

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

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

---

**Entwicklung eines dreidimensionalen Fibringelmodells  
zur *In-Vitro*-Analyse von Fibrose und Angiogenese  
Alginate-mikroverkapselter Langerhans-Inseln**

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

vorgelegt von

Artur Medwedowsky

aus Frankfurt am Main

Würzburg, Mai 2010

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

Korreferent: Professor Dr. med. Thiede

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.11.2010

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungen</b>	
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Offene Fragen</b>	<b>8</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>9</b>
3.1 Zellkulturen	9
3.1.1 Humane Fibroblasten	9
3.1.1.1 Herstellung des Grundmediums	9
3.1.1.2 Kulturen aus Hautfibroblasten	9
3.1.1.3 Mediumwechsel	10
3.1.1.4 Subkultivierung der Zellen	10
3.1.1.5 Kryokonservierung	11
3.1.1.6 Auftauen der Zellen	11
3.1.1.7 Zellzahlbestimmung	12
3.1.2 Humane Endothelzellen	12
3.2 Isolierung porziner Langerhans-Inseln	12
3.2.1 Präparation der Pankreata	12
3.2.2 Aufbau der Isolierungsapparatur	13
3.2.3 Pankreasdesintegration	14
3.3 Herstellung von Bariumalginat-Mikrokapseln	15
3.3.1 Leere Mikrokapseln	15
3.3.2 Mikroverkapselung von Langerhans-Inseln	15
3.3.3 Kollagen-beschichtete leere Mikrokapseln	15
3.4 Untersuchungen von Zell-Mikrokapsel-Interaktionen <i>in vitro</i>	15
3.4.1 Co-Kultur leerer Mikrokapseln mit Zellen	15
3.4.2 Herstellung des zweischichtigen Fibringels	16
3.4.3 Herstellung des einschichtigen Fibringels	16
3.5 Funktionsteste	17
3.5.1 Insulinbestimmung	17
3.5.2 Zytokinbestimmungen	17
3.6 Vitalitätsprüfungen	18
3.6.1 FDA/PI-Färbung	18

3.6.2	Trypanblau-Färbung	18
3.7	Anfertigung von Paraffinschnitten	18
3.8	Hämalaun&Eosin-Färbung	19
3.9	Lichtmikroskopische Auswertung und Fotodokumentation	19
3.10	Statistische Auswertung	19
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>20</b>
4.1	Etablierung des Fibringelmodells für die Untersuchung der Mechanismen von Fibrose und Angiogenese <i>in vitro</i>	20
4.1.1	Entwicklung des zweischichtigen Fibringelmodells	20
4.1.2	Entwicklung des einschichtigen Fibringelmodells	21
4.2	Untersuchung der mitogenen Eigenschaften der mikroverkapselten Langerhans-Inseln	21
4.2.1	Einfluss der Alginat-Qualität auf die Mitogenität des Insel-Transplantates	22
4.2.2	Einfluss der Langerhans-Inseln auf die Mitogenität des Transplantates	23
4.3	Einfluss der Fibrose auf die mikroverkapselten Langerhans-Inseln	26
4.3.1	Einfluss des Fibroblasten-Wachstums im Fibringel auf die Vitalität der mikroverkapselten Langerhans-Inseln	27
4.3.2	Einfluss des Fibroblasten-Wachstums im Fibringel auf die Insulin-Sekretion der mikroverkapselten Langerhans-Inseln	27
4.4	Untersuchungen zur Angiogenese und zu den die Angiogenese beeinflussenden Faktoren <i>in vitro</i>	28
4.4.1	Einfluss der Fibrose auf die Freisetzung von VEGF aus mikroverkapselten Langerhans-Inseln	28
4.4.2	Einfluss von Insulin auf die Freisetzung von VEGF aus den humanen Fibroblasten	29
4.4.3	Wachstum humaner Endothelzellen im Fibringel mit leeren Alginat-Mikrokapseln	30
4.5	Interaktion von humanen Fibroblasten und Endothelzellen mit leeren Alginat-Mikrokapseln im Fibringel	31

4.5.1	Co-Kultur leerer Alginat-Mikrokapseln mit humanen Fibroblasten	31
4.5.2	Co-Kultur leerer Alginat-Mikrokapseln mit humanen Endothelzellen	32
4.5.3	Co-Kultur Kollagen-beschichteter Alginat-Mikrokapseln mit humanen Endothelzellen	33
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>35</b>
5.1	Etablierung des Fibringelmodells	35
5.2	Untersuchungen der Fibrose und Angiogenese im+ Fibringelmodell	38
5.3	Weitere Verwendungsmöglichkeiten des 3D-Fibringelmodells	40
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>45</b>
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Liste der Veröffentlichungen</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
2D-	zweidimensional
3D-	dreidimensional
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsufoxid
DTZ	Dithizon
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent-assay
FCS	fetal calf serum
FDA/PI	fluoresceine diacetate and propidium iodide
g	Gramm
GMS	Göttinger Miniaturschwein
h	Stunde(n)
HBSS	Hank's balanced salt solution
H&E	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HUVEC	human umbilical vein vascular endothelial cell
IE	Internationale Einheit(en)
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-8	Interleukin-8
Insel	syn. für Langerhans-Insel
Kapsel	syn. für Alginat-Mikrokapsel
kDa	Kilodalton
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
Mikrokapsel	syn. für Alginat-Mikrokapsel
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ U	microunit

NHDF-c	Fibroblasten-Zelllinie
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphate buffered saline
pg	Pikogramm
SD	standard deviation
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/mL	Units pro Milliliter
UW	University of Wisconsin
VEGF	vascular endothelial growth factor
x	mal
x g	Vielfaches der Erdanziehung

# 1 Einleitung

Es gibt Schätzungen, wonach ca. 285 Millionen Menschen weltweit an den unterschiedlichen Typen des Diabetes mellitus leiden [1]. Damit gehört er zu den am weitesten verbreiteten Erkrankungen. Eine typische Folge des Diabetes sind die gefürchteten Sekundärerkrankungen nach 15-20 Jahren – als Folge der langfristig unbefriedigenden Glukosehomöostase – trotz der täglich mehrfachen parenteralen Insulin-Injektionen: die Mikro- und Makroangiopathien, die Neuropathie, die Nephropathie und die diabetische Retinopathie. Sie verkürzen die Lebenserwartung der Diabetiker, vermindern ihre Lebensqualität und verursachen jährlich Folgekosten in vielen Milliarden Euro. Aus diesen Gründen wird nicht nur eine verbesserte Insulinsubstitution mittels Injektionen und eine der Erkrankung angepasste Lebensweise angestrebt, sondern auch die Transplantation lebender, Insulin-produzierender Zellen, denn sie unterliegen – im Gegensatz zum exogen applizierten Insulin – der körpereigenen Feinregulation; mit einer deutlich verbesserten Glukosehomöostase sollte es möglich sein, die o. g. Sekundärerkrankungen zu verhindern.

## **Exogene Insulinzufuhr**

Mering und Minkowski entdeckten 1889, dass die Entfernung der Bauchspeicheldrüse bei Hunden den Diabetes mellitus verursacht [2]. So wurde der Zusammenhang zwischen dem Pankreas und der Blutzuckerregulation festgestellt. Folglich versuchte man, verschiedene Pankreasextrakte für die Behandlung des Diabetes zu verwenden: Zum Beispiel bereitete man aus Rinderbauchspeicheldrüsen einen Extrakt zu, der in diabetischen Hunden den Blutzucker senken sollte; allerdings führten die Autoren den positiven Effekt dieses Extraktes auf Vorhandensein von Laktat zurück [3]. Sodann entwickelten Banting und Best 1922 in Toronto eine neue Methode zur Aufbereitung des Pankreasextraktes. Sie ermöglichte die schnelle Blutzuckersenkung in diabetischen Tieren [4]. Innerhalb der nächsten Jahre erkannte man, dass die wiederholte Injektion des aktiven Faktors aus diesem Extrakt (Insulin) eine wirkungsvolle Therapie des Diabetes mellitus darstellt.

## **Transplantation Insulin-produzierender Zellen**

Die Langerhans-Inseln sind inselförmige Ansammlungen endokriner Zellen in der Bauchspeicheldrüse, die ca. 1-2 % des Gewebes ausmachen und aus unterschiedlichen Zelltypen



bestehen. Die wichtigsten sind die Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen. Sie machen etwa 60-80 % der endokrinen Zellen aus. Beim Diabetes mellitus Typ 1, der auch als juveniler oder *insulin dependent diabetes mellitus* (IDDM) bekannt ist, werden spezifisch die  $\beta$ -Zellen durch einen Autoimmunprozess irreversibel zerstört, bei dem sich autoreaktive T-Zellen und/oder Autoantikörper gegen unterschiedliche Autoantigene, unter ihnen das Insulin, richten [5]. Daraus resultiert die fehlende Insulinproduktion.

Die Transplantation des gesamten Pankreas wird derzeit in einem sehr späten Stadium der Erkrankung durchgeführt, um die Produktion des Insulins wiederherzustellen. Der Eingriff ist chirurgisch anspruchsvoll und nicht ohne Risiko für den Patienten. Zudem bedarf es der lebenslangen Immunsuppression, um der Abstossung des transplantierten Organs vorzubeugen [6]. Dieser Eingriff wird zumeist zusammen mit einer allogenen Nierentransplantation bei Patienten mit Diabetes-bedingter Niereninsuffizienz durchgeführt. Entweder werden Pankreas und Niere gleichzeitig transplantiert (*SPK - simultaneous pancreas and kidney*) oder das Pankreas nach erfolgreicher Nierentransplantation übertragen (*PAK - pancreas after kidney*). Bei Diabetikern ohne ausgeprägte Niereninsuffizienz wird auch das Pankreas alleine übertragen (*PTA - pancreas transplantation alone*), vor allem dann, wenn die Einstellung des Blutzuckers trotz aller Bemühungen instabil ist und zu lebensbedrohlichen Entgleisungen führt, oder seine Lebensqualität durch die labile Stoffwechselsituation inakzeptabel eingeschränkt ist. Die Transplantationen sind mit einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität (1) und der Lebenserwartung (2) der Diabetiker verbunden. Gesichert ist, dass die kombinierte Pankreas/Nierentransplantation zur weniger hypoglykämischen Episoden (3) führt, seltener Niereninsuffizienz und hoher Blutdruck beobachtet werden [7].

Die Transplantation isolierter Langerhans-Inseln ist eine interessante Alternative zur Transplantation des Gesamtorgans. Einen durchschlagenden Erfolg versprach man sich vom sogenannten *Edmonton Protocol*, worunter eine Modifikation der bis dahin üblichen Transplantation/Immunsuppression zu verstehen ist [8]: Das bis dahin üblich Immunsuppressivum Cyclosporin A wurde durch eine geringe Dosierung des moderneren FK 506 ersetzt, ausser Rapamycin wurde der anti-Interleukin-2-Rezeptor-Antikörper Daclizumab verabreicht. Auf Corticosteroide wurde wegen ihrer diabetogenen Eigenschaften ganz verzichtet. Zudem wurden Langerhans-Inseln von mehreren Spendern verwendet und eine 2. und 3. Transplantation durchgeführt, wenn die 1. kein

befriedigendes Ergebnis lieferte. Wegen der schweren immunsuppressiven Therapie ist dieser Ansatz für die Behandlung eines komplikationsfreien Diabetes mellitus bei jungen Diabetikern nicht akzeptabel. Zwar waren die ersten Ergebnisse mit dem *Edmonton Protocol* sehr vielversprechend (80 % der Patienten benötigten 1 Jahr nach Transplantation kein exogenes Insulin mehr), jedoch zeigte sich im weiteren Verlauf, dass die Anzahl „insulinfreier“ Patienten nach 5 Jahren unter 10 % lag, und damit deutlich unter den 71 % „Insulinfreiheit“ fünf Jahre nach Transplantation des Gesamtorgans [9]. Hinzu kommt, dass für eine Transplantation 2-4 Spenderorgane benötigt werden, was die Gesamtzahl der Transplantationen und die Anzahl der transplantierten Patienten erheblich einschränkt. Klar ist, dass mit dem grösseren Erfolg der Gesamtorgan-Transplantation relativ weniger Organe für die Inselzell-Transplantation verfügbar sind. Diese Situation hat sich in den vergangenen Jahren besonders verschärft und dürfte mit dem neuen *pancreas scoring system* von Eurotransplant® noch problematischer und damit schwieriger werden [10].

### **Xenotransplantation**

Eine Quelle für Langerhans-Inseln ist das Pankreas des Hausschweins [11]. Bei der sogenannten xenogenen Inselzell-Transplantation werden adulte, neonatale oder fetale Inseln aus dem Pankreas des Schweins isoliert und in Typ I Diabetiker transplantiert. Dies ist zwischen 1990 und 1991 in zehn Diabetikern in Stockholm durchgeführt worden – allerdings mit nur sehr geringem Erfolg [12]. Vorteilhaft ist, dass sich humanes und porcines (vom Schwein stammendes) Insulin nur in einer Aminosäure unterscheiden, das porcine Insulin also sehr gut vertragen wird. Schweine sind in ausreichender Anzahl verfügbar, ihre Physiologie ähnelt der des Menschen, ihre Haltung ist kostengünstig und ethische Bedenken gegen die Verwendung porciner Transplantate sind gering. Trotz dieser vielfältigen Vorteile stehen der zukünftigen Verwendung xenogener Inselzell-Transplantate eine Reihe von Hindernissen gegenüber: (1) Die Abstossung des xenogenen Transplantats ist heftiger als die eines allogenen Transplantats [11], so dass die Immunsuppression sehr viel stärker ist als im allogenen Modell – mit allen dazugehörigen Nebenwirkungen [11], wie dies in diversen Primatenmodellen kürzlich gezeigt werden konnte [13].

### **Immunisation**

Unter Immunisation versteht man die immunologische Abschirmung des Transplantats vom Empfänger-Immunsystem mit biokompatiblen Membranen [14]. Dabei werden die

transplantierten Inseln durch eine Kapsel oder Membran vom umgebenden Gewebe getrennt, welche die Diffusion von Sauerstoff, Nährstoffen und Glukose ins Kapselinnere, und Insulin nach aussen erlauben, nicht jedoch das Eindringen von Antikörpern oder T-Zellen ins Innere der Kapsel, welche die Betazellen im Inneren schädigen könnten. Erste Versuche, um verkapselte Zellen zu transplantieren, wurden 1933 von Biceglie unternommen [15]. Hierbei wurden mit einer in einer Polymermembran umschlossene Tumorzellen in die porcine Peritonealhöhle transplantiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen lange genug überlebten, ohne vom Immunsystem zerstört zu werden.

Inzwischen wurden sehr unterschiedliche Modelle zur Verkapselung – besonders isolierter Langerhans-Inseln – entwickelt [16]. Als Materialien dienten Cellulose [17], Acryl-Copolymer-Hohlfasern, Silikon, Polylysin-Alginat, Chitosan und Biodritin, oder biologische Membranen wie etwa autologe FAS-Ligand transgene Myoblasten oder autologe Chondrozyten [18]. Dabei unterscheidet man zwischen der Makro- und der Mikroverkapselung. Mikrokapseln besitzen folgende vorteile gegenüber Makrokapseln [19]: Sie besitzen ein günstigeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis, sind leichter zu transplantieren und können leichter durch Nadelaspiration oder eine Lavage zurück gewonnen werden.

Die Mikroverkapselung kann das Überleben der porcinen Langerhans-Inseln signifikant verlängern, und dies ohne Immunsuppression. Besonders gebräuchlich sind Alginat, Naturpolymere aus braunen Meeresalgen. Mit 2-wertigen Kationen bilden die Alginat feste Hydrogele, in denen die Langerhans-Inseln eingeschlossen sind: Sauerstoff, Nährstoffe und Insulin passieren diese Barriere, nicht aber Antikörper und/oder die Zellen des Immunsystems [20]. Ob Zytokine die Barriere überwinden können, ist immer noch nicht ganz klar, und daher Gegenstand von Untersuchungen. So können die zu erwartenden heftigen immunologischen Abwehrreaktionen nach Xenotransplantation mittels Mikroverkapselung der artfremden Zellen mit biokompatiblen Alginaten weitgehend gemildert oder sogar völlig vermieden werden. Dennoch, trotz dieses sehr wirkungsvollen Schutzes vor akuter Abstossung, entwickelt sich über längere Zeit eine milde spezifische Immunantwort gegen die artfremden Zellen [21].

### **Fibrosierung der Mikrokapseln**

Das Überleben von mikroverkapselten Langerhans-Inseln ist in Tierversuchen auf ungefähr ein Jahr beschränkt. Ein Teil der explantierten mikroverkapselten Langerhans-Inseln zeigt eine perikapsuläre Fibrose, bzw. Wachstum und Ansammlung von Fibroblasten, Makrophagen und Leukozyten [22]. Das Auftreten einer Fibrose kann nicht vollständig vermieden werden. Die von Makrophagen während der Fibrose produzierten Faktoren können die mikroverkapselten Langerhans-Inseln schädigen. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 17.5 kDa), und der *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ , 51 kDa) können offenbar die semipermeable Membran durchdringen, und ihre Zytotoxizität kann zur Verschlechterung der Funktion und zum Absterben der mikroverkapselten Langerhans-Inseln führen [23]. IL-1 $\beta$  erhöht zusätzlich die Produktion des *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) in mikroverkapselten Langerhans-Inseln, was Makrophagen anlockt und die Entwicklung der Fibrose intensiviert [24]. Zudem können die Makrophagen Stickstoffmonoxid sezernieren, das in das Alginat-Hydrogel eindringt und die mikroverkapselten Inseln zerstört [25].

Eine grosse Bedeutung spielt die Biokompatibilität des Alginats. So wurde gezeigt, dass Kapseln aus *highly purified alginate* weniger zur Fibrose in der Peritonealhöhle der Ratten neigen, als Kapseln, die aus weniger reinem Alginat hergestellt wurden [26].

### **Revaskularisierung des Transplantates**

Die Versorgung der intakten Langerhans-Inseln im Pankreas erfolgt durch ein zartes Kapillarsystem, besonders fenestrierte Kapillaren [27], die während der enzymatischen Isolierung und der dann folgenden *In-Vitro*-Kultivierung nachweislich zerstört werden bzw. verklumpen [28]. Dies ist aus immunologischer Sicht unbedingt wünschenswert, um das immunogene Potential der MHC-Klasse-II-positiven Kapillaren zu senken, aus physiologischer Sicht aber fatal: Denn die isolierten Inseln können nunmehr nur über die Stoffdiffusion mit ihrer Umgebung kommunizieren. Die somit schlechtere Primärversorgung der Inseln führt zum Absterben der Betazellen, zu zentralen Inselnekrosen, besonders wenn es sich um grosse Inseln (>250  $\mu$ m Durchmesser) handelt, und zur verzögerten Insulin-Ausschüttung auf einen Glukosereiz [29]. Verschiedene Autoren, wie auch die eigene Arbeitsgruppe, berichten bzw. beobachten, dass die Revaskularisierung der Inselzell-Transplantate im Empfänger ca. 7-14 Tage benötigt [30]; damit kommt ihr eine entscheidende Rolle für das Überleben und die Funktionsfähigkeit

der transplantierten Zellen zu. In diesem Zusammenhang dürften Angiogenese-Faktoren, wie etwa der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) eine ganz besondere Rolle spielen [31]. Im Idealfall wäre es wünschenswert, wenn man die Fibrosierung komplett unterdrücken und die Angiogenese so früh wie möglich induzieren könnte. Dies erscheint nahezu unmöglich, da beide Prozesse unmittelbar miteinander verknüpft sind [32].

### **Fibringel als 3-dimensionale Matrix**

Um die molekularen und zellulären Mechanismen von Angiogenese und Fibrose differenziert und detailliert *in vitro* zu untersuchen, muss ein Ersatz für die extrazelluläre Matrix geschaffen werden. In den letzten Jahren wurden insbesondere Hydrogele als extrazelluläre Matrices im *tissue engineering* verwendet, wobei das Fibringel bevorzugt eingesetzt wurde [33]. Fibrin ist ein natürliches und bioabbaubares Polymer, welches das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung in biologischen Prozessen unterstützt. Fibrinogen wird bei der Blutgerinnung durch das Enzym Thrombin und Calcium in Fibrin umgewandelt. Das Fibrin bietet eine perfekte 3-dimensionale extrazelluläre Matrix, die eine wichtige Rolle in der Hämostase, in der Wundheilung und in der Entwicklung von Tumoren spielt. Während der Blutgerinnung wird Fibrinogen durch Thrombin in ein Fibrinnetzwerk polymerisiert, in dem unterschiedliche Blutzellen und Proteine eingeschlossen sind. Das Fibringel ist in seiner Struktur der extrazellulären Matrix in mehreren Geweben ähnlich und ist biokompatibel. Es ermöglicht die Migration und die Proliferation sehr unterschiedlicher Zellarten, z. B. von Fibroblasten, Chondrozyten, glatten Muskelzellen, Keratinozyten und anderen [33-35]. Bei andauernder Kultur der Zellen im Fibringel kommt es zur Fibrinolyse. Um die Struktur und die Stabilität des Fibringels zu erhalten, kann dem Fibringel bzw. dem umgebenden Zellkulturmedium ein Protease-Inhibitor, z. B. Aprotinin, zugefügt werden [36].

