UNTERSUCHUNGEN ZU DER REVASKULARISATION TRANSPLANTIERTER AVASKULÄRER ORGANE AN DEM BEISPIEL DER LANGERHANS'SCHEN INSEL

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Darius A. Schneider

aus Hermannstadt

Gießen 2006

Aus dem Zentrum für Innere Medizin,

Medizinische Klinik und Poliklinik III

Direktor: Professor Dr. Reinhard G. Bretzel

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

1. Gutachter: Professor Dr. med. Thomas Linn

2. Gutachter: PD Dr. med Jürgen Bauer

Datum der Disputation: 15. Februar 2007

Der erste Trunk

aus dem Becher der Naturwissenschaft

macht atheistisch,

doch auf dem Grund des Bechers

wartet Gott.

Werner Heisenberg (1901-1976)

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS IV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS V

TABELLENVERZEICHNIS VI

1. EINLEITUNG UND ZIELE DER ARBEIT 1

Diabetes mellitus 1

1.1 HISTORIE 1

1.2 ÄTIOLOGISCHE KLASSIFIZIERUNG DES DIABETES MELLITUS 2

1.3 EPIDEMIOLOGIE DES DIABETES MELLITUS 4
1.3.1 Prävalenz und Inzidenz des Diabetes mellitus in Deutschland 4
1.3.1.2 Epidemiologische Daten zum Diabetes mellitus Typ 1 4
1.3.1.2.1 Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 1 5
1.3.1.2.2 Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 1 5

1.4 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE DES TYP 1 DIABETES 6
1.4.1 Definition 6
1.4.2 Pathogenese 6
1.4.2.1 Genetische Disposition 6
1.4.2.2 Rolle der T-Lymphozyten 7
1.4.3 Spätkomplikationen des Diabetes mellitus 8
1.4.4 Therapiestrategien 9
1.4.4.1 Medikamentöse Therapie 10
1.4.4.1.1 Therapie mit oralen Antidiabetika (OAD) 10
1.4.4.1.2 Therapie mit Insulin 10
1.4.4.1.2.1 Formen der Insulintherapie 10
1.4.4.2 Transplantationstherapie: Pankreas- oder Inselzelltransplantation 11
1.4.4.2.1 Pankreastransplantation 11
1.4.4.2.2 Inselzelltransplantation 13
Das Edmonton-Protokoll 14
1.4.4.2.3 Grenzen und Perspektiven der humanen Inselzelltransplantation 15

1.5 DAS GEFÄßSYSTEM PANKREATISCHER INSELN 15
1.5.1 Die Morphologie des Gefäßsystems endogener Inseln 15
1.5.2 Die Blutperfusion endogener pankreatischer Inseln 17
1.5.3 Das Blutgefäßsystem transplantierter pankreatischer Inselzellen 18
1.5.4 Die Regulation der Vaskularisierung transplantierter pankreatischer Inselzellen 18
1.5.4.1 Zeitlicher Ablauf der Revaskularisierung 18
1.5.4.2 Entstehung der Blutgefäße innerhalb des Transplantates 19
1.5.4.3 Mechanismen der Angiogenese 19
1.5.4.4 Die Morphologie der Kapillaren im Transplantat 21

1.5.4.5 Die Gefäßdichte und –architektur transplantierter Inselzellen 21
1.5.4.6 Einflussfaktoren der Revaskularisierung transplantierter Inselzellen .. 22
1.5.4.7 Der angiogene Wachstumsfaktor VEGF und seine Rolle bei der Ausbildung von Gefäßen innerhalb der pankreatischen Insel 22
1.5.5 Die Funktion des Gefäßsystems transplantierter Inselzellen..... 25
1.5.5.1 Die Blutperfusion..... 25
1.5.5.2 Sauerstoffspannung und Stoffwechsel..... 25
1.5.6 Maßnahmen zur Verbesserung der Funktion des Gefäßsystems im Transplantat 25

1.6 ZIELE DER ARBEIT 27

2. MATERIAL UND METHODEN 29

2.1. VERSUCHSTIERE 29
2.1.1 C57Bl/6J Mäuse..... 29
2.1.2 RIP-VEGF-A Mäuse..... 29
2.1.2.1 Charakterisierung der RIP-VEGF-A Mäuse..... 30

2.2. VERSUCHSSERIEN 31
2.2.1 Vorversuchsgruppen 31
2.2.1.1 Gruppe VG-1 Persistenz von Spender-Endothelzellen im Insel-Transplantat 31
2.2.1.2 Gruppe VG-2: Etablierung eines Minimalen Inselmasse-Modells 32
2.2.1.3 Gruppe VG-3: Bestimmung der Serum VEGF- und Insulinspiegel nach Applikation von Glukose..... 32
2.2.2 Hauptversuchsgruppen 33

2.3. INDUKTION DES EXPERIMENTELLEN DIABETES MELLITUS TYP 1 33
2.3.1 Induktion des Diabetes mellitus..... 33
2.3.2 Festellen der diabetischen Stoffwechsellage, Blutzuckerprotokollierung 34
2.3.3 Definition des Diabetes mellitus 34

2.4. ISOLATION VON PANKREATISCHEN INSELN AUS DER MAUS..... 34
2.4.1 Narkose für die Inselzellisolation..... 35
2.4.2 In-vitro-Distension und Entnahme des Pankreas 35

2.5 KULTIVIERUNG DER INSELZELLEN 37

2.6. TRANSPLANTATION VON PANKREATISCHEN INSELN 37
2.6.1 Einschlusskriterien für diabetische Tiere..... 37
2.6.2 Narkose der Tiere während der Transplantation..... 38
2.6.3 Vorbereitung der Inseln, Bestimmung der Inselzahl..... 38
2.6.4 Vorbereitung der Tiere, Transplantation..... 38

2.7. MESSUNG DER DURCHBLUTUNG VON INSELZELL-TRANSPLANTATEN..... 40
2.7.1 Prinzip der LASER-Doppler Perfusionsmessung 40
2.7.2 Aufbau der Meßeinrichtung..... 41
2.7.3 Durchführung der Messung..... 42
2.7.3.1 Narkose der Tiere 42
2.7.3.2 Vorbereitung der Tiere für die Messung..... 42

2.7.3.3 Messung der Transplantatdurchblutung 43

2.8 HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE VERFAHREN 43
2.8.1 Fixierung und Sektionierung der Transplantate 43
2.8.2 Färbung der Schnitte 44
2.8.2.1 BS-1 Färbung und Messung der vaskulären Dichte 44
2.8.2.2 Insulinfärbung 44

2.9 PROTEINEXTRAKTION UND MESSUNG DES INSULIN- UND VEGF-GEHALTES IM ELISA-VERFAHREN 45
2.9.1 Proteinextraktion aus den transplantattragenden Nierenproben 45
2.9.1.1 Herstellung des Lysispuffers: 45
2.9.2 VEGF- und Insulin-Bestimmung im Gewebelysat mittels ELISA 46
2.9.2.1 Testprinzip 46
2.9.2.2 Test-Ablauf des quantitativen ELISAs: 46

2.10 STATISTISCHE AUSWERTUNG 47
2.10.1 Allgemeine Angaben 47
2.10.2. Varianzanalysen 48

3. ERGEBNISSE 49

3.1 VORVERSUCHSGRUPPEN 49
3.1.1 Versuchsgruppe VG-1: Persistenz von Spender-Endothelzellen im Insel-Transplantat 49
3.1.2 Gruppe VG-2: Definierung eines suboptimalen Inselzahl-Modells 50
3.1.3 Gruppe VG-3: Bestimmung der Sekretionskapazität für Insulin und VEGF 50

3.2 HAUPTVERSUCHSGRUPPEN - TRANSPLANTATIONSEXPERIMENTE MIT RIP-VEGF INSELN 52
3.2.1 Messung der Durchblutung von Transplantaten 53
3.2.2 Bestimmung des Gesamtgehaltes an VEGF (HG-1) 54
3.2.3 Messung des Gesamtgehaltes an Insulin 55
3.2.4 Histologische und immunhistochemische Analyse 56
3.2.5 Langzeit-Blutzuckerprotokollierung 58

4. DISKUSSION 59

5. LITERATURVERZEICHNIS 66

6. ZUSAMMENFASSUNG 77

7. ABSTRACT 78

8. DANKSAGUNG 79

9. ERKLÄRUNG 81

10. CURRICULUM VITAE 81

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ANOVA	Analysis of Variance
AT II	Angiotensin II
cDNA	Complementary Desoxy Ribo Nucleic Acid
CT	Conventional Therapy
CTL	Cytotoxic Lymphocyte
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DTT	Dithiotreitol
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERK	Extracellular Regulated Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLK	FMS-Like Tyrosin Kinase
FLT	Fetal Liver Kinase
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HG	Hauptversuchsgruppe
HIF-1α	Hypoxia Induced Factor 1α
HSP	Heat Shock Protein
ICT	Intensified Conventional Therapy
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITA	Islet Transplantation Alone
Ma	Macrophage
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MHC I, II	Major Histocompatibility Complex I und II
n.s.	nicht signifikant
NO	Nitric Oxide
OAD	Orale Antidiabetika
PAK	Pancreas After Kidney Transplantation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PTA	Pankreas Transplantation Alone
RIP	Rat Insulin Promoter
RPDGF	Receptor for the Platelet Derived Growth Factor
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SPK	Simultaneous Pancreas and Kidney Transplantation
TGF	Transforming Growth Factor
TH1, TH2	T-Helper Lymphocyte
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R1, -R2	VEGF Receptor 1 und 2
VG	Vorversuchsgruppe
WT	Wildtype

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Das Th1/Th2-Modell der Insulitis

Abbildung 2 Schematische Darstellung des Gefäßsystems endokriner pankreatischer Inseln

Abbildung 3 Prinzip der Laser-Doppler-Perfusionsmessung

Abbildung 4 Darstellung LacZ-markierter Spender-Endothelzellen innerhalb des Inselzelltransplantates in der diabetischen Empfängermaus

Abbildung 5 VEGF (A) und Insulinspiegel (B) vor und nach Glukosebelastung

Abbildung 6 Fotografische Darstellung eines subnephrokapsulären Inselzell-Transplantates

Abbildung 7 Graphische Darstellung der Blutzuckerverläufe in den beiden Versuchsgruppen

Abbildung 8 Gesamtgehalt an VEGF der transplantattragenden Nieren

Abbildung 9 Gesamtgehalt an Insulin der transplantattragenden Nieren

Abbildung 10 Histologische Schnitte eines Wildtyp-Transplantates bzw. eines RIP-VEGF-A-Transplantates

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Einteilung und Äthiologie des Diabetes mellitus

Tabelle 2 Relatives Risiko eines gesunden Verwandten an Diabetes mellitus Typ 1 zu erkranken

Tabelle 3 Relative Risikoerhöhung für ausgewählte Spätschäden und Begleiterkrankungen bei Diabetesbetroffenen im Vergleich zu Nicht Diabetesbetroffenen bzw. zur Normalbevölkerung

Tabelle 4 VEGF und Insulinspiegel vor und nach Glukosebelastung

Tabelle 5 Durchblutung innerhalb des Transplantates, der Nierenoberfläche und die prozentuale Differenz der Transplantatdurchblutung von der jeweiligen Nierenoberflächendurchblutung

Tabelle 6 Vaskuläre Dichte innerhalb der Transplantate am Tag 12 post transplantationem

1. EINLEITUNG UND ZIELE DER ARBEIT

Diabetes mellitus

Als herausfordernstes Gesundheitsproblem des 21. Jahrhunderts bezeichnen die International Diabetes Foundation und die WHO den dramatischen Anstieg des Diabetes mellitus weltweit. Mit dem Begriff Diabetes mellitus werden verschiedene Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels zusammengefasst, die durch erhöhte Blutzuckerwerte gekennzeichnet sind. Die beiden wichtigsten Formen sind der Diabetes mellitus Typ 1, an dem 5 bis 10 Prozent der Menschen mit Diabetes in Deutschland leiden, und der Typ-2-Diabetes, dem ca. 90 Prozent der Menschen mit Diabetes zuzuordnen sind.

1.1 HISTORIE

„Honigsüßer Durchfluss“

Diabetes war bereits in der Antike bekannt. Der Name Diabetes für die durch Harnflut und unersättlichen Durst gekennzeichnete Zuckerkrankheit wurde von dem griechisch-römischen Arzt Aretaios von Kappedonien (ca. 80-130 n.Chr.) geprägt, abgeleitet vom griechischen Wort für hindurchfließen: Diabainein, sowie mellitus aus dem Lateinischen für honigsüß. Die Bezeichnung wurde vom deutschen Internisten Johann Peter Frank (1745-1821) in die Bezeichnung der Zuckerkrankheit zur Abgrenzung von der Wasserharnruhr, Diabetes insipidus, eingeführt. Diesem gelang 1790 auch erstmals die Einführung des so genannten Hefegärungstestes zur quantitativen Harnzuckerbestimmung, ein erstes quantitatives Verfahren, das den Ärzten die bis dato übliche „Urinverkostung“ ersparen sollte.

1.2 ÄTIOLOGISCHE KLASSIFIZIERUNG DES DIABETES MELLITUS

Die von der American Diabetes Association (ADA) 1997 vorgeschlagene und von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) übernommene Einteilung des Diabetes mellitus folgt im wesentlichen pathogenetischen Gesichtspunkten (siehe Tabelle 1):

Diabetes mellitus Typ 1	**Kennzeichen:** Betazelldestruktion, die in der Regel zu absoluten Insulinmangel führt: ▪ **Autoimmun** (**Typ 1 A**), meist in jugendlichem Alter, dazu zählen auch Betroffene mit einem Erkrankungsalter über 30 Jahren, früher als LADA (Latent autoimmune diabetes mellitus of the adult) bezeichnet ▪ **Idiopathisch** (**Typ 1 B**), ohne erkennbare Ursache mit wahrscheinlich genetisch-ethnischer Komponente
Typ 2-Diabetes	**Kennzeichen:** Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel, im Langzeitverlauf evtl. ausgeprägter Insulinmangel mit oder ohne Resistenz
Andere Diabetesformen	▪ Genetische Defekte der Betazellfunktionen ▪ Genetische Defekte der Insulinwirkung ▪ Erkrankungen des exokrinen Pankreas ▪ Endokrinopathien

	▪ Iatrogener Diabetes mellitus ▪ Infektionen (intrauterine Rötelninfektioen u.a.) ▪ Seltene immunmediierte Diabetesformen (Stiff-man-Syndrom, Anti-Insulinrezeptor-Antikörper u.a.) ▪ Seltene genetische Störungen (Friedreich-Ataxie, Wolfram-Syndrom u.a.)
Gestationsdiabetes	

Tabelle 1: *Einteilung und Äthiologie des Diabetes mellitus*

1.3 EPIDEMIOLOGIE DES DIABETES MELLITUS

1.3.1 Prävalenz und Inzidenz des Diabetes mellitus in Deutschland

Weltweit ist eine lawinenartige Zunahme der Diabeteserkrankungen zu verzeichnen. Während in einigen Ländern hinreichend exakte Angaben zur Häufigkeit des Diabetes mellitus und der assoziierten Erkrankungen vorliegen, ist die Datenlage aus epidemiologischer Sicht für die meisten Länder in Europa, so auch in Deutschland, lückenhaft. In der aktuellsten Erhebung wurde die Zahl von Menschen mit bekanntem Diabetes in einer großen Versicherten-Stichprobe der AOK Hessen für den Zeitraum 1998 bis 2001 erfasst. Dabei wurden alle Abrechnungsunterlagen und Diagnosenennungen von mehr als 300 000 Versicherten vollständig ausgewertet. Rechnet man die dabei gewonnenen Ergebnisse auf die deutsche Bevölkerung hoch, dann waren im Jahr 2001 knapp 7 Prozent aller Deutschen wegen einer Zuckerkrankheit in Behandlung. Dies entspricht einer Zahl von ca. 5,7 Millionen Menschen mit bekanntem Diabetes in Deutschland. [1]. Ergänzt man die gesicherten Zahlen um die vermutete Dunkelziffer dürften bereits jetzt ca. 10 Prozent der Deutschen an einem Diabetes mellitus leiden, das entspräche einer Gesamtzahl von 8 Millionen Diabetikern in Deutschland.

Die Internationale Diabetesföderation (IDF) bestimmte für das Jahr 2003 für Deutschland eine Gesamtprävalenz (bekannt und unbekannt) des Diabetes mellitus von 10,2% innerhalb der Altersgruppe zwischen 20 und 79 Jahren, Deutschland nimmt damit im weltweiten Ranking mit 6,4 Millionen an Diabetes mellitus Erkrankter den sechsten Platz ein.

Neuesten Prognosen zufolge wird sich die Zahl der Diabetiker in Deutschland bis 2010 nahezu verdoppeln, vor allem bedingt durch den steilen Anstieg der Zahl Typ 2 Diabetiker.

1.3.1.2 Epidemiologische Daten zum Diabetes mellitus Typ 1

10% aller Diabetiker weltweit leiden an Diabetes mellitus Typ 1, dies entspricht für die USA einer Gesamtzahl von 1,4 Millionen Diabetiker, weltweit sind es 10-20 Millionen Typ-1 Diabetiker. Bei etwa 40% der an Diabetes mellitus Typ 1 Erkrankter kommt es vor dem 20-ten Lebensjahr zu der Erstmanifestation der Erkrankung, somit

ist der Diabetes mellitus Typ 1 die wohl wichtigste chronische Erkrankung des Kindesalters.

In den USA, wo ca. 30 000 Neuerkrankungen pro Jahr diagnostiziert werden, erkrankt eines von 300 Kindern und einer von 100 Erwachsenen während seines Lebens an Diabetes mellitus Typ 1 [2]. Der natürliche Verlauf der Erkrankung umfasst nach neuesten Definitionen der WHO vier Stadien: die prä-klinische ß-Zell Autoimmunität mit progredienter Insulin-Sekretionsinsuffizienz, die klinische Erstmanifestation des Diabetes (in 20-40% der unter 20-Jährigen als diabetische Ketoazidose [3], das Stadium der vorübergehenden Remission und ausgeprägter Diabetes assoziiert mit akuten und chronischen Komplikationen. Für jedes dieser Stadien ergeben sich unterschiedliche epidemiologische Daten.

Charakteristisch für die weltweite Inzidenz und Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 1 ist die ausgesprochene geographische Variabilität: die höchsten Inzidenzen und Prävalenzen findet man in Skandinavien und auf Sardinien, die niedrigsten in Albanien, Rumänien und in orientalischen Populationen [4].

1.3.1.2.1 Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 1

Angaben zur Prävalenz des Typ 1 Diabetes über alle Altersgruppen hinweg gibt es für Deutschland nicht. Ausgehend von Prävalenzschätzungen sind hochgerechnet für Deutschland derzeit 11000 bis 12000 Kinder unter 15 Jahren bzw. 22 000 bis 24 000 Kinder und Jugendliche unter 20 Jahren an einem Typ 1 Diabetes erkrankt [1], im Alter unter 40 Jahren ist von mindestens 100 000 Personen mit einem Typ 1 Diabetes auszugehen.

1.3.1.2.2 Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 1

Auch für die Inzidenz des Typ 1 Diabetes über alle Altersgruppen hinweg gibt es für Deutschland keine vollständigen Daten. Aktuelle Inzidenzdaten für Deutschland sprechen jedoch in der Altersgruppe unter 15 bzw. 20 Jahren von bis 2000 bzw. 3000 jährlichen Neuerkrankungen an einem Typ 1 Diabetes. Die Mehrzahl der Typ 1 Diabetespatienten erkrankt jedoch nach dem 20. Lebensjahr. Die Schätzung der kumulativen Inzidenzen ergibt, dass etwa 1 von 500 bzw. 300 Neugeborenen bis zum Alter von 15 bzw. 20 Jahren an einem Typ 1 Diabetes erkrankt.

Nach den Diabetesregistern im Rheinland, in Baden-Württemberg und in Sachsen steigt die Inzidenzrate seit den 90-er Jahren jährlich um ca. 3 bis 4 Prozent. Auch weltweit hat die Inzidenz des Typ 1 Diabetes kontinuierlich zugenommen [5].

1.4 Ätiologie und Pathogenese des Typ 1 Diabetes

1.4.1 Definition

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist durch eine selektive und nach dem heutigen Kenntnisstand irreversible Destruktion der Insulin produzierenden Betazellen des Pankreas charakterisiert.

1.4.2 Pathogenese

Betazellspezifische autoaggressive T-Lymphozyten führen auf der einen Seite zu einer **selektiven Rarefizierung der Betazellen**, wobei sich keine Destruktion der Somatostatin- bzw. Glucagon-produzierenden Zellen zeigt, und auf der anderen Seite zu einer **Rundzellinfiltration der Langerhans-Inseln**, der so genannten Insulitis [6].

Die zugrunde liegende Ursache des Diabetes mellitus Typ 1 ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. In der Diskussion sind unter anderem eine pathologische Reaktion auf Infektionen mit pankreotropen Viren sowie allergische Reaktionen auf Bestandteile aus Nahrungsmitteln oder toxische Substanzen. Eine entscheidende Rolle im Rahmen der Genese dieser Prozesse spielen dabei die genetische Disposition sowie eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen.

1.4.2.1 Genetische Disposition

Bei mehr als 90 Prozent der kaukasischen Typ 1-Diabetiker zeigen sich die HLA Merkmale DR3 und/oder DR4. Der Diabetes mellitus Typ 1 tritt in etwa 90% der Fälle spontan auf. In 5-10% sind jedoch erstgradig Verwandte mit Diabetes bekannt, wobei sich eine Abhängigkeit des Risikos von der HLA-(Teil)-Identität mit der oder dem Betroffen zeigte. Das Risiko (Angaben in %) eines zunächst gesunden Verwandten

an Diabetes zu erkranken, ist abhängig vom Verwandtschaftsgrad (siehe Tabelle 3, nach [7], [8].

Kinder diabetischer Mütter oder Väter	2-7%
Kinder, wenn Mutter und Vater diabetisch	ca. 30%
Geschwister eines diabetischen Kindes (a), wenn HLA-DR3/Dr4 identisch (b)	(a) 5-7% (b) >20%
Eineiige Zwillinge, von denen zunächst einer betroffen ist	30-50%

Tabelle 2: *Risiko eines gesunden Verwandten an Diabetes Mellitus Typ1 zu erkranken*

1.4.2.2 Rolle der T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten nehmen bei der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 eine tragende Rolle ein. Bei Manifestation liegen im Blut vermehrt autoreaktive T-Lymphozyten vor, die spezifisch gegen Betazellantigene gerichtet sind. Es wurden hierbei autoreaktive T-Zellen gegen Glutamatdecarboxylase, Insulin, Tyrosinkinase 1A-2, sowie gegen weitere Antigene im peripheren Blut nachgewiesen [9], [10]. Die Bedeutung, die diesen autoreaktiven T-Zellen im Rahmen der Beta-Zelldestruktion zukommt, ist jedoch bei weitem noch nicht hinreichend geklärt.

Alle bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass der Diabetes mellitus Typ 1 durch eine zytotoxische T-Helfer-1 (Th1)-dominierte Immunreaktion hervorgerufen wird. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass lange vor der Diabetes-Manifestation eine Th2-gewichtete, sogenannte benigne Insulitis mit inselspezifischen Autoantikörpern vorliegt, wobei es durch einen bisher unbekannten Trigger zur Entstehung einer Th1-Reaktion kommt, die eine Destruktion der Betazellen bewirkt und die Auslösung des Diabetes bewirkt (siehe Abbildung 1).

