

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. A. Thiede

**Untersuchungen zur Isolierung, Reinigung und In-Vitro-
Funktion porziner Langerhans-Inseln**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von
Mareike Krickhahn
aus Neumünster**

Würzburg, Dezember 2002

Referentin: Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs

Korreferent: Professor Dr. med. B. Allolio

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2003

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	7
2.1	Untersuchungsmaterial	7
2.2	Isolierung porziner Langerhans-Inseln.....	7
2.2.1	Präparation der Pankreata.....	7
2.2.2	Aufbau der Isolierungsapparatur	8
2.2.3	Pankreasdesintegration	9
2.3	Anfertigung lichtmikroskopischer Präparate.....	10
2.3.1	Herstellung von Gefrierschnitten	10
2.3.2	Immunhistochemie	10
2.4	Reinigung der Langerhans-Inseln	11
2.4.1	Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation	12
2.4.2	OptiPrep-Dichtegradienten-Zentrifugation	13
2.5	Viabilität der Langerhans-Inseln	14
2.6	In-Vitro-Funktion von Langerhans-Inseln	14
2.7	Messdaten und ihre Auswertung	15
2.7.1	Berechnung der Inseläquivalente (IEQ/g Organ).....	15
2.7.2	Reinheit und Ausbeute der Langerhans-Inseln	17
2.7.3	Insulinbestimmung	17
2.8	Fotodokumentation.....	17
2.9	Statistische Auswertung	17
3	Ergebnisse	18
3.1	Isolierung porziner Langerhans-Inseln.....	18
3.1.1	Vergleich verschiedener Spenderschweine	18
3.1.2	Vergleich junger und alter Spenderschweine.....	20
3.1.3	Einfluss der Liberase PI auf das Isolierungsergebnis.....	22
3.1.4	Vergleich der Morphologie des Pankreas von jungen und alten Spenderschweinen	23
3.2	Reinigung porziner Langerhans-Inseln mittels Dichtegradienten- Zentrifugation	28

3.2.1	Reinheit nach Dichtegradienten-Zentrifugation	29
3.2.2	Ausbeute nach Dichtegradienten-Zentrifugation	32
3.3	Viabilität isolierter porziner Langerhans-Inseln.....	35
3.4	In-Vitro-Funktion isolierter porziner Langerhans-Inseln.....	36
3.4.1	Einfluss der Inselzahl auf die dynamische Insulinausschüttung	37
3.4.2	Einfluss der Kulturtemperatur auf die dynamische Insulinausschüttung	38
3.4.3	Einfluss der Kulturdauer auf die dynamische Insulinausschüttung	39
3.4.4	Einfluss von Nicotinamid auf die Langzeit-Kultivierung isolierter porziner Langerhans-Inseln	40
4	Diskussion	42
4.1	Einfluss von Rasse und Alter des Spenderschweines auf das Ergebnis der Inselisolierung.....	45
4.2	Einfluss der verwendeten Liberase PI-Charge auf das Ergebnis der Inselisolierung.....	46
4.3	Unterschiede der Pankreasmorphologie bei jungen und alten Spenderschweinen und deren Auswirkung auf das Isolierungsergebnis.....	48
4.4	Reinheit und Ausbeute der Langerhans-Inseln nach Dichtegradienten- Zentrifugation	50
4.5	Viabilität und In-Vitro-Funktion isolierter Langerhans-Inseln	52
5	Ausblick	56
6	Zusammenfassung	58
7	Literaturverzeichnis	61
	Anhang	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Störung des Kohlenhydratstoffwechsels. Man unterscheidet den insulinabhängigen Diabetes (Typ I, „insulin-dependent diabetes mellitus“, IDDM) vom insulinunabhängigen (Typ II, „non-insulin-dependent diabetes mellitus“, NIDDM) Diabetes. Der IDDM manifestiert sich in der Regel bereits im Jugendalter, ihm liegt ein Autoimmunprozess zugrunde, der durch zytoplasmatische Autoantikörper gegen Inselzellen (ICA = „islet-cell-antibodies“), gegen Insulin (IAA = „insulin-autoantibodies“) und/oder gegen ein inselzelleigenes Protein, die Glutamatdecarboxylase (Anti-GAD) charakterisiert ist und zu einer irreversiblen Zerstörung der β -Zellen der Langerhans-Inseln führt [1-4]. Die Folge ist ein absoluter Insulinmangel mit konsekutiver Hyperglykämie, der nur durch exogene Insulinzufuhr behandelbar ist. Ätiopathogenetisch wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen; sowohl genetische Prädispositionen (spezifische HLA-DQ-Allele) als auch virale Infektionen [5, 6] und Nahrungsbestandteile (in der Kuhmilch enthaltenes Rinderalbumin) begünstigen die klinische Manifestation des IDDM. Der Typ II Diabetes beruht auf einer herabgesetzten Insulinwirkung an den Erfolgsorganen (periphere Insulinresistenz) sowie einer gestörten Insulinsekretion der β -Zellen. Die Inzidenz nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Neben genetischer Disposition begünstigen exogene Faktoren, wie z.B. Adipositas und Bewegungsmangel, die klinische Manifestation. In der Mehrzahl der Fälle ist der NIDDM durch eine Diät und Änderungen in der Lebensführung zu beherrschen.

Ziel jeder Therapie des IDDM ist die Normalisierung des Blutzuckers. Für die Insulinsubstitution stehen unterschiedlich schnell wirksame Insuline zur Verfügung. Das Schicksal eines Diabetikers wird durch die einzelnen Sekundärkomplikationen, wie Mikro- und Makroangiopathie [7, 8], Retinopathie [9], Nephropathie [10] und Neuropathie [11, 12] bestimmt. Trotz intensivierter Insulintherapie können Blutzuckerschwankungen im Verlauf der Erkrankung nicht vermieden werden. Aufgrund der Hyperglykämie kommt es zur nicht-enzymatischen Glykosilierung von Proteinen, die als Ursache für die Sekundärkomplikationen angesehen wird [13]. Je schlechter der Blutzucker eingestellt ist, desto häufiger und desto früher treten die oben genannten Sekundärschäden auf [14]. Zunehmend wird daher über alternative

Behandlungsmethoden nachgedacht, um die Blutzuckerschwankungen zu verringern. Ein mögliches Behandlungskonzept ist die Transplantation insulinproduzierenden Gewebes. Hierbei ist zunächst die Pankreastransplantation zu nennen, die meist in Kombination mit einer Nierentransplantation im Stadium des chronischen Nierenversagens durchgeführt wird [15]. Dabei ist eine lebenslange immunsuppressive Therapie erforderlich. Die Auswirkungen einer Pankreastransplantation auf die oben genannten Sekundärkomplikationen sind unterschiedlich [16]: Während eine Nephropathie des renalen Allotransplantates verhindert werden kann, profitiert eine fortgeschrittene Retinopathie ebenso wenig wie eine bereits bestehende autonome Neuropathie von einer Pankreastransplantation. Deutliche klinische Verbesserungen zeigten sich bei einer bestehenden peripheren senso-motorischen Polyneuropathie. Die Effekte auf die diabetische Makroangiopathie wurden bisher nur unzureichend untersucht, es zeigte sich jedoch eine günstige Auswirkung auf den Lipidstoffwechsel. In Anbetracht dessen, sowie aufgrund der Schwere des chirurgischen Eingriffes und der lebenslangen Immunsuppression muss man die Pankreastransplantation als Therapieoption für den jungen Typ I Diabetiker im Frühstadium der Erkrankung ausschließen. Ein vielversprechenderes Verfahren stellt die Transplantation isolierter Langerhans-Inseln dar. Es konnte bereits in Tierexperimenten gezeigt werden, dass isolierte Langerhans-Inseln die diabetische Stoffwechsellage korrigieren und Sekundärkomplikationen verhindern [17-19]. Die Vorteile gegenüber der Pankreastransplantation sind (1) ein minimal invasiver chirurgischer Eingriff und (2) die Möglichkeit der Manipulation des zu transplantierenden Gewebes im Sinne einer Immunogenitätssenkung, z.B. durch bestimmte Kulturbedingungen *in vitro* [20, 21] oder durch eine Verkapselung des Transplantates mit biokompatiblen Membranen [22-28]. Trotz der Erfolge der Inseltransplantation im Tiermodell blieben die Erfolge der klinischen Inseltransplantationen jedoch hinter den bisherigen Erwartungen zurück. Seit 1893 bis Dezember 2000 wurden nach Erhebungen des Internationalen Inseltransplantationsregisters weltweit 493 allogene Inseltransplantationen bei Patienten mit Diabetes mellitus durchgeführt. Eine detaillierte Analyse der Inseltransplantationen zwischen 1990 und 1999 zeigte ein Ein-Jahres-Transplantat-Überleben von 41%, aber nur 11% der Patienten blieben länger als ein Jahr insulinunabhängig [29]. Neuere Ergebnisse einer kanadischen Arbeitsgruppe sind jedoch sehr vielversprechend: Durch

ein neu entwickeltes immunsuppressives Regime gelang es, in vier von zwölf Patienten (33%) eine Insulinunabhängigkeit nach allogener Inseltransplantation über einen mittleren Beobachtungszeitraum von 10 Monaten zu erreichen [30].

Trotz signifikanter Verbesserungen der Ergebnisse der klinischen Inseltransplantation bleibt ein weiteres Problem ungelöst: das Problem des Spendermangels. Einen Lösungsansatz bietet die Verwendung tierischen Gewebes (Xenotransplantation). Aufgrund der phylogenetischen und damit immunogenetischen Nähe zum Menschen wurde zunächst an Primaten (z.B. Schimpansen, Rhesusaffen, Paviane) als Organspender gedacht. Diese scheiden jedoch sowohl aus ethischen Gründen, als auch aufgrund der Bedrohung einiger Arten, der Gefahr einer möglichen Infektionsübertragung und der hohen Kosten für Zucht und Haltung als Spendertiere aus. Die Verwendung von Nutztieren (Rind, Schaf, Schwein) als Spendertiere für die Xenotransplantation ist hingegen ein interessanter Lösungsansatz. Insbesondere das Schwein wäre als Spendertier für Langerhans-Inseln geeignet. Es ist ebenso wie der Mensch ein Allesfresser und ihm physiologisch sehr ähnlich. Das porcine Insulin unterscheidet sich von humanem Insulin in nur einer Aminosäure und wurde vor der Ära des rekombinant hergestellten humanen Insulins zur Insulinsubstitution bei Diabetes mellitus verwendet.

Vor einer erfolgreichen Inseltransplantation aber steht die Isolierung der Langerhans-Inseln aus dem Pankreas. 1965 wurde die Isolierung mittels enzymatischer Verdauung erstmals beschrieben [31]; 1967 konnte gezeigt werden, dass mittels retrograder Enzyminjektion in den Ductus pancreaticus die Wirksamkeit des Verdauprozesses verbessert werden kann [32]. Zehn Jahre später wurde mit der Einführung der Verdauungs-Filtrations-Methode [33] die enzymatische Inselisolierung entscheidend verbessert. Die Automatisierung der Methode durch C. Ricordi [34-36] stellte den entscheidenden Durchbruch dar, mit dieser Technik konnten in den letzten Jahren sehr viel erfolgreicher Langerhans-Inseln sowohl aus humanen Spendern [37-40], als auch aus Säugetieren, insbesondere dem Schwein [39-52] und Nagern [53] isoliert werden.

Dennoch, die Inselisolierung aus dem porcinen Pankreas ist bis heute kein Standardverfahren. Es gestaltet sich noch immer als ausserordentlich schwierig, regelmässig Langerhans-Inseln von sehr guter Qualität aus dem porcinen Pankreas zu isolieren. Die Gründe liegen zum einen auf Seiten der Spendertiere, zum anderen im Verfahren der Isolierung selbst. Sowohl das Alter, als auch der genetische Hintergrund des Spendertieres sind variable Parameter, die den Erfolg der Isolierung bestimmen [54-57]. Aber auch die Wahl des Enzyms, d.h. der Kollagenase, ist entscheidend für das Gelingen der Inselisolierung [58-60]. Die optimale Konzentration des Enzyms [61, 62], ein geeignetes Lösungsmedium [63, 64], der geeignete Zeitpunkt der Injektion der Kollagenase [64, 65], der optimale Zeitpunkt des Abbruchs sowie die optimale Temperatur während des Desintegrationsvorganges [66] sind für den Erfolg der Inselisolierung mitentscheidend. Ferner können plötzliche Aktivitätsverluste, chargenabhängige Unterschiede hinsichtlich der Enzymaktivität [38] sowie toxische Verunreinigungen in erfolglosen Isolierungen resultieren. Die Entwicklung der Liberase PI – ein speziell für die porcine Inselisolierung entwickeltes Enzymgemisch unbekannter Zusammensetzung – stellt zwar eine Verbesserung gegenüber den bisher verwendeten Kollagenasen dar, ein wirklicher Durchbruch ist jedoch auch damit bislang nicht erzielt worden.

An die enzymatische Desintegration des porcinen Pankreas schließt sich die Reinigung der gewonnenen Gewebesuspension an. Das endokrine Gewebe macht im porcinen Pankreas 1-2% des Gesamtgewebes aus, nach Reinigung sollte der Anteil der Langerhans-Inseln an der Gewebesuspension im Idealfall 100% betragen. In der Regel wird diese mittels Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt, da endokrines Gewebe eine niedrigere Dichte als exokrines Gewebe aufweist [67]. Eine Verunreinigung der Inselpräparation durch exokrines Gewebe muss vermieden werden, da es zu einer Verstärkung der Immunantwort gegen das xenogene Transplantat kommen kann [68]. Des weiteren birgt jede Volumenerhöhung des zu transplantierenden Gewebes die Gefahr einer intravasalen Koagulation, wenn, wie bisher bevorzugt, die Langerhans-Inseln in die Pfortader injiziert werden [69]. Auch im Hinblick auf die Anreicherung porciner Langerhans-Inseln mittels Dichtegradienten-Zentrifugation existiert bisher kein

Standardverfahren, welches zuverlässige Ergebnisse hinsichtlich Reinheit und Ausbeute ermöglicht.

Im Anschluss an Isolierung und Reinigung ist der Nachweis der Vitalität des gewonnenen Gewebes *in vitro* zu fordern. Hier sind zwei Möglichkeiten zu nennen: die lichtmikroskopische Beurteilung mittels Vitalitätsfärbung [70] sowie die Messung der Insulinausschüttung im Kulturmedium nach Stimulation mit Glukose. Die Messung der Insulinausschüttung kann dabei sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Bedingungen [71] erfolgen. Im Gegensatz zu humanen Langerhans-Inseln [72, 73] liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben zur dynamischen Insulinausschüttung isolierter porziner Langerhans-Inseln vor [41, 42, 73-76]. Eine suffiziente *In-Vitro*-Funktion nach Glukosestimulation ist jedoch in jedem Fall zu fordern, bevor die isolierten Langerhans-Inseln *in vivo* auf Funktionalität getestet werden.