In der Literatur werden mehrere sehr unterschiedliche Methoden beschrieben, um Zellen im Fibringel zu untersuchen:

- (1) Die Zellen werden nach der Polymerisation des Fibrins auf der Fibringel-Oberfläche verteilt [37].
- (2) Es erfolgt die Herstellung des Fibringels zusammen mit den Zellen, die sich dann gleichmässig im Fibringel verteilen [38].
- (3) Ein *Fibringel Bead Assay* für die Untersuchung der Angiogenese: Die Endothelzellen werden auf Microcarrier aufgetragen und in ein Fibringel

eingebettet. Fibroblasten werden an der Oberfläche des Gels gezüchtet. Dabei produzieren sie die erforderlichen löslichen Faktoren, um das Wachstum von Endothelzellen von der Oberfläche der Microcarrier zu fördern [39].

- (4) Zunächst werden Zellen auf dem Boden der Kulturschale bis zum Erreichen der Konfluenz gezüchtet, und anschliessend mit dem Fibringel bedeckt [40].
- (5) In der Mitte des Fibringels wird ein Loch ausgestanzt, in das dann die Zellen pipettiert werden [41].

## 2 Offene Fragen

Ausgehend von dem Ziel, Fibrose und Angiogenese im Rahmen der Transplantation mikroverkapselter Langerhans-Inseln näher zu studieren, dies zunächst *in vitro*, und ausgehend vom Stand der Forschung, wie er in der Einleitung dargelegt wurde, galt es folgende offene Fragen zu bearbeiten:

- (1) Gelingt es, ein Fibringelmodell zu etablieren, mit dessen Hilfe die Mechanismen von Fibrose und Angiogenese dreidimensional *in vitro* untersucht werden können? Unklar war, welches der bereits bestehenden Modelle, das zweischichtige oder das einschichtige, für die hiesigen Untersuchungen besser geeignet sei.
- (2) In einem optimierten 3D-Modell war dann die Frage nach den mitogenen Eigenschaften der mikroverkapselten Langerhans-Inseln zu klären. Im Fokus der Untersuchungen stand hier die Qualität des Alginats wie auch die vitale Langerhans-Insel selbst.
- (3) Offen war auch die Frage nach dem Einfluss der Fibrose auf die mikroverkapselten Langerhans-Inseln. Hier sollte der Einfluss des Fibroblasten-Wachstums auf Vitalität und Insulin-Sekretion der Langerhans-Inseln untersucht werden.
- (4) Fragen zur Untersuchung der Angiogenese und den sie beeinflussenden Faktoren beinhalteten Analysen zur Freisetzung von VEGF aus den mikroverkapselten Langerhans-Inseln (durch Fibrose und/oder Insulin), wie auch den Versuch, aus Endothelzellen gefäßähnliche Strukturen im Fibringel zu generieren.
- (5) Die letzte Frage betraf die Interaktion von Fibroblasten/Endothelzellen und leeren Mikrokapseln im 3D-Fibringel. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der schnellen Ausbildung von Gefäßen; zu diesem Zweck sollten eine Kollagenbeschichtung der Mikrokapseln und der Zusatz von VEGF zum Kulturmedium erprobt werden.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Zellkulturen**

##### **3.1.1 Humane Fibroblasten**

###### **3.1.1.1 Herstellung des Grundmediums**

Das verwendete Grundmedium (DMEM High Glucose, 500 mL; Fa. Cell Concepts, Umkirch) enthält anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, Glukose (4.500 mg/mL), Puffer und den Indikator Phenolrot. Damit die Zellen *in vitro* optimal gedeihen, müssen dem Grundmedium einige Substanzen zugefügt werden. Dies sind: 50 mL fötales Kälberserum (FCS; Fa. Cell Concepts), entspricht 10 % FCS Endkonzentration, 5 mL Penicillin/Streptomycin-Lösung (Fa. Cell Concepts), entspricht 1 % Endkonzentration und 5 mL L-Glutamin (Fa. Cell Concepts), entspricht 1 % Endkonzentration.

Das FCS, das Wachstumsfaktoren, Hormone und Proteine wie Albumin enthält, wurde zuvor bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und bei 56 °C für 30 min Hitze-inaktiviert. Dadurch werden im Serum enthaltene Komplementfaktoren und kreuzreagierende Immunglobuline zerstört. Eine Komplementaktivierung würde die zu kultivierenden Zellen lysieren und töten. Die Antibiotika sollen das Risiko einer bakteriellen Kontamination ausschalten. Das FCS, wie auch die anderen Lösungen, wurden portioniert und bei -20 °C tief gefroren oder im Kühlschrank gelagert, um eine gleich bleibende Qualität des Mediums zu gewährleisten. Das gebrauchsfertige Medium (Vollmedium) wurde im Kühlschrank maximal zwei Wochen bei +4 °C gelagert.

###### **3.1.1.2 Kulturen aus Hautfibroblasten**

Hautfibroblasten (Zelllinie NHDF-c, Cat.-Nr. C-12.300) wurden von der Fa. Promocell (Heidelberg) in der 1. Subkultur bezogen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen mit Mikroorganismen zu verhindern. Gearbeitet wurde unter einer Sterilbank mit laminarer Luftströmung, und es wurden ausschliesslich sterile bzw. sterilisierte Materialien verwendet. Es wurde stets mit Latexhandschuhen gearbeitet, um den Kontakt mit gefährlichen Chemikalien zu vermeiden. Nach dem raschen Auftauen der Zellen im Wasserbad bei 37 °C wurde die Zellsuspension in Vollmedium aufgenommen und nach Zugabe von etwas DMEM High Glucose Medium zentrifugiert, um das beim Einfrieren



zugegebene zelltoxische DMSO (Dimethylsulfoxyd; Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA) auszuwaschen. Daraufhin wurde das Zellpellet erneut in Vollmedium suspendiert, in Kulturflaschen (Fa. Greiner, Nürtingen) mit 10 mL Vollmedium überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Luft in einer feuchten Atmosphäre kultiviert.

### **3.1.1.3 Mediumwechsel**

Die Häufigkeit des Mediumwechsels hängt von der Zellart, der Zelldichte und der Zellaktivität ab. Der dem Grundmedium zugegebene Farbindikator Phenolrot zeigt bereits geringe Verschiebungen des pH-Wertes durch einen Farbumschlag an. Bei Zunahme des pH-Wertes tritt ein Umschlag ins rot-violette auf, bei Überwiegen saurer Valenzen ins gelbe (z. B. bei hohem CO<sub>2</sub>-Gehalt des Mediums durch hohe Stoffwechselaktivität der Zellen). Letzteres zeigt die Notwendigkeit eines Mediumwechsels an. Um jedoch weitgehend gleiche Bedingungen für die einzelnen Kulturen zu schaffen, wurde das Medium alle 2-3 Tage erneuert, da manche Zusätze, so z. B. die Antibiotika bei 37 °C lediglich 3 Tage stabil sind. Vor dem Wechsel wurde das Medium bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Das verbrauchte Medium wurde mit sterilen Pasteurpipetten über eine elektrische Pumpe abgesaugt oder zur Hälfte abpipettiert. Anschliessend wurde das frische Vollmedium so zugegeben, dass der Zellrasen nicht mit der Pipette berührt wurde, da dies zur Ablösung der Zellen bzw. zu ihrer mechanischen Schädigung geführt hätte. In die 250 mL-Flaschen wurden stets 30 mL und in die 50 mL-Flaschen stets 10 mL Medium pipettiert.

### **3.1.1.4 Subkultivierung der Zellen**

Die Zellen wachsen logarithmisch, wobei jede Zellart bei gleichen Kulturbedingungen ihre eigene charakteristische Verdopplungszeit hat (bei Hautfibroblasten beträgt diese ca. 20 h). Bei Züchtung der Fibroblasten in Kulturflaschen kommt es zur Ausbildung eines einzellschichtigen Zellrasens. Spätestens bei Erreichen des Konfluenzstadiums, d. h. der dichtest möglichen Anordnung der Zellen als sog. Monolayer, sollte die Kultur geteilt werden, um die Teilungsaktivität der Zellen zu erhalten und so ein optimales Wachstum der Kultur zu ermöglichen. Wird der Zellrasen zu dicht, tritt eine Kontaktinhibition auf, die Zellen proliferieren nicht mehr und gehen in die Erhaltungsphase des Zellzyklus über. Dies führt unter Umständen zum Tod der Kultur. Zur Subkultivierung wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Flasche mit 37 °C-warmem PBS (*phosphate buffered saline*, Fa. Dulbecco A, Hampshire, England) gewaschen. Durch das Fehlen von Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-

Ionen in der Spüllösung werden diese dem Zellrasen entzogen, wodurch die Adhärenz der Zellen am Flaschenboden und der Zusammenhalt der Zellen untereinander geschwächt werden. Nach Entfernen der Spüllösung wurde Trypsin/EDTA (Fa. Promocell) zu den Zellen gegeben, in 250 mL-Flaschen 8 mL und in 50 mL-Flaschen 2 mL. Das Trypsin/EDTA-Gemisch bewirkt die vollständige Lösung der Zellen voneinander und vom Boden nach 3-5 min. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle erfolgte die Zugabe des Vollmediums zur Zellsuspension. Das darin enthaltene FCS inaktiviert das Trypsin. Es folgte eine Zentrifugation, und nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in frischem Vollmedium resuspendiert und je nach Zellzahl bzw. Bedarf auf mehrere Kulturflaschen verteilt und erneut kultiviert.

#### **3.1.1.5 Kryokonservierung**

Zellen, die nicht für nachfolgende Versuche benötigt wurden, bzw. als Reserve aufbewahrt werden sollten, wurden, um sie vor Kontaminationen und Veränderungen ihres Phänotyps durch häufiges Subkultivieren zu schützen, in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren. Als Gefrierschutzmittel wurde DMSO eingesetzt. Diese Substanz verhindert die Dehydratation des Zytoplasmas und unterbindet die Ausbildung von Eiskristallen, was die Zellmembranen zerstört und zu ihrer Lyse führt. Da DMSO selbst jedoch zelltoxisch ist, sollten Einfrieren und Auftauen stets rasch erfolgen. Vor dem Einfrieren wurde das Einfriermedium, bestehend aus 10 % DMSO und 90 % FCS, angesetzt und anschliessend kalt gestellt. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, sedimentiert und zum Entfernen des Trypsins noch einmal mit PBS gewaschen und sedimentiert. Dann wurde das Pellet rasch in ca. 2 mL-Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen (Fa. Biochrom, Berlin; 1 mL Volumen für  $10^6$  Zellen) überführt. Im Anschluss erfolgte das schrittweise Einfrieren. Zunächst wurde die Zellsuspension für zwei Stunden bei -20 °C abgekühlt und dann über Nacht in -70 °C belassen. Erst am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **3.1.1.6 Auftauen der Zellen**

Für die erneute Kultur der Zellen wurden sie nach Entnahme aus dem Stickstoff sofort im 37 °C-warmen Wasserbad aufgetaut. Nach Aufnahme der Zellsuspension (1 mL) im frischen, vorgewärmten Vollmedium (10 mL) wurden sie gewaschen, um das zelltoxische DMSO möglichst komplett zu entfernen. Anschliessend wurde das Pellet in frischem Vollmedium resuspendiert und in die Kulturflaschen überführt.

### **3.1.1.7 Zellzahlbestimmung**

Um eine optimale und konstante Zellzahl für die Versuche zu erhalten, müssen die Zellen vor der Aussaat gezählt werden. Hierzu wird üblicherweise eine Zählkammer nach Neubauer eingesetzt. Die in frischem Medium aufgenommene Zellsuspension wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette homogenisiert. Anschliessend wurden 50 µL Zellsuspension mit 50 µL Trypanblau-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gut vermischt und 1 Tropfen des Gemisches auf die Zählkammer aufgebracht. Trypanblau färbt tote Zellen blau, da tote Zellen ihre Semipermeabilität verlieren und für den Farbstoff durchlässig werden. Diese Zellen werden nicht mitgezählt. Dann wurden unter dem Lichtmikroskop die vier Eckquadrate ausgezählt. Das Volumen dieser vier Felder beträgt  $4 \times 10^{-4}$  mL. Die Zellzahl in 1 mL Zellsuspension errechnet sich dann bei  $n$  gezählten Zellen wie folgt:  $(n \times 2 \times 10^4)/4 = n \times 5.000$  Zellen/mL.

### **3.1.2 Humane Endothelzellen**

Die Endothelzellen (HUVEC-p, *human umbilical vein endothelial cells*, C-12250) wurden ebenfalls von der Fa. Promocell erworben. Die Zellen wurden wie die Fibroblasten behandelt und kultiviert. Im Gegensatz zu den Fibroblasten verwendeten wir hier das Zellkulturmedium *endothelial cell growth medium* der Fa. Promocell (Cat.-Nr. C-22010).

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

Die Isolierung der porzinen Langerhans-Inseln wurde mit Hilfe der halb-automatischen Isolierungstechnik nach Ricordi [42], modifiziert nach Heiser [43] durchgeführt. Um die Langerhans-Inseln von exokrinem Gewebe zu unterscheiden, wurde sie mit Dithizon (Diphenylthiocarbazone, DTZ, Cat.-No. D-5130; Fa. Sigma, Deisenhofen) gefärbt [44]. Die Langerhans-Inseln färben sich rot (DTZ bindet spezifisch an Zink). Das exokrine Gewebe bleibt ungefärbt.

### **3.2.1 Präparation der Pankreata**

Als Pankreasspender dienten weibliche, 1-2 Jahre alte, 100-200 kg schwere hirntote Hybridschweine der Deutschen Landrasse. Alle Pankreata wurden im Rahmen des Schlachtvorganges entnommen. Der Schlachtkörper wurde durch einen medianen Bauchschnitt eröffnet und neben anderen Organen der Magen-Darm-Trakt inklusive Milz und Pankreas entnommen. Dieses Darmpaket wurde uns zur halbsterilen Pankreas-Entnahme zur Verfügung gestellt. Die Milz wurde aufgesucht, um das unmittelbar dort

anliegende Pankreas-Schwanzstück zu identifizieren, freizulegen und von umgebendem Fett- und Bindegewebe frei zu präparieren. Anschliessend wurde das Schwanzstück vom übrigen Pankreasgewebe abgetrennt. Des Weiteren wurde ein Teil des Korpus entnommen; dieser Teil diente der immunhistochemischen Analyse. Die warme Ischämie betrug 20-30 min. Das gewonnene Gewebe wurde in einer Plastiktüte, die entweder mit 300 mL steriler HBSS (*Hank's balanced salt solution*, Cat.-No. 3-02F00-I, Fa. Cell Concepts), welche mit 25 mM Hepes (Hepes Buffer, Cat.-No. 5-31F00-H, Fa. Cell Concepts) versetzt war, oder mit 300 mL UW-Lösung (*University of Wisconsin solution*, Cat.-No. 54300-7, Fa. ViaSpan, Dupont Pharma, Niederlande) gefüllt war, auf Eis gelagert ins Labor transportiert. Die kalte Ischämie betrug 60-120 min. Im Labor erfolgte die endgültige Präparation des Organs unter sterilen Bedingungen. Das Pankreas wurde in eine Nierenschale gelegt und während des gesamten Präparationsvorganges auf Eis gelagert. Mesenteriales Fett, Bindegewebe, Gefässe und Lymphknoten wurden entfernt. Dann wurde der Ductus pancreaticus major mit einer 18-23 G Braunüle (Fa. Braun, Melsungen) kanüliert. Diese Kanüle diente später der Injektion der Enzymlösung (s. u.). Abschliessend wurde das Organ gewogen. Die verwendeten Organteile hatten je nach Spendergewicht ein mittleres Gewicht zwischen 80 und 135 g.

### **3.2.2 Aufbau der Isolierungsapparatur**

Die Verdaukammer bestand aus Edelstahl und enthielt zwei Teflon-beschichtete Stahlkugeln. Vor dem Ausfluss der Kammer befand sich ein Stahlsieb mit einer Maschenweite von 0,54 mm. Zunächst wurden Schlauchsystem und Kammer steril aufgebaut, anschliessend wurde das Schlauchsystem mit steriler HBSS (enthielt 25 mM Hepes) bzw. UW-Lösung gefüllt und mit einer Pumpgeschwindigkeit von 85 U/min (Fa. Ismatec MCP, Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mondfeld) durch das System gepumpt. Der Desintegrationsvorgang gliederte sich in eine Rezirkulationsphase und eine Elutionsphase. Während der Rezirkulationsphase blieb das System geschlossen, so dass das Pankreas permanent von Enzymlösung umspült wurde. Die Temperatur wurde zwischen 32 °C und 37 °C mit Hilfe eines Thermostaten konstant gehalten. Während der Elutionsphase, die sich unmittelbar an die Rezirkulationsphase anschloss, wurde der Desintegrationsvorgang durch Kühlung unterbrochen. Das System wurde geöffnet und das verdaute Gewebe in einem Sammelgefäss aufgefangen.

### 3.2.3 Pankreasdesintegration

Der Desintegrationsvorgang wurde eingeleitet, indem über den kanülierten Ductus pancreaticus major mit einer 50 mL-Perfusorspritze 24 °C warme Enzymlösung injiziert wurde. Als Enzym diente LiberasePI *purified enzyme blend* (Cat.-No. 1667122, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim), welche in HBSS bzw. UW gelöst und in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurde. Das Organ wurde durch das Injizieren der Enzymlösung „aufgeblasen“. Leckagen des Gangsystems wurden mit Klemmen abgedichtet. Anschliessend wurde die Braunüle entfernt. Nicht distendierte Organteile wurden abgeschnitten und gewogen. Das Organ wurde anschliessend in drei Teile zerschnitten und in die Verdaukammer gelegt. Die restliche Enzymlösung wurde ebenfalls in die Verdaukammer gefüllt, danach wurde die Kammer fest verschlossen. Die Temperatur wurde alle 3 min registriert. Um den Desintegrationsvorgang zu unterstützen, wurde die Verdaukammer 10 x pro min manuell geschüttelt. Nach 20 min wurde die erste Biopsie entnommen, weitere Biopsien folgten in zweiminütigem Abstand. Das Volumen einer Biopsie betrug 300 µL. Zur Identifizierung des endokrinen Gewebes wurden die Proben mit jeweils 300 µL DTZ in einer Zellkulturplatte gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Wenn die erste freie, d. h. ohne exokrines Gewebe behaftete, Langerhans-Insel sichtbar wurde, wurde die Rezirkulationsphase beendet und die Elutionsphase eingeleitet. Das System wurde mit 1.500-4.000 mL 4 °C kaltem Elutionsmedium (HBSS + 5 % FCS + 25 mM Hepes) gespült, die Flussrate betrug 85 U/min. Während der Elutionsphase wurde die Verdaukammer kontinuierlich manuell geschüttelt. Das Eluat wurde in sterilen Plastikgefässen auf Eis gesammelt. Nachdem das System leer gelaufen war, wurde die Kammer geöffnet. Der Inhalt wurde über ein Edelstahlsieb (Maschenweite: 630 µm) gegossen, in einem 200 mL-Erlenmeyerkolben gesammelt und die Kammer abschliessend mit ca. 40 mL Elutionsmedium gespült. Die aufgefangene Zellsuspension wurde ebenfalls in ein steriles Plastikgefäss gegeben und auf Eis gelagert. Nicht verdaute Organteile wurden gewogen. Danach wurde das Eluat zweimal bei 250 x g, 4 °C für 5 min zentrifugiert (Rotanta 46R, Fa. Hettich, Tuttlingen). Abschliessend wurde das Gewebesediment mit UW-Lösung auf 200 mL resuspendiert und für 60 min auf Eis gelagert.

### **3.3 Herstellung von Bariumalginat-Mikrokapseln**

#### **3.3.1 Leere Mikrokapseln**

Für die Herstellung leerer Mikrokapseln wurde 1 mL 2 %ige Alginatlösung (Pronova UP MVG, Fa. Nova Matrix, Oslo, Norwegen) in einer 1-mL-Spritze aufgenommen und mit der Spritzenpumpe durch den Zentralkanal der Zweikanaldüse der Verkapselungsanlage (Fa. Steinau, Berlin) getrieben. Die Kapselgrösse betrug 600-800  $\mu\text{m}$  (Einzelheiten zur Verkapselungstechnik, siehe 3.3.2).

#### **3.3.2 Mikroverkapselung von Langerhans-Inseln**

Bei der Mikroverkapselung werden einzelne Inseln in einem Alginattropfen eingebettet, wodurch die Insel vor dem Immunsystem des Empfängers weitestgehend geschützt sein sollte [45]. Zuvor aber wurden die Inseln nach der Isolierung zunächst für mindestens 1 Tag kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Inseln wurden dreimal mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. 1-3 mL Alginat-Lösung wurden zu den Inseln gegeben und vorsichtig resuspendiert. Mit einer 1 mL-Spritze wurde diese Suspension aufgezogen und in die Verkapselungsapparatur eingesetzt. Bei der Verkapselung wurden Kapseln in der Grösse zwischen 600 und 800  $\mu\text{m}$  hergestellt. Die Alginattropfen wurden für 4 min in 40 mL Vernetzerlösung, bestehend aus 20 mM  $\text{BaCl}_2$ , 10 mM MOPS (3-[N-morpholino]-propanesulfonic acid; Fa. Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) und 115 mM NaCl, geliert. Anschliessend wurden die Kapseln 3 x mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und lichtmikroskopisch auf Unversehrtheit bzw. leere Kapseln inspiziert.

