.

Beide, die Doppel- wie auch die Einfachverkapselung, sind bereits experimentell so weit entwickelt, dass präklinische Versuche mit guten Ergebnissen durchgeführt werden können (Hasse et al. 1998; Ulrichs et al. 1999). Beide Verfahren sind jedoch noch nicht komplett ausgereift. Von der Doppelkapsel erhoffen wir uns eine komplette immunologische Abschirmung, die die Einfachkapsel naturgemäss nur unvollständig leisten kann. Die Ernährung der verkapselten Zellen und ihre Versorgung mit Sauerstoff sind mit Sicherheit in der Doppelkapsel schwieriger – Zelluntergänge sind damit vorbestimmt. Beiden Kapselarten ist gemeinsam, dass sie nach längerem Verbleib im Empfänger fibrosieren, d. h. von einer Fibroseschicht umgeben werden, was die Versorgung der mikroverkapselten Zellen sehr erschwert. Allerdings ist dieses Problem mit zunehmender Reinheit der Alginat geringer geworden; ob es komplett ausgeschaltet werden kann, müssen weitere Forschungen, auch in enger Zusammenarbeit mit der Industrie, die diese Alginat produziert, zeigen.

5.3.4. Transplantation und Transplantationsort

Der operative Eingriff zur Übertragung der mikroverkapselten Langerhans-Inseln in das diabetische Empfängertier stellt für einen erfahrenen Chirurgen kein grösseres Problem dar. Ein kleiner Schnitt zur Eröffnung der Bauchhöhle oder der laparoskopische Zugang genügen, um die Langerhans-Inseln an die gewünschte Stelle, in das Omentum oder in die Bauchhöhle zu transplantieren. Zu vermeiden sind unbedingt das zu langer Herumstehen des Transplantates (Vitalitätsverluste), offenes Herumstehen des Transplantates (Infektionsgefahr) und versehentliches Herunterfallen des Transplantates (Totalverlust). Diese Punkte werden immer wieder bei der Risikoabwägung vergessen, weil sie so selbstverständlich erscheinen, dies aber keineswegs sind.

Das Omentum als Transplantationsort ist inzwischen etabliert (van der Windt et al. 2008; Kobayashi et al. 2006; Gustavson et al. 2005); sie hat den Vorteil, dass die Langerhans-Inseln dort gut durchblutet werden; sie sind von den übrigen Organen örtlich abgegrenzt und können im Fall einer Komplikation (z. B. Nicht-Funktion oder Infektion) problemlos *in toto* explantiert werden. Dieser zuletzt genannte Vorteil entfällt bei der Transplantation in die Bauchhöhle – im Schwein dürfte es schwierig werden, jede einzelne Mikrokapsel zu identifizieren und dann zu entfernen; in der viel kleineren Ratte war dies nie ein Problem.

Natürlich werden die mikroverkapselten Langerhans-Inseln in jedem Fall vor der Transplantation auf Keimfreiheit geprüft; aber ein Restrisiko bleibt bestehen. Im Kleintier sind die Bauchhöhle, das Pfortadersystem der Leber, das Omentum und die Nierenkapsel erprobte Transplantationsorte mit guter Inselfunktion (Szot et al. 2007; van der Windt et al. 2008; Rogers et al. 2003), im Grosstier das Pfortadersystem der Leber (für unverkapselte Inseln), das Omentum und die Bauchhöhle (Gustavson et al. 2005). Welcher Transplantationsort letztendlich in der Klinik den Vorzug erhalten wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Die unverkapselten Inseln wurden bisher in das Pfortadersystem der diabetischen Patienten transplantiert (Bucher et al. 2004) oder, in spezielle Trägersysteme verpackt, unter die Bauchhaut (Kobayashi 2008).

5.3.5. Therapie des experimentellen Diabetes

Der vor Transplantation #1 beobachtete gravierende Vitalitätsverlust der mikroverkapselten Langerhans-Inseln (s. o.) liess uns daran zweifeln, dass dieses Transplantat Normoglykämie im Empfänger induzieren könnte. Folgerichtig zeigten die Nachuntersuchungen durchweg eine persistierende diabetische Stoffwechsellage. Dies musste aber noch nicht dafür sprechen, dass die Transplantation ein voller Misserfolg gewesen wäre. Erst der Nicht-Anstieg des C-Peptids nach Glukose- oder Argininstimulus würde dies signalisieren. Nach Transplantation #1 wurde – trotz der diabetischer Stoffwechsellage – ein Anstieg des C-Peptids nach dem ersten Glukosestimulus beobachtet, der vor Transplantation #1 nicht auftrat. Dieser Effekt kann mit der Restfunktion des Transplantates erklärt werden – eine häufige Beobachtung auch nach der allogenen klinischen Transplantation, was somit einen ersten kleinen Erfolg darstellt. Nach Transplantation #2 konnte kein C-Peptid gemessen werden. Hierfür könnten verschiedene Faktoren verantwortlich sein: die zu geringe Anzahl transplantiertes Inseln; immerhin wurden bei #2 mit 426.000 Inseln nur etwa $\frac{1}{2}$ so viele transplantiert wie bei Transplantation #1. Die ausschliessliche Transplantation in die freie Bauchhöhle ist insofern problematisch, als die Inseln dort in den ersten Tagen – bis zur Vaskularisierung der Mikrokapillaren – nur unzureichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Dies ist ein in der Inselzell-Transplantation bisher noch ungelöstes Problem. In anderen Arbeiten wurde z. B. gezeigt, dass viele Inselzellen selbst nach Transplantation in das Pfortadersystem innerhalb der ersten 7 Tage „verloren gehen“ bzw. Funktionsverluste erleiden (Emamaullee and Shapiro 2007; Pawelec et al. 2008; Eich et al. 2007).

