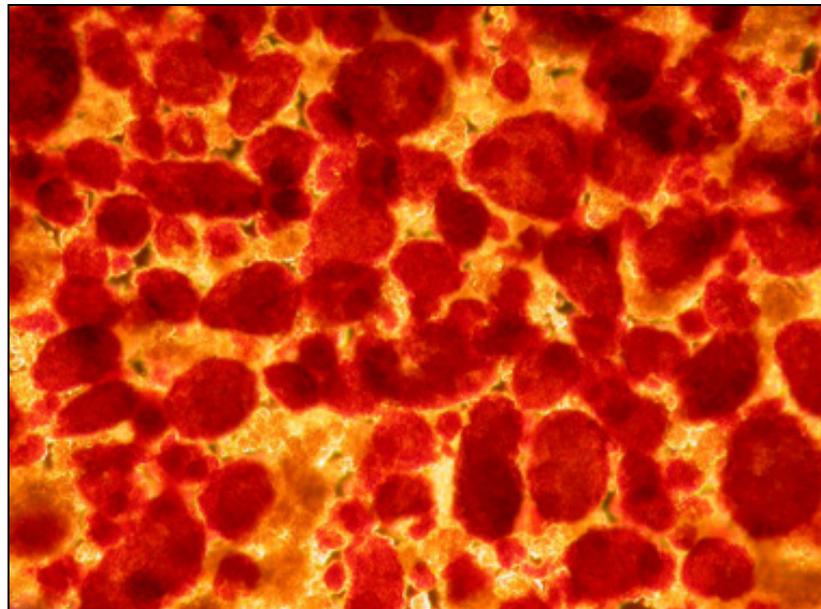


---

# **Optimierung des frühen Überlebens transplantiertter Langerhans'scher Inseln des Menschen und der Ratte durch Variation der Inselkulturbedingungen vor Transplantation**

---

**Torsten Eich**



**Optimierung des frühen Überlebens transplantierte  
Langerhans'scher Inseln des Menschen und der Ratte  
durch Variation der Inselkulturbedingungen  
vor Transplantation**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Torsten Michael Eich  
aus Mayen/Eifel

Giessen 2002

Aus der Medizinischen Klinik III und Poliklinik  
des medizinischen Zentrums für Innere Medizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Reinhard G. Bretzel  
am Universitätsklinikum Gießen

Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer  
Gutachter: PD. Dr. H. Jahr

Tag der Disputation: 13.05.2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Definition.....	1
1.2. Geschichtliche Hintergründe des Diabetes mellitus.....	1
1.3. Einteilung des Diabetes mellitus.....	2
1.3.1. Diabetes mellitus Typ 2.....	2
1.3.2. Diabetes mellitus Typ 1.....	3
1.4. Epidemiologie.....	5
1.5. Diabetische Folgeerkrankungen.....	5
1.6. Therapie.....	6
1.6.1. Pankreastransplantation.....	8
1.6.2. Inseltransplantation.....	9
1.6.2.1. Inselmasse.....	13
1.6.2.2. Ansätze für ein verbessertes Transplantationsergebnis.....	17
1.7. Ziele der Arbeit.....	22
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.1. In vitro Qualitäts- und Funktionstests für isolierte Inseln.....	23
2.1.1. Vitalitätstests.....	23
2.1.1.2. Reinheit einer Inselpräparation.....	23
2.1.2. In vitro Testung der Empfindlichkeit von Ratteninseln gegenüber Stickstoffmonoxid (NO) produzierendem Natriumnitroprussid und Superoxid (ROI) produzierender Xanthin/Hypoxanthinoxidase.....	24
2.1.3. Inselfunktionstest.....	25
2.1.3.1. Statische Glukosestimulation.....	25
2.1.3.2. Bestimmung des Insulingehaltes im Transplantat-tragenden Organ.....	27
2.2. Inselgewinnung und Kultur.....	27
2.2.1. Medium TCM199 + 5% FCS.....	27
2.2.2. Medium CMRL 1066.....	28
2.2.3. Endotoxinbestimmung.....	29
2.2.4. Inselisolation im Nagetiermodell.....	29
2.2.4.1. Spendertiere.....	29
2.2.4.2. Isolation.....	30
2.2.4.3. Präparation, Distension und Entnahme des Pankreas.....	30
2.2.4.4. Digestion.....	31
2.2.4.5. Reinigung.....	32
2.2.4.6. Kultur.....	33
2.3. In vivo Versuche.....	33
2.3.1. Induktion des Diabetes mellitus.....	33
2.3.2. Empfängertiere.....	33
2.3.2.1. Allogenes Modell.....	34
2.3.2.2. Xenogenes Modell.....	34
2.3.3. Transplantationsvorgang.....	35
2.3.4. Stoffwechselkontrolle.....	38
2.3.4.1. Postprandiale Blutzuckermessung.....	38
2.3.5. In vivo Stimulationstest.....	39
2.3.5.1. Intraperitonealer Glukosetoleranztest.....	39

2.3.5.2. Herzpunktion bei C57Bl/6J Mäusen.....	40
2.3.6. Körpergewichtbestimmung.....	40
2.4. Isolierung humaner Langerhans´scher Inseln.....	40
2.4.1. Vorbemerkungen.....	41
2.4.2. Präparation.....	41
2.4.3. Distension.....	42
2.4.4. Digestion und Filtration.....	42
2.4.5. Reinigung.....	44
2.4.6. Verwendete Medien.....	44
2.5. Auswertung der gemessenen Werte .....	45
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1. In vitro Versuche .....	46
3.1.2. In vitro Untersuchungen von frischen Ratteninseln versus 1 d bei 37°C in TCM199 + 5% FCS kultivierten Ratteninseln be- züglich der Empfindlichkeit gegenüber Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid (ROI).....	46
3.2. In vivo Versuche .....	47
3.2.1. Allgemeine Einteilung nach Transplantationsreihen.....	47
3.2.2. Allogenes Nagetiermodell .....	48
3.2.2.1. Allogene Transplantation frisch isolierter Ratteninseln unter die Nierenkapsel diabetischer Wistar Furth Ratten .....	49
3.2.2.2. Allogene Transplantation von Ratteninseln nach einem Tag Kultur (Medium TCM199 + 5% FCS bei 37°C) unter die Nierenkapsel diabetischer Wistar Furth Ratten .....	50
3.2.3. Konkordant xenogenes Transplantationsmodell (Ratte in Maus) ..	52
3.2.3.1. Kontrollgruppe.....	52
3.2.3.2. Einfluß der Kultur bei 22°C versus 37°C in TCM199 + 5% FCS auf das frühe Transplantatüberleben unter Berücksichtigung der Inselmasse.....	52
3.2.3.3. Bestimmung des Insulingehaltes des Transplantat tragenden Organs mittels Enzymimmunoassay.....	56
3.3. Diskordant xenogenes Modell (humane Inseln in Maus)	
3.3.1. Transplantation humaner Insel unter die Nierenkapsel nicht diabetischer C57Bl/6J Mäuse nach einer Kultur bei 22°C/CMRL 1066 ver. 22°C/TCM199 + 5% FCS ver. 37°C/TCM199 + 5% FCS.....	57
3.3.2. Intraperitoneale Glukosebelastung .....	58
3.3.3. Einzelergebnisse der Transplantationsserien .....	58
3.3.3.1. Ergebnisse des humanen Organs Nr. 1 .....	58
3.3.3.2. Ergebnisse des humanen Organs Nr. 2 .....	59
3.3.3.3. Ergebnisse des humanen Organs Nr. 3 .....	60
3.3.3.4. Zusammenfassende Gesamtdarstellung aller Transplantationsreihen .....	60
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>62</b>
4.1. Allgemeines.....	62
4.2. Beeinflussende Faktoren für eine erfolgreiche Transplantation .....	63
4.3. Einflüsse auf die transplantierte Insel .....	64
4.3.1. Immunologische Abstoßungsphänomene .....	65
4.3.2. Primary Nonfunction (PNF) .....	70

4.3.3. Stickstoffmonoxid (NO) .....	73
4.3.4. Reactive oxygen intermediates (ROI) .....	73
4.3.5. Die Rolle der Inselmasse .....	74
4.4. Transplantationsort .....	75
4.4.1. Meßparameter für ein Transplantationsüberleben .....	76
4.4.2. Diabeteserzeugung .....	77
4.4.3. Insulinextraktion .....	77
4.5. Verwendetes Tiermodell .....	78
4.6. Kultur Langerhans'scher Inseln und Kulturmedium .....	79
4.7. Darstellung der eigenen Ergebnisse .....	81
4.7.1. Vergleich des allogenen Transplantatüberlebens von frisch isolierten Nagetierinseln gegenüber einem Tag bei 37°C kultivierten Inseln (Ratte in Ratte) .....	81
4.7.2. In vitro Empfindlichkeit von frisch isolierten gegenüber einem Tag kultivierten Inseln der Ratte gegenüber NO und Superoxid..	82
4.7.3. Vergleich des Transplantatüberlebens von Nagetierinseln (Ratte in Maus) bei 22°C gegen 37°C und unterschiedlichen Insel- mengen (konkordant xenogenes Modell) .....	82
4.7.4. Vergleich des Transplantatüberlebens humaner Inseln bei unter- schiedlichen Kulturtemperaturen und –medien (diskordant xenogenes Modell) .....	85
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>110</b>

## **1. Einleitung:**

### **1.1. Definition:**

Der Begriff Diabetes mellitus bezeichnet eine Stoffwechselerkrankung, die mit erhöhten Blutglukosekonzentrationen einhergeht, welche auf einem relativen oder absoluten Insulinmangel beruhen. Die WHO definierte 1999 den Diabetes mellitus als manifest bei mehrmals gemessenen Nüchternwerten über 126 mg/dl oder bei einem oralen Glukosetoleranztest, welcher einen maximalen Wert von > 200 mg/dl und/oder einen Wert von > 140 mg/dl zwei Stunden nach der Belastung zeigt (WHO, 1999).

Als Vorstufe zum manifesten Diabetes mellitus definiert man die gestörte Glukosetoleranz (IGT: Impaired Glucose Tolerance). Diese bildet den Übergang von der Normoglykämie zur Manifestation der Erkrankung.

### **1.2. Geschichtliche Hintergründe des Diabetes mellitus**

Seit mehreren Jahrtausenden wird über die Symptome des Diabetes mellitus berichtet. 1550 v. Chr. wird in einem altägyptischen Papyrus von einer Erkrankung mit übermäßigem Harnfluss berichtet; der Ausdruck „Honigsüßer Durchfluss“ scheint seinen Ursprung in der altindischen Medizin zu haben. Der arabische Arzt Avicienna verwendete den Begriff des „Honig-Urin“. Der Begriff „Diabetes“ in der griechischen Bedeutung ‚Hindurchlassen‘ wird vom alexandrinischen Arzt Demetrius von Apameia verwendet. In den Überlieferungen findet sich im Verlauf der nächsten Jahrhunderte kaum eine weitere Erwähnung des Krankheitsbildes oder des Begriffes. Obwohl die klinischen Phänomene schon mehrmals beschrieben wurden und bekannt waren, dauerte es bis Ende des 19. Jahrhunderts, bevor auf Grund weiterer Ergebnisse die Zusammenhänge der klinischen Veränderungen mit dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus verknüpft werden konnten.

MERING und MINKOWSKI führten 1890 eine Pankreatektomie beim Hund durch. Die daraufhin entstehenden Symptome glichen denen der bereits bekannten Erkrankung des ‚Honigsüßen Durchflusses‘. Somit postulierten sie einen Zusammenhang zwischen den bekannten Symptomen und der Bauchspeicheldrüse als Ursprungsorgan (MERING und MINKOWSKI, 1890). 1893 versuchten die britischen Ärzte Williams und Harsant durch Xenotransplantation ein 15-jähriges diabetisches Kind zu heilen. Sie transplantierten Teile eines frisch geschlachteten Schafpankreas subkutan. Dieser Versuch schlug leider fehl. Dass die Bauchspeicheldrüse auch eine endokrine Funktion neben der exokrinen hat, wurde schon länger vermutet, konnte aber nie bewiesen werden. 1921 gelang es dem kanadischen Physiologen Frederick Banting und seinem Studenten Charles Best mit der

Isolierung des klinisch verwertbaren Insulins den Grundstein der bis heute bestehenden Therapie des Diabetes mellitus zu legen. Es gelang Ihnen 1922 den 14-jährigen Leonard Thompson erfolgreich mit dem von Ihnen hergestellten Stoff, dem sie den Namen 'Insulin' gegeben hatten, zu behandeln. Thompson nahm in den ersten vier Monaten nach Therapiebeginn 8 Kg an Gewicht zu (BANTING UND BEST, 1922). Somit ist seit dieser Zeit neben den Therapieprinzipien der Diät und der körperlichen Bewegung das Insulin als effektives Therapieprinzip verfügbar.

### **1.3. Einteilung des Diabetes mellitus**

Im Laufe der letzten Jahre wurde die Einteilung des Diabetes mellitus dem erweiterten Kenntnisstand angepaßt. Verlassen wurde die Klassifikation der insulinabhängigen (IDDM) und nicht insulinabhängigen (NIDDM) Diabetiker. Nach den Angaben der WHO unterscheidet man heute den Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1, welcher durch einen Verlust der Langerhans'schen  $\beta$ -Zellen und somit durch einen absoluten Insulinmangel definiert wird vom Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, welcher zum einen durch eine Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel und/oder zum anderen durch ein Kompensationsversagen des Pankreas definiert wird (WHO, 1999; ADA, 2002).

Des Weiteren unterscheidet man zusätzlich den Gestationsdiabetes als selbständige Gruppe von einer Gruppe von Patienten, die auf Grund verschiedenster Ereignisse wie z.B. chronische Pankreatitis, Endokrinopathien, medikamenteninduziert, infektiös, etc. an einem Diabetes mellitus erkrankt sind. Dieser beruht vor allem auf äußeren Noxen und ist somit von unterschiedlicher Pathogenese als die Übrigen.

#### **1.3.1. Diabetes mellitus Typ 2**

Der Diabetes mellitus Typ 2 (früher NIDDM), welcher sich vor allem im Erwachsenenalter manifestiert, ist ca. zwanzigmal häufiger als der Typ 1 Diabetes. Ursächlich werden heute zwei Faktoren verantwortlich gemacht: Eine Insulinresistenz, die familiär gehäuft auftritt und deshalb wahrscheinlich genetisch verankert ist, erzeugt am Effektororgan, also den insulin-abhängigen Organen Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber eine sekundäre Hyperinsulinämie. Ursächlich für diese Resistenz scheint ein Postrezeptordefekt zu sein.

Der zweite Faktor ist eng mit dem Ersten verbunden. Im Verlauf der Insulinresistenz kommt es durch die permanente und lang anhaltende Sekretionsstreßsituation, der die  $\beta$ -Zelle ausgesetzt ist, zu einer Erschöpfung der Sekretionsleistung. Hierbei scheint wiederum eine genetische Determinante eine Rolle zu spielen. Verstärkt und zeitlich beschleunigt werden beide Faktoren durch Adipositas, welche häufig durch ein

Überangebot von Kalorien kombiniert mit Bewegungsmangel entsteht. (KLEIN und HÄRING, 1990).

### **1.3.2. Diabetes mellitus Typ 1**

Beim Diabetes mellitus Typ 1 (früher IDDM) findet man die gleichen bzw. ähnliche Symptome wie beim Diabetes mellitus Typ 2. Der Patient berichtet häufig über Polydipsie, Polyurie, Durst, Gewichtsverlust, Müdigkeit, etc. Ein wesentlicher Unterschied ist, daß sich der Diabetes mellitus Typ 1 überwiegend vor dem Erreichen des 35. Lebensjahres manifestiert und somit früher auch als juveniler Diabetes mellitus bezeichnet wurde. Pathophysiologisch stellt er sich durch einen absoluten Insulinmangel dar, der durch die Gabe von exogenem Insulin behoben werden muß.

#### Ätiologie und Pathogenese

Der komplette Entstehungsprozeß und die einzelnen, auslösenden Ursachen sind bis heute nicht völlig geklärt.

An untersuchten humanen Pankreata von jüngeren, verstorbenen Diabetikern fiel eine Zahlen- und Größenabnahme der Inseln auf (BOTTAZZO et al., 1985). Allerdings traten starke interindividuelle Schwankungen bezüglich der Anzahl auf. Eine negative Korrelation zur Diabetesdauer konnte gesichert werden (FOULIS et al., 1986).

Histomorphologisch sieht man eine zelluläre „Insulitis“ mit lymphozytären Infiltrationen. In 78 % der untersuchten Patienten, die kurz nach Erstmanifestation verstarben, konnten diese Infiltrationen nachgewiesen werden (FOULIS et al., 1986). Auffallend war hierbei allerdings, daß sich die Infiltration auf die  $\beta$ -Zelle der Langerhans'schen Insel beschränkt und die  $\alpha$ - und die  $\delta$ -Zelle verschont. Die Zerstörung erfolgt über die Lyse nach dem Anlagern von Lymphozyten an die Zellwand (LAMPETER et al., 1987).

Im Rahmen der humoralen Antwort des Immunsystems spielen Antikörper gegen spezielle Merkmale der  $\beta$ -Zelle eine Rolle. So findet man in der Mehrzahl der untersuchten Fälle autoreaktive Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase (GAD-65), in geringerem Umfang Antikörper gegen Inselzellen (ICA) und Insulinautoantikörper (IA-2) (ATKINSON und MACLAREN, 1990).

Die BABYDIAB-Studie konnte zeigen, daß beim Vorliegen von zwei von drei Inselautoantikörpern (GAD-65 und IA-2) vor dem 2. Lebensjahr eine Manifestation vor dem 10. Lebensjahr wahrscheinlich ist (ZIEGLER et al., 1999). Eine direkte zytotoxische Wirkung der Antikörper gilt jedoch als unwahrscheinlich.

Zudem besteht eine genetische Prädisposition (TODD et al., 1993). Ca. 95 % der untersuchten Patienten wiesen die HLA-Merkmale DR 3 und/oder DR 4 auf (ROTTER et al., 1983).

In der Vergangenheit wurde immer wieder eine entscheidende Rolle der viralen Genese, hier vor allem die Coxsackieviren, diskutiert (YOON et al., 1979; CONRAD et al., 1997). In der jüngeren Vergangenheit lassen sich die bekannten Zusammenhänge allerdings nicht eindeutig bestätigen. Allein die Tatsache, daß die Entwicklung eines Diabetes mellitus eine langsame und schleichende Erkrankung ist, scheint einen direkten Einfluß der Viren auf die  $\beta$ -Zellzerstörung unwahrscheinlich zu machen (TARN et al., 1987). Wahrscheinlicher erscheinen die Ergebnisse der Untersuchungen von OHASHI et al., die einen Hinweis sahen, daß Viren Zellen der inaktiven Autoimmunität aktivieren, Zytokine zu bilden, die Ihrerseits eine  $\beta$ -Zell Destruktion bewirken. (OHASHI et al., 1991)

In der zellvermittelten Antwort des Immunsystems spielen T-Lymphozyten und Monozyten eine zentrale Rolle (KOLB et al., 1995). Es gelang durch die Gabe von Antikörpern gegen T- Zellen die Ausprägung einer Insulitis und die Manifestation der Erkrankung zu verhindern (SHIZURU et al., 1988). CHARLES et al. zeigten einen direkten zytotoxischen Effekt auf die  $\beta$ -Zelle (CHARLES et al., 1983) und LAMPETER et al. spezifizierten den Zelltyp: vor allem  $CD8^+$  Zellen, geringere Mengen an  $CD4^+$  und Makrophagen (LAMPETER et al., 1987).

Ein weiterer Hinweis auf die zentrale Rolle der T-Lymphozyten ist die Möglichkeit, daß man mit einer spezifischen Immunsuppression die Manifestation eines Diabetes unterdrücken kann (JENNER et al., 1992).

Auch die Makrophagen sind an der Pathogenese beteiligt. In vielen Untersuchungen hat sich gezeigt, daß die Makrophagen sowohl im diabetischen Tierexperiment als auch im humanen, diabetischen Pankreas nachzuweisen sind (SIBLEY et al., 1987; In't Veld et al., 1988). Dabei tauchen sie im zeitlichen Ablauf der Entzündungsreaktion als eine der ersten Zellen auf (WALKER et al 1988).

Auffällig ist auch das gehäufte, parallele Auftreten von Autoimmunerkrankungen. Eine Häufung zeigt sich für das gemeinsame Auftreten von Diabetes mellitus Typ 1 mit Erkrankungen wie der Hashimoto Thyreoiditis, der rheumatoiden Arthritis oder dem Morbus Addison. So kommen autoreaktive Schilddrüsenerkrankungen 30-mal häufiger in Verbindung mit einem Diabetes mellitus Typ 1 vor (PAYAMI et al., 1989).

In der weltweiten, geographischen Verteilung der Erkrankung gibt es Unterschiede, die, wenn die Gründe dafür geklärt sind, auch zu einer Klärung der Pathogenese beitragen können.

So findet man in Finnland die höchste Inzidenzrate und in Japan die niedrigste. Die Wahrscheinlichkeit für ein Kind an Diabetes mellitus zu erkranken, ist in Skandinavien 30 mal so hoch wie in Japan (Diabetes Epidemiology Research International Study group, BMJ 1987; LaPORTE et al., 1985).

Die Verteilung zwischen den Geschlechtern ist fast ausgeglichen. Eine Erstmanifestation kann in jedem Alter auftreten. Es zeigt sich allerdings ein Gipfel zwischen dem 11. und 13. Lebensjahr (SPENCER et al., 1982; JONES et al., 1997).

Diskutiert wird auch, ob es einen Zusammenhang zwischen der Prädisposition zur Bildung von Anti-Kuhmilchprotein-Antikörpern und Typ 1 Diabetes gibt. Somit bestände die Möglichkeit der Kreuzreaktivität zwischen Zellmembranproteinen der  $\beta$ -Zelle und gebildeten Antikörpern gegen Kuhmilchalbumin (KARJALAINEN et al., 1992).

#### **1.4. Epidemiologie**

Die Prävalenz für den Typ 2 Diabetes beträgt in Deutschland momentan 4.82 %. In konkreten Zahlen bedeutet dies eine Patientenzahl von 3.85 Mio. in Deutschland. Für den Typ 1 Diabetes findet man eine Prävalenz von 0.22 %, insgesamt 180.000 Patienten. Somit gibt es aktuell in Deutschland ca. 4 Millionen Diabetiker, Tendenz steigend. (HASSLACHER et al., 1989; HAUNER et al., 1992 und 1996; ADA, 1993).

#### **1.5. Diabetische Folgeerkrankungen**

Vor Beginn der breiten klinischen Anwendung von Insulin waren die Überlebenschancen eines Diabetikers äußerst gering. So verstarben ca. 75 % der Diabetiker an sogenannten Akutkomplikationen, wie z.B. das Coma diabeticum (BRETZEL, 1984). Dies konnte auf ca. 1% Letalität in den 70-iger Jahren gesenkt werden. Somit treten für den Diabetiker die Spätkomplikationen vermehrt in den Vordergrund.

Am gravierendsten treten die angiopathischen Veränderungen auf. Betroffen von der sogenannten Mikroangiopathie sind vor allem die Organe Niere, Augen und die Nervenleitbahnen. Wie gravierend hoch die Zahlen sind, kann man am Beispiel der diabetischen Nephropathie eindrucksvoll verdeutlichen. So ist die diabetische Nephropathie heute die häufigste Ursache der chronischen Niereninsuffizienz. Die Inzidenz für eine Dialysetherapie liegt bei 4000 Neuerkrankungsfällen pro Jahr (KOCH et al., 1989; LIPPERT et al., 1995). Der Kostenaufwand für diese Neuerkrankungsfälle

beläuft sich auf ca. 360 Millionen DM pro Jahr. Die 45-Monatsüberlebenswahrscheinlichkeit eines Diabetikers an der Dialyse beträgt für Typ 2 Diabetiker 50 % und für Typ 1 Diabetiker 57 % (KOCH et al., 1993).

Diabetiker weisen auch ein erhöhtes Risiko für eine koronare Herzerkrankung sowie für eine zentrale und periphere Atherosklerose auf (diabetische Makroangiopathie). So erleiden heute ca. 35000 Diabetiker pro Jahr einen tödlichen Herzinfarkt. Die 7-Jahresinzidenz betrug in einer Studie 20.2 % (dem gegenüber steht die Re-Infarktrate eines nicht diabetischen Vergleichskollektivs mit 18.8%), verbunden mit einer Reinfarktrate von 45% (HAFFNER et al., 1998).

Zusätzliche Risikofaktoren hierbei sind die Hyperglykämie, Hyper- und Dyslipoproteinämie, Hypertonie und Rauchen. (KUUSISTO et al., 1994; STAMLER et al., 1986; CASTELLI 1992; OBERMANN et al., 1990).

Die Gesamtkosten für das Gesundheitssystem in Deutschland beliefen sich im Jahre 1996 auf insgesamt 25 Mrd. DM. Die Tendenz war bislang steigend.

Zusätzlich leidet ein Diabetiker an einer erhöhten Infektanfälligkeit. Die genaue Ursache ist unklar, eine reduzierte humorale und zelluläre Immunantwort wird diskutiert (PERSCHEL et al., 1995).

Die Gesamtzahl der Todesfälle ist bis zum 50. Lebensjahr fünfmal höher als bei Nicht – Diabetikern und die Lebenserwartung ist nach wie vor um die Hälfte verkürzt.

Eine wesentliche, vital bedrohliche Erkenntnis ist die, daß bei einer Diabetesdauer von mehr als 20 Jahren bei ca. 50 % der untersuchten Typ 1 Diabetiker eine Hypoglykämiewahrnehmungsstörung vorliegt und 70 % gegenregulatorische Defizite aufweisen (MEYER et al., 1998).

Somit ist die Lebensqualität eines Patienten mit einem Diabetes mellitus in wesentlichen Punkten eingeschränkt.

## **1.6. Therapie**

Die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 basiert heute auf den Prinzipien der Schulung des Patienten, der richtigen Ernährung, genügend körperlicher Aktivität, eventuell medikamentöser Therapie und auf der richtigen Patientenführung (LAUBE, 2000; ADA, 2002). Wenn ein Patient die durch entsprechende Schulung notwendigen Änderungen seiner Lebensgewohnheiten ausreichend umsetzt („life style changes“), so ist in den meisten Fällen davon auszugehen, daß er nur eine geringe oder gar keine medikamentöse

Therapie benötigt. Zur medikamentösen Therapie stehen zum einen die oralen Antidiabetika, wie Akarbose, Sulfonylharnstoffe, Metformin und seit kurzem auch sogenannte Insulinsensitizer zur Verfügung. Dies sind Medikamente, die den „heruntergeregelten“ Insulinrezeptor erneut zugänglicher für das vorhandene Insulin macht. Bei Versagen der genannten Maßnahmen muß man zur subkutanen Gabe von Insulin greifen, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit oralen Antidiabetika (Nationale Versorgungs-Leitlinie, 2002).

Die Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 basiert sowohl auf einer adäquaten Insulinsubstitutionstherapie als auch auf den oben genannten „life style changes“.

Seit der Zeit von Banting und Best sind die Insuline permanent weiterentwickelt worden. Es gelang tierisches Insulin, wie z.B. Schweineinsulin, zu extrahieren und für einen weit verbreiteten Einsatz aufzubereiten. Zum Teil werden diese Insuline heutzutage noch eingesetzt. In den letzten Jahren gewannen immer mehr die Insulinanaloga an Bedeutung. Auch unterschiedliche Therapiemodelle werden angewendet, angefangen bei der konventionellen Therapie (CT) und intensivierter `konventionelle´ Therapie (ICT) bis hin zur Pumpentherapie. Die beiden letzteren funktionieren nach dem Basis-Bolus-Prinzip.

Die Therapie mit dem starren Schema ist die CT. Es sollte allerdings, soweit möglich, auf eine der beiden anderen Therapien zurückgegriffen werden. Mit einer ICT hat man die Möglichkeit der besseren Reaktion auf geänderte Lebensumstände. Es ermöglicht auch eine größere individuelle Freiheit. Dasselbe gilt für die Pumpentherapie. Diese wird im klinischen Einsatz noch als „Open Loop“ Modell verwendet und hat somit keinen Glukosesensor, der automatisch die Blutzuckersituation erfaßt und korrigiert. Diese Modelle, „Closed Loop“ genannt, befinden sich für eine Dauerbenutzung als sicheres und vor allem auch praktisch gut anwendbares Verfahren noch im Entwicklungsstadium.

In einer prospektiven Studie (DCCT Studie) konnte gezeigt werden, daß eine Therapie nach dem Basis-Bolus-Prinzip kombiniert mit intensiver Schulung des Patienten und Selbstkontrolle des Blutzuckers eine Reduktion des HbA<sub>1c</sub> und eine Verlangsamung der Spätschäden an Augen und Niere erzielen kann. Im Gegenzug zeigte sich aber, daß sich die Rate der schweren Hypoglykämien verdreifacht hatte. Bereits eingetretene Spätschäden und Organmanifestationen waren nicht reversibel. Ebenso konnte keine Normalisierung des HbA<sub>1c</sub> erzielt werden. (DCCT, 1993).

Diese und weitere Studien haben gezeigt, daß die Insulintherapie zwar eine wesentliche Verbesserung gegenüber dem Stand vor dieser Ära ist, dennoch die Komplikationsrate nach wie vor sehr hoch ist. Zudem ist es nur eine symptomatische Therapie.

Um langfristig eine normoglykämische, stabile Stoffwechsellage und ein Aufhalten der Spätkomplikationen zu erzielen, ist die kausale Therapie mittels des biologischen Ersatzes möglich. Hierzu stehen zwei Verfahren zur Verfügung. Zum einen eine Verpflanzung eines gesamten, vaskularisierten Pankreas oder von Pankreassegmenten und zum anderem die Transplantation von vorher isolierten Langerhans'schen Inseln (BRETZEL et al., 1992a, 1996; MOREL et al., 1991).

### 1.6.1. Die Pankreastreansplantation

Die erste Pankreastreansplantation im klinischen Bereich wurde 1966 an der Universität von Minnesota durchgeführt (KELLY et al., 1967). Seitdem wurden insgesamt 15710 Pankreastreansplantationen durchgeführt. In der überwiegenden Anzahl der Fälle wurde simultan zur Pankreastreansplantation eine Nierentransplantation (SPK) durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit ist die Pankreastreansplantation nach bereits erfolgter Nierentransplantation (PAK) und eine Pankreastreansplantation alleine (PTA). In den Anfängen der Pankreastreansplantation zeigten sich allerdings hohe Komplikationsraten. Diese konnten durch verbesserte chirurgische Techniken, ein verbessertes peri-operatives Management und weiterentwickelte immunsuppressive Strategien gesenkt werden.

Die Erfolgsrate ist in Tabelle 1 dargestellt:

	SPK	PAK	PTA
1 – Jahres Patientenüberleben (%)	94	96	98
1 – Jahres Transplantatüberleben (%)	84	76	61

**Tabelle 1:** Ein-Jahres Überlebenszahlen für Patienten und Pankreastreansplantat bei simultaner Pankreas-Nieren Transplantation (SPK), Pankreas nach Nieren Transplantation (PAK) und Pankreastreansplantation alleine (PTA) (International Pancreas Transplantation Registry, (IPTR) update, 2001)

Neben dem Erreichen der Insulinunabhängigkeit konnte auch gezeigt werden, dass sich die Lebensqualität der Patienten nach der Transplantation erhöhte (KIEBERT et al., 1994). Zudem zeigte sich ein protektiver Effekt auf die Transplantatniere (FIORETTO et al., 1993, BILOUS et al., 1989) und eine Verbesserung der diabetischen Neuropathie (SOLDERS et al., 1992).

Dennoch besteht bei der Pankreastreansplantation ein erhöhtes Komplikationsrisiko gegenüber einer Nierentransplantation alleine, wie z.B. häufigere akute Abstoßungsreaktionen, höheres Infektionsrisiko und häufigere Rehospitalisierungen (PIRSCH et al., 1996; SUTHERLAND, 1993). Das Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko bei

einer SPK ist bei diabetischen Patienten höher als bei einer alleinigen Nierentransplantation (MANSKE et al., 1995).

### **1.6.2 Inseltransplantation**

Auf Grund der Tatsache, daß bei Diabetikern lediglich die Langerhans'schen Inseln defekt sind und die meisten Komplikationen durch den exokrinen Anteil des Pankreas bedingt sind (BRETZEL, 1986; BRETZEL und FEDERLIN, 1987), liegt es nahe, „nur“ den Inselapparat zu transplantieren.

MOSKALEWSKI entwickelte 1965 eine Methode, Langerhans'sche Inseln aus dem Gesamtorgan Pankreas herauszulösen. Dies gelang ihm durch einen enzymatischen Verdauungsprozesses. Die Methode wurde in den folgenden Jahren weiterentwickelt und verbessert, so daß 1972 erstmals im Tierversuch eine lang anhaltende Stoffwechselverbesserung bei diabetischen Ratten erzielt werden konnte (BALLINGER und LACY, 1972). In weiteren Untersuchungen wurde tierexperimentell gezeigt, daß durch eine frühzeitige Inseltransplantation die Spät komplikationen verhindert werden können (FEDERLIN und BRETZEL, 1984; BRETZEL et al., 1990; 1992, WARNOCK et al., 1992).

Die Anwendung im klinischen Bereich wurde ermöglicht durch grundlegende Verbesserungen und Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Isolation der Inseln von höherstehenden Säugetieren und humanen Pankreata in den achtziger Jahren. (RICORDI et al., 1988, 1990, 1992; HERING et al., 1990).

Seit Anfang der neunziger Jahre führt man die Inseltransplantation bei Typ 1 Diabetikern als Allotransplantation und bei Patienten, die auf Grund anderer Ursachen ihr ursprüngliches Pankreas (z.B. durch eine Pankreatitis ohne Verlust des  $\beta$ -Zellapparates), verloren haben als Autotransplantation durch. Die Xenotransplantation in einer klinischen Anwendung wurde bislang nur experimentell durchgeführt (GROTH et al., 1994).

Wenn man die Statistik des internationalen Inseltransplantationsregisters (ITR) an unserer Klinik auswertet, kann man eine relativ hohe Insulinunabhängigkeitsrate für die Inselautotransplantation von 64 % für eine Insulinunabhängigkeit für mehr als sieben Tage ablesen. 40 % der Patienten waren nach 1 Jahr noch insulinunabhängig. Bei einem Patienten liegt nunmehr seit 13 Jahren eine intakte Transplantatfunktion vor (BRENDDEL et al., 2001). Die Gruppe um RICORDI berichtet 1995 über eine Serie von insgesamt 11 Patienten, die eine kombinierte Insel/Lebertransplantation erhielten. Diesen Patienten war auf Grund einer malignen Grunderkrankung eine Reihe von abdominalen Organen

operativ entfernt worden (Leber, Pankreas, Magen, Milz und Teile des Dünndarms). Die aus dem eigenen Pankreas isolierten Inseln wurden in die neue Transplantatleber injiziert. 4 Patienten erhielten innerhalb der ersten 5 Tage eine weitere Inseltransplantation. Insgesamt entwickelten 7 Patienten eine Insulinunabhängigkeit (im Mittel 514 Tage; längste Dauer 1726 Tage) (CARROLL et al., 1995).

Die Zahlen für die Inselallotransplantation belegen allerdings einen schlechteren Transplantationserfolg gegenüber der Autotransplantation.

Von insgesamt 355 Transplantierten weltweit erreichten im Zeitraum von 1990 bis 2000 19 % eine Insulinunabhängigkeit länger als eine Woche und 11 % länger als ein Jahr. Die maximale Insulinunabhängigkeit liegt momentan bei 70 Monaten. Nach einem Jahr haben 41 % eine nachweisbare Transplantatfunktion gemessen an einem C-Peptid  $> 0.5$  ng/ml. Die längste Inseltransplantatfunktion gemessen am C-Peptid besteht seit nunmehr acht Jahren. Die Einjahresüberlebenswahrscheinlichkeit der Patienten liegt bei 96 %. Die Zahlen für das Zentrum in Gießen zeigen durch erweiterte Spender- und Empfängerkriterien eine etwas bessere Situation: Hier wurde bei 88% der Fälle eine Transplantatfunktion für eine simultane Insel/Nierentransplantation und bei 54% für eine Insel nach Nierentransplantation gesehen. 30% der Patienten wurde zumindest zeitweise insulinunabhängig (BRENDEL et al., 2001, BRETZEL et al., 1999).

Gleich der Einteilung der Pankreastransplantation wurde auch in der Inseltransplantation eine Einteilung nach Indikationsgebieten vorgenommen. Die meisten Erfahrungen existieren bei Patienten, die auf Grund einer bestehenden oder kurz bevor stehenden Dialysepflicht eine simultane Insel-Nieren-Transplantation benötigen (SIK). Eine weitere Kategorie sind Patienten, die bereits eine Niere im Ablauf der vorangegangenen Monate und Jahre erhalten haben (Insel nach Nierentransplantation, IAK). Bei diesen beiden Kategorien ist die durchzuführende Immunsuppression bereits auf Grund der Nierentransplantation indiziert.

Wenig Erfahrungen, insbesondere im Langzeitbereich, existieren für eine Inseltransplantation alleine (ITA). Diese Kategorie betrifft Patienten, die noch keine schwerwiegenden Spätschäden erlitten haben und bei denen somit relativ früh in den Erkrankungsverlauf eingegriffen werden kann. Dabei muß allerdings immer der Nutzen für den Patienten mit den Problemen einer Immunsuppression abgewogen werden. Diese Transplantationen wurden nur an wenigen Zentren durchgeführt, unter anderem in Gießen und Edmonton, Kanada. In Gießen wurden 5 Patienten mit zu dieser Zeit aktuellen Immunsuppression und T-Zell Induktionstherapie transplantiert. Alle zeigten eine

Transplantatfunktion und 2 Patienten wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen insulinunabhängig (BRENDEL et al., 2001, MEYER et al., 1998). Zum anderen wurde durch die Gruppe um Shapiro eine Serie von 7 Patienten transplantiert. Alle wurden insulinunabhängig und blieben es für den berichteten Beobachtungszeitraum von 12 Monaten. Bei diesen Transplantationen wurden zusätzlich sequentielle (Mehrfach-) Transplantationen mit einer Mindestmenge von 6000 IEQ/Kg Körpergewicht pro Transplantation, eine steroidfreie Kombination dreier Immunsuppressiva und eine verbesserte Isolationstechnik verwendet. Die Transplantation erfolgt direkt im Anschluß an die erfolgreiche Isolation (SHAPIRO et al., 2000). Basierend auf diesen guten Ergebnissen wurde 1999 das Vorhaben einer internationalen, multizentrischen Studie gefaßt. Diese wird aktuell an insgesamt 10 Zentren weltweit nach dem sogenannten Edmonton-Protokoll durchgeführt. Dabei soll neben dem Erreichen der Insulinunabhängigkeit der Patienten Erfahrungen gesammelt werden bezüglich des Isolationsvorganges, der Spender und Empfänger Auswahl, der Immunsuppressionskombination und der Nachbetreuung der Patienten nach Transplantation.

Bei allen Patienten gilt die Insulinunabhängigkeit als das zu erreichende Maximalziel; in vielen Fällen war allerdings nur ein Teilerfolg erreichbar und ein Transplantatüberleben gemessen als Insulin-C-Peptid Sekretion. Aber auch dadurch erhalten die Patienten einen Benefit: Die Insulingesamtdosis kann reduziert werden und der Patient hat eine wesentlich stabilere Blutzuckereinstellung unter Vermeidung von exzessiv hohen und niedrigen Blutzuckerwerten (LUZI et al., 2001). Die Rate der spontanen, schweren Hypoglykämien, die eine starke vitale Bedrohung des Patienten darstellen, werden effektiv gesenkt und treten in den meisten Fällen während der Zeit, in der ein Inseltransplantat funktioniert, nicht mehr auf (MEYER et al., 1998). Diese Faktoren bewirken bei den meisten Patienten eine wesentliche Steigerung Ihrer Lebensqualität (INVARDI et al., 2001).