#### **3.3.3 Kollagen-beschichtete leere Mikrokapseln**

Zur Herstellung der Kollagen-beschichteten Mikrokapseln wurde leere Alginatkapsel in 0,5 % Kollagenlösung (Collagen Type IV *from human cell culture*, C6745, Fa. Sigma-Aldrich) über 30 Minuten inkubiert [46].

### **3.4 Untersuchungen von Zell-Mikrokapsel-Interaktionen *in vitro***

#### **3.4.1 Co-Kultur leerer Mikrokapseln mit Zellen**

Leere Mikrokapseln wurden in 1 mL Vollmedium (DMEM High Glucose) suspendiert. Von dieser Suspension wurden je 100  $\mu\text{L}$  mit ca. 160 Mikrokapseln in die Löcher einer 24-Loch-Platte pipettiert. Anschliessend wurden 50.000 Zellen (Fibroblasten oder Endothelzellen) pro Loch dazu gegeben und 2 mL Vollmedium. Nach 2 h Co-Kultur, in der die Zellen sich auf der Kapseloberfläche anhefteten, wurden die Mikrokapseln aus dem

Loch entnommen und in das Loch einer neuen Platte pipettiert und mit 2 mL Vollmedium bedeckt. Nach 3 Tagen wurden die Kapseln vitalmikroskopisch auf anhaftende Zellen untersucht [46].

### **3.4.2 Herstellung des zweischichtigen Fibringels**

Fibrinogen (*fibrinogen from human plasma*, F3879, Fa. Sigma-Aldrich) wurde in PBS gelöst, in der Konzentration 3 mg/mL. Um die überschüssige Fibrinolyse der im Fibringel eingebetteten Zellen zu verhindern, wurde Aprotinin (Trasylol®; Fa. Bayer, Leverkusen) in die Fibrinogen-Lösung in der Konzentration 200 U/mL dazugegeben. Fibrinogen wurde 30 min unter ständigem Rühren aufgelöst (Magnetrührer) und danach mit einer Original-Perfusor-Spritze (50 mL) durch einen 0,2 µm Einmal-Filter (Fa. Schleicher-Schüll, Nürnberg) steril filtriert. Für die erste Fibrinogenschicht wurden pro Loch je 1,96 mL Fibrinogen-Trasylol-Lösung und 40 µL Thrombinstammlösung (25 U/mL; *thrombin from human plasma*, T7009, Fa. Sigma-Aldrich) gegeben. Nach 30 min wurde die Fibrinogenbildung gestoppt. Dazu wurden 2 mL Vollmedium für 10 min in jedes Loch gegeben und danach abgesaugt. Die leeren Mikrokapseln wurden in 50 mL-Röhrchen für 2 min in 3 mL Vollmedium zentrifugiert (1.000 U/min, ohne Bremse). Nach Absaugen des Mediums wurden die Kapseln in 500 µL Fibrinogen-Trasylol-Lösung resuspendiert. Danach wurden 350 µL Kapselsuspension pro Loch gegeben und mit 10 µL Thrombinlösung gemischt. 30 min später war der Gerinnungsvorgang abgeschlossen. Dann wurde das Fibringel für 10 min in 2 mL Vollmedium inkubiert, anschliessend das Medium absaugt und  $10^5$  NHDF-p-Zellen (Fa. Promocell) in 2 mL Vollmedium hinzugefügt. Alle 48 h wurde das Medium gewechselt.

### **3.4.3 Herstellung des einschichtigen Fibringels**

Für die Herstellung des einschichtigen Fibringels wurde die Fibrinogenlösung Tissucol® (Fa. Baxter, Heidelberg) verwendet. Dazu wurden zunächst die Lösungen vorbereitet. 126-198 mg Tissucol®-Trockensubstanz (mit 70-110 mg Fibrinogen) wurden mit 1 mL Aprotinin-Lösung (3.000 KIE; Fa. Sigma-Aldrich) und 4 mL PBS vermischt. Die 5 mL-Lösung enthielt eine Fibrinogen-Konzentration von 18 mg/mL. Thrombin S (500 IE; Fa. Biorup, Bubendorf, Schweiz) wurde mit 1 mL Kalziumchloridlösung (5,88 mg CaCl<sub>2</sub>) und 3,2 mL PBS vermischt. Daraus resultierten 4,2 mL Lösung mit der Thrombinkonzentration von 120 IE/mL. In jedes Loch der 24-Loch-Platte wurden zuerst 10 µL Thrombinlösung gegeben, 150 µL Kapselsuspension (mit etwa 150 Mikrokapseln, leer oder mit

Langerhans-Inseln gefüllt) und 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension in Vollmedium ( $4 \times 10^5$  Fibroblasten). Die Zellkulturplatte wurde sanft geschüttelt, um die Zellen und die Mikrokapseln gleichmässig im Loch zu verteilen. Anschliessend wurden 50  $\mu\text{L}$  Fibrinogen hinzugefügt. Nach 5 min war der Gerinnungsvorgang abgeschlossen. 2 mL Vollmedium wurden in jedes Loch pipettiert. Die Zellkulturplatte wurde bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  in Luft im Brutschrank bebrütet. Das Vollmedium wurde nach 24 h erstmals gewechselt und dann an jedem 2. Tag. Mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln verweilten bis Tag +14 im Fibringel.

### **3.5 Funktionsteste**

#### **3.5.1 Insulinbestimmung**

Für die Bestimmung von Insulin nach der Stimulation der Inseln durch niedrige und hohe Glukosekonzentrationen im Vollmedium wurden 160 mikroverkapselte Inseln in 300  $\mu\text{L}$  Fibringel zusammen mit  $7 \times 10^5$  Fibroblasten (bzw. ohne Fibroblasten), wie oben beschrieben, eingebettet. Zwei mL Vollmedium (DMEM High Glucose mit 4.500 mg/mL Glukose) wurden am 1. und am 3. Tag gewechselt. Am 5. Tag wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und anschliessend pro Well je 2,5 mL frisches Medium (DMEM Low Glucose mit 1.000 mg/mL Glukose) pipettiert und dann 2,5 mL Medium abgesaugt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um Insulinreste aus dem Fibringel zu entfernen. Danach wurde Fibringel 20 Minuten mit 2 mL Medium (DMEM Low Glucose) inkubiert. 1 mL Mediumüberstand wurde für die Insulinbestimmung entnommen und 1 mL Medium wurde abgesaugt. Danach wurde das Fibringel dreimal hintereinander mit 2,5 mL Medium (DMEM High Glucose) gewaschen und 20 min mit 2 mL des Mediums inkubiert. Dann wurde 1 mL Mediumüberstand für die Insulinbestimmung entnommen.

Die Insulinmessung wurde mit einem ELISA (INS-EASIA, Cat.-No. 4012500, Fa. Biosource, Europe S.A., Nivelles, Belgien) durchgeführt. Die Absorption wurde bei zwei Wellenlängen (450 und 490 nm) gegen eine Referenzwellenlänge (650 nm) mit Hilfe eines ELISA-Readers (Thermo Max Microplate Reader, Fa. MWG Biotech, Ebersberg) gemessen.

#### **3.5.2 Zytokinbestimmungen**

Nach 14-tägiger Co-Kultur von mikroverkapselten Langerhans-Inseln und Zellen im Fibringel wurde 1 mL Vollmedium aus den Überständen gewonnen, bei -20 °C eingefroren



und zu gegebener Zeit mit ELISA auf die Zytokine IL-1 $\beta$  (Human ELISA Kit, KHC0012, Fa. Biosource International, Camarillo, USA), IL-8 (Human ELISA Kit, KHC0081, Fa. Biosource), TNF- $\alpha$  (Human ELISA Kit, KHC3011, Fa. Biosource) und VEGF (Human ELISA Kit, KHG0112, Fa. Biosource) untersucht.

### **3.6 Vitalitätsprüfungen**

#### **3.6.1 FDA/PI-Färbung**

Nach der Inkubation wurde das Fibringel mit den eingebetteten mikroverkapselten Inseln vorsichtig aus den Wells entnommen. Um die Vitalität der Langerhans-Inseln zu prüfen, wurde eine Doppelfärbung mit Fluoreszeindiacetat (FDA, Cat.-No. F7378, Fa. Sigma, Deisenhofen) und Propidiumiodid (PI, Cat.-No. P4170, Fa. Sigma) durchgeführt. FDA ist ein Esterase-spezifischer Farbstoff mit Grünfluoreszenz, der ausschliesslich vitale Zellen färbt. PI färbt nur die Kerne toter Zellen mit einer Rotfluoreszenz. Es wurden 1,25 mM FDA und 9,0 mM PI in N,N-Dimethylformamid (Cat.-No. D4254, Fa. Sigma) gelöst und 1:100 mit HBSS (Cat.-No. 14065-049, Fa. Life Technologies, Eggenstein) verdünnt. Zehn Langerhans-Inseln wurden auf einem Objektträger mit dieser Lösung gefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beurteilt.

#### **3.6.2 Trypanblau-Färbung**

Die Trypanblaufärbung wurde wie folgt durchgeführt: Etwa 100  $\mu$ L Zellsuspension wurden mit vorgewärmter Trypanblau-Lösung (100  $\mu$ L einer 0,5 %igen Lösung; Fa. Sigma-Aldrich) versetzt. Die Suspension wurde mit einer Pipette durchgemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Lebende Zellen blieben ungefärbt, tote Zellen waren durchgängig blau gefärbt. Diese Methode wurde vor allem für die Vitalitätstestung und die Zählung von Fibroblasten und Endothelzellen verwendet.

### **3.7 Anfertigung von Paraffinschnitten**

Das Fibringel mit den mikroverkapselten Inseln und Zellen wurde in 3,5 % Formaldehyd-Lösung fixiert, im Einbettungsautomaten entwässert und in Paraffin eingebettet. Danach wurden 1  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte am Mikrotom (Histoslide 2000 R, Fa. Jung; Leica, Nussloch) hergestellt, im Wasserbad bei 50 °C auf silanisierte Objektträger aufgetragen und bei 37 °C über Nacht getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung in Objektträgerkästen aufbewahrt.

### **3.8 Hämalaun&Eosin-Färbung**

Die Veränderungen im Fibringel und das Wachstum der Fibroblasten und Endothelzellen im Gel wurden mit der Hämalaun&Eosin-Färbung (H&E-Färbung) beurteilt. Dazu wurden die Paraffinschnitte zunächst mit Aceton (Fa. Backer; Deventer-Holland, Holland) bei 4 °C für 5 min fixiert. Die Zellkerne wurden sodann mit 1 % wässriger Hämalaun-Lösung nach Mayer (Fa. Merck; Darmstadt) für 7-10 min gefärbt. Nach der Spülung der Präparate mit Leitungswasser und A. dest. erfolgte die Cytoplasma-Kontrast-Färbung für 1-3 min mit einer 0,5 % wässrigen Eosin-Lösung (Fa. Merck; Darmstadt). Unter Zusatz von 1 Tropfen Eisessig auf 100 mL Farblösung wurde durch Abbruch des alkalischen Bläuens die Kontrastbildung erleichtert, 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 pro min) und anschließend mit Xylol (Fa. Merck) entwässert. Die Einbettung erfolgte konventionell mit dem Schnelleinbettmedium Pertex (Fa. Medite GmbH; Burgdorf).

### **3.9 Lichtmikroskopische Auswertung und Fotodokumentation**

Die lichtmikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation erfolgten mit einem BX50 Mikroskop (Fa. Olympus; Hamburg) und der digitalen Kamera ColorView12 (Fa. Olympus) unter Zuhilfenahme der Software analySIS® (Soft Imaging System; Münster). Als Filmmaterial wurden Farbdiafilme der Firma Fujichrome (Professional 64T) verwendet.

### **3.10 Statistische Auswertung**

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

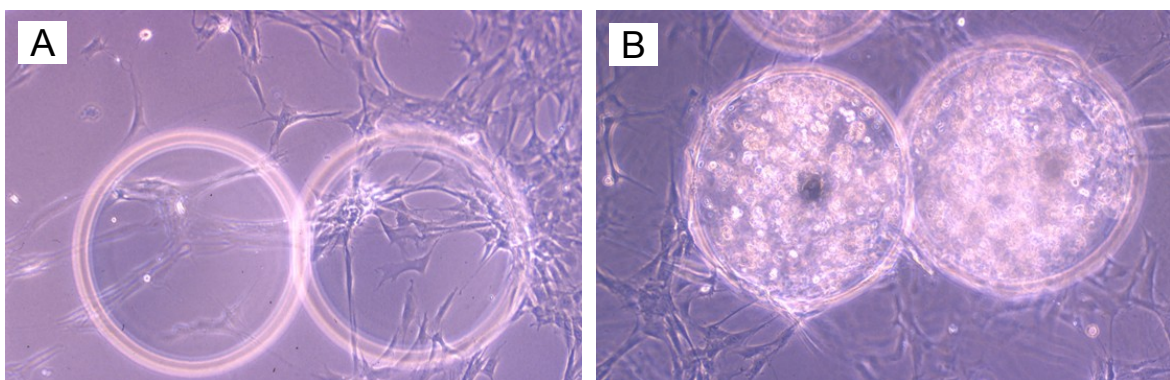
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung des Fibringelmodells für die Untersuchung der Mechanismen von Fibrose und Angiogenese *in vitro*

#### 4.1.1 Entwicklung des zweischichtigen Fibringelmodells

Für die Untersuchungen der Interaktionen von humanen Fibroblasten und Alginat-mikroverkapselten Langerhans-Inseln wurde das Fibringelmodell von Pepper und Mitarbeitern [47] wie folgt modifiziert: Um die Mikro kapseln gezielt an der Fibringel-Oberfläche zu lokalisieren, wurden sie im zweiten Schritt mit Fibrinogen-Lösung auf das im ersten Schritt vorbereitete Fibringel pipettiert; anschließend wurde Fibrinogen mit Thrombin polymerisiert, mit der Folge, dass der obere Teil der Mikro kapseln nicht mit dem Fibringel bedeckt war (s. 3.4.2). Die Fibroblasten wuchsen zweidimensional an der Fibringel-Oberfläche (**Abb. 1**). Dieses System zeigte aber einige gravierende Nachteile:

- (1) Das zweidimensionale Wachstum der Zellen im Fibringel ist artifiziell und entspricht nicht dem dreidimensionalen Wachstum in der Peritonealhöhle nach Transplantation Alginat-mikroverkapselter Langerhans-Inseln.
- (2) Mehrere Mikro kapseln lösten sich bereits nach 1-2 Tagen aus der oberen Schicht des Fibringels heraus; zwischen diesen Mikro kapseln und den Fibroblasten gab es folglich nicht die erforderlichen Kontakte.
- (3) In mehreren Wells waren die Fibroblasten nicht – wie erwünscht – ausreichend gleichmässig auf der Fibringel-Oberfläche verteilt.



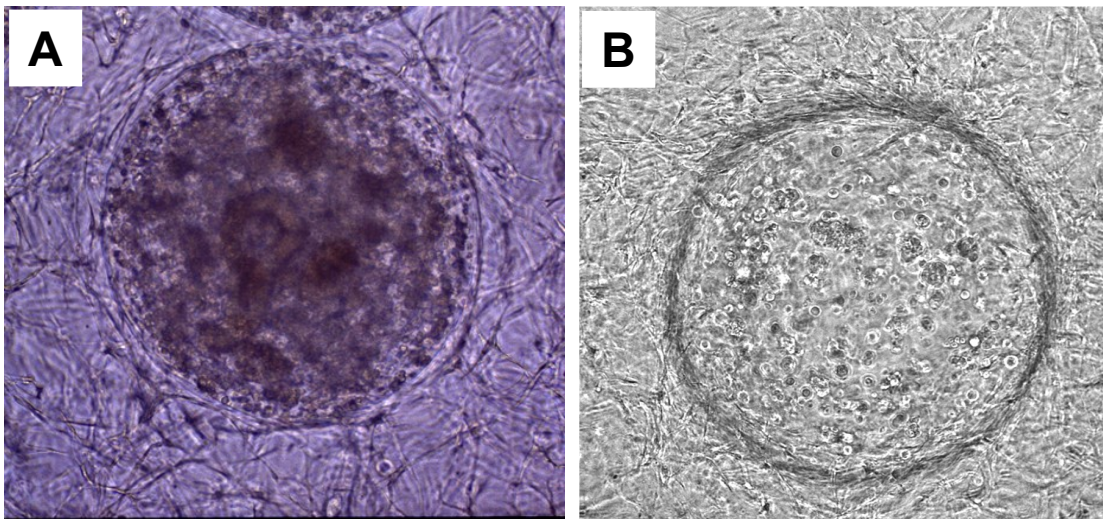
**Abb. 1:** Wachstum einer humanen Fibroblasten-Zelllinie auf der Oberfläche des zweischichtigen Fibringels nach 2 Tagen. (A) Leere Mikro kapseln und (B) mikroverkapselte porcine Langerhans-Inseln (3D-Vitalmikroskopie). Die Fibroblasten wachsen in Clustern und daher sehr ungleichmässig auf der Oberfläche des Fibringels.

#### 4.1.2 Entwicklung des einschichtigen Fibringelmodells

Das zweischichtige Fibringelmodell hatte die oben beschriebenen Nachteile gezeigt. Um unser Modell in den entscheidenden Punkten verbessern, wurde für die weiteren Untersuchungen das von Gillery und Mitarbeitern [38] beschriebene Fibringelmodell modifiziert (s. 3.4.3). In seinem Modell erfolgte die Polymerisation der Fibrinogen-Lösung im Beisein der Alginate-Mikrokapseln und der Fibroblasten (**Abb. 2**).

Die Vorteile dieses Modells sind folgende:

- (1) Die Fibroblasten konnten in diesem Fibringel ungehindert in alle Richtungen wachsen und bildeten so das erwünschte dreidimensionale Netzwerk.
- (2) Fibroblasten und Mikrokapseln verteilten sich im Fibringel sehr gleichmässig.
- (3) Es gab keine Mikrokapseln, die sich aus dem Fibringel herauslösten und so ohne Kontakt zu den Fibroblasten blieben.



**Abb. 2:** Wachstum von humanen Fibroblasten im einschichtigen Fibringelmodell (3D-Vitalmikroskopie). Nach 4 Tagen im Fibringel zusammen mit den mikroverkapselten Langerhans-Inseln bildeten die Fibroblasten ein enges dreidimensionales Netzwerk (A), das sich nach 14 Tagen (B) zu einem „Fibrosering“, d. h. einer Fibrosekapsel um die Alginate-Mikrokapsel herum entwickelt.

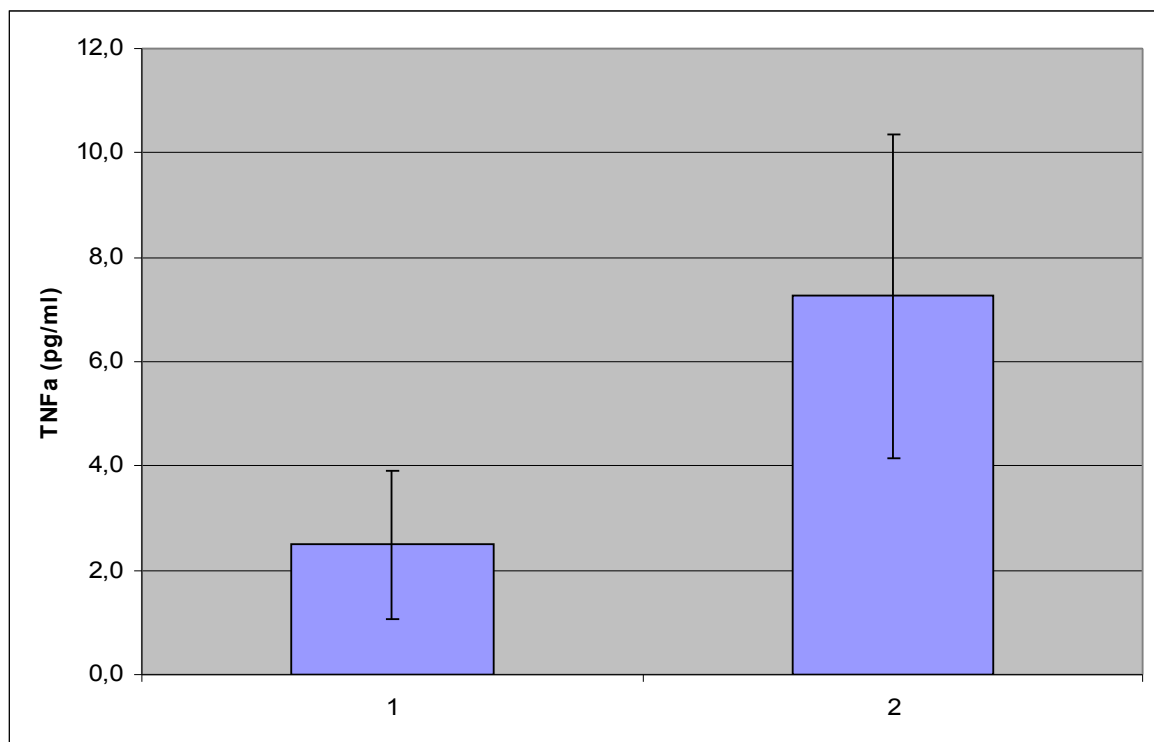
#### 4.2 Untersuchung der mitogenen Eigenschaften der mikroverkapselten Langerhans-Inseln

Die Mitogenität des xenogenen Insel-Transplantates hängt von mehreren Faktoren ab: Einerseits spielt die Qualität der für die Mikroverkapselung verwendeten Alginat eine essentielle Rolle; andererseits wird die Mitogenität des Transplantates natürlich auch von den

Zellen in den Barium-Alginatkapseln mit beeinflusst. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, den Einfluss dieser beiden Faktoren auf die Fibrose zu untersuchen.

