

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
des Zentrums für Innere Medizin
Universitätsklinikum Giessen
Betreuer: Prof. Dr. med. R.G. Bretzel

Eingereicht über das Institut für Ökotröphologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen
Im Fachbereich
Vertreten durch: Prof. Dr. med. M. Krawinkel

**Evaluierung verschiedener Techniken zur
Präservierung von porzinen Pankreata für die nachfolgende
Isolierung Langerhansscher Inselzellen.**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. oec. troph.)
am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotröphologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Eingereicht von
Marcus Iken
Dipl. oec. troph. aus
Hannover

Giessen 2005

Dissertation am Fachbereich

Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und Umweltmanagement

Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 10. Oktober 2005

Prüfungskommission:

Vorsitzende: Prof. Dr. Kunz

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Krawinkel

2. Gutachter: Prof. Dr. R.G. Bretzel

Prüfer: Prof. Dr. T. Linn

Prüfer: Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIALIEN UND METHODEN	5
2.1 MATERIALIEN	5
2.1.1 Reagenzien	5
2.1.2 Kit-Systeme	6
2.1.3 Narkotika	6
2.1.4 Enzyme	6
2.1.5 Zusammensetzung häufig benutzter Lösungen und Puffer	6
2.2 METHODEN	9
2.2.1 Beschaffung der Schweinepankreatata	9
2.2.2 Lagerung der Pankreatata	9
2.2.2.1 Organpräservierung in UW-Lösung	9
2.2.2.2 Two-Layer Methode	9
2.2.2.3 One-Layer Methode	10
2.2.3 Inselzellisolierung	11
2.2.3.1 Digestion	11
2.2.3.2 Purifikation	12
2.2.4 Inselkultivierung	13
2.2.5 Qualitätskontrolle	13
2.2.5.1 in vitro Qualitätskontrolle	13
2.2.5.1.1 Quantifizierung	13
2.2.5.1.2 ATP-Bestimmung	14
2.2.5.1.3 Proteinbestimmung	14

2.2.5.1.4 Insulinbestimmung	14
2.2.5.1.5 Bestimmung der Mitochondrienaktivität	14
2.2.5.1.6 Glukosestimulierte Insulinsekretion	15
2.2.5.1.7 Viabilität	15
2.2.5.2 in vivo Qualitätskontrolle	15
2.2.6 Statistische Auswertung	16
3. ERGEBNISSE	17
3.1 Einteilung der Versuchsgruppen	17
3.2 Vorversuche	19
3.3 Teilstudie 1 (Enzymapplikation, Präservierungsmethodik)	20
3.4 Teilstudie 2 (Technik der PFC-Applikation)	26
3.5 Teilstudie 3 (Präservierungstemperatur)	32
3.6 Teilstudie 4 (Prävention ischämischer Schäden durch nachfolgende PFC-Lagerung)	38
4. DISKUSSION	45
4.1 Zeitpunkte der Enzymapplikation (Teilstudie 1)	46
4.2 Technik der PFC-Applikation (Teilstudie 2)	47
4.3 Präservierungstemperatur (Teilstudie 3)	49
4.4 Prävention ischämischer Schäden durch nachfolgende PFC-Lagerung (Teilstudie 4)	51
5. ZUSAMMENFASSUNG	52
6. LITERATURVERZEICHNIS	54

7. ANHANG	58
8.1 Abkürzungen	58
8.2 Tabellen	60
8.3 Abbildungen	61
Danksagung	64

1. Einleitung

Der Diabetes mellitus ist eine in den Industrienationen häufig anzutreffende Stoffwechselkrankheit. Die beiden häufigsten Formen sind der insulinabhängige Typ 1 und der insulinunabhängige Typ 2 Diabetes.

Gekennzeichnet sind beide Formen des Diabetes mellitus durch das Unvermögen des Organismus, die Homöostase des Glucosehaushaltes zu gewährleisten. Dabei greifen zwei unterschiedliche Pathomechanismen, die beide letztendlich in der Dysregulation enden.

Auf den Diabetes Typ 2 soll in der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen werden.

Der Typ 1 Diabetes, meist im Jugendalter beginnend und deshalb auch juveniler Diabetes genannt, ist mit etwa 5 % Prävalenz vertreten [1]. Zu Beginn der Erkrankung steht eine unspezifische Autoimmuninsulinitis, die durch eine progrediente Zerstörung der β -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas des Patienten gekennzeichnet ist. Im weiteren Verlauf entwickelt der Diabetiker einen absoluten Insulinmangel, der eine Substitution von Insulin zur Regulation des Blutzuckerhaushaltes erfordert.

Trotz der ständig verbesserten Diabetestherapie sind Lebenserwartung und Lebensqualität des Patienten durch die Entwicklung und den Verlauf von Spätkomplikationen an Herz- und Gefäßsystem, Augen, Nieren und Nervensystem bestimmt [2].

Diese Spätkomplikationen sind im wesentlichen Mikroangiopathien an Augen, Nerven und Nieren sowie Makroangiopathien in Form der Arteriosklerose. Dabei muss bei ca. 50 % der Diabetiker nach fünfundzwanzigjähriger Krankheitsdauer mit einer Nierenfunktionsstörung gerechnet werden [3]. Das größte Risiko einer intensivierten Insulintherapie besteht jedoch in der Möglichkeit einer schweren Hypoglykämie, die nicht selten einen letalen Ausgang findet [4].

Ziel der Diabetesforschung ist es daher, Therapieformen zu entwickeln, die Spätschäden am Organismus und die Hypoglykämien des Diabetikers verhindern.

Neben der Implantation von Insulinpumpen, besteht eine weitere Therapiemöglichkeit im biologischen Ersatz des erkrankten Inselzellapparates durch eine Pankreas- oder Inselzelltransplantation. Durch eine Transplantation lässt sich eine signifikante Verbesserung, im Idealfall eine Normalisierung des glykolisierten Hämoglobins, als Langzeitparameter einer korrekten Blutzuckereinstellung, erreichen [4, 5].

Einleitung

Die Pankreastransplantation gilt heute als ein Verfahren, das in den letzten Jahren mit Ein-Jahres-Funktionsraten von bis zu 90 % gute Erfolge zeigte [7]. Bei diesem technisch aufwendigen Eingriff unter Vollnarkose stehen einer signifikanten Verbesserung der Lebensqualität [8] und Lebenserwartung [9] des Patienten schwere Komplikationen, wie z.B. eine Pankreatitis mit all ihren Folgeerkrankungen [10], gegenüber.

Eine Alternative hierzu ist die alleinige Transplantation des endokrinen Pankreasanteils. Bei dieser minimal-invasiven Therapie werden isolierte Langerhanssche Inseln unter lokaler Betäubung über einen Katheder in die Pfortader der Leber injiziert, wo sich die Zellen ansiedeln und ihre Funktion aufnehmen. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens bietet die Möglichkeit einer Inselvorbehandlung in Kultur, um so die Dosis der applizierten Immunsuppressiva zu reduzieren [11].

Obwohl die Inselzelltransplantation durch die Anwendung einer kortikoidfreien Immunsuppression sehr gute Erfolge neben der Insulinfreiheit zeigt [11], ist es bis jetzt nur in sehr seltenen Fällen möglich einen Empfänger mit nur einer Inselzelltransplantation von seinem vollständigen Insulinmangel und den damit verbundenen Spätfolgen zu heilen [12]. Der Mangel an Spenderorganen [13] und die teilweise durch die Entnahme bedingte schlechte Qualität der menschlichen Pankreasspenden [14], macht es unmöglich, alle potentiellen Patienten mit Typ I Diabetes mit einer Transplantation zu behandeln. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, sowohl nach anderen Spenderressourcen zu suchen, als auch nach einer Möglichkeit, Inselzellen aus qualitativ minderwertigen Organen transplantationsfähig zu machen.

Als eine mögliche Spenderquelle für Inselzellmaterial tritt seit einigen Jahren das Hausschwein in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Das vom Hausschwein produzierte Insulin entspricht in seiner Aminosäuresequenz zu 98 % dem humanen Insulin und wurde schon vor der synthetischen Herstellung von humanem Insulin als Insulinersatz beim Menschen angewandt.

Aufgrund der hohen Verfügbarkeit, der Ähnlichkeit des produzierten Insulins und der geringen soziokulturellen Probleme, ist das Schwein als xenogener Spender [15] eine herausragende Möglichkeit, den ansteigenden Bedarf an transplantationsfähigem Gewebe zu befriedigen [16].

Das große Potential der Xenotransplantation von Schweineinseln auf den Menschen wird allerdings durch die spezifische Fragilität der porzinen Inseln während des enzymatischen Inselisolierungsverfahrens beeinträchtigt [17]. Frühere Studien haben gezeigt, dass die porzine Inselisolierung durch Modifikation der Digestion [18], eine Selektion der

Einleitung

Spendertiere hinsichtlich der Rasse [19], des Alters [20] und der individuellen Histologie und Morphologie [21] optimiert werden kann. Ein verbleibendes Risiko bei der Transplantation von tierischem Gewebe auf den Menschen ist allerdings die Übertragung von pathogenen Mikroorganismen und des porcinen endogenen Retrovirus (PERV), der in mehreren Varianten im Genom der Schweine verankert ist [22]. Die Wahrscheinlichkeit einer Xenobiose, die ansonsten die größte Hürde für die klinische Realisierung der Xenotransplantation darstellt, kann durch eine zentrale Aufzuchtstelle mit kontinuierlicher Überwachung der möglichen Spendertiere in einer keimfreien Umgebung [23] und durch Impfung der Spendertiere gegen die bekannten Mikroorganismen minimiert werden [24].

Der Transport von entnommenen Organen zu dezentral liegenden Isolationszentren wird allerdings mit einer signifikanten Ischämiezeit des Spendergewebes verbunden sein. Charakterisiert ist die Ischämie oder Blutleere eines Organs durch die komplette Unterbrechung der Sauerstoff- und Substratzufuhr sowie der erhöhten Akkumulation von CO₂ und anderen Metaboliten. Der rasch fortschreitende zellinterne Katabolismus während der Ischämie, führt bei entsprechender Dauer zur Nekrose der Zellen und zu einem Funktionsverlust des ischämischen Organs [25]. Während die warme oder normothermische Ischämie den Zeitraum des Verbleibs in situ beschreibt, charakterisiert die kalte Ischämie den Transport und die Lagerung der resezierten Organe bei hypothermen Temperaturen. Sie spielt eine entscheidende Rolle für die Ausbeute und Viabilität der isolierten Inseln [14].

Um die Organfunktionalität und -integrität während der Ischämie zu gewährleisten, wurde das Pankreas bisher mit kalter Lösung der Universität von Wisconsin (UW) vaskulär perfundiert und anschließend in kalter UW-Lösung inkubiert [26, 27]. Ein signifikanter Fortschritt bei der Präservierung von ischämisch geschädigten Organen konnte durch die Etablierung der so genannten Two-Layer Methode (TLM) erzielt werden. Hierbei wird UW-perfundiertes und -inkubiertes Pankreasgewebe auf Perfluorkarbon (PFC), ein hoch effektiver Sauerstoffträger, gelagert, um das Gewebe während der Lagerung kontinuierlich mit O₂ zu versorgen. Diese Technik ermöglichte die extreme Verlängerung der Ischämie zur anschließenden erfolgreichen Isolierung von Hundeinseln [28]. Erste Ergebnisse in der klinischen Inselzelltransplantation zeigen das große Potential dieser Methode, die Funktion geschädigten Gewebes nach Transplantation zu verbessern [29, 30].

Da bisher noch keinerlei relevante Daten vorlagen, war es bisher völlig unklar, ob die PFC-Lagerung für die Präservierung von Schweinepankreatata geeignet ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen die PFC-Anwendung beim ischämischen Schweinepankreas zum Zweck der nachfolgenden Isolierung zu etablieren und zu optimieren,

Einleitung

zum anderen sollte geklärt werden, ob eine ischämisch bedingte Schädigung des Inselgewebes durch die Anwendung von PFC zumindest partiell revidiert werden kann.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Reagenzien

Reagenz	Bestellnummer	Hersteller
AEBSF-HCl	12745	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Aqua destillata	001428	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
ATP-Lysepuffer	92252120	Roche, Mannheim
Biocoll Separating Solution	L6125	Biochrom, Berlin
Ciprobay	BXB816-2	Bayer, Leverkusen
CMRL 1066	T15-095	Biochrom, Berlin
Diphenylthiokarbazon	200-454-1	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	K32461731 341	Sigma, Deisenhofen
Fetal Calf Serum	S0125	Biochrom, Berlin
Freka-Nol	4916781	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Glukose Reagenz + Standard	671640	Beckmann Instr. GmbH, München
Glukose (40 %)	0484A96	Mediatech, USA
Hanks` Balanced Salt Solution (10x)	L2025	Biochrom, Berlin
Hepes Buffer Solution	L1613	Biochrom, Berlin
Kaliumsorbit	1535 935	Merck, Darmstadt
Medium 199 w/o Carbonat	042-01180M	Biochrom, Berlin
N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine	K0202	Biochrom, Berlin
Natrium Chlorid (0,9 %)	001498	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Natriumdeoxycholat	206-132-7	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat (8,4 %)	163E	Biochrom, Berlin
Natriumhydrogenphosphat	B897970	Merck, Darmstadt
Natriumziträt	B898090	Merck, Darmstadt
Newborn Calf Serum	S0125	Biochrom, Berlin
Penicillin-Streptomycin	DE17-602E	Cambrex, Belgien
Perfluorkarbon (95 %)	S0319A/2	F2 Chemicals, England
Phenolrotindikator	50H-0399	Biochrom, Berlin
Phosphat Puffer Lösung	437-302	BAG, Lich
Schweineserum	S0165	Biochrom, Berlin
Streptozotocin	16539	Sigma, Deisenhofen
Tetracyclin	35866	Sigma, Deisenhofen
Tritisol	109970	Merck, Darmstadt
Trypanblau (0,4 %)	15250-061	Invitrogen, USA
Ultra-Glutamin	BE17-605E/U1	Cambrex, Belgien
UW-Lösung	D4B03 7100	Bristol-Meyers Squibb GmbH, München

Materialien

2.1.2 Kit-Systeme

Kit-System	Bestellnummer	Hersteller
ATP-KIZ HS II	91123220	Roche, Mannheim
Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	G3580	Promega GmbH, Mannheim
Insulin ELISA	042802	DRG Instruments GmbH, Marburg

2.1.3 Narkotika

Narkotikum	Bestellnummer	Hersteller
Äther	130 GR	ASID Bonz GmbH, Deutschland
Ketamin	4703	Ratiopharm, Ulm
Narcoren®	134063	Merial GmbH, Hallbergmoos
Rompun	KP02EK1	Bayer, Leverkusen

2.1.4 Enzyme

Enzym	Bestellnummer	Hersteller
Kollagenase NB-8	17456	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Neutrale Protease	30301	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

2.1.5 Zusammensetzung häufig benutzter Lösungen und Puffer

CMRL 1066 (500 ml):

500 mg	Glukose
60 ml	Schweineserum
60 ml	Foetal Calf Serum
6 ml	Ciprobay
5,5 ml	Na-Pyruvat
5,5 ml	Penicillin-Streptomycin
3,5 ml	Ultra-Glutamin
1 – 2,5 ml	1N NaOH

Dithizone Lösung:

50 mg	Diphenylthiokarbazon
50 ml	HBSS (1x)
5 ml	Dimethylsulfoxid

Materialien

Functionality Solution 2,8 mM:

500 ml RPMI w/o Glc.
57 ml Newborn Calf Serum
12,5 ml Hepes Buffer
5 ml Penicillin-Streptomycin
640 µl Glukose 45 %

Functionality Solution 20 mM:

500 ml RPMI w/o Glc.
57 ml Newborn Calf Serum
12,5 ml Hepes Buffer
5 ml Penicillin-Streptomycin
4632 µl Glukose 45 %

Hanks`-Ficoll (1,083g/l bei 10°C):

500 ml Biocoll Seperating Solution
50 ml HBSS (1x)
12 ml Hepes Buffer Solution
5 ml Penicillin-Streptomycin
0,7 ml NaOH

HBSS (Hanks`balanced salt solution):

900 ml Aqua destillata
100 ml HBSS (10x)
10 ml Penicillin-Streptomycin
9-10 ml Bikarbonat

Hanks` Balanced Salt Solution (+ 10 % NCS):

1000 ml HBSS
100 ml Newborn Calf Serum

IRI-Puffer:

990 ml Aqua destillata
6 ml NaCl
5,6 g wasserfreies Natriumhydrogenphosphat
3 g Bovine serumalbumin

Materialien

Ketanest Anästhetikum:

1 ml NaCl
10 mg Ketamin
20 mg Rompun

pro g Maus 10 μ l,

Trinkwasser für Nacktmäuse:

1000 ml steriles Leitungswasser
1350 mg Kaliumsorbat
300 mg Tetracyclin
nach Bedarf 6 N HCl (pH = 2,5)

Alle übrigen verwendeten Arbeitsmaterialien und Geräte werden im jeweiligen Methodenkapitel erwähnt.

2.2 METHODEN

2.2.1 Beschaffung der Schweinepankreatia

Alle Spendertiere wurden für die Ferkelproduktion in einer zentralen Aufzuchtstelle gehalten. Zuchtsauen im Alter ≥ 17 Monaten, die aufgrund mangelhafter Fertilität und/oder körperlicher Gebrechen aus der Zucht ausgeschlossen wurden, dienten als Organspender und wurden bei einem lokalen Metzger durch Bolzenschuss in die Stirn getötet. Um den Blutgehalt der Organe zu minimieren [31], ließ man die Tiere mindestens 5 min ausbluten. Das Gewicht der Spendertiere wurde nach Abtrennen des Kopfes, Abziehen der Haut und nach Herausnahme des Gastrointestinaltraktes (GIT) bestimmt. Der GIT wurde während einer warmen Ischämiezeit (WIZ) von ca. 10 – 15 min bzw. 30 min aus dem Schlachtkörper entnommen und das Pankreas ex situ präpariert.

Nach intraduktaler Distension mit kalter UW-Lösung (2 ml/g) wurden die Organe in kalter NaCl-Lösung gelagert und innerhalb von 30 min zum Isolationslabor transportiert.

2.2.2 Lagerung der Pankreatia

2.2.2.1 Organpräservierung in UW-Lösung

Die Organe wurden, wie in Abbildung 1 dargestellt, in 800 ml UW-Lösung für 6 h auf Eis gelagert.

2.2.2.2 Two-Layer Methode

Die Two-Layer Methode (TLM) wurde wie bei Matsumoto beschrieben mit kleineren Veränderungen durchgeführt (Abb. 2) [32]. Präparierte und distendierte Organe wurden hierbei auf 500 ml oxygeniertem Perfluorkarbon (PFC, 100 % O₂, 30 min, 2000 ml/min) gelagert und mit 300 ml UW-Lösung überschichtet. Mittels einer Vorrichtung wurden die Organe an der Interphase zwischen PFC und UW-Lösung fixiert und für 6 h gelagert. Während der Lagerung wurde das PFC mit einer Flussrate von 300 ml/min mit O₂ begast.

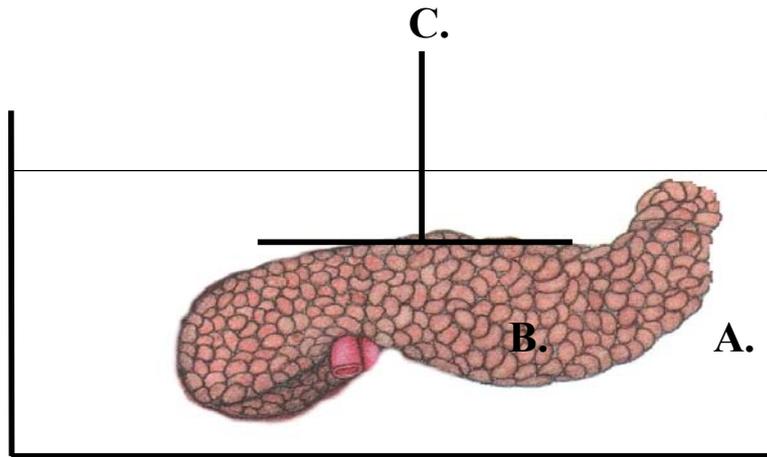


Abb. 1 UW-Lagerung, A. UW-Lösung, B. Schweinepankreas, C. Halterung

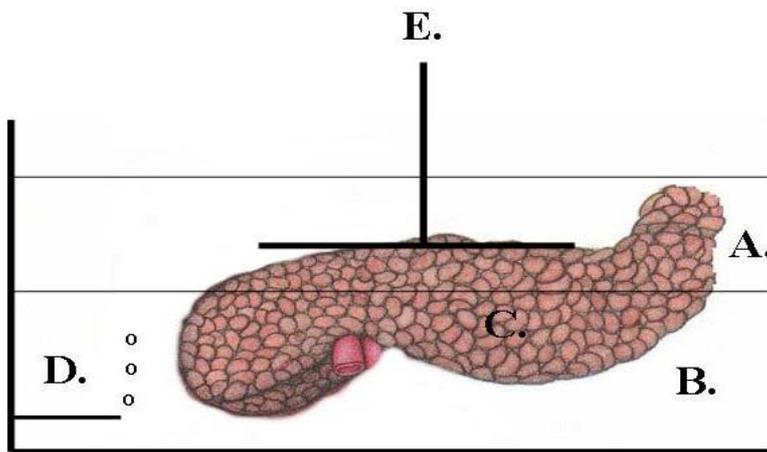


Abb. 2 Two-Layer Methode, A. UW-Lösung, B. Perfluorkarbon, C. Schweinepankreas, D. Sauerstoffzufuhr, E. Halterung

2.2.2.3 One-Layer Methode

Die präparierten und distendierten Organe wurden mittels einer Fixationsvorrichtung in 800 ml oxygeniertem PFC (100 % O₂, 30 min, 2000 ml/min) für 3 bzw. 6 h inkubiert. Je nach Versuchsgruppe betrug die Lagerungstemperatur 4°C bzw. 20°C (Abb. 3). Während der Lagerung wurde das PFC mit einer Flussrate von 300 ml/min mit O₂ begast.

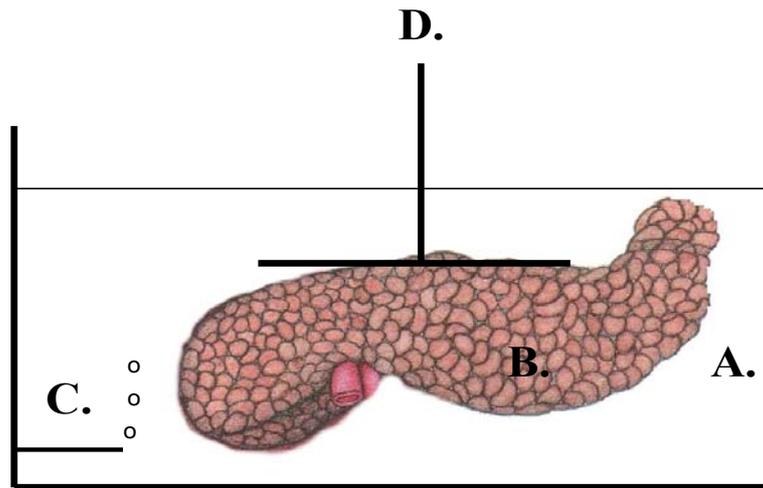


Abb. 3 One-Layer Methode, A. Perfluorkarbon, B. Schweinepankreas, C. Sauerstoffzufuhr, D. Halterung

2.2.3 Inselzellisolierung

2.2.3.1 Digestion

Die von Ricordi entwickelte Methode wurde nach einer Modifikation von Brandhorst durchgeführt [33, 18]. Dabei wurde eine automatisierte Digestions- und Filtrationsapparatur verwendet (Abb. 4).