Aus den oben genannten kurzen Ausführungen wird deutlich, daß die Inseltransplantation eine sinnvolle und physiologische Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 darstellt. Das Maximalziel, die Insulinunabhängigkeit kontinuierlich zu erreichen, zu erhalten und in ausreichendem Maße anzubieten, ist zum aktuellen Zeitpunkt hauptsächlich auf Grund folgender Ursachen noch nicht erreicht:

- Begrenzte Verfügbarkeit von Spenderorganen
- Nebenwirkungen der notwendigen Immunsuppression auf den Empfänger und auf das Transplantat

- Erneutes Ausbrechen des Diabetes auf Grund immunologischer Einflüsse (Disease recurrence)
- Probleme der sogenannten 'Primary Nonfunction' des Transplantats
- Transplantatabstoßungen

Bislang wurde viel Energie darauf verwandt, diese Probleme zu verstehen und Lösungen zu erarbeiten.

Neben vielen anderen Wegen wurde auch versucht, folgende, zur bislang bekannten Inseltransplantation alternative, Lösungswege zu gehen. Hier eine kurze Auswahl:

- Immunisolation: Ein weiteres Bestreben in der Verbesserung des Transplantatüberlebens nach einer Inseltransplantation, ist, die Insel durch eine 'Schutzhülle' vor den Abstoßungsreaktionen zu schützen. Ursprünglich wurde eine Alginatbasis als Material verwendet (LIM et al., 1980). Anfängliche Erfolge in Nagetiermodellen konnten allerdings nicht in Großtierversuchen bestätigt werden. Dafür wurden zwei Dinge verantwortlich gemacht: Zum einen entsteht auf Grund der Bioinkompatibilität des Materials eine perikapsuläre Fibrose und zum anderen scheinen die  $\beta$ -Zellen Antigene freizusetzen, die Zytokine stimulieren, eine T-Zell-Antwort induzieren und eine Fibrose bewirken (SIEBERS et al., 1999).
- Toleranzinduktion: Durch die Transplantation von Inseln wird Fremdgewebe dem Empfänger ausgesetzt. Um die entstehenden Abstoßungsreaktionen zurückzudrängen, wird eine Immunsuppression eingesetzt, die für die Dauer der Transplantatfunktion eingenommen werden muß. Diese hat allerdings, wie jedes Medikament, mehr oder weniger starke Nebenwirkungen, wie z.B. ein potentiell erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen und auch diabetogene Wirkungen. Sinnvoll ist es, eine spenderspezifische Toleranzinduktion zu bewirken. Durch Manipulationen des Immunsystems an zentralen Stellen, die meistens T-Zell gesteuert waren, konnte ein verlängertes Transplantatüberleben erzielt werden, sowohl im Tiermodell als auch in einigen wenigen klinischen Modellen (LEVISETTI et al., 1997; OKT4A Studie, 1997). Dennoch sind diese Verfahren noch nicht im Stadium der breiten klinischen Anwendung.
- Xenotransplantation: Angesichts bestehender und weiter zunehmender Spenderorganknappheit bei weiter steigender Inzidenz des Typ 1 Diabetes wandte man sich der Xenotransplantation zu. Im Verlauf der letzten Jahre kristallisierte sich heraus, daß das Schwein ein idealer Spender sein könnte. Es steht in nahezu

- unbegrenztem Umfang zur Verfügung, ist standardisiert reproduzierbar, weist eine hohe Gewebekompatibilität auf und bietet die Möglichkeit vor einer Transplantation immunmodulatorische Vorbehandlungen durchzuführen (SACHS, 1994). Aber auch hier sieht man sich vielen Problemen der Abstoßung und Immunogenität gegenüber. Es konnte allerdings bereits gezeigt werden, daß grundsätzlich Schweineinseln, bedingt durch entsprechende Immunsuppression, im Menschen überleben können, wenn auch ein eindeutiger Effekt auf die metabolische Situation der Empfänger nicht nachweisbar war (GROTH et al., 1994). Die Frage, ob Viren, Prionen oder andere Krankheitserreger durch eine Transplantation übertragen werden können, ist bis heute noch nicht geklärt. In vitro konnte ein Retrovirus von Schweinezellen auf humane Zellen übertragen werden (PATIENCE et al., 1997). Im Gegensatz dazu steht die Erkenntnis, daß in den mit Schweineinseln transplantierten Patienten bis heute keinerlei Hinweis auf eine Infektion gefunden werden konnte (HENEINE et al., 1998).
- Genterapie: In den vergangenen Jahren rückte die Möglichkeit der Gentechnik wiederholt in den Vordergrund. Zum einen wurde versucht  $\beta$ -Zellenlinien mittels Gentransfer zur Zellteilung anzuregen (BECKER et al., 1994) oder die  $\beta$ -Zellen gegen den Immunangriff zu schützen, z.B. durch die Bildung von immunmodulatorischen Zytokinen (EFRAT et al., 1995). Diese Entwicklungsrichtung befindet sich allerdings noch im Anfangsstadium und wird noch einige Zeit bis zur klinischen Anwendung benötigen. In jüngster Zeit wird die Nutzung von Stammzellen, embryonal oder adult, heftigst diskutiert. Neben den ethisch-moralischen Diskussionen, stehen praktische funktionale Probleme im Vordergrund, wie z.B. die Differenzierung von Stammzellen in eine Insulin produzierende Zelle (SORIA, 2001). Diese Zellen bilden einen viel versprechenden Weg in der Therapie des Diabetes mellitus, der allerdings noch ganz am Anfang steht.

Neben diesen genannten Wegen, wurde intensiv an Verbesserungen und Neuerungen der bislang durchgeführten Inseltransplantationsprotokolle gearbeitet.

#### **1.6.2.1. Inselmasse**

Wie bereits erwähnt, erscheint es sinnvoll, bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 1 nicht das gesamte Organ, sondern nur den defekten Teil – den Inselapparat – zu transplantieren. Basierend auf historischen und neueren Kalkulationen wurde als Gesamtmasse der Inseln eines humanen Pankreas ein Anteil von ca. 0.5% bis 4% berechnet. Wenn man bei den Berechnungen eine standardisierte Inselgröße von 150  $\mu\text{m}$  zu Grunde legt, läßt sich eine Menge von ca. 700.000 Inseln dieser Größe errechnen

(WEIR et al., 1990). Bei der Gesamtinselzahl scheint es allerdings Abweichungen bis zur fünffachen Menge zu geben (SAITO et al., 1978).

Zum besseren Vergleich der Isolationsergebnisse wurde die Bezeichnung Inseläquivalente (IEQ) eingeführt. Sie bedeutet, daß bei der Bestimmung der Inselmasse mittels Aliquots jede Insel bezüglich ihrer Größe in Schritten von jeweils 50 µm beurteilt wird. Als Standardgröße gilt eine Insel mit einem Durchmesser von 150 µm. Die Anzahl der Inseln jeder Größe wird mit einem definierten Faktor multipliziert. So erhält man eine vergleichbare Zahl der Inselmasse (RICORDI et al., 1990). Dadurch kann die Transplantatfunktion auch mit der Inselmasse korreliert werden.

Daß die Inselmasse einen entscheidenden Einfluß auf den Transplantationserfolg hat, erscheint einleuchtend und wird auch als ein Entscheidungskriterium für eine klinische Inseltransplantation gefordert (BRETZEL et al., 1994). Als Grundlage für eine errechnete Mindestzahl an Inseln wurden die Beobachtungen nach erfolgter Pankreasteilresektion und der Entwicklung eines Diabetes mellitus herangezogen. Dabei zeigte sich, daß eine Pankreasteilresektion von 90% nicht automatisch zur Manifestation eines Diabetes mellitus führt (SUN et al., 1974; CHILD et al., 1969). Andere Autoren beschrieben, daß bei einer 80 bis 95%-igen Pankreatektomie 72% der Patienten einen Diabetes mellitus manifestierten, wo hingegen bei einer Resektion von weniger als 80% nur 32% erkrankten (FREY et al., 1997). Das Risiko, eine gestörte Glukosetoleranz nach erfolgter Lebendspende zu haben, wird in einer Untersuchung mit bis zu 15 % angegeben (GRUESSNER et al., 1997) und zusätzlich erwiesen sich die Nüchternseruminsulin- und C-Peptidkonzentrationen vermindert (KENDALL et al., 1990). Die Insulinsekretionsreserve des Pankreas ist nach einer Lebendspende eindeutig verringert (SEAQUIST et al., 1992).

Somit wäre, laut den Berechnungen, ein Minimum von 10% des ursprünglichen Gewebes erforderlich, um die vorliegende Hyperglykämie zu beheben.

Die Mindestgrenzen, die bislang definiert wurden, haben sich im Verlauf der letzten 10 Jahre mehrfach geändert und wurden bezüglich der Menge nach oben korrigiert. Als Grundlage stehen allerdings nur die Erfahrungen aus bislang durchgeführten klinischen Transplantationsserien zur Verfügung. Diese existieren sowohl im Bereich der humanen Allotransplantation als auch aus der humanen Autotransplantation. Bei letzterer zeigte sich, daß Patienten, die mehr als 2500 IEQ/kg Körpergewicht (KG), entsprechend 175.000 IEQ für einen 70 kg Patienten, erhalten hatten, eine höhere Insulinunabhängigkeitsrate erzielten als Patienten die weniger als 2500 IEQ/kg KG erhielten (KANDASWAMY et al., 2000).

In einer anderen Untersuchung wird eine Mindestmenge von im Mittel 265.000 Inseln genannt (110.000 bis 412.000 Inseln). Dabei erlangten fünf von fünf untersuchten Patienten dieser Transplantationsserie eine Insulinunabhängigkeit mit wesentlich verbesserten metabolischen Parametern (Nüchternblutzucker, HbA<sub>1c</sub>, oraler Glukosetoleranztest). Leider sind diese Inselmengen nur indirekt mit der ersten genannten Untersuchung zu vergleichen, da nur die Inselzahl und nicht IEQ angegeben wurde (PYDROWSKI et al., 1992). Diese Ergebnisse sind insofern interessant, da keine Alloimmunität und auch keine Autoimmunität vorlag und auch keine diabetogene Immunsuppression gegeben wurde. Bei der Allotransplantation findet man differente Angaben von Mindestmengen. LUZI et al. beschreiben eine Transplantatfunktion bei acht Patienten gemessen am C-Peptid bei Transplantation von 722.853 Inseln im Mittel. Bei der Verwendung von im Mittel nur 640.717 Inseln bei sieben weiteren Patienten zeigte sich keine Transplantatfunktion gemessen am C-Peptid (LUZI et al., 1996). Eine weitere Publikation berichtet über acht Patienten. Alle zeigten eine Langzeittransplantatfunktion gemessen am C-Peptid. Zwei dieser Patienten erlangten eine Insulinunabhängigkeit für 36 bzw. 38 Tage. Es wurden Verbesserungen bezüglich der o.g. metabolischen Parameter gesehen. In dieser Transplantatserie wurden ein Minimum von 15.000 IEQ/kg KG transplantiert. Die benötigte Transplantatmenge wurde aus einem und bis zu fünf einzelnen Pankreata isoliert (ALEJANDRO et al., 1997). 2000 gelang es der Gruppe in Edmonton um SHAPIRO eine höhere Quote der Insulinunabhängigkeit nach einer Inseltransplantation zu erzielen. Hierbei wurde ein Minimum von 11.000 IEQ/kg KG veranschlagt. Dadurch und durch weitere Modifikation des Transplantationsprotokolls konnten sieben von sieben transplantierten Patienten langfristig (im Durchschnitt ca. 12 Monate) insulinunabhängig werden. Die gewünschte Menge an isolierten Inseln konnte aus jeweils zwei und für einen Patienten aus drei Spenderpankreatata isoliert werden (SHAPIRO et al., 2000). Diese Transplantationsserie wurde mittlerweile erfolgreich weitergeführt (RYAN et al., 2001). Die Studien von Alejandro und Shapiro weisen entscheidende Unterschiede auf. Obwohl Alejandro eine größere Inselmasse verwendete, erlangte die Gruppe um Shapiro die besseren Ergebnisse. Eine mögliche Ursache könnten die unterschiedlichen Empfängerkriterien und unterschiedlichen immunsuppressiven Protokollen. Shapiro transplantierte nur Patienten ohne gravierende Spätschäden und er verwendete eine Immunsuppression mit geringeren diabetogenen Nebenwirkungen. Auf die Verwendung von Steroiden verzichtete diese Gruppe.

Kürzlich berichtete allerdings die Gruppe um BERTUZZI von einer Rate von 66% Insulinunabhängigkeit bei 15 Patienten, die bei fünf dieser Patienten länger als ein Jahr anhielt. Alle Patienten hatten zuvor eine Nierentransplantation auf Grund einer terminalen Niereninsuffizienz erhalten und waren somit Patienten mit einer gravierenden Spätkomplikation. Bei acht der zehn insulinunabhängigen Patienten wurden zwei Präparationen pro Patient transplantiert. Zwei der zehn Patienten erhielten nur eine Präparation. Aus ihren Ergebnissen folgern die Autoren, daß es durchaus möglich ist, auch diese Gruppe von Patienten erfolgreich zu transplantieren. Auch die Verwendung von weniger als 8000 IEQ/kg KG erscheint ihnen sinnvoll. Dennoch vermuten sie, daß bei den Patienten, die nur eine Transplantatfunktion ohne Insulinunabhängigkeit zeigten, eine Erhöhung der Inselmasse durch eine weitere Transplantation eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Insulinunabhängigkeit bedeuten könnte. Die Ergebnisse führen die Autoren auf die Kultur in Medium TCM199 für einen Tag und auf das geänderte Transplantationsmanagement zurück. Bezüglich der Inselmasse zogen sie nur, wie bereits erwähnt, einen indirekten Bezug zur Insulinunabhängigkeit (BERTUZZI et al., 2002).

Aus diesen Berichten erscheint die Mindestinselmasse von 11.000 IEQ/kg KG, verbunden mit weiteren Neuerungen, auf die im weiteren Verlauf eingegangen werden wird, für das Erzielen einer Insulinunabhängigkeit, welche zu einem hohen Prozentsatz auch noch nach einem Jahr besteht soll, eine Grundvoraussetzung zu sein.

Betrachtet man die Isolationsergebnisse einzelner Zentren, so liegen die Ergebnisse bei bis zu 500.000 IEQ pro Pankreas. In Einzelfällen liegen die Werte auch bei über 1 Million IEQ (Ergebnisse der Datenbank humane Isolation, Gießen). Somit ergibt sich, daß eine erfolgreiche Inseltransplantation in der weitaus überwiegenden Zahl der Fälle die Isolation von mindestens zwei Organen oder mehr bedeutet. Dies stellt im Hinblick auf die seit langem bestehende, große Organknappheit ein großes Problem dar. Zusätzlich stellt sich die Problematik dar, daß nicht aus jedem Organ, welches der Inselisolation zur Verfügung steht, eine erfolgreiche Isolation hervorgeht. Genaue Zahlen wurden nicht publiziert. Wenn man sich ersatzweise Zahlen der Organspende und Organtransplantationen bedienen möchte, steht man dem Problem gegenüber, daß die Zahlen der Inseltransplantation unter der Rubrik der Pankreastransplantation subsumiert ist. Somit ist eine exakte Aussage schwer möglich.

Ausgehend von der Tatsache des hohen Organbedarfs zum Erreichen der Insulinunabhängigkeit eines Patienten, wird das anzustrebende Ziel, eine erfolgreiche

Inseltransplantation mit Erreichen einer langfristig anhaltenden Insulinunabhängigkeit mit der Konstellation ein Spender – ein Empfänger sein.

#### **1.6.2.2. Ansätze für ein verbessertes Transplantationsergebnis**

Wenn man sich die Frage stellt, welche Ansatzpunkte es zu diesem Ziel gibt, findet man eine ganze Reihe von Punkten. Nachfolgend soll eine kleine Auswahl angesprochen werden:

- Verbesserung der Organspende und der Organbehandlung
- Inselisolationsvorgang
- Immunsuppression und Gabe von eventuell protektiven Substanzen
- Vorbehandlung der isolierten Inseln

Hinsichtlich der Organspende, ihrer Kriterien und der Organbehandlung wurde in den vergangenen Jahren eine Reihe von Verbesserungen eingeführt. Einfluß auf den Transplantationserfolg nehmen mehrere Faktoren. So z.B. die Art des Hirntodes (PRATSCHKE et al., 1999), das Alter (> 20 Lebensjahre) und Body Mass Index (BMI > 21) des Spenders, eine intakte Organkapsel, Verwendung von „University of Wisconsin“ (UW) Lösung zur Perfusion des Organ (Mindestvolumen > 3 Liter) (BRANDHORST et al., 1994), die warme (< 20 Min.) und kalte (< 6 h) Ischämiezeit (KETCHUM et al., 1994, LAKEY et al., 1995). Um Organe, die aus organisatorischen Gründen eine absehbar längere Ischämiezeit erzielen würden, dennoch verwenden zu können bzw. die durch die vorhandene kalte Ischämiezeit auftretenden Schäden reversibel zu machen, wurde das Konzept der sogenannten „Two layer method“ auf die Inselisolation adaptiert. Hierbei wird das Organ in zwei Lagen, UW-Lösung und Perfluorkohlenwasserstoff, gelagert. Dadurch soll eine verbesserte Inselausbeute resultieren ( KURODA et al., 1993).

Die Inselisolation basiert nach wie vor auf der 1988 eingeführten (semi-) automatisierten Methode durch RICORDI et al., 1988. Diese wurde bislang im allgemeinen wie dort beschrieben beibehalten. Veränderungen wurden hinsichtlich der Distension des Organ eingebracht. Durch die Gruppe in Edmonton wurde eine Methode der druckkontrollierten Perfusion des Organs entwickelt (LAKEY et al., 1999). Des weiteren werden keine endotoxin-haltigen Substanzen verwendet, da dadurch ein schlechteres Transplantationsergebnis erzielt wird (ECKHARDT et al., 1996). Endotoxin-haltige Kollagenase aktiviert Zytokine wie z.B. IL-1 $\beta$  (JAHR et al., 1999), TNF- $\alpha$ , IL-6, und NO (VARGAS et al., 1995) und humanes Komplement (JAHR et al., 1995). Unter anderem wird in den meisten Zentren mittlerweile das Enzym „Liberase“ zur Isolation verwendet,

welches nur geringe Endotoxin enthält. Im Bereich der Reinigung sind in den letzten 10 Jahren kaum Veränderungen etabliert worden. Der Standard ist nach wie vor die Verwendung eines kontinuierlichen Gradienten (ROBERTSON et al., 1993) und des Zellseparator 2991 von COBE (LAKE et al., 1989). Allerdings kommen unterschiedliche Reagenzien zum Einsatz, ohne daß eine Kombination einen entscheidenden Vorteil gegenüber einer anderen hinsichtlich der Inselausbeute, der Viabilität und der Reinheit bietet.

Viele Entwicklungen gab es auf dem Gebiet der Immunsuppression und eventuell Inselprotektiver Substanzen. Dies war auf Grund der vorhandenen  $\beta$ -Zell-toxischen Potenz vieler verwendetet Immunsuppressiva dringend notwendig. So wirken sowohl Kortikosteroide, Cyclosporin A als auch Tacrolimus diabetogen (WEIR et al., 1999) und beeinflussen unter anderem die Insulinsynthese und Insulinsekretion. Zusätzlich besteht eine potentiell erhöhte Gefahr für Infektionen und maligne Erkrankungen (GAYA et al., 1995; LONDON et al., 1995). Andere Immunsuppressiva zeigen geringere Nebenwirkungen. Einen potenten klinischen, immunsuppressiven Effekt zeigen 15-Deoxyspergualin (GORES et al., 1993) ohne  $\beta$ -Zell toxische Nebenwirkung (XENOS et al., 1993) und Mycophenolate Mofetil, welches keinen diabetogenen Effekt zeigt (PLATZ et al., 1991). Rapamycin, das bereits erfolgreich klinisch im Rahmen der Transplantationsserie der Gruppe in Edmonton verwendet wurde, zeigte nur in hohen Dosierungen eine diabetogene Wirkung (MORRIS, 1992). Eine Kombination mit Tacrolimus ergab synergistische Effekte (McALISTER et al., 2000). Dies wird unterstützt durch die guten Ergebnisse der Arbeitsgruppe in Edmonton. Leflunomide zeigte in Tierexperimenten eine adäquate, immunsuppressive Wirkung und keine Insel-toxischen Effekte (GUO et al., 1997). Ebenfalls im Tiermodell konnte erfolgreich gezeigt werden, daß Pravastatin, ein HMG-CoA Reduktasehemmer, welcher in der klinischen Routine zur Behandlung von Fettstoffwechselstörungen eingesetzt wird, einen positiven Effekt auf die allogene Rejektion, in Verbindung mit niedrig dosiertem Cyclosporin, besitzt (ARITA et al., 1998). Dennoch besitzen alle genannten Immunsuppressiva viele andere Nebenwirkungen, auf die hier nicht im Einzelnen eingegangen werden kann, so daß die Situation zwar verbessert wurde, aber noch weit von einer befriedigenden Lösung entfernt ist.

Unter dem Gesichtspunkt der Immunogenitätsminderung ist ein wesentlich und entscheidender Vorteil der Kultur die Möglichkeit, während der Kulturperiode eine Vorbehandlung der Inseln zur Verringerung der Immunogenität durchzuführen. Diese

Ansätze haben eine Verlängerung des Transplantatüberlebens zum Ziel. Bei tierexperimentellen Untersuchungen zu dieser Frage wird immer ein Überschuß an Inselmasse transplantiert, um einen Transplantatverlust auf Grund früher inflammatorischer Prozesse ausgleichen zu können. Zur Immunmodulation von Inseln sind mittlerweile eine große Zahl von Untersuchungen durchgeführt worden. Als praktische Vorteile einer vor der Transplantation erfolgenden Inselkultur ergeben sich für das klinische Procedere, daß man ausreichend Zeit erhält, den Patienten auf die Transplantation vorzubereiten. So läßt sich ein sicheres und effektives Peri-Transplantationsmanagement aufrecht erhalten.

Bei der Vorbehandlung der isolierten Insel vor Transplantation gibt es mehrere Ansätze. JAMES beschrieb für eine Gammabestrahlung der Inseln mit 2.5 Gy im Nagetiermodell einen Langzeittransplantationserfolg in Verbindung mit niedrig dosiertem Cyclosporin A. Als Grund wird ein Verlust MHC Klasse II tragender Zellen des Spenders vermutet (JAMES et al., 1989). Ein weiterer Ansatz ist die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht. HARDY zeigte im allogenen und auch xenogenen Tiermodell eine Verlängerung des Transplantatüberlebens durch eine UV-Bestrahlung mit  $1000 \text{ J/m}^2$  (HARDY et al., 1984). Eine verminderte Immunogenität humaner Inseln konnte durch eine UV-Bestrahlung von  $300\text{-}700 \text{ J/m}^2$  erzielt werden (BENHAMOU et al., 1994). Ein weiterer Ansatz zur Verminderung der Immunogenität ist die Vorbehandlung mit monoklonalen Antikörpern. Diese versuchen spezifisch an Rezeptoren der Insel zu binden und vor allem die T-Zell Antwort zu verringern oder sogar zu unterbinden. Bisläng sind eine Vielzahl von Antikörper mit unterschiedlichen Erfolgen vor allem im Tiermodell (Antikörper gegen MHC Klasse I bzw. II, ICAM-1/lymphozyte functional antigen, CTLA4Ig, CD154, etc.) getestet worden.

Es wurden die Kulturbedingungen verändert, um einen Effekt auf die Immunogenität zu sehen. LACY et al. kultivierten Inseln im xenogenen Tiermodell bei 95% Sauerstoff mit 5%  $\text{CO}_2$ . Dadurch wurde eine Verlängerung des Transplantatüberlebens erzielt (LACY et al., 1982). Durch die Kultur bei  $37^\circ\text{C}$  für 7 Tage zeigte KNETEMAN ebenfalls eine Transplantatverlängerung im Tiermodell. Ursächlich dafür sei eine Verringerung der MHC Klasse I und II Expression (KNETEMAN et al., 1991). Auch für eine Niedrigtemperaturkultur bei  $24^\circ\text{C}$  wurde eine Transplantatverlängerung gesehen, sowohl für Nagetierinseln (LACY et al., 1979) als auch für humane Inseln (FALQUI et al., 1991). Allerdings war in beiden Fällen eine passagere Immunsuppression mit Antilymphozytenserum (ALS) notwendig. Sozusagen als Nebeneffekt der Kultur ist eine

wesentlich höhere Reinheit der Inselpräparation beschrieben. Es zeigte sich, daß der Anteil an exokrinem Gewebe, Endothelzellen und duktalem Gewebe nach Kultur verringert war (LACY et al., 1979, Yasunami et al., 1983, Faustmann et al., 1981). In den genannten Untersuchungen wurde hauptsächlich RPMI 1640 oder CMRL 1066 verwendet. In einer vergleichenden Studie unterschiedlicher, kommerzieller Medien zeigte sich CMRL 1066 für die humane Insel im Hinblick auf Insulingehalt, Inselüberleben, Viabilität und Transplantationserfolg als das am besten geeignete Medium. Wie bereits erwähnt, spielt auch die Kulturtemperatur eine Rolle. Dabei unterscheidet man hauptsächlich 37°C von der Niedrigtemperatur 22°C bzw. 24 °C. Der aktuelle klinische Standard in Gießen sieht eine Kultur bei 22°C in CMRL 1066 vor.

In der klinischen Anwendung waren bislang T-Lymphozyten Antikörper, wie z.B. ALS, Antithymozytenserum oder OKT3. Keine der erwähnten Substanzen ist aktuell in der klinischen, humanen Inseltransplantation anwendbar oder zeigte einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Substanzen.

Aus klinischer Sicht stellt sich prinzipiell die Frage, ob eine Kultur der Inseln sinnvoll ist und welchen Vorteil es bringt. Als Nachteil steht vor allem die Gefahr einer Kontamination mit Bakterien oder Pilzen im Vordergrund, die parallel zur Länge der Kulturdauer ansteigt. Diese Risiken können durch Befolgen grundlegender Arbeitsvorschriften und Verwenden von sterilen Arbeitsmaterialien minimiert werden. Allerdings gibt es zu dieser Problematik und deren klinische Auswirkungen nur vereinzelte Berichte. SCHARP beschrieb, daß die größte Kontaminationsgefahr von der Transportflüssigkeit des humanen Pankreas ausgeht. Im Bereich des Isolationsvorganges erwies sich der Dichtegradient als größte potentielle Kontaminationsquelle (SCHARP et al., 1992). Diese Probleme wurden bislang in der humanen Inselisolation am Zentrum in Gießen nicht beobachtet.

Eine andere Zielstellung wird in Versuchsmodellen verfolgt, die eine primäre Funktion zum Ziel haben und die frühen Vorgänge des Transplantatverlustes untersuchen. Dabei spielt das sogenannte Modell der 'marginalen Inselmasse' eine große Rolle. Dies bedeutet, daß die Inselmasse minimiert wird, um jeglichen Effekt, der durch Zellverluste entsteht, erkennen zu können und nicht durch ausreichend vorhandenes Zellmaterial zu überdecken. Es wurde zum einen durch Zugabe von Substanzen versucht dieses Ziel zu erreichen, wie z.B. durch die Inkubation mit Probucol (ECKHARDT, Inaug. Diss. 2002) oder mit unterschiedlichen Vitaminen (WINTER et al., 2002).

Bei manchen Fragestellungen ist es allerdings sinnvoll, bei Überschneidungen beide Möglichkeiten der Vorbehandlung zu betrachten und eventuell zu kombinieren. Dies

erscheint auch unter dem Gesichtspunkt sinnvoll, daß eine frühe inflammatorische Antwort die akute, T-Zell vermittelte Rejektion beeinflußt (HALLORAN et al., 1997, siehe Diskussion).

In der vorliegenden Arbeit soll basierend auf diesen Erkenntnissen der Frage nachgegangen werden, welchen Effekt die Kultur in TCM199 + 5% FCS (Fetal Calf Serum), welches als Standardmedium in unserem experimentellen Labor Anwendung findet, auf den Transplantationserfolg und das frühe Transplantatüberleben hat. Verbunden damit ist der Einfluß der Kulturtemperatur. Die unterschiedlichen Medien und ihre Bestandteile werden im weiteren Verlauf besprochen werden.

## 1.7. Ziele der Arbeit

Im Einzelnen wurden folgende Ziele mit der vorliegenden Arbeit verfolgt:

1. Nach wie vor bedient man sich des allogenen Rattenmodells, um unterschiedliche Vorgehensweisen zur Verhinderung der Transplantatabstoßung zu untersuchen. Zur Vereinfachung des Modells kann man direkt nach der Isolation, sozusagen frisch isolierte, Inseln transplantieren. Die Frage ist, ob ein Unterschied zwischen der Transplantation von frischen Inseln gegenüber 1 Tag kultivierten Inseln bei 37°C in TCM199 + 5% FCS besteht?
2. Konsekutiv stellt sich die Frage, ob Ratteninseln in vitro eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Radikalen wie Stickstoffmonoxid und Superoxid in vitro aufweisen, wenn man frische gegen einen Tag kultivierte Inseln vergleicht?
3. Im Hinblick auf die klinische Situation soll der Frage nachgegangen werden, welche Rolle der Kultur bei 37°C gegenüber 22°C in TCM199 + 5% FCS bezüglich des frühen Transplantatüberlebens im konkordant xenogenen Modell der Ratte als Spender zukommt. Die Transplantation erfolgte unter die Nierenkapsel im diabetischen Mäusemodell.
4. Es galt zu untersuchen, ob eine Kultur der Inseln bei 22°C oder 37°C in TCM199 + 5% FCS einen entscheidenden Vorteil bezüglich des frühen Transplantatüberlebens gegenüber einer Kultur bei 22°C in CMRL 1066 erbringt.



### 2.1.2. In vitro Testung der Empfindlichkeit von Ratteninseln gegenüber Stickstoffmonoxid (NO) produzierendem Natriumnitroprussid und Superoxid (XO) produzierender Xanthin/Hypoxanthinoxidase

Isolierte Inseln weisen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Noxen auf (siehe Diskussion). In den durchgeführten in vitro Tests wurden sowohl Ratteninseln als auch humane Inseln getestet.

#### Material

96 Lochplatte Flachboden	Falcon, Frankreich
Pipetten, 10, 100, 1000 l	Gibco, Frankreich
Pipettenspitzen, steril	Greiner, Frickenhausen
Brutschrank	Heraeus, Hanau

#### Reagenzien

Natriumnitroprussid (NNP)	Sigma, St. Louis
Hypoxanthin	Sigma, St. Louis
Hypoxanthinoxidase, 20 U/ml	Böhringer, Mannheim
Trypanblau	Merck, Darmstadt
TCM199 + 5% FCS	siehe 2.2.1

#### Stammlösung

Natriumnitroprussid: 18 ml NNP in 5 ml TCM199 + 5% FCS lösen. Dies ergibt eine Lösung von 12 mmol/l. Die Herstellung der Stammlösung erfolgt unmittelbar vor der Verwendung, da sich Natrium-Nitroprussid in Lösung relativ schnell spontan zersetzt.

Hypoxanthinlösung: 2.04 mg Hypoxanthin in 50 ml TCM199 + 5% FCS lösen. Diese Lösung (3 mmol/l) kann für mehrere Wochen ohne Aktivitätsverlust bei 4 °C aufbewahrt werden.

Hypoxanthinoxidase Stammlösung (täglich frisch hergestellt): 20 µL Hypoxanthinoxidase in 3.3 ml TCM199 + 5% FCS entsprechen 120 mU/ml. Durch Zugabe von TCM199 + 5% FCS in gewünschte Konzentrationen bringen.

#### Durchführung:

Es wurden pro Test jeweils 15 parallel verlaufende Inkubationen durchgeführt. Pro Inkubationsvertiefung („Well“) einer 96-Lochplatte wurden je 15 Inseln zusammen mit 100 µl TCM199 + 5% FCS eingefüllt. Bei den Kontrollinkubationen wurden weitere 50 µl TCM199 + 5% FCS zugesetzt. Zur Bestimmung der Sensitivität der Inseln gegenüber NO-vermittelter Zellschädigung erfolgte der Zusatz von 50 µl entsprechend vorverdünnter NNP-Lösung (Verdünnung in TCM199 + 5% FCS), so daß die in Abbildung 1 angegebenen Endkonzentrationen erreicht wurden. Zur Bestimmung der Sensitivität der Inseln gegenüber XO-vermittelter Zellschädigung wurden anstelle der NNP-Lösung zuerst 25 µl der unverdünnten Hypoxanthinlösung (Endkonzentration im Test damit 0.5 mmol/l) und dann 25 µl entsprechend vorverdünnter Xanthinoxidaselösung (so daß die in Abbildung 2 angegebenen Endkonzentrationen erreicht wurden) zu jedem Well hinzugefügt. Nach 20-stündiger Inkubation bei 37°C wurde dann jeweils 100 µl des

Kulturüberstandes aus den Wells entfernt und die Inseln wurden mit 10 µl Trypanblau inkubiert. Nach zwei Waschschrinen erfolgte für jede einzelne Insel eines gegebenen Wells eine mikroskopische Abschätzung des Anteils vitaler (nicht blau gefärbter) Zellen; davon ausgehend wurde ein Mittelwert für die Inseln jedes Wells gebildet.

### 2.1.3. Inselfunktionstest

Aufgrund der vielfältigen Stresssituationen während des Isolationsprozesses in der humanen Inselisolation muß man vor Transplantation die Funktionsfähigkeit einer Inseln bestimmen, um das Transplantationsergebnis korrelieren zu können.

#### 2.1.3.1. Statische Glukosestimulation

Mittlerweile in der humanen Inselisolation standardisiert eingesetzt sind die statischen Stimulationstests mit Glukose. Hierbei wird mit einer speziellen Glukoselösung stimuliert und die Insulinsekretion gemessen.

Material:

Wasserbad	Köttermann
Röhrchen 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten, 10, 100, 1000 l	Gibco, Frankreich
Pipettenspitzen, steril	Greiner, Frickenhausen

#### IRI-Puffer (Puffer zur Bestimmung von immunreaktivem Insulin)

1l Aqua dest + 7,12 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  + 6 g NaCl + 3 g RSA (Rinderserumalbumin; Merck, Darmstadt)

#### Stimulationslösungen

Ausgangsmaterial für die verwendeten Stimulationslösungen ist eine spezielle glukosefreie TCM199-Charge. Es werden Stimulationslösungen mit 0,1% RSA und 30 mg/dl und 300 mg/dl Glukose hergestellt.

##### **Stammlösungen:**

Glukose-0: 500 ml TCM-199 (FZ 0665, w/o Glukose, w/o Carbonate, Biochrom H069) + 100 µl konz. HCl + 5 ml Penicillin/Streptomycin (Bio Whittaker, Verviers)

Glukose-300: Wie Glucose-0, aber mit 7,5 ml 20%iger Glukoselösung/500 ml.

RSA-300: 0,5 g Rinderserumalbumin, gelöst in 50 ml Glukose-300, dann steril filtrieren.

##### **Gebrauchslösungen:**

TCM199/30: 45 ml Glukose-30 + 5 ml RSA-300.

TCM199/300: 45 ml Glukose-300 + 5 ml RSA-300.

#### Insulinsekretion

Die isolierten humanen Inseln werden gewaschen und in eine Petrischale mit TCM-199/30 mg/dl Glukose überführt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C, wird das in diesem

Zeitraum sezernierte Insulin durch erneutes Überführen in frisches TCM-199/30 mg/dl Glukose entfernt. Dieser Vorinkubationsschritt führt zu einer erheblichen Senkung der aus einer Mischung von passiver Insulinfreisetzung (aus geschädigten Zellen) und basaler Insulinsekretion bei 30 mg/dl resultierenden Basalrate.

Unter dem Stereomikroskop werden je 5 Inseln des Durchmessers 150 µm in 10 µl Medium mit einer geeigneten Eppendorf-Pipette in Plastikreagenzröhrchen überführt. Jeweils 5 der Röhrchen enthalten 0,5 ml TCM-199/30mg/dl Glukose, 5 Röhrchen 0,5 ml TCM-199/300 mg/dl Glukose. Sie werden über 90 Minuten bei 37°C im Wasserbad – bei leichtem Schütteln – inkubiert. Zur Gewinnung von `Leerwerten´ für die Insulinbestimmung werden parallel jeweils zwei Röhrchen nur mit Medium ohne Insulin inkubiert.

Aus jedem Ansatz werden 100 µl Überstand in 1 ml IRI-Puffer überführt und geschüttelt. 25 µl davon (Ratte) bzw. 50 µl (Mensch) werden im jeweiligen Enzymimmunessay (EIA) verwendet (siehe unten).

#### Insulingehalt

Die Inseln und das verbliebene Medium werden mittels eines Ultraschallhomogenisators beschallt, mit IRI Puffer verdünnt und der Insulingehalt der Suspension ebenfalls mit dem EIA festgestellt.

Material:

Ultraschallhomogenisator	Labsonic
Pipetten, 10, 100, 1000 l	Gibco, Frankreich
Pipettenspitzen, steril	Greiner, Frickenhausen

Insulinbestimmung:

Material:

Insulin Enzymimmunessay (EIA) für humanes Insulin	DRG, Marburg
Aqua dest, pyrogenfrei	Pharmacia Upjohn

Durchführung:

Die Insulinbestimmung mittels eines EIA ist heute ein Standardverfahren. Das Prinzip basiert auf einer Bindung markierter Antikörper, welche über eine enzymatische Reaktion eine Farbreaktion auslösen, die man photometrisch bestimmen kann.

Die Durchführung erfolgte strikt nach den Bestimmungen des Herstellers. Ebenso wurden, abgesehen von Aqua destillata, nur Reagenzien, welche dem Test-Kit beiliegen, verwendet. Beim Humaninsulin-EIA besteht laut den Angaben des Herstellers besteht keine Kreuzreaktivität zu Ratten- oder Mäuse-Insulin. Die vollständige Abwesenheit einer

Reaktion auf Ratten- und Mäuseinsulin und Proinsulin wurde durch das Nichtansprechen auf Extrakte von Pankreasextrakten oder Inselhomogenate dieser Spezies von uns überprüft. Damit ist im Unterschied zu den ebenfalls getesteten Radio- oder Enzymimmunoassays anderer Hersteller der von uns verwendete Enzymimmunoassay geeignet, humanes Insulin selektiv in Mäuseplasma oder Serum nachzuweisen. Nach photometrischer Bestimmung der Extinktionswerte wurde anhand der Eichkurve der Insulingehalt in  $\mu\text{U/ml}$  errechnet. Zur Bestimmung Insulinsekretion pro Inseläquivalent wird der gemessene Insulingehalt mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

### **2.1.3.2. Bestimmung des Insulingehaltes im Transplantat-tragenden Organ**

Die transplantierten Tiere werden mittels Äthernarkose betäubt. Mittels derselben Technik wie sie zur Transplantation angewandt wird, wird die das Transplantat-tragende Niere entnommen (siehe 2.3.3.). Der Teil der Niere, welcher das Transplantat trägt, wird ausgeschnitten und in ein Gewebekulturröhrchen überführt. Die Nieren wurden in Säure-Alkohol nach Ziegler (ZIEGLER et al., 1985) homogenisiert und extrahiert. Aus Aliquots der Extrakte wurde nach einer Verdünnung von mindestens 1:20 mit IRI-Puffer der Insulingehalt mittels EIA bestimmt. Der entsprechende Ratteninsulin-EIA wurde ebenso nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (siehe auch Abschnitt 2.1.3.1.).

## **2.2. Inselgewinnung und Kultur**

- Ratteninseln
- Humane Inseln

### **2.2.1. Medium TCM199 + 5% FCS**

TCM-199, w/o Carbonate, w/o Hepes, mit L-Glutamine, 10fach	Gibco, Paisley, Scotland
Aqua dest, pyrogenfrei	Pharmacia Upjohn
Hepes-Puffer, 1M,	Biochrom, Berlin
N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamine, 200 mM,	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
NaOH, 10 M	Serva, Heidelberg
FCS, Charge 30 L, endotoxinarm	Biochrom, Berlin

Als Grundlage des Kulturmediums wurde das kommerzielle, allgemein verbreitete Medium TCM-199 mit Zusatz von 5% komplementinaktiviertem, fetalem Kälberserum (FCS) mit niedrigem Endotoxingehalt verwendet (TCM-199 + 5% FCS). Zum Erreichen einer pH-Stabilität verwendeten wir Hepes-Puffer. Dem Medium wurde kein Karbonat

zugesetzt. Dies ermöglicht die Verwendung unter normalen atmosphärischen Bedingungen ohne Veränderung des pH Wertes. Prophylaktisch erfolgte eine antibiotische Abdeckung.