#### 4.2.1 Einfluss der Alginat-Qualität auf die Mitogenität des Insel-Transplantates

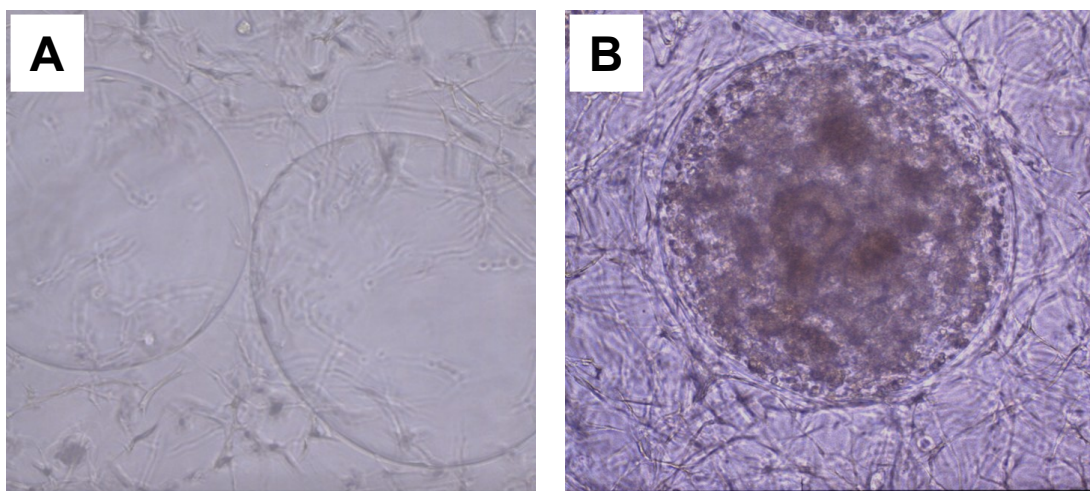
Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ist ein wichtiges Zytokin, das unter anderem von Fibroblasten ausgeschüttet wird und im Körper eine entzündungsähnliche Reaktion auslöst. Von dieser Überlegung ausgehend wurde die TNF- $\alpha$ -Produktion als Mass für die Mitogenität der Alginat-Mikrokapseln verwendet. Die humanen Fibroblasten wurden für 12 Tage mit Mikrokapseln, (a) aus einem mitogenen Alginat und (b) einem hochreinen Alginat bestehend co-kultiviert. Anschliessend wurde die Konzentration des TNF- $\alpha$  in den Kulturüberständen mit einem TNF- $\alpha$ -ELISA gemessen. **Abbildung 3** zeigt das Ergebnis: In Wells, die Mikrokapseln aus dem mitogenen Alginat enthielten, wurde nicht signifikant mehr TNF- $\alpha$  gemessen, als in jenen Wells mit Mikrokapseln aus dem hochreinen Alginat.



**Abb. 3:** Humane Fibroblasten produzieren mehr TNF- $\alpha$  nach 12 Tagen Co-Kultur mit mikroverkapselten porzinen Langerhans-Inseln, wenn für die Mikroverkapselung ein mitogenes Alginat (2) anstelle eines hochreinen Alginates (1) verwendet wurde (n=3; p<0,08).

#### 4.2.2 Einfluss der Langerhans-Inseln auf die Mitogenität des Transplantates

Um zu untersuchen wie stark die porzinen Langerhans-Inseln in den Mikrokapseln die Fibrose beeinflussen, wurde ein Fibringel, bestehend aus humanen Fibroblasten und mikroverkapselten Langerhans-Inseln, bzw. aus humanen Fibroblasten und leeren Alginat-Mikrokapseln in mehreren Ansätzen hergestellt. Die leeren Mikrokapseln wurden aus dem gleichen Alginat hergestellt, das auch für die Mikroverkapselung der Langerhans-Inseln verwendet wurde. In beiden Ansätzen wurden humane Fibroblasten aus der gleichen Zellkultur in das jeweilige Fibringel eingebracht. Auch die Kulturmedien in den unterschiedlichen Ansätzen wurden stets gleichzeitig und unter identischen Bedingungen gewechselt.

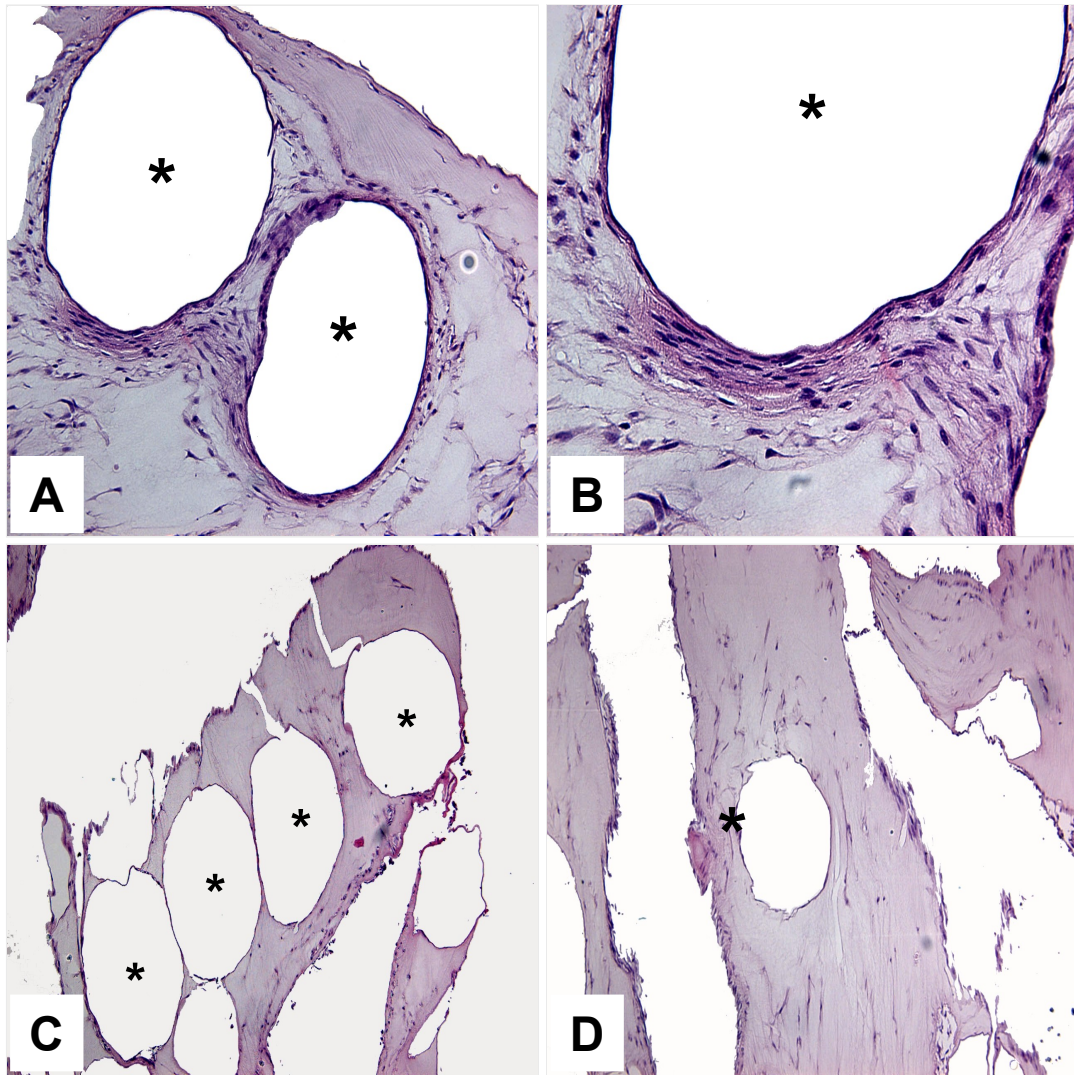


**Abb. 4:** Fibringel mit humanen Fibroblasten nach 4-tägiger Co-Kultur mit leeren Alginat-Mikrokapseln (A) und mit mikroverkapselten Langerhans-Inseln (B) (3D-Vitalmikroskopie). Die Fibroblasten bildeten in Anwesenheit der mikroverkapselten Langerhans-Inseln ein sehr viel engeres dreidimensionales Netzwerk im Fibringel.

Bereits nach 4 Tagen waren deutliche Unterschiede im Wachstum der humanen Fibroblasten in Co-Kultur mit leeren Alginat-Mikrokapseln und in Co-Kultur mit Alginat-mikroverkapselten Langerhans-Inseln zu beobachten (**Abb. 4**): Die Fibroblasten proliferierten in den Wells mit den Inselzellen schneller und bildeten hier ein viel dichteres Netzwerk um die Mikrokapseln. Am Tag +14 trat dieser Unterschied lichtmikroskopisch noch deutlicher hervor (nicht dokumentiert).

Mikroverkapselte Langerhans-Inseln bzw. leere Alginat-Mikrokapseln wurden 14 Tage mit den humanen Fibroblasten co-kultiviert. Danach wurde das Fibringel aus den Wells entfernt, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mittels H&E-Färbung histologisch untersucht. Es bestätigte sich, dass die mikroverkapselten Inselzellen die Proliferation der Fibro-

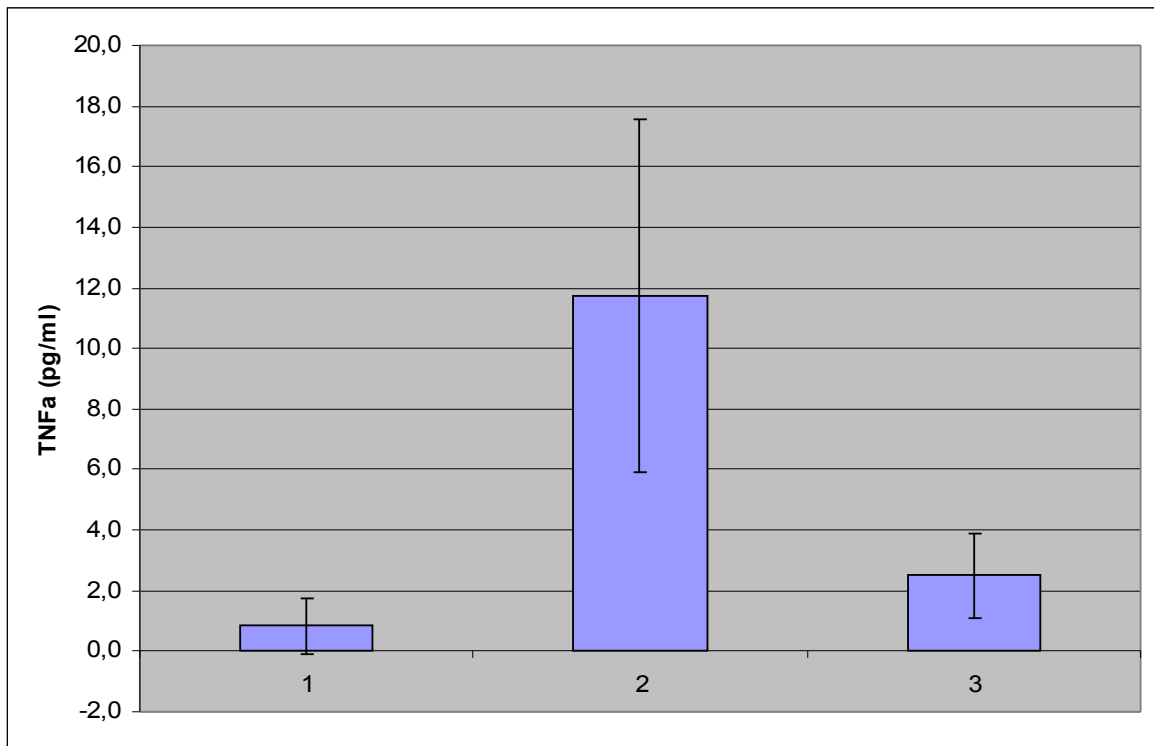
blasten beschleunigten. In den Schnitten wurden stets mehr Fibroblasten in unmittelbarer Nähe der mikroverkapselten Langerhans-Inseln beobachtet als in der Nähe der leeren Alginate-Mikrokapseln (**Abb. 5**). Die Löcher in den Abbildungen sind Artefakte. An diesen Stellen sind die leeren und gefüllten Mikrokapseln bei der Präparation aus dem Schnitt „herausgefallen“.



**Abb. 5:** H&E-Färbung von Paraffinschnitten des Fibringels, in dem humane Fibroblasten mit Alginate-mikroverkapselten Langerhans-Inseln (A; B: Vergrößerung aus A) bzw. leeren Mikrokapseln (C; D: Vergrößerung aus einem anderen Schnitt der gleichen Serie) co-kultiviert wurden. Die Fibrosierung war in der Nähe der mikroverkapselten Inselzellen deutlich stärker ausgeprägt, als im Bereich der leeren Alginate-Mikrokapseln. Zu den Löchern (\*) in den Schnitten: siehe Text.

Anschliessend wurde untersucht, wie mikroverkapselte Langerhans-Inseln die Produktion von TNF- $\alpha$  beeinflussen. **Abbildung 6** zeigt, dass die humanen Fibroblasten nach 12 Tagen im Fibringel in Co-Kultur mit den mikroverkapselten Langerhans-Inseln wesentlich mehr TNF- $\alpha$  produzierten, als in Co-Kultur mit den leeren Alginate-Mikrokapseln. Hier wurde in allen Fällen ausschliesslich das hochreine Alginate verwendet. Mikroverkapselten Langer-

hans-Inseln, die nicht mit humanen Fibroblasten co-kultiviert wurden, schütteten nur sehr geringe Mengen TNF- $\alpha$  aus.

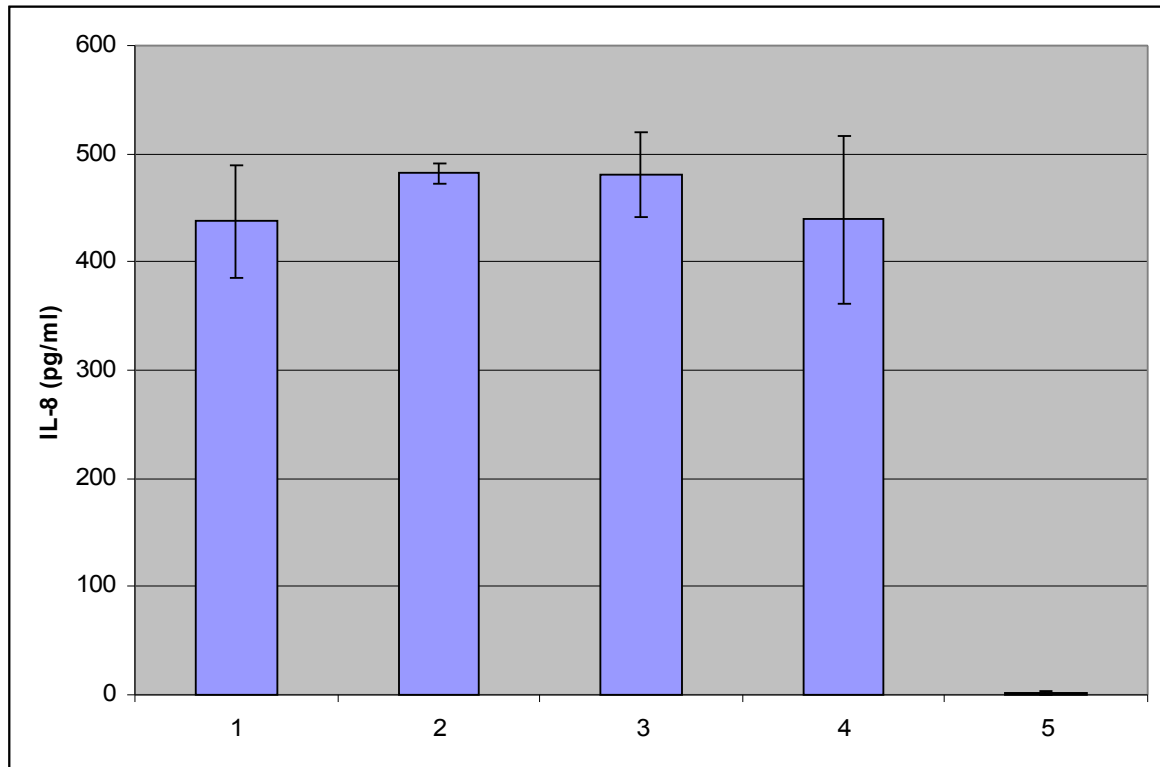


**Abb. 6:** Humane Fibroblasten produzieren mehr TNF- $\alpha$  nach 12-tägiger Co-Kultur mit mikroverkapselten Langerhans-Inseln im Fibringel (2) als nach 12-tägiger Co-Kultur mit leeren Alginate-Mikrokapseln (3). Mikroverkapselte Langerhans-Inseln, die nicht mit Fibroblasten co-kultiviert wurden (1), schütteten nur sehr geringe Menge TNF- $\alpha$  aus. In allen Fällen wurde hochreines Alginate verwendet. TNF- $\alpha$  wurde mit einem Cytokin-spezifischen ELISA nachgewiesen; n=3; p=0,06 Säulen 1 und 2; p=0,08 Säulen 2 und 3.

Untersucht wurde in diesem Zusammenhang auch die Produktion von IL-8, das bei der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen eine essentielle Rolle spielt [48], aber auch ein Marker für aktivierte Fibroblasten darstellt. In unserem Modell, das zwar keine neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen enthielt, wohl aber Fibroblasten, müssten die humanen Fibroblasten dieses Cytokin als Folge ihrer Aktivierung produzieren. **Abbildung 7** dokumentiert, dass humane Fibroblasten IL-8 produzierten, ungeachtet der Tatsache, dass die Zellen im Fibringel alleine kultiviert wurden, mit leeren Alginate-Mikrokapseln co-kultiviert wurden, diese Co-Kultur durch den Zusatz von Insulin im Kulturmedium modifiziert wurde oder die Fibroblasten mit mikroverkapselten Langerhans-Inseln co-kultiviert wurden. In allen vier Fällen erreichte die IL-8-Produktion das gleiche Aus-



mass; Unterschiede sind nicht vorhanden. Lediglich die mikroverkapselten Langerhans-Inseln im Fibringel produzierten kein IL-8.



**Abb. 7:** Bestimmung von IL-8 nach 7-tägiger Kultivierung/Aktivierung humaner Fibroblasten im Fibringel: (1) nur Fibroblasten, (2) Fibroblasten mit leeren Alginat-Mikrokapseln plus Insulin im Kulturmedium, (3) Fibroblasten mit leeren Alginat-Mikrokapseln ohne Insulin-Zusatz, (4) mikroverkapselte Langerhans-Inseln mit Fibroblasten im Fibringel und (5) mikroverkapselte Langerhans-Inseln ohne Fibroblasten im Fibringel. IL-8 wurde mit einem Cytokin-spezifischen ELISA nachgewiesen; (1) n=4; (2) n=3; (3) n=4; (4) n= 4; (5) n=3.

#### 4.3 Einfluss der Fibrose auf die mikroverkapselten Langerhans-Inseln

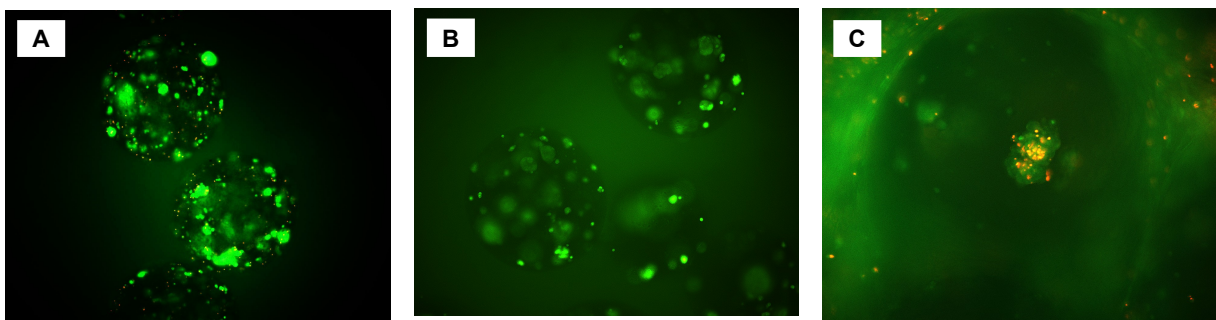
*In vivo* würde die perikapsuläre Fibrose um die transplantierten mikroverkapselten Langerhans-Inseln langfristig zur Funktionsminderung der Inselzellen und letztlich zum Zelluntergang führen. Die wichtigsten Gründe dafür dürften folgende sein:

- (1) Die transplantierten Inselzellen sterben ab, weil Nährstoffe und Sauerstoff durch den perikapsulären Fibrosesaum nicht zu den Zellen diffundieren können; zudem dürften die an der Fibrose beteiligten Zellen für die Inselzellen schädliche Cytokine ausschütten.
- (2) Die ausgeprägte perikapsuläre Fibrose verhindert, dass die Inseln unverzüglich (dynamisch) auf Veränderungen der Glukose-Konzentration im Blut mit der Ausschüttung von Insulin reagieren.