Die Pankreata wurden im Isolationslabor zunächst mit Kollagenase NB-8 (4 PZ-U) und Neutraler Protease, die in kalter UW-Lösung gelöst wurde, distendiert (2 ml/g). Die Enzymapplikation erfolgte je nach Versuchsgruppe entweder vor oder nach der Präservierung (Tab. 2, S. 17). Die Aktivität der Neutralen Protease (N.P.) wurde nach Vorversuchen für jede experimentelle Gruppe neu justiert (Tab. 2, S 17).

Die mit Enzymen distendierten Organe wurden mittels einer Digestionsapparatur sowohl enzymatisch als auch mechanisch dissoziiert (Abb. 4). Um eine Digestionstemperatur von 35 – 37°C zu gewährleisten, wurde die Apparatur über ein Schlauchsystem und einer peristaltischen Pumpe mit einer Wärmeschlange verbunden (Abb. 4). Während der Digestion wurde das System mit HBSS gefüllt und rezirkuliert. Gleichzeitig wurde die Digestionskammer in eine vertikale Bewegung gesetzt (300 Oszillationen/min).

Zur Differenzierung der Inseln vom restlichen Pankreasgewebe, wurden die im Verlauf der Digestion genommenen Biopsien mit Diphenylthiokarbazon (DTZ) angefärbt.

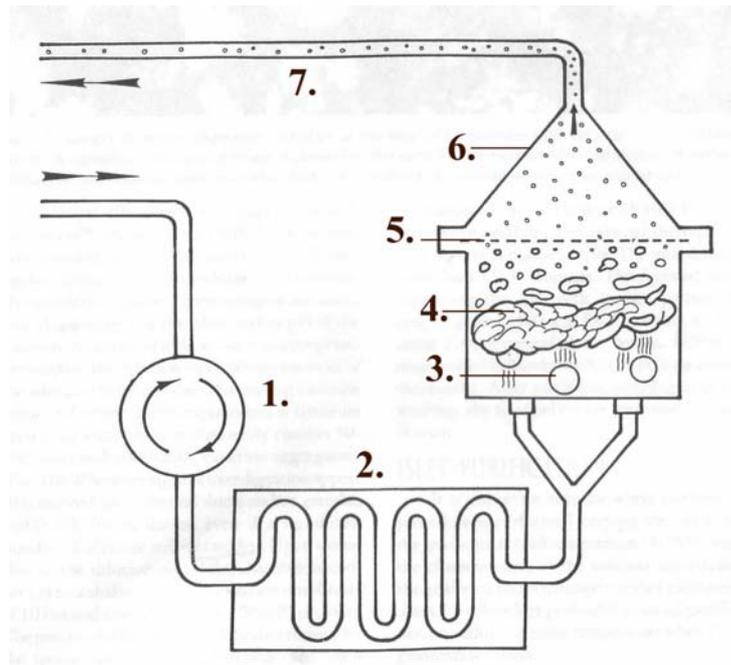


Abb. 4 Schematische Darstellung der Digestions- und Filtrationsapparatur zur Isolierung von Inselzellen [33]. 1. peristaltische Pumpe, 2. Wärmeschlange, 3. Murmeln, 4. Pankreas, 5. Siebeinsatz, 6. Stahlkammer, 7. Schlauchsystem

Sobald eine signifikante Anzahl an Inseln in den Biopsien zu sehen war, wurde das System geöffnet und mit frischer HBSS gespült. Das verdauten Gewebe wurde dabei in konischen Zentrifugenröhrchen aufgefangen, die mit 35 ml Newborn Calf Serum (NCS) vorgefüllt waren und anschließend zentrifugiert (150xg, 4°C). Die entstandenen Pellets wurden anschließend in kalter UW-Lösung gepoolt und bei 4°C für 60 min inkubiert.

2.2.3.2 Purifikation

Nach Zentrifugation (150xg, 4°C, 4 min) wurde der Überstand entfernt und das Gewebepellet in 400 ml Ficoll der Dichte 1085 g/l resuspendiert. Diese Suspension wurde mittels einer peristaltischen Pumpe in das Schlauchsystem eines Cobe 2991 (Gambro, München) geladen. Nach Beschleunigung auf 800xg wurde mit 150 ml HBSS + 10 % NCS überschichtet und insgesamt für 5 min bei 20°C zentrifugiert. Um die gereinigten Inseln an der Interphase zwischen Ficoll + HBSS zu entnehmen, wurde der Cobe hydraulisch entladen und die Suspension fraktionsweise in einer 20 ml HBSS + 10 % NCS Vorlage aufgefangen. Die reine Inselnfraktion wurde anschließend in HBSS + 10 % NCS gewaschen und in CMRL 1066 (Kapitel 2.1.5) resuspendiert.

2.2.4 Inselkultivierung

Für die Kultivierung bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftsauerstoff, wurden die Inseln zu jeweils 10.000 IEQ in 10 cm Petrischalen aliquotiert.

2.2.5 Qualitätskontrolle

2.2.5.1 in vitro Qualitätskontrolle

2.2.5.1.1 Quantifizierung

Die Reinheit der finalen Schweineinselisolierung wurde nach Anfärbung mit DTZ [34] ermittelt. Dabei wurde das Verhältnis von Insel- zu Nichtinselgewebe bestimmt.

Die Evaluierung der Inselausbeute erfolgte in einer Vierfachbestimmung vor und nach Reinigung. Das Abschätzen des Durchmessers der Inseln erfolgte unter einem Zweiphasenmikroskop mit einem kalibrierten Zählgitter und wurde anschließend in Inseläquivalente (IEQ) umgerechnet [35]. Ein IEQ entspricht einer theoretischen Durchschnittsinsel von 150 µm Durchmesser. Die durchschnittliche Inselgröße wurde durch das Verhältnis von IEQ zu Inselzahl kalkuliert und dient als Isolationsindex (II), als Parameter für die Fragmentierung des Inselgewebes.

Nach Quantifizierung wurden die Inseln, wie in Tabelle 1 beschrieben, behandelt.

Tab. 1 Probenbehandlung

	Proben-Volumen	Zugabe (HBSS)	Waschen (3000xg ¹)	Zugabe (4°C)			
ATP	2x400 µl	2x1600 µl	2 ¹ / ₁ ¹ / ₁ ¹ - 1950 µl	450 µl Lysepuffer ²	10 ¹ bei 24°C	N ₂ -Schock ⁵ - 80°C	
Protein	2x400 µl	2x1600 µl	2 ¹ / ₁ ¹ / ₁ ¹ - 1950 µl	950 µl NaCl	sonif. ⁴ 3x10 ¹	zentrifug. 3000xg	Überstand einfrieren ⁶
Insulin	2x400 µl	2x1600 µl	2 ¹ / ₁ ¹ / ₁ ¹ - 1950 µl	950 µl ³ IRI Puffer	sonif. ⁴ 3x10 ¹	zentrifug. 3000xg	Überstand einfrieren ⁶

¹2 min Anlauf/1 min Zentrifugation/1 min Bremsen; ²Lysepuffer aus ATP-Kit HS II; ³in 2 ml-Cryotubes überführen; ⁴auf Eis; ⁵komplette Proben; ⁶bei -20°C lagern;

Methoden

2.2.5.1.2 ATP-Bestimmung

Der ATP-Gehalt wurde mittels des kommerziellen Assays CLS II (Roche, Mannheim) luminometrisch bestimmt. Nach Lysierung der Zellen (Tab. 1, S. 13) wurden 80 μ l Probenvolumen zu gleichen Teilen mit Luciferaselösung versetzt und in einen Biolumaten (Berthold, Wildbad) bei 25°C für 30 sec gemessen (Abb. 5).

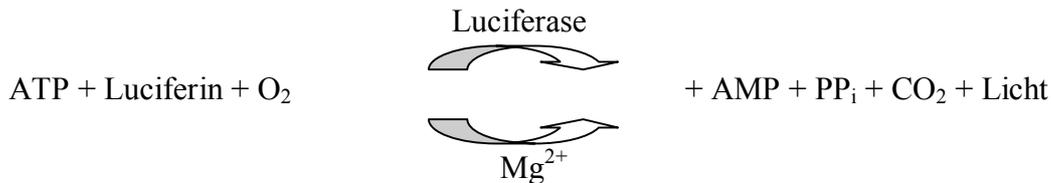


Abb. 5 Biolumineszenzreaktion zwischen Luciferase und ATP.

2.2.5.1.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Inseln wurde nach Vorbehandlung (Tab. 1, S 13) und Sonifikation (3x10 sec, Power 50, Tab. 1) mit einem kommerziellen Proteinanalyse-Kit (Bio Rad, München) in einer Doppelbestimmung [36] in einem Platten-Elisa-Reader bei 690 nm photometrisch bestimmt.

2.2.5.1.4 Insulinbestimmung

Der intrazelluläre Insulingehalt wurde nach Vorbehandlung (Tab. 1, S 13) und Sonifikation (3x10 sec, Power 50, Tab. 1) mittels eines Enzym-Immunoassays für humanes Insulin (DRG Instruments GmbH, Marburg) in einer Doppelbestimmung bei 450 nm photometrisch in einem Platten-Elisa-Reader ermittelt. Die Kreuzreaktivität zwischen humanem und porcinem Insulin betrug 1,625.

2.2.5.1.5 Bestimmung der Mitochondrienaktivität

Die Mitochondrienaktivität wurde mittels der photometrischen Messung der mitochondrialen Formazanproduktion aus 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) bei 490 nm in einem Platten-Elisa-Reader photometrisch ermittelt. Hierzu wurden in einer Vierfachbestimmung Inseln mit 20 % MTS-Reagenz (Promega, Mannheim) für 4 h bei 37°C in 24-Lochplatten inkubiert. Der zellfreie Überstand

Methoden

(150 µl) wurde anschließend in einem Platten-Elisa-Reader bei 490 nm photometrisch bestimmt. Leerwerte wurden aus reinem Medium, das auf die gleiche Art und Weise behandelt wurde, bestimmt.

2.2.5.6 Glukosestimulierte Insulinsekretion

Die *in vitro* Qualitätskontrollen beinhalten weiterhin die Insulinsekretion während der statischen Glukoseinkubation. Dabei wurden Aliquots von 5-15 IEQ in 1500 µl einer 2,8 bzw. 20 mM Glukoselösung in einem Schüttelwasserbad bei 37°C für 120 min inkubiert. Anschließend wurde der Insulingehalt mittels eines Enzym-Immunoassays für humanes Insulin (DRG Instruments GmbH, Marburg) bei 450 nm photometrisch in einem Platten-Elisa-Reader ermittelt. Die Kreuzreaktivität zwischen humanem und porzinem Insulin betrug 1,625.

2.2.5.7 Viabilität

Zeitgleich zur Glukosestimulierten Insulinsekretion wurde die Viabilität der Inseln anhand eines Trypanblau Ausschlusstests [37] bewertet. Dabei wurden 50 µl einer Inselsuspension in ein Well einer 96 Loch-Platte überführt, 20 % Trypanblau zugegeben und für 10 min unter schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Inseln in Medium 199 gewaschen und bei 20 Inseln das Verhältnis von toten d.h. blau gefärbten, und viablen (nicht gefärbten) Zellen durch ein Zweiphasenmikroskop abgeschätzt.

2.2.5.2 In vivo Qualitätskontrolle

Der *in vivo* Funktionstest der finalen Inselpräparation wurde, wie bei Ricordi beschrieben, durchgeführt [35]. Die Qualitätskontrolle erfolgte in männlichen, diabetischen NMRI Nacktmäusen (Harlan & Winkelmann, Hannover). Drei Tage vor Transplantation wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von 240 mg/kg Streptozotocin diabetisch gemacht. Die diabetische Stoffwechsellage wurde mittels zweier unabhängiger Messungen der postprandialen Serumglukosekonzentrationen (> 300 mg/dl) in einem Beckmann Glukoseanalyser (Beckmann, München) überprüft. Vorversuche ergaben eine zu transplantierende Inselzellmasse von 3000 IEQ für frisch prozessierte und 4000 IEQ für präservierte Organe.

Methoden

Die in Kulturmedium suspendierten Schweineinseln wurden nach einer 24 h-Kultivierung in ein konisches 2 ml Röhrchen zum Sedimentieren überführt. Der Überstand wurde verworfen und das Gewebepellet in einer Hamiltonspritze (Hamilton, Bonaduz) aspiriert.

An der dorsalen Seitenfläche beginnend, wurde die Mäuseniere in der Medianebene mit der vorbereiteten Hamiltonspritze punktiert, sodass die Nadelspitze an der ventralen Seitenfläche unter der Nierenkapsel zu liegen kam, ohne diese zu verletzen. Die Inseln wurden langsam unter die Kapsel injiziert, wobei das Volumen der Suspension ($< 40 \mu\text{l}$) so gering wie möglich gehalten wurde, um ein Sprengen der Kapsel durch Überdruck zu vermeiden.

Die Serumglukosekonzentration wurde in der ersten Woche nach Transplantation täglich und in den darauf folgenden Zeitraum jeden zweiten Tag gemessen. Serumglukosekonzentrationen $< 200 \text{ mg/dl}$ wurden als normoglykämisch und die Inseln somit als funktionsfähig eingestuft. 26 Tage nach Transplantation wurde die inseltragende Niere entnommen, um durch einen Wiederanstieg des Blutzuckers den Nachweis für die Transplantatfunktion zu führen.

Die Parameter Reinheit, Viabilität, Ausbeute, Isolationsindex, Mitochondrienaktivität, Protein-, Insulin- und ATP-Gehalt der isolierten Inselzellen wurden direkt nach Reinigung der Inseln bestimmt. Die statische Glukoseinkubation mit Ermittlung des Stimulationsindex und die in vivo Funktionskontrolle in diabetischen Nacktmäusen wurde nach 24 h Kultivierung der Inselzellen ermittelt.

2.2.6 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler (MW \pm SEM) dargestellt. Die Datenauswertung erfolgte unter Verwendung des Statistiksoftwarepakets SPSS (SPSS Inc., München).

Aufgrund kleiner Fallzahlen wurde eine beliebige Verteilung der Messdaten vorausgesetzt. Bei einer unabhängigen Anzahl von Versuchsgruppen > 2 , erfolgte die statistische Auswertung anhand des Kruskal-Wallis Tests. Stellte sich dabei eine statistische Wahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ ein, erfolgte die weitere Analyse der einzelnen Gruppenpaarungen anhand des Mann-Whitney Tests. Abhängige Gruppen mit einer Anzahl gleich 2 wurden direkt mit dem Wilcoxon Test analysiert. Die statistische Analyse der kumulativen Transplantatfunktion wurde mittels Log-Rank Test durchgeführt [38].

3. ERGEBNISSE

3.1 Einteilungen der Versuchsgruppen

Dauer, Temperatur und verwendete Enzymkonzentration der jeweils durchgeführten Präservierungstechnik sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2 Versuchsdeterminanten der untersuchten experimentellen Gruppen.

Gruppe	Präservierungstechnik	Präservierungsdauer (h)	Präservierungstemperatur (°C)	Zeitpunkt der Enzymapplikation	N.P.-Konzentration (DMC-U/g Organ)
1	Frisch (0 min WIZ)	-	-	-	0,94
2	UW-prä	6	4	vor Präservierung	0,14
3	UW-post	6	4	nach Präservierung	0,92
4	TLM-prä	6	4	vor Präservierung	0,13
5	TLM-post	6	4	nach Präservierung	0,93
6	OLM	6	4	nach Präservierung	0,94
7	OLM-3 h/20°C	3	20	nach Präservierung	0,97
8	OLM-3 h/4°C	3	4	nach Präservierung	0,94
9	Frisch (30 min WIZ)	-	-	-	0,68
10	OLM-3 h/4°C (30 min WIZ)	3	4	nach Präservierung	0,71

Ergebnisse

Entsprechend der unterschiedlichen Versuchsdeterminanten wurde die vorliegende Arbeit in 4 Teilstudien separiert (Tab. 3). Frisch prozessierte Organe der Gruppe 1 dienten in den Teilstudien als Kontrolle und wurden mit allen anderen Versuchsgruppen verglichen.

In der ersten Teilstudie wurden die Versuchsdeterminanten Zeitpunkt der Enzymapplikation sowie die Präservierungsmethodik der UW-Inkubation und TLM verglichen. Bei dem Zeitpunkt der Enzymapplikation wurde die Enzymdistension vor Präservierung der Pankreata durch die UW-Lösung oder der TLM als UW-prä oder TLM-prä bezeichnet. Die Enzymapplikation nach Organpräservierung wurde als UW-post oder TLM-post benannt. Die zweite Teilstudie untersuchte die Techniken der PFC-Applikation. Gegenstand der dritten und vierten Teilstudie war der Einfluss der Präservierungstemperatur sowie eine mögliche Reparatur ischämisch bedingter Schäden durch eine nachfolgende OLM-Präservierung.

Tab. 3 Untersuchungen der einzelnen Teilstudien.

	Versuchsgruppen	Variable
1. Teilstudie	a. Kontrolle (n=6)	Enzymapplikation: vor Präservierung (prä) nach Präservierung (post)
	b. UW-post (n=3) vs. UW-prä (n=8) c. TLM-post (n=10) vs. TLM-prä (n=7)	
	d. UW-post (n=3) vs. TLM-post (n=10) e. UW-prä (n=8) vs. TLM-prä (n=7)	Präservierungsmethode
2. Teilstudie	a. Kontrolle (n=6)	Technik der PFC- Applikation
	b. TLM (n=10) vs. OLM (n=8)	
3. Teilstudie	a. Kontrolle (n=6)	Präservierungstemperatur
	b. OLM-3 h/20°C (n=7) vs. OLM-3 h/4°C (n=5)	
4. Teilstudie	a. Kontrolle (n=6)	Prävention ischämischer Schäden durch nach- folgende PFC-Lagerung
	b. Frisch (30 min WIZ, n=6) vs. OLM-3 h/4°C (30 min WIZ, n=6)	

3.2 Vorversuche

Vor dem Einsatz des Perfluorkarbons als Präservierungsmedium wurde die Substanz mit Sauerstoff (O_2) begast und gesättigt. Dazu wird O_2 mit einer Flowrate von 2000 ml/min für 30 min in das PFC eingeleitet. Der Sauerstoffpartialdruck steigt dabei von 160 mm Hg auf 920 mm Hg an. Bei einer Flowrate von 300 ml/min benötigt das PFC für eine Sättigung von 920 mm Hg 60 min (Abb. 6).

Nach der initialen O_2 -Sättigung wird der O_2 -Gehalt ohne weitere Begasung im PFC ohne signifikante Verluste gehalten (Abb. 7).

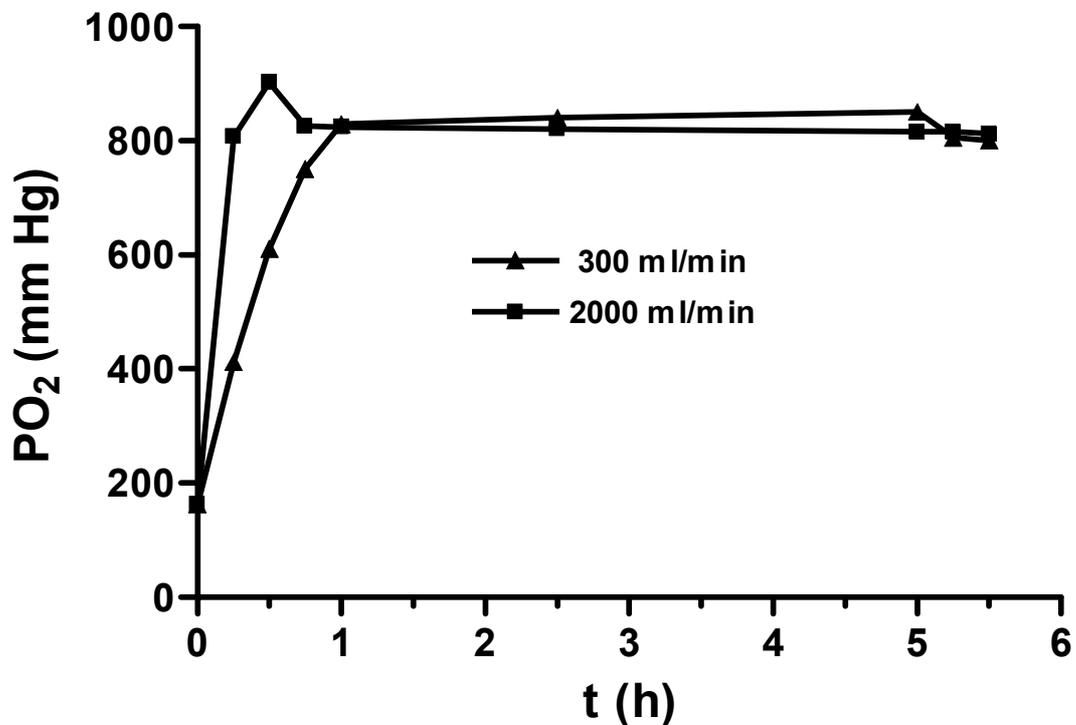


Abb. 6 Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks während der O_2 Begasung von Perfluorkarbon bei 300 ml (▲) und 2000 ml O_2 /min (■).

Ergebnisse

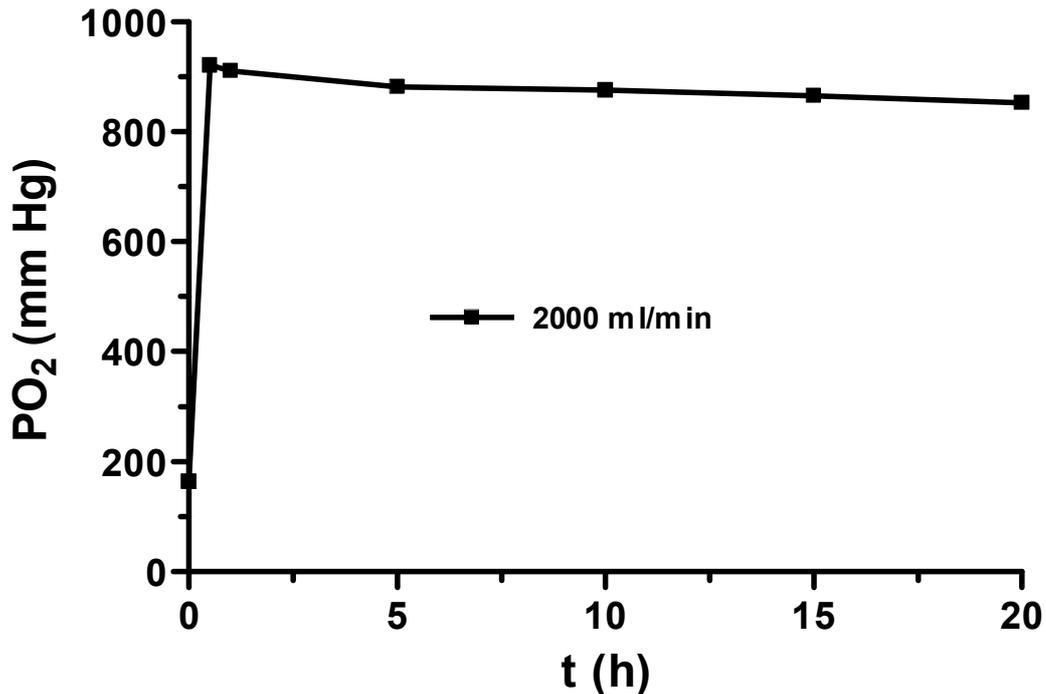


Abb. 7 Sauerstoffaufnahme- und Bindungskapazität von PFC. Das PFC wurde zunächst für 30 min mit 2000 ml O₂/min (■) begast und anschließend über mehrere Stunden ohne weitere Begasung gelagert und gemessen.

3.3 Teilstudie 1 (Enzymapplikation, Präservierungsmethode)

In der ersten Teilstudie dieser Arbeit wurden der Zeitpunkt der Enzymapplikation vor oder nach Lagerung der Organe in der Lösung der Universität von Wisconsin und der Two-Layer Methode und der Vergleich der Präservierungsmethoden UW-Inkubation und TLM durchgeführt. Insgesamt wurden dafür 34 Schweine prozessiert (Tab. 3). Das Alter der Spendertiere variierte von 24 bis 49 Monate und das Körpergewicht von 131 bis 297 kg (NS). Nach Reinigung der Inseln lag die Reinheit und Viabilität bei allen 5 Gruppen über 95 %.