Das Medium enthielt folgende Endkonzentrationen: TCM-199, 5% FCS, 2 mmol/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, 20 mmol/l Hepes (pH=7,4), 100 IU/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin.

Das komplette Kulturmedium war im Test mit dem entsprechenden Immunoassay Kit (Roche, Mannheim) frei von Mycoplasmen.

### 2.2.2. Medium CMRL 1066

CMRL 1066	Gibco, Paisley, Scotland
DTT- Gebrauchslösung	siehe unten
Hepes-Puffer, 1M,	Biochrom, Berlin
Glycyl-L-Glutamin, 200 mM,	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Ciprobay	Bayer Vital, Leverkusen
Hydrocortison 1 mg	Pharmacia, Erlangen
Na-Pyruvat	Serva, Heidelberg
FCS, Charge 30 L, endotoxinarm	Biochrom, Berlin

Weitere Substanzen zum Herstellen der Gebrauchslösungen:

Äthanol 80 %, unvergällt	Klinikumsapotheke
CMRL 1066	Gibco, Paisley, Scotland

Herstellen der Gebrauchslösungen:

Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
----------------	--------------------

Dithiothreitol (DTT): 77 mg Pulver werden in 100 ml original CMRL 1066 gelöst. Davon werden 5 ml auf 500 ml CMRL Gesamtlösung verwendet.

Natrium Pyruvat (1mM): 110 mg werden in 10 ml original CMRL 1066 gelöst. Davon werden 5.5 ml auf 500 ml CMRL 1066 Gesamtlösung verwendet.

Hydrocortison: Als lipophile Substanz wird es in 1 ml vergälltem 80% -igen Alkohol gelöst und mit 5 ml CMRL 1066 vermischt. Dies wird 2-fach durchgeführt und es werden 10 ml auf 500 ml CMRL 1066 Gesamtlösung verwendet.

Als Grundlage des Kulturmediums diene das kommerzielle Medium CMRL 1066 mit niedrigem Endotoxingehalt. Das Medium enthält Karbonat und benötigt eine Umgebung mit 5 % CO<sub>2</sub> in Raumluft.

Die verwendeten Mengen in der fertigen Kulturlösung waren folgende: Auf 500 ml CMRL werden 5 ml DTT-Gebrauchslösung, 5.5 ml Glycyl-L-Glutamin (200 mM), 5.5 ml Na-Pyruvat, 5.5 ml Ciprobay, 5.5 ml HEPES Puffer (1 M), 10 ml Hydrocortison (1 mg), 60 ml FCS, 10 ml Penicillin/Streptomycin verwendet.

Beide Kulturmedien wurden unter sterilen Bedingungen an einem sterilen Arbeitsplatz und mit sterilen Materialien hergestellt. Probleme der Kontamination mit Mikroorganismen traten nicht auf.

### **2.2.3. Endotoxinbestimmung**

Ein zentrales Problem der Verwendung von Medien und Enzymgemischen in der Inselisolation ist die Kontamination durch Endotoxin. Der "Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate"-Test-Kit (BioWhittaker, Walkersville, USA) weist Endotoxin in Lösungen nach. Die Endotoxinbestimmung wurde an Isolations- und Kulturmedien nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### **2.2.4. Inselisolation im Nagetiermodell**

Die Isolation von Langerhans'schen Inseln im Nagetiermodell, speziell im Rattenmodell, ist seit vielen Jahren weltweit eine etablierte Methode zur Gewinnung von Langerhans'schen Inseln und geht auf eine von MOSKALEWSKI 1965 für Meerschweinchen entwickelte und von LACY und KOSTANIOVSKI 1967 und von GOTOH 1990 modifizierte Methode zurück. (MOSKALEWSKI 1965, LACY und KOSTANIOVSKI 1967, GOTOH, et al. 1990). Eine weitere Modifikation wurde in unserem Labor im Rahmen einer Dissertation durch T. ECKHARDT weiterentwickelt und angepaßt (Inaug. Dissertation, Giessen 2002). Das Verfahren ist schnell zu erlernen und gut zu standardisieren.

Das Verfahren ist folgendes:

#### **2.2.4.1. Spendertiere**

Als Spendertiere dienen ca. 350 g schwere männliche Ratten des Inzuchtstammes Lewis (MHC = RT1<sup>1</sup>) der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln. Dieses Gewicht entspricht einem Alter von 12-15 Wochen. Die Tiere sind in einem eigenen Tierstall der Laboratorien der Medizinischen Poliklinik bei 22°C und relativer Luftfeuchte von 70 bis 80 % untergebracht. Es bestand ein regelrechter Tag/Nacht Rhythmus. In speziellen Käfigen haben die Tiere ungehinderten Zugang zu Futter (Altromin-Pellets, Altromin GmbH, Lage) und Wasser.

#### **2.2.4.2. Isolation:**

Material:

Kollagenase (Lot-Nr. 18114)  
Hank's salt solution  
Penicillin/Streptomycin

Serva, Heidelberg,  
Biochrom, Berlin  
Biochrom, Berlin

Hepes Buffer, 1 M	Biochrom, Berlin
Histopaque 1077	Sigma, Steinheim
Ficoll seperating solution	Biochrom, Berlin
Gentamicin 80	Brahms, Wiesbaden
Pentobarbital-Natrium	Klinikumsapotheke
Ethanol, vergällt, 80%	Klinikumsapotheke
Flowbench LaminAir HA2472	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Köttermann
Cenco, Reagenzglasschüttler	Breda, NL
Kühlzentrifuge, Rotana TR	Hettich, Tuttlingen
Brutschrank, Cytoperm	Heraeus, Hanau
Flockeneisbereiter, AF 10	Scotsman, Italien
Pipetten, 10, 100, 1000 µl, Pipetman	Gilson, Frankreich
Pipettenspitzen, steril	Greiner, Frickenhausen
Sterile und unsterile Mullkompressen	Fuhrmann Verbandstoffe AG, Neunkirchen
Spritzen 5, 10 ml	Braun, Melsungen
Kanülen 0,45 x 12 und 1,2 x 40	Terumo, Leuven
Petrischalen, steril, 94/16 und 60/13 mm	Falcon, Le Pont de Claix
Gewebekulturröhrchen, 10 ml, TC, steril	Greiner, Frickenhausen
PP-Röhrchen, 50 ml, steril	Greiner, Frickenhausen

OP-Besteck: Große Schere, Kleine Schere, Chirurgische Pinzette, Anatomische Pinzette, schmale Klemme, steriler Faden, Polyethylen-Katheter (Fa. Braun)

#### 2.2.4.3. Präparation, Distension und Entnahme des Pankreas

Da im gesamten Ablauf ein zügiges Arbeiten notwendig ist, sollte eine gute Vorbereitung erfolgen und alle notwendigen Dinge bereitliegen. Als Arbeitsunterlage wird eine Styroporbox, gefüllt mit Eis benötigt, da die Kollagenase Temperaturgesteuert agiert.

Zur Vermeidung von Kondenswasserbildung wird die als Trockensubstanz tiefgefrorene Kollagenase auf Raumtemperatur erwärmt und es werden 25 mg abgewogen. Diese Menge wird mit 15 ml Hanks-Lösung gelöst, steril filtriert, in einer Spritze aufgezogen und in Eis weiterhin gekühlt.

Das entsprechende Spendertier wird durch eine intraperitoneale Injektion von Nembutal in einer Dosierung von 0.13 ml pro 100 mg Körpergewicht narkotisiert. Bei Eintritt einer ausreichend tiefen Narkose, welche durch Auslösen eines Schmerzstimulus zu überprüfen ist, wird die Haut im Abdominalgebiet freirasiert. Anschließend wird mit 80%-igem Alkohol eine gründliche Sprühdesinfektion durchgeführt.

Das Tier wird in Rückenlage auf das Eis gelegt. Das Abdomen wird durch einen U-förmigen Schnitt von distal nach proximal eröffnet, das Xiphoid mit einer kräftigen Schere entfernt, so daß man einen freien Blick über das gesamte Abdomen erhält. Über den nun freiliegenden Rippenbogen wird eine Kompresse gelegt und unter leichtem Druck beider Daumen die Leber nach kranial luxiert. Die Fixierung der Leber in dieser Position ist in der Regel ausreichend durch die Kompresse gewährleistet. Man sucht entlang des Duodenums

mit Hilfe zweier Pinzetten das distale Ende des Ductus choledochus auf. An dieser Stelle wird mit einer gebogenen Klemme die Faszie durchstoßen und somit der Ductus unterfahren. Mit Hilfe dieser Klemme zieht man einen Faden unter dem Ductus hindurch und knotet ihn fest, so daß in dieser Richtung keine Passage mehr möglich ist. Der proximale Übergang des Ductus wird an der Leberpforte knapp distal der letzten Einmündung der Gallengänge aufgesucht und in ähnlicher Weise mit einem Faden unterfahren ohne einen Knoten zu machen. Mit einer kleinen, spitzen und leicht gebogenen Schere eröffnet man den Ductus an der oberen Seite ohne ihn komplett zu durchtrennen. Durch diese Öffnung wird der Polyethylenkatheter eingebracht, einige Millimeter in Richtung Pankreas vorgeschoben und mit der zuvor gelegten Schlinge fixiert. Auf das andere Ende des Katheters wird die Spritze mit der vorbereiteten Kollagenaselösung gesetzt. Der Magen wird mit einer Pinzette gefasst und nach cranial umgeschlagen. Bevor man die Kollagenaselösung infundiert, durchtrennt man die Aorta abdominalis, um kein hämorrhagisches Pankreas zu erzeugen. Ca. 12 ml der Kollagenaselösung werden mit konstantem Druck in das Pankreas infundiert. Dabei zieht man das Pankreas etwas nach oben, um eine bessere Füllung zu unterstützen. Dann präpariert man zügig das Pankreas frei, beginnend am cranialen Pankreasrand und löst es vom Magen ab. Nun entfernt man die Ligaturen und den Katheter und löst stumpf das Pankreas vom Dünn- und Dickdarm. Zum Schluß muß der Übergang zur abdominellen Hinterwand und der Milz durchtrennt werden. Nachdem man das ganze Organ freipräpariert hat, gibt man es in ein 12 ml Gewebekulturröhrchen (‘Red cap’) und verschließt es gut.

#### **2.2.4.4. Digestion**

Die Digestion erfolgt in einem Rüttlerwasserbad bei 37°C. Der gesamte Vorgang teilt sich in mehrere Phasen ein: Zuerst erfolgt für ca. 10 bis 11 Minuten ohne Unterbrechung eine Inkubation im Wasserbad (37°C). Anschließend wird die Suspension für 15 Sekunden auf einem Rüttler gemischt, um dann für weitere 12 Minuten zu inkubieren. Diese letzte Periode wird durch Phasen von wiederum jeweils 15 Sekunden Dauer der Durchmischung alle 3 Minuten unterbrochen.

#### **2.2.4.5. Reinigung**

##### Dichtegradient:

In der o.g. Inkubationszeit bereitet man den benötigten Dichtegradienten vor. Dies geschieht unter sterilen Bedingungen unter einer Flow-Bench.

**Material:**

Bodenlayer (Dichte 1,090) Lösung	16,6 ml Ficoll solution (Dichte 1,100) + 2 ml Hanks-
Mittellayer (Dichte 1,077)	10 ml Histopaque
Toplayer (Dichte 1,040) Lösung	2 ml Histopaque (Dichte 1,077) + 10 ml Hanks-

Man verwendet einen kontinuierlichen Dichtegradienten, welcher sich in der Vergangenheit für die Inselisolierung bewährt hat. Die einzelnen Dichten werden vorsichtig übereinander geschichtet. Die Lösungen müssen permanent bei 4 °C gehalten werden.

Um die Kollagenaseaktivität zu stoppen, überführt man nach dem gesamten Verdauungsvorgang sofort die gesamte Kollagenase-/Pankreassuspension in ein 50 ml Gewebekulturröhrchen (‘Blue cap’) und verdünnt sie mit 4 °C kalter Hanks-Lösung. Das zur Gewebeerddauung verwendete ‘Red cap’ wird mehrmals gespült, um das verbliebene Restgewebe zu überführen. Eine Zentrifugation bei 700 U/min über 5 min wird direkt angeschlossen. Der Überstand wird verworfen und erneut zentrifugiert.

Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, nimmt man das gelöste Restgewebe mit einer großlumigen Kanüle in eine 10 ml Spritze auf und gibt es langsam auf den vorbereiteten Bodenlayer. Das Restpellet wird mit dem Rest des Bodenlayers vermischt und gibt es ebenfalls in das ‘Blue cap’. Große Gewebestücke, Lymphknoten und Gefäßteile können mit Hilfe einer Pasteurpipette entfernt werden. Im Anschluß werden die beiden weiteren Schichten in absteigender Dichte aufgetragen, indem man sie vorsichtig am Rand des Röhrchens herunterlaufen läßt. Der Dichtegradient wird bei 2000 U/min und bei 4 °C 12 Minuten lang zentrifugiert. Um den Gradienten stabil zu halten, sollte eine Anlaufzeit von 90 Sekunden eingehalten werden und die Zentrifugenbremse sollte ausgeschaltet sein. Die Inselnfraktion befindet sich nach der Zentrifugation in der Grenzschicht zwischen Toplayer und Mittellayer, die man mittels einer großlumigen Kanüle abnehmen kann und in ein ‘Blue cap’ überführt. Die gereinigte Inseln suspension wird nochmals mit Hanks gewaschen, mit 15 ml TCM199 + 5% FCS resuspendiert und in eine Gewebekulturschale überführt. Die Reinheit der Inselnpräparation kann durch manuelles ‘Picken’ erhöht werden, indem man noch vorhandenes exokrines Gewebe, dukta le Bestandteile oder Lymphknoten entfernt.

**2.2.4.6. Kultur**

Die Kulturpassagen wurde in zwei aufgrund der verschiedenen Medien unterschiedlich begasten (mit oder ohne CO<sub>2</sub>), sonst allerdings identischen Inkubatoren, durchgeführt.

1. Ratteninseln, frisch isoliert, keine Kultur
2. Ratteninseln in Kultur für ca. 20 h bei 37°C in TCM199 + 5% FCS
3. Humane Inseln in Kultur über 5 bis 9 Tage bei 37°C in TCM199 + 5% FCS
4. Humane Inseln in Kultur über 5 bis 9 Tage bei 22°C in TCM199 + 5% FCS
5. Humane Inseln in Kultur über 5 bis 9 Tage bei 22°C in CMRL 1066

Medium TCM199 + 5% FCS siehe 2.2.1.

Medium CMRL 1066, siehe 2.2.2.

## **2.3 In vivo Versuche**

### **Transplantation von Langerhans'schen Inseln**

#### **2.3.1. Induktion des Diabetes mellitus**

Um nach einer Transplantation eine Transplantatfunktion bzw. ein Transplantatüberleben dokumentieren zu können, gibt es einige wenige Parameter, die man als hinweisend für einen Transplantaterfolg heranziehen kann. Der einfachste und überzeugendste ist die Normoglykämie nach Transplantation, nachdem vor der Transplantation ein Diabetes mellitus vorlag bzw. erzeugt wurde.

Material:

Einmalhandschuhe	Johnson & Johnson, Nordenstedt
Einmalkanülen, steril, 26 G	Braun, Melsungen
Einmalspritzen, Steril 1 ml, Luer	Braun, Melsungen
Laborwaage	Mettler, Gießen
Analysenwaage	Mettler, Gießen
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Zellstoff/Tupfer (Pur-Zellin)	Hartmann, Heidenheim
Äther pro Narkotikum	Höchst AG, Frankfurt/Main

Reagenzien:

Streptozotocin (Lot.-Nr.: 08011)	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Physiologische Kochsalzlösung	Braun, Melsungen

#### **Durchführung:**

Bei nicht-diabetischen Tieren kann man einen Diabetes durch die intravenöse Gabe von Streptozotocin nach dem Hochdosis/Einmal-Gabe Prinzip induzieren. Diese Substanz hat eine hohe Affinität zur  $\beta$ -Zelle und zerstört den  $\beta$ -Zellapparat. Zur Induktion des Diabetes mellitus bei Wistar Furth Ratten verwendet man 65 mg/kg Körpergewicht (KG). Das in Pulverform vorliegende Streptozotocin wird mit ca. 1 ml Aqua destillata gelöst. Nach dem Wiegen des Tieres und dem Abwiegen der entsprechenden Menge Streptozotocin wird das Tier in Äthernarkose gelegt. Nach Erreichen der Bewusstlosigkeit des Tieres hält man den

Schwanz des Tieres in ca. 40 °C warmes Wasser, so dass eine Hyperämie entsteht und die Schwanzvenen des Tieres besser zu erkennen sind. Man punktiert die Vene in einem flachen Winkel mittels einer dünnen Kanüle, aspiriert kurz zur Lagekontrolle und infundiert bei korrekter Lage langsam die Lösung. Eventuelle Nachblutungen werden mit einem Tupfer zum Stillstand gebracht. Die Lagekontrolle ist wichtig, da paravasal injiziertes Streptozotocin starke Nekrosen mit Verlust des gesamten, betroffenen Schwanzes des Tieres bedeuten würde. In der Aufwachphase markiert man das Tier und legt es in einen separaten Käfig.

Ähnlich wird bei C57Bl/6J Mäusen verfahren. Die Dosierung beträgt allerdings 190 mg Streptozotocin pro kg KG. Das Tier wird in eine spezielle Röhre gelegt, in der sich das Tier nicht bewegen kann; das Ende wird mit einem Gummipfropf, welcher ein zentral gelegenes Loch hat, verschlossen, so daß der Schwanz des Tieres herauschaut. Den nötigen Sauerstoff bekommt das Tier durch eine kleine Öffnung an der Spitze der Röhre. Nun wird der heraushängende Schwanz in warmes Wasser gehalten und ebenso verfahren wie oben beschrieben.

### **2.3.2. Empfängertiere**

#### **2.3.2.1. Allogenes Modell**

Als Empfängertiere für die Transplantation von Ratteninseln wurden männliche Tiere des Inzuchtstammes Wistar Furth der Firma Charles River, Sulzfeld verwendet. Die Tiere hatten ein Gewicht von ca. 250 g, entsprechend einem Alter von ca. 8 Wochen. Bei einem MHC-Haplotyp „RT1<sup>U</sup>“ sind diese Empfängerratten immunologisch inkompatibel zum „RT1<sup>L</sup>“ Lewis-Spenderstamm.

#### **2.3.2.2. Xenogenes Modell:**

Als Empfängertiere für die Transplantation von humanen Inseln und von Ratteninsel im xenogenen Modell verwendeten wir männliche C57Bl/6J Mäuse (MHC = H 2<sup>b</sup>) der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln. Diese hatten ein Ausgangsgewicht von 20 bis 24 g und ein Alter von 14 bis 18 Wochen. Das Modell Ratte in Maus ist ein konkordant xenogenes Modell. Als diskordant xenogen bezeichnet man das Modell Human in Maus.

Alle Tiere wurden in o.g. Tierstall der Medizinischen Poliklinik unter oben genannten Bedingungen gehalten. Sie hatten permanenten und uneingeschränkten Zugang zu Futter (Altromin-Pellets, Altromin GmbH, Lage) und Wasser.

### 2.3.3. Transplantationsvorgang

Die Inseltransplantation im Nagetiermodell ist mittlerweile ein häufig angewendetes Verfahren. Als Haupttransplantationsorte gelten die Leber und die Niere. Die Transplantation in die Leber (über die Pfortader) entspricht dem aktuellen klinischen Standard. Im Nagetiermodell birgt es allerdings praktische Probleme, wie z.B. erhöhte Blutungsgefahr oder Organthrombose. Bei einer Transplantation unter die Nierenkapsel ist diese Gefahr wesentlich geringer. Es gibt noch weitere Vorteile dieses Transplantationsortes. Zum einen ist die Handhabung wesentlich einfacher, da die Niere auf Grund ihrer Lage wesentlich besser zugänglich ist. Zum anderen kann man z.B. zur Bestimmung des Insulingehaltes bei Bedarf eine Nephrektomie der das Transplantat tragenden Niere durchführen, ohne daß das Tier verstirbt oder eine starke Funktionseinschränkung davonträgt. Ein Wiederanstieg der Plasmaglukose nach Entfernung der das Transplantat tragenden Niere ergibt den Nachweis, daß die metabolische Verbesserung tatsächlich auf einer Funktion des Transplantats und nicht auf einer Regeneration des endogenen Inselapparates beruhte.

Der Nachteil der Leber als Transplantationsort ist, daß bei einer Transplantation von Großtierinseln, wie z.B. humane oder Schweine Inseln, eine Gerinnungsaktivierung erfolgt. Dies führt zum Verklumpen der Inseln und zur Funktionseinschränkung (BENNET et al., 1999). Die oben genannte Organthrombose kann auf Grund des Kontaktes des Blutes mit der Insel entstehen.

Aus diesen Gründen wurde für die vorliegende Studie der subkapsuläre Raum der Niere als Transplantationsort gewählt.

#### Material:

Microliter Spritze	Hamilton, Reno, Nevada
Flowbench LaminAir HA247	Heraeus, Hanau
Pipetten, 10, 100, 1000 ml, Pipetman	Gilson, Frankreich
Pipettenspitzen, steril	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen, steril	Falcon, Le Pont de Claix

OP-Besteck: Große Schere, Kleine Schere, Chirurgische Pinzette, Anatomische Pinzette, schmale Klemme, steriler Faden

Sterile und unsterile Mullkompressen Neunkirchen	Fuhrmann	Verbandstoffe	AG,
---	----------	---------------	-----

#### Reagenzien:

TCM 199 + 5% FCS	siehe 2.1.1
Ethanol, vergällt, 80%	Klinikumsapotheke
Physiologische Kochsalzlösung	Klinikumsapotheke
Metofane	Janssen-Cilag, Neuss

Avertin® Mouse Anesthetic  
Aqua bidest.

s. u.  
Pfrimmer & Co

#### Herstellen der Avertinlösungen:

Avertin® Mouse Anesthetics: 2 g 2.2.2.-Tribrom-Ethanol wurden in 2ml 2-Methyl-2-Butanol gelöst. Diese Lösung wurde mit 50 °C heißem Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt, gut durchmischt und in Eppendorf Gefäßen zu 1 ml aliquotiert. Gelagert wurde das fertig gestellte Avertin® bei – 20°C. Es ist lichtempfindlich und wurde maximal 10 min nach dem Auftauen verwendet.

#### Vorbereiten der Inseln:

##### Material:

Microliter Spritze	Hamilton, Reno, Nevada
Flowbench LaminAir HA2472	Heraeus, Hanau
Pipetten, 10, 100, Pipetman	Gilson, Frankreich
Pipettenspitzen, steril	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen, steril	Falcon, Le Pont de Claix
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Stereomikroskop mit Raster	Zeiss, Oberkochen

Man nimmt die Kulturschalen mit den Inseln aus den entsprechenden Brutschränken und stellt sie unter eine LaminAir FlowBench. Bevor man die Insel zur Transplantation vorbereitet, entnimmt man die notwendige Menge Inseln für die geplanten Vitalitätsteste.

Man zentriert die Inseln manuell und nimmt sie mit einer Pipette auf, um sie in eine andere Kulturschale mit TCM199 + 5% FCS zu überführen. Diesen Waschvorgang wiederholt man ca. dreimal. Zur Bestimmung der Inselmenge wurde die Gesamtmenge unter einem Stereomikroskop ausgezählt. Nach dem Zählvorgang werden die Inseln erneut überführt, zentriert und mit einer Pipette in einem kleinen Eppendorfgefäß gesammelt. Aus diesem können sie nun mit einer Hamiltonspritze aufgezogen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass sich sowohl über als auch unter der Inselfraktion Medium befindet, um einem Inselverlust während der Transplantation vorzubeugen.

#### Durchführung:

An Vorbereitungen für eine Transplantation sind folgende Dinge durchzuführen:

Die Hamiltonspritze hat eine scharfe Metallspitze. Diese würde während des Transplantationsvorganges die Nierenkapsel hochwahrscheinlich nicht nur an der Einstichstelle, sondern auch an der gegenüberliegenden Transplantatstelle perforieren. Aus diesem Grunde muß man vor dem ersten Gebrauch die Spitze mit einer Feile abstumpfen und zum leichteren Vorgehen die Metallkanüle in eine Position von ca. 120° biegen.

Die Betäubung des Tieres erfolgt mittels einer Avertin® Injektion nach kg KG. Das Eintreten einer ausreichenden Narkosetiefe wird durch Setzen eines Schmerzreizes überprüft. Nun wird die Flanke des Tieres, unter der sich die Transplantatniere befindet, rasiert. Diese Stelle wird großzügig mit Alkohol desinfiziert und das Tier in Seitenlage gebracht. Die Niere sollte nun durch die Haut tastbar sein. Die Haut wird an dieser Stelle mittels einer chirurgischen Pinzette gefaßt und vom Tier weggezogen. Mittels einer gebogenen Schere eröffnet man das seitliche Abdomen durch einen ca. 2 cm langen Querschnitt unter Berücksichtigung der restlichen abdominellen Organe, insbesondere des Darmes. Die Niere kann man nun unter leichtem Druck zweier Finger durch diese Öffnung herausdrücken. Teilweise ist es hilfreich sich hierbei eines Wattestäbchens zu bedienen, das auch die Niere in dieser Position fixieren kann. Man sollte auch während des gesamten Vorgangs darauf achten, dass die Oberfläche der Niere nicht austrocknet. Zu diesem Zweck lässt man steriles Kochsalzlösung auf das OP-Gebiet tropfen. Vor dem nun folgenden Transplantationsvorgang wählt man eine bestimmte Stelle der Niere aus, die einem makroskopisch unkompliziert für eine Transplantation erscheint. Am praktischsten hat sich erwiesen, kontinuierlich denselben Transplantationsort zu wählen. Der Vorteil dabei ist, daß die Inseln bei Bedarf histologisch einfacher wieder zu finden sind und die Verletzungsgefahr der Niere bei z.B. dem oberen Nierenpol geringer ist. Dies war auch die präferierte Stelle für diese Transplantationsserie.

Nun nimmt man die vorbereitete Hamiltonspritze in die eine Hand, wobei darauf zu achten ist, dass man keinen Druck auf den Stempel der Spritze ausübt, da sonst die Inseln verloren wären. Mit dem Zeigefinger der anderen Hand wird die Niere so in ihrer Lage fixiert, daß sie beim nun folgenden Einstich nicht verrutscht. Wenn diese durchstoßen ist, geht man unter dem Aspekt der möglichst geringen Gewebeverletzung waagrecht durch das Nierenparenchym bis unter die gegenüberliegende Nierenkapsel unter dem dort anliegenden Finger. Nach Kontrolle der richtigen Lage der Kanülenspitze infundiert man nun die Inselsuspension kontinuierlich unter die Kapsel. Dabei sollte man auf eine gleichmäßige Verteilung der Inseln unmittelbar unter der Nierenkapsel achten. Diese Verteilung der Inseln begünstigt im Vergleich zu der zum Teil von anderen Laboratorien durchgeführten Transplantation als Inselaggregat (‘islet clot’) die Sauerstoffzufuhr zu den einzelnen Inseln. Im Anschluß wird die Spritze möglichst durch den gleichen Kanal wieder zurückgezogen. Die Niere wird nach einer kurzen Nachblutungskontrolle, einer erneuten kurzen Spülung des OP-Gebietes, in ihre ursprüngliche Position zurückverlagert. Man verschließt die Muskulatur und Faszie mit einigen Stichen. Ebenso die Haut. Nach

Aufbringen eines Sprühpflasters auf die Naht, legt man das Tier für die Aufwachphase in einen separaten Käfig unter eine Wärmelampe. Von Zeit zu Zeit sollte die Aufwachphase kontrolliert werden.

### 2.3.4. Stoffwechselkontrolle

Zur Dokumentation des induzierten Diabetes mellitus wurde die Blutzuckermessung und das Körpergewicht herangezogen. Es wurde zum einen vor der genannten Injektion und zum anderen an den Folgetagen im Zeitraum von 8:00 Uhr bis 10:00 Uhr der Blutzucker gemessen. Als manifester Diabetes wurden Blut- bzw. Serumglukosewerte von  $> 300$  mg/dl für Maus bzw. Ratte definiert.

#### 2.3.4.1. Postprandiale Blutzuckermessung

Geräte:

Zentrifuge, Microliter	Eppendorf
Glukoseanalyser 2 und Zubehör	Beckman Instruments GmbH, München
Kanüle, 0,45 x 12	Neolus, Leuven
Microkapillare	Kabe, Nümbrecht
Microtubes, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Uranylacetat	Kabe, Nümbrecht

Reagenzien:

Beckmannreagenzien	Beckmann Instruments GmbH, München
--------------------	---------------------------------------

Durchführung:

#### A. Messung der Serumglukose der Ratte:

Die Ratte wird aus dem Käfig genommen, das äußerste Ende des Schwanzes des Tieres mit den Fingern festgehalten und mit einer Kanüle in die Schwanzspitze gestochen. Das austretende Blut wird mit Hilfe einer Mikroliterpipette aufgefangen. Durch einen mit den Fingern verursachten Venenstau wird dieses unterstützt.

Das gewonnene Blut wird in den Mikroliterpipetten bei 15000 U/min für ca. 2 min zentrifugiert. Parallel hierzu wird der Beckmann Glukoseanalyser nach Angaben des Herstellers durch das Erstellen einer Eichkurve geeicht. Nach diesem Vorgang bringt man, ebenfalls nach den Angaben des Herstellers, 10  $\mu$ l in den Messvorgang ein. Der gemessene Wert wird auf einem Display als mg/dl dargestellt.

#### B. Messung des Blutzuckers der Maus:

Für die Blutentnahme verwendet man das gleiche Verfahren wie oben für die Ratten beschrieben. Die Abnahme erfolgt in heparinisierten 20  $\mu$ l Mikrokapillaren. Diese werden in einem mit 100  $\mu$ l Uranylacetat gefüllten Mikrotube geschüttelt, so dass sich das Blut im

Uranylacetat löst. Nach Zentrifugation des Microtubes bei 15000 U/min werden 50 µl des Überstands abgenommen und in den Messvorgang eingebracht. Vorher erfolgte eine Eichung des Beckmann Glukoseanalysators mit Analog in Uranylacetat verdünnter Glukoselösung.

### **2.3.5. In vivo Stimulationstest**

#### **2.3.5.1. Intraperitonealer Glukosetoleranztest**

Material:

Spritze, 5 ml	Braun, Melsungen
Kanüle, 26G	Neolus, Leven
Schutzhandschuh	

Reagenzien:

Glukose, G20	Braun, Melsungen
--------------	------------------

Um eine Transplantatfunktion nachweisen zu können, kann man neben der Blutzuckernormalisierung bei diabetischen Tieren auch ein Modell mit normoglykämischen Tieren verwenden. Als Meßparameter kann man Seruminsulin oder C-Peptid bestimmen, wenn ein Assay zur Verfügung steht, der die von den transplantierten Inseln produzierte Substanzen von den endogen produzierten des Empfängertieres eindeutig unterscheiden kann (d.h. wenn keine Kreuzreaktivität im EIA besteht). Für Insulin ist diese Differenzierung zwischen humanem bzw. Schweineinsulin versus Mäuseinsulin mit dem verwendeten EIA eindeutig möglich, nicht aber für Ratten- versus Mäuseinsulin. Somit ist dieses Modell bei einer Transplantation von humanen oder Schweineinseln in die Maus verwendbar.

Es ist sinnvoll, Insulin vornehmlich nach einer Stimulation zu bestimmen. Hierzu empfiehlt sich – parallel zur in vitro Testung – eine Glukosestimulation. Zur Durchführung wurden in Vorversuchen eine Korrelation zwischen der intraperitoneal applizierten Menge Glukose und dem zeitlichen Glukoseverlauf im Serum erstellt.

Die nicht narkotisierten Tiere werden mit der behandschuhten Hand gefaßt, hochgenommen, so daß das Abdomen frei zugänglich ist. Mit der anderen Hand wird die Glukose intraperitoneal gespritzt. Danach setzt man das Tier in den Käfig zurück und entnimmt nach 10 Minuten mittels einer intrakardialen Punktion ca. 1 ml Vollblut.

### 2.3.5.2. Herzpunktion bei C57Bl/6J Mäusen

Zur Messung des Gehalts von humanen Insulin nach Transplantation benötigt man genügend Ausgangsmaterial von mindestens 100 µl Vollblut. Da diese Menge nicht aus der Schwanzvene einer Maus abzunehmen ist, erfolgt die Blutentnahme intrakardial.

Material:

Zentrifuge, Microliter	Hettich, Tuttlingen
Spritze, 1ml	Braun, Melsungen
Kanüle, steril, 26 G	Neolus, Leuven
Microtubes, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Äther pro Narkotikum	Höchst AG, Frankfurt/Main

Die Maus ist mit einer Äthernarkose zu betäuben und bei Erreichen der Schmerzfreiheit in Rückenlage zu legen. Mit dem Zeigefinger kann man nun die kardiale Region tasten. Die Punktion ist streng senkrecht intrakardial durchzuführen und bei erfolgreicher Aspiration zieht man langsam ca. 1 ml Vollblut ab. Nach erfolgter Blutentnahme legt man das Tier zum Aufwachen in einen separaten Käfig. Das gewonnene Vollblut muß zügig weiterverarbeitet werden. Dazu gibt man es in ein kleines Eppendorfgefäß, zentrifugiert es bei 2000 U/min 2 Minuten lang und pipetiert das Serum ab. Bis zur weiteren Verarbeitung kann man es bei – 20 °C einfrieren.

### 2.3.6. Körpergewichtbestimmung

Material:

Laborwaage	Mettler, Gießen
------------	-----------------

Durchführung:

Vor Gabe von Streptozotocin, vor Transplantation und vor jeder Blutzuckerbestimmung wurde das Gewicht der Tiere mittels einer Laborwaage bestimmt und dokumentiert.

## 2.4. Isolierung humaner Langerhans'scher Inseln

Das aktuelle Isolationsprotokoll stützt sich auf die grundlegenden Erkenntnisse, die durch RICORDI (RICORDI et al., 1988 und 1989) durch die Modifikation der Digestion-Filtrations-Methode gewonnen wurden. Dies entspricht dem aktuellen Standardprotokoll der humanen Inselisolation, welches weltweit in vielen Laboratorien angewendet wird.

Diese Weiterentwicklungen basieren auf vielen grundlegenden Experimenten wie z.B. durch HORAGUCHI et al. (1981) bei Hunden oder LACY et al. (1982a) bei Rindern und RICORDI et al. (1986) bei Schweinen. Für die Bedingungen des örtlichen Labors in Gießen wurde die durch RICORDI (1988) beschriebene Methode durch BRANDORST D und BRANDHORST H adaptiert und weiterentwickelt (BRANDHORST et al., 1998).

Humane Inseln wurde durch D. Brandhorst oder H. Brandhorst und unter meiner Mitarbeit isoliert.

#### 2.4.1. Vorbemerkungen

Die in diesen Untersuchungen verwendeten isolierten, humanen Inseln stammen in allen Fällen aus Spenderorganen von hirntoten Multiorganspendern, die unserem Transplantationszentrum durch die Organisation „Eurotransplant“ in Leiden, Niederlande, vermittelt wurden. Es lag das Einverständnis zur Verwendung in Forschungsvorhaben vor. Die Isolation der humanen Inseln erfolgt in einem speziellen Raum mit speziellen Vorrichtungen, die eine Keim-reduzierte Umgebung erschaffen. Während der Isolation wird spezielle, zum Teil sterile Kleidung getragen, um das Risiko einer Kontamination zu reduzieren. Alle verwendeten Materialien sind entweder autoklavierbar oder Einmalartikel. Alle Arbeitsoberflächen werden vor Gebrauch mit Sprühalkohol gereinigt. Die Reinigung der wiederverwendbaren Materialien erfolgte durch eine separate Spülmaschine, in der nur Materialien der humanen Isolation gereinigt werden.

Material:

Desinfektionsspülautomat G 7783	Miele
Aqua Purifikator G 7749	Miele
Entsalzungspatrone E 310	Behr
Laborautoklav	Webeco

#### 2.4.2. Präparation

Das Organ, welches nach der sogenannten „No-touch-technique“ als Spleno-Duodeno-Pankreatektomie en bloc und steril verpackt auf Eis, transportiert werden muß, wird nach dem Entpacken unter einer sterilen Flow-Bench auf einer eisgekühlten Metallschale präpariert. Dabei ist initial die Milz und das Duodenum abzupräparieren. Bei sehr stark in Fett eingebundenen Organen kann man dieses zu Anfang mit entfernen. Nach der Bestimmung des Organgewichts versucht man den Ductus pancreaticus retrograd mit einer Venenverweilkanüle zu intubieren. Diese wird mit Nahtmaterial fixiert.

Material:

Flow-Bench TL 2472	Heraeus
Abdecktuch 75x90 cm	Klinidrape
OP-Handschuhe, -Haube, -Maske	Johnson&Johnson
Metallschale	Uniklinikum
Verschiedene chirurgische Instrumente	Aeskulap
Kompressen (steril)	Fuhrmann
Venenverweilkanüle Venflow 14,18,22 g	Braun, Melsungen
Chirurgische Nahtseide (3.0 x 75)	Ethicon
Kühlakku	Bosch

Waage Diggi 2000  
Glasschale 20 cm Ø

Wedo  
Schott

### 2.4.3. Distension

Die Liberase wird mit 20 ml Hanks Buffered Salt Solution (HBSS) in einem Becherglas mittels eines Magnetrührers gelöst und auf die erforderliche Menge von 2.5 bis 3 ml pro Gramm Pankreasgewebe mit HBSS aufgefüllt. Dieses Volumen wird mittels einer sterilen 50 ml Perfusorspritze über die Venenverweilkanüle bei Raumtemperatur injiziert und somit das Pankreas distendiert. Eventuell vorhandene Lecks oder Parenchymverletzungen, die einen Austritt der Liberaselösung verursachen, werden mit Gefäßklemmen verschlossen.

Material:

Becherglas 500 ml	Schott
Magnetrührer RCT	IKA
Spritze 20 ml	Braun, Melsungen
Kanüle	Braun, Melsungen
Perfusorspritze 50 ml	Braun, Melsungen
Klemmen (unterschiedliche Form)	Aesculap
HBSS	s. 2.3.6.
Liberase (Lot.-nr.: XXXX)	Roche

### 2.4.4. Digestion und Filtration

Das mit der Liberaselösung distendierte Organ wird nun in die eigentliche Isolationskammer (Ricordikammer) überführt. Diese ist aus Metall und besteht aus einem größeren zylindrischen Unterteil und aus einem kleineren, als Deckel der Kammer konzipierten, konischen Unterteil. Der genaue Aufbau, Funktionsweise und weitere benötigte Materialien sind durch RICORDI et al. und BRANDHORST et al. (RICORDI et al., 1988, 1992a, 1994; BRANDHORST et al., 1998) eingehend beschrieben. Der in unserem Isolationslabor verwendete Geräteaufbau wurde auf die speziellen Gegebenheiten vor Ort adaptiert.

Das Gesamtvolumen der Kammer richtet sich nach der Größe des Organs. Meistens kommen Kammern mit 350 ml bis 450 ml Gesamtvolumen zum Einsatz. Die Kammer hat im Unterteil zwei Zuflüsse und im Oberteil einen Abfluss, so dass ein Zirkulationskreislauf erzeugt werden kann. In die Ausstrombahn der Kammer wird ein Sieb mit 500 µm Durchfluss gelegt. Im unteren Teil befinden sich sieben Glaskugeln mit ca. 1 cm Durchmesser zur besseren Durchmischung. Die Kammer ist auf eine vertikale Hubmechanik aufgeschraubt.