Insgesamt ist vor einer klinischen Transplantation porziner Langerhans-Inseln im Hinblick auf die Qualität des zu transplantierenden Gewebes Folgendes zu fordern: (1) Mittels Isolierung und anschließender Reinigung muss zunächst regelmässig und zuverlässig eine ausreichende Anzahl Langerhans-Inseln gewonnen werden, (2) die Langerhans-Inseln müssen einen hohen Reinheitsgrad aufweisen, (3) eine suffiziente Insulinausschüttung der gewonnenen Langerhans-Inseln nach Glukosestimulation *in vitro* muss gewährleistet sein, (4) eine Transplantation in diabetische Labortiere muss zu einer Normalisierung des Blutzuckers dieser Tiere führen, und (5) die Langerhans-Inseln sollten über einen längeren Zeitraum kultivierbar sein, um eine Immunmodulation des endokrinen Gewebes vor Transplantation zu ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich zunächst mit der enzymatischen Desintegration des porzinen Pankreas. Hierbei wurde insbesondere der Einfluss von Variablen des Spendertieres und des verwendeten Enzyms auf das Isolierungsergebnis untersucht. Des weiteren wurde ein neuer diskontinuierlicher Dichtegradient zur Reinigung der aus der Isolierung gewonnenen Gewebesuspension eingeführt. Dieser wurde hinsichtlich Ausbeute und Reinheit mit dem bereits für die porzine Inselisolierung etablierten kontinuierlichen Ficoll-Dichtegradienten [67] verglichen. Abschließend wurden Untersuchungen zur *In-Vitro*-Funktion der isolierten porzinen Langerhans-Inseln

durchgeführt; dabei wurde sowohl die dynamische Insulinausschüttung einzelner Inselpräparationen untersucht, als auch die Insulinausschüttung der isolierten Langerhans-Inseln in das Kulturmedium gemessen.

Offene Fragen:

1. Gibt es Rassen- bzw. Kreuzungs-spezifische Unterschiede in Bezug auf die Ergebnisse der porzinen Inselisolierung? Wie verändert sich dieses Ergebnis, wenn Spenderschweine unterschiedlichen Alters verwendet werden?
2. Zeigt Liberase PI – ein speziell für die porzine Inselisolierung entwickeltes Enzymgemisch – ähnliche chargenabhängige Aktivitätsschwankungen, wie sie für die bisher verwendeten Kollagenasen bekannt sind?
3. Unterscheiden sich junge und alte Spenderschweine hinsichtlich ihrer Pankreas-Morphologie? Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Erfolg der Inselisolierung und bestimmten morphologischen Gegebenheiten?
4. Gibt es Unterschiede hinsichtlich Reinheit und Ausbeute der Langerhans-Inseln nach Dichtegradienten-Zentrifugation, wenn Spenderschweine unterschiedlichen Alters verwendet werden?
5. Sind isolierte porzine Langerhans-Inseln ausreichend vital?
6. Zeigen isolierte porzine Langerhans-Inseln eine adäquate dynamische Insulinausschüttung in vitro? Gibt es Bedingungen, die die dynamische Insulinausschüttung in vitro beeinflussen?
7. Gibt es Substanzen, welche die Langzeit-Kultivierung isolierter porziner Langerhans-Inseln verbessern?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

In dieser Arbeit wurde die Zwergschweinrasse Göttinger Miniaturschwein (GMS), die reinrassige Hausschweinrasse Duroc (DU), Schweine aus der Kreuzung Deutsche Landrasse und Piétrain (DL x PI), sogenannte ausgemusterte Zuchtsauen (ZS) und Hybridschweine (HY) untersucht. Die ausgemusterten Zuchtsauen waren weibliche, 2-3 Jahre alte Schweine mit einem Gewicht von 200-300 kg, die zu 70% reinrassig (Deutsche Landrasse) und zu 30% Kreuzungen (entweder Deutsche Landrasse gekreuzt mit Deutschem Edelschwein oder Deutsche Landrasse gekreuzt mit Piétrain) waren. Die Hybridschweine waren weibliche, junge Tiere (4-6 Monate alt) mit einem Gewicht von 120-180 kg. Ihre Züchtung basierte auf Kreuzungen von mindestens vier verschiedenen Rassen. Die GMS waren Versuchstiere der Universität Würzburg, ihr mittleres Gewicht betrug 50 kg. DU und DL x PI waren 8-12 Monate alte Schweine und entsprachen in ihrem Gewicht den Hybridschweinen. Alle Schweine stammten von verschiedenen Züchtern des Würzburger Umlandes; die Pankreata, mit Ausnahme der GMS, wurden im Rahmen des Schlachtvorganges an verschiedenen Schlachthöfen der Würzburger Umgebung.

2.2 Isolierung porziner Langerhans-Inseln

Die Isolierung porziner Langerhans-Inseln wurde mit Hilfe der halb-automatischen Isolierungstechnik nach Ricordi [36], modifiziert nach Heiser [77] durchgeführt. Um die Langerhans-Inseln von exokrinem Gewebe zu unterscheiden, wurde mit Dithizon (Diphenylthiocarbazone, Firma Sigma, Deisenhofen, Cat.-No.: D-5130) gefärbt [78].

2.2.1 Präparation der Pankreata

Alle Pankreata (Ausnahme GMS) wurden im Rahmen des Schlachtvorganges entnommen. Dabei wurden die Tiere mittels Elektroschock betäubt und anschliessend durch einen Kehlschnitt getötet. Gemäß den Vorschriften der Europäischen Union wurden die Tiere durch ein 60°C warmes Wasserbad gezogen, mit einem Gasbrenner abgeflammt und enthaart. Anschliessend wurde der Schlachtkörper durch einen medianen Bauchschnitt eröffnet und neben anderen Organen der Magen-Darm-Trakt inklusive Milz und Pankreas entnommen. Dieses Darpaket wurde uns zur Entnahme

des Pankreas zur Verfügung gestellt. Die Milz wurde aufgesucht, um das unmittelbar dort anliegende Schwanzstück des Pankreas zu identifizieren, freizulegen und von umgebendem Fett- und Bindegewebe frei zu präparieren. Anschliessend wurde das Schwanzstück vom übrigen Pankreasgewebe abgetrennt. Des weiteren wurde ein Teil des Korpus entnommen; dieser Teil des Pankreas diente der immunhistochemischen Analyse. Die warme Ischämie betrug 15-30 Minuten. Bei den GMS (Versuchsgut für Tierzucht der Universität Göttingen, Dassel) handelte es sich um genehmigte Versuchstiere der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg. Die Organentnahme (s.o.) erfolgte im tierexperimentellen Operationssaal; die Schweine wurden intubiert und mit Lachgas/Sauerstoff (1:2) unter Zugabe des Narkosemittels Halothan beatmet. Zur Schmerzbekämpfung wurden 45 µl/kg Körpergewicht Tramal intravenös verabreicht. Unter diesen Umständen betrug die warme Ischämie maximal 2 Minuten. Das gewonnene Gewebe wurde in einer Plastiktüte, die entweder mit 300 ml steriler HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Cat.-No.: 3-02F00-I, Firma Cell Concept, Umkirch), welche mit 25 mM HEPES (HEPES Buffer, Cat.-No.: 5-31F00-H, Firma Cell Concept) versetzt war, oder mit 300 ml UW-Lösung (University of Wisconsin Solution, Firma ViaSpan, Cat.-No.: 54300-7, Dupont Pharma, Niederlande) gefüllt war, auf Eis gelagert und ins Labor transportiert. Die kalte Ischämie betrug 15-120 Minuten. Im Labor erfolgte die entgeltige Präparation des Organs unter sterilen Bedingungen. Das Pankreas wurde in eine Nierenschale gelegt und während des gesamten Präparationsvorganges auf Eis gelagert. Mesenteriales Fett, Bindegewebe, Gefäße und Lymphknoten wurden entfernt. Dann wurde der Ductus pancreaticus major mit einer 18-23G Braunüle kanüliert. Diese Kanüle diente später der Injektion der Enzymlösung (s.u.). Abschliessend wurde das Organ gewogen. Die verwendeten Organteile hatten je nach Rasse ein mittleres Gewicht zwischen 50 und 135 g.

2.2.2 Aufbau der Isolierungsapparatur

Die Verdaukammer bestand aus Edelstahl und enthielt zwei teflonbeschichtete Stahlkugeln. Vor dem Ausfluss der Kammer befand sich ein Stahlsieb mit einer Maschenweite von 0,54 mm. Zunächst wurden Schlauchsystem und Kammer steril aufgebaut, anschliessend wurde das Schlauchsystem mit steriler HBSS (enthielt 25 mM HEPES) bzw. UW-Lösung gefüllt und mit einer Pumpgeschwindigkeit von 85 U/min

(Ismatec MCP, Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mondfeld) durch das System gepumpt.

Der Desintegrationsvorgang gliederte sich in eine Rezirkulationsphase und eine Elutionsphase. Während der Rezirkulationsphase blieb das System geschlossen, so dass das Pankreas permanent von Enzymlösung umspült wurde. Die Temperatur wurde zwischen 32 °C und 37 °C mit Hilfe eines Thermostaten (Assistent WTE var 3185) konstant gehalten. Während der Elutionsphase, die sich unmittelbar an die Rezirkulationsphase anschloss, wurde der Desintegrationsvorgang durch Kühlung unterbrochen. Das System wurde geöffnet und das verdaute Gewebe in einem Sammelgefäß aufgefangen.

2.2.3 Pankreasdesintegration

Der Desintegrationsvorgang wurde eingeleitet, indem über den kanülierten Ductus pancreaticus major mit einer 50 ml Perfusorspritze 24 °C warme Enzymlösung injiziert wurde. Als Enzym diente Liberase PI Purified Enzyme Blend (Cat.-No. 1667122, Firma Roche Diagnostics, Mannheim), welche in HBSS bzw. UW gelöst und in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurde. Das Organ wurde durch das Injizieren der Enzymlösung „aufgeblasen“. Leckagen des Gangsystems wurden mit Klemmen abgedichtet. Anschliessend wurde die Braunüle entfernt. Nicht distendierte Organteile wurden abgeschnitten und gewogen. Das Organ wurde anschliessend in drei Teile zerschnitten und in die Verdaukammer gelegt. Die restliche Enzymlösung wurde ebenfalls in die Verdaukammer gefüllt, danach wurde die Kammer fest verschlossen. Die Temperatur wurde alle drei Minuten registriert. Um den Desintegrationsvorgang zu unterstützen, wurde die Verdaukammer zehnmal pro Minute manuell geschüttelt. Nach 21 Minuten wurde die erste Biopsie entnommen, weitere Biopsien folgten in zweiminütigem Abstand. Das Volumen einer Biopsie betrug 300 µl. Zur Identifizierung des endokrinen Gewebes wurden die Proben mit jeweils 300 µl Dithizon in einer Zellkulturplatte gefärbt (endokrines Gewebe rot, exokrines Gewebe ungefärbt) und lichtmikroskopisch beurteilt. Wenn die erste freie, d.h. ohne exokrines Gewebe behaftete, Langerhans-Insel sichtbar wurde, wurde die Rezirkulationsphase beendet und die Elutionsphase eingeleitet. Das System wurde mit 1500–4000 ml 4 °C kaltem Elutionsmedium (HBSS + 5% hitzeinaktiviertes FCS (Fetal Calf Serum, Firma JUK

Kraeber, Wedel, Cat.-No.: 00611190-1) + 25 mM Hepes) gespült, die Flussrate betrug 85 U/min. Während der Elutionsphase wurde die Verdaukammer kontinuierlich manuell geschüttelt. Das Eluat wurde in sterilen Plastikgefässen auf Eis gesammelt. Nach vollständigem Entleeren des Systems, wurde die Kammer geöffnet. Der Inhalt wurde über ein Edelstahlsieb (Maschenweite: 630 µm) gegossen, in einem 200 ml Erlenmeyerkolben gesammelt und die Kammer abschliessend mit ca. 40 ml Elutionsmedium gespült. Die aufgefangene Zellsuspension wurde ebenfalls in ein steriles Plastikgefäss gegeben und auf Eis gelagert. Nicht verdaute Organteile wurden gewogen. Danach wurde das Eluat zweimal bei 250 x g, 4 °C fünf Minuten zentrifugiert (Zentrifuge: Rotanta 46R, Firma Hettich, Tuttlingen). Abschliessend wurde das Gewebesediment mit UW-Lösung auf 200 ml resuspendiert und 60 Minuten auf Eis gelagert.

2.3 Anfertigung lichtmikroskopischer Präparate

2.3.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Das Gewebestück, welches für die Anfertigung histologischer Präparate entnommen wurde, wurde ebenfalls von Fett, Bindegewebe, Gefässen und Lymphknoten freipräpariert und anschliessend in Blöckchen von 0,5 x 0,5 x 0,5 cm zerteilt. Die Pankreasblöcke wurden mit Einfriermedium (Tissue Tek, Firma Sakura, Sakura Finetek, USA, Cat.-No.: 4583) in Einfrierröhrchen (Firma Brand GmbH, Wertheim, Cat.-No.: 61920) überführt, für 2 Minuten inkubiert und anschliessend in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C. Mit Hilfe eines Kryostaten (Frigocut-N-2800, Firma Reichert Jung, Firma Leica, Bensheim) wurden bei -20 °C 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt.

2.3.2 Immunhistochemie

Als Primäntikörper wurde ein polyklonaler schweine-spezifischer Antikörper gegen Insulin verwendet (Firma Fitzgerald (Vertrieb über Firma Natutec, Frankfurt), Cat.-No.: 20-IP35, Verdünnung 1:600). Die Immunfärbung erfolgte mit Hilfe des Biotin-Streptavidin-Amplifikations-Nachweissystems.