Die Ausbeute isolierter Inselzellen/g Pankreas nach Reinigung wurde durch 7 h kalter Ischämie teilweise signifikant reduziert. Der Umfang der Reduzierung der UW-gelagerten Organe wurde durch den Zeitpunkt der Enzymapplikation signifikant beeinflusst. Im Gegensatz zu den TLM-präservierten Pankreata wirkte sich eine vor Lagerung durchgeführte Distension mit Enzymen signifikant günstiger aus als die Enzymapplikation nach Lagerung. Bei den TLM-präservierten Organen kamen dagegen Organe in den Bereich der frisch prozessierten Pankreata, wenn die Enzymdistension nach Lagerung erfolgte (Abb. 8).

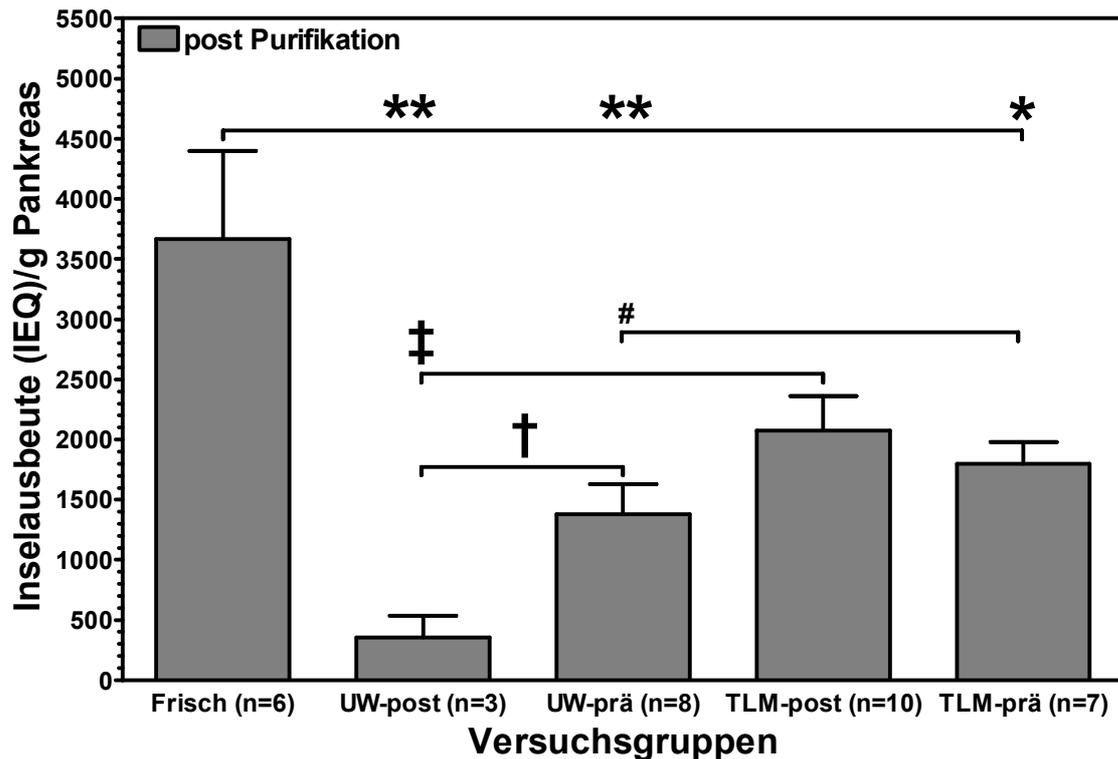


Abb. 8 Ausbeute isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen.

*P<0.05; **P<0.01 vs. Frisch, †P<0.05 vs. UW-prä, ‡P<0.01 vs. TLM-post, #P<0.05 vs. TLM-prä

Der Isolationsindex (II), der Parameter der morphologischen Inselintegrität, war bei den Gruppen der UW-Inkubation im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. Die PFC-präservierten Organe wiesen keine signifikante Reduktion zur Kontrolle auf. Im Vergleich der Präservierungstechniken mit Enzymdistension nach Lagerung erwies sich der II bei der UW-Gruppe zur TLM-Gruppe als signifikant vermindert (Abb. 9).

Der intrazelluläre Insulingehalt der Schweineinseln unterschied sich nicht signifikant innerhalb der fünf Versuchsgruppen. Nach UW-Präservierung wurde ein leichter Anstieg des Insulingehaltes beobachtet. Die große Schwankungsbreite bei den UW-post Organen verhinderte einen signifikanten Unterschied bei der statistischen Analyse (Abb. 10).

Der während der Glukoseinkubation gemessene Stimulationsindex (SI, 20 mM/2,8 mM Glukose) wurde durch eine 7 h Präservierung reduziert. Der SI der UW- und TLM-präservierten Gruppen waren im Vergleich zu der nicht präservierten Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Bei den UW-präservierten Organen mit Enzymdistension nach Lagerung verhinderte ein Messwert einen signifikanten Unterschied bei der statistischen Auswertung (Abb. 11).

Ergebnisse

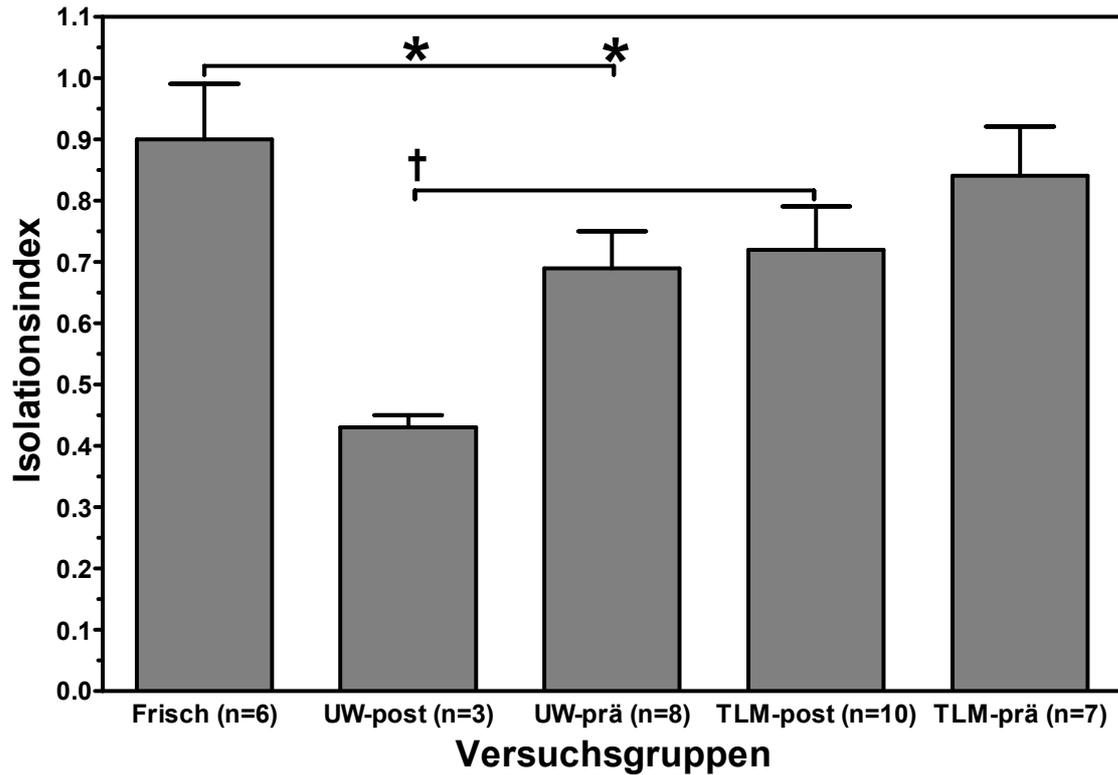


Abb. 9 Isolationsindex isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen.

* $P < 0.05$ vs. Frisch, † $P < 0.05$ vs. TLM-post

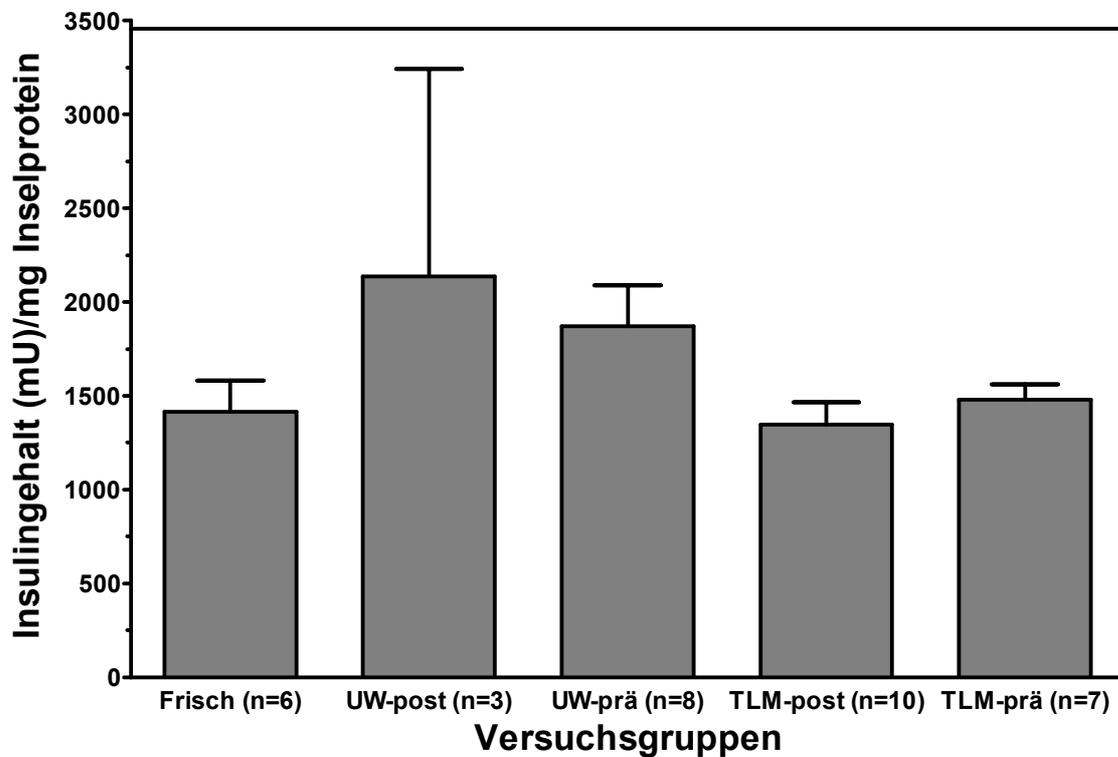


Abb. 10 Intrazellulärer Insulingehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen.

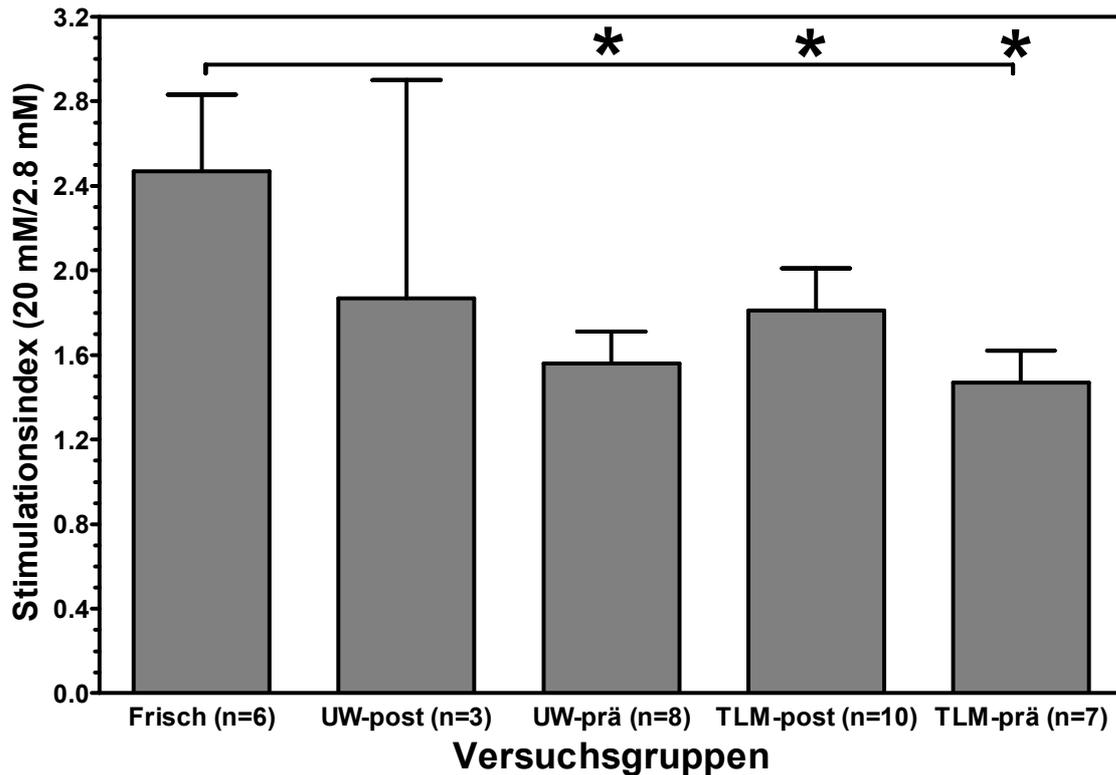


Abb. 11 Stimmulationsindex isolierter Inseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen nach statischer Glukoseinkubation in 2,8 und 20 mM Glukose.
* $P < 0.05$ vs. Frisch

Die Formazanproduktion als Parameter für die Mitochondrienviabilität unterschied sich signifikant zwischen den TLM-präservierten Organen. Hierbei zeigte sich eine Steigerung wenn die Enzymapplikation vor kalter Lagerung erfolgte (Abb. 12).

Der luminometrisch ausgewertete ATP-Gehalt der Inseln der Gruppen bewegte sich, bis auf die Gruppe der TLM-prä präservierten Organe, im Bereich von 0.65 bis 0.85 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Inselprotein. Die TLM-prä Inseln wiesen einen ATP-Gehalt von 2.28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Inselprotein auf und waren im Vergleich zu den Gruppen TLM-post und UW-prä signifikant erhöht (Abb. 13).

Ergebnisse

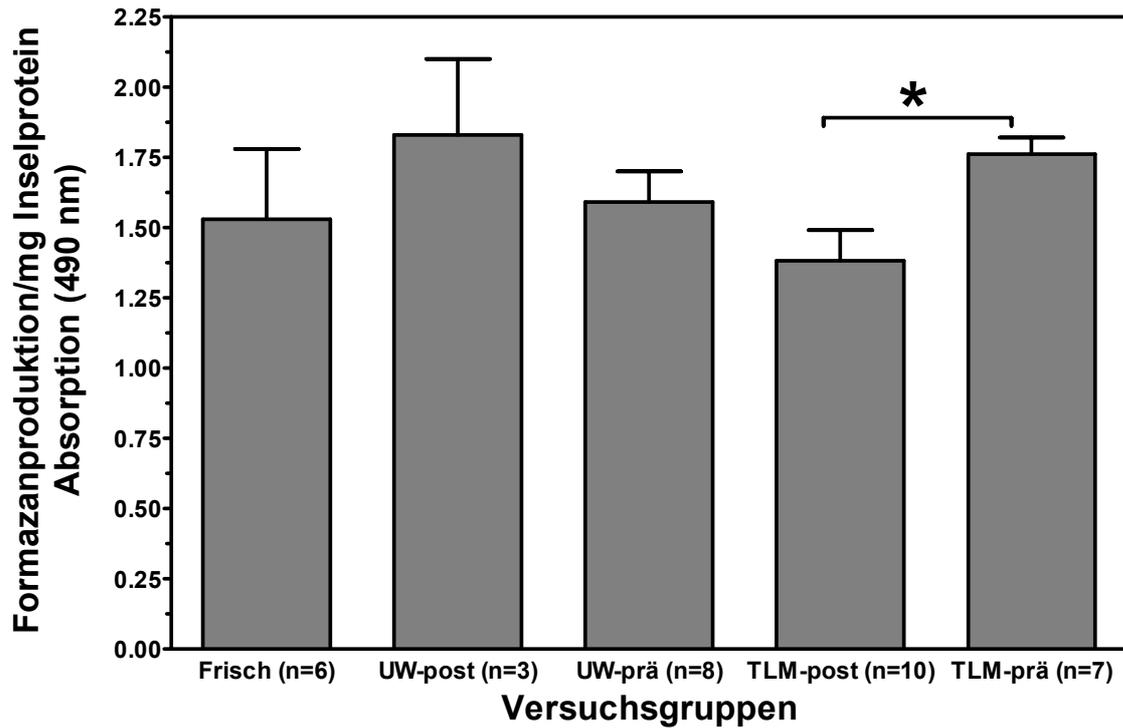


Abb. 12 Mitochondriale Formazanproduktion isolierter Inseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen.
*P<0.05 vs. TLM-prä

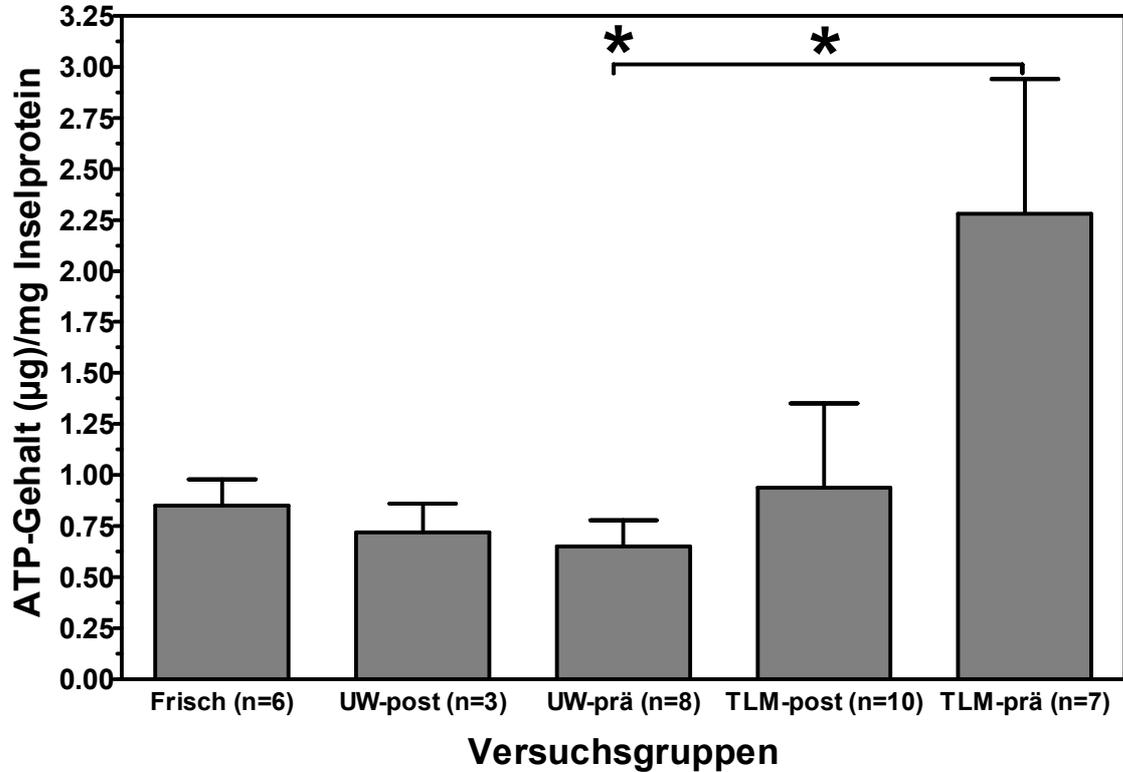


Abb. 13 ATP-Gehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen.
*P<0.05 vs. TLM-prä

Ergebnisse

Wie in Abbildung 14 zu sehen, zeigte die Transplantation der frisch prozessierten und TLM-post präservierten Organe einen sofortigen und anhaltenden Rückgang der Hyperglykämie. Nach Nephrektomie der inseltragenden Niere am Tag 26 konnte eine erneute Hyperglykämie beobachtet werden. Im Gegensatz dazu waren Tiere, die mit Inseln aus TLM-prä bzw. UW-prä präservierten Pankreata transplantiert wurden nur für 4 bzw. 2 Tage normoglykämisch (Abb. 15).

Die Analyse der kumulativen Transplantatfunktion mittels des Log-Rank Testes zeigte signifikante Unterschiede im Vergleich zu frisch prozessierten und TLM-post gelagerten Organen (Abb. 15).

Auf eine Transplantation der Gruppe UW-post wurde aufgrund der schlechten Ausbeute abgesehen.

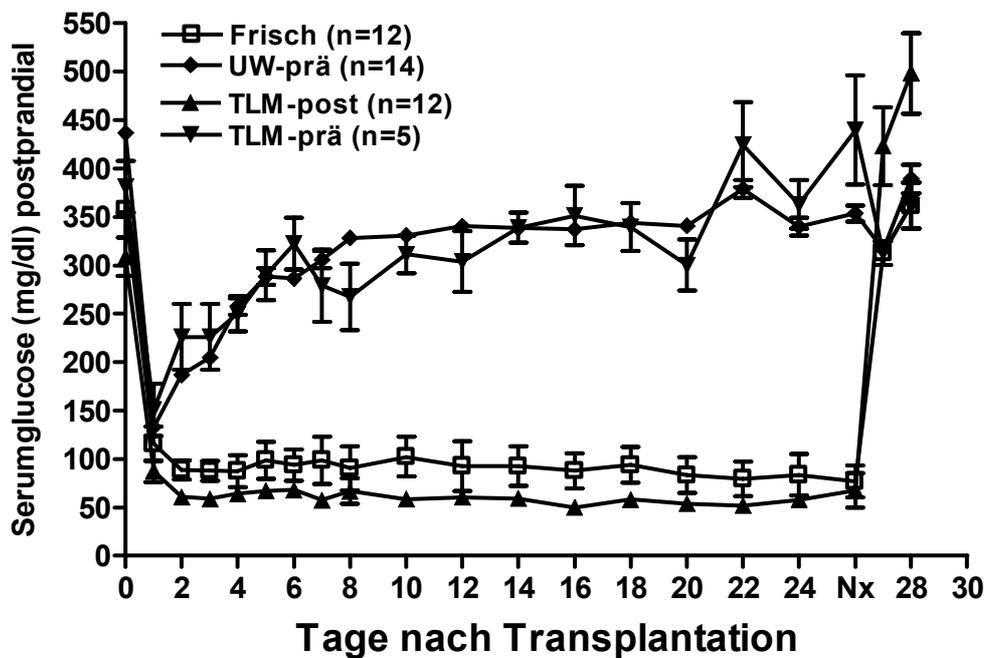


Abb. 14 In vivo Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (\square) und präservierten (\diamond , \blacktriangle , \blacktriangledown) Pankreata nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW \pm SEM).

