

Aus dem Institut für Medizintechnik
der Technischen Universität München (IMETUM)
Leitung Prof. Dr. rer. nat. Axel Haase

Syngene Inseltransplantation ins Knochenmark diabetischer Ratten

Etablierung der Methode und Erkenntnisse zum Einfluss
auf den murinen Glukosestoffwechsel

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julian Nikolaus Bucher

aus Friedrichshafen

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Manfred Stangl

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Bärbel Otto

Prof. Dr. Oliver Schnell

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiterin: Dr. med. Alice Schwarznau

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2013

1	Einleitung	1
1.1	Definition Diabetes mellitus	1
1.2	Einteilung des Diabetes mellitus	1
1.2.1	Diabetes mellitus Typ 2	2
1.2.2	Diabetes mellitus Typ 1	3
1.2.2.1	Genetische Suszeptibilität	4
1.2.2.2	Autoimmunität.....	5
1.2.2.3	Umweltfaktoren als Auslöser der Erkrankung.....	6
1.2.3	Klinik und Diagnostik.....	7
1.3	Komplikationen und diabetische Folgeerkrankungen	8
1.4	Epidemiologische Aspekte des Diabetes mellitus und seinen Folgeerkrankungen	11
1.5	Therapie	13
1.5.1	Die Pankreastransplantation als Therapieoption bei Diabetes mellitus	14
1.5.2	Die Inseltransplantation als Therapieoption bei Diabetes mellitus	17
1.5.3	Problematik der Inseltransplantation	20
1.5.3.1	Das Knochenmark als Transplantationsort	24
1.6	Fragestellung	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Inselisolation im Nagetiermodell.....	26
2.2	Spendertiere.....	26
2.3	Inselisolation	26
2.3.1	Chemikalien und Lösungen.....	26
2.3.2	Chirurgische Instrumente und Verbrauchsmaterialien	27
2.3.3	OP Ausstattung	28
2.3.4	Laboraausstattung	28
2.3.5	Vorbereiten der Lösungen.....	28
2.3.5.1	Ketamin/Xylazin Injektionslösung (Volumen für 1 Ratte)	28
2.3.5.2	Dissociation Buffer (25 mM HEPES /HBSS).....	28
2.3.5.3	Quenching Buffer (HBSS, 10% FBS)	29
2.3.5.4	Kultur Medium (CMRL 1066, 10% FBS, PenStrep)	29
2.3.5.5	Dithizon Lösung (DTZ)	29
2.3.5.6	Enzymlösung (Volumen für 1 Ratte).....	29
2.3.6	Vorbereitung für die Isolationsprozedur	30
2.3.6.1	Präparation, Distention und Entnahme des Pankreas	30
2.3.6.2	Digestion.....	31
2.3.6.3	Aufreinigung	32
2.3.6.4	Quantifizierung der Inselmenge und Umrechnung in Inseläquivalente	33
2.3.6.4.1	Inseläquivalent	33
2.3.6.4.2	Identifikation der Inseln	33
2.3.6.4.3	Umrechnung	34
2.3.6.5	Zellkultur	35
2.3.6.5.1	Kulturbedingungen	35
2.3.6.5.2	Kultivierung der Inseln.....	35
2.3.6.5.3	Das Kulturmedium.....	35
2.4	Empfängertiere.....	35
2.4.1	Lewis Ratte	35
2.4.2	Induktion des Diabetes mellitus.....	36

2.4.2.1	Streptozotocin induzierter Diabetes	36
2.4.2.1.1	Streptozotocin (STZ)	36
2.4.2.2	Herstellung der Streptozotocinlösung	37
2.4.2.2.1	Chemikalien und Lösungen	37
2.4.2.2.2	Laborausstattung	37
2.4.2.2.3	Verbrauchsmaterialien	37
2.4.2.3	Herstellung des Citratpuffers	37
2.4.2.4	Abwiegen und Auflösen des Streptozotocins	38
2.4.2.5	Intraperitoneale Injektion der Streptozotocinlösung	38
2.4.3	Blutzuckerbestimmung im Vollblut der Ratten	38
2.4.3.1	Material	38
2.4.3.2	Messprinzip und Durchführung	39
2.4.4	Gewichtsbestimmung	39
2.5	Inseltransplantation	39
2.5.1	Präoperative Gabe von Insulin	39
2.5.2	Inseltransplantation ins Knochenmark des Femurs von männlichen Lewis Ratten	40
2.5.2.1	Chemikalien und Lösungen	40
2.5.2.2	Chirurgische Instrumente und Verbrauchsmaterial	41
2.5.2.3	Laborausstattung	41
2.5.2.4	OP Ausstattung	42
2.5.2.5	Inseltransplantation ins Knochenmark - Nylonkatheter	42
2.5.2.5.1	Vorbereiten des Nylonkatheters	42
2.5.2.5.2	Laden des Nylonkatheters	43
2.5.2.5.2.1	Waschen der Inseln	44
2.5.2.5.2.2	Laden des Nylonkatheters	44
2.5.2.6	Narkose und postoperative Schmerztherapie der Empfängertiere ..	45
2.5.2.7	Präparation des Femurs und Durchführung der Transplantation	45
2.5.2.8	Postoperative Haltung und Versorgung	46
2.5.2.9	Postoperative Kontrolle der Transplantatfunktion	47
2.6	Histologie	47
2.6.1	Organentnahme	47
2.6.2	Gewebekonservierung	47
2.6.2.1	Chemikalien und Lösungen	47
2.6.2.2	Verbrauchsgegenstände	47
2.6.2.3	Laborausstattung	47
2.6.2.4	EDTA-Entkalkungslösung (pH 7)	48
2.6.2.5	Fixieren der entnommenen Organe	48
2.6.2.6	Entkalken und Einbetten der Femurknochen	48
2.6.3	Herstellung der Gewebeschnitte	49
2.6.3.1	Objektträger	49
2.6.3.1.1	Material	49
2.6.3.1.2	Grundierung der Objektträger	49
2.6.3.2	Zuschneiden der Paraffinblöcke	49
2.6.4	Histologie und Immunhistochemie	49
2.6.4.1	H&E Färbung	50
2.6.4.1.1	Material	50
2.6.4.1.2	Wässrige Eosinlösung 0,1%	50
2.6.4.1.3	Durchführung	50

2.6.4.2	Insulin-Färbung.....	51
2.6.4.2.1	Material	51
2.6.4.2.2	Pufferlösungen	52
2.6.4.2.2.1	TRIS-Cl-Puffer pH 7,5 und TRIS-Cl-Puffer pH 6,0.....	52
2.6.4.2.2.2	H ² O ² -Lösung 7,5%.....	52
2.6.4.2.3	Durchführung	52
2.6.4.3	Lebend/Tod - Fluoreszenzfärbung.....	53
2.6.4.3.1	Chemikalien	53
2.6.4.3.2	Laboraausstattung	53
2.6.4.3.3	Durchführung	54
2.7	Insulin-Sekretions-Test mittels ELISA zur Vitalitätsbestimmung der Inseln	54
2.7.1	Chemikalien und Lösungen.....	54
2.7.2	Laboraausstattung	55
2.7.3	Krebs-Ringer-Puffer (KRB).....	55
2.7.4	Stimulationslösungen (Glukose 3,3 mM und Glukose 16,6 mM).....	55
2.7.5	Stimulation der Insulin-Sekretion.....	56
2.7.6	Insulin ELISA.....	56
2.7.6.1	Durchführung des Insulin-ELISA	57
2.8	Datenerhebung und Statistische Analyse.....	57
3	Ergebnisse.....	58
3.1	Untersuchung der Inseln auf Funktion und Viabilität nach dem Laden des Nylonkatheters	58
3.1.1	Versuchaufbau	58
3.1.1.1	Dithizonefärbung	59
3.1.2	Lebend/Tod - Fluoreszenzfärbung	61
3.1.3	Insulinsekretionstest.....	64
3.2	Untersuchung der Schädigung des Knochenmarks durch das Applikationsverfahren.....	65
3.2.1	Versuchsaufbau	65
3.2.1.1	H&E Färbung.....	65
3.3	Nachweisbarkeit der Inseln im Knochenmark	67
3.3.1	Ergebnisse der Testtransplantation.....	67
3.3.2	Langzeitüberleben der Inseln im Knochenmark	69
3.3.2.1	Versuchsaufbau.....	69
3.3.2.2	Insulinfärbung.....	69
3.3.3	Quantitative Auswertung der Präparate der Gruppe Km5.....	72
3.3.4	Untersuchung der Konglomerate	73
3.3.5	Einfluss der Inseltransplantation ins Knochenmark auf den Glukosestoffwechsel der diabetischen Ratten	74
4	Diskussion	76
4.1	Das Knochenmark als Zielorgan zur Inseltransplantation	76
4.2	Welche Methode ist geeignet, um die Inseln unbeschadet und in ausreichender Zahl ins Knochenmark der Versuchstiere zu applizieren?.....	77
4.2.1.1	Schlauch-Ladeversuch	79
4.2.1.2	Test-Transplantation.....	81
4.2.2	Schädigung des Knochenmarks durch den Applikationsprozess	82
4.3	Morphologische Beurteilung der Transplantate	82
4.3.1	Morphologie von Inseln in situ.....	82

4.3.2	Morphologie der transplantierten Inseln und Rückschlüsse auf Vitalität und Funktion.....	82
4.3.3	Quantitative Auswertung der Insulin-positiven Areale.....	85
4.4	Einfluss der Inseltransplantation ins Knochenmark auf den Glukosestoffwechsel der diabetischen Ratten	86
4.5	Kritische Betrachtung der verwendeten Methode und Ausblick	88
5	Zusammenfassung	90
6	Literaturverzeichnis.....	94
7	Danksagung.....	A
8	Bisher veröffentliche Teile dieser Arbeit	B

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMWF	Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
Aqua dest.	Aqua destilata
CITR	Collaborative Islet Transplant Registry
DHC	Ductus hepaticus communis
Dm	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTZ	Dithizon
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immuno Assay
ET-OH	Ethanollösung
FBS	Fetales Kälberserum
G	Gauge
GAD	Glutamat Dekarboxylase
GLUT II	Glukose-Transport-Protein 2
HbA1c	Glykohämoglobin
HBBS	Hank's balanced salt solution
HLA	Human leucocyte antigen
IA-2	Insulinom-assoziiertes Protein
IBMIR	Instant blood mediated incompatibility reaction
IEq	Inseläquivalent

INN	Internationaler Freiname
ITx	Inseltransplantation
IUPAC	Internationale Union für freie und angewandte Chemie
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
KG	Körpergewicht
LADA	Late onset Diabetes in adults
Lsg.	Lösung
MHC	Major histocompatibility complex
MODY	Maturity onset Diabetes of the Young
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
OGGT	Oraler Glukose-Toleranz-Test
PAK	Pankreas- nach Nierentransplantation
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymerase
PBS	Phosphate buffered salt solution
PE	Polyethylen
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PTA	alleinige Pankreastransplantation
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Umdrehungen pro Minute
rR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan
Sham	Kontrollgruppe
SPK	Simultane Pankreas- und Nierentransplantation
Stk.	Stück (Anzahl)

STZ Streptozotocin
TRIS 7,5 Tris-Puffer 7,5%

WHO World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Definition Diabetes mellitus

Der Begriff Diabetes mellitus beschreibt eine heterogene Gruppe von Stoffwechselstörungen die durch eine chronisch erhöhte Blutglukosekonzentration charakterisiert sind. Des Weiteren bestehen meist Störungen im Kohlehydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel. Ursache dafür ist entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine gestörte Insulinwirkung oder auch Beides. Klinisch kann sich die Erkrankung mit den Symptomen Durst, Polyurie, visuellen Störungen und Gewichtsverlust präsentieren. In der schwersten Form entwickeln sich die diabetische Ketoazidose oder das hyperosmolare Koma, die zu Somnolenz, Stupor, Koma und schließlich zum Tode führen können. Die Langzeitschäden des Diabetes mellitus betreffen die verschiedensten Organe und Gewebe (siehe 1.3) [1].

Die Diagnose Diabetes mellitus wird entsprechend der World Health Organisation (WHO) beim nüchternen Patienten bei einer Blutglukosekonzentration von über 126 mg/dl im Plasma, bzw. über 110mg/dl im kapillaren Vollblut gestellt. Ebenfalls als beweisend gilt ein oraler Glukosetoleranztest (OGGT) mit einem Maximalwert von >200 mg/dl oder/und einem Wert von >140 mg/dl (im Plasma und kapillaren Vollblut) zwei Stunden nach der Glukosebelastung [1].

Als Vorstufe zum manifesten Diabetes mellitus wird von der WHO der Zustand der gestörten Glukosetoleranz und der Zustand der gestörten Nüchternglukosekonzentration definiert (IGT: Impaired Glucose Tolerance; IFG: Impaired Fasting Glycemia). Diese sind durch Blutzuckerwerte zwischen den für Diabetes mellitus charakteristischen Werten und den normoglykämien Werten definiert.

1.2 Einteilung des Diabetes mellitus

Entsprechend dem heutigen Kenntnisstand zur Pathogenese der verschiedenen Formen des Diabetes mellitus, wird die Erkrankung folgendermaßen klassifiziert:

Beim Diabetes mellitus Typ 1 (DM Typ1) führt die Zerstörung der β -Zellen des Pankreas zum absolutem Insulinmangel. Dieser Vorgang ist wahrscheinlich autoimmunologisch bedingt und betrifft meist jüngere Patienten. Tritt bei älteren

Patienten ein DM Typ1 auf so wird von „late onset Diabetes in adults“ (LADA) gesprochen [2].

Der Diabetes mellitus Typ 2 (Dm Typ 2) ist definiert als Erkrankung mit relativem Insulinmangel bei Insulinresistenz und/oder einem Kompensationsversagen des Pankreas. Er tritt charakteristischer Weise bei älteren Patienten auf und ist häufig mit weiteren Symptomen assoziiert, die im Kontext des metabolischen Syndroms auftreten [2].

Neben den o.g. großen Klassen existieren weitere Formen des Diabetes mellitus, die sich durch ihre Ätiologie und Pathogenese unterscheiden. Es seien hier nur einige dieser Erkrankungen genannt:

Diverse Medikamente können Diabetes mellitus auslösen, z.B. Glukokortikoide, Neuroleptika, Alpha-Interferon, Pentamidin und Calcineurininhibitoren. Des Weiteren sind einige Endokrinopathien (z.B. Cushing-Syndrom, Akromegalie, Phäochromozytom) und diverse genetische Defekte und Syndrome (Maturity Onset Diabetes of the Young, kurz MODY; Klinefelter-Syndrom; Turner-Syndrom; etc.) mit Diabetes mellitus assoziiert. Und nicht zu Letzt können Infektionserkrankungen (insbesondere in der Pränatalperiode) und Erkrankungen des exokrinen Pankreas (Tumoren, Pankreatitiden) einen Diabetes mellitus hervorrufen.

Ausführlich werden hier nur die beiden großen Klassen Dm Typ1 und Typ 2 beschrieben, und jene, für die die Inseltransplantation eine Therapieoption darstellen kann.

1.2.1 Diabetes mellitus Typ 2

DM Typ 2 ist charakterisiert durch eine Insulinresistenz des Gewebes und einem relativen Insulinmangel. Es wird von einer multifaktoriellen Pathogenese ausgegangen, die ätiologisch sowohl auf eine genetische Prädisposition als auch auf Lebensstil- und Umweltfaktoren zurückzuführen ist. Der manifesten Erkrankung geht meist eine lange Periode der eingeschränkten Glukosetoleranz voraus.

Verantwortlich für die Insulinresistenz, die in der Pathogenese eine zentrale Rolle einnimmt [3,4], sind wahrscheinlich Postrezeptorendefekte im Signalweg des Insulinrezeptors [3,5]. Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung dieser Defekte ist Adipositas [5,6,7].

Der relative Insulinmangel ist zunächst auf den, durch die Insulinresistenz der Effektorgewebe (u.a. Hepato-, Myo- und Adipozyten) bedingten, erhöhten Insulinbedarf zurückzuführen. Außerdem kommt es zu einem Sekretionsdefizit der β -Zellen des Pankreas. Die Gründe hierfür liegen wahrscheinlich einerseits bei einer genetischen Prädisposition und andererseits bei einer alimentären oder/und stoffwechselbedingten Überlastung der β -Zellen [8,9].

Der Dm Typ 2 ist häufig von weiteren Erkrankungen wie Hypertonie, Dyslipidämie, Adipositas u.a. begleitet. Diese Konstellation wird als Metabolisches Syndrom bezeichnet und spielt epidemiologisch und sozioökonomisch eine immer größere Rolle.

Die, für Diabetes mellitus typische Symptome wie Polydypsie, Polyurie und Nykturie treten beim DM Typ 2 eher selten auf. Die Patienten fallen meist durch unspezifische Beschwerden wie Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Infektionsanfälligkeit auf. Bei Vielen sind schon zum Zeitpunkt der Diagnose die charakteristischen diabetischen Folgeerkrankungen (s.u.) vorhanden.

Behandelt wird der Dm Typ 2 in Deutschland entsprechend eines Stufenschemas der AMWF Leitlinien:

Zunächst wird durch eine Umstellung des Lebensstils versucht, die Stoffwechsellage zu kontrollieren. Auf der zweiten Stufe steht der Einsatz oraler Antidiabetika die auch in Mehrfachkombination einsetzbar sind. Bei Nicht-Erreichen der metabolischen Therapieziele wird die Insulinsubstitution hinzugezogen [10].

1.2.2 Diabetes mellitus Typ 1

Diabetes mellitus Typ 1 ist pathogenetisch durch den primären Verlust der β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas gekennzeichnet [11]. Es existieren 2 Formen des Dm Typ 1: Die häufige Form Dm Typ 1 A, bei der ein Autoimmunprozess für die Zerstörung der β -Zellen verantwortlich gemacht wird und der sehr seltene Typ B, bei dem keine Anzeichen für Autoimmunität identifiziert werden können und bei dem eine idiopathische Genese vermutet wird [12].

Die Zusammenfassung der Ätiologie der Erkrankung bezieht sich im Folgenden auf Dm Typ 1 A:

In den Pankreata von jüngeren, verstorbenen Diabetikern fällt histologisch eine Abnahme der Langerhansschen Inseln in Zahl und Größe auf. Es kann eine negative Korrelation der Inselzahl mit der Diabetesdauer festgestellt werden. Nach heutigem Kenntnisstand werden bei den meisten Patienten die β -Zellen der Inseln durch eine zelluläre Insulinitis angegriffen [13]. Die Zerstörung erfolgt durch Lyse nach dem Anlagern von Lymphozyten an die Zellwand der β -Zellen [14]. Die anderen Zellentitäten der Langerhansschen Inseln sind dabei nicht betroffen. Es handelt sich um einen Prozess, der meist mehrere Monate bis Jahre voranschreitet, zunächst ohne Symptome zu zeigen.

Der Prozess der autoimmunen Zerstörung der β -Zellen ist zu großen Teilen genetisch determiniert und wird zudem wahrscheinlich von einem oder mehreren Umweltfaktoren ausgelöst. Die genaue Ätiologie der Erkrankung ist aber noch nicht vollständig geklärt.

1.2.2.1 Genetische Suszeptibilität

Für nahe Verwandte von Dm Typ 1 Patienten besteht ein deutlich erhöhtes Krankheitsrisiko. Es beträgt für die Kinder eines Dm Typ 1 Patienten ca. 6%, für dessen Geschwister (inklusive dizygote Zwillinge) ca. 5% und für monozygote Zwillinge ca. 50% [11,15,16].

Es existieren einige HLA-Haplotypen die gehäuft in Dm Typ 1 Patienten vorkommen. So tragen z.B. über 90% der Patienten entweder den Haplotyp HLA-DR3'DQB1*0201 oder DR4'DQB1*0302, wohingegen diese Haplotypen nur in 40% der Nicht-Diabetiker vorkommen [17].

Ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Dm Typ 1 kann auch mit mehreren Genpolymorphismen in Zusammenhang gebracht werden. Hierbei spielen vor allem die Genloci HLA-DQalpha, HLA-DQbeta, HLA-DR, Preproinsulin, das PTPN22 Gen, CTLA-4, interferon-induced helicase, IL2 Rezeptor (CD25), ein ‚lectin-like‘ Gen, ERBB3e, und ein unidentifiziertes Gen auf 12q eine Rolle. Aufgrund dieser Erkenntnisse sind inzwischen ca. 48% der Fälle von familiärer Häufung von Dm Typ 1 auf die o.g. Genloci zurückzuführen [18,19,20,21,22,23,24].

Trotz der starken Assoziation des Erkrankungsrisikos mit den o.g. Konstellationen im HLA-System, wird davon ausgegangen, dass Dm Typ 1 einen polygenen Hintergrund

hat [25,26]. Es sind diverse nicht-MHC Gene identifiziert worden, die teilweise eigenständig und teilweise nur in Assoziation mit den o.g. Risiko-HLA-Haplotypen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht werden können. Dazu zählt z.B. der Polymorphismus eines Insulinpromotors [27] oder der Austausch einer Aminosäure in einer lymphozytenspezifischen Tyrosin-Phosphatase [28].

Es gibt noch viele weitere Genloci bei deren Polymorphismus von einem erhöhten Erkrankungsrisiko ausgegangen wird. Es seien hier nur einige genannt,

Ein Polymorphismus des zytotoxischen-T-Lymphozyten-assoziierten Antigens 4 (CTLA-4)[29], des interferon-gamma-inducing-factor (IGIF) [30] und des, für regulatorische T-Zellen essentiellen Transkriptionsfaktors FoxP3 [31].

1.2.2.2 Autoimmunität

Die autoimmunen Reaktionen spielen sich in der Pathogenese des Dm Typ 1 sowohl auf humoraler-, als auch auf zellulärer Ebene ab.

In der Mehrzahl der Patienten finden sich Autoantikörper, die gegen Antigene der β -Zellen gerichtet sind. So lassen sich in 85% der Patienten Antikörper (AK) gegen Inselzellen (Islet Cell Antibodies; ICA) nachweisen [11]. Weitere Antigene gegen die in vielen Patienten Antikörper existieren, sind die Glutamat-Decarboxylase (GAD) (AK in 70% der Patienten) [32], das Insulinom-assoziierte-Protein (IA-2) (AK in 58% der Patienten) [33], der Zinktransporter ZnT8 (AK in 60-80% der Patienten) [34] und das Peptidhormon Insulin selbst [35]. Ein direkter zytotoxischer Mechanismus der Antikörper gilt zwar als unwahrscheinlich, jedoch besitzt das Auftreten von Antikörpern gegen die o.g. Antigene eine prädiktive Aussagekraft. In der BABYDIAB-Studie konnte z.B. gezeigt werden, dass bei Vorliegen von zwei Insel-Autoantikörpern (GAD und IA-2) vor dem 2. Lebensjahr das relative Risiko (rR) für das Auftreten der Erkrankung innerhalb von 5 Jahren um 50% gegenüber Probanden mit nur einem (rR=14%), bzw. keinem vorhandenen Antikörper (rR=0%) erhöht ist [36].

Neben der humoralen Komponente spielt die zelluläre Autoimmunität ebenfalls eine Rolle.

Die für die Zerstörung der β -Zellen verantwortlichen Effektorzellen sind hauptsächlich T-Lymphozyten und Monozyten [37; 38]. Vor allem in der prädiabetischen Phase

lassen sich viele autoreaktive, Inselantigen-spezifische T-Zellen nachweisen [39]. Außerdem wurde der direkte zytotoxische Effekt von T-Zellen auf β -Zellen nachgewiesen. Des Weiteren ließ sich durch Immunsuppression mit T-Zell-Antikörpern die Insulinitis und die Manifestation des Diabetes für eine gewisse Zeit unterdrücken [40].

1.2.2.3 Umweltfaktoren als Auslöser der Erkrankung

Die Pathogenese des Dm Typ 1 wird heutzutage als eine multifaktoriell bedingte Autoimmunreaktion verstanden, bei der eine genetische Suszeptibilität besteht, welche durch bisher unbekannte endogene und/oder exogene Faktoren ausgelöst wird. Diskutiert werden derzeit die folgenden Hypothesen:

Es wird eine Assoziation mit Virusinfektionen während der Pränatalperiode und Kindheit angenommen. Enterovirale Infekte in der Kindheit und besonders die Infektion mit Coxsackieviren der Mutter während der Schwangerschaft scheinen signifikant mit dem Auftreten von Dm Typ 1 assoziiert zu sein [41]. Es besteht eine signifikante Strukturhomologie zwischen dem Inselantigen GAD und dem F2C Protein des Coxsackievirus B4 was ein molekulares Mimikry vermuten lässt [42,43].

Eine weitere Hypothese verbindet den Genuss von Kuhmilchprodukten im Säuglings- und Kleinkindesalter mit einem erhöhten Dm Typ 1 Risiko. Grundlage für diese Hypothese ist die Theorie, dass Teile des Kuhmilch-Albumins und das Kuhmilch-Protein beta-Casein die Autoimmunreaktion triggern [44,45]. Epidemiologische Studien zu diesen Hypothesen lieferten allerdings uneinheitliche Ergebnisse [46,47].

Des Weiteren werden perinatale Faktoren als Risikofaktoren diskutiert. In einer Multicenterstudie wurden 892 Kinder mit Diabetes mit 2291 gesunden Kindern hinsichtlich potentieller perinataler Risikofaktoren verglichen. Für ein mütterliches Alter > 25 Jahre, Präeklampsie, respiratorische Anpassungsstörung und neonataler Ikterus (besonders auf Grund einer ABO-Inkompatibilität) wurde ein leicht erhöhtes Risiko festgestellt. Protektive Faktoren waren ein niedriges Geburtsgewicht und eine geringe Körpergröße [48].

1.2.3 Klinik und Diagnostik

Diabetes mellitus Typ 1 ist eine chronische Erkrankung, die sich meist erstmals im Kindes- und Jugendalter manifestiert. Die Patienten klagen über die typische Symptome Müdigkeit, Durstgefühl, Polydypsie, Polyurie und Gewichtsverlust. Eine derartige Symptomkonstellation sollte immer zu einer eingehenden Diabetesdiagnostik veranlassen. Die Diagnostik umfasst die Bestimmung der Blutglukosekonzentration im nicht-nüchternen und nüchternen Patienten, sowie die Durchführung eines OGGT. Bei Vorliegen von klassischen Symptomen und der folgenden Blutglukosekonstellation kann vom Vorliegen eines Dm Typ 1 ausgegangen werden:

Ein Gelegenheits-Blutglukosewert von >200 mg/dl ($11,1$ mmol/l) im venösen Plasma oder kapillaren Vollblut oder die Bestätigung einer Nüchternblutglukosekonzentration von >110 mg/dl ($6,1$ mmol/l) im kapillaren Vollblut bzw. >126 mg/dl ($7,0$ mmol/l) im venösen Plasma oder ein OGTT-2-h-Wert im venösen Plasma oder kapillaren Vollblut von >200 mg/dl ($11,1$ mmol/l) [2].

Aufgrund der steigenden Inzidenz von Dm Typ 2 in jüngeren Patienten ist die Differenzierung des Diabetes Typus von großer Wichtigkeit. Die Differentialdiagnose basiert auf der Anamnese, der Klinik und Laborparametern:

Dm Typ 2 – Patienten sind meist übergewichtig mit einem Bodymassindex oberhalb der 85%-Perzentile. Typ 1 – Diabetiker sind hingegen meist eher untergewichtig und berichten zudem in vielen Fällen über einen aktuellen Gewichtsverlust. Dm Typ 2 tritt meist nach dem Beginn der Pubertät auf, wohingegen Dm Typ 1 sich meist in jüngeren Kindern manifestiert. Es besteht hier eine bi-phasische Inzidenzkurve mit einem Gipfel bei 4-6 Jahren und dem Zweiten zwischen 10 und 14 Jahren. Die Bestimmung der o.g. Antikörper im Serum der Patienten (GAD-Antikörper, IA-2-Antikörper und Insulinantikörper) kann ebenfalls richtungsweisend sein. Jedoch besitzt nur der positive Antikörpernachweis eine Aussagekraft.

Dm Typ 2 ist häufig mit weiteren Erkrankungen und Symptomen assoziiert, die üblicherweise nicht bei Typ 1 – Diabetikern auftreten. Es handelt sich hier z.B. um Acanthosis nigricans, einem Zeichen für die Insulinresistenz in DM Typ 2 Patienten. Außerdem leiden Typ 2 – Diabetiker häufig unter Hypertonus, Dyslipidemie oder unter polyzystischen Ovarien. Dies sind alles Befunde die für Dm Typ 1 eher untypisch sind. Die Bestimmung des Diabetes Typs stützt sich also nicht auf einen

einzelnen diagnostischen Test, sondern muss durch die o.g. Befundkonstellation klinisch gestellt werden.

1.3 Komplikationen und diabetische Folgeerkrankungen

Die Komplikationen der diabetischen Stoffwechsellage bei Dm Typ 1 und 2 lassen sich in akute und chronische Komplikationen bzw. Folgeerkrankungen einteilen.

Die bedrohlichsten Akutkomplikationen sind das ketoazidotische- und das hyperosmolare Koma. Es handelt sich hierbei um akute Syndrome, die durch einen exzessiv erhöhten Blutzuckerspiegel ausgelöst werden. Im Vordergrund steht bei beiden Formen eine Exikose durch osmotische Diurese mit massiver Glukosurie. Diese kann sich bis zum hypovolämischen Schock aggravieren. Desweiteren kommt es zu Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma durch zentrale Regulationsstörungen bei Dehydratation und Elektrolytentgleisung.

Die beiden o.g. Formen unterscheiden sich in ihrer Pathogenese. Beim ketoazidotischen Koma kann bei absolutem Insulinmangel die im Blut vorhandene Glukose von den insulinsensitiven Geweben nicht mehr aufgenommen werden. Eine zusätzliche Stimulation der Glukoneogenese durch Glukagon, Katecholamine und Glukokortikoide trägt ebenfalls zur Entstehung einer Hyperglykämie mit osmotischer Glukosurie und Polyurie bei. Außerdem wird wegen des peripheren Insulinmangels die hepatische Ketogenese aktiviert und es entsteht eine metabolische Azidose. Die Blutglukosekonzentration liegt dennoch meist unter 700 mg/dl (39 mmol/l). Klinisch präsentieren sich die Patienten mit eingeschränkter Vigilanz, Acetongeruch, Kussmaul-Atmung, ggf. Erbrechen und Abdominalbeschwerden (Pseudoperitonitis diabetica). Das ketoazidotische Koma tritt entsprechend der Pathogenese meist bei Typ 1 Diabetikern auf [49]. Die Letalität liegt zwischen 1-10%.

Beim hyperosmolaren Koma steht pathogenetisch hauptsächlich die osmotische Diurese und die resultierende intrazelluläre Dehydratation im Vordergrund. Auslöser dafür ist eine meist alimentär oder non-Compliance bedingte exzessive Hyperglykämie mit Blutglukosekonzentrationen über 800 mg/dl (41 mmol/l). Begleitend treten Elektrolytentgleisungen auf [49]. Beim hyperosmolaren Koma liegt die Letalität zwischen 40 – 60%!

Die Therapie beider Syndrome konzentriert sich in erster Linie auf die Korrektur des Flüssigkeitsdefizits durch Infusionen und der langsamen Normalisierung des

Blutzuckerspiegels durch Insulinsubstitution. Die Kontrolle und Korrektur des Elektrolythaushalts ist ebenfalls essentiell [50]!

Bei den meisten der diabetischen Folgeerkrankungen handelt es sich um Mikro- bzw. Makroangiopathien in verschiedenen Organen und Geweben. Daneben existieren noch anderweitige Veränderungen, von denen in diesem Umfang nur die diabetische Neuropathie erwähnenswert ist.

