

Pankreas øytransplantasjon som behandling for diabetes mellitus.

Av Afaf Sahraoui, medisinstudent UiO



Heloderma suspectum

ABSTRACT.

Background. Results in pancreatic islet transplantation have improved during the last decade, but long term results remain disappointing. This is partly due to loss of islets in pre-transplant culture and immediate post-transplant period.

Aim. Exendin is currently being used as drug therapy of type 2 diabetes mellitus. We wanted to investigate the in vitro effect of exendin on insulin secretion, pro- and anti-inflammatory cytokines in isolated pancreatic islets from rats.

Materials and methods. Freshly isolated rat islets were obtained. One half of the cells was stimulated with exendin-4 (10nmol), the other served as controls. The incubation lasted for 48-72 hours. Subsequently the islets were stimulated with two different concentrations of glucose, respectively 1,67 mM and 20 mM, followed by measure of insulin secretion with EIA. Real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction was used to assess the gene expression of IL-6, IL-10 and TNF- α . Cell free supernatant was harvested to quantify the protein secretion of IL-10 and TNF- α .

Results. The insulin secretion was significantly better for the islets stimulated with exendin-4 for 48-72 hours as compared to controls ($p=0,01$, $n=5$). The gene expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines were higher in the control group compared with the exendin group, but the protein secretion of IL-10 and TNF- α was higher in the exendin group.

Conclusion. These findings suggest that exendin improve the insulin secretion, and may also reduce the inflammation in the islets. Islet culture with exendin before transplantation may therefore improve the outcome, but further investigations are needed.

INNLEDNING.

I fagplanen for profesjonsstudiet medisin står det at alle medisinstudenter skal levere en prosjektoppgave i løpet av studiet. Denne har som hensikt å gi muligheten til fordypning i et selvvalgt tema. På denne måten vil man få erfaring i å innhente og kritisk vurdere medisinske data, som vil bli en del av en leges hverdag. For å sikre at pasienter hele tiden får den beste tilgjengelige medisinske behandlingen, er det et absolutt krav at legen er faglig oppdatert til enhver tid.

Mitt valg av oppgave har bakgrunn i interessen for en relativt ny metode for behandling av diabetes mellitus type 1, transplantasjon av de Langerhanske øyer, som er de endokrine insulinproduserende cellene i pankreas.

Denne oppgaven vil innledningsvis gi en kort beskrivelse av pankreas og sykdommen diabetes mellitus, samt de karakteristika som kjennetegner denne sykdommen. Videre har hensikten vært å utføre et vitenskapelig arbeid med øyer isolert fra rotte i laboratoriet til forskningsgruppen for øytransplantasjon ved Rikshospitalet. Resultatene fra disse *in vitro* forsøkene vil presenteres og diskuteres i lys av dagens status for klinisk øytransplantasjon på Rikshospitalet og internasjonalt.

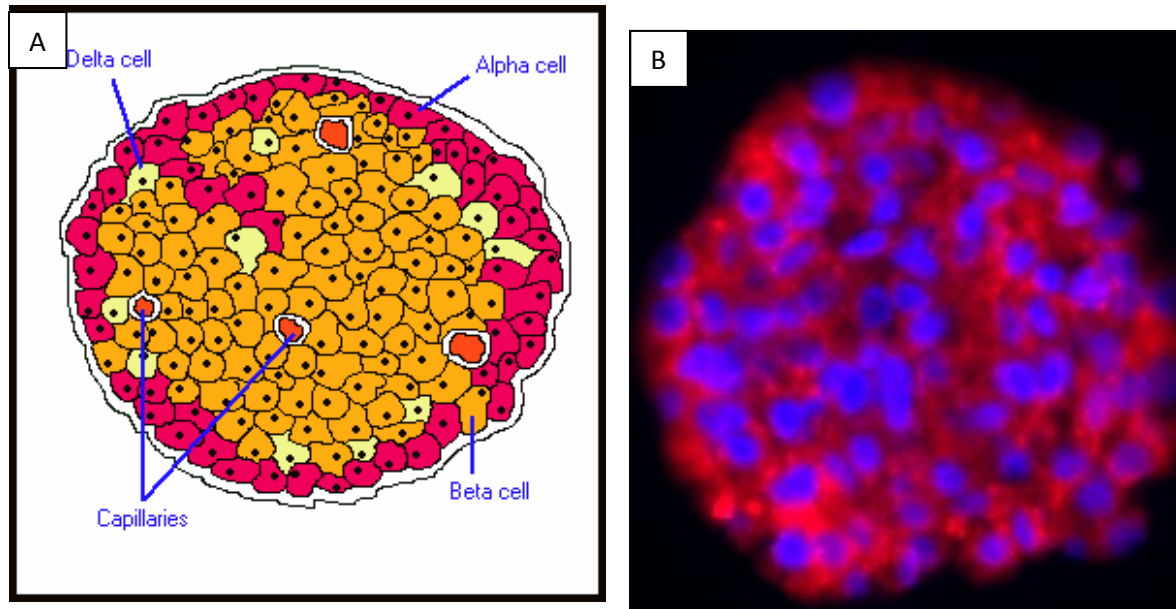
Normal metabolisme i pankreas.

Endokrine pankreas.

Pankreas består av flere typer celler: (I) eksokrine celler som skiller ut fordøyelsesenzymer og bikarbonat til tarmlumen og (II) endokrine celler (Langerhanske øyer). Den normale humane pankreas inneholder 0.5-3 mill øyer. Øyene kan være ovale eller sfæriske, og måler mellom 50 og 300 μm i diameter. Øyene inneholder 4 typer sekretoriske celler: α -celler som skiller ut glukagon, β -celler (figur 1) som skiller ut proinsulin, insulin, C-peptid og amylin, δ -cellene som skiller ut somatostatin og F-cellene (pankreatiske polypeptidceller) som skiller ut pankreatisk polypeptid. Hormonsekresjonen fra øyene styres av informasjon fra kroppen og innbyrdes kommunikasjon mellom de endokrine cellene. Disse kommunikasjonslinjene kan deles i 3 grupper:

1. Humoral kommunikasjon. Blodstrømmen i øyene beveger seg fra sentrum og utover perifert, og bringer på den måten med seg de stoffene som skilles ut. Hos rotter, men ikke hos mennesker, befinner de insulinproduserende cellene seg mest i midten av øy og de andre celletypene mer perifert.
2. Celle-til-celle kommunikasjon. Både gap junctions og tette celleforbindelser (tight junctions) forbinder cellene i øyene til hverandre, og virker som kommunikasjonsvei.
3. Neural kommunikasjon. Det sympatiske og parasympatiske avsnitt fra det autonome nervesystemet påvirker også øyene. Cholinerg stimulering forsterker insulinsekresjonen. Adrenerg stimulering kan virke både inhiberende og stimulerende, avhengig av hvorvidt det er α -adrenerg (inhiberende), eller β -adrenerg (stimulerende) overvekt.

Disse 3 kommunikasjonsmekanismene tillater en stram kontroll av syntese og sekresjon av hormoner fra øyene (1).

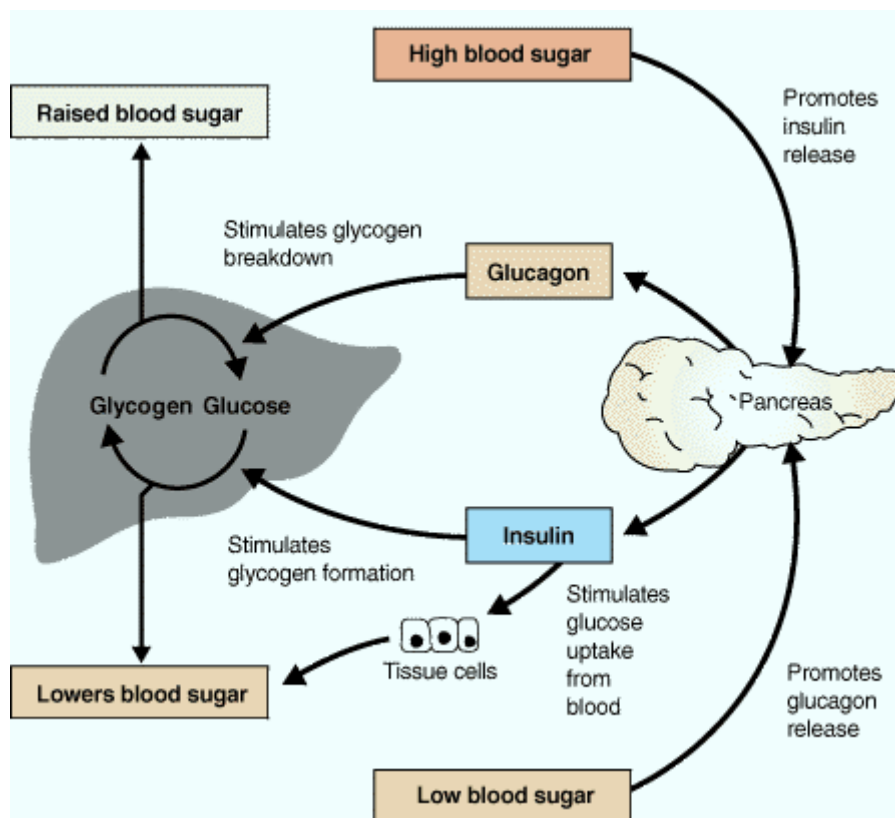


Figur 1

En skjematisk tegning av en øy (A) med bl.a. β -celler (2), og fluorescensfarging som viser distribusjon av β -cellene i en øy (B), der insulin er farget rød og cellekjernene er farget blå.