5.3.6. Explantation der mikroverkapselten Langerhans-Inseln

Die Explantation des Transplantat #1 brachte ein unerwartetes Ergebnis: Die grosse Anzahl jener Langerhans-Inseln, die in die Bauchhöhle übertragen worden waren, hatte sich in grossflächigen Aggregaten auf der Oberfläche von Milz und Leber und der abdominalen Seite des Zwerchfells angesiedelt. Natürlich wurden auch freie Doppelkapseln aus der Bauchhöhle gewaschen (Lavage); sie waren aber deutlich in der Minderzahl. Dieses feste Anwachsen/Verwachsen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden; welche zell- und molekularbiologischen Prozesse diese Entwicklung steuern, ist nicht bekannt. Denkbar ist, dass organspezifische Cytokine das *homing* der Langerhans-Inseln steuern; hier bedarf es aber noch detaillierter Untersuchungen. Ganz ähnliche Beobachtungen, d. h. die Zusammenlagerung der Mikrokapseln zu grösseren Gruppen (Aggregaten) haben wir in der eigenen Arbeitsgruppe im Modell *Schwein-auf-Ratte* gemacht (unveröffentlicht); bevorzugte Orte der Adhäsion waren das Pankreas, das Zwerchfell, die Leber und die Milz. Tatsache ist, dass jede einzelne Mikrokapsel von einem Kapillarnetz umgeben ist, womit die Versorgung der Zellen im Inneren gesichert sein dürfte. Zu überbrücken bliebe dann immer noch die kritische Phase von 7-14 Tagen nach Transplantation, in der sich das Kapillarnetz in der Regel ausbildet.

Die Explantation von Transplantat #2 entfiel, da das Tier eine rapide Pneumonie entwickelte und ohne Rücksprache mit dem Versuchsleiter aus dem Versuch genommen werden musste; dies ist ein logistischer Misserfolg, der zukünftig unbedingt zu vermeiden ist.

Die hier geschilderten Pilotversuche zeigen, dass die allogene Transplantation *Schwein-auf-Schwein* grundsätzlich erfolgreich durchführbar ist. Wir konstatieren auch, dass diese Versuche, im Sinne der angestrebten Therapie, dann erfolgreich sein werden, wenn es gelingt, strukturell gut erhaltene, hochvitale, mikroverkapselte Langerhans-Inseln in ausreichender Anzahl zu transplantieren. Die hier beschriebenen technischen Hürden sind – und das beweist diese Arbeit – überwindbar.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein diabetisches Modell im Grosstier *Schwein* zu etablieren, um noch fehlende Voraussetzungen für eine spätere klinische xenogenen Inselzell-Transplantation in der dann relevanten Kombination *Schwein-auf-Mensch* zu evaluieren. Zwei Verfahren wurden erprobt: die Diabetes-Induktion mit dem Betazellgift Streptozotocin (STZ) und mittels Pankreatektomie (PE). Transplantationen mit Alginat-mikroverkapselten Langerhans-Inseln im experimentellen Modell *Schwein-auf-Schwein* sollten die Tragfähigkeit des diabetischen Modells zeigen, wie auch das Zusammenspiel aller beteiligten Personen und technisch-methodischen Abläufe *in vivo* trainieren. Göttinger Miniaturschweine (GMS) dienten als diabetische Empfänger, Schweine der Deutschen Landrasse (DL) als Spender der Langerhans-Inseln. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

(1) Da die GMS eng verwandte Tiere und keine etablierte Inzucht sind, und die wenigen Literaturdaten zur Glukosephysiologie variierten, wurden Blutzucker-, Insulin- und C-Peptidprofile von unbehandelten und diabetischen GMS (STZ; PE) vergleichend erstellt. Dies geschah mit Hilfe des *Real Time Glucose Monitoring* (RTGM), bekannt aus der Humanmedizin. Hieraus wurde ein spezielles Insulin-Therapieprotokoll entwickelt, mit dem diabetische GMS über mehrere Monate – bis zur Transplantation – in sehr gutem Allgemeinzustand gehalten wurden.

(2) Die Pankreatektomie am Schwein (DL) wurde von uns in Würzburg neu etabliert; damit waren erstmals Spenderorgane von hoher Qualität für die Inselzell-Isolierung verfügbar. So erhöhte sich die Vitalität der Inseln um 15 % auf nun ca. 90 %. Hierbei war das von uns früher entwickelte histologische *pre-screening* stets ein zuverlässiger Parameter für die zu erwartende Insel-Masse. Die DL-Spenderschweine zeigten zudem grosse Unterschiede in der Glukosetoleranz *in vivo*; in dieser Arbeit wurden erstmals normoglykämische und eindeutig diabetische Tiere identifiziert – welche Auswirkungen dies auf die spätere Transplantatfunktion hat, ist derzeit unbekannt.