Makroangiopathische Veränderungen treffen meist Patienten mit Dm Typ 2 und sind eher als Folge der Fettstoffwechselstörung und dem assoziierten Hypertonus bei Metabolischem Syndrom zu sehen. Die Makroangiopathie manifestiert sich am häufigsten als Koronare Herzerkrankung, in Form von zerebralen Durchblutungsstörungen und als periphere arterielle Verschlusskrankheit.

Beim Typ 1 Diabetiker, aber auch beim Typ 2 Patienten treten als direkte Folge der chronischen Hyperglykämie mikroangiopathische Veränderungen auf. Es kommt zur verstärkten Glykosilierung von Proteinen mit nachfolgender Funktionsveränderung. Davon sind hauptsächlich Proteine der vaskulären Intimaschicht und der vaskulären Basalmembran betroffen. Zudem wird Sorbit in diversen Zelltypen eingelagert und die konsekutive Wassereinlagerung führt zu Veränderungen der Endothelzellen und fördert Mikrothrombosen. Davon sind besonders Organe und Gewebe betroffen, deren vaskuläre Mikroarchitektur sehr fein ausgeprägt ist und eng mit der Funktionalität der Organe verknüpft ist. Vorwiegend entstehen die mikroangiopathischen Komplikationen in den Nieren und der Netzhaut [51].

So ist 20 Jahre nach Erkrankungsbeginn bei mehr als 20% der insulinpflichtigen Diabetiker eine diabetische Nephropathie nachweisbar. Es handelt sich um eine Mikroangiopathie der glomerulären Gefäße, die im Verlauf meist zur Niereninsuffizienz führt. Die diabetische Nephropathie ist derzeit die häufigste Ursache einer Dialysepflichtigkeit. Die Schwere der, auch als Kimmelstiel-Wilson Glomerulosklerose bezeichneten Erkrankung korreliert mit der Diabetesdauer und der Stoffwechsel- und Hypertonuseinstellung [52]. Des Weiteren finden sich häufig auch assoziierte makroangiopathische Veränderungen der Nierengefäße.

Die diabetische Retionopathie ist nach 15 Jahren Krankheitsdauer bei über 60% der Diabetiker vorhanden. Sie ist die häufigste Ursache für Erblindung in diesem Patientenkollektiv. Kennzeichnend sind Mikroaneurysmen und Hämorrhagien der

retinalen Gefäße. Außerdem kommt es durch Gefäßverschlüsse zu Vernarbungen und Exudaten auf der Netzhaut. Im Verlauf führt eine Neovaskularisierung der Netzhaut und angrenzender Glaskörperanteile zu Glaskörperblutungen und schließlich zur Netzhautablösung.

Therapeutisch ist in erster Linie die Prävention durch akkurate Stoffwechseleinstellung und Hypertonuskontrolle erfolversprechend. Eine frühzeitige Behandlung der Nephropathie mit ACE-Hemmern kann hier die Progression verlangsamen [52]. Die Retinopathie sollte möglichst nach Früherkennung durch Laserkoagulation behandelt werden.

Die diabetische Neuropathie präsentiert sich meist als symmetrische, distale Neuropathie, die fast ausschließlich sensorischen Nervenfasern der unteren Extremität betrifft. Es handelt sich hierbei um die wahrscheinlich häufigste Langzeitkomplikation des Diabetes mellitus. Mehrere große Studien zeigen, dass ca. 50% der Dm Patienten im Laufe der Erkrankung eine Neuropathie entwickeln [53, 55]. Es kommt dabei zu einer distal beginnenden Axonschädigung, die sich in einem als „dying back“- bezeichneten Muster nach proximal ausbreitet [54]. Die Pathogenese ist noch nicht vollständig geklärt. Es scheint ein Zusammenwirken von metabolischen Faktoren und ischämischen Vorgängen für die neuronale Schädigung verantwortlich zu sein. Durch die Hyperglykämie kommt es zur intrazellulären Anhäufung von Metaboliten und zur Veränderung von Molekülen, die zu einer erhöhten Anfälligkeit für oxidativen Stress führt. Eine Mikroangiopathie der Vasa nervorum führt zusätzlich zur hypoxisch-ischämischen Belastung der Neurone [55]. Die Patienten werden durch progrediente Hypo-, Dys- und Parästhesie der distalen Unterschenkel und Füße beeinträchtigt. Durch Verlust der propriozeptiven Neurone des Fußes kommt es häufig auch zur Ataxie. Seltener betrifft die Neuropathie auch das autonome Nervensystem und die Patienten entwickeln Symptome der inneren Organe. Therapeutisch steht die Progressionsverminderung durch akkurate Blutzuckereinstellung und Behandlung des Metabolischen Syndroms bei Dm Typ 2 Patienten im Mittelpunkt. Zur symptomatischen Therapie kommen diverse Schmerzmittel, Antidepressiva sowie Antikonvulsiva zum Einsatz [56].

1.4 Epidemiologische Aspekte des Diabetes mellitus und seinen Folgeerkrankungen

Die Prävalenz für Diabetes Mellitus beträgt in Deutschland momentan 6,91%. In konkreten Zahlen bedeutet dies, dass derzeit 5,5 Mio. Patienten an Diabetes leiden. Es ist eine Zunahme der Erkrankungshäufigkeit zu beobachten. Die Prävalenz für Diabetes mellitus stieg in der BRD von ca. 6,0% im Jahre 1998 auf ca. 6,91% im Jahre 2001 und es ist davon auszugehen, dass sich dieser Trend fortsetzt [57]. Dabei leiden ca. 90-95% der Patienten an einem Dm Typ 2. Der Dm Typ 1 betrifft ca. 5% der Diabetiker. Dies entspricht in etwa einer Prävalenz von 0,3% beziehungsweise ca. 200.000 Patienten in Deutschland [57]. Weitere 5-15% werden dem MODY (Maturity onset Diabetes of the Young = LADA - late onset Diabetes in adults) zugerechnet [58].

Diabetes Mellitus geht mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität und aufgrund der Akut- und Langzeitkomplikationen mit einer erhöhten Morbidität und einem erhöhten Mortalitätsrisiko einher [59]. Maßgeblich sind es die angiopathischen Veränderungen, die die hohe Morbidität unter Diabetikern ausmachen. Das rR für makro- und mikrovaskuläre Erkrankungen ist gegenüber Gesunden deutlich erhöht. Eine 1993 durchgeführte Studie zeigte die Odds-Ratios für angiopathische Komorbiditäten bei Diabetikern (siehe Tabelle 1) [60].

Tabelle 1

Komorbidität	Odds Ratio	95 %iges KI
KHK	3,32	3,12 - 3,53
Periphere arterielle Verschlusskrankheit	3,14	2,79 - 3,53
Zerebrovaskuläre Erkrankungen	2,26	1,94 - 2,62
Arterielle Hypertonie	2,83	2,71 - 2,9
Augenerkrankungen	3,1	2,94 - 3,27
Nierenerkrankungen	4,63	3,86 - 5,54
Periphere Nervenerkrankungen	2,26	1,98 - 2,58

Angiopathische Komorbiditäten durch Diabetes mellitus (aus Rendell et al. 1993 [60])

Zwischen den verschiedenen Diabetes Typen existieren jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich des Risikos und der Prävalenz der o.g. Komorbiditäten. Dies kann anhand von zwei Studien zur Koronaren Herzerkrankung unter Diabetikern verdeutlicht werden: In der EURODIAB IDDM Complications Study lag die Prävalenz einer koronaren Herzerkrankung bei Patienten mit Typ 1 Diabetes bei 9% für Männer und 10% für Frauen [61]. In der Paris Prospective Study betrug die Prävalenz der koronaren Herzerkrankung bei Typ 2 Diabetikern ca. 40% für Männer und ca. 45% für Frauen [62]. Das Risiko für eine koronare Herzerkrankung nimmt sowohl bei Patienten mit Typ 1 als auch mit Typ 2 Diabetes mit der Diabetesdauer zu [63]. Die assoziierte periphere arterielle Verschlusskrankheit und das Diabetische Fußsyndrom tragen ebenfalls stark zur Morbidität der Diabetespatienten bei. Die Prävalenz von Fußamputationen lag z.B. in Jena für Patienten mit Typ 1 Diabetes bei 3 Prozent und für Patienten mit Typ 2 Diabetes bei 4 Prozent [64]. Die Inzidenz für Fußamputationen bei Diabetikern liegt dementsprechend zwischen 209,2 und 720 pro 100.000 Personenjahre. Für Personen ohne Diabetes mellitus liegt die Inzidenz zwischen 9,4 und 16 pro 100.000 Personenjahre. Nach Hochrechnung von Krankenkassendaten werden in Deutschland jährlich 26 000 Amputationen der unteren Extremitäten aufgrund des Risikofaktors Diabetes mellitus (60 bis 70% aller Amputationen) durchgeführt [65].

Die diabetische Mikroangiopathie der Niere (diabetische Glomerulosklerose) ist die für den Diabetespatienten selbst, als auch für das Gesundheitssystem wohl schwerwiegendste Langzeitkomplikation. Das erste klinische Zeichen der Nephropathie ist die Mikroalbuminurie (von 30 bis 299 mg/24h). Eine Mikroalbuminurie ist bei 30 bis 40% der Patienten mit Dm Typ 1 nachweisbar [66]. Ohne spezifische Intervention entwickeln bis zu 80% der Typ 1 Diabetiker mit Mikroalbuminurie innerhalb von 10 bis 15 Jahren eine Makroalbuminurie (>300 mg/dl/24h), von denen etwa die Hälfte innerhalb von 10 Jahren eine terminale Niereninsuffizienz aufweist [67]. Jedoch scheint in den nordeuropäischen Ländern die Inzidenz der Mikroalbuminurie und Nephropathie bei Dm Typ1 in den letzten 2 bis 3 Jahrzehnten aufgrund einer verbesserten Behandlung (HbA1c, Blutdruck) rückläufig zu sein [68;69]. Bei Dm Typ 2 ist aufgrund der langen präklinischen Phase und des altersbedingten höheren Risikos für andere Nierenerkrankungen eine

Mikroalbuminurie häufig bereits bei Diagnosestellung nachweisbar (United Kingdom Prospective Diabetes mellitus Study; UKPDS: 7 %) [70]. Trotzdem ist die Erkrankung z.B. in den USA in 34 % aller neu aufgetretenen Fälle für die terminale Niereninsuffizienz verantwortlich [71]. Dies macht die diabetische Nephropathie zur häufigsten Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz. Solche Verhältnisse sind in ähnlichen Größenordnungen sicherlich auch für Deutschland gültig. Diabetes mellitus stellt eine der großen Herausforderungen für die Gesundheitssysteme dar, zumal die Behandlung des Diabetes mellitus sehr kostspielig ist. Bis zu 25% der Ausgaben in Gesundheitssystemen müssen allein für diese Patientengruppe aufgewendet werden [72].

1.5 Therapie

Im Gegensatz zu Dm Typ 2, der durch die Insulinresistenz und den relativen Insulinmangel charakterisiert ist, besteht bei Dm Typ 1 ein absoluter Insulinmangel. Dieser macht die exogene Insulinsubstitution unbedingt notwendig. Die Insulinsubstitution bei Dm Typ 1 setzt sich aus dem Einsatz von Langzeit- oder Intermediärinsulinen zur Deckung des basalen Insulinbedarfs und der Verwendung von variabel angepassten, kurzwirksamen Insulinen zur Vermeidung von Blutzuckerspitzen nach den Mahlzeiten zusammen. Immer häufiger kommen auch automatische Insulinpumpen zum Einsatz. Die Therapieziele sind in erster Linie die Erhaltung und Verbesserung der Lebensqualität der Patienten und die Vermeidung und Verzögerung von Komplikationen und Folgeerkrankungen [73].

Als Parameter zum Verlaufsmonitoring wird das glykosilierte Hämoglobin HbA1c verwendet. Es dient zur Abschätzung der mittleren Blutglukosekonzentration während der vergangenen 8-12 Wochen [74]. Blutzuckerspitzen werden durch das HbA1c-Monitoring jedoch nicht erkannt. Zur Anpassung der basalen und postprandialen Insulinsubstitution muss regelmäßig mehrmals pro Tag die Blutglukosekonzentration bestimmt werden [73]. Richtwert für die Blutglukosekonzentration ist ein Zielbereich von 80–140 mg/dl (4,5–7,8 mmol/l). Für den HbA1c Wert gilt ein Optimalbereich von <7,5%. Eine Neuanpassung der Therapie wird bei Abweichungen von >1,2% des oberen Labornormwerts notwendig.

Generell gilt es, den Blutzuckerspiegel und HbA1c-Wert so niedrig zu halten wie es ohne das Auftreten von schweren Hypoglykämien möglich ist [73].

1.5.1 Die Pankreastransplantation als Therapieoption bei Diabetes mellitus

Durch eine intensivierete Insulinsubstitution und durch die konsequente Vermeidung von Hyperglykämien kann die Morbiditätsrate von Typ 1- Diabetikern signifikant gesenkt werden [75]. Dementsprechend sollte eine kontinuierliche, an den Blutzuckerspiegel adaptierte Insulinsubstitution als Idealthherapie angestrebt werden. Diese intensive Therapie ist zwar hinsichtlich der o.g. Morbiditätsreduktion sehr effektiv, birgt jedoch die Gefahr von Hypoglykämien und bedarf ein hohes Maß an Patientencompliance. Bisher ist eine ideale Blutzuckereinstellung ohne Hypoglykämiegefahr nur durch die Pankreastransplantation zu erreichen.

Die weltweit erste Pankreastransplantation wurde 1966 an der Universität von Minnesota durchgeführt. Es war eine kombinierte Nieren-Pankreastransplantation (Simultaneous Pancreas Kidney transplantation = SPK) [76]. Seither wurden weltweit über 23.000 Pankreata transplantiert. Die Indikationen für eine Pankreastransplantation sind laut American Diabetes Association das Langzeitversagen der intensivierten Insulinsubstitutionstherapie oder/und klinische oder psychische Probleme mit der exogenen Insulinsubstitution [77]. Meist wird die Pankreastransplantation simultan mit einer Nierentransplantation durchgeführt, da durch die Nierentransplantation die Indikation zur Immunsuppression bereits gegeben ist und so die Pankreastransplantation in diesem Kontext ein vertretbares Risiko mit deutlichem Benefit für den Patienten darstellt. Neben der SPK sind die Pankreastransplantation nach einer bereits erfolgten Nierentransplantation (Pancreas After Kidney = PAK) sowie die alleinige Pankreastransplantation (Pancreas Transplantation Alone = PTA) weitere Möglichkeiten. Vor allem die PAK und die PTA haben in den letzten Jahren anteilsmäßig zugenommen. Die relative Häufigkeit für PAK und PTA lagen 2003 in den USA z.B. bei 25%, bzw. 7%. Die SPK wurde aber mit einem Anteil von 60% nach wie vor am häufigsten durchgeführt [78].

Tabelle 2

	SPK	PAK	PTA	Gesamt
Überleben 1Jahr (%)	98	95	95	95
Überleben 3Jahre (%)	-	-	-	88
Transplantatfunktion 1 Jahr (%)	85	78	76	85
Transplantatfunktion 3 Jahre (%)	-	-	-	62

1- und 3 Jahres Überleben für Patienten nach simultaner Pankreas-Nieren Transplantation (SPK), nach Pankreas- nach Nierentransplantation und alleiniger Pankreastransplantation, sowie die 1- und 3- Jahresraten für die Funktion des jeweiligen Transplantats. (International Pancreas Transplantation Registry (IPTR) update 2003)

Die Ziele der Pankreastransplantation, die Insulinunabhängigkeit und die stabile normoglykämie Stoffwechsellage werden inzwischen in fast allen Patienten erreicht (siehe Tabelle 2) [78]. Dies wirkt sich positiv auf die Lebensqualität der Patienten aus und es ist ein protektiver Effekt auf die (Transplantat-) Nieren der Diabetes-Patienten festzustellen [79;80]. Zudem wurde eine Verbesserung der diabetischen Neuropathie festgestellt [81].

Die Langzeit-Transplantatfunktion und die mit der Transplantation assoziierte Mortalität bewegen sich in der heutigen Zeit in einem vertretbaren Rahmen (siehe Tabelle 2).

Dennoch ist festzustellen, dass das mit einer solitären Pankreas Transplantation (PAK und PTA) assoziierte relative Mortalitätsrisiko im Vergleich mit einer Kontrollgruppe (auf der Warteliste) signifikant erhöht ist! In einer Studie hierzu ergab sich für die PAK- bzw. PTA-Gruppe ein relatives Mortalitätsrisiko von 1,42 bzw. 1,57. Die SPK-Gruppe hatte ein relatives Mortalitätsrisiko von 0,43 [82]. Doch auch im Vergleich von SPK-Patienten mit Patienten, die sich nur einer Nierentransplantation (Kidney Transplantation Alone = KTA) unterzogen haben, fällt eine verminderte Überlebenschance in der SPK-Gruppe auf (83- vs. 92% in der SPK- bzw. KTA-Gruppe). Die SPK-Patienten verstarben dabei meist an Myokardinfarkt, Sepsis und chirurgischen Komplikationen [83].

Für SPK-Patienten wurde zudem eine, im Vergleich mit KTA-Patienten deutlich erhöhte Morbidität festgestellt. SPK Patienten sind nach der Transplantation durchschnittlich 23 Tage länger im Krankenhaus, werden im ersten Jahr öfter

rehospitalisiert (75%) und benötigen häufiger chirurgische Interventionen(19%) [84; 85].

Die Komplikationen der solitären und kombinierten Pankreastransplantation lassen sich in frühe und späte Komplikationen stratifizieren. Die frühen Komplikationen sind häufig technischer Natur und können meist mit dem (bei SPK und PAK zusätzlichen) operativen Eingriff in Verbindung gebracht werden. Der Transplantatverlust durch technische Komplikationen tritt in ca. 8% der Pankreastransplantationen auf. Hierbei spielen vor allem Thrombose, Blutungen, Transplantatpankreatitis und lokale Infektionen eine Rolle [86]. Viele der Patienten leiden zudem unter Wundheilungsstörungen (23%), Hämaturie und Harnwegsinfekten (bei vesiculärer Drainage) (15%), abdominalen Abszessen (5%) und Ileus (5%).

Neben den technischen Komplikationen ist die erhöhte Morbidität auch durch systemische Komplikationen bedingt. Es handelt sich hier unter anderem um Infarkt (s.o.), Sepsis (s.o.), tiefe Venenthrombosen (18- vs. 6% in der SPK- bzw. der KTA-Gruppe) und Lungenembolien (4,7- vs. 1,7% in der SPK- bzw. der KTA Gruppe) [87].

Die Langzeitkomplikationen einer Pankreastransplantation sind einerseits virale Infektionen, die durch die für den Organerhalt notwendige Immunsuppression der Patienten begünstigt werden [88] und andererseits sind es metabolische Störungen. Diese treten jedoch nur bei vesiculärer Drainage des Pankreassekrets auf. Es kommt dabei zum Verlust des Bicarbonat haltigen Pankreassafts in den Urin, und somit zur metabolischen Azidose. Die Patienten leiden zudem unter Hyponatriämie und der konsekutiven Hypovolämie. Durch die Anastomose und Drainage des Transplantats an die enterale Passage (Jejunum oder Ileum) wird diese Komplikation vermieden [89].

Die Pankreastransplantation bei Diabetes mellitus ist eine weltweit anerkannte und heutzutage übliche Therapieoption. Durch langjährige Erfahrungen und Entwicklungen auf dem Gebiet der Organtransplantation wurden die Mortalität und die Komplikationsrate stark abgesenkt.

Dennoch sind mit der Transplantation dieses „medikamentös-substituierbaren“ Organs Risiken verbunden, die nicht vernachlässigt werden können. Insbesondere die peri-operative Morbidität und Mortalität, sowie die Notwendigkeit zur lebenslangen Immunsuppression mit den damit verbundenen Nebenwirkungen und

Risiken müssen bei der Entscheidungsfindung kritisch beachtet werden. Es ist heutzutage durch die intensivierete Insulintherapie nach dem Basis-Bolus-Schema bzw. durch Verwendung von Insulinpumpen möglich, den Blutzuckerspiegel diabetischer Patienten weitestgehend im physiologischen Bereich zu halten. Wenn aber die konventionellen Therapieoptionen ausgeschöpft wurden bzw. sich als unzureichend erwiesen haben, hat die Pankreastransplantation einen wichtigen Stellenwert als Behandlungsmöglichkeit des Diabetes mellitus.

1.5.2 Die Inseltransplantation als Therapieoption bei Diabetes mellitus

Die schwerwiegenden Symptome und Komplikationen des Dm Typ1 werden durch eine Schädigung des endokrinen Anteils des Pankreas verursacht. Betroffen sind lediglich die Insulin produzierenden β -Zellen der Langerhansschen Inseln. Der gesamte exokrine Teil des Organs ist also im weitesten Sinne unbeteiligt. Um der Invasivität und den Komplikationen der Pankreastransplantation zu entgehen, wurde in den vergangenen 50 Jahren das Verfahren der Inseltransplantation (ITx) entwickelt. Dabei werden die Langerhansschen Inseln eines Spenderorgans durch enzymatischen Verdau aus dem exokrinen Gewebe gelöst, durch Gradientenzentrifugation aufgereinigt und dann dem Empfänger durch ein interventionell-radiologisches Verfahren transplantiert.

Die Idee zur Transplantation von β -Zell-haltigem Gewebe ist über 100 Jahre alt. 1893 transplantierte der Brite Dr. Watson Williams klein gehackte Pankreasfragmente eines frisch geschlachteten Schafs unter die Haut eines diabetischen Jungen. Tatsächlich wurde eine temporäre Verbesserung der Glukosurie festgestellt. Der Patient verstarb jedoch wenige Tage nach der Prozedur [90].

Den ersten Schritt zur Entwicklung des heute favorisierten Verfahrens machte Moskalewski 1965, der eine Methode zur Isolation von Inseln aus den Pankreata von Meerschweinchen erfand [125]. Ballinger und Lacy konnten daraufhin 1972 die erste erfolgreiche Insel-Transplantation im Tiermodell publizieren [91]. Zudem wurde offenbar, dass sich durch die Inseltransplantation auch diabetische Langzeitschäden verhindern bzw. zurückdrängen lassen [92]. Nachdem auch die Methode zur Isolation der Inseln weitere Verbesserungen erfuhr, wurden in den neunziger Jahren

erste experimentelle Inseltransplantationen am Menschen durchgeführt. Diese erfolgten sowohl im autologen als auch im allogenen Setting mit wechselndem Erfolg. Die Erfahrungen mit der neuen Methode waren äußerst gering und es bestand große Unsicherheit über die zu verwendende Inselmenge und über die Aufbereitung des Transplantats. Es wurden zwischen 100.000 und 1,2mio Inseln pro Patient verwendet [93;94] und die Inseln wurden auf unterschiedlichste Weise vorbehandelt; manche Wissenschaftler transplantierten inselhaltige Pankreasfragmente, andere verwendeten kryo-konservierte- oder umkapselte Inseln [95; 96; 97]. Einigkeit bestand hingegen in der Wahl des Transplantationsorts. Wie bei Ballinger und Lacy wurden auch beim Menschen die Inseln durch Infusion in die Pfortader in die Leber transplantiert [95; 96; 97; 98].

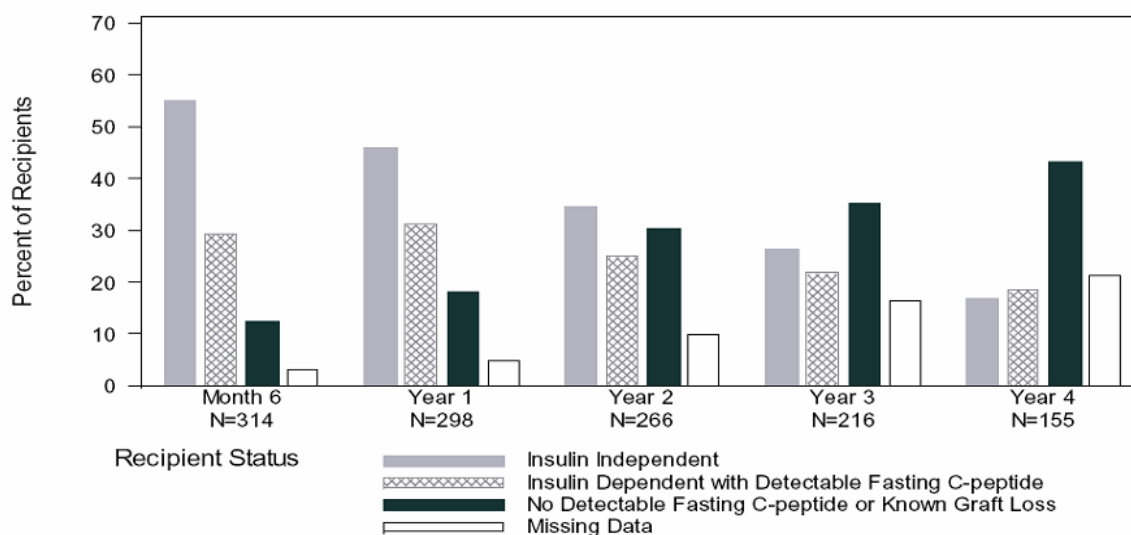
Die Erfolgsraten der Inseltransplantation waren bis zum Jahre 2000 unbefriedigend. Es wurde weltweit nur bei etwa 10% der Patienten eine längerfristige (1-Jahr) Transplantatfunktion erreicht [99]. Durch eine sorgfältige Auswahl der Patienten, durch Modifikation des immunsuppressiven Regimens und durch die Verwendung einer großen Inselmenge gelang es dann einer Gruppe in Edmonton, in allen teilnehmenden Patienten (n=7) eine längerfristige Transplantatfunktion und Insulinfreiheit zu erreichen. Der Erfolg dieses, heute als Edmonton-Protokoll bekannten Transplantationsprotokolls liegt in zwei grundlegenden Neuerungen begründet: Zunächst versuchten die o.g. Wissenschaftler die Insel-Toxizität des Immunspressions-Regimens durch den Verzicht auf Glukokortikoide und durch die Verwendung von Sirolimus, Tacrolimus und Daclizumab zu minimieren. Zudem wurde eine ausgesprochen große Inselzahl transplantiert. Jeder Patient erhielt im Durchschnitt 11.547 Inseläquivalente (IEq; Definition siehe S.33) pro Kilogramm Körpergewicht in multiplen Transplantationen [100].

In den folgenden Jahren wurden an immer mehr Zentren weltweit Inseltransplantationen nach dem Edmonton-Protokoll durchgeführt. Die initialen Erfolgsraten wurden besser und besser, aber der durchschlagende Erfolg der Originalstudie konnte leider nicht reproduziert werden. Im Jahr 2005 publizierten die Autoren des Edmonton-Protokolls eine 5-Jahres follow-up Studie mit einer 1-Jahres Erfolgsrate (Insulinunabhängigkeit!) von über 70%. Die 5-Jahres-Erfolgsrate betrug jedoch nur etwa 10%. Immerhin konnte auch 5 Jahre später, noch eine partielle

Transplantatfunktion, gemessen am C-Peptidspiegel, in ca. 80% der Patienten festgestellt werden [101].

Die aktuellsten Zahlen zu Inseltransplantationen weltweit, werden jedes Jahr vom Collaborative Islet Transplant Registry (CITR), dem zentralen Insel-Transplantationsregister der USA publiziert. Laut des CITR wurden im Zeitraum von 1999 bis zum Jahr 2008 weltweit 828 allogene, meist multiple Inseltransplantationen an 412 Patienten durchgeführt. Von diesen Patienten waren ein halbes Jahr nach ihrer letzten ITx 55% insulinunabhängig. Nach 4 Jahren waren es noch 16%. Ein primäres Transplantatüberleben, gemessen am C-Peptidspiegel konnte nach 4 Jahren in immerhin noch 19-31% der Patienten nachgewiesen werden [102] (siehe Grafik 1).

Grafik 1



Insulinunabhängigkeit, Insulinabhängigkeit, oder Nicht-Vorhandensein von C-Peptid nach der letzten Inseltransplantation in ITx-Patienten. (2009 Scientific Summary of the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR))

Es konnte ebenfalls ein signifikanter Rückgang schwerwiegender Hypoglykämien nach ITx festgestellt werden, sowie ein deutliches Absinken des Langzeitparameters HbA1c. Als gemeinsamer Endpunkt betrachtet, stieg der Anteil von ITx-Patienten mit HbA1c-Werten < 6,5% und ohne schwerwiegende hypoglykämische Episode von 2% vor ITx, auf 50-60% ein Jahr nach ITx. Dieser Anteil sank zwar nach 4 Jahren auf 20-45%, liegt aber dennoch weit über dem Ausgangswert. Es wurde außerdem ein Rückgang der sog. Hypoglycaemia-Unawareness, dem Unvermögen eine Hypoglykämie zu spüren festgestellt [102].

Rückblickend sind im letzten Jahrzehnt große Fortschritte auf dem Gebiet der Inseltransplantation gemacht worden. Es hat sich gezeigt, dass initiale Insulinunabhängigkeit in einem großen Teil der Patienten erreicht werden kann und dass unter idealen Bedingungen auch Langzeiterfolge möglich sind. Die Patienten profitieren außerdem vom positiven Einfluss der transplantierten Inseln auf den HbA1c-Wert und die Verhinderung von schwerwiegenden Hypoglykämien.

1.5.3 Problematik der Inseltransplantation

Seit dem Jahr 2000, als in Edmonton erstmals in mehreren Patienten Insulinfreiheit erreicht wurde ist bekannt, dass ein entscheidender Aspekt für den Erfolg der ITx die Transplantation einer sehr großen Anzahl an Inseln ist. Eine Anzahl von 10.000 IEq/kg Körpergewicht (KG) wird derzeit als notwendige Mindestmenge angesehen [100]. In den vergangenen 10 Jahren wurden laut CITR im Durchschnitt 842.000 IEq pro Patient, bzw. 13.000 IEq/kg KG, in mehreren, konsekutiven Prozeduren transplantiert [102]. Eine gute Isolationsprozedur liefert pro Spenderpankreas zwischen 300.000 und 600.000 IEq [103]. Somit sind zum Erreichen der notwendigen Inselmenge für eine erfolgreiche ITx derzeit mindestens 2-3 geeignete Spenderorgane notwendig [106].

Bei breiterer klinische Etablierung der Inseltransplantation als Therapie des DM Typ 1 könnte dieser hohe Bedarf an Spenderorganen schnell zu einer Organknappheit führen. Außerdem steigt mit jeder konsekutiven allogenen Transplantation die Antigenlast des Patienten und kann zur Hyperimmunisierung und somit zur Limitation der weiteren Transplantierbarkeit des Patienten führen [104].

Im gesunden menschlichen Pankreas finden sich ca. 1 mio Langerhansscher Inseln, die die Glukosehomöostase des Organismus aufrechterhalten. Untersuchungen an Patienten nach partieller Pankreatektomie haben aber gezeigt, dass auch ein Bruchteil dieser Inseln für einen euglykämien Stoffwechsel ausreichend sein kann. Es existieren hierbei zwar interindividuelle Unterschiede, jedoch wird allgemein davon ausgegangen, dass 10-20% der endogenen Inseln ausreichend sind [105]. Dies entspricht, wenn von einer physiologischen Inselmenge ausgegangen wird, etwa 100.000 – 200.000 Inseln.

Weshalb ist es also nötig, bei der ITx derart viele Inseln zu transplantieren um erfolgreich zu sein?