*P<0.05 vs. Frisch u. TLM-post

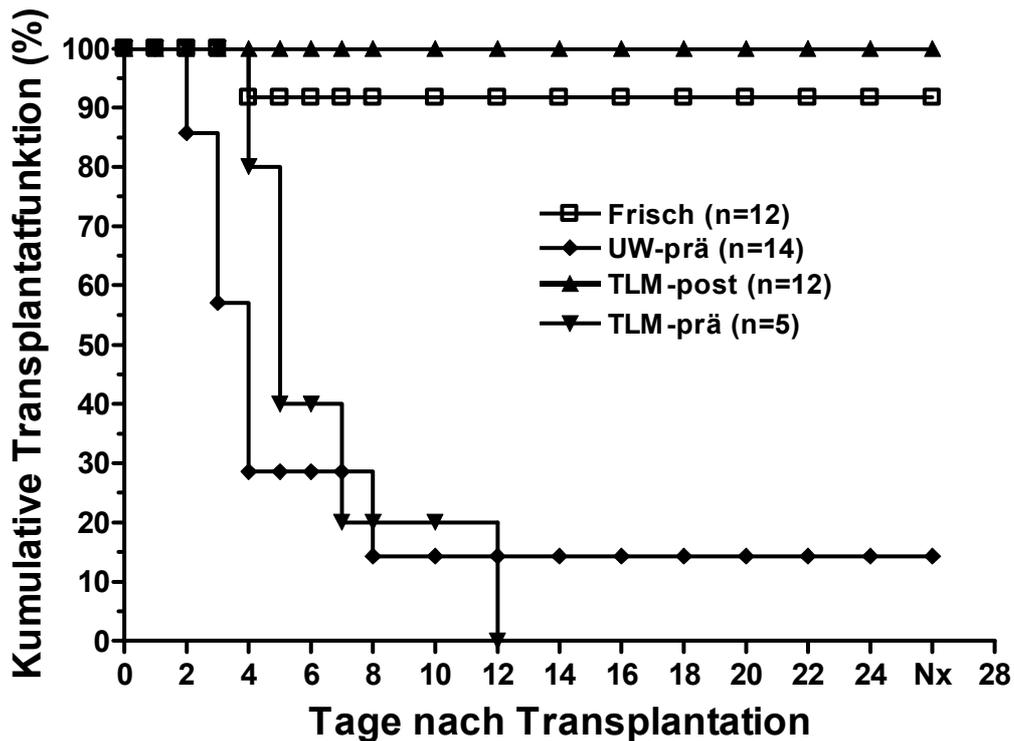


Abb. 15 Kumulative Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (\square) und präservierten (\diamond , \blacktriangle , \blacktriangledown) Pankreata nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW \pm SEM).
*P<0.05 vs. Frisch u. TLM-post

3.4 Teilstudie 2 (Technik der PFC-Applikation)

In diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der PFC-Applikation als Two-Layer und One-Layer Methode miteinander verglichen. Bei allen Organen dieser Teilstudie erfolgte die Enzymadministration nach Lagerung. Insgesamt wurden in dieser Gruppe 24 Schweine prozessiert (Tab. 3). Das Körpergewicht der Tiere variierte zwischen 131 und 297 kg und das Alter der untersuchten Schweine lag zwischen 24 und 46 Monaten (NS). Sämtliche Präparationen aller experimentellen Gruppen wiesen eine Reinheit und Viabilität von über 95 % auf.

Die Ausbeute isolierter Inselzellen/g Pankreas zeigte nach Purifikation bei der TLM-Gruppe eine deutliche, aber keine signifikante Reduktion, die im Fall der OLM-Präservierung wesentlich geringer ausfiel (Abb. 16).

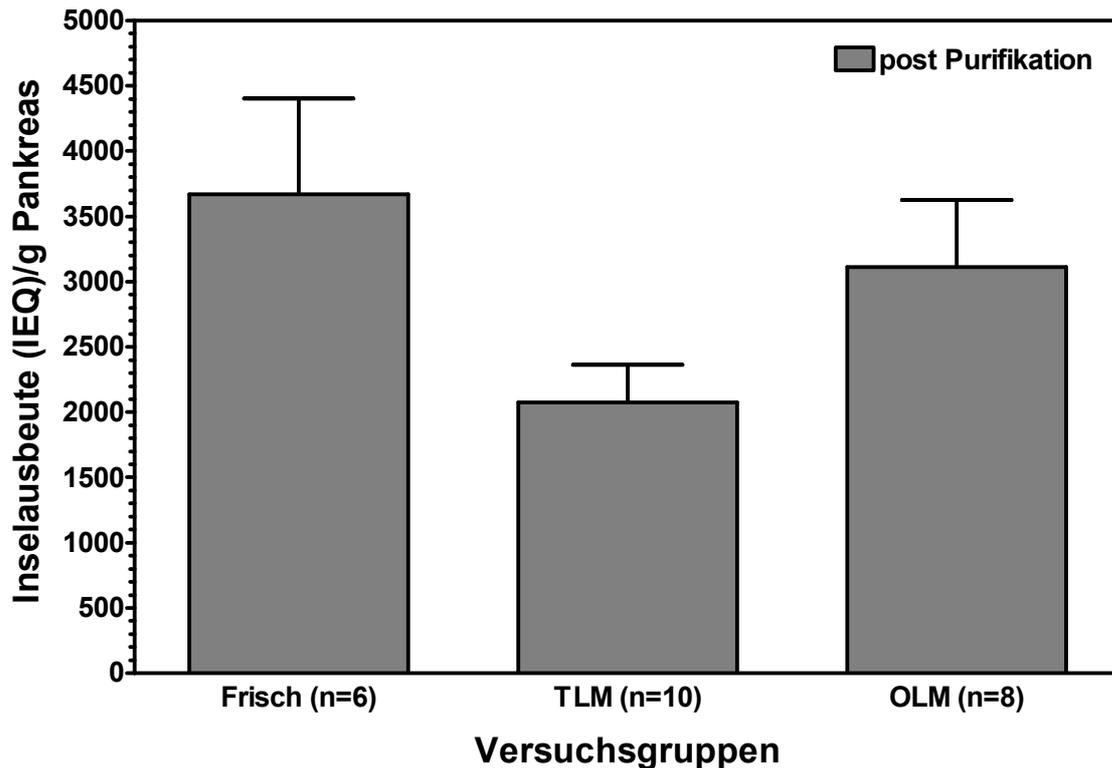


Abb. 16 Ausbeute isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.

Die morphologische Inselintegrität der PFC-präservierten Organe verhielt sich zur Kontrollgruppe ähnlich, wobei der Isolationsindex der OLM-Gruppe signifikant zur TLM-Gruppe anstieg (Abb. 17).

Während der intrazelluläre Insulingehalt in Inseln aus frisch prozessierten und TLM-präservierten Organen nahezu identisch waren, ließ sich bei OLM-präservierten Organen im Vergleich zu TLM-gelagerten Pankreata ein signifikanter Anstieg nachweisen (Abb. 18).

Ergebnisse

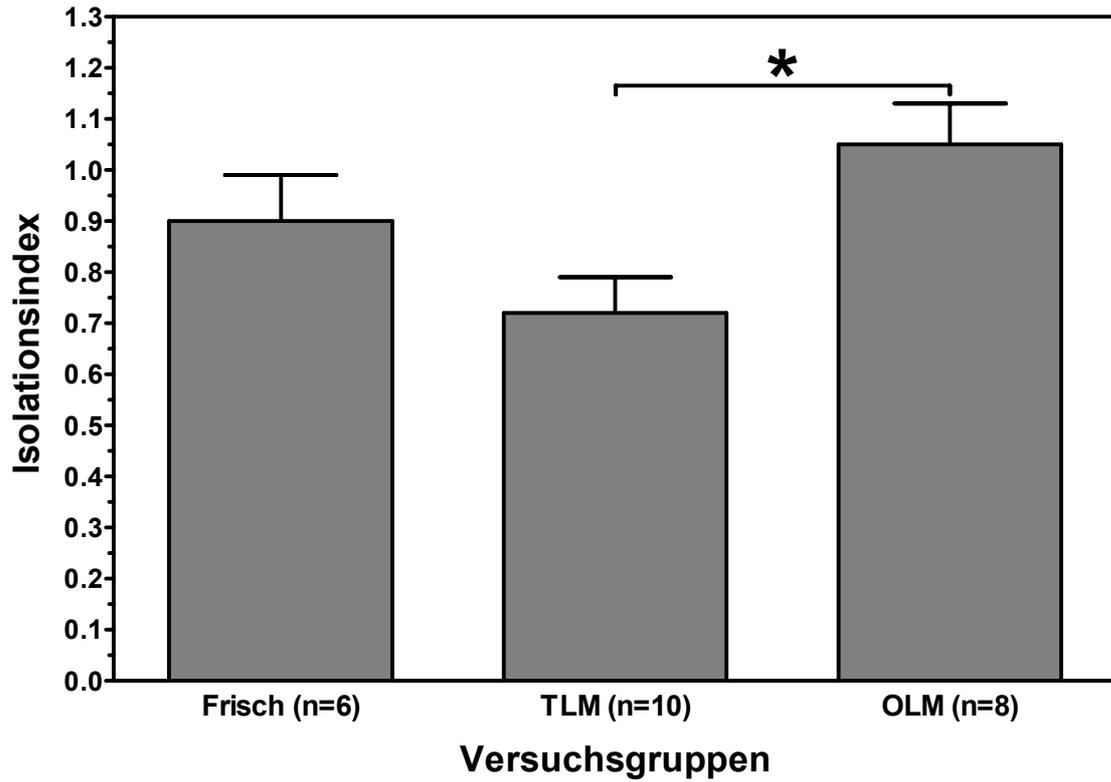


Abb. 17 Isolationsindex isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.

* $P < 0.05$ vs. OLM

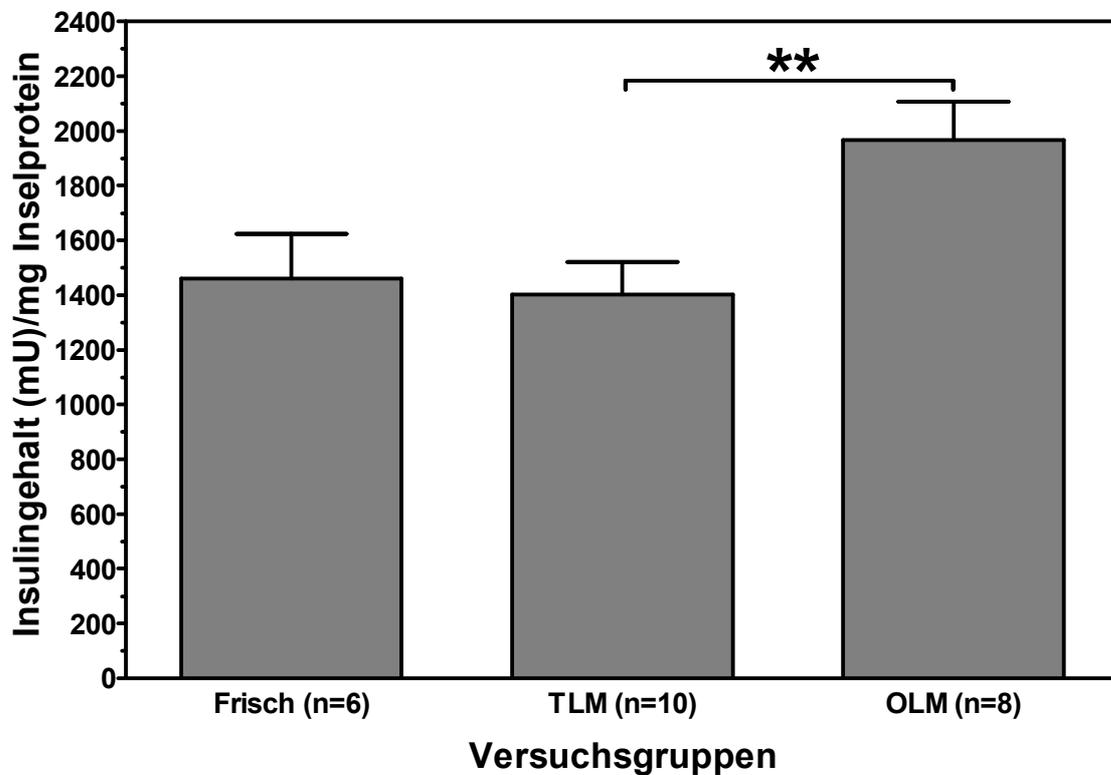


Abb. 18 Intrazellulärer Insulingehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.

** $P < 0.01$ vs. OLM

Ergebnisse

Der Vergleich der Glukose-Stimulationsindices ergab hingegen, dass, im Gegensatz zur OLM-Präservierung, eine Präservierung mittels TLM zu einer signifikanten Reduktion der Insulinsekretionskapazität zu Kontrollinseln führte (Abb. 19).

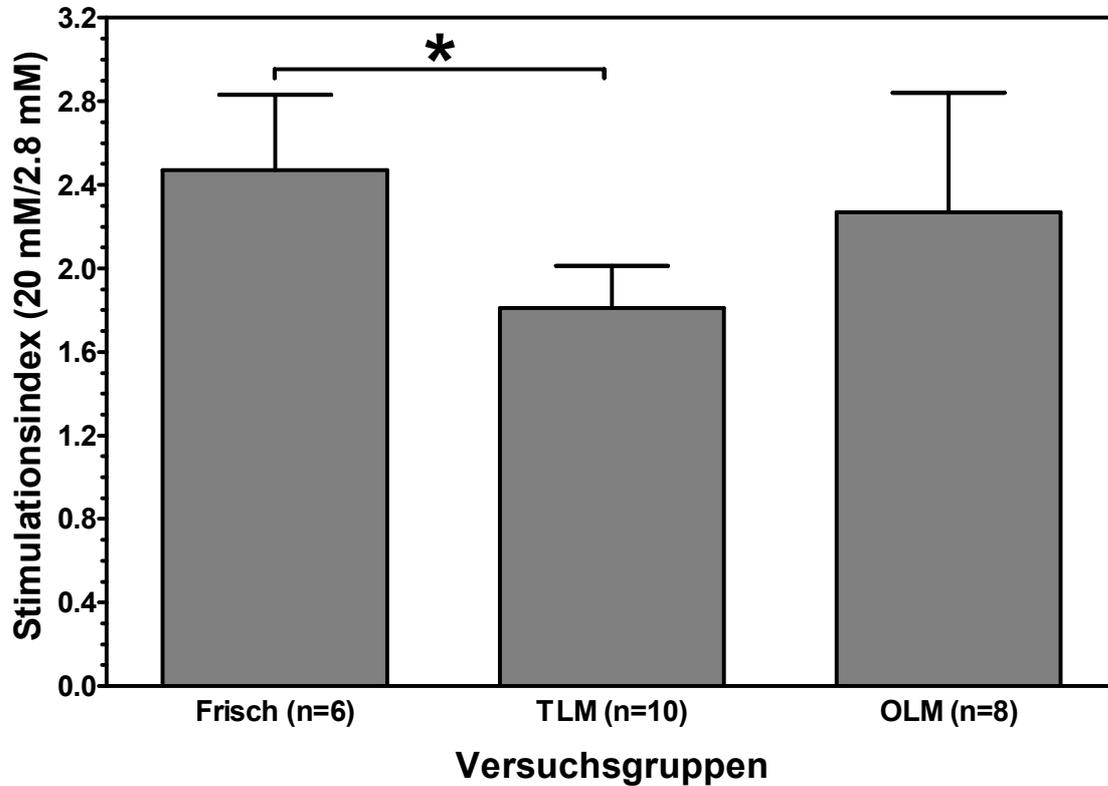


Abb. 19 Stimulationsindex isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen nach statischer Glukoseinkubation in 2,8 und 20 mM Glukose.

* $P < 0.05$ vs. Frisch

Hinsichtlich der mitochondrialen Formazanproduktion zeigte sich zwischen Inseln aus frisch prozessierten Organen als auch aus PFC-präservierten Pankreata kein Unterschied (Abb. 20).

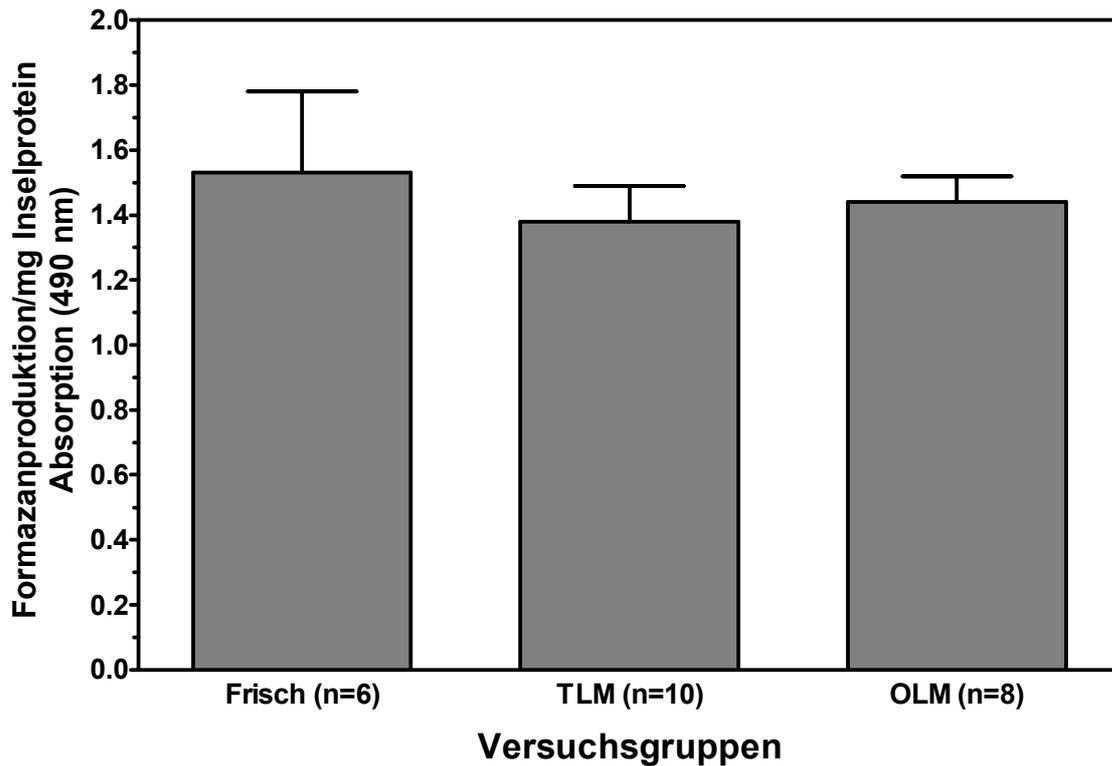


Abb. 20 Mitochondriale Formazanproduktion isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.

Der ATP-Gehalt als Parameter für die O_2 -Versorgung und Effizienz der Energieproduktion der Zelle, konnte sowohl durch die TLM- als auch durch die OLM-Technik während der ischämischen Lagerung auf dem Niveau von frisch prozessierten Organen gehalten werden. Die Technik der PFC-Anwendung hatte auf diesen Parameter ebenfalls keinen Einfluss (Abb. 21).

Wie in Abbildung 22 zu sehen, zeigte sich nach Transplantation der Inseln unter die Nierenkapsel von diabetischen Nacktmäusen in allen Gruppen eine sofortige und dauerhafte Korrektur des hyperglykämischen Stoffwechsels. Die kumulative Transplantatfunktion der Inseln wiesen über den Beobachtungszeitraum keinerlei signifikante Unterschiede auf (Abb. 23).

Ergebnisse

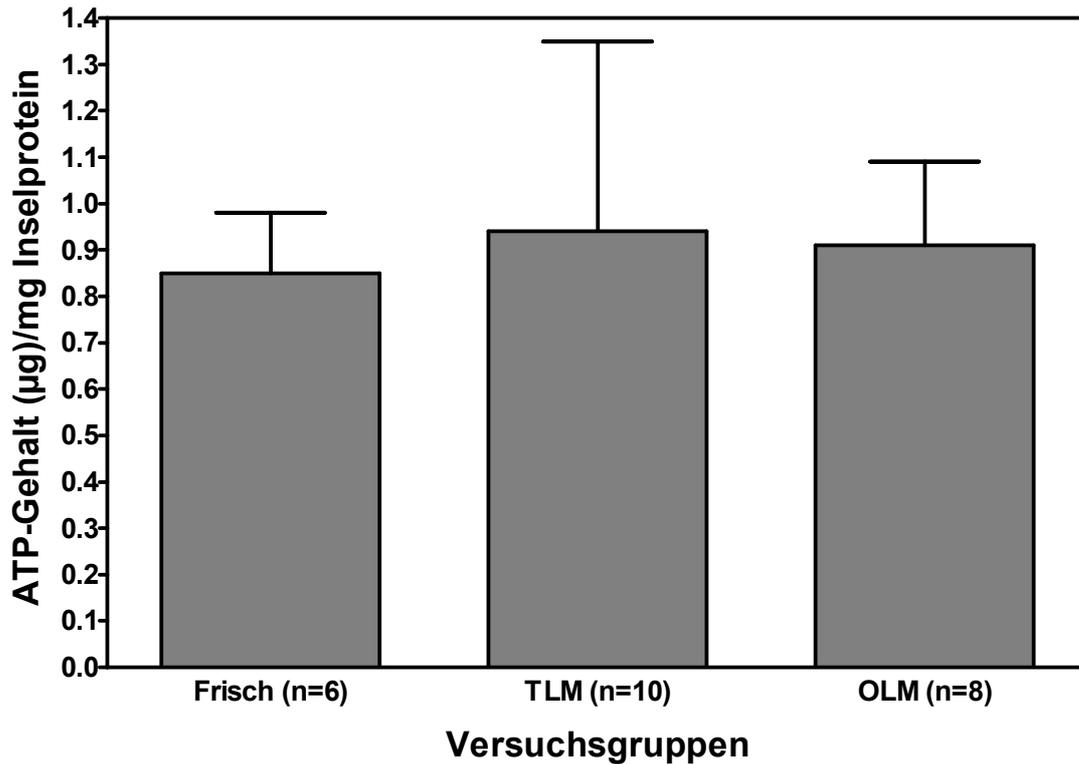


Abb. 21 ATP-Gehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.

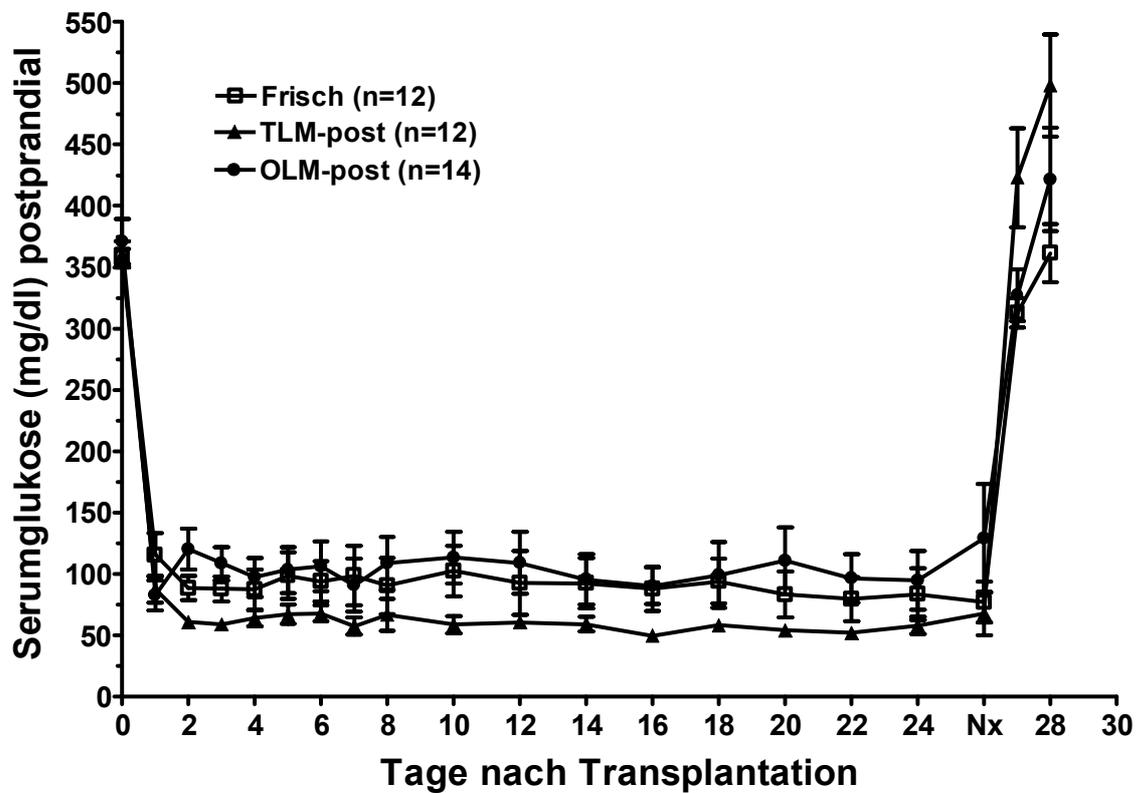


Abb. 22 In vivo Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (□) und PFC-präservierten (▲, ●) Pankreata nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW±SEM).