Nachdem das Organ in der Kammer ist, wird diese mit Schrauben gut verschlossen und das Schlauchsystem, in das eine Metallspirale in einem Wärmebad zur Temperaturregulation zwischengeschaltet ist, wird mit HBSS aus einem Vorratsgefäß gefüllt. Die Kammer wird mit einer Hubfrequenz von 200/min in Bewegung gesetzt. In dieser Phase 1 ist das System ein geschlossener Kreislauf, welcher über ein Vorratsgefäß verfügt. Die Temperatur wird durch ein Wärmebad bei 35 °C bis 37°C gehalten. Gemessen wird die Temperatur in der Kammer über einen von außen eingebrachten Thermofühler.

Man entnimmt in Phase 1 ca. jede Minute eine Probe zur Beurteilung des Isolationsprozesses, indem man etwas Zirkulationssuspension in eine kleine Petri-Schale zusammen mit Dithizone-Lösung gibt. Diese Probe kann man nun unter einem Invertroskop unter den Kriterien Anteil an exokrinem Material, dessen Größe und Beschaffenheit, Anteil an Inseln und dessen Struktur, beurteilen. Sobald sich der Anteil der Inseln erhöht, wird der geschlossene Kreislauf geöffnet. Die Phase 2 beginnt. Die Suspension wird nun in gekühlte Zentrifugenflaschen, in welche Newborn Calf Serum (NCS) (ca. 35 ml) vorgelegt wurde, abgefüllt und bei 4 °C mit 100 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pumpe abgesaugt und verworfen. Das am Boden befindliche Pellet wird mit gekühlter University of Wisconsin Lösung (UW-Lösung) resuspendiert und weiterhin gekühlt. Das Gesamtgewebe wird in einer Zentrifugenflasche gesammelt. Die Inkubation in UW-Lösung soll eine osmotische Zellschwellung verhindern und die Eigenschaften der Inseln im Dichtegradienten verbessern (ROBERTSON et al., 1993). Dieser Vorgang wird solange fortgeführt bis in den Proben des Isolationsvorganges keine Inseln mehr zu erkennen sind. Vor der nun folgenden, ca. 60 minütigen Inkubationszeit des Gewebes in UW-Lösung erfolgt eine Zählung der Inseln zum Zeitpunkt vor der Reinigung.

#### Material:

Kammer, Hubmechanik, Zirkulationskreislauf wurden auf die speziellen Begebenheiten durch einen regionalen Instrumentenbauer adaptiert. Alle sensiblen Teile sind autoklavierbar bzw. sterile Einmalartikel.

Erlenmeyerkolben 500 ml	Schott
Becherglas 500 ml	Schott
Temperatursonde Luerlock	Mallinckrodt
Conical Tubes	Corning
Petrischale 94x16 mm	Greiner
Invertmikroskop Labovort	Leitz

#### Medium:

Newborn Calf Serum (NCS)	Biochrom
--------------------------	----------

### 2.4.5. Reinigung

Die Reinigung soll eine Separation der Inseln vom exokrinen und duktalem Gewebe erzeugen. Verwendet wird ein COBE 2991 Zellseparator. Mittlerweile häufig verwendet ist ein Ficoll-Gradient, in welchen die Gewebesuspension als Top-Layer aufgebracht wird. Dieser Gradient wird kurz vor dem eigentlichen Reinigungsvorgang unter Verwendung vorgefertigter Lösungen hergestellt. Mittels eines speziellen Gradientenmischers und eines Magnetührers wird der Dichtegradient hergestellt. Dazu werden 125 ml Ficoll 1.100 g/L als erste Schicht in den Beutel des COBE gepumpt. Die zweite Dichteschicht wird durch das gleichzeitige Einpumpen von Ficoll 1.077 g/L und Ficoll 1.100 g/L erzeugt. Als nächster Schritt wird das verbliebene Inseln pellet nach nochmaliger Abzentrifugation mit UW-Lösung aufgefüllt und in als letztes auf den Dichtegradienten aufgebracht. Während des gesamten ist der COBE Zellseparator bei 2500 U/min in Betrieb. Nach Abschluß des Ladevorganges wird für weitere fünf Minuten bei 2500 U/Min weiterzentrifugiert. Im Anschluß wird der Ficoll-Gradient in Gewebekulturflaschen, in denen 15 ml TCM199 + 10% FCS (Lösung III) vorgelegt sind, abgefüllt. Dabei ist es nur sinnvoll die Gewebetragenden Schichten aufzufangen und die Restlichen zu verwerfen.

Die Gewebekulturflaschen mit weiterverwertbarem Inhalt werden gepoolt, nochmals durch Zentrifugation gereinigt, Aliquots zum Bestimmen der Inselmenge entnommen und anschließend in Kulturmedium CMRL 1066 überführt. Die Kultur erfolgt in CO<sub>2</sub> begasten Brutschränken bei 22°C in unbehandelten Kulturflaschen.

Material:

Gradientenmischer GM-1	Pharmacia
COBE Beutel	COBE
Conical Tube 200 ml	Nalge
Variopette 10-100 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf

### 2.4.6. Verwendete Medien

Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom, Berlin
Newborn calf serum (NCS)	Biochrom, Berlin
University of Wisconsin Lösung (UW)	DuPont
(Hanks-) Ficoll	Biochrom, Berlin
CMRL 1066	(s. 2.2.2.)

Herstellen verwendeter Medien:

#### 1. Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)

Hanks Balanced Salt Solution	Biochrom, Berlin
Aqua dest, pyrogenfrei	Pharmacia Upjohn
Penicillin/Streptomycin	Bio Whittaker, Verviers
NaOH, 10 M	Serva, Heidelberg

Der Ansatz für ca. einen Liter HBSS sieht folgende Einzelmengen vor: 890 ml Aqua dest., 100 ml HBSS, 10 ml Penicillin/Streptomycin und 9 bis 9.5 ml NaOH 7.5 %.

## 2. University of Wisconsin (UW) Lösung

UW-Lösung	DuPont
Penicillin/Streptomycin	Bio-Whittaker, Verviers

## 3. TCM199 + 10% NCS

TCM-199, w/o Carbonate, w/o Hepes, with L-Glutamine, 10fach Newborn calf serum (NCS)	Gibco, Paisley, Scotland Biochrom, Berlin
--	--

## 4. (Hanks-)Ficoll

Ficoll (1.100 g/l bzw. 1.077 g/l)	Biochrom, Berlin
NaOH (1 M)	Serva, Heidelberg
Hepes (1 M)	Biochrom, Berlin
HBSS (10x)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin

Es werden jeweils folgende Mengen für einen Ansatz der Lösungen verwendet:  
Ficoll jeweils 500 ml, Penicillin/Streptomycin 5 ml, NaOH (1 M) 0.7 ml, Hepes-Puffer (1M) 12 ml und HBSS 26 ml. Die Gesamtflüssigkeit ist nach dem Zusammenmischen kräftig zu schütteln und der pH Wert sollte im Bereich von 7.2 bis 7.4 eingestellt werden. Die Osmolarität muß 470-480 mmol betragen.

### Weitere Materialien:

Flow Bench TL 2472	Heraeus
COBE Cell Processor 2991	COBE, Gambro
COBE Cooler	COBE, Gambro
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Rotixa 50RS	Hettich

Übrige Verbrauchsmaterialien wurden bereits bei der Beschreibung der in vivo Versuche angegeben.

## 2.5. Auswertung der gemessenen Werte

Alle einzelnen Werte wurden mittels des Computerprogramms Microsoft Excel in Tabellenform übertragen und die notwendigen Graphiken angefertigt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels des Statistikprogramms InStat 2.0 für MacIntosh. Statistische Beurteilungen wurden für Graphiken mit Mittelwerten durch Mann-Whitney-Test und für Verlaufskurven mittels des Wilcoxon-Tests erhoben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. In vitro Versuche

Langerhans'sche Inseln im allgemeinen und Ratteninseln im besonderen weisen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid (NO) auf. Die Einzelzusammenhänge werden in der Diskussion näher erläutert werden. Nachfolgende Tabelle zeigt eine Kurzzusammenstellung der in vitro Versuche.

**Tabelle 2:**

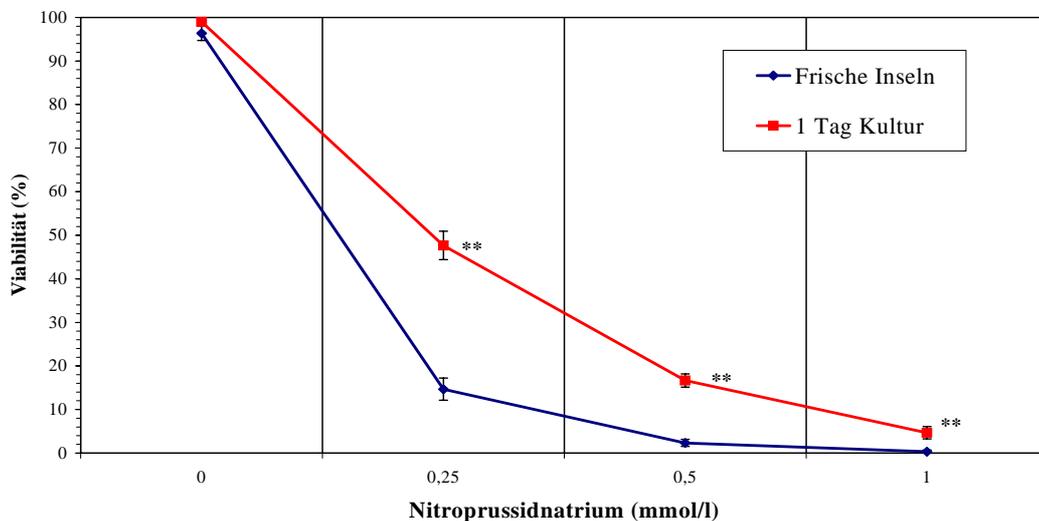
Spendertier	Qualität der Inseln		Vorbehandlung der Inseln
Lewis Ratten	Frisch	1 d Kultur	Xanthinoxidase
Lewis Ratten			Nitroprussidnatrium

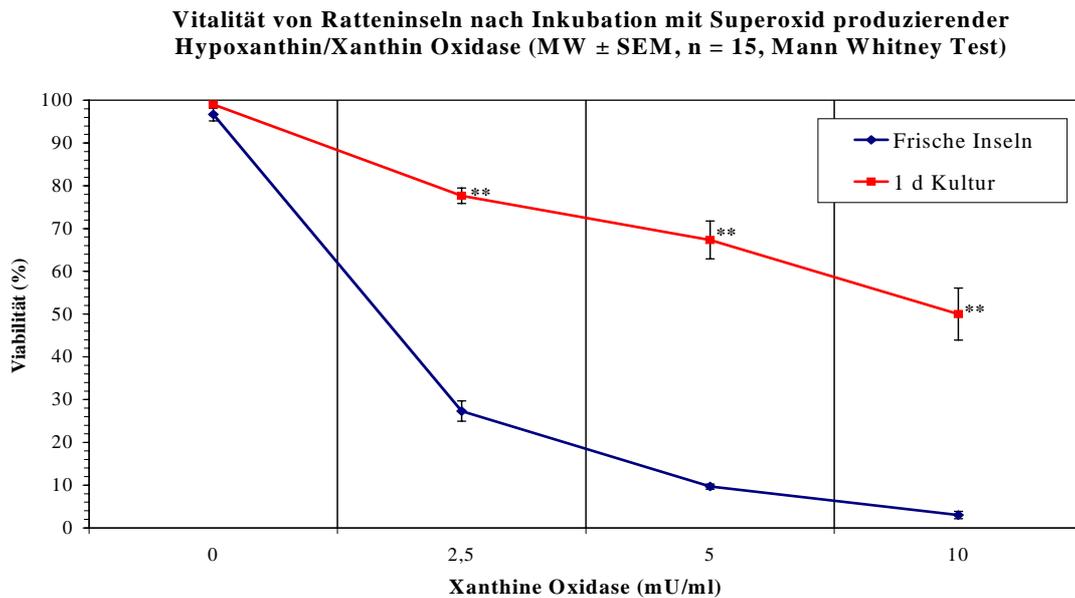
#### 3.1.2. In vitro Untersuchungen von frischen Ratteninseln versus 1 d bei 37°C in TCM199 + 5% FCS kultivierten Ratteninseln bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid (ROI)

Die Empfindlichkeit von Ratteninseln gegenüber NO und Sauerstoffradikalen ist bekannt (STEVEN at al., 1996) und ebenso die bedeutende Rolle bei frühen, inflammatorischen Prozessen (siehe auch Diskussion). Um diesen Einfluß auf frische bzw. kultivierte Inseln und um einen protektiven Einfluß der Kultur bei 37°C in TCM199 + 5% FCS zu untersuchen, wurden jeweils 15 Inseln 4 unterschiedlichen Konzentrationen von NO produzierendem Nitroprussidnatrium ausgesetzt und nach 20 h mittels Trypanblau eine Vitalitätsbestimmung durchgeführt.

**Abb. 1:**

**Vitalität von Ratteninseln nach Inkubation mit NO produzierendem Nitroprussidnatrium (MW ± SEM, n = 15, Mann-Whitney Test)**



**Abb. 2:**

Die Graphiken zeigen eine dosisunabhängige, signifikant (\*\*= $p < 0.0001$ ) deutlich höhere Empfindlichkeit frisch isolierter Inseln sowohl gegenüber NO und als auch gegenüber XO im Verhältnis zu 1 d kultivierten Inseln. Es ist zu vermuten, daß entsprechende Unterschiede auch unmittelbar nach Tx weiter bestehen werden und somit einen Einfluß auf das frühe inflammatorische Inselüberleben haben können.

### 3.2. In vivo Versuche

#### 3.2.1. Allgemeine Einteilung nach Transplantationsreihen

Insgesamt wurden 8 in vivo Gruppen gebildet, die im folgenden Schema aufgelistet sind und die die einzelnen Fragestellungen betreffen:

**Tabelle 3:**

Spendertier	Empfängertier	Vorbehandlung der Inseln
1. Lewis Ratten	Wistar Furth Ratten, diabetisch	Frisch isoliert
2. Lewis Ratten	Wistar Furth Ratten, diabetisch	37°C TCM199 + 5% FCS 1 d Kultur
3. Lewis Ratten	C57Bl/6J Mäuse, diabetisch	22°C TCM199 + 5% FCS 1 d Kultur
4. Lewis Ratten	C57Bl/6J Mäuse, diabetisch	37°C TCM199 + 5% FCS 1 d Kultur
5. Lewis Ratten	C57Bl/6J Mäuse, nicht diabetisch	37°C TCM199 + 5% FCS 1 d Kultur
6. Humane Inseln	C57Bl/6J Mäuse, nicht diabetisch	37°C, TCM199 + 5% FCS, 1-9 d Kultur

7. Humane Inseln	C57Bl/6J Mäuse, nicht diabetisch	37°C CMRL 1066 + 5% FCS, 1-9 d Kultur
8. Humane Inseln	C57Bl/6J Mäuse, nicht diabetisch	22°C CMRL 1066 + 5% FCS, 1-9 d Kultur

Somit kamen insgesamt drei in vivo Tiermodelle zur Anwendung: ein allogenes und zwei xenogene Modelle.

Im allogenen Tiermodell der Ratte in Ratte Transplantation waren die Empfängertiere diabetisch. Transplantiert wurde, wie auch bei den anderen Modellen, unter die Nierenkapsel. Im konkordant xenogenen Modell Ratte-in-Maus waren die Empfängertiere diabetisch, abgesehen von Gruppe 5, in der die Transplantation mit dem Ziel der Insulinextraktion durchgeführt worden war. Das dritte Modell war ein diskordant xenogenes Modell, humane Inseln auf Maus. Hier waren die Empfängertiere nicht diabetisch. Die Grundvoraussetzungen für die Kultur waren für die unterschiedlichen Versuchsgruppen untereinander jeweils vergleichbar.

### 3.2.2. Allogenes Nagetiermodell

Für diese Versuchsreihe wurden als Spendertiere ausschließlich männliche Lewisratten verwendet (MHC=RT1').

Für eine Transplantation wurden die Inseln aus Pankreata von 3 Spendertieren isoliert, entsprechend ca. 400 bis 600 Inseln pro Pankreas und einer Gesamtinselzahl von ca. 1200 bis 1500 Inseln pro Transplantation. Die Inseln wurden zum einen direkt nach dem letzten Isolationsvorgang transplantiert, zum anderen über Nacht (ca. 20 h) bei 37°C im Medium TCM199 + 5% FCS kultiviert. Der Transplantationsort war der subkapsuläre Raum der linken Niere.

Als Empfängertiere dienten männliche Wistar Furth Ratten (MHC=RT1<sup>u</sup>). In diesem Modell sind somit starke gewebespezifische Barrieren gegeben. Da Ratten des Haplotyp RT1<sup>u</sup> außerdem als immunologische „high responder“ gelten, kann die Spender-/Empfänger-Kombination als sogenanntes „hartes“ Modell betrachtet werden

#### Diabeteserzeugung

Zur Induktion eines Diabetes mellitus erhielten die Empfängertiere eine einmalige Applikation von Streptozotocin intravenös in die Schwanzvene (65 mg/kg Körpergewicht). Dieses Vorgehen zur Diabetesinduktion findet allgemein Anwendung. Vor der Streptozotocingabe wurde der Blutzucker und das Gewicht bestimmt. Die nächste Messung erfolgte am Tag der Transplantation. Eine Transplantation wurde nur bei eindeutig erhöhten Blutzuckerwerten durchgeführt. Als manifester Diabetes wurden

mindestens zwei gemessene Werte über 300 mg/dl gewertet. Eine spontane Regeneration des Pankreas wurde nicht festgestellt. Da alle Tiere nach Erreichen der Normoglykämie zwischen dem 5. und 9. Tag nach Transplantation das Transplantat abstießen, war innerhalb dieses Zeitraumes nicht von einer kurzfristigen Regeneration auszugehen.

#### Beurteilung der Inselviabilität und Reinheit

Vor Transplantation wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt, um den prozentualen Anteil der nekrotischen Inseln zu beurteilen. Der Anteil der nicht Trypanblau gefärbten Inseln lag in beiden Gruppen im Bereich von 90 bis 95 % und die Reinheit betrug in beiden Gruppen 85 bis 95 %.

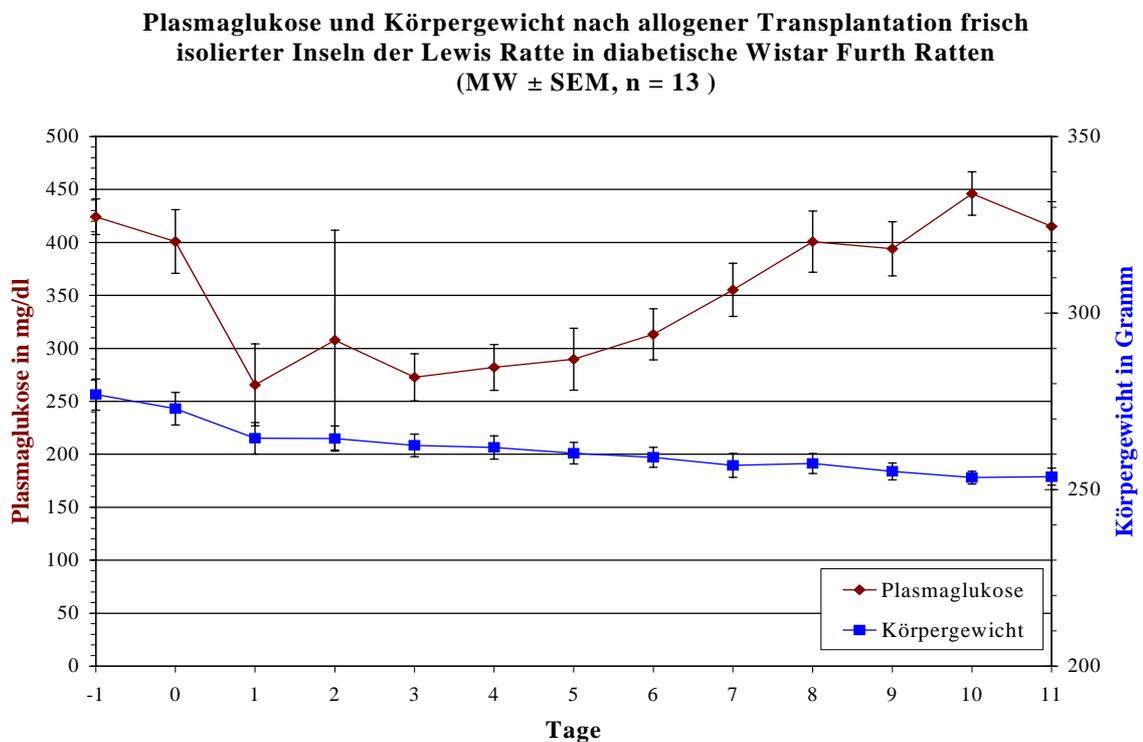
#### Einzelergebnisse

Als erfolgreiche Transplantation bzw. als Überleben des Transplantats wurde ein Erreichen der Normoglykämie (80 – 140 mg/dl) angesehen. Eine Abstoßung des Transplantats liegt bei permanenten Werten von > 250 mg/dl vor.

### **3.2.2.1. Allogene Transplantation frisch isolierter Ratteninseln unter die Nierenkapsel diabetischer Wistar Furth Ratten**

Die Transplantation erfolgte unmittelbar im Anschluß an die Aufbereitung des letzten (jeweils dritten) Spenderpankreas. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

#### **Abb. 3:**

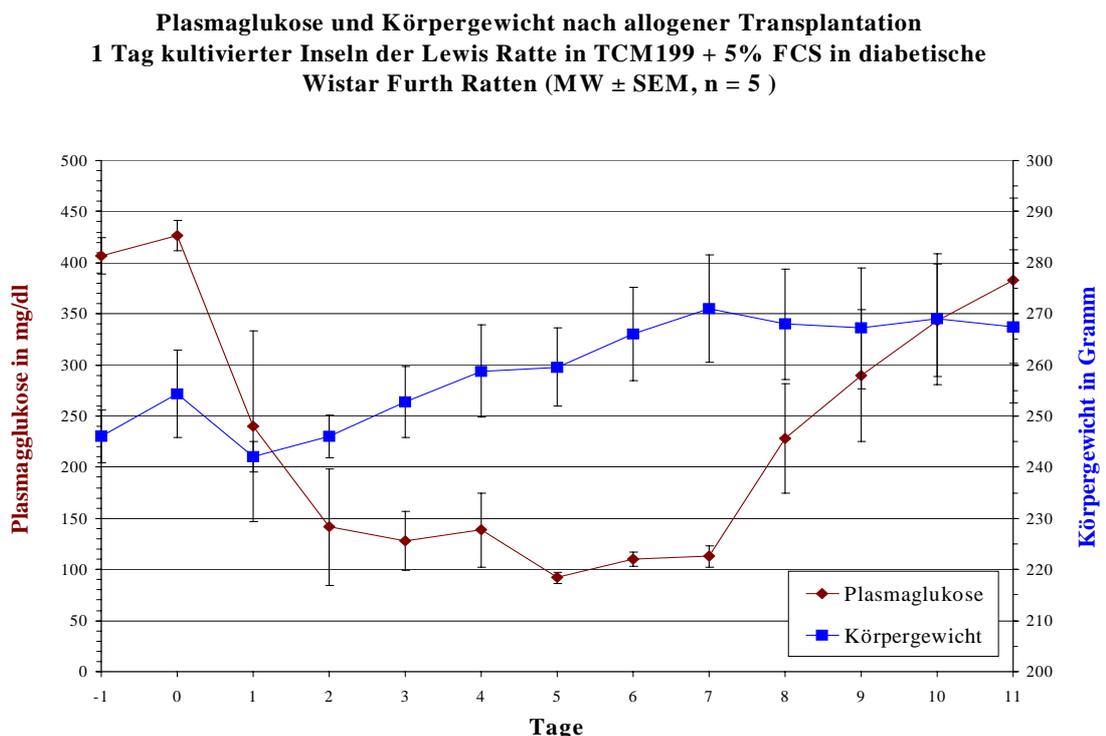


An Hand der graphischen Darstellung zeigt sich deutlich, daß die Transplantation von 1200 – 1500 frisch isolierter Inseln unter die Nierenkapsel allogener Ratten nicht in der Lage ist, eine Normoglykämie zu erzeugen. Es gelang nur bei einem von 13 transplantierten Tieren eine Normoglykämie zu erzeugen. Diese blieb über einen Zeitraum von 9 Tagen bestehen. Einige Tiere zeigten an den ersten beiden Tagen eine Senkung des Blutzuckers, um an den darauf folgenden Tagen wieder auf höhere Werte anzusteigen. Dadurch, daß ein  $\beta$ -Zellverlust stattfindet, wird das gespeicherte Insulin freigesetzt und gelangt in den systemischen Kreislauf. Dies bewirkt eine kurzzeitige Senkung der Plasmaglukose. Die verbliebenen Inseln sind nicht in der Lage, diesen initialen Verlust zu kompensieren. Der Isolationsbedingte Zellstreß und die inflammatorische Antwort des Empfängers scheint ausreichend zu sein, eine Funktion des allogenen Transplantats zu unterbinden. Dies spiegelt sich auch in der Entwicklung des Körpergewichts wieder. Im Gegensatz zu einer erfolgreichen Transplantation fällt das Körpergewicht konstant ab von im Mittel  $277 \pm 4$  Gramm vor Transplantation auf  $254 \pm 2$  Gramm nach 11 Tagen.

### 3.2.2.2. Allogene Transplantation von Ratteninseln nach 1 Tag Kultur (Medium TCM199 + 5% FCS bei 37°C) unter die Nierenkapsel diabetischer Wistar Furth Ratten

Die Transplantation erfolgte am darauf folgenden Tag nach Isolation, entsprechend einer Kulturdauer von 15 bis 20 Stunden. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

**Abb.4:**



Beim Vergleich dieser Graphik mit Abbildung 3 ist eindeutig der positive Einfluß der

Kultur für einen Tag auf die Transplantatfunktion im allogenen Modell zu erkennen. Bei fünf von fünf Tieren wurde eine eindeutige Normoglykämie erzielt. Die Kulturpassage scheint den Inseln nach dem Isolationsvorgang die Möglichkeit der Regeneration zu geben (WÖHRLE et al., 1990). Bei Betrachtung der Einzeltiere erkennt man interindividuelle Unterschiede. Bei 3 von 5 Tieren trat die Normoglykämie bereits am 1. Tag, bei 1 von 5 Tieren am 2. Tag und bei 1 von 5 Tieren am 5. Tag nach Transplantation ein. Die Dauer der normoglykämischen Stoffwechsellage lag im Durchschnitt bei  $6.6 \pm 1.2$  Tagen. Nach Abstoßung der Inseln stiegen die Blutzuckerwerte erneut auf Werte  $> 300$  mg/dl.

Das Transplantatüberleben lag im Mittel bei  $6.6 \pm 1.2$  Tagen. Die Dauer bei den einzelnen Tieren (n=5) sind in Tabelle 4 aufgeführt.

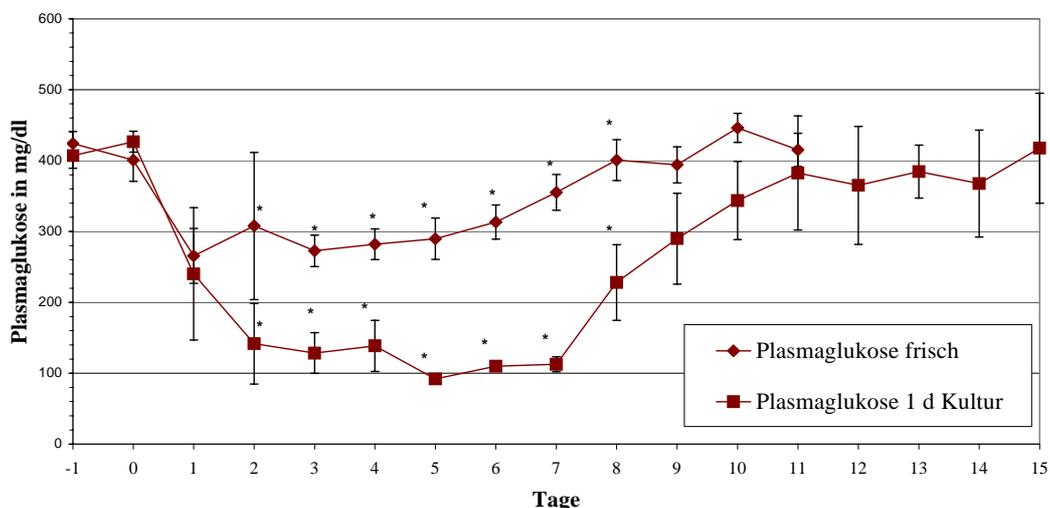
**Tabelle 4:** Transplantatüberlebenszeiten in Tagen (d) bei Transplantation von Inseln nach 1 d Kultur bei  $37^\circ\text{C}$  in Medium TCM199 + 5% FCS

	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Mittelwert	SEM
Transplantat-Überleben	7	7	9	2	8	6.6	1.21

In Abb. 5 sind zur Verdeutlichung die Verläufe der Plasmaglukose der transplantierten Tiere mit frisch isolierten Inseln und mit ein Tag kultivierten Inseln dargestellt. Aus diesen Daten ergibt sich im allogenen Rattenmodell ein eindeutiger, signifikanter Vorteil ( $*=p<0.05$ ) bezüglich des Transplantatüberlebens für eine Kultur über ca. 20 h gegenüber der Verwendung von frisch isolierten Inseln.

**Abb. 5:**

Vergleich der Plasmaglukose nach allogener Transplantation frischer (n=5) und 1 Tag kultivierter Inseln der Lewis Ratte (n=13) in TCM199 + 5% in diabetische Wistar Furth Ratten (MW  $\pm$  SEM, Wilcoxon Test)



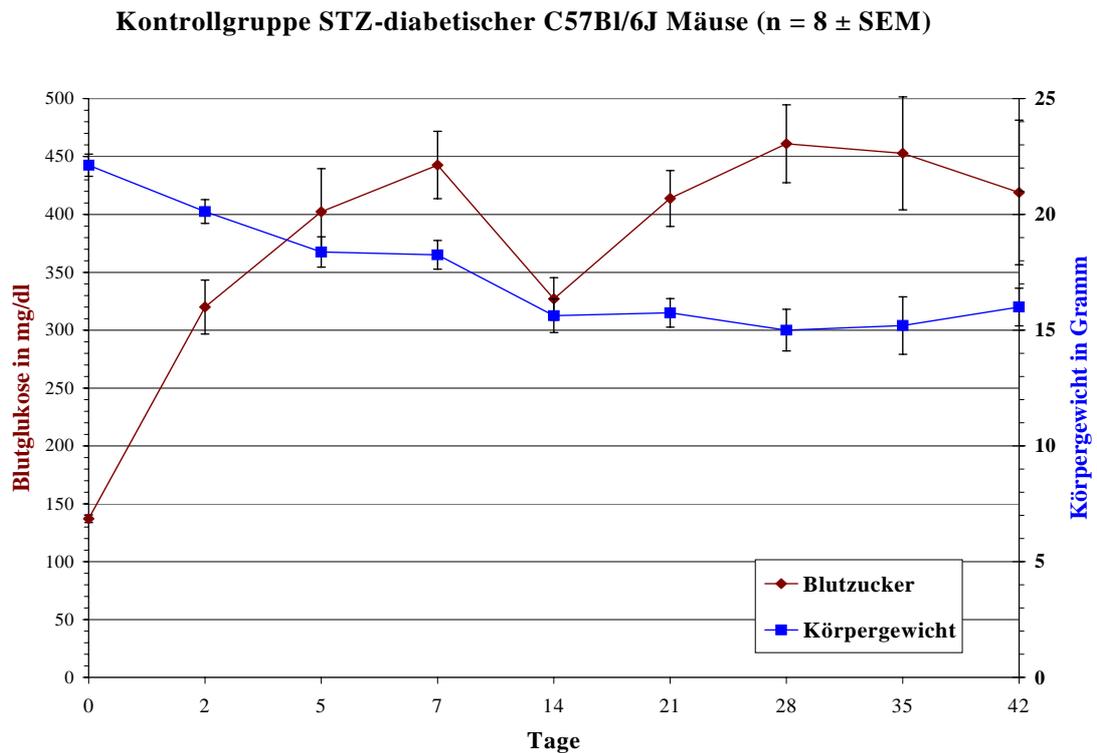
Auch bezüglich des Körpergewichts konnte eine positive Entwicklung nach Transplantation von 1 d kultivierten Inseln festgestellt werden. Vor Transplantation ergab sich ein mittleres Gewicht von  $254 \pm 9$  g. Dieses steigerte sich im Zeitraum der Normoglykämie um 10 g auf ein mittleres Höchstgewicht von  $267 \pm 12$  g. Nach der Rejektion des Transplantats begann das Gewicht erneut zu sinken. Für die Transplantation von frisch isolierten Inseln zeigte sich parallel zu den hohen Blutzuckerwerten ein Absinken des Körpergewichts von  $277 \pm 4$  g am Tag der Transplantation auf  $254 \pm 2$  g an Tag 11.

### 3.2.3. Konkordant xenogenes Transplantationsmodell (Ratte in Maus)

#### 3.2.3.1. Kontrollgruppe

Eine diabetische Kontrollgruppe wurde für diese Versuchsreihe durchgeführt. Diese wurde nach dem Protokoll der Transplantationsgruppe behandelt und erhielten ebenfalls 190 mg/kg KG Streptozotocin in die Schwanzvene appliziert.

Abb. 6:



### **3.2.3.2. Einfluß der Kultur bei 22°C versus 37°C in TCM199 + 5% FCS auf das frühe Transplantatüberleben unter Berücksichtigung der Inselmasse**

#### Spender- und Empfängertiere

Die Spendertiere in dieser Versuchsreihe waren erneut männliche Lewisratten. Die Isolation der Inseln wurde nach dem gleichen Protokoll und unter den gleichen Bedingungen des oben genannten allogenen Tiermodells durchgeführt. Die Empfängertiere waren männliche C57BL/6J Mäuse.

#### Diabeteserzeugung

Zur Induktion eines Diabetes mellitus erhielten die Empfängertiere eine einmalige Applikation von Streptozotozin intravenös in die Schwanzvene (190 mg/Kg Körpergewicht). Dieses Vorgehen zur Diabetesinduktion findet allgemein Anwendung. Eine Regeneration des endokrinen Pankreas wurde nicht beobachtet.

#### Inselviabilität und Reinheit

Vor der Transplantation wurden die Inseln auf Ihre Viabilität und die gesamte Präparation auf ihren Reinheitsgehalt überprüft. Im Trypanblautest zeigt sich eine Viabilität von ca. 95%. Die Reinheit lag zwischen 90 und 95 %.

#### Transplantationsserien

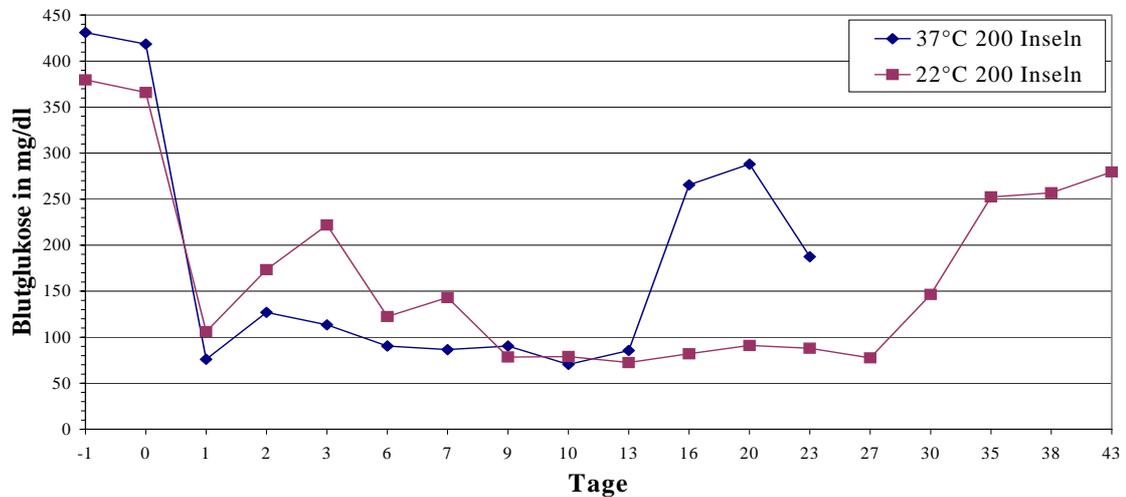
Es wurden in dieser Versuchsreihe die Kulturbedingungen 22°C gegen 37°C im Kulturmedium TCM199 + 5% FCS gegeneinander verglichen. Als Nachweis einer Transplantatfunktion gilt das Erreichen einer Normoglykämie nach vorbestehendem STZ-induzierten Diabetes mellitus. Die Normoglykämie ist definiert als das Vorliegen von Plasmaglukosewerten von 80 bis 150 mg/dl.

In vielen in der Literatur beschriebenen Versuchsmodellen wurde keine Gewichtung auf die transplantierte Inselmasse gelegt. Deshalb wurde in den meisten Fällen in einem Inselüberschuß transplantiert. In der Versuchsserie der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Inselmengen (200, 100, 50 Inseln) transplantiert. Dadurch sollen Effekte der Kulturbedingungen besser erkennbar sein und nicht durch das Transplantieren einer übergroßen Menge an Inseln die Tatsache verschleiert werden, daß in der frühinflammatorischen Phase große Mengen Inseln untergehen (siehe auch Diskussion).

In beiden Gruppen wurden die Inseln nach dem entsprechenden Protokoll für 1 Tag in Kultur gehalten.

Abb.7:

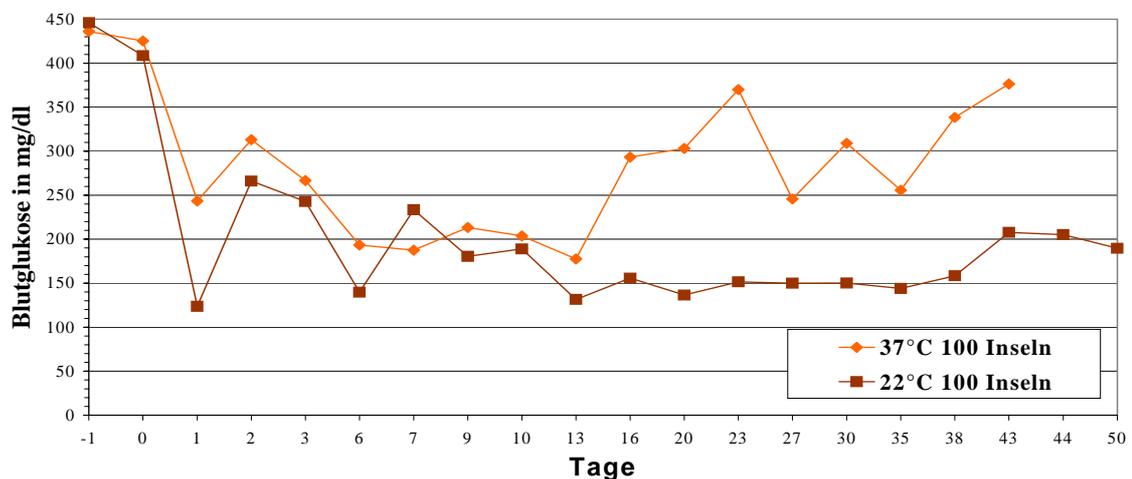
**Konkordant xenogene Transplantation von 200 Lewis Ratteninseln in diabetische C57Bl/6J Mäuse nach Kultur bei 22°C oder 37°C in TCM199 + 5% FCS (MW, n=2)**



Diese Plasmaglukosekurven veranschaulichen einen Transplantationserfolg gemessen an der Normoglykämie für 200 Inseln. Es zeigen sich bei beiden Temperaturen bezüglich dem Erreichen der Normoglykämie nur geringe, nicht signifikante Unterschiede. Diese treten im Hinblick des Zeitraums zum Erreichen der Normoglykämie auf. Die Kultur bei 37°C erzielt am ersten Tag nach Transplantation eine normoglykämische Stoffwechsellage, während dies die 22° Inseln im Mittel erst am sechsten Tag erreichen. Das Transplantat der 37°C Inseln wird an Tag 13 abgestoßen im Gegensatz zu den 22°C Inseln. Diese werden erst nach mehr als einem doppelt so langen Zeitraum abgestoßen (am 27. Tag nach Transplantation).