Um diesen Sachverhalt zu erklären ist es zweckmäßig, zunächst die Anatomie der Langerhansschen Inseln zu beschreiben:

Es handelt sich um kugelige Zellhaufen von durchschnittlich 50-400 μm Durchmesser. Neben den β -Zellen (65-80%) enthalten die Inseln die Glucagon produzierenden α -Zellen (15–20 %), Somatostatin produzierende δ -Zellen (3–10 %), pankreatisches Polypeptid enthaltende PP-Zellen und Ghrelin enthaltende Ghrelin- oder ϵ -Zellen. Die Blutversorgung der Inseln erfolgt über mehrere Arteriolen, die sich sphärisch innerhalb der Insel aufzweigen.

Beim Isolationsvorgang werden die Inseln durch Enzyme aus dem umgebenden Gewebe herausgeschnitten. Dabei werden sowohl Bindegewebsfasern als auch die versorgenden Blutgefäße durchtrennt. Die Inseln sind also komplett avaskulär und somit zunächst ausschließlich auf die Versorgung durch Diffusion angewiesen. Zudem sind sie durch den zytotoxischen und hypoxischen Stress der Isolation äußerst anfällig für weitere Schäden. Innerhalb der ersten Stunden und Tage nach der Infusion der Inseln in den Pfortaderblutstrom und die Embolisation in die Sinusoide der Leber, kommt es zum Zugrundegehen eines Großteils (ca. 70%) der transplantierten Inseln [106].

Für dieses initiale Absterben der Transplantate (early graft loss) sind ein Reihe unspezifischer Reaktionen verantwortlich, die zumeist mit dem Transplantationsort Leber in Verbindung gebracht werden können.

Vier Faktoren spielen höchst wahrscheinlich eine Schlüsselrolle.

Oxygenierung:

Die Langerhansschen Inseln des Pankreas sind sehr gut durchblutete Areale mit hohem Sauerstoffbedarf. Obwohl die Inseln nur einen Anteil von 1-3% an der Gesamtmasse des Pankreas haben, erhalten sie bis zu 15% des arteriellen Blutstroms [107]. Sie sind von einem komplexen Gefäßnetz ähnlich einem Glomerulum durchzogen [108]. Bei der Isolation der Inseln aus dem Spenderpankreas werden diese Gefäßverbindungen enzymatisch zerstört. Die Revaskularisierung im Empfängerorganismus erfolgt erst nach 9-14 Tagen [109]. Somit sind die Inseln in der Initialphase auf die Diffusion von Sauerstoff aus dem

umgebenden Blut und Gewebe angewiesen. Das Pfortaderblut weist jedoch einen, im Vergleich zum arteriellen-, deutlich verminderten Sauerstoffpartialdruck auf [110]. Eine hypoxische Schädigung scheint daher ein maßgeblicher Faktor für das Versagen und Absterben eines großen Anteils der transplantierten Inseln zu sein [106]

IBMIR (Instant Blood mediated Incompatibility Reaction):

Die Inseln werden bei der klinischen Transplantation nach perkutaner Pfortaderpunktion über einen Katheter direkt in den Blutstrom injiziert. Es kommt hier zu einer sog. Instant Blood mediated Incompatibility Reaktion, also zu einer unspezifischen Initialreaktion der Blutbestandteile gegen das Fremdmaterial. Die in-vitro Inkubation von syngenen Inseln in nicht-antikoaguliertem Blut hat gezeigt, dass es zu einer sofortigen Gerinnungsaktivierung an der Inseloberfläche kommt. Diese ist auf Kollagenresiduen auf der Inseloberfläche und durch die autochtone Expression von Tissue-Factor durch die Inselzellen zu erklären. Die Aktivierung des Gerinnungssystems hat eine Thrombusbildung um die Inseln zur Folge. Der Thrombus vermindert als Diffusionsbarriere die Versorgung der Inseln zusätzlich. Außerdem führt eine durch die Inselzellen initiierte Komplementaktivierung zur weiteren Schädigung. [111]

Interaktion mit Kupfferzellen:

Als ortsständige Makrophagen stellen die Kupfferzellen (Kupffersche Sternzellen) eine wesentliche immunologische Barriere auf zellulärer Ebene bei der ITx in die Leber dar. Es wird von einer unspezifischen Reaktion der Kupfferzellen gegen die Inseltransplantate ausgegangen [112,113]. Durch experimentelle Hemmung der Kupfferzellen konnte ein signifikant verlängertes Überleben von Inseltransplantaten gezeigt werden [114].

Belastung mit Metaboliten:

Die transplantierten Inseln embolisieren meist in die Lebersinusoide. Dort werden sie konstant von Pfortaderblut umspült und sind dadurch einer hohen Konzentration von Metaboliten und (u.a. immunsuppressiven-) Pharmaka aus dem Intestinum ausgesetzt [115]. Eine hohe Konzentration an Nährstoffen (hauptsächlich Fettsäuren

und Aminosäuren) stimuliert eine übermäßige Insulinsekretion. Gerade in den ersten Tagen nach der Implantation könnte diese Belastung ein wichtiger Faktor für das Zugrundegehen der Inseln sein. Eine Depletion an Energie- und Redoxäquivalenten durch die übermäßig stimulierte Insulinsynthese ist denkbar. Außerdem wurde gezeigt, dass die übermäßige Insulinsekretion der transplantierten Inseln eine exzessive Lipogenese der umgebenden Hepatozyten stimuliert. Die Hydrolyse des entstandenen Fettes führt zu einer Überflutung der Inselzellen mit Fettsäuren. Diese Lipotoxizität trägt zusätzlich zum Verlust der Inseln bei [116].

Operatives Risiko:

Nicht zu Letzt birgt die intraportale Inseltransplantation auch ein operatives Risiko. In einer Studie der Edmonton-Gruppe wurde eine Komplikationsrate von 18% ermittelt. Die Akutkomplikationen sind Pfortaderthrombose, Leberhämatome und intraabdominelle Blutungen [117].

Entsprechend der oben genannten Faktoren sind in jüngster Zeit Zweifel an der Eignung der Leber als Transplantationsort aufgekommen [118]!

Durch eine Variation des Transplantationsorts könnten viele der oben genannten Faktoren des early graft loss vermindert oder vermieden werden.

Dementsprechend sollte ein idealer Transplantationsort folgenden Anforderungen entsprechen:

- ein stark vaskularisiertes und gut durchblutetes Gewebe mit einem hohen interstitiellen Sauerstoffpartialdruck
- ein hoch regeneratives Gewebe mit dem Potential zur Revaskularisierung und zur Neoangiogenese
- ein Gewebe mit der Möglichkeit zur risikoarmen, extravasalen Inselapplikation
- ein Gewebe mit möglichst geringem immunreaktiven Potential

Es wurden schon viele unterschiedliche Organe und Gewebe hinsichtlich ihrer Eignung zur Inseltransplantation untersucht. So ist z.B. die ITx unter die Organkapsel der Niere eine weit verbreitete experimentelle Praxis mit guten Ergebnissen in Nagetieren, jedoch ohne Anwendbarkeit in Menschen [119]. Auch die subkutane und intramuskuläre Transplantation von Inseln haben sich bisher nicht erfolgversprechend gezeigt [120]. Die Transplantation von Inseln unter die

Organkapsel des Pankreas zeigte sich zunächst vielversprechend, benötigt jedoch weitere Erforschung und ist mit einem hohen Risiko für Nachblutungen und posttraumatischer Pankreatitis verbunden [121].

1.5.3.1 Das Knochenmark als Transplantationsort

Als neuer, alternativer Transplantationsort wurde in dieser Arbeit das Knochenmark hinsichtlich seiner Eignung zur Inseltransplantation untersucht. Es besitzt alle grundlegenden Eigenschaften eines idealen Transplantationsorts (siehe 1.5.3). Es ist ein stark vaskularisiertes Gewebe; die versorgenden Gefäße durchbrechen die Compacta des Knochens und fächern sich im Markraum zu einem dichten Netz von sinusoidalen Gefäßen auf. Es ist ein äußerst gut durchblutetes Gewebe mit einem ausreichenden interstitiellen Sauerstoffpartialdruck [122;123]. Die Regenerationsfähigkeit und Plastizität des Knochenmarks ist allgemein bekannt. Ein weiterer, für die Inseltransplantation sehr interessanter Aspekt ist ein mögliches Immunprivileg des Knochenmarks. Es wird angenommen, dass regulatorisch T-Zellen bevorzugt das Knochenmark bevölkern und somit Immunreaktionen im Knochenmark gemäßiger ablaufen als in anderen Geweben [124]. All diese Faktoren lassen das Knochenmark als ideales Empfängergewebe zur Inseltransplantation erscheinen. Außerdem ist es im menschlichen Körper an vielen Stellen gut und mit geringem Komplikationsrisiko zu erreichen

1.6 Fragestellung

In dieser Arbeit sollte die grundsätzliche Eignung des Knochenmarks als Zielort zur Inseltransplantation erforscht werden. Dazu musste zunächst ein geeignetes Tiermodell sowie eine geeignete Methode gefunden werden. Es wurden dann Inseln ins Knochenmark der Tiere transplantiert, diese wurden beobachtet und es wurden histologische Präparate gewonnen, die eine augenscheinliche Beurteilung der Transplantate ermöglichten.

Auf folgende Fragen sollten mit dieser Arbeit Antworten gefunden werden:

- 1.) Welche Methode ist geeignet, um die nach der Isolation äußerst vulnerablen Inseln unbeschadet und in ausreichender Zahl ins Knochenmark der Versuchstiere zu applizieren?
- 2.) Wird das Knochenmark durch die Applikationsprozedur nachhaltig geschädigt?
- 3.) Sind die Inseln nach der Transplantation im Knochenmark wieder auffindbar und überleben sie eine relevante Zeitspanne im Knochenmark?
- 4.) Wie reagiert das Knochenmark auf das Fremdgewebe?
- 5.) Welchen Einfluss hat die Inseltransplantation ins Knochenmark auf den pharmakologisch induzierten Diabetes der Versuchstiere?

2 Material und Methoden

2.1 Inselisolation im Nagetiermodell

Die Inselisolation im Nagetiermodell ist eine, seit vielen Jahren weltweit etablierte Methode. Ursprünglich wurde sie von Moskalewski im Jahr 1965 für Meerschweinchen entwickelt [125]. Lacy und Kostaniowsky (1967), sowie Gotoh (1990) modifizierten und verbesserten die Methode und verwendeten sie dann zur Inselisolation im Rattenmodell [126;127]. Das in dieser Arbeit verwendete Isolationsprotokoll wurde von Camillo Ricordi und Luis A. Fernandez, basierend auf den o.g. Konzepten entwickelt.

2.2 Spendertiere

Als Spendertiere wurden ca. 250g schwere, männliche Ratten des Inzuchtstammes Lewis (LEW/Crl) mit dem MHC Halotyp RT1A' verwendet. Diese stammten von der Firma Charles River in Sulzfeld, Deutschland. Das o.g. Gewicht der Tiere entspricht einem Alter von ca. 8 Wochen. Die Tiere wurden im Tierstall des Zentrums für präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München bei 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70-80% untergebracht. Der Tag/Nacht Rhythmus entsprach jeweils 12 Stunden. Es bestand freier Zugang zu Wasser und zu Futter (Altromin, Lage; Haltungsdiät für Ratten und Mäuse 1324 TPF).

Die Spendertiere wurden 12 Stunden vor der Inselisolation nüchtern gestellt, wobei der Zugang zu Wasser uneingeschränkt blieb.

2.3 Inselisolation

2.3.1 Chemikalien und Lösungen

- Ketavet® 100 ad us. vet., Injektionslösung Pfizer Tiergesundheit
- Rompun® 2% ad us. vet., Injektionslösung Provet
- Hanks balanced salt solution (HBBS) Sigma
- Fetales Kälberserum (FBS) Lonza
- 1M HEPES Puffer Sigma

- Penicillin / Streptomycin Biochrome
- Deoxyribonuclease I (DNase I) Roche
- Collagenase 5 Sigma
- CMRL 1066 Cellgro Mediatech
- Ficoll Gradients (1,108g/cm³, 1,096g/cm³, 1,037g/cm³) Cellgro Mediatech
- Dithizone (DTZ) Sigma
- Dimethylsulfoxide (DMSO) Sigma
- Isofluran (Forene) Abbott
- Cutasept Bode
- 1 X PBS Biochrome

2.3.2 Chirurgische Instrumente und Verbrauchsmaterialien

- Abdecktücher Secu-Drape Sengewald
- Mulltupfer Askina
- Mullkompressen Askina
- Baumwolltupfer (Q-Tips) Medchrom
- Leukosilk Tape schmal Beiersdorf
- Sterile Handschuhe Cardinal Health
- Mundschutz Meditrade
- 10 ml Spritzen Braun
- 1 ml Insulinspritzen Braun
- PE 50 Polythene Schlauch Smiths Medical
- Kanülen, stumpf (23 G) Dispomed
- Cooperschere, fein Braun (Aesculap)
- Microschere, gerade Braun (Aesculap)
- Pinzette, chirurgisch, fein Braun (Aesculap)
- Pinzette, anatomisch, fein Braun (Aesculap)
- Pinzette, gebogen, fein Braun (Aesculap)
- Bulldogklemmen, fein, 2 Stk. Braun (Aesculap)

2.3.3 OP Ausstattung

- Anaesthesiegerät für kleine Säugetiere (Isotec III) Völker GmbH,
- Narkosekammer für kleine Säugetiere Völker GmbH,
- Operationsmikroskop Zeiss
- Operationstisch Gaymar
- Behältnis für Eis

2.3.4 Laborausstattung

- Beheizbares Wasserbad mit Shaker Thermo Haake
- Invertiertes Mikroskop (Axiovert 25) Zeiss
- Zentrifuge (Rotanta 460R) Hettich
- Flowbench (Hera Safe) Heraeus
- 5% CO₂/O₂ Tank Westfalen
- 200 ml Nalgene Behälter Nalgene Labware
- Zellsieb (400 µm Maschengröße) Sigma
- Kollektor für Zellsieb Sigma
- Filtersysteme für Falcon Tubes (steriflip) Millipore
- Petrischalen BD Falcon
- Petrischalen mit Gitter Nalge Nunc
- Blasenspritzen 60 ml BD Plastipak
- Falcon Tubes 15 ml BD Falcon
- Falcon Tubes 50 ml BD Falcon

2.3.5 Vorbereiten der Lösungen

2.3.5.1 Ketamin/Xylazin Injektionslösung (Volumen für 1 Ratte)

- Aufziehen von 300 µl Ketavet-Lsg in eine Insulinspritze
- Aufziehen von 60 µl Rompun -Lsg in dieselbe Insulinspritze

2.3.5.2 Dissociation Buffer (25 mM HEPES /HBSS)

- Hinzufügen von 25 ml 1M HEPES zu 1l HBSS

- steril filtern
- auf Eis lagern

2.3.5.3 Quenching Buffer (HBSS, 10% FBS)

- Hinzufügen von 110 ml FBS zu 1 l HBSS
- steril filtern
- auf Eis lagern

2.3.5.4 Kultur Medium (CMRL 1066, 10% FBS, PenStrep)

Mischen folgender Chemikalien:

- 1 l CMRL 1066
- 110 ml FBS
- 5 ml Pen/Strep

2.3.5.5 Dithizon Lösung (DTZ)

- Abwiegen von 100 mg Dithizone (in einem 50 ml Falcon Tube)
- Hinzufügen von 10 ml DMSO
- Auffüllen mit 40 ml 1 X PBS
- Überführen der Lösung in eine Petrischale und aspirieren in eine 60 ml Perfusorspritze
- Aufsetzen eines 22 µl Filters

2.3.5.6 Enzymlösung (Volumen für 1 Ratte)

- Abwiegen von 15 mg Collagenase5
- Auflösen in 15 ml Dissociation Buffer
- Hinzufügen von 150 µl DNase I
- steril filtern
- auf Eis lagern

2.3.6 Vorbereitung für die Isolationsprozedur

Um die bestmögliche Qualität zu erreichen, muss der gesamte Arbeitsablauf der Inselisolation möglichst schnell durchgeführt werden. Es empfiehlt sich daher die Entnahme der Pankreata zu Zweit durchzuführen.

Die Enzymlösung (2.3.5.6) darf erst kurz vor der Präparation hergestellt werden, da es sich bei der Kollagenase um ein wärmelabiles und in Lösung sehr begrenzt haltbares Enzym handelt. Pro Tier stellt man 15 ml der Enzymlösung her. Davon werden 10 ml in eine 10 ml Spritze aufgezogen und 5 ml in einen 200 ml Nalgene Behälter vorgelegt. Sowohl der Nalgene Behälter, als auch die Spritzen müssen bis unmittelbar vor dem Gebrauch auf Eis gelagert werden.

Zur Injektion der Enzymlösung wird ein angespitzter, ca. 25 cm langer PE 50 Schlauch verwendet, der auf eine stumpfe 23 G Kanüle geschoben wird.

Die verwendete Zentrifuge muss vor Beginn der Digestion auf 4°C heruntergekühlt werden.

2.3.6.1 Präparation, Distention und Entnahme des Pankreas

Bei der Pankreasdistention wird die Enzymlösung retrograd über den Ductus pankreatikus injiziert. Die Azini des Pankreas blähen sich dadurch auf und das Gewebe wird bestmöglich mit der Enzymlösung inkubiert [127].

Die Narkose des Spendertieres wird mit Isofluran in der Narkosekammer eingeleitet. Nach beobachtetem Verlust der Stellreflexe wird das Spendertier durch eine intraperitoneale Injektion narkotisiert. Es wird die in der Veterinärmedizin und in der tierexperimentellen Forschung übliche intraperitoneale Ketamin- (Ketavet™), Xylazin- (Rompun™) Narkose verwendet (Ketamin 100 mg/kg KG; Xylazin 4 mg/kg KG). Es wird so eine Narkose von 20-30 Minuten erreicht. Durch die beschriebene Narkose wird eine völlige Anästhesie und Hypnose des Spendertieres erreicht. Nach Eintritt der Narkose und Abwarten eines Sicherheitszeitraumes wird die Organentnahme durchgeführt. Das Spendertier wird in Rückenlage mit dem Kopf in Richtung des Operateurs auf der OP-Unterlage mit Leukosilkstreifen fixiert. Es erfolgt die großzügige Desinfektion des Abdomens mit Cutasept. Durch eine mediane Laparotomie eröffnet man das Abdomen vom Xiphoid bis zur Blase. Das Xiphoid wird

mit einer kräftigen Schere abgetrennt, um einen besseren Zugang zum Leberhilus zu erreichen. Nun luxiert man vorsichtig das Darmpaket und platziert es auf einer feuchten Kompresse rechts außerhalb der Bauchhöhle. Mit einer anatomischen Pinzette wird das Duodenum angehoben. Im Gegenlicht lässt sich der Choledochus erkennen, der durch das Pankreasparenchym zur Vaterschen Papille zieht. Direkt proximal und distal der Mündungsstelle wird nun das Duodenum mit Bulldogklemmen abgeklemmt, um ein Abfließen der Enzymlösung in Darm oder Magen zu verhindern. Mit Hilfe einer sterilen Kompresse wird dann durch Druck auf das inferiore Sternum die Leber luxiert und nach kranial auf die Kompresse geklappt. Durch Auflegen eines Fingers fixiert man die Leber auf dem Brustkorb und exponiert den Leberhilus. Nun erfolgt eine Inzision mit der Mikroschere in den Duktus hepaticus communis (DHC) an einer augenscheinlich geeigneten Stelle (Bifurkation des DHC). Dort wird der an die mit Enzymlösung gefüllte Spritze angeschlossene und entlüftete PE 50 Schlauch mit dem angespitzten Ende in den DHC eingeführt und einige Millimeter in Richtung Duodenum vorgeschoben. Der Schlauch muss mit Hilfe einer Pinzette im DHC fixiert werden. Nun wird die Enzymlösung zügig injiziert. Das Pankreas bläht sich deutlich auf. Sobald die gesamte Lösung injiziert ist, wird das Pankreas zügig, aber vorsichtig präpariert und in den Nalgene Behälter mit der vorgelegten Enzymlösung überführt. Der Truncus coeliacus sollte direkt nach Distention abgesetzt werden um eine hämorrhagische Infarzierung des Pankreas zu vermeiden. Die übermäßige Kontamination mit Blut behindert später den Verdauungsvorgang. Die entnommenen Pankreata müssen bis zur Weiterbehandlung auf Eis gekühlt werden.

2.3.6.2 Digestion

Das Prinzip der Digestion ist es, die Pankreasinseln durch enzymatischen Verdau aus dem umgebenden Gewebe heraus zu lösen. Hierbei werden sowohl die kollagenen Faserstrukturen, die die Insel im Pankreasgewebe verankern, als auch die zu- und abführenden Blutgefäße gekappt.

Sind alle Pankreata im Nalgene Behälter gesammelt, werden sie für 5 Minuten mit einem 5% CO₂ / 95% O₂ Gasgemisch durchflutet. Dies erfolgt im o.g. Nalgene Behälter, gekühlt, durch eine an die Gasflasche angeschlossene Pipettenspitze.

Durch das Durchfluten werden die Flüssigkeit und das Gewebe maximal mit Sauerstoff inkubiert, um den hypoxischen Stress für die Inseln möglichst minimal zu halten.

Um dann den enzymatischen Verdau zu starten, platziert man den Nalgene Behälter in einem Wasserbad bei 37°C. Durch regelmäßiges Schwenken der Suspension im Gegenlicht wird der Verdau überwacht. Nach ca. 18 min bzw. nach einer ausreichenden Fragmentation des Gewebes stoppt man die Enzymaktivität durch Verdopplung des Volumens mit eisgekühltem Quenchingbuffer. Größere Gewebsfragmente werden durch mehrmaliges, langsames auf-und ab-Pipettieren mit einer 60 ml Blasenspritze (ohne Kanüle) zerkleinert. Im Anschluss daran wird die Suspension durch ein Zellsieb mit einer Maschengröße von 400 µm filtriert. Der Filtrerrückstand wird verworfen. Die gefilterte Gewebesuspension wird auf mehrere 50 ml Falcontubes aufgeteilt. Die Tubes werden mit gekühltem Quenchingbuffer bis zur 50 ml Marke aufgefüllt und dann bei 1000 RPM für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen. Die Tubes werden ein weiteres Mal mit Quenchingbuffer aufgefüllt und das Pellet wird sorgfältig resuspendiert. Es folgt eine weitere Zentrifugation bei 1000 RPM für 1 min. Dieser Vorgang dient dazu das Gewebe von Enzymrückständen zu reinigen.

2.3.6.3 Aufreinigung

Bei der Aufreinigung werden die Inseln mittels Zentrifugation in einem Dichtegradienten vom azinären Pankreasgewebe getrennt.

Es ist wichtig, die Lösungen und die Gewebssuspension beständig bei 4°C zu halten.

Nach dem zweiten „Waschgang“ (siehe 2.3.6.2) wird erneut der Überstand abpipettiert. Das Pellet wird nun in 11 ml des dichtesten Ficoll Gradienten (1,108 g/cm³) resuspendiert. Die Suspension wird dann vorsichtig mit 10 ml des zweiten (1,096 g/cm³) und des dritten Ficoll Gradienten (1,037 g/cm³) überschichtet. Die Gradienten bilden nun drei Phasen und dürfen sich keinesfalls vermischen! Die Tubes werden bei 2400 RPM für 4min bei 4°C zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge muss ausgeschaltet sein, um eine Vermischung der Gradienten zu

vermeiden. Die Inseln sammeln sich in der Phasengrenze zwischen den oberen beiden Schichten und können mit einer Pasteurpipette aufgenommen werden. Sie werden in einem 50 ml Falcontube gesammelt und dort mit angewärmtem (37°C) Kulturmedium für eine Minute bei 1000 RPM gewaschen. Nach dem Abnehmen des Überstandes wird das Inselpellet mit zunächst nur 40 ml Kulturmedium resuspendiert. Von dieser Suspension werden 3 repräsentative Aliquots (hier je 0,5 ml) zur Auszählung der Inseln abgenommen. Nach Bestimmung der im Aliquot enthaltenen Inseläquivalente (s.u.) kann die isolierte Gesamtmenge an Inseläquivalente näherungsweise bestimmt werden. Danach wird das Falcon Tube mit Kulturmedium aufgefüllt und ein zweites Mal gewaschen.

2.3.6.4 Quantifizierung der Inselmenge und Umrechnung in Inseläquivalente

Um zu gewährleisten, dass jedem Versuchstier eine äquivalente Anzahl an β -Zellen transplantiert wird, müssen die Inseln vor der Transplantation gezählt und in Inseläquivalente (IEq) umgerechnet werden. Hierzu werden nach dem ersten Waschgang (2.3.6.3) 3 repräsentative Aliquots als Stichproben entnommen. Diese werden in 3 gekennzeichnete Petrischalen mit Gitter verbracht und mit einigen Tropfen Dithizonlösung (2.3.5.5) vermischt. Die Auszählung erfolgt unter dem Invertierten Mikroskop (Zeiss Axiovert 25).

2.3.6.4.1 Inseläquivalent

Ratteninseln variieren in ihrer Größe zwischen 50 μm bis 400 μm . Um die Ausbeute an funktioneller β -Zellmasse quantifizieren und vergleichen zu können, bedarf es der Konversion der absoluten Anzahl der Inseln in die relative Einheit der Inseläquivalente (IEQ). Dabei entspricht ein Inseläquivalent einer sphärischen Inseln von 150 μm Durchmesser.

2.3.6.4.2 Identifikation der Inseln

Exokrines Pankreasgewebe ist lichtmikroskopisch transparent gelblich, wohingegen Inseln eine goldbraune Färbung aufweisen. Ebenfalls signifikant für Inseln ist die

sphäroide bis sphärische Form. Exogenes Pankreasgewebe ist hingegen asymmetrisch und fransig.

Dennoch werden die Inseln in den zur Quantifizierung abgenommenen Aliquots mit Dithizonlösung rot angefärbt. Dithizon ist ein Chelatkomplexbildner welcher das, in den β -Zellen vorhandene Zink komplexiert und eine charakteristische Rotfärbung hervorruft. Die Inseln werden somit spezifisch angefärbt und können leicht von azinärem Gewebe unterschieden werden. Außerdem können unvollständig abgelöste, azinäre Gewebereste an den Inseln entdeckt werden.

2.3.6.4.3 Umrechnung

Mit Hilfe einer Petrischale mit eingraviertem Gitter werden die Inseln gezählt und vermessen. Entsprechend der von Ricordi et al 1990 publizierten Methode [128] werden sie, entsprechend ihrer Größe, einer Größenklasse zugeordnet (siehe Tabelle 3). Die absolute Zahl der Inseln einer jeweiligen Klasse wird dann mit einem entsprechenden Faktor, multipliziert. Der Faktor konvertiert die Anzahl der Inseln einer Größenklasse in die entsprechende Anzahl Inseläquivalente. Durch Multiplikation der, für die 3 repräsentativen Aliquots gemittelten Anzahl an IEq mit dem Verdünnungsfaktor (hier x 80) erhält man näherungsweise die Gesamtanzahl der Isolierten IEq.

Tabelle 3

Inseldurchmesser in μm	Konversion in IEq
50-100	$n/6.00$
100-150	$n/1.50$
150-200	$n \times 1.7$
200-250	$n \times 3.5$
250-300	$n \times 6.3$
300-350	$n \times 10.4$
>350	$n \times 15.8$

Tabelle zur Konversion von Inselgröße in Inseläquivalente
entsprechend der Methode von Ricordi et al (1997)[128]

2.3.6.5 Zellkultur

2.3.6.5.1 Kulturbedingungen

Nach dem zweiten Waschgang (2.3.6.3) werden die Inseln in unbehandelte Zellkulturflaschen (ohne Beschichtung zur Zellkultur) verbracht. Es ist zu beachten, dass eine Maximalkonzentration von mehr als 300 IEQ pro Milliliter Kulturmedium nicht überschritten wird. Die Inseln werden bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre in einem Brutschrank kultiviert.

2.3.6.5.2 Kultivierung der Inseln

Um ideale Voraussetzungen für das Überleben und die Funktion der Transplantate zu gewährleisten wurden die Inseln vor der Transplantation für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Der positive Einfluss der Kurzkultur auf die Qualität der Inseln ist seit langem bekannt. Die Kurzkultur der Inseln reduziert signifikant deren immunogenes Potential [129]. Außerdem wird durch die Kultur eine höhere Reinheit der Inselpräparation erzielt, da bei Verwendung eines entsprechenden Mediums die verunreinigenden Zell-Entitäten, wie exokrine Pankreaszellen, Endothelzellen und duktales Zellen absterben, wohingegen die Inseln protektiert werden [130;131;132].

2.3.6.5.3 Das Kulturmedium

Es handelt sich bei dem CMRL 1066 „supplemented“ Medium um ein speziell für die Kultivierung von Pankreasinseln konzipiertes Medium. Es wird von der Firma Cellgro Mediatech in Virginia, USA hergestellt.

2.4 Empfängertiere

2.4.1 Lewis Ratte

Im syngenen Ansatz wurden als Empfängertiere ca. 250 g schwere, männliche Ratten des Inzuchtstammes Lewis (LEW/Crl), MHC Halotyp RT1A' verwendet. Die Lewis-Ratte eignet sich als stabiler Inzuchtstamm für syngene Transplantationsexperimente. Es bestehen hier weltweit langjährige Erfahrungen.

2.4.2 Induktion des Diabetes mellitus

2.4.2.1 Streptozotocin induzierter Diabetes

Die diabetische Stoffwechsellage im verwendeten Ratten-Modell wurde durch die intraperitoneale Injektion eines selektiven β -Zellgifts erreicht. Hierzu wurde das diabetogene Pharmakon Streptozotocin (STZ) verwendet. Die so erzeugte Stoffwechsellage gleicht pathophysiologisch sowie klinisch in hohem Maße dem Diabetes mellitus Typ I des Menschen.

2.4.2.1.1 Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin (INN) ist ein natürlich vorkommendes diabetogenes Pharmakon mit der systematischen Bezeichnung 2-Deoxy-2-(3-methyl-3-nitroso-ureido)-D-glucopyranose (IUPAC). Es kann aus dem Bodenbakterium *Streptomyces achromogenes* isoliert werden. STZ zählt zur Substanzklasse der Nitrosoharnstoffe. Nach systemischer Applikation von STZ wird es selektiv von den β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas über den Glukosetransporter Typ II (GLUT II) aufgenommen [133]. Die GLUT II -Affinität von STZ ist auf den Glukoserest des Moleküls zurückzuführen [134]. Es wirkt alkylierend auf die DNA [135]. Eine Schädigung der DNA durch die Generierung von Stickoxid und freien Radikale wird ebenfalls als Wirkmechanismus diskutiert [135]. Als entscheidender Mechanismus wird jedoch die, durch die massive Akkumulation von DNA Schäden übermäßige Aktivierung des DNA-Reparatur-Enzyms Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) angesehen [136]. Es kommt dadurch zu einem exzessiven NAD-Verbrauch und in Folge dessen werden die ATP Vorräte der Zelle ausgezehrt. Die Inselzelle wird nekrotisch und stirbt ab [135].

Die Lyse der Inselzellen macht sich nach etwa 6-8 Stunden durch eine kurze hypoglykämische Phase mit hohen Plasma-Insulin Spiegeln bemerkbar [135].

Neben der Verwendung als klassisches diabetogenes Pharmakon in der Wissenschaft wird STZ als Chemotherapeutikum bei Inselzelltumoren (Insulinomen) verwendet.