(3) In zwei Pilot-Transplantationen wurden Alginat-mikroverkapselte DL-Inseln in STZ-diabetische GMS transplantiert, in das Omentum und/oder frei in die Bauchhöhle. In keinem der beiden Versuche wurde langfristig Normoglykämie erzielt. Ursache sind u. a. Vitalitätsverluste der Inseln, da für die Mikroverkapselung vor Transplantation #1 lange Transportwege zu bewältigen waren (Abfall von 95 % auf ca. 40 % unmittelbar vor der Transplantation). Transplantat #2 enthielt deutlich weniger Inseln, welche frei in die Bauchhöhle transplantiert wurden. Hier ist die ihre Versorgung wegen der fehlenden Vaskularisierung der Mikrokapseln in den ersten post-operativen Tagen suboptimal. Die

mit einer klinischen xenogenen Inselzell-Transplantation verbundenen Arbeitsabläufe, wie auch das Zusammenspiel aller beteiligten Mitarbeiter (für die Pankreatektomie im Grosstier-OP, Isolierung der Inseln im Labor, Mikroverkapselung der Inseln, Transplantation und Nachsorge der Empfänger) wurden koordiniert und trainiert. Kein Mitarbeiter verfügte zuvor über die notwendigen Erfahrungen im Gesamtablauf; dies war für die gesamte Gruppe „Neuland“. Mit Ausnahme des Narkosezwischenfalls bei einem DL-Schwein (s. Text) wurden die Arbeitsschritte in allen Teilbereichen fehlerlos bewältigt – was als hervorragendes Ergebnis bewertet werden muss.

Das hier etablierte und *in praxi* erfolgreich erprobte diabetische Grosstiermodell steht damit für alle weiter führenden Untersuchungen zur xenogenen Transplantation von mikroverkapselten Langerhans-Inseln zur Verfügung. Im Vergleich zum prä-klinisch relevanten Modell *Affe-auf-Mensch* ist es in einem gut ausgestatteten Universitätsklinikum vergleichsweise einfach und kostengünstig zu etablieren.

7. Literatur

- Aktories K, Förstermann U, Hoffmann FB, Stark K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage.
Verlag Urban & Fischer, 2005
- Andersson A. Tissue culture of isolated pancreatic islets.
Acta Endocrinol Suppl 205: 283-294, 1976
- Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease.
Endocrin Rev 15: 516-542, 1994
- Begemann JF, Pollok JM, Kaufmann PM, Kluth D, Broelsch CE, 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
- Besse J, Billaud L, Battistelli F, Tric P, Lestrade F. Long term study of mortality and vascular complications in juvenile-onset (type I) diabetes.
Diabetes 30: 175-179, 1981
- Brendel M, Hering BJ, Schultz AO, Bretzel RG. The International Islet Transplant Registry. Justus-Liebig-Universität, Giessen.
Newsletter No. 9, 8: 1-20, 2000
- Bretzel RG, Eckhard M, Bendel MD. Pancreatic islet and stem cell transplantation: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus.
Panminerva Med 46: 25-42, 2004
- Bretzel RG, Jahr H, Eckhard M, Martin I, Winter D, Brendel MD. Islet cell transplantation today.
Langenbecks Arch Surg 392: 239-253, 2007
- Bucher P, Mathe Z, Bosco D, Becker C, Kessler L, Greget M, Benhamou PY, Andres A, Oberholzer J, Buhler L, Morel P, Berney T. Morbidity associated with intraportal islet transplantation.
Transplant Proc 36: 1119-1120, 2004
- Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, Bantle JP, Sledge I. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and metaanalysis.
Am J Med 122: 248-256, 2009

- Cardona K, Korbitt GS, Milas Z, Lyon J, Cano J, Jiang W, Bello-Laborn H, Hacquoil B, Strobert E, Gangappa S, Weber CJ, Pearson TC, Rajotte RV, Larsen CP. Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways.
Nat Med 12: 304-306, 2006
- Chaillous L, Darquy S, Maugeudre S, Rivereau AS, Reach G, 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
- Clarke BF, Ewing DJ, Campbell IW. Diabetic autonomic neuropathy.
Diabetologia 17: 195-212, 1979
- Classen M, Diehl V, Kochsiek K. Innere Medizin, 5. Auflage.
Verlag Urban & Fischer, 2004
- Clayton HA, James RF, London NJ. Islet microencapsulation: a review.
Acta Diabetol 30:181-189, 1993
- Cudworth AG, White GB, Woodrow JC, Gamble DR, Lendrum, Bloom A. Aetiology of juvenile-onset diabetes. A prospective study.
Lancet 1(8008): 385-388, 1977
- Davies MD. Diabetic retinopathy, diabetes control and blood pressure.
Transplant Proc 18: 1565-1568, 1986
- Deckert D, Poulsen JE. Diabetic neuropathy: Fault or destiny?
Diabetologia 21: 178-183, 1981
- Denner J. Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation?
Arch Virol 153: 1421-1426, 2008
- Denner J, Specke V, Karlas A, Chodnevskaja I, Meyer T, Moskalenko V, Kurth R, Ulrichs K. No transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in a long-term pig to rat xenotransplantation model and no infection of immunosuppressed rats.
Ann Transplant 13: 20-31, 2008
- Dufrane D, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept.
Transplantation 81:1345-1353, 2006