Ziel der folgenden Versuche war es daher, Erkenntnisse darüber zu erarbeiten, in wie fern die Fibroblasten-Proliferation Vitalität und Funktion der mikroverkapselten Langerhans-Inseln im Fibringel beeinflusst.

#### 4.3.1 Einfluss des Fibroblasten-Wachstums im Fibringel auf die Vitalität der mikroverkapselten Langerhans-Inseln

Die Vitalität der mikroverkapselten Langerhans-Inseln wurde mit FDA/PI-Färbung vital-mikroskopisch getestet. Unmittelbar nach der Mikroverkapselung betrug die Vitalität der Inseln, je nach Isolierung, 80-95% (*Abb. 8A*). Auch nach der Übertragung ins Fibringel und 14-tägiger Inkubation blieb ihre Vitalität mit ca. 80% nahezu unverändert (*Abb. 8B*). Erst während der Co-Kultur der mikroverkapselten Inseln mit den humanen Fibroblasten kam es zu signifikanten Verlusten der Insel-Vitalität (*Abb. 8C*).

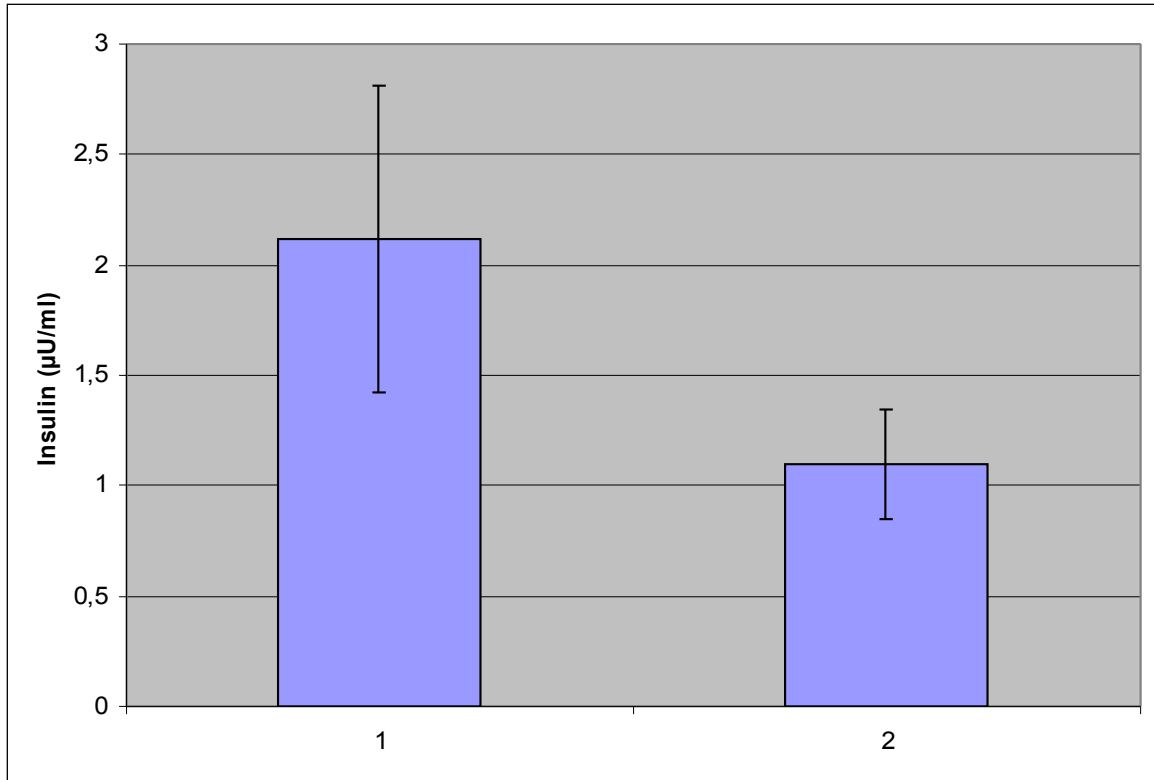


*Abb. 8:* Einfluss des Fibroblasten-Wachstums im Fibringel auf die Vitalität der mikroverkapselten Langerhans-Inseln (FDA/PI-Färbung; 3D-Vitalmikroskopie). Die lebenden Inselzellen erscheinen grün, die toten Zellen rot. Die sehr gute Vitalität der mikroverkapselten Langerhans-Inseln unmittelbar nach der Mikroverkapselung (A) blieb auch nach 14 Tagen im Fibringel – ohne Fibroblasten (B) – nahezu unverändert erhalten. Die Co-Kultur der mikroverkapselten Langerhans-Inseln mit humanen Fibroblasten und deren Proliferation im Fibringel führte nach 14 Tagen zum allmählichen Absterben der Inselzellen (C). Die proliferierenden Fibroblasten sind hier nicht gut erkennbar, da der Fokus auf die Inselzellen gerichtet war.

#### 4.3.2 Einfluss des Fibroblasten-Wachstums im Fibringel auf die Insulin-Sekretion der mikroverkapselten Langerhans-Inseln

Die mikroverkapselten Langerhans-Inseln sollen nach Transplantation möglichst unverzüglich und dynamisch auf Veränderungen der Glukose-Konzentration im Blut mit der Ausschüttung von Insulin reagieren. Um zu überprüfen, wie die Fibroblasten-Proliferation diese Dynamik *in vitro* beeinflusst, wurden die mikroverkapselten Inseln 14 Tage mit humanen Fibroblasten co-kultiviert und anschliessend mit High Glukose-Lösung stimuliert.

Die mikroverkapselten Langerhans-Inseln setzten signifikant ( $p < 0,02$ ) weniger Insulin pro Mikro kapsel frei, als jene mikroverkapselte Inselzellen, die 14 Tage ohne Fibroblasten kultiviert wurden (**Abb. 9**).



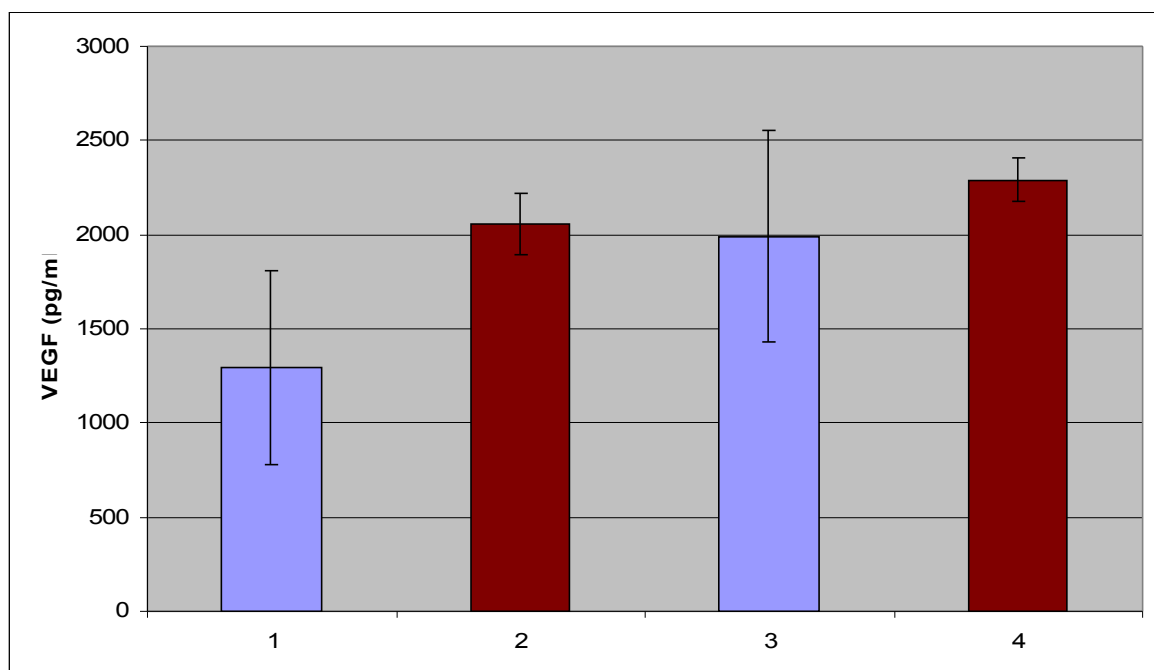
**Abb. 9:** Einfluss des Fibroblasten-Wachstums im Fibringel auf die Insulin-Sekretion der Alginat-mikroverkapselten Langerhans-Inseln. Gemessen wurde die Insulin-Freisetzung pro Mikro kapsel nach 14-tägiger Co-Kultur im Fibringel mit anschliessender Inkubation der Mikro kapseln in High Glukose Lösung für 1 Stunde. Der Insulingehalt in den Kulturüberständen wurde mit dem Insulin-ELISA bestimmt. Die Proliferation der humanen Fibroblasten minderte die Insulin-Ausschüttung der mikroverkapselten Langerhans-Inseln signifikant ( $p < 0,02$ ); (1) mikroverkapselte Langerhans-Inseln ohne co-kultivierte humane Fibroblasten; (2) mikroverkapselte Langerhans-Inseln mit co-kultivierten humanen Fibroblasten;  $n=4$ .

#### 4.4 Untersuchungen zur Angiogenese und zu den die Angiogenese beeinflussenden Faktoren *in vitro*

##### 4.4.1 Einfluss der Fibrose auf die Freisetzung von VEGF aus mikroverkapselten Langerhans-Inseln

Es ist bekannt, dass VEGF eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt [49]. Dieses Zytokin wird auch aus mikroverkapselten Langerhans-Inseln freigesetzt, besonders dann, wenn diese unter Hypoxie leiden [50], wie dies unmittelbar nach Isolierung und Mikrover-

kapselung zu erwarten ist. Das Kapillarnetz, das die Langerhans-Inseln natürlicherweise durchzieht und die Versorgung der verschiedenen Inselzellen gewährleistet, wird durch die enzymatische Isolierung vom Kapillarnetz des Spenderorgans getrennt und anschliessend als Folge der *In vitro*-Kultur zerstört [51]. Die Inselzellen werden bis zur Ausbildung neuer Kapillaren – des Empfängers – nun ausschliesslich durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Im Folgenden wurde untersucht, wie die Fibrose *in vitro* im Fibringel die Ausschüttung des VEGF aus den mikroverkapselten Inseln beeinflusst (**Abb. 10**). Nach 7-tägiger Co-Kultur im Fibringel wurde signifikant ( $p < 0,015$ ) weniger VEGF von jenen mikroverkapselten Langerhans-Inseln freigesetzt, die mit Fibroblasten co-kultiviert als von jenen, die ohne Fibroblasten co-kultiviert worden waren. Dieser Effekt liess sich auch durch 7 weitere Tage Co-Kultur (bis Tag +14) nicht weiter verstärken.

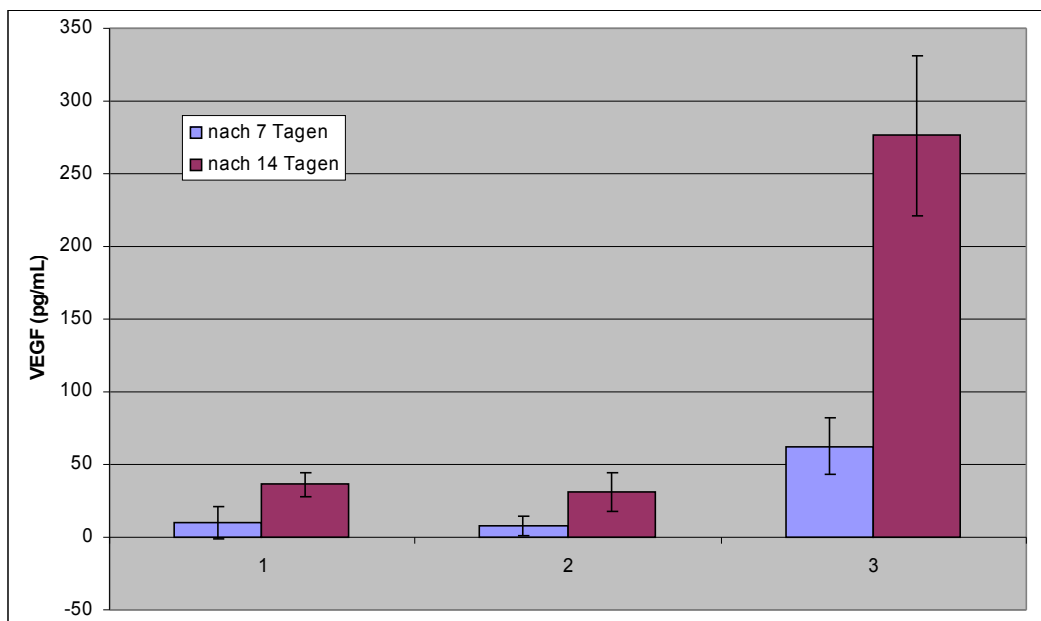


**Abb. 10:** Einfluss der Fibrose auf die Freisetzung von VEGF aus mikroverkapselten Langerhans-Inseln. Dargestellt ist die VEGF-Freisetzung aus mikroverkapselten Inseln in Co-Kultur mit humanen Fibroblasten nach 7 Tagen (1) und nach 14 Tagen (3), aus mikroverkapselten Inselzellen ohne Fibroblasten nach 7 Tagen (2) und nach 14 Tagen (4). Nach 7-tägiger Co-Kultur wurde von den ohne Fibroblasten kultivierten Langerhans-Inseln signifikant ( $p < 0,015$ ) mehr VEGF sezerniert als von jenen, die mit Fibroblasten kultiviert wurden;  $n=4$  für (1)–(4).

#### 4.4.2 Einfluss von Insulin auf die Freisetzung von VEGF aus den humanen Fibroblasten

VEGF wird nicht nur von den mikroverkapselten Langerhans-Inseln, sondern auch von humanen Fibroblasten produziert. Es wurde untersucht, in wieweit Insulin im Kulturmedium

die VEGF-Freisetzung aus Fibroblasten verändert. Humane Fibroblasten wurden mit leeren Alginat-Mikrokapseln im Fibringel für 7 und 14 Tage co-kultiviert, wobei ein Teil der Kulturen zusätzlich humanes Insulin als möglichen Fibroblasten-Wachstumsfaktor erhielt. Nach 7-tägiger Kultur, sehr viel ausgeprägter aber nach 14-tägiger Kultur wurde signifikant mehr VEGF von jenen Fibroblasten abgegeben, die Insulin als Wachstumsfaktor erhalten hatten ( $p < 0,003$ ), als von jenen Fibroblasten, die alleine oder zusammen mit leeren Alginat-Mikrokapseln im Fibringel kultiviert worden waren (**Abb. 11**).

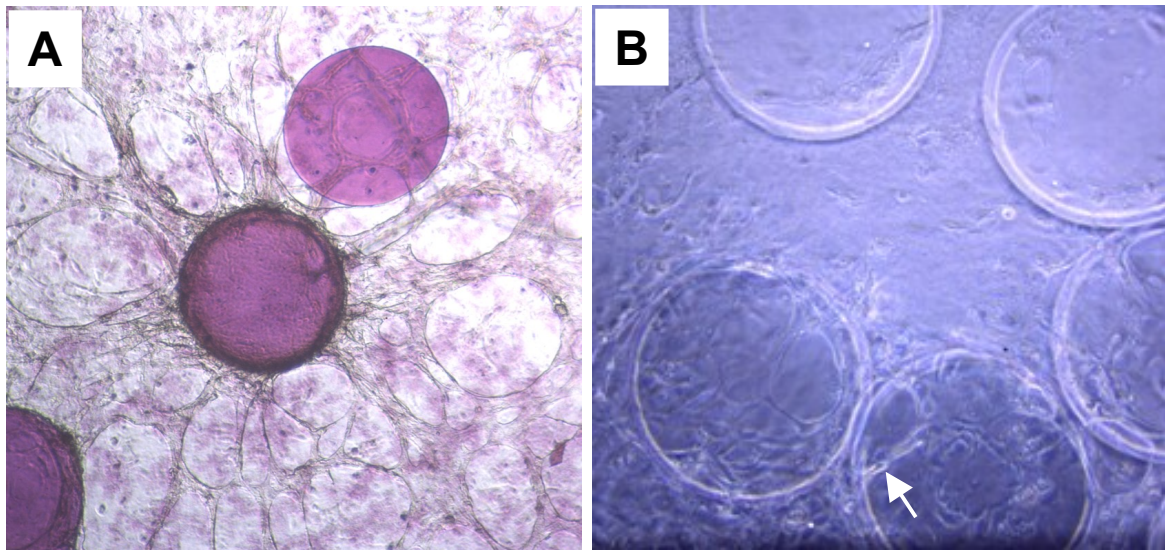


**Abb. 11:** Einfluss von Insulin-Zusatz im Kulturmedium auf die Freisetzung von VEGF aus humanen Fibroblasten. Nach 7 Tagen, ganz besonders aber nach 14 Tagen produzieren humane Fibroblasten, die mit Insulin-Zusatz im Kulturmedium kultiviert wurden, signifikant mehr VEGF ( $p < 0,003$ ), als Fibroblasten ohne Insulin-Zusatz. (1) Fibroblasten ohne Alginat-Mikrokapseln; (2) Fibroblasten mit leeren Alginat-Mikrokapseln; (3) Fibroblasten mit leeren Alginat-Mikrokapseln und Insulin-Zusatz im Kulturmedium;  $n=4$  für (1)–(3).

#### 4.4.3 Wachstum humaner Endothelzellen im Fibringel mit leeren Alginat-Mikrokapseln

Mit dem folgenden Versuch galt es zu beweisen, dass sich das einschichtige Fibringel und die 3D-Kultur nicht nur für das Wachstum von Fibroblasten eignen, sondern auch für andere Zellen, so z. B. auch humane Endothelzellen. Humane Endothelzellen wurden zu leeren Alginat-Mikrokapseln ins Fibringel gegeben und ihr Wachstum in der 3D-Kultur in den folgenden Tagen mikroskopisch verfolgt. Bereits 2-3 Tage nach Kulturbeginn bildeten die

Endothelzellen gefäßähnliche, röhrenartige Strukturen im Fibringel aus (**Abb. 12**). Diese Strukturen hatten enge Kontakte zu den leeren Alginat-Mikrokapseln.



**Abb. 12:** 3D-Kultur von humanen Endothelzellen zusammen mit leeren Alginat-Mikrokapseln im einschichtigen Fibringel. Nach 2-3 Tagen bilden sich gefäßähnliche, röhrenförmige Strukturen aus. (A) Leere Kapseln und Endothelzellen im Fibringel, 12 h nach Kulturbeginn (3D-Vitalmikroskopie); (B) Ausbildung röhrenförmiger Strukturen (Pfeil) nach 2-3 Tagen im Fibringel (3D-Vitalmikroskopie nach H&E-Färbung).

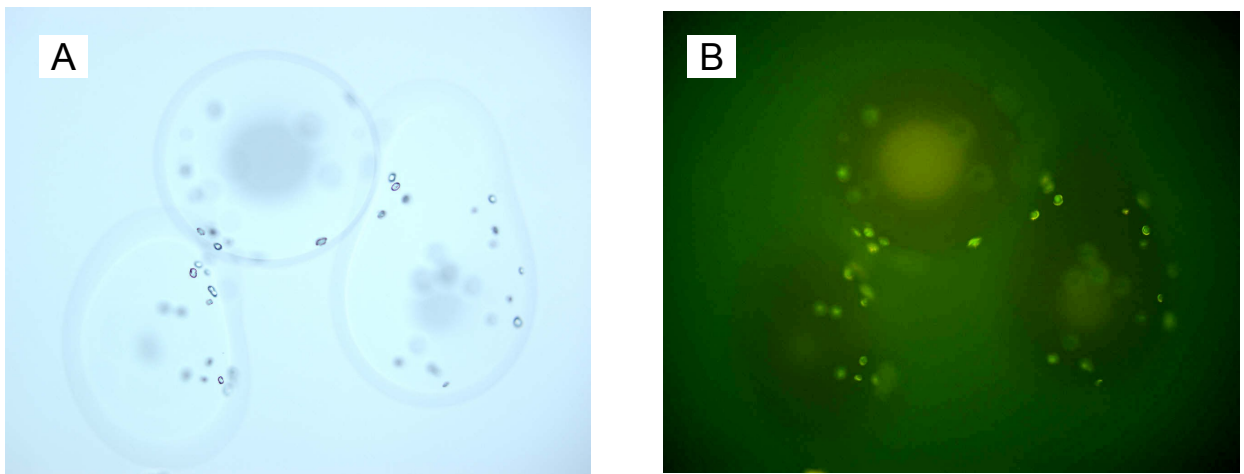
#### 4.5 Interaktion von humanen Fibroblasten und Endothelzellen mit leeren Alginatmikrokapseln im Fibringel

Nach Transplantation der mikroverkapselten Langerhans-Inseln in die Peritonealhöhle kommt es alsbald zum Kontakt zwischen den Kapseln und diversen körpereigenen Zellen. Mit der Verwendung eines hoch reinen Alginats (s. o.) sollte die Ausbildung der perikapsulären Fibrose verhindert/verringert werden. In den folgenden Versuchen wollten wir untersuchen, in wie weit humane Fibroblasten und humane Endothelzellen, die bei der Fibrose und der Angiogenese eine essentielle Rolle spielen, *in vitro* an den Kapseloberflächen wachsen können. Einerseits ist das Wachstum der Fibroblasten unerwünscht, andererseits ist das der Endothelzellen zur schnellen Versorgung der Inselzellen unbedingt wünschenswert. Daraus ergibt sich die Frage, ob es möglich ist, die Endothelzellen vor Transplantation der mikroverkapselten Langerhans-Inseln an der Kapseloberflächen anzuzüchten, um so quasi Gefäßvorläufer *in vitro* auszubilden, die dann *in vivo* Kontakt mit den Empfänger-

eigenen Gefäßen aufnehmen. Das würde die Versorgung der mikroverkapselten Langerhans-Inseln mit Sauerstoff und Nährstoffen sehr beschleunigen.