Ergebnisse

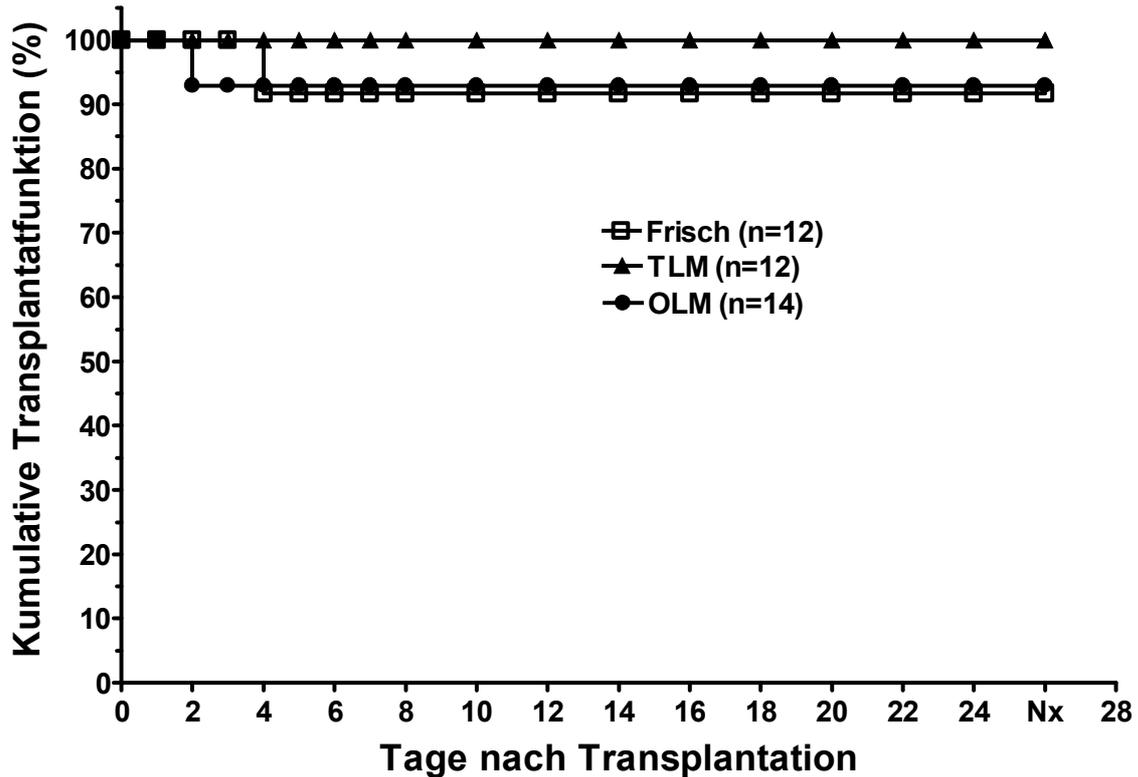


Abb. 23 Kumulative Transplantatfunktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (\square) und PFC-präservierten (\blacktriangle , \bullet) Pankreata nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW \pm SEM).

3.5 Teilstudie 3 (Präservierungstemperatur)

Für den Vergleich der Präservierungstemperatur (4°C vs. 20°C) während der 3 stündigen Lagerung auf PFC wurden insgesamt 18 Schweine prozessiert (Tab 3). Alle Organe dieser Teilstudie wurden erst nach Lagerung mit Enzymen behandelt. Das Alter der Spendertiere variierte von 23 bis 44 Monate und das Körpergewicht von 131 bis 297 kg (NS). Nach Reinigung der Inseln lag die Reinheit und Viabilität bei allen 3 Gruppen über 95 %.

Die Auswertung der Inselausbeute/g Pankreas nach Purifikation ergab, dass eine Steigerung der Präservierungstemperatur von 4°C auf 20°C zu einer signifikanten Reduktion der Inselausbeute im Vergleich zu frisch prozessierten Pankreata führte (Abb. 24).

Ergebnisse

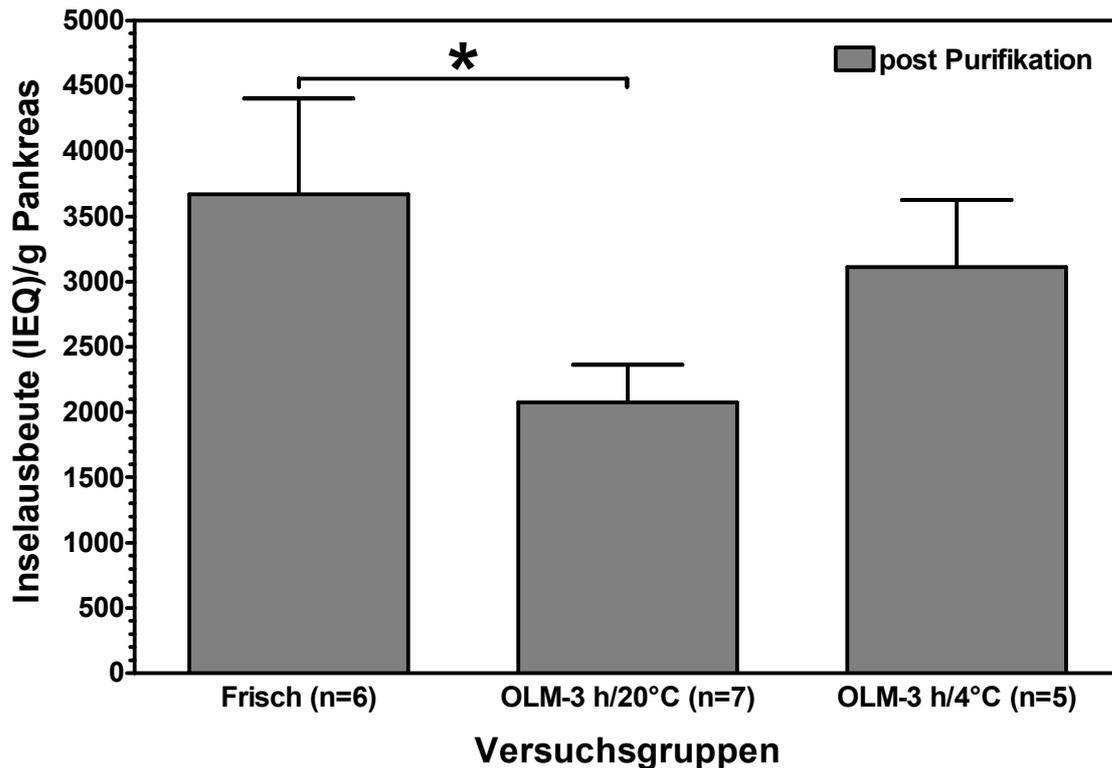


Abb. 24 Ausbeute isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.
*P<0.05 vs. Frisch

Die morphologische Integrität der isolierten Inseln wurde dagegen durch die Präservierungstemperatur nicht signifikant beeinflusst (Abb. 25).

Der intrazelluläre Insulingehalt der Inseln war nach OLM-Lagerung erhöht, wobei der Unterschied zwischen den Gruppen Frisch und OLM (3 h/20°C) signifikant war (Abb. 26).

Ergebnisse

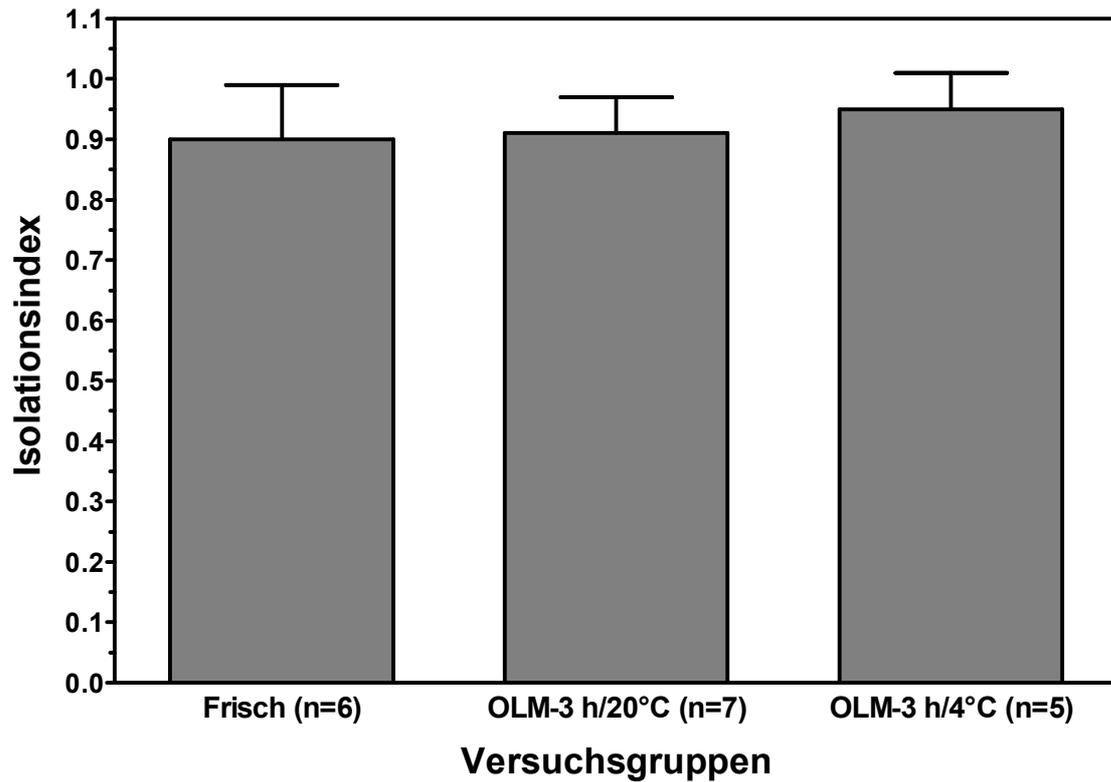


Abb. 25 Isolationsindex isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.

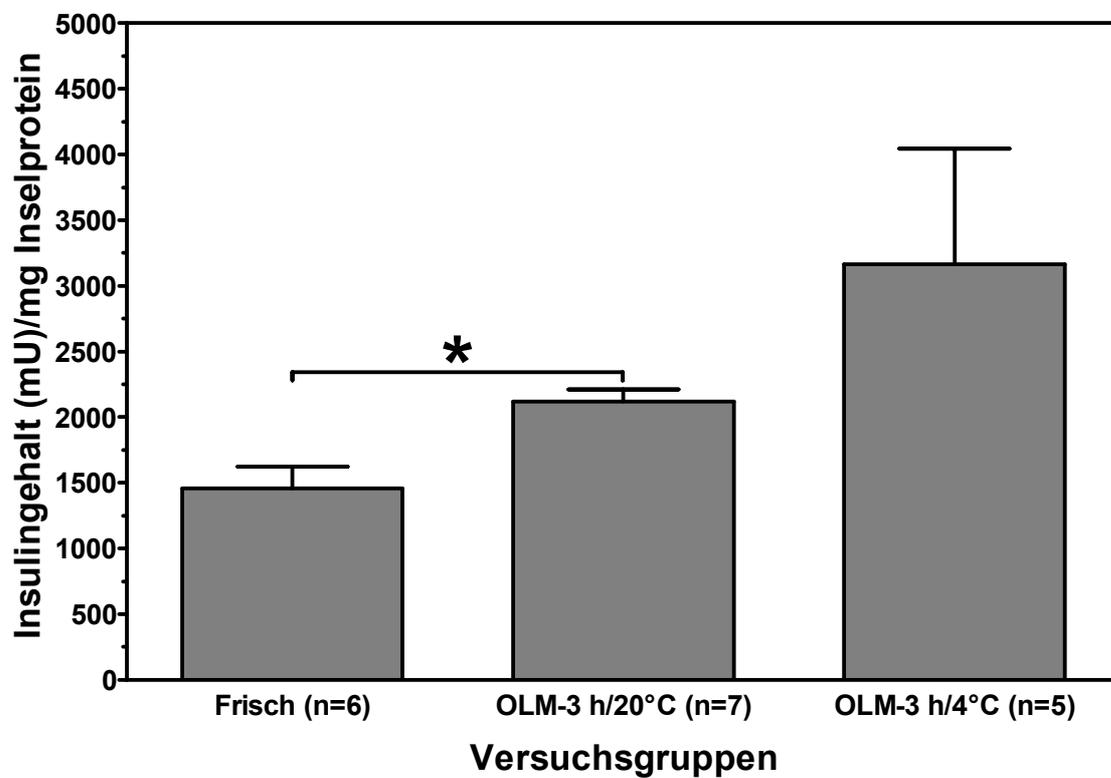


Abb. 26 Intrazellulärer Insulingehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.

* $P < 0.05$ vs. OLM-3 h/20°C

Ergebnisse

Die statische Glukoseinkubation zeigte nach Lagerung der Organe in PFC eine temperaturabhängige, aber nicht signifikante Reduktion (Abb. 27).

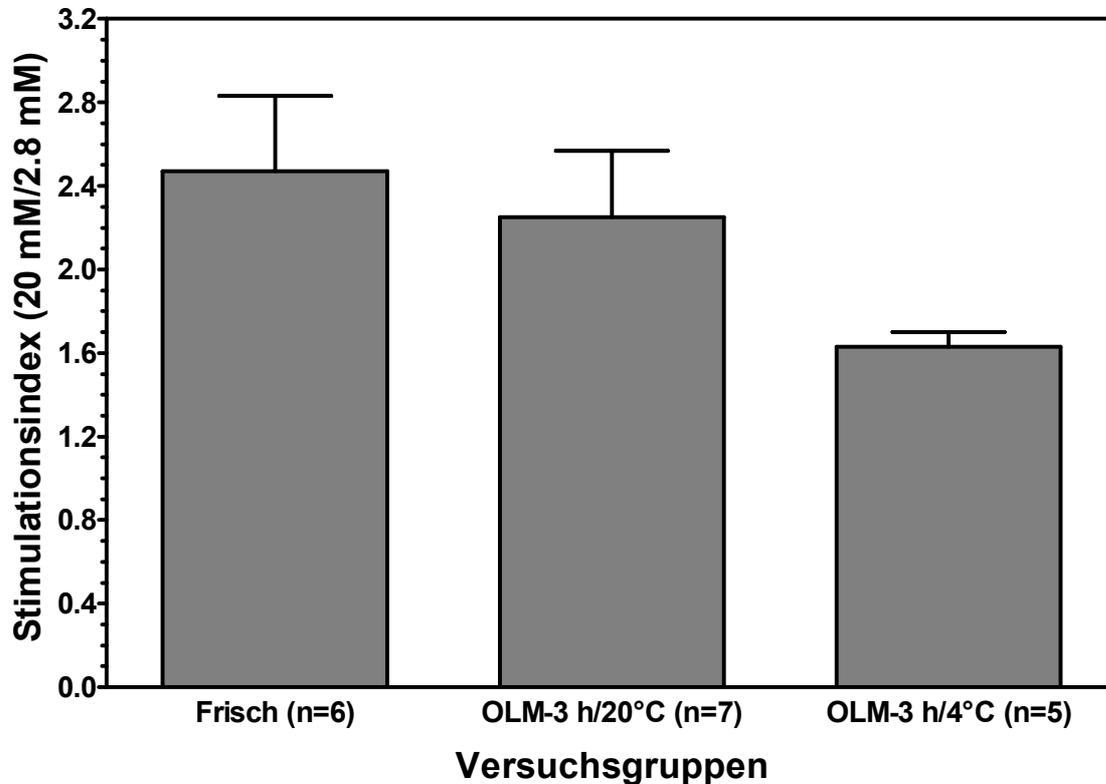


Abb. 27 Stimulationsindex isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen nach statischer Glukoseinkubation in 2,8 und 20 mM Glukose.

Bei der mitochondrialen Formazanproduktion der drei experimentellen Gruppen wurde eine leichte, aber keine signifikante Reduktion durch die OLM-Lagerung bei 4°C beobachtet (Abb. 28).

Ein signifikanter Einfluss der Präservierungstemperatur auf den Energiemetabolismus der Inselzellen konnte durch die ATP-Messung gezeigt werden. Wie in Abb. 29 dargestellt, zeigte der ATP-Gehalt der Inselzellen durch die OLM-Lagerung bei 4°C eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den beiden anderen experimentellen Gruppen. Im Gegensatz dazu wurde die Synthese durch eine Lagerung in PFC bei 20°C deutlich, aber nicht signifikant, im Vergleich zu frisch prozessierten Organen erhöht.

Ergebnisse

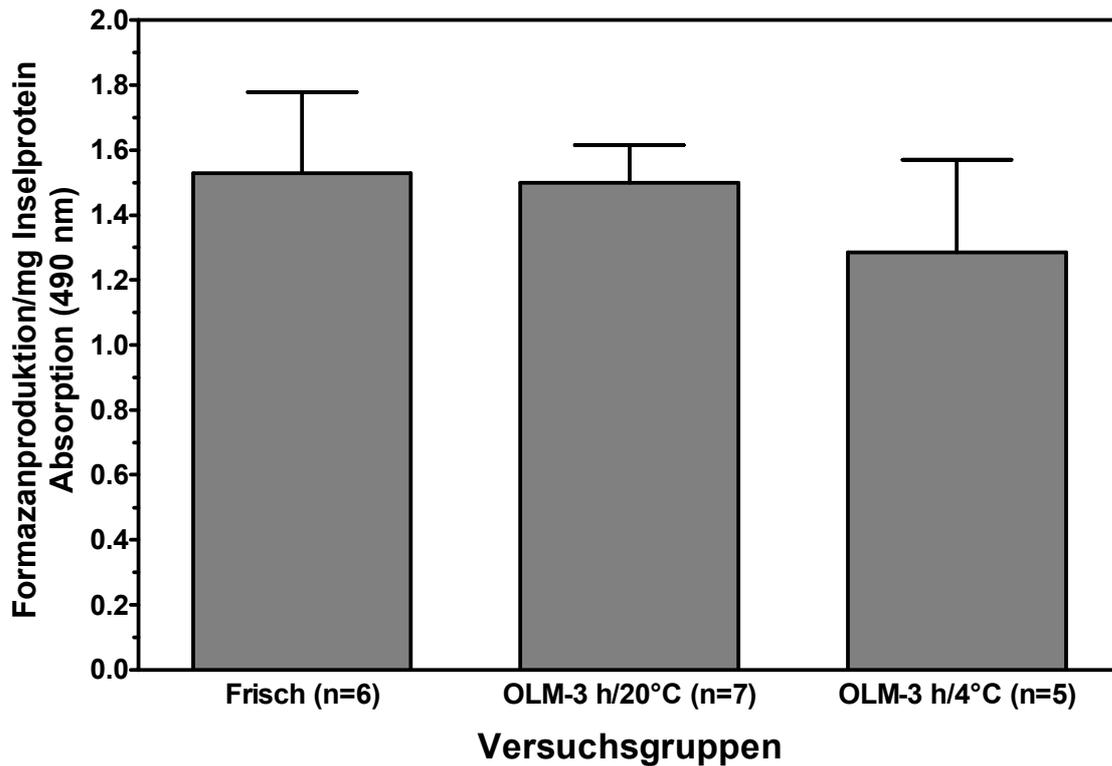


Abb. 28 Mitochondriale Formazanproduktion isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.

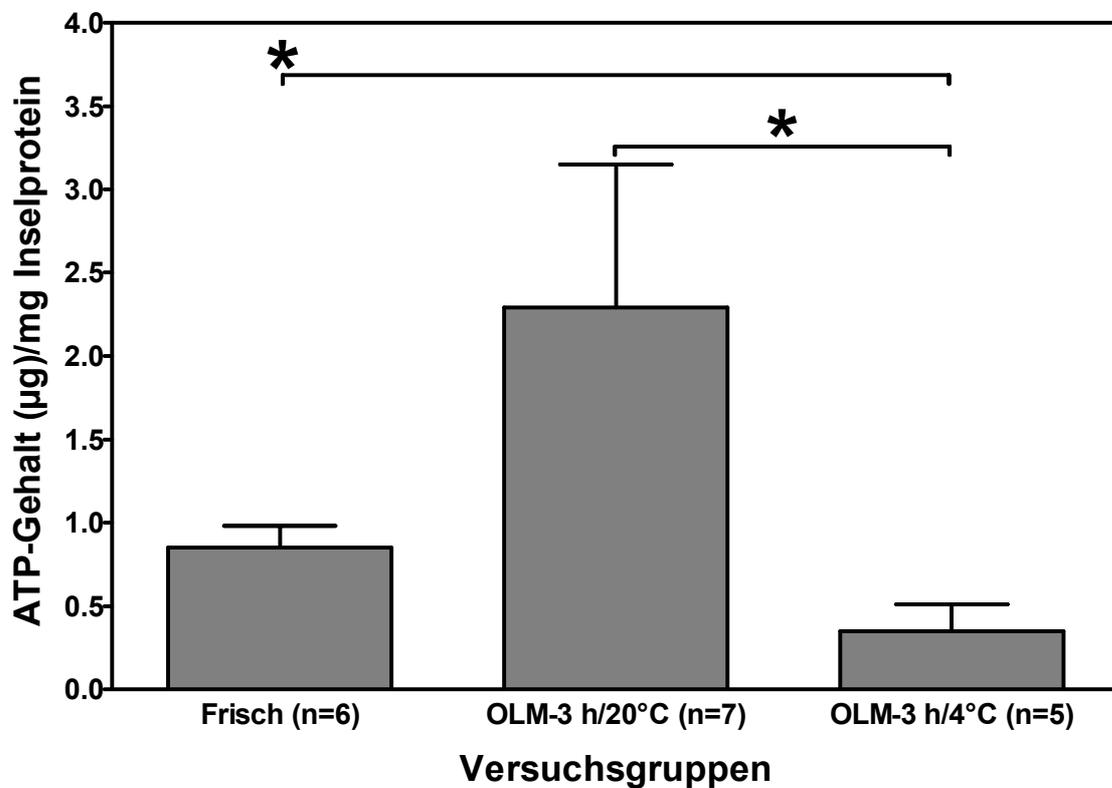


Abb. 29 ATP-Gehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.

* $P < 0.05$ vs. Frisch und OLM-3 h/20°C

Ergebnisse

Bei der Transplantation isolierter Inseln unter die Nierenkapsel diabetischer Nacktmäuse wurde in allen Gruppen eine Reduktion der Serumglukose beobachtet (Abb. 30). Empfänger von Inseln aus Pankreata, die bei 20°C gelagert wurden, ließen allerdings nur eine Partialfunktion des Transplantats erkennen, da eine deutliche Normalisierung der Serumglukose nur während der ersten 7 Tage zu beobachten war. Die kumulative Transplantatfunktion war nach Lagerung bei 20°C im Vergleich zu den anderen experimentellen Gruppen signifikant reduziert (Abb. 31).