- Dufrane D, Gianello P. Pig islet xenotransplantation into non-human primate model.
Transplantation 86: 753-760, 2008
- Edamura K, Itakura S, Nasu K, Iwami Y, Ogawa H, Sasaki N, Ohgawara H. Xenotransplantation of Porcine Pancreatic Endocrine Cells to Total Pancreatectomized Dogs.
J Vet Med Sci 65: 549-556, 2003
- Eich T, Eriksson O, Sundin A, Estrada S, Brandhorst D, Brandhorst H, Langstrom B, Nilsson B, Korsgren O, Lundgren T. Positron emission tomography: a real-time tool to quantify early islet engraftment in a preclinical large animal model.
Transplantation 84: 893-898, 2007
- El Aoufi S, Gendre P, Sennoune SR, Rigoard P, Maixent JM, Griene L. A high calorie diet induces type 2 diabetes in the desert sand rat (*Psammomys obesus*).
Cell Mol Biol 53 Suppl: 943-953, 2007
- Elliott RB, Escobar L, Tan PL, Muzina M, Zwain S, Buchanan C. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation.
Xenotransplantation 14: 157-161, 2007
- Emamaullee JA, Shapiro AMJ. Factors influencing the loss of beta-cell mass in islet transplantation.
Cell Transplant 16: 1-8, 2007
- Engelhart v D. Diabetes in Medizin und Kulturgeschichte.
Springer Verlag, 1989
- Gäbel H, Bitter-Suermann H, Henriksson C, Säve-Söderbergh J, Lundholm K, Brynner H. Streptozotocin Diabetes in Juvenile Pigs. Evaluation of an Experimental Model.
Horm Metabol Res 17: 275-280, 1985
- Gerabek W, Haage BD, Keil G. Enzyklopädie Medizingeschichte. 1. Auflage.
Verlag Gruyter, 2004
- Goto M, Johansson U, Eich TM, Lundgren T, Engkvist M, Felldin M, Foss A, Kallden R, Salmela K, Tibell A, Tufveson G, Nilsson B, Korsgren O. Key factors for human islet isolation and clinical transplantation.
Transplant Proc 37: 1315-1316, 2005
- Graf EF, Bothe W. Mikroverkapselung durch Zertropfen.
Pharmazie in unserer Zeit 13: 71-82, 1984

- Grüssner R, Nakhleh R, Grüssner A, Tomadze G, Diem P, Sutherland D. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in pigs.
Horm Metab Res 25: 199-203, 1993
- Gustavson SM, Rajotte RV, Hunkeler D, Lakey JR, Edgerton DS, Neal DW, Snead WL, Penaloza AR, Cherrington AD. Islet auto-transplantation into an omental or splenic site results in a normal beta cell but abnormal alpha cell response to mild non-insulin-induced hypoglycemia.
Am J Transplant 5: 2368-2377, 2005
- Hasse C, Schlosser A, Klöck G, Barth P, Stinner B, Zimmermann U, Rothmund M. Heterologous transplantation of human parathyroid glands after microencapsulation with clinically suitable alginate: long-term function without immunosuppression in the animal model.
Langenbecks Arch Chir Suppl 115: 713-718, 1998
- Heiser A. Reindarstellung der Langerhans-Inseln aus dem Pankreas von Schweinen und ihre immunbiologische Charakterisierung.
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts Universität zu Kiel, 1994
- Heiser A, Ulrichs K, Müller-Ruchholtz W. Influence of porcine strain, age, and pH of the isolation medium on porcine pancreatic islet isolation success.
Transplant Proc 26: 618-620, 1994
- Hering C, Cunningham DA, Whittam AJ, Fernández-Suárez XM, Langford GA. Monitoring xenotransplant recipients for infection by PERV.
Clin Biochem 34: 23-27, 2001
- Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hardstedt M, Aasheim TC, Jie T, Ansit JD, Nakano M, Cheng J, Li W, Moran K, Christians U, Finnegan C, Mills CD, Sutherland DE, Bansal-Pakala P, Murtaugh MP, Kirchoff N, Schuurman HJ. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates.
Nat Med 12: 301-303, 2006
- Jain K, Asina S, Yang H, Blount ED, Smith BH, Diehl CH, Rubin AL. Glucose control and long-term survival in biobreeding/Worcester rats after intraperitoneal implantation of hydrophilic containing islets without immunosuppression.
Transplantation 68: 1693-1700, 1999

- Kaiser N, Neshar R, Donath MY, Fraenkel M, Behar V, Magnan C, Ktorza A, Cerasi E, Leibowitz G. Psammomys obesus, a model for environment-gene interactions in type 2 diabetes.
Diabetes 54 Suppl 2: 137-144, 2005
- Kin T, Korbitt GS, Kobayashi T, Dufour JM, Rajotte RV. Reversal of diabetes in pancreatectomized pigs after transplantation of neonatal porcine islets.
Diabetes 54:1032-1039, 2005
- Klöck G, Frank H, Houben R, Zekorn T, Horcher A, Siebers U, Wöhrle M, Federlin K, Zimmermann U. Production of purified alginates suitable for use in immunisolated transplantation.
Appl Microbiol Biotechnol 40: 638-643, 1994
- Kobayashi K, Kobayashi N, Okitsu T, Yong C, Fukazawa T, Ikeda H, Kosaka Y, Narushima M, Arata T, Tanaka N. Development of a porcine model of type 1 diabetes by total pancreatectomy and establishment of a glucose tolerance evaluation method.
Artif Organs 28: 1035-1042, 2004
- Kobayashi N. Bioartificial pancreas for the treatment of diabetes.
Cell Transplant 17: 11-17, 2008
- Kobayashi T, Aomatsu Y, Iwata H, Kin T, Kanehiro H, Hisanga M, Ko S, Nagao M, Harb G, Nakajima Y. Survival of microencapsulated islets at 400 days post-transplantation in the omental pouch of NOD mice.
Cell Transplant 15: 359-365, 2006
- Krickhahn M, Meyer T, Bühler C, Thiede A, Ulrichs K. Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation: numbers, purity yield and in vivo function.
Ann Transplant 6: 48-54, 2001
- Krickhahn M, Bühler C, Meyer T, Thiede A, 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