#### 4.5.3 Co-Kultur leerer Alginate-Mikrokapseln mit humanen Fibroblasten

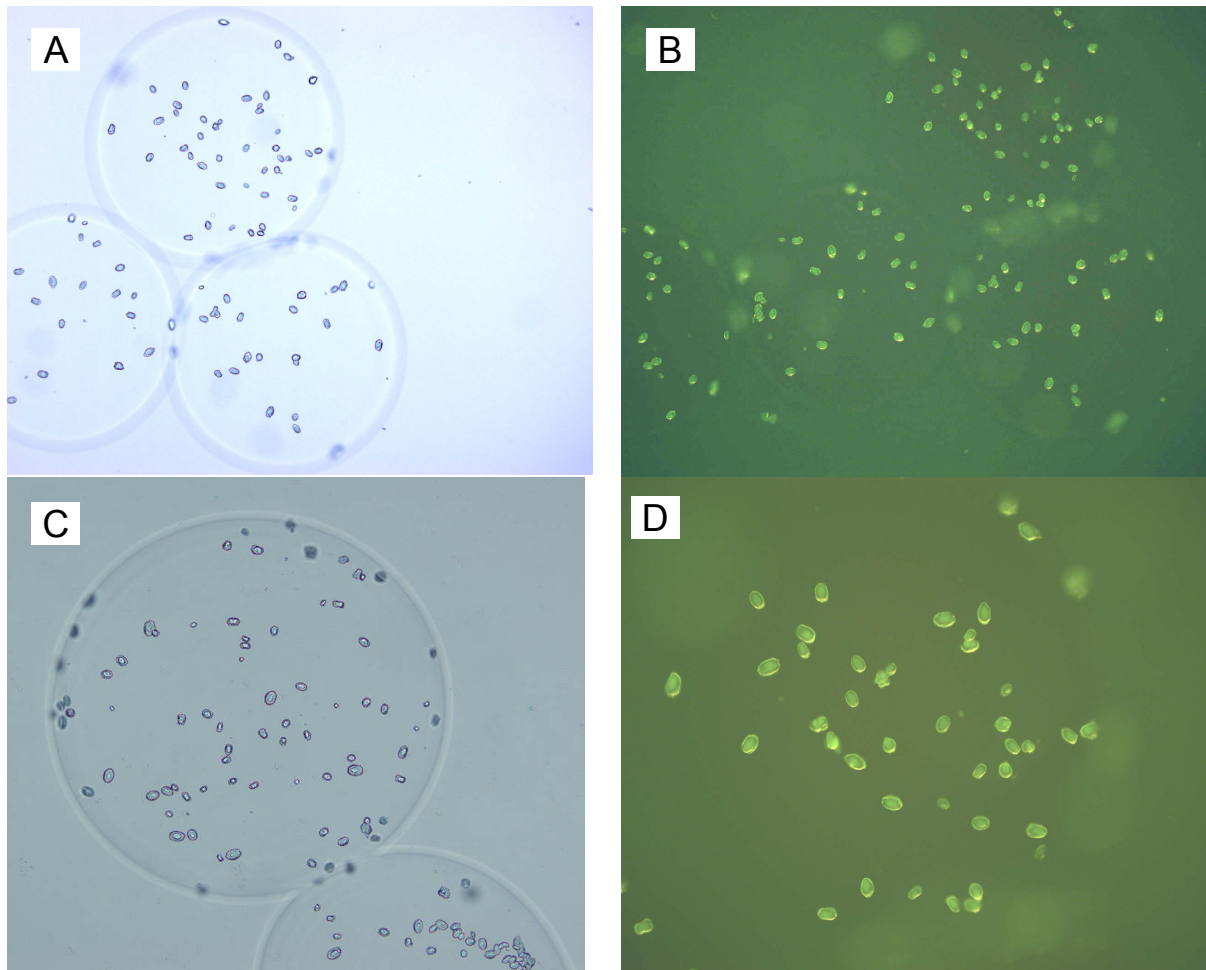
Die Co-Kultur leerer Alginate-Mikrokapseln mit Fibroblasten erfolgte wie in 3.4.1 beschrieben. Nach 3 Tagen wurden die Kapseln aus dem Kulturmedium herausgenommen, mit FDA/PI gefärbt (s. 3.6.1) und lichtmikroskopisch untersucht. Zwar konnten die Fibroblasten an der Kapseloberfläche in dem Kulturmedium überleben, aber sie proliferierten nicht. Auch nach 7 Tagen Co-Kultur beobachteten wir identische negative Ergebnisse.



**Abb. 13:** (A) Anhaftung von Fibroblasten an leeren Alginate-Mikrokapseln nach 3 Tagen im Kulturmedium (3D-Durchlicht-Mikroskopie am Vitalpräparat); (B) die Grünfärbung der Fibroblasten nach FDA/PI-Färbung beweist ihre Vitalität (3D-Fluoreszenz-Mikroskopie am Vitalpräparat).

#### 4.5.4 Co-Kultur leerer Alginate-Mikrokapseln mit humanen Endothelzellen

Mit den humanen Endothelzellen wurde genauso verfahren wie zuvor mit den Fibroblasten. Auch die humanen Endothelzellen (**Abb. 14A**) waren nach der 3-tägigen Co-Kultur immer noch vital (**Abb. 14B**), proliferierten aber nicht. Anschliessend wurden die aus der Co-Kultur befreiten Mikrokapseln mit den anhaftenden Endothelzellen für weitere 4 Tage im Fibringel kultiviert. Trotz ihrer guten Vitalität (**Abb. 14D**) proliferierten sie auch im Fibringel nicht (**Abb. 14C**).



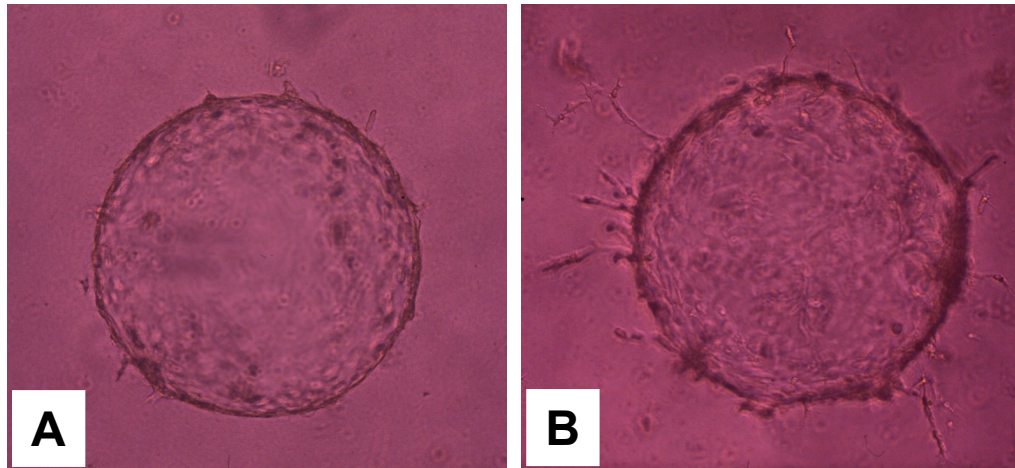
**Abb. 14:** Humane Endothelzellen haften nach 3-tägiger Kultur an den leeren Alginat-Mikrokapseln an (A); sie proliferieren zwar nicht, sind aber vital (B). Wurden Mikrokapseln plus Endothelzellen aus dem Kulturmedium in das Fibringel übertragen, proliferierten sie auch unter diesen Bedingungen nicht (C), blieben aber vital (D). A und C 3D-Durchlicht-Mikroskopie und B und D 3D-Fluoreszenz-Mikroskopie am Vitalpräparat.

#### 4.5.5 Co-Kultur Kollagen-beschichteter Alginat-Mikrokapseln mit humanen Endothelzellen

Um das Wachstum der humanen Endothelzellen auf den Alginat-Mikrokapseln zu verbessern, wurden die leeren Mikrokapseln mit Kollagen beschichtet, bevor sie mit Endothelzellen, wie oben beschrieben, co-kultiviert wurden. Nach 2 Tagen bildeten die Endothelzellen einen dichten Zellrasen an der Kapseloberfläche. Anschliessend wurden Kapseln plus Endothelzellen in das Fibringel überführt und weiter kultiviert. Die humanen Endothelzellen bildeten bereits nach nur wenigen Tagen gefässähnliche Strukturen im Fibringel (**Abb. 15A**).



Um nun den Einfluss von VEGF auf dieses Geschehen zu untersuchen, wurde dieses „Mikrokapsel/Endothelzell-Konstrukt“ im Fibringel mit VEGF kultiviert. **Abbildung 15B** verdeutlicht, dass der Zusatz von VEGF zum Fibringel die Ausbildung gefäßähnlicher, röhrenförmiger Strukturen aus diesem Konstrukt heraus begünstigt bzw. sehr beschleunigt.



**Abb. 15:** Humane Endothelzellen wurden mit leeren Kollagen-beschichteten Alginat-Mikrokapseln zunächst für 3 Tage im Kulturmedium kultiviert; sodann wurden die „Mikrokapsel/Endothelzell-Konstrukte“ ins Fibringel übertragen und für weitere 2 Tage *in vitro* ohne (A) oder mit (B) Zusatz des Angiogenesefaktors VEGF kultiviert. An der Oberfläche der „Mikrokapsel/Endothelzell-Konstrukte“ wachsen im Fibringel plus VEGF deutlich mehr gefäßähnliche, röhrenförmige Strukturen als an der Oberfläche der Konstrukte, die im Fibringel ohne VEGF kultiviert wurden (3D-Durchlicht-Mikroskopie am Vitalpräparat).

## 5 Diskussion

### 5.1 Etablierung des Fibringelmodells

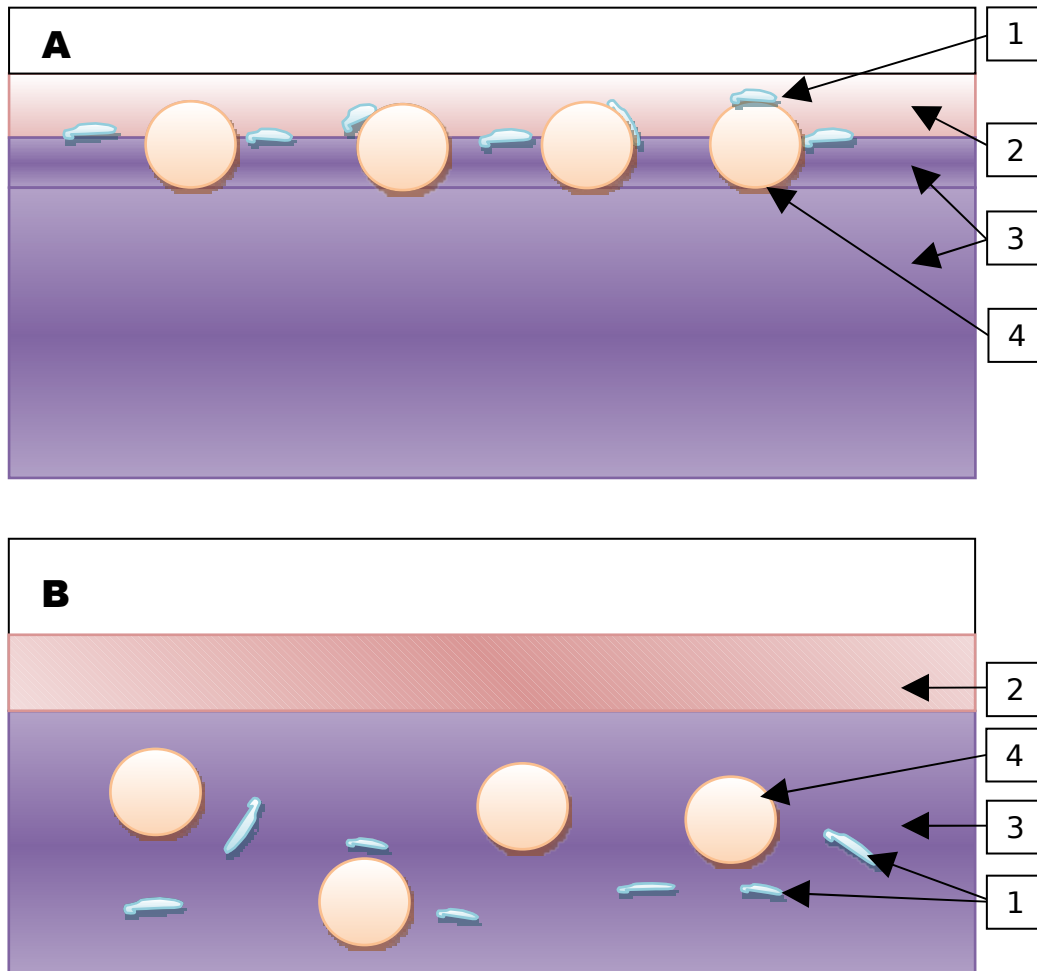
Bei der Entwicklung eines Modells zur Untersuchung der Mechanismen von Fibrose und Angiogenese *in vitro* wählten wir Fibringel als Ersatz für die *extrazelluläre Matrix*. Diese Substanz wird heute schon routinemässig in sehr differenzierten Ansätzen zur 3D-Kultur unterschiedlicher Zellen und Gewebe, mit und ohne Wachstumsfaktoren, als Carriersystem für Proteine, ganz besonders aber auch in Untersuchungen zur Angiogenese *in vitro* verwendet: so z. B. zur osteogenen Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen in einer Leukozyten-haltigen Fibrinmatrix [52]; als Carriersystem zur verzögerten Freisetzung von *bone morphogenetic protein-2* im Zuge der Knochenregeneration bei Ratten [53]; zur 3D-Kultur von aus adipösem Gewebe gewonnenen humanen Stammzellen, um die oberflächliche Lamina propria der Stimmlippen zu erneuern [54]; zur Charakterisierung der 3D-Angiogenese von Glioblastomen mittels Co-Kultur von HUVEC und Glioblastomazellen *in vitro* [55]; zur Analyse der komplexen Mechanismen der Angiogenese *in vitro* und den dabei beteiligten vielfältigen Faktoren [56], bzw. zur Identifizierung von Angiogenese-inhibierenden Genen [57].

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit waren derartig komplexe Ansätze selten, ganz zu schweigen von der Verwendung des Fibringelmodells im Zusammenhang mit isolierten Langerhans-Inseln und der Neubildung von Blutkapillaren, die für deren Überleben essentiell sind. Sehr frühzeitig widmet sich die Arbeit von Linn und Mitarbeitern [58] diesem wichtigen Aspekt in der Transplantation isolierter Langerhans-Inseln. So benutzen die Autoren das Fibringelmodell um Endothel-Vorläuferzellen in den Spenderinseln mittels diverser Stimulatoren in Blutgefäss-ähnliche Strukturen zu entwickeln. Es ist erstaunlich, dass – unabhängig von der vorliegenden Arbeit – erst fünf Jahre später das Konzept der Neovaskularisation von isolierten Langerhans-Inseln von Johansson und Mitarbeitern [59] wieder aufgegriffen wird. Hier wird das Fibringelmodell dazu verwendet, um isolierte humane Langerhans-Inseln mit mesenchymalen Stammzellen aus menschlichem Knochenmark plus Endothelzellen aus der Haut zu beschichten. Dieses zusammengesetzte Transplantat (*composite islet graft*) wird dann im 3D-Fibringel *in vitro* kultiviert, in der Hoffnung, dass es möglichst viele neue Blutkapillaren ausbildet. Die Autoren schätzen am Fibringelmodell, dass es einfach zu handhaben ist, 3D-Wachstum ermöglicht, mit

unterschiedlichen Komponenten und in unterschiedlichen Kombinationen beschichtet werden kann, kostengünstig ist und natürlich makroskopisch und mikroskopisch viel leichter zu analysieren ist, als ein natives 3D-Gewebe.

Vorversuche im eigenen Labor erfolgten zunächst mit einer Serie anderer 3D-Matrizes, mit mehr oder weniger gutem Erfolg. Dies waren vor allem unterschiedliche Schwämme aus natürlichen Materialien und diversen Kunststoffen (nicht dokumentiert). Das Problem hierbei war, dass Zellen und/oder die isolierten Langerhans-Inseln, mit denen die Matrizes besiedelt wurden, während der mehrtägigen Kulturphase aus dem 3D-Gewebe herauskullerten, womit das Gesamtsystem zu instabil war. Auf die Idee mit dem Fibringel und die Verwendung seiner positiven Eigenschaften als 3D-Matrix kamen wir durch seine tägliche Nutzung zur Versorgung von Verbrennungswunden, bzw. seinen Einsatz zur Wundbehandlung in der Plastischen Chirurgie, Allgemein-, Gefäß- und Kieferchirurgie [60].

Zu Beginn versuchten wir mit einem zweischichtigen Fibringelmodell die Angiogenese und Fibrose *in vitro* zu untersuchen. Zur Herstellung der zweischichtigen Matrix wurde ein kommerziell erhältlicher Gewebekleber verwendet, das Tissucol® der Firma Baxter (Deutschland). Gegenüber einem lyophilisierten Fibrinogen, das zunächst erst einmal in Lösung gebracht werden muss, besitzt Tissucol® den Vorteil (a) der gleichbleibenden Fibrinkonzentration, (b) fehlender LPS-Kontamination sowie (c) der zusätzlichen Anwesenheit von Matrixproteinen, wie Fibronectin und anderen, die sich positiv auf das Wachstum und das Adhäsionsverhalten der Endothelzellen und Fibroblasten auswirken [61]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen war eine Fibrinkonzentration von 3 mg/mL optimal für unser Zellwachstum – bei ansonsten ausreichender mechanischer Stabilität [62]. Um in der Anfangsphase der Kultur eine zu frühe Degradation der stabilisierenden Fibrinmatrix zu verhindern, wurde dem Medium Aprotinin zugesetzt [63, 64]. Aprotinin ist ein pankreatischer Trypsin-Inhibitor und ein natürliches Polypeptid des Hausrinds, das in der Humanmedizin zur Reduktion der Blutungsneigung verwendet wird. Trotz der guten Eigenschaften des Aprotinins entschieden wir uns, das zweischichtige gegen ein einschichtiges Fibringelmodell auszuwechseln (**Abb. 16**).



**Abb. 16:** Schematische Darstellung des zweischichtigen (A) und des einschichtigen (B) Fibringelmodells. (1) Fibroblasten/Endothelzellen, (2) Kulturmedium, (3) Fibringel, (4) Alginate-Mikrokapseln mit oder ohne Langerhans-Inseln.

Gründe dafür waren die in 4.1.1 beschriebenen funktionellen Nachteile, z. B. das artifizielle 2D-Zellwachstum, das Herauslösen der Alginate-Mikrokapseln aus dem Fibringel und die ungleiche Verteilung der Fibroblasten auf der Fibringel-Oberfläche. Die häufigere Handhabung führte dazu, dass sich die Qualität des Fibringels und auch die Reproduktion der Versuche stetig verbesserten. Unter diesen spezifischen Bedingungen gelang es, ein 3D-Matrixmodell mit einem 3D-Wachstum der Fibroblasten und der Endothelzellen zu generieren. Trotz Beachtung aller methodisch-technischen Details gelang es zunächst nicht in allen Versuchen, eine gleichmässige Verteilung der Alginate-Mikrokapseln und auch der humanen Fibroblasten im Fibringel zu erreichen. Einzelne Versuche mussten wegen der zu schlechten Qualität des Fibringels abgebrochen werden. Es zeigte sich, dass neben der Beachtung der methodisch-technischen Details ein hohes

handwerkliches Können und eine grosse Erfahrung mit diesem System erforderlich sind, um eine weitgehend gleichbleibende Qualität des Fibringels zu erzielen – und in der Tat verbesserte sich dessen Qualität im Laufe der Zeit deutlich.