Abb. 8:

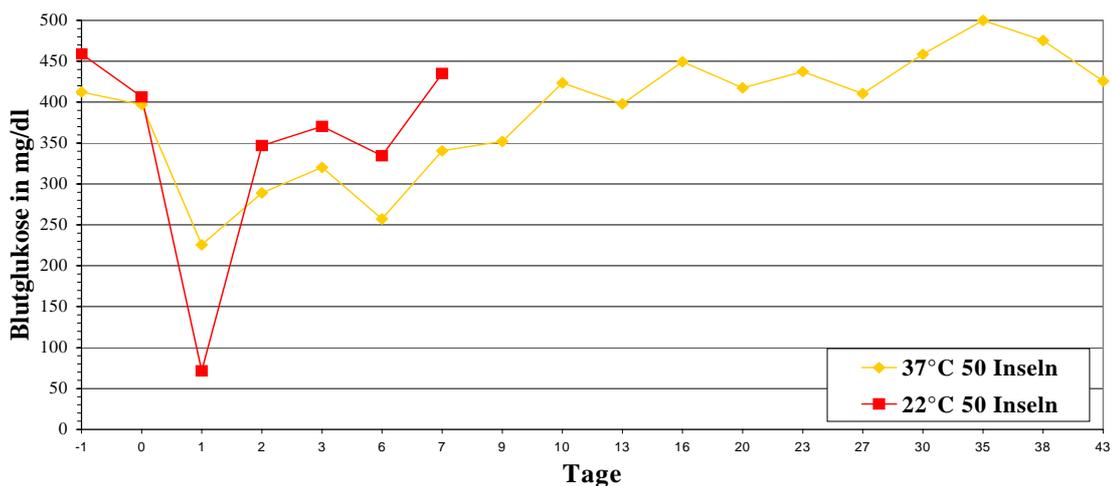
**Konkordant xenogene Transplantation von 100 Lewis Ratteninseln in diabetische C57Bl/6J Mäuse nach Kultur bei 22°C (n=4) oder 37°C (n=3) in TCM199 + 5% FCS (MW)**



Bei Transplantation von 100 Inseln stellt sich folgendes Ergebnis dar: Inseln beider Gruppen sind in der Lage eine Absenkung der Plasmaglukose zu erreichen, die allerdings verglichen mit der Gruppe mit 200 Inseln langsamer einsetzt. Die 22°C Gruppe erreicht eine anhaltende Normoglykämie, wohingegen die 37° Inseln an Tag 13 immunologisch abgestoßen werden und somit nicht in der Lage sind eine Normoglykämie zu erzielen. Bis zur immunologischen Abstoßung erfolgte eine Absenkung der Plasmaglukose. Die Hintergründe einer immunprivilegierten Situation und der 22°C kultivierten Inseln wurden bereits durch verschiedene Gruppen beschrieben (MARKMANN et al., 1990, FAUSTMANN et al., 1991, JÄGER et al., 1994) und sollen hier, da sie auch nicht Arbeitsgegenstand dieser Arbeit waren, nicht weiter besprochen werden.

**Abb. 9:**

**Konkordant xenogene Transplantation von 50 Lewis Ratteninseln in diabetische C57Bl/6J Mäuse nach Kultur bei 22°C oder 37°C in TCM199 + 5% FCS (MW, n=2)**



Bei der Transplantation von 50 Inseln konnte keine Normoglykämie erreicht werden, unabhängig der Kulturtemperatur. Allenfalls kann man von einer Senkung der Plasmaglukose auf weiterhin hyperglykämische Werte sprechen.

Insgesamt betrachtet ergaben sich folgende Erkenntnisse:

- Eine Kultur der Inseln bei 22°C in TCM199 + 5% FCS ergeben im konkordant xenogenen Tiermodell eine Transplantatfunktion gemessen an der Normoglykämie. Diese tritt versetzt zur Transplantation ein und bleibt annähernd doppelt so lange bestehen gegenüber den transplantierten 37°C Inseln. Für diesen Effekt ist eine Mindestmenge von 100 Inseln notwendig.
- Eine Kultur der Inseln bei 37°C in TCM199 + 5% FCS kann ebenfalls eine Normoglykämie, die am Tag der Transplantation einsetzt, erzeugen. Die Dauer ist

gegenüber den 22°C Inseln auf Grund der einsetzenden immunologischen Transplantatabstoßung um mehr als die Hälfte verringert. Die notwendige Mindestmenge für eine eindeutige Normoglykämie liegt bei 200 Inseln. 100 Inseln können auf Grund der einsetzenden Abstoßung keine eindeutige Normoglykämie, sondern nur eine Absenkung auf hyperglykämische Werte bewirken.

### **3.2.3.3. Bestimmung des Insulingehaltes des Transplantat tragenden Organs mittels Enzymimmunassay**

#### Versuchstiere

Der in vivo Versuchsaufbau entspricht den bereits genannten Protokollen. Das Ziel war es, anhand eines zweiten Parameters neben der Normoglykämie, eine weitere Beurteilung des Transplantatüberlebens zu ermöglichen, um der o.g. Frage des Einflusses unterschiedlicher Kulturtemperaturen auf das Transplantatüberleben nachzugehen.

#### Inselviabilität und Reinheit

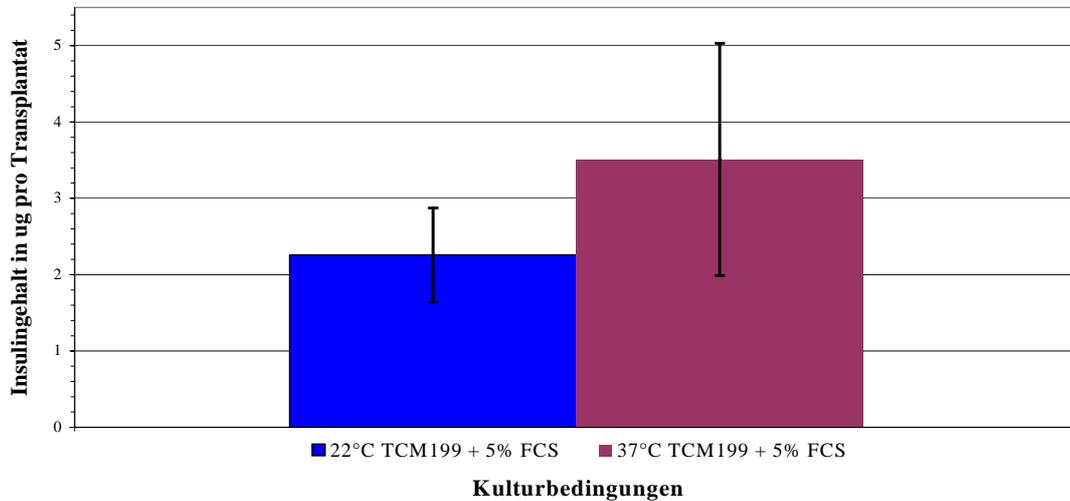
Vor der Transplantation wurden die Inseln auf Ihre Viabilität und die gesamte Präparation auf die prozentuale Reinheit überprüft. Im Trypanblautest zeigt sich eine Viabilität von ca. 95%. Die Reinheit lag zwischen 90 und 95 %.

#### Transplantation und Nephrektomie

Die Transplantation wurde auch hier unter die Nierenkapsel durchgeführt. Zum besseren Vergleich wurde in beide Nieren in einem Vorgang transplantiert. Die Menge betrug jeweils 100 Inseln. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Transplantation und in der Zeit bis zur Nephrektomie, die am dritten Tag nach Transplantation durchgeführt wurde, normoglykämisch.

**Abb. 10:**

Konkordant xenogene Transplantation in nicht diabetische C57/B16J Mäuse unter die Nierenkapsel mit Nephrektomie am 3. Tag nach Tx und Bestimmung des Insulingehaltes pro Transplantat (n= 3 ± SEM)



In den Insulinbestimmungen zeigt sich ein 1.5 fach höherer Gehalt im Transplantat der 37°C kultivierten Inseln gegenüber 22°C kultivierten Inseln. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Beobachtungen zu bringen, die eine höhere Stoffwechselaktivität der  $\beta$ -Zelle bei 37°C in CMRL 1066 beschrieben haben, die zu einer höheren Insulinsekretion führt (WÖHRLE et al., 1990). In vivo erbringt diese höhere Aktivität ein schnelleres Erreichen der Normoglykämie.

### 3.3. Diskordant xenogenes Modell (humane Inseln in Maus)

#### 3.3.1. Transplantation humaner Insel unter die Nierenkapsel nicht diabetischer C57Bl/6J Mäuse nach einer Kultur bei 22°C/CMRL 1066 ver. 22°C/TCM199 + 5% FCS ver. 37°C/TCM199 + 5% FCS

Es wurden insgesamt 4 Transplantationsreihen durchgeführt. Die Inseln hierfür stammen aus drei unterschiedlichen Präparationen.

##### Statische Glukosestimulation

Am Tag nach der Isolation wurde eine statische Glukosestimulation durchgeführt. Dieser Test beurteilt Vitalität, Insulingehalt, Stimulationsfaktor auf einen definierten Glukosereiz und die Zahl der Inseläquivalenten (IEQ).

##### Transplantation

Es wurden pro Transplantation 300 IEQ verwendet. Transplantationsort war die Nierenkapsel der linken Niere. Empfängertiere waren normoglykämische C57Bl6J Mäuse. Die Tiere waren nicht nüchtern und keinen weiteren Vorbehandlungen unterworfen.

### Intraperitoneale Glukosestimulation und intrakardiale Blutentnahme

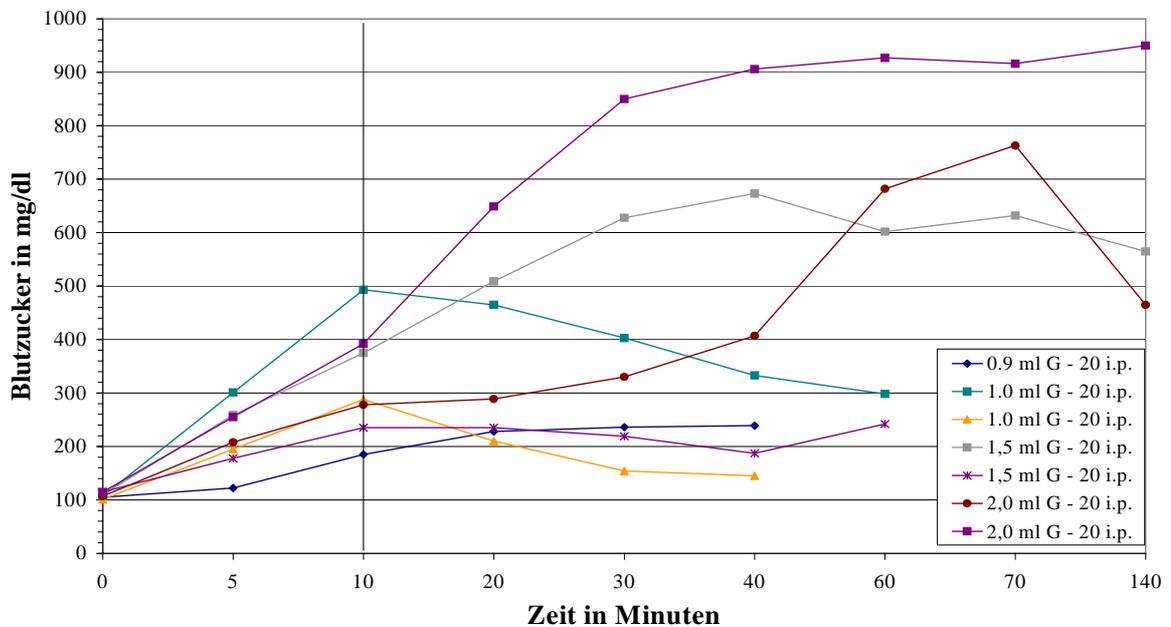
An Tag 3, 7 und 14 nach Transplantation erhielten die Tiere eine intraperitoneale Glukoseinjektion zur Stimulation der vorhandenen Inselmasse. Nach Ablauf von 10 Minuten erfolgte die Blutentnahme aus dem Herzen. Das Serum wurde anschließend in einem Enzymimmunoassay zur Bestimmung von humanem Insulin eingesetzt.

### 3.3.2. Intraperitoneale Glukosebelastung

In Vorversuchen wurde eine Glukosebelastung normoglykämischer C57Bl/6J Mäuse durchgeführt und die Plasmaglukose gemessen. Es ergaben sich folgende Verlaufskurven:

**Abb. 11:**

**Darstellung der gemessenen Plasmaglukose in C57Bl/6J Mäusen nach intraperitonealer Glukoseapplikation (G-20) in unterschiedlichen Mengen**



Aufgrund dieser erhobenen Werte entschieden wir uns für die Gabe von 1,0 ml G-20 i.p. für die Transplantationsserien.

### 3.3.3 Einzelergebnisse der Transplantationsserien

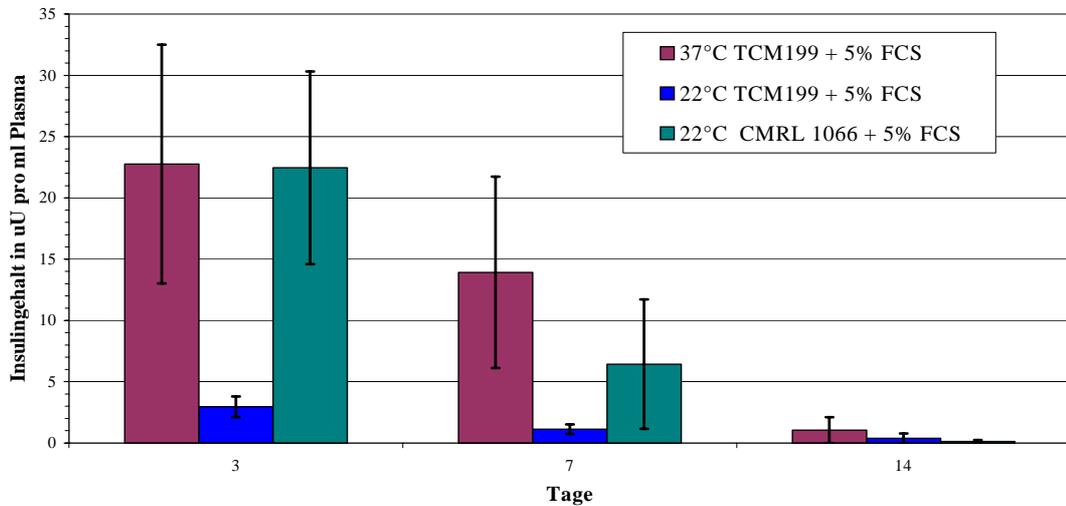
#### 3.3.3.1 Ergebnisse des humanen Organs Nr. 1

In vitro Charakterisierung der verwendeten Inseln:

- Vitalität (im Trypanblautest): 91.8 %
- Insulingehalt: 104,6  $\mu$ U/Inseläquivalent $\mu$
- Eine verwendete Insel entsprach durchschnittlich 1,45 IEQ
- Stimulationsfaktor für die glukosestimulierte Insulinsekretion (300/30 mg/dl): > 30

Abb. 12:

Humanes Insulin im Plasma i.p. glukosestimulierter C57Bl/6J-Mäuse nach Transplantation von 300 unterschiedlich kultivierten humanen Inseln eines Organspenders (MW  $\pm$  SEM, n=4)



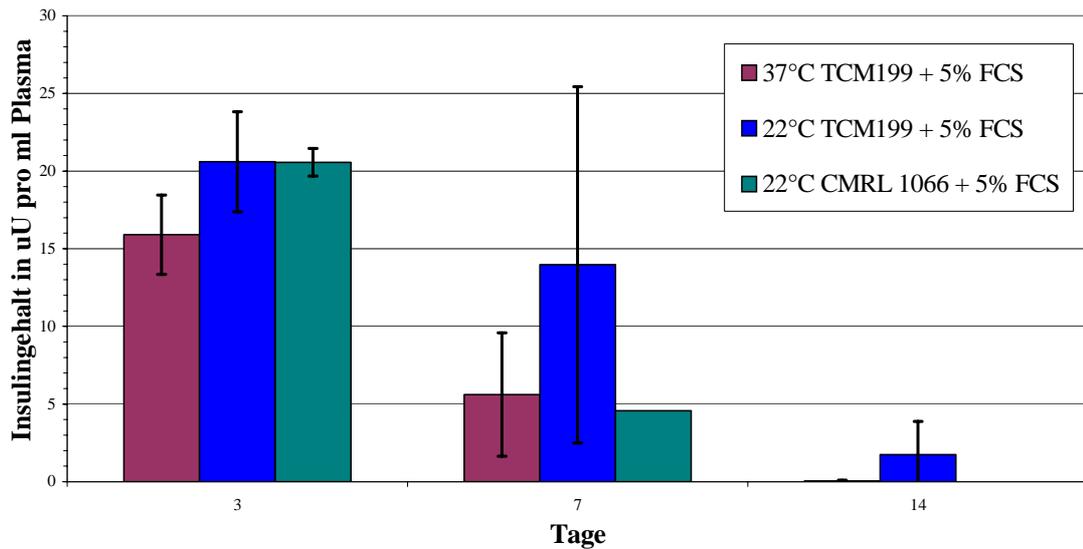
### 3.3.3.2. Ergebnisse des humanen Organs Nr. 2

In vitro Charakterisierung der verwendeten Inseln:

- Vitalität (im Trypanblautest): 93 %
- Insulingehalt: 154.8  $\mu$ U/Inseläquivalent
- Eine verwendete Insel entsprach durchschnittlich 1.77 IEQ
- Stimulationsfaktor für die glukosestimulierte Insulinsekretion (300/30 mg/dl): 1.16

Abb. 13:

Humanes Insulin im Plasma i.p. glukosestimulierter C57Bl/6J-Mäuse nach Transplantation von 300 unterschiedlich kultivierten humanen Inseln eines Organspenders (MW  $\pm$  SEM, n=4)



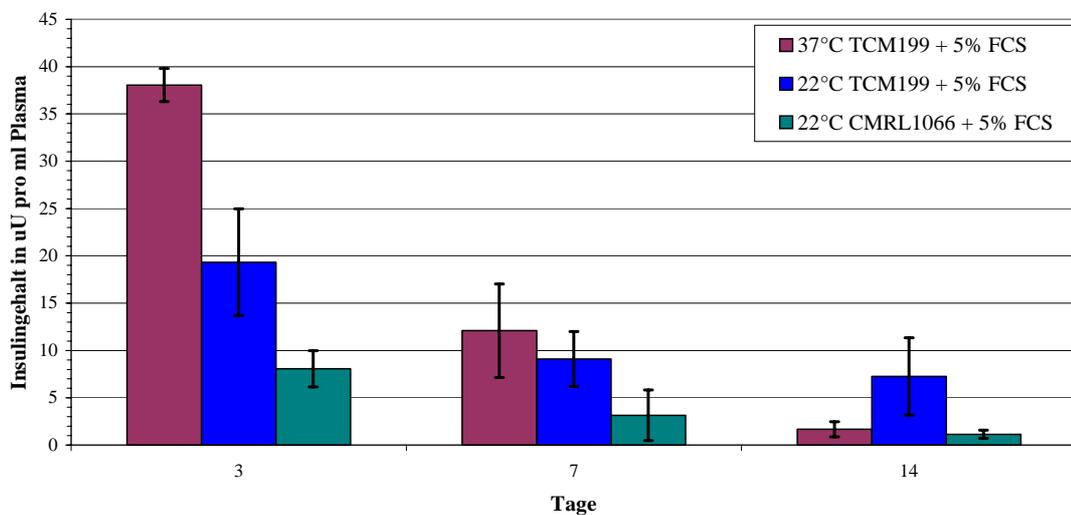
### 3.3.3.3. Ergebnisse des humanen Organs Nr. 3

In vitro Charakterisierung der verwendeten Inseln:

- Vitalität (im Trypanblautest): 87 %
- Insulingehalt: 90.5  $\mu$ U/Inseläquivalent
- Eine verwendete Insel entsprach durchschnittlich 1.18 IEQ
- Stimulationsfaktor für die glukosestimulierte Insulinsekretion (300/30 mg/dl): 5.89

**Abb. 14:**

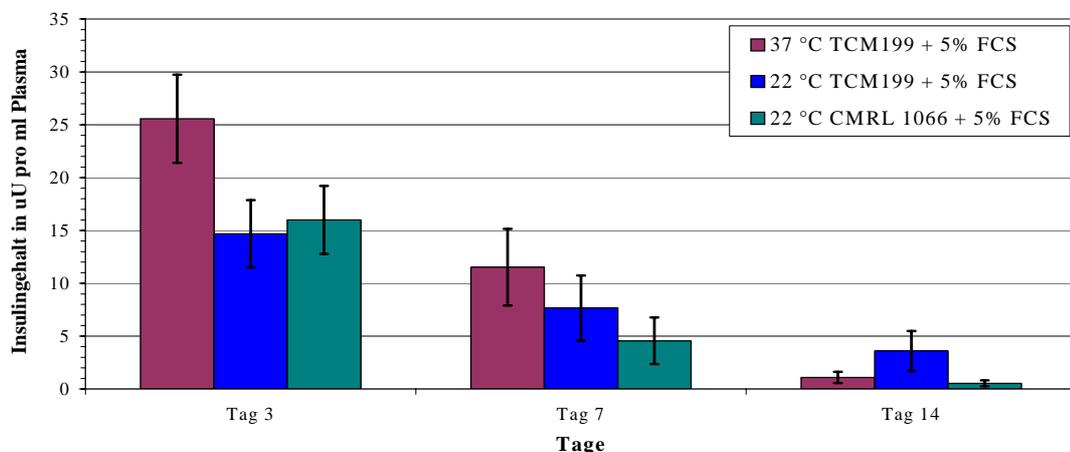
**Humanes Insulin im Plasma i.p. glukosestimulierter C57Bl/6J-Mäuse nach Transplantation von 300 unterschiedlich kultivierten humanen Inseln eines Organspenders (MW  $\pm$  SEM, n=4)**



### 3.3.3.4. Zusammenfassende Gesamtdarstellung aller Transplantationsreihen

**Abb. 15:**

**Gesamtdarstellung der gemessenen Plasma-Insulingehalte nach i.p. Glukosestimulation der diskordant xenogenen Transplantation Langerhans'scher Inseln unter die Nierenkapsel (MW  $\pm$  SEM, n= 12)**



Aus diesen Transplantationsreihen wird ein deutlicher Vorteil der 37°C/TCM199 + 5% FCS kultivierten Inseln für den Zeitraum direkt nach Transplantation bis hin zu 7 Tagen ersichtlich. Die gemessenen Insulinwerte liegen an Tag 3 nach Transplantation für die

37°C Kultur annähernd 1.5-fach höher als diejenigen der 22°C Kultur. Einen nur geringen Unterschied findet man bei 22°C im Vergleich der Kultur in TCM199 + 5% FCS gegenüber CMRL 1066. Am siebten Tag nach Transplantation verschiebt sich dieses Bild zu Gunsten des Kulturmediums TCM199 + 5% FCS. Der Insulingehalt bei 22°C/CMRL 1066 liegt zum Meßzeitpunkt mehr als zweifach niedriger als derjenige der 37°C/TCM199 + 5% FCS und ca. 1.5 niedriger als derjenige der 22°C/TCM199 + 5% FCS kultivierten Inseln. Bezüglich des Vergleichs 37°C und 22°C für TCM199 + 5% FCS, besteht weiterhin ein Vorteil der 37°C gegenüber der 22°C Kultur. Dieser ist 1.5-fach höher, vergleichbar mit demjenigen an Tag 3.

Ein weiterer, deutlicher Verlust läßt sich im Zeitraum Tag 7 bis Tag 14 dokumentieren. Den geringsten Verlust zeigten allerdings die 22°C/TCM199 + 5% FCS kultivierten Inseln. Der gemessene Insulingehalt liegt ca. 3-fach höher als für die 37°C/TCM199 + 5% FCS kultivierten Inseln. Noch deutlicher ist der Unterschied im Vergleich zur Gruppe der 22°C/CMRL 1066 kultivierten Inseln, der annähernd 7-fach geringer ist. Somit kann man vermuten, daß für diese Übergangsphase der frühinflammatorischen Reaktion in die akute Abstoßung (siehe Diskussion) sich ein Vorteil für die Niedrigtemperaturkultur bei 22°C in TCM199 + 5% FCS zeigt. Allerdings zeigte sich bei allen Ergebnissen keine eindeutige Signifikanz.

Wenn man die gemessenen Insulinmengen als Anhaltspunkt für ein Transplantatüberleben betrachtet, läßt sich zusammenfassend sagen, daß eine Kultur von humanen Inseln bei 37°C in TCM199 + 5% FCS einen deutlichen Vorteil gegenüber der 22°C Kultur für den frühen Zeitraum nach Transplantation – im diskordant xenogenen Modell – aufweist. Für den Zeitraum nach dem siebten Tag nach Transplantation zeigen die Ergebnisse einen deutlichen Vorteil für die Kultur bei 22°C in TCM199 + 5% FCS.

## 4. Diskussion

### 4.1. Allgemeines

Die Diagnose eines Diabetes mellitus Typ 1 stellt für den betroffenen Patienten einen großen Einschnitt in seinem Leben dar und bringt große Veränderungen seines Lebens mit sich. Ohne eine adäquate Therapie verringert sich die Lebenserwartung auf ein Minimum. Seit Entdeckung des Insulins steht diesen Patienten eine adäquate Therapieform zur Verfügung. Dennoch bleiben die Gefahren, wie z.B. eine lebensbedrohliche Hypoglykämie, bestehen. Auch die Spätkomplikationen lassen sich nur schwer aufhalten. Somit ist die Insulintherapie von einer Reihe von Faktoren und letztendlich vom Patienten selbst abhängig.

Seit Mitte der sechziger Jahre wurden Verfahren des Organersatzes etabliert. Einerseits besteht die Möglichkeit, eine Transplantation eines vaskularisierten Pankreas durchzuführen. Dieses Verfahren bietet, allerdings bei strenger Indikationsstellung, einen hohen Transplantationserfolg gemessen an der Insulinunabhängigkeit mit 76% nach einem Jahr (IPTR, 2001). Dadurch, daß dieses Verfahren einen großen chirurgischen Eingriff mit sich bringt, treten eine nicht zu vernachlässigende Anzahl von schweren Komplikationen auf, die häufig eine erneute Operation notwendig machen. Auch verlaufen Abstoßungsreaktionen häufig fulminant.

Da bei Typ 1 Diabetikern nur ein kleiner Bestandteil des Pankreas, die Langerhans'schen Inseln, welche ca. 1% des Gesamtpankreas ausmachen, defekt ist, ist es sinnvoll auch nur diesen zu ersetzen. Basierend auf ersten Erkenntnissen von MOSKALWSKI im Jahre 1965 wurde es zuerst im Tiermodell möglich, Inseln zu isolieren, allerdings bei noch geringer Menge (MOSKALEWSKI, 1965). Modifikationen von LACY und KOSTANIOWSKY ermöglichten eine Steigerung der isolierten Inselmenge (LACY und KOSTANIOWSKY et al., 1967). Eine weitere Verbesserung bedeutete die Dichtegradientenzentrifugation (BALLINGER und LACY, 1967), die intraduktale Applikation des verwendeten Enzyms, der Kollagenase, (GOTOH et al., 1990) und eine höhere Standardisierung des Gesamtprozesses (GOTOH et al., 1990b). Darauf aufbauend wurde im Gießener Insellabor ein Isolierungsprotokoll ausgearbeitet, das eine ausnahmslos zuverlässige Isolierung von Ratteninseln in hoher Zahl, Reinheit und Viabilität erlaubt (ECKHARDT, Inaug. Dissertation eingereicht).

Ermutigt durch die vielversprechenden Ergebnisse mit Nagerinseln, wandte man sich der humanen Inselisolation zu. Durch RICORDI gelang es 1988 die humane und auch die Großtierinselisolierung durch die sogenannte (semi-) automatisierte Methode hinsichtlich

der Inselmenge, Viabilität und Funktion, entscheidend zu verbessern (RICORDI et al., 1988). Diese Verbesserungen führten Ende der 80-iger Jahre zur Etablierung eines klinischen Inseltransplantationsprogrammes. Im Gegensatz zur Transplantation eines vaskularisierten Pankreas blieben die Ergebnisse gemessen an der Insulinunabhängigkeit hinter den Erwartungen zurück. Es erlangte nur eine wesentlich geringere Anzahl von Patienten (11%) eine Insulinunabhängigkeit nach einem Jahr (BRENDEL et al., 2001). Der Vorteil des Verfahrens im Vergleich zur Gesamtorgantransplantation ist die geringe Belastung durch den eigentlichen Transplantationsvorgang und die sehr niedrige Komplikationsrate, auch bei Abstoßungsreaktionen. Der Patient bemerkt hierbei allenfalls einen ansteigenden Blutzuckerwert. Trotz des geringen operativen Aufwandes ist auch eine Inseltransplantation eine Verpflanzung von allogenem Gewebe mit der Konsequenz der Immunsuppression.

#### **4.2. Beeinflussende Faktoren für eine erfolgreiche Transplantation**

Welche Faktoren können nun einen entscheidenden Einfluß auf den Erfolg einer Inseltransplantation haben?

Einflüsse auf den Erfolg einer Inseltransplantation entstehen durch die Organspende, die weitere Organbehandlung (das sog. „Organ procurement“) (BRANDHORST et al., 1994, LAKEY et al., 1994 und 1996), den Isolationsvorgang (RICORDI et al., 1988) inklusive des Reinigungsvorganges (LAKE et al., 1989) und die dabei verwendeten Reagenzien (JAHR et al., 1995b). Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargelegt, scheint die transplantierte Inselmasse entscheidend zu sein. Die Erfahrungen zeigen allerdings unterschiedliche Mindestmengen, die bei einer klinischer Inseltransplantation zum Erreichen der Insulinunabhängigkeit notwendig sind. BRETZEL et al. sahen 1994 eine Mindestgrenze bei 8000 IEQ/kg KG. Nach den Erfolgen von SHAPIRO und seiner Gruppe erscheinen ein Minimum von 11000 IEQ/kg KG notwendig (SHAPIRO et al., 2000). Dem gegenüber steht der Bericht von BERTUZZI et al. aus diesem Jahr, der in einer Transplantationsserie Insulinunabhängigkeiten auch bei Transplantation von weniger als 8000 IEQ/kg KG erzielen konnte. Die transplantierten Inselmengen schwankten zwischen 7412 IEQ/kg KG und 14250 IEQ/kg KG. Fünf dieser Patienten blieben länger als ein Jahr insulinunabhängig. Auch in dieser Untergruppe läßt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Mindestinselmengemenge von 11000 IEQ und einer Insulinunabhängigkeit zeigen. Diejenigen Patienten, die keine Insulinunabhängigkeit erreichten, erhielten Inselmengen von 7450 IEQ/kg KG bis 11600 IEQ/kg KG. Somit zeigt sich in dieser Gruppe kein eindeutiger Zusammenhang für eine Inselmindestmenge und dem Erreichen

einer Insulinunabhängigkeit. Die Autoren vermuteten allerdings, daß bei den Patienten, die nicht insulinunabhängig wurden, eine Transplantation größerer Inselmengen wahrscheinlich eine Insulinunabhängigkeit nach sich gezogen hätte (BERTUZZI et al., 2002).

Aus diesen, zum Teil konträren, Erfahrungen läßt sich zum einen eine zentrale Rolle der Inselmasse für die erfolgreiche Inseltransplantation interpretieren zum anderen aber auch die Problematik der zu fordernden Inselmindestmenge. Wie eingangs bereits erwähnt, werden für eine Inseltransplantation zum Erreichen von mehr als 11000 IEQ/kg KG mindestens zwei Spenderorgane benötigt. Somit wäre es wünschenswert, vor allem im Hinblick auf den aktuell bestehenden dramatischen Mangel an Spenderorganen, Möglichkeiten zu entwickeln, die eine erfolgreiche Transplantation von einem Spender auf einen Empfänger ermöglichen würden.

Betrachtet man die von einigen Autoren kalkulierte Mindestmenge, basierend auf den Ergebnissen bei pankreasteilresezierten Patienten und klinischen Autotransplantationen von Inseln (siehe Einleitung), sollte dies theoretisch möglich sein. Ausgehend von diesen Überlegungen stellt sich die Frage, welche Faktoren die unterschiedlichen Ergebnisse der Inselfunktion in vivo bewirken.

Neben den bereits erwähnten Einflüssen der Immunsuppression (siehe Einleitung), sind die transplantierten Inseln Schädigungen durch Hypoxie, Mangelversorgung mit Nährstoffen, der Autoimmunität des Empfängers, frühinflammatorischen Prozessen und Abstoßungsphänomenen ausgesetzt. Durch jeden einzelnen Faktor bedingt geht eine unbestimmte Anzahl von Inseln zu Grunde. Zusätzlich spielen die Reinheit der Inselpräparation, ihre Vitalität und der Transplantationsort eine Rolle, die zum Teil auch Einfluß auf die zuvor genannten Faktoren nehmen.

#### **4.3. Einflüsse auf die transplantierte Insel**

Im nachfolgenden werden die einzelnen Faktoren angesprochen und eine eventuelle Vernetzung dargestellt werden wie auch ihr Einfluß auf das Transplantatüberleben, insbesondere auf das frühe Transplantatüberleben.

Im Gegensatz zur vaskularisierten Pankreastransplantation, befindet sich eine transplantierte Insel bis ca. 10 Tage nach Transplantation ohne direkten Gefäßanschluß (MENGER et al., 1992). Die Versorgung während dieser Zeit erfolgt im allgemeinen durch Diffusion. Erst nach Abschluß dieser Revaskularisation kann die Insel kontinuierlich und gleichmäßig mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. In diesem Zeitraum bilden

sich vor allem in zentralen Bezirken größerer Inseln Nekrosen und somit geht ein gewisser, nicht vernachlässigbarer Anteil der Inseln zu Grunde (DAVALLI et al., 1996). Beeinflußt wird die Revaskularisierung durch unterschiedliche Faktoren wie das Bestehen einer hyperglykämischen Stoffwechsellage (MENDOLA et al., 1994, JANSON et al., 1990), die Immunsuppression (MENGER et al., 1990) und die Reinheit einer Inselpräparation (GRAY et al., 1988). Zudem ist die Insel durch den Isolierungsvorgang aus dem neurologischen Netz des Pankreas herausgerissen (NODA et al., 1993). Bis zur erneuten Versorgung mit Nervenendigungen, die anscheinend vom Empfänger entlang der revaskularisierten Gefäße erfolgt (GRIFFITH et al., 1977), kann die Insel nur sehr schlecht auf metabolische Anforderungen reagieren. Aus diesem Grunde werden in der klinischen Inseltransplantation die Patienten in den ersten Tagen nach Transplantation mittels einer totalen parenteralen Ernährung inklusive Insulinapplikation versorgt (HERING et al., 1994). Als weiteres Problem kann die vorhandene Autoimmunität erneut aktiv werden (SIBLEY et al., 1985) und die  $\beta$ -Zelle schädigen. Auch eine Immunsuppression kann diesen Prozeß nicht unterbinden (STEGALL et al., 1996). Allerdings ist der Effekt bei unterschiedlichen Patienten unterschiedlich ausgeprägt. Es ist aber auch nicht bekannt, wodurch dies beeinflußt wird. Es zeigte sich jedoch ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Antikörpern gegen GAD-65, Inselzellantikörpern und der Prognose des Transplantatüberlebens (JÄGER et al., 1997).

#### **4.3.1. Immunologische Abstoßungsphänomene**

Parallel zu diesen Vorgängen ist die Alloimmunität aktiv. Diese gliedert sich in unterschiedliche Abschnitte, die man am sinnvollsten entlang einer Zeitachse darstellt. Eine Schwierigkeit der Einteilung stellt sich mit der Tatsache dar, daß bei der Entwicklung der Abstoßungstheorien vor allem das allogene Modell betrachtet wurde. Durch ein gestiegenes Interesse an einer klinisch durchführbaren Xenotransplantation traten auch diese Phänomene etwas vermehrt in den Vordergrund. Somit unterscheidet man in der klassischen Rejektion eine akute und eine chronische Rejektion (siehe unten). Vor dem Einsetzen dieser T- Zell vermittelten Immunantwort findet man eine davon unabhängige Zellschädigung. Diese wird im Allgemeinen als „Primary nonfunction“ (PNF) oder auch als frühe Inseldysfunktion bezeichnet. Diese kann man erneut unterteilen in eine hyperakute, antikörperassoziierte Abstoßungsreaktion und in eine frühinflammatorische Schädigung.

In der Vergangenheit wurde oft über das Phänomen der PNF diskutiert. Anfangs wurde es als ein technisches Problem des Transplantationsvorganges dargestellt. Es konnte aber

gezeigt werden, daß bei einer syngenen Transplantation im Nagetiermodell diese Effekte nicht auftraten. Auch eine Immunsuppression mit Cyclosporin A erbrachte keine eindeutige Reduktion der Rate für PNF (KAUFFMAN et al., 1990). Auch wurden die Probleme einer PNF der klinischen Inselallotransplantation in der Inselautotransplantation nicht nachvollzogen.

#### Hyperakute Abstoßungsreaktion

Eine hyperakute Abstoßung basiert auf im Empfänger vorhandener präformierter Antikörper ohne daß eine Präimmunisierung stattgefunden hat (GALLI, 1993). Das Prinzip ist vergleichbar dem ABO-System des Blutes. In der Transplantation vaskularisierter Organe, vor allem bei phylogenetisch ungleichen Spezies, sieht man vereinzelt schon während der Operation eine makroskopische Abstoßung mit Organzyanose und Hämorrhagien. Die zirkulierenden Antikörper richten sich gegen die Endothelwände der Gefäße des Spenderorgans und aktivieren Komplement über den klassischen Weg. Daraus resultiert eine schwere Koagulopathie, Hämorrhagie und ein verändertes Gefäßbett mit konsekutivem Organverlust (BACH et al., 1994).

Als wichtigste, präformierte Antikörper werden derzeit die anti-Galaktosyl-(Gal-) Immunglobuline eingeordnet (VAUGHAN et al., 1994). Sie binden am Galaktose- $\alpha$ -1,3-galaktose Epitop (gal-Epitop). Dieses Epitop findet man auf der Zelloberfläche aller Säugetiere, ausgenommen denen des Menschen und der Affen der alten Welt (PARKER et al., 1994). Menschen und diese Affen haben gegen dieses Epitop Antikörper entwickelt. Die hyperakute Abstoßung ist somit ein Phänomen der Xenotransplantation und tritt als Problem z.B. bei einer Transplantation von Schweinezellen auf den Menschen auf.

Eine eindeutige Klärung des Einflusses der hyperakuten Abstoßungsreaktion in der Inseltransplantation ist bis heute noch nicht erfolgt. Mit Sicherheit spielt sie eine untergeordnete Rolle im Vergleich zu anderen Abstoßungsmechanismen, da zum einen die Insel aus Ihrem Gefäßbett herausgelöst ist und somit keinen direkten Bezug mehr zum Endothelbett hat und Transplantationen ohne Immunsuppression im xenogenen Modell durchzuführen sind (LACY et al., 1989; MANDEL et al., 1997).

Basierend auf dem Vorhandensein präformierter Antikörper wurde eine Klassifikation der Xenotransplantation geschaffen. Von einem diskordant-xenogenen Modell spricht man, wenn natürliche präformierte Antikörper existieren (humane Inseln auf Maus); fehlen diese bezeichnet man es als konkordant xenogenes Transplantationsmodell (Ratteninseln auf Maus) (CALNE et al., 1970). Bei den in den vorliegenden Arbeit verwendeten

Tiermodellen (siehe unten) spielen die Phänomene der hyperakuten Abstoßung keine Rolle.

### Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung entspricht der klassischen allogenen Abstoßung. Da sich die Ergebnisse dieser Arbeit vornehmlich auf die frühinflammatorischen Phänomene beziehen und erst in zweiter Linie auf die akute Abstoßung, soll diese hier nicht in allen Einzelheiten angesprochen werden. Im Zusammenhang dieser Arbeit ist wichtig, daß die akute Abstoßung durch frühinflammatorische Reaktionen beeinflusst werden kann (siehe 4.3.4.).

Zeitlich gesehen kann die akute Abstoßung nach einigen Tagen bis hin zu drei Monaten eintreten. Sie bildet im Bereich der klinischen Transplantation die wichtigste und gravierendste Reaktion. Sie ist eine T-Zell vermittelte Abstoßungsreaktion.

Zum besseren Verständnis sind einige allgemeine Vorbemerkungen notwendig.

### Allgemeines und Definitionen:

Durch die Beschreibung des sogenannten 'Major Histocompatibility complex' (MHC) als eine polymorphe Region des sogenannten Human Leukocyte Antigen (HLA) konnten vielen Immunphänomene besser verstanden werden. Den MHC unterteilt man in MHC Klasse I und MHC Klasse II.

MHC Klasse I findet man auf allen kernhaltigen Zellen als Membran gebundenes Protein. Diese dienen dazu, Peptide, die bei der Verarbeitung von eigenen, intrazellulären Proteinen entstehen, zu präsentieren. Diese werden dann durch eine T-Zelle mit spezifischen T-Zell-Rezeptoren und von unspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt.

MHC Klasse II werden auf Antigen präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert. Es werden Antigene über Endozytose aufgenommen, verarbeitet und über die APCs präsentiert. Dies geschieht auf der extrazellulären Matrix mittels spezifischen T-Zellrezeptoren in Verbindung mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen (YORK et al., 1996; ROCK et al., 1996). Eine permanente Expression von APC findet man auf dendritischen Zellen und B-Zellen, die beide ursprünglich aus dem Knochenmark stammen. Es gibt allerdings auch Zellen, die nicht permanent aktiv präsentieren und eine Induktion benötigen. Ein Beispiel hierfür sind die Endothelzellen von Nagern. Die  $\beta$ -Zelle weist normalerweise keine MHC Klasse II Expression auf (KOENE et al., 1986; FAUSTMANN et al., 1980).

Die Bindung MHC-Peptid-T-Zellrezeptor führt nicht zu einer Aktivierung der T-Zelle. Zur Aktivierung werden ko-stimulatorische Moleküle benötigt, die nur durch permanent MHC exprimierende APCs bereitgestellt werden können.

Die Effektorfunktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt über direkten Zell-Zell Kontakt und über die Sezernierung von Zytokinen. Auf dieser Basis kann man die CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen in Th1-Zellen, die IL-2, IFN  $\gamma$  und TNF  $\beta$  produzieren, und Th2-Zellen, die IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produzieren, einteilen. Th1-Zellen und deren Zytokine kann man als aggressive Zellen bezeichnen, die eine B-Zellaktivierung, Makrophagenaktivierung und eine durch CD8<sup>+</sup> Zellen medierte Zytotoxizität bewirken können. Th2-Zellen und deren Zytokine sind an der Aktivierung der Antikörperprodukte und von Eosinophilen (einschließlich IgE) beteiligt.

Als Erklärungsansatz der Immunmechanismen, die bei einer allogenen Transplantatabstoßung ablaufen, wurde von SNELL schon 1957 das „passenger (leukocyte) cell“ Konzept beschrieben (SNELL et al., 1957). Modifikationen erfolgten durch LAFFERTY und BILLINGHAM (LAFFERTY et al., 1984, LAFFERTY et al., 1989, BILLINGHAM, 1971). Dieses Konzept unterscheidet zwischen direkter und indirekter Antwort.

Als direkte Antwort bezeichnet man die Präsentation von allogenen MHCs und Peptiden auf Spender APCs. Bei einer Transplantation werden mit dem Gewebe immer Spender APCs mittransplantiert. Diese exprimieren MHC Klasse I Moleküle, die eine permanente Präsentation von Spenderpeptiden bewirken. Zusätzlich erfolgt eine Expression von ko-stimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD40 (HARDT, 1997). T-Zellen greifen diese 'Peptid-MHC Klasse I Komplexe' an, erhalten zusätzlich noch ein ko-stimulatorisches Signal, werden aktiviert und zerstören die Zelle (SYKES, 1996). Die Effektorzellen sind Makrophagen und dendritische Zellen.

Der indirekten Antwort liegt die Überlegung zu Grunde, daß Spenderantigene durch Empfänger APCs über Endozytose aufgenommen werden, weiterverarbeitet und dann dem Empfängerimmunsystem, als eine Verbindung aus eigenen MHC und fremden Peptiden präsentiert werden. Diesmal binden Empfänger T-Zellen an Empfänger APCs. Daraufhin erfolgt eine Aktivierung der T-Zellen und die Zerstörung des Transplantats.

Die Erkenntnisse bezüglich einer Antwort im xenogenen Modell sind bei weitem nicht so gesichert wie die der allogenen Antwort. Die zelluläre Immunantwort gegenüber xenogener Transplantate scheint langsamer abzulaufen (SYKES, 1996), da die Antwort der T-Helfer Zellen und der T-Zellen langsamer abläuft als bei einer allogenen Antwort (HERING, 1992). Eine Begründung für diesen Umstand könnte die relative Unfähigkeit der T-Zellen sein, mit APC Zellen anderer Spezies zu interagieren (WOLF et al., 1995).

Auch scheint der indirekte Weg der APCs eine zentrale Rolle zu spielen (CHITILIAN et al., 1998). Die hauptsächliche Immunantwort läuft über  $CD4^+$  T-Zellen (WILSON et al., 1989). Unterstützt wird diese Hypothese durch Erkenntnisse aus Transplantationsserien mit anti- $CD4$  Antikörpern, die eine Verlängerung des Transplantatüberlebens zeigten (RICORDI et al., 1987), und bei Transplantationen auf Nacktmäuse ohne T-Zellfunktion, die ebenfalls keine Transplantatabstoßung zeigten (WARNSCOCK et al., 1990).

$CD8^+$  T-Zellen spielen eine untergeordnete bis gar keine Rolle (SIMEONONVIC et al., 1990) und eine Gabe von anti- $CD8^+$  Antikörpern zeigt keine Verlängerung des Transplantatüberlebens (WILSON et al., 1989).

Es konnte gezeigt werden, daß MHC Klasse II das bevorzugte Ziel der Empfängerimmunantwort ist und  $CD4^+$  Zellen, Makrophagen und Eosinophile sind die zellulären Effektoren (MANDEL und KOULMANDA, 1992).

Für die in der vorliegenden Studie verwendeten xenogenen Modelle konnte gezeigt werden, daß sowohl im konkordant xenogenen (Ratte  $\rightarrow$  Maus) (KAWAI et al., 1989) als auch im diskordant xenogenen Modell (RICORDI et al., 1987)  $CD4^+$  T-Zellen die führende Rolle bezüglich einer akuten Transplantatabstoßung innehaben.

#### Chronische Abstoßung:

Da die Versuchsreihe dieser Arbeit nicht bis in den zeitlichen Zeitraum einer chronischen Abstoßung reicht, soll dieser Punkt nur kurz angesprochen werden.

Über die Mechanismen der chronischen Abstoßung sind bislang nur geringe Erkenntnisse gesammelt worden und dies vor allem bei Transplantationen von Gesamtorganen. Die meisten Erkenntnisse existieren über die Niere und das Herz. Als Auslöser wurden hier nicht nur immunologische Faktoren angeführt, sondern z.B. auch die Ischämiezeit oder Perfusionschaden, Spenderbezogene Faktoren wie Alter und Todesart (ALMOND et al., 1993). Die ablaufende Reaktion der chronischen Abstoßung ist eine Inflammation auf niedrigem Niveau mit interstitieller Fibrose und Verringerung des Gefäßlumens. Somit ist sie im Gegensatz zur akuten Abstoßung ein proliferativer Vorgang (HÄYRY, 1998).  $CD4^+$  T-Zellen scheinen auch bei der chronischen Rejektion eine Rolle zu spielen, dennoch können auch Antikörper eine zentrale Rolle spielen (SUCIU FOCA et al., 1991). So wurden Antikörper, die gegen die Inseloberfläche gerichtet sind (ICSA), und eine zytotoxische Serumaktivität im allogenen System gemessen (BRETZEL et al., 1980). Im xenogenen System wurde dies für die Herztransplantation gesehen (BAILEY et al., 1986).

#### **4.3.2. Primary Nonfunction (PNF)**

Bei einer PNF spielt vor allem die frühinflammatorische Reaktion eine große Rolle. Der untersuchte Zeitraum der durchgeführten Versuchsreihen deckt sich größtenteils mit dem Zeitraum der frühinflammatorischen Reaktion und erstreckt sich auch über die beginnende akute Abstoßung.

Was bezeichnet man im allgemeinen als frühinflammatorische Reaktion, wann läuft sie ab, wodurch wird sie ausgelöst, welche Effektoren sind daran beteiligt und welche Konsequenzen hat sie?

Die frühinflammatorische Reaktion setzt durch den Transplantationsvorgang ein und spielt sich somit in der Phase ab, bevor eine zellvermittelte Abstoßung einsetzt. Sie ist nicht T-Zell vermittelt, hat aber Einflüsse auf die darauf folgende akute, T-Zell vermittelte Rejektion.

Durch den Transplantationsvorgang wird eine Gewebeverletzung verursacht, die eine lokale Inflammation hervorruft (SABLINSKI et al., 1996; HERING, 1992). In experimentellen Modellen verwendet man häufig den subkapsulären Raum der Niere als Transplantationsort. Um dorthin zu gelangen muß man zum einen die Nierenkapsel auf der einen Seite und das Nierenparenchym durchstoßen. Dabei entsteht eine vorstellbare, lokale Gewebsschädigung. ALBINA et al. wiesen nach erfolgten Transplantationen Konzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO) nach, welches  $\beta$ -Zell toxisch wirken kann, indem sie Polyvinyl-Alkohol Schwämme in Ratten transplantierten, die keine Antigenität aufwiesen (ALBINA et al., 1988). In der klinischen Inseltransplantation wird die Leber als Transplantationsort verwendet. Um die Inseln dorthin zu bringen, wird ein Katheter in die Portalvene der Leber eingebracht. Somit ist die lokale Gewebeschädigung an einem anderen Ort als die transplantierten Inseln, so daß in der klinischen Situation die Effekte durch das Transplantationstrauma wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielen. Mehr Bedeutung hat in diesem Modell die Tatsache, daß die Inseln den proinflammatorischen Molekülen des Blutes ausgesetzt sind (BENNET et al., 1999). Die unterschiedlichen Transplantationsorte werden im weiteren Verlauf besprochen werden.

Betrachtet man die Erkenntnisse über die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 als Autoimmunerkrankung mit  $\beta$ -Zellzerstörung, die frühinflammatorische Reaktion und die Zell-vermittelte Rejektion, erkennt man, daß alle diese Vorgänge über dieselbe Endstrecke agieren. Eine zentrale Rolle kommt dabei den Makrophagen zu.

Daß es neben der T-Zell vermittelten Immunantwort einen weiteren beeinflussenden Faktor geben mußte, zeigten die Ergebnisse einer Anti-CD4<sup>+</sup>/Anti-CD8<sup>+</sup> Lymphozyten

Behandlung im Tiermodell. Dadurch konnte die Transplantatüberlebenszeit eindeutig verbessert werden, aber die Rate der PNF zeigte sich unverändert. Bei intraperitonealer Transplantation einer Antimakrophagensubstanz, genannt Silica, im allogenen Mausmodell trat keine PNF auf. Es kam allerdings auch nicht zu einer Beeinflussung des Langzeittransplantatüberlebens. In der histologischen Aufarbeitung zeigten sich mehr Infiltrationen mit Makrophagen in der Gruppe, die eine PNF erlitten hatte. Ebenso wurden intakte  $\beta$ -Zellen, umgeben von einem Saum inflammatorischer Zellen gesehen (KAUFMAN et al., 1990). Diese Ergebnisse sprechen für eine starke Beteiligung der Makrophagen an einer PNF. In allen Einzelheiten geklärt ist aber noch nicht, in welchem Maße eine direkte  $\beta$ -Zellschädigung erfolgt und inwieweit eine Hemmung der Inseln vorliegt. Entscheidend für den Einfluß auf eine PNF der Makrophagen ist der Grad der Aktivierung. Eine Lyse von  $\beta$ -Zellen in großen Mengen konnte nach 15 h Inkubationszeit mit aktivierten Makrophagen beobachtet werden, im Gegensatz zu Makrophagen, deren Aktivität gehemmt wurde (APPELS et al., 1989).

Die meisten beobachteten Effekte werden durch von Makrophagen-induzierte Produkte erzielt. Als Makrophagenprodukte sind zum einen Zytokine, und zum anderen reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Intermediates, ROI) und Stickstoffmonoxid (NO) bekannt. Als für die Insel bedeutende, proinflammatorische Zytokine kennt man bislang Interleukin-1 (IL-1), Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) und Tumor Necrosis Factor (TNF) (MANDRUP-POULSEN et al., 1990). Diese können sich gegenseitig beeinflussen. Im Vergleich zu anderen Zelltypen zeigte sich, daß Inseln einen geringen antioxidativen Schutz besitzen (GRANKVIST et al., 1981a; ASAYAMA et al., 1986) und deshalb sehr anfällig gegen genannte Faktoren sind.

Im folgenden sollen die einzelnen Zytokine kurz dargestellt werden:

IL-1 kann von Makrophagen produziert werden. Es hat eine ko-stimulatorische Rolle auf  $CD4^+$  Zellen, eine chemotaktische Funktion für Lymphozyten und es steigert die Synthese von Prostaglandin  $E_2$ , Thromboxan und Kollagen (HALLORAN et al., 1989). Bezüglich des Effekts auf die Insel zeigte sich für die Ratteninsel in einer Kultur mit IL-1 eine Verminderung des Insulingehaltes und der Insulinfreisetzung, Verminderung der Gesamtproteinbiosynthese und der Inselzellreplikation (SPINAS et al., 1986/1987/1988; COMENS et al., 1987; MANDRUP-POULSEN et al., 1986). Diese Effekte sind dosisabhängig und führen bei niedrigeren Dosierungen zu einer Stimulation der Insulinsekretion (SPINAS et al., 1986). Dieselben Effekte konnten für Mäuseinseln

(LEITER, 1987) und für humane Inseln festgestellt werden. Für letztere zeigte sich bei diesen Experimenten, daß erst durch die Kombination von IL-1, INF- $\gamma$  und TNF $\alpha$  der beschriebene Effekt zu erzielen war (CUNNINGHAM et al., 1994).

INF- $\gamma$ , produziert durch aktivierte T-Zellen aller Art, bewirkt eine Induktion von MHC Expression und deren Produkte, Makrophagenaktivierung und hat einen zytotoxischen Effekt. TNF $\alpha$  wird von aktivierten Makrophagen freigesetzt und bewirkt eine Lyse von Zielzellen, Makrophagenaktivierung mit Phagozytose, IL-1 und Platelet activating factor (PAF) Produktion und die Produktion von Sauerstoffmetaboliten. Durch eine Endothelzellstimulation wird eine Freisetzung von IL-1, PAF und eine prokoagulatorische Aktivität bewirkt (HALLORAN et al., 1989). Alleine hat TNF keinen zytotoxischen Effekt auf die  $\beta$ -Zelle. In Synergismus mit IL-1 konnte eine Zytotoxizität für Mäuse und auch für humane Inseln nachgewiesen werden (RABINOVITCH et al., 1990; SOLDEVILA et al., 1991).

Diese genannten Zytokine sind in ihren Effekten miteinander verknüpft. INF- $\gamma$  und TNF wirken synergistisch bei der Induktion von MHC und Nekrosen der Zielzellen. INF- $\gamma$  induziert die Expression von Rezeptoren für TNF. Beide aktivieren Makrophagen und induzieren die IL-1 Synthese. IL-1 verringert die Aktivität der TNF-Rezeptoren und TNF triggert die IL-1 Freisetzung aus Monozyten und Endothelzellen. Beide zeigen eine zytotoxische Fähigkeit gegenüber Zielzellen. IL-1 und INF- $\gamma$  haben einen additiven, zytotoxischen Effekt auf ungeschützte Zellen und INF- $\gamma$  induziert IL-1 (HALLORAN et al., 1989). Somit kommt IL-1 eine zentrale Rolle in der inflammatorischen Antwort zu, benötigt allerdings weitere Zytokine, um seine ganze Potenz anwenden zu können.

Daß es neben den beschriebenen Zytokinen noch einen weiteren Mechanismus für die zytotoxische Zerstörung geben muß, belegen Versuche an Ratteninseln und – Makrophagen. Trotz einer Blockade von IL-1 und TNF $\alpha$  wurden die  $\beta$ -Zellen zerstört. Somit werden die entscheidenden Mediatoren durch die Zytokine in ihrer Produktion beeinflusst (KRÖNCKE et al., 1991).

#### **4.3.3. Stickstoffmonoxid (NO)**

Eine zentrale Rolle in der  $\beta$ -Zellzerstörung spielt NO. Es wird aus L-Arginin mittels Stickstoffmonooxidsynthase (Nitric oxide synthase, NOS) hergestellt (KNOWLES et al., 1994). Diese existiert in drei Unterformen, wobei die sogenannte induzierbare Synthase

(iNOS) vor allem in Makrophagen exprimiert wird (KOLB et al., 1992). Für eine starke Beteiligung von NO an Gewebeerstörung in inflammatorischen und auch autoimmunen Vorgängen sprechen mehrere Erkenntnisse. Erstens wird iNOS in Gewebe bei einer Inflammation gesehen und es existiert eine Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und Expression von iNOS (APPELTON et al., 1996; FARRELL et al., 1996; KLEEMANN et al., 1993). Zweitens bestätigte sich die Vermutung, daß NO in vitro eine Zellschädigung hervorrufen kann und daß der Zelltod durch Nekrose und Apoptose mittels hoher Dosen NO getriggert werden kann (KRÖNCKE et al., 1997). Auch eine Blockade der Produktion von NO ergab eine geringere Rate an  $\beta$ -Zellzerstörung (LUKIC et al., 1991).

NO hat unterschiedlichste Fähigkeiten. Es kann Enzyme zu Komplexen binden und greift somit in diverse, enzymatische Zyklen ein, wie z.B. in den Zitratzyklus (CORBETT et al., 1991). Dadurch entsteht unter anderem eine verminderte Glukoseoxidation (SANDLER et al., 1987) und eine Inhibition der DNA-Synthese (KWON et al., 1992). Das Ergebnis ist eine defekte Insulinsynthese und Insulinseznernierung.

#### **4.3.4. Reactive oxygen intermediates (ROI)**

Ebenfalls beteiligt an inflammatorischen Prozessen sind die bereits erwähnten ROI. Diese entstehen durch Reduktion von Sauerstoff. Während der Phase der Ischämie kumuliert Hypoxanthin. Diese wird bei einer Reperfusion bzw. Reoxigenierung durch das Endothelzell-assoziierte Enzym Xanthinoxidase (XO) katalysiert (JARASCH et al., 1981 und 1987). Dabei werden verschiedene ROI freigesetzt (ZWEIER et al., 1988). Auch TNF  $\alpha$  kann die Generierung von ROI induzieren (WARD, 1991). Für diese Gruppe wurde eine Reihe von Antioxidantien beschrieben, die einen Schutz der Insel vor oxidativem Streß darstellen (Desferoxamin, Nicotinamid, Probucol, etc. ) (NOMIKOS et al., 1986; DRASH et al., 1988).

Welche Bedeutung ergab sich aus diesen grundlegenden Erkenntnissen?

Dabei muß man die unterschiedlichen Spezies unterscheiden. Betrachtet man Nagetierinseln, zeigt sich eine Toxizität für ROI (RABINOVITCH et al., 1992; BURKHART et al., 1992). Gleiches gilt für die humane Insel (JAHR et al., 1995a). Es zeigte sich auch, daß sich für Nagetierinseln ein Schutz durch Antioxidantien wie z.B. Nikotinamid erreichen läßt (BURKART et al., 1992; MANDRUP-POULSEN et al., 1990). Ratteninseln weisen im Vergleich zu humanen Inseln eine wesentlich höhere Empfindlichkeit gegenüber NO auf. Letztere und Schweineinseln sind am wenigstens empfindlich gegenüber NO. Die Inseln der Maus besitzen eine Empfindlichkeit, die zwischen diesen beiden anzusiedeln ist (EIZIRIK et al., 1994; JAHR et al., 1995a). Auch

läßt sich die NO-Produktion in Ratten am leichtesten induzieren und zeigt die größte Freisetzung (MONCADA et al., 1991). Dagegen ist eine NO-Produktion in den Makrophagen des Menschen, des Schweines und der Maus wesentlich geringer ausgeprägt (MONCADA et al., 1991; JAHR et al., 1994).

In jüngerer Zeit bestärkt sich die Hypothese, daß die frühinflammatorische Reaktion auch einen Einfluß auf die akute Rejektion hat. HALLORAN et al. fanden bei Mäusen nach Nierentransplantation, daß eine Ischämie und ein toxischer Schaden, wie bereits dargelegt, eine inflammatorische Antwort hervorrief. Nach Ablauf von drei bis fünf Tagen konnten sie MHC Klasse I und II positive Parenchymalzellen nachweisen. Nach fünf Tagen dokumentierten sie einen Anstieg an MHC Klasse II positiven Zellen (HALLORAN et al., 1997). Sie berichten auch über einen signifikanten Anstieg von akuten Rejektionen bei einer initial schlechten Transplantatfunktion von 55% auf 68% im klinischen Bereich. Das ließ sie zu dem Schluß kommen, daß eine Immunantwort aus drei Anteilen besteht: Zuerst wird die MHC-Expression, das Antigen, durch die Gewebsverletzung hochreguliert, eventuell in Kombination mit einem ko-stimulatorischen Signal. Wenn beide abgelaufen sind, treten die Zytokine als dritter Schritt hinzu. Als ein „Teufelskreislauf“ wird das gegenseitige Aktivieren von Inflammation und Immunantwort dargestellt, der dann langfristig wiederum zur chronischen Abstoßung führen soll (HALLORAN et al., 1997).

Insgesamt sind die Zusammenhänge der frühinflammatorischen Reaktion noch nicht in allen Einzelheiten verstanden worden – auch unter dem Aspekt der speziesspezifischen Unterschiede.

#### **4.3.5. Die Rolle der Inselmasse**

Bei einer PNF kommt auch der transplantierten Inselmasse eine große Bedeutung zu. Zum einen muß eine ausreichende Menge Inseln, die in der Lage sind, eine Normoglykämie zu erreichen, transplantiert werden, und zum anderen wird durch die inflammatorischen Prozesse eine nicht unerhebliche Anzahl zerstört. Das Problem der Mindestmasse in der klinischen Inseltransplantation wurde bereits besprochen (siehe Einleitung). Im Tiermodell läßt sich durch die bessere Standardisierungsmöglichkeit eine bessere Beurteilung durchführen. Doch auch hier variieren die Ergebnisse je nach Tiermodell und Transplantationsort. Im syngenem Mausmodell ist eine erfolgreiche 1:1 Transplantation (ca. 200 Inseln) durchführbar (GOTOH et al., 1990a). Berichte über syngene Rattenmodelle geben Zahlen von 2:1 (ca. 1200 Inseln) und mehr an (AR`RAJAB et al., 1994; SHAPIRO et al., 1996). Im allogenen Tiermodell wurden bislang nur Zahlen von

mehr als zwei Spendern und einem Empfänger (ca. 1200 Inseln) angegeben (SELAWRY et al., 1983). Allerdings gelang es JAHR et al. durch Verwendung von veränderten Kulturbedingungen allogene 1:1 Transplantation durchzuführen (JAHR et al., 2002). Die Berichte im xenogenen Nagetiermodell differieren ein wenig bezüglich der Zahl. Frühe Untersuchungen berichteten über eine schlechtere Transplantatüberlebensdauer bei höheren Inselzahlen. GOTOH et al. sahen ein Transplantatüberleben für 100 Inseln bis 50 Tage gegenüber 18 Tage für 600 Inseln im Modell Ratte auf Maus (GOTOH et al., 1987). Ähnliches berichtet LACY 1990 im gleichen Modell. Bei Transplantationen von 50 Inseln wurde eine wesentlich längere Transplantatüberlebenszeit gesehen gegenüber einer Transplantation von 100, 200 oder 300 Inseln. Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen stützt sich auf das Passenger cell Konzept. Ausgehend von einer geringeren Inselmasse, ergeben sich auch weniger 'passenger leukocytes' in der Insel (LACY et al., 1990). Versuche unserer eigenen Gruppe ergaben 120 Inseln als ein Minimum für einen Transplantationserfolg (WINTER et al., 2002).

#### **4.4. Transplantationsort**

Das Transplantationsergebnis ist auch vom gewählten Transplantationsort abhängig. Viele Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Tiermodelle verwendet, um alternative Transplantationsorte zu suchen, wie z.B. intramuskulär oder subkutan (WEBER, 1978; KEMP, 1973), intraperitoneal (YOUNOSZAI et al., 1970), intrathekal (HARA, 1994), Transplantation in die Milz (KONCZ et al., 1976), in die Leber (KEMP et al., 1973) oder unter die Nierenkapsel (TOLEDO-PEREYA et al., 1984). Obwohl jeder einzelne Ort bestimmte Vorteile mit sich brachte, wird in der klinischen Inseltransplantation der Zugang in die Leber verwendet. Dafür sprechen mehrere Gründe: Zum einen sind die Leber und ihre Gefäße gut zugänglich und das Einlegen des Katheters technisch gut zu bewältigen. Dazu ist kein chirurgischer Eingriff notwendig. In der Leber wird eine Hyperglykämie gut durch physiologische Insulinproduktion in das Portalsystem kontrolliert und die hepatische Blutglukoseproduktion reagiert sensitiv auf Insulin im Portalsystem (SINDELAR et al., 1996). Im Tierexperiment zeigte sich eine gute biphasische Insulinfreisetzung in der Leber (BROMME et al., 1988). Als Nachteil zu bewerten ist allerdings der direkte Kontakt der Insel in der Blutbahn mit Blutbestandteilen, der die Aktivierung der Gerinnungskaskade nach sich zieht (BENNET et al., 1999). Der subkapsuläre Raum der Niere weist ebenfalls einige Vorteile auf. Im Verhältnis zur Leber bietet er bessere Wachstumsbedingungen für die Insel (MELLGREN et al., 1986). Nachteilig ist allerdings die unphysiologische und systemische Insulinapplikation und die schlechtere Versorgung mit Sauerstoff

(CARLSSON et al., 1998). Technisch gesehen ist die Niere im Tierversuch besser zugänglich als die Leber. Auch gibt es Berichte, die ein längeres Transplantatüberleben unter die Nierenkapsel transplantiert Inseln im Verhältnis zur intraportalen Transplantation belegen, sowohl im allogenen (REECE-SMITH et al., 1981), im syngenem Rattenmodell (HILLER et al., 1991) als auch im xenogenem Modell (JÄGER et al., 1994). Allerdings gibt es auch Berichte entgegen diesen Erkenntnissen (LACY et al., 1989). Die Gründe, warum diese Unterschiede existieren, sind bislang unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Inseln in allen verwendeten Tiermodellen unter die Nierenkapsel transplantiert, da uns folgende Überlegungen zu der Erkenntnis brachten, daß dieser Transplantationsort vorteilhafter ist: 1) Die Niere ist im Tiermodell besser zugänglich, vor allem in der Maus. Dadurch wird ein Transplantatversagen durch technische Probleme stark reduziert und ein höheres Überleben der Tiere gewährleistet. 2) Es kann eine Nephrektomie zur Insulinextraktion durchgeführt werden ohne daß das Tier verstirbt. 3) Die Konzentrationen an NO sind in der Leber der Ratte wesentlich höher als in der Niere.

#### **4.4.1 Meßparameter für ein Transplantatüberleben**

Um einen Transplantationserfolg beurteilen zu können, benötigt man messbare Parameter. Dabei hat man mehrere Möglichkeiten.

Das am häufigsten angewandte Modell ist eine Transplantation bei diabetischen Tieren, um anhand der gemessenen Blutzucker und Körpergewichte eine Aussage über die Transplantatfunktion machen zu können. An diabetischen Modellen stehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Zum einen die experimentell induzierten und zum anderen die spontandiabetischen Modelle (FEDERLIN und BECKER, 1980). Letztere eignen sich auf Grund der großen Nähe zum Diabetes mellitus Typ 1 auch gut zum Studium der Autoimmunphänomene. Als Tiermodelle sind hier die NOD Maus und die BB-Ratte zu nennen. Diese Autoimmunphänomene waren jedoch nicht Gegenstand der hier beschriebenen Untersuchungen; deshalb wurden die technisch einfacher durchführbaren Modelle des chemisch induzierten Diabetes gewählt.

#### **4.4.2. Diabeteserzeugung**

Als experimentell induziertes Tiermodell eines Diabetes mellitus Typ 1 bezeichnet man die Applikation von  $\beta$ -Zell zerstörenden Substanzen, wie z. B. das Streptozotocin (STZ). Man hat zwei Möglichkeiten der Applikation: Zum einen die wiederholte intravenöse Gabe von

subdiabetogenen Dosen. Diese führt zur Ausbildung einer Insulitis mit Autoimmunphänomenen. Es resultiert ein Diabetessyndrom. Allerdings ist der exakte Charakter der Erkrankung unklar (FEDERLIN und BECKER, 1990). Die zweite Möglichkeit ist die einmalige intravenöse Gabe einer hohen Dosis von Streptozotozin (Hochdosis/Einmal-Gabe). Dies führt zu  $\beta$ -Zell toxischen Effekten ohne Insulitis (RUDAS, 1972). Der daraus resultierende Effekt hat große Ähnlichkeit mit einem durch völligen Insulinmangel gekennzeichneten Diabetes mellitus (BRETZEL, 1984).

#### Kontrollgruppen

In der diabetischen Mäusekontrollgruppe konnte kein Anhalt für eine spontane Erholung gesehen werden. In dieser Gruppe stieg der Blutzucker nach STZ Applikation rapide an und blieb konstant bei hohen Werten von über 300 mg/dl. Parallel dazu konnte eine gleichmäßige Gewichtsabnahme dokumentiert werden. Des weiteren zeigten alle Tiere die klinischen Anzeichen einer hyperglykämischen Stoffwechsellage, die bei einer Reihe von Tieren zum Tode führte.

Auch im allogenen Rattenmodell konnte kein Anhalt für eine spontane Erholung der  $\beta$ -Zelle gefunden werden. In der Gruppe der allogenen transplantierten Tiere mit einem Tag Kultur sahen wir eine Rejektion nach fünf bis neun Tagen. Es fand in diesem Zeitraum keine Erholung der STZ-zerstörten  $\beta$ -Zellen statt. Aus diesem Grund wurde auf eine weitere, große Kontrollgruppe für die vorliegende Arbeit verzichtet.

Auf Grund der besseren manuellen Handhabung und der in unserem Labor bestehenden Erfahrungen wurde das Hochdosis/Einmalgabe Prinzip angewendet. Nach sachgerechter Applikation kam es in allen Fällen zur Ausbildung eines Diabetes mellitus mit hyperglykämischer Stoffwechsellage.

#### **4.4.3. Insulinextraktion**

Eine weitere Möglichkeit, Transplantatüberleben zu messen, ist die Bestimmung von Insulin im Transplantat mittels Insulinextraktion. Dabei wird nach Transplantatnephrektomie die Niere mit den transplantierten Inseln durch ein spezielles Verfahren aufbereitet und vorhandenes Insulin gemessen. Dadurch lassen sich konkrete Aussagen zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Transplantation bezüglich der zu einem gegebenen Zeitpunkt im Transplantat vorhandenen Insulinmenge machen, wodurch man wiederum Rückschlüsse auf die Menge der noch vorhandenen Inseln ziehen kann. Zusätzlich zu den Blutzucker-/Gewichtsverläufen der Tiere erhält man dadurch einen

weiteren Parameter zur Beurteilung des Transplantatüberlebens. Diese Verfahren kann man mit diabetischen und nicht diabetischen Tieren durchführen.

#### 4.5. Verwendete Tiermodelle

Die weltweit meisten Erfahrungen existieren mit Nagetiermodellen. Sie sind gut reproduzierbar, standardisierbar, sowohl im Hinblick auf die Isolation als auch auf die Transplantation. Im Gießener Labor sind Ratten- und Mäusemodelle etabliert.

Es wurden folgende Tiermodelle verwendet:

1. Allogenes Nagetiermodell mit Ratten
2. (Konkordant) xenogenes Nagetiermodell mit Ratten als Spender und Mäusen als Empfänger
3. (Diskordant) xenogenes Nagetiermodell mit humanen Inseln als Spendergewebe und Mäusen als Empfänger.

Für eine Verwendung von Mäusen (und gegen eine Verwendung von Ratten) als Empfänger für humane Inseln sprechen folgende Gründe: In Ratten transplantierte Inseln zeigen zumeist keine Funktionsaufnahme, d.h. es liegt in der Regel eine 'primary nonfunction' vor (Übersicht in JAHR et al., 1998a). Dies ist eine Situation, die nicht mit der klinischen Inseltransplantation – hier ist die Problematik der PNF inzwischen weitgehend überwunden worden – vergleichbar ist. In der Transplantation im Rattenmodell spielt es keine Rolle, ob intraportal (SUNG et al., 1996) oder renal subkapsulär (TZE et al., 1989) transplantiert wird. Dies kann neben noch unbekanntem Ursachen sowohl an der wesentlich höheren lytischen Aktivität von Rattenkomplement (SASSI et al., 1987) als auch an größeren Mengen NO, welches durch Rattenmakrophagen produziert wird (JAHR et al., 1998a), liegen. Bei Transplantation von Inseln höherer Spezies (Mensch, Schwein) kommt es in der Regel zu keiner PNF, sondern zur initialen Funktionsaufnahme; offenbar haben die vorhandenen xenogenen natürlichen Antikörper hier keine toxische Wirkung auf die Insel.

Die Verwendung von humanen Inseln ist in ihrer Verfügbarkeit nicht planbar. Bei tierexperimentellen Studien bedient man sich häufig des diabetischen Mausmodells. Die Ausprägung eines manifesten STZ-induzierten Diabetes mellitus benötigt jedoch mehrere Tage. Die Durchführung der Transplantationsserie wäre abhängig von der Verfügbarkeit von STZ-diabetischen Mäusen. Es zeigte sich allerdings in vielen Transplantationsserien, daß diese Mäuse, auch bei täglicher Applikation von Insulin, versterben. Da das Erreichen der Normoglykämie im diabetischen Modell nur eine der potentiellen Möglichkeiten zur

Durchführung einer Versuchsreihe ist, kam folgendes Modell zur Anwendung: Als Empfänger werden normoglykämische Mäuse verwendet, die nach Transplantation der humanen Inseln an festgelegten Tagen eine intraperitoneale Glukoseapplikation erhalten. Die darauf folgende intrakardiale Blutentnahme stellt genügend Material zur Insulinbestimmung zur Verfügung. Die Problematik liegt vor allem darin, den Glukosereiz akkurat zu applizieren, und die Herzpunktion zur Blutgewinnung beinhaltet ein gewisses Mortalitätsrisiko. Dennoch ist dies ein praktikables und auch einfaches Modell zur Beurteilung der Funktion von Langerhans'schen Inseln, insbesondere von humanen Inseln *in vivo*.

#### **4.6. Kultur Langerhans'scher Inseln und Kulturmedium**

Die Frage, ob es durch spezielle Bedingungen möglich ist, Zellen und Zellverbände *in vitro* am Leben zu erhalten, beschäftigt die Wissenschaftler seit mehr als hundert Jahren. ROUX unternahm 1885 den ersten erfolgreichen Versuch, Zellen eines Hühnerembryos über mehrere Tage vital zu erhalten, und Arnold gelang es zwei Jahre später, Froschleukozyten in einer warmen Elektrolytlösung zu kultivieren (PAUL, 1973). Seit Beginn der 1950-iger, als permanente Zelllinien immer mehr an Aufmerksamkeit erhielten, verbesserten sich auch die zur Verfügung stehenden Kulturmedien zusehend. Es wurden eine Vielzahl von Kulturmedien entwickelt, einige werden auch heute noch verwendet.

In der klinischen Anwendung der Inseltransplantation befindet sich das Medium CMRL 1066, ein 1957 entwickeltes Medium (PARKER et al., 1957). Als weiteres Medium, welches in unserem Labor vorzugsweise für die tierexperimentellen Fragestellungen und auch für *in vitro* Versuche zum Einsatz kommt, wurde TCM199 verwendet. Es wurde bereits 1950 entwickelt (MORGAN et al., 1950). Auf diese beiden soll in der vorliegenden Arbeit fokussiert werden.

Für ein erfolgreiches Überleben der Inseln sind unterschiedliche Zusätze in das Medium notwendig.

Zum einen Fetal Calf Serum (FCS). Dadurch wird eine Verbesserung des Zellüberlebens und Zellwachstums erreicht. Des weiteren werden ausreichend Proteinbindungen zur Verfügung gestellt (BARNES et al., 1980). In Vergleich von Kulturmedium mit und ohne Serum konnten einige entscheidende Unterschiede gezeigt werden. Nachweisbar ist ein 25 %-iger Verlust von Insulingehalt bei Inseln kultiviert mit TCM199 ohne Serum gegenüber einer Kultur mit FCS. Die Insulinbiosynthese liegt dreimal so hoch bei Verwendung von FCS als Zusatz (ANDERSSON, 1978). Eine Fragmentierung der Inseln (ANDERSSON, 1976) und eine Degranulierung der  $\beta$ -Zelle wird verhindert (ANDERSSON, 1978).

Die Frage, ob und in welcher Menge die Verwendung von Glukose in der Inselzellkultur einen positiven oder einen negativen Effekt hat, ist nicht einheitlich geklärt. Da die meisten Kulturmedien zur Zellproliferation entwickelt wurden, enthielten sie hohe Konzentrationen von Glukose (11 mmol/L oder höher). Inseln besitzen einen starken Metabolismus und die Insulinproduktion ist stark glukoseabhängig. Es konnte gezeigt werden, daß bei hohen Glukosekonzentrationen die Insel weniger sensibel ist (RAMIREZ et al., 1992), eine Reihe von funktionalen Defekten eintreten, wie z.B. die verringerte Freisetzung von Insulin auf einen Glukosereiz hin, verringerter Insulingesamtgehalt (MARSHAK et al., 1999) und eine verringerte Proteingesamtsynthese besteht (EIZIRIK et al., 1991). Überhöhte Glukosekonzentrationen führen zu einem irreversiblen Schaden der  $\beta$ -Zelle (DAVALLI et al., 1991; PEHUET-FIGONI et al., 1994).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil einer Kultur für Inseln sind Aminosäuren. Sie sind wichtige Bestandteile der Insulinbiosynthese und können Insulin und Glukagon freisetzen. (ANDERSSON, 1976; MALAISSE et al., 1968). Allerdings ist auch hier noch nicht eindeutig geklärt, welche Aminosäure oder Aminosäurenkombination in welcher Konzentration einen Nutzen in der Kultur bewirkt. Die verwendeten substituierten Aminosäuren N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin für TCM 199 und Glycyl-L-Gutamin für CMRL 1066 werden in unserem Labor seit langer Zeit als Zusätze verwendet und haben bislang keinen nachteiligen Effekt gezeigt.

In einer Zellkultur kommt dem pH Wert eine zentrale Rolle zu. Es konnte gezeigt werden, daß bei einer Kultur bis zu einer Woche ein pH-Wert von 7.4 bis 7.6 optimale Bedingungen bezüglich der Insulinfreisetzung bietet (BRUNSTEDT und NIELSEN, 1978). Die Überlegenheit von HEPES Puffer gegenüber Bikarbonat Puffer wurde durch SHIPMAN beschrieben (SHIPMAN, 1969).

Die Eignung des Mediums TCM199 + 5% FCS für die Inselkultur vor Transplantation wurde unter anderem durch die erstmalig erfolgreiche ein Spender-/ein Empfänger-Inseltransplantation im allogenen Rattenmodell nachgewiesen (JAHR et al., 2002). Die Bedeutung von CMRL 1066 ist seit vielen Jahren im experimentellen und klinischen Bereich belegt.