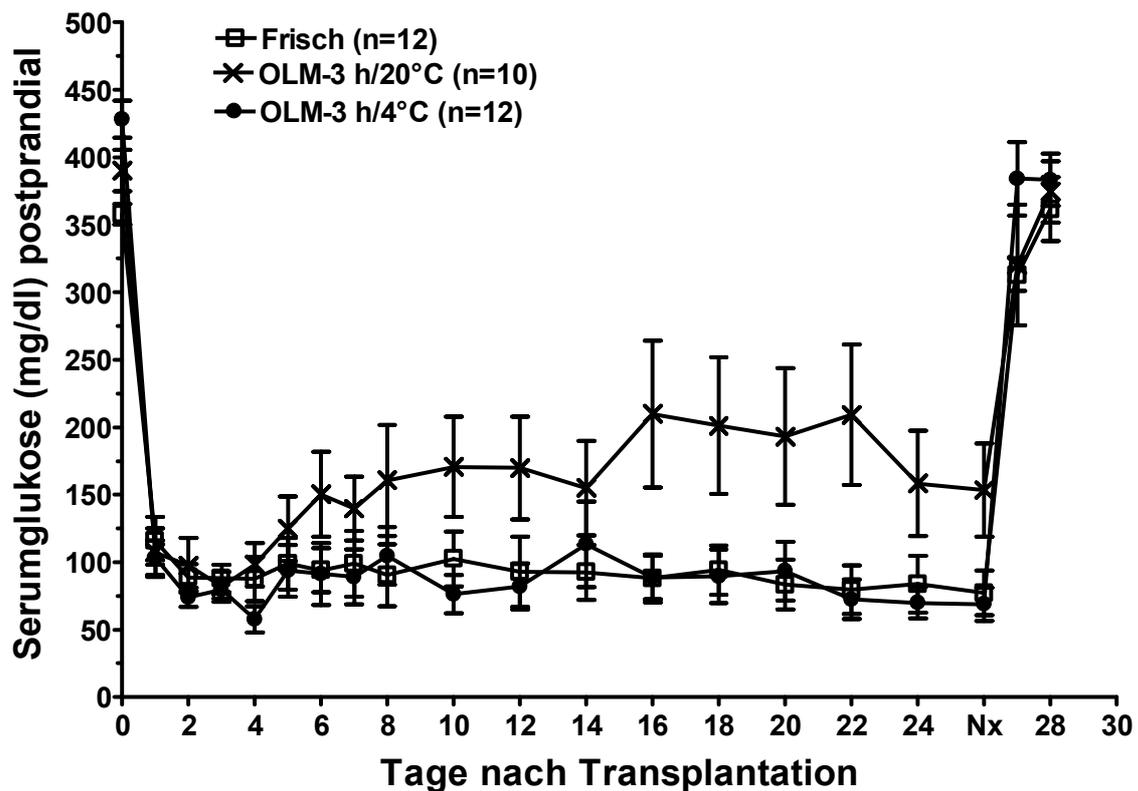


Abb. 30 In vivo Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (□) und PFC-präservierten (x, ●) Pankreata, nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW±SEM).

*P<0.05 vs. Frisch u. OLM-3 h/4°C

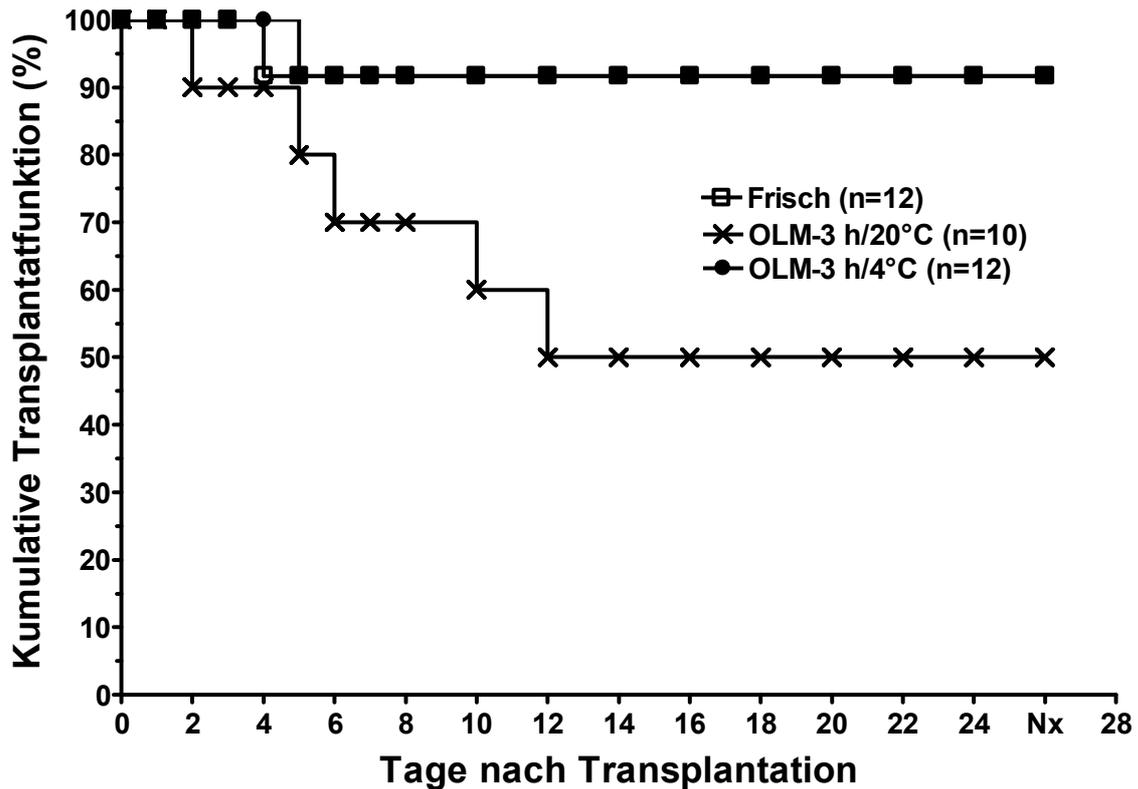


Abb. 31 Kumulative Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (\square) und präservierten (\times , \bullet) Pankreata, nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW \pm SEM).

*P<0.05 vs. Frisch u. OLM-3 h/4°C

3.6 Teilstudie 4 (Prävention ischämischer Schäden durch nachfolgende PFC-Lagerung)

Die Untersuchung zur Prävention ischämischer Schäden durch die nachfolgende 3 stündige Lagerung bei 4°C in PFC wurde an insgesamt 18 Spendertieren durchgeführt (Tab. 3). Alle Organe dieser Teilstudie wurden erst nach Lagerung mit Enzymen distendiert. Das Körpergewicht der Tiere variierte zwischen 131 und 297 kg und das Alter der untersuchten Schweine lag zwischen 17 und 38 Monaten (NS). Die Präparationen aller Versuchsgruppen wiesen eine Reinheit von über 95 % auf.

Die Ausbeute isolierter Inselzellen/g Pankreas nach Reinigung wurde durch eine 30 min Ischämie in den jeweiligen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. Ein positiver Einfluss durch die Oxygenierung der Pankreata konnte nicht festgestellt werden (Abb. 32).

Ergebnisse

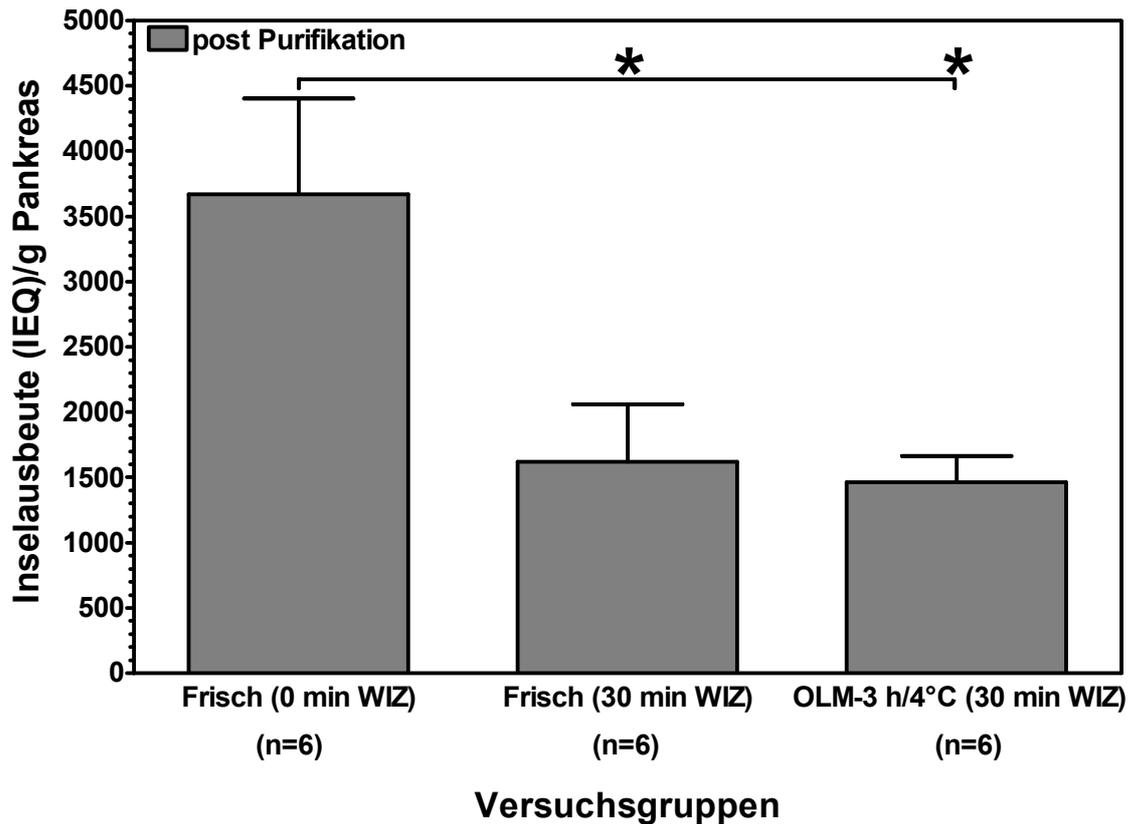


Abb. 32 Ausbeute isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen.
* $P < 0.05$ vs. Frisch (0 min WIZ)

Der II wurde durch die verlängerte WIZ nicht signifikant beeinflusst. Erst durch die zusätzliche 3 h OLM-Präservierung wurde die morphologische Inselintegrität im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert (Abb. 33).

Bei der Viabilität der gereinigten Inseln konnte eine deutliche Verschlechterung durch die verlängerte warme Ischämiezeit beobachtet werden. Diese wurde durch die zusätzliche PFC-Präservierung über 3 h weiter reduziert (Abb. 34).

Ergebnisse

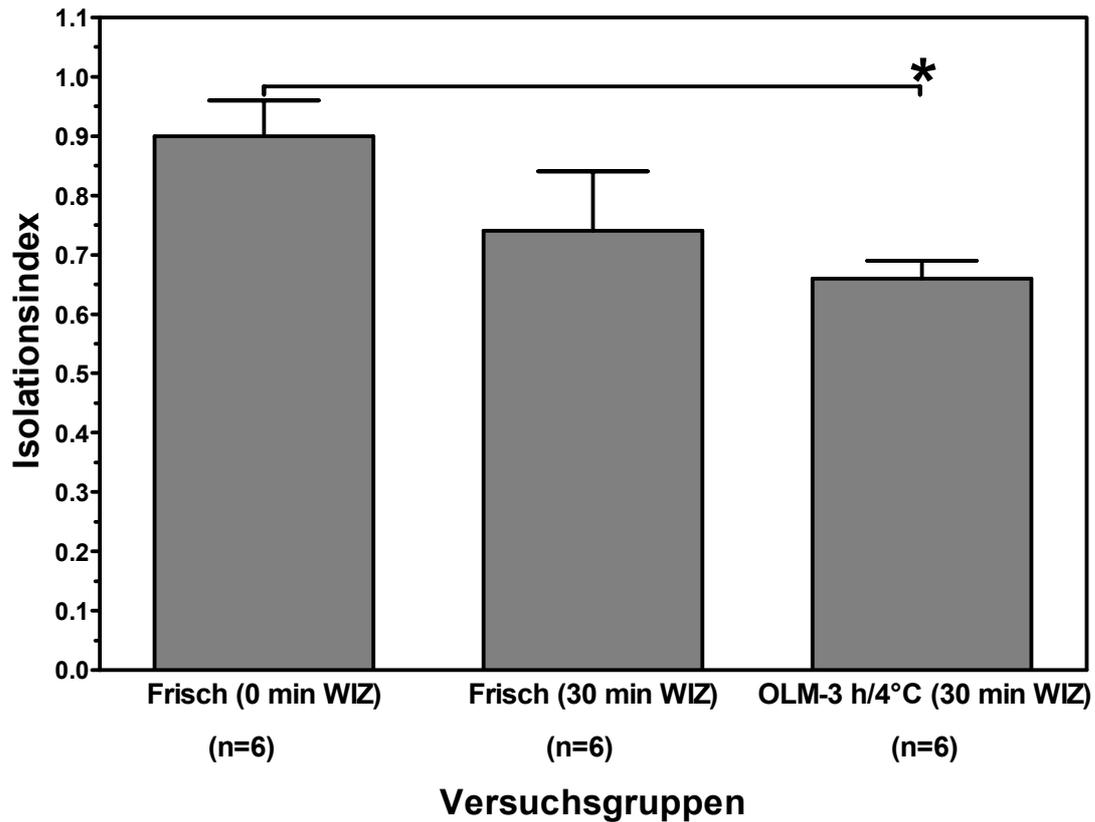


Abb. 33 Isolationsindex isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen.
*P<0.05 vs. Frisch (0 min WIZ)

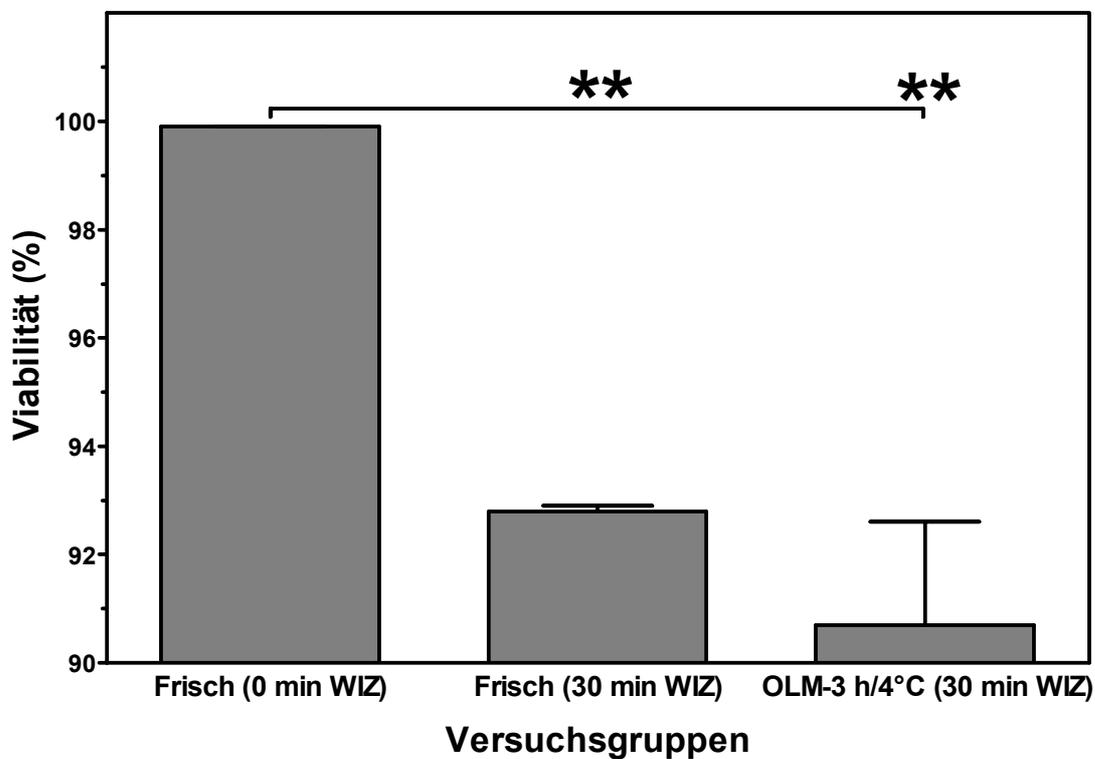


Abb. 34 Viabilität isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen.
**P<0.01 vs. Frisch (0 min WIZ)

Ergebnisse

Der intrazelluläre Insulingehalt der Inseln wurde durch eine normothermische Ischämie nicht beeinflusst, stieg aber signifikant durch eine nachfolgende Lagerung in PFC an (Abb. 35).

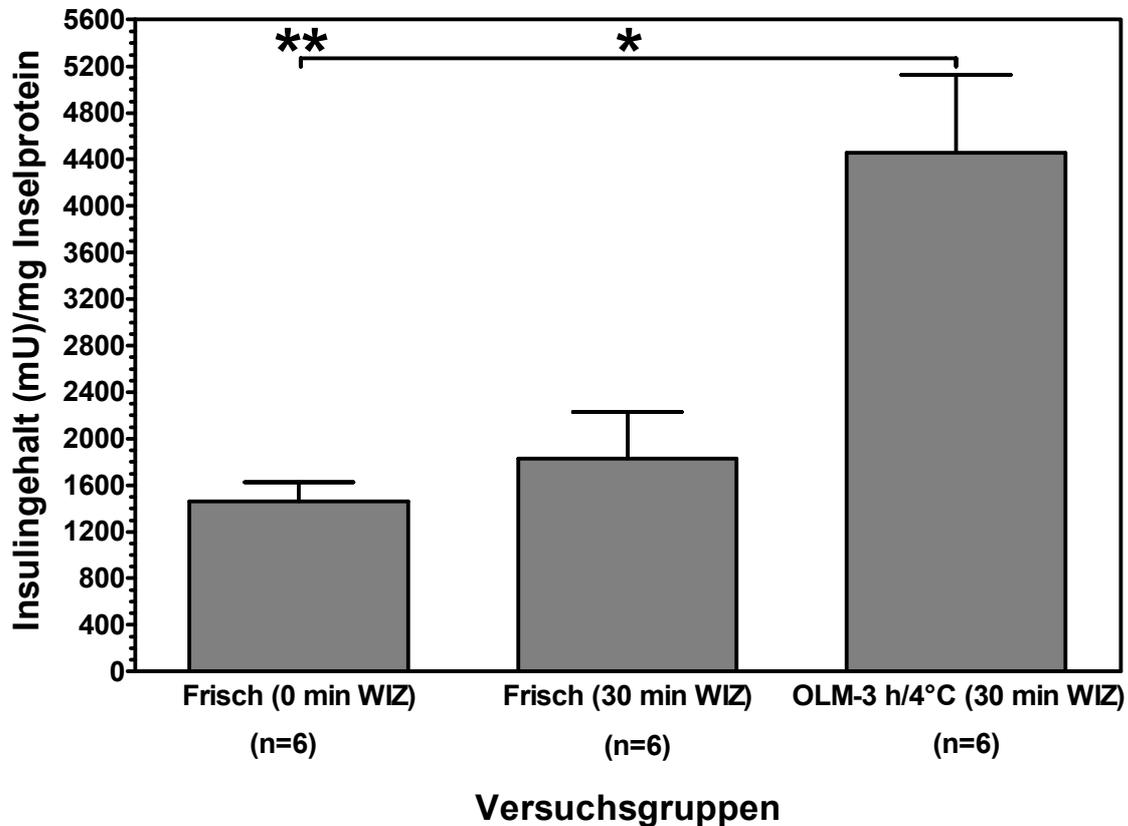


Abb. 35 Intrazellulärer Insulingehalt isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. OLM (30 min WIZ)

Eine glukosestimulierte Insulinsekretion, dargestellt als Stimulationsindex, wurde durch eine normothermische Ischämie vollständig eliminiert und konnte durch eine nachfolgende PFC-Lagerung bei 4°C nahezu vollständig restoriert werden (Abb. 36).

Ein deutlicher Einfluss einer normothermischen Ischämie von 30 min auf die Mitochondrienfunktion ließ sich nicht darstellen (Abb. 37).

Ergebnisse

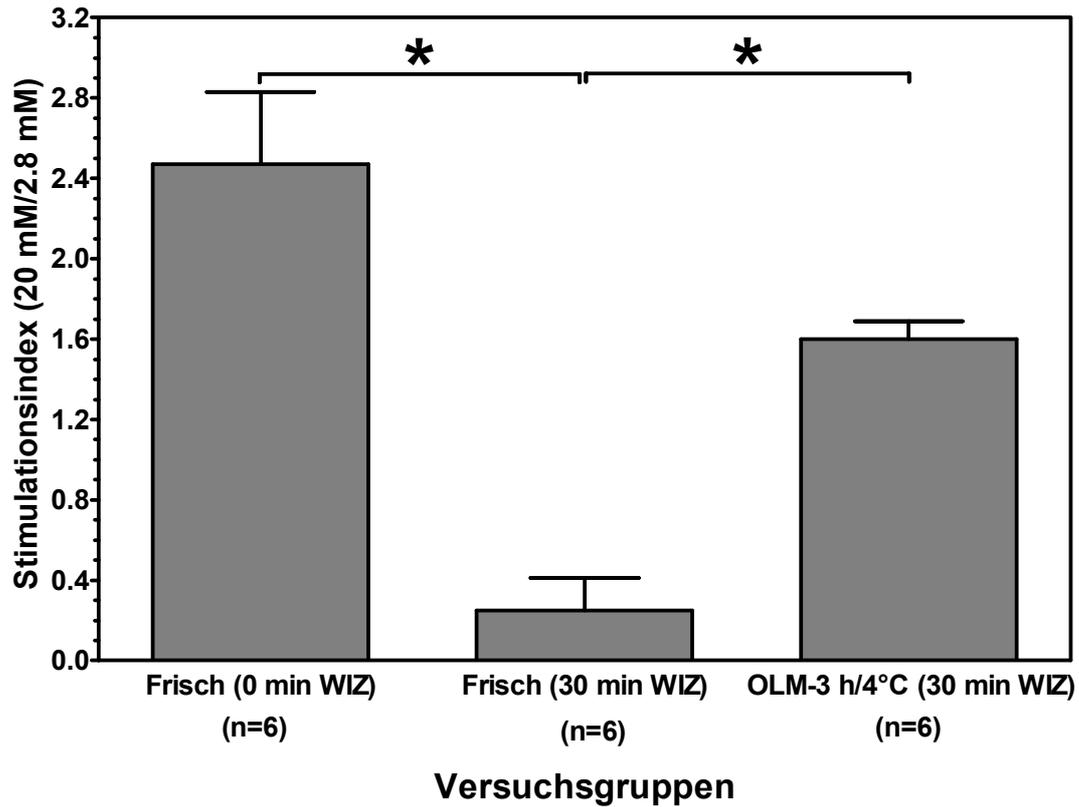


Abb. 36 Stimulationsindex isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen nach statischer Glukoseinkubation in 2,8 und 20 mM Glukose.
* $P < 0.05$ vs. Frisch (0 min WIZ) u. OLM (30 min WIZ)

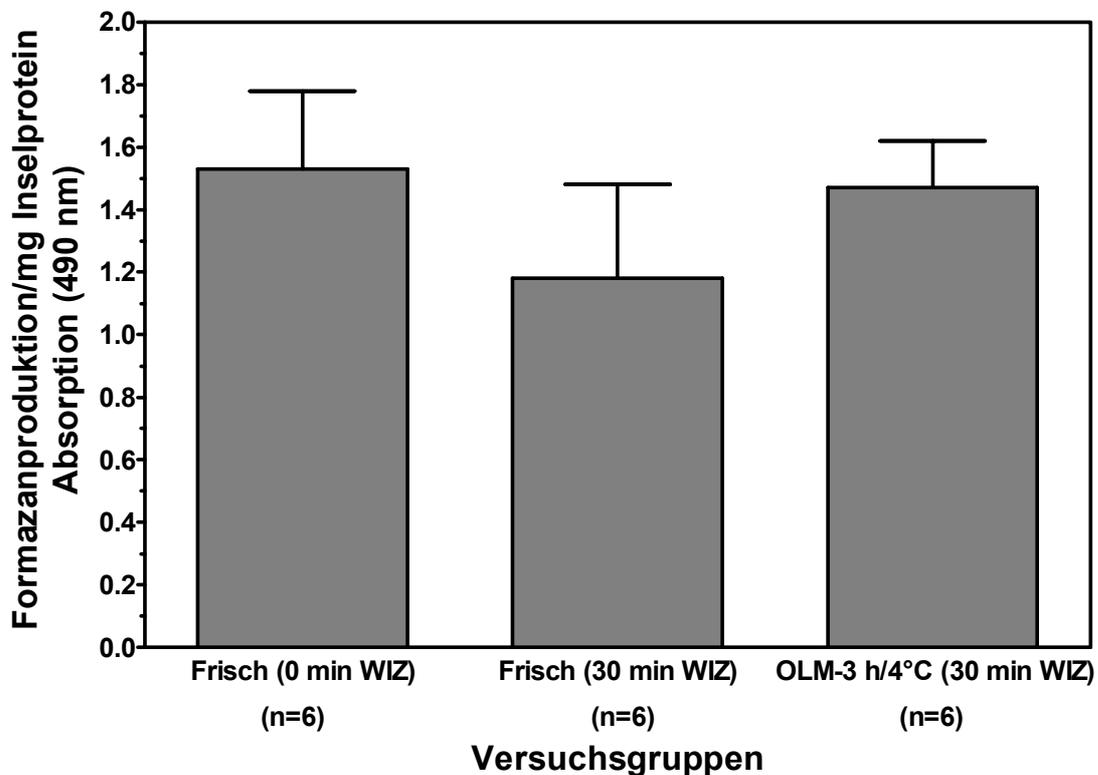


Abb. 37 Mitochondriale Formazanproduktion aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen.