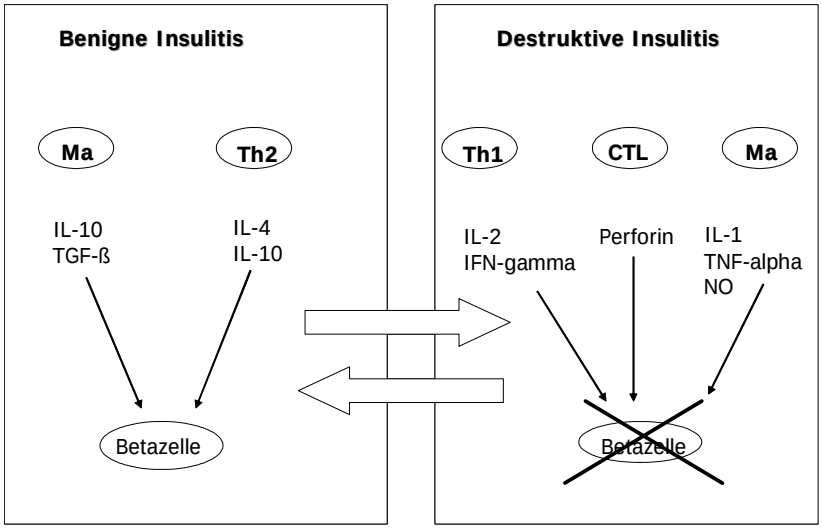

Abbildung 1: *Das Th1/Th2-Modell der Insulitis, Ma=Macrophagen, CTL=zytotoxische Lymphozyten, NO= Stickstoffmonoxid, IL=Interleukin, TGF=Tissue growth factor, IFN=Interferon*

1.4.3 Spätkomplikationen des Diabetes mellitus

Ausgehend von deren Morphologie wird bei der Beschreibung von diabetischen Folgeschäden von *makroangiopathischen* und *mikroaangiopatischen* Folgeschäden gesprochen. Erstere manifestieren sich auch bei Diabetikern überwiegend als koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit und zerebrovaskuläre Insuffizienz, letztere als diabetische Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie. Diabetes mellitus führt sowohl zu einem erhöhten Risiko als auch zu einem beschleunigten und schwereren Verlauf dieser Erkrankungen. Tabelle 2 zeigt das relative Risiko der Erkrankung an den genannten Krankheiten für Diabetiker im Vergleich zu Nicht-Diabetikern bzw. zur Normalbevölkerung. Es ist darin ersichtlich, dass das Risiko für Diabetiker wesentlich höher liegt als für Nicht-Diabetiker.

Komplikation	**Risikoerhöhung (RR)**
Herzinfarkt	Männer: 3,7 3,5–3,9
	Frauen: 5,9 5,5–6,4
Tod durch Herz-Kreislauf-Krankheit	Diagnose vor dem 30. Lebensjahr: 9,1

	Diagnose nach dem 30. Lebensjahr: 2,3
Apoplex	2 bis 4
Erblindung 3,8–7,1	5,2
Terminale Niereninsuffizienz	bei Männern 12,7
Amputation unterer Extremitäten	22,2

Tabelle 3 *Relatives Risiko (RR, Risikoerhöhung) für ausgewählte Spätschäden und Begleiterkrankungen bei Diabetesbetroffenen im Vergleich zu Nicht Diabetesbetroffenen bzw. zur Normalbevölkerung. Quelle: DDG (2004), Leitlinie Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland*

1.4.4 Therapiestrategien

Die Bestrebungen der Therapie bei Diabetes mellitus dienen der bestmöglichen Einstellung des Blutzucker-Stoffwechsels und dadurch der weitgehenden Vermeidung von diabetischen Komplikationen und Spätschäden. Großangelegte, internationale klinische Studien haben hierzu gezeigt, dass eine gute glykämische Einstellung zu einem deutlichen Rückgang der Inzidenz und Prävalenz diabetischer Folgekrankheiten führt. Der Diabetes Control and Complications Trial [11] zeigte für Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1, dass sich durch eine intensivierte Insulintherapie die HbA1c-Werte verbessern und sich die Spätfolgen wie diabetische Nephropathie, Neuropathie und Retinopathie verhindern lassen. Gleichsam zeigte die United Kingdom Prospective Diabetes Study [12], dass eine enge Blutzuckereinstellung bei Patienten mit Typ-2-Diabetes mikrovaskuläre Komplikationen wie Retinopathie und Nephropathie minimieren kann [12].

1.4.4.1 Medikamentöse Therapie

1.4.4.1.1 Therapie mit oralen Antidiabetika (OAD)

Ungefähr 40% der an Diabetes erkrankten Patienten können mittels oraler antidiabetischer Medikamente therapiert werden, wichtige Vertreter sind Biguanide, Sulfonylharnstoffe und Glitazone.

1.4.4.1.2 Therapie mit Insulin

Insulin wurde 1921 durch Frederic Banting und Charles Best in Canada isoliert [13] und revolutionierte die Therapie des Diabetes und die Möglichkeiten der Prävention diabetischer Folgeschäden. Nach den Daten der AOK Hessen werden derzeit ca. 1,35 Millionen Menschen mit Diabetes in Deutschland mit Insulin behandelt [14].

Für Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 ist die Substitutionstherapie mit Insulin oder Insulinanaloga in den allermeisten Fällen lebensnotwendig und die einzig mögliche Therapie. Für Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist zwar die exogene Zufuhr von Insulin meistens nicht lebensnotwendig, jedoch bei mindestens einem Drittel der Typ 2 Diabetiker wird Insulin benötigt, um den Blutzucker einzustellen.

1.4.4.1.2.1 Formen der Insulintherapie

Bei der Therapie mit Insulin werden mehrere Therapieformen unterschieden:

- die additive Substitution von langwirksamem, so genannten Basalinsulin bei oral unzureichend eingestellten Typ 2 Diabetikern.
- die vollständige Insulinsubstitution, hier werden unterschieden die Insulinapplikation nach einem festen Zeitschema (konventionelle Therapie, CT) und nach einem flexiblen Schema in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme (intensivierte CT, ICT).
- die Insulinpumpentherapie, hierbei übernimmt eine Pumpe die konstante Applikation einer basalen Insulindosis, das prandiale Insulin muss individuell appliziert werden.

Hauptziel der Insulintherapie beim Typ-1 Diabetiker aber auch beim Typ-2 Diabetiker, ist die Wiederherstellung einer die physiologische Situation am besten nachahmende

Stoffwechseleinstellung. Der Preis für eine bessere Blutzuckerkontrolle besteht jedoch in der deutlichen Zunahme schwerer Hypoglykämien [11], eine Zunahme, die mitunter zu einem limitierenden Faktor einer optimalen Therapie werden kann.

1.4.4.2 Transplantationstherapie: Pankreas- oder Inselzelltransplantation

Trotz neuer Insuline zur Blutzuckerkontrolle ist eine Normalisierung des Blutzuckerstoffwechsels nur bei wenigen Patienten mit Diabetes mellitus zu erreichen, in den meisten Fällen geht diese gute Einstellung mit einem stark erhöhten Risiko schwerer Hypoglykämien einher. Mikro- und makrovaskuläre Folgekomplikationen stellen somit weiterhin große Langzeitrisiken für Diabetespatienten dar. Etwa 5–35% aller Patienten auf der Warteliste zu einer Nierentransplantation sind heutzutage Diabetiker. Ein effizienter Ersatz der Beta-Zellfunktion des Pankreas wäre deshalb wünschenswert.

Bereits seit Jahren wird an der Entwicklung eines künstlichen Pankreas gearbeitet, in welchem eine Langzeitblutzuckermessung eine Insulinpumpe steuert. Es gibt hierzu bereits implantierbare, intravaskuläre Blutzuckermessgeräte und subkutan implantierbare Insulinpumpen. Die therapeutische Insulinapplikation erfolgt jedoch in der Regel weiterhin nach dem Basis-Bolus-Prinzip, da die Algorithmen zur Verwendung im direkt gekoppelten Kreislauf („closed loop“) noch keine ausreichende Blutzuckerkontrolle insbesondere bei schnell wechselnden Blutzuckerspiegeln erlauben.

Eine sehr elegante und dem physiologischen Regelkreis am ehesten entsprechende Lösung ist die Transplantation von Pankreasorganen oder von pankreatischen Inseln bei Menschen mit insulinabhängigem Diabetes mellitus.

1.4.4.2.1 Pankreastransplantation

Knapp 30 Jahre vor der Entdeckung des Insulins wurden bereits die ersten Versuche zur Pankreastransplantation durchgeführt. Minkowsky berichtete 1892, dass die subkutane Transplantation von autologem Pankreasgewebe die tödlichen Folgen einer Pankreasentfernung verhindern konnte [15]. Ein Jahr später transplantierten Watson u. Williams Stücke eines frisch geschlachteten Schafspankreas unter die

Haut eines 15-jährigen Jungen mit diabetischer Ketoazidose. Trotz einer temporären Verbesserung des klinischen Zustands starb der Junge 3 Tage später, da das xenogene Material ohne Immunsuppression versagte [16]. 1966 führten Kelly und Lillehei an der University of Minnesota die erste vaskularisierte Pankreasallotransplantation durch [17]. Auch wenn die initialen Versuche nur kurze Überlebenszeiten zur Folge hatten, führten verbesserte Operationstechniken und Fortschritte der immun-suppressiven Therapie zu einer deutlichen Reduktion der postoperativen Morbidität und Mortalität.

Bis Juni 2003 wurden über 19 600 Pankreastransplantationen (USA 14.300, Rest 5300) an das International Pancreas Transplant Registry (IPTR, http://www.iptr.umn.edu) gemeldet. Davon bekamen 78% der Patienten eine gleichzeitige Pankreas- und Nierentransplantation (simultaneous pancreas and kidney transplantation, SPK), 4% eine Pankreas- nach Nierentransplantation (pankreas after kidney, PAK) und 6% eine ausschließliche Pankreastransplantation (pancreas transplantation alone, PTA). Das 1 Jahres-Patientenüberleben (Transplantationszeitraum 1999–5/2003) lag bei 98,4% für PTA und 95% für SPK- und PAK-Patienten). Die höhere Mortalität in der letzteren Gruppe ist auf eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität zurückzuführen. Dies liegt sicher an den fortgeschrittenen diabetischen Sekundärkomplikationen. Die 1-Jahres-Überlebensrate des transplantierten Pankreas lag bei 84% für Patienten mit SPK und bei 78% für Patienten mit PAK, PTA (Transplantationszeitraum 1999–5/2003 [18]. Dies verdeutlicht die besseren Ergebnisse der Transplantatfunktion und die geringere Abstoßungsrate bei gleichzeitiger Nieren- und Pankreastransplantation. In einzelnen großen Zentren werden 1-Jahres-Transplantatüberlebensraten bei SPK von bis zu 93% berichtet [19].

Im Jahr 2003 wurden in Deutschland 191 Pankreastransplantationen an 24 Kliniken durchgeführt, davon 170 in Kombination mit einer Niere [20]. Untersucht man den Zeitraum nach Einführung der neuen Immunsuppressiva, liegen deutsche Zentren hinsichtlich Patienten und Transplantatüberleben auf internationalem Niveau [21].

1.4.4.2.2 Inselzelltransplantation

Bei der Inselzelltransplantation werden Inseln aus kadaverischen Pankreata enzymatisch isoliert und perkutan unter radiologischer Kontrolle in die Pfortader des Empfängers injiziert.

Jede der ca. 10^6 Inseln im menschlichen Pankreas ist ein 80–300 µm großes Gewebe aus mehreren Hundert endokrin aktiven α- (Glukagon), β- (Insulin), δ- (Soma-tostatin) und γ-Zellen (pankreatisches Polypeptid). Bereits 1967 gelang es Lacey et al., durch Organdistension, Kollagenaseverdau und Zentrifugation in Sucrosegradienten Langerhanssche Inseln von exokrinem Gewebe zu trennen [22].

Eine ähnliche Methode wird heutzutage auch zur Aufreinigung von Inseln aus menschlichem Gewebe verwendet. Nach kontrollierter Perfusion mittels neuartiger, endotoxinfreier Kollagenaselösung definierter Aktivität, folgt eine weitere mechanische Dissoziation. Das verdaute, zerkleinerte Gewebe wird mittels Dichtezentrifugation in einem Cobe-Blutzellapheresesystem in exokrines Gewebe und Inseln getrennt und anschließend nach perkutaner Punktion der Pfortader intraportal appliziert [23].

Obwohl die Transplantation isolierter Inseln nach perkutaner Pfortaderpunktion gegenüber der Pankreastransplantation deutlich weniger invasiv ist, war die Umsetzung dieses Therapiekonzepts in den klinischen Alltag deutlich schwieriger als die Ganzorgantransplantation. 1973 gelang es erstmals einen chemisch induzierten Diabetes in Nagetiermodellen durch Transplantation isolierter Inseln dauerhaft zu heilen [24]. Die erste klinische Transplantation eines Inselallografts bei einem Patienten nach Nierentransplantation wurde 1974 durchgeführt [25]. Keiner der Patienten wurde jedoch insulinunabhängig. Von dem ersten Patienten, welcher nach allogener Inseltransplantation nach einem Jahr noch insulinunabhängig war, wurde 1979 aus der Schweiz berichtet [26].

Generell war der Erfolg der Inselzelltransplantation jedoch zunächst gering. Von 1974 bis 2000 wurden 450 Versuche an das International Islet Transplant Registry in Gießen gemeldet [27]. Die Insulinunabhängigkeit nach einem Jahr war dabei kleiner als 10%. Demgegenüber betrug die Insulinunabhängigkeit bei Patienten, welche nach Pankreasresektion ein autologes zumeist nicht weiter aufgereinigtes Pankreashomogenat erhielten, nach einem Jahr 70% [27]. Die Misserfolge wurden durch eine zu niedrige Inselzellmasse, eine schlechte Inselqualität, unzureichende

Immunprotektion und die Verwendung toxischer und diabetogener Immunsuppressiva erklärt.

Das Edmonton-Protokoll

Erst durch die Ergebnisse der in Edmonton durchgeführten Studie zur Inselzelltransplantation wurde dieses Verfahren wieder interessant. 7 von 7 Patienten waren nach einem Jahr insulinunabhängig [28] und eine Folgestudie des gleichen Zentrums zeigte eine 1-Jahres-Insulinunabhängigkeit von 80% (n=50; [29]). Alle Patienten waren Diabetes mellitus Typ 1 - Patienten mit intakter Nierenfunktion. Die Mehrzahl hatte eine Hypoglykämiewahrnehmungsstörung. Der Erfolg beruhte jedoch im Wesentlichen auf den folgenden Kriterien:

1. Es wurde eine große Anzahl an Inseln gegeben (>9000 Inseln/kg Empfänger-gewicht). Um diese Zahl zu erreichen mussten bis zu 3 Spenderorgane auf einen Empfänger übertragen werden.
2. Es wurde eine steroid- und Cyclosporin-A-freie Immunsuppression mit niedrigen Tacrolimusspiegeln in Kombination mit Rapamycin nach Induktionstherapie mit einem monoklonalen anti-IL-2-Rezeptor-Antikörper verwendet. Diese Therapie sollte eine möglichst geringe Toxizität gegenüber Beta-Zellen aufweisen.
3. Die Empfänger waren schlanke Typ-1-Diabetiker mit niedrigem Insulinbedarf vor der Transplantation.

Da es sich bei der Transplantation sowohl des Pankreas als auch von pankreatischen Inseln in der Regel um Gewebe von allogenen Spendern handelt, bedeutet die Transplantation, dass eine lebenslange Insulintherapie durch eine lebenslange Immunsuppression eingetauscht wird, weshalb die Indikation zur Transplantation derzeit sehr eng ist.

Im Wesentlichen werden deshalb heute Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1 mit einer Wahrnehmungsstörung für Hypoglykämien (97%) oder Patienten, welche mit einer intensivierten Insulintherapie keine ausreichende Stoffwechselkontrolle mehr erreichen (3%) mit einer alleinigen Inselzell- oder Pankreastransplantation (PTA, ITA) versorgt. Derzeit ist noch fraglich, ob Patienten mit fortschreitenden diabetischen Folgekomplikationen (z. B. Proteinurie) trotz maximaler, intensivierter

Therapie des Glukosestoffwechsels ebenfalls Kandidaten für eine β-Zellersatztherapie durch Transplantation darstellen.

Bei diabetischen Patienten, welche aufgrund einer Nephropathie eine Nierentransplantation erhalten sollen, besteht hingegen bereits die Notwendigkeit zu einer langandauernden Immunsuppression, so dass hier eine Pankreas- oder Inselzelltransplantation leichter zu rechtfertigen ist.

1.4.4.2.3 Grenzen und Perspektiven der humanen Inselzelltransplantation

Obwohl normalerweise 20% der Inselmasse für eine effiziente Glukoseregulation ausreicht, zeigt sich nach Transplantation von Inseln von bis zu 3 Spendern noch eine pathologische Glukosetoleranz nach Belastung. Dieser hohe Bedarf an Inseln beschränkt die Prozedur bisher auf schlanke Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1. Ein wichtiger Ansatzpunkt also, um dieses Verfahren in Zukunft einer breiteren Patientenzahl zugänglich zu machen, ist zum einen die Verbesserung der Isolationsausbeute, zum anderen die Einschränkung der Inselzellverluste im Rahmen der Isolation und Transplantation [30].

Es ist zur Zeit davon auszugehen, dass neben den Verlusten bei der Isolation, die im Einzelnen schwer quantifizierbar sind, eine große Anzahl an Inseln (~70%) bereits in den ersten Stunden bis Tagen nach Transplantation zugrunde geht. Hierfür sind immunologische und nicht-immunologische Faktoren ursächlich [31], [32], [33], [34], [35], [36], [37], im Rahmen der nicht-immunologischen gilt als wichtigster Faktor die mangelhafte posttransplantationale Revaskularisierung transplantierter pankreatischer Inseln [38].

1.5 Das Gefäßsystem pankreatischer Inseln

1.5.1 Die Morphologie des Gefäßsystems endogener Inseln

Die Morphologie pankreatischer Inseln ist sehr komplex mit vier verschiedenen endokrinen Zelltypen, die um ein sinusoidales Netzwerk fenestrierter Kapillaren organisiert sind [39]. Untersuchungen mittels Elektronenmikroskop konnten zeigen, dass die Größe pankreatischer Inseln ihre Blutversorgung beeinflusst:

Kleine Inseln (<100 µM) sind zusammen mit exokrinen Zellen in ein Kapillar-Netzwerk eingeschlossen. Im Gegensatz dazu werden große Inseln von 1-3 Arteriolen, die von intralobulären Arterien abzweigen, versorgt [40]. Große Inseln münden in Venolen, die in Form eines Netzwerkes die Oberfläche der Inseln bedecken [39]. Neben der Venen bilden effluente Gefäße ein insulär-acinäres portales System, bestehend aus kleinen Gefäßen, die die Insel-Kapillaren mit den Kapillaren im exokrinen Parenchym verbinden [41]. Dieses portale System versorgt exokrine Acini mit hohen Konzentrationen an Insulin, was diesem Gewebe als trophischer Wachstumsstimulus dient [42], [43]. In Abbildung 2 ist eine schematische Darstellung des Gefäßsystems endogener pankreatischer Inseln gezeigt.

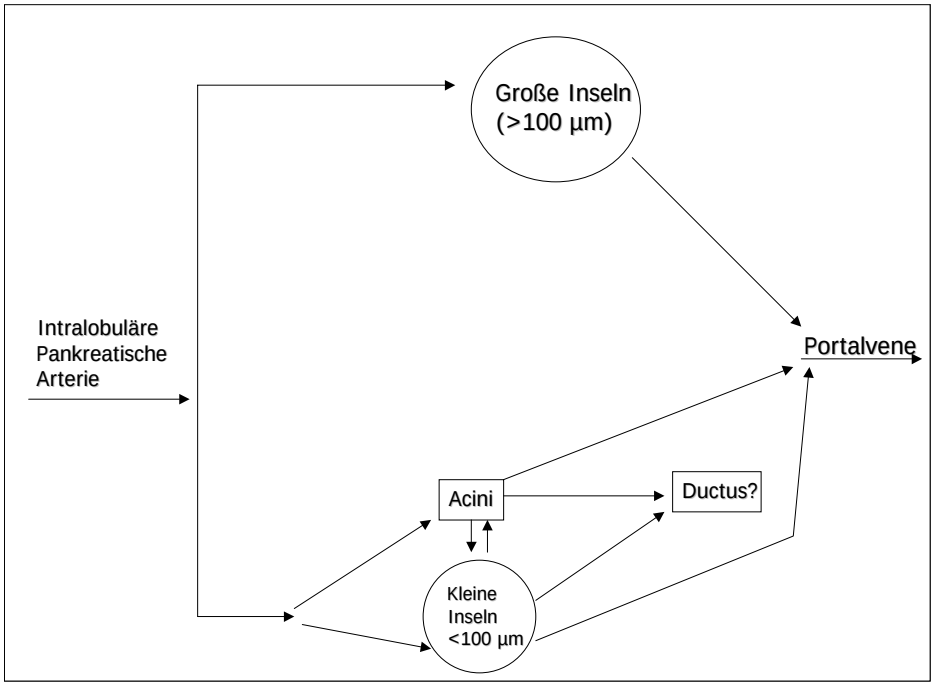

Abbildung 2: *Schematische Darstellung des Gefäßsystems endokriner pankreatischer Inseln (modifiziert nach [44]).*

Arterielle Blutgefäße, die die Inseln erreichen, treffen auf ein dichtes Netzwerk sinusoidaler Kapillaren, die morphologische Ähnlichkeit mit renalen Glomeruli aufweisen. Diese Kapillaren dienen nicht nur der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der endokrinen Zellen, sondern sorgen zusätzlich für Signalübermittlung aus anderen Körperzellen mittels endothelialer Rezeptoren [45] sowie zur Abgabe sezernierter Hormone. Es ist davon auszugehen, dass der

arterielle Blutfluss zunächst zu den Betazellen, dann zu Alpha- und Deltazellen gelangt [46].

Im Rahmen der Isolation pankreatischer Inseln kommt es zu einer Abtrennung des Gefäßsystems [47]. Der Wiederherstellung der vaskulären Architektur und Funktion kommt bei der Erreichung einer intakten Transplantat-Funktion eine entscheidende Rolle zu.

1.5.2 Die Blutperfusion endogener pankreatischer Inseln

Neue Studien ermöglichten anhand der „Microsphären-Technik“ quantitative Bestimmungen der endogenen pankreatischen Blutperfusion, dabei ergab sich für alle pankreatischen Inseln eine Perfusion von 5-15% des gesamten Pankreas, wobei pankreatische Inseln weniger als 1% des pankreatischen Volumens umfassen [48], [49], [50], [51]. Früheren Studienergebnissen zufolge wurde angenommen, dass die Perfusion der pankreatischen Inselzellen einer autonomen Regulation gemäß der Bedürfnisse der endokrinen Zellen folgt [52]. Um eine angemessene Perfusion im Rahmen einer Steigerung der Insulinsekretion zu gewährleisten, erfolgt die Regulation der Inselzell-Perfusion anhand von nervösen, endokrinen und metabolischen Signalen, wobei den cholinergen Signalen eine Schlüsselrolle in der Regulation zuzukommen scheint [53].

Da die Inselzell-Isolation eine Denervierung der Zellen mit sich bringt [54], [55], [56], hat dies auch Veränderungen in der Regulation des Blutflusses zufolge. Die etwa 10 Minuten nach Glukosestimulation in nativen Inselzellen beobachtete, wahrscheinlich Adenosin-vermittelte Steigerung der Blutflussrate in den Inselkapillaren fehlt in transplantierten und folglich denervierten Pankreata [57]. Eine Regulation der Inselzell-Perfusion erfolgt zudem über gastrointestinale Hormone, in der Hauptsache Incretine, sowie über endotheliale Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Angiotensin, Endotheline und Natriuretisches Peptid [52]. Eine intakte NO-Produktion scheint dabei für die Regulation der Inselzell-Perfusion von besonderer Bedeutung zu sein [58], [59], [60], zudem reagiert das insuläre Gefäßsystem empfindlicher gegenüber vasokonstriktorische Stimuli wie Endotheline und Angiotensin II als exokrine Blutgefäße [57], [61].