Zunächst wurden die Gefrierschnitte 10 Minuten in Azeton bei Raumtemperatur (RT) fixiert, anschliessend für 15 Minuten getrocknet. Nun erfolgte zunächst die Blockierung

der endogenen Peroxidase mit Hilfe eines Methanol-Wasserstoffperoxid-Gemisches (200 ml Methanol + 5 ml 30%iges H₂O₂ 30 Minuten bei RT), um mögliche spätere unspezifische DAB-Reaktionen auszuschliessen. Danach wurden die Schnitte dreimal mit PBS-Puffer, pH 7,6 auf dem Schüttelgerät gewaschen. Um mögliche unspezifische Antikörperreaktionen zu verhindern, wurden die Schnitte nun für 10 Minuten im Brutschrank mit einem Proteinblock (Normal-Goat-Serum, Firma Biogenex, San Ramon, CA 94583, USA; Vertrieb durch Dr. Sartori, Hamburg; Cat.-No.: HK 112-9K) inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit Hilfe eines hintergrundreduzierenden Antikörper-Verdünnungsmediums (Firma Dako, Hamburg, Cat.-No.: S 3022) verdünnt, auf die Gefrierschnitte aufgetragen und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Anschliessend wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS, pH 7,6 gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Multi-Link-Antikörper (Firma Biogenex, Cat.-No.: HK 340-9K) auf die Schnitte aufgetragen und 5 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (pH 7,6) wurde der „Tertiärantikörper“, ein Peroxidase-konjugierter Streptavidin Super-Sensitive-Label (Firma Biogenex, Cat.-No.: HK 330-9K) auf die Schnitte aufgetragen und für 5 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Schnitte wurden erneut dreimal mit PBS (pH 7,6) gewaschen. Als Färbesubstrat wurde in 200 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) und 34 µl 30%igem H₂O₂ gelöstes 3,3 Diaminobenzidin (DAB, Firma Boehringer, Ingelheim, Cat.-No.: 18865) verwendet, welches durch die enzymatische Wirkung der Peroxidase in einen bräunlichen Farbstoff umgewandelt wird. Die Inkubation erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle für ca. 3 Minuten. Dann wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest. gespült. Nun erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun (nach Mayer, Cat.-No.: 1.09249.0500, Firma Merck, Darmstadt). Nach „Bläuen“ der Schnitte mit Leitungswasser und Aqua dest. wurden diese mit Alkohol (4 x je 1 Minute aufsteigende Alkoholreihe) und anschliessend mit Xylol (2 x je 20 Minuten, Firma Merck, Cat.-No.: 1.08685.2500) entwässert. Die Einbettung erfolgte auf konventionelle Art mit dem Schnelleinbettmedium Pertex (Medita GmbH, Burgdorf).

2.4 Reinigung der Langerhans-Inseln

Die Trennung der Langerhans-Inseln von exokrinen Gewebeteilen (Reinigung) wurde mit drei unterschiedlichen Dichtegradienten durchgeführt: dem kontinuierlichen Ficoll-

Dichtegradienten (Euro-Collins, Firma Fresenius, Bad Homburg; Ficoll, Firma Sigma, Deisenhofen, Cat-No.: F 9378) im COBE 2991 Cell Processor (COBE Inc, Lakewood, Colorado, USA) und dem diskontinuierlichen OptiPrep-Dichtegradienten, der (a) manuell (in 50ml-Falcon-Röhrchen) und (b) im COBE 2991 Cell Processor durchgeführt wurde. Der COBE 2991 Cell Processor wird in der Transfusionsmedizin routinemäßig zur Trennung von Zellgemischen verwendet.

2.4.1 Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zunächst wurde ein steriles Schlauchsystem in den COBE Cell Processor eingelegt, welches mit einer Pumpe verbunden wurde. Für die Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden zwei Lösungen unterschiedlicher Dichte benötigt: Ficoll-Lösung high-density (HD) mit einer Dichte von 1,108 g/ml sowie Ficoll-Lösung low-density (LD) mit einer Dichte von 1,037 g/ml. 270 ml HD und 120 ml LD wurden in einen Gradientenbereiter gegeben, der auf einem Magnetprüher (IKA Combimag Ret., Firma Jahnke & Kunkel, Staufen) aufgebaut und ebenfalls mit der Pumpe verbunden war. In die ruhende Zentrifuge wurden 150 ml der HD-Lösung eingepumpt. Danach wurde der Magnetprüher eingeschaltet und der kontinuierliche Gradient in die bei 1200 U/min drehende Zentrifuge mit einer Pumpgeschwindigkeit von 30 ml/min eingepumpt, dann folgte das in UW-Lösung resuspendierte Pankreasgewebe. Das Schlauchsystem wurde mit 50 ml UW-Lösung gespült und abschliessend wurde fünf Minuten bei 1800-2000 U/min zentrifugiert. Danach wurden zunächst 150 ml als Abfall abgepumpt, es folgten zwölf Fraktionen von jeweils 30 ml, die in 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt wurden. Aus jedem Röhrchen wurden 300 µl entnommen und mit 300 µl Dithizon gefärbt. Röhrchen, in denen Langerhans-Inseln nachweisbar waren, wurden bei 250 x g, 4 °C fünf Minuten zentrifugiert, das Gewebesediment wurde mit dem Zellkulturmedium Ham's F12 (500 ml Ham's F12 (Firma Cell Concepts, Cat.-No.: 1-14F04-I) und jeweils 5 ml Penicillin-Streptomycin (Cat.-No.: 4-01F00-H), Amphotericin B (Cat.-No.: 4-05F00-H) und L-Glutamine (Cat.-No.: 5-10K00-H; Firma Bioconcept, Schweiz) sowie 5% inaktiviertes FCS zugesetzt) resuspendiert und in Zellkulturflaschen (Firma Greiner Labortechnik, Frickenhausen) überführt. Die Kultivierung der Langerhans-Inseln *in vitro* erfolgte im Brutschrank (Firma Zapf, Saalstedt) bei 24 °C, 5% CO₂ und 95% O₂.

2.4.2 OptiPrep-Dichtegradienten-Zentrifugation

Für die Reinigungen mittels OptiPrep wurden folgende Lösungen benötigt: doppelt konzentrierte UW-Lösung, Working Solution (WS) und Low Density Solution (LDS). Um die Working Solution herzustellen, wurde doppelt konzentrierte UW-Lösung mit der gleichen Menge OptiPrep (Firma Nycomed Pharma AS Diagnostics, Norwegen, Cat.-No.: 1030061) gemischt, die Dichte betrug 1,206 g/ml. Um LDS herzustellen, wurden 68,76 ml WS und 181,24 ml UW gemischt.

Die manuelle Reinigung mittels OptiPrep erfolgte in Anlehnung an das Protokoll der Arbeitsgruppe van der Burg et al [79]. Der aus der Isolierung gewonnene Gewebebrei wurde zwei Minuten bei 200 x g und 4 °C zentrifugiert, jeweils 10 ml Gewebesediment wurden anschliessend mit 110 ml UW resuspendiert. In ein 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 10 ml WS pipettiert, dann folgten 20 ml Gewebebrei. Nun wurde vorsichtig per Inversion gemischt. Das erhaltene Gemisch wurde zuerst mit 8 ml LDS, dann mit 10 ml UW überschichtet. Für 5 Minuten wurde bei 500 x g, 4 °C zentrifugiert. Die Langerhans-Inseln befanden sich in der zweiten Schicht von oben, das exokrine Gewebe sammelte sich in der unteren Schicht. Die Langerhans-Inseln wurden abpipettiert und mit UW gewaschen. Zur Bestimmung der Inselausbeute wurden Biopsien gewonnen und mit Dithizon gefärbt, abschliessend wurden die Langerhans-Inseln in Kultur gegeben (s.o.).

Für die Reinigung mittels OptiPrep im COBE 2991 Cell Processor wurde der aus der Isolierung gewonnene Gewebebrei bei 200 x g, 4 °C für 2 Minuten zentrifugiert. Das Gewebesediment wurde dann mit 220 ml UW resuspendiert. Anschliessend wurden 120 ml WS hinzugegeben, das Gemisch in den zuvor vorbereiteten (s.o.) COBE Cell Processor gepumpt und bei 1000 U/min zentrifugiert. Dann wurden 96 ml LD und 120 ml UW bei 50 U/min in die COBE gepumpt. Nach fünfminütiger Zentrifugation wurde das Gemisch abgepumpt. Dabei wurden die ersten 50 ml verworfen, die restliche Gewebesuspension wurde in Fraktionen von jeweils 30 ml in Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Röhrchen, in denen Langerhans-Inseln mittels Dithizonfärbung (s.o.) nachweisbar waren, wurden mit jeweils 30 ml UW aufgefüllt und bei 250 x g fünf Minuten zentrifugiert. Abschliessend wurden die Langerhans-Inseln in Kultur gegeben (s.o.).

2.5 Viabilität der Langerhans-Inseln

Um die Viabilität der isolierten Langerhans-Inseln zu prüfen, wurde eine Doppelfärbung mit Fluoreszeindiacetat (FDA, Cat.-No.: F7378, Firma Sigma, Deisenhofen) und Propidiumiodid (PI, Cat.-No.: P4170, Firma Sigma) durchgeführt [70, 77]. FDA ist ein esterase-spezifischer Farbstoff mit Grünfluoreszenz, der ausschliesslich viable Zellen färbt. PI färbt nur die Kerne toter Zellen mit einer Rotfluoreszenz. Es wurden 1,25 mM FDA und 9,0 mM PI in N,N-Dimethylformamid (Cat.-No.: D4254, Firma Sigma) gelöst und 1:100 mit HBSS (Cat.-No.: 14065-049, Firma Life Technologies, Schottland) verdünnt. Zehn Langerhans-Inseln wurden auf einem Objektträger mit dieser Lösung gefärbt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes beurteilt.

2.6 In-Vitro-Funktion von Langerhans-Inseln

Zur Analyse einer suffizienten In-Vitro-Funktion der isolierten porzinen Langerhans-Inseln wurde die halb-automatische Perifusion mittels Perifusionsgerät (Suprafusion System SF-06, Firma Brandel, U.S.A.) durchgeführt. Dabei wurden die Langerhans-Inseln mit Glukose-Lösungen (Glukose, Firma Merck, Darmstadt, Cat.-No.: 8342) unterschiedlicher Konzentration umspült, die Insulinausschüttung der Langerhans-Inseln in das Kulturmedium wurde anschliessend gemessen.

Die gewünschte Anzahl Langerhans-Inseln wurde in die dafür vorgesehene Kammer gefüllt. Zunächst wurde 40 Minuten mit HBSS bei einer Pumpgeschwindigkeit von 4 ml/min gespült, da sich die Langerhans-Inseln zuvor in Ham's F-12 Kulturmedium befanden, welches eine Glukosekonzentration von 180,2 mg/dl aufweist und somit eine Stimulation zur Insulinausschüttung während der Kulturdauer vorhanden war. Die Temperatur aller Spülmedien wurde auf 37 °C eingestellt. Nach 40 Minuten wurde niedrig konzentrierte Glukose-Lösung (50 mg Glukose pro dl HBSS) in das System gepumpt. Nach weiteren 40 Minuten wurde die Pumpgeschwindigkeit auf 2 ml/min eingestellt und die erste Probe genommen, weitere Proben folgten in zehnmütigem Abstand. Nach 80 Minuten erfolgte ein Mediumwechsel. Die Konzentration der Glukose-Lösung betrug nun 300 mg/dl. Es wurden zunächst zwei Proben nach jeweils 5 Minuten aufgefangen, dann vier Proben nach jeweils 2,5 Minuten. Nach 100 Minuten wurde erneut im zehnmütigen Abstand der Überstand aufgefangen. Nach 140 Minuten

wurde letztmalig das Medium gewechselt, die Langerhans-Inseln wurden mit niedrig konzentrierter Glukose-Lösung für weitere 60 Minuten umspült. Alle zehn Minuten wurden Proben aufgefangen. Von den gesammelten Proben wurden jeweils 500 µl in Eppendorfgläsern (Firma Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) bei -30 °C eingefroren, um den Insulingehalt mittels ELISA-Technik (s.u.) zu bestimmen.

2.7 Messdaten und ihre Auswertung

In dieser Arbeit wurden sowohl Parameter bestimmt, welche die Inselausbeute nach dem Desintegrationsvorgang und nach der Reinigung der Inselpräparationen betreffen, als auch Daten, die Aussagen über die Reinheit der Inselpräparationen und über die Insulinausschüttung der Langerhans-Inseln nach Glukosestimulation zulassen.

2.7.1 Berechnung der Inseläquivalente (IEQ/g Organ)

Die Zahl der gewonnenen Langerhans-Inseln nach Desintegration des porcinen Pankreas und nach Dichtegradienten-Zentrifugation wurde bestimmt, indem in einem Dreifach-Ansatz jeweils 100 µl der Inselsuspension mit 100 µl Dithizon in einer 24-Lochplatte gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet wurden. Nur Langerhans-Inseln mit einem Durchmesser ≥ 50 µm, die vollständig frei von exokrinem Gewebe waren, wurden gezählt. Um die Isolierungen unabhängig von der Grösse der gewonnenen Langerhans-Inseln vergleichen zu können, wurden die Inselzahlen in Inseläquivalente (IEQ) umgerechnet. Ein IEQ entspricht einer Langerhans-Insel mit einem Durchmesser von 150 µm [36].

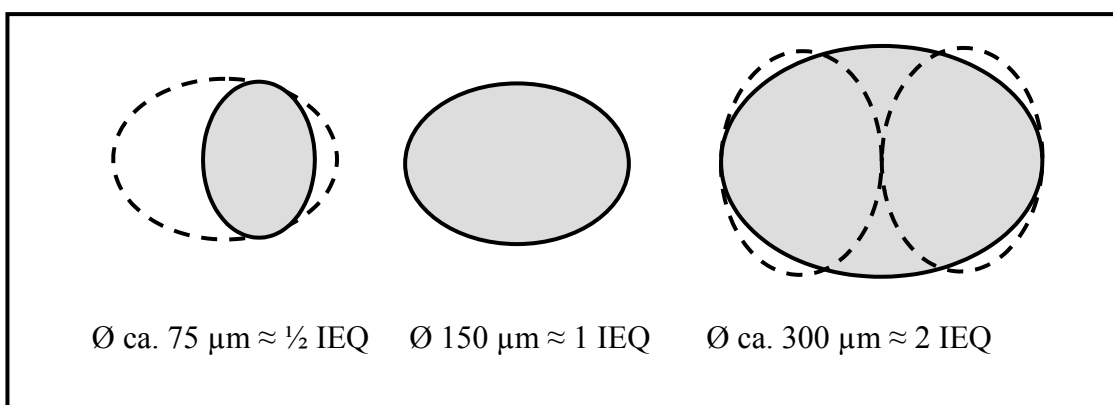


Abb. 1: Schematische Darstellung der Inseläquivalente anhand des lichtmikroskopisch ermittelten Durchmessers der Langerhans-Inseln.