Hva gjør insulin?

Forenklet kan man si at insulin sørger for å fylle opp energireservene i muskler, lever og fettvev. Insulin styrer metabolismen så vel under matinntak som ved faste (figur 2). Når man faster skilles det ut mindre insulin, og når insulinnivået i kroppen faller, mobiliseres lipider fra fettvevet og aminosyrer fra proteinlagrene i muskler og andre vev. Aminosyrene og lipidene tjener som forstadier til ketogenese og glukoneogenese. Ved matinntak øker insulinsekresjonen og økte nivåer av insulin reduserer mobiliseringen av endogene energireserver, samt stimulerer til opptak av karbohydrater, aminosyrer og lipider i spesifikke, insulinsensitive vev. På denne måten vil insulin bidra til å fylle opp energilagrene som ble tømt under faste. Som en følge av insulinets evne til å regulere mobiliseringen og lagringen av energi, vil insulin opprettholde en glukosekonsentrasjon i plasma innenfor et relativt smalt vindu (4-7mmol/l). Denne typen regulering sikrer sentralnervesystemet en kontinuerlig og konstant tilførsel av glukose som energikilden til opprettholdelse av kortikale funksjoner da hjernen ikke kan oksidere frie fettsyrer til eget energiforbruk (3).



Figur 2. Insulinets virkning på ulike vev(4).

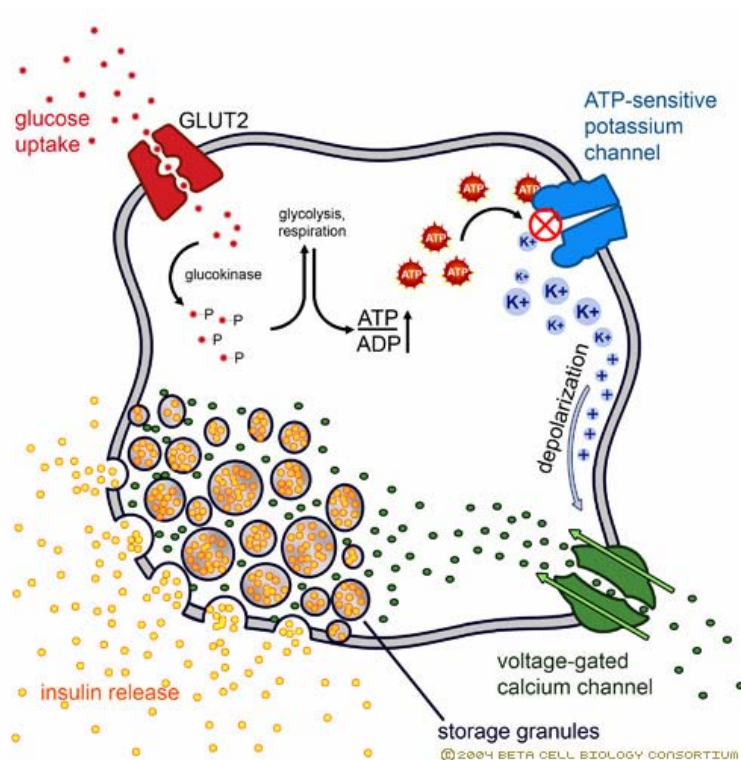
Insulinsyntese og sekresjon.

Insulin syntetiseres eksklusivt av β -celler i øyene og kodes for av den korte armen på kromosom 11. Både insulinsyntesen så vel som sekresjonen stimuleres av glukose. Dette fører til at insulinsekresjonen er bifasisk. Første fase kommer hurtig i løpet av 0-5 minutter som en respons på forandring av glukosekonsentrasjonen. Denne frigjøringen er avhengig av hvor mye insulin som er tilgjengelig på "lager". Ved fortsatt økte glukosenivåer, vil den andre fase inntre. Denne fasen varer lenger da insulin må syntetiseres før frigjøring (1).

Insulin dannes som et prohormon i β -cellene og pakkes av Golgiapparatet inn i sekretoriske vesikler. I vesiklene vil en protease kløyve proinsulin til insulin og C-peptid. Vesiklene vil slik inneholde både insulin, proinsulin og C-peptid, som vil frigjøres til den portale sirkulasjonen ved glukosestimulering. Kun 5 % av insulinet som frigjøres til blodet er proinsulin, og spiller dermed ingen stor rolle i reguleringen av blodglukosen. C-peptid skiller ut i 1:1 ratio med insulin og brukes i klinikken som en markør for insulinsekresjon.

Selve sekresjonen er kompleks. β -cellene får tilgang til glukose ved Type 2 glukosetransportørkanalene (GLUT2) og metaboliserer det til ATP, som er det sentrale energimolekylet i celler. I sin tur vil dette føre til at kaliumkanalene i cellemembranen stenges og det blir en økt positiv ladning inni cellene som kulminerer i en depolarisering av β -cellene. Spenningsstyrte kalsiumkanaler åpnes, kalsium strømmer intracellulært og den økte

konsentrasjonen utløser eksosytose av de insulinholdige vesiklene (1). Insulin vil deretter diffundere over i det omfangsrike kapillærsystemet rundt pankreas og videre ut i kroppen.



Figur 3. Insulinsekresjon fra en β -celle etter glukosestimulering. (5).

Hva er diabetes mellitus?

Diabetes mellitus er en kronisk sykdom som skyldes absolutt, eller relativ insulinmangel (1, 3, 6, 7).

Type 1 diabetes (DMT1), også kalt insulinavhengig diabetes, skyldes skade av de insulinproduserende β -cellene i pankreas forårsaket av en autoimmun reaksjon (3, 8). Pasienter med denne diabetesvarianten må ha insulin, ellers vil sykdommen være dødelig. Sykdommen oppstår i alle aldersgrupper, men er mest vanlig hos barn, ungdom og unge voksne (3, 8, 9). Det er en svært alvorlig sykdom og en medvirkende årsak til utvikling av hjerte- og karsykdommer, hjerneslag, nyresvikt, blindhet, sår på føttene og amputasjoner (3).

Type 2 diabetes skyldes en kombinasjon av insulinresistens og redusert funksjon i de insulinproduserende β -cellene (3, 6). Denne typen diabetes anses i dag som en del av det metaboliske syndrom (abdominal fedme, overvekt, hypertensjon, og hyperlipidemi) (3). Sykdommen er mest vanlig hos middelaldrende mennesker, og forekomsten øker med alderen,

men de siste årene har man observert at stadig yngre mennesker utvikler sykdommen (6, 9). Type 2 diabetes er også kalt ”den nye folkesykdommen” p.g.a. den eksplosjonsartete prevalensen og insidensen, og henger antagelig tett sammen med den moderne livsstilen med høyt inntak av raffinerte karbohydrater og mettede fettsyrer, og mindre fysisk aktivitet.

I Norge regner man med en prevalens og insidens på hhv. 25000 og 600 ved type 1 diabetes og 175000 og 6000-7000 ved diabetes type 2 (6, 8, 9). Diabetes er den vanligste stoffskiftesykdommen i verden og er forbundet med mange komorbide tilstander som fedme og hypertensjon (6, 8, 10).

De siste tallene fra WHO angir at det er i underkant av 200 mill mennesker i verden i dag som lider av diabetes (10). I år 2030 forventer man at dette tallet vil fordobles. Omtrent 90 % av disse har type 2 diabetes (10).

Diabetes mellitus type 1.

Ved type-1 diabetes oppstår de klassiske symptomer på diabetes og hyperglykemi opptrer når 70-90 % av øyene er destruert. Det histo-patologiske bildet av en pankreas rett før diabetes er manifest er karakterisert ved en spesifikk destruksjon av β -cellene, hvor de andre cellene i øyene forblir intakte. Siden sykdommen er immunmediert vil det initialt dannes antistoffer mot øyene, men disse vil forsvinne etter hvert. DMT1 er ellers assosiert med andre autoimmune sykdommer, bl.a. thyreoideasykdommer og cøliaki (3).

Eneste behandlingsalternativ utenom transplantasjon, er daglige insulininjeksjoner som settes subkutan. Man kombinerer gjerne langsomtvirkende og mer hurtigvirkende varianter av insulin for å opprettholde et jevnt blodglukosenivå gjennom hele døgnet. DMT1 krever i enda større grad enn type 2 diabetes streng kontroll av metabolismen for å unngå senkomplikasjoner (3, 11, 12). Et svært svingende og variert blodsukkernivå, som er karakteristisk for dårlig kontrollert diabetes, resulterer først og fremst i diabetisk angiopati. Fortykket basalmembranen i kapillærene, økt vaskulær permeabilitet og trykk i karsystemet i kroppen resulterer i retinopati, nefropati, og nevropati (3). Det finnes ingen studier som viser at man ved terapi kan reversere senkomplikasjonene. Derimot har det vært overbevisende studier som har vist at man kan utsette, eller redusere disse betydelig. Den største studien har vært den amerikansk-kanadiske ”The Diabetes Control and Complication Trial”(DCCT). DCCT-studien fulgte 1441 type 1 diabetikere over en 10-årsperiode (1983-1993). Her viste man at om en opprettholdt en streng glykemisk kontroll, dvs. HbA1C (glykolyisert hemoglobin) rundt 7 %, fikk man en 60 % reduksjon i risiko for å utvikle diabeteskomplikasjoner. Ingen annen enkeltfaktor enn blodglukosenivå hadde i like stor grad betydning for utviklingen av diabetiske senkomplikasjoner (3, 12, 13). UKPDS(UK Prospective Diabetes Study), som er en britisk studie på type 2 diabetes, viste tilsvarende resultater (3, 13, 14).