2.4.2.2 Herstellung der Streptozotocinlösung

2.4.2.2.1 Chemikalien und Lösungen

- Streptozotocin Sigma
- Natriumcitrat (mM 294,10) Roth
- Citronensäure Monohydrat Roth
- Aqua destilata

2.4.2.2.2 Laborausstattung

- Feinwaage (BP 211D) Sartorius
- Narkosekammer für kleine Säugetiere Völker GmbH
- Behältnis für Eis Styroporverpackung
- pH-Meter inoLab

2.4.2.2.3 Verbrauchsmaterialien

- Falcontubes 50 ml BD Falcon
- 15 ml Spritzen Braun
- 5 ml Spritzen Braun
- Kanülen (20 G) Braun
- Kanülen (23 G) Braun

2.4.2.3 Herstellung des Citratpuffers

- Auflösen von 1,47 g Natriumcitrat in 50 ml Aqua destilata
- Einstellen des pH-Werts der Lösung auf 4,5 mit Citronensäure-Monohydratlösung (2,1 g Citronensäure-Monohydrat gelöst in 100 ml Aqua destilata)
- steril filtern
- auf Eis lagern

2.4.2.4 Abwiegen und Auflösen des Streptozotocins

Zunächst werden die zu induzierenden Tiere gewogen und es wird berechnet, wie viel STZ benötigt wird um eine Endkonzentration von 45 mg/kg Körpergewicht zu erreichen.

- Abwiegen der entsprechenden Menge an STZ
- Mischen mit Citratpuffer (pH 4,5) zu einer Endkonzentration von 4 mg/ml

2.4.2.5 Intraperitoneale Injektion der Streptozotocinlösung

Um die bestmögliche Wirkung des STZ zu erzielen, müssen die Tiere ab 12 Stunden vor Injektion nüchtern gehalten werden. Der Zugang zu Wasser bleibt aber weiter uneingeschränkt. Die Tiere werden zum Berechnen des individuellen Injektionsvolumens vorher gewogen und entsprechend markiert. Die Injektion erfolgt in Isofluran Kurznarkose. Sofort nach Eintritt der Narkose erfolgt die Injektion der entsprechenden Menge der STZ-Lösung intraperitoneal in den rechten unteren Abdominalquadranten. Eine intrainestinale Injektion führt zum Misserfolg der Induktion und eine intramuskuläre Injektion kann Nekrosen hervorrufen. Nach der Injektion bleiben die Tiere für weitere 2 Stunden nüchtern. Danach werden sie normal gefüttert.

Die Blutzuckerwerte sind erfahrungsgemäß bereits 24 Stunden nach Injektion, spätestens jedoch nach 48 Stunden über 300 mg/dl im kapillaren Vollblut. Der Diabetes im Transplantationsversuch wurde als stabil bewertet, wenn an 3 aufeinander folgenden Tagen Blutzuckerwerte über 300 mg/dl im kapillaren Vollblut gemessen wurden.

2.4.3 Blutzuckerbestimmung im Vollblut der Ratten

2.4.3.1 Material

- Contour Blutzuckermessgerät Bayer
- Contour Sensoren Bayer
- Kanülen 24 G (Sterican) Braun

2.4.3.2 Messprinzip und Durchführung

Die Blutzuckermessung wurde mit dem Contour-Blutzuckermessgerät der Firma Bayer durchgeführt. Das Gerät bestimmt den Blutzucker durch Messung des Elektronenflusses, der durch die Reaktion der Blutglukose mit den Reagenzien an der Elektrode des Sensors erzeugt wird.

Zur in vivo Kontrolle der Transplantatfunktion wurde der Blutzuckerspiegel der nachtaktiven Tiere am frühen Morgen ca. 1 Stunde nach Ende der Nachtphase gemessen. Zu diesem Zeitpunkt kann von einer postprandialen Lage des Stoffwechsels ausgegangen werden (CHARLES RIVER 850263474).

Die Blutzuckermessung erfolgt im geöffneten Käfig. Das jeweilige Tier wird am Schwanz festgehalten und mit einer 24 G Kanüle wird kurz in die Schwanzspitze gestochen. Es bildet sich sofort ein Blutstropfen, der zur Messung verwendet werden kann.

2.4.4 Gewichtsbestimmung

Simultan mit der Blutzuckerkontrolle wurde eine Gewichtsbestimmung durchgeführt. Das Gewicht der Tiere diente neben der Kontrolle des Allgemeinzustands als zweiter Parameter zur Einschätzung der Stoffwechsellage.

2.5 Inseltransplantation

2.5.1 Präoperative Gabe von Insulin

Die durch Streptozotocin induzierte diabetische Stoffwechsellage der Ratten stellt durch eine verstärkte Diurese, veränderte Elektrolytverhältnisse und gestörte Plasmaosmolalität, eine Belastung für den Organismus der Tiere dar. Um möglichst stabile Kreislaufverhältnisse für die Operation zu gewährleisten, wurde den Ratten 8 Stunden vor Transplantation Insulin subcutan (s.c.) entsprechend dem unten gezeigten Schema (Tabelle 4) verabreicht.

Tabelle 4

Blutzucker in mg/dl	Insulin (Lantus) in Internationalen Einheiten
300-400	4
400-500	5
500-600	6
>600	7

Nach Messen der postprandialen Blutzuckerwerte wurde den diabetischen Ratten, bei Bedarf, entsprechend diesem Schema Insulin durch s.c. Injektion verabreicht.

2.5.2 Inseltransplantation ins Knochenmark des Femurs von männlichen Lewis Ratten

Die Markhöhle des Femurknochens ist das größte zusammenhängende Marklager im Skelett der Lewis Ratte. Durch die Zylinderform des Markraums und seine verhältnismäßig gute Zugänglichkeit über ein Bohrloch im Femurschaft bietet er sich für die experimentelle Transplantation von Inseln ins Knochenmark an. Um eine möglichst große Anzahl Inseln transplantieren zu können, wurden beide Femurknochen zur Transplantation verwendet.

2.5.2.1 Chemikalien und Lösungen

- Transplant Media (non supplemented) Cellgro Mediatech
- Kulturmedium (siehe 2.3.5.4)
- Isofluran (Forene) Abbott
- Cutasept® Bode
- Ringer Infusionslösung Baxter
- Buprenorphin (Temgesic®) Essex Chemie AG
- Metamizol (Novalgin®) Sanofi-Aventis
- Tabotamp® Ethicon
- Aqua injektibile
- Ethanol 70% Merck

2.5.2.2 Chirurgische Instrumente und Verbrauchsmaterial

- | | |
|--|------------------|
| • Portex® Nylon Tubing (ID 0,5 mm; OD 0,63 mm) | Smith Medical |
| • PE 50 Tubing (ID 0,4mm; OD 0,8 mm) | Smith Medical |
| • Insulinspritzen 1 ml (stumpfer Konus) | Braun |
| • 10 ml Spritzen | Braun |
| • Kanülen 25 G (Sterican) | Braun |
| • Kanülen 20 G (Sterican) | Braun |
| • Einmalrasierer | Wilkinson |
| • Abdecktücher Secu-Drape | Sengewald |
| • Klebeband | VWR |
| • Mulltupfer | Askina |
| • Mullkompressen | Askina |
| • Baumwolltupfer (Q-Tips) | Medchrom |
| • Knochenwachs | Ethicon |
| • Vicryl® 2/0 | Ethicon |
| • Nylon 4/0 | Ethicon |
| • Sterile Handschuhe | Cardinal Health |
| • Mundschutz | Meditrade |
| • Cooperschere, fein | Braun (Aesculap) |
| • Pinzette, chirurgisch, fein | Braun (Aesculap) |
| • Pinzette, anatomisch, fein | Braun (Aesculap) |
| • Pinzette, gebogen, fein | Braun (Aesculap) |
| • Gummieretraktoren | Eigenbau |
| • Stahlbohrer 1mm | Lux |
| • Dremel Feinwerkzeug | Dremel |

2.5.2.3 Laborausstattung

- | | |
|----------------------------------|-----------|
| • Zentrifuge Groß (Rotanta 460D) | Hettich |
| • Flowbench (Hera safe) | Heraeus |
| • Pipettenspitzen 10 ml | BD Falcon |

- Pipettenspitzen 1 ml StarLab
- Pipettenspitzen 200 µl StarLab
- Falcontubes 50 ml BD Falcon
- Falcon Tubes 15 ml BD Falcon
- Schere Aesculap
- Niedrigtemperatur – Klebepistole (LT 110) UHU

2.5.2.4 OP Ausstattung

- Anästhesiegerät für kleine Säugetiere (Isotec III) Völker GmbH,
- Narkosekammer für kleine Säugetiere Völker GmbH,
- beheizbarer Operationstisch Gaymar OP -
Wärmesystem
- Narkosetrichter für Ratten Völker GmbH

2.5.2.5 Inseltransplantation ins Knochenmark - Nylonkatheter

Die Inseln werden mit Hilfe eines Nylonkatheters in den Markraum des Femurknochens appliziert. Der Katheter zeichnet sich durch besondere Dünnwandigkeit aus. Außerdem ist Nylon als besonders gewebeverträglicher Kunststoff für die Inseltransplantation geeignet [137]. Der Transplantationsvorgang sowie das Laden des Nylonkatheters wird idealerweise von 2 Personen durchgeführt, wobei eine Person die Präparation der Tiere durchführt und die Zweite das Laden der Katheter übernimmt. Für das hier beschriebene Experiment wurden Inseln in beide Femurknochen transplantiert. Demnach mussten die unten genannten Verfahren je Tier zwei Mal durchgeführt werden.

2.5.2.5.1 Vorbereiten des Nylonkatheters

Der Nylonkatheter muss zunächst mit einer vorher zurechtgeschnittenen gelben 200 µl Pipettenspitze verbunden werden. Man schneidet mit einer kräftigen Schere den oberen, breiten Teil der Pipettenspitze ab, um sie mit dem Konus einer Insulinspritze verbinden zu können.

Nun muss das Lumen der Pipettenspitze durch Abschneiden eines ca. 0,5 mm langen Stücks vergrößert werden. Idealerweise vergrößert man das Lumen dadurch soweit, dass sich der Nylonkatheter mit leichtem Widerstand hindurch ziehen lässt. Dann wird ein ca. 20 cm langes Stück des Nylonkatheters soweit durch die präparierte Pipettenspitze gezogen, bis es nur noch minimal im Lumen steckt. Es ist darauf zu achten, dass kein Winkel mehr zwischen dem überstehenden Schlauch und dem Lumen der Pipettenspitze bestehen bleibt. Der Schlauch wird dann mit einem kleinen Tropfen Heißkleber abgedichtet. Es empfiehlt sich die Verbindung durch mehrmaliges Durchspülen des Katheters mit Aqua injeckabile zu überprüfen. Nach der Überprüfung der Dichtheit des Katheters wird dieser trocken gelagert. Vor dem Beladen des Katheters mit Inseln muss er zur Desinfektion zunächst mit Ethanol 70% durchgespült und wieder getrocknet werden. Dies sollte auf einer sterilen Unterlage (Secu Drape®) und mit sterilen Handschuhen erfolgen. Danach wird er für mindestens 10 Minuten mit Kultur Medium (2.3.5.4) inkubiert, um mögliche Proteinbindungsstellen, an denen die Inseln adherieren könnten, zu blockieren. Nach der Inkubation wird der Katheter mit mindestens 1 ml Transplant Media durchgespült, um das Kulturmedium zu entfernen. Nach dem Durchspülen wird der Katheter mit Transplant Media entlüftet und das distale Ende wird durch Abknicken eines ca. 1 cm langen Stücks verschlossen. Der Knick wird mit Klebeband fixiert. Nun wird mit einer 20 G Kanüle das Transplant Media aus der Pipettenspitze soweit aspiriert, bis sich nur noch wenige µl in der vordersten Spitze, an der Verbindungsstelle zwischen Pipettenspitze und Schlauch, befinden. Es ist bei dem gesamten Vorgang darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen im Schlauch bilden. Der Schlauch ist nun vorbereitet und kann mit Inseln beladen werden.

2.5.2.5.2 Laden des Nylonkatheters

Für den Ladevorgang ist steriles Arbeiten erforderlich. Die Arbeitsschritte werden unter der Flowbench durchgeführt. Die Inseln wurden idealerweise nach der Isolation bereits portioniert. Es befinden sich nun die Inseln für jeweils einen Femur in einer Flasche.

2.5.2.5.2.1 Waschen der Inseln

Die Inseln werden aus der Kulturflasche mit Hilfe einer 10 ml Pipette in einen 50 ml Falcontube überführt. Dieser wird dann bis zur 50 ml Markierung mit Transplant Media aufgefüllt und bei 1000 RPM für 1 Minute zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml Transplant Media resuspendiert und in einen 15 ml Falcontube überführt. Das 50 ml Falcontube wird mit weiteren 4 ml gespült, um hängen gebliebene Inseln mitzunehmen. Es folgt eine Zentrifugation bei 1000 RPM für eine Minute. Der Überstand wird soweit ab-pipettiert, bis sich inklusive dem Inselfellet noch ca. 0,2 ml Flüssigkeit im Falcontube („Bodensatz“) befinden.

2.5.2.5.2.2 Laden des Nylonkatheters

Das Pellet wird nun durch ein- bis zweimaliges, vorsichtiges auf- und ab-pipettieren mit einer 1 ml Eppendorfpipette (auf 300 µl eingestellt) resuspendiert. Die Pipettenspitze sollte zuvor mit Kulturmedium gespült werden, um Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nun wird die Inselfuspension vorsichtig mit der Pipette aufgenommen und in die Pipettenspitze des Nylonkatheters überführt. Je nach Füllung der Pipettenspitze kann das Falcontube und die Spitze der 1 ml Eppendorfpipette noch mit wenigen µl Transplantmedia nachgespült werden. Hier ist man auf Augenmaß angewiesen. Etwaige Luftblasen in der Spitze können mit einer 20 G Kanüle aspiriert werden. Die Inseln sedimentieren schnell in die Spitze der gelben Pipettenspitze. Man knickt nun vorsichtig den Nylonschlauch ca. 3 mm unterhalb der Verbindungsstelle ab, um ihn abzudichten und fixiert ihn mit einem Klebestreifen an der Pipettenspitze. Diese Konstruktion wird nun mit der Spitze voran in eine 1 ml Spritze, deren Stempel vorher entfernt wurde, eingeführt. Der Nylonschlauch steht nach oben ab. Man fixiert die Pipettenspitze in der Spritzenhülse mit einem Klebestreifen und verbringt die Konstruktion in einen leeren 15 ml Falcontube. Die Spritzenhülse sitzt mit den Flügeln auf dem Rand des Falcontubes auf. Dieser wird nun ohne Deckel bei 500 RPM für 1 min zentrifugiert. Die Inseln sind jetzt zu einem Pellet an der Spitze der gelben Pipettenspitze sedimentiert und sind transplantationsbereit.

2.5.2.6 Narkose und postoperative Schmerztherapie der Empfängertiere

Als Narkose zur Inseltransplantation wird eine Kombination aus Isofluran (Forene®) und Metamizol (Novalgin®) verwendet. Isofluran wird mit dem Isotec III (Völker GmbH) vaporisiert und entsprechend der benötigten Narkosetiefe dosiert. Metamizol wird vor Operationsbeginn in einer Dosierung von 15 mg/kg KG intramuskulär appliziert. Die postoperative Schmerztherapie besteht aus 2 s.c. Injektionen von 0,01 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®). Die erste Dosis Buprenorphin wird direkt nach Transplantation verabreicht, die zweite Dosis folgt 12 Stunden später.

2.5.2.7 Präparation des Femurs und Durchführung der Transplantation

Die Narkose der Lewis-Ratte wird in der Narkosekammer eingeleitet. Zur Transplantation der Inseln wird das Tier dann auf den beheizbaren Operationstisch gelegt. Hier wird die Narkose durch Anfluten des Gas-Luftgemischs über den Narkosetrichter aufrechterhalten. Man lagert das Tier in Seitenlage und exponiert die Oberschenkelaußenseite. Die Anästhesie des Versuchstieres wird vor Beginn und regelmäßig während der Operation überprüft. Nach der Rasur des lateralen Oberschenkels vom Knie bis zum Ursprung der Glutealmuskulatur, wird das Operationsgebiet sowie das gesamte Bein des Tieres großzügig mit Cutasept desinfiziert und mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt. Man ertastet nun die Margo lateralis des Femurs sowie den Trochanter major. Der Hautschnitt erfolgt ca. 0,5 cm proximal des Trochanter majors ca. 2 cm longitudinal des Femurknochens. Blutungen werden mit einem Tupfer kurz komprimiert und sistieren innerhalb kurzer Zeit. Durch teils stumpfe, teils scharfe Präparation gelangt man auf den Musculus gluteus maximus. Dieser wird entlang der Muskelfasern inzidiert und man verschafft sich so Zugang zur Margo lateralis des Femurknochens. Dort präpariert man scharf den Muskelansatz des Vastus lateralis ab und erhält so Zugang zur Facies anterior, die nach proximal bis zum Trochanter major dargestellt wird. Die Facies anterior sollte ausführlich dargestellt werden, da es sich bei der Inselapplikation um ein feinmotorisch anspruchsvolles Verfahren handelt! Die Präparation der Facies anterior erfolgt zur Zeitersparnis beidseitig vor der Transplantation und bestenfalls simultan zur Vorbereitung der Nylonkatheter.

Der Zugang zur Markhöhle wird durch eine Bohrung geschaffen. Das Bohrloch wird mit dem Feinwerkzeug ca. 5 mm unterhalb der Spitze des Trochanter major, medial, in einem Winkel von 45° in Richtung distale Epiphyse platziert. Direkt nach der Bohrung führt man den PE 50 Schlauch in das Bohrloch ein und schiebt ihn in der Markhöhle nach distal vor. Mit dieser Prozedur wird Platz für die Inseln geschaffen. Erfolgt dieser Schritt nicht, werden die Inseln nach der Applikation durch den entstandenen Überdruck im Markraum wieder herausgedrückt!

Die Pipettenspitze des beladenen Nylonkatheters wird nun mit einer 1 ml Spritze, gefüllt mit Transplant Media verbunden. Es dürfen sich keine Luftblasen in der Spritze und in der Pipettenspitze befinden. Der proximale Knick im Katheter wird nun vorsichtig geöffnet und die entstandene Kerbe im Schlauch wird mit der feinen anatomischen Pinzette ausmassiert. Als Nächstes wird der Schlauch direkt oberhalb des distalen Knicks abgesetzt. Dies dient zur Druckentlastung im Schlauch. Es ist möglich, dass sich dadurch das Inselpellet einige Millimeter im Schlauch bewegt. Nun wird der Schlauch ein zweites Mal, ca. 5 cm distal der Pipettenspitze, spitz abgesetzt. Durch vorsichtigen Druck auf den Stempel wird die Inselfraktion bis zur Schlauchspitze vorbewegt. Der im Markraum befindliche PE Schlauch wird entfernt und der Nylonkatheter wird bis zur distalen Epiphyse (bis zum Anschlag) eingeführt. Jetzt werden die Inseln langsam unter Rückzug in den Markraum appliziert. Der Katheter wird dann vorsichtig aus dem Bohrloch gezogen und dieses wird sofort mit Knochenwachs verschlossen. Zur Fixierung wird ein kleiner Streifen Tabotamp™ auf die Facies anterior gelegt und etwas angedrückt. Die Adaption der Muskulatur erfolgt mit lockeren Vicrylnähten. Die Hautnaht erfolgt fortlaufend mit Nylon 4/0. Ebenso wird mit dem anderen Femurknochen verfahren. Noch in Narkose erhält die Ratte die erste Dosis Buprenorphin (0,01 mg/kg KG) s.c..

2.5.2.8 Postoperative Haltung und Versorgung

Die Tiere werden nach der Operation für 2 Stunden unter Beobachtung in einem gewärmten Käfig im Operationsraum gehalten, überwacht und danach in den Tierstall zurückgebracht.

2.5.2.9 Postoperative Kontrolle der Transplantatfunktion

Die Kontrolle der Transplantatfunktion erfolgt durch regelmäßige Kontrolle des Blutzuckerspiegels und des Gewichts, entsprechend den in 2.4.3 beschriebenen Methoden. Die Parameter wurden für das hier beschriebene Experiment ab dem 3. Tag nach Transplantation und dann jeweils 3 Mal pro Woche erhoben.

2.6 Histologie

2.6.1 Organentnahme

Nach dem Beobachtungszeitraum wurden die Tiere erneut mit Isofluran anästhetisiert und durch die intrakardiale Injektion einer Überdosis Phenobarbital getötet. Die Femurknochen sowie die Pankreata wurden entnommen.

2.6.2 Gewebekonservierung

Um das Gewebe zur histologischen Aufarbeitung zu konservieren, musste es zunächst mit einer formaldehydhaltigen Lösung inkubiert werden. Außerdem mussten die Femurknochen durch EDTA-Entkalkung schneidbar gemacht werden.

2.6.2.1 Chemikalien und Lösungen

- Titriplex III R Merck
- Natronplätzchen Merck
- Aqua destilata

2.6.2.2 Verbrauchsgegenstände

- Falcontubes 50ml BD Falcon
- Glasflaschen 1l VWR

2.6.2.3 Laborausstattung

- Waage (BP 211D) Sartorius

- | | |
|--------------------------|-----------|
| • Heizplatte (RCT basic) | IKA Werke |
| • Rührfische | Bola |
| • pH-Meter (InoLab) | WTW |

2.6.2.4 EDTA-Entkalkungslösung (pH 7)

- mischen von 200 g Titriplex III R und 20 g Natronplätzchen in 800 ml Aqua dest.
- unter Erhitzen lösen
- pH messen und ggf. auf pH 7 – 7,2 korrigieren
- nach Erkalten der Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

2.6.2.5 Fixieren der entnommenen Organe

Nach der Entnahme wurden die Organe für 48 Stunden bei 4°C mit 4% Formalin inkubiert.

2.6.2.6 Entkalken und Einbetten der Femurknochen

Um die Femurknochen zur histologischen Begutachtung schneiden zu können mussten sie mit Hilfe des Calcium-Komplexbildners EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) entkalkt werden. Dazu wurden sie für 10 Tage in der Entkalkungslösung (siehe 2.6.2.4) bei 37°C und täglichem Wechsel der Lösung inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Knochen longitudinal halbiert und die Trochanterregion wurde abgesetzt, um sie auf den Objektträgern vollständig platzieren zu können (die Inseln wurden an die distale Epiphyse transplantiert und sind nicht in der Trochanterregion zu erwarten). Danach erfolgte die Entwässerung und Einbettung nach dem üblichen Verfahren für Paraffinschnitte.

2.6.3 Herstellung der Gewebeschnitte

2.6.3.1 Objektträger

Um ein Abschwimmen des Gewebes bei der immunhistochemischen Färbung der Schnitte zu vermeiden, wurden die Objektträger mit einer Klebemischung grundiert.

2.6.3.1.1 Material

- | | |
|----------------------------------|-------|
| • Pritt Bastelkleber | Pritt |
| • Poly-L-Lysin 0,1% in Wasser | Sigma |
| • Objektträger Super-Frost Plus® | VWR |

2.6.3.1.2 Grundierung der Objektträger

Die o.g. (2.6.3.1.2) Chemikalien wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und mit einem Pinsel dünn auf die Super-Frost Plus Objektträger aufgetragen.

2.6.3.2 Zuschneiden der Paraffinblöcke

Aus den eingebetteten Femurknochen wurden mit einem Microtom (Leica RM 2165) 6µm dünne Gewebsschnitte hergestellt. Diese wurden auf die grundierten Super-frost Plus Objektträger (siehe 2.6.3.1) aufgezogen. Die Schnitte erfolgten im Abstand von 100-200µm.

2.6.4 Histologie und Immunhistochemie

Zur histologischen Beurteilung des Transplantationsergebnisses wurden histochemische- und immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die transplantattragenden Femurknochen und die der Kontrollgruppe wurden auf das Vorhandensein von Inseln und auf deren Zustand hin untersucht. Es kamen hier die folgenden Methoden zum Einsatz:

2.6.4.1 H&E Färbung

2.6.4.1.1 Material

- Aqua destilata
- Roti-Histokitt II Roth
- Mayers Hämalaunlösung Merck
- Eosin G-Lösung 0,5% wässrig Merck
- Xylol 99,9% Applichem
- ET-OH 99,9% Applichem
- Deckgläschen VWR

2.6.4.1.2 Wässrige Eosinlösung 0,1%

Mischen von:

- 400ml Aqua dest.
- 100ml Eosin G-Lösung 0,5% wässrig

2.6.4.1.3 Durchführung

Die Durchführung der Färbung erfolgt unter dem Abzug im Histologie-Labor. Die Präparate werden entsprechend der angegebenen Zeiten mit den Lösungen inkubiert. Die alkoholische Verdünnungsreihe wird durch Verdünnung des 99% Ethanol (ET-OH 99%, siehe 2.6.4.1.1) hergestellt.

Zunächst werden die Präparate durch 10 min Inkubation in Xylol entparafiniert. Danach erfolgt die Hydratation für jeweils 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe (96%; 80%; 70%; 50%). Darauf folgen 5 min in Aqua dest.. Im Anschluss erfolgt die Kernfärbung in „Mayers Hämalaunlösung“ für 3-8 Minuten. Danach wird zwei Mal mit Aqua dest. gespült und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Darauf folgt die Gegenfärbung für 10-15 min in 0,1% Eosin. Die Farbreste werden unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen und die Färbung wird in 80% ET-OH differenziert. Die Entwässerung erfolgt für 4 min in 96% ET-OH und für 5 min in Xylol. Das Eindeckeln erfolgt mit Histokitt unter einem Deckgläschen.

2.6.4.2 Insulin-Färbung

2.6.4.2.1 Material

- Aqua dest.
- H₂O₂ 30% Fluca
- Anti-Insulin (Best.-Nr.: GTX27842) GeneTex
- Anti-Guinea-pig (Best.-Nr.: BA 7000) Vector labs
- Vectastain Elite ABC-Kit Standard Vector labs
- Super Picture Invitrogen
- Peroxidase Substratkit AEC Biologo
- EtOH 99,9% Applichem
- Dako Verdünnungsmedium Dako
- Dako Proteinblock Dako
- Hematoxylin Vector labs
- Aquatex Merck
- NaCl VWR
- TRIZMA Base Sigma
- TRIZMA Hydrochlorid Sigma
- HCl Merck
- Xylol 99,9 % Applichem

2.6.4.2.2 Pufferlösungen

2.6.4.2.2.1 TRIS-Cl-Puffer pH 7,5 und TRIS-Cl-Puffer pH 6,0

Mischen von:

- 0,9 g TRIZMA Base (121.1 g/mol)
- 6,85 g TRIZMA Hydrochloride (157,6 g/mol)
- 8,75 g NaCl (58,44 g/mol)
- 800 ml Aqua dest.
- pH-Einstellen mit HCl
- auffüllen auf 1 l mit Aqua dest.

2.6.4.2.2.2 H₂O₂-Lösung 7,5%

Mischen von:

- 50 ml H₂O₂ Stock-Lsg 30%
- 150 ml Aqua dest.

2.6.4.2.3 Durchführung

Zunächst werden die Präparate für 30 min in Xylol entparaffiniert und dann für je 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe. (ET-OH 100%; 99%; 96%; 70%; Aqua dest.) und Aqua dest. rehydriert. Die Antigenmaskierung erfolgt durch Mikrowellenverdau bei 90° für 20 min in TRIS-Cl-Puffer pH 6,0. Danach wird 3 x innerhalb von 10 min in TRIS-Cl-Puffer pH 7,5 (TRIS 7,5) gewaschen. Das Blockieren der endogenen Peroxidase erfolgt für 10 min in H₂O₂-Lösung 7,5%. Die Präparate werden dann für 10 min in fließendem Leitungswasser gewässert. Danach wird erneut 3 x innerhalb von 10 min in TRIS 7,5 gewaschen. Nun werden für 10 min mit Dako Proteinblock die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Es folgt die Inkubation mit dem Insulin primär-Antikörper aus Meerschweinchen (1:100 in Dako Verdünnungsmedium) für 1h bei RT. Danach 2x Waschen in TRIS 7,5. Durch Inkubation für 30 min mit dem biotinylierten sekundär-Antikörper (secAb anti-guineapig von Vector Labs; 1:200 in Dako Verdünnungsmedium) wird die ABC-Komplex-Affinität des Insulin primär-

Antikörpers verstärkt. Darauf folgt 2x Waschen in TRIS 7,5. Mit dem ABC-Komplex aus dem Vectastain-Kit wird nun 30 min bei RT der Enzymkomplex an den sekundär-Antikörper konjugiert. Es folgt 2x Waschen in TRIS 7,5. Nun wird der ABC-Komplex durch Inkubation für 10-30 min mit der AEC-Gebrauchslösung (Chromogen) detektiert. Es empfiehlt sich das Ergebnis zwischendurch zu kontrollieren. Danach wird für 5 min in Aqua dest. gewässert. Die Gegenfärbung zur Darstellung der Zellstrukturen erfolgt mit Hämatoxilin (siehe 2.6.4.1.1) für 10-30 sec. Nun werden die Präparate noch für 10 min unter fließendem Wasser gebläut und können dann mit Aquatex und Deckgläschen eingedeckt werden. Insulin-positive Zellen zeigen nun eine charakteristische Braunfärbung und heben sich deutlich vom, mit Hämatoxilin blau gefärbten Gewebe ab.

2.6.4.3 Lebend/Tod - Fluoreszenzfärbung

Zur Bestimmung der Vitalität der Inselzellen wurde nach der Isolation und nach dem Ladevorgang des Nylonkatheters eine Vitalitätsfärbung mit Acridine Orange und Propidium-Iodid durchgeführt. Diese Färbemethode wurde erstmals 1987 von H.L. Bank zur Beurteilung der Viabilität von isolierten Inseln beschrieben und hat sich als zweckmäßig und verlässlich erwiesen [138].

2.6.4.3.1 Chemikalien

- | | |
|-------------------|-----------|
| • Acridine Orange | Sigma |
| • Propidium-Iodid | Sigma |
| • PBS | Biochrome |

2.6.4.3.2 Laborausstattung

- | | |
|---------------------------------------|------|
| • Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200) | Zeiß |
| • Reaktionsgefäß | Nunc |

2.6.4.3.3 Durchführung

Zunächst werden 450 µl PBS in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Dann werden 30 µl Inselsuspension mit der zu untersuchenden Anzahl Inseln hinzu-pipettiert. Nun werden 10 µl einer 15 µM Propidium-Iodid Lösung (in PBS) und 10 µl einer 10 µM Acridine-Orange Lösung (in PBS) hinzugefügt. Die Inseln müssen dann mit einer gelben Eppendorfpipette aufgenommen und in ein weiteres Reaktionsgefäß mit vorgelegtem PBS überführt werden, um das Hintergrundleuchten der Lösung zu minimieren. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigen sich die lebenden Zellen grün gefärbt, die toten Zellen sind rot.

2.7 Insulin-Sekretions-Test mittels ELISA zur Vitalitätsbestimmung der Inseln

Um die Vitalität und Funktionsfähigkeit der Inseln nach dem Isolationsvorgang und besonders nach dem Laden in den Nylonkatheter zu überprüfen, wurde ein Insulin-Sekretionstest durchgeführt. Mit diesem Test lässt sich die Synthese- und Sekretionsfähigkeit der β -Zellen überprüfen. Eine Stichprobe an Inseln wird für eine definierte Zeit mit einer Lösung mit geringer Glukose-Konzentration inkubiert. Danach erfolgt ein Wechsel zu einer hochkonzentrierten Lösung. Durch diese Stimulation wird eine Insulinsekretion provoziert. Durch Messung und Vergleich des Insulingehalts der Lösungen vor und nach der Stimulation mittels ELISA-Assay können Rückschlüsse auf die Synthesefähigkeit der getesteten Inseln getroffen werden.