Anhand ihres lichtmikroskopisch ermittelten Durchmessers wurden die Langerhans-Inseln einer der folgenden Gruppen zugeteilt: 50–99 µm, 100–149 µm, 150–199 µm, 200–249 µm, 250–299 µm, 300–349 µm und ≥ 350 µm. Zur Berechnung der IEQ wurde die Anzahl der Langerhans-Inseln jeder Durchmessergruppe mit dem entsprechenden Umrechnungsfaktor multipliziert (Tab. 1).

Tab. 1: Darstellung der Umrechnungsfaktoren für den jeweiligen Inseldurchmesser [36].

Durchmesser der Langerhans-Inseln [µm]	Umrechnungsfaktor
50–99	0,16
100–149	0,66
150–199	1,7
200–249	3,5
250–299	6,3
300–349	10,4
≥ 350	15,8

Anschliessend wurde mittels nachfolgender Formel die Gesamtzahl der aus der Isolierung bzw. Reinigung gewonnenen IEQ berechnet. Die errechnete Gesamtzahl wurde abschliessend durch das Organgewicht dividiert, so erhielt man die IEQ/g eingesetzten Organs, womit die Ergebnisse aus einzelnen Isolierungen vergleichbar sind.

$$\text{IEQ gesamt} = \frac{P_1 + P_2 + P_3}{V_p} \times V_g$$

Dabei entspricht

IEQ gesamt	Anzahl IEQ in der Präparation
$P_1 - P_3$	Zahl der IEQ in den Proben 1 bis 3
V_p	Volumen der Proben in ml
V_g	Volumen der Gewebesuspension in ml

2.7.2 Reinheit und Ausbeute der Langerhans-Inseln

Die Reinheit der Inselpräparationen nach Dichtegradienten-Zentrifugation bezeichnet den Anteil endokrinen Gewebes an der Gewebesuspension. Dabei wurde die Gewebesuspension nach Färbung mit Dithizon lichtmikroskopisch untersucht, der Anteil reiner Inseln wurde in Prozent ausgedrückt. Um die Ausbeute (Wiederfindungsrate) nach Dichtegradienten-Zentrifugation zu bestimmen, wurden die IEQ/g nach Desintegration mit den IEQ/g nach Reinigung verglichen, das Verhältnis in Prozent ausgedrückt.

2.7.3 Insulinbestimmung

Die Insulinmessung wurde mittels eines ELISA (INS-EASIA, Cat.-No.: 4012500, Firma Biosource, Europe S.A., Nivelles, Belgien) durchgeführt. Der ELISA ist gegen humanes Insulin gerichtet, eine Kreuzreaktivität von 100% mit porcinem Insulin ist nachgewiesen, eine Kreuzreaktivität mit humanem oder porcinem Proinsulin ausgeschlossen.

Die Absorption wurde bei zwei Wellenlängen (450 nm und 490 nm) gegen eine Referenzwellenlänge (650 nm) mit Hilfe eines Readers (Thermo Max Microplate Reader, Firma MWG Biotech, Ebersberg) gemessen. Mittels Computer Software (MikroWin Version 3.0, Mikrotek) wurde eine Standardkurve erstellt, die Insulinkonzentration der Proben an ihr ermittelt und in $\mu\text{U/ml}$ angegeben.

2.8 Fotodokumentation

Die fotografische Dokumentation der Daten wurde an einem Mikroskop (Axiovert 25, Firma Zeiss, Jena) mit einer Kamera des Typs Contax erstellt. Als Filmmaterial wurden Farbdiafilme der Firma Fujichrome (Professional 64T) verwendet. Der interne Vergrößerungsfaktor des Mikroskops betrug 2,5.

2.9 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) angegeben. Signifikanzen für verschiedene Ergebnisse wurden mit Hilfe des Student-t-Test für ungepaarte Stichproben geprüft. Ergebnisse waren statistisch signifikant, wenn sich für sie ein $p < 0,05$ ergab.

3 Ergebnisse

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse wurden im Zuge des Neuaufbaus der Isolierung porziner Langerhans-Inseln an der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg erarbeitet. Es galt, die porzinen Langerhans-Inseln zu isolieren, sie mittels Dichtegradienten zu reinigen und in vitro funktionell zu analysieren.

3.1 Isolierung porziner Langerhans-Inseln

3.1.1 Vergleich verschiedener Spenderschweine

Zwischen Oktober 1998 und Dezember 1999 wurden insgesamt 102 Isolierungen durchgeführt, davon 99 technisch erfolgreich aus dem Pankreas hirntoter Tiere folgender Rassen oder Kreuzungen: Göttinger Miniaturschwein (GMS; n=3), Duroc (DU; n=2), Deutsche Landrasse x Pietrain (DL x PI; n=4), Hybridschwein (HY, 4-6 Monate alt; n=65) und Zuchtsauen (ZS, 2-3 Jahre alt; n=25). Grundlage der Isolierung war die halbautomatische Isolierungstechnik nach C. Ricordi [34]. Sie ist ein publiziertes, weltweit vielfach angewandtes Verfahren, dessen Erfolg jedoch von einer Reihe örtlicher Parameter bestimmt wird, so z.B. den vor Ort verfügbaren porzinen Pankreasspendern, der technischen Ausstattung des Labors und dem biotechnologischen „know-how“ der für die Isolierungen verantwortlichen Mitarbeiter. Das Ergebnis der 99 technisch einwandfreien Isolierungen ist in Abb. 2 dargestellt und zeigt die Zahl freier Inseläquivalente pro Gramm eingesetzten Organs (IEQ/g Organ). Der besseren Übersicht halber wurde diese Darstellung nach Rassen/Kreuzungen und nicht nach fortlaufender Isolierungsnummer geordnet. Danach zeigten GMS unbefriedigende Isolierungsergebnisse mit 112 ± 41 IEQ/g Organ. Gute Ergebnisse wurden mit DL x PI (2.366 ± 2.348) und HY (2.868 ± 2.081) erzielt, sehr gute Ergebnisse mit DU (4.391 ± 1.888) und ZS (4.806 ± 3.526). Die Abbildung zeigt eindrucksvoll die starken Ergebnisschwankungen innerhalb der einzelnen Rassen/Kreuzungen, wobei in Einzelfällen weit überdurchschnittliche Ergebnisse von >10.000 IEQ erzielt wurden. Alle Zahlenangaben beziehen sich zunächst auf freie, intakte Inseln im Gewebeprei unmittelbar nach enzymatischer Desintegration des intakten Pankreas. Diese wurden dann im weiteren Versuchsablauf angereichert bzw. gereinigt (s.u.).

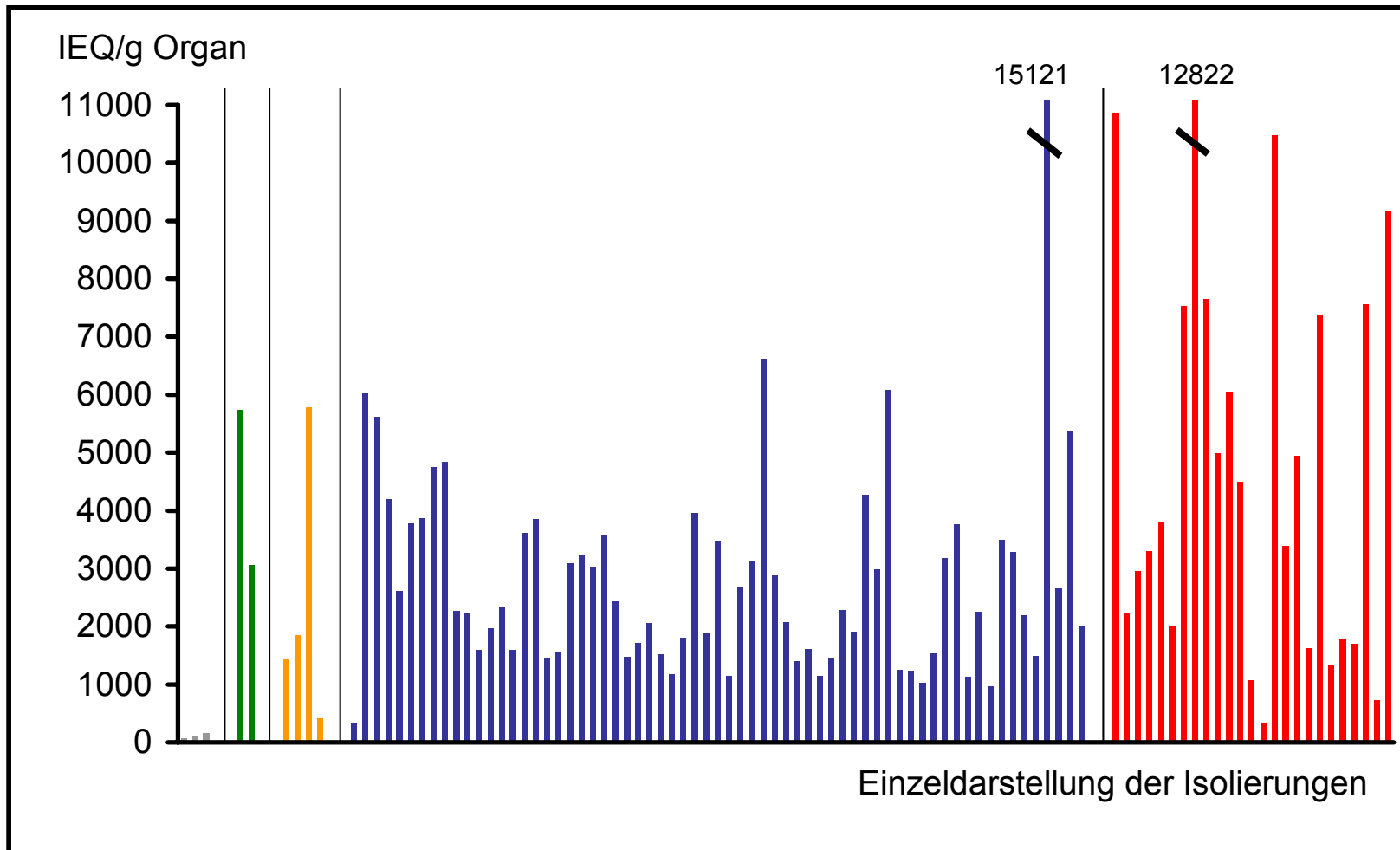


Abb. 2: Das Ergebnis der 99 Isolierungen, sortiert nach Rassen/Kreuzungen und dargestellt als Anzahl freier Inseläquivalente pro Gramm eingesetzten Organs im Gewebeprei nach enzymatischer Digestion des intakten Pankreas; GMS (n=3) ■ , DU (n=2) ■ , DLxPI (n=4) ■ , HY (n=65) ■ , ZS (n=25) ■ .

3.1.2 Vergleich junger und alter Spenderschweine

In Abb. 2 deutete sich bereits an, dass ältere Spenderschweine (ZS) insgesamt bessere Isolierungsergebnisse liefern als jüngere (HY), ein Befund, der bereits bei früheren Isolierungen an der Universität Kiel erhoben [54, 55] und auch in der Literatur wiederholt beschrieben wurde [80, 81]. Um dieser Frage im Zuge des Neuaufbaus der Isolierung an der Universität Würzburg nachzugehen, wurden die Isolierungsergebnisse aus jungen Hybridschweinen (n=65) mit jenen aus alten Zuchtsauen (n=25) verglichen und separat dargestellt (Abb. 3). Danach liegt das Isolierungsergebnis aus alten Zuchtsauen mit 4.806 ± 3.526 IEQ/g Organ signifikant ($p < 0,002$) über jenem aus jungen Hybridschweinen (2.868 ± 2.081).

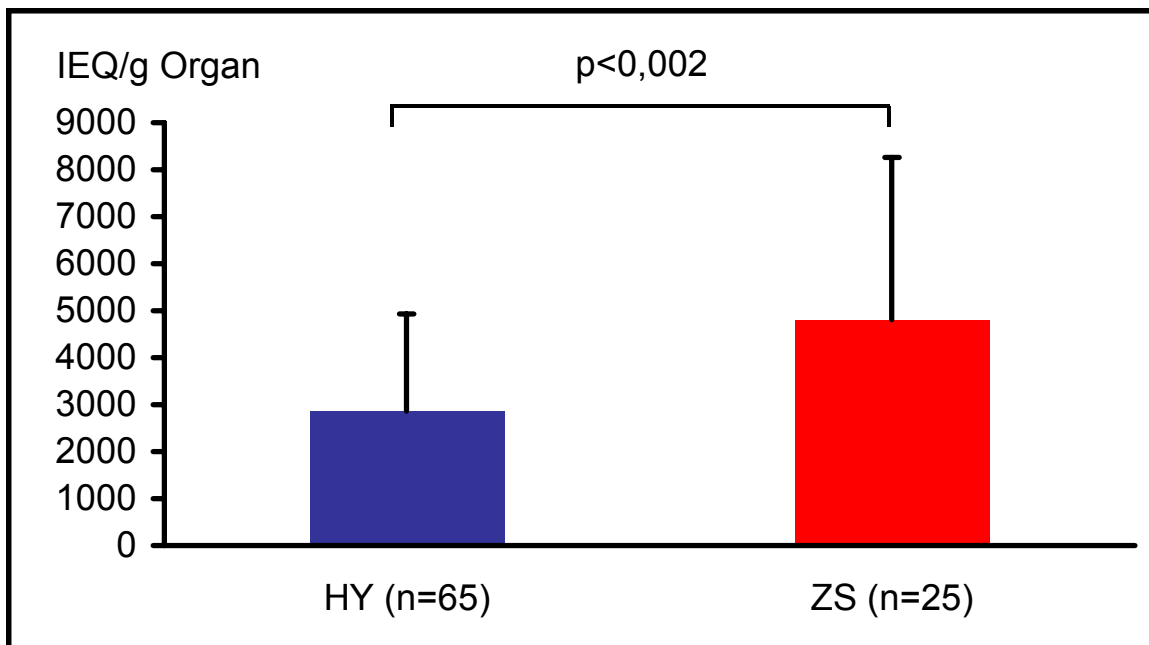


Abb. 3: Vergleich der Isolierungsergebnisse aus jungen Hybridschweinen (HY) und alten Zuchtsauen (ZS), dargestellt als Anzahl freier Inseläquivalente pro Gramm eingesetzten Organs.