1.5.3 Das Blutgefäßsystem transplantierter pankreatischer Inselzellen

Für die Funktionserhaltung transplantierter Inselzellen ist die Integration der transplantierten Zellen in das Implantationsorgan von entscheidender Wichtigkeit. Dabei handelt es sich jedoch um einen komplexen Prozess, der neben der Revaskularisierung und Reinnervation auch das Einwachsen in das umliegende Gewebe sowie die Reorganisation der endokrinen Zellen umfasst [62], [48], [63]. Im Rahmen dieser Entwicklung muss jedoch die angeborene Fähigkeit bestimmter Implantationsorgane zur Stimulation der Gefäßneubildung, venösen Drainage bzw. der Reinnervation berücksichtigt werden. Das Verständnis hinsichtlich des Ablaufs dieser ineinander greifenden Prozesse ist bei weitem noch nicht vollständig.

Von Bedeutung für die Adaptation in das Implantationsorgan ist zusätzlich die Tatsache, dass in der Regel eine Transplantation einzelner Inseln bzw. Inselaggregate erfolgt, jedoch ohne oder nur mit geringen Mengen an assoziiertem exokrinem Gewebe. Der Einfluss der exokrinen Kontamination auf das Transplantationsergebnis ist noch nicht eindeutig charakterisiert und ist Objekt kontroverser Diskussionen. Einerseits ist durchaus denkbar, dass durch Vermeidung exokriner Kontamination die Zahl transplantierter, immunologisch aktiver Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) vermindert wird, was dem Transplantationsergebnis förderlich wäre. Andererseits enthält das exokrine Gewebe auch dem Transplantatanwachsen nützliche Zellgruppen, so z.B. Endothelzellen. So zeigen einige Studien eine Verschlechterung des Transplantationsergebnisses durch exokrine Kontamination [64], in anderen hingegen konnte eine angiogenetische Überlegenheit frisch transplantierter Inseln gezeigt werden [65].

1.5.4 Die Regulation der Vaskularisierung transplantierter pankreatischer Inselzellen

Die folgenden Ausführungen beziehen sich, wenn nicht gesondert angeführt, auf die Transplantation eines murinen Inselzellaggregates unter die Nierenkapsel an der Maus.

1.5.4.1 Zeitlicher Ablauf der Revaskularisierung

Im Gegensatz zur Transplantation vollständiger Organe, im Rahmen derer eine unmittelbare Gefäßanastomose die Erhaltung der Perfusion des transplantierten

Organs sicherstellt, erfolgt bei der Transplantation pankreatischer Inselzellen keine direkte Verbindung zum Gefäßsystem des Empfängers. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass 3-5 Tage nach der Transplantation innerhalb des Transplantates neue Blutgefäße erkennbar sind und es in der Folge innerhalb von 7-14 Tagen zu einer Wiederherstellung der Blutversorgung kommt [66], [67], [68], [69], [70], [71], [72]. Die Transplantationsart (Transplantation einzelner Inselzellen versus der Transplantation von Inselzellaggregaten) sowie das Implantationsorgan scheinen geringen Einfluss auf die Zeitspanne der Wiederherstellung des Blutflusses zu haben [73] nicht jedoch auf die Revaskularisationsqualität hinsichtlich Blutfluss und Sauerstoffspannung.

1.5.4.2 Entstehung der Blutgefäße innerhalb des Transplantates

Anhand von in vitro Untersuchungen wurde zunächst angenommen, dass es im Rahmen der Kultivierung isolierter pankreatischer Inselzellen zu einem Verschwinden sowohl von endothelialen Zellen, als auch von Makrophagen und dendritischen Zellen und Nervenzellen kommt [74]. Neue Untersuchungsergebnisse weisen jedoch eher auf eine Dedifferenzierung endothelialer Zellen als auf deren Verschwinden hin [75], möglicherweise kommt es nach erfolgter Implantation zu einer Wiedererlangung des ursprünglichen Phänotyps und dadurch zu einer Beteiligung an der Formation neuer Blutgefäße. Es ist jedoch auch davon auszugehen, dass ein Großteil der neu gebildeten Gefäße ihren Ursprung vom Empfänger nimmt [76], was die Bedeutung der Wahl des Implantationsorgans in den Vordergrund stellt. Studienergebnisse konnten in der Tat zeigen, dass das Ausmaß der Revaskularisation in Abhängigkeit von dem Implantationsorgan deutliche Unterschiede aufweist, im Vergleich zum nativen Pankreas jedoch an allen untersuchten Implantationsorten (Leber, Niere, Milz) wesentlich niedriger ist. Die beste Revaskularisierungsrate, gemessen an der Inselperfusion, zeigten Inseln, welche unterhalb der Nierenkapsel transplantiert wurden, die geringste Durchblutung zeigten Inseln, welche in die Milz transplantiert wurden [77].

1.5.4.3 Mechanismen der Angiogenese

Angiogenese ist die Bildung neuer Gefäße ausgehend von einem bestehenden Mikrogefäßsystem.

Die Angiogenese ist ein äußerst komplexer Prozess, der regelhaft abläuft und mehrere unterschiedliche Schritte impliziert. In einem eng regulierten zeitlichen Rahmen erfolgt durch die Sekretion von angiogenen Faktoren die Teilung von Endothelzellen und deren Migration in Richtung des chemotaktischen Signals, welches von den proangiogenen Faktoren ausgeht.
Dieser Schritt ist gefolgt von der Degradation und Neubildung von Basalmembranen, der Organisation zu tubulären Strukturen, der Anlockung von Pericyten und Myozyten und schließlich der Festigung des neuen Gefäßes durch interzelluläre und Zell-Matrix-Bindungen [78], [79].
Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), dessen Aufgabe in der Förderung der Angiogenese liegt, wird an verschiedenen Stellen in fötalen Geweben [80], aber auch in Inselzellen erwachsener Spender gebildet [81]. VEGF ist an den verschiedenen Stufen der Angiogenese, also der Aussprossung kapillärer Gefäße aus bestehenden Gefäßen, beteiligt. Der initiale Effekt von VEGF ist die vaskuläre Steigerung der Permeabilität des Ausgangsgefäßes (Tag 1-3), wodurch eine Extravasation von Fibrin und Gerinnungsfaktoren erfolgt. Parallel hierzu entstehen durch Degradation der Basalmembran des Ausgangsgefäßes und Ablösung von Pericyten weite, pericytenlose Sinusoide, deren endotheliale Auskleidung durch Ausdehnung und Ausschmälerung der Endothelzellen des Ausgangsgefäßes gewährleistet wird. In den folgenden 3-7 Tagen kommt es unter Einfluß von VEGF zu einer verstärkten Zellteilung und Proliferation der Endothelzellen. Dadurch entstehen intraluminale endotheliale Brücken innerhalb der oben beschriebenen Gefäßvorläufer, welche den Blutfluss in mehrere perfundierte Kanälchen unterteilt. Innerhalb weniger Tage trennen sich diese Kanälchen voneinander und es entstehen neue Kapillaren. [82], [83], [84]

Die beschriebenen Stufen der Angiogenese konnten auch im Rahmen der Revaskularisation transplantierter fötaler Insel-Zell-Clustern (ICC) [85], [80] und nach Implantation adulter Inselzellen beobachtet werden [66]. Als weiterer Mechanismus wurde bei der Transplantation von fötalen ICC das Einwachsen von Gewebsbrücken in bestehende Kapillare beschrieben, welche nach einigen Tagen ein Lumen aufwiesen und perfundiert wurden. Es ist jedoch bis jetzt nicht bekannt, ob dieser Vorgang auch im Rahmen der Revaskularisierung adulter Inselzellen erfolgt [85].

1.5.4.4 Die Morphologie der Kapillaren im Transplantat

Die Blutgefäße, die innerhalb der transplantierten pankreatischen Inselzellen gebildet werden, weisen morphologische Ähnlichkeiten mit denen endogener Inselzellen auf. Sie bestehen aus weiten Kapillaren und besitzen ein fenestriertes Endothel [86], [87].

Es ist noch nicht hinreichend geklärt, inwieweit die Funktion endothelialer Zellen innerhalb des Transplantates mit der endogener Inselzellen übereinstimmt. Frühere Untersuchungen zeigten das Vorhandensein des Angiotensin-Converting-Enzymes sowie der endothelialen NO-Synthase sowohl in endogenen als auch in transplantierten Inselzellen [88], [89]. Auch in diesem Zusammenhang bleibt die Bedeutung der Wahl des Implantationsorgans hinsichtlich der Beeinflussung des Phänotypes Transplantat-Endothels noch offen.

Eine wichtige Rolle spielen Integrine bei der Interaktion zwischen Inseln und Matrixproteinen [90], [91], hier besonders die Interaktionen zwischen dem insulären α6β1-Integrin und Matrixproteinen wie Laminin oder Fibronectin sowie dem Rezeptor für den thrombozytären Wachstumsfaktor R-PDGF, Interaktionen, welche die Insulinsekretion als Antwort auf Insulinsekretagoga modulieren [90]. In vitro Studien haben hierzu gezeigt, dass es im Rahmen der Isolation und des Collagenase-Gewebeverdaus zu einer Herunterregulation mehrerer Beta-Integrine kommt [92].

1.5.4.5 Die Gefäßdichte und –architektur transplantierter Inselzellen

Endogene Inselzellen weisen ein dichtes Gefäßsystem auf, wobei gezeigt wurde, dass dabei im Besonderen der endokrine Teil des Pankreas eine höhere Dichte aufweist als der exokrine Teil der Drüse [93], [94].

Werden einzelne Inselzellen transplantiert, so kommt es im Rahmen der Angiogenese zur Bildung eines Glomerulus-artigen Gefäßsystems vergleichbar mit dem endogener Inselzellen, das zudem im Vergleich mit dem umliegenden Gewebe eine höhere Dichte an Gefäßen aufweist [48]. Untersuchungen, bei denen eine Transplantation von Inseln als zelluläre Aggregate erfolgte, beispielsweise unter die Nierenkapsel, ergaben, dass die Architektur des Gefäßsystems deutliche Ähnlichkeit mit der nativer Inselzellen besitzt [48]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Gefäßdichte innerhalb des endokrinen Gewebes im Vergleich mit endogenen Inselzellen in der Tat deutlich niedriger liegt [77], wobei sich dies unabhängig davon

ergab, ob die Inselzellen unter die Nierenkapsel, in die Milz oder intraportal transplantiert wurden.

1.5.4.6 Einflussfaktoren der Revaskularisierung tranplantierter Inselzellen

Exokrine Kontamination nach der Inselzellisolation kann den Angiogenese-Prozess sowie die Adaptation des Transplantates in das Implantationsorgan entscheidend beeinflussen [95]. Eine Hauptfunktion der Kultivierung isolierter Inselzellen vor der Transplantation lag in der Entfernung von anderen endokrinen Zellen, sowie Makrophagen, Dendritischen Zellen, exokrinen Zellen und Endothel. Die Anwendung des Edmonton-Protokolls [28] ergab jedoch, dass die Transplantation frisch isolierter Inselzellen für die folgende Adaptation an das zu implantierende Organ durchaus von Vorteil sein kann. Als eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse wurde angenommen, dass diese Inselzellen, die auch kontaminierende Zellen enthalten, zudem auch endotheliale Zellen beinhalten, die im Folgenden die Angiogenese begünstigen können. Neue Untersuchungen konnten weiterhin zeigen, dass frisch isolierte Inselzellen einen höheren Sauerstoffpartialdruck aufweisen [65]. Langzeitfolgestudien sind nötig, die die Bedeutung dieser Wirkungen bei der Transplantation frisch isolierter Inselzellen näher charakterisieren.

Die Größe der Inseln beeinflusst zudem die Geschwindigkeit der Gefäßneubildung sowie die Adaptation an das Implantationsorgan [96], wobei bei kleineren Inseln die oben genannten Prozesse eher langsamer verlaufen.

Im Licht der Diskussion hinsichtlich der Revaskularisierung transplantierter Inselzellen steht zudem auch die Rolle bestehender Hyperglykämien in der Initialphase nach der Implantation für die Angiogenese und das Einwachsen von Gefäßen. Die zunächst angenommene, negative Beeinflussung der Gefäßneubildung durch ein initial hyperglykämisches Milieu [97], mitunter bedingt durch eine verzögerte Expression angiogener Faktoren und ihrer Rezeptoren in Inseltransplantaten [75], konnte nicht konklusiv beantwortet werden [34].

1.5.4.7 Der angiogene Wachstumsfaktor VEGF und seine Rolle bei der Ausbildung von Gefäßen innerhalb der pankreatischen Insel

Der vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor VEGF ist ein homodimeres Glykoprotein, welches in Abhängigkeit von der Exonspaltung in 4 verschiedenen

Isoformen vorkommt mit jeweils 121, 189, 165 und 206 Aminosäuren. Die weitaus Häufigste Isoform ist VEGF-A 165, ein heparinbindendes Glycoprotein von 45 kDa Molekulargewicht. Stärkste Induktoren der Expression von VEGF sind Hypoxie, vermittelt über den HIF-1α Signalstransduktionsweg [98], [99], sowie Wachstumsfaktoren wie der Fibroblastenwachstumsfaktor FGF, der Thrombozyten-abgeleitete Wachstumsfaktor PDGF, der Keratinozyten-abgeleitete Wachstumsfaktor KGF, die Tumorwachstumsfaktoren TGF-α und TGF-β, ferner entzündungsassoziierte Zytokine wie die Interleukine IL-6 und IL-10, als Hinweis für die VEGF-abhängige Angiogenese im Rahmen von Inflammationsprozessen.

VEGF vermittelt seine Effekte über mehrere Rezeptoren, wobei der VEGF-Rezeptor 1 (VEGF-R1, auch bekannt als flt-1 und VEGF-R2 (auch bekannt als flk-2) hierbei die wichtigste Rolle einnehmen; hierbei handelt es sich um zwei Rezeptoren der Tyrosin-Kinasefamilie, welche nahezu ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert werden. Während der VEGF-R1 eine sehr starke Bindungsaktivität bei schwacher transduktorischer Aktivität aufweist und somit eher antagonistische Signale vermittelt, zeigt der VEGF-R2 eine schwächere Bindungsaktivität bei starker transduktorischer Wirkung und führt dadurch zur Vermittlung agonistischer Signale der Angiogenese [100].

Die Effekte und die Funktionen des VEGF in Embryogenese und Organogenese sind mannigfaltig und in vielen Fällen noch nicht vollständig charakterisiert. Von Interesse für die Fragestellung dieser Arbeit sind die Funktionen des VEGF in der Organogenese des Pankreas sowie seine Rolle in der Ausbildung und Wiederherstellung von Blutgefäßen innerhalb der nativen und/oder transplantierten pankreatischen Insel.

VEGF-A hat in der Embryogenese des endokrinen Pankreas eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des Insel-spezifischen Gefäßsystems. [101]. Über eine parakrine Sekretion können dabei Endothelzellen die Ausdifferenzierung von mesodermalen Zellen zu insulinproduzierenden Zellen induzieren, dabei spielt VEGF als Informationsträger eine wesentliche Rolle.

Die Beta-Zelle führt anschließend über eine parakrine Sekretion von VEGF-A zur Anlockung von Endothelzellen aus benachbarten Gefäßen, die dann unter Einfluss des VEGF über die Vorstufe primitiver tubulärer Strukturen Mikrokapillaren ausbilden [102].

Somit ergibt sich für das Wirkungsmuster des VEGF das Modell einer parakrinen Schleife.

Auch unter dem Einfluss des VEGF kommt es dann zur Ausbildung der für das Gefäßsystem des endokrinen Pankreas spezifischen Merkmale wie Fenestrierung und implizit gesteigerte Permeabilität der endothelialen Gefäßauskleidung [103], [104]. Durch starke Fenestrierung des endokrin-spezifischen Gefäßsystems kommt es im Bereich des Kontaktpunktes zwischen Endothelzelle und Inselzelle im Bereich einer endothelialen Fenestra zu einer Minimierung des Abstandes zwischen den randständig lokalisierten Insulingranula innerhalb der β-Zellen und dem Blutstrom im benachbarten Blutgefäß auf Werte unterhalb 500 nm, was die extrem schnelle Insulinreaktion nativer pankreatischen Inseln auf einen Glukosereiz erklärt und hierfür essentiell ist.

Durch die unterschiedliche Verteilung der VEGF-Rezeptoren innerhalb des Pankreas und der pankreatischen Insel kommt es einerseits zu der Ausbildung morphologisch unterschiedlicher Gefäßstrukturen (deutlich stärker fenestriertes, endokrines Kapillarsystem in den Inseln), sowie zu der Ausbildung eines gerichteten Blutflusses innerhalb der Insel (Arteriolen bringen das Blut zuerst in den hauptsächlich aus Beta-Zellen bestehenden Inselkern). Letzteres wird dadurch erreicht, dass der agonistisch transduzierende VEGF-R2 vor allem von den Endothelzellen im Inselkern exprimiert wird, während der antagonistische VEGF-R1 in der Peripherie vermehrt exprimiert wird [105].

Auf Endothelzellen besitzt VEGF eine chemotaktische und mitogene Wirkung, es führt innerhalb von Endothelzellen über die Vorstufe von intrazellulären Vakuolen zur Ausbildung von tubulären Strukturen [106], [107]. Zudem ist VEGF als „Überlebensfaktor“ für Endothelzellen bekannt, es reguliert Transduktionswege wie die Aktivierung der mitogen aktivierten Protein Kinase (MAPK) bzw. der extrazellulär regulierten Kinasen (Erk1/2) und der Stress aktivierten Protein Kinasen SAPK/JK [108].

Auf transplantierte Inselzellen hat VEGF bekanntermaßen auch einen zytoprotektiven Effekt [106]. Zudem ist bereits gezeigt worden, dass VEGF Antiapoptosegene zu aktivieren vermag und direkt in den Apoptoseprozess eingreifen kann, so z.B. in die Hemmung der Caspase-Kaskade der Caspasen 3, 8, 9, sowie der Phosphatidylinsitol 3 Kaskade PI3K [109]. Ferner zeigt VEGF auch einen immunoprotektiven Effekt über

eine Hemmung der Präsentation von MHC Klasse II Antigenen und über eine Förderung der Expression von Zellschutzproteinen wie beispielsweise der Hitzeschockproteine (HSP) 59 und 60 [110].

1.5.5 Die Funktion des Gefäßsystems transplantierter Inselzellen

1.5.5.1 Die Blutperfusion

Endogene pankreatische Inselzellen besitzen eine Blutperfusion, die die des exokrinen Parenchyms um das 5-10 fache übersteigt.

Aktuelle Untersuchungen mittels Laser-Doppler-Technik zeigten in transplantierten Inselzellen einen Blutfluss, der 25-50% niedriger liegt als im Transplantationsorgan (Niere, Milz, Leber) [111], [112].

1.5.5.2 Sauerstoffspannung und Stoffwechsel

Eine der Hauptaufgaben des neu entwickelten Gefäßsystems innerhalb transplantierter pankreatischer Inselzellen ist die ausreichende Sauerstoffversorgung für die metabolischen Bedürfnisse des Inselzelltransplantates. Initial nach der Transplantation ist die Sauerstoffversorgung innerhalb des Transplantates in der Regel unzureichend, sie erreicht selbst nach 9 Monaten post transplantationem nicht das Niveau der nativen Insel [112].

1.5.6 Maßnahmen zur Verbesserung der Funktion des Gefäßsystems im Transplantat

Innerhalb der letzten Jahre wurde vermehrt versucht, die Adaptation der pankreatischen Inselzellen und damit die funktionelle Kapazität des Transplantates besonders auch im Hinblick auf die Revaskularisierung zu verbessern. Dies wurde anhand mehrerer Angiogenese-fördernder Faktoren und ihrer Rolle hinsichtlich des Wachstums, Überlebens und der Differenzierung sowohl an adulten als auch an fötalen transplantierten Inselzellen untersucht. Erste Ergebnisse ergaben, dass kultivierte und transplantierte Inselzellen VEGF produzieren, was somit die Bedeutung dieses Faktors für die Initiierung des Gefäßneubildungsprozesses hervorheben kann.

Darauf basierend wurde in verschiedenen Ansätzen versucht, über eine Erhöhung der VEGF-Konzentration am Transplantationsort das Transplantationsergebnis zu verbessern. Die Ansätze für diese Konzentrationserhöhung sind mannigfaltig, angefangen von der prätransplantationalen Behandlung des Transplantationsortes mit rekombinantem VEGF [38], über den Einschluss von Inseln in VEGF-reiche Kapseln aus verschiedenen Biomaterialien [113], [114], bis hin zur Transplantation von Inseln, die über eine Transfektion mit VEGF-Genmaterial vermehrt VEGF produzierten [115], [116].

In nahezu allen diesen Arbeiten wurde ein dem Transplantationsergebnis förderlicher Effekt des VEGF gezeigt, die molekularen Mechanismen dieses Effektes sind jedoch in den meisten Fällen nicht ausreichend erforscht.

1.6 ZIELE DER ARBEIT

Die Transplantation pankreatischer Inseln ist zurzeit der einzige kurative Ansatz zur Behandlung des Diabetes mellitus. Sie allein ermöglicht die Wiederherstellung einer nahezu physiologischen Blutzuckerregulation. Der Erfolg der Inselzelltransplantation hängt jedoch von der Verpflanzung einer sehr hohen Anzahl von Inseln ab, da lediglich ca. 30-50% der transplantierten Inseln im Empfängerorganismus langfristig anwachsen. Eine rasche Revaskularisation der transplantierten Inseln, ein Prozess, der bekanntermaßen innerhalb der ersten 10-14 Tage post transplantationem erfolgt, ist ein entscheidender Faktor für ein adäquates Anwachsen.

Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass die Durchblutung der transplantierten Inseln und die Sauerstoffspannung innerhalb der Inseln auch nach Beendigung des Revaskularisationsprozesses unterhalb des Niveaus nativer Inseln bleiben. Ferner wurde gezeigt, dass Wachstumsfaktoren wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF eine sehr wichtige Rolle in der Förderung der Revaskularisation transplantierter Inseln und, implizit, in der Verbesserung ihres Überlebens und ihrer Funktion spielt und somit ein prominentes Werkzeug zur Reduktion der initial zur Heilung des Diabetes benötigten Inselzahl darstellt. Die exakten Mechanismen hierfür sind bis heute nur unzureichend bekannt.

In dieser Arbeit wollten wir zeigen, dass durch eine topische Applikation von VEGF am Transplantationsort pankreatischer Inseln eine verbesserte Adaptation der Inseln im Implantationsorgan und, implizit, eine höhere Überlebensrate und eine verbesserten Funktion letzterer erreicht werden kann – als Voraussetzungen für eine erhebliche Reduktion der für eine erfolgreiche Transplantation benötigter Inseln.

Die Ziele dieser Arbeit sind hiernach:

i) die Quantifizierung des Effektes einer glukoseabhängigen, topischen VEGF Applikation auf die Angiogenese und den Blutfluss innerhalb des Transplantates

ii) zu zeigen, dass endotheliale Zellen des Spenders im Transplantat auch im diabetischen Empfänger persistieren und Ziel der parakrinen VEGF-Sekretion durch die Beta-Zellen sein können

iii) zu zeigen, dass durch eine verbesserte Perfusion der Inseln deren Überleben und primäres Anwachsen verbessert wird und hierduch ein

besseres funktionelles Ergebnis mit einer wesentlich geringeren Anzahl transplantierter Inseln erreicht werden kann

iv) die Bestätigung bzw. Untermauerung der Hypothese, wonach einer der wichtigsten Mechanismen, durch den VEGF die Implantation und das Überleben der transplantierten Inseln verbessert, die VEGF-vermittelte Förderung der Angiogenese und die hiermit verbundene verbesserte Durchblutung transplantierter Inseln darstellt.