2.7.1 Chemikalien und Lösungen

- NaCl Merck
- KCl Merck
- NaHCO₃ Merck
- KH₂PO₄ Merck
- MgSO₄-7H₂O Merck
- CaCl₂-2H₂O Merck
- Glukose Merck
- BSA Sigma

- Rat Insulin ELISA Kit Merckodia

2.7.2 Laborausstattung

- 25 µl-Micropipette mit Pipettenspitzen Eppendorf
- EIA-Plate-Reader (Sunrise) Tecan
- Heizplatte (RCT basic) IKA Werke
- Rührfische Bola
- pH-Meter (InoLab) WTW

2.7.3 Krebs-Ringer-Puffer (KRB)

Auflösen in 1 l Aqua dest.:

- NaCl 8.0 g/l
- KCl 0,44 g/l
- NaHCO₃ 2,1 g/l
- KH₂PO₄ 0,16 g/l
- MgSO₄·7H₂O 0,3 g/l
- CaCl₂·2H₂O 0,37 g/l

2.7.4 Stimulationslösungen (Glukose 3,3 mM und Glukose 16,6 mM)

- Erhitzen von 100 ml KRB im Wasserbad auf 37°C
- Begasen mit 10-15 min mit 95% O₂/ 5% CO₂
- Zugabe von 0,05 g BSA und Auflösen lassen
- pH auf 7.4 einstellen mit HCl oder NaOH, falls nötig
- 25 ml in 50 ml Falcon überführen
- 150 µl sterile 1.65 M Glukose D(+) zu 75 ml KRB-BSA-Lösung
→ ergibt: 3.3 mM Glukoselösung
- 250 µl sterile 1.65 M Glukose D(+) zu 25 ml KRB-BSA-Lösung
→ ergibt: 16,7 mM Glukoselösung
- Lösungen sofort verwenden

2.7.5 Stimulation der Insulin-Sekretion

Zunächst werden zwei Petrischalen mit 25 ml Basalpuffer (3,3 mM) vorbereitet (Basal#1 und Basal#2). Desweiteren werden 0,5 ml Basalpuffer in Eppendorftubes vorgelegt und bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert (Anzahl entsprechend Probenmenge). Die Inseln werden nun vorsichtig in Basal#1 überführt und bei 37°C / 5% CO₂ für 10 min inkubiert. Dann werden die Inseln in Petrischale mit Basal#2 überführt. Dies dient zum Reinigen der Inseln vom Insulinhaltigen Kulturmedium! Nun werden vorsichtig 8-10 Inseln in jedes Eppendorftube überführt. Dabei ist darauf zu achten, dass möglichst wenig Volumen von Basal#2 Medium mitgenommen wird. Die Inseln werden nun für 60 min im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Dann werden die Inseln durch vorsichtiges Zentrifugieren (1 min, 500 RPM) pelletiert. Nun vorsichtig 0,4 ml Überstand abnehmen und in gekennzeichnete Eppendorftubes überführen. Es folgt nun die Stimulaton durch Hinzupipettieren von 0,4 ml 16,6 mM Glukoselösung. Erneutes Inkubieren für 60 min im Schüttelwasserbad bei 37°C. Inseln durch vorsichtiges Zentrifugieren (1 min, 500 RPM) pelletieren. Nun vorsichtig 0,4 ml Überstand abnehmen und in gekennzeichnete Eppendorftubes überführen. Die Tubes können bis zur Insulinbestimmung bei 20°C eingefroren werden. Die Insulinbestimmung erfolgt aus dem Überständen durch Mercodia Insulin ELISA.

2.7.6 Insulin ELISA

Die Bestimmung der durch Glukose stimulierten Insulin-Sekretion im Überstand der Proben erfolgt enzymimmunologisch mittels ELISA (z.B. Rat-Insulin ELISA von Mercodia). Es handelt sich dabei um einen Zwei-Phasen-Immunoassay auf Basis der direkten Sandwich-Methode. Diese Methode ermöglicht eine Quantifizierung des Insulingehalts einer Lösung. Ein anti-Insulin-Antikörper ist am Boden einer 96 well Platte gebunden. Die Standards sowie die Sekretionsmedien (2.7.5) werden zu je 25 µl pipettiert. Anschließend werden 50 µl einer Konjugatlösung zu jeder Probe bzw. Standard hinzugegeben. Unter ständiger Bewegung werden die Proben für 2 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit binden die gelösten Insulinmoleküle an die am Boden der Wells adherierten Antikörper. Die mit einer Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper binden wiederum an die Insulinmoleküle. Nicht gebundene Insulinmoleküle und freies Konjugat werden anschließend durch 6 Waschschr

entfernt. Die entstandenen Antigen-Antikörper-Verbindungen können mit dem Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (200 µl) sichtbar gemacht werden. Es wird durch die Peroxidase in ein farbiges Endprodukt umgesetzt. Nach der 30 min Inkubation wird die Reaktion durch eine Stopplösung unterbrochen. Die Mikroplatte wird für 5 s auf einem Schüttler bewegt. Dies führt zu einem Farbumschlag in den Proben, dessen Intensität von der initialen Insulinkonzentration der Probe abhängt. Die quantitative Insulinbestimmung erfolgte über die spektrophotometrische Bestimmung der angefärbten Enzym-Substrat-Verbindungen mittels Photometer bei 450 nm. Als Referenzwert dient die aus den Ratten-Insulin-Standards gewonnene Standardkurve.

2.7.6.1 Durchführung des Insulin-ELISA

Die Proben werden aufgetaut und bei 3000 RPM 5 min zentrifugiert, um sämtliche Inselrückstände zu entfernen. Der Insulin-ELISA Assay wird entsprechend dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm, die Referenzmessung bei 620 nm.

2.8 Datenerhebung und Statistische Analyse

Die Erhebung der graphischen Daten für die Bildauswertung der Lebend/Tod-Floureszenzfärbung erfolgte mit der „Zeiss AxioVision Digital Image Processing Software“.

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit SPSS Statistic 20 (IBM™). Für Vergleiche von mehreren Gruppen wurde der Kruskal Wallis Omnibustest zur Varianzanalyse angewendet. Als post-hoc Analyse diente der Mann-Whitney-U Test. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit unter 5% angenommen. Die ausgewerteten Daten wurden mit SPSS und Microsoft Excel graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Inseln auf Funktion und Viabilität nach dem Laden des Nylonkatheters

Um die Inseln ins Knochenmark des Femurs der Lewis-Ratten zu transplantieren, mussten sie in einen dünnen Nylonkatheter geladen werden. Wegen des begrenzten Volumens der Markhöhle des Femurknochens wurden die Inseln mittels Zentrifugation sehr dicht im Schlauch komprimiert. Um zu ermitteln, ob der Ladevorgang die Inseln schädigt und ihre Funktion beeinträchtigt, wurde der Ladevorgang zunächst *in vitro* simuliert und die Inseln wurden mittels Dithizone-Färbung, Lebend/Tod-Fluoreszenzfärbung und Insulin-Sekretionstest hinsichtlich der Morphologie, Vitalität und Funktion überprüft.

3.1.1 Versuchsaufbau

Nach der Inselisolation von 3 Lewis Ratten wurden die Inseln gepoolt und 24 Stunden in CMRL 1066 „supplemented“ Medium kultiviert. Danach erfolgte die Aliquotierung in Referenz-, Kontroll- und Versuchsgruppe.

Referenzgruppe: Hier wurden die Inseln lediglich dem Waschvorgang (siehe 2.5.2.5.2.1) unterzogen und danach wieder in CMRL 1066 „supplemented“ Medium kultiviert.

Kontrollgruppe: Die gängige Praxis der Inseltransplantation im Rattenmodell ist die ITx in die Leber nach Laparotomie durch eine Injektion der Inseln in die Pfortader. Hierzu werden die Inseln mit einer Insulinspritze aufgezogen und über eine 22 G Kanüle in das Gefäß injiziert. Dies ist ein seit Langem etabliertes und häufig verwendetes Verfahren, welches reproduzierbar, erfolgreiche Inseltransplantationen im Rattenmodell ermöglicht [91]. Der Vergleich der Inseln nach dem Aufziehen und der Injektion durch eine Insulinspritze samt Kanüle mit den Inseln nach dem Laden in den Nylonschlauch bietet sich also als positiv-Kontrolle an. Die Inseln wurden nach der Isolation dem Waschvorgang (siehe 2.5.2.5.2.1) unterzogen. Danach wurden sie

durch kreisende Bewegungen in der Mitte einer Petrischale konzentriert und mit einer Insulinspritze aufgezogen. Nach einer Sedimentationszeit von 3 Minuten in der aufrecht gestellten Spritze wurde die 22 G Kanüle angebracht und die Inseln wurden langsam zurück in eine Petrischale mit Kulturmedium injiziert.

Versuchsgruppe: Die Inseln wurden hier nach dem Waschvorgang durch das unter 2.5.2.5.2 beschriebene Verfahren in den Nylonkatheter geladen. Nach der Zentrifugation wurden die Inseln für 15 Minuten im Nylonkatheter belassen. Diese Zeit entspricht der Präparationsphase des Zugangs zum Knochenmark. Daraufhin wurden die Inseln langsam in eine Petrischale mit Kulturmedium injiziert.

Die Inseln aller Gruppen wurden nach der Prozedur für eine Stunde im Brutschank kultiviert.

3.1.1.1 Dithizonefärbung

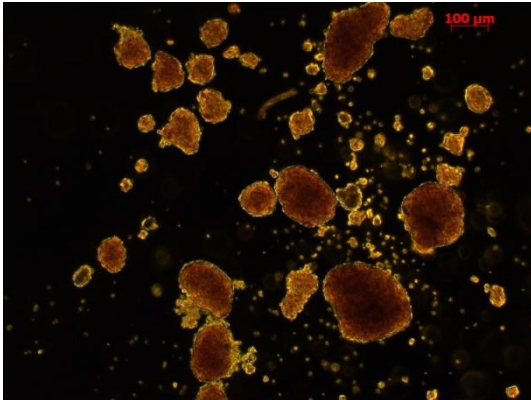
Um durch den Ladevorgang verursachte morphologische Veränderungen zu erkennen, wurde eine Dithizonefärbung durchgeführt.

Die Inseln wurden jeweils vor und nach der o.g. Prozedur mit Dithizone angefärbt und unter dem Binokular betrachtet. Die morphologische Beurteilung erfolgte nach den unten genannten Kriterien.

Für den Vergleich der Morphologie sind Störungen der rund-ovalen Form der Inseln, zerbrochene Inseln sowie Änderungen im Anfärbeverhalten relevant.

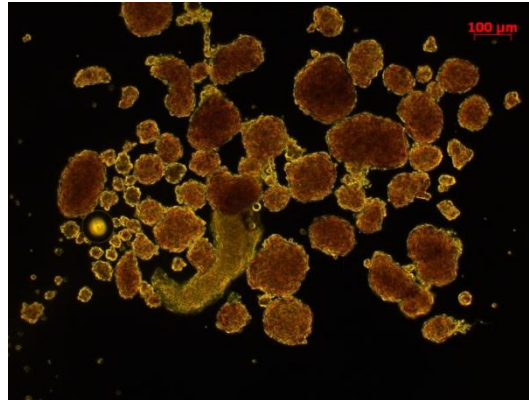
Hinsichtlich dieser Kriterien unterschieden sich die Inseln der o.g. Gruppen nicht.

Abb. 1



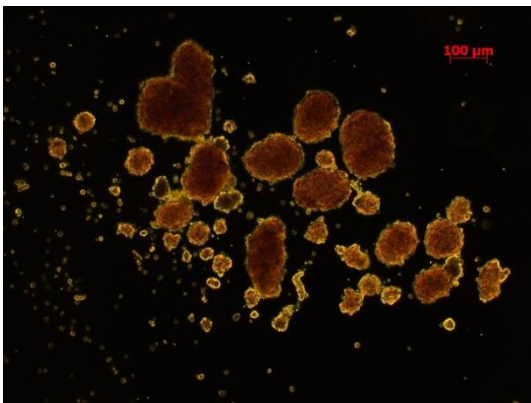
Inseln der Referenzgruppe vor dem Waschen. Die Inseln sind rund-oval und ohne morphologische Anzeichen für eine Schädigung. Nach 24 h Zellkultur hat sich einiger Zelldebris angesammelt.

Abb. 2



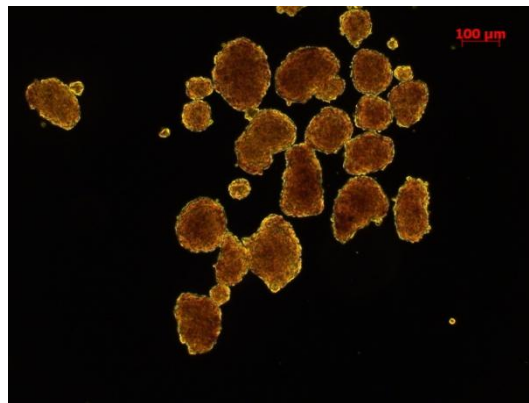
Inseln der Referenzgruppe nach dem Waschen. Die Form der Inseln ist nach wie vor rund-oval. Auch lassen sich keine Störungen der morphologischen Integrität feststellen. Die Reinheit der Inselnsuspension ist nach dem Waschen höher.

Abb. 3



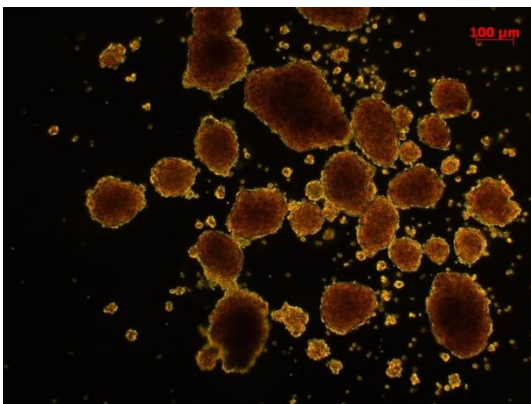
Inseln der Kontrollgruppe vor der Injektion durch eine Insulinspritze. Die Inseln sind morphologisch gesund. Es findet sich auch hier Zelldebris, der sich während der 24h in Zellkultur angesammelt hat.

Abb. 4



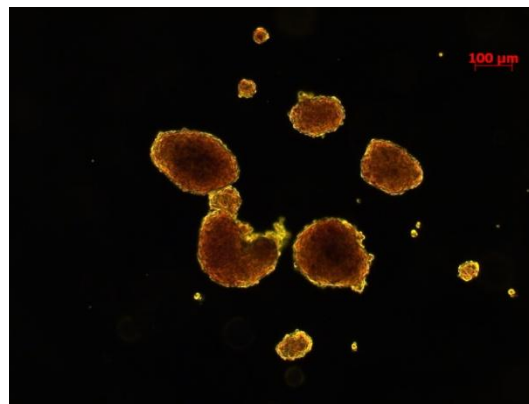
Inseln der Kontrollgruppe nach der Injektion durch eine Insulinspritze. Es finden sich auch hier keine Anzeichen für eine morphologische Schädigung.

Abb. 5



Inseln der Versuchsgruppe vor dem Laden in den Nylonkatheter. Die Inseln sind morphologisch intakt. Auch hier ist der Zelldebris nach 24h Zellkultur zu erkennen.

Abb. 6



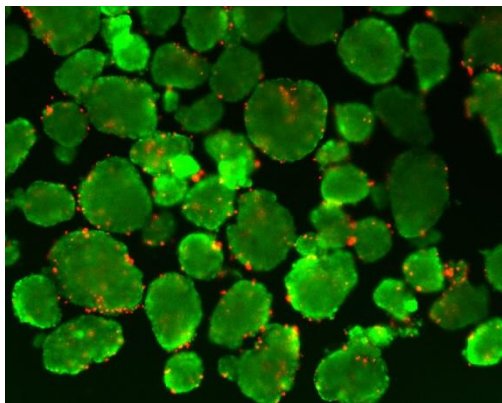
Inseln der Versuchsgruppe nach dem Laden in den Nylonkatheter. Auch hier sind die Inseln morphologisch intakt.

3.1.2 Lebend/Tod - Fluoreszenzfärbung

Durch die Färbung von Zellen mit Propidium-Iodid- und Acridine-Orange lassen sich lebende von toten Zellen unterscheiden. Acridine-Orange kann die Zellmembran passieren, interagiert mit DNA und RNA und färbt, nach Beleuchtung mit einer entsprechenden Wellenlänge (525 nm), die Zellen grün an. Propidium-Iodid hingegen ist nicht membrangängig und kann nur bei geschädigter Zellmembran ins Zytosol eindringen. Dort interagiert es ebenfalls mit der DNA und färbt nach Beleuchtung mit einer Wellenlänge von 590 nm die geschädigten Zellen rot.

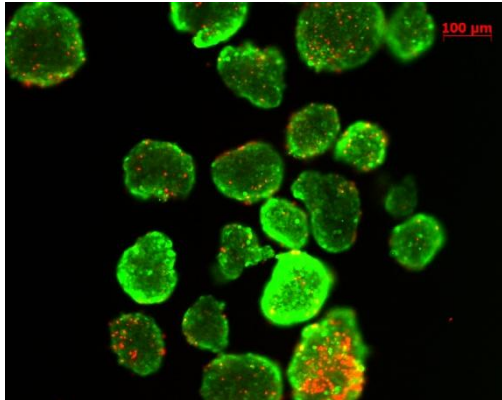
Um nun zu überprüfen, ob und wie stark die Inseln durch die Schlauch-Lade-Prozedur geschädigt werden, wurden die Inseln der unter 3.1.1 definierten Versuchsgruppen mit der Lebend/Tod – Fluoreszenzfärbung (siehe 2.6.4.3) untersucht. Hierzu wurden die Inseln nach Abnahme des für den Insulinsekretionstest (3.1.3) benötigten Anteils entsprechend 2.6.4.3.3 in ein Reaktionsgefäß überführt. Es wurde die gesamte Inselmenge des Schlauchladeversuchs untersucht (mindestens n=20 pro Gruppe).

Abb. 7



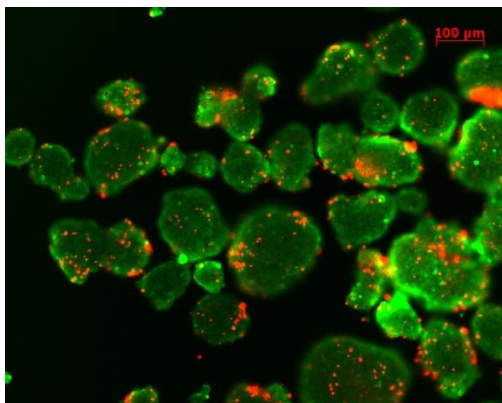
Referenzgruppe: Es sind an den meisten Inseln hauptsächlich randständig rot gefärbte Zellen zu sehen. Die Zellmembran dieser Zellen ist entsprechend der Wirkungsweise der Lebend/Tod-Färbung als terminal geschädigt anzusehen. Da diese Zellen hauptsächlich randständig liegen, ist anzunehmen, dass es sich um residuelle azinäre Zellen handelt

Abb. 8



Kontrollgruppe: Im Gegensatz zur Referenzgruppe sind hier die meisten der rot gefärbten Zellen innerhalb der Inseln lokalisiert. Viele der Inseln weisen nur einige rot gefärbte Zellen auf, d.h. es ist von weitgehend intakten Inseln auszugehen. Jedoch befinden sich am unteren Bildrand auch zwei Inseln mit ausgeprägter Rotfärbung, was auf eine stärkere Traumatisierung hindeutet.

Abb. 9



Versuchsgruppe: Wie in der Kontrollgruppe sind hier die rot gefärbten Zellen meist innerhalb der Inseln lokalisiert. Die meisten Inseln weisen ebenfalls vereinzelte rot gefärbte Zellen auf, jedoch erscheint die absolute Anzahl pro Insel höher zu sein. Es sind jedoch nach wie vor nur vereinzelte rote Zellen zu erkennen und es ist von einer weitgehenden Integrität der Inseln auszugehen.

Das Verhältnis von rot gefärbten Zellen zur Inselfläche in μm^2 kann als Index für die Inselqualität nach der Ladeprozedur herangezogen werden. Dazu wurde die Fläche der grün gefärbten Inseln durch graphische Auswertung der oben gezeigten Bilder mit Hilfe der „Zeiss AxioVision Digital Image Processing Software“ ermittelt. Die Fläche steht repräsentativ für die Masse der intakten Inselzellen. Die Anzahl der rot gefärbten Zellen (tote Zellen) wurde ausgezählt und mit der zugehörigen Inselfläche ins Verhältnis gesetzt ($(\text{Anzahl roter Zellen} / \text{Inselfläche in } \mu\text{m}^2) \times 1000$). Es ergaben sich folgende Indizes.

Referenzgruppe (n=62)

Anzahl roter Zellen / Inselfläche: Median 1,62 (IQR 0,57; 2,51)

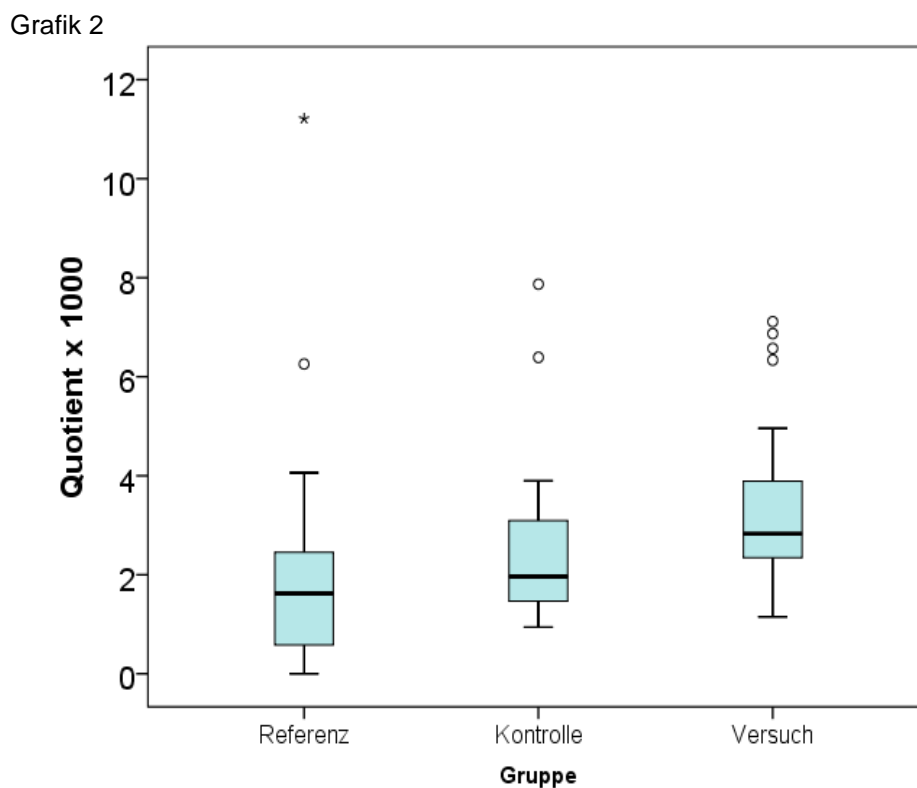
Kontrollgruppe (n=20)

Anzahl roter Zellen / Inselfläche: Median 1,97 (IQR 1,44; 3,10)

Versuchsgruppe (n=35)

Anzahl roter Zellen / Inselfläche: Median 2,83 (IQR 2,32; 3,91)

Grafisch stellen sich die Verhältnisse wie in Grafik 2 abgebildet dar.



Vergleich der Verhältnisse von der Anzahl rot gefärbter Zellen zur Inselfläche (Anzahl / μm^2) in den Bildern des Schlauch-Lade-Versuchs der Gruppen: Referenzgruppe, Kontrollgruppe und Versuchsgruppe.

Die Varianzanalyse mit Kruskal-Wallis Omnibustest ergab eine Heterogenität der drei untersuchten Gruppen. Der Mann-Whitney U post hoc Test ergab daraufhin signifikante paarweise Unterschiede zwischen Referenzgruppe und Versuchsgruppe ($p < 0.001$), sowie zwischen Kontrollgruppe und Versuchsgruppe ($p = 0.018$, keine Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus berücksichtigt, da hierarchische Testprozedur), jedoch nicht zwischen Referenzgruppe und Kontrollgruppe ($p = 0,114$).

3.1.3 Insulinsekretionstest

Als weiterer Parameter für eine Schädigung der Inseln wurde die Insulinsekretion vor und nach Stimulation mit Glukose untersucht. Hierzu wurden jeweils 5 x 8 Inseln der jeweiligen Gruppe (Referenz-, Kontroll- und Versuchsgruppe) konsekutiv mit 2 Lösungen unterschiedlicher Glukosekonzentration (3,3 mM und 16,6 mM) inkubiert. Die dadurch stimulierte Insulinausschüttung wurde durch einen Insulin sensitiven ELISA gemessen. Die jeweils gemessenen Werte wurden in Relation zueinander gesetzt. Somit wurde ein Index für jede Gruppe gebildet, der einen Vergleich der Sekretionsfähigkeit ermöglichte.

Die Stimulationsindizes der Gruppen waren wie folgt (graphische Darstellung siehe Grafik 3).

Referenzgruppe (n=5)

Stimulationsindex: Median 1,72 (Minimum 0,52; Maximum 4,77)

Kontrollgruppe (n=5)

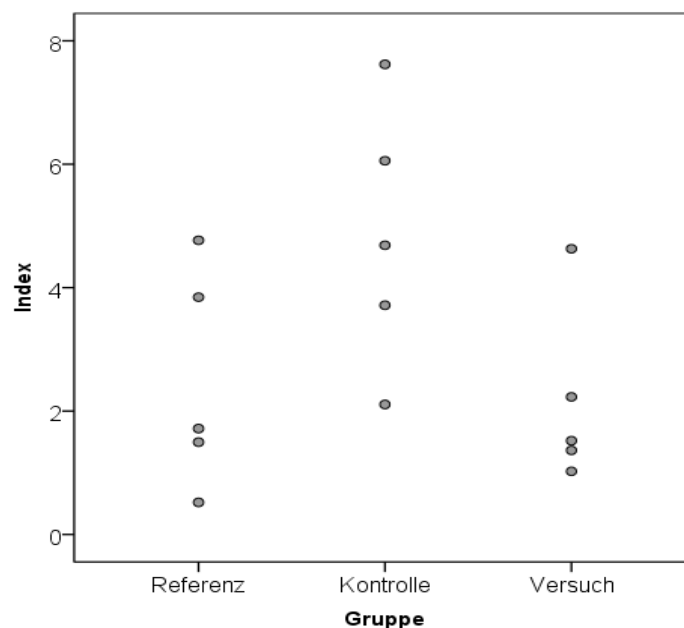
Stimulationsindex: Median 4,69 (Minimum 2,11; Maximum 7,62)

Versuchsgruppe (n=5)

Stimulationsindex: Median 1,52 (Minimum 1,02; Maximum 4,63)

Die Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis ergab keine signifikante Heterogenität des Stimulationsindex zwischen den untersuchten Gruppen.

Grafik 3



Darstellung der Stimulationsindizes des Insulinsekretionstest der Gruppen des Schlauchladeversuchs.

3.2 Untersuchung der Schädigung des Knochenmarks durch das Applikationsverfahren

Nach dem Laden des Nylonkatheters (siehe 2.5.2.5.2) wurden die Inseln nach Kanülierung der Markhöhle in den Femurknochen der Empfängertiere appliziert (siehe 2.5.2.7). Dieses Verfahren erwies sich als das Bestmögliche, um die Inseln sicher und in genügender Anzahl in den Markraum zu transplantieren. Dennoch stellt das Einführen und Vorschieben eines Katheters durch die gesamte Markhöhle einen traumatisierenden Vorgang dar. Im folgenden Versuch sollte festgestellt werden, in wie weit die Regenerationsfähigkeit des Knochenmarks das Trauma kompensieren kann und welche langfristigen Veränderungen der Gewebearchitektur resultieren.

3.2.1 Versuchsaufbau

Als Negativ-Kontrolle für die Transplantationsversuche wurde eine Kontrollgruppe (SHAM; n=2) festgelegt. Die Tiere dieser Gruppe wurden exakt gleich behandelt wie die Tiere der Versuchsgruppe. Es erfolgte ebenfalls die Präparation des Femurknochens und die Kanülierung der Markhöhle mit dem Nylonkatheter. Jedoch erfolgte keine Inseltransplantation. Es wurde lediglich Transplant-Media appliziert. Nach einer Beobachtungszeit von 30 Tagen wurden von den Femurknochen Gewebeschnitte hergestellt und mit H&E-Färbung gefärbt (siehe 2.6.4.1).

3.2.1.1 H&E Färbung

Bohrloch:

Zur Applikation wurde der Markraum durch Aufbohren eröffnet. Die Bohrung wurde nach Applikation des Transplant-Media durch einen Pfropf aus Knochenwachs verschlossen. Nach 30 Tagen war der Wachspfropf in beiden Tieren der SHAM-Gruppe nachweisbar. Er stellt sich in den histologischen Schnitten als runde, zellfreie Struktur dar. Diese ist von einem schmalen Saum aus Fibroblasten und Monozyten umgeben. In unmittelbarer Umgebung (< 150 µm) ist eine Hyperzellularität des Knochenmarks erkennbar. Die Zellen sind zum Großteil granulozytären Ursprungs. Auf der Innenseite finden sich Reste eines hyalinen Materials. Des Weiteren findet man in der Umgebung der Struktur mehrere Knocheninseln mit aktiven Osteoblasten,

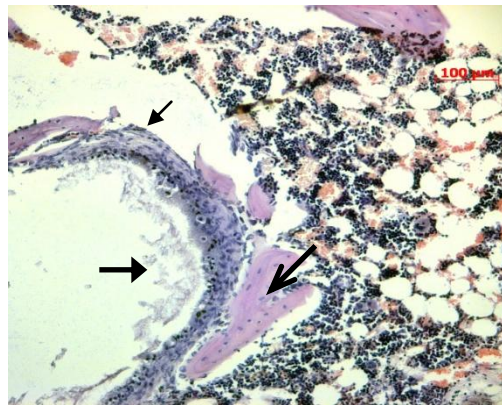
Osteoklasten und ruhenden Osteozyten. Das umliegende Knochenmark (> 150 µm) unterscheidet sich nicht in Struktur und Zellularität von weiter entfernten Arealen.

Abb. 10



Präparat der SHAM-Gruppe: Man sieht deutlich die Aussparung durch den Wachspfropf mit umgebendem Fibroblastensaum (→). Im oberen Knochenbälkchen (→) befinden sich Osteozyten, im Unteren hauptsächlich Osteoblasten (→).

Abb. 11



Präparat der SHAM-Gruppe: hier ist ein breiterer Fibroblastensaum erkennbar (→). Es zeigen sich auch die besagten Reste hyalinen Materials (→). Auch hier gibt es Knochenbälkchen mit Osteozyten (→).

Diaphyse und Knochenmark:

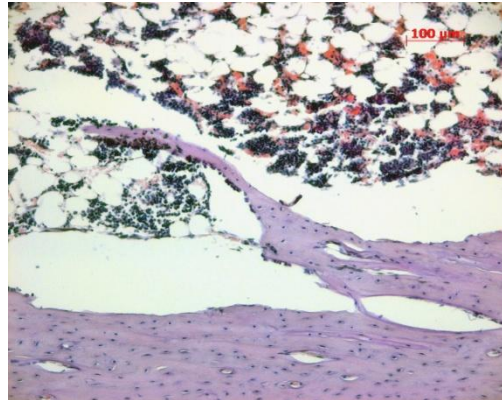
Die Diaphysen der Femurknochen der Tiere der SHAM-Gruppe sind vollständig mit intaktem Knochenmark ausgefüllt und gleichen in Variation und Anzahl der Zellentitäten dem Knochenmark gesunder, nicht behandelter Lewis-Ratten (eigen erhobene Daten). Auffallend sind kleine knöcherne Strukturen, die vereinzelt (1-3 pro Femur) im Markraum zu finden sind. Bei den Zellen dieser Sequester handelt es sich meist um aktive Osteoblasten. Es sind jedoch auch ruhende Osteozyten zu finden. Im Randbereich der Markhöhle findet sich in einem Präparat zudem eine spikulär ins Lumen ragende Knochenschuppe.