- Kumagai N, LaMattina JC, Kamano C, Vagefi PA, Barth RN, O'Neil JJ, Yamamoto S, Moran SG, Utsugi R, Sachs DH, Yamada K. Vascularized islet cell transplantation in miniature swine: islet-kidney allografts correct the diabetic hyperglycemia induced by total pancreatectomy.
Diabetes 51: 3220-3228, 2002
- Lakey JR, Warnock GL, Rajotte RV. Intrathymic transplantation of fresh and cryopreserved islets for the induction of a state of unresponsiveness in rats.
Transplantation 61: 506-508, 1996
- Lanza RP, Butler DH, Borland KM, Staruk JE, Faustman DL, Solomon BA, Muller TE, Rupp RG, Maki T, Monaco AP. Xenotransplantation of canine, bovine, and porcine islets in diabetic rats without immunosuppression.
Proc Natl Acad Sci USA 88: 11100-11104, 1991
- Lanza RP, Kühtreiber WM, Ecker D, Staruk JE, Chick WL. Xenotransplantation of porcine and bovine islets without immunosuppression using uncoated alginate microspheres.
Transplantation 59: 1377-1384, 1995
- Lanza RP, Jackson R, Sullivan A, Ringeling J, McGrath C, Kühtreiber W, Chick WL. Xenotransplantation of cells using biodegradable microcapsules.
Transplantation 67: 1105-1111, 1999
- Larsen MO, Rolin B. Use of the Göttingen minipig as a model of diabetes, with special focus on type 1 diabetes research.
ILAR J 45: 303-313, 2004
- Lendrum R, Walker G, Gamble DR. Islet-cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset.
Lancet 1(7912): 880-882, 1975
- Magre S, Takeuchi Y, Bartosch B. Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses.
Rev Med Virol 13: 311-329, 2003
- Malecki MT. Genetics of type 2 diabetes mellitus.
Diab Res Clin Pract 68 Suppl 1: 10-21, 2005
- Marcelli-Tourvieille S, Hubert T, Pattou F, Vantyghem MC. Acute insulin response (AIR): review of protocols and clinical interest in islet transplantation.
Diabetes Metab 32: 295-303, 2006

- Meyer T, Bühler C, Debus S, Beutner U, Otto C, Timmermann W, Tsapenko N, Hamelmann W, Thiede A, Ulrichs K. Traumatized pigs are unsuitable as organ donors for pancreatic islet isolation.
Transplant Proc 30: 2475-2477, 1998
- Meyer T, Breuer S, Bühler C, Popel A, Beutner U, Klöck G, Thiede A, Ulrichs K. Cellular and humoral immune reactions in rats with long-term functioning microencapsulated porcine pancreatic islet grafts.
Xenotransplantation 8 Suppl 1: 22, 2001
- Meyer T, Höcht B, Ulrichs K. Xenogeneic islet transplantation of microencapsulated porcine islets for therapy of type I diabetes: long-term normoglycemia in STZ-diabetic rats without immunosuppression.
Pediatr Surg Int 24: 1375-1378, 2008
- Morgensen CE, Steffes MW, Deckert T, Sandahl-Christiansen J. Functional and morphological renal manifestations in diabetes mellitus.
Diabetologia 21: 89-93, 1981
- Morsiani E, Fogli L, Lanza G Jr, Lebow LT, Demetriou AA, Rozga J. Long-Term Insulin Independence Following Repeated Islet Transplantation in Totally Pancreatectomized Diabetic Pigs.
Cell Transplant 11: 55-66, 2002
- Nakagawara G, Kojima Y, Mizukami T, Ono H, Miyazaki I. Experimental studies on cadaver pancreas preserved by perfusion.
Gastroenterol Jpn 16: 514-520, 1981
- Okitsu T, Kobayashi N, Jun HS, Shin S, Kim SJ, Han J, Kwon H, Sakaguchi M, Totsugawa T, Kohara M, Westerman KA, Tanaka N, Leboulch P, Yoon JW. Transplantation of reversibly immortalized insulin-secreting human hepatocytes controls diabetes in pancreatectomized pigs.
Diabetes 53: 105-112, 2004
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs.
Nat Med 3: 282-286, 1997
- Pawelec K, Juszczak MT, Kumar A, Powis SH, Press M. Time course of islet loss after intraportal transplantation.
Ann N Y Acad Sci 1150: 230-233, 2008