Mange type 1 diabetikere opplever til tross for et sunt kosthold, jevnlig mosjon og regelmessig livsførsel, at blodsukkernivået er vanskelig å regulere gjennom døgnet. Studier viser at det er flere faktorer som spiller inn på reguleringen av blodglukosen, bl.a. hormonnivå, stress,

matinntak, aktivitet, og hvor insulininjeksjonene er satt (15, 16, 17). Kontinuerlige blodsuktermålinger utført på Rikshospitalet viser at selv en velregulert pasient med type 1 diabetes kun ligger 20-40 % av døgnet innenfor normalområdet for blodsukker (personlig kommunikasjon dr. T. Lund).

Behandling av diabetes mellitus.

Type 1 diabetikere må ha insulin i form av daglige injeksjoner for å erstatte egenproduksjonen. Den eneste muligheten til insulinfrihet, inntil nylig, for type 1 diabetikere har vært pankreas helorgantransplantasjon. Dette gjøres oftest hos type 1 diabetikere med nyresvikt, vanskelig regulerbar diabetes og fremskredne systemiske komplikasjoner av sykdommen. Da transplanteres gjerne nyre og pankreas simultant (18).

Type 2 diabetikere har litt flere alternativer i form av kostregulering, perorale antidiabetika, og i siste instans insulininjeksjoner. Det er også mulig for type 2 diabetikere å kombinere perorale medikamenter og insulin.

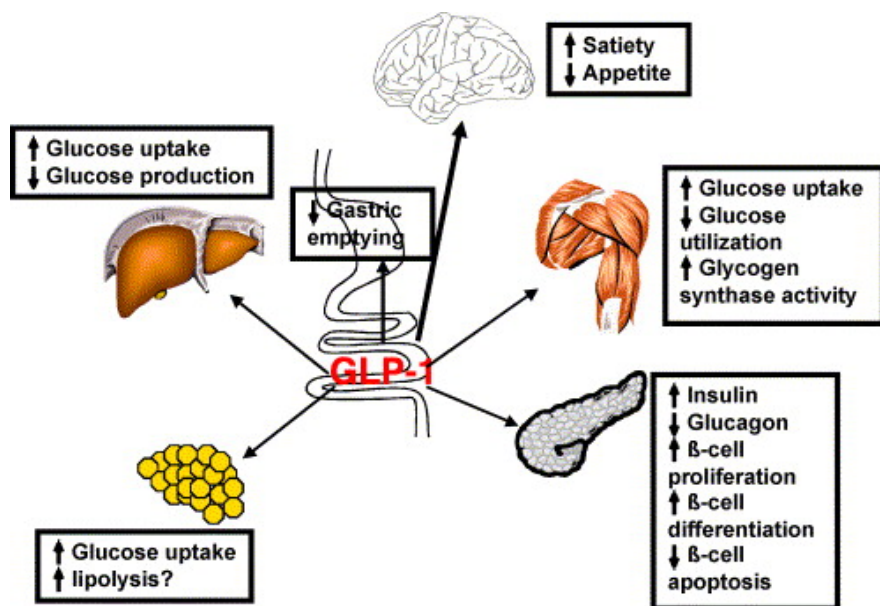
Av perorale antidiabetika har man:

1. Sulfonylureaderivatene, som virker ved å stimulere β -cellenes insulinsekresjon (3).
2. Biguanidderivater (metformin), hvor virkningsmekanismene ikke er helt kartlagte. Antagelig øker det glukoseopptaket og glukosebruken i skjelettmuskulatur, og reduserer hepatisk glukoneogenese (19).
3. α -glukosidasehemmere (akarbose/miglitol) forsinker karbohydratabsorpsjonen i tarmen og reduserer stigning i blodglukose etter et måltid (3, 19).
4. Tiazolidindioner=glitazoner (pioglitazon og rosiglitazon) virker ved å aktivere kjernereseptoren PPAR γ -peroksisomal proliferator aktivert gamma reseptor, som for det meste finnes i fettvev, men også i muskelvev og lever, og reduserer insulinresistensen her (3, 19, 20).
5. Glinider (repaglinid og nateglinid) betinger at man har en viss endogen insulinproduksjon og virker ved å stimulere insulinsekresjonen fra pankreas (3, 19, 20)
6. DPP-IV inhibitor (vildagliptin). Er en inhibitor av dipeptidyl peptidase IV som bryter ned GLP-1 (se nedenfor) og kan få en plass i behandlingen av type 2 diabetes i fremover (21).

Exendin (exenatide).

De siste årene har inkretinmimetika tilkommet som mulig behandling for type 2 diabetes. Kroppens insulinsekresjon er høyere ved inntak av glukose peroralt enn om det skulle ha blitt gitt intravenøst. Dette skyldes delvis effekten av en viss type tarmhormoner, nemlig inkretiner, som forsterker effekten av glukoseindusert insulinsekresjon (3). Glukagon-liknende peptid 1 (GLP-1) er et slikt inkretin som stimulerer insulinsekresjonen (3, 22, 23, 24, 25, 26). Exenatide er et syntetisk inkretinmimetika som går under salgsnavnet Byetta (produseres av Lilly) og brukes nå i behandlingen av type 2 diabetes (ikke i Norge). Det kan kombineres med andre perorale

antidiabetika og administreres som subkutane injeksjoner (27, 28, 29). GLP-1 (glukagon-liknende peptid 1) er et tarmhormon som stort sett produseres i L-cellene i duodenum, ileum og kolon (30). GLP-1 stimulerer til syntese av proinsulin og selve insulinsekresjonen ved å påvirke β -cellene til å mobilisere flere insulingranula mot celleoverflaten (22). I tillegg undertrykker det også glukagonsekresjon, forsinker tømming av ventrikkelen, og reduserer appetitten (se figur 4) (31, 32). Hos type 2 diabetikere er den naturlige effekten av inkretin redusert, eller fraværende (24).



Figur 4. Effekten av GLP-1 på glukose i pankreas og i annet vev. I øyer stimulerer GLP-1 insulinsekresjonen og undertrykker glukagonutskillelsen. I tillegg vil GLP-1 stimulere til proliferasjon av β -cellene.

GLP-1 brytes raskt ned av dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) og har en halveringstid i plasma på omtrent 2 minutter om det gis intravenøst (22).

Exendin-4 (naturlig forekommende exenatide) ble isolert fra spyttet til øglen *Heloderma suspectum* i 1992 (24). Man fant at exendin-4 sirkulerte i systemet etter at øglen hadde bitt i byttet sitt. Exenatide har 53 % DNA-homologi med GLP-1 og det har vært vist at exenatide binder seg til GLP-1 reseptorer både hos mennesker og dyr (28, 30). Exenatide imiterer riktignok ikke alle effektene av GLP-1, men den viktigste, nemlig forsterkingen av insulinsekresjon i nærvær av forhøyete glukosekonsentrasjoner, er slått fast (23, 25, 31, 33). I tillegg har exendin vist seg å være resistent mot DPP-IV og Byetta har en halveringstid på omtrent 2.5 timer når det administreres subkutant (28).

Historikk

Det eksisterer nedtegnelser som beskriver diabetes datert mer enn 2000 år tilbake (8). Likevel var sykdommen fatal frem til oppdagelsen av insulinet i begynnelsen av 1920-årene (13, 18, 34). I løpet av 1923 ble insulin masseprodusert og dermed forvandlet man en potensielt dødelig sykdom til en kronisk tilstand. Insulin er for de fleste insulinavhengige diabetikere fremdeles eneste behandlingsalternativ.