Abb. 12



Präparat der SHAM-Gruppe: Knochensequester im Markraum. Zu sehen sind sowohl aktive Osteoblasten (→), als auch ruhende Osteozyten (⇨).

Abb. 13



Präparat der SHAM-Gruppe: Knochenschuppe auf der Innenseite der Compacta der Diaphyse, die ca. 300 µm weit ins Lumen der Diaphyse hinein ragt

Fibroseareale oder anderweitige Inhomogenitäten waren in keinem der Präparate zu erkennen.

3.3 Nachweisbarkeit der Inseln im Knochenmark

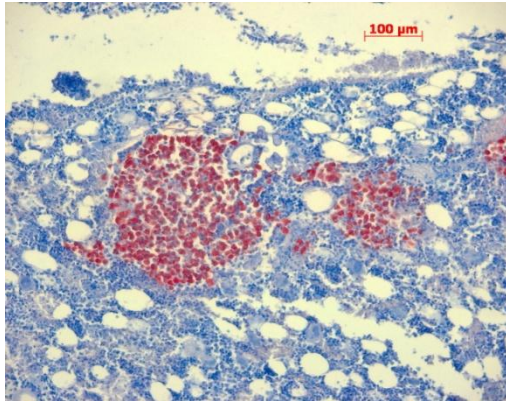
Die Inseln wurden nach Kanülieren der Markhöhle und Vorschieben des Nylonkatheters entlang der Diaphyse im Rückzug in den Markraum appliziert. Dabei kam es zur Verdrängung von Knochenmark durch die Inselmasse. Um herauszufinden, ob die Inseln bei diesem Verfahren in der Markhöhle verbleiben und sich gleichmäßig über den Markraum verteilen, wurde ein Transplantationsversuch in einer Lewis-Ratte (Test-Ratte; n=1) unternommen, wobei schon 10 Minuten nach ITx die Organentnahme und histologische Aufarbeitung erfolgte. Von Interesse waren hier hauptsächlich das generelle Vorhandensein und die Lokalisierung der Inseln im Knochenmark. An den gewonnenen Präparaten wurde eine H&E-, sowie eine Insulin-Färbung durchgeführt (siehe 2.6.4.1 & 2.6.4.2).

3.3.1 Ergebnisse der Testtransplantation

In allen Präparaten der Testtransplantation (TEST-Ratte) sind Insulin-positive Zellen sowie Inseln nachweisbar. Sie sind über die gesamte Länge und Breite des Markraumes verteilt. In der Mitte des Markraumes sind in der H&E Färbung Anschnitte des eingebluteten Stichkanals des Nylonkatheters sichtbar. Einige Inseln

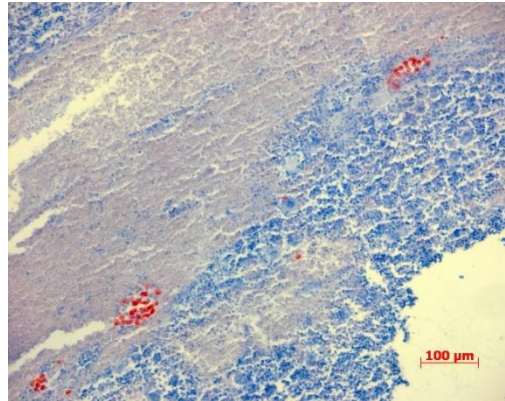
platzieren sich am Rand des Stichkanals. Neben Inseln findet man an einigen Stellen ein amorphes Material im Markraum. Wahrscheinlich handelt es sich um Knochenmehl von der Bohrung, welches beim Vorschieben des Katheters mit in die Diaphyse gelangt ist.

Abb. 14



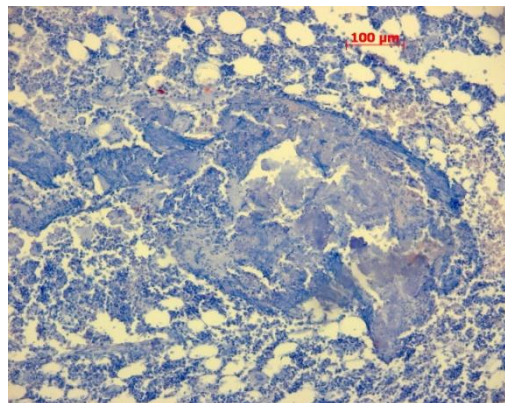
Präparat der TEST-Ratte: Es sind 2 Inseln sowie einige Bruchstücke sichtbar. Sie sind von intaktem Knochenmark umgeben.

Abb. 15



Präparat der TEST-Ratte: 2 Inseln liegen am Rand des Stichkanals.

Abb. 16



Präparat der TEST-Ratte: Amorphes Material im Bereich der Diaphyse. Es entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit Knochenmehl, welches nach der Bohrung in den Stichkanal eingebracht wurde.

3.3.2 Langzeitüberleben der Inseln im Knochenmark

3.3.2.1 Versuchsaufbau

Nachdem die die Testtransplantation gezeigt hat, dass es möglich ist, Inseln durch das Katheterverfahren erfolgreich in die Diaphyse des Femurknochens einzubringen, sollte nun herausgefunden werden, ob sie über einen längeren Zeitraum (30 Tage) im Knochenmark überleben können. Hierzu wurde in 4 Lewis-Ratten (Gruppe „KM5“) eine syngene Inseltransplantation mit 3000 IEq, jeweils 1500 IEq pro Femurknochen in beide Hinterläufe durchgeführt. Die Ratten wurden vor der Transplantation mit Streptozotocin diabetisiert (siehe 2.4.2), um einen Einfluss der ITx auf den Blutzuckerspiegel erkennen zu können. Nach Transplantation wurden die Tiere für den o.g. Zeitraum beobachtet und danach zur Organentnahme getötet.

3.3.2.2 Insulinfärbung

Die beste Methode, um Inselzellen in histologischen Präparaten vom umliegenden Gewebe unterscheiden zu können, ist, das produzierte Insulin mittels Immunhistochemie spezifisch anzufärben. Von den entnommenen Femurknochen wurden histologische Präparate gewonnen, die entsprechend 2.6 behandelt wurden. Es wurden Femurknochen von 4 Tieren untersucht.

In 7 von 8 Femurknochen konnten Insulin-positive Areale detektiert werden.

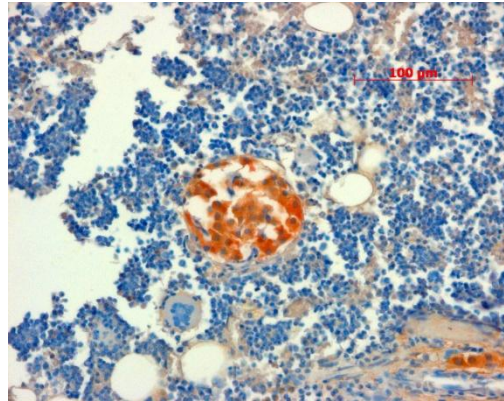
Um diese quantifizieren zu können, wurden die mit Insulin-Antikörpern angefärbten Areale entsprechend ihrer Morphologie den folgenden Kategorien zugeordnet:

Kategorie 1: Morphologisch intakte Inseln

Insulin-positive Areale dieser Kategorie weisen die gleichen morphologischen Merkmale auf wie Inseln im nativen Ratten-Pankreas. Es handelt sich um zusammenhängende, rundliche Areale Insulin-positiver Zellen, die sich untereinander in Größe und Form, sowie im Anfärbeverhalten gleichen. Die Areale zeichnen sich durch eine ununterbrochene Integrität aus, d.h. keine Zelle verlässt den rundlichen Zellverbund und es kommt nicht zum Einwandern Insel-fremder Zellen

(Granulozyten, Fibroblasten etc.). Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Abwesenheit eines mehrschichtigen Fibrosesaumes.

Abb. 17

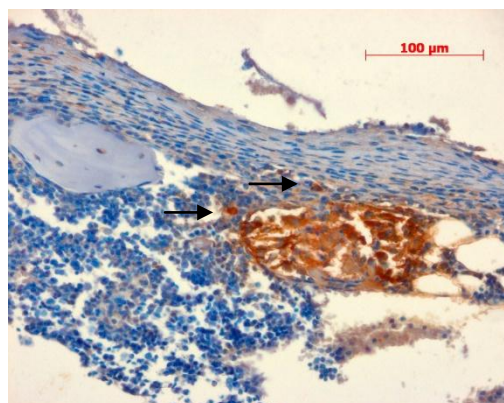


Präparat der Gruppe KM5: Diese Insel entspricht der Kategorie 1. Es handelt sich um eine morphologisch intakte Insel. Die runde Form ist vorhanden und der Zellverband ist intakt.

Kategorie 2: Intakte Inseln mit Ausbreitung ins umliegende Gewebe.

Es zählen die gleichen Kriterien wie in Kategorie 1, jedoch verlassen hier einzelne Zellen den Zellverbund und wandern ins umliegende Gewebe aus. Dennoch ist eine rundliche Form erkennbar und die Areale sind noch als intakte Insel zu erkennen.

Abb. 18

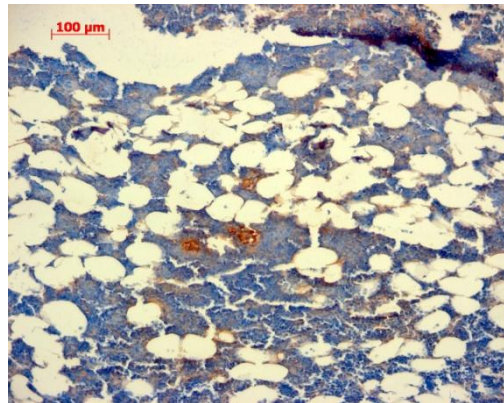


Präparat der Gruppe KM5: Diese Insel entspricht der Kategorie 2. Es handelt sich um eine morphologisch intakte Insel. Die runde Form ist vorhanden, jedoch verlassen einzelne Zellen den Verband und wandern ins umliegende Gewebe aus (→).

Kategorie 3: Inselbruchstücke oder einzelne Insulin-positive Zellen.

Insulin-positive Areale ohne rundlich intakte Architektur und ohne erkennbaren Zellverband sind dieser Kategorie zugeordnet. Desweiteren werden auch Areale mit ausgiebiger Fibrose und umgebender Ossifikation in diese Kategorie eingeschlossen. Es handelt sich entweder um Bruchstücke von Inseln oder um einzelne β -Zellen, die sich auch noch nach 30 Tagen im Knochenmark nachweisen lassen.

Abb. 19

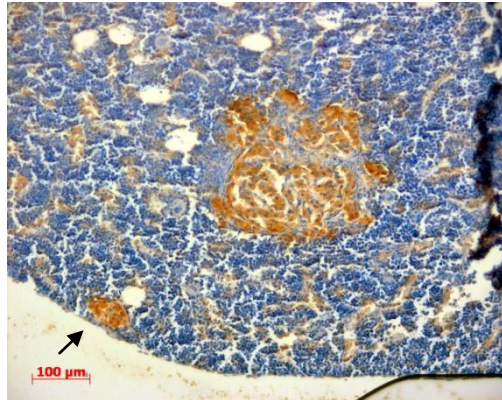


Präparat der Gruppe KM5: Diese Insulin-positiven Areale entsprechen der Kategorie 3. Es handelt sich um Inselbruchstücke. Sie können nicht als intakte Inseln identifiziert werden, jedoch besteht auch noch nach 30 Tagen die Fähigkeit, Insulin zu synthetisieren.

Kategorie 4: Insel- Konglomerate

In 5 von 8 Präparaten sind größere Insulin-positive Areale ($> 400 \mu\text{m}$) zu identifizieren, in denen einzelne Inseln nicht eindeutig abgrenzbar sind. Es handelt sich um Konglomerate von Insulin-produzierenden Zellen. Diese Areale sind von Bindegewebssepten durchzogen. Bei genauer Betrachtung lassen sich rundliche Zellhaufen erkennen, die wahrscheinlich den ursprünglichen Inseln entsprechen. In der Diskussion wird näher auf die Ätiologie dieser Konglomerate eingegangen.

Abb. 20



Präparat der Gruppe KM5: Dieses Insulin-positive Areal entspricht der Kategorie 4. Man sieht ein Konglomerat, sowie eine einzelne Insel, die der Kategorie 1 zuzuordnen ist (→).

3.3.3 Quantitative Auswertung der Präparate der Gruppe Km5

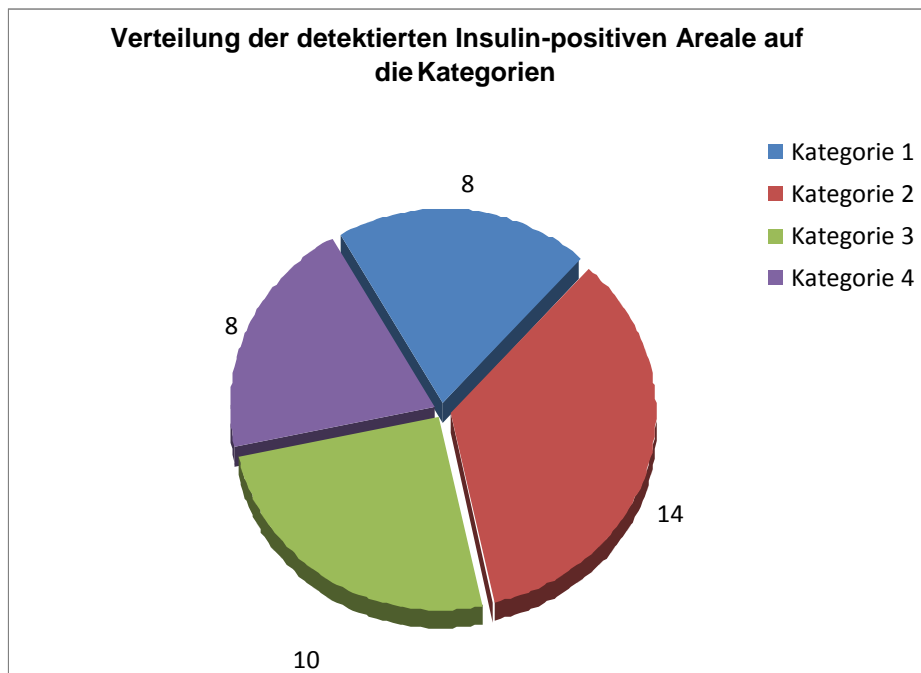
Nach einem Beobachtungszeitraum von 30 Tagen wurden die 4 Versuchstiere der Gruppe KM5 getötet und die Femurknochen wurden entsprechend 2.6 aufbereitet. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte mit dem Zeiss Axioskop 2 plus. Pro Präparat wurden mindestens 10 Gewebeschnitte (Femur, longitudinal) nach Insulin-positiven Arealen abgesehen. Jedes Areal wurde hinsichtlich der unter 3.3.2.2 vorgestellten Kategorien beurteilt und die Areale wurden den entsprechenden Kategorien zugeteilt.

In 7 von 8 Femurknochen waren nach dem Beobachtungszeitraum noch Inseln bzw. Insulin-positive Areale nachweisbar. Diese verteilten sich auf insgesamt 20 von 80 untersuchten Gewebeschnitten.

Entsprechend der unter 3.3.2.2 vorgestellten Kategorien war die Verteilung der Inseln bzw. Insulin-positiven Areale wie folgt:

Es waren insgesamt 8 morphologisch intakte Inseln (Kategorie 1) nachweisbar. 14 Inseln wurden der Kategorie 2 zugeordnet. Desweiteren wurden 10 Inselbruchstücke (Kategorie 3) nachgewiesen. In den 80 untersuchten Gewebeschnitten fanden sich außerdem 8 Inselkonglomerate.

Grafik 4



Grafik 4 zeigt die Verteilung der Insulin-positiven Areale auf die verschiedenen Kategorien.

3.3.4 Untersuchung der Konglomerate

Die Insulin-positiven Areale der Kategorien 1-3 entsprachen immer einzeln abgrenzbaren und zählbaren Inseln bzw. Zellen. Die Konglomerate der Kategorie 4 enthielten hingegen eine große Anzahl an Inseln, die jedoch nicht gut als Einzelne abgrenzbar waren. Um abschätzen zu können, welchen Anteil die Inseln innerhalb der Konglomerate an der gesamten Inselmasse im Knochenmark der transplantierten Ratten hatten, wurden die als einzelne Inseln erkennbaren Bereiche innerhalb der Konglomerate farblich umrandet und dann ausgezählt.

Es wurden 45 als einzelne Inseln abgrenzbare Bereiche innerhalb der Anschnitte der 8 Konglomerate sowie eine nicht quantifizierbare Menge an Insulin-positiven Zellen gefunden.

Die Morphologie der als Inseln abgrenzbaren Bereiche innerhalb der Konglomerate war ein Kontinuum von Bereichen, welche morphologisch fast „in-situ-Inseln“ glichen, bis hin zu Bereichen von Insulin-positiven Zellen die dissoziiert, ohne Ausrichtung und erkennbare Gruppierung im Bindegewebe liegen. Diese Bereiche ließen sich nicht farblich umranden.

Der größte Teil der farblich umrandeten Bereiche entsprach Inseln der Kategorie 2. Jedoch war die äußere Form der Inseln weniger rund-oval. Die farblich umrandeten Insulin-positiven Bereiche innerhalb der Konglomerate waren eher traubenförmig mit

bindegewebigen Einziehungen und einer dadurch eher unregelmäßigen Oberfläche (siehe Abb. 20). Innerhalb der Bereiche waren die einzelnen Zellen weniger gleichmäßig in Größe und Ausrichtung als in Inseln der Kategorie 1 und 2. Auf die Ätiologie der Konglomerate und mögliche Gründe für die veränderte Morphologie wird in der Diskussion eingegangen (siehe 4.3.2).

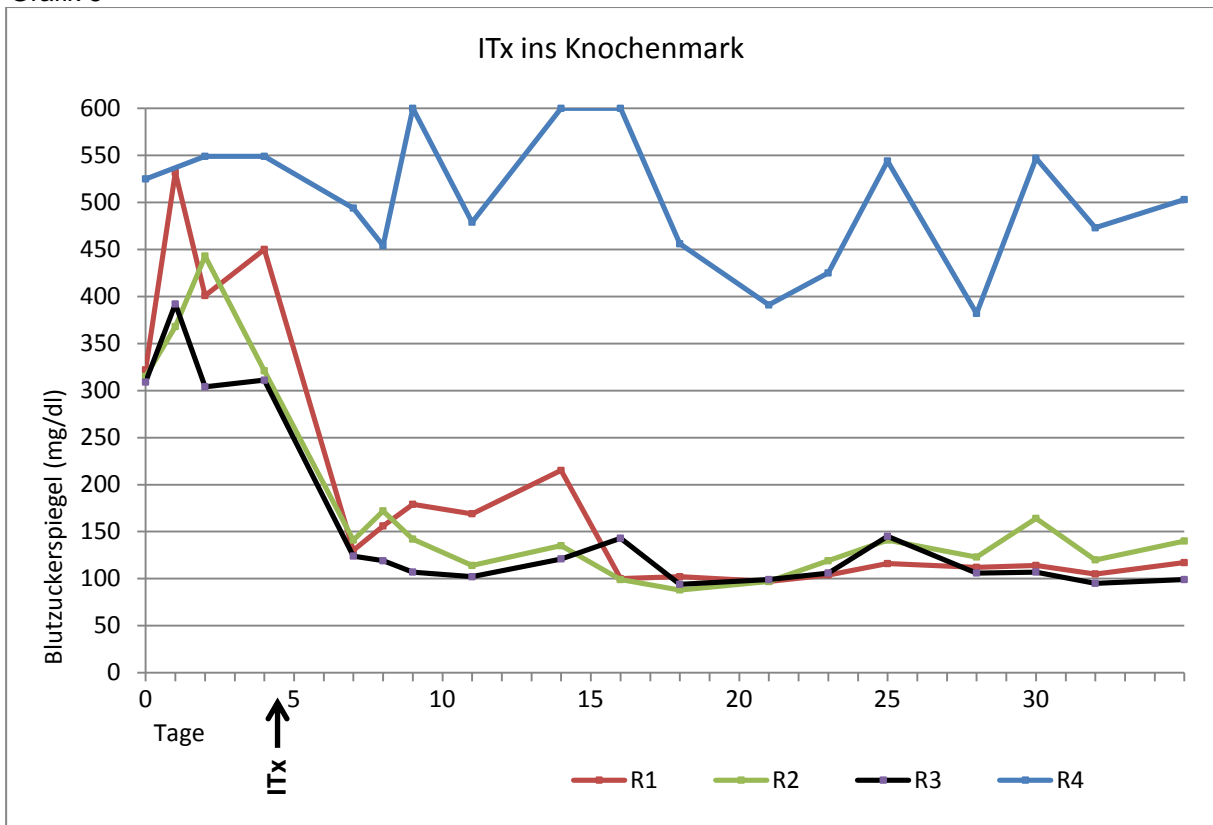
3.3.5 Einfluss der Inseltransplantation ins Knochenmark auf den Glukosestoffwechsel der diabetischen Ratten

Nachdem an 3 aufeinanderfolgenden Tagen Blutzuckerwerte über 300 mg/dl gemessen wurden, wurde der mit Streptozotocin induzierte Diabetes der Tiere als manifest angesehen und die Inseltransplantation konnte erfolgen. Vor Transplantation wurden die Tiere der Gruppe KM5 und der Kontrollgruppe SHAM entsprechend dem unter 2.5.1 beschriebenen Schema mit Insulin behandelt, um für die Operation möglichst stabile Kreislaufverhältnisse zu schaffen.

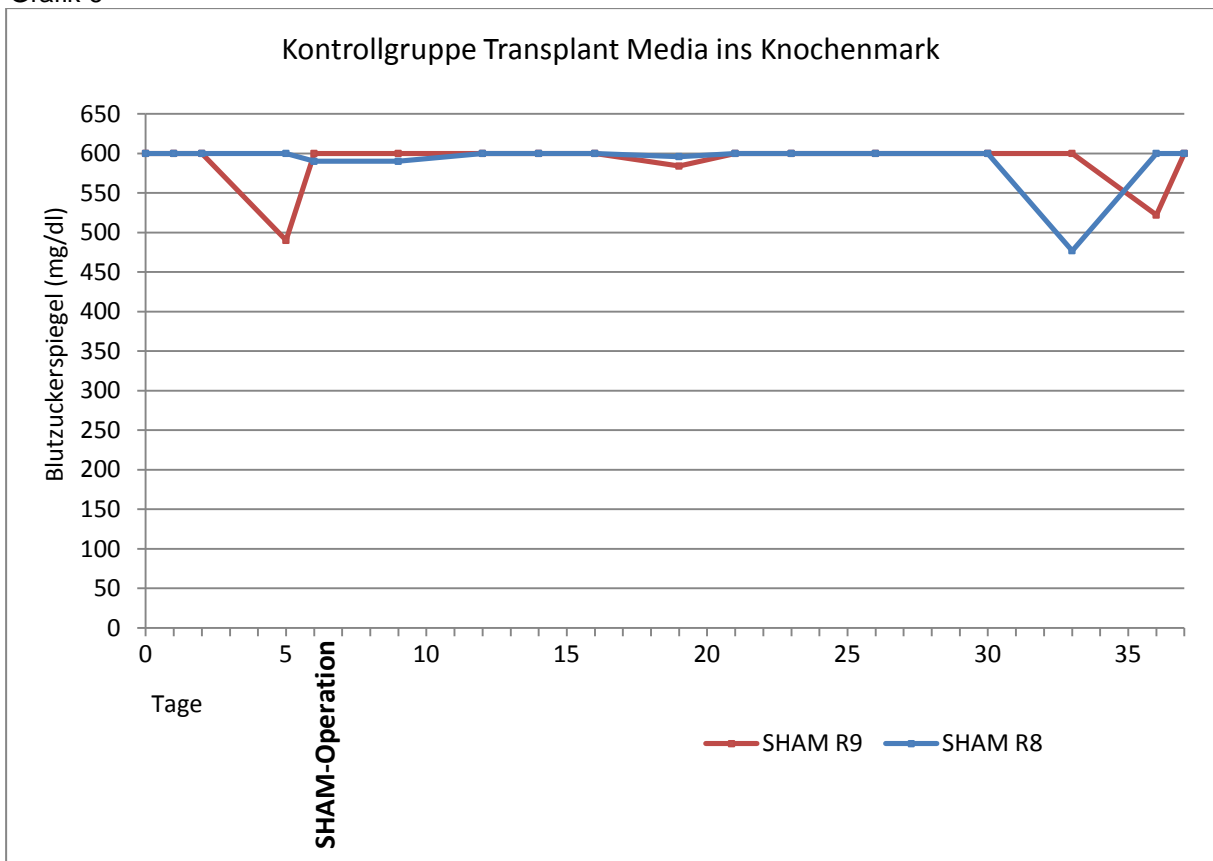
Bei der ersten Messung am 3. Tag nach der Transplantation wurde bei 3 von 4 Tieren ein Absinken der postprandial gemessenen Blutzuckerwerte auf unter 150 mg/dl festgestellt. Im Verlauf kam es bei diesen 3 Tieren noch zu Schwankungen der Werte zwischen 88 mg/dl und 215 mg/dl. Ab dem 14. Tag nach der Transplantation pendelten sich die Werte dann zwischen maximal 164 mg/dl und minimal 95 mg/dl ein. Es handelte sich bei diesen Werten um postprandiale Werte. Bei dem vierten Tier (in Grafik 5 als R4 bezeichnet) ließ sich kein Absinken der Blutzuckerwerte nach Transplantation feststellen. Hier schwankten die Werte zwischen 382 mg/dl und Werten über 600 mg/dl, wobei dieser Wert die obere Grenze des mit dem Contour-Blutzuckermessgerät der Firma Bayer messbaren Bereichs darstellt (Werte über diesem Bereich werden in den Diagrammen immer als Punkte bei 600 mg/dl dargestellt).

Die Blutzuckerwerte der Kontrollgruppe (SHAM; Applikation von Transplant -Media ins Knochenmark; n=2) blieben während des gesamten Beobachtungszeitraumes hoch diabetisch (siehe Grafik 6). Es ließen sich hier keine auf den Eingriff zurückzuführenden Schwankungen des Blutzuckerspiegels feststellen.

Grafik 5



Grafik 6



4 Diskussion

4.1 Das Knochenmark als Zielorgan zur Inseltransplantation

Die Leber stellt den klassischen Transplantationsort zur Inseltransplantation (ITx) dar. Seit mehr als 20 Jahren werden Inseln in der klinischen Anwendung in die Pfortader der Patienten transplantiert. Die Erfolge der ITx sind in der vergangenen Dekade besser und reproduzierbarer geworden, jedoch sind die Langzeitergebnisse nach wie vor unbefriedigend [101]. Durch die Untersuchung der Gründe für diesen Sachverhalt kamen in den letzten Jahren Zweifel an der Eignung der Leber als primärem Transplantationsort für die ITx auf [118]. Es wurden inzwischen mehrere Faktoren identifiziert die den Erfolg der ITx in die Leber negativ beeinflussen [106; 107; 110; 111; 112; 113; 115; 116; 117]. Die Faktoren sind unter 1.5.3 aufgeführt und diskutiert.

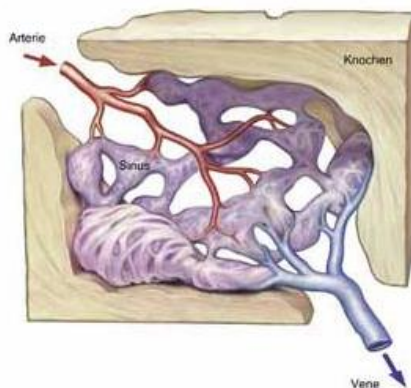
Nachdem sich die Leber als relativ ungeeignet für die ITx erwiesen hat wurde begonnen, alternative Organe und Gewebe hinsichtlich ihrer Eignung zu untersuchen. Bisher wurde jedoch noch kein zufriedenstellender Ersatz gefunden [118].

Entsprechend den Anforderungen für das erfolgreiche Anwachsen und das langfristige Überleben von transplantierten Inseln wurde in dieser Arbeit das Knochenmark hinsichtlich seiner Eignung als primärem Transplantationsort zur Inseltransplantation untersucht.

Das Knochenmark ist ein äußerst gut vaskularisiertes Gewebe, das von äußeren Einflüssen bestens geschützt im Markraum der großen Knochen von Wirbeltieren vorkommt. Es besitzt ein hohes regeneratives Potential und zeichnet sich zudem durch seine gute Erreichbarkeit durch eine transossäre Punktion aus. Eine Punktion der Markhöhle ist im Vergleich zur Pfortaderpunktion einfacher durchführbar und mit einem wesentlich geringeren Komplikationsrisiko verbunden. Die Vorteile des Knochenmarks, hinsichtlich der Inseltransplantation und gegenüber der Leber, sind die Möglichkeit zur extravasalen Platzierung der Inseln, eine höhere extravasale Verfügbarkeit von Sauerstoff [122; 123], eine geringere Belastung mit intestinalen Metaboliten und ein wahrscheinlich geringeres immunogenes Potential der residentiellen Zellentitäten (siehe 1.5.3.1). In einer Publikation von Wie et al. (2006)

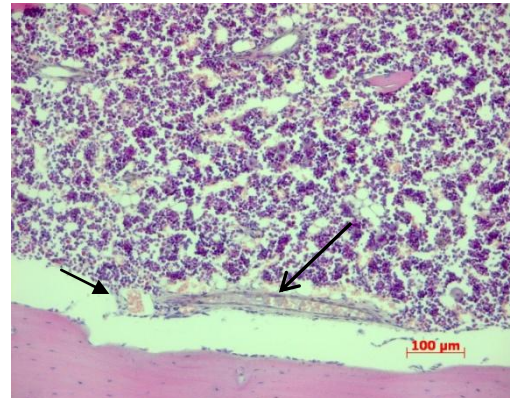
wurde dem Knochenmark ein Immunprivileg, bedingt durch einen hohen Anteil an T-regulatorischen Zellen zugeschrieben, was hinsichtlich einer Inseltransplantation ebenfalls positive Relevanz hat [124].

Abb. 21



Schematische Darstellung der Gefäßversorgung des Knochenmarks. Zwischen den Knochenbälkchen spannt sich ein Netzwerk aus kollagenen Fasern auf, in das die Zellen der Hämatopoese eingebettet sind. Durchzogen wird dieses Geflecht von Arterien, die sich im terminalen Segment zu Sinusoiden aufweiten und ein fenestriertes Endothel aufweisen. Der Abfluss des Blutes erfolgt über Venolen (Bild: Roche).

Abb. 22



Histologisches Präparat des Knochenmarks einer gesunden Lewis-Ratte in H&E-Färbung. Zu sehen sind die Zellen der Hämatopoese, Knochenbälkchen, mit Erythrozyten gefüllte Sinusoide (→) und eine versorgende Arterie (⇨).

4.2 Welche Methode ist geeignet, um die Inseln unbeschadet und in ausreichender Zahl ins Knochenmark der Versuchstiere zu applizieren?