- Permutt MA, Chiu K, Ferrer J, Glaser B, Inoue H, Nestorowicz A, Stanley CA, Tanizawa Y. Genetics of type II diabetes.
Recent Prog Horm Res 53: 201-216, 1998
- Rajab A, Buss J, Diakoff E, Hadley GA, Osei K, Ferguson RM. Comparison of the Portal Vein and Kidney Subcapsule as Site for Primate Islet Autotransplantation.
Cell Transplant 17: 1015-1023, 2008
- Rajotte RV. Islet cryopreservation protocols.
Ann N Y Acad Sci 875: 200-207, 1999
- Rakotoambinina B, Timsit J, Deschamps I, Laborde K, Gautier D, Jos J, Boitard C, Robert JJ. Insulin responses to intravenous glucose, intravenous arginine and a hyperglycaemic clamp in ICA-positive subjects with different degrees of glucose tolerance.
Diab Metab 23: 43-50, 1997
- Ricordi C, Socci C, Davalli AM, Staudacher C, Baro P, Vertova A, Sassi I, Gavazzi F, Pozza G, Di Carlo V. Isolation of the elusive pig islet.
Surgery 107: 688-694, 1990
- Ricordi C, Socci C, Davalli AM, Staudacher C, Vertova A, Baro P, Sassi I, Braghi S, Guizzi N, Pozza G. Application of the automated method to islet isolation in swine.
Transplant Proc 22: 784-785, 1990
- Rogers SA, Liapis H, Hammerman MR. Intraperitoneal transplantation of pancreatic anlagen.
ASAIO J 49: 527-532, 2003
- Rood RR, Buhler LH, Bottino R, Trucco M, Cooper DK. Pig to nonhuman primate islet xenotransplantation: a review of current problems.
Cell Transplant 15: 89-104, 2006
- Roth F. Co-Kultivierung von Langerhans'schen Inseln und GLP-1 produzierenden Zellen in einer biokompatiblen Matrix.
Diplomarbeit, Biologische Fakultät, Universität Würzburg, 2005
- Ryan EA, Lakey RJT, Rajotte RV, Korbutt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliot JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AMJ. Islet clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol.
Diabetes 50: 710-719, 2001

- Sambanis A. Encapsulated islets in diabetes treatment.
Diab Technol Ther 5: 665-668, 2003
- Sambanis A. Engineering challenges in the development of an encapsulated cell system for treatment of type 1 diabetes. Review.
Diab Technol Ther 2: 81-89, 2000
- Schmidt RF, Thews G, Lang F. Physiologie des Menschen. 28. Auflage.
Springer Verlag, 2000
- Shafir E. Albert Renold memorial lecture: molecular background of nutritionally induced insulin resistance leading to type 2 diabetes – from animal models to humans.
Int J Exp Diab Res: 2: 299-319, 2001
- Shafir E, Ziv E, Kalman R. Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: *Acomys cahirinus* (spiny mice) and *Psammomys obesus* (desert gerbil).
ILAR J 47: 212-224, 2006
- Shapiro AM et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation.
N Engl J Med 355: 1318-1330, 2006
- Siebers U, Horcher A, Bretzel RG, Federlin K, Zekorn T. Alginate-based microcapsules for immunoprotected islet transplantation.
Ann N Y Acad Sci 831: 304-312, 1997
- Srinivasan P, Huang GC, Amiel SA, Heaton ND. Islet cell transplantation.
Postgrad Med J 83: 224-229, 2007
- Stadlbauer V, Schaffellner S, Iberer F, Lackner C, Liegl B, Zink B, Kniepeiss D, Tscheliessnigg KH. Occurance of apoptosis during ischemia in porcine pancreas islet cells.
Int J Artif Organs 26: 205-210, 2003
- Sun YL, Ma X, Zhou D, Vacek I, Sun AM. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression.
J Clin Invest 98: 1417-1422, 1996
- Sykes M, Cozzi E. Xenotransplantation of pig islets into Mexican children: were the fundamental ethical requirements to proceed with such a study really met?
Eur J Endocrinol 154: 921-922, 2006

- Szot GL, Koudria P, Bluestone JA. Transplantation of pancreatic islets into the kidney capsule of diabetic mice.
J Vis Exp 9: 404, 2007
- Tanioka Y, Hering BJ, Sutherland DE, Kronson JW, Kuroda Y, Gilmore TR, Aasheim TC, Rusten MC, Leone JP. Effect of pancreatic warm ischemia on islet yield and viability in dogs.
Transplantation 64:1637-1641, 1997
- The Diabetes Control and Complication Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in the insulin-dependent diabetes mellitus.
N Engl J Med 329: 977-986, 1993
- Tooke JE. Microvascular function in human diabetes. A physiological perspective.
Diabetes 44: 721-726, 1995
- Turner RC, Hattersley AT, Shaw JT, Levy JC. Type II diabetes: clinical aspects of molecular biological studies.
Diabetes 44: 1-10, 1995
- Tyden G, Bolinder J, Solders G, Brattström C, Tibell A, Groth C. 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
- Ulrichs K, Hamelmann W, Bühler C, Beutner U, Meyer T, Otto C, Klöck G, Thiede A. Transplantation of porcine Langerhans islets for therapy of type I diabetes. The way to clinical application.
Zentralbl Chir 124: 628-635, 1999
- Uludag H, De Vos P, Tresco PA. Technology of mammalian cell encapsulation.
Adv Drug Deliv Rev 42: 29-64, 2000
- Valdés-González RA, White DJ, Dorantes LM, Terán L, Garibay-Nieto GN, Bracho-Blanchet E, Dávila-Pérez R, Evia-Viscarra L, Ormsby CE, Ayala-Sumuano JT, Silva-Torres ML, Ramirez-González B. Three-yr follow-up of a type 1 diabetes mellitus patient with an islet xenotransplant.
Clin Transplant 21: 352-357, 2007