#### **4.7. Darstellung der eigenen Ergebnisse**

##### **4.7.1 Vergleich des allogenen Transplantatüberlebens von frisch isolierten Nagetierinseln gegenüber 1 Tag bei 37°C kultivierten Inseln (Ratte in Ratte)**

Das allogene Modell Ratte in Ratte wird aufgrund der guten Handhabung seit langer Zeit für die unterschiedlichsten Fragestellungen benutzt. Sehr häufig werden die Inseln nach

einer definierten Kulturdauer transplantiert. Von Interesse war die Frage, ob eine Kultur der Inseln über 20 h in TCM199 + 5% FCS einen Einfluß auf das frühe Transplantatüberleben hat.

Dazu wurden direkt im Anschluß an die Isolation und an die zusätzliche, manuelle Reinigung 1200 bis 1500 Inseln unter die Nierenkapsel transplantiert. Die Spendertiere waren Lewisratten (MHC = RT1<sup>l</sup>) und die Empfängertiere waren Wistar Furth Ratten (MHC=RT1<sup>u</sup>), ein MHC inkompatibles, allogenes Modell. Eine Immunsuppression wurde nicht gegeben.

In der Gruppe der frisch transplantierten Tiere erlangte nur ein Tier eine kurze Normalisierung des Blutzuckers (n=13). Diese trat am ersten Tag nach Transplantation ein und blieb bis 9 Tage erhalten.

In der Gruppe der über einen Tag kultivierten Inseln zeigte sich, daß von fünf transplantierten Tieren alle fünf normoglykämisch wurden und eine Transplantatfunktion für  $6.6 \pm 1.2$  Tage behielten. Nach Ablauf dieses Zeitraumes entwickelten alle eine anhaltende Hyperglykämie mit Werten von über 300 mg/dl.

#### **4.7.2. In vitro Empfindlichkeit von frisch isolierten gegenüber 1 Tag bei 37°C kultivierten Inseln der Ratte gegenüber NO und Superoxid.**

Wie bereits ausgeführt, werden durch Rattenmakrophagen große Mengen NO und ROI produziert (siehe oben). Da bei einer Kultur der Inseln über 20 h in TCM199 + 5% FCS Ratteninseln ein wesentlich verbessertes Transplantatüberleben aufweisen, sollte gezeigt werden, ob die Empfindlichkeit gegenüber NO und Superoxid durch die Kulturpassage verringert worden ist.

Dazu wurde eine definierte Inselmenge von jeweils 15 zufällig ausgewählten Inseln mit Nitroprussidnatrium über 20 h in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Das produzierte NO bewirkt je nach Konzentration unterschiedlich stark ausgeprägte nekrotische Defekte der Insel. Frische Inseln weisen schon bei geringen Konzentrationen eine deutlich höhere Zahl nekrotischer  $\beta$ -Zellen auf. Die Empfindlichkeit für frische Inseln gegenüber NO ist 3 bis 14 mal höher als für kultivierte Inseln. Bei einer Belastung durch Superoxid ist der Unterschied noch etwas deutlicher. Frische Inseln sind 3 bis 16 mal empfindlicher.

Diese Daten zeigen, daß Ratteninseln nach einem Tag Kultur bei 37°C im Medium TCM199 + 5% FCS eine wesentlich geringe Empfindlichkeit gegenüber toxischen Radikalen aufweisen. Die Kultur bewirkt eine weitgehende Erholung der Inseln von den

Streßnoxen der Isolation. Bedingt durch die Temperatur von 37°C und die Substanzen, die dem Kulturmedium beigefügt sind, wie z.B. Vitamine und Antioxidantien (JAHR et al., 2002), kann sich die Insel innerhalb kürzester Zeit wieder erholen. Dadurch, daß die Inseln bei 37°C einen konstant hohen Stoffwechselaktivität besitzen, können eventuell durch die Isolation aufgetretene Zellschäden behoben werden. Die Integrität der Insel steigt (WÖHRLE et al., 1990).

Aus diesen *in vivo* und *in vitro* Versuchen läßt sich ableiten, daß die Kultur von Inseln bei 37°C in TCM199 + 5% FCS den bereits von anderen Kulturmedien, wie z.B. CMRL 1066, bekannten Vorteil der Transplantatverlängerung (JÄGER et al., 1994) im allogenen Modell bietet. Auf Grund der größeren Rate von nekrotischen  $\beta$ -Zellen *in vitro* kann man vermuten, daß die PNF der frischen Inseln auf einen nekrotischen Zelluntergang *in vivo* zurückzuführen ist. Die verbleibenden Inseln können die benötigte Insulinsekretion nicht gewährleisten, auch im Hinblick darauf, daß durch die lokalen Makrophagen eine Sekretionshemmung erfolgt (KAUFMAN et al., 1990). Die bestehende Hyperglykämie stimuliert die verbleibenden Inseln zur Insulinsekretion und führt zu permanentem Streß für diese  $\beta$ -Zellen. Dies führt zur  $\beta$ -Zelldegranulation (DAVALLI et al., 1996). Dadurch, daß die Inseln nach Transplantation einen Zeitraum der Hypoxie durchleben müssen, kann Apoptose in der  $\beta$ -Zelle induziert werden (JACOBSON et al., 1995). Eventuell sind die Inseln durch die Kultur und damit durch die Versorgung mit Nährstoffen resistenter gegen diese zusätzlichen Belastungen.

#### **4.7.3. Vergleich des Transplantatüberlebens von Nagetierinseln (Ratte in Maus) bei 22°C gegen 37°C und unterschiedlichen Inselmengen (konkordant xenogenes Modell)**

Basierend auf diesen Erkenntnissen, den Berichten aus der Literatur und auf den Erfahrungen in unserem eigenen Labor, sollte der Frage nachgegangen werden, ob auch im konkordant xenogenen Modell durch unterschiedliche Kulturbedingungen ein verbessertes Transplantatüberleben in den ersten Tagen nach Transplantation erzielt werden kann.

JÄGER et al. konnten für dieses Modell einen besseren Effekt im Hinblick auf das Langzeittransplantatüberleben für die Kultur bei 37°C belegen. Es wurde das Kulturmedium CMRL 1066 verwendet (JÄGER et al., 1994).

Hat eine Kultur bei 37°C/TCM199 + 5% FCS einen besseren Einfluß auf das frühe Transplantatüberleben, oder die Kultur bei 22°C/TCM + 5% im Tiermodell Ratte auf Maus?

Verbunden damit ist die Frage, ob die bislang verwendeten Mindestmengen von Inseln auch in diesem Modell und in diesem Versuchsaufbau erreicht werden können?

In den bisher durchgeführten Modellen wurde meistens Inseln in einer ausreichenden Menge transplantiert. JÄGER et al. verwendeten 300 bis 350 Ratteninseln (JÄGER et al., 1994). Wie bereits erwähnt, ergaben Versuche unseres Labors eine absolute Zahl von 120 Inseln zum Erreichen der Normoglykämie. In der vorliegenden Arbeit wurden Mengen von 200, 100 und 50 Inseln unter die Nierenkapsel von diabetischen Mäusen transplantiert. Direkt nach Transplantation wurde einmalig eine Immunsuppression mittels Anti-Lymphozytenserum appliziert.

Bei Transplantation von 100 Inseln kann eine Normoglykämie erreicht werden, die im Vergleich mit der Transplantation von 200 Inseln langsamer einsetzt. Die Tatsache, daß die 37°C Inseln im Gegensatz zu den 22°C Inseln bereits vor dem Erreichen einer eindeutigen Normoglykämie abgestoßen wurden, kann man als eine Art 'Immunprivileg' der 22°C Inseln interpretieren (MARKMANN et al., 1990, FAUSTMANN et al., 1991). Die höheren Blutglukosewerte der 37°C Gruppe kann man darauf zurückzuführen, daß die Kultur bei 37°C der Insel zwar gute Bedingungen zur Regeneration bietet, dennoch ist sie auch ein wesentlich stärkerer Auslöser für die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (EL-OUAGHLIDI et al., 1998).

Die Transplantation von 200 Inseln erzeugt für beide Temperaturen eine Normoglykämie. Für das Erreichen der Normoglykämie benötigen die 22°C Inseln einen längeren Zeitraum als die 37°C Inseln. Diese bleibt allerdings wesentlich länger bestehen (10 Tage versus 20 Tage). Die Normoglykämie bei 37°C kultivierten Inseln tritt direkt nach Transplantation ein und bleibt stabil normoglykämisch bis zur Abstoßung. Diese Ergebnisse kann man auf folgendes zurückführen: 37°C kultivierte Inseln unterliegen einer schnelleren Streßregeneration und erzielen dadurch eine verbesserte Inselmorphologie. Die Stoffwechselsituation der Inseln nach 22°C Kultur ist erniedrigt (WÖHRLE et al., 1990) und besitzen einen reduzierten Insulingehalt (MARKMANN et al., 1990a).

Die Bestimmung des Insulingehaltes in der Transplantatniere nicht diabetischer Mäuse zeigte am dritten Tag nach Transplantation einen 1.5 fach höheren Gehalt für 37°C kultivierte Inseln.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch die Verwendung von TCM199 + 5% FCS als Kulturmedium auch im konkordant xenogenen Modell eine Normoglykämie zu erreichen ist. Dabei erzielt die Kultur bei 37°C eine schnellere Normalisierung des Blutzuckers.

Unter anderem liegt dies im höheren Insulingehalt gegenüber 22°C Inseln begründet. Dies ist auch in Einklang zu bringen mit anderen Berichten (SELAWRY et al., 1978). Die Tatsache, daß die Verwendung von 100 37°C Inseln in der Zeit vor der Transplantatabstoßung nur eine Blutzuckerabsenkung erzielen konnte, läßt sich darauf zurückführen, daß eine starke Induktion von proinflammatorischen Faktoren bei 37°C kultivierten Ratteninseln bekannt ist (EL-OUAGHLIDI et al., 1998). Zudem erscheint es logisch, daß dadurch, daß ein höherer Zellumsatz besteht, die vorliegende Hypoxie im subkapsulären Spalt die 37°C Inseln wesentlich stärker beeinflusst als die 22°C Inseln mit niedrigerem Zellumsatz (WÖHRLE et al., 1990). Die frühere Transplantatabstoßung der 37°C Inseln kann man auf unterschiedliche Umstände zurückführen: Zum einen gibt es einen Zusammenhang zwischen der frühinflammatorischen Reaktion, die zeitlich vor der T-Zell vermittelten Immunantwort erfolgt und eben dieser Zellantwort. Wie bereits weiter oben dargelegt, konnte eine MHC Klasse I und Klasse II Expression nach Ablauf der inflammatorischen Reaktion nachgewiesen werden (HALLORAN et al., 1997). LACY et al. zeigten den Zusammenhang des verringerten MHC Klasse II in vitro mit einem verlängerten Transplantatüberleben (LACY et al., 1979). FAUSTMAN konnte diese Ergebnisse durch die Gabe von MHC Klasse II Antikörpern unterstützen (FAUSTMAN et al., 1981). Auch eine Reduktion von MHC Klasse I in vitro erzielte ein verbessertes Transplantatüberleben (MARKMANN et al., 1990). Eine Gabe von MHC Klasse I Antikörpern erbrachte gleich lautende Ergebnisse (FAUSTMAN et al., 1991). Man kann daraus den Schluß ziehen, daß die ablaufende Inflammation eine Expression von MHC Klasse I und II bewirkt und dadurch eine akute Rejektion einleitet. Dadurch, daß die 22°C Inseln auf Grund des reduzierten Zellumsatzes eine geringere Inflammation auslösen, finden diese Prozesse zeitversetzt statt.

Im allogenen Rattenmodell ist ein optimaler Effekt auf das Transplantatüberleben bei einer Kultur von einem Tag 37°C und einer anschließenden eintägigen Kultur bei 22°C beschrieben. Als Medium wurde TCM199 + 5% FCS verwendet (JAHR et al., 2002). Dieses Vorgehen sollte auf das xenogene Modell erweitert werden.

#### **4.7.4. Vergleich des Transplantatüberlebens humaner Inseln bei unterschiedlichen Kulturtemperaturen und – medien (diskordant xenogenes Modell)**

Ausgehend von der klinischen Situation – Verwendung von CMRL 1066 bei 22°C – wurde der Einfluß des Mediums TCM199 + 5% FCS auf das frühe Transplantatüberleben untersucht.

Im diskordant xenogenen Modell mit Mäusen als Empfänger wurden jeweils 300 Inseln pro Kulturbedingung unter die Nierenkapsel nicht diabetischer Mäuse transplantiert. Direkt nach Transplantation wurde einmalig Anti-Lymphozytenserum appliziert.

Betrachtet man die Ergebnisse, so erkennt man an Tag 3 eine Überlegenheit der Kulturbedingung 37°C/TCM199. Der Insulingehalt ist ca. 1.7 fach höher gegenüber den beiden anderen Kulturbedingungen, die beinahe gleiche Insulingehalte aufweisen.

Im Zeitraum von Tag 3 bis Tag 7 ereignet sich ein eindeutiger  $\beta$ -Zellverlust gemessen am Insulingehalt. Gegenüber Tag drei zeigt die 37°C Kultur einen Rückgang um 55%, die 22°C/TCM199 + 5% FCS Kultur um knapp 48% und die 22°C/CMRL 1066 Kultur um 71%.

Bis zum Tag 14 nach Transplantation setzt sich der Prozeß fort. Es findet eine nochmalige starke Verringerung des Insulingehaltes statt. Den größten Abfall in der Stimulierbarkeit mit nochmals ca. 90% weisen die 37°C/TCM199 + 5% FCS kultivierten Inseln gegenüber Tag 3 auf. 22°C/TCM199 + 5% FCS kultivierte Inseln weisen den höchsten Wert auf, der allerdings auch um ca. 50% niedriger liegt. Der Gehalt für die 22°C/CMRL 1066 kultivierten Inseln lag nur noch gering über der Nachweisgrenze.

Die anfängliche starke Überlegenheit der 37°C Kultur bestätigt die Ergebnisse der Insulinbestimmung im konkordant xenogenen Tiermodell

Diese Ergebnisse der Kulturversuche lassen den Schluß zu, daß humane Inseln in vivo bei einer Kultur mit TCM199 + 5% FCS eine höhere Insulinfreisetzung auf einen Glukosestimulus hin erbringen können im Vergleich zu in CMRL 1066 kultivierten Inseln. Dies steht, zumindest zum Teil, im Gegensatz zu den Erkenntnissen, die durch HOLMES et al. erzielt wurden. Der Vergleich von zehn kommerziellen Medien erbrachte für die humane Insel die besten Ergebnisse für eine Kultur in CRML 1066. Allerdings bezogen sich diese Erkenntnisse auf in vitro Testungen, so daß keine Transplantationen durchgeführt wurden (HOLMES et al., 1995). Ähnliches wird von in vitro Testungen bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Radikalen berichtet. Hierbei wurde gezeigt, daß sowohl frisch isolierte humane Inseln als auch bei 22°C kultivierte Inseln, wenn man sie anschließend einer Inkubation mit Nitroprussidnatrium, welches NO generiert und mit Hypoxanthin/Xanthinoxidase, welches Superoxid freisetzt, aussetzt, eine wesentlich höhere Rate an Zelluntergängen aufweist als nach Kultur bei 37°C. Als Medium wurde TCM199 + 5% FCS bei 37°C und 22°C verwendet, CMRL 1066 nur bei 22°C. Die Kulturdauer – 1 Tag vs. 4 Tage – ergab keinen Unterschied (JAHR et al., 1998).

Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Kultur humaner Inseln bei 37°C TCM199 + 5% FCS ein wesentlich verbessertes Transplantatüberleben hinsichtlich der Transplantatfunktion im Bereich der ersten Tage nach Transplantation bewirkt. Dies deckt sich mit den bereits besprochenen Erkenntnissen (siehe oben).

Ebenfalls ähnlich dem oben besprochenen konkordant xenogenen Modell stellen sich die Ergebnisse für die 22°C Kultur dar. Nach verringerten Insulingehalten in den ersten Tagen, bleibt die Funktion stabiler erhalten. Dabei ist ebenfalls wieder für das Kulturmedium TCM199 + 5% FCS ein Vorteil vorhanden. Da innerhalb dieses Zeitraumes (nach Tag 7 nach Transplantation) der Beginn der T- Zelle vermittelten Immunantwort liegt, ist davon auszugehen, daß bei 37°C Inseln eine höhere Aktivierung der T- Zelle vorliegt als bei 22°C Inseln. Dabei scheint es allerdings von Bedeutung zu sein, in welchem Medium diese kultiviert wurden, da eine bessere Funktion für TCM199 + 5% FCS besteht. Diese Inseln scheinen eine erniedrigte Immunogenität zu besitzen.

Zusammenfassend läßt sich ein Vorteil der Kultur in TCM199 + 5% FCS gegenüber CMRL 1066 belegen. Dabei ist eine Kultur bei 37°C vorteilhafter im Hinblick auf das frühe Transplantatüberleben gemessen an der Transplantatfunktion. Bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber der darauf folgenden akuten Rejektion als T-Zelle vermittelte Reaktion ergaben sich die besten Ergebnisse für eine Kultur in TCM199 + 5% FCS bei 22°C. Sicherlich von Interesse wäre eine Kultur in TCM199 + 5% FCS bei einem Tag 37°C und einem Tag 22°C im diskordant xenogenen Modell. Wie bereits angesprochen, bietet dieses Vorgehen im allogenen Tierversuch eine Verbesserung der Transplantation (JAHR et al., 2002). Das bislang verwendete Protokoll der klinischen Inseltransplantation sieht die Verwendung von CMRL 1066 als Kulturmedium vor. Dies basiert auf Untersuchungen durch HOLMES et al., 1995. Ausgehend von den in dieser vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnissen im konkordant xenogenen und vor allem im diskordant xenogenen Modell mit humanen Inseln, erscheint es durchaus lohnenswert zu prüfen, ob die Verwendung von TCM199 + 5% FCS in der klinischen Inseltransplantation sinnvoll ist und bei positiven Ergebnissen sollte ein Austausch der Kulturmedien in Erwägung gezogen werden.

## **5. Zusammenfassung:**

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich ein Einfluß unterschiedlicher Kulturbedingungen (37°C und 22°C) und Kulturmedien (TCM199 + 5% FCS und CMRL1066) auf das frühe Transplantatüberleben humaner Inseln und Nagetierinseln – vor einer immunologischen Abstoßung – in unterschiedlichen Modellen erzielen läßt. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Streßnoxen existiert.

### **1. Vergleich von frisch isolierten und ein Tag kultivierten Inseln im allogenen, diabetischen Tiermodell der Ratte**

Es zeigte sich *in vivo* eine eindeutige Überlegenheit ( $p < 0.05$ ) der ein Tag in TCM199 + 5% FCS kultivierten Inseln, da nach Transplantation alle Tiere normoglykämisch wurden ( $n = 5$ ). Im Gegensatz dazu erlangte nur ein Tier der mit frisch isolierten Inseln transplantierten Gruppe eine Normoglykämie ( $n = 13$ ).

Dieses Resultat wurde durch *in vitro* Versuche unterstützt, die gezeigt haben, daß frisch isolierte Inseln eine eindeutig höhere Empfindlichkeit gegenüber Noxen wie Stickstoffmonoxid und Superoxid ( $p < 0.001$ ) haben, gemessen an der Kernnekroserate der Inseln.

### **2. Vergleich von 22°C gegen 37°C in TCM199 + 5% FCS kultivierten Inseln im konkordant xenogenen Tiermodell mit Transplantation von Ratteninseln in diabetische C57Bl/6J Mäuse**

Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Inselmengen (200, 100, 50) durchgeführt. Für die Transplantation von 200 Inseln zeigte sich kein eindeutiger Unterschied bezüglich dem Erreichen der Normoglykämie. 100 bei 37°C kultivierte und transplantierte Inseln senken den Blutzucker auf leicht hyperglykämische Werte bevor sie an Tag 13 abgestoßen werden. Dagegen erreichen die 22°C Inseln eine anhaltende Normoglykämie. Die Transplantation von 50 Inseln erzielte keinen normoglykämischen Effekt. In der Bestimmung des Insulingehaltes im Transplantat-tragenden Organ an Tag 3 nach Transplantation lag der Gehalt der bei 37°C kultivierten Inseln ca. 1.5 fach über dem der bei 22°C kultivierten Inseln. Dies und der bekannte höhere Stoffwechsel der 37°C Insel, können für das schnellere Absinken des Blutzuckers bei Transplantation von 37°C Inseln gegenüber 22°C Inseln als Ursache angesehen werden.

Somit erscheint auch im konkordant xenogenen Modell die Kultur in TCM199 + 5% FCS bei 37°C für einen Transplantationserfolg für den Zeitraum direkt nach

Transplantation und die Kultur bei 22°C für eine langfristige Normoglykämie sinnvoll zu sein. Dies wurde schon für das allogene Rattenmodell beschrieben (JAHR et al., 2002) und sollte auf eine Kombination beider Kulturbedingungen ausgedehnt werden.

### **3. Vergleich von 37°C bzw. 22°C in TCM199 + 5% FCS und 22°C in CMRL 1066 kultivierten Inseln im diskordant xenogenen Modell (humane Inseln in nicht diabetische C57Bl/6J Mäuse)**

Transplantiert wurden ca. 300 humane Inseln, die zuvor unter o.g. unterschiedlichen Kulturbedingungen kultiviert worden waren. An Tag 3, 7 und 14 nach Tx wurde eine intraperitoneale Glukosestimulation durchgeführt. Die höchste Stimulation zeigte sich an Tag 3 für die bei 37°C/TCM199 + 5% FCS kultivierten Inseln. (ca. 1.5 fach höher als 22°C/TCM199 + 5% FCS). Der Unterschied der beiden 22°C Kulturen ist nur gering. An Tag 7 liegen die Stimulationswerte für 37°C/TCM1999 + 5% FCS 2.5-fach höher als 22°C/CMRL1066 und 1.7-fach höher als 22°C/TCM199 + 5% FCS. An Tag 14 findet man die beste Stimulation für die 22°C/TCM199 + 5% FCS Kultur, die ca. 3-fach (37°C/TCM199 + 5% FCS) bzw. 7-fach (22°C/CMRL) höher liegt.

Für die Transplantation im diskordant-xenogenen Modell läßt sich somit zusammenfassend ein Vorteil der Kultur im Medium TCM199 + 5% FCS bei 37°C für das frühe Transplantatüberleben bis ca. Tag 7 post Tx ablesen. Im darauf folgenden Zeitraum bis Tag 14 sieht man einen Vorteil der 22°C/TCM199 + 5% FCS Kultur. Daraus kann man eine höhere Resistenz der 37°C/TCM199 + 5% Insel gegenüber inflammatorischen Noxen ableiten bezüglich des Zeitraumes bis Tag 7 post Tx.

Auf Grund dieser in vivo Ergebnisse im konkordant und diskordant xenogenen Modell und auf Grund Berichte anderer Gruppen sollte diskutiert werden, ob es lohnenswert erscheint, in weitergehenden Versuchen den aktuellen klinischen Standard der Kultur der Langerhansschen Insel vor Transplantation – die Kultur in CMRL1066 bei 22°C – durch eine Kombination mit 37°C in TCM199 + 5%FCS zu verbessern.

## 6. Literaturverzeichnis

Albina J, Mills C, Barbul A, Thirkill C, Henry W, Mastofrancesco B, Caldwell M: Arginine metabolism in wounds. *Am J Physiol* 1988; 254: 459-467

Alejandro R, Lehmann R, Ricordi C, Kenyon N, Angelico C, Burke G, Esquenazi V, Nery J, Betancourt A, Kong S, Miller J, Mintz D: Long-Term function (6 years) of islet allografts in type 1 Diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 1983-1989

Almond P, Matas A, Gillingham K, Dunn D, Payne W, Gores P, Gruessner R, Najarian J: Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplant* 1993; 55: 752-756

American Diabetes Association: Diabetes 1993 Vital Statistics. Alexandria, VA, ADA, 1993

American Diabetes Association (ADA): Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2002; 25 (Suppl. 1): S5-S20

American Diabetes Association (ADA): Diabetes mellitus and Exercise. *Diabetes Care* 2002; 25 (Suppl. 1): S64-S68

Andersson A: Tissue culture of isolated pancreatic islets. *Acta Endocrinologia* 1976; 205 (Suppl): 283-293

Andersson A: Stimulation of insulin biosynthesis in isolated mouse islets by l-Leucine, 2-aminonorbornane-2-carboxylic acid and  $\alpha$ -ketoisocaproic acid. *Acta Biochim Biophys* 1976, 437; 345-353

Andersson A: Isolated mouse pancreatic islets in culture: Effects of serum and different culture media on the insulin production of the islets. *Diabetologia* 1978; 14: 397-404

Appels B, Burkart V, Kantwerk-Funke G, Funda J, Kolb-Bachofen V, Kolb H: Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *J Immunol* 1989; 142: 3803-3808

Appleton I, Tomlinson A, Wiloughby D: Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Adv Pharmacol* 1996; 35: 27-78

Ar'Rajab A, Dawidson I, Harris E, Sentementes J: Effect of number of islets on the outcome after transplantation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm Metabol Res* 1994; 26: 355-259

Arita S, Kasraie A, Une S, Ohtsuka S, Atiya A, Shevlin L, Mullen Y: Pravastatin and low-dose cyclosporine treatment prevent islet allograft rejection in mice. *Transplant Proc* 1998; 30: 522

Asayama K, Kooy N, Burr I: Effect of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islets: decrease of islet manganosuperoxide dismutase. *J Lab Clin Med* 1986; 107: 459-464

- Atkinson M, MacLaren N: Insulinabhängiger Diabetes: Eine Autoimmunkrankheit. *Spektr Wiss* 1990; 9: 102-110
- Bach F, Robson S, Ferran C, Winkler H, Millan M, Stuhlmeier K, Vanhove B, Blakely M, van der Werf W, Hofer E, et al.: Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection. *Immunol Rev* 1994; 141: 5-30
- Bailey L, Nehlson-Canarella S: Observation on cardiac xenotransplantation. *Transplant Proc* 1986; 18: 88-91
- Ballinger W, Lacy P: Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 1972; 72: 175-186
- Banting F, Best C: The internal secretion of the pancreas. *J Lab Clin Med* 1922; 7: 251-266
- Barnes D, Sato D: Methods for growth of cultured cells in serum free medium. *Anat. Biochem* 1980; 10: 255-270
- Becker T, Noel R, Coats W, Gomez-Foix A, Alam T, Gerard R, Newgard C: Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods of Cell Biology* 1994; 43: 161-189
- Benhamou P, Mullen Y, Stein E, Watt P, Hober C, Brunicardi F: Ultraviolet-B irradiation for immunoalteration of human islets. *Transplant. Proc* 1994; 26: 750
- Bennet W, Sundberg B, Groth C, Brendel M, Brandhorst D, Brandhorst H, Bretzel R, Elgue G, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O: Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans. *Diabetes* 1999; 48: 1907-1914
- Bertuzzi F, Grohovaz F, Maffi P, Caumo A, Aldrighetti L, Nano R, Hengster P, Calori G, Di Carlo V, Bonifacio E, Secchi A: Successful transplantation of human islets in recipients bearing kidney graft. *Diabetologia* 2002; 45: 77-84
- Billingham R: The passenger cell concept in transplantation immunology. *Cell Immun* 1971; 2: 1-12
- Bilous R, Mauer S, Sutherland D, Najarian J, Goetz F, Steffes M: The effects of pancreas transplantation on the glomerular structure of renal allografts in patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 1989; 321: 80-85
- Bottazzo G, Dean B, McNally J, MacKay E, Swift P, Gamble D: In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med* 1985; 313: 353-360
- Brandhorst D, Hering B, Brandhorst H, Federlin K, Bretzel R: Influence of donor data and organ procurement on human islet isolation. *Transplant proc* 1994; 26: 592-593
- Brandhorst H, Brandhorst D, Brendel M, Hering B, Bretzel R: Assessment of intracellular insulin content during all steps of human islet isolation procedure. *Cell Transplant* 1998; 7: 489-495

Brendel M, Hering B, Schultz A, Bretzel R: International Islet Transplant Registry. Newsletter 2001, 8 (1), 1-20

Bretzel R, Schneider J, Zekorn T, Federlin K: Zytotoxizität humoraler Antikörper gegen Inselzellen nach experimenteller Inseltransplantation. *Akt Endokrinol Stoffw* 1980; 1: 166-168

Bretzel R: Inseltransplantation und Diabetes mellitus. Experimentelle Grundlagen und klinische Versuche. Habilitationsschrift 1984; Pflaum, München: 1-644

Bretzel R, Slijepevic M, Federlin K: Experimental and clinical islet transplantation. *Z Exp Chir Transplant* 1986; 19: 243-246

Bretzel R, Federlin K: Pancreas and islands of Langerhans transplantation in diabetes mellitus. *Internist* 1987; 28: 254-261

Bretzel R, Flesch B, Hering B, Brendel M, Klitscher D, Brandhorst H, Schelz J, Münch K, Federlin K: Impact of culture and cryopreservation on MHC class II antigen expression in canine and porcine islets. *Horm Metab Res* 1990; 25(Supp 1): 128-132

Bretzel R, Hering B, Strödter D, Zekorn T, Federlin F: Experimental islet transplantation in small animals. In: *Pancreas Islet Cell Transplantation*. Ricordi (ed.) RG Landes, Austin, Georgetown 1992: 249-260

Bretzel R, Hering B, Federlin K: Islet transplantat registry report 1991. *Diab Nutr Metabol* 1992a; 5 (Suppl. 1): 177-181

Bretzel R, Alejandro R, Hering B, Van Suylichem P, Ricordi C: Clinical islet transplantation: Guidelines for islet quality control. *Transplant Proc* 1994; 26: 388-392

Bretzel R: Islet cell and pancreas transplantation in diabetes: status 1996. *Ther Umsch* 1996; 53: 889-901

Bretzel R: Pancreatic transplantation (islet cell). In: *A Companion to specialist surgical practice-transplantation surgery*. Forsythe JLR, (ed.); New York, WB Saunders 1997: 203-228

Bretzel R, Hering B, Federlin K: Transplantation of the pancreas and pancreatic islets. In: *Textbook of Diabetes*. Pickup, J., Williams, G. (eds.), 2nd edition, Blackwell Science, Oxford, 1997; chapter 86: 1-19

Bretzel R, Brandhorst D, Brandhorst H, Eckhard M, Ernst W, Friemann S, Rau W, Weimar B, Rauber K, Hering B, Brendel M: Improved survival of intraportal pancreatic islet cell allografts in patients with type-1 diabetes mellitus by refined peritransplant management. *J Mol Med* 1999; 77: 140-143

Bromme H, Hahn H, Blech W: Biphasic release of insulin from islets of Langerhans after their transplantation into the liver of rats. *Horm Metabol Res* 1988; 20: 138-140

Brunstedt J, Nielsen J: Long term effect of pH on  $\beta$ -cell function in isolated islets of Langerhans in tissue culture. *Diabetologia* 1978; 15: 181-185

- Burkhart V, Koike T, Brenner H, Kolb H: Oxygen radicals generated by the enzyme xanthine oxidase lyse rat pancreatic islet cells in vitro. *Diabetologia* 1992; 35: 1028-1034
- Calne RY: Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant proc* 1970; 2: 550-553
- Carlsson P, Liss P, Anderson A, Jansson L: Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. *Diabetes* 1998; 47: 1027-1032
- Carroll P, Rilo H, Alejandro R, Zeng Y, Khan R, Fontes P, Tzakis A, Carr B, Ricordi C: Long-Term (>3 year) insulin independence in a patient with pancreas islet transplantation following upper abdominal exenteration and liver replacement for fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Transplant* 1995; 59: 875-879
- Castelli W, Anderson K, Wilson PW, Levy D: Lipids and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Epidemiol* 1992; 2: 23-28
- Charles M, Suzuki M, Waldeck M, Dodson N, Slater L, Ong K, Kershenar A, Buckingham B, Golden M: Immune islet killing mechanisms associated with insulin dependent diabetes: in vitro expression of cellular and antibody mediated islet cell cytotoxicity in humans. *J Immunol* 1983; 120: 1189-1194
- Child C, Frey C, Fry W: A reprisal of removal of ninety-five percent of the distal portion of the pancreas. *Surg Gynecol Obstet* 1969; 129: 49-56
- Chitilian H, Laufer T, Stenge K, Shea S, Auchincloss H: The length of cell-mediated xenograft rejection in the mouse is due to the CD4+ indirect response. *Xenotransplantation* 1998; 5: 93
- Comens P, Wolf B, Unanue E, Lacy P, McDaniel M: Interleukin-1 is a potent modulator of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 1987; 36: 963-970
- Conrad B, Weissmahr R, Boni J, Arcari R, Schupbach J, Mach B: A human endogenous retroviral super antigen as candidate autoimmune gene in type 1 diabetes. *Cell* 1997; 90(2): 303-313
- Corbett J, Lancaster Jr J, Sweetland M, McDaniel M: Interleukin-1 $\beta$  induced formation of EPR-detectable iron-nitrosyl complexes in islet of Langerhans. *J Biol Chem* 1991; 266: 21351-21354
- Cunningham J, Green I: Cytokines, nitric oxide and insulin secreting cells. *Growth Regul* 1994; 4: 173-180
- Davalli A, Ricordi C, Socci C, Braghi S, Bertuzzi F, Fattor B, Di Carlo V, Pontiroli A, Pozza G: Abnormal sensitivity to glucose of human islets cultured in a high glucose medium: partial reversibility after an additional culture in a normal glucose medium. *Journal of Clin Endocrinol & Metabol* 1991; 72: 202-208

Davalli A, Scaglia L, Zangen D, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir G: Vulnerability of islets in the immediate post transplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 1996; 45: 1151-1167

Deng S, Ketchum R, Kucher T, Weber M, Shaked A, Naji A, Brayman K: Adenoviral transfection of canine islet xenografts with immunosuppressive cytokine genes abrogates primary nonfunction and prolongs graft survival. *Proc. Transplant Proc* 1997; 29(1-2): 770

Diabetes Control and Complication Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986

Diabetes Epidemiology Research International Study group: Preventing insulin dependent diabetes mellitus: the environmental challenge. *Diabetes Epidemiology Research International. Br Med J* 1987; 295: 479-481

Drash A, Rudert W, Borguaye S, Wang R, Lieberman I: Effect of probucol on development of diabetes mellitus in BB rats. *Am J Cardiol* 1988; 62: 27B-30B

Eckhardt T, Jahr H, Federlin K, Bretzel R: Endotoxin impairs the engraftment of rat islets transplanted beneath the kidney capsule of C57bl/6 mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104: A51

Eckhardt T: Tierexperimentelle Untersuchungen zum Engraftment transplantierte Langerhans'scher Inseln. Inaugural-Dissertation eingereicht, 2001

Efrat S, Fejer G, Brownlee M, Horwitz M: Prolonged survival of pancreatic islet allografts mediated by adenovirus immunoregulatory transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 6947-6951

Eizirik D, Strandell E, Sandler S: Prolonged exposure of pancreatic islets isolated from 'pre-diabetic' non-obese diabetic mice to a high glucose concentration does not impair beta-cell function. *Diabetologia* 1991; 34: 6-11

Eizirik D, Sandler S, Welsh N, Cetkovic-Cvrlje M, Nieman A, Geller D, Pipeleers D, Bendtzen K, Hellerström C: Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *J Clin Invest* 1994; 93: 1968-1974

El-Ouaghli A, Jahr H, Pfeiffer G, Bretzel R: Local cytokine mRNA expression after allogeneic islet transplantation is influenced by pre-transplant islet culture. *Diabetologia* 1998; 41 (Suppl 1): A164

Falqui L, Finke E, Carel J, Scharp D, Lacy P: Marked prolongation of human islet xenograft survival (human to mouse) by low-temperature culture and temporary immunosuppression with human and mouse anti-lymphocyte sera. *Transplant* 1991; 51: 1322-1324

Farrell A, Blake D: Nitric oxide. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 7-20

Faustman D, Hauptfeld V, Davie J, Lacy P, Shreffler D: Murine pancreatic  $\beta$ -cells express H-2K and H-2D, but not Ia antigens. *J Natl Acad Sci USA* 1980; 78: 5153-5168

- Faustman D, Hauptfeld V, Lacy P: Prolongation of murine islet allograft survival by pretreatment of islets with antibody directed to Ia determinants. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 1981; 78: 5156-5159
- Faustmann D, Coe C: Prevention of xenograft rejection by masking donor HLA class I antigens. *Science* 1991; 252: 1700-1702
- Federlin K, Becker F: Specific therapeutic attempts in experimental and clinical type I diabetes. *Klin Wochenschr* 1990; 68 (Suppl XXI): 38-44
- Federlin K, Bretzel R: The effect of islet transplantation on complications in experimental diabetes of the rat. *World J Surg* 1984; 8(2): 169-178
- Fioretto P, Mauer S, Bilous R, Goetz F, Sutherland D, Steffes M: Effects of pancreas transplantation on glomerular structure in insulin-dependent diabetic patients with their own kidneys. *Lancet* 1993; 342: 1193-1196
- Foulis A, Liddle C, Farquharson M, Richman J, Weir R: The histopathology of the pancreas in type 1 (insulindependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 1986, 29: 267-274
- Frey C, Ho H: Distal pancreatectomy in chronic pancreatitis. In: *Surgery of the Pancreas*, Trede M, Carter D (eds.), London: Churchill and Livingstone; 1997: 347-357
- Frey C, Child III C, Fry W: Pancreatectomy for chronic pancreatitis. *Ann Surg* 1976; 184: 403-414
- Galli U: Interaction of the natural anti-Gal antibody with  $\alpha$ -galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today* 1993; 14: 480-482
- Gaya S, Rees A, Lechler R, Williams G, Mason P: Malignant disease in patients with long-term renal transplants. *Transplant* 1995; 59: 1705-1709
- Gores P, Najarian J, Stephanian E, Loveras J, Kelley S, Sutherland D: Insulin independence in type 1 diabetes after transplantation of unpurified islets from single donor with 15-Deoxyspergualin. *Lancet* 1993; 341: 19-21
- Gotoh M, Maki T, Kiyozumi T, Stomi S, Monaco A: An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplant* 1985; 40: 437-438
- Gotoh M, Maki T, Porter J, Monaco A: Augmented survival of purified islet xeno- and allografts with reduced numbers. *Transplant Proc* 1987; 19: 984
- Gotoh M, Ohzato H, Dono K, Kawai M, Yamamoto H, Kanai T, Monden M, Mori T: Successful islet isolation from preserved rat pancreas following pancreatic ductal collagenase at the time of harvesting. *Horm Metabol Res*, 1990, Suppl, 25: 1-4
- Gotoh M, Ohzato H, Maki T, Porter J, Monaco A: Crucial role of pancreatic ductal collagenase injection for isolation of pancreatic islets. *Horm Metabol Res*, 1990b; Suppl 25: 10-16

- Grankvist K, Marklund S, Täljedal I: Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islets in vitro. *Biochem J* 1981a; 182: 17-25
- Grankvist K, Marklund S, Täljedal I: Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes. *Nature* 1981; 294: 158-160
- Gray D, Sutton R, McShane P, Peters M, Morris P: Exocrine contamination impairs implantation of pancreatic islet transplantation beneath the kidney capsule. *J Surg Res* 1988; 45: 432-442
- Griffith R, Scharp D, Hartmann B, Ballinger W, Lacy P: A morphologic study of intrahepatic portal-vein islet isografts. *Diabetes* 1977; 26: 201-214
- Groth C, Korsgren O, Tibell A, Tollemar J, Möller E, Bolinder J, Östman J, Reinholt F, Hellerström C, Andersson A: Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 1994; 344: 1402-1404
- Gruessner R, Kendall D, Drangstveit M, Gruessner A, Sutherland D: Simultaneous pancreas-kidney Transplantation from live donors. *Ann Surg* 1997; 226: 471-482
- Guo Z, Chong A, Shen J, Foster P, Sankary H, McChesney L, Mital D, Jensik S, Williams J: Prolongation of rat islet allograft survival by the immunosuppressive agent leflunomide. *Transplant* 1997; 63: 711-716
- Häyry P: Chronic rejection: An Update on the Mechanism. *Transplant Proc* 1998; 30: 3993-3995
- Haffner S, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M: Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998, 339; 229-234
- Halloran P, Cockfield S, Madrenas J: The mediators of inflammation (Interleukin 1, Interferon- $\gamma$ , and Tumor necrosis factor) and their relevance to rejection. *Transplant Proc* 1989; 21: 26-30
- Halloran P, Hornik J, Goes N, Lui S, Urmson J, Ramassar V, Cockfield S: The „injury response“: A concept linking nonspecific injury, acute rejection and long term transplant outcomes. *Transplant Proc* 1997; 29: 79-81
- Hara Y, Taniguchi H: Intrathecal allotransplantation of rat pancreatic islet by lumbar puncture. *Cell Transplant* 1994; 3: 23-25
- Hardt D: Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-3287
- Hardy M, Lau H, Weber C, Reemtsma K: Induction of graft acceptance by UV irradiation of donor tissue. *Ann Surg* 1984; 200: 441-448