Beurteilt man die Isolierungsergebnisse nach unbefriedigenden (< 1.000 IEQ/g Organ), guten (1.000-4.000) und sehr guten (> 4.000) Ergebnissen, dann zeigt sich folgendes Bild (Abb. 4 und 5): Der Prozentsatz unbefriedigender Ergebnisse aus jungen und alten Spenderschweinen ist mit 4% und 8% nahezu identisch. Der Prozentsatz guter Ergebnisse liegt mit 81% aus jungen Spenderschweinen deutlich über jenem aus alten Spenderschweinen (44%). Der Prozentsatz sehr guter Ergebnisse hingegen übertrifft mit 48% für alte Spenderschweine deutlich die 15% für junge Spenderschweine. Mit anderen Worten, aus jungen Spenderschweinen werden mit 81%iger Häufigkeit

Ergebnisse zwischen 1.000 und 4.000 IEQ/g Organ erzielt, aus alten Spenderschweinen mit 44%iger Häufigkeit Ergebnisse von 1.000-4.000 IEQ/g Organ, aber mit 48%iger Häufigkeit Ergebnisse von >4.000 IEQ/g Organ; das heisst, hier liefert nahezu jede zweite Isolierung ein sehr gutes Ergebnis.

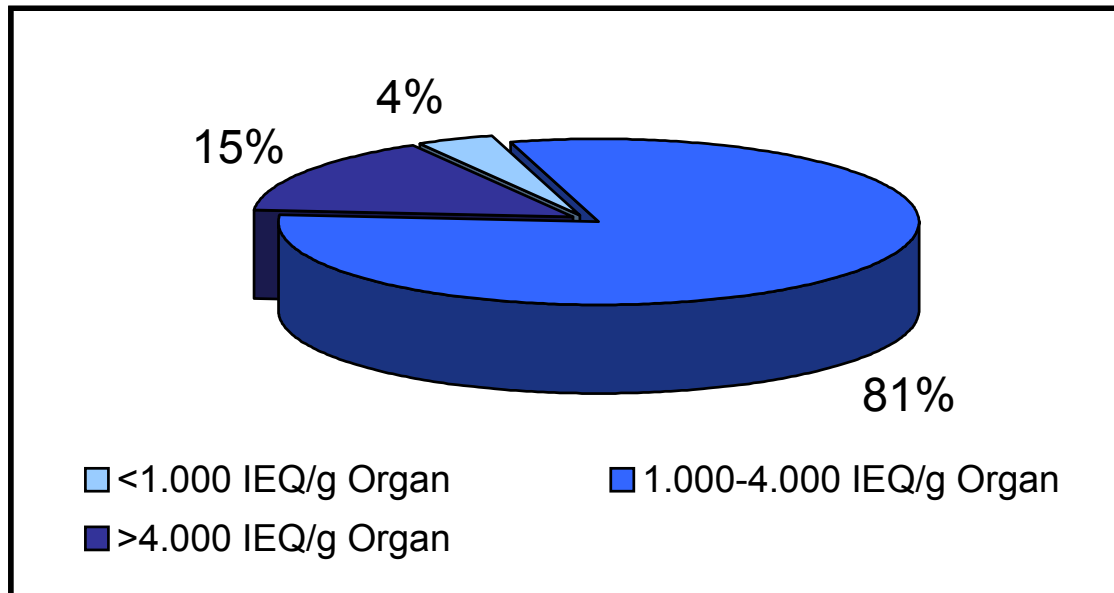


Abb. 4: Häufigkeit der Isolierungen aus jungen Hybridschweinen (n=65) mit unbefriedigenden (<1.000 IEQ/g), guten (1.000–4.000 IEQ/g) und sehr guten (>4.000 IEQ/g) Ergebnissen.

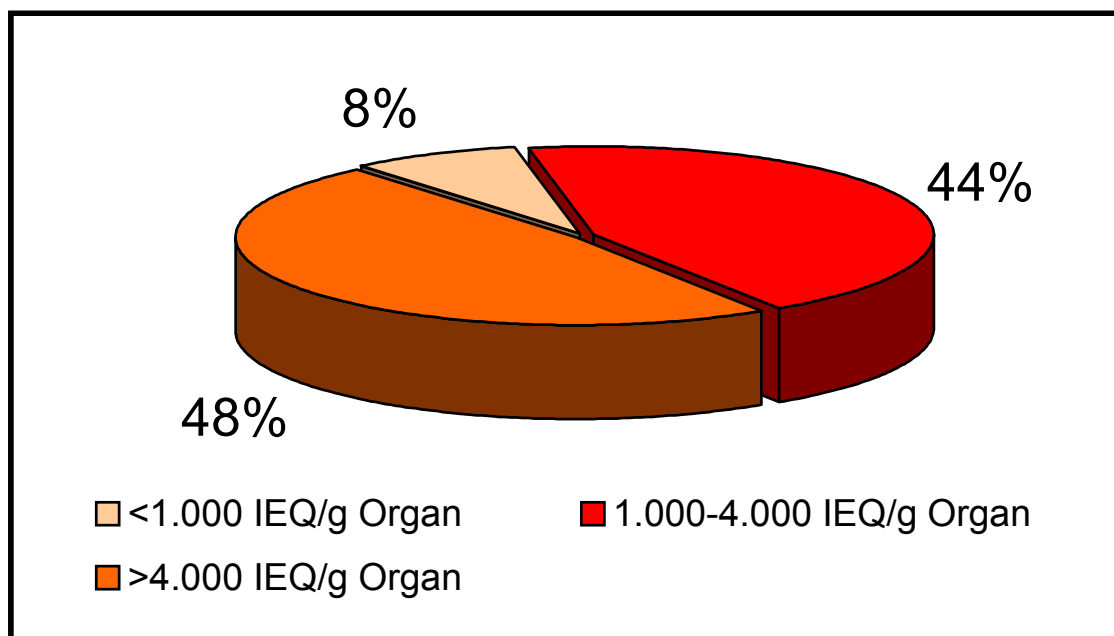


Abb. 5: Häufigkeit der Isolierungen aus alten Zuchtsauen (n=25) mit unbefriedigenden (<1.000 IEQ/g), guten (1.000–4.000 IEQ/g) und sehr guten (>4.000 IEQ/g) Ergebnissen.

3.1.3 Einfluss der Liberase PI auf das Isolierungsergebnis

Für alle Isolierungen wurde Liberase PI, ein speziell für die Isolierung porziner Langerhans-Inseln entwickeltes Enzymgemisch unbekannter Zusammensetzung, verwendet. Im Vergleich zu anderen handelsüblichen Kollagenasen soll Liberase PI, laut Angaben der Firma Roche Diagnostics, keine Qualitäts- bzw. Aktivitätsschwankungen zeigen. Wäre dies dennoch der Fall, müssten Qualitätsunterschiede – gemäss jahrzehntelanger Erfahrungen mit Kollagenasen in Klein- und Grosstieren [38, 61, 66] – das Isolierungsergebnis beeinflussen. Für die 65 Isolierungen aus jungen Hybridschweinen und 25 Isolierungen aus alten Zuchtsauen wurden insgesamt 4 unterschiedliche Liberase PI-Chargen verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 als Zahl freier Inseläquivalente pro Gramm eingesetzten Organs dargestellt.

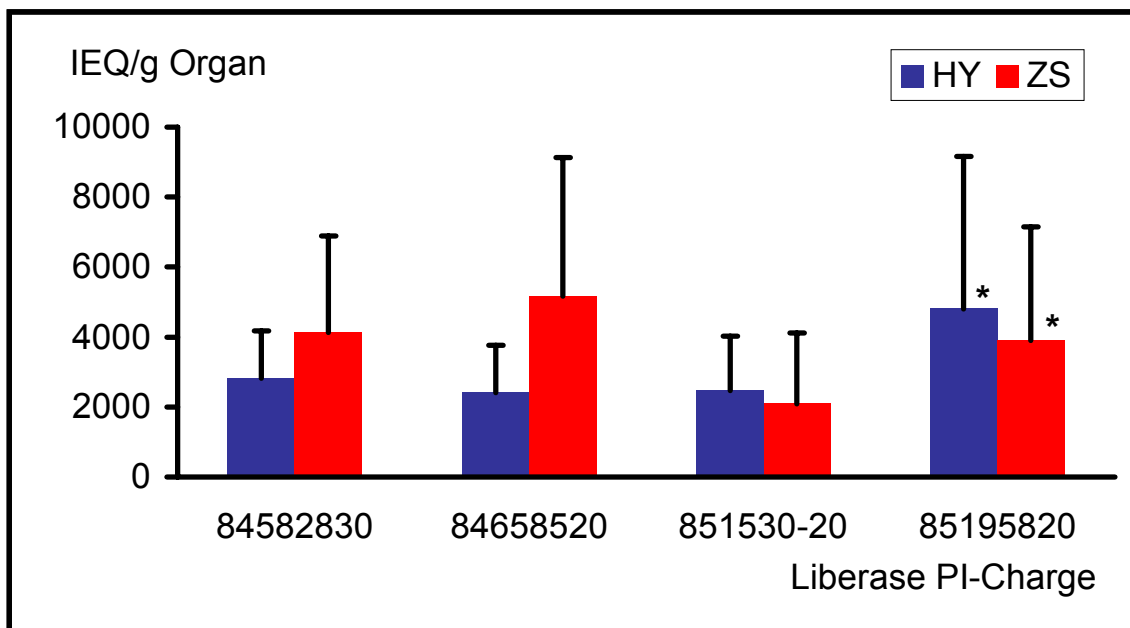


Abb. 6: Vergleich der Isolierungsergebnisse mit vier unterschiedlichen Liberase PI-Chargen. Die Ergebnisse der Isolierungen aus HY (n=31, n=14, n=12 und n=7) und ZS (n=9, n=7, n=3 und n=8) werden getrennt dargestellt. Die Enzymkonzentration betrug bei den ersten drei Chargen für HY bzw. ZS pro Gramm eingesetzten Organs 0,7 bzw. 0,5 mg. Bei der letzten Charge (*) musste annähernd die doppelte Menge (1,4 bzw. 1,1 mg/g) eingesetzt werden.

Der Vergleich der vier Liberase PI-Chargen zeigte erhebliche Schwankungen der Isolierungsergebnisse sowohl bei jungen Hybridschweinen als auch bei alten Zuchtsauen. Betrachtet man zunächst die Isolierungsergebnisse aus HY, so unterschieden sich die ersten drei Chargen kaum hinsichtlich der Isolierungsergebnisse

(2.822 ± 1.357 bzw. 2.406 ± 1.365 bzw. 2.473 ± 1.549 IEQ/g Organ), mit der vierten Charge wurden jedoch deutlich bessere Ergebnisse erzielt (4.801 ± 4.363 IEQ/g). Allerdings musste bei dieser Charge (85195820) die Enzymkonzentration verdoppelt werden (statt der sonst üblichen 0,7 mg Liberase PI pro Gramm Organ wurden hier 1,4 mg verwendet), um überhaupt eine erfolgreiche Isolierung durchführen zu können. Wurden hier die sonst üblichen 0,7 mg Enzymmenge verwendet, die bei den ersten drei Chargen ausreichend war, schlugen die Isolierungen komplett fehl; in den die Isolierung begleitenden Biopsaten waren keine freien Inseln sichtbar und der Desintegrationsvorgang musste abgebrochen werden. Die Qualität der vierten Liberase PI-Charge lag somit deutlich unter jener der drei ersten Chargen.

Noch deutlichere Ergebnisschwankungen wurden bei Isolierungen aus ZS beobachtet. Hier wurden die besten Ergebnisse mit der Charge 84658520 erzielt (5.164 ± 3.972 IEQ/g), die schlechtesten mit der Charge 851530-20 (2.089 ± 2.020 IEQ/g). Die Ergebnisse der ersten und der vierten Charge unterschieden sich kaum voneinander (4.124 ± 2.769 versus 3.907 ± 3.248 IEQ/g). Analog zu den Isolierungen aus HY musste auch bei ZS die Enzymmenge bei der vierten Liberase PI-Charge mehr als verdoppelt werden, um erfolgreich zu isolieren (statt der hier üblichen 0,5 mg Liberase PI pro Gramm Organ wurden 1,1 mg verwendet). Die Ergebnisse der Isolierungen aus ZS zeigen somit, dass die Liberase PI-Chargen drei und vier hier von deutlich schlechterer Qualität waren als die Chargen eins und zwei. Im Gegensatz zu den Angaben der Firma Roche Diagnostics waren somit deutliche, das Isolierungsergebnis beeinflussende, Qualitäts- bzw. Aktivitätsschwankungen innerhalb der vier Liberase PI-Chargen erkennbar. Diese Qualitätsunterschiede wirkten sich besonders dann aus, wenn Pankreata alter Spenderschweine für die Isolierung verwendet wurden.

3.1.4 Vergleich der Morphologie des Pankreas von jungen und alten Spenderschweinen

Es stellte sich zwangsläufig die Frage nach den Ursachen für die insgesamt besseren Isolierungsergebnisse aus alten (ZS) im Vergleich zu jungen (HY) Spenderschweinen. Schweine werden mit ca. 6 Monaten geschlechtsreif und werden in diesem Alter bereits für die Nahrungsproduktion verwendet, gelten aber als noch nicht ausgewachsen. Man darf daher annehmen, dass zu diesem Zeitpunkt auch das Pankreas noch nicht voll

ausgereift ist. Danach müsste das Pankreas junger (6 Monate) und alter Spenderschweine (2-3 Jahre) sichtbare morphologische Unterschiede aufweisen. Zum Zeitpunkt der hiesigen Experimente lagen jedoch noch keine vergleichenden morphologischen Analysen vor, obwohl viele Arbeitsgruppen aus logistischen Gründen auf 6-7 Monate alte Tiere, die der Nahrungsproduktion dienen, zurückgreifen [45-47]. In der nun folgenden Untersuchung wurde das Pankreas junger und alter Spenderschweine, das im Zuge des Schlachtprozesses für Isolierungen gewonnen wurde, mittels anti-Insulinfärbung retrospektiv charakterisiert. Untersuchungskriterium war die Größe der Langerhans-Inseln (Durchmesser) im histologischen Präparat (Gefrierschnitt). Langerhans-Inseln wurden als „klein“ bezeichnet, wenn sie Durchmesser von 50 bis 200 μm aufwiesen, während jene mit Durchmessern $>200 \mu\text{m}$ als „gross“ bezeichnet wurden. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 und Tab. 2 dargestellt.