In der Folge kann eine Aussage über den günstigsten Zeitpunkt der VEGF-Applikation innerhalb der Implantationsphase und die notwendige Konzentration des VEGF formuliert werden als mögliche Hinweise für eine zukünftige Anwendung ähnlicher Versuchsansätze in der klinischen Inselzelltransplantation.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. VERSUCHSTIERE

Alle Versuche wurden an männlichen Mäusen im Alter von 8-10 Wochen durchgeführt, die aus der Eigenzucht des Tierlabors der Medizinischen Klinik III Gießen stammten. Die Tiere aus allen Versuchsgruppen wurden bei 23°C und ca. 50% relativer Luftfeuchte in einem 12:12 Licht : Dunkelrhythmus einzeln in Makrolonkäfigen (Tecnoplast, Padova, Italien) auf Holzgranulateinstreu (Altromin, Lage/Lippe, BRD) gehalten und erhielten Standard-Pelletdiät (Altromin Haltungsfutter 1324, Lage/Lippe, BRD) und Wasser ad libitum.

Es wurden folgende Mäusestämme verwendet:

- C57Bl/6J -Inzuchtmäuse aus Eigenzucht
- RIP-VEGF Mäuse mit genotypischem C57Bl/6J Hintergrund
- Tie2LacZ Mäuse mit genotypischem C57Bl/6J Hintergrund

2.1.1 C57Bl/6J Mäuse

Dieser Mausstamm stammt ursprünglich aus der Zucht der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, BRD) und wurde im Tierlabor der Medizinischen Klinik III Giessen nach den Zuchtregeln der Inzucht-Züchtung weitergezüchtet.

2.1.2 RIP-VEGF-A Mäuse

Um die Effekte einer gesteigerten Konzentration des vaskulären Wachstumsfaktors VEGF am Transplantationsort zu untersuchen, wurden Langerhanssche Inseln von RIP-VEGF-A Mäusen im Transplantationsmodell verwendet. Diese Mäuse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Breier, Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim.

Die RIP-VEGF-A-Linie ist eine transgene Mauslinie mit C57Bl/6J Hintergrund, bei der die Expression von vaskulärem Wachstumsfaktor A (VEGF-A), gesteuert durch den Ratten-Insulinpromoter (rat insulin promoter, RIP), an die pankreatischen Beta-Zellen gekoppelt wurde. Dabei wurde ein vollständiger Strang humaner VEGF-A cDNA zwischen dem Ratten-Insulingen II Promoter (RIP) und dem SV40 small T-Antigen und Polyadenylierungssignal-Gen eingebaut. RIP-VEGF-A Mäuse sind lebensfähig,

in Größe und Gewicht von Wildtyp-C57Bl/6J Mäusen nicht zu unterscheiden, normoglykämisch und fruchtbar.

Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen, zeigten immunhistochemische Untersuchungen von Pankreata von RIP-VEGF-A Mäusen eine starke VEGF-A Expression in den meisten Inselzellen.

Pankreatische Beta-Zellen von RIP-VEGF-A zeigen bereits unter Normalbedingungen eine etwa 1,5 bis 2-fach erhöhte VEGF-A Sekretion im Vergleich zu Inseln von Wildtyp-Mäusen, unter hyperglykämischen Bedingungen steigt diese bis auf das Dreifache an (Daten aus Parallelversuchen unserer Arbeitsgruppe).

2.1.2.1 Charakterisierung der RIP-VEGF-A Mäuse

Die Genotypisierung der RIP-VEGF-A Mäuse erfolgte mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), als Gewebe wurden Schwanzproben verwendet, welche in der 2.-3. Lebenswoche entnommen wurden.

Nach Extraktion genomischer DNA mithilfe eines DNA-Extraktionskits (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden 10 µg des DNA-Proteins mithilfe einer Restriktionsendonuklease (*Eco*RI, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verdaut. Für die anschließende Polymerasekettenreaktion wurden spezifische Primer (MWG Biotech, Martinsried, Deutschland) für die humane VEGF-A cDNA verwendet (forward: 5'-TCCGGACTCGACCTCTCGGAC, reverse 5'-CCCCACATCTATACACACCTCC). Die PCR-Produkte wurden auf 6% Poly-acrylamid-Gelen aufgetragen und analysiert.

2.1.3 TIE2-LacZ Mäuse

Diese Mauslinie ist eine transgene Mauslinie mit C57Bl/6J Hintergrund, bei der die Expression von Beta-Galaktosidase, kodiert durch das LacZ Gen, an die transkriptionelle Regulation des Endothelzell-spezifischen Tie2 Promoters gekoppelt wurde. LacZ positive Endothelzellen können histochemisch durch Nachweis der Beta-Galaktosidase identifiziert werden.

2.2. VERSUCHSSERIEN

2.2.1 Vorversuchsgruppen

Im Vorfeld der Transplantationsexperimente mit Inseln, die eine verstärkte VEGF-Sekretion aufweisen, wurden drei Vorversuche vorgenommen: zum einen ein Versuch zur Demonstration der Persistenz von Spender-Endothelzellen in den transplantierten Inseln im diabetischen Empfänger (VG-1), zum anderen ein Versuch zur Definierung einer minimalen zu transplantierenden Inselzahl (minimale Inselmasse, MIM, Versuchsgruppe VG-2) und schließlich ein Experiment zur Quantifizierung der Insulin- und der VEGF-Sekretionsantwort auf einen definierten Glukosereiz.

2.2.1.1 Gruppe VG-1 Persistenz von Spender-Endothelzellen im Insel-Transplantat

Da in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe [117] gezeigt worden war, dass Endothelzellen des Spenders im Insel-Transplantat post transplantationem für mehr als 21 Tage persistieren und darüber hinaus aktiv an der Revaskularisierung des Transplantates beteiligt sind und dass dieser Prozess durch vaskuläre Wachstumsfaktoren gefördert werden kann, galt es nun im Vorfeld die Frage zu beantworten, ob diese Persistenz auch im diabetischen Empfänger existiert und gegebenenfalls, wie lange Spender-Endothelzellen im Transplantat nachweisbar sind.

Zu diesem Zweck wurden insgesamt 14 Transplantationen in diabetischen Tieren vorgenommen, wobei je 300 Inseln aus Tie2LacZ positiven Mäusen (8-10 Wochen alt) in diabetische Empfänger (Wildtyp C57Bl/6J, männlich, 8-10 Wochen alt) unter die Nierenkapsel transplantiert wurden. An den Tagen 5, 10, 15, 20, 30 und 35 wurden jeweils zwei Tiere getötet, die transplantattragende Niere wurde entnommen, es wurden histologische Schnitte erstellt und das Vorhandensein von LacZ-positiven Endothelzellen im Transplantat wurde mithilfe histochemischer Methoden überprüft.

2.2.1.2 Gruppe VG-2: Etablierung eines Minimalen Inselmasse-Modells

Es wurden 20 Transplantationen mit Inseln von Wildtyp-C57Bl/6J Mäusen in diabetische Wildtyp-C57Bl/6J Mäuse vorgenommen. Als minimale Inselmasse wurde diejenige Inselzahl definiert, bei deren Transplantation nur noch höchstens 1/3 (33%) der diabetischen Empfänger posttransplantational eine normoglykämische Stoffwechsellage erreichten (Nüchternblutzucker <200 mg/dl) und diese über mehr als 5 aufeinander folgende Tage beibehielten. Diese Inselzahl wurde in diesen Versuchen bei 150 Inseln festgelegt, bei Empfängertieren mit einem Körpergewicht zwischen 25-30 g und einem prätransplantationalen Nüchternblutzucker zwischen 250 und 350 mg/dl.

2.2.1.3 Gruppe VG-3: Bestimmung der Serum VEGF- und Insulinspiegel nach Applikation von Glukose

Zur Bestimmung der Insulin- und der VEGF-Sekretionsantwort auf einen definierten Glukosereiz, wurde ein intraperitonealer Glukosetoleranztest an insgesamt 12 Mäusen durchgeführt (6 Wildtyp-C57Bl/6 Mäuse und 6 RIP-VEGF-A-Mäuse). Die Tiere wurden über Nacht nüchtern gesetzt (12 h). Eine Bolusinjektion Glukose (3 g/kg Körpergewicht) wurde durch intraperitoneale Injektion mittels einer 25G Kanüle (B. Braun, Melsungen, BRD) appliziert. Für die Blutentnahme wurden die Mäuse im Anschluss in ein zylindrisches Glasgefäß überführt, diese wurde unter eine Rotlichtlampe (Philips, Eindhoven, Niederlande) gestellt. Blutproben wurden aus der Schwanzspitze zu den Zeitpunkten 0, 10, 20 und 40 Minuten nach der Glukoseapplikation entnommen. Der Blutzucker wurde mithilfe eines Blutzuckermessgerätes vom Typ Glucometer Elite (Bayer, Leverkusen, BRD) gemessen, Insulin und VEGF im ELISA-Verfahren.

2.2.2 Hauptversuchsgruppen

In den Hauptversuchen wurden je 150 Inseln von RIP-VEGF Mäusen beziehungsweise Wildtyp-Mäusen diabetischen Wildtyp-C57Bl/6J Mäusen unter die Nierenkapsel transplantiert. Es wurden insgesamt 20 Transplantationen vorgenommen.

Ab dem ersten Tag nach der Transplantation wurde bei allen transplantierten Tieren die Messung des Nüchternblutzuckers fortgesetzt, die Werte wurden täglich bis zum Töten der Tiere protokolliert.

Ein Teil der Tiere (n=6, jeweils 3 Mäuse aus jeder Transplantationsgruppe) wurde am Tag 7 durch zervikale Dislokation nach Sedierung getötet, und die transplantattragende Niere wurde entnommen. Darin wurde mittels ELISA der Gesamtgehalt an VEGF (human und murin) bestimmt (Gruppe HG-1).

An weiteren 12 Tieren (jeweils 6 RPI-VEGF-A- und 6 Wildtyp-Inseln-Empfänger) wurde am Tag 12 die Durchblutung des Transplantates im Laser-Dopplerverfahren gemessen. Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die transplantattragende Niere wurde entnommen und für histochemische und immunhistochemische Untersuchungen verwendet (Gruppen HG-2).

Schließlich wurden zwei der diabetischen Empfängermäuse nach der Transplantation von RIP-VEGF-A Inseln und der darauf folgenden Wiederherstellung der Normoglykämie für einen Zeitraum von 6 Monaten gehalten, dabei wurde der Blutzucker einmal wöchentlich protokolliert. Am Ende dieses Zeitraumes wurde der Blutfluss im Transplantat gemessen und die Nieren für histologische Untersuchungen entnommen (Gruppe HG-3).

2.3. INDUKTION DES EXPERIMENTELLEN DIABETES MELLITUS TYP 1

2.3.1 Induktion des Diabetes mellitus

Als Modell für einen experimentellen Diabetes mellitus Typ 1 wurde das bekannte Modell der Streptozotocin-induzierten Destruktion der pankreatischen Beta-Zellen angewendet. Streptozotocin blockiert die Glucose-Transportkanäle der

pankreatischen Beta-Zellen, so dass diese in dosisabhängiger Zahl irreparabel zerstört werden.

Streptozotocin (Boeringer, Ingelheim, BRD) wurde in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma, Steinheim, BRD) in einer Endkonzentration von 1 mg/ml vollständig gelöst. Die Mäuse wurden gewogen und die Streptozotocinlösung wurde entsprechend einer Dosierung von 180 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Während der ersten postinduktionalen Stunden wurden die Tiere engmaschig beobachtet. Um eine durch die Entleerung der Insulingranula aus den destruierten Beta-Zellen bedingte Hypoglykämie zu vermeiden, wurde den Tieren für die ersten 24h nach Induktion 10% glucosehaltiges Trinkwasser angeboten.

2.3.2 Festellen der diabetischen Stoffwechsellage, Blutzucker-protokollierung

Am nächstfolgenden Tag nach der Induktionsbehandlung, eine Stunde nach Beendigung der Aktivitätsphase der Tiere, wurde mit dem Messen des Blutzuckers begonnen. Der Blutzucker wurde mithilfe eines Blutzuckermessgerätes vom Typ Glucometer Elite (Bayer, Leverkusen, BRD) gemessen, dieser wurde im Vorfeld mittels eines photometrischen Glucosemessgerätes (Beckmann Coulter, Krefeld, BRD) geeicht.

2.3.3 Definition des Diabetes mellitus

Ein Diabetes mellitus wurde festgestellt, wenn die Blutzuckermessung an drei darauf folgenden Tagen Werte >200 mg/dl ergab. Tiere, die 48h nach Induktion keine diabetische Stoffwechsellage aufwiesen, wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen, auf eine Reinduktion wurde bewusst verzichtet, um die prätransplantationellen Bedingungen interindividuell konstant zu halten.

2.4. ISOLATION VON PANKREATISCHEN INSELN AUS DER MAUS

Für die Isolation von pankreatischen Langerhans'schen Inseln aus der Maus wurde eine abgewandelte Form der Collagenase-Digestionsmethode von Gotoh und

Kollegen [118] angewendet, diese wurde eigens für die Versuche in dieser Arbeit entwickelt.

Am Vorabend der Isolationsdurchführung wurden die Spendertiere nüchtern gesetzt.

Die Collagenaselösung wurde hergestellt durch Auflösen von Collagenase P (Serva Electrophoresis, Heidelberg, BRD) in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma, Steinheim, BRD) in einer Endkonzentration von 2,5 mg/ml. Bis zur Anwendung wurde die Collagenase-Lösung auf Eis gelagert.

2.4.1 Narkose für die Inselzellisolation

Am Folgetag, unmittelbar vor der Isolation, wurden die Spendermäuse gewogen und eine Mischung aus Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen, BRD) und Ketaminhydrochlorid (Ketanest®, Bayer, Leverkusen, BRD) wurde den Tieren intraperitoneal injiziert, entsprechend einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin und 60 mg/kg Körpergewicht Ketaminhydrochlorid.

2.4.2 In-vitro-Distension und Entnahme des Pankreas

Nach Überprüfung einer ausreichenden Narkosetiefe durch einen definierten Schmerzreiz, wurde die Haut im Bereich des Abdomens mithilfe eines elektrischen Rasiergerätes (Wahl KennelPro, Sterling IL, USA) rasiert und das Tier auf dem Operationstisch gelagert und mittels Pflasterstreifen (Leukoplast®, Beiersdorf, Hamburg, BRD) fixiert. Mittels einer Dissektionsschere (Hammacher, Solingen, BRD) wurde anschließend das Abdomen bis auf Zwerchfellhöhe eröffnet und die Abdominalorgane wurden demonstriert. Der *Processus xyphoideus* des Sternums wurde disseziert und die Leber wurde in eine feuchte Kompresse eingeschlagen (Hartmann, Heidenheim, BRD) und nach kranial umgeklappt, so dass Gallenblase und *Ductus choledochus* identifiziert werden konnten. Mithilfe eines Stereomikroskops (Wild M3B, Heerbrugg, Schweiz) wurde der *Ductus choledochus* aufgesucht und der kraniale Anteil wurde durch eine Ligatur verschlossen. Nun wurde der Ductus von proximal nach distal mit einem Polyethylen-Katheter von 0,3 mm Durchmesser (RCT, Heidelberg, BRD) kanüliert, an dessen freiem Ende wurde im Vorfeld eine 27G Kanüle befestigt (B. Braun, Melsungen, BRD). Zur Fixierung des Katheters wurde über letzteren und *Ductus coledochus* eine weitere Ligatur

vorgenommen. In eine 5 ml Einmalspritze (B. Braun, Melsungen, BRD) wurden 4 ml Collagenase-Lösung aufgezogen und die Spritze wurde an die Kanüle am Ende des Katheters befestigt. Nun wurde die Maus durch einen kleinen Schnitt in die abdominale Aorta kaudal des Austrittes der *Aa. renales* getötet. Um eine weitgehende Blutleere des Pankreas zu erreichen, wurde eine Zeitspanne von ca. 2-3 Minuten abgewartet. Im Anschluss daran wurden 3 ml der eiskalten Collagenase-Lösung durch den Katheter unter Sichtkontrolle langsam in das Pankreas injiziert, wodurch im Falle einer gelungenen Katheterisierung des *Ductus choledochus* eine Distension des Pankreas erreicht wurde, sichtbar an der deutlichen Volumenvergrößerung des Organs.

Nun wurde mithilfe einer kleinen Präparierschere und einer feinen chirurgischen Pinzette (beide von Hammacher, Solingen, BRD) das Pankreas aus dem Abdomen herausgelöst und in ein 10 ml Falcon-Röhrchen (BD, Heidelberg, BRD) transferiert, die in der Spritze verbliebene Collagenase-Lösung wurde dazugegeben. Nun wurde das Röhrchen mit dem distendierten Pankreasgewebe in einem Wasserbad (Julabo, Seelbach, BRD) bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach etwa 12 Minuten war die Digestion abgeschlossen, sichtbar an einer vollständigen Auflösung des Pankreasgewebes zu einem milchig-opaken Homogenat. Um die Collagenasewirkung zu unterbrechen, wurde nun das Röhrchen auf Eis gelegt und 6 ml eiskaltes RPMI1640 Zellkulturmedium (Sigma, Steinheim, BRD) supplementiert mit 10% foetalem Kälberserum (FCS, PAA, Wien, Österreich) wurden dazugegeben. Anschließend wurde das Röhrchen bei 1200 Umdrehungen/Minute für 3 Minuten zentrifugiert (Megafuge, Heraeus, Langenselbold, BRD).

Nach erfolgter Zentrifugation wurde unter einer Sterilbank der Überstand verworfen und das Pellet in 8 ml HBSS resuspendiert und erneut einer Zentrifugation bei 1200 U/min für 3 Minuten zugeführt. Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pelett in 8 ml RPMI1640 Zellkulturmedium, supplementiert mit 10% FCS resuspendiert und mithilfe einer 10 ml Pipette (BD, Heidelberg, BRD) durch ein 100 µm Zellsieb (BD, Palo Alto, USA) filtriert. Das in dem Zellsieb verbliebene Gewebe wurde nun in 8 ml RPMI1640 10%FCS suspendiert und in eine Petrischale (Greiner, Nürtingen, BRD) transferiert. Anschließend wurde unter einem inversen Mikroskop (Leitz, Wetzlar, BRD) mit einer 100 µl Pipette (Eppendorf, Hamburg, BRD) die vorhandenen Inseln aus der Petrischale manuell gepickt und in eine neue Petrischale mit 7 ml RPMI 10%FCS, supplementiert mit Streptomycin,

Penicillin (beide von Sigma, Steinheim, BRD) und Gentamycin (Brahms, Hennigsdorf, BRD), überführt. Aus einem Mauspankreas wurden in diesem Verfahren ca. 100-150 Inseln isoliert.

2.5 KULTIVIERUNG DER INSELZELLEN

Alle isolierten pankreatischen Inseln wurden in Petrischalen in 7 ml RPMI1640 Zellkulturmedium mit 10% FCS, supplementiert mit Penicillin, Streptomycin und Gentamycin in einem Zellkulturschrank (Heraeus-Kendro, Langenselbold, BRD) unter Schutzatmosphäre bei 37°C, 70% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 für 24 Stunden bis zur Transplantation inkubiert.

2.6. TRANSPLANTATION VON PANKREATISCHEN INSELN

Als Transplantationsmodell wurde das bekannte Modell der Transplantation von pankreatischen Inseln unter die Nierenkapsel angewendet. Die Transplantationstechnik hierfür wurde eigens für diese Versuche entwickelt, um die Möglichkeit der Messung der Durchblutung an der Transplantatoberfläche mithilfe einer Lasersonde zu ermöglichen.

Als Empfängermäuse wurden ausschließlich männliche Wildtyp C57Bl/6J Mäuse im Alter von 10-12 Wochen verwendet, bei denen im Vorfeld ein Diabetes mellitus induziert worden war.

2.6.1 Einschlusskriterien für diabetische Tiere

Um ein vergleichbares Transplantationsergebnis zu erzielen, wurden Einschlusskriterien für die zu transplantierenden, diabetischen Tiere aufgestellt:

- Nüchternblutzucker nicht höher als 350 mg/dl.
- Gewichtsverlust nach Diabetesinduktion nicht stärker als 20%.
- Körpergewicht nicht unter 20 g und nicht über 35 g.
- Diabetesdauer nicht länger als 10 Tage.

- Klinisch guter Allgemein- und Ernährungszustand, erkennbar an der optischen Beschaffenheit des Fells, der Futteraufnahme, der Aktivität und dem sozialen Verhalten (Aggressivität) der Tiere.

Am Vorabend der Transplantation wurden die Tiere, falls noch nicht erfolgt, in Einzelkäfige gesetzt, das Futter wurde für maximal 12 h vor Operationsbeginn entzogen.

Am Tag der Transplantation (Tag 0) wurden die Tiere gewogen und die Dosis der Narkosemittel sowie die Anzahl der zu transplantierenden Inseln wurden berechnet.

2.6.2 Narkose der Tiere während der Transplantation

Es erfolgte eine intraperitoneale Injektionsnarkose mit Avertin®, einer Mischung von Tribromoethanol (Sigma, Steinheim, BRD) und Tert-Amyl-Glykol (Riedel de Haen, Steinheim, BRD) in einer Dosierung entsprechend 15 mg/kg Körpergewicht Tribromoethanol. Damit wurde eine stabile Narkose für einen Zeitraum von etwa 30 Minuten erreicht. Bei Bedarf wurde in einigen seltenen Fällen eine Resedierung mit Avertin vorgenommen.

2.6.3 Vorbereitung der Inseln, Bestimmung der Inselzahl

Am Vormittag des Transplantationstages wurden die Inseln aus dem Kulturschrank entnommen und mittels Sichtprüfung unter dem Invertmikroskop auf Viabilität überprüft. Je nach Versuch wurde eine bestimmte Anzahl von Inseln in eine kleinere Petrischale überführt, in 2-3 ml raumluftstabilen DMEM Zellkulturmedium supplementiert mit 10% FCS, Penicillin, Streptomycin, Gentamycin und Ciprofloxacin (Bayer, Leverkusen, BRD) resuspendiert und bis zur Transplantation bei Raumtemperatur unter der Sterilbank gehalten.

2.6.4 Vorbereitung der Tiere, Transplantation

Nach Induktion der Narkose und Überprüfung der Tiefe letzterer durch einen standardisierten Schmerzreiz, wurde das Fell der Tiere im Bereich der linken Flanke rasiert (Rasiergerät Wahl® KennelPro, Sterling IL, USA) und mit Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde die Maus in Rechtsseitenlage auf den Operationstisch auf eine

elektrische Wärmeplatte (35°C) gelegt, die Beleuchtung des Operationstisches erfolgte durch zwei Kaltlichtquellen (Schott, Mainz, BRD).

In ein steriles Tuch wurde ein 2 cm großes Loch eingeschnitten, dieses wurde über die linke Flanke des Tieres gelegt. Mit einer sterilisierten Hautschere wurde nun ein Hautschnitt von ca. 1,5 cm im Bereich der linken Flanke gelegt und das Operationsfeld wurde durch zwei Hauthaken (Hammacher, Solingen, BRD) links und rechts freigehalten, so dass das Peritoneum und die durchschimmernde linke Niere demonstriert werden konnten. Nun wurde mit einer kleinen Muskelschere (Hammacher, Solingen, BRD) ein 1 cm langer Schnitt im Peritoneum über der linken Niere vorgenommen und durch leichten Druck auf das Abdomen die linke Niere nach Außen luxiert. Anschließend wurde das Operationsfeld mit einer feuchten Kompresse bedeckt, um eine Austrocknung weitgehend zu vermeiden.