- Wilkin T, Hoskins PJ, Armitage M, Rodier M, Casey C, Diaz JL, Pyke DA, Leslie RD. Value of insulin autoantibodies as serum markers for insulin dependent diabetes mellitus.
Lancet 1(8427): 480-481, 1985
- Wilson CA. Porcine endogenous retro viruses and xenotransplantation.
Cell Mol Life Sci 65: 3399-3412, 2008
- Windt van der DJ, Echeverri GJ, Ijzermans JNM, Cooper DKC. The Choice of the Anatomical Site for Islet Transplantation.
Cell Transplant 17: 1005-1014, 2008
- Zhang Z, Bédard E, Luo Y, Wang H, Deng S, Kelvin D, Zhong R. Animal models in xenotransplantation.
Expert Opin Invest Drugs 9: 2051- 2068, 2000

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Experimentellen Chirurgie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Frau Professor Dr. K. Ulrichs angefertigt. Ihr gilt mein ganz besonderer Dank, dafür dass sie sie meine Arbeit mit grosser Passion, nie nachlassendem Engagement und der steten Bereitschaft, mich nach Kräften zu fördern, begleitet hat.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung mit Mitteln der Grundausstattung, die mit diesen material-, arbeits- und zeitaufwendigen Untersuchungen verbunden sind, möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. C.-T. Germer, dem Direktor der Klinik, sowie seinem Vorgänger, Herrn Professor Emeritus Professor h. c. Dr. A. Thiede, sehr bedanken.

Die vorliegende Arbeit war in grossen Teilen nur im Team zu bewältigen. Vor allem für die praktische und theoretische Hilfe in allen Fragen der Chirurgie in Grosstieren und ihrer Intensivhaltung, sowie für seine herzliche Freundschaft möchte ich Herrn Dr. V. Moskalenko (jetzt Universitätsklinikum Mainz) sehr herzlich danken.

Darüber hinaus gilt mein ganz besonderer Dank Frau Dr. I. Chodnevskaja, Herrn Dr. C. Tiurbe, Herrn A. Reichert, Herrn J. Weinberger, Herrn B. Heuler und Frau B. Schneiker für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Isolierung der Langerhans-Inseln, den verschiedenen Färbungen, OP-Assistenz und der Haltung und Betreuung der Tiere. Ohne ihre technische und Hilfe und hohe Kompetenz wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Im Übrigen danke ich allen Kolleginnen und Kollegen der Experimentellen Chirurgie, die mich jederzeit freundlich unterstützt haben.

Ich danke den Mitarbeitern der CellMed AG in Alzenau für die freundliche Bereitstellung der Alginat-Doppelkapseln.

Diese Arbeit wurde zu grossen Teilen mit Mitteln der Europäischen Union (6th Framework Programme, 2002-2006; Project BARP+ NMP3-CT-2003-505614) finanziert).

Anhang

Insulin-Therapie für diabetische Göttinger Miniaturschweine, wie sie in den hiesigen Untersuchungen entwickelt wurde.

Zur Definition des Diabetes im Schwein

- Nüchtern-Blutzucker >126 mg/dL
- Spontan-Blutzucker >200 mg/dL
- 1 h nach Glukosebolus im oralen Glukosetoleranztest >200 mg/dL

Einige allgemeine Bemerkungen

- Jede Hypoglykämie kann ein Schwein töten, deshalb sollte man im Zweifelsfall eher weniger als mehr Insulin verabreichen;
- Hyperglykämien schaden den Tieren vermutlich erst im längern Versuchsverlauf, speziell wenn der Diabetes schleichend beginnt.
- Wasser sollte *ad libitum* gegeben werden und die Fütterung einmal am Tag mit einer zuvor festgelegten Futtermenge erfolgen;
- die hiesigen GMS wogen 35-50 kg; auf dieses Gewicht beziehen sich die Empfehlungen;
- ob dieses Vorgehen auch bei schwereren Schweinen und den gebräuchlichen Hauschweinerassen angebracht ist, muss geprüft werden; vermutlich steigt der Insulin-Bedarf bei übergewichtigen Schweinen, die möglicherweise eine periphere Insulin-Resistenz entwickeln, an;
- es ist hilfreich, ein *Real Time Glucose Monitoring* durchzuführen, um die Insulin-Therapie zu optimieren.

Die verwendeten Insuline

- Alt-Insulin: Wirkungsbeginn: 15-30 min; Maximal-Wirkung: 1-3 h; Wirkungsdauer: 5-8h
- NovoRapid[®]: Wirkungsbeginn: <15 min; Maximal-Wirkung: 1 h; Wirkungsdauer: 2-3 h
- Lantus[®]: Wirkungsbeginn: 2-4 h; Wirkungsdauer: >24 h; kein Maximum
- Novomix[®] 30/70: Kombination aus 30 % Aspart-Insulin und 70 % Intermediär-Insulin