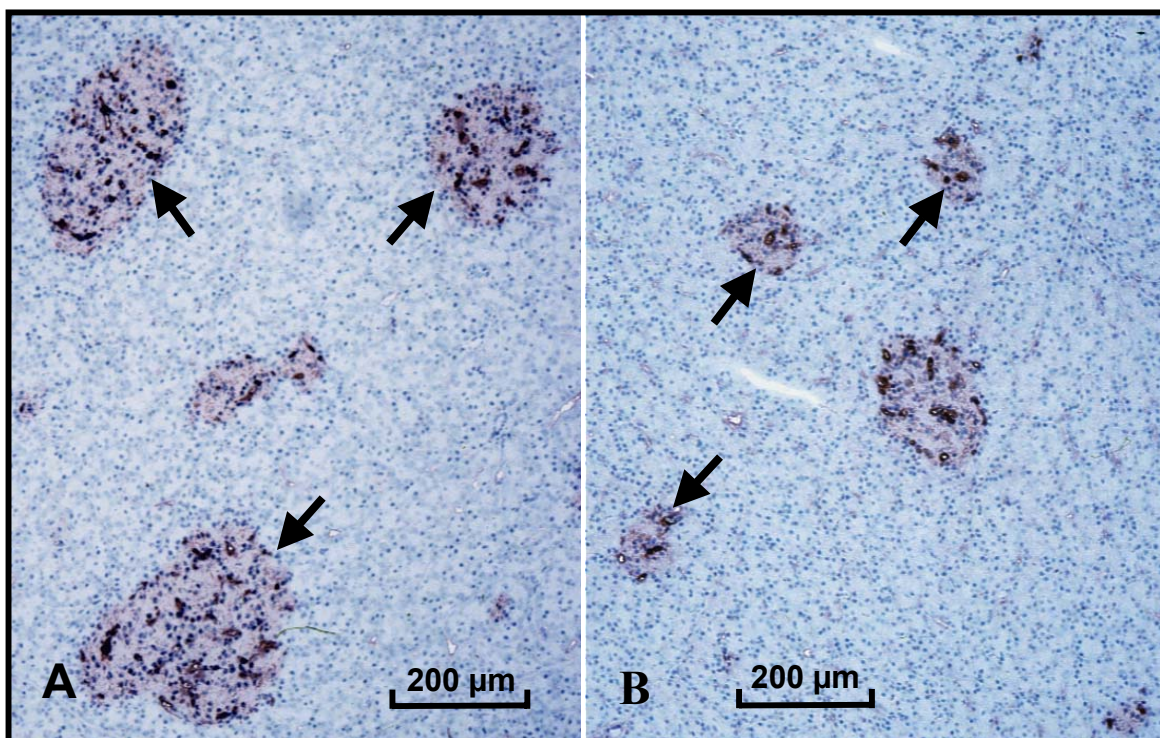


Abb. 7: Retrospektive immunhistochemische Analyse des porzinen Pankreas mit anti-Insulin Antikörper in Abhängigkeit vom untersuchten Spenderschwein; A: überwiegend grosse Langerhans-Inseln (Durchmesser $>200 \mu\text{m}$) im Pankreas einer alten Zuchtsau; B: überwiegend kleine Langerhans-Inseln (Durchmesser 50-200 μm) im Pankreas eines jungen Hybridschweines; Pfeile weisen auf die Langerhans-Inseln; Vergrößerung 100x.

Es zeigte sich, dass von 42 jungen HY lediglich 15 Pankreata (36%) überwiegend grosse Inseln aufwiesen, während 27 (64%) überwiegend kleine Inseln zeigten. Bei ZS zeigte sich ein gegensätzliches Bild: Von 30 ZS wiesen 25 Pankreata (83%) überwiegend grosse Inseln auf, während nur 5 (17%) überwiegend kleine Inseln zeigten. Danach zeigten die Pankreata von ZS in der Histologie sehr viel häufiger grosse Langerhans-Inseln als die Pankreata von HY.

Tab. 2: Nachweis grosser und kleiner Langerhans-Inseln in jungen (HY) und alten (ZS) Spenderschweinen. Vergleichende retrospektive immunhistochemische Analyse jener intakten porzinen Spenderpankreatata, die zur Isolierung verwendet wurden (anti-Insulin-Färbung auf Gefrierschnitten). Diese Analyse beinhaltet u.a. Spenderpankreatata, die zwischen Januar und April 2000 für Isolierungen gewonnen wurden.

Spenderschwein	HY (n=42)		ZS (n=30)	
	Anzahl der Pankreata	%	Anzahl der Pankreata	%
Überwiegend grosse Langerhans-Inseln Durchmesser >200 µm	15/42	36	25/30	83
Überwiegend kleine Langerhans-Inseln Durchmesser 50-200 µm	27/42	64	5/30	17

Von besonderem Interesse war, ob dieser morphologische Unterschied auch nach enzymatischer Desintegration des porzinen Pankreas nachweisbar ist. Dazu wurde der Durchmesser der isolierten Langerhans-Inseln unmittelbar nach enzymatischer Desintegration des intakten Pankreas lichtmikroskopisch beurteilt (Abb. 8). Hier zeigte sich auf den ersten Blick ein anderes Bild: Von der Gesamtzahl der isolierten Langerhans-Inseln (100%) wiesen $87 \pm 8\%$ aus HY (n=40) einen Durchmesser

zwischen 50 und 200 μm auf; bei ZS (n=28) waren dies $77 \pm 17\%$. Lediglich $13 \pm 8\%$ aller Langerhans-Inseln aus HY zeigten einen Durchmesser $>200 \mu\text{m}$, bei ZS waren dies immerhin $23 \pm 17\%$. Trotz der unerwarteten Ähnlichkeit ist der Unterschied zwischen HY und ZS bezüglich kleiner und grosser Langerhans-Inseln signifikant ($p < 0,0003$ versus $p < 0,0003$). Mit anderen Worten, aus den Pankreata von ZS wurden signifikant mehr Langerhans-Inseln mit einem Durchmesser von $>200 \mu\text{m}$ isoliert als aus den Pankreata von HY.

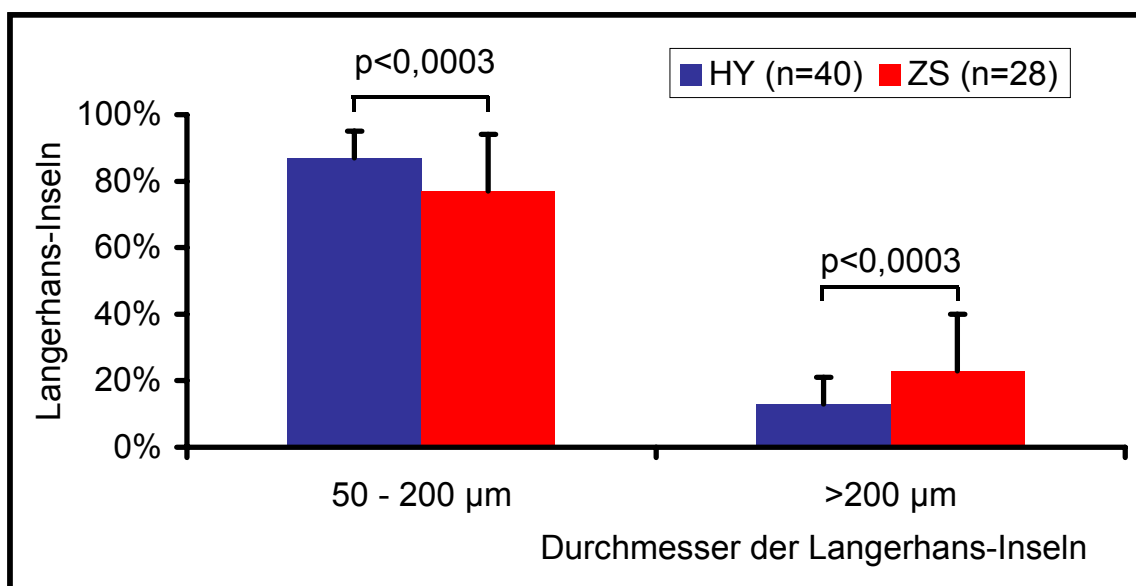


Abb. 8: Prozentualer Anteil kleiner (50–200 μm Ø) und grosser ($>200 \mu\text{m}$ Ø) Langerhans-Inseln nach enzymatischer Desintegration des intakten Pankreas junger (HY) und alter (ZS) Spenderschweine.

Im Anschluss an die Untersuchungen zur Morphologie des porzinen Pankreas stellte sich nun die Frage nach dem Zusammenhang der dargestellten morphologischen Unterschiede mit den Isolierungsergebnissen. Mit anderen Worten, sind bestimmte morphologische Gegebenheiten mit einem bestimmten Isolierungsergebnis assoziiert und lassen sich durch der enzymatischen Desintegration vorranginge histologische Untersuchungen im Sinne einer „Schnellschnittdiagnostik“ Voraussagen über den Erfolg einer Inselisolierung an diesem Organ treffen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die Isolierungen retrospektiv analysiert. Das Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung eines Pankreas („grosse“ versus „kleine“ Langerhans-Inseln) wurde dem entsprechenden Ergebnis der Inselisolierung aus diesem

Organ (IEQ/g Organ) zugeordnet. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 9 in Abhängigkeit vom Alter der Spenderschweine dargestellt. Es zeigte sich, dass Isolierungen aus Pankreata von HY, die in der immunhistochemischen Analyse hauptsächlich kleine Langerhans-Inseln zeigten (n=26) ein Isolierungsergebnis von 2.060 ± 961 IEQ/g Organ aufwiesen. Aus HY, deren immunhistochemische Analyse hauptsächlich grosse Langerhans-Inseln zeigte (n=14), wurden mit 3.720 ± 3.440 signifikant bessere Isolierungsergebnisse erzielt ($p < 0,04$). Bei ZS zeigte sich ein ähnliches Bild: Wurden Pankreata verwendet, deren immunhistochemische Analyse hauptsächlich grosse Langerhans-Inseln zeigte (n=23), konnten signifikant bessere Isolierungsergebnisse erzielt werden, als aus Pankreata, deren immunhistochemische Analyse hauptsächlich kleine Langerhans-Inseln zeigte (n=5) (5.379 ± 3.366 versus 1.353 ± 954 IEQ/g; $p < 0,02$). Bei vergleichbaren morphologischen Gegebenheiten waren demnach keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Isolierungsergebnisse aus HY und ZS erkennbar.

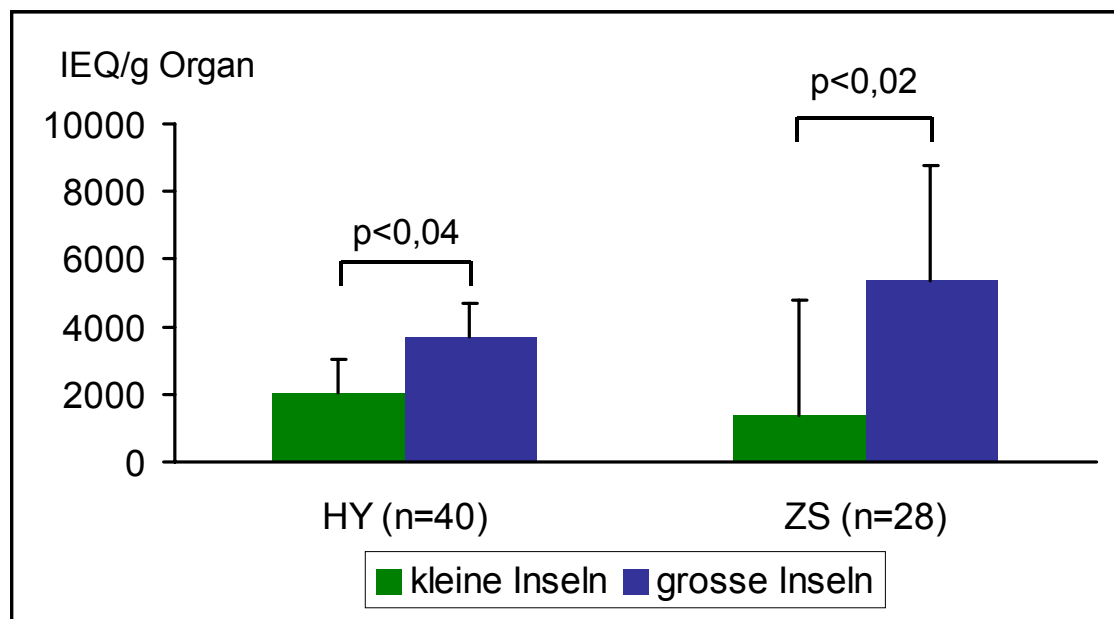


Abb. 9: Retrospektive Analyse der Isolierungsergebnisse aus HY und ZS in Korrelation zur Grösse der Langerhans-Inseln im histologischen Präparat (vergleiche dazu Abb. 7 und Tab. 2).

3.2 Reinigung porciner Langerhans-Inseln mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

An den Desintegrationsvorgang, die Isolierung, schloss sich die Anreicherung des endokrinen Gewebes mittels Dichtegradienten-Zentrifugation an. Der Erfolg dieses Verfahrens wird damit begründet, dass endokrines Gewebe eine niedrigere Dichte als exokrines Gewebe aufweist. Da eine Verunreinigung der zu transplantierenden Inseln mit exokrinem Gewebe zu einer Verstärkung der Immunantwort gegen das xenogene Transplantat führt [68], ist eine höchstmögliche Reinheit der Inselpräparation vor Transplantation anzustreben. Des Weiteren führt jede Erhöhung des zu transplantierenden Volumens zu einer Erhöhung der Gefahr einer intravasalen Koagulation, wenn die Langerhans-Inseln in die Pfortader injiziert werden [69]. Der prozentuale Anteil des endokrinen Gewebes im Pankreas beträgt natürlicherweise ca. 1-2% [82]; nach der Reinigung im Dichtegradienten sollte er im Idealfall 100% betragen (Abb. 10).