Ein etwa 10 cm langer Katheterschlauch von 0,5 mm Durchmesser (RCT, Heidelberg, BRD) wurde durch Hitzeeinwirkung an einem Ende auf einen Durchmesser von etwa 0,3 mm verjüngt. An dem anderen Ende wurde eine 26G Kanüle befestigt (B. Braun, Melsungen, BRD). Das Katheter-Kanüle-System wurde nun an eine 100 µl Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) befestigt. Unter mikroskopischer Sichtkontrolle wurden nun die im Vorfeld vorbereiteten Inseln aus der Petrischale in den Katheterschlauch aufgezogen, wobei darauf geachtet wurde, dass das Volumen 10 µl nicht überschreitet. Das schmale Katheterende wurde anschließend mit einer spitzen Sondennadel (Hammacher, Solingen, BRD) verschlossen, durch senkrechtes Halten des Katheters erfolgte eine Sedimentation der Inseln in dem verjüngten Ende, diese konnte visuell überprüft werden.

Nun wurde das abgedeckte Operationsfeld aufgedeckt, die Maus wurde unter ein Stereomiskroskop gelegt und mit einem Mikroskalpell (Feather® Nr. 11, Osaka, Japan) wurde ein 1 mm Schnitt in die Nierenkapsel parallel zur Querachse etwa in Höhe des Nierenpols auf der dorsalen Seite des Organs vorgenommen und mithilfe eines 0,3 mm Katheters wurde ein 4 mm langer Tunnel unterhalb der Nierenkapsel, von distal nach proximal gelegt. Anschließend wurde der Verschluss des Katheters, in welchem die Inseln aufgezogen worden waren entfernt, und das schmale Ende wurde in den vorbereiteten, subkapsulären Tunnel eingeführt. Durch vorsichtiges Drücken auf den Kolben der Mikroliterspritze wurden nun unter langsamem Herausziehen des Katheters die Inseln unter die Nierenkapsel injiziert, sichtbar an

der Ausbildung einer 1 mm im Durchmesser messenden weißen Vorwölbung. Nach komplettem Herausziehen des Katheters wurde mit einem Wattetupfer ein eventuell vorhandener Blutfluss im Bereich des Kapselschnittes gestillt und die Niere wurde vorsichtig zurück in den Abdomenraum repositioniert.

Anschließend erfolgte die Naht des Peritoneums mit resorbierbarem Faden (Vicryl 7-0, Ethicon, Norderstedt, BRD). Die Haut wurde mittels St. Michel-Hautklammern (Hammacher, Solingen, BRD) verschlossen und die Wunde mit Sprühpflaster (Leukospray®, Beiersdorf, Hamburg, BRD) versiegelt. Zur Infektionsprophylaxe wurde den Mäusen eine intraperitoneale Injektion mit Ciprofloxacin (Ciprobay®, Bayer, Leverkusen, BRD) in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht appliziert, im Anschluss wurde die Maus zurück in ihren Käfig verlegt. Um eine postoperative Unterkühlung zu vermeiden, wurden die Käfige bis zum Aufwachen der Tiere unter eine Infrarotlampe gestellt (Philips, Eindhoven, Niederlande).

2.7. MESSUNG DER DURCHBLUTUNG VON INSELZELL-TRANSPLANTATEN

Zur Evaluation eines funktionellen Parameters der Revaskularisierung wurde am Tag 12 post transplantationem die Durchblutung der Transplantate gemessen. Hierzu wurde ein Laser-Doppler Gerät vom Typ Periflux 5000 (Perimed, Stockholm, Schweden) mit einer Messsonde mit einem äußeren Durchmesser von 0,45 mm verwendet.

2.7.1 Prinzip der LASER-Doppler Perfusionsmessung

Das Prinzip dieses Perfusionsmessgerätes besteht darin, dass in das Gewebe von einer Sendeeinheit abgegebene Laser-Photonen durch sich bewegende Erythrozyten reflektiert werden und dabei in Abhängigkeit von der Menge und Bewegungsgeschwindigkeit der Erythrozyten ihre Wellenlänge spezifisch verändern (Doppler-Effekt). Eine Empfängereinheit empfängt die reflektierten Laser-Strahlen und analysiert deren Wellenlänge (Abbildung 3). Daraus können durch einen mathematischen Algorithmus Rückschlüsse auf die Durchblutung des Gewebes gezogen werden. Dabei können aus technischen Gründen keine Absolutwerte (in

ml/s) errechnet werden, man hat sich auf eine international akzeptierte, arbiträre Maßeinheit geeinigt (tissue perfusion units, TPU).

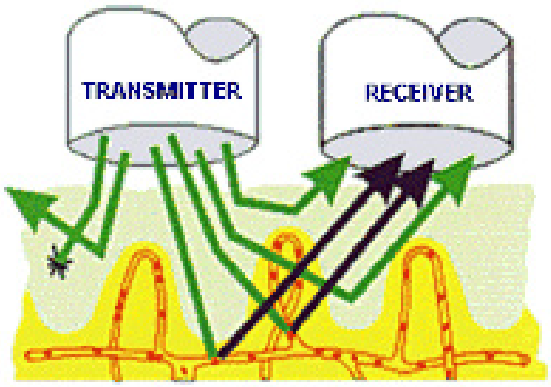

Abbildung 3: *Prinzip der Laser-Doppler-Perfusionsmessung*

2.7.2 Aufbau der Meßeinrichtung

Die Perfusionsmessung erfolgte mithilfe eines computergestützen Laser-Doppler Meßsystem der Firma Perimed, Schweden bestehend aus einer Meßsonde (Sende- und Empfangseinheit) mit einem äußeren Durchmesser von 0,45 mm, einer LASER-Einheit (Periflux 5000) mit integriertem Mikroprozessor zur Wellenlängenanalyse und einem auf das Betriebssystem Microsoft-Windows ® (Microsoft, Unterschleißheim, BRD) basierenden Rechner.

Um eine senkrechte Platzierung der Sonde auf dem zu messenden Gewebe zu gewährleisten, wurde ein Mikromanipulator vom Typ MM33 (Märzhäuser, Wetzlar, BRD) verwendet.

Für die Fixierung der Niere während der etwa 20 minütigen Messung wurde eine Halterung gebaut, bestehend aus einem U-förmig gebogenen Edelstahl-Rohr mit einem Durchmesser von 5 mm, welches mit einem dünnen Latexfilm überzogen wurde. Das Ende des Rohres wurde mittels einer Schraubklemme an eine senkrecht in einer Bodenplatte fixierten Säule befestigt. An beiden Enden des Rohres wurden Polyethylenschläuche (RCT, Heidelberg, BRD) fixiert und 37°C warmes Wasser wurde aus einem Wasserbad (Julabo, Norderstedt, BRD) durch das Rohr gepumpt, so dass dessen Oberfläche eine gleich bleibende Temperatur von 37°C erreichte. Unmittelbar vor der Messung wurde ein inertes Gel (Lubrikano, Ort, BRD) auf das Rohr verteilt.

Um eine gleich bleibende Temperatur der Maus während der Messung zu erreichen, wurde eine elektrisch betriebene Wärmeplatte verwendet (Julabo, Norderstedt, BRD)

Während der gesamten Messung wurden mithilfe einer Schwanzmanschette (Perimed, Stockholm, Schweden) Blutdruck und Puls des Tieres gemessen, anhand dieser Parameter (Puls 120/min, Blutdruck 100/70 mmHg) wurde die Tiefe der Narkose angepasst.

2.7.3 Durchführung der Messung

Am Vorabend der Messung wurden die Tiere, falls noch nicht erfolgt, in Einzelkäfige gesetzt, das Futter wurde für maximal 12 h abgesetzt.

Am Tag der Messung wurden die Tiere gewogen und die Dosis der Narkosemittel berechnet.

2.7.3.1 Narkose der Tiere

Es erfolgte zunächst eine intraperitoneale Injektionsnarkose mit Avertin®, einer Mischung von Tribromoethanol (Sigma, Steinhausen, BRD) und Tert-Amyl-Glykol (Riedel de Haen, Steinhausen, BRD) in einer Dosierung entsprechend 150 mg/kg Körpergewicht Tribromoethanol. Die Erhaltungsnarkose erfolgte inhalativ mit Isofluran (Forene®, Ort, Land).

2.7.3.2 Vorbereitung der Tiere für die Messung

Nach Induktion der Narkose und Überprüfung der Tiefe letzterer durch einen standardisierten Schmerzreiz, wurde das Fell der Tiere im Bereich der linken Flanke rasiert (Rasiergerät Wahl®, Louisville, USA) und mit Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde die Maus in Rechtsseitenlage auf den Operationstisch auf eine elektrische Wärmeplatte (35°C) gelegt, die Beleuchtung des Operationstisches erfolgte durch zwei Kaltlichtquellen (Schott, Wiesbaden, BRD).

Mit einer sterilen Pinzette wurden nun die Hautklammern eröffnet, das Operationsfeld wurde durch zwei Hauthaken (Hammacher, Solingen, BRD) links und rechts freigehalten, so dass das Peritoneum und die Peritonealnaht der vorangegangenen Transplantation visualisiert wurden. Nun wurde mit einer kleinen Muskelschere

(Aeskulap, Solingen, BRD) die Naht eröffnet und durch leichten Druck auf das Abdomen die linke Niere mit dem Insel-Transplantat nach Außen luxiert. Das Transplantat war in den meisten Fällen als stecknadelkopfgroßer, weißer Fleck mit freiem Auge erkennbar.

2.7.3.3 Messung der Transplantatdurchblutung

Nun wurde die Niere vorsichtig in der oben beschriebenen Halterung befestigt. Nach einer 4-5 minütigen Pause bis zum Erreichen des standardisierten Blutdrucks und Pulses wurde die Messsonde senkrecht auf das Gewebe platziert. Es wurden drei Messungen zu je 5 Minuten an dem Transplantat und drei an der umliegenden Nierenrinde vorgenommen, das Auswertungsprogramm errechnet vollautomatisch den Mittelwert der jeweiligen drei Messungen zu einem einzigen Messwert.

Nach Beendung der Messung wurde die Messsonde entfernt und die Niere aus der Halterung befreit. Eine Ligatur wurde 3 mm vom Nierenpol entfernt um die Nierengefäße gelegt und die Nierengefäße wurden mithilfe einer kleinen Schere (Aesculap, Solingen, BRD) abgeschnitten. Die Niere wurde sofort der Formaldehydfixation (4% Formaldehyd, Riedel-de-Haen, Steinheim, BRD) und anschließenden Paraffineinbettung für die histologische Analyse zugeführt oder für die Proteinanalyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Das Peritoneum der Maus wurde mit resorbierbarem Faden zugenäht und die Haut mit Hautklammern verschlossen. Bis zum Aufwachen verblieben die Tiere auf der Wärmeplatte, zur Infektionsprophylaxe wurde eine intraperitoneale Injektion mit Ciprofloxacin (Ciprobay®, bayer, Leverkusen) in einer Dosierung von 5mg/kg Körpergewicht appliziert.

2.8 HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE VERFAHREN

2.8.1 Fixierung und Sektionierung der Transplantate

Die Nieren für die histologische und/oder die immunhistochemische Analyse wurden nach Entnahme in Formaldehyd-Lösung (4%) fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend vom apikalen zum kaudalen Pol quer zur Längsachse in einer Schichtdicke von 7 µm sektioniert (Jung Mikrotom).

2.8.2 Färbung der Schnitte

Paraffinschnitte (7 µm) auf Objektträgern, die im Vorfeld mit Poly-L-Lysin (Merck, Darmstadt, BRD) beschichtet wurden, wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Um die Schnitte zu fixieren und Antigene besser für die Antikörperbindung zugänglich zu machen, wurden sie in Citrat-Puffer in der Mikrowelle bei 600 Watt zweimal für 10 min behandelt.

2.8.2.1 BS-1 Färbung und Messung der vaskulären Dichte

Anschießend wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer mit normalem Ziegenserum inkubiert (NGS, Dakopatts AS Glostrup, Dänemark), welches im Vorfeld im Verhältnis 1:20 in Tris-buffered Saline (TBS) mit 0,1%igem Bovinen Serum Albumin (BSA, Sigma, Steinheim, Deutschland) gelöst wurde. Nach einer Vorbehandlung mit Neuraminidase X (Sigma, Steinheim, BRD) wurden die Schnitte mit biotinyliertem *bandeira simplicifolia* Lectin (BS-1, Sigma, Steinheim, BRD) bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte drei Mal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und für 30 Minuten mit StreptAB Complex (Dako, Glostrupp, Dänemark) bei RT inkubiert, anschließend wurden Fuchsin und 1mM Levamisol (beides von Sigma, Steinheim, BRD) dazugegeben.

Die Messung der vaskulären Dichte erfolgte durch Auszählen der Gefäßquerschnitte in 10 Feldern durch einen für diesen Versuch verblindeten Untersucher mithilfe eines computergestützten Licht-Mikroskopsystems (Motic GmbH, Wetzlar, BRD) bei einer 450-fachen Vergrößerung.

2.8.2.2 Insulinfärbung

Die fixierten Schnitte wurden dreimal mit PBS gespült. Nun wurde endogene Peroxidase durch eine 10-minütige Inkubation mit einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung neutralisiert. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (polyklonaler Meerschweinchen anti-Mausinsulin-Antikörper) in einer Verdünnung von 1:200 über eine Stunde bei Raumtemperatur, als Sekundärantikörper wurde ein polyklonaler Ziege anti-Meerschweinchen-Antikörper verwendet, in einer Verdünnung von 1:20 und einer Inkubationszeit von 30 Minuten

(alle Antikörper von Dako AS, Glostrupp, Dänemark). In diesem Verfahren färbt sich das Zytosol insulinsezernierender Zellen braun an. Zur besseren Kontrastierung wurde als zellnukleäre Gegenfärbung eine Standard Hämatoxylin-Eosin Färbung durchgeführt.

2.9 Proteinextraktion und Messung des Insulin- und VEGF-Gehaltes im ELISA-Verfahren

2.9.1 Proteinextraktion aus den transplantattragenden Nierenproben

Die Aufbereitung der Gewebeproben wurde mittels des Nuclear Extract Kit® (Active Motif, Rixensart, Belgien) durchgeführt.

2.9.1.1 Herstellung des Lysispuffers:

Entsprechend des benötigten Volumens Puffer erfolgte die Lysis-Pufferherstellung anhand folgender Konzentrationen:

- 10% (v/v) 10 mM Dithiotreitol (DTT)
- 1% (v/v) Protease-Inhibitor-Cocktail
- 89% (v/v) Lysispuffer AM1

Die bei -80°C gelagerten Nierenproben wurden zunächst auf Eis mechanisch (Homogenisator, Turrax Ultra Blender T25, Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen, BRD) in Lysispuffer mit einer Gewebekonzentration von 333 mg/ml für 45 Sekunden zerkleinert. Zur Gewebelyse wurden die Proben im Anschluss daran für 30 min auf Eis inkubiert.

Die Proben wurden daraufhin in vorgekühlte Falcon-Röhrchen (15 ml, Greiner, Frankfurt, BRD) überführt und bei 4000 x g für 20 min zentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in ein neues vorgekühltes Falcon-Röhrchen wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt, das Pellet wurde zuvor verworfen. Zur weiteren Klärung des Lysates wurden die Proben mittels eines QIAshredder-Homogenization-Cups (QIAGEN, Hilden, BRD) für 2 min bei 4°C und 10 000 rpm zentrifugiert. Der

Überstand wurde aliquotiert und die portionierten Zell-Lysate bei -80°C für den weiteren Gebrauch gelagert.

2.9.2 VEGF- und Insulin-Bestimmung im Gewebelysat mittels ELISA

Die Bestimmung der VEGF-Konzentration im Gewebelysat erfolgte mittels Quantikine Human VEGF Immunoassay bzw. Quantikine Mouse VEGF Immunoassay (beide R&D Systems, Abingdon, UK).

Die Bestimmung der Insulin-Konzentration erfolgte mittels ALPCO Mouse Insulin ELISA (Alpco, Windham, USA).

2.9.2.1 Testprinzip

Dieser Test nutzt die quantitative Sandwich-Immunoassay-Technik. Hierfür befindet sich ein monoklonaler VEGF- oder Insulin-Antikörper bereits immobilisiert auf einer 96-well Platte. Entsprechende Standards für VEGF bzw. Insulin sowie die Proben werden in die jeweiligen wells pipettiert. Das in den Proben bzw. in den Standards vorhandene zu messende Protein bindet an den immobilisierten monoklonalen Antikörper. Alle ungebundenen Substanzen werden in einem folgenden Waschschritt entfernt. In nächsten Schritt wird ein Enzym-gebundener polyklonaler VEGF- bzw. Insulin-Antikörper in die entsprechenden wells pipettiert. Nach einem erneuten Waschschritt zur Entfernung des ungebundenen Antikörper-Enzym-Reagenzes erfolgt die Substrat-Zugabe. Die Farbentwicklung erfolgt proportional zur Menge des in den jeweiligen Proben vorhandenen Proteins, das im Initial-Schritt gebunden worden war. Die Farbentwicklung wird gestoppt und die optische Dichte im ELISA-Reader photometrisch gemessen. Die Standardreihe ermöglicht die Berechnung der Konzentrationen in den untersuchten Proben.

2.9.2.2 Test-Ablauf des quantitativen ELISAs:

Die Messung der VEGF- bzw. Insulinkonzentration in den Proben erfolgte gemäß den Angaben des ELISA-Kit-Herstellers. Die Schritte im Einzelnen:

- Vorbereitung der Reagenzien und Standards.
- In jedes well werden 50 µl Assay-Diluent pipettiert.

- Danach werden 200 µl Standard bzw. Probe in jedes well pipettiert, jeder Ansatz jeweils im Duplikat.
- Die Well-Platte wird mit Folie verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.
- Mit jeweils 400 µl Waschpuffer/well erfolgen 3 Waschschritte (Autowascher, SLT, TECAN, Salzburg, Österreich). Nach dem dritten Waschschritt wird die Platte auf Zellstoff vorsichtig ausgeklopft.
- Nun werden die VEGF- bzw. Insulin-Conjugate pro well zugegeben. Die Platte wird mit entsprechender Folie verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach einem Waschschritt werden 200 µl Substratlösung pro well zugegeben, danach 50 µl Stopp-Lösung.
- Innerhalb von 30 min wird nun die optische Dichte mittels eines Mikroplatten-Readers (TECAN, Rainbow, Salzburg, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Auswertung und Berechnung der Protein-Konzentrationen anhand der Standard-Reihe erfolgt anhand des zugehörigen Auswertungsprogramms (Magellan, TECAN, Salzburg, Österreich).

2.10 STATISTISCHE AUSWERTUNG

2.10.1 Allgemeine Angaben

Die Eingabe der Rohdaten in tabellarischer Form erfolgte mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms MS Excel® für Windows®, die Erstellung der Arbeit mithilfe des Textbearbeitungsprogramms MS Word ® für Windows® (Microsoft GmbH, Unterschleissheim, BRD).

Bei allen angewandten statistischen Verfahren wurde ein Signifikanzniveau von $P<0,05$ angenommen. Die Signifikanzniveaus wurden kenntlich gemacht durch

***** = $P<0,05$; ****** = $P<0,01$; ******* = $P<0,001$.

Alle statistischen Tests wurden mithilfe des Computerprogramms Sigma Stat® für Windows durchgeführt, alle graphischen Darstellungen mithilfe des Graphikprogramms Sigma Plot® für Windows (SPSS Corporation, Chicago IL, USA).

2.10.2. Varianzanalysen

Die Ergebnisse einer Varianzanalyse sind nur dann verlässlich, wenn die Werte zum einen normalverteilt sind und zum anderen gleiche Varianzen besitzen. Diese Prüfung erfolgt von Sigma Stat® durch einen Test auf Normalverteilung (nach Kolmogorov-Smirnov) und den Levene-Median-Test auf gleiche Varianzen. War eine dieser Bedingungen nicht erfüllt, so wurde die Rangordnung der Werte bestimmt und die Varianzanalyse mit diesen Rangwerten durchgeführt [119].

Alle Varianzanalysen wurden durch ANOVA erstellt, die Varianzanalyse der Interaktionen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte nach Tukey.

Die statistische Auswertung der Daten aus den Blutflußmessungen erfolgte teilweise mithilfe des in dem Laser-Doppler-Messprogramm Perisoft® für Windows integrierten Statistikprogramms (Perimed AB, Stockholm, Schweden).

3. ERGEBNISSE

3.1 VORVERSUCHSGRUPPEN

3.1.1 Versuchsgruppe VG-1: Persistenz von Spender-Endothelzellen im Insel-Transplantat

In der Vorversuchsgruppe 1 (VG-1) wurden Inseln aus Tie2LacZ-positiven Mäusen transplantiert, an deren endothelzell-spezifischem Tie2-Rezeptor eine ß-Galaktosidase angekoppelt ist. Dadurch können diese Zellen in einer immunhistochemischen Reaktion dargestellt werden.

Es wurden insgesamt 8 Transplantationen in diabetischen Tieren vorgenommen, wobei jeweils 300 Inseln aus Tie2LacZ positiven Mäusen (8-10 Wochen alt) in diabetische Empfänger (Wildtyp C57Bl/6J, männlich, 8-10 Wochen alt) unter die Nierenkapsel transplantiert wurden. An den Tagen 5, 10, 20 und 35 wurden jeweils zwei Tiere getötet, die transplantattragende Niere wurde entnommen, es wurden histologische Schnitte erstellt und das Vorhandensein von LacZ-positiven Endothelzellen im Transplantat wurde überprüft.

An jedem der Untersuchungstage konnten im Transplantat Spender-Endothelzellen identifiziert werden, exemplarisch sind hier histologische Schnitte der Untersuchungen an den Tagen 20 und 35 dargestellt (Abbildung 4A und 4B). Obwohl das Tie-2 Molekül spezifisch für Endothelzellen ist, kann seine Expression lediglich nachgewiesen werden, wenn die Tie2-Produktion aktiviert ist [120]. Somit ist Tie2 nicht nur ein Marker für Endothelzellen, sondern auch für deren Aktivierungszustand.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen zu jedem der untersuchten Zeitpunkte aktive Endothelzellen, dies nicht nur im Inneren des Transplantates, sondern auch im Randgebiet der anliegenden Nierenrinde, was zudem ein Indiz für eine vorhandene Migration der Endothelzellen posttransplantational darstellt.

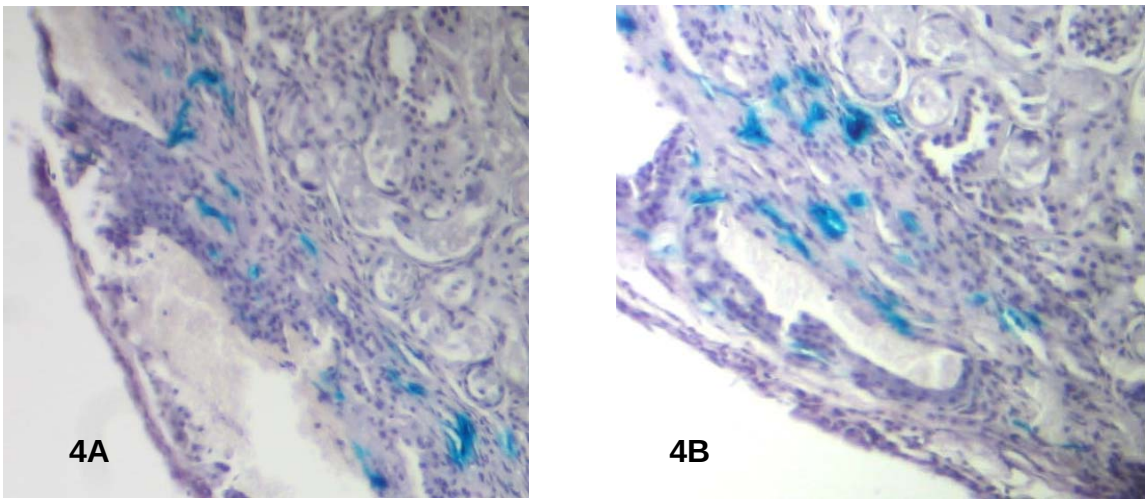

***Abbildung 4A, 4B**. Darstellung LacZ-markierter Spender-Endothelzellen innerhalb des Inselzelltransplantates in der diabetischen Empfängermaus am Tag 20 (Abbildung 4A) und 35 (Abbildung 4B)*

3.1.2 Gruppe VG-2 Etablierung eines suboptimalen Inselzahl-Modells

In mehreren Vorversuchen wurden insgesamt 20 Transplantationen mit Inseln von Wildtyp-C57Bl/6J Mäusen in diabetische Wildtyp-C57Bl/6J Mäuse vorgenommen. Bei einer Inselzellzahl von 150 Inseln erreichten 33% der diabetischen Empfänger (Körpergewicht zwischen 25-30 g und einem prätransplantationalen Nüchternblutzucker zwischen 250 und 350 mg/dl) posttransplantational eine normoglykämische Stoffwechsellage (Nüchternblutzucker <200 mg/dl). Diese Inselzahl wurde als suboptimale Inselzellmasse definiert.