Ein entscheidender Nachteil jedes Fibringelmodells ist der notwendige 2-tägige Wechsel des Zellkulturmediums. Die Vitalität der Zellen wird von zytotoxischen Mediatoren, die sich im Laufe der 2 Tage im Kulturmedium ansammeln, ungünstig beeinflusst. Diese lagern sich auch in der 3D-Matrix ab und sind mit wenigen Waschschritten bzw. in der kurzen Zeit des Mediumwechsels nur schwer komplett zu entfernen – ohne Frage ist dies ein gravierender Nachteil dieses ansonsten eleganten 3D-Modells. Eine Kopplung des 3D-Modells mit der von Kerscher [65] in unserem Labor entwickelten Perifusionskammer könnte diesen Nachteil beheben. In der Perifusionskammer erfolgt ein Pumpen-getriebener kontinuierlicher Mediaustausch, der die zytotoxischen Mediatoren nicht nur aus dem Kulturmedium sondern nach und nach auch aus der Matrix (über das stoffliche Konzentrationsgefälle) entfernen und gleichfalls stetig auch neue Nährstoffe nachliefern würde.

## **5.2 Untersuchung der Fibrose und der Angiogenese im Fibringelmodell**

In unserem 3D-Fibringelmodell kann man den Einfluss einzelner Faktoren auf die Vitalität und die Insulinausschüttung der mikroverkapselten Langerhans-Inseln gut überprüfen. Es wurde gezeigt, dass die Proliferation der Fibroblasten in dem Fibringel die Vitalität der Inselzellen beeinflusst. In mehreren Versuchen wurde schon nach einer Woche die Vitalität der mit den Fibroblasten co-kultivierten Alginat-mikroverkapselten Langerhans-Inseln deutlich vermindert – im Vergleich zu mikroverkapselten Inseln, die ohne Fibroblasten kultiviert wurden. Dies führte dazu, dass die Alginat-mikroverkapselten Langerhans-Inseln mit der erniedrigten Vitalität erwartungsgemäss auch weniger Insulin sezernierten. Es ist denkbar, dass die verringerte Vitalität der Inselzellen auf die zytotoxische Wirkung von Zytokinen ausgeht, die von den Fibroblasten sezerniert werden. In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 17.5 kDa), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 51 kDa) und auch Stickoxid (NO) das semipermeable Geflecht der Guluron- und Mannurosäuremoleküle der Alginat-Mikrokapseln durchdringen und so bis zu den Zellen vordringen können [66-68]. Ausserdem können diese Zytokine die Hyperproliferation der Inselzellen anregen, die unter Umständen zum Transplantat-Versagen führen, weil so die Überlebenszeit der Langerhans-Inseln verringert wird. Das kann man darauf zurückführen,

dass Betazellen nur eine beschränkte Replikation besitzen [69-73]. Zudem kann sich das Verhältnis von Beta-/non-Betazellen verändern, was wiederum Einfluss auf die Physiologie der Betazellen haben würde [74, 75]. In der vorliegenden Arbeit konnte die vermehrte Ausschüttung von TNF- $\alpha$  nach Co-Kultur der Langerhans-Inseln mit den Fibroblasten eindrucksvoll bestätigt werden. Ebenso eindrucksvoll und signifikant war die verringerte Insulin-Ausschüttung der Betazellen nach Co-Kultur der isolierten Langerhans-Inseln mit den Fibroblasten.

Tatsache ist, dass auch das 3D-Fibringelmodell keine komplette Rekonstruktion der *in vivo* tatsächlich herrschenden Bedingungen erlaubt. Neben den vielen bekannten Interferenzen gibt es auch heute noch wenig erforschte Mechanismen der Angiogenese und auch der Fibrose. Im Körper erfolgen wechselseitige Interaktionen zwischen den diversen Zellen und den diversen Faktoren/Zytokinen. So führt die Proliferation der Fibroblasten einerseits zur Verringerung der Funktionalität des Transplantates, andererseits fördern bestimmte Zytokine, wie der *fibroblast growth factor* [76, 77] die Proliferation der Endothelzellen und so die Neubildung von Blutkapillaren in unmittelbarer Umgebung der transplantierten Inselzellen. Alle Limitationen eingerechnet, erlaubt das Fibringelmodell dennoch die Dekonstruktion der komplexen Abläufe/Interferenzen *in vivo* und ihre schrittweise Rekonstruktion mit begleitender moderner Analytik *in vitro*. Unser Verständnis für die Komplexität von Fibrose und Angiogenese *in vivo* müsste sich in jedem Fall mit der geschickten Anwendung dieses Modell erweitern – das zumindest ist unsere begründete Erwartung.

In der Arbeit von Bottino und Mitarbeitern [78] wurde gezeigt, dass Langerhans-Inseln nach der Isolierung auch unter normalen Kulturbedingungen nach 60 Stunden IL-8 produzieren. Aus anderen Publikationen ist bekannt, dass Fibroblasten in der Lunge über Wechselwirkungen mit spezifischen Rezeptoren IL-1 und TNF- $\alpha$  aktivieren. Ein Effekt dieser Fibroblasten/Rezeptoren-Wechselwirkungen ist eine vermehrte Produktion der Zytokine IL-6 und IL-8 [79]. In unseren Versuchen war die von den mikroverkapselten Langerhans-Inseln produzierte IL-8-Konzentration nach einer 7-tägigen Kulturphase deutlich geringer als die von den Fibroblasten produzierte IL-8-Konzentration. Das ist vielleicht durch eine mangelhafte Reinheit der Inseln zu erklären, die irgendwo zwischen 75 und 95% angesiedelt war; denn in der Regel sind andere als die Betazellen für die IL-8-Produktion verantwortlich. Nach der Kultivierung der Fibroblasten alleine, oder mit leeren

Alginate-Mikrokapseln, oder mit mikroverkapselten Langerhans-Inseln wurden keine signifikanten Unterschiede in der produzierten IL-8-Konzentration festgestellt. Die Ursachen dafür sind nicht bekannt.

### 5.3 Weitere Verwendungsmöglichkeiten des 3D-Fibringelmodells

Die Notwendigkeit der Gefäßneubildung im Empfänger zur schnellen Versorgung des Inselzell-Transplantates klang oben bereits an. Werden Inselzell-Transplantate in den Empfänger übertragen, so erfolgt die Versorgung der Insulin-produzierenden Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen in den ersten 7 Tagen nach Transplantation *per diffusionem*, d.h. durch einen oberflächlichen Stoffaustausch. Die Versorgung der Zellen im Zentrum der Insel ist in aller Regel unzureichend und führt häufig zu Zellnekrosen und damit zu einem unerwünschten Funktionsverlust. Dies wurde von der Gruppe um P. E. Lacy für Ratteninseln [80], von unserer Arbeitsgruppe für porcine Langerhans-Inseln (unpubliziert) und der Gruppe um J. Schrezenmeir [81], wenn diese mehrere Tage *in vitro* kultiviert wurden, festgestellt. Man kann sich vorstellen, dass dieser unerwünschte Effekt sich bei Alginate-mikroverkapselten Langerhans-Inseln noch weiter verstärkt, da die Diffusionsstrecken hier noch länger sind und der Stoffaustausch insgesamt erschwert ist [82]. Es dauert etwa 4-7 Tage, bis aus dem Empfänger in das Transplantat einsprossende Gefäße die Versorgung der syngen transplantierten Mäuse-Inselzellen unter der Nierenkapsel übernehmen [83]; andere Autoren sprechen sogar von 7-14 Tagen *post transplantationem* bis eine ausreichende Versorgung der Inselzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen möglich ist [84]. Mahgoub und Mitarbeiter [85] haben dies nach Transplantation von Amnionmembran-verkapselten Langerhans-Inseln in die Bauchhöhle eindrucksvoll dokumentiert.

Eine Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Fibringelmodell zu benutzen, um ein *composite islet graft* herzustellen, also ein Inselzell-Transplantat mit vorgefertigten künstlichen Empfänger-Blutkapillaren, die sich möglichst schnell mit den nativen Empfänger-eigenen Kapillaren verbinden, um so eine ausreichende Sauerstoff-/Nährstoff-Versorgung der Inseln in der kritischen Phase von Tag +1 bis Tag +7 zu erzielen. Es ging darum, ein Modell zu etablieren mit dem *in vitro* der Nachweis gelingt, dass das kritische Zeitintervall bis zum Zelluntergang deutlich verkürzt werden kann.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass sich Endothelzellen, die auf Kollagen-beschichteten Alginat-mikroverkapselten Langerhans-Inseln kultiviert werden, *in vitro*, also im 3D-Fibringel in verzweigte kapillarähnliche Strukturen ausbilden. Damit hat sich unser Modell vom Ansatz her als tragfähig erwiesen. Johansson und Mitarbeiter [59] berichten, dass die zusätzlich Beimischung von mesenchymalen Stammzellen zu den mit Endothelzellen besiedelten Langerhans-Inseln die Entstehung eines *composite islet graft* deutlich beschleunigt, verglichen mit der ausschliesslichen Besiedelung mit Endothelzellen. Es dürfte heute kein Problem mehr darstellen, ausreichende Mengen Empfänger-eigener Endothelzellen und auch mesenchymaler Stammzellen vor der eigentlichen Transplantation zu generieren, um ein *composite islet graft* herzustellen. Natürlich sollte ein solches Transplantat in diabetischen Kleintiermodellen vor seinem klinischen Einsatz hinreichend getestet werden. Das sollte aber wegen der Vielzahl gut etablierter Diabetes-Modelle in der Ratte und der Maus kein Problem darstellen.

Fügt man diesem soeben beschriebenen und auch erfolgreichen Ansatz im Fibringelmodell *in vitro* den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in der Zellkultur hinzu, dann wird die Aussprossung der neuen Kapillaren deutlich beschleunigt. Das überrascht nicht, weil die Wirkung von VEGF auf Endothelzellen bereits gut untersucht ist [86, 87]. Dieser Erfolg ist insofern bedeutsam, als alles, was die kritische Phase von Tag +1 bis Tag +7 signifikant verkürzt – mehr Kapillaren sind besser als weniger – einen entscheidenden Schritt in Richtung erfolgreicher Inselzell-Transplantation darstellt. Natürlich produzieren Inselzellen unter hypoxischen, d. h. sauerstoffarmen Bedingungen VEGF, das wiederum die Neoangiogenese induziert [88, 89]. Dieser natürliche Vorgang benötigt verständlicherweise Zeit, und genau in dieser Zeit werden die noch vorhandenen funktionsfähigen Betazellen irreversibel geschädigt. Daher muss es das Ziel sein, die besagte Zeitspanne künstlich zu verkürzen – und zwar *in vitro* und noch vor der Transplantation in den Empfänger. Denkbar ist, dass man den natürlichen VEGF-Gehalt durch Zugabe von exogenem VEGF erhöht und so den Prozess der Gefässneubildung beschleunigt.

Dass es auch *in vivo* eine Lösung gibt, also nicht vor, sondern nach erfolgter Inselzell-Transplantation, zeigen Sigrist und Mitarbeiter [90]. Sie transplantierten Alginat-mikroverkapselte Langerhans-Inseln xenogen in diabetische Mäuse und setzten dem Alginat künstlich VEGF hinzu. Dieses wird nach und nach aus den Alginat freigesetzt und



wirkt auf die unmittelbare Umgebung der Langerhans-Inseln im Empfänger, mit dem Erfolg, dass sich schneller als in der Vergleichsgruppe ohne VEGF Blutkapillaren ausbreiten und sich mit dem Empfänger-eigenen Gefäßnetz verbinden und die Inselzell-Transplantate auch deutlich besser funktionieren. Auch die Co-Transplantation von Knochenmarkszellen kann die Revaskularisation des Inselzell-Transplantates beschleunigen und so Funktionsverluste verhindern [91].

Die hiesige Arbeit stellt ein 3D-Fibringelmodell vor, mit dem Fibrose und Angiogenese isolierter Alginat-mikroverkapselter Langerhans-Inseln *in vitro* unter verschiedenen, realitätsnahen Bedingungen erfolgreich analysiert werden können. Das Modell ist jedoch noch keineswegs ausgereizt; so könnte man weitere Zytokine und Zytokin-Gemische in unterschiedlichen Konzentrationen in ihrer Wirkung auf die Fibrose erproben, bzw. neben VEGF weitere Angiogenesefaktoren zur Induktion von möglichst vielen Kapillaren im *composite islet graft* einsetzen. Interessant wäre zudem, neben dem Kollagen auch andere extrazelluläre Matrixproteine wie sie beispielsweise im Pankreas nativ vorkommen [92] – allein oder im Gemisch in den Angiogenesestudien zu verwenden.

## 6 Zusammenfassung

Mikroverkapselte Langerhans-Inseln (Inseln) stellen inzwischen eine experimentell gut erprobte und ernsthaft diskutierte klinische Therapieoption für Typ 1 Diabetiker dar. Der ideale Transplantationsort in diabetische Patienten steht derzeit noch nicht fest. Diskutiert werden das Omentum und die freie Bauchhöhle. Ein bisher ungelöstes Problem ist die ungenügende Versorgung der mikroverkapselten Inseln mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der gerichtete schnelle Transport des Insulins in den Empfänger nach der Transplantation. Diese Frühphase der Versorgung geschieht allein durch Diffusion der Stoffe über ein Konzentrationsgefälle. Bis zur Aussprossung neuer, vom Empfänger ausgehender Kapillaren, die das Transplantat versorgen, vergehen in der Regel 7-14 Tage. In dieser Zeit kommt es zum Funktionsverlust und zum Absterben der Betazellen. Zudem beschleunigen lokale entzündliche Prozesse nach der Transplantation das Fibroblasten-Wachstum, bewirken damit die Fibrose der Mikro kapseln, was zu weiteren Zelluntergängen führt.

Die hiesige Arbeit stellt ein 3D-Fibringelmodell vor, mit dem Fibrose und Angiogenese isolierter Alginat-mikroverkapselter (verkapselter) Inseln *in vitro* unter verschiedenen, realitätsnahen Bedingungen erfolgreich analysiert werden sollen. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Entwicklung des Fibringelmodells vom zweischichtigen zum einschichtigen mit erheblichen methodisch-technischen Vorteilen (Fibroblasten bilden 3D-Netzwerk, Fibroblasten und Kapseln verteilen sich gleichmässig im Gel, kein Herauslösen der Kapseln aus dem Gel).
2. Zu den mitogenen Eigenschaften der verkapselten Inseln tragen bei: die Qualität und Reinheit des Alginats, wie auch die Inseln selbst, die trotz hoher Alginat-Reinheit das Fibroblasten-Wachstum um die Kapsel herum fördert.
3. Der Einfluss der Fibrose auf die verkapselten Inseln wirkt sich wie folgt aus: Die Vitalität der Inselzellen lässt etwa 14 Tage nach Co-Kultur der Kapseln mit humanen Fibroblasten nach; verkapselte Inseln, die mit Fibroblasten co-kultiviert werden, produzieren signifikant weniger Insulin als die Kontrollen.
4. Der Einfluss der Fibrose auf die VEGF-Sekretion aus verkapselten Inseln zeigte, dass die Sekretion aus den Inseln höher war, wenn die Inseln nicht mit Fibroblasten co-kultiviert wurden. Erhalten die Fibroblasten exogenes Insulin als zusätzlichen Wachstumsfaktor im Kulturmedium, dann sezernieren sie deutlich mehr VEGF als

ohne Insulin-Zusatz. Humane Endothelzellen – Ausgangsmaterial für die Kapillarbildung – wachsen ebenfalls sehr gut im einschichtigen Fibringel zusammen mit den Kapseln.

5. Im letzten Schritt galt es leere Mikrokapseln mit Endothelzellen zu besiedeln, um das Aussprossen von Kapillaren zu induzieren. Werden Endothelzellen mit leeren Kapseln im Kulturmedium co-kultiviert, haften sie zwar am Alginat, proliferieren aber nicht. Werden die leeren Kapseln aber mit Kollagen beschichtet, bilden die Endothelzellen bereits nach 2 Tagen einen Zellrasen. Wird ein solches *composite graft* sodann ins Fibringel überführt, wachsen allmählich gefäßähnliche, röhrenförmige Strukturen um die Kapseln herum. Das Kapillar-Wachstum wird noch einmal deutlich beschleunigt, wenn der Angiogenesefaktor VEGF dem Fibringel zugesetzt wird.

Mit dieser Arbeit werden einige wesentliche, wenn auch noch nicht alle relevanten Fragen im Zusammenhang mit der Sauerstoff- und Nährstoff-Versorgung Alginat-mikroverkapselter Langerhans-Inseln beantwortet. Das Modell ist mit diesen Experimenten noch keineswegs ausgereizt; so könnte man weitere Zytokine und Zytokin-Gemische, bzw. Fibroblasten-Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen in ihrer Wirkung auf die Fibrose erproben, bzw. neben VEGF weitere Angiogenesefaktoren zur Induktion von möglichst vielen Kapillaren im *composite islet graft* einsetzen.

Festzuhalten bleibt, dass sich das einschichtige Fibringelmodell hervorragend zur *in vitro* Analyse von Fibrose und Angiogenese mikroverkapselter Langerhans-Inseln eignet; entscheidende Fragen zum Überleben bzw. zur Versorgung der transplantierten Inselzellen können so elegant vor Transplantation beantwortet werden.

## 7 Literatur

1. World Wide Web: International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas, October 2009.
2. Keck, F. S., Pfeiffer, E. F. The first experimental diabetes mellitus. *Acta Diabetol Lat* **26**: 79-81, 1989.
3. Murlin, J. R., Kramer, B. The influence of pancreatic and duodenal extracts on the glycosuria and the respiratory metabolism of de-pancreatized dogs. *J Biol Chem* **15**: 365-383, 1913.
4. Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R., Fletcher, A. A. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can Med Assoc J* **12**: 141-146, 1922.
5. Bach, J. F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* **15**: 516-542, 1994.
6. Ming, C. S., Chen, Z. H., Ming, C. S., Chen, Z. H. Progress in pancreas transplantation and combined pancreas-kidney transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **6**: 17-23, 2007.
7. Gremizzi, C., Vergani, A., Paloschi, V., Secchi, A. Impact of pancreas transplantation on type 1 diabetes-related complications. *Curr Opin Organ Transplant* **15**: 119-123, 2010.
8. Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* **343**: 230-238, 2000.
9. Leitão, C. B., Cure, P., Tharavanij, T., Baidal, D. A., Alejandro, R. Current challenges in islet transplantation. *Curr Diab Rep* **8**: 324-331, 2008.
10. Desschans, B., Van Gelder, F., Van Hees, D., De Rocy, J., Monbaliu, D., Aerts, R., Coosemans, W., Pirenne, J. Evolution in Allocation Rules for Renal, Hepatic, Pancreatic and Intestinal Grafts. *Acta Chir Belg* **108**: 31-34, 2008.
11. Dufrane, D., Gianello, P. Pig islets for clinical islet xenotransplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **18**: 495-500, 2009.
12. Groth, C. G., Korsgren, O., Tibell, A., Tollemar, J., Möller, E., Bolinder, J., Ostman, J., Reinholt, F. P., Hellerström, C., Andersson, A. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* **344**: 1402-1404, 1994.

13. Cozzi, E., Severo, M., Bosio, E., Besenon, F., Ancona, E. Antibody mediated rejection in pig-to-nonhuman primate xenotransplantation models. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **5**: 233-253, 2005 Review.
14. Lanza, R. P., Sullivan, S. J., Chick, W. L. Perspectives in diabetes. Islet transplantation with immunoisolation. *Diabetes* **41**: 1503-1510, 1992.
15. Bisceglie V. Über die antineoplastische Immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-Embryonen. *Ztschr Krebsforsch* **40**: 122-140, 1933.
16. Kobayashi, N. Bioartificial pancreas for the treatment of diabetes. *Cell Transplant* **17**: 11-17, 2008.
17. Schaffellner, S., Stadlbauer, V., Stiegler, P., Hauser, O., Halwachs, G., Lackner, C., Iberer, F., Tscheliessnigg, K. H. Porcine islet cells microencapsulated in sodium cellulose sulfate. *Transplant Proc* **37**: 248-252, 2005.
18. Pollok, J. M., Kölln, P. A. Islets of Langerhans encapsulated with a tissue-engineered membrane of rat chondrocytes maintain insulin secretion and glucose-insulin feedback for at least 30 days in culture. *Transplant Proc* **33**: 1713-1714, 2001.
19. Lanza, R. P., Chick, W. L. Immunoisolation at a turning point. *Immunol Today* **18**: 135-139, 1997.
20. Awrey, D. E., Tse, M., Hortelano, G., Chang, P. L. Permeability of alginate microcapsules to secretory recombinant gene products. *Biotechnol Bioeng* **52**: 472-484, 1996.
21. Van Schilfgaarde, R., De Vos, P. Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. *J Mol Med* **77**: 199-205, 1999.
22. Clayton, H. A., James, R. F., London, N. J. Islet microencapsulation: a review. *Acta Diabetol* **30**: 181-189, 1993.
23. Kulseng, B., Thu, B., Espevik, T., Skjak-Braek, G. Alginate polylysine microcapsules as immune barrier: permeability of cytokines and immunoglobulins over the capsule membrane. *Cell Transplant* **6**: 387-394, 1997.
24. Vidal, B., Serrano, A. L., Tjwa, M. et al. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGF $\beta$ /alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev* **22**: 1747-1752, 2008.