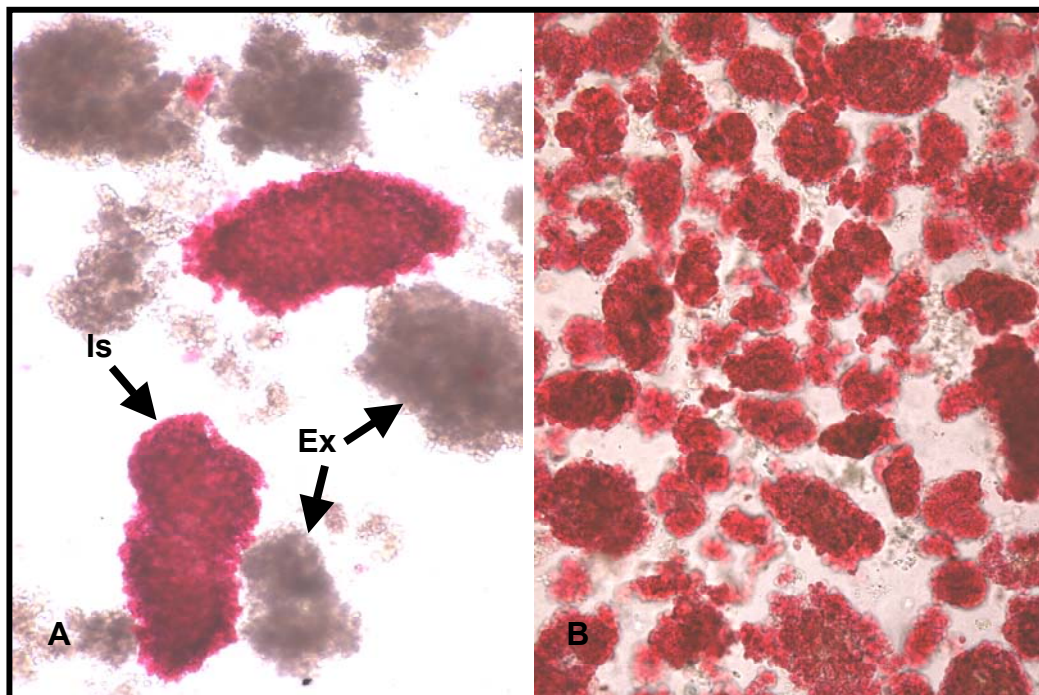


Abb. 10: Isolierte porcine Langerhans-Inseln nach Dithizon-Färbung. A: Inselpräparation vor Reinigung; Is = Langerhans-Insel, Ex = exokrines Gewebe; Vergrößerung 300x; B: Inselpräparation nach Reinigung mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (Reinheit >95%); Vergrößerung 100x.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Dichtegradienten hinsichtlich Reinheit und Ausbeute miteinander verglichen: der schon aus der Literatur bekannte und in der porzinen Inselisolierung am häufigsten angewandte kontinuierliche Ficoll-Dichtegradient [67] und der erstmals für die Reinigung porziner Inseln verwendete diskontinuierliche OptiPrep-Dichtegradient in zwei Varianten. Der Ficoll-Dichtegradient wurde ausschliesslich im COBE Cell Processor eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein Gerät, welches in der Transfusionsmedizin zur Trennung von Zellgemischen und auch in anderen Laboratorien für die Reinigung von Inselpräparationen verwendet wird. Der OptiPrep-Dichtegradient wurde zunächst manuell (d.h. in 50 ml Zentrifugenröhrchen) in Anlehnung an das von der Arbeitsgruppe van der Burg et al [79] beschriebene Protokoll durchgeführt, bevor auch dieser hier erstmalig mit dem COBE Cell Processor betrieben wurde.

3.2.1 Reinheit nach Dichtegradienten-Zentrifugation

Zunächst wurden die drei Dichtegradienten hinsichtlich der Reinheit der Inselpräparationen miteinander verglichen. Dabei wurde der prozentuale Anteil des endokrinen Gewebes an der angereicherten Zellsuspension lichtmikroskopisch beurteilt. Die Ergebnisse für junge (HY) und alte (ZS) Spenderschweine sind in Abb. 11 getrennt dargestellt. Nach Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation betrug die Reinheit der Langerhans-Inseln aus HY (n=28) $62 \pm 12\%$. Mittels OptiPrep-Dichtegradienten-Zentrifugation wurden sowohl mit dem manuellen Verfahren (n=6) als auch bei Verwendung des COBE Cell Processors (n=11) signifikant bessere Reinheiten für HY erzielt ($81 \pm 12\%$ bzw. $86 \pm 7\%$). Für ZS zeigte sich ein ähnliches Bild: Wurde mittels Ficoll-Dichtegradient gereinigt (n=5), betrug die Reinheit der Langerhans-Inseln $73 \pm 17\%$. Mit dem manuellen OptiPrep-Dichtegradienten (n=5) wurde eine Reinheit von $77 \pm 17\%$ erzielt, im COBE Cell Processor (n=7) $83 \pm 16\%$. Im Gegensatz zu HY sind die Reinigungsergebnisse für ZS (Ficoll vs. OptiPrep manuell vs. OptiPrep COBE) nicht signifikant verschieden.

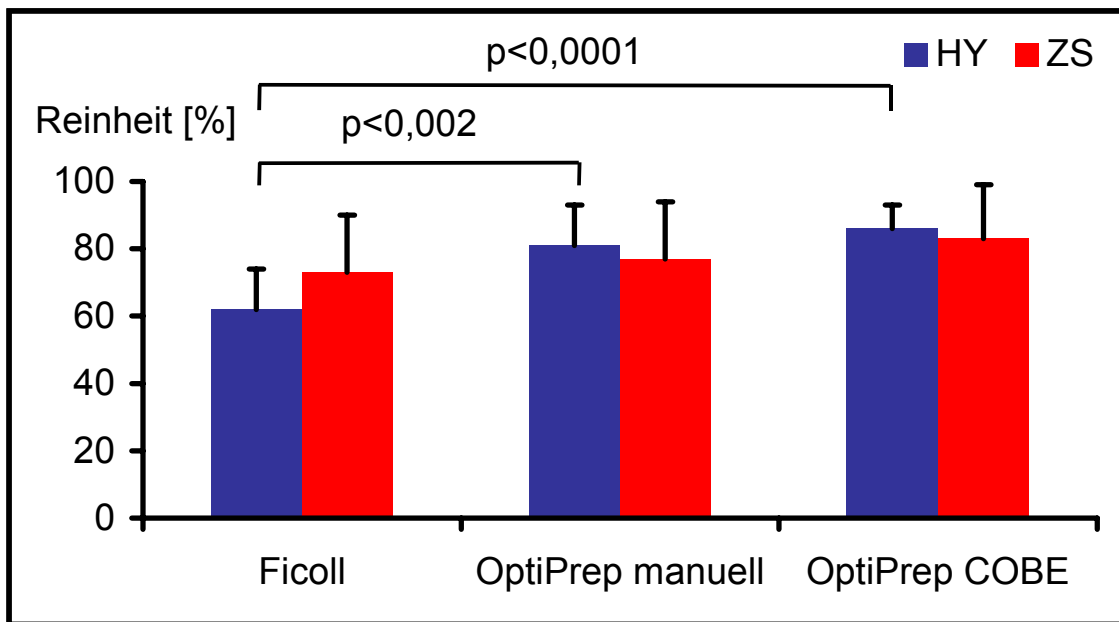


Abb. 11: Anreicherung (Reinheit) des endokrinen Gewebes (%) nach enzymatischer Desintegration des Pankreasgewebes mit drei unterschiedlichen Verfahren der Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Ergebnisse sind für junge (HY: n=28, n=6, n=11) und alte (ZS: n=5, n=5, n=7) Spenderschweine getrennt dargestellt.

Aus Abb. 11 lassen sich jedoch keine Aussagen über die Streubreite der Ergebnisse hinsichtlich der Reinheit nach Dichtegradienten-Zentrifugation treffen, ein Gesichtspunkt, der für die Beurteilung eines Verfahrens im Hinblick auf seine Zuverlässigkeit jedoch entscheidend ist. Daher wurden im folgenden die drei Verfahren zur Dichtegradienten-Zentrifugation hinsichtlich unbefriedigender (0-50%), befriedigender (51-75%) und sehr guter (76-100%) Reinheiten beurteilt (Abb. 12). Für HY zeigte sich, dass, wenn mit Ficoll gereinigt wurde, 40% der Versuche Reinheiten zwischen 0 und 50% ergaben, während dies bei keinem der Versuche mittels OptiPrep der Fall war. Der höchste Anteil von Versuchen mit sehr guter Reinheit wurde mittels OptiPrep COBE erzielt (82%), mit OptiPrep manuell waren dies 67%, mit Ficoll lediglich 13%. Für ZS war der prozentuale Anteil von Versuchen, die in einer unbefriedigenden Reinheit resultierten, für Ficoll und OptiPrep manuell mit 20% gleich. Die Wahrscheinlichkeit, eine sehr gute Reinheit zu erreichen, war am grössten, wenn mittels OptiPrep manuell gereinigt wurde (80%), mit OptiPrep COBE waren es 71%, mit Ficoll lediglich 60%.

Somit ist sowohl für HY als auch für ZS eine Anreicherung des endokrinen Gewebes auf 76-100% mit allen drei Verfahren zur Dichtegradienten-Zentrifugation möglich. Die Wahrscheinlichkeit, eine sehr gute Reinheit zu erzielen, ist jedoch für HY und ZS dann am geringsten, wenn mittels Ficoll gereinigt wird.

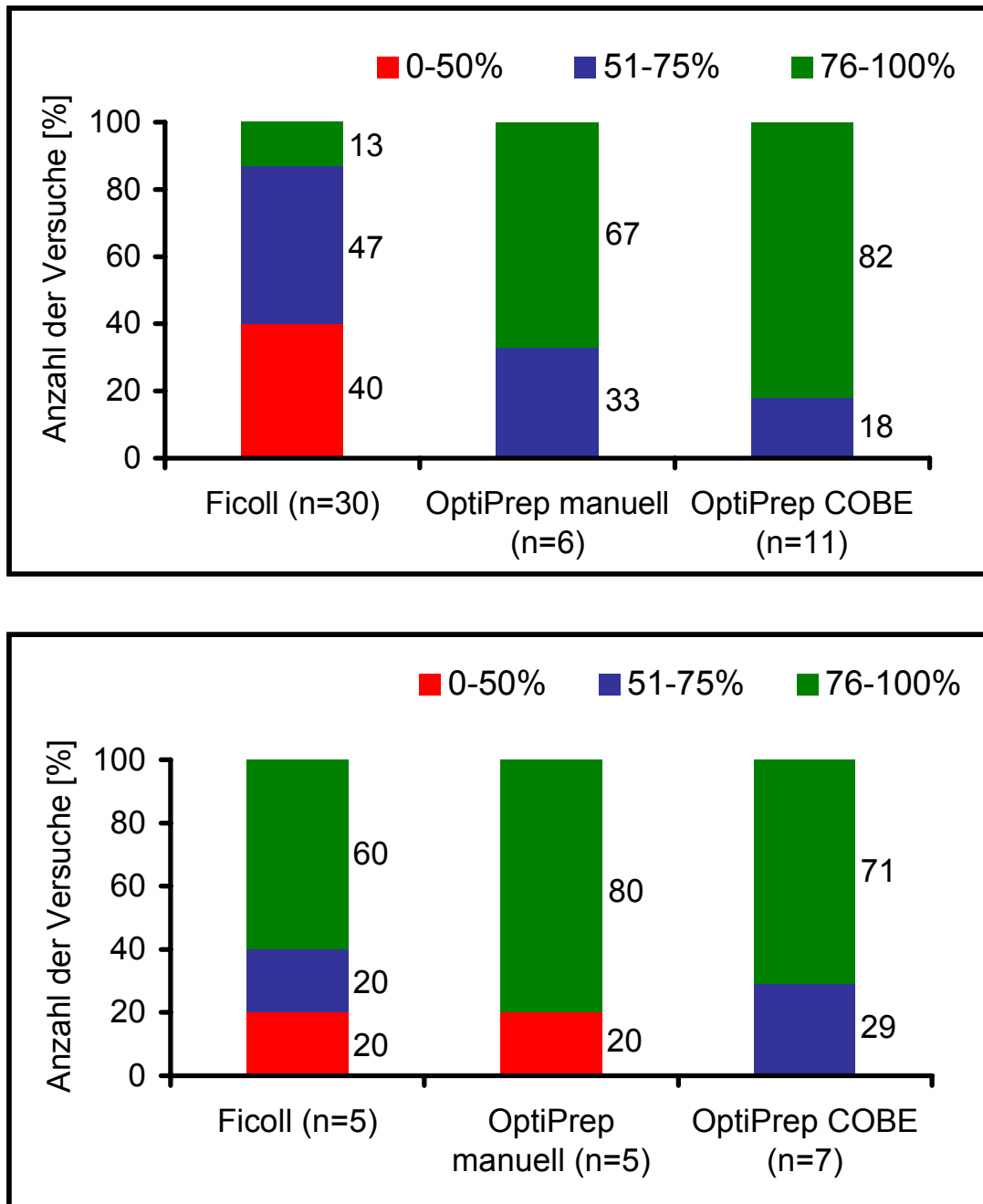


Abb. 12: Beurteilung der Verfahren zur Dichtegradienten-Zentrifugation bezüglich unbefriedigender (0-50%), befriedigender (51-75%) und sehr guter (76-100%) Reinheit. Die obere Grafik zeigt die Ergebnisse für junge (HY), die untere für alte (ZS) Spenderschweine.

3.2.2 Ausbeute nach Dichtegradienten-Zentrifugation

Neben der Reinheit ist die Ausbeute der Langerhans-Inseln nach Dichtegradienten-Zentrifugation (Abb. 13) ein weiteres wichtiges Kriterium für die spätere Transplantation. Dabei sollten die Zellverluste nach Reinigung möglichst gering ausfallen, um eine Ausbeute von 100% anzustreben. Aus HY (n=30, 2 Fehlversuche) wurden mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation 871 ± 686 gereinigte IEQ/g Organ (insgesamt 71.823 ± 55.310 IEQ) wiedergefunden. Ähnliche Werte wurden erreicht, wenn zur Reinigung der manuelle OptiPrep-Dichtegradient (n=6) angewandt wurde: 890 ± 455 IEQ/g (insgesamt 36.389 ± 18.825 IEQ). Die Ausbeute betrug damit $36 \pm 32\%$ nach Ficoll- und $36 \pm 14\%$ nach manueller OptiPrep-Dichtegradienten-Zentrifugation. Wurde die Reinigung mittels OptiPrep-Dichtegradient im COBE Cell Processor durchgeführt, konnten aus n=11 HY 1.336 ± 1.206 IEQ/g (73.535 ± 63.359 IEQ) wiedergefunden werden, was einer Ausbeute von $47 \pm 30\%$ entspricht. Auch wenn die Ausbeute für HY nach OptiPrep/COBE Cell Processor am grössten war, konnten hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Reinigungsverfahren nachgewiesen werden.