3.1.3 Gruppe VG-3: Bestimmung der Sekretionskapazität für Insulin und VEGF

An insgesamt 12 Mäusen (6 Wildtyp und 6 RIP-VEGF-A) wurde ein intraperitonealer Glukose-Toleranztest mit 3 g Glukose pro kg Körpergewicht durchgeführt. Unmittelbar vor der Glukose-Applikation (Zeitpunkt „0“) und nach 10, 20 und 40 Minuten wurde aus der Schwanzvene Blut entnommen und Blutzucker, Serum-Insulin (Zeitpunkte 0 und 20) sowie Gesamt-Plasma-VEGF (Zeitpunkte 0,10, 20, 40) bestimmt. Es zeigte sich zu allen Messzeitpunkten ein deutlich höherer VEGF-Serumspiegel bei den RIP-VEGF-A Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen,

der Unterschied war am größten zum Zeitpunkt 40 Minuten (31,5 pg/ml vs. 18,5 pg/ml). Statistisch war der Unterschied in den VEGF-Spiegeln zu allen Zeitpunkten signifikant (Zeitpunkt 0 p<0,007, Zeitpunkt 10 p<0,006, Zeitpunkt 20 p<0,004 und Zeitpunkt 40 p<0,001). Bei den gemessenen Insulinspiegel gab es zu den beiden gemessenen Zeitpunkten (0 und 20 Minuten) keine signifikanten Unterschiede. Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte der VEGF bzw Insulinmessungen zu den jeweiligen Messzeitpunkten, in Abbildung 5 werden diese graphisch dargestellt.

	Zeitpunkt	**RIP**	**WT**	**P**
	0	17,7±3,6	8,1±5,6	<0,007
VEGF	***10***	18,6±3,2	8,7±5,9	<0,006
[pg/ml]	***20***	20,7±4,0	8,9±6,3	<0,004
	40	32,8±4,1	9,5±6,4	<0,001
Insulin	***0***	2,9±0,9	2,0±0,7	n. s.
[ng/ml]	***20***	9,7±1,5	8,7±0,6	n. s.

Tabelle 4: *VEGF und Insulinspiegel vor (Zeitpunkt 0) und nach Injektion von 3g Glukose / kg Körpergewicht.*

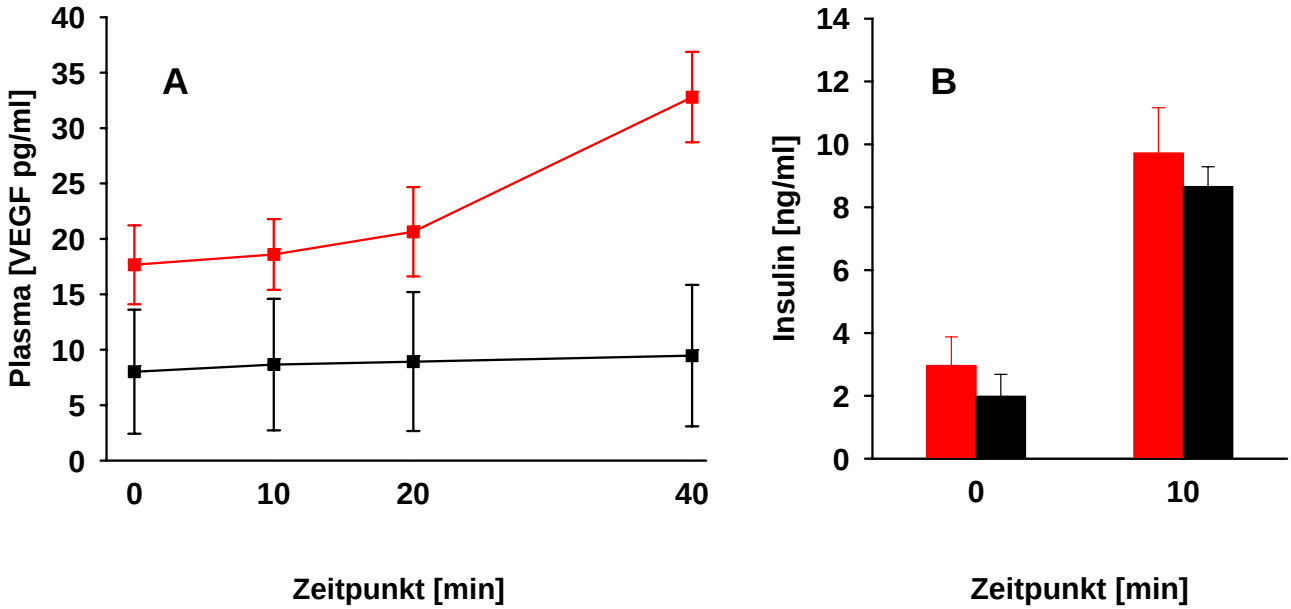

Abbildung 5*: VEGF (A) und Insulinspiegel (B) vor (Zeitpunkt 0) und nach Injektion von 3g Glukose / kg Körpergewicht. Rot dargestellt RIP-VEGF-A Mäuse, schwarz Wildtyp-Mäuse.*

3.2 HAUPTVERSUCHSGRUPPEN - TRANSPLANTATIONSEXPERIMENTE MIT RIP-VEGF INSELN

In den Hauptversuchsgruppen wurden jeweils 150 Inseln von RIP-VEGF Mäusen beziehungsweise Wildtyp-Mäusen diabetischen Wildtyp-C57Bl/6J Mäusen unter die Nierenkapsel transplantiert. Es wurden insgesamt 20 Transplantationen vorgenommen. Abbildung 6 zeigt ein subnephrokapsuläres Transplantat. Um mögliche postoperative Einflüsse auf den Blutzuckerspiegel auszuschließen, wurde mit der Messung des Blutzuckerspiegels an Tag 2 post transplantationem begonnen, die Werte wurden täglich bis zum jeweiligen Versuchsende protokolliert. In der Abbildung 7 sind die Blutzuckerverläufe der Tiere beider Hauptversuchsgruppen (HG-1 und HG-2)<graphisch dargestellt.

Die Nummerierung der Versuchstage beginnt einen Tag vor der Transplantation an (Tag -1) und geht bis zum Tag 12. Mit Tag „0“ ist der Transplantationstag gekennzeichnet.

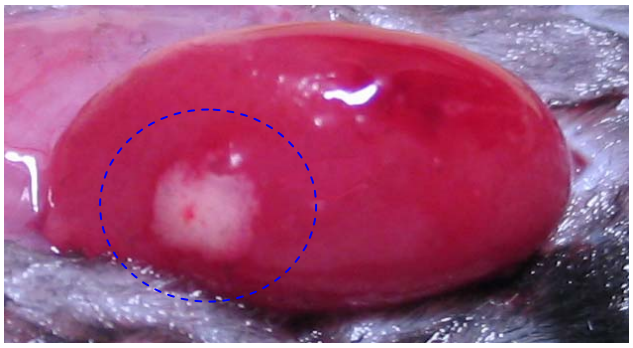

Abbildung 6: *Fotografische Darstellung eines subnephrokapsulären Inselzell-Transplantates*

Die Empfängertiere von RIP-VEGF-A-Inseln weisen ab Tag 2 post transplantationem normoglykämische Blutzuckerwerte auf, die bis zum Versuchsende an Tag 12 eingehalten werden. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der Transplantation von Wildtyp-Inseln nach anfänglicher Normoglykämie, welche am ehesten durch eine postoperativ verminderte Nahrungsaufnahme bedingt ist, ein funktionelles Transplantatversagen.

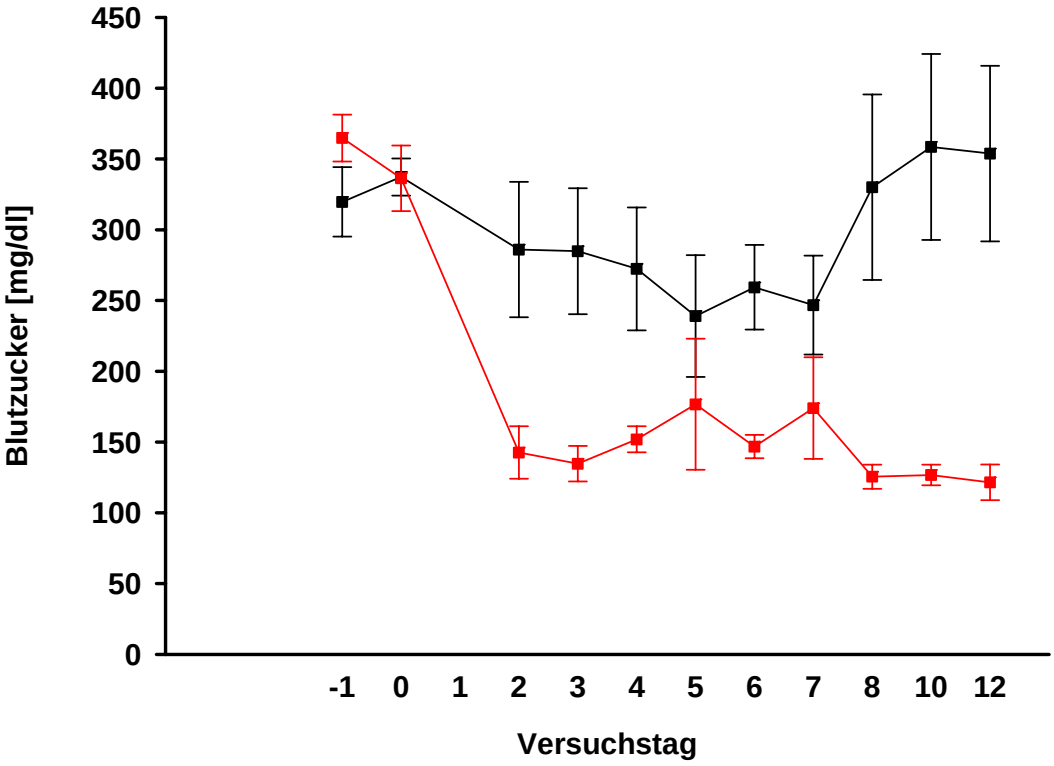

***Abbildung 7**: Graphische Darstellung der Blutzuckerverläufe in den beiden Hauptversuchsgruppen HG-1 und HG-2. Rot dargestellt die Empfänger von RIP-VEGF-A Inseln, schwarz die Empfänger von Wildtyp-Inseln.*

3.2.1 Messung der Durchblutung von Transplantaten

An weiteren 12 Tieren wurde am Tag 12 die Durchblutung des Transplantates im Laser-Dopplerverfahren gemessen (Gruppe HG-2).

Die Messung der Durchblutung in den Transplantaten ergab dabei eine wesentlich höhere Durchblutung in den RIP-VEGF-A Transplantaten im Vergleich zu den Wildtyp-Transplantaten. Als Referenz galt bei jeder Messung die Perfusion an der benachbarten Nierenoberfläche, in Vorarbeiten [73] wurde gezeigt, dass zwischen dieser und der Durchblutung nativer Inseln im Pankreas eine gute Übereinstimmung besteht. So ergab die Perfusionsmessung für die RIP-VEGF-A Transplantate eine prozentuale Differenz zu der Nierenoberfläche von 9%, die Perfusionsmessung an Wildtyptransplantaten eine prozentuale Differenz von 36% bei einem Sigifikanzniveau $p<0,001$ (***).

In der Tabelle 5 sind die Perfusionsergebnisse der einzelnen Versuchstiere dargestellt, sowie die prozentualen Abweichungen von der jeweiligen Nierenoberfläche.

Maus	transpl. Inseln	Durchblutung					
		Niere [PU]	Std. Abw.	Transplantat [PU]	Std. Abw.	*Differenz [%]*	*Std. Abw. [%]*
HG2-1	WT	200,09	14,97	138,18	32,04	-31%	20%
HG2-2	WT	197,85	23,07	111,53	19,13	-44%	15%
HG2-3	WT	208,70	7,47	144,53	21,71	-31%	12%
HG2-4	WT	199,36	23,82	125,76	6,62	-37%	10%
HG2-5	WT	207,98	27,89	152,94	25,25	-26%	19%
HG2-6	WT	206,56	15,43	127,83	26,06	-38%	16%
HG2-7	RIP	203,48	13,66	208,13	12,91	2%	12%
HG2-8	RIP	205,50	7,42	182,44	13,61	-11%	9%
HG2-9	RIP	211,08	9,54	181,34	68,81	-14%	35%
HG2-10	RIP	198,78	10,77	172,87	16,52	-13%	12%
HG2-11	RIP	202,35	31,98	177,81	34,79	-12%	27%
HG2-12	RIP	211,09	17,45	200,37	16,91	-5%	15%

***Tabelle 5**: Durchblutung innerhalb des Transplantates, der Nierenoberfläche und die prozentuale Differenz der Transplantatdurchblutung von der jeweiligen Nierenoberflächendurchblutung. Angaben in perfusion units [PU] bzw. [%].*

3.2.2 Bestimmung des Gesamtgehaltes an VEGF (HG-1)

Bei einem Teil der Tiere (n=6, jeweils 3 Mäuse aus jeder Transplantationsgruppe) wurde am Tag 7 post transplantationem mittels ELISA der Gesamtgehalt an VEGF (human und murin) bestimmt (Abbildung 8). Es zeigte sich dabei ein signifikant höherer VEGF-Gesamtgehalt in den RIP-VEGF-A Transplantaten als in den Wildtyp-Transplantaten (91,66±43,79 pg/mg versus 34,97±23,78 pg/mg), Signifikanzniveau $p<0,01$ (**).

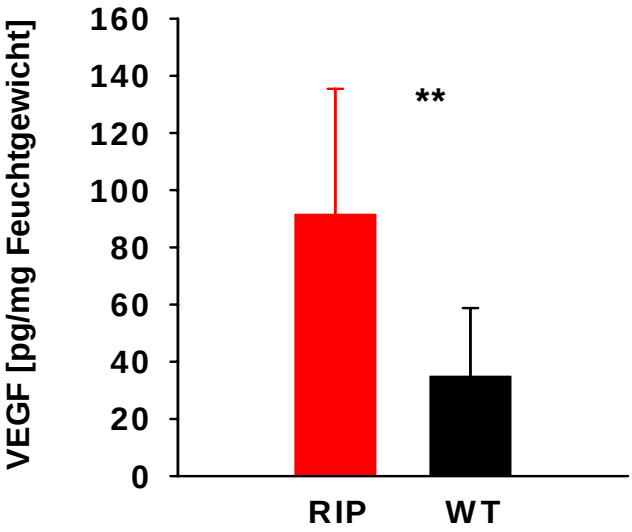

***Abbildung 8**: Gesamtgehalt an VEGF [pg/mg Feuchtmasse]. p<0,01 (**).#*

3.2.3 Messung des Gesamtgehaltes an Insulin

Nach der Perfusionsmessung wurden die transplantattragenden Nieren entnommen und in einem Teil der Organe (n=6, jeweils 3 aus jeder Transplantationsgruppe) wurde der Gesamtgehalt an Insulin mittels ELISA bestimmt. Die Messung ergab einen signifikant höheren Gesamt-Insulingehalt in RIP-VEGF-A Transplantaten im Vergleich zu Wildtyp-Transplantaten, 1052±201 ng/ml versus 206±337 ng/ml bei einem Signifikanzniveau von p<0,01 (**). In der Abbildung 9 werden die jeweiligen Mittelwerte der Insulinspiegel graphisch dargestellt.

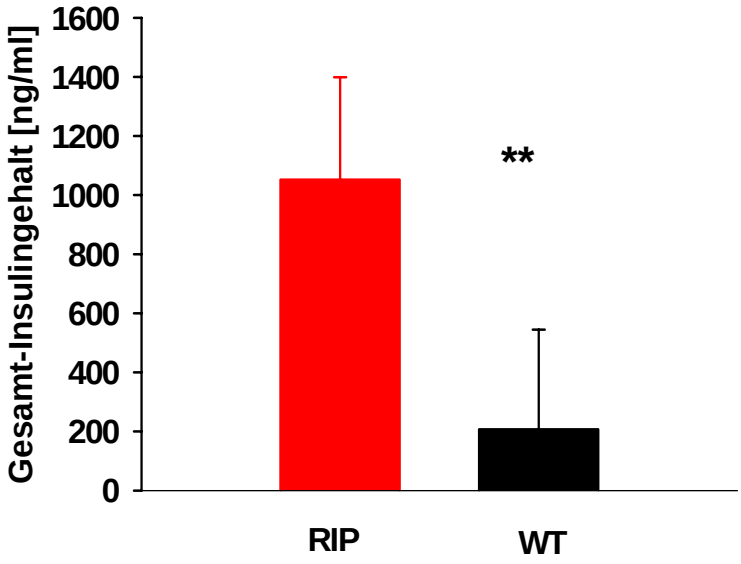

Abbildung 9: *Gesamtgehalt an Insulin der transplantattragenden Nieren am Tag 12, rot dargestellt bei RIP-VEGF-A Transplantaten, schwarz bei Wildtyp-Transplantaten. p<0,01 (**).*

Als Korrelat zu dem in dieser Arbeit gemessenen Transplantat-Insulingehalt, wurde in einem Parallelversuch unserer Arbeitsgruppe die Betazellmasse innerhalb der transplantattragenden Nieren Tag 14 post transplantationem quantifiziert am. Hierzu wurde anhand von histologischen Schnitten die relative Fläche Insulinfärbung-positiver Zellen errechnet und mit der Schnittdicke multipliziert. Diese Messung ergab eine signifikant höhere Betazellmasse innerhalb der RIP-VEGF-A Transplantate im Vergleich zu den WT-Transplantaten (1,82±0,53 mg in RIP-VEGF-A Transplantaten versus 0,96±0,31 mg in WT-Transplantaten, *p*=0,02).

3.2.4 Histologische und immunhistochemische Analyse

Ein Teil der transplantattragenden Nieren wurde histologisch aufgearbeitet und die Schnitte wurden immunhistochemisch analysiert, dabei wurden mithilfe eines Lectins (Bandeirea simplicifolia) Endothelzellen innerhalb der Transplantate dargestellt. Durch Auszählen von Gefäßdurchschnitten wurde im Anschluss die Gefäßdichte innerhalb der Transplantate berechnet (Abbildung 10A+B).

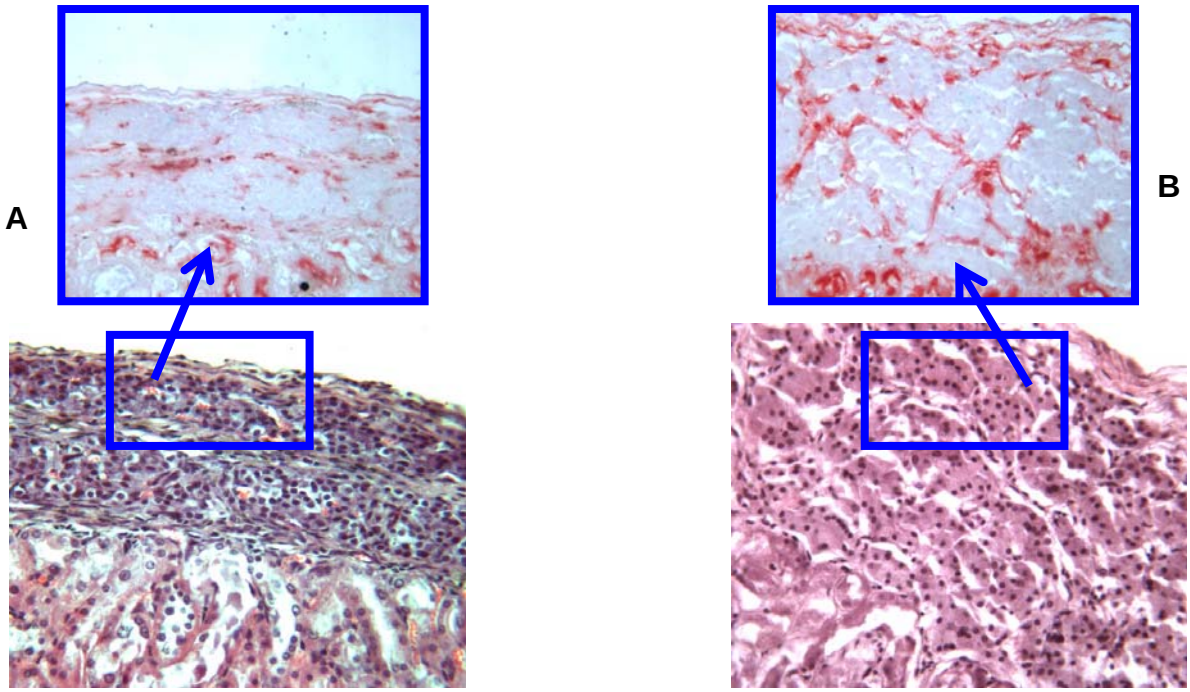

Abbildung 10: *Histologische Schnitte eines Wildtyp-Transplantates (Ab. 10A) bzw. eines RIP-VEGF-A-Transplantates (Abbildung 10B). Bandeirea simplicifolia Färbung mit Hämatoxylin-Eosin-Gegenfärbung, 200-fache Vergrößerung. In den Ausschnittskästen die entsprechende Lektinfärbung (400-fache Vergrößerung) mit Darstellung der Endothelien.*

	Wildtyp-Transplantat	**RIP-VEGF-A-Transplantat**
Vaskuläre Dichte	17 ± 8 / mm^2	28 ± 9 / mm^2

Tabelle 6: *Vaskuläre Dichte innerhalb der Transplantate am Tag 12 post transplantationem.*

Die immunhistochemische Analyse ergab als morphologisches Korrelat zu dem höheren VEGF-A-Gehalt eine signifikant höhere Gefäßdichte (Tabelle 8) innerhalb der RIP-VEGF-A Transplantate im Vergleich zu den Wildtyp-Transplantaten (17±8/mm^2 versus 28±9/mm^2 bei einem Signifikanzniveau von $p<0,05$ (*).

3.2.5 Langzeit-Blutzuckerprotokollierung

Zwei der diabetischen Empfängermäuse wurden nach der Transplantation von RIP-VEGF-A Inseln und der darauf folgenden Wiederherstellung der Normoglykämie für einen Zeitraum von 6 Monaten gehalten, dabei wurde der Blutzucker einmal wöchentlich protokolliert. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Transplantation einer suboptimalen Anzahl von RIP-VEGF-A Inseln die normoglykämische Stoffwechsellage auch dauerhaft erhalten werden kann (Ergebnisse nicht dargestellt).