25. De Vos, P., Smedema, I., van Goor, H., Moes, H., van Zanten, J., Netters, S., de Leij, L. F. M., de Haan, A., de Haan, B. J. Association between macrophage activation and function of micro-encapsulated rat islets. *Diabetologia* **46**: 666-673, 2003.
26. Langlois, G., Dusseault, J., Bilodeau, S., Tam, S. K., Magassouba, D., Hallé, J. Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules. *Acta Biomater* **5**: 3433-3440, 2009.
27. Hara, M., Dizon, R. F., Glick, B. S., Lee, C. S., Kaestner, K. H., Piston, D. W., Bindokas, V. P. Imaging pancreatic beta-cells in the intact pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**: 1041-1047, 2006.
28. Moskalewski, S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Compar Endocrinol* **5**: 342-353, 1965.
29. Van Schilfgaarde, R., de Vos, P. Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. *J Mol Med* **77**: 199-205, 1999.
30. Menger, M. D., Jaeger, S., Walter, P., Feifel, G., Hammersen, F., Messmer, K. Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes* **38**: 199-201, 1989.
31. Lammert, E., Gu, G., McLaughlin, M., Brown, D., Brekken, R., Murtaugh, L. C., Gerber, H. P., Ferrara, N., Melton, D. A. Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol* **13**: 1070-1074, 2003.
32. Rajnoch, J., Viklicky, O. Angiogenesis and organ transplantation. *Folia Microbiol (Praha)* **49**: 499-505, 2004.
33. Gorodetsky, R. The use of fibrin based matrices and fibrin microbeads (FMB) for cell based tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther* **8**: 1831-1846, 2008, Review.
34. Currie, L. J., Sharpe, J. R., Martin, R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg* **108**: 1713-1726, 2001.
35. Fiegel, H. C., Kneser, U., Kluth, D., Metzger, R., Till, H., Rolle, U. Development of hepatic tissue engineering. *Pediatr Surg Int* **25**: 667-763, 2009, Review.
36. Shaikh, F. M., Callanan, A., Kavanagh, E. G., Burke, P. E., Grace, P. A., McGloughlin, T. M. Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs* **188**: 333-346, 2008.

37. Pepper, M. S., Vassalli, J. D., Orci, L., Montesano, R. Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis. *Exp Cell Res* **204**: 356-363, 1993.
38. Gillery, P., Bellon, G., Coustry, F., Borel, J. P. Cultures of fibroblasts in fibrin lattices: models for the study of metabolic activities of the cells in physiological conditions. *J Cell Physiol* **140**: 483-490, 1989.
39. Nakatsu, M. N., Sainson, R. C., Aoto, J. N., Taylor, K. L., Aitkenhead, M., Perez-del-Pulgar, S., Carpenter, P. M., Hughes, C. C. Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modelled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1. *Microvas Res* **66**: 102-112, 2003.
40. Janvier, R., Sourla, A., Koutsilieris, M., Doillon, C. J. Stromal fibroblasts are required for PC-3 human prostate cancer cells to produce capillary-like formation of endothelial cells in a three-dimensional co-culture system. *Anticancer Res* **17**: 1551-1557, 1997.
41. Fournier, N., Doillon, C. J. In vitro effects of extracellular matrix and growth factors on endothelial cell migration and vessel formation. *Cells Mater* **4**: 399-408, 1994.
42. Ricordi, C., Socci, C., Davalli, A. M., Staudacher C., Baro, P., Vertova, A., Sassi, I., Gavazzi, F., Pozza, G., Di Carlo, V. Isolation of the elusive pig islet. *Surgery* **107**: 688-693, 1990.
43. Heiser, A., Ulrichs, K., Müller-Ruchholtz, W. Isolation of porcine pancreatic islets: low trypsin activity during the isolation procedure guarantees reproducible high islet yields. *J Clin Lab Anal* **8**: 407-411, 1994.
44. Latif, Z. A., Noel, J., Alajandro, R. A. A simple method of staining fresh and cultured islets. *Transplantation* **45**: 827-830, 1988.
45. Zimmermann, U., Hasse, C., Rothmund, M., Kühtreiber, W. Biocompatible encapsulation materials: fundamentals and application. In: Kühtreiber, W. M., Lanza, R. P., Chick, W. L. (Eds.). *Cell Encapsulation Technology And Therapeutics*. Birkhäuser-Verlag, Boston. p. 40-52, 1999.
46. Gröhn, P., Klöck, G., Zimmermann, U. Collagen-coated Ba<sup>2+</sup>-alginate microcarriers for the culture of anchorage-dependent mammalian cells. *Biotechniques* **22**: 970-975, 1997.

47. Pepper, M. S., Vassalli, J. D., Orci, L., Montesano, R. Biphasic effect of transforming growth factor beta 1 on in vitro angiogenesis. *Exp Cell Res* **204**: 356-363, 1993
48. Kobayashi, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* **13**: 2400-2407, 2008.
49. Germain, S., Monnot, C., Muller, L., Eichmann, A. Hypoxia-driven angiogenesis: role of Tpp cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr Opin Hematol* **17**: 245-251, 2010.
50. Lember, N., Wesche, J., Petersen, P., Doser, M., Zschocke, P., Becker, H. D., Ammon, H. P. Encapsulation of islets in rough surface, hydroxymethylated polysulfone capillaries stimulates VEGF release and promotes vascularization after transplantation. *Cell Transplant* **14**: 97-108, 2005.
51. Mendola, J. F., Goity, C., Fernández-Alvarez, J., Saenz, A., Benarroch, G., Fernández-Cruz, L., Gomis, R. Immunocytochemical study of pancreatic revascularization in islet isograft. Effect of hyperglycemia of the recipient and of in vitro culture of islets. *Transplantation* **57**: 725-730, 1994.
52. Seybold, D., Schildhauer, T. A., Geßmann, J., Muhr, G., Köller, M., Roetman, B. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells is promoted by a leukocyte-containing fibrin matrix. *Langenbecks Arch Surg* [epub ahead of print], 2010.
53. Yang, H. S., La, W. G., Bhang, S. H., Jeon, J. Y., Lee, J. H., Kim, B. S. Heparin-Conjugated Fibrin as an Injectable System for Sustained Delivery of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part A*. **16**: 1225-1233, 2010.
54. Park, H., Karajanagi, S., Wolak, K., Aanestad, J., Deheron, L., Kobler, J., Lopez-Guerra, G., Heaton, J., Langer, R. S., Zeitels, S. 3D hydrogel model using adipose-derived stem cells for vocal fold augmentation. *Tissue Eng Part A*. February 2010: 535-543.
55. Chen, Z., Htay, A., Dos Santos, W., Gillies, G. T., Fillmore, H. L., Sholley, M. M., Broaddus, W. C. In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells. *J Neurooncol* **92**: 121-128, 2009.
56. Nakatsu, M. N., Davis, J., Hughes, C. C. Optimized fibrin gel bead assay for the study of angiogenesis. *J Vis Exp* **186**: 1-2, 2007.



57. Taylor, K. L., Leaman, D. W., Grane, R., Mechti, N., Borden, E. C., Lindner, D. J. Identification of interferon-beta-stimulated genes that inhibit angiogenesis in vitro. *J Interferon Cytokine Res* **28**: 733-740, 2008.
58. Linn, T., Schneider, K., Hammes, H. P., Preissner, K. T., Brandhorst, H., Morgenstern, E., Kiefer, F., Bretzel, R. G. Angiogenic capacity of endothelial cells in islets of Langerhans. *FASEB J* **17**: 881-883, 2003.
59. Johansson, U., Rasmusson, I., Niclou, S. P., Forslund, N., Gustavsson, L., Nilsson, B., Korsgren, O., Magnusson, P. U. Formation of composite endothelial cell-mesenchymal stem cell islets: a novel approach to promote islet revascularization. *Diabetes* **57**: 2393-2401, 2008.
60. Mooney, E., Loh, C., Pu, L. L. The use of fibrin glue in plastic surgery. ASPS/PSEF Technology Assessment Committee. *Plast Reconstr Surg* **124**: 989-992, 2009.
61. Dorweiler, B., Vahl, C.-F. Pathogenesis of atherosclerosis: Evaluation of an in vitro model for the simulation of plaque development. *Z Herz-, Thorax-, Gefäßschirurgie* **21**: 225-235, 2007.
62. Lanir, N., Ciano, P. S., Van de Water, L., McDonagh, J., Dvorak, A. M., Dvorak, H. F. Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration. *J Immunol* **140**: 2340-2349, 1988.
63. Grassl, E. D., Oegema, T. R., Tranquillo, R. T. Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a media equivalent. *J Biomed Mater Res* **60**: 607-612, 2002.
64. Jockenhoevel, S., Zund, G., Hoerstrup, S. P., Chalabi, K., Sachweh, J. S., Demircan, L., Messmer, B. J., Turina, M. Fibrin gel - advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg* **19**: 424-430, 2001.
65. Kerscher, A. Entwicklung einer mikroskopierbaren Perfusions-Kulturkammer für die Kultivierung, die In-Vitro-Vitalitäts- und Funktionsdiagnostik von endokrinen Zellen. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg, 2006.
66. Cole, D. R., Waterfall, M., McIntyre, M., Baird, J. D. Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure. *Diabetologia* **35**: 231-237, 1992.

67. Bergmann, L., Kröncke, K. D., Suschek, C., Kolb, H., Kolb-Bachofen, V. Cytotoxic action of IL-1 beta against pancreatic islets is mediated via nitric oxide formation and is inhibited by NG-monomethyl-L-arginine. *FEBS Lett* **299**: 103-106, 1992.
68. Kulseng, B., Thu, B., Espevik, T., Skjak-Braek, G. Alginate polylysine microcapsules as immune barrier: Permeability of cytokines and immunoglobulins over the capsule membrane. *Cell Transplant* **6**: 387-394, 1997.
69. Hunter, T., Pines, J. Cyclins and cancer. *Cell* **66**: 1071-1074, 1991.
70. Richter, K. H., Afshari, C. A., Annab, L. A., Burkhart, B. A., Owen, R. D., Boyd, J., Barrett, J. C. Down-regulation of cdc2 in senescent human and hamster cells. *Cancer Res* **51**: 6010-6013, 1991.
71. Adelman, R., Saul, R. L., Ames, B. N. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2706-2708, 1988.
72. Franceschi, C. Cell proliferation, cell death and aging. *Aging (Milan)* **1**: 3-15, 1989.
73. Hayflick, L. The cell biology of human aging. *N Engl J Med* **295**: 1302-1308, 1976.
74. Pipeleers, D., In't Veld, P., Maes, E., Van de Winkel, M. Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 7322-7325, 1982.
75. Keymeulen, B., Korbitt, G., De Paepe, M., Gorus, F., Klöppel, G., Pipeleers, D. G. Long term metabolic control by rat islet grafts depends on the composition of the implant. *Diabetes* **45**: 1814-1821, 1996.
76. Le, K. N., Hwang, C.-W., Tzafriri, A. R., Lovich, M. A., Hayward, A., Edelman, E. R. Vascular Regeneration by Local Growth Factor Release Is Self-Limited by Microvascular Clearance. *Circulation* **119**: 2928-2935, 2009.
77. Przybylski, M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis. *J Wound Care* **18**: 516-519, 2009.
78. Bottino, R., Balamurugan, A. N., Tse, H., Thirunavukkarasu, C., Ge, X., Profozich, J., Milton, M., Ziegenfuss, A., Trucco, M., Piganelli, J. D. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes* **53**: 2559-2568, 2004.
79. Monick, M. M., Aksamit, T. R., Geist, L. J., Hunninghake, G. W. Dexamethasone inhibits IL-1 and TNF activity in human lung fibroblasts without affecting IL-1 or TNF receptors. *AJP - Lung Cell Mol Physiol* **267**: 33-38, 1994.

80. Ono, J., Lacy, P. E., Michael, H. E., Greider, M. H. Studies of the functional and morphologic status of islets maintained at 24°C for four weeks in vitro. *Am J Pathol* **97**: 489-503, 1979.
81. Schrezenmeir, J., Gerö, L., Laue, C., Kirchgessner, J., Müller, A., Hüls, A., Passmann, R., Hahn, H. J., Kunz, L., Mueller-Klieser, W. The role of oxygen supply in islet transplantation. *Transplant Proc* **24**: 2925-2929, 1992.
82. Schrezenmeir, J., Kirchgessner, J., Gerö, L., Kunz, L. A., Beyer J., Mueller-Klieser, W. Effect of Microencapsulation on Oxygen Distribution in Islet Organs. *Transplantation* **57**: 1308-1314, 1994.
83. Morini, S., Brown, M. L., Cicalese, L., Elias, G., Carotti, S., Gaudio, E., Rastellini, C. Revascularization and remodelling of pancreatic islets grafted under the kidney capsule. *J Anat* **210**: 565-577, 2007.
84. Jansson, L., Carlsson, P. O. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia* **45**: 749-763, 2002.
85. Mahgoub, M. A., Ammar, A., Fayez, M., Edris, A., Hazem, A., Akl, M., Hammam, O. Neovascularization of the amniotic membrane as a biological immune barrier. *Transplant Proc* **36**: 1194-1198, 2004.
86. Folkman, J., Klagsbrun, M. Angiogenetic factors. *Science* **235**: 442-447, 1987.
87. Coultas, L., Chawengsaksophak, K., Rossant, J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* **438**: 937-945, 2005.
88. Goodsell, D. S. Fundamentals of Cancer Medicine. The Molecular Perspective: VEGF and Angiogenesis. *The Oncologist* **7**: 569-570, 2002.
89. Szekanecz, Z., Besenyei, T., Paragh, G., Koch, A. E. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* **42**: 563-573, 2009.
90. Sigrist, S., Mechine-Neuville, A., Mandes, K., Calenda, V., Braun, S., Legeay, G. Influence of VEGF on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice. *Cell Transplant* **12**: 627-635, 2003.
91. Sakata, N., Chan, N. K., Chrisler, J., Obenaus, A., Hathout, E. Bone Marrow Cell Cotransplantation With Islets Improves Their Vascularization and Function. *Transplantation* **89**: 686-693, 2010.
92. Meyer, T., Czub, S., Chodnewska, I., Beutner, U., Hamelmann, W., Klöck, G., Zimmermann, U., Thiede, A., Ulrichs, K. Expression pattern of extracellular matrix proteins in the pancreas of various domestic pig breeds, the Goettingen Minipig and the Wild Boar. *Ann Transplant* **2**: 17-26, 1997.

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei all jenen Menschen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben und den Grundstein für mein Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit legten:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Transplantations-Immunologie“ (ETI) der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie (Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer) im Klinikum der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg unter der Leitung von Frau Professor Dr. rer. nat. Karin Ulrichs angefertigt. Für die Überlassung des interessanten Themas, für motivierende und kritische Diskussionen, die wissenschaftlichen Freiräume, die mir ein unbefangenes Experimentieren ermöglichten sowie die aus zahlreichen Diskussionen hervorgegangenen Anregungen bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Professor Ulrichs. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit aus Mitteln der Grundausrüstung, und ihr stetes Interesse an ihrem Fortschreiten möchte ich mich ebenso herzlich bei Herrn Professor Germer und Herrn Professor Dr. med. Prof. h. c. Arnulf Thiede, dem ehemaligen Direktor der Klinik, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Kollegen und Freund, Dr. med. Vassiliy Moskalenko, der mich stetig bei der Arbeit unterstützt hat. Sein guter Rat und manche technische Hilfe haben den Fortgang der Arbeit sehr beflügelt. Er hat mir seine Freude an klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeiten vermittelt und meine Entscheidung für die Weiterbildung zum Facharzt für Unfallchirurgie und Orthopädie stark beeinflusst.

Insbesondere möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe ETI bedanken. Sie haben mir jederzeit mit hervorragender praktischer Hilfe bei der gemeinsamen Bearbeitung des Probenmaterials und auch mit konstruktiver Kritik zur Seite gestanden. Ohne die sehr freundschaftliche Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dafür möchte ich sehr herzlich Frau Dr. I. Chodnevskaja, Frau S. Gahn, Frau S. Eber, Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Otto, Frau L. Stevenson-Knebel sowie Herrn H. Bergauer und Frau M. Baumgartl-Schlotter aus dem Fotolabor danken.

Die vorliegende Arbeit entstand mit grosszügiger finanzieller Unterstützung durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) Würzburg, Teilprojekt D3.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während der Anfertigung meiner Arbeit durch gute Gespräche ermutigt, begleitet und unterstützt haben.

## Liste der Veröffentlichungen (A. Medwedowsky)

### Publizierte Abstrakte

**Medwedowsky A**, Moskalenko V, Chodnevsckaja I, Eber S, Gahn S, Knoke K, Ulrichs K. A 3D fibrin-gel model to study fibrosis and vascularization of encapsulated cells/tissues (ENC) *in vitro*. *Cytotherapy* 6(3), 285, 2004

Ulrichs K, **Medwedowsky A**, Moskalenko V. Entwicklung eines Fibringels zur Untersuchung von Fibrose und Angiogenese mikroverkapselter Langerhans-Inseln *in vitro*. *Transplantationsmedizin (Suppl)*, 32, 2004

Moskalenko V, **Medwedowsky A**, Ulrichs K. Angiogenesis/Vasculogenesis of the bioartificial pancreatic graft using a newly developed fibringel-model *in vitro*. *Acta Diabetol* 42: 47, 2005

### Vortrag

**Medwedowsky A**, Ulrichs K. Fibringelmodell zur Untersuchung der Fibrose und der Angiogenese der mikroverkapselten Langerhans-Inseln *in vitro*. 13. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG), Kiel, 21.-23. Oktober 2004

### Poster

**Medwedowsky A**, Moskalenko V, Ulrichs K. A 3D fibringel model to study fibrosis and vascularization of encapsulated cells/tissues *in vitro*. International Conference „Strategies in Tissue Engineering“, Würzburg, 17-19 June 2004

**Medwedowsky A**, Moskalenko V, Ulrichs K. Fibringelmodell zur Untersuchung der Fibrose und der Angiogenese der mikroverkapselten Langerhans-Inseln *in vitro*. Promomed-Kongress; Promotionen in der Medizin; Fachschaft der Medizinischen Fakultät, Würzburg, 26.-27. November 2004 (**Posterpreis**)

**Medwedowsky A**, Moskalenko V, Otto, C, Ulrichs K. A3-Dimensional (3D) fibringel model to study fibrosis and vascularization of encapsulated cells/tissues (ENC) *in vitro*. IZKF-Workshop Regenerative Medicine, Evangelische Akademie, Meissen, 16-18 March 2005 (**Posterpreis**)

Moskalenko V, **Medwedowsky A**, K. Ulrichs. Angiogenesis/Vasculogenesis of the bioartificial pancreatic graft using a newly developed fibringel-model *in vitro*. 24<sup>th</sup> Workshop of the Study Group on Artificial Insulin Delivery, Pancreas and Islet Transplantation (AIDPIT) of the European Association for the Study of Diabetes (EASD) Igl, Austria, 23-25 January 2005.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Artur Medwedowsky
Geburtsdatum	18.08.1979
Geburtsort	Lviv (Lemberg), Ukraine
Familienstand	ledig, keine Kinder

### **Schulbildung**

1986-1994	Allgemeinbildende Schule Nr. 50, Lviv, Ukraine
1994-1996	Private Jüdische Schule, Lviv, Ukraine
1996	Abitur (Note 1,2)

### **Hochschulbildung**

1996-1998	Studium der Biologie an der Universität Lviv
1999-2000	Studienkolleg bei den Universitäten des Freistaates Bayern, München
WS 2000-WS 2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
WS 2005-WS 2006	Studium der Humanmedizin an der Universität Erlangen
März 2002	Ärztliche Vorprüfung, Physikum (Note 2,33)
März 2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3)
April 2005	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3,33)
Mai 2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2)

### **Praktische Erfahrungen**

April 2003	Vierwöchige Famulatur, Chirurgie, Missionsärztliche Klinik, Würzburg
September 2003	Vierwöchige Famulatur, Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Würzburg
März 2003	Vierwöchige Famulatur, Intensivstation, Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Würzburg
Juni 2004	Vierwöchige Famulatur, Viszeralchirurgie, VA Medical

	Center, Northport, NY, USA
5/2005-8/2005	Sechzehn Wochen Wahlfach Anästhesie, Anästhesiologische Klinik am Universitätsklinikum Erlangen
8/2005-11/2005	Sechzehn Wochen Innere Medizin, Klinikum Nürnberg
11/2005-2/2006	Sechzehn Wochen Chirurgie, Klinikum Nürnberg
7/2006-5/2010	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung der Kreisklinik Roth
Seit 7/2009	Teilnahme an der notärztlichen Versorgung im Kreis Roth
Ab 5/2010	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädische Chirurgie, Klinikum Offenbach
2003-2005	Anfertigung der vorliegenden Arbeit in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I (Direktor: Prof. Dr. med. A. Thiede) des Universitätsklinikums Würzburg, Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantationsmedizin unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs

Würzburg, im Mai 2010

Artur Medwedowsky