Hasslacher C, Ritz E, Wahl P, Michael C: Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 1989; 4(10): 859-863

Hauner H, von Ferber L, Köster I: Prävalenz und ambulante Versorgung insulinbehandelter Diabetiker im Alter unter 40 Jahren. Eine Analyse von Krankenkassendaten der AOK Dortmund. *Diab Stoffw* 1996; 5: 101-106

Hauner H, von Ferber L, Köster I: Schätzung der Diabeteshäufigkeit für die Bundesrepublik Deutschland anhand von Krankenkassendaten. *Dtsch Med Wochenschr* 1992; 117: 645-650

Heiser A, Ullrichs K, Müller-Ruchholtz W: Prophylactic trypsin inhibition during the isolation procedure guarantees reducible high porcine islet yield. *Xenotransplantation* 1994; 1: 66-68

Heneine W, Heneine W, Tibell A, Switzer W, Sandstrom P, Rosales G, Mathews A, Korsgren O, Chapman L, Folks T, Groth C: No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 1998; 352: 695-699

Hering B, Muench K, Schelz J, Amelang D, Heitfeld M, Bretzel R, Bonath K, Federlin K: The evaluation of neutral density separation Ficoll-sodium diatrizoate and Nycodenz and centrifugal elutriation in the purification of bovine and canine islet preparations. *Horm Metabol Res* 1990; 25 Suppl: 57-63

Hering B: Islet Xenotransplantation. In: *Pancreatic islet cell transplantation : 1892-1992, one century of transplantation for diabetes*, Ricordi C (ed.), Austin, Tx: Landes; 1992: 313-335

Hering B, Bretzel R, Hopt U, Brandhorst H, Brandhorst D, Bollen C, Raptis G, Helf F, Grossmann R, Mellert J, et al.: New protocol toward prevention of early human islet allograft failure. *Transplant Proc* 1994; 26: 570-571

Hiller W, Klempnauer J, Lück R, Steiniger B: Progressive deterioration of endocrine function after intraportal but not kidney sub capsular rat islet transplantation. *Diabetes* 1991; 40: 134-140

Holmes M, Clayton H, Chadwick D, Bell P, London N, James R: Functional studies of rat, porcine and human pancreatic islets cultured in ten commercially available media. *Transplant* 1995; 60: 854-860

Horaguchi A, Merrell R: Preparation of viable islet cells from dogs by a new method. *Diabetes* 1981; 30: 455-458

In't Veld P, Pipeleers D: Appearance of non-endocrine cells with surface MHC class II antigens and cytoplasmic insulin immunoreactivity. *J Clin Invest* 1988; 82: 1123-1128

Inverardi L, Ricordi C: Tolerance and pancreatic islet transplantation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 200; 356: 759-765

International Pancreas Transplant Register (IPTR): 2001 Midyear update, 2001

Jacobson M, Raff M: Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 1995; 274: 814-816

Jahr H, Nicolae M, Braun K, Ketchum R, Koeberlein B, Barker C, Brayman K: Islet xenografts in mice and rats: II. Mixed islet-spleen cell assay to analyze nitric oxide production and inhibition in xenogeneic species combinations. *Transplant Proc* 1994; 26: 775

Jahr H, Bretzel R, Wacker T, Weinand S, Brandhorst H, Brandhorst D, Lau D, Hering B, Federlin K: Toxic effects of superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide on human and pig islets. *Transplant Proc* 1995a; 27: 3220-3221

Jahr H, Hering B, Brandhorst H, Brandhorst D, Bretzel R, Federlin K. Isolated human pancreatic islets in vitro activate human complement. *Transplant Proc* 1995b; 27: 3270

Jahr H, Brandhorst D, Brandhorst H, Brendel M, Bretzel R: Tissue culture at 37°C enhances the resistance of isolated human islets to radical-mediated toxic damage. *Acta Diabetologia* 1998; 35: 239

Jahr H, Brandhorst D, Brandhorst H, Brendel M, Eckhardt T, El-Ouaghli A, Hußmann B, Lau D, Nahidi F, Wacker T, Zwolinski A, Bretzel RG: Abstoßungsreaktionen bei der tierexperimentellen xenogenen Transplantation von isolierten Langerhans'schen Inseln des Schweins. *Zentralblatt Chirurgie* 1998a; 123: 823-829

Jahr H, Pfeiffer G, Hering B, Federlin K, Bretzel R: Endotoxin mediated activation of cytokine production in human PBMC's by collagenase and Ficoll. *J Mol Med* 1999, 77; 118-120

Jahr H, Hußmann B, Eckhardt T, Bretzel R: Successful single donor islet allotransplantation in the streptozotocin diabetes rat model. *Cell Transplantation* 2002; 11: 513-518

Jäger C, Wöhrle M, Bretzel R, Federlin K: Effect of transplantation site and culture pretreatment on islet xenograft survival (rat to mouse) in experimental diabetes without immunosuppression of the host. *Acta Diabetologia* 1994; 31: 193-197

Jäger C, Brendel M, Hering B, Eckhard M, Bretzel R: Progressive isle graft failure occurs significantly earlier in auto antibody-positive than in autoantibody negative IDDM recipients of intrahepatic grafts. *Diabetes* 1997; 46: 1907-1910

James R, Lake S, Chamberlain J, Thirdborough S, Mistry N, Bassett P, Bell, P: Long-term survival of rat islet allografts after pretreatment with low-dose gamma irradiation. *Transplant Proc* 1989; 21: 2725-2726

Janson L, Korsgren O, Sandler S, Andersson A: Influence of persistent hyperglykemia on transplanted pancreatic islets. *Horm Metabol Res* 1990; 25 (Suppl): 137-142

Jarasch E, Grund C, Bruder G, Heid H, Kern T, Franke W: Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* 1981; 25: 67-82

- Jarasch E, Bruder G, Heid H: Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Phys Scand* 1986 (Suppl); 548: 39-46
- Jenner M, Bradish G, Stiller C, Atkinson P: Cyclosporine A treatment of young children with newly diagnosed type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. London diabetes study group. *Diabetologia* 1992; 35: 884-888
- Jones B, Gill G: Insulin-dependent diabetes mellitus: an overview. In: *Textbook of Diabetes*, Pickup, J, Williams, G (eds.), 2nd edition, Blackwell Science, Oxford, 1997; chapter 12: 1-13
- Kandaswamy R, Hering B, Sutherland D: Critical islet mass in islet autotransplantation after pancreas resection. *Transplant* 2000; 69: 268
- Karjalainen J, Martin J, Knip M, Ilonen J, Robinson B, Savilahti E, Akerblom H, Dosch H: A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1992; 327: 302-307
- Kauffman D, Platt J, Rabe F, Dunn, D, Bach F, Sutherland D: Differential roles of MAC-1<sup>+</sup> cells and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in primary nonfunction and classic rejection of islet allografts. *J Exp Med* 1990; 172: 291-302
- Kawai M, Gotoh M, Monden M, Yamamoto H, Ichikawa T, Valdivia L, Mori T: Effect of L3T4 and Lyt-2 monoclonal antibodies on islet xenograft (rat to mouse) rejection. *Transplant Proc* 1989; 21: 2709-2710
- Kelly W, Lillehei R, Merkel F, Idezuki Y, Goetz F: Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 1967; 61: 827-837
- Kiebert G, van Oosterhout E, Lemkes H, van Bronswijk H, Gooszen H: Quality of life after combined renal-pancreatic transplantation. *Transplant Proc* 1994; 26: 517
- Kemp C, Knight M, Scharp D, Ballinger W, Lacy P: Effect of transplantation site on the result of pancreatic islet isograft in diabetic rats. *Diabetol* 1973; 9: 486-491
- Kemp C, Knight M, Scharp D, Lacy P, Ballinger W: Transplantation of isolated pancreatic islets into the portal vein of diabetes rats. *Nature* 1973; 244: 329-338
- Kendall D, Sutherland D, Narjarian J, Goetz F, Robertson R: Effects of hemipancreatectomy on insulin secretion and glucose tolerance in healthy humans. *N Engl J Med* 1990; 322: 898-903
- Ketchum R, Nicolae M, Jahr H, Friedman A, Naji A, Barker C, Brayman, K: Analysis of donor age and cold ischemia as factors in cadaveric human islet isolation. *Transplant Proc* 1994; 26: 596-597
- Kiebert G, Van Oosterhout E, Van Bronswijk H, Lemkes H, Gooszen H: Quality of life after combined kidney-pancreas or kidney transplantation in diabetic patients with end-stage renal disease. *Clin Transplant* 1994; 8: 239-245

- Kleemann R, Rothe H, Kolb-Bachofen V, Xie Q, Nathan C, Martin S, Kolb H: Transcription and translation of inducible nitric oxide synthase in the pancreas of prediabetic rats. *FEBS Lett* 1993; 328: 9-12
- Klein H, Häring H: Pathogenese des Diabetes mellitus Typ II. *Internist* 1990; 31: 168-179
- Kneteman N, Halloran P, Sanden W, Wang T, Seelis R: Major histocompatibility complex antigens and murine islet allograft survival. *Transplant* 1991; 51: 247-251
- Knowles RG, Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 268: 249-58
- Koch M, Thomas B, Tschöpe W, Ritz E: Diabetes mellitus accounts for an ever-increasing proportion of the patients admitted for renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* 1989; 3: 399
- Koch M, Thomas B, Tschöpe W, Ritz E: Survival predictors of death in dialysed diabetic patients. *Diabetologia* 36; 1993: 1113-1117
- Koene R, Waal R, Bogman J: Variable expression of major histocompatibility antigens: role in transplantation immunology. *Diabetologia* 1986; 30: 1-8
- Kolb H, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunology today* 1992; 13: 157-160
- Kolb H, Kolb-Bachofen V, Roep BO: Autoimmune versus inflammatory type 1 diabetes: a controversy? *Immunol today* 1995; 16: 170-172
- Koncz L, Zimmerman C, DeLellis R, Davidoff F: Transplantation of pancreatic islets into the spleen of diabetes rats and subsequent splenectomy. *Transplant* 1976; 21: 427-429
- Kroencke K, Kolb-Bachofen V, Berschick B, Burkart V, Kolb H: Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 752-8
- Kroencke K, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1997; 1: 107-20
- Kuroda Y, Morita A, Fujino Y, Tanioka Y, Ku Y, Saitoh Y: Successful extended preservation of ischemically damaged pancreas by the two layer (University of Wisconsin/perfluorchemical) cold storage method. *Transplant* 1993; 56: 1087-1090
- Kuusisto J, Mykkänen L, Pyörälä K, Laakso M: NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes* 1994; 43: 960-967
- Kwon N, Stuehr D, Nathan C: Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 1991; 174: 761-7
- Lacy P, Kostianovsky M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35-39

- Lacy P, Davie J, Finke E: Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24°C) and a single injection of ALS. *Science* 1979; 204: 312-313
- Lacy P, Finke E, Janney C, Davie J: Prolongation of islet xenograft survival by in vitro culture of rat megaislets in 95% O<sub>2</sub>. *Transplant* 1982; 33: 588-592
- Lacy P, Lacy E, Finke E, Yasunami Y: An improved method for the isolation of islets from the beef pancreas. *Diabetes* 1982a; 31 (Suppl 4): 109-111
- Lacy P, Ricordi C, Finke E: Effect of transplantation site and L3T4 treatment on survival of rat, hamster and rabbit islet xenografts in mice. *Transplant* 1989; 47: 761-766
- Lacy P, Finke E, Dye E: Effect of minimal number of donor rat islets on xenograft survival in mice. *Transplant* 1990; 50: 715-717
- Lafferty K, Prowse SJ: Theory and practice of immunoregulation by tissue treatment prior transplantation. *World J Surg* 1984; 8: 187-197
- Lafferty K: Islet cell transplantation as a therapy for type I diabetes mellitus. *Diab. Nutr. Metabolism* 1989; 2: 323-332
- Lake S, Bassett P, Larkins A, Revell J, Walczak K, Chamberlain J et al: Large-scale purification of human islets utilizing discontinuous albumin gradient on IBM 2991 cell separator. *Diabetes* 1989; 38: 143-145
- Lakey J, Rajotte R, Warnock G, Kneteman N: Cold ischemic tolerance of human pancreas: assessment of islet recovery and function. *Transplant Proc* 1994; 26: 3416
- Lakey J, Rajotte R, Warnock G, Kneteman N: Human pancreas preservation prior to islet isolation – cold ischemic tolerance. *Transplant* 1995; 59: 689-694
- Lakey J, Warnock G, Rajotte R, Suarez-Almazor M, Ao Z, Shapiro A et al: Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplant* 1996; 61: 1047-1053
- Lakey J, Warnock G, Shapiro A, Korbitt G, Ao Z, Kneteman N, Rajotte R: Intraductal collagenase delivery into the human pancreas using syringe loading or controlled perfusion. *Cell Transplant* 1999; 8: 285-292
- Lampeter E, Bierwolf B, Krug J, Verlohren H, Lohmann D, Cossel L: Electronmicroscopical investigations on lymphocyte cytotoxicity against  $\beta$ -cells in recent onset IDDM. *Diabetes Research* 1987; 6: 159-167
- LaPorte R, Tajima N, Akerblom H, Berlin N, Brosseau J, Christy M, Drash A, Fishbein H, Green A, Hamman R, et al: Geographic differences in the risk of insulin-dependent diabetes mellitus: the importance of registries. *Diabetes Care* 1985; 8 (Suppl 1); 101-107
- Laube H: Therapie des Typ 2-Diabetes mellitus. In: *Diabetes mellitus-Prävention und Therapie diabetischer Folgeerkrankungen*. Bretzel RG (ed.), 1. Auflage, Bremen; UNI-MED 2000: 182-198

- Leiter E: Murine macrophages and pancreatic beta cells. Chemotactic properties of insulin and beta-cytostatic action of interleukin-1. *J Exp Med* 1987; 166: 1174-1179
- Levisetti M, Levisetti M, Padrid P, Szot G, Mittal N, Meehan S, Wardrip C, Gray G, Bruce D, Thistlethwaite J Jr, Bluestone J: Immunosuppressive effects of human CTLA4-Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation model. *J Immunol* 1997; 159: 5187-5191
- Lim F, Sun A: Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210: 908-910
- Lippert J, Ritz E, Schwarzbeck A, Schneider P: The rising tide of end stage renal failure from diabetic nephropathy type 2 – an epidemiological analysis. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 462-467
- London N, Farmery S, Will E, Davison A, Lodge J: Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet* 1995; 346: 403-406
- Lukic M, Stosic-Grujicic S, Ostojic N, Chan W, Liew F: Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozotocin in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 913-920
- Luzi L, Hering B, Socci C, Raptis G, Battezzati A, Teruzzi I et al: Metabolic effects of successful intraportal islet transplantation in insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996; 97: 2611-2618
- Luzi L, Perseghin G, Brendel M, Teruzzi I, Battezzati A, Eckhard M, et al.: Metabolic effects of restoring partial beta-cell function after islet allotransplantation in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 2001; 50: 277-282
- Malaisse W, Malaisse-Lagae F: Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites. *J Lab Clin Med* 1968; 72: 438-448
- Mandel T, Koulmanda M: The survival of xeno- allo- and isografts in NOD mice, and xenografts in other strains, after immunosuppression with anti CD4 monoclonal antibody. *Diab Nutr Metab* 1992; 5 (Suppl 1): 1992
- Mandel T, Koulmanda M, Cozzi W, Waterworth P, Tolan M, Langford G, White D: Transplantation of normal and DAF-transgenic fetal pig pancreas into cytomolgus monkeys. *Transplant Proc* 1997; 29: 940
- Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Dinarello C, Svenson M, Nielsen J: Affinity-purified human interleukin-1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. *Diabetologia* 1986; 29: 63-67
- Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Wogensen L, Molvig J, Pociot F, Johannesen, Nerup J: Cytokines and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. *Cur Top Microbiol Immunol* 1990; 164: 169-193

- Manske C, Wang Y, Thomas W: Mortality of cadaveric kidney transplantation versus combined kidney-pancreas transplantation in diabetic patients. *Lancet* 1995; 346: 1658-1662
- Markmann J, Wöhrle M, Roza A, Barker C, Naji A: Islet transplantation to study autoimmune pathogenesis of diabetes in BB rat. *Horm Metabol Res* 1990a; 25 (Suppl): 116-119
- Markmann J, Tomaszewski J, Posselt A, Levy M, Wöhrle M, Barker C, Naji A: The effect of islet cell culture in vitro at 24 °C on graft survival and MHC antigen expression. *Transplant* 1990; 49: 272-277
- Marshak S, Leibowitz G, Bertuzzi F, Socci C, Kaiser N, Gross DJ et al.: Impaired  $\beta$ - cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 1999; 48: 1230
- McAllister V, Gao Z, Peltekian K, Domingues J, Mahalati K, MacDonald A: Sirolimus-Tacrolimus combination immunosuppression. *Lancet* 2000; 355: 376-377
- Mellgren A, Schnell Landstrom A, Petersson B, Anderson A: The renal subcapsular site offers better growth conditions for transplanted mouse pancreatic islet cells than the liver or the spleen. *Diabetologia* 1986; 29: 670-672
- Mendola J, Fernandez-Alvarez J, Saenz A, Benarroch G, Fernandez-Cruz L, Gomis R: Effect of hyperglycemia and of one week culture of islets on the revascularization of pancreatic islet isografts. *Transplant Proc* 1994; 26: 689-691
- Menger M, Wolf B, Jager S, Walter P, Messmer K: The influence of prednisolone on revascularization of pancreatic islet grafts. *Transplant Proc* 1990; 22: 2042-2043
- Menger M, Vaikoczy P, Leiderer Jager S, Messmer K: Influence of experimental hyperglycemia on micro vascular blood perfusion of pancreatic islet isografts. *J Clin Invest* 1992; 90: 1361-1369
- Mering J, Minkowski O: Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1890; 26: 371-374
- Meyer C, Hering B, Grossmann R, Brandhorst H, Brandhorst D, Gerich J et al: Improved glucose counter regulation and autonomic symptoms after intraportal islet transplantation alone in patients in longstanding type 1 diabetes mellitus. *Transplant* 1998; 66: 233-240
- Meyer C, Grossmann R, Mitrakou A, Mahler R, Veneman T, Gerich J, Bretzel R: Effects of autonomic neuropathy on counter regulation and awareness of hypoglycemia in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 1998b; 21: 1960-1966
- Moncada S, Palmer R, Higgs E: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142
- Morel P, Brayman K, Goetz F, Kendall D, Moudry-Munns K, Chau C, Balakumar M, Stevens B, Dunn D, Sutherland D: Long-term metabolic function of pancreas transplants and influence of rejection episodes. *Transplant* 1991; 51: 990-1000

- Morris R: Rapamycin: antifungal, antitumor, antiproliferative and immunosuppressive macrolides. *Transplant Rev* 1992; 6: 39-87
- Morgan J, Morton H, Parker R: Nutrition of animal cells in tissue culture: Initial studies on a synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950; 73: 1- 8
- Moskalewski S: Isolation and culture of the islet of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endocrinol* 1965; 5: 324-353
- Nationale Versorgungsleitlinie: Diabetes mellitus Typ 2. Bundesärztekammer, AkdÄ, DDG; FDS, DGIM, AWMF 2002; 1. Auflage: 1-23
- Noda N, Ina K, Yasunami Y, Ryu S, Ono J, Takaki R: Reinnervation of intraportal islet allografts in rats. *Transplant* 1993; 55: 664-665
- Nomikos I, Prowse S, Carotenuto P, Lafferty K: Combined treatment with nicotinamide and desferrioxamine prevents islet allograft destruction in NOD mice. *Diabetes* 1986; 35: 1302-1304
- Oberman A, Wassertheil-Smoller S, Langford H, Blafox M, Davis B, Blaszkowski T, Zimbaldi N, Hawkins C: Pharmacologic and nutritional treatment of mild hypertension: changes in cardiovascular risk status. *Ann Intern Med* 1990; 112: 89-95
- Ohashi P, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi C, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel R, Hengartner H: Ablation of „tolerance“ and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991; 65: 305-317
- OKT4A – Study: Cooperative Clinical Trials in Transplantation Research group: Murine OKT4A immunosuppression in cadaver donor renal allograft recipients: a cooperative clinical trials in transplantation pilot study. *Transplant* 1997; 63: 1243-1251
- Parker R, Castor L, McCulloch E: Altered cell strains in continuous culture: a general survey. *N Y Acad Sci* 1957; 5: 303-313
- Parker W, Yu P, Holzkecht Z, Lundberg K, Buckley R, Platt J. Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies. *J Immunol* 1994; 153: 3791-3803
- Paul J: Cell and tissue culture. Edinburgh: Churchill, Livingstone 1973
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss R: Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 1997; 3: 282-286
- Payami H, Joe S, Thomson G: Autoimmune thyroid disease in type 1 diabetic families. *Gent Epidomol* 1989; 6: 137-141
- Pehuet-Figoni M, Ballot E, Bach J, Chatenoud L: Aberrant function and long-term survival of mouse  $\beta$ - cells exposed in vitro to high glucose concentrations. *Cell Transplant* 1994; 3: 445-451

Pirsch J, Andrews C, Hricik D, Josephson M, Leichtman A, Lu C, Melton L, Rao V, Riggio R, Stratta R, Weir M: Pancreas transplantation for diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 444-450

Perschel W, Langefeld T, Federlin K: Susceptibility to infections in diabetes – effects on metabolism. *Immun Infekt* 1995; 23: 196-200

Platz K, Sollinger H, Hullett D, Eckhoff D, Eugui E, Allison A: RS-61443 – a new, potent immunosuppressive agent. *Transplant* 1991; 51: 27-31

Pratschke J, Wilhelm M, Kusaka M, Basker M, Cooper D, Hancock W et al.: Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplant* 1999; 67: 343-348

Pyzdrowski K, Kendall D, Halter J, Nakhleh R, Sutherland D, Robertson R: Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts. *N Engl J Med* 1992; 327: 220-226

Rabinovitch A, Sumoske W, Rajotte R, Warnock G: Cytotoxic effects of cytokines on human pancreatic islet cells in monolayer culture. *J Clin Endocrinol Metabol* 1990; 71: 152-156

Rabinovitch A, Auarez W, Thomas P, Strynad K, Simpson L: Cytotoxic effects of cytokines on rat islets: evidence for involvement of free radicals and lipid peroxidation. *Diabetologia* 1992; 35: 409-413

Ramirez C, Stephens C: Effect of maintenance glucose concentration and length of culture on the glucose-induced insulin response of isolated rat islets. *Horm Metab Res* 1992; 24: 197-199

Reece-Smith H, Du Toit D, McShane P, Morris P: Prolonged survival of pancreatic islet allografts transplanted beneath the renal capsule. *Transplant* 1981; 31: 305-306

Ricordi C, Finke E, Lacy P: A method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. *Diabetes* 1986; 35: 649-653

Ricordi P, Lacy P, Sterbenz K, Davie J: Low temperature culture of human islets or in vivo treatment with L3T4 antibody produces a marked prolongation of islet human to mouse xenograft survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 8080-8084

Ricordi C, Kraus C, Lacy P: Effect of low-temperature culture on the survival of intratesticular rat islet allografts. *Transplant* 1988; 45: 234-236

Ricordi C, Lakey P, Finke E, Olack B, Scharp D: Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988; 37: 413-420

Ricordi C, Gray D, Hering B, Kaufman D, Warnock G, Kneteman N, Lake S, London N, Soggi C, Alejandro R, et al.: Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat* 1990; 27: 185-195

- Ricordi C, Tzakis A, Carrol P, Zeng Y, Rilo H, Alejandro R, Shapiro A, Fung J, Demetris A, Mintz D, et al.: Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplant* 1992; 53: 407-414
- Ricordi C: The automated method for islet isolation. In: *Pancreatic islet cell transplantation. 1892-1992. One century of transplantation for diabetes*, Ricordi (ed.) 1992a, Austin, RG; Landes: 99-111
- Ricordi C, Digion B III., Mintz D, Alejandro R: Human islet separation. In: *Pancreatic islet Transplantation Vol I: Procurement of pancreatic islets*, Lanz RP and Chick WL (eds.) 1994; RG Landes: 97-105
- Robertson G, Chadwick D, Contractor H, Rose S, Chamberlain R, Clayton H, Bell P, James R, London N: Storage of human pancreatic digest in University of Wisconsin solution significantly improves subsequent islet purification. *Br J Surg* 1992; 79: 899-902
- Robertson G, Chadwick D, Contractor H, James R, Bell P, London N: The use of continuous density gradients for the assessment of islet and exocrine tissue densities and islet purification. *Acta diabetologia* 1993; 30: 175-180
- Rock K, Clark K: Analysis of the role of MHC class I presentation in the stimulation of cytotoxic T- lymphocytes by antigens targeted into the exogenous antigen-MHC class I presentation pathway. *J Immunol* 1996; 156: 3721-3726
- Rotter J, Anderson C, Rubin R, Congleton J, Terasaki P, Rimoin D: HLA genotypic study of insulin-dependent diabetes the excess of DR3/DR4 heterozygotes allows rejection of the recessive hypothesis. *Diabetes* 1983; 32: 169-174
- Ryan E, Lakey J, Rajotte R, Korbitt G, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott J, Bigam D, Kneteman N, Warnock G, Larsen I, Shapiro A: Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton Protocol. *Diabetes* 2001; 20: 710-719
- Ryan E, Lakey J, Paty B, Imes S, Korbitt G, Kneteman N, Bigam D, Rajotte R, Shapiro A: Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 2002; 51(7): 2148-2157
- Rudas B: Streptozotozin. *Arzneimittelforschung* 1972; 22: 830-861
- Sachs D: The pig as a xenograft donor. *Pathol Biol (Paris)* 1994; 42: 217-219
- Saito K, Iwama N, Takahashi T: Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. *Tohoku J Exp Med* 1978; 124: 177-186
- Sandler S, Andersson A, Hellerström C: Inhibitory effects of interleukin 1 on insulin secretion, insulin biosynthesis, and oxidative metabolism of isolated rat pancreatic islets. *Endocrinology* 1987; 121: 1424-1431
- Sassi F, Hugo F, Muhly M, Kahled A, Bhakdi S: A reason for the cytolytic inefficiency of murine serum. *Immunology* 1987; 62: 145-147

Scharp D, Lacy P, McLear M, Longwith J, Olack B: The bioburden of 590 consecutive human pancreata for islet transplant research. *Transplant Proc* 1992; 24: 974-975

Scornik J, Salomon D, Howard R, Pfaff W: Evaluation of antibody synthesis in broadly sensitized patients. *Transplant* 1988; 45: 95-100

Selawry H, Exton J, Rabinovitch A, Mintz D: Effects of intrahepatic transplantation of pancreatic islets on hepatic metabolism in the rat. *Metabolism* 1978; 27: 911-920

Selawry H, Mui M: The effect of islet cell mass and timing of ALS administration on pancreatic allograft survival. *Transplant* 1983; 36: 102-104

Seaquist E, Robertson R: Effects of hemipancreatectomy on insulin secretion and glucose tolerance in healthy humans. *J Clin Invest* 1992; 89: 1761-1766

Shapiro A, Hao E, Rajotte R, Kneteman N: High yield of rodent islets with intraductal collagenase and stationary digestion – a comparison with standard technique. *Cell transplant* 1996; 5: 631-638

Shapiro A, Lakey J, Ryan E, Korbitt G, Toth E, Warnock G, Kneteman N, Rajotte V: Islet transplantation in seven patients with Typ 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238

Siebers U, Horcher A, Brandhorst H, Brandhorst D, Hering B, Federlin K, Bretzel R, Zekorn T: Analysis of the cellular reaction towards microencapsulated xenogeneic islets after intraperitoneal transplantation. *J Mol Med* 1999; 77: 215-218

Shipman C: Evaluation of 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES) as a tissue culture buffer. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 130: 305-310

Shizuru J, Taylor E, Banks B, Gregory A, Fathmann C: Immunotherapy of the non obese diabetic mouse: Treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science* 1988; 240: 659-662

Sibley R, Sutherland D, Goetz F, Michael A: Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft: a light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. *Lab Invest* 1985; 53: 132

Sibley R, Sutherland D: Pancreas transplantation. An immunohistologic and histopathologic examination of 100 cases. *Am J Pathol* 1987; 128: 141-170

Simeonovic C, Credig R, Wilson J: Effect of GK 1.5 monoclonal antibody dosage on survival of pig proislet xenografts in CD4+ T cell-depleted mice. *Transplant* 1990; 49: 849

Sindelar D, Balcom J, Chu C, Neal D, Cerrington A: A comparison of the effects of a selective increase in peripheral insulin on hepatic glucose production. *Diabetes* 1996; 45: 1594-1604

Snell GD: The homograft reaction. *Annu Rev Microbiol* 1957; 11: 439-458.

Solders G, Tydén G, Persson A, Groth C: Improvement of nerve conduction in diabetic neuropathy. A follow-up study 4 yr after combined pancreatic and renal transplantation. *Diabetes* 1992; 41: 946-951

Soldevila G, Buscema M, Doshi M, James R, Bottazzo G, Pujol-Borrell R: Cytotoxic effect of IFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$  on human islet cells. *J Autoimmun* 1991; 4: 291-306

Soria B: In vitro differentiation of pancreatic  $\beta$ -cells. *Differentiation* 2001; 68: 205-219

Spencer K, Gorsuch A, Cudworth A, Bottazzo G: Diabetes and month of birth. *Lancet* 1982; 1: 449

Spinas G, Mandrup-Poulsen T, Molvig J, Back L, Bendtzen K, Dinarello C, Nerup J: Low concentration of interleukin-1 stimulate and high concentrations inhibit insulin release from isolated rat islets of Langerhans. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986; 113: 551-558

Spinas G, Hansen B, Linde S, Kastern W, Molvig J, Mandrup-Poulsen T, Dinarello C, Nielsen J, Nerup J: Interleukin-1 dose dependently affects the biosynthesis of (pro)insulin in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetologia* 1987; 30: 474-480

Spinas G, Palmer J, Mandrup-Poulsen T, Andersen H, Nielsen J, Nerup J: The bimodal effect of interleukin-1 on rat pancreatic  $\beta$ - cell stimulation followed by inhibition depends upon dose, duration of exposure and ambient glucose concentration. *Acta Endocrinol* 1988; 119: 307-311

Stamler J, Wentworth D, Neaton J: Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256: 2823-2828

Stegall M, Lafferty K, Kam I, Gill R: Evidence of recurrent autoimmunity in human allogeneic islet transplantation. *Transplant* 1996; 61: 1272-1274

Suciu-Foca N, Reed E, D'Agati V, Ho E, Cohen D, Benvenisty A, McCabe R, Brensilver J, King D, Hardy M: Soluble HLA antigens, anti-HLA antibodies, and antiidiotypic antibodies in the circulation of renal transplant recipients. *Transplant* 1991; 51: 593-601

Sun A, Coddling J, Haist R: A study of glucose tolerance and insulin response in partially depancreatized dogs. *Diabetes* 1974; 23: 424-432

Sung R, Fiedor P, Yaron I, Zakheim A, Quadracci K, Goodman E, Hardy M: Survival of islet xenografts irradiated with ultraviolet B in diabetic rats. *Transplant Proc* 1996; 28: 839

Sutherland D: Is there a need for pancreas transplantation? *Transplant Proc* 1993; 25: 47-51

Sykes M: Immunobiology of transplantation. *FASEB J* 1996; 10: 721-730

Tarn A, Smith C, Spencer K, Bottazzo G, Gale E: Type 1 (insulin dependent) diabetes: a disease of slow clinical onset? *Br Med J* 1987; 294: 342-345

- Todd R, Neuman R, Geller B, Fox L, Hickok J: Genetic studies of affective disorders: Should we be starting with childhood onset probands? *J Am Acad Child Adolesc psychiatry* 1993; 32: 1164-1171
- Toledo-Pereya L, Bandlien K, Gordon D, MacKenzie G, Reyman T: Renal subcapsular islet cell transplantation. *Diabetes* 1984; 33: 910-914
- Tze W, Tai J, Cheung S: Xenotransplantation of human islets in diabetic rats. *Transplant Proc* 1989; 21: 2741-2743
- Vargas F, Somoza N, Sammarti A, Pujol-Borell R: Endotoxin contaminating islet preparations may explain primary non-function of human islet grafts. *Autoimmunity* 1995; 21: 83-84
- Vaughan H, Loveland B, Sandrin M: Gal-alpha(1,3)Gal is the major xenoepitope expressed on pig endothelial cells recognized by naturally occurring cytotoxic human antibodies. *Transplant* 1994; 58: 879-882
- Walker R, Bone A, Cooke A, Baird J: Distinct macrophage subpopulations in pancreas of pre-diabetic BB/E rats. Possible role for macrophages in pathogenesis of IDDM. *Diabetes* 1988; 37: 1301-1304
- Warnock G, Kneteman N, Rajotte R: Effect of diabetes on the function of transplanted human islets of Langerhans. *Transplant Proc* 1990; 22: 804-805
- Warnock G, Ryan E, Kneteman N, Ao Z, Lakey J, Rajotte R: The natural history of transplantation of insulin-producing pancreatic islets into type I diabetic patients. *Transplant Proc* 1992; 24: 3058
- Weber C, Sci D, Hardy M, Pi-Sunyer P, Zimmerman E, Reemtsma K: Tissue culture preservation and intramuscular transplantation of pancreatic islets. *Surgery* 1978; 84: 166-174
- Weber C, Zabinski S, Koschitzky T, Wicker L, Rajotte R, D'Agati V et al.: The role of CD4<sup>+</sup> helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in NOD mice. *Transplant* 1990; 49: 396-404.
- Weber C, Krekun S, Koschitzky T, Zabinski S, D'Agati V, Hardy M et al.: Prolonged functional survival of rat-to-NOD mouse islet xenografts by ultraviolet-B (UV-B) irradiation plus micro encapsulation of donor islets. *Transplant Proc* 1991; 23: 764-766
- Weir G, Bonner-Weir S, Leahy J: Islet mass and function in diabetes and transplantation. *Diabetes* 1990; 39: 401-405
- Weir M, Fink J: Risk for post transplant Diabetes mellitus with current immunosuppressive medications. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 1-13
- Wilson J, Simeonovic C, Ting J, Credig R: Role of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes in rejection by mice of fetal pig proislet xenografts. *Diabetes* 1989; 38 (Suppl 1): 217

- Winter D, Eich T, Brendel M, Jahr H, Bretzel R: Influence of Antioxidant Therapy on Islet Graft Survival. *Transplant Proc* 2002; 34(6): 2366
- Wöhrle M, Beyer K, Bretzel R, Federlin K: The influence of the culture temperature on insulin release, antigen expression and allograft survival of islets of Langerhans. *Horm Metabol Res* 1990, 25 (Suppl): 96-100
- Wolf L, Coulombe M, Gill R: Donor antigen-presenting cell-independent rejection of islet xenografts. *Transplant* 1995; 60: 1164-1170
- World Health Organization (WHO): Definition, Diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation. WHO; 1999
- Xenos E, Casanova D, Sutherland D, Farney A, Lloveras J, Gores P: The in vivo and in vitro effect of 15-deoxyspergualin on pancreatic islet function. *Transplant* 1993; 56: 144-147
- Yasunami Y, Lacy P, Davie J: Prolongation of islet xenograft survival (rat to mouse) by in vitro culture at 37°C. *Transplant* 1983; 35: 281-284
- Yoon J, Austin M, Onodera T, Notkins A: Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 1979; 300: 1173-1179
- York I, Rock K: Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 369-396
- Younoszai R, Sorenson R, Lindall A: Homotransplantation of isolated pancreatic islets. *Diabetes* 1970; 19: 406
- Ziegler B, Hahn H, Ziegler M: Insulin recovery in pancreas and host organs of islet grafts. *Exp Clin Endocrinol* 1985; 85(1): 53-60
- Ziegler A, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E: Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes. The 2-year analysis of the German BABYDIAB study. *Diabetes* 1999; 48: 460-468
- Zweier J, Kuppusamy P, Luty G: Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in post ischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4046-4050

## Danksagung

Herrn PD Dr. rer. nat Henning Jahr danke ich für die Überlassung des Themas, der stets zur Verfügung stehenden Unterstützung bei unterschiedlichsten Problemen und Fragestellungen. Ebenfalls erwähnt werden muß seine offene Diskussionsbereitschaft über wissenschaftliche Fragestellungen oder Dinge betreffend das Allgemeinwissen.

Prof. Dr. med. Reinhardt G. Bretzel für die Bereitstellung der Laborräumlichkeiten, Apparate und deren Erhaltung und sein großes, langjähriges Engagement im Rahmen der experimentellen und klinischen Inseltransplantation.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors: Birte Hußmann, Gudrun Pfeiffer und Birgit Janczik. Von Beginn an herrschte ein gutes, freundschaftliches Arbeitsklima. Sie scheuten nicht davor zurück, auch mir ihr Wissen und ihre Fähigkeiten über die Inselisolation, die Behandlung der Inseln und die Transplantation unermüdlich weiterzugeben. Bei allen Problemen waren sie stets ansprechbar und hilfsbereit.

Vielen Dank auch bei den beiden Doktoranden Daniel Winter und Olaf Teichert, die durch ihr kollegiales Verhalten, ihre Hilfsbereitschaft und vieles mehr, einiges erleichtert haben.

Dres. oec. troph. Daniel und Heide Brandhorst für die Bereitschaft, viel Wissen über die humane Inselisolation zu vermitteln und mir das Erlernen dieser Technik zu ermöglichen.

Danken möchte ich auch Andreas Schultz, der uns immer behilflich bei der Vorbereitung von wissenschaftlichen Präsentationen gewesen ist, auch wenn die Anfrage teilweise kurzfristig erfolgte.

Einen ganz großen Dank möchte ich an meine Eltern und meinen Bruder richten. Zum einen, daß sie mir meine Ausbildung und das Studium ermöglicht haben, die eine Grundvoraussetzung für eine Promotionsarbeit sind. Zum anderen für die permanente Unterstützung und die vielen Gespräche, die immer sehr anregend und aufbauend sind.

Zum Schluß möchte ich mich bei Cecilia Persson bedanken, daß sie immer an mich und an die Zukunft geglaubt hat und dies weiterhin tut.

# Lebenslauf

Torsten Eich

Geburtstag	18.01.1972
Geburtsort	Mayen/Eifel
Allgemeine Hochschulreife	07/1991 am Gymnasium der Salesianer Don Boscos, Buxheim, Bayern
<b>Hochschulstudium</b>	Beginn 09/1993 Justus-Liebig-Universität Gießen
Physikum	03/1995
1. Staatsexamen	03/1997
2. Staatsexamen	09/1999
Praktisches Jahr	05/1999 bis 05/2000
3. Staatsexamen	05/2000
<b>Promotionsarbeit</b>	ab 1997, Morphologisches Labor, Medizinische Klinik III und Poliklinik, Universitätsklinikum Gießen
<b>Beruflicher Werdegang</b>	
Arzt im Praktikum	07/2000 – 01/2002 Medizinische Klinik III und Poliklinik, Universitätsklinikum Gießen
Assistenzarzt	01/2002 – 05/2002 Medizinische Klinik III und Poliklinik, Universitätsklinikum Gießen
Forschungsaufenthalt	seit 05/2002 Department of clinical immunology Rudbeck laboratory University of Uppsala, Sweden