Ergebnisse

Der ATP-Gehalt der Inseln wurde durch eine 30 minütige Ischämie im Vergleich zu den frisch prozessierten Organen hoch signifikant reduziert. Eine nachfolgende Oxygenierung der ischämischen Organe bedingte eine signifikante Steigerung der ATP-Synthese (Abb. 38).

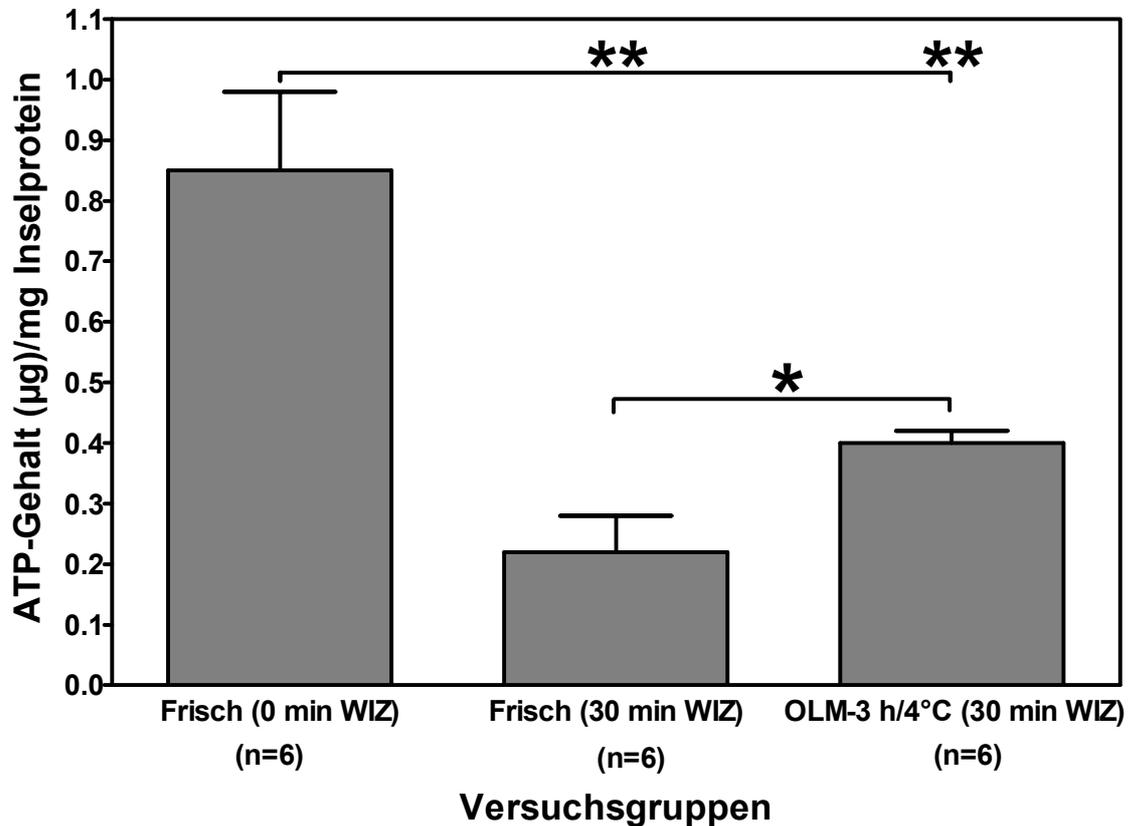


Abb. 38 ATP-Gehalt isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen.

* $P < 0.05$ vs. OLM (30 min WIZ), ** $P < 0.01$ vs. Frisch (0 min WIZ)

Trotz der Verbesserung verschiedener Viabilitätsmuster durch eine nachfolgende Oxygenierung ischämischer Organe, ließ sich nur eine marginale Verbesserung der Funktion ischämischer Inseln in Nacktmäusen erzielen (Abb. 39)

Ergebnisse

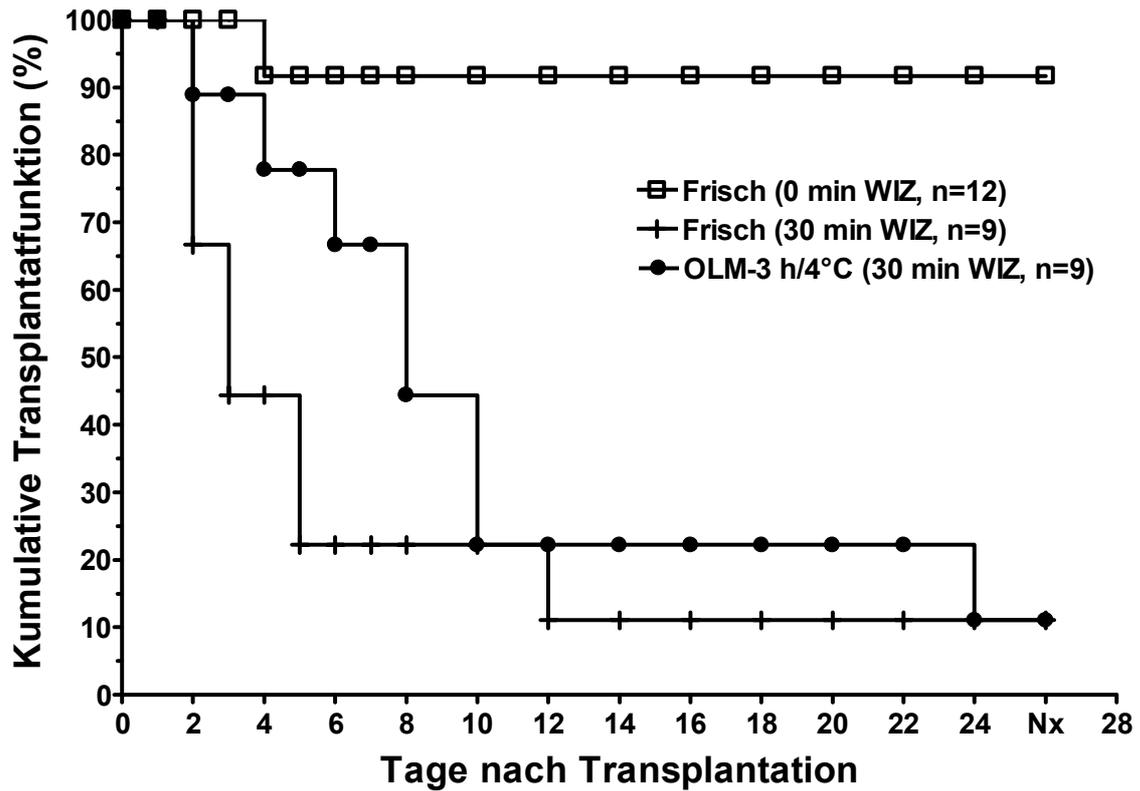


Abb. 39 Kumulative Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (\square), ischämischen (+) und PFC-präservierten (\bullet) Pankreata, nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW \pm SEM).

*P<0.05 vs. Frisch (0 min WIZ)

4. Diskussion

Etwa 300000 Menschen in der Bundesrepublik Deutschland sind am Diabetes Mellitus vom Typ I erkrankt [1]. Neben der intensivierten Insulintherapie, die teilweise mit einer schweren Hypoglykämie verbunden ist, bestehen zwei weitere Therapieansätze: die Pankreas- und Inselzelltransplantation. Diese ermöglichen eine signifikante Verbesserung, im Idealfall eine Normalisierung, des glykolisierten Hämoglobins als Langzeitparameter einer korrekten Blutzuckereinstellung [5, 6].

Im Vergleich zur Pankreastransplantation bietet sich die Transplantation isolierter Inseln als minimal-invasive Alternative an. Obwohl neue Immunsuppressionsmethoden die Rate der Insulinunabhängigkeit nach Inseltransplantation auf ein völlig neues Niveau gehoben haben [11], wird es in Zukunft unmöglich sein, den Bedarf an viablem Pankreasgewebe für potentielle Inselempfänger mit Typ I Diabetes zu decken [13, 14, 16].

Eine alternative Spenderquelle für die zukünftige klinische Inseltransplantation bietet aufgrund hoher Strukturhomologie des Insulins, der großen Verfügbarkeit und der potentiellen genetischen Manipulationen das Hausschwein.

Ein verbleibendes Risiko bei der Transplantation von tierischem Gewebe auf den Menschen ist allerdings die Übertragung von pathogenen Mikroorganismen und des porcinen endogenen Retrovirus (PERV), der in mehreren Varianten im Genom der Schweine verankert ist [22]. Die Wahrscheinlichkeit einer Xenobiose, die ansonsten die größte Hürde für die klinische Realisierung der Xenotransplantation darstellt, kann durch eine zentrale Aufzuchtstelle mit kontinuierlicher Überwachung der möglichen Spendertiere in einer keimfreien Umgebung [39] und durch Impfung der Spendertiere gegen die bekannten Mikroorganismen minimiert werden [24].

Der Transport von entnommenen Organen zu dezentral liegenden Isolationszentren wird allerdings mit einer signifikanten Ischämiezeit des Spendergewebes verbunden sein. Sie spielt eine entscheidende Rolle für die Ausbeute und Viabilität der isolierten Inseln [14].

Um die Organfunktionalität und –integrität während der Ischämie zu gewährleisten, wurde das Pankreas bisher mit kalter UW-Lösung vaskulär perfundiert und anschließend in kalter UW-Lösung inkubiert [26, 27]. Ein signifikanter Fortschritt bei der Präservierung von ischämisch geschädigten Organen konnte durch die Etablierung der so genannten Two-Layer Methode (TLM) erzielt werden [29].

Die einzelnen Untersuchungen haben verdeutlicht, dass die spezifische Fragilität der Schweineinseln [17], die schon früher beschriebene Unfähigkeit porcine Pankreata für mehr als 3 h zu präservieren [40] und die Länge der kalten Ischämiezeit dieses Modell zusätzlich erschweren. Andererseits reduziert es die Variabilität an Spenderfaktoren, die bei humanen Pankreata auftreten [41] und erleichtert eine Durchführbarkeit einer kontrollierten Studie.

4.1 Zeitpunkte der Enzymapplikation (Teilstudie 1)

Der erste Abschnitt der vorliegenden Studie vergleicht die Effizienz des bisherigen Standardpräservierungsverfahrens d.h. die Perfusion und Immersion des Pankreas mit bzw. in kalter UW-Lösung, mit dem neu etablierten Verfahren der TLM [29, 30]. Weiterhin wurde der Einfluss der Enzymapplikation zu unterschiedlichen Zeitpunkten in beiden Verfahren untersucht.

Bisherige Studien haben gezeigt, dass Rattenpankreatata über einen Zeitraum von 48 h und Hundepankreatata über 72 h erfolgreich in der UW-Lösung gelagert werden können. Diese Präservierung konnte durch die Lagerung auf PFC bei beiden Spezies um weitere 24 h erfolgreich ausgedehnt werden [42, 43].

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die über eine erfolgreiche porcine Inselisolierung nach einer längerfristigen kalten Ischämie von 7 h berichtet. Eine teilweise signifikante Reduktion der Ausbeute nach 7 h Präservierung konnte durch keine getestete Präservierungstechnik verhindert werden. Trotzdem ermöglichte die Anwendung der TLM-Technik eine signifikante Steigerung der Ausbeute im Vergleich zur einfachen UW-Präservierung.

Die verminderte Ausbeute von isolierten Inselzellen durch die längere Ischämiezeit, die in der vorliegenden Arbeit dargestellt wurde, steht im Einklang mit vorherigen Veröffentlichungen, die zeigten, dass das Schwein [40] ein sehr sensitives Modell für eine erfolgreiche Organpräservierung ist. Diese Befunde zeigen zusätzlich, dass porcine Inselzellen wesentlich empfindlicher auf ischämische Schäden reagieren als canine [28] oder humane Inseln [32].

Die verbesserte Ausbeute der Organe mit Enzymapplikation vor UW-Präservierung im Vergleich zur Enzymapplikation nach UW-Präservierung steht im Einklang mit Versuchen an Hunde- und Rattenpankreatata [44], sowie Pankreatata vom Schwein [45] und Mensch [46]. Völlig gegensätzliche Daten wurden bei Evaluierung dieser Fragestellung in der Gruppe der TLM-präservierten Pankreatata erhoben.

Die Gründe für diese widersprüchlichen Befunde sind bisher rein spekulativ. Möglich wäre eine Steigerung der Enzymaktivität durch die O₂-Zufuhr während der TLM-Präservierung. Aufgrund der morphologischen Fragilität der Schweineinseln [47], die durch die geringe Ausprägung einer periinsulären Kollagenkapsel und die enge zelluläre Vernetzung mit dem exokrinen Gewebe bedingt ist [48], könnten sich schon kleine Änderungen in der Enzymaktivität destruktiv auf die morphologische Inselintegrität auswirken.

Hierzu konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass eine Reduktion der Neutralen Protease eine verbesserte Ausbeute zur Folge hat (Daten nicht veröffentlicht). Jedoch ist eine vollständige Eliminierung der Neutralen Protease nicht möglich, da dieses Enzym zum einen essentiell für eine erfolgreiche Organverdauung ist [49], zum anderen die Neutrale Protease in der von uns verwendeten Serva NB-8 Kollagenase aus technischen Gegebenheiten nicht weiter reduziert werden kann.

Unabhängig vom unterschiedlichen Einfluss des Zeitpunktes der intraduktalen Enzymdistension auf die Inselausbeute in Abhängigkeit der angewendeten Präservierungsmethode zeigte sich, dass die Enzymgabe vor einer 7 stündigen Lagerung mittels einfacher UW-Technik oder der TLM-Technik, in einer Reduzierung der Funktion isolierter Schweineinseln in diabetischen Nacktmäusen resultiert.

4.2 Technik der PFC-Applikation (Teilstudie 2)

Der Hintergrund dieses Vergleiches zur unterschiedlichen Technik der PFC-Anwendung war die Frage, ob PFC, auch als One-Layer Methode angewendet, zur Präservierung von Pankreata großer Spezies erfolgreich genutzt werden kann.

In der vorliegenden Studie konnte die Verminderung der Inselausbeute nach 7 h kalter Ischämie durch die TLM-Technik nicht verhindert werden. Im Gegensatz dazu waren die beobachteten Ergebnisse nach Präservierung der Organe durch die OLM, im Vergleich zu frisch prozessierten Organen, nur marginal erniedrigt.

Die Qualitätskontrollen in vitro und in diabetischen Nacktmäusen zeigten, dass sowohl TLM- als auch OLM-Inseln vergleichbar zur Funktionalität frisch isolierter Inseln sind. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit einer Studie an Hunden [50], die zeigt, dass PFC als alleiniges Präservierungsmedium Pankreata über einen längeren Zeitraum erfolgreich präservieren kann.

Die Fähigkeit der TLM, Pankreata über einen langen Zeitraum zu präservieren, beruht auf einer Fortführung der ATP-Synthese aus Adenosin durch den kontinuierlichen O₂-Support des präservierten Gewebes [51]. Dies ermöglicht dem Gewebe in ischämischen Organen energieabhängige Reparaturprozesse sowie Vorgänge zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität durchzuführen [52]. Weitere Vorversuche haben gezeigt, dass die intraduktale Injektion von UW-Lösung in das Schweinepankreas eine essentielle Vorbedingung für eine erfolgreiche Präservierung mittels PFC ist. Dies kann nicht durch alleinige Immersion des Organs mit UW-Lösung erreicht werden (Daten nicht veröffentlicht). Dieser Umstand könnte besonders wichtig für fette oder fibrotische humane Organe sein. Dies steht im Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Arbeit an Ratten [53], die besagt, dass durch intraduktale UW-Administration eine höhere Inselausbeute erzielt werden kann als durch alleinige Immersion des Organs in UW-Lösung. Im Gegensatz dazu ist die erfolgreiche Langzeitpräservierung von Hundepankreata zur anschließenden Isolierung von Inselzellen auch ohne intraduktale Injektion von UW-Lösung durchführbar [28]. Der Widerspruch zwischen diesen Befunden könnte durch die unterschiedliche Textur und Größe der Pankreata bedingt sein, die eine Diffusion der UW-Lösung in das Parenchym der Hundepankreata begünstigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen dem intrazellulären ATP in Inseln nach TLM oder OLM-Präservierung beobachtet. Beide Methoden hielten den ATP-Gehalt in den Inseln auf dem Level frisch prozessierter Organe. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass während der Oxygenierung des Pankreas durch das PFC die Anwesenheit von UW-Lösung als zweiter Layer nicht essentiell ist. Die signifikant erhöhte Überlebensrate an langzeit PFC-präservierten Rattenpankreata zeigen, dass PFC als One-Layer signifikant effizienter zur Oxygenierung der gelagerten Organe beiträgt als die TLM-Technik [42]. Dies steht im Einklang mit den von uns beobachteten Inselausbeuten nach OLM-Präservierung.

Momentan durchgeführte Vorversuche an humanen Pankreata zeigen, dass die OLM-Technik auch eine erfolgreiche Isolierung humaner Inseln anhand langfristigen Präservierungsintervallen erlaubt (Daten nicht publiziert). Die Verschickung der Organe in oxygeniertem PFC von Spenderzentren zum Isolationszentrum könnte somit ohne größeren logistischen Aufwand und speziellem technischen Equipment, wie für die TLM-Technik erforderlich, erfolgen.

4.3 Präservierungstemperatur (Teilstudie 3)

Die Fähigkeit der TLM- und OLM-Technik, Pankreata über einen längeren Zeitraum zu präservieren, wird, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, auf die kontinuierlich fortgeführte ATP-Synthese zurückgeführt [52].

Wie an ischämisch geschädigten Hundepankreata nach Autotransplantation erfolgreich demonstriert, konnte aufgrund der Temperaturabhängigkeit der ATP-Synthese eine Anhebung der Präservierungstemperatur von 4°C auf 20°C zu einer Beschleunigung von Reparaturprozessen und einer verbesserten Transplantatfunktion führen [54].

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss einer erhöhten Präservierungstemperatur auf die Qualität und Ausbeute von isolierten Schweineinseln untersucht werden. Die Pankreata wurden dazu für 3 h bei 20°C oder bei 4°C gelagert. Eine Erhöhung der Präservierungstemperatur von 4°C auf 20°C hatte eine signifikante Reduktion der Inselausbeute zur Folge.

Wie erwartet resultierte eine Präservierungstemperatur von 20°C in einem enorm erhöhten intrazellulären ATP-Gehalt der sogar den ATP-Gehalt frisch isolierter Inseln übertraf. Doch im Gegensatz zu der von Kuroda postulierten Korrelation zwischen dem ATP-Gehalt und der Funktion transplantierte Pankreata [55], zeigte sich bei Inseln aus warm präservierten Pankreata eine signifikant verschlechterte Transplantatfunktion im Vergleich zu Inseln aus kalt gelagerten Organen. Weiterhin wurde deutlich, dass der prädiktive Wert der in vitro durchgeführten Qualitätskontrollen nur von geringer Bedeutung für die Transplantatfunktion ist. Dies deutet darauf hin, dass sich Befunde, die an solitären Pankreata beobachtet wurden, nicht ohne weiteres auf die Funktion transplantierte Inseln übertragen lassen.

Gründe für diese Diskrepanz liegen vermutlich in der speziebedingten Sensitivität des Schweinepankreas gegenüber der beschleunigt ablaufenden Autolyse, deren destruktive Effekte nicht mehr durch eine erhöhte ATP-Synthese kompensiert werden können [56].

4.4 Prävention ischämischer Schäden durch nachfolgende PFC-Lagerung (Teilstudie 4)

Teilstudie 4 untersuchte den Einfluss einer 30 minütigen normothermen Ischämie auf die Viabilität und Funktionalität isolierter Schweineinseln und die mögliche Prävention negativer ischämischer Effekte durch eine nachgeschaltete hypotherme Pankreasoxygenierung auf PFC mittels OLM.

Diskussion

Die vorliegenden Daten stehen im Einklang mit älteren Veröffentlichungen, die besagen, dass eine normotherme Ischämie einen bedeutenden Einfluss auf die morphologische Integrität und Ausbeute isolierter Schweineinseln hat [35]. Damit verbunden ist eine signifikante Reduktion der glukoseabhängigen Funktionalität der Inseln sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Die verminderte Stimulierbarkeit der fragilen Schweineinseln durch Glukose scheint durch einen signifikanten Verlust an peripheren α -Zellen und der damit verbundenen Abnahme an Glukagon und cAMP in den β -Zellen bedingt zu sein [57, 58]. Die artspezifische Fragilität der porzinen Inseln kann durch deren enge Verzahnung mit dem exokrinen Gewebe des Pankreas mittels proteasesensitiver Zell-zu-Zell Adhäsionen und der geringen Separation durch eine kollagene Kapsel erklärt werden [48]. Eine warme Ischämie beschleunigt die Autolyse des Gewebes, die insbesondere die peripheren α -Zellen der Inseln in Mitleidenschaft zieht [59]. Verbunden mit einer normothermen Ischämie ist auch ein signifikanter Verlust an intrazellulärem ATP.

Wie die vorliegenden Daten zeigen, lässt sich bei ischämisch geschädigten Schweineinseln ein ähnlicher Effekt durch die Oxygenierung des Spenderpankreas vor Isolierung erreichen. Ein signifikant gesteigener ATP-Gehalt korrelierte dabei mit einer signifikant verbesserten glukosestimulierten Insulinsekretion *in vitro*.

Wie an ischämisch geschädigten Hundepankreata gezeigt, ist die vollständige Regeneration des depletierten ATP-Pools von essentieller Bedeutung für die Transplantatfunktion [60]. In der vorliegenden Studie ist mit der verbesserten *in vitro* Funktion der ischämisch geschädigten Inseln nur eine temporäre Steigerung der Transplantatfunktion in diabetischen Nacktmäusen verbunden.

In der vorliegenden Studie konnte eine vollständige ATP-Regeneration innerhalb der Oxygenierungsphase von 3 h nicht stattfinden. Auf der anderen Seite zeigten Vorversuche, dass eine Extension der Oxygenierung ischämisch geschädigter Pankreata nicht durchführbar war (Daten nicht veröffentlicht).

Die Annahme, dass die Anfälligkeit der Pankreata gegenüber der warmen und kalten Ischämie eine Spezies spezifische Variable ist, wurde nicht nur am Schwein beobachtet. Die ATP-Synthese in humanen [61] und caninen Pankreata [62], die einer längeren Ischämie vor TLM-Präservierung ausgesetzt waren, zeigt, dass die ischämische Toleranz von Hundepankreata wesentlich höher liegt als bei anderen Spezies.