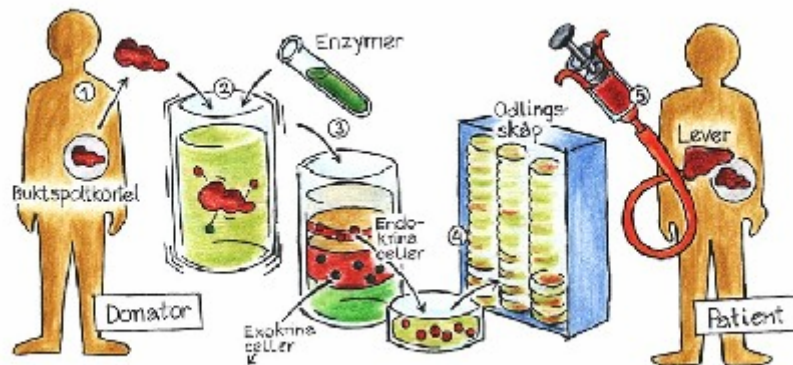
Allerede tilbake i 1889 oppdaget von Mering og Minkowski forholdet mellom pankreas og diabetes ved å observere hyperglykemi og glukosuri hos hunder hvor pankreas var fjernet (18). 5 år senere gjorde man det første forsøket på å transplantere pankreas hos en 13 år gammel gutt, som var døende p.g.a. ketoacidose, ved å implantere biter av sauepankreas under huden på ham. Riktig nok døde han 3 dager senere, men en klarte å vise en forbigående reduksjon av glukosuri (18, 34). Likevel ble ideen om å transplantere pankreas lagt på is den første tiden etter insulinets oppdagelse, men etter at man skjønnte at insulinbehandling ikke hindret utviklingen av komplikasjonene til diabetes, fikk kirurgi en ny oppsving som et alternativ til insulinbehandling (18). “Revolusjonen” kom ikke før i 1980-årene med bruken av moderne immunosuppressiva, men helorgantransplantasjon av pankreas er fortsatt forbundet med både perioperative-, og postoperative komplikasjoner (34).

I 1902 forslo Ssobolew å kun transplantere det ”endokrine vevet i pankreas”, en idé som ble oversett i nærmere 70 år inntil 1972 da Ballinger og Lacy rapporterte at de hadde klart å reversere medikamentelt induert diabetes hos rotter, ved å bruke øyer isolert fra friske rotter (18, 34). 6 år senere ble den første diabetespasienten rapportert å være insulinfri 1 år etter intrasplenisk infusjon med pankreasøyer (18).

I løpet av -80 og -90 tallet ble flere diabetikere forsøkt transplantert ved øytransplantasjon, men man klarte ikke å løse problemet med at insulinuavhengigheten var av forbigående art (35). De færreste av de som ble transplantert var insulinfrie etter 1 år. Igjen ble ideen om å transplantere øyer lagt litt på is inntil det store gjennombruddet kom 27.juli 2000 med en artikkel av Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV kalt ” Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen” i NEJM, som introduserte den såkalte “Edmontonprotokollen” (36). Edmontonprotokollen er et immunsuppresjonsregime som består av en kombinasjon av glukokortikoidfri immunsuppresjon (sirolimus, tacrolimus og daclizumab) og et adekvat antall øyer som transplanteres. Med denne metoden klarte man å gjøre 7 type 1 diabetikere insulinfrie og optimismen var så stor at flere hundre diabetikere er siden behandlet etter denne metoden. En oppfølgingsstudie etter introduksjonen av protokollen viste imidlertid at kun 10 % var insulinfrie etter 5 år (37). Likevel representerer Edmontonprotokollen et banebrytende arbeid i forhold til bruken av glukokortikoidfri immunsuppresjon fordi man både unngikk den diabetogene effekten som de mer tradisjonelle immunosuppressive medikamenter har, samtidig som man fikk effektive immunsuppresjon.

Hva er øytransplantasjon?

i dag er pankreas øytransplantasjon en, om ikke utbredt, etablert behandling av type 1 diabetes og det investeres store summer i forskningen. I 1999 opprettet man det nordiske øynettverket i Uppsala og i Oslo (Rikshospitalet), som er det største i Europa (38). I Norge har man transplantert 10 pasienter med type 1 diabetes med variable resultater (personlig kommunikasjon dr.T. Lund). Primærmålet med behandling med øytransplantasjon er å oppnå egenproduksjon av insulin. Med dette vil man få tilbake den naturlige insulinfrigjøringen som responderer adekvat på blodglukosenivået i kroppen. Man vil dermed også få et blodsukker som er lettere å regulere, og forhåpentligvis bli fri fra de fremtidige komplikasjonene som diabetes medfører.



Figur 5. Skjematisk tegning av prosedyren for øytransplantasjon fra donor til resipient (39).

Stegene i en transplantasjonsprosess av isolerte pankreasøyer er vist i figur 5. (i) Etter tillatelse vil pankreas høstes fra donor og (ii) behandles i spesiellaboratorie med et enzym som løser vevet slik at (iii) det endokrine og eksokrine vevet skiller lag i størst mulig grad. (iiii) Øyene vil behandles ytterligere for å være i best mulig stand til å transplanteres. (iiiii) De isolerte øyene vil gis pasienten ved infusjon i vena porta og fanges av leveren for så å produsere insulin herfra. De fleste vil trenge 2-3 infusjoner for å bli insulinfri.

Det gjenstår mange utfordringer før øytransplantasjon kan bli en fullverdig behandling. Disse kan oppsummeres i følgende hovedkategorier:

1. Raffinering av isolasjonsmetoder og teknikk.
2. Donor:resipient ratio.
3. Immunsuppresjon.
4. Adjuvant medikamentell behandling av øyer før, under og etter transplantasjon for å optimalisere graftfunksjon.

EFFEKTEN AV EXENDIN PÅ ISOLERTE PANKREAS ØYER FRA ROTTE IN VITRO.

Hensikten med denne delen av oppgaven er å gjøre et vitenskapelig arbeid for å verifisere de rapporterte positive effektene av exendin på isolerte øyer. Effektene må valideres før de kan overføres til mennesker.

Introduksjon.

På tross av forbedrede resultater de siste 10 år, er øytransplantasjon fortsatt en eksperimentell behandling. I hovedsak er dette forårsaket av tap av β -cellemasse under isolasjon, tid i kultur og under transplantasjonen. Dette fører til at behandlingen er lite effektiv. Exendin har vist lovende resultater i behandlingen av type 2 diabetes, og formålet med denne studien er å kartlegge effekten på øyer isolert fra rotte, for å evaluere en mulig applikasjon ved øytransplantasjon.

Materiale og metoder.

Reagenser.

Følgende reagenser ble benyttet i forsøkene:

RPMI medium 1640, HBSS 1x, HEPES 1M (Gibco, Invitrogen, Paisley, Scotland, U.K.)

Ficoll Separation Solution 1.077g/ml og 1.100g/ml (Biochrom AG, Berlin, Tyskland).

Albumin 200mg/ml infusjonsvæske (Octapharma AG, Lachen, Sveits).

Glukose 300mg/ml (apoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge).

Liberase HI 0.33mg/ml (Roche, USA).

University of Wisconsin-løsning (University of Wisconsin, USA).

Exendin-4, CaCl_2 , MgCl_2 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)

Øyisolering.

Innavlede Lewisrotter ble benyttet som pankreasdonorer. Disse ble tatt om hånd om etter Rikshospitalets reglement for håndtering av forsøksdyr jf. norsk lov.

Rottene ble tilstrekkelig sedert med Hyponorm/Dormicum (0.2-0.35 ml/100 g s. c). Stamløsning ble laget ved 2.5 ml Dormicum (1mg/ml) + 2.5 ml Hypnorm (0.5 mg/ml) i 5 ml NaCl. Rottene ble lagt i ryggleie på operasjonsbordet og åpnet med en sentral, abdominal midtlinjeincisjon.

Pankreas og duodenum ble identifisert, og pankreasgangen klemt av nær dens innløp i duodenum. Deretter ble pankreas fylt med 10ml kald Liberaseløsning (0.33 mg/ml) løst i kald Hanks medium via intraduktal injeksjon med sprøyte og kateter. Rotten ble avlivet ved å klippe ut hjertet, og pankreas ble umiddelbart tatt ut av rotten og lagt i et 50ml Corningrør med 5ml kald Liberaseløsning.

Resisert pankreas ble inkubert i et vannbad ved 37 °C i 20 minutter. Det digerererte pankreasvevet ble spunnet på en Vortex mikser 3 ganger, 10 sekunder av gangen og deretter ble digerereringen stoppet ved å tilsette kald Hanks medium med 10 % varme-inaktivert føtalt kalveserum.

Cellepelleten ble vasket 3 ganger med kald Hanks medium med 10 % varme-inaktivert føtalt kalveserum før pelleten ble løst i 1xUW-løsning (University of Wisconsin) og lagt på is i 30 minutter. Videre ble de endokrine cellene separert fra det eksokrine vevet ved å benytte seg av Ficoll løsninger med ulik tetthetsgrad (3 lags gradient). Ficoll løsningene 1.100 og 1.077 g/ml var på forhånd løst i Hanks medium til hhv. 1.090 og 1.040 g/ml. Øypelleten ble først løst i 10 ml 1.090 g/ml Ficoll løsning. Deretter ble 10 ml 1.077 g/ml Ficoll løsning lagt over det første laget og til slutt ble det lagt 10 ml 1.040 g/ml Ficoll løsning over dette laget (3 lags gradient). Corningrøret ble sentrifugert ved 4 °C i 15 minutter på 2500 rpm/min uten bremse på sentrifugen. De endokrine, insulinproduserende øyene ble høstet i sjiktet mellom 1.077 og 1.040 g/ml lagene.

Øyene ble vasket to ganger i RPMI-1640 medium og deretter sådd ut i petriskåler (9 cm) i 10 ml RPMI 1640 med tilsatt L-glutamin (2 mmol/l), HEPES (10 mmol/l), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), fungizone (0.25 µg/ml) og 10 % varme-inaktivert føtalt kalveserum (dyrkningsmedium) og dyrket i en standard celleinkubator ved 37 °C (5 % CO₂).