4. DISKUSSION

Im Gegensatz zum vaskularisierten Pankreastransplantat verlieren isolierte Inseln im Rahmen der Aufreinigung ihr hochkomplexes Kapillarsystem, eine Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff findet in den ersten Tagen post transplantationem lediglich über Diffusion statt. Eine rasche Wiederherstellung dieses Kapillarnetzwerkes ist somit eines der Hauptprobleme, die bewältigt werden müssen, um die Zukunft der Inselzelltransplantation als einzige kurative Therapieoption des Diabetes mellitus Typ 1 zu sichern.

Langzeitstudien haben gezeigt, dass eine gute Blutzuckereinstellung die Entstehung und Progression von diabetischen Folgeschäden- und krankheiten verhindern kann. Im Gegensatz zu der konventionellen Insulintherapie des Diabetes mellitus Typ 1 sind die Transplantation von Pankreata oder von pankreatischen Inseln zur Zeit die einzigen Verfahren, die eine Wiederherstellung einer konstanten Normoglykämie und eine weitgehende Verhinderung hypoglykämischer Episoden bieten – eine typische und bei enger Blutzuckereinstellung sehr häufige, unerwünschte Wirkung täglicher Insulininjektionen.

Seit Einführung des Edmonton-Protokolls in der Inseltransplantation [28] ist es gelungen, bei weit mehr als 50% der transplantierten Diabetiker eine weitgehende Insulinunabhängigkeit und eine nahezu regelrechte Glukosetoleranz zu erreichen.

Eine der größten Schwierigkeiten, von deren Lösung in entscheidendem Maße die Zukunft dieses Verfahrens abhängt, ist die sehr große Anzahl an Spenderorganen die benötigt werden, um eine erfolgreiche Transplantation durchzuführen. Einer der Hauptgründe für die sehr hohe Anzahl an benötigten Inseln ist der hohe Prozentsatz an unmittelbar nach der Transplantation zugrunde gehenden Inselzellen. Die Gründe für dieses frühe Absterben der transplantierten Inseln sind immunologischer (Abstoßungsreaktionen aber auch Schäden durch die immunsuppressive Therapie) und nichtimmunologischer Natur, hier insbesondere die gestörte Ausbildung von Gefäßen innerhalb der transplantierten Inseln und, implizit, eine gestörte Anbindung an das nutritive Gefäßsystem des Empfängers. Aus vielen vorangehenden Studien ist bekannt, dass es bei lediglich 30-40% der transplantierten Inseln zu einem dauerhaften, primären Anwachsen im Empfängerorganismus kommt.

Während der Isolationsprozedur verlieren Inseln ihr hochkomplexes Gefäßsystem [87], die avaskulär transplantierten Inseln können lediglich über Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Die Initiierung der Revaskularisation erfolgt durch die Sekretion von angiogenen Wachstumsfaktoren durch die Inseln [57, 73], [121], wobei die Umstellung der Expression von angiogenen Faktoren den Revaskularisationsprozess steuert. Inseln reagieren auf eine lokal verminderte Sauerstoffzufuhr mit einer Serie von Mechanismen, unter anderem der Steigerung der VEGF-Expression [122]. Unter hypoxischen Bedingungen kultivierte Inseln zeigen eine Hochregulation der VEGF-Expression [123]. Die in einigen Vorpublikationen unterstrichene Tatsache, dass die Durchblutung transplantierter Inseln im Vergleich zu der nativer pankreatischer Inseln stark vermindert ist, zeigt jedoch, dass die angiogene Kapazität der transplantierten Insel unzureichend ist.

Zudem weisen einige aktuelle Untersuchungen darauf hin, dass die im Rahmen der klinischen Inselzelltransplantation angewandten Immunsuppressiva Ciclosporin, Sirolimus und Tacrolimus eine antiangiogene Wirkung haben [124], [125]. Wenn auch die molekularen Grundlagen dieser Inhibition noch nicht ausreichend bekannt sind, so kann deren Anwendung bei Insel-Transplantierten zu einer weiteren Verschlechterung der Revaskularisation der Inseln führen.

Eine rasche Wiederherstellung eines adäquaten mikrovaskulären Systems in transplantierten Inseln ist von entscheidender Bedeutung für das primäre Anwachsen und für das Langzeitüberleben und die Langzeitfunktion von Inselzell-Transplantaten [126].

In dieser Arbeit haben wir überprüft, ob eine durch gesteigerte VEGF-Konzentration am Transplantationsort verstärkte Angiogenese zu einer verstärkten Durchblutung der Transplantate führt und diese verstärkte Perfusion das Überleben und die Funktion transplantierter Inseln verbessert – als Schlüssel zur Reduktion der für die Heilung des Diabetes mellitus Typ 1 benötigten Inselzahl.

Wir transplantierten Inseln, die unter der Kontrolle des Ratten-Insulinpromoter RIP [127] glukoseabhängig vermehrt VEGF produzieren, unter die Nierenkapsel von Empfängermäusen, bei denen im Vorfeld durch Streptozotozin ein experimenteller, primär insulinabhängiger Diabetes mellitus induziert wurde. Zur Überprüfung der verstärkten Expression von VEGF-A, bestimmten wir den Gesamtgehalt an VEGF-A

in den einzelnen Transplantaten am Tag 7 nach der Transplantation, wobei RIP-VEGF-A Transplantate einen wesentlich höheren VEGF-A-Gehalt aufwiesen (Abbildung 8).

In den Transplantationsexperimenten konnten wir zeigen, dass:

i) eine topisch in den transplantierten Inseln erhöhte Expression des vaskulären Wachstumsfaktors VEGF-A zu einer verbesserten morphologischen und funktionellen Revaskularisation führt.

ii) diese verbesserte Durchblutung mit einer höheren Überlebensrate transplantierter Inseln assoziiert war, wodurch die Anzahl der für eine erfolgreiche Transplantation und glykämischen Kontrolle im diabetischen Empfänger benötigten Inseln verringert werden konnte.

Als erstes zeigten wir, dass bei der Transplantation von Inseln mit einer erhöhten VEGF-A Sekretion im Rahmen eines Minimalen-Inselzahl-Experimentes die Anzahl der für eine erfolgreiche Transplantation benötigten pankreatischen Inseln um die Hälfte reduziert ist im Vergleich zu der Transplantation von Wildtyp-Inseln (Abbildung 7). Als eine mögliche plausible Erklärung dieses verbesserten Überlebens transplantierter Inseln fanden wir eine verbesserte Revaskularisation in den transplantierten RIP-VEGF-A Inseln im Vergleich zu den Wildtyp-Inseln.

Diese verbesserte Wiederherstellung von Gefäßen in den transplantierten Inseln konnte sowohl funktionell, anhand einer wesentlich höheren Durchblutung von RIP-VEGF-A Transplantaten (Tab. 5), als auch – als Korrelat hierzu – morphologisch, anhand einer signifikant Verstärkten endothelialen Anfärbung histologischer Schnitte von RIP-VEGF-A Transplantaten (Tab. 6, Abbildung 10A und 10B) gezeigt werden.

Als Korrelat für die bessere glykämische Kontrolle einerseits und für die höhere Überlebensrate / Inselzellmasse andererseits wiesen 7 Tage nach der Transplantation alle RIP-VEGF-A Transplantate einen wesentlich höheren Insulingehalt auf als die Wildtyp-Inseltransplantate (Abbildung 9).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass eine erhöhte VEGF-A-Konzentration am Transplantationsort die vaskuläre Dichte und die Durchblutung der Transplantate steigert, dadurch das primäre Anwachsen des Transplantates fördert

und eine Glykämiekontrolle in transplantierte, STZ-induzierte diabetische Mäuse mit einer suboptimalen Inselzahl ermöglicht.

Betrachtet man jedoch erneut die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass es bei den Empfängertieren, welchen RIP-VEGF-A Inseln transplantiert wurden unmittelbar in den ersten 1-3 Tagen nach der Transplantation zu einem Sinken des Blutzuckerspiegels und einer verbesserten glykämischen Kontrolle kommt, eine geraume Zeit bevor es zu der Ausbildung neuer Gefäße kommen konnte. Daraus ergibt sich, dass der günstige Effekt der erhöhten VEGF Konzentration am Transplantationsort nicht allein über eine verstärkte Angiogenese vermittelt wird, sondern dass auch weitere, bereits unmittelbar post transplantationem eingreifende Eigenschaften des VEGF eine große Rolle spielen. So konnten Stagner et al 2004 zeigen [110], dass VEGF auch über andere Mechanismen als die bereits 1992 gezeigte verstärkte Angiogenese [38] das Transplantationsergebnis wesentlich verbessern vermag, so über eine Hemmung der Expression von INF-γ, einer Hemmung der Transduktionskaskaden von Apoptose und Nekrose und über eine Förderung der Expression von Zellschutzproteinen. In diesem Zusammenhang ist denkbar, dass VEGF über die Hemmung der Expression von INF-γ indirekt auch die Induktion und Präsentation von MHC I und II Antigenen auf Inselzellen hemmen könnte [128]. Weil Immunabstoßung und (inadäquate) Revaskularisation jedoch in etwa derselben Zeitspanne stattfinden, haben wir aus Gründen der klaren Abgrenzbarkeit dieser beiden Effekte in der vorliegenden Arbeit ein isogenes Transplantationsmodell verwendet.

Die zytoprotektiven Effekte des VEGF sind auch aus anderen Ansätzen bekannt, so z.B. im Rahmen der Nierenangiogenese [129]. VEGF vermittelt zudem antiapoptotische Signale auf Endothelzellen [109], diese Eigenschaft spielt sicherlich auch bei dem Überleben von Spender-Endothelzellen im Rahmen der Inseltransplantation eine Rolle.

So kann von einer bivalenten Rolle von VEGF-A im Rahmen der Inseltransplantation gesprochen werden, einerseits als zytoprotektives Agens während der Überbrückungsphase bis zur Revaskularisierung und andererseits als potenter Induktor der Angiogenese. Der vaskuläre Endotheliale-Wachstumsfaktor VEGF spielt auch eine wesentliche Rolle in der Organogenese des endokrinen Pankreas und in der Aufrechterhaltung dessen physiologischer Funktion [101], er ist ein starker

Induktor der Neoangiogenese und steuert die Ausbildung und Wiederherstellung der spezifischen Gefäßsysteme endokriner Drüsen [102], [130], [131]. Die Beta-Zelle führt über eine parakrine Sekretion von VEGF-A zur Anlockung von Endothelzellen aus benachbarten Gefäßen, die dann unter Einfluss des VEGF über die Vorstufe primitiver tubulärer Strukturen Mikrokapillaren ausbilden [102]. Auch unter dem Einfluss des VEGF kommt es dann zur Ausbildung der für das Gefäßsystem des endokrinen Pankreas spezifischen Merkmale wie Fenestrierung und implizit gesteigerte Permeabilität der endothelialen Gefäßauskleidung [103], [104]. Das ermöglicht einen Abstand zwischen randständigen Insulingranula innerhalb der Beta-Zellen und Blutstrom im benachbarten Blutgefäß von <500 nm, was die extrem schnelle Insulinreaktion nativer pankreatischen Inseln auf einen Glukosereiz erklärt.

Aus der Vielzahl an bekannten, vaskulären und endothelialen Wachstumsfaktoren erscheint VEGF-A am besten geeignet, in der Inselzelltransplantation zur Verbesserung des Transplantationsergebnisses Anwendung zu finden.

Der Ansatz, die Wiederherstellung eines adäquaten mikrovaskulären Systems durch Erhöhung der Konzentration an proangiogenen Wachstumsfaktoren am Transplantationsort erscheint vor dem Hintergrund der vorangegangenen Ausführungen ein geeigneter Mechanismus zu sein, die Zahl der posttransplantational überlebenden Inseln zu erhöhen, die Funktion der überlebenden Inseln zu verbessern und die Anzahl an Spenderorganen, die nötig sind für eine Heilung des Diabetes, zu reduzieren. Zumal aus Vorarbeiten bekannt ist, dass die Expression von VEGF in transplantierten Inseln vermindert und die seiner Rezeptoren verspätet ist, wobei diese Verminderung im hyperglykämisches Milieu verstärkt ist [81], [132], [133], [134].

Dieser Ansatz einer verbesserten Transplantat-Revaskularisierung über ein erhöhtes Angebot an vaskulären Wachstumsfaktoren am Transplantationsort wurde bereits in verschiedenen Versuchen verwirklicht. So zeigten Stagner und Mitarbeiter 1992 ein verbessertes Transplantationsergebnis nach Vorbehandlung des Implantationsortes durch topische VEGF-Applikation [38]. Auch führte in einem anderen Ansatz die Transfektion pankreatischer Inseln mit humaner VEGF cDNA ebenfalls zu einer verstärkten Ausbildung von Gefäßen innerhalb der Transplantate und zu einem höheren Insulingehalt derselben [135]. Sigrist et al [113] zeigten in einem Versuchsaufbau, in welchem Inseln in den Peritonealraum transplantiert wurden,

nachdem sie in Kollagen in Gegenwart von VEGF immobilisiert und anschließend in Mikrokapseln eingeschlossen wurden, dass die lokale Freisetzung von VEGF innerhalb der Transplantate das Überleben letzterer signifikant verbesserte und zu einer verbesserten und verlängerten physiologischen Glykämiekontrolle im STZ-induziertem Diabetes mellitus der Maus führte.

Ferner werden auch in anderen therapeutischen Konzepten die proangiogenen Eigenschaften von VEGF verwendet, so z.B. in der Therapie von arteriellen Verschlusskrankheiten (koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit) mittels Plasmid- oder adenoviralem Vektor eingebaute VEGF-Genteile [136], [137], so dass es nahe liegt, die gleiche Strategie der lokoregionären Freisetzung von angiogenen Molekülen in Inseltransplantaten zu verfolgen.

Ein weiterer, im Zusammenhang der Rolle des Empfängers und des Spenders in der Ausbildung neuer Blutfgefäße innerhalb des Transplantates noch zu diskutierender Punkt ist derjenige des Überlebens von Spender-Endothelzellen innerhalb des Transplantates, welche dann für die Ausbildung neuer Kapillaren nach der Transplantation rekrutiert werden können. In der überwiegenden Mehrzahl der bis jetzt veröffentlichten Studien wurde postuliert, dass Inseln im Rahmen des enzymatischen Collagenase-Isolationsverfahrens ihr Gefäßsystem und die inselgebundenen Endothelzellen verlieren und es somit keine Persistenz von Spenderendothelzellen in dem Transplantat geben kann [48], [138], [139]. Im Gegensatz dazu konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass inseleigene Endothelzellen bis über den 21. Tag posttransplantational persisitieren und darüber hinaus *aktiv* an der Ausbildung neuer Gefäße innerhalb des Transplantates beteiligt sind [117].

Um diese Ergebnisse auch im Modell der Inseltransplantation bei STZ-induziertem primär insulinabhängigem Diabetes mellitus zu bestätigen, transplantierten wir im Vorfeld Inseln aus Mäusen, an deren endothelzellspezifischen Tie2-Gen das Gen für Beta-Galaktosidase gebunden wurde, in diabetische Empfänger. Wir konnten in diesem Ansatz zeigen, dass spendereigene, inselzellgebundene Endothelzellen nach der Transplantation über den 35. Tag hinaus im Transplantat in einem aktiven Zustand persistieren und in einem frühen Stadium der Revaskularisation, durch den

VEGF-Reiz angelockt, Gefäßvorläufer innerhalb der Insel ausbilden können. Unterstützend hierzu kommt auch die Tatsache, dass VEGF antiapoptotische Signale auf endotheliale Zellen ausüben kann [109].

Als wichtige Neuheit konnte in der vorliegenden Arbeit unserem gegenwärtigen Wissensstand folgend zum ersten Mal gezeigt werden, dass die erhöhte topische Konzentration an VEGF am Transplantationsort morphologisch (Gefäßdichte) **und** funktionell (Durchblutung) zu einer verstärkten Revaskularisierung führt und dass dieser Effekt positiv mit einer verbesserten glykämischen Kontrolle und einer erhöhten Transplantat-Überlebensrate (Betazellmasse post transplantationem) korreliert. Neu ist zudem die glukoseabhängige topische VEGF-Sekretion, welche vor dem Hintergrund des direkt posttransplantationell vorherrschenden hyperglykämischen Milieus das Gesamtkonzept sicherlich unterstützt.

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Untersuchungsergebnisse lassen somit den Schluss zu, das VEGF als ein prominentes Werkzeug zur Reduktion der Anzahl der benötigten Spenderinseln im Rahmen einer Heilung des Diabetes mellitus Typ 1 fungieren kann und sicherlich das Potential besitzt, mittelfristig in der klinischen Inselzelltransplantation Anwendung zu finden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Deutsche Diabetes Union, *Gesundheitsbericht.* 2004.
2. Rewers, M., J. Norris, and D. Dabelea, *Epidemiology of type 1 Diabetes Mellitus.* Adv Exp Med Biol, 2004. **552**: p. 219-46.
3. Hamman, R.F., et al., *Medical care patterns at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus: association with severity and subsequent complications.* Diabetes Care, 1985. **8 Suppl 1**: p. 94-100.
4. International Diabetes Federation, 2003, *Annual report.*
5. King, H., R.E. Aubert, and W.H. Herman, *Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections.* Diabetes Care, 1998. **21**(9): p. 1414-31.
6. Durinovic-Bello, I., *Autoimmune diabetes: the role of T cells, MHC molecules and autoantigens.* Autoimmunity, 1998. **27**(3): p. 159-77.
7. Rewers, M., et al., *Beta-cell autoantibodies in infants and toddlers without IDDM relatives: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY).* J Autoimmun, 1996. **9**(3): p. 405-10.
8. Barker, J.M., et al., *Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY).* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(8): p. 3896-902.
9. Griffin, A.C., et al., *Experimental autoimmune insulitis. Induction by T lymphocytes specific for a peptide of proinsulin.* Am J Pathol, 1995. **147**(3): p. 845-57.
10. Roll, U., et al., *Perinatal autoimmunity in offspring of diabetic parents. The German Multicenter BABY-DIAB study: detection of humoral immune responses to islet antigens in early childhood.* Diabetes, 1996. **45**(7): p. 967-73.
11. *Adverse events and their association with treatment regimens in the diabetes control and complications trial.* Diabetes Care, 1995. **18**(11): p. 1415-27.
12. Turner, R.C. and R.R. Holman, *Lessons from UK prospective diabetes study.* Diabetes Res Clin Pract, 1995. **28 Suppl**: p. S151-7.
13. Banting, F.G. and C.H. Best, *Pancreatic extracts. 1922.* J Lab Clin Med, 1990. **115**(2): p. 254-72.
14. Hauner, H., I. Koster, and L. von Ferber, *[Prevalence of diabetes mellitus in Germany 1998-2001. Secondary data analysis of a health insurance sample of*

the AOK in Hesse/KV in Hesse]. Dtsch Med Wochenschr, 2003. **128**(50): p. 2632-7.

15. Minkowsky, O. and :, *Untersuchungen uber den Diabetes Mellitus nach Extirpation des Pankreas.* Berl Klin Wschr, 1892. **29**: p. 90.
16. Williams, P., *Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas.* BMJ, 1894. **2**: p. 1303–1304.
17. Kelly, W.D., et al., *Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy.* Surgery, 1967. **61**(6): p. 827-37.
18. *Annual report.* International Islet Transplant Registry Giessen, 2003.
19. Sollinger, H.W., et al., *Experience with 500 simultaneous pancreas-kidney transplants.* Ann Surg, 1998. **228**(3): p. 284-96.
20. Organtransplantation, D.S., *Bulettin.* 2003.
21. Frei, U., et al., *[Simultaneous pancreas and kidney transplantation--a chance for diabetic patients with renal failure].* Dtsch Med Wochenschr, 2003. **128**(22): p. 1237-42.
22. Lacy, P.E. and M. Kostianovsky, *Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.* Diabetes, 1967. **16**(1): p. 35-9.
23. Ricordi, C., P.E. Lacy, and D.W. Scharp, *Automated islet isolation from human pancreas.* Diabetes, 1989. **38 Suppl 1**: p. 140-2.
24. Reckard, C.R., M.M. Ziegler, and C.F. Barker, *Physiological and immunological consequences of transplanting isolated pancreatic islets.* Surgery, 1973. **74**(1): p. 91-9.
25. Najarian, J.S., et al., *Human islet transplantation: a preliminary report.* Transplant Proc, 1977. **9**(1): p. 233-6.
26. Largiader, F., et al., *[Successful allotransplantation of an island of Langerhans].* Schweiz Med Wochenschr, 1979. **109**(45): p. 1733-6.
27. Bretzel, R.G., M. Eckhard, and M.D. Brendel, *Pancreatic islet and stem cell transplantation: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus.* Panminerva Med, 2004. **46**(1): p. 25-42.
28. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen.* N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 230-8.
29. Ryan, E.A., et al., *Five-year follow-up after clinical islet transplantation.* Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2060-9.

30. Bretzel, R.G., et al., *Islet transplantation: present clinical situation and future aspects.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001. **109 Suppl 2**: p. S384-99.

31. Vargas, F., et al., *Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation.* Transplantation, 1998. **65**(5): p. 722-7.

32. Kaufman, D.B., et al., *Differential roles of Mac-1+ cells, and CD4+ and CD8+ T lymphocytes in primary nonfunction and classic rejection of islet allografts.* J Exp Med, 1990. **172**(1): p. 291-302.

33. Bottino, R., et al., *Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation.* Diabetes, 1998. **47**(3): p. 316-23.

34. Menger, M.D., et al., *Influence of experimental hyperglycemia on microvascular blood perfusion of pancreatic islet isografts.* J Clin Invest, 1992. **90**(4): p. 1361-9.

35. Berney, T., et al., *Endotoxin-mediated delayed islet graft function is associated with increased intra-islet cytokine production and islet cell apoptosis.* Transplantation, 2001. **71**(1): p. 125-32.

36. El-Ouaghlidi, A., et al., *Cytokine mRNA expression in peripheral blood cells of immunosuppressed human islet transplant recipients.* J Mol Med, 1999. **77**(1): p. 115-7.

37. Bennet, W., et al., *Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation?* Diabetes, 1999. **48**(10): p. 1907-14.

38. Stagner, J.I. and E. Samols, *Induction of angiogenesis by growth factors: relevance to pancreatic islet transplantation.* Exs, 1992. **61**: p. 381-5.

39. Brunicardi, F.C., et al., *Microcirculation of the islets of Langerhans. Long Beach Veterans Administration Regional Medical Education Center Symposium.* Diabetes, 1996. **45**(4): p. 385-92.

40. Thiel, A., *[Studies on vascular system of pancreatic lobule in various mammals with special reference to the capillary glomeruli of Islands of Langerhans.].* Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1954. **39**(4): p. 339-72.

41. Fujita, T. and T. Murakami, *Microcirculation of monkey pancreas with special reference to the insulo-acinar portal system. A scanning electron microscope study of vascular casts.* Arch Histol Jpn, 1973. **35**(4): p. 255-63.

42. Henderson, J.R., *Why are the islets of Langerhans?* Lancet, 1969. **2**(7618): p. 469-70.

43. Henderson, J.R., P.M. Daniel, and P.A. Fraser, *The pancreas as a single organ: the influence of the endocrine upon the exocrine part of the gland.* Gut, 1981. **22**(2): p. 158-67.

44. Liu, Y.M., et al., *Dynamic in vivo observation of rat islet microcirculation.* Pancreas, 1993. **8**(1): p. 15-21.

45. Sakamoto, C., et al., *Localization of saturable CCK binding sites in rat pancreatic islets by light and electron microscope autoradiography.* Diabetes, 1985. **34**(4): p. 390-4.

46. Samols, E., et al., *The order of islet microvascular cellular perfusion is B----A----D in the perfused rat pancreas.* J Clin Invest, 1988. **82**(1): p. 350-3.

47. Jansson, L. and P.O. Carlsson, *Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets.* Diabetologia, 2002. **45**(6): p. 749-63.