Da noch keine Daten zur Isolierung von Hundeinseln aus ischämisch geschädigten Pankreata publiziert wurden, kann nur spekuliert werden, ob Befunde, die nach Transplantation solitärer

Diskussion

Hundepankreata erhoben wurden, sich ohne Einschränkung auf die Situation transplantierte Inseln übertragen lassen.

Daten, die nach der Etablierung der TLM in der klinischen Inseltransplantation vorliegen, sind bezüglich der Ischämiezeit sehr rudimentär und unvollständig [29, 30]. Unsere Vermutung, dass die Sensitivität im Pankreasgewebe gegenüber einer warmen oder kalten Ischämie eine speziesbedingte Variable ist, wird durch Untersuchungen der ATP-Synthese in humanen [61] und caninen Pankreata [62], die einer normothermen Ischämie ausgesetzt waren, bestätigt.

Diese Untersuchung zeigt, dass das Zeitfenster, in dem die ischämisch bedingten Zellschäden in Schweineinseln reversibel bleiben, im Vergleich zu vaskularisierten Hundepankreata sehr eng ist.

5. Zusammenfassung

Der vorliegende Mangel an Spenderorganen und der große Bedarf an humanen Pankreata erfordert die Suche nach alternativem Spendergewebe. Aufgrund der Körpergröße der phylogenetischen Beziehung hinsichtlich des Insulinmetabolismus sowie der relativ guten Verfügbarkeit erscheint das Hausschwein als eine realistische Gewebequelle für eine zukünftige klinische Xenotransplantation isolierter Inseln. Ein verbleibendes Risiko bei der Transplantation von tierischem Gewebe auf den Menschen ist allerdings die Übertragung von pathogenen Mikroorganismen und des porcinen endogenen Retrovirus.

Die Wahrscheinlichkeit einer Xenobiose könnte durch Haltung der möglichen Spendertiere in einer zentralen Aufzuchtstelle mit kontinuierlicher Überwachung der möglichen Spendertiere in einer keimfreien Umgebung, sowie durch prophylaktische Impfung gegen bekannte Mikroorganismen, minimiert werden.

Beim Transport der Organe zum Isolationslabor tritt die so genannte Two-Layer Methode zur Pankreaspräservierung in den Vordergrund. Dabei wird das Organ auf einem hoch effektiven Sauerstoffträger, dem Perfluorkarbon, gelagert und kontinuierlich mit O₂ versorgt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anwendung von Perfluorkarbon beim ischämischen Schweinepankreas zum Zweck der nachfolgenden Isolierung zu etablieren und optimieren. Weiterhin sollte geklärt werden, ob eine ischämisch bedingte Schädigung des Inselgewebes durch die Anwendung von Perfluorkarbon wenigstens partiell revidiert werden kann.

Die Präservierung mittels Two-Layer Methode ist der einfachen Lagerung der Organe in UW-Lösung hinsichtlich der erzielten Ausbeute und Transplantatfunktion signifikant überlegen. Trotz der Eliminierung von Neutraler Protease zeigte sich ein negativer Einfluss der vor Präservierung durchgeführten Enzymapplikation auf die Inselnaktivität.

Mit Anwendung von Perfluorkarbon als One-Layer Methode wurden Inselausbeuten erzielt, die denjenigen frisch prozessierter Organe entsprachen.

Eine Erhöhung der Präservierungstemperatur von 4°C auf 20°C hatte eine signifikante Reduktion der Inselausbeute zur Folge. Trotz eines erhöhten ATP-Gehaltes zeigten diese Inseln bei der Funktionskontrolle im Nacktmausbioassay eine verminderte Funktion.

Der negative Einfluss der normothermen Ischämie auf die Inselausbeute konnte durch eine nachfolgende Oxygenierung ischämischer Pankreata nicht verhindert werden. Trotz einer verbesserten in-vitro Funktion ischämischer Inseln konnte die nachfolgende Lagerung auf Perfluorkarbon die Transplantatfunktion nur temporär verbessern.

Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit das enorme Potential einer Pankreasoxygenierung mittels Perfluorkarbon demonstrieren. Erstmals ist es gelungen, viable Inseln aus Schweinepankreatata nach 7 stündiger Ischämie zu isolieren.

Literaturverzeichnis

1. Bretzel RG (2001/2002): Gießener Universitätsblätter
2. Bretzel RG (2004): Intensive insulin regimens: evidence or benefit (In Process Citation). *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 suppl 2, 8-13
3. Hasslacher C, Ritz E, Wahl P, Michael C (1989): Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus. *Nephrol. Dial. Transplant*, 859-863
4. DeWitt DE, Hirsch IB (2003): Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus. Scientific review *Jama* 289(17), 2254-2264
5. Morel P, Goetz FC, Moudry-Munns K, Freier E, Sutherland DE (1991): Long-term glucose control in patients with pancreatic transplants. *Ann Intern Med.* 115(9), 694-696
6. Bretzel RG, Hering BJ, Federlin KF (1992): Islet transplantation registry report 1991. *Diab Nutr Metab* 5 suppl, 177-181
7. Robertson RP, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland DE (2000): Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care* 23(1), 112-116
8. Nakache R, Tyden G, Groth CG (1994): Long-term quality of life in diabetic patients after combined pancreas-kidney transplantation or kidney transplantation. *Transplant Proc* 26(2), 510-511
9. Drognitz O, Hopt UT (2003): Pancreas transplantation: a survey an indications, surgical techniques, immunosuppression, complications and outcome. *Zentralbl Chir* 128(10), 821-830
10. Gruessner RW, Sutherland DE, Troppmann C, Benedetti E, Hakim N, Dunn DL, Gruessner AC (1997): The surgical risk of pancreas transplantation in the cyclosporine era: an overview. *J Am Coll Surg* 185(2), 128-144
11. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV (2000): Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343(4), 230-238
12. Ryan EA, Lakey JRT, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM (2001): Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton Protocol. *Diabetes* 50, 710-719
13. Elsner A (2004): Organspende: Mangel nicht beseitigt. *Deutsches Ärzteblatt* 101(40), 2662
14. Lakey JR, Warnock GL, Rajotte RV, Suarez-Alamazor ME, Ao Z, Shapiro AM, Kneteman NM (1996): Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation* 61(7), 1047-1053
15. Sykes M, d'Apice A, Sandrin M (2003): Position paper of the Ethics Committee of the International Xenotransplantation Association. *Xenotransplantation* 10(3), 194-203
16. Sheehy E, Conrad SL, Brigham LE, Luskin R, Weber P, Eakin M, Schkade L, Hunsicker L (2003): Estimating the number of potential organ donors in the United States. *N Engl J Med* 349(7), 667-674
17. Toso C, Brandhorst D, Oberholzer J, Triponez F, Buhler L, Morel P (2000): Isolation of adult porcine islets of Langerhans. *Cell Transplant* 9(3), 297-305
18. Brandhorst H, Brandhorst D, Hering BJ, Bretzel RG (1999): Significant progress in porcine islet mass isolation utilizing liberase HI for enzymatic low-temperature pancreas digestion. *Transplantation* 68(3), 355-361
19. Kirchoff N, Hering BJ, Geiss V, Federlin K, Bretzel RG (1994): Evidence for breed-dependent differences in porcine islets of Langerhans. *Transplant Proc* 26(2), 616-617
20. Soggi C, Ricordi C, Davalli AM, Staudacher C, Baro P, Vertova A, Freschi M, Gavazzi F, Braghi S, Pozza G (1990): Selection of donors significantly improves pig islet isolation yield. *Horm Metab Res* 25, 32-34

21. Krickhahn M, Buhler C, Meyer T, Thiede A, Ulrichs K (2002): The morphology of islets within the porcine donor pancreas determines the isolation result: successful isolation of pancreatic islets can now be achieved from young market pigs. *Cell Transplant* 11(8), 827-838
22. Akiyoshi DE, Denaro M, Zhu H, Greenstein JL, Banerjee P, Fishman JA (1998): Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *Journal of Virology* 72, 4503-4507
23. Tucker A, Belcher C, Moloo B, Mazzulli T, Humar A, Hughes A, McArdle P, Talbot A (2002): The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: baseline clinical pathology and organ size studies. *Xenotransplantation* 9(3), 203-208
24. Specke V, Tacke SJ, Boller K, Schwendemann J, Denner J (2001): Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models. *Journal of General Virology* 82, 837-844
25. Bretschneider HJ (1991): Organübergreifende Prinzipien zur Verlängerung der Ischämietoleranz. *Jahrbuch 1991 der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina (Halle/Saale) Leopoldina* 37, 120-133
26. Wahlberg JA, Love R, Landegaard L, Southard JH, Belzer FO (1987): 72-hour preservation of the canine pancreas. *Transplantation* 43(1), 5-8
27. Belzer FO (1989): Clinical organ preservation with UW solution. *Transplantation* 47(6), 1097-1098
28. Tanioka Y, Sutherland DE, Kuroda Y, Gilmore TR, Asaheim TC, Kronson JW, Leone JP (1997): Excellence of the two-layer method (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) in pancreas preservation before islet isolation. *Surgery* 122(2), 435-441
29. Tsujimura T, Kuroda Y, Kin T, Avila JG, Rajotte RV, Korbitt GS, Ryan EA, Shapiro AMJ, Lakey RT (2002): Human islet transplantation from pancreases with prolonged cold ischemia using additional preservation by the Two-Layer (UW Solution/Perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 74, 1687-1691
30. Hering BJ, Matsumoto I, Sawada T, Nakano M, Sakai T, Kandaswamy R, Sutherland DER (2002): Impact of Two-Layer pancreas preservation on islet isolation and transplantation. *Transplantation* 74, 1813-1816
31. Wright MJ, Cavanagh TJ, Fetterhoff TJ, Wile KJ (1994): Effect of blood content on porcine pancreatic dissociation and islet yield. *Transplant Proc* 26(6), 3442
32. Matsumoto S, Kuroda Y (2002): Perfluorocarbon for Organ Preservation before Transplantation. *Transplantation* 74, 1804-1809
33. Ricordi C, Lacy PE, Finke E, Olack B, Scharp DW (1988): Automated Method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37, 413-420
34. Noel J, Latif Z, Alejandro R (1987): A rapid staining method for the identification of mammalian islets of Langerhans. *Diabetes* 36 (suppl A), 276-278
35. Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, Kaufmann DB, Warnock GL, Knetemann NM, Lake SP, London NJ, Socci C, Alejandro R (1990): Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat Jul-Sep* 27(3), 185-195
36. Lowry OH, Rosbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275
37. Jahr H, Hussmann B, Eckhardt T, Bretzel RG (2002): Successful single donor islet allotransplantation in the streptozotocin diabetes rat model. *Cell Transplant* 11(6), 513-518
38. Zöfel P (1985): *Statistik in der Praxis*, Fischer Verlag, Stuttgart

39. Tucker A, Belcher C, Moloo B, Mazzulli T, Humar A, Hughes A, McArdle P, Talbot A (2002): The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: baseline clinical pathology and organ size studies. *Xenotransplantation* 9(3), 203-208
40. Barthel M, Leonhardt U, Kohler H, Siegel EG, Tytko A, Nebendahl K, Peiper HJ, Creutzfeld W (1989): The perfused porcine pancreas as a model for testing organ protective solutions. *Res Exp Med (Berl)* 189(5), 303-311
41. Brandhorst D, Brandhorst H, Hering B, Federlin K, Bretzel RG (1995): Islet Isolation from the Pancreas of Large Mammals and Humans: 10 Years of Experience. *Exp Clin Endocrinol* 103, 3-14
42. Urushihara T, Sumimoto K, Ikeda M, Hong HQ, Fukuda Y, Dohi K (1994): A comparative study of two-layer cold storage with perfluorochemical alone and University of Wisconsin solution for rat pancreas preservation. *Transplantation* 57(11), 1684-1686
43. Fujino Y, Kuroda Y, Suzuki Y, Fujiwara H, Kawamura T, Morita A, Ku Y, Saitoh Y (1991): Preservation of canine pancreas for 96 hours by modified two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 51, 1133-1135
44. Munn SR, Kaufman DB, Field MJ, Viste AB, Sutherland DE (1989): Cold-storage preservation of the canine and rat pancreas prior to islet isolation. *Transplantation* 47(1), 28-31
45. Mellert J, Hering BJ, Hopt UT, Bretzel RG, Hufnagel B, Pfeffer F, Brandhorst H, Klitscher D, Federlin K (1991): Exchange of pancreata and islets between centers for experimental islet transplantation in the pig. *Transplant Proc* 23(5), 2435-2436
46. Soggi C, Davalli AM, Vignali A, Pontiroli AE, Maffi P, Magistretti P, Gavazzi F, De Nittis P, Di Carlo V, Pozza G (1993): A significant increase of islet yield by early injection of collagenase into the pancreatic duct of young donors. *Transplantation* 55(3), 661-663
47. van Suylichem PT, van Deijnen JE, Wolters GH, van Schilfgaarde R (1995): Amount and distribution of collagen in pancreatic tissue of different species in the perspective of islet isolation procedures. *Cell Transplant* 4(6), 609-614
48. van Deijnen JH, Hulstaert CE, Wolters GH, van Schilfgaarde R (1992): Significance of the peri-insular extracellular matrix for islet isolation from the pancreas of rat, dog, pig, and man. *Cell Tissue Res* 267(1), 139-146
49. Brandhorst D, Iken M, Tanioka Y, Brendel MD, Bretzel RG, Brandhorst H (2005): Influence of collagenase loading on long-term preservation of pig pancreas by the two-layer method for subsequent islet isolation. *Transplantation* 79(4), 433-437
50. Kuroda Y, Fujino Y, Kawamura T, Suzuki Y, Fujiwara H, Saitoh Y (1990): Excellence of perfluorochemical with simple oxygen bubbling as a preservation medium for simple cold storage of canine pancreas. *Transplantation* 49, 648-650
51. Kuroda Y, Hiraoka K, Tanioka Y, Matsumoto S, Morita A, Fujino Y, Suzuki Y, Ku Y, Saitoh Y (1994): Role of adenosine in preservation by the two-layer method of ischemically damaged canine pancreas. *Transplantation* 57, 1017-1020
52. Kuroda Y, Fujino Y, Morita A, Ku Y, Saitoh Y (1991): Correlation between high adenosine triphosphate tissue concentration and good posttransplant outcome for the canine pancreas graft after preservation by the two-layer cold storage method. *Transplantation* 52(6), 989-991
53. Sawada T, Matsumoto I, Nakano M, Kirchhof N, Sutherland DE, Hering BJ (2003): Improved islet yield and function with ductal injection of University of Wisconsin solution before pancreas preservation. *Transplantation* 75(12), 1965-1969

54. Matsumoto S, Kuroda Y, Hamano M, Kim Y, Suzuki Y, Ku Y, Saitoh Y (1996): Direct evidence of pancreatic tissue oxygenation during preservation by the two-layer-method. *Transplantation* 62, 1667-1670
55. Kuroda Y, Matsumoto S, Fujita H, Tanioka Y, Sakai T, Hamano M, Hiraoka K, Kim Y, Suzuki Y, Ku Y, Saitoh Y (1996): Resuscitation of ischemically damaged pancreas during short-term preservation at 20 degrees C by the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) method. *Transplantation* 61(1), 28-30
56. Masshoff W, Lindlar F, Stolpmann HJ (1963): Morphologische und lipidchemische Untersuchungen zur Autolyse von Leber und Pankreas. *Virchows Arch. path. Anat.* 337, 340-352
57. Davalli AM, Bertuzzi F, Socci C, Scaglia L, Gavazzi F, Freschi M, Di Carlo V, Pontiroli AE, Pozza G (1993): Paradoxical release of insulin by adult pig islets in vitro. Recovery after culture in a defined tissue culture medium. *Transplantation* 56(1), 148-154
58. Bertuzzi F, Berra C, Socci C, Davalli AM, Calori G, Freschi M, Piemonti L, De Nittis P, Pozza G, Pontiroli AE (1995): Glucagon improves insulin secretion from pig islets in vitro. *J Endocrinol* 147(1), 87-93
59. Ohgawara H, Kobayashi A, Chong SJ, Akaike T, Hashimoto Y (1994): Preparation of adult pig pancreatic cells: comparative study of methods with or without proteolytic enzymes. *Cell Transplant* 3(4), 325-331
60. Morita A, Kuroda Y, Fujino Y, Tanioka Y, Ku Y, Saitoh Y (1993): Assessment of pancreas graft viability preserved by a two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) method after significant warm ischemia. *Transplantation* 55(3), 667-669
61. Kuroda Y, Tanioka Y, Morita A, Hiraoka K, Matsumoto S, Fujino Y, Ku Y, Saitoh Y, Sugihara J, Okumura S (1994): The possibility of restoration of human pancreas function during preservation by the two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) method following normothermic ischemia. *Transplantation* 57, 282-285
62. Kuroda Y, Morita A, Fujino Y, Tanioka Y, Ku Y, Saitoh Y (1993): Restoration of pancreas graft function preserved by a two-layer (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) cold storage method after significant warm ischemia. *Transplantation* 55, 227-228

8. ANHANG

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
d	Tag (e)
dl	Deziliter
DMC-U	Dimethylcaseinase-Units
DTZ	Diphenylthiokarbazon
EIA	Enzym-Immunoassay
FCS	Fetal Calf Serum
g	Ortsfaktor der Erdanziehungskraft
g	Gramm
GIT	Gastrointestinaltrakt
Glc.	Glukose
h	Stunde (n)
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
Hg	Quecksilber
IEQ	Inseläquivalent
IRI	Immunreaktives Insulin
II	Isolationsindex
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KIZ	kalte Ischämie Zeit
l	Liter
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium
MW	Mittelwert
n	Anzahl
nm	Nannometer
Na	Natrium
NaCl	Natrium Chlorid
NaOH	Natronlauge
NCS	Newborn Calf Serum
N.P.	Neutrale Protease
NS	nicht signifikant
Nx	Nephrektomie
O ₂	Sauerstoff
OLM	One-Layer Methode
PBS	Phosphat Puffer Lösung

Anhang

PERV	porziner endogener Retrovirus
PFC	Perfluorkarbon
post	nach Präservierung
PPi	anorganisches Phosphat
prä	vor Präservierung
PZ-U	Wünsch Units
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
SI	Stimulationsindex
sonif.	sonifizieren
STZ	Streptozotocin
Tab.	Tabelle
TLM	Two-Layer Methode
TX	Transplantation
U	Units
UW	Lösung der Universität von Wisconsin
vs.	versus
WIZ	warme Ischämie Zeit
w/o	without
zentrifug.	Zentrifugation
µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
&	und
%	Prozent

8.2 Tabellen

	Seite
Tab. 1 Probenbehandlung	13
Tab. 2 Versuchsdeterminanten der untersuchten experimentellen Gruppen.	17
Tab. 3 Untersuchungen der einzelnen Teilstudien.	18

8.3 Abbildungen

		Seite
Abb. 1	UW-Lagerung, A. UW-Lösung, B. Schweinepankreas, C. Halterung	10
Abb. 2	Two-Layer Methode, A. UW-Lösung, B. Perfluorkarbon, C. Schweinepankreas, D. Sauerstoffzufuhr, E. Halterung	10
Abb. 3	One-Layer Methode, A. Perfluorkarbon, B. Schweinepankreas, C. Sauerstoffzufuhr, D. Halterung	11
Abb. 4	Schematische Darstellung der Digestions- und Filtrationsapparatur (Ricordi et al. 1988) zur Isolierung von Inselzellen. 1. peristaltische Pumpe, 2. Wärmeschlange, 3. Murneln, 4. Pankreas, 5. Siebeinsatz, 6. Stahlkammer, 7. Schlauchsystem	12
Abb. 5	Biolumineszenzreaktion zwischen Luciferase und ATP.	14
Abb. 6	Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks während der O ₂ Begasung von Perfluorkarbon bei 300 ml (▲) und bei 2000 ml O ₂ /min (■).	19
Abb. 7	Sauerstoffaufnahme- und Bindungskapazität von PFC. Das PFC wurde zunächst für 30 min mit 2000 ml O ₂ /min (■) begast und anschließend über mehrere Stunden ohne weitere Begasung gelagert und gemessen.	20
Abb. 8	Ausbeute isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen.	21
Abb. 9	Isolationsindex isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen.	22
Abb. 10	Intrazellulärer Insulingehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen.	22
Abb. 11	Stimulationsindex isolierter Inseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen nach statischer Glukoseinkubation in 2,8 und 20 mM Glukose.	23
Abb. 12	Mitochondriale Formazanproduktion isolierter Inseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen.	24
Abb. 13	ATP-Gehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und präservierten Organen.	24
Abb. 14	In vivo Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (□) und präservierten (◆, ▲, ▼) Pankreata nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW±SEM).	25

Abb. 15	Kumulative Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (□) und präservierten (◆, ▲, ▼) Pankreata nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW±SEM).	26
Abb. 16	Ausbeute isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.	27
Abb. 17	Isolationsindex isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.	28
Abb. 18	Intrazellulärer Insulingehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.	28
Abb. 19	Stimulationsindex isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen nach statischer Glukoseinkubation in 2,8 und 20 mM Glukose.	29
Abb. 20	Mitochondriale Formazanproduktion isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.	30
Abb. 21	ATP-Gehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.	31
Abb. 22	In vivo Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (□) und PFC-präservierten (▲, ●) Pankreata nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW±SEM).	31
Abb. 23	Kumulative Transplantatfunktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (□) und PFC-präservierten (▲, ●) Pankreata nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW±SEM).	32
Abb. 24	Ausbeute isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.	33
Abb. 25	Isolationsindex isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.	34
Abb. 26	Intrazellulärer Insulingehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen.	34
Abb. 27	Stimulationsindex isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen nach statischer Glukoseinkubation in 2,8 und 20 mM Glukose.	35

Anhang

- Abb. 28** Mitochondriale Formazanproduktion isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen. 36
- Abb. 29** ATP-Gehalt isolierter Inseln aus frisch prozessierten und PFC-präservierten Organen. 36
- Abb. 30** In vivo Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (\square) und PFC-präservierten (\times , \bullet) Pankreata, nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW \pm SEM). 37
- Abb. 31** Kumulative Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (\square) und präservierten (\times , \bullet) Pankreata, nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW \pm SEM). 38
- Abb. 32** Ausbeute isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen. 39
- Abb. 33** Isolationsindex isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen. 40
- Abb. 34** Viabilität isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen. 40
- Abb. 35** Intrazellulärer Insulingehalt isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen. 41
- Abb. 36** Stimulationsindex isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen nach statischer Glukoseinkubation in 2,8 und 20 mM Glukose. 42
- Abb. 37** Mitochondriale Formazanproduktion aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen. 42
- Abb. 38** ATP-Gehalt isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten, ischämischen und PFC-präservierten Organen. 43
- Abb. 39** Kumulative Funktion isolierter Schweineinseln aus frisch prozessierten (\square), ischämischen (+) und PFC-präservierten (\bullet) Pankreata, nach Transplantation unter die Nierenkapsel STZ behandelter NMRI Nacktmäuse. Die Entnahme des Transplantats erfolgte mittels Nephrektomie (Nx) an Tag 26 nach Transplantation (MW \pm SEM). 44

Danksagung

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. R. G. Bretzel danke ich für die freundliche Aufnahme in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, die Überlassung des Themas und die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten im Labor.

Bei Prof. Dr. med. M. Krawinkel bedanke ich mich herzlich für die Vertretung dieser Arbeit im Fachbereich Ökotrophologie der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Danken möchte ich auch B. Hußmann, M. Michel, S. Wagner und ganz besonders A. Alt für die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit im Labor sowie für die kontinuierliche technische Unterstützung ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank auch an PD. Dr. H. Jahr, der mir so manche hilfreiche Anregung zur Versuchsdurchführung lieferte.

Ganz besonders liegt mir am Herzen, mich bei Dr. H. Brandhorst und Dr. D. Brandhorst für die gemeinsame Arbeit, die ständige Unterstützung während der Isolierung und der Probenbearbeitung, der unermüdlichen Diskussionsbereitschaft und die allzeit neuen Lösungsvorschläge für auftauchende Probleme und Fragen zu bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Mutter und meinem Bruder Andreas bedanken.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“