Antall IEQ ((µl øyer x renhet (%)) x 435)/100) og renhet ble bestemt etter farging med diphenylthiocarbazone ved bruk av mikroskop. Renheten på øyene benyttet i studien var fra 60 % til 90 %.

In vitro forsøkene.

Øyer som ble benyttet til forsøkene ble likt fordelt på 2 petriskåler (9 cm), der den ene skålen ble tilsatt exendin-4 (10 nM) og den andre ble tilsatt PBS (løsningsmiddel for exendin-4) i like stor mengde som exendin-4 (kontroll). Skålene ble inkubert i 48-72 timer i en standard celleinkubator (37 °C, 5 % CO₂). Øyene fra petriskålene (kontroll og exendin-4) ble deretter benyttet til statisk glukosestimulering og insulinfrigjøring (se under). Videre ble det også ved de angitte tidspunkt høstet cellefrie supernatanter til ulike proteinanalyser (se under) og plukket 100-200 øyer under mikroskop til genanalyser og for intracellulære proteinanalyser (se under). Øyene ble vasket i to gang i 1xPBS (pH=7.4) før pelletene og supernatantene ble lagret i fryser ved -70° inntil videre analyser.

Statisk glukosestimulering og insulinfrigjøring.

Øyene ble stimulert med ulik konsentrasjon av glukose for å se på insulinfrigjøringen. Man lagde først en inkubasjonsbuffer som bestod av stockbuffer, CaCl₂, MgCl₂, Hepes, albumin samt destillert vann, og fordelte denne på 2 Corningrør. Disse ble tilsatt en glukoseløsning på 300 mg glukose per ml slik at det ene røret fikk en totalkonsentrasjon glukose på 1.67 mM (lav) og det andre røret en totalkonsentrasjon glukose på 20 nM (høy). I en 12-brønners plate ble de 2 øverste radene med totalt 8 brønner tilsatt 4ml buffer med lav glukosekonsentrasjon i hver brønn og den nederste raden med totalt 4 brønner ble det tilsatt 4 ml buffer med høy

glukosekonsentrasjon i hver brønn. I den øverste raden la man så løst en transwell (diameter 12mm, porestørrelse 12µm) i hver brønn. Under mikroskopisk veiledning ble 20-25 øyer (100-150 µm) håndplukket med en 10 µl pipette, fra petriskålene til hver transwell. Det ble plukket øyer til to transwell fra skålen tilsatt exendin og til de to andre transwell fra kontrollskålen, slik at man fikk dupletter. Dette ble inkubert i 30 minutter ved 37 °C på en ristemaskin som holdt 30 rpm, deretter ble transwell med øyer flyttet fra første til andre rad med lav glukose, og inkuberte videre i 60 minutter ved 37 °C som beskrevet. Etter 60 minutter ble transwell med øyer flyttet fra andre til tredje rad med høy glukose, og inkuberte videre i 60 minutter ved 37 °C som beskrevet over. Etter denne inkuberingen ble de fire transwell flyttet tilbake til første rad og 1 ml supernatant fra brønnene i andre og tredje rad overført til et eppendorfrør og fryst (-70 °C) inntil insulinkonsentrasjonen ble målt ved EIA.

Oppsett av 12-brønners plate med transwell:

	Kontroll 1	Kontroll 2	Exendin 1	Exendin 2
Lav glukose- 30 min	Transwell	Transwell	Transwell	Transwell
Lav glukose- 60 min	↓	↓	↓	↓
Høy glukose - 60 min				

Insulin EIA.

For måling av insulinkonsentrasjon i supernatantene fra glukosestimuleringen ble det benyttet et kommersielt tilgjengelig kit (Mercodia Rat Insulin EIA) der medfølgende bruksanvisning for preparering av løsninger og prosedyre ble benyttet. Kort fortalt ble supernatanter fra glukosestimuleringen og kalibratorer samt Enzyme Conjugate tilsatt til en 96 brønners plate ferdig coatede brønner med monoklonalt anti-insulin fra mus. Prøvene og standardene ble analysert som dupletter. Platen med brønnene fikk stå på rister i 2 timer ved romtemperatur dekket med parafilm. Deretter ble brønnene vasket 6 ganger med vaskeløsning, tilsatt Substrate TBM og inkubert i 15 min ved romtemperatur. Etter 15 minutter ble brønnene tilsatt 50µl stoppløsning, ristet i 5 sekunder og deretter avlest spektrofotometrisk (apparat) ved 450 nm innen 30 min. Insulinfrigjøringen ble angitt som stimuleringsindeks (SI) som regnes ut som forholdet mellom insulinkonsentrasjonen målt i supernatantene fra øyer inkubert i høy glukosekonsentrasjon (stimulert sekresjon) og insulinkonsentrasjonen målt i supernatant fra øyer inkubert i lav glukosekonsentrasjon (basalsekresjon) (37). Stimuleringsindeksen (SI) ble beregnet som insulinkonsentrasjonen i 20 mM glukose stimuleringsmedium dividert med insulinkonsentrasjonen i 1.67 mM glukose stimuleringsmedium.

$$SI = \frac{\text{høy insulinkonsentrasjon}}{\text{lav insulinkonsentrasjon}}$$

Real time Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).

Total-RNA ble isolert fra frosne pelletter ved å benytte et RNA isoleringskit (RNA Isolation Kit High Performance) og en RNA isoleringsrobot (MagNa Pure LC instrumentet Roche Applied Science, Indianapolis, IN) i henhold til bruksveiledningen. cDNA fra total-RNA ble syntetisert ved bruk av cDNA High Capacity Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primere ble designet av Primer Express software, versjon 2.0 (Applied Biosystems). mRNA ble kvantifisert ved bruk av ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems) og SyBr Green assay (Eurogentec, Seraing, Belgia). Spesifisiteten til SyBr Green assay ble bekreftet ved en smeltepunktanalyse og gel elektroforese (37). Genekspresjonen til "housekeeping" genet 18-S (18S Predeveloped Assay reagents; Applied Biosystems) ble brukt for normalisering.

Målgen	Sekvens (5'→3')	Acc. Nr.
IL-10	(+)-CCTTACTGCAGGACTTTAAGGGTTA	Y00787
	(-)-TTTCTGGGCCATGGTTCTCT	
IL-6	(+)-ATATGTTCTCAGGGAGATCTTGAA	AF0365
	(-)-TGCATCATCGCTGTTTCATACAA	
TNF- α	(+)-AGACCCTCACACTCAGATCATCTTCT	M10988
	(-)-CACGCTGGCTCAGCCACT	

Tabell 1. Egenskaper av real time -qPCR assayet som ble benyttet. Sekvensen av primere brukt i real time -qPCR assayet. (+) forward primers; (-)reverse primers; Acc.nr. GenBank accessionnumber.

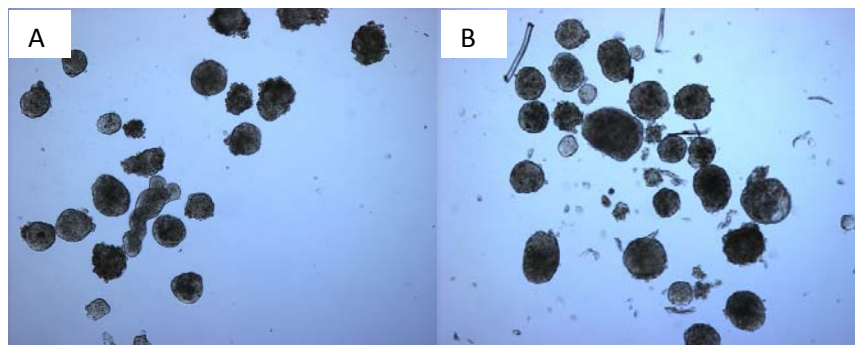
Enzyme Immunoassays (EIA).

Det ble målt proteinkonsentrasjon av IL-10, TNF- α (Biosource, Camarillo, Calif) og insulin (Mercodia AB, SE-75450, Uppsala, Sweden) i cellefrie supernatanter ved å benytte kommersielle EIA i henhold til bruksveiledningen.

Resultater.

Øymorfologi.

Renheten av de isolerte øyene lå mellom 60 % og 90 %. Etter 48-72 timer i kultur ble de renere fordi en del av det eksokrine vevet kom av øyene. Under mikroskop syntes øyene stimulert med exendin noe mer jevne i størrelsen, en tendens som gikk igjen i forsøkene.



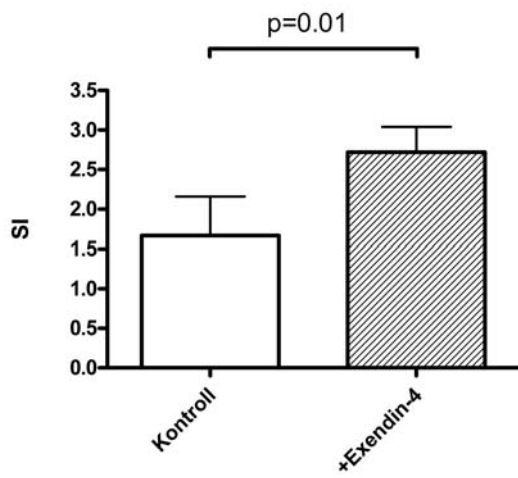
Figur 6 Øyer fra rotte uten (A) og med tilsatt exendin (B). Bildene er tatt etter farging med diphenylthiocarbazone og mikroskopi.