48. Menger, M.D., J. Yamauchi, and B. Vollmar, *Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans.* World J Surg, 2001. **25**(4): p. 509-15.

49. Lifson, N., et al., *Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans.* Gastroenterology, 1980. **79**(3): p. 466-73.

50. Meyer, H.H., et al., *Measurement of blood flow in pancreatic islets of the rat: effect of isoproterenol and norepinephrine.* Am J Physiol, 1982. **242**(5): p. E298-304.

51. Jansson, L. and C. Hellerstrom, *Stimulation by glucose of the blood flow to the pancreatic islets of the rat.* Diabetologia, 1983. **25**(1): p. 45-50.

52. Jansson, L., *The regulation of pancreatic islet blood flow.* Diabetes Metab Rev, 1994. **10**(4): p. 407-16.

53. Jansson, L. and C. Hellerstrom, *Glucose-induced changes in pancreatic islet blood flow mediated by central nervous system.* Am J Physiol, 1986. **251**(6 Pt 1): p. E644-7.

54. Korsgren, O., et al., *Reinnervation of transplanted pancreatic islets. A comparison among islets implanted into the kidney, spleen, and liver.* Transplantation, 1993. **56**(1): p. 138-43.

55. Korsgren, O., L. Jansson, and F. Sundler, *Reinnervation of transplanted fetal porcine endocrine pancreas. Evidence for initial growth and subsequent*

degeneration of nerve fibers in the islet grafts. Transplantation, 1996. **62**(3): p. 352-7.

56. Persson-Sjogren, S., S. Forsgren, and I.B. Taljedal, *Peptides and other neuronal markers in transplanted pancreatic islets.* Peptides, 2000. **21**(5): p. 741-52.

57. Carlsson, P.O., C. Berne, and L. Jansson, *Angiotensin II and the endocrine pancreas: effects on islet blood flow and insulin secretion in rats.* Diabetologia, 1998. **41**(2): p. 127-33.

58. Svensson, A.M., et al., *Inhibition of nitric oxide synthase by NG-nitro-L-arginine causes a preferential decrease in pancreatic islet blood flow in normal rats and spontaneously diabetic GK rats.* Endocrinology, 1994. **135**(3): p. 849-53.

59. Moldovan, S., et al., *Glucose-induced islet hyperemia is mediated by nitric oxide.* Am J Surg, 1996. **171**(1): p. 16-20.

60. Svensson, A.M., S. Sandler, and L. Jansson, *The blood flow in pancreatico-duodenal grafts in rats: inhibition of nitric oxide synthase preferentially decreases islet blood flow.* Eur J Pharmacol, 1995. **275**(1): p. 99-103.

61. Carlsson, P.O., *The renin-angiotensin system in the endocrine pancreas.* Jop, 2001. **2**(1): p. 26-32.

62. Menger, M.D., et al., *The microvasculature of xenogeneic transplanted islets of Langerhans.* Transplant Proc, 1990. **22**(2): p. 802-3.

63. Furuya, H., et al., *Revascularization and function of pancreatic islet isografts in diabetic rats following transplantation.* Cell Transplant, 2003. **12**(5): p. 537-44.

64. Heuser, M., et al., *Exocrine contamination of isolated islets of Langerhans deteriorates the process of revascularization after free transplantation.* Transplantation, 2000. **69**(5): p. 756-61.

65. Olsson, R. and P.O. Carlsson, *Better vascular engraftment and function in pancreatic islets transplanted without prior culture.* Diabetologia, 2005. **48**(3): p. 469-76.

66. Menger, M.D., et al., *Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans.* Diabetes, 1989. **38 Suppl 1**: p. 199-201.

67. Hart, T.K. and R.M. Pino, *Pseudoislet vascularization. Induction of diaphragm-fenestrated endothelia from the hepatic sinusoids.* Lab Invest, 1986. **54**(3): p. 304-13.

68. Rooth, P., et al., *Prevention of detrimental effect of cyclosporin A on vascular ingrowth of transplanted pancreatic islets with verapamil.* Diabetes, 1989. **38 Suppl 1**: p. 202-5.

69. Andersson, A., O. Korsgren, and L. Jansson, *Intraportally transplanted pancreatic islets revascularized from hepatic arterial system.* Diabetes, 1989. **38 Suppl 1**: p. 192-5.

70. Sandberg, J.O., et al., *Transplantation of fetal porcine pancreas to diabetic or normoglycemic nude mice. Evidence of a rapid engraftment process demonstrated by blood flow and heat shock protein 70 measurements.* Transplantation, 1995. **59**(12): p. 1665-9.

71. Vajkoczy, P., et al., *Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts.* Transplantation, 1995. **60**(2): p. 123-7.

72. Adeghate, E. and T. Donath, *Pancreas, diabetes mellitus and pancreatic transplantation--a retrospective survey.* Acta Chir Hung, 1998. **37**(1-2): p. 133-51.

73. Carlsson, P.O., et al., *Capillary blood pressure in syngeneic rat islets transplanted under the renal capsule is similar to that of the implantation organ.* Diabetes, 1998. **47**(10): p. 1586-93.

74. Parr, E.L., K.M. Bowen, and K.J. Lafferty, *Cellular changes in cultured mouse thyroid glands and islets of Langerhans.* Transplantation, 1980. **30**(2): p. 135-41.

75. Bicknell, R. and A.L. Harris, *Mechanisms and therapeutic implications of angiogenesis.* Curr Opin Oncol, 1996. **8**(1): p. 60-5.

76. Vajkoczy, P., et al., *Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin.* Am J Pathol, 1995. **146**(6): p. 1397-405.

77. Mattsson, G., L. Jansson, and P.O. Carlsson, *Decreased vascular density in mouse pancreatic islets after transplantation.* Diabetes, 2002. **51**(5): p. 1362-6.

78. Kurz, H., *Physiology of angiogenesis.* J Neurooncol, 2000. **50**(1-2): p. 17-35.

79. Patan, S., *Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling.* J Neurooncol, 2000. **50**(1-2): p. 1-15.

80. Weinstein, B.M., *What guides early embryonic blood vessel formation?* Dev Dyn, 1999. **215**(1): p. 2-11.

81. Vasir, B., et al., *Gene expression of VEGF and its receptors Flk-1/KDR and Flt-1 in cultured and transplanted rat islets.* Transplantation, 2001. **71**(7): p. 924-35.

82. Dvorak, H.F., *Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma.* Am J Pathol, 2003. **162**(11): p. 174-177.

83. Pettersson, A., et al., *Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor.* Lab Invest, 2000. **80**(1): p. 99-115.

84. Nagy, J.A., A.M. Dvorak, and H.F. Dvorak, *VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis.* Trends Cardiovasc Med, 2003. **13**(5): p. 169-75.

85. Korsgren, O., R. Christofferson, and L. Jansson, *Angiogenesis and angioarchitecture of transplanted fetal porcine islet-like cell clusters.* Transplantation, 1999. **68**(11): p. 1761-6.

86. Cossel, L., et al., *Morphological findings in the liver of diabetic rats after intraportal transplantation of neonatal isologous pancreatic islets.* Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1990. **59**(2): p. 65-77.

87. Lukinius, A., L. Jansson, and O. Korsgren, *Ultrastructural evidence for blood microvessels devoid of an endothelial cell lining in transplanted pancreatic islets.* Am J Pathol, 1995. **146**(2): p. 429-35.

88. Chappell, M.C., et al., *Evidence for an intrinsic angiotensin system in the canine pancreas.* J Hypertens, 1991. **9**(8): p. 751-9.

89. Suschek, C., et al., *Primary cultures of rat islet capillary endothelial cells. Constitutive and cytokine-inducible macrophagelike nitric oxide synthases are expressed and activities regulated by glucose concentration.* Am J Pathol, 1994. **145**(3): p. 685-95.

90. Longhurst, C.M. and L.K. Jennings, *Integrin-mediated signal transduction.* Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(6): p. 514-26.

91. Bosco, D., et al., *Importance of cell-matrix interactions in rat islet beta-cell secretion in vitro: role of alpha6beta1 integrin.* Diabetes, 2000. **49**(2): p. 233-43.

92. Wang, R.N., S. Paraskevas, and L. Rosenberg, *Characterization of integrin expression in islets isolated from hamster, canine, porcine, and human pancreas.* J Histochem Cytochem, 1999. **47**(4): p. 499-506.

93. Vetterlein, F., A. Petho, and G. Schmidt, *Morphometric investigation of the microvascular system of pancreatic exocrine and endocrine tissue in the rat.* Microvasc Res, 1987. **34**(2): p. 231-8.

94. Svensson, A.M., L. Jansson, and C. Hellerstrom, *The volume and area of the capillaries in the endocrine and exocrine pancreas of the rat.* Histochemistry, 1988. **90**(1): p. 43-6.

95. Gray, D.W., et al., *Exocrine contamination impairs implantation of pancreatic islets transplanted beneath the kidney capsule.* J Surg Res, 1988. **45**(5): p. 432-42.

96. Wolf, B., et al., *[Significance of the size of islands of Langerhans for successful vascularization after free transplantation].* Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd, 1998. **115**(Suppl I): p. 153-4.

97. Jansson, L. and S. Sandler, *Altered blood flow regulation in autotransplanted pancreatic islets of rats.* Am J Physiol, 1990. **259**(1 Pt 1): p. E52-6.

98. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor.* Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.

99. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.* Faseb J, 1999. **13**(1): p. 9-22.

100. Hiratsuka, S., et al., *Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9349-54.

101. Lammert, E., O. Cleaver, and D. Melton, *Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels.* Science, 2001. **294**(5542): p. 564-7.

102. Lammert, E., et al., *Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets.* Curr Biol, 2003. **13**(12): p. 1070-4.

103. Esser, S., et al., *Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro.* J Cell Biol, 1998. **140**(4): p. 947-59.

104. Roberts, W.G. and G.E. Palade, *Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor.* J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 6)**: p. 2369-79.

105. Konstantinova, I. and E. Lammert, *Microvascular development: learning from pancreatic islets.* Bioessays, 2004. **26**(10): p. 1069-75.

106. Folkman, J. and C. Haudenschild, *Angiogenesis in vitro.* Nature, 1980. **288**(5791): p. 551-6.

107. Davis, G.E., K.J. Bayless, and A. Mavila, *Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices.* Anat Rec, 2002. **268**(3): p. 252-75.

108. Gupta, K., et al., *VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling.* Exp Cell Res, 1999. **247**(2): p. 495-504.

109. Nor, J.E., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression.* Am J Pathol, 1999. **154**(2): p. 375-84.

110. Stagner, J., et al., *Beta-cell sparing in transplanted islets by vascular endothelial growth factor.* Transplant Proc, 2004. **36**(4): p. 1178-80.

111. Olsson, R., et al., *Local blood flow regulation in transplanted rat pancreatic islets: influence of adenosine, angiotensin II, and nitric oxide inhibition.* Transplantation, 2000. **70**(2): p. 280-7.

112. Carlsson, P.O., et al., *Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site.* Diabetes, 2001. **50**(3): p. 489-95.

113. Sigrist, S., et al., *Induction of angiogenesis in omentum with vascular endothelial growth factor: influence on the viability of encapsulated rat pancreatic islets during transplantation.* J Vasc Res, 2003. **40**(4): p. 359-67.

114. Linn, T., et al., *Polymers for induction of revascularization in the rat fascial flap: application of vascular endothelial growth factor and pancreatic islet cells.* Cell Transplant, 2003. **12**(7): p. 769-78.

115. Zhang, N., et al., *Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization.* Diabetes, 2004. **53**(4): p. 963-70.

116. Lai, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor increases functional beta-cell mass by improvement of angiogenesis of isolated human and murine pancreatic islets.* Transplantation, 2005. **79**(11): p. 1530-6.

117. Linn, T., et al., *Angiogenic capacity of endothelial cells in islets of Langerhans.* Faseb J, 2003. **17**(8): p. 881-3.

118. Gotoh, M., et al., *An improved method for isolation of mouse pancreatic islets.* Transplantation, 1985. **40**(4): p. 437-8.

119. Bortz, J., *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler.* Springer Verlag, 2005.

120. Nilsson, I., M. Shibuya, and S. Wennstrom, *Differential activation of vascular genes by hypoxia in primary endothelial cells.* Exp Cell Res, 2004. **299**(2): p. 476-85.

121. Dionne, K.E., C.K. Colton, and M.L. Yarmush, *Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans.* Diabetes, 1993. **42**(1): p. 12-21.

122. D'Angio, C.T. and J.N. Finkelstein, *Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites.* Mol Genet Metab, 2000. **71**(1-2): p. 371-80.

123. Vasir, B., et al., *Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene and protein expression in cultured rat islet cells.* Diabetes, 1998. **47**(12): p. 1894-903.

124. Hernandez, G.L., et al., *Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2.* J Exp Med, 2001. **193**(5): p. 607-20.

125. Guba, M., et al., *Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor.* Nat Med, 2002. **8**(2): p. 128-35.

126. Andersson, A., et al., *Promoting islet cell function after transplantation.* Cell Biochem Biophys, 2004. **40**(3 Suppl): p. 55-64.

127. Gannon, G., et al., *Overexpression of vascular endothelial growth factor-A165 enhances tumor angiogenesis but not metastasis during beta-cell carcinogenesis.* Cancer Res, 2002. **62**(2): p. 603-8.

128. Thomas, H.E., et al., *IFN-gamma action on pancreatic beta cells causes class I MHC upregulation but not diabetes.* J Clin Invest, 1998. **102**(6): p. 1249-57.

129. Villegas, G., B. Lange-Sperandio, and A. Tufro, *Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells.* Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 449-57.

130. Inoue, M., et al., *VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis.* Cancer Cell, 2002. **1**(2): p. 193-202.

131. LeCouter, J., et al., *Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium.* Nature, 2001. **412**(6850): p. 877-84.

132. Korsgren, O., L. Jansson, and A. Andersson, *Effects of hyperglycemia on function of isolated mouse pancreatic islets transplanted under kidney capsule.* Diabetes, 1989. **38**(4): p. 510-5.

133. Hellerstrom, C., et al., *Aspects of pancreatic islet transplantation in diabetes mellitus.* Baillieres Clin Gastroenterol, 1989. **3**(4): p. 851-63.

134. Biarnes, M., et al., *Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia.* Diabetes, 2002. **51**(1): p. 66-72.

135. Kim, S.C., et al., *Study for improvement of early implantation and long-term graft survival in pancreatic islet cell transplantation by induction of angiogenesis with gene transfection of vascular endothelial growth factor.* Transplant Proc, 2003. **35**(1): p. 486-7.

136. Schwarz, E.R., et al., *Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat--angiogenesis and angioma formation.* J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(5): p. 1323-30.

137. Maillard, L., et al., *[Gene therapy with VEGF].* Presse Med, 2000. **29**(31): p. 1731-7.

138. Flatt PR, L.S., *Insulin secretion and pancreatic B-cell research.* 1994: p. 605-611.

139. Carlsson, P.O., et al., *Engraftment and growth of transplanted pancreatic islets.* Ups J Med Sci, 2000. **105**(2): p. 107-23.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Transplantation pankreatischer Inseln ist neben der Pankreastransplantation der einzige kurative Ansatz bei dem Diabetes mellitus Typ 1. Der Erfolg der Inselzelltransplantation wird durch die sehr hohe Anzahl an pankreatischen Inseln begrenzt, die für die Heilung des Diabetes transplantiert werden müssen, da nur ~30% der transplantierten Inseln dauerhaft in dem Implantationsorgan anwachsen. Die rasche Revaskularisierung der Inseltransplantate ist ein entscheidender Faktor für ein adäquates Anwachsen, dieser Prozess erfolgt innerhalb der ersten 10-14 Tage post transplantationem. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Durchblutung und die Sauerstoffspannung innerhalb der Inseltransplantate erheblich unter der nativer Inseln liegt. Der vaskuläre Wachstumsfaktor VEGF spielt eine entscheidende Rolle in der Förderung der Revaskularisierung transplantierter pankreatischer Inseln, er verbessert die Funktion und das Überleben der Transplantate. Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass eine topische Applikation von VEGF am Transplantationsort die Revaskularisation der transplantierten Inseln steigert, dadurch deren Funktion und Überleben verbessert und die Zahl der für eine erfolgreiche Transplantation benötigter Inseln erheblich reduziert.

Als Ansatz für eine topische VEGF-Applikation transplantierten wir murine pankreatische Inseln, die unter der Kontrolle des Ratten-Insulinpromoters (RIP) glukoseabhängig VEGF-A synthetisieren können, unter die Nierenkapsel von STZ-induzierten, diabetischen Empfängermäusen. Der Nüchtern-Glukosespiegel wurde als Indikator für Überleben und Funktion der Transplantate gemessen. Am Tag 12 post transplantationem wurde die Durchblutung der Transplantate mithilfe eines Laser-Dopplers gemessen. Der VEGF- und Insulingehalt der Transplantate wurde anschließend im ELISA-Verfahren quantifiziert.

Mehr als 80% der Empfänger von RIP-VEGF-A Inseln und nur ~20% der Empfänger von Wildtyp-Inseln erreichten post transplantationem eine dauerhafte Euglykämie. RIP-VEGF Transplantate wiesen einen signifikant höheren Insulingehalt und eine höhere Gefäßdichte auf als Wildtyp-Inseltransplantate. Die höhere Gefäßdichte korrelierte mit einer signifikant höheren Durchblutung der RIP-VEGF Transplantate.
In einem nach unserem Wissen neuen Ansatz einer glukoseabhängigen topischen VEGF-Sekretion gelang es uns zu zeigen, dass die exogene Applikation von VEGF am Transplantationsort über eine verbesserte funktionelle und morphologische Revaskularisierung die Funktion und das Überleben der Transplantate wesentlich verbessert und die Anzahl der für eine erfolgreiche Transplantation benötigter Inseln erheblich reduziert –Voraussetzung für die Etablierung der Inselzelltransplantation als Therapieverfahren bei dem Diabetes mellitus Typ 1.

7. ABSTRACT

The transplantation of pancreatic islets and the pancreas whole organ transplantation are the only curative therapeutic approaches for Insulin Dependant Diabetes Mellitus. The success of pancreatic islets transplantation depends on the implantation of a large quantity of islets, because only ~30% become stably engrafted. Rapid revascularisation of the islet grafts is a crucial factor for adequate engraftment, and is known to be finalised within 10-14 days after transplantation. Recent studies have shown that the islet graft blood perfusion and oxygen tension remain decreased in compare with native pancreatic islets.

Growth factors like VEGF play an important role in promoting the revascularization of transplanted islets and improving their survival and function, the exact mechanisms for this being largely not understood until now.

The aim of this study was to prove that the topical application of VEGF at the transplantation site improves islet revascularisation and is linked to functionally increased graft perfusion, thus improving the function and the survival rate of transplanted islets.

As a model for elevated VEGF-A expression we used the RIP-VEGF-A transgenic mice in which VEGF-A expression, driven by the Rat Insulin Promoter (RIP), is targeted to pancreatic beta-cells. Grafts, consisting of a marginal islet number of 150 C57Bl/6 or C57Bl/6-RIP-VEGF-A islets, were implanted syngeneically under the left kidney capsule of streptozotocine-induced diabetic recipients. Fasting blood glucose served as indicator for graft survival and function. At posttransplantational day 12 graft-bearing kidneys were exposed and graft blood perfusion was measured by means of a laser Doppler. Graft VEGF and insulin content were quantified by ELISA, graft vascularization by immunohistochemistry.

More than 80% of the RIP-VEGF-A-islets recipients became euglycemic after transplantation whereas only ~20% of the control islets recipients were cured. RIP-VEGF-A grafts showed, in contrast to controls, significantly increased graft insulin content and a greater degree of microvasculature. The higher degree of vasculature correlated with a significantly increased graft blood perfusion.

Through a novel approach of glucose-controlled VEGF release at the transplantation site, we have shown that VEGF improves the revascularisation of islets grafts from morphological and functional point of view thus improving their engraftment and reducing considerably the number of islet needed to cure diabetes.

8. ERKLÄRUNG

“Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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.“

Darius Schneider

9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Thomas Linn für die Überlassung des interessanten Themas, die wissenschaftliche Betreuung, seine vielfachen konstruktiven Hinweise und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Besonders dankbar bin ich auch für die zahlreichen ermutigenden Worte, die oft über eine rein wissenschaftliche Betreuung hinausgegangen sind und mir eine wertvolle Hilfe waren.

Auch danke ich für die Erlaubnis, die Ergebnisse einiger seiner Publikationen als Grundlage für meine Arbeit zu nutzen, sowie für die Erstellung des Erstgutachtens.

Ferner bedanke ich mich bei dem Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Gießen, Herrn Professor Dr. Reinhard Bretzel, für die großzügige Überlassung der für die Erstellung dieser Arbeit notwendigen Räumlichkeiten und Geräte sowie für den stets kompetenten und freundlichen Rat in allen wissenschaftlichen aber auch persönlichen Fragen.

Besonderer Dank gilt Doris Erb, Gundula Hertl und Judith Schmitz aus dem Labor von Professor Linn für ihre geschätzte Hilfe bei der Betreuung und Charakterisierung der Versuchstiere, der Erstellung der histologischen Schnitte und Färbungen sowie ihre tatkräftige Unterstützung bei allen im Laufe der Versuche auftretenden Schwierigkeiten. Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Gießen für deren wertvolle Unterstützung und stets freundschaftliche Gesinnung im Laufe meiner Tätigkeit dort.

Meiner Freundin Carolin danke ich dafür, dass sie immer für mich da war und ist. Ihrer unerschöpflichen Motivationskraft und Ihrer tiefgründigen Fähigkeit, Kraft und Hoffnung zu spenden, habe ich es zu verdanken, dass diese Arbeit überhaupt entstehen konnte. Bei allen Widrigkeiten, die mir im Laufe dieser Arbeit auf persönlicher und wissenschaftlicher Ebene begegnet sind, war sie mein ständiger Begleiter.

Abschließend möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern und Freunden von ganzem Herzen danken für ihre vielumfassende Unterstützung sowohl während meines Studiums als auch bei der Dissertationsarbeit. Für ihre wertvollen Ratschläge in allen Lebenslagen bin ich unendlich dankbar.

Darius Schneider.

10. CURRICULUM VITAE

Persönliche Information

Name, Vorname:	Schneider, Darius Alexander
Geburtsdatum:	02.06.1979
Geburtsort:	Hermannstadt (rum. Sibiu), Rumänien
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Religion:	Evangelisch
Eltern:	Dipl. Ing. Basil Schneider † (Vater), StR. Ana Schneider (Mutter)
Geschwister:	Andrada Schneider, Studentin der Humanmedizin

Ausbildung

1985-1993	Besuch der Grundschule mit deutscher Unterrichtssprache in Hermannstadt (Rumänien)
1993-1997	Besuch des deutschen „Brukenthal“ – Gymnasiums Hermannstadt (Schwerpunkt Mathematik-Physik-Chemie)
Juli 1997	Abitur in Hermannstadt, Note 9.67 (Notenskala von 4 bis 10)
Oktober 1997	Aufnahmeprüfung an der medizinischen Fakultät der Lucian-Blaga-Universität Hermannstadt. Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hermannstadt
April 1998	Zulassung zum Studium an der Universität Gießen. Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Gießen zum Sommersemester 1998.
April 1999	Ablegung der ärztlichen Vorprüfung an der Universität Gießen.
April 2001	Ablegung des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
Januar 2002	Aufnahme in die Studienförderung der Friedrich-Ebert-Stiftung
August/September 2003	Ablegung des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung (Note 2.0)
Oktober 2003 bis September 2004	Praktisches Jahr (PJ) am Universitätsklinikum Giessen und am Evangelischen Krankenhaus Giessen.
November 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Gießen (Note 1.0) und Approbation als Arzt
Dezember 2004	Einstellung als Assistenzarzt am Universitätsklinikum Heidelberg, Medizinische Klinik I.