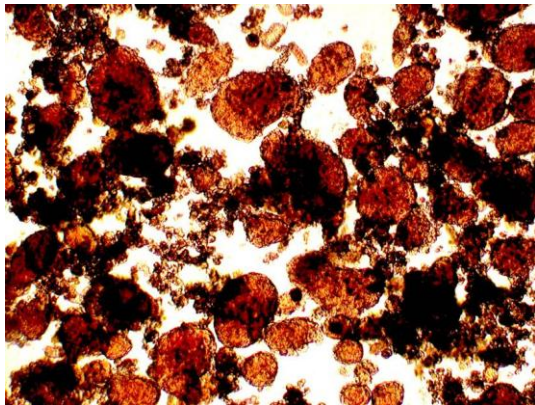
Um die Inseln sicher und unbeschadet in den Markraum der Diaphyse des Femurknochens der Ratten zu transplantieren, bedurfte es der Entwicklung einer neuen Methode zur Inselapplikation. Um den Erfolg der Transplantation theoretisch zu ermöglichen, muss eine Mindestanzahl von ca. 1500 Inseln pro Ratte transplantiert werden [139]. Die Herausforderung bestand in der Diskrepanz zwischen dem geringen Platzangebot der Markhöhle und dem nicht unerheblichen Volumen des Inseltransplantats. Um diese Diskrepanz zu kompensieren, musste das Platzangebot im Femurknochen voll ausgeschöpft und die Inseln über die gesamte Markhöhle verteilt werden, ohne die Gefäßversorgung des Knochenmarks zu zerstören.

Um eine gleichmäßige Verteilung der Inseln zu erreichen, sollte eine vollständige Kanülierung des Markkanals mit einem flexiblen Katheter erfolgen. Im Rückzug des Katheters sollten die Inseln dann ins Knochenmark appliziert werden.

Grundvoraussetzung für dieses Verfahren war zum einen eine möglichst atraumatische Kanülierung und zum anderen das Vorliegen der Transplantate in einem Paket, welches den Markkanal nicht vollständig ausfüllte. Dazu wurden die Inseln mit einer speziell angefertigten Konstruktion in einen flexiblen Schlauch mit möglichst geringem Außendurchmesser und zum Schutz der Inseln auch möglichst großem Innendurchmesser zentrifugiert (siehe 2.5.2.5.1).

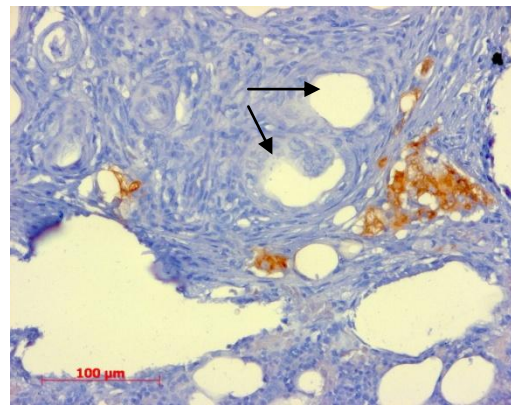
In einer vorangegangenen Studie wurde das o.g. Verfahren erstmals angewendet. Es zeigte sich, dass ein entscheidender Aspekt für den Erfolg eine hohe Reinheit der Inselsuspension ist. Eine zu starke Verunreinigung (>10% der Inselmasse) erhöhte das Volumen des Inselpakets im Schlauch. Bei einer vollständigen Applikation des Insel-Pakets in den Markraum entstanden dort hohe Drücke, die die Inseln und vor allem die Durchblutung des Knochenmarks negativ beeinflussten. Außerdem führte die Verunreinigung der Inselsuspension mit exokrinem Pankreasgewebe zur Ausbildung von Zysten im Knochenmark. Diese Zysten wurden wahrscheinlich durch das Überleben von azinären Zellen hervorgerufen, die im Knochenmark nach wie vor Enzyme produzierten und diese in die Zysten sezernierten (siehe Abb. 24 & Abb. 25)

Abb. 23



Inselsuspension nach dem alten Isolations- und Aufreinigungsverfahren. Es sind deutliche Verunreinigungen mit azinärem Pankreasgewebe zu erkennen. Die Reinheit der Suspension kann mit etwa 60% Inseln und 40% azinärem Gewebe angegeben werden.

Abb. 24



Histologisches Präparat des Knochenmarks einer Ratte 30 Tage nach Inseltransplantation. Zu sehen sind eine dissoziierte Insel der Kategorie 2 sowie einige Inselbruchstücke. Die Insel ist von starker Fibrose umgeben, die als Resultat des erhöhten intramedullären Druckes angesehen werden kann. Es sind zudem 2 zystische Strukturen zu sehen, die von Zylinderepithel ausgekleidet sind (→). Sie sind als residuelle azinäre Pankreaszellen anzusehen, die Pankreasenzyme ins Zystenlumen sezernieren. Dies ist die Folge einer Verunreinigung der Inselsuspension mit azinärem Pankreasgewebe.

Um diese Störfaktoren (erhöhter intramedullärer Druck und Verunreinigung durch azinäres Pankreasgewebe) auszuschalten, wurde das Isolationsprotokoll überarbeitet. Es wurde von einem Verfahren, das an der Universität Mailand entwickelt wurde zu einem Verfahren von der University of Wisconsin gewechselt. Es konnten so wesentlich reinere Inseln isoliert (reproduzierbar Reinheit von > 90%; Eigene Daten) und somit das zu applizierende Volumen deutlich verringert werden. Damit wurde der nach der Applikation bestehende intramedulläre Druck gesenkt. Außerdem wurde durch die erhöhte Reinheit die Prävalenz der Zysten im Knochenmark nach Transplantation auf 0% gesenkt!

Nun wurde die Methode hinsichtlich der Eignung zur Inseltransplantation ins Knochenmark evaluiert.

Es stellten sich folgende Fragen:

Werden die Inseln durch den Lade- und Applikationsprozess so beschädigt, dass der Erfolg der Inseltransplantation beeinträchtigt wird?

Ermöglicht die o.g. Methode eine Applikation aller Inseln in den Markraum und wird das Knochenmark dabei nur soweit geschädigt, dass eine Versorgung der Inseln mit Sauerstoff und Nährstoffen trotzdem sichergestellt werden kann?

Welche Veränderungen ergeben sich im Knochenmark durch das Operationstrauma und dem Einbringen von Fremdgewebe?

4.2.1.1 Schlauch-Ladeversuch

Mit dem unter 3.1 beschriebenen Schlauch-Ladeversuch wurde die Vitalität und die Funktionsfähigkeit der Inseln nach der Ladeprozedur untersucht. Es zeigte sich eine Beeinträchtigung der Inseln nach dem Laden des Nylonschlauchs im Vergleich mit Inseln, die nicht bzw. nur in eine Spritze geladen wurden. Zwar ergaben sich keine makroskopisch erkennbaren Schäden (vgl. 3.1.1.1), jedoch war die Anzahl, der in der Lebend-Tod Färbung (Acridine-Orange / Propidium-Iodid) rot gefärbten (geschädigten) Zellen im Verhältnis zur Inselfläche in der Versuchsgruppe am höchsten. Es ergab sich hier ein Verhältnis der terminal geschädigten Zellen zur Inselfläche von 2,83 / 1000 μm^2 (Median; IQR 2,32; 3,91). In der Kontrollgruppe (Inseln in Spritze geladen) war das Verhältnis mit 1,97 / 1000 μm^2 (Median; IQR 1,44; 3,10) signifikant niedriger ($p=0,018$). Das Verhältnis der nicht behandelten Inseln der

Referenzgruppe war mit nur 1,62 / 1000 μm^2 (Median; IQR 0,57; 2,51) signifikant am niedrigsten ($p < 0,001$). Dies zeigt, dass in der Versuchsgruppe eine Beeinträchtigung der Inselzellen auftritt. Diese Beeinträchtigung bzw. das Absterben einiger Inselzellen ist jedoch, trotz statistischer Signifikanz im Verhältnis zu der großen Anzahl von unbeschädigten Zellen innerhalb der Inseln als unerheblich anzusehen: Eine durchschnittliche Insel (Durchmesser 150 μm ; entspricht 1 IEq) hat eine Querschnittsfläche von ca. 17672 μm^2 . Sie besteht aus ca. 2500 einzelnen Zellen [145]. Dementsprechend finden wir durchschnittlich 29 tote Zellen pro IEq in der Referenzgruppe. Die Inseln sind in der Fluoreszenzfärbung transparent und rote Zellen können deshalb innerhalb der ganzen spärlichen Insel detektiert werden. In der Kontrollgruppe sind es durchschnittlich 34 tote Zellen / IEq und in der Versuchsgruppe ca. 50 tote Inselzellen / IEq. Entsprechend dieser Annahmen muss bei der Kontrollgruppe mit dem Verlust von ca. 1,4% der Inselzellmasse gerechnet werden, bei der Versuchsgruppe, d.h. nach dem Laden der Inseln in den Applikationskatheter mit dem Verlust von durchschnittlich ca. 2% der Inselmasse. Diese Verluste sind als geringfügig anzusehen und mit 98% gesunder Inselzellen ist ein negativer Einfluss auf den Erfolg der Inseltransplantation durch das Laden der Inseln in den Applikationskatheter demnach nicht anzunehmen.

Der im Anschluss durchgeführte Insulinsekretionstest ist in diesem Zusammenhang wohl als die sensitivste Methode zur Beurteilung der Inseln anzusehen. Im klinischen Setting stellt er einen wichtigen Test zur Evaluation der Inselqualität vor der Transplantation dar [140]. Durch die Stimulation der Inseln mit Glukoselösung wird die physiologische Insulinsekretion provoziert. Eine geschädigte Insel hat ein eingeschränktes Sekretionsvermögen, was durch den Insulin-Sekretionstest detektiert werden kann. Die Auswertung des Sekretionstests liefert für jede Stichprobe den Sekretionsindex, der das relative Sekretionsvermögen der untersuchten Inseln anzeigt und so die Ergebnisse unabhängig von der Inselgröße innerhalb der Stichprobe vergleichbar macht. Der Insulinsekretionstest zeigte keine signifikante Beeinträchtigung der Inseln nach dem Schlauch-Ladeversuch (siehe 3.1.3).

Nachdem die Schädigung der Inseln durch die Ladeprozedur nach Untersuchung der Inselstruktur, der Vitalität und der Funktionalität mit den o.g. Verfahren überprüft

wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Inseln zwar in geringem Ausmaß von der Prozedur geschädigt werden, aber dass sich dadurch keine nachhaltigen bzw. terminale Beeinträchtigungen der Inseln ergeben.

Die Ladeprozedur ist aber sicherlich trotzdem ein Faktor, der bei der histologischen Untersuchung der Präparate in Betracht gezogen werden muss. Auch durch eine nicht-terminale Schädigung der Zellen, durch Hypoxie und mechanischen Stress während der Prozedur, könnte die Chemokin- und Zytokinproduktion der Inselzellen stimuliert werden, was zu Inflammation und Fibrosierung der transplantierten Inseln im Knochenmark führen könnte [141; 142].

Ein weiterer wesentlicher Faktor ist die Formation von Inselpaketen durch den Druck der Zentrifugation. Die Inseln werden mit großer Kraft im Schlauch zusammengepresst, und es besteht dadurch die Gefahr dass sie zu größeren Formationen verkleben. Diese Formationen sind aufgrund der Form des Schlauches zylinderförmig und könnten beim Zurückziehen des Schlauches im Ganzen in die Markhöhle appliziert werden. Wenn sich diese Formationen nicht auflösen und sich die Inseln nicht einzeln platzieren, könnten sie als Formation im Knochenmark anwachsen und sind dann in den histologischen Präparaten als Konglomerate zu finden. Im Randbereich der Konglomerate ist der Stoffaustausch durch Diffusion sicherlich nicht wesentlich beeinträchtigt. Im zentralen Bereich der Konglomeratzylinder ist jedoch von einer hohen Diffusionsbarriere auszugehen. Die resultierende Hypoxie und der Nährstoffmangel sind Auslöser von Zelluntergang, Zytokinproduktion, Inflammation und schließlich Fibrose [141; 142]. Dieser Ablauf könnte die hohe Prävalenz von Fibrosearealen und den eher schlechten Zustand der Inseln innerhalb der Konglomerate (wie unter 3.3.4 festgestellt) erklären.

4.2.1.2 Test-Transplantation

Die Testtransplantation (siehe 3.3.1), bei der nach einer Wartezeit von nur 10 Minuten nach ITx die Organentnahme erfolgte, lieferte wichtige Erkenntnisse über Eignung der Methode und die initiale Platzierung der Inseln im Knochenmark. Es zeigte sich, dass die Inseln tatsächlich die Markhöhle erreichen und sich über die gesamte Länge des Markraumes verteilen. Außerdem zeigte sich, dass sich die Inseln hauptsächlich am Rand des Stichkanals platzieren und dort mit intaktem, gut

durchblutetem Knochenmark in direktem Kontakt stehen. Der Versuch der Testtransplantation zeigte also die Effektivität der Methode und lieferte die Grundlage für die weiteren Untersuchungen. Hinsichtlich der Konglomeratformation erbrachte die Test-Transplantation allerdings keine weiteren Erkenntnisse. In den untersuchten Präparaten wurden keine Konglomerate, bzw. dicht gepackte Inseln gefunden. Die Relevanz dieser Tatsache ist aufgrund der kleinen Gruppengröße (n=1) nicht verwertbar.

4.2.2 Schädigung des Knochenmarks durch den Applikationsprozess

Mit der SHAM-Gruppe wurde nicht nur die Bedingung einer Negativ-Kontrolle erfüllt, sondern es wurden auch Erkenntnisse über die Veränderungen des Knochenmarks durch das Kanülieren mit dem Nylonkatheter und einer Kontamination des Knochenmarks mit Transplant-Media gewonnen. Es zeigten sich hier geringfügige strukturelle Veränderungen, die hauptsächlich der mechanischen Irritation des Markraumes und der Innenseite der Compacta anzuschulden sind. Die vereinzelt auftretenden, in den Markraum hineinragenden spikulären Knochenstrukturen sind jedoch für die Funktion des Knochenmarks als unerheblich einzuordnen.

4.3 Morphologische Beurteilung der Transplantate

4.3.1 Morphologie von Inseln in situ

Inseln im Pankreas gesunder Ratten stellen sich histologisch als rund-ovale Formationen von weitgehend apolaren Zellen dar. Sie sind vom umgebenden exokrinen Pankreasgewebe durch eine dünne Bindegewebskapsel getrennt [144].

4.3.2 Morphologie der transplantierten Inseln und Rückschlüsse auf Vitalität und Funktion

Der early-graft-loss sowie das Zugrundegehen von Inselzellen in den ersten Tagen nach Transplantation sind mit deutlichen morphologischen Veränderungen der Inseln verbunden. Durch Hypoxie kommt es zur Nekrose, welche sich zunächst im Zentrum der spärlichen Inseln manifestiert [143]. Eine Resorption durch eingewanderte Monozyten führt zu einer Veränderung der Inselmorphologie und es ist anzunehmen,

dass neben dem Isolationsprozess der unmittelbare Angriff durch Granulozyten und Komplementfaktoren während der IBMIR sowie die Interaktion mit Kupfferzellen in der Leber ebenfalls zu einer veränderten Inselarchitektur führt (siehe 1.5.3) [141]. Eine veränderte Morphologie der transplantierten Inseln kann deshalb ein Zeichen für das Vorhandensein von schädigenden Faktoren sein [144].

Auch spielt die Mikroarchitektur der Langerhansschen-Inseln für deren Funktion eine wichtige Rolle. Es wird eine parakrine Interaktion über Gap-Junctions sowie eine endokrine Interaktion über ein lokales Pfortadersystem zwischen den verschiedenen Zellentitäten der Inseln angenommen [145].

Davalli et al. und Morini et al. publizierten Untersuchungen zur Inselmorphologie nach Inseltransplantation unter die Nierenkapsel von Mäusen und zeigten eine Veränderung der Inselmorphologie innerhalb der ersten 14 Tage nach Transplantation. Die Inseln lagerten sich zu Gruppen um Blutgefäße zusammen und nahmen skurrile Formen an. Dieser Prozess wurde als „remodelling“ bezeichnet. Die veränderte Morphologie schien zwar keinen Einfluss auf die Inselfunktion unter normaler Glukosebelastung zu haben, jedoch wurde eine eingeschränkte Blutzucker-Regulation nach intraperitonealem Glukose-Toleranztest festgestellt [144; 146].

Eine eingeschränkte Inselfunktion nach Transplantation einer eigentlich ausreichenden Menge an Inselequivalenten ist auch in anderen Experimenten festgestellt worden und wird von vielen Autoren auf eine Veränderung der Inselmorphologie zurückgeführt [147; 148; 149].

Die histomorphologische Auswertung, der ins Knochenmark transplantierten Inseln ergab ein uneinheitliches Bild. Es fanden sich sowohl morphologisch intakte Inseln, welche den Inseln im Pankreas einer gesunden Ratte stark ähnelten, als auch Inseln mit veränderter Morphologie.

Es ist davon auszugehen, dass Inseln, die morphologisch „in-situ“ Inseln gleichen (Kategorie 1), auch funktionell intakt sind.

Inseln der Kategorie 1 zeichnen sich durch eine klare Integrität der Inselzellen, eine rundliche Form und klare Abgrenzbarkeit zum umgebenden Gewebe aus. Sie sind lediglich von einer dünnen Schicht Bindegewebe umgeben. Sie unterscheiden sich also morphologisch kaum von in-situ Inseln (siehe 4.3.1). Die erhaltene Anfärbbarkeit mit Insulin-Antikörpern über 30 Tage nach Transplantation setzt eine erhaltene Synthesefähigkeit der Insel voraus und unterstützt diese Annahme.

Auch bei den Inseln der Kategorien 2 ist von einer erhaltenen Synthesefähigkeit auszugehen. Diese Inseln sind definitionsgemäß nach wie vor als solche erkennbar. Sie weisen lediglich einzelne Zellen, die den Zellverband verlassen haben und ins umliegende Gewebe abgewandert sind auf. Inselzellen, die außerhalb der transplantierten Inseln liegen, wurden auch nach intraportaler Inseltransplantation in Ratten und Mäusen festgestellt [150; 151]. Für dieses "Auswandern" einzelner Zellen gibt es bisher keine Erklärung.

Die gefundenen Inselbruchstücke der Kategorie 3 zeichneten sich ebenfalls durch eine erhaltene Anfärbarkeit mit Insulin-Antikörpern aus. Die Ätiologie dieser Bruchstücke ist nicht endgültig festzustellen. Sie könnten die Überreste von, zum Zeitpunkt der Transplantation noch intakten Inseln sein, die durch unbekannte, Insel-schädigende Faktoren im Knochenmark entstanden sind. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass die Bruchstücke durch den Prozess des Ladens in den Nylon-Schlauch und die Transplantationsprozedur entstanden sind. Für diese Ätiologie spricht, dass die meisten der Bruchstücke von nur wenig Fibrose umgeben sind. Gleiches gilt für die unversehrten Inseln der Kategorie 1.

Die meisten der Insulin-positiven Areale waren von einem schmalen Saum aus Fibroblasten umgeben. Die Fibrose ist als Reaktion des Knochenmarks auf eine chronische Entzündung und somit als eine sekundäre Fibrosierung anzusehen. Fibrose entsteht durch die Einwanderung von Fibrozyten. Diese stammen aus dem umliegenden Knochenmark und folgen einem Gradienten aus Zytokinen und Chemotaxinen die von den Inseln selbst, aber auch von umliegenden Makrophagen und Lymphozyten ausgeschüttet werden [152]. Die Organentnahme und die histologische Auswertung der Transplantate erfolgten nach einer Beobachtungszeit von 30 Tagen. Es kann davon ausgegangen werden, dass im syngenen Setting die Inflammations- und Resorptionsprozesse nach diesem Zeitraum abgeschlossen sind und sich das Knochenmark sowie die Transplantate in einem stabilen Zustand befinden. Somit kann die Größe und Ausbreitung des Fibrosesaums als Marker für die initiale Schädigung der Inseln und des umgebenden Knochenmarks angesehen werden.

Die Tatsache, dass die Inseln der Kategorie 1 nur von wenigen Schichten Fibroblasten umgeben sind, führt zur Annahme, dass diese Inseln intakt ins

Knochenmark transplantiert werden und dort nicht oder nur geringfügig geschädigt werden.

Die Ätiologie der als Kategorie 4 klassifizierten Inselkonglomerate wurde unter 4.2.1.1 bereits angesprochen. Wahrscheinlich ist, dass durch die Zentrifugation viele Inseln im Schlauch komprimiert werden und sich dann im Knochenmark nicht wieder voneinander lösen. Eine weitere Theorie zur Entstehung dieser Formationen liefern die Untersuchungen von Morini et al. Dort wurde beobachtet, dass sich Inseln, die unter die Nierenkapsel von Mäusen transplantiert wurden, innerhalb weniger Tage zu Formationen um Blutgefäße herum gruppieren. Dies wird auf die initiale Hypoxie und die damit verbundene Nekrose vieler zentral gelegener Zellen sowie auf eine peri-Insuläre Inflammation und Ödem-Bildung zurückgeführt [146].

Die Bildung der Konglomerate und die gestörte bzw. skurrile Morphologie der eingeschlossenen Inseln lassen sich wahrscheinlich durch eine Kombination der beiden o.g. Theorien erklären. Die Inseln wurden als Formation ins Knochenmark appliziert. Dort trennten sich die Inseln nicht und es kam zur Hypoxie der zentral gelegenen Inseln bzw. Zellen aufgrund der erhöhten Diffusionsbarriere. Dadurch wurden Zyto- und Chemokine ausgeschüttet. Es kam zur intra-, inter- und peri-Insulären Inflammation und schließlich zum Einwandern von Fibroblasten [152]. Weitere Faktoren für peri-Insuläre Inflammation sind das Gewebetrauma durch die Kanülierung und die, trotz der hohen Reinheit der Inselsuspension vorhandene Kontamination mit exokrinem Gewebe [146]. Dieser Ablauf erklärt sehr wahrscheinlich die Entstehung der Konglomerate. Inwieweit die Lage der Inseln in Konglomeraten und die veränderte Morphologie die Inseln funktion beeinträchtigt, kann durch die hier vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden.

4.3.3 Quantitative Auswertung der Insulin-positiven Areale

Bei der quantitativen Auswertung der Insulin-positiven Areale in den Gewebeschnitten war die Mehrzahl (22/40, 55%) der gefundenen Areale den Kategorien 1 und 2 zuzuordnen (8/40 bzw. 14/40) und wies demnach eine, für die Inseln funktion höchst wahrscheinlich weitgehend unerhebliche Inseln morphologie auf [150; 151]. 25% (10/40) der gefundenen Areale waren der Kategorie 3 zuzuordnen.

Bei diesen Inselbruchstücken ist von keinem signifikanten Einfluss auf den Glukosestoffwechsel auszugehen. Bei weiteren 20% (8/40) der Insulin-positiven Areale handelte es sich um die o.g. Konglomerate. In den Konglomeraten war jedoch die größte Anzahl an Insulin positiven Zellen zu finden. Aufgrund der, im Vergleich zu nativen Inseln deutlich veränderter Morphologie der Inseln innerhalb der Konglomerate muss von einer eingeschränkten Inselfunktion ausgegangen werden. Dennoch scheinen auch die in Konglomeraten liegenden Inselzellen glucotrope Hormone zu sezernieren, da die geringe absolute Anzahl von Inseln der Kategorie 1 und 2 (22/40) nicht ausreicht um die Normalisierung des Glukosestoffwechsels der Ratten der Versuchsgruppe KM5 auszulösen. Eine, wenn auch ggf. eingeschränkte Funktion der Inselzellen in den Konglomeraten ist also, auch im Kontext mit den Erkenntnissen von Davalli et al. und Morini et al. [144; 146] anzunehmen.

4.4 Einfluss der Inseltransplantation ins Knochenmark auf den Glukosestoffwechsel der diabetischen Ratten

Entsprechend der Entwicklung der Blutzuckerwerte der, vor der ITx ins Knochenmark diabetischen Ratten, ist ein positiver Einfluss der Transplantation auf den Glukosestoffwechsel anzunehmen.

Grafik 5 zeigt ein deutliches Absinken der postprandialen Blutzuckerwerte in 3 von der insgesamt 4 Ratten der Versuchsgruppe, schon am dritten Tag nach Transplantation. Die Blutzuckerwerte der Kontrollgruppe (Applikation von Transplant-Media ins Knochenmark) blieben während des gesamten Beobachtungszeitraums hoch diabetisch (siehe Grafik 6).

Die Schwankungen der Blutzuckerwerte zwischen physiologischen und (sub-)diabetischen Werten innerhalb der ersten 14 Tage nach Transplantation könnte in Bezug auf besonders niedrige Werte mit der Nekrose einzelner Inselzellen bzw. Inseln und der damit verbundenen unkontrollierten Insulinfreisetzung und, in Bezug auf besonders hohe Werte mit der noch unzureichenden Revaskularisierung der Transplantate erklärt werden. Erst nach 14 Tagen ist von einer stabilen Gefäßversorgung der Inseln, entsprechend den Publikationen von Menger et al. [109] auszugehen. Auch Morini et al. beschreiben eine abgeschlossene

Revaskularisierung zu diesem Zeitpunkt sowie ein Zugrundegehen von terminal geschädigten Inselzellen fast ausschließlich innerhalb der ersten 14 Tage [146].

Das Verhalten des Glukosestoffwechsels der als R4 bezeichneten Ratte, d.h. das Fortbestehen einer deutlich diabetischen Stoffwechsellage trotz ITx kann entweder als empirische Varianz, oder aber im Kontext einer Schädigung der transplantierten Inseln durch Glukotoxizität bei Hyperglykämie in der peri-Transplantationsphase angesehen werden [153; 154]. Bei der R4 Ratte waren die Blutzuckerwerte vor der ITx durchschnittlich 180 mg / dl höher als bei den anderen Tieren. In diesem Sinne könnte die verwendete Inselmenge von 3000 IEq in diesem Experiment auch eine marginale Anzahl an IEq für die Heilung der diabetischen Ratten durch ITx ins Knochenmark darstellen.

Das Absinken der postprandialen Blutzuckerwerte in einen, für Lewis-Ratten normalen Bereich [155] in 3 von 4, vor ITx diabetischen Tieren liefert substantielle Evidenz für einen Therapieeffekt der ITx ins Knochenmark. Die Forschungshypothese, dass die ITx ins Knochenmark den Streptozotocin induzierten Diabetes in Lewis Ratten heilen kann, wird damit unterstützt. Allerdings weisen die Konfidenzintervallschranken für die Erfolgswahrscheinlichkeit von 20-90% auf eine hohe stichprobengrößenassoziierte Unsicherheit des Ergebnisses hin.

Eine alternative Theorie zur Erklärung des Absinkens der Blutzuckerwerte nach ITx darf dementsprechend aufgrund der kleinen Gruppengröße nicht unbeachtet bleiben. Durch die präoperative Insulingabe wurde der Blutzuckerspiegel schon vor der Inselapplikation in einen per Definition subdiabetischen Bereich abgesenkt. Drei Tage nach ITX befanden sich die Werte der im Verlauf als geheilt anzusehenden Tiere schon im physiologischen Bereich. Dementsprechend ist die Möglichkeit einer spontanen Remission des Streptozotocin induzierten Diabetes erwähnenswert. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass keine Berichte über eine Spontanremission von STZ-induziertem Diabetes in der Fachliteratur zu finden sind. Außerdem ist ein zeitgleiches Auftreten dieses Phänomens in 3 Tieren mit vormals stabilem Diabetes mellitus (Blutzuckerspiegel >300mg/dl an 3 aufeinanderfolgenden Tagen) ein recht unwahrscheinliches Ereignis.

Desweiteren muss im o.g. Kontext ein möglicher methodischer Fehler im Sinne eines Selektions-Bias angesprochen werden. Die Tiere, die der Versuchsgruppe

zugeordnet waren wiesen vor der ITx zwar definitionsgemäß einen stabilen STZ-induzierten Diabetes mellitus auf (BZ > 300 mg / dl an 3 aufeinander folgenden Tagen), jedoch waren die gemessenen BZ-Werte durchschnittlich ca. 150 mg / dl unter den Werten der Kontrollgruppe. Dieser methodische Fehler ist ggf. auf die zweizeitige Durchführung der o.g. ITx- Experimente (Versuchsgruppe und SHAM-Gruppe) und die verschiedenen Chargen des verwendeten STZ zurückzuführen.

4.5 Kritische Betrachtung der verwendeten Methode und Ausblick

Die hier vorgelegte Arbeit stellt den ersten Schritt bei der Entwicklung einer neuen Technik zur Transplantation von Inseln ins Knochenmark im diabetischen Kleintiermodell dar. Auf dem Gebiet der Inseltransplantation sind in den vergangenen 50 Jahren viele experimentelle Methoden entwickelt und bis zur guten Reproduzierbarkeit etabliert worden. Die vorgestellte Arbeit ist dementsprechend lediglich als Machbarkeitsstudie („Proof-of-Principle“) anzusehen. Sie weist noch deutlichen Verbesserungsbedarf der Methode und Validierungsbedarf der Ergebnisse auf.

Für die Lewis-Ratte als Modellorganismus in der Diabetes- und Transplantationsforschung bestehen seit langem weltweite Erfahrungen [155]. Als Inzuchtstamm eignet sich die Lewis-Ratte zudem sehr für syngene Transplantationsexperimente. Aufgrund der kurzer Generationszeit, den günstigen Haltungsbedingungen, vielfältig etablierten und kommerziell erhältlichen Diagnosemethoden und nicht zuletzt wegen eines effizienten Insel-Isolationsprotokolls für Lewis-Ratten fiel die Wahl auf diesen Rattenstamm. Dennoch ist der Schwachpunkt der vorgelegten Arbeit die Auswahl der Ratte als Modellorganismus. Aufgrund des, im Verhältnis zur Körpermasse geringen Platzangebots in der Markhöhle des Femurknochens und des, im Verhältnis zur Körpermasse relativ großen Gesamtvolumens der, für den Erfolg der ITx notwendigen Inselmenge, musste die Konzentration der Inseln im Nylonkatheter erfolgen. Wie unter 4.2.2 und 4.3.2, diskutiert kommt es durch dieses Verfahren zu einer leichten Schädigung der Inseln, sowie konsekutiv wahrscheinlich zur Ausbildung der sog. Konglomerate. Der Störfaktor des Konzentrationsverfahrens wäre in einem Großtiermodell (z.B. diabetisches Schwein) nicht relevant. Hier könnte

die Inselapplikation durch Infusion der Inseln ins Knochenmark erfolgen. Eine Konzentration im Applikationskatheter wäre nicht notwendig. Hier wäre ein interessanter Aspekt, in wie weit es im Knochenmark dennoch zum „remodelling“ (siehe 4.3.2) kommt. Dieser Ansatz könnte jedoch auch noch im Rattenmodell mit der hier vorgestellten Technik, allerdings mit Transplantation einer wesentlich geringeren Anzahl an Inseln und ohne einen Heilversuch untersucht werden.

Ein weiterer Kritikpunkt der hier vorgelegten Arbeit ist die geringe Stichprobenzahl (n=4) im ITx-Experiment. Dementsprechend ist das Ergebnis der Diabetes-Remission durch ITx ins Knochenmark im diabetischen Rattenmodell mit Konfidenzintervallschranken für die Erfolgswahrscheinlichkeit von 20-90% recht unsicher. Allerdings ist dies, aufgrund der Konzeption der vorgelegten Arbeit als Machbarkeitsstudie nicht von höchster Relevanz. Im Vordergrund stand die Etablierung der Methode der intraossären Inselapplikation und die Generierung von verwertbaren histologischen Präparaten. In diesen Präparaten glichen 20 % (8/40) der gefundenen Insulin-positiven Areale den intakten Langerhanschen Inseln im Pankreas gesunder Ratten. Demnach scheint das Langzeitüberleben von morphologisch intakten, syngen transplantierten Inseln im Knochenmark von diabetischen Ratten möglich zu sein. Die notwendigen Bedingungen hierfür sollten in weiteren Experimenten mit einer optimierten Transplantationsmethode untersucht werden. Desweiteren sollte der direkte morphologische Vergleich von intrahepatisch- und intraossär transplantierten Inseln angestrebt werden. Erweist sich die intraossäre ITx dann mindestens äquivalent zur intrahepatischen ITx, sollten beide Applikationsorte auf ihren Einfluss auf den early-graft-loss und die jeweils benötigte Mindestmenge an Inseln für eine erfolgreiche ITx untersucht werden. Eine weitere Translation des Konzepts der ITx ins Knochenmark sollte dann über Experimente im Großtiermodell führen.