Statisk glukosestimulering og insulinfrigjøring målt ved insulin EIA.

Tabell 2 Insulinfrigjøring hos øyer etter glukosestimulering			
Øyer	n	*Stimuleringsindeks (Gjennomsnitt ± SEM)	p
Kontroll	5	1,66±0,46	p=0.01
Exendin	5	2,72±0,78	

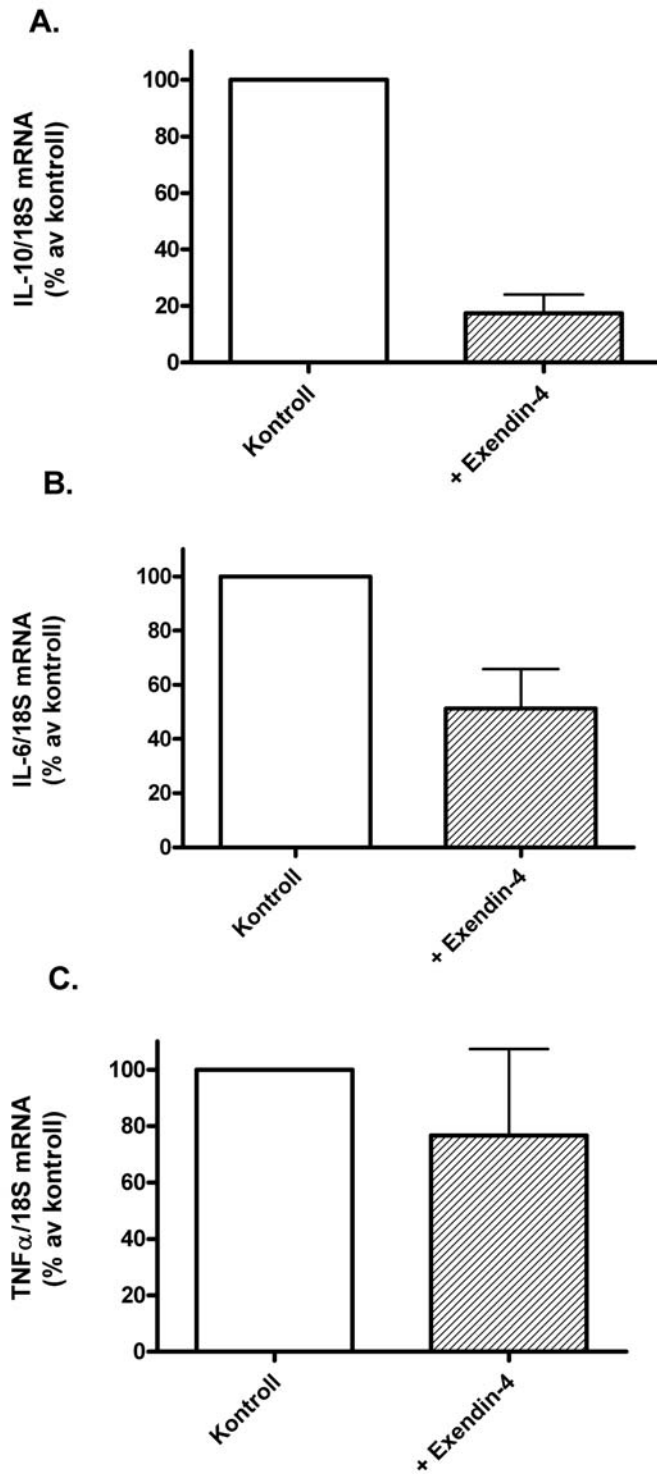
*SI ble beregnet som insulinkonsentrasjonen av 20-25 øyer inkubert i 20 mM glukose stimuleringsmedium dividert med insulinkonsentrasjonen av de samme øyene inkubert i 1,67 mM glukose stimuleringsmedium.

Isolerte øyer fra rotte ble delt i to like grupper, der den ene gruppen ble tilsatt exendin-4 (10 nmol) og den andre ikke (kontroll). Insulinfrigjøringen ble målt ved insulin EIA og SI beregnet som beskrevet i materiale og metoder. Tabell 2 og figur 7 viser at øyer stimulert med exendin i 48-72 timer har en signifikant økt insulinfrigjøring etter glukosestimulering sammenlignet med kontroll.



Figur 7 Stimuleringsindeks (SI) for exendinstimulerte øyer (skravert kolonne) sammenliknet med kontroller (blank kolonne).

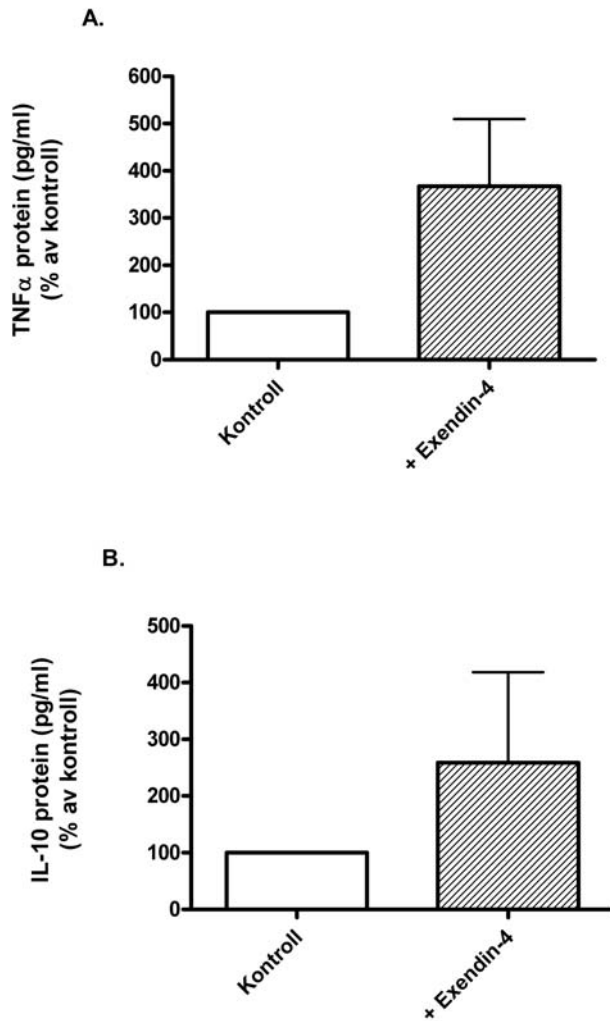
Real time Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).



Figur 8 Genuttrykket av IL-10 (A), IL-6 (B) og TNF α (C) (mRNA) i øyer stimulert med exendin-4 10nmol (skravert kolonne) sammenlignet med kontroller (åpen kolonne) etter 48-72 timer i kultur.

Figur 8 viser genuttrykket av IL-10 (A), IL-6 (B) og TNF- α (C) hos isolerte øyer fra rotte målt ved mRNA-ekstraksjonsteknikk(RT-qPCR), som beskrevet i materiale og metoder. Exendinstimulerte øyer ble sammenliknet med kontroller, og det proinflammatoriske genuttrykket er generelt oppregulert hos kontrolløyene. Den største forskjellen mellom de to gruppene er i ekspresjonen av IL-10, hvor exendin ligger på 20 % sammenliknet med kontrolløyene. Den minste forskjellen er i uttrykk av TNF- α hvor genekspresjonen av de exendinstimulerte øyene ligger på knappe 80 % sammenliknet med kontrolløyenes ekspresjon. Genekspresjonen av IL-6 hos exendinstimulerte øyer ligger på ca. 50 % av kontrolløyenes ekspresjon.

Enzyme Immunoassays(EIA).



Figur 9. Proteinsekresjonen av TNF- α (A) og IL-10 (B) i exendinstimulerte øyer (skravert kolonne) og kontrolløyer (åpen kolonne).

I cellefri supernatant ble sekresjonen av TNF- α (A) og IL-10 (B) målt etter 48-72 timers inkubasjon av isolerte rotteøyer. Øyene ble enten stimulert med exendin-4 (10nmol), eller tjente som kontroll. Figur 9 viser at proteinsekresjonen av både IL-10 og TNF- α er signifikant høyere hos øyene som ble tilsatt exendin sammenliknet med kontrolløyene.

DISKUSJON.

Denne oppgaven har tatt for seg øytransplantasjon som et behandlingsalternativ til selekterte pasienter med type-1 diabetes. Til tross for flere tiårs forskning er langtidsresultatene likevel ikke tilfredsstillende. Litteraturen innen fagfeltet er omfattende og det er bred enighet om at årsaken til at ikke flere pasienter blir insulinfrie, er et kontinuerlig tap av øyer fra tidspunktet for organhøsting til graftet er revaskularisert og pasienten er insulinfri. I tillegg medfører injeksjon av øyer i blod en trombocyttaggregering og komplementaktivering. Man antar i dag at mellom 30-50% av øyene ødelegges før de når leversinusoidene ved transplantasjonen (personlig kommunikasjon prof. O. Korsgren). Tap av øyer åpner for intervensjon på flere plan, hvorav medikamentell intervensjon kan være ett angrepspunkt. Exendin kan være et slikt medikament i og med at det muligens virker positivt på β -celleproliferasjon og samtidig antagelig har antiapoptotiske effekter (se nedenfor). En økt celledannelse, eller redusert apoptoserate vil potensielt kunne gi økt cellemassen, som er et kritisk parameter ved øytransplantasjon. Videre er det vist at exendin øker intracellulær akkumulasjon av insulin (se nedenfor).