Die Grundlagen der Insulin-Therapie

- Akute Behandlung der Hyperglykämie: 1 I.E. Insulin (Alt-Insulin) senkt den Blutzuckerspiegel um etwa 30 mg/dL;
- der Grundbedarf beträgt etwa 0,5-1 I.E. Insulin/kg/d, es empfiehlt sich mit 0,5 I.E. Insulin/kg/d zu beginnen, um Hypoglykämien vorzubeugen;
- es sollten 2/3 morgens, 1/3 abends gegeben werden (1/2 und 1/2 ist auch möglich);
- 1/3 kurzfristig wirkendes Insulin; 2/3 langfristig wirkendes Insulin;
- Applikationszeitpunkt: Die in der Literatur empfohlene Applikation von 15 min vor Nahrungsaufnahme halten wir nicht für sinnvoll, da die Nahrungsaufnahme des Tieres nach Insulin-Gabe nicht gesichert ist. Eine einmal verabreichte Insulin-Dosis ist nicht leicht zu antagonisieren! Deshalb sollte die Insulin-Gabe während oder kurz nach der Nahrungsaufnahme erfolgen; zu diesem Zeitpunkt ist das Tier auch durch die Nahrungsaufnahme abgelenkt und hält still;
- Applikationsort: Es hat sich bewährt die Insulin-Gabe mit einem handelsüblichen Insulin-Pen hinter dem Ohr durchzuführen. Hier ist die Haut dünn genug, um sie mit einer Insulin-Nadel zu punktieren.

Unser Vorgehen

- Fütterung des Tieres morgens zu einem festgelegten Zeitpunkt; dabei Messen des Blutzuckerwertes;
- je nach Blutzuckerwert, Berechnung der Insulin-Menge (aktueller Wert – Ziel [150 mg/dL])/30 + etwa 1/3 Tagesbedarf) als Kombinations-Insulin Novomix;
- Applikation des Insulins erst, wenn die Nahrung sicher aufgenommen wurde;
- abends etwa 1/3 bis 1/2 des Tagesbedarfs als Lantus[®]-Insulin geben;
- hohe Blutzuckerwerte bei Spontanmessungen lassen sich gut mit NovoRapid[®] senken.

Sicherheitsmassnahmen

- Es sollten für den Notfall (z. B. Hypoglykämie) stets 100 mL einer G-40 % Injektionslösung und 1.000 mL G-20 % und G-5 % vorgehalten werden; ebenso alle für die Schaffung eines peripher-venösen Zugangs nötigen Materialien in mehrfacher Ausführung;

- bei Hypoglykämie: peripherer Zugang; 20 mL G-40 %; so oft wiederholen bis das Tier wieder wach ist; danach 1.000 mL G-5 % über ca. 2 h geben; regelmässige Blutzuckerbestimmungen;
- CAVE: Intravenös verabreichte Glukoselösung hebt nur für einen kurzen Zeitraum den Blutzuckerspiegel, danach sinkt er wieder. Daraus folgt im Notfall: regelmässige Blutzuckerkontrollen; hohe Blutzuckerwerte dann nicht mit Insulin behandeln, sondern dem Tier Nahrung geben;
- falls es im Laufe der Therapie zu einem starken Anstieg der benötigten Insulin-Mengen kommt, sollte geprüft werden, ob sich eine Allergie entwickelt, bzw. sich Antikörper gegen die verwendeten Insuline bilden (in diesem Fall: humanes Insulin applizieren) ausgebildet hat; ein solcher Fall wurde von uns bislang noch nicht beobachtet.

Liste der Veröffentlichungen

Peer-Reviewed Originalarbeiten

- Strauss A, Tiurbe C, Chodnevskaja I, Thiede A, Timm S, Ulrichs K, Moskalenko V. Use of the continuous glucose monitoring system in Goettingen Minipigs, with a special focus on the evaluation of insulin-dependent diabetes.
Transplant Proc 40: 536-539, 2008
- Strauss A, Moskalenko V, Chodnevskaja I, Timm S, Otto C, Ulrichs K. Exendin-4 improves the oral glucose tolerance in diabetic rats: pancreas regeneration, better function of pancreatic islets, or impaired glucose uptake?
Transplant Proc 40: 533-535, 2008

Vorträge

- Strauss A. Isolation Of Adult Islets Of Langerhans From The Porcine Pancreas Without Warm Ischemia. 5th Workshop, Arbeitskreis Transplantations-Immunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Leipzig 21. 04. 2007
- Strauss A. Das pankreatektomierte Göttinger Minipig (GMP) als Modell für die Insel-Transplantation zur Therapie des Typ I Diabetes. 16. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Mainz 12. 10. 2007

Poster

- V. Moskalenko, A. Strauss, C. Tiurbe, B. Schneiker, I. Chodnevskaja, S. Gahn, S. Timm, A. Thiede, K. Ulrichs. Explantation of Pancreata without Warm Ischemia Time (WIT) Produces Highly Viable Adult Pig Islets (PI). Joint Conference of CTS, IPITA and IXA, Minneapolis (USA), 15-20 September 2007
- V. Moskalenko, A. Strauss, C. Tiurbe, S. Timm, A. Thiede, C. Otto, K. Ulrichs. The *Continuous Glucose Monitoring System*® (CGMS) Improves Glycemic Control in Two Preclinical Goettingen Minipig (GMP) Models of Insulin Dependent Diabetes Mellitus. Joint Conference of CTS, IPITA and IXA, Minneapolis (USA), 15-20 September 2007
- A. Strauss, V. Moskalenko, S. Timm, A. Thiede, C. Otto, K. Ulrichs. Exendin-4 (Ex4) Improves The Oral Glucose Tolerance (OGT) In Diabetic Rats: Pancreas Regeneration, Better Function Of Pancreatic Islets (PI), Or Impaired Glucose Uptake? Joint Conference of CTS, IPITA and IXA, Minneapolis (USA), 15-20 September 2007