5 Zusammenfassung

Um der Invasivität und den Komplikationen einer Pankreastransplantation als vormals einziger Möglichkeit zur kausalen Behandlung des Diabetes mellitus Typ 1 (Dm Typ 1) zu entgehen, wurde in den vergangenen 50 Jahren das Verfahren der Inseltransplantation (ITx) entwickelt. Zur ITx werden die Langerhansschen Inseln eines Spenderorgans durch enzymatischen Verdau aus dem umgebenden exokrinen Pankreasgewebe gelöst, durch Gradientenzentrifugation aufgereinigt und dann dem Empfänger in ein geeignetes Zielorgan transplantiert.

Die Leber ist das klassische Zielorgan der klinischen ITx. Die Inseln werden über eine perkutane, transhepatische Punktion in den Pfortaderblutstrom infundiert und embolisieren von dort in die Leber.

Dieses Verfahren birgt allerdings einige Risiken und Nachteile. Vor allem die verminderte Oxygenierung des Pfortaderblutes, die sogenannte IBMIR (Instant Blood mediated Incompatibility Reaction) mit Gerinnungs-, Komplement-, und Granulozytenaktivierung, die Schädigung durch Kupfferzellen und die Belastung der Inseln mit Metaboliten aus dem Intestinum sind die hauptsächlich inselschädigenden Faktoren. Aufgrund dieser Faktoren kommt es bereits initial nach ITx zum Absterben von bis zu 70% der transplantierten Inseln. Um dennoch zumindest einen initialen Erfolg der ITx zu ermöglichen, müssen in den meisten Fällen Inseln aus mehreren Spenderorganen (durchschnittlich 2 – 3 Pankreata) in mehreren konsekutiven Transplantationen, mit sich addierendem Komplikations- und Rejektionsrisiko und weiterer Verstärkung des herrschenden Organmangels transplantiert werden.

Als exzellent kapillarisiertes und beim Menschen leicht zugängliches Organ besitzt das Knochenmark die grundlegenden Voraussetzungen als Zielorgan zur ITx. Durch einen hohen Sauerstoffpartialdruck im Gewebe, durch die Möglichkeit zur extravasalen Applikation der Inseln und durch ein potentiell Immunprivileg des Knochenmarks könnten die o.g. negativen Einflüsse reduziert und teilweise vermieden werden. In dieser Arbeit sollte eine geeignete Methode entwickelt werden um die Eignung des Knochenmarks als alternatives Zielorgan zur ITx zu erforschen.

Als Tiermodell wurden, mit Streptozotocin diabetisierte Lewisratten zur syngenem ITx ins Knochenmark des Femurknochens verwendet.

Um die isolierten Inseln in ausreichender Anzahl ins Knochenmark des Femurknochens transplantieren zu können, mussten sie mittels Zentrifugation in einem Nylonkatheter konzentriert werden. Um eine terminale Schädigung durch diese Prozedur auszuschließen wurden die Inseln nach dem Ladevorgang untersucht und mit nativen Inseln, sowie mit Inseln der Kontrollgruppe, die entsprechend dem üblichen Verfahren zur ITx in die Pfortader von Ratten behandelt wurden, verglichen. Die mikroskopische Untersuchung ergab keine morphologischen Unterschiede der verschiedenen Gruppen, jedoch wurde nach der Färbung mit Propidium-Iodid und Acridine-Orange, eine signifikante Beeinträchtigung der Inseln nach dem Ladevorgang festgestellt. Im Vergleich mit Inseln der o.g. Kontrollgruppen, wurde diese Schädigung jedoch als nicht relevant bewertet. Desweiteren konnte durch einen Insulin-Sekretions-Test gezeigt werden, dass zwischen den verschiedenen Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Synthesefähigkeit der Inseln nach dem Laden in den Katheter bestand. Dies sprach ebenfalls gegen eine terminale Schädigung der Inseln durch die Ladeprozedur.

Eine Testtransplantation (n=1), bei der die Organentnahme und die Gewebefixierung bereits 10 Minuten nach ITx erfolgte zeigte, dass die Inseln den Markraum erreichten, sich über die gesamte Diaphyse verteilten und dort mit intaktem Knochenmark in direktem Kontakt standen. Die Grundvoraussetzungen für ein Anwachsen der Inseln konnten somit bestätigt werden.

Nun erfolgte die syngene Transplantation von je 3000 Inseläquivalente (IEq), jeweils 1500 IEq pro Femurknochen, in 4, mit Streptozotocin diabetisierten Ratten, sowie die Transplantationsoperation ohne ITx in 2 diabetischen Ratten als Kontrollgruppe.

Die immunhistochemische Färbung der Präparate nach einem Beobachtungszeitraum von 30 Tagen zeigte, dass sich auch nach langer Zeit noch intakte Inseln im Knochenmark von 7 der 8 Femurknochen nachweisen ließen. 55 % (22/40) der gefundenen Insulin-positiven Areale wurden als morphologisch und funktionell weitgehend intakte Inseln bewertet. Davon entsprachen 20% (8/40) morphologisch den nativen Inseln im Pankreas von gesunden Ratten und 35% (14/40) wiesen lediglich einzelne Insulin-positive Zellen auf, die aus dem Inselverband ins umgebende Gewebe abgewandert waren. Dieses Phänomen wurde

im Tiermodell schon von anderen Autoren bei der ITx in andere Zielorgane festgestellt und wurde dort als, für die Inseln funktionell unerheblich bewertet. 25% (10/40) der Insulinpositiven Areale waren morphologisch nicht als Inseln erkennbare Inselbruchstücke, die wahrscheinlich durch das Konzentrations- und Applikationsverfahren entstanden waren. Weitere 20% der Insulin-positiven Areale (8/10) waren Konglomerate aus eng zusammenliegenden Insulin-positiven Zellen. Die Ätiologie dieser Konglomerate wurde auf eine, durch die Zentrifugation im Schlauch hervorgerufene Verdichtung der Inseln, die sich im Knochenmark nicht mehr voneinander lösen konnten zurückgeführt. Das Zusammenlagern von Inseln nach ITx ist ebenfalls vorbeschrieben und wird als sog. „remodeling“ bezeichnet. Der Einfluss des „remodelling“ auf die Inseln funktionell ist noch unklar. Die histologische Untersuchung der Präparate der Kontrollgruppe zeigte, dass das Operationstrauma nach ITx zu keinen relevanten Langzeitschäden im Knochenmark der Ratten führte. Bei 3 von 4 Tieren der Versuchsgruppe zeigte sich in den, ab dem 3. Tag nach ITx regelmäßig durchgeführten Blutzuckerkontrollen ein Absinken der Werte zunächst in den subdiabetischen-, und nach 14 Tagen in den physiologischen Bereich. Für den restlichen Beobachtungszeitraum blieben die Werte im physiologischen Bereich. Die Blutzuckerwerte der Kontrollgruppe blieben hoch diabetisch.

Die hier vorgestellte Methode eignet sich nach Überprüfung des Einflusses auf die Funktionalität und Vitalität der Inseln während und nach dem Transplantationsprozess für die weitere Untersuchung der ITx ins Knochenmark. Nachteilig ist eine geringfügige Schädigung der Inseln durch das Laden in den Nylonkatheter. Diese Schädigung ist jedoch mit der Schädigung, die durch das Verfahren bei der intrahepatischen ITx im Rattenmodell hervorgerufen wird vergleichbar. Die Formation der Konglomerate ist dagegen ein schwerwiegenderer Nachteil. Hier besteht Verbesserungsbedarf der Methode.

Es konnten zudem erste Erkenntnisse über die Eignung des Knochenmarks als Zielorgan zur Inseltransplantation gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass syngene transplantierte Inseln im Knochenmark von Lewis-Ratten einen Zeitraum von 30 Tagen überleben, im Gewebe integriert werden und sich zu einem großen Teil morphologisch nicht bzw. nur wenig von nativen Inseln unterscheiden.

Das Absinken der Blutzuckerwerte in einen subdiabetischen bzw. nach 14 Tagen in einen physiologischen Bereich in 3 von 4 Tieren ist ein weiteres Indiz für die

Funktionsfähigkeit der transplantierten Inseln und die potentielle Eignung des Knochenmarks als Zielorgan zur ITx. Es ergibt sich daher die Notwendigkeit der weiteren Erforschung dieses Potentials.

6 Literaturverzeichnis

- 1 World Health Organisation (WHO): Definition, Diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation. WHO; 1999
- 2 Kerner W, Brückel J. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes Mellitus. Diabetologie 2008; 3 Suppl 2: 131–133
- 3 Beck-Nielsen H., Groop LC. Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest 1994; 94(5): 1714 -1721.
- 4 Kahn CR. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes 1994; 43(8): 1066-1084.
- 5 De Fronzo RA., Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. Diabetes Care 1991;14(3):173-194
- 6 Friedman JE., Caro JF. Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle of morbidly obese patients after weight loss. Effect on muscle glucose transport and glucose transporter GLUT4. J Clin Invest 1992;89(2):701-705
- 7 Henry RR; Scheaffer L; Olefsky JM. Glycemic effects of intensive caloric restriction and isocaloric refeeding in noninsulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 1985;61(5):917-925
- 8 Thorens BA. Toggle for type 2 diabetes? N Engl J Med. 2006; 354(15):1636-1638.
- 9 Li Y., Weng J. Induction of long-term glycemic control in newly diagnosed type 2 diabetic patients is associated with improvement of beta-cell function. Diabetes Care 2004;27(11):2597-2602.
- 10 Matthaer S., Häring HU. Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2. Diabetologie 2008; 3 Suppl 2:157–161
- 11 Atkinson MA., Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med. 1994; 331(21):1428-36
- 12 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1997; 20:1183
- 13 Foulis A., 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
- 14 Lampeter E., Cossel L. Electromicroscopical investigations on lymphocyte cytotoxicity against β -cells in recent onset IDDM. Diabetes Research 1987; 6: 159-167
- 15 Redondo MJ., Eisenbarth GS. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. BMJ 1999;318(7185):698-702
- 16 Kaprio J., Kesaniemi YA. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. Diabetologia 1992;35(11):1060-1067
- 17 Tisch R., McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. Cell 1996;85(3):291-297
- 18 Smyth DJ., Todd JA. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. Nat Genet. 2006;38(6):617-619

- 19 Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-678
- 20 Todd JA., Clayton DG. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007;39(7):857-864
- 21 Hakonarson H., Polychronakos C. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature*. 2007;448(7153):591-594
- 22 Lowe CE., Todd JA. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007;39(9):1074-1082
- 23 Concannon P., Rich SS. A human type 1 diabetes susceptibility locus maps to chromosome 21q22.3. *Diabetes*. 2008;57(10):2858-2861
- 24 Concannon P., Rich SS., Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med*. 2009;360(16):1646-1654
- 25 Bell GI; Horita S; Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1984;33(2):176-183
- 26 Davies JL., Palmer SM., et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994;371(6493):130-136.
- 27 Barratt BJ., Todd JA. Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes. *Diabetes* 2004;53(7):1884-1889
- 28 Bottini N., Mustelin T. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004;36(4):337-338
- 29 Kavvoura FK., Ioannidis JP. CTLA-4 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol* 2005;162(1):3-16
- 30 Rothe H., Kolb H. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest* 1997;99(3):469-474.
- 31 Wildin RS; Freitas A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J Autoimmun*. 2005;25 Suppl:56-62
- 32 Baekkeskov S., Camilli PD. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990;347(6289):151-156
- 33 Ellis TM., Atkinson MA. The relationship between humoral and cellular immunity to IA-2 in IDDM. *Diabetes* 1998; 47(4):566-569
- 34 Wenzlau JM., Hutton JC. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(43):17040-17045.
- 35 Ziegler AG., Standl E. On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. *Diabetologia* 1993; 36(5):402-408.
- 36 Ziegler A., 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
- 37 Kolb H., Roep BO. Autoimmune versus inflammatory type 1 diabetes: a controversy? *Immunol today* 1995; 16: 170-172

- 38 Charles MA., 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; 130(3):1189-94..
- 39 Durinovic-Bellò I., Ziegler AG. Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. *Diabetes*. 1996 Jun; 45(6): 795-800.
- 40 Silverstein J., Johnson S. Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988;319(10): 599-604
- 41 Hyoty H., Hovi T., et al. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes* 1995;44(6):652-657
- 42 Kaufman DL., Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*1992; 89(1): 283-292.
- 43 Atkinson MA., Maclaren NK. Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1994; 94(5):2125-2129.
- 44 Virtanen SM., Akerblom HK. Diet, cow's milk protein antibodies and the risk of IDDM in Finnish children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia* 1994;37(4):381-387
- 45 Cavallo MG., Pozzilli P. Cell-mediated immune response to beta casein in recent-onset insulin-dependent diabetes: implications for disease pathogenesis. *Lancet* 1996; 348(9032):926-928
- 46 Norris JM; Rewers M. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *JAMA* 1996; 276(8):609-614
- 47 Elliott RB., Wasmuth HE. Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. *Diabetologia* 1999;42(3):292-296.
- 48 Dahlquist GG., Patterson C., Soltesz G. Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetes Care* 1999;22(10):1698-1702
- 49 Delaney MF., Kettyle WM. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar nonketotic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000;29(4):683-705
- 50 Kitabchi AE., Fisher JN. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes: a consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2009; 32:1335
- 51 Orasanu G., Plutzky J. The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(5 Suppl):35-42
- 52 Frank H., Pscherer S. Diabetische Nephropathie: Diagnostik, Therapie, Progressionshemmung und Prävention. *Nephrologe* 2007; 2(1):53-59
- 53 Dyck PJ., O'Brien PC. Variables influencing neuropathic endpoints: the Rochester Diabetic Neuropathy Study of Healthy Subjects. *Neurology* 1995;45(6):1115-21
- 54 Malik RA. The pathology of human diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997;46 Suppl 2: 50-53
- 55 Edwards JL., Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther*. 2008;120(1):1-34
- 56 Haslbeck Met al. Diabetische Neuropathie. *Diabetologie* 2008; 3 Suppl 2: 134-140

- 57 Hauner H, Köster I, von Ferber L. Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland 1998- 2001. Dtsch Med Wochenschr. 2003; 128: 2632-2638
- 58 Schiel R, Müller UA: GAD autoantibodies in a selection-free population of insulin-treated diabetic patients: indicator of a high prevalence of LADA? Diabetes Res Clin Pract. 2000; 49 (1): 33-40
- 59 Panzram G. , Zabel-Langhennig R. Prognosis of diabetes mellitus in a geographically defined population. Diabetologia 1981; 20 (6): 587-591
- 60 Rendell M, Fulmer J. The health care status of the diabetic population as reflected by physician claims to a major insurer. Arch Intern Med 1993;153 (11): 1360-1366
- 61 Koivisto VA, Ebeling P, et al: Cardiovascular disease and its risk factors in IDDM in Europe. EURODIAB IDDM Complications Study Group. Diabetes Care 1996;19 (7): 689-697
- 62 Balkau B, Charles MA, Eschwege E. Coronary Complication of diabetes: the epidemiologist's perspective. Mediographia 1997; 19: 89-96
- 63 Krolewski AS, Christlieb AR. Evolving natural history of coronary artery disease in diabetes mellitus. Am J Med 1991; 90 (2A):56-61
- 64 Schiel R, Hunger-Dathe W, et al. The JEVIN trial: a population-based survey on the quality of diabetes care in Germany:1994/1995 compared to 1989/1990. Diabetologia 1997; 40 (11): 1350-1357
- 65 Heller G, Schellschmidt H. Wie häufig sind Diabetes-bedingte Amputationen unterer Extremitäten in Deutschland? Dtsch med Wochenschr 2004;129: 429-433
- 66 Harvey JN, Meadows PA. Population-based survey and analysis of trends in the prevalence of diabetic nephropathy in Type 1 diabetes. Diabetic Medicine 2001; 18: 998-1002
- 67 American Diabetes Association: Nephropathy in Diabetes. Diabetes Care 2004; 27 (Suppl. 1): 79-83
- 68 Bojestig M, Ludvigsson J. Declining incidence of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1994; 330 (1): 15-18
- 69 Hovind P, Parving HH. Decreasing incidence of severe diabetic microangiopathy in type 1 diabetes. Diabetes Care 2003; 26 (4): 1258-1264
- 70 Adler AI, Holman RR, on behalf of the UKPDS Group. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). Kidney International 2003; 63: 225-232
- 71 Nelson R, Bennett P: Kidney diseases in diabetes. Diabetes in America. 2nd ed 1999: 339-348
- 72 Hogan P., Dall T., Nikolov P. Economic costs of diabetes in the US in 2002. DiabetesCare 2003; 26: 917-932
- 73 Martin S., et al. Behandlung des Diabetes mellitus Typ 1. Diabetologie 2008; 3 Suppl 2: 155-156
- 74 Rohlfing CL., Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Care 2002;25(2):275-278

- 75 Robertson R. P. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: Pancreatic and islet transplantation for diabetes--cures or curiosities? N Engl J Med 1992; 327:
- 76 Kelly, WD, Merkel, FK, et al. Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. Surgery 1967; 61:827
- 77 Pancreas and islet transplantation in type 1 diabetes. Diabetes Care 2006; 29:935
- 78 www.ustransplant.org
- 79 Bohman SO. Groth CG. Prevention of kidney graft diabetic nephropathy by pancreas transplantation in man. Diabetes 1985;34(3):306-308
- 80 Bilous RW. Steffes MW. The effects of pancreas transplantation on the glomerular structure of renal allografts in patients with insulin-dependent diabetes. N Engl J Med 1989; 321(2):80-85
- 81 Navarro X. Kennedy WR. Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. Ann Neurol 1997; 42(5):727-736
- 82 Venstrom JM. Harlan DM. Survival after pancreas transplantation in patients with diabetes and preserved kidney function. JAMA 200;290(21):2817-2823
- 83 Douzdjian V. Hunsicker LG. Simultaneous pancreas-kidney versus kidney-alone transplants in diabetics: increased risk of early cardiac death and acute rejection following pancreas transplants. Clin Transplant 1994; 8(3 Pt 1): 246-251
- 84 Sollinger HW, Pirsch JD. Experience with 500 simultaneous pancreas-kidney transplants. Ann Surg 1998;228(3):284-296
- 85 Cheung AH, Matas AJ. Simultaneous pancreas-kidney transplant versus kidney transplant alone in diabetic patients. Kidney Int 1992; 41(4): 924-929
- 86 Gruessner, AC, Sutherland, DE. Pancreas transplants for United States (US) and non-US cases as reported to the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) and to the United Network for Organ Sharing (UNOS). Clinical Transplants - 1997, Cecka, M, Terasaki, P (Eds), UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles 1998.
- 87 Humar A, Matas AJ. Venous thromboembolic complications after kidney and kidney-pancreas transplantation: a multivariate analysis. Transplantation 1998; 65(2): 229-234
- 88 Stehman-Breen CO, Davis CL. Association of hepatitis C virus infection with mortality and graft survival in kidney-pancreas transplant recipients. Transplantation 1997;64(2):281-286
- 89 Monroy-Cuadros M, McLaughlin K. Bladder vs enteric drainage in simultaneous pancreas-kidney transplantation. Nephrol Dial Transplant. 2006;21(2):483-487
- 90 Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress. N Engl J Med. 2004; 350(7): 694-705
- 91 Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. Surgery. 1972; 72(2): 175-186
- 92 Bassi R, Fiorina P. Impact of islet transplantation on diabetes complications and quality of life. Curr Diab Rep 2011; 11(5): 355-363
- 93 Tzakis AG, Alejandro R, et al. Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. Lancet 1990; 336: 402-405.

- 94 Luzi L, Socci C, et al. Metabolic effects of successful intraportal islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996; 97: 2611-2618.
- 95 Largiader F, Kolb E, Binswanger U. A long-term functioning human pancreatic islet allotransplant. *Transplantation* 1980; 29: 76-77.
- 96 Warnock GL, Rajotte RV. Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35: 89-95
- 97 Soon-Shiong P, Merideth N, et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 1994; 343: 950-951
- 98 Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, et al. Insulin independence after islet transplantation into type 1 diabetic patient. *Diabetes* 1990; 39: 515-518.
- 99 ITR newsletter 9. Vol. 8. No. 1. 2001:1-20. (Giessen, Deutschland: International Islet Transplant Registry, Universitätsklinik Giessen.) (Recherche am 22.03.10 unter www.med.uni-giessen.de/itr/newsletter/no_9/news_9.pdf.)
- 100 Shapiro AMJ, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 Diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238
- 101 Edmond AR, Shapiro AMJ, Five-Year Follow-Up After Clinical Islet Transplantation. *Diabetes* 2005; 54:2060–2069
- 102 2009 Scientific Summary of the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) (National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases, USA, Recherche am 27.03.2010 unter www.citregistry.com/)
- 103 Kaddisa J.S. Fernandez L.A. Multicenter Analysis of Novel and Established Variables Associated with Successful Human Islet Isolation Outcomes *American Journal of Transplantation* 2010; 10: 646–656
- 104 Han D. et al. Assessment of cytotoxic lymphocyte gene expression in the peripheral blood of human islet allograft recipients: elevation precedes clinical evidence of rejection. *Diabetes* 2004; 53: 2281–2290.
- 105 Slezak L.A.; Andersen D. K. Pancreatic resection: Effects on glucose metabolism. *World J. Surg.* 2001; 25(4):452- 460
- 106 Emamaullee J.A. Shapiro A.M.J. Factors Influencing the Loss of β -Cell Mass in Islet Transplantation. *Cell Transplantation* 2007; 16: 1–8
- 107 Lifson, E. J. Lender. 1980. Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans. *Gastroenterology.* 79:466-473.
- 108 Bonner-Weir S. Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 1982; 31:883-339
- 109 Menger, M. D. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World Journal of Surgery* 2001; 25 (4): 509-515
- 110 Hughes S.J. Press M. Effect of Inspired Oxygen on Portal and Hepatic Oxygenation: Effective Arterialization of Portal Blood by Hyperoxia Cell Transplantation 2004;13: 801–808
- 111 Bennet W. Sundberg B. Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? *Diabetes* 1999; 48 (10): 1907-1914

- 112 Clayton H. A. Davies J. E. A coculture model of intrahepatic islet transplantation: activation of Kupffer cells by islets and acinar tissue. *Cell Transplant* 2001;10 (1): 101-108
- 113 Moberg L. The role of the innate immunity in islet transplantation. *Ups. J. Med. Sci.* 2005; 110:17–55
- 114 Bottino R. Fernandez L.A. Effects of Macrophage Depletion on Graft Survival and Microenvironment Activation. *Diabetes* 1998; 47: 316-323
- 115 Shapiro A.M.J. Kneteman N.M. The portal immunosuppressive storm: relevance to islet transplantation? *Ther. Drug Monit.* 2005; 27(1): 35–37
- 116 Lee Y. Ravazzola M. Metabolic Mechanisms of Failure of Intraportally Transplanted Pancreatic Cells in Rats. Role of Lipotoxicity and reversion by Leptin. *Diabetes* 2007; 56: 2295–2301
- 117 Owen R.J. et al. Percutaneous transhepatic pancreatic islet cell transplantation in type 1 diabetes mellitus: radiologic aspects. *Radiology* 2003; 229: 165–170
- 118 v. d. Windt D.J. Cooper D.K.C. The Choice of Anatomical Site for Islet Transplantation. *Cell Transplantation* 2008; 17: 1005–1014
- 119 Rajab A. Comparison of the portal vein and kidney subcapsule as sites for primate islet autotransplantation. *Cell Transplantation*, 2008; 17(9): 1015-1023
- 120 Juang J.H.. Kuo C.H. Islet Transplantation at Subcutaneous and Intramuscular Sites. *Transplantation Proceedings* 2005; 37: 3479–3481
- 121 Stagner J.I. White K.K. The Pancreas as an Islet Transplantation Site. Confirmation in a Syngeneic Rodent and Canine Autotransplant Model. *Journal of the Pancreas* 2007; 8(5): 628-636
- 122 Harrison J.S. Bandari P. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood* 2002; 99: 394
- 123 Le'Veesque J.P. Nilsson S.K. Hematopoietic Progenitor Cell Mobilization Results in Hypoxia with Increased Hypoxia-Inducible Transcription Factor-1_α and Vascular Endothelial Growth Factor A in Bone Marrow. *Stemcells* 2007;25: 1954–1965
- 124 Wie S., Kryczek I., Zou W., Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood*, 2006: 108 (2): 426-431
- 125 Moskalewski S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen Comp Endokrinol* 1965; 5:324-353
- 126 Lacy PE, Kostaniovsky M. Method for the Isolation of intact islets of Langerhans from the rat Pancreas. *Diabetes*, 1967; 16(1):35-39
- 127 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
- 128 Ricordi C. Alejandro R. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat.* 1990;27(3):185-95
- 129 Stein E, Mullen Y, Benhamou Py, et al. Reduction in immunogenicity of human islets by 24°C culture. *Trans Proc* 1994; 26:755.
- 130 Lacy P, Davie J, Finke E. Prolongation of islet allograft survival in vitro culture (24°) and a single injection of ALS. *Science* 1979; 204:312-313

- 131 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
- 132 Faustmann 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
- 133 Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT-2 expressing cells. *Diabetes* 1994; 43:1326-1333
- 134 Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S: Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 2000; 43: 1528-1533
- 135 T. Szkudelski (), The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 2001; 50: 536-546
- 136 Pieper AA, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 16:96(6):3059-3064
- 137 Sruji S, Adamson JE. A comparative study of tendon suture materials in dogs. *Plast Reconstr Surg.* 1972;50(1):31-5.
- 138 Bank H. L. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cellular & Developmental Biology.* 1988; 24 (4):266-273
- 139 Hara Y. Li X.-K. Influence of the Numbers of Islets on the Models of Rat Syngeneic-Islet and Allogeneic-Islet Transplantations. *Transplantation Proceedings* 2006; 38: 2726–2728
- 140 Hanson M. Fernandez L.A. A Simplified Approach to Human Islet Quality Assessment. *Transplantation* 2010; 89(10): 1178-1188
- 141 Merani S. Shapiro J. A..M. Chemokines and Their Receptors in Islet Allograft Rejection and as Targets for Tolerance Induction. *Cell Transplantation.* 2006; 15: 295–309
- 142 Barshes NR., Gross JA. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol.* 2005; 77: 587–597
- 143 Giuliani M., Weber M. Central Necrosis in Isolated Hypoxic Human Pancreatic Islets: Evidence for Postisolation IschemiaCell Transplantation. 2005; 14: 67–76
- 144 Davalli A.M., Weir G.C. Vulnerability of islet in the immediate posttransplantation period: dynamic changes in structure and function. *Diabetes.* 1996; 45: 1161–1167
- 145 Weir G.C., Bonner-Weir S. Islets of Langerhans: The Puzzle of Intraislet Interactions and Their Relevance to Diabetes. *J Clin Invest.* 1990; 85: 983-987
- 146 Morini S., Rastellini C. Revascularization and remodelling of pancreatic islets grafted under the kidney capsule. *J. Anat.* 2007; 210: 565–577
- 147 Stagner JI., Samols E. Altered microcirculation and secretion in transplanted islet. *Transplantation Proc.* 1994; 26: 1100–1102
- 148 Shi CL., Täljedal IB. Dynamics of glucose-induced insulin release from mouse islets transplanted under the kidney capsule. *Transplantation* 1996; 62: 1312–1318
- 149 Ricordi C., et al. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation.* 1992; 53: 407–414.

150 Griffith R. C. Lacey P.E., A Morphologic Study of Intrahepatic Portal-vein Islet Isografts. *Diabetes*. 1976; 26: 201-214

151 Yonekawa Y., Matsumoto S., A New Mouse Model for Intraportal Islet Transplantation with Limited Hepatic Lobe as a Graft Site. *Transplantation*. 2006 15; 82(5): 712-715

152 Wynn T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214(2): 199–210.

153. Laybutt D. R., Weir G. C. Influence of diabetes on the loss of beta cell differentiation after islet transplantation in rats. *Diabetologia* 2007; 50: 2117–2125

154 Ar`Rajab A., Ahrén B. Prevention of Hyperglycemia Improves the Long-Term Result of Islet Transplantation in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Pancreas* 1992; 7: 435-442

155 Lewis Ratte (LEW/Crl). Charles River. 1989; 3 (2)

7 Danksagung

Die Experimente der vorliegende Arbeit wurde im Institut für Medizintechnik der Technischen Universität München (Leitung Prof. Dr. rer. nat. Axel Haase), in der Arbeitsgruppe für Inseltransplantation von PD. Dr. med. Manfred Stangl durchgeführt.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Haase für die Aufnahme in das Institut bedanken.

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Manfred Stangl gilt mein herzlichster Dank für die Aufnahme und die Integration in seine Arbeitsgruppe und für die Überlassung des interessanten Themas. Als ständiger Ansprechpartner erlangte ich von ihm die Fähigkeiten zum wissenschaftlichen Denken und die Möglichkeit zur Arbeit in einer stets professionellen und freundschaftlichen Umgebung.

Frau Dr. med. Alice Schwarznau danke ich für die langjährige, hervorragende und produktive Betreuung.

Bei Frau Dr. rer. nat. Elisabeth Schremmer-Danninger und Frau Dr. rer. nat. Veronika Auer möchte ich mich für die gewissenhafte Einarbeitung in die experimentellen Methoden und die immer wieder geleisteten Hilfestellungen bedanken. Insbesondere möchte ich auch Frau Ulrike Bouquain für die immer freundliche und kompetente Unterstützung im Labor danken.

Herrn Prof. Dr. med. Aurel Perren (ehem. Pathologisches Institut der TUM) danke ich für die gute Zusammenarbeit, für die Unterstützung bei der histologischen Aufbereitung und seine Expertise bei der Auswertung der Präparate.

Ein herzlicher Dank gilt auch dem Leiter des Pathologischen Instituts der LMU, Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner und seinem Mitarbeiter Herrn Janusz Minda.

Den Mitdoktoranden unserer Arbeitsgruppe danke ich für die gute Atmosphäre im Labor und die Zusammenarbeit, die sich sowohl in praktischer als auch moralischer Unterstützung äußerte.

Bei meinen Eltern, Dipl. inf. Josef Bucher und Margund Bucher, bedanke ich mich sehr für die geistige und nicht zuletzt finanzielle Unterstützung während der Zeit der Doktorarbeit und meines gesamten Studiums, ohne die mir dieser Schritt nicht möglich gewesen wäre.

Mein Besonderer Dank gilt Louise von Johnston und ihrer Familie.

8 Bisher veröffentlichte Teile dieser Arbeit

- 2011 Auer VJ, Bucher J, Schremmer-Danninger E, Paulmurugan R, Maechler P, Reiser MF, Stangl MJ, Berger F.
Non-invasive imaging of ferucarbotran labeled INS-1E cells and rodent islets in vitro and in transplanted diabetic rats.
Current Pharmaceutical Biotechnology 2011 Apr;12(4):488-96
- 2008 Vortrag bei der Jahrestagung der Deutschen
Transplantationsgesellschaft, 2008; Titel: „Transplantation von Inseln ins Knochenmark diabetischer Ratten“