Forfatteren har derfor utført en egen in vitro studie for å studere den direkte effekten av exendin på øyer isolert fra rotte. Isolerte øyer ble stimulert i 48-72 timer med exendin-4 og sammenliknet med ustimulerte øyer (kontrolløyer). Resultatene fra disse forsøkene viser at insulinsekresjon i de exendinstimulerte øyene økte signifikant sammenliknet med kontrolløyene. I tillegg ble genekspressjonen (mRNA nivået) i øyene og proteinnivået i supernatant av pro- og anti-inflammatoriske cytokiner (IL-6, IL-10 og TNF- α) analysert ved bruk av henholdsvis real time-qPCR og EIA. Resultatene viste en nedregulering av både de pro-, og anti-inflammatoriske cytokinene i de exendinstimulerte øyene sammenlignet med kontrollcellene. Derimot viste analysene av proteinsekresjonen en høyere utskillelse av TNF- α og IL-10 hos de exendinstimulerte øyene. I denne in vitro-studien valgte vi å høste øyene til insulinfrigjøring, genekspressionsanalyse og analyse av proteinmengde i supernatant etter 48, eller 72 timer. Dette betyr at vi kun har et øyeblikksbilde av situasjonen, noe som muligens kan forklare de ulike tendenser vi ser mellom genuttrykket og proteinuttrykket i øyene (proteinsyntesen vil normalt ta lengre tid enn genekspressjonen). Derfor vil det ved fremtidige forsøk og målinger av disse parametrene være viktig å måle kinetikken ved en tidskurve for genekspressjonen og proteinsekresjonen. Likeså har vi ikke i denne studien testet om vi får en dose-respons kurve av exendin-4. Stimuleringsdosen av exendin-4 (10nM) ble valgt ut fra andre in vitro studier (40, 41, 42, 43). Ved slike supplerende forsøk vil man ha bedre holdepunkter for å uttale seg om exendins

effekt på inflammatoriske markører. Våre resultater kan imidlertid tyde på at exendin kan dempe den negative stressresponsen øyene gjennomgår ved høsting og inkubering. Dette er i tråd med andre studier som har vist at exendin-4 stimulering av øyer gir bedre resultater etter transplantasjon (40, 44). Exendin-4 behandling bedrer også den glykemiske kontrollen etter øytransplantasjon og øker insulininnholdet (41, 42). Videre mener man at exendin-4 og GLP-1 har effekt på proliferasjonen av β -celler og stimulerer til nydannelse av de insulinproduserende cellene (30). Proliferasjonseffekten kan skyldes de antiapoptotiske egenskapene (25,42,45). Man mener at GLP-1 reseptoragonistene muligens beskytter β -cellemassen ved a) direkte interaksjon med GLP-1 reseptorene på β -cellene, eller på forstadiene til øyene og aktiverer signalveier som regulerer β -celle proliferasjon, nydannelse og apoptose, eller b) reduserer den økte sirkulasjonen av glukose og fettsyrer og dermed indirekte beskytter β -cellene fra det skadelige metabolske miljøet (25). Exendin-4 er vist å forbedre metabolsk kontroll hos pasienter med type 2 diabetes ved å øke glukosestimulert insulinsekresjon, redusere fastende og postprandiale blodglukosenivåer, redusere HbA_{1c} og plasmanivåene av frie fettsyrer (22, 23, 24, 25, 30), og er derfor godkjent som antidiabetika for diabetes type 2 i enkelte land.

KONKLUSJON.

GLP-1 analoger er en gruppe aktive inkretiner som har fått økende interesse innen pankreas øytransplantasjon, særlig exendin. In vitro-studier har vist flere interessante biologiske egenskaper ved exendin, men det gjenstår fremdeles en del forskning for å vise at disse mekanismene også gjelder *in vivo* hos mennesker. GLP-1 analoger representerer et nytt og spennende forskningsfelt som vil kunne få stor klinisk interesse i fremtiden. Hovedvekten i forskningen på denne analogen fremover vil dreie seg om å avdekke exendins eksakte virkningsmekanismer. Den store DNA-homologien med GLP-1 gjør at man antar at de har like virkningsmekanismer. Men det er likevel en kjensgjerning at exendin ikke har alle effektene til GLP-1, hvorav den viktigste kanskje er halveringstiden. Dette åpner for mange spennende muligheter, og spesielt interessant vil det være å se mer grundig på exendins rolle i transplantasjon av øyer.

OPPSUMMERING OG VIDERE PLANER.

De kliniske resultatene ved øytransplantasjon har vært svært utilfredsstillende i forhold til helorgantransplantasjon med tanke på antall pasienter som blir insulinfri. Ovenfor har vi diskutert mulige årsaker til hvorfor det er slik. Et annet intervensjonsområde kan muligens også være alternativ lokalisasjon for graftimplantasjon. Den konvensjonelle teknikken som brukes i øyeblikket er at isolerte øyer transplanteres ved intraportal infusjon, slik at øyene fanges i

leveren og begynner å produsere insulin herfra. Andre steder som det forskes på som mulig graftsted er nyrekapsel, blære, intraperitonealt og intramuskulært (46, 47).

Gevinsten ved å optimalisere medikamentbruk i forbindelse med transplantasjon, isolasjonsprosessen og finne det ideelle graftstedet er å oppnå en donor-resipient ratio på 1:1. Per tid er det slik at hver resipient vil trenge 2-3 donorer for å få tilstrekkelig øyer til å produsere nok endogent insulin (48). Ved Rikshospitalet er 10 pasienter transplantert med til sammen 35 transplantasjoner (personlig kommunikasjon dr. T. Lund). Dette er ikke holdbart både fordi tilgangen på organer er begrenset og fordi transplantasjon er en kirurgisk prosedyre som innebærer en risiko for resipienten hver gang en slik transplantasjon utføres.

Man mener at den viktigste årsaken til retransplantasjon, er en kontinuerlig prosess med tap av øyer fra tidspunktet for høsting til øyene er transplantert og har begynt å produsere insulin. Dette tapet kan illustreres som en tredelt prosess:

Fase 1 illustrerer tap av β -celler fra organhøsting til transplantasjon, og man regner med at omtrent 30 % av øyene går tapt i denne fasen. Hovedmomentet her er hjernedød hos donor, som gir en øyeblikkelig generell oppregulering av proinflammatoriske mekanismer i perifere organer (49,50). I tillegg tilkommer varm ischemi som øyene utsettes for under høsting og under isolasjonsprosessen. Dette kan trigge immunmekanismer hos resipienten som kan føre til akutt rejeksjon av transplantatet (49, 51, 52).

Fase 2 er kvantitetstap av øyer under transplantasjonen. Uppsalagruppen viste at øyer uttrykker tissue factor (TF), som er en sentral faktor i "Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction" (IBMIR) (53). IBMIR er å anse som en koagulasjonsprosess. Den er kjennetegnet ved aktivering av koagulasjons-, og komplementsystemet og ved at aktiverte blodplater hurtig binder seg til øyene etter infusjon i vena porta. Dette resulterer raskt (ca. 15 minutter) i at øyene fanges i koagler og infiltreres i all hovedsak av nøytrofile granulocytter (54). Dette er den viktigste årsaken til tap av øyer umiddelbart etter transplantasjon (55, 56, 57). Det er også antydnet at IBMIR kan være en utløsende faktor for dannelse av intraportal trombose, som er en alvorlig og fryktet komplikasjon ved øytransplantasjon.

Det tar 2-3 uker fra infusjonstidspunktet til øyene er revaskularisert, og i løpet av denne tiden utsettes de for høye konsentrasjoner av immunsuppressiva. Disse medikamentene kan være potensielt toksiske for øyene da konsentrasjonen av medikamentene i portablodet er dramatisk høyere sammenliknet med konsentrasjonen systemisk (58, 59). Sammen med IBMIR vil dette bidra til at ytterligere 40 % av øyene går tapt i denne fasen.

Fase 3 er tap av øymasse p.g.a. immunmodulerende medikamenter. Edmontonprotokollen består i steroidfri immunsuppresjon med sirolimus (Rapamune), tacrolimus (Prograf) og IL-2 reseptorblokkeren daclizumab (Zenapax) (36) og har så langt vært enerådende som immunmodulerende regime etter øytransplantasjon, til tross for at disse medikamentene er potensielt toksiske for øyer og at de kan være diabetogene, spesielt tacrolimus (58, 60).

Øygruppen ved Rikshospitalet har nylig vist at metylprednisolon signifikant hemmer uttrykket av proinflammatoriske cytokiner og TF i humane øyer uten å affisere insulinsekresjonen i det lange løp (61). Derfor kan man tenke seg at steroidbehandling av donor før organhøsting, øyer i

kultur, eller resipient kan være fordelaktig. Dette kan føre til en reduksjon av IBMIR og potensielt øke langtidsoverlevelsen av graftet.

Det er startet studier på humane øyer etter samme behandlingsprotokoll med exendin-4 som beskrevet her. Preliminære data herfra viser at exendin-4 gir en bedre insulinsekresjon sammenliknet med kontrollene. Neste steg vil være, som tidligere nevnt, å avdekke reaksjonsveiene og virkningsmekanismene til exendin-4, for å bekrefte at resultatene er overførbare til transplantasjon hos mennesker.

Forfatteren vil takke øygruppen ved Rikshospitalet. En spesiell takk går til Hanne Scholz for stort engasjement og uvurderlig veiledning, Tormod Lund for mange gode innspill og hjelp, og Martin Brunvand for opplæring i prosedyrer og labteknikker.

LITTERATURLISTE.

1. Barrett, EJ. The endocrine pancreas. In: Boron WF, Boulpaep EL, editors. Medical physiology. Updated edition. Pennsylvania, USA: Elsevier Saunders; 2005. P. 1066-85.
2. http://cal.man.ac.uk/student_projects/2000/mnby7lc2/pancreas.htm
3. Frier BM, Fisher M. Diabetes mellitus. In: Boon NA, Colledge NR, Walker BR, Hunter JAA, editors. Davidson's Principle & Practice of Medicin. 20th edition. Pennsylvania, USA: Churchill Livingstone Elsevier; 2006. p. 805-47.
4. <http://www.geriatricsyllabus.com/syllabus/main.jsp?cid=SCC-END-2-2>
5. <http://www.betacell.org/content/articles/print.php?aid=1>
6. <http://www.diabetes.no/index.asp?id=23018>
7. <http://www.who.int/diabetes/en>
8. <http://www.diabetes.no/index.asp?id=23017>
9. <http://www.diabetes.no/index.asp?id=23023>
10. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/print.html>
11. Bantle JP, Laine DC. Day-to-day variation in glycemic control in type I and type II diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 1988 Jul; 8 (3):147-9.
12. DCCT (no authors listed). The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes.* 1996 Oct; 45 (10):1289-98.
13. <http://www.diabetes.no/index.asp?id=1710>
14. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998 Sep 12; 352 (9131):854-65.
15. Zehrer C, Hansen R, Bantle J. Reducing blood glucose variability by use of abdominal insulin injection sites. *Diabetes Educ.* 1990 Nov-Dec; 16 (6):474-7.

16. Ionescu-Tîrgoviște C, Guja C, Ioacă S et al. Continuous glucose monitoring: physiologic and pathophysiologic significance. *Rom J Intern Med.* 2004; 42 (2):381-93.
17. Bantle JP, Laine DC. Day-to-day variation in glycemic control in type I and type II diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 1988 Jul; 8 (3):147-9.
18. Lakey JR, Burridge PW, Shapiro AM. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl Int.* 2003 Sep; 16 (9):613-32.
19. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. The endocrine pancreas and the control of blood glucose. In Rang, Dale, Ritter, Moore, editors. *Pharmacology.* 5th edition. Churchill Livingstone Elsevier; 2003. p. 380-93.
20. <http://www.felleskatalogen.no>
21. http://www.novartis.com/downloads/investors/News_release_-_Galvus_FDA_-_February_2007.pdf
22. Mikhail N. Exenatide: a novel approach for treatment of type 2 diabetes. *South Med J.* 2006 Nov; 99 (11):1271-9.
23. Barnett AH. Exenatide. *Drugs Today (Barc.)* 2005 Sep; 41 (9):563-78.
24. De Leon DD, Crutchlow MF, Ham JY et al. Role of glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38 (5-6):845-59.
25. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007 May; 132 (6):2131-57.
26. Holz GG. New insights concerning the glucose-dependent insulin secretagogue action of glucagon-like peptide-1 in pancreatic [beta]-cells. *Horm Metab Res* 2004; 36: 787.
27. http://www.byetta.com/hcp/byetta_hcp_information_200.jsp?reqNavId=0
28. <http://pi.lilly.com/us/byetta-pi.pdf>
29. <http://www.lilly.com/products>
30. Nielsen LL, Young AA, Parkes DG. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. *Regul Pept.* 2004 Feb 15;117(2):77-88.

31. Ruggles JA, Kelemen D, Baron A. Emerging therapies: controlling glucose homeostasis, immunotherapy, islet transplantation, gene therapy, and islet cell neogenesis and regeneration. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004 Mar; 33 (1):239-52, xii.
32. Doyle ME, Egan MJ. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther.* 2007 Mar; 113 (3):546-93.
33. Ghofaili KA, Fung M, Ao Z et al. Effect of exenatide on beta cell function after islet transplantation in type 1 diabetes. *Transplantation.* 2007 Jan 15; 83 (1):24-8.
34. Srinivasan P, Huang GC, Amiel SA et al. Islet cell transplantation. *Postgrad Med J.* 2007 Apr; 83 (978):224-9.
35. Naftanel MA and Harlan DM. Pancreatic Islet Transplantation. *PLoS Med.* 2004 Dec; 1 (3):e58; quiz e75.
36. Shapiro AM, Lakey JR, 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 Jul 27;343(4):230-8.
37. Ryan EA, Paty BW, Senior PA et al. Five year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 2005 Jul; 54(7):2060-69.
38. <http://www.medscinet.com/nordicislets/default.aspx>
39. <http://www.medscinet.com/nordicislets/about1.aspx>
40. King A, Lock J, Xu G et al. Islet transplantation outcomes in mice are better with fresh islets and exendin-4 treatment. *Diabetologia.* 48:2074-2079; 2005.
41. Sharma A, Sorenby A, Wernerson A et al. Exendin-4 treatment improves metabolic control after rat islet transplantation to athymic mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 49:1247-1253; 2006
42. Bohman S, Waern I, Andersson A, King A. Transient beneficial effects of exendin-4 treatment on the function of microencapsulated mouse pancreatic islets. *Cell Transplant.* 2007; 16 (1):15-22.
43. Parkes DG, Pittner R, Jodka C, Smith P, Young A. Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 in vivo and in vitro. *Metabolism.* 2001 May; 50 (5):583-9.

44. Tsunekawa S, Yamamoto N, Tsukamoto K et al. Protection of pancreatic β -cells by exendin-4 may involve the reduction of endoplasmic reticulum stress; in vivo and in vitro studies. *J Endocrinol.* 2007 Apr; 193 (1):65-74.
45. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 2003; 144: 5149.
46. Morini S, Brown ML, Cicalese L et al. Revascularization and remodelling of pancreatic islets grafted under the kidney capsule. *J Anat.* 2007 May; 210 (5):565-77.
47. Lau J, Mattsson G, Carlsson C et al. Implantation site-dependent dysfunction of transplanted pancreatic islets. *Diabetes.* 2007 Jun; 56 (6):1544-50.
48. <http://www.medscinet.com/nordicislets/sjukvard1.aspx>
49. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, et al. Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Ann Surg* 2000; 232: 263-7.
50. Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation.* 1998; 65:1533-8.
51. Cao X, Gao Z, Robert CE et al. Pancreatic-Derived Factor (FAM3B), a Novel Islet Cytokine, Induces Apoptosis of Insulin-Secreting Cells. *Diabetes* 52: 2296-2303, 2003
52. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL: Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 55: 1139-1149, 1998.
53. Moberg L, Johansson H, Foss A, et al. Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *The Lancet* 2002; 360:2039-45.
54. Moberg L, Korsgren O, Nilsson B. Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO-compatible blood. *Clin Exp Immunol.* 2005 Oct; 142 (1):125-31.
55. Bennet W, Groth CG, Larsson R et al. Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Ups J Med Sci.* 2000; 105 (2):125-33.
56. Inverardi L, Ricordi C. Therapeutic approaches to counteract immediate blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation. *Transplantation* 2006 Aug 15; 82 (3):312-3.

57. Johansson M, Lukinius A, Foss A, et al. Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; 54 (6):1755-62.
58. Desai NM, Goss JA, Markmann JF, et al. Elevated portal vein drug levels of sirolimus and tacrolimus in islet transplant recipients: local immunosuppression or islet toxicity? *Transplantation* 2003; 76(11):1623-5
59. Shapiro AM, Gallant HL, Hao EG et al. The portal immunosuppressive storm: relevance to islet transplantation? *Ther Drug Monit.* 2005 Feb; 27 (1):35-7
60. Berney T, Buhler LH, Majno P, Mentha G, Morel P. Immunosuppression for pancreatic islet transplantation. *Transplant Proc.* 2004 Mar; 36 (2 Suppl):362S-366S.
61. Lund T, Fosby B, Korsgren O et al. Glucocorticoids reduce proinflammatory cytokines and tissue factor in human islets without permanent adverse effect on insulin secretion in vitro.
62. Ullrich S, Berchtold S, Ranta F et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion. *Diabetes.* 2005 Apr; 54 (4):1090-9.
63. Liu X, Gunther L, Drognitz O et al. Persistent normoglycemia in the streptozotocin-diabetic rat by syngenic transplantation of islets isolated from a single donor with Liberase. *Pancreas.* 2006 Jan; 32 (1):9-15.