Ein ähnliches Ergebnis wurde für ZS erzielt. Mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation (n=5) wurden 1.736 ± 1.432 IEQ/g Organ (gesamt 146.724 ± 125.114 IEQ) wiedergefunden; dies entspricht einer Ausbeute von $48 \pm 51\%$. Diese Ergebnisse unterschieden sich kaum von jenen, die mittels OptiPrep-Dichtegradient erzielt wurden. Mit dem manuellen OptiPrep-Dichtegradienten wurden aus n=5 ZS 2.217 ± 1.498 IEQ/g (insgesamt 125.954 ± 114.589 IEQ) wiedergefunden. Das entspricht einer Ausbeute von $47 \pm 16\%$. Bei Verwendung des COBE Cell Processors (n=7), wurden 1.475 ± 1.312 IEQ/g (insgesamt 106.214 ± 82.269 IEQ) wiedergefunden; dies entspricht einer Ausbeute von $46 \pm 14\%$. Auch für die ZS liessen sich hinsichtlich der Ausbeute (Wiederfindungsrate) keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Reinigungsverfahren feststellen.

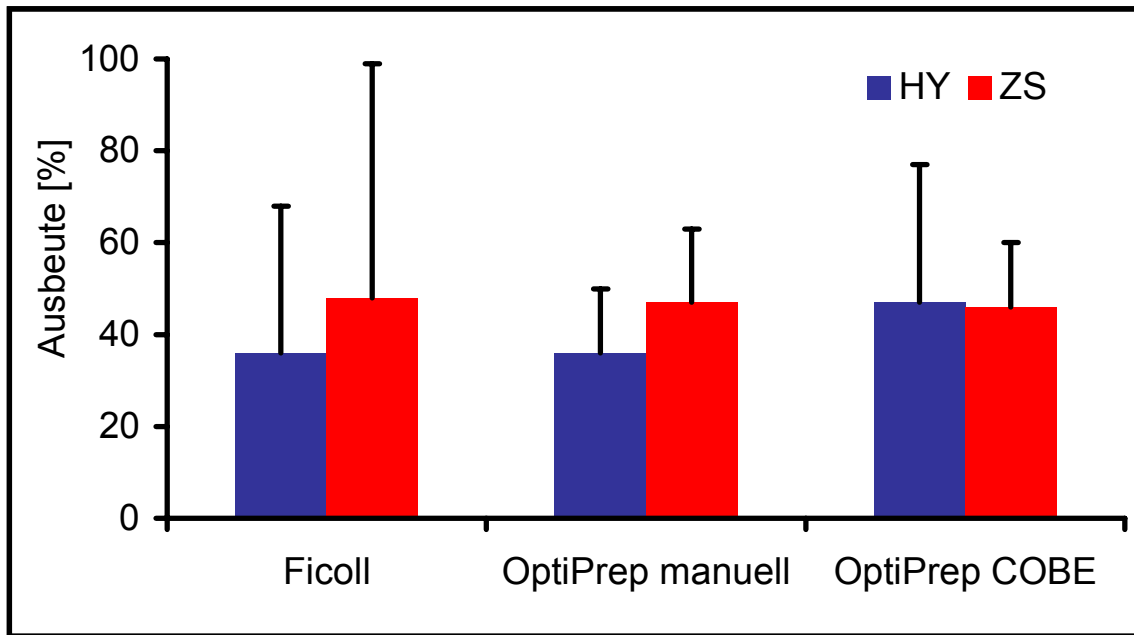


Abb. 13: Vergleich der Ausbeute von Langerhans-Inseln nach drei unterschiedlichen Verfahren der Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Ergebnisse sind für junge (HY: n=28, n=6, n=11) und alte (ZS: n=5, n=5, n=7) Spenderschweine getrennt dargestellt.

Da die Menge der zu transplantierenden Langerhans-Inseln für die spätere klinische Anwendung von entscheidender Bedeutung ist, stellte sich die Frage, ob in Einzelfällen mit den drei dargestellten Verfahren sehr gute Ausbeuten (>75%) erreicht wurden. Dazu wurden die Reinigungsergebnisse bezüglich unbefriedigender (0-25%), befriedigender (26-50%), guter (51-75%) und sehr guter (76-100%) Ausbeuten bewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 für HY und ZS getrennt dargestellt. Für HY zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit, eine unbefriedigende Ausbeute zu erzielen, am grössten war, wenn mittels Ficoll gereinigt wurde (50%), mittels OptiPrep waren dies nur 17 (manuell) bzw. 27% (COBE). Die Wahrscheinlichkeit, ein gutes bzw. sehr gutes Ergebnis zu erzielen, war dann am grössten, wenn mittels OptiPrep COBE (27 bzw. 19%) gereinigt wurde. Für ZS zeigte sich ein etwas anderes Bild: Eine unbefriedigende Ausbeute wurde nur mittels Ficoll erzielt (60%). Wurde mit OptiPrep gereinigt, resultierten keine Versuche in einer unbefriedigenden Ausbeute, es konnten jedoch auch keine sehr guten Ergebnisse erzielt werden, bei Ficoll waren dies immerhin 20%.

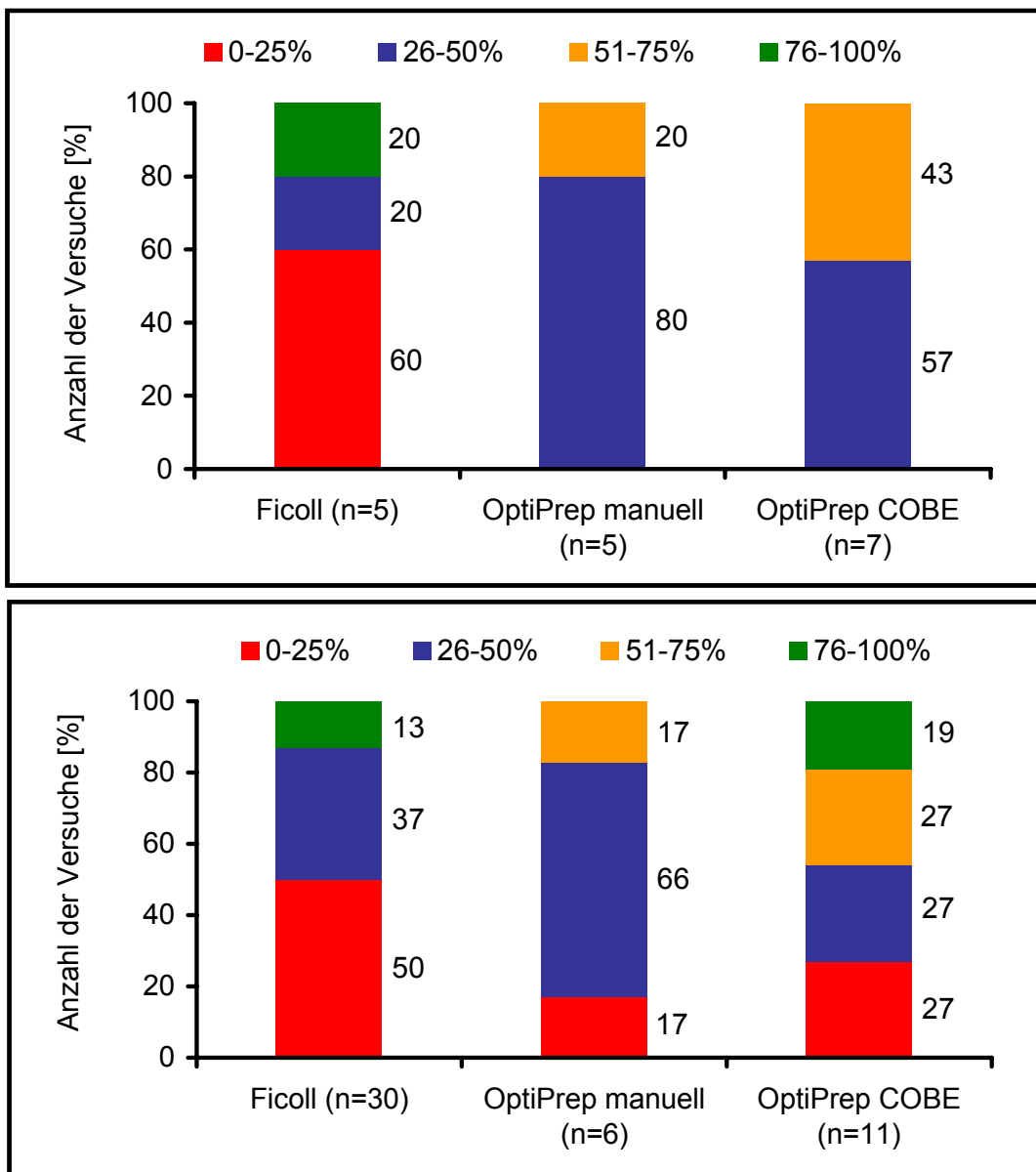


Abb. 14: Beurteilung der Verfahren zur Dichtegradienten-Zentrifugation bezüglich unbefriedigender (0-25%), befriedigender (26-50%), guter (51-75%) und sehr guter (76-100%) Ausbeute. Die obere Grafik zeigt die Ergebnisse für junge (HY), die untere für alte (ZS) Spenderschweine.

Betrachtet man das Gesamtergebnis für HY und ZS, so ist festzustellen, dass die Ausbeute (Wiederfindungsrate) nach Reinigung im Dichtegradienten für beide Spendertiere (HY und ZS) im Mittel lediglich im Bereich von 36% und 48% liegt; mit anderen Worten die Zellverluste nach Reinigung belaufen sich mit den o.g. Verfahren auf Werte zwischen 64% und 52%. Es sind jedoch vereinzelt sehr gute Ausbeuten möglich – bei HY mittels Ficoll und OptiPrep COBE, bei ZS nur mittels Ficoll.

3.3 Viabilität isolierter porziner Langerhans-Inseln

Die Viabilität der porzinen Langerhans-Inseln nach enzymatischer Desintegration und Reinigung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurde regelmässig untersucht. Dazu wurden die Langerhans-Inseln mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoreszeindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) gefärbt und fluoreszenz-mikroskopisch bewertet. Abb. 15 A zeigt sowohl das durchlichtmikroskopische als auch das fluoreszenzmikroskopische Bild einer vitalen isolierten porzinen Langerhans-Insel, während in Abb. 15 B die entsprechenden Abbildungen einer nicht vitalen isolierten porzinen Langerhans-Insel dargestellt sind.

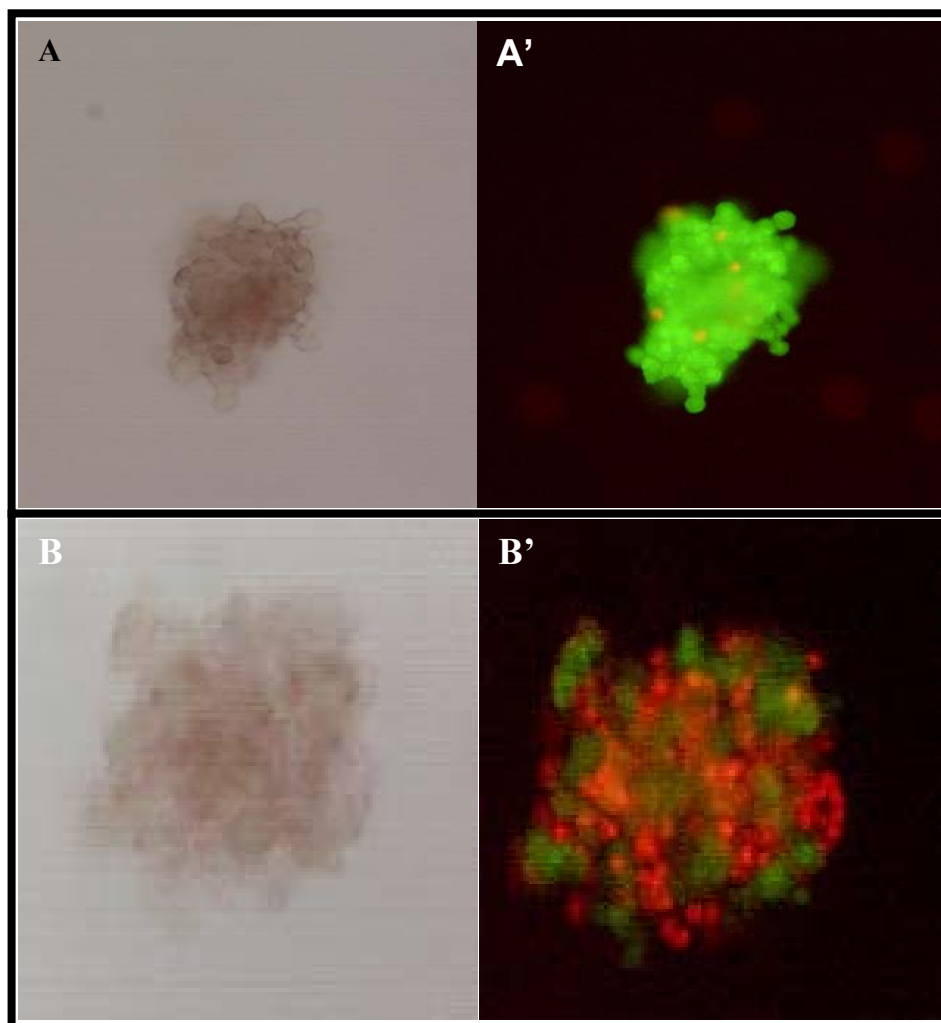


Abb. 15: Nachweis der Vitalität isolierter porziner Langerhans-Inseln mittels Färbung mit FDA und PI. A': grünfluoreszierende und damit vitale Langerhans-Insel; B': hauptsächlich rotfluoreszierende und damit nicht vitale Zellen; A und B zeigen das durchlichtmikroskopische Bild der entsprechenden Langerhans-Inseln; die partielle Unschärfe der Abbildungen ist darauf zurückzuführen, dass es sich hierbei um Andruckpräparate der dreidimensionalen Langerhans-Inseln handelt und nicht um Schnittpräparate; Vergrößerung 300x.

3.4 In-Vitro-Funktion isolierter porziner Langerhans-Inseln

Die suffiziente In-Vitro-Funktion der isolierten porzinen Langerhans-Inseln ist Vorbedingung für eine erfolgreiche Xenotransplantation. In der Literatur finden sich zu diesem Thema jedoch widersprüchliche, z.T. unvollständige Angaben [41, 42, 73-76]. In dieser Arbeit wurde die dynamische Insulinausschüttung der isolierten porzinen Langerhans-Inseln nach Glukosestimulation mittels Perifusion untersucht. Dabei wurden die Langerhans-Inseln kontinuierlich mit Medium umspült, welches unterschiedliche Glukosekonzentrationen aufwies. Während der ersten 80 Minuten betrug die Glukosekonzentration 50 mg/dl, dann erfolgte über 60 Minuten die Stimulation mit 300 mg/dl Glukose, abschliessend wurde 60 Minuten erneut mit 50 mg/dl gespült. Der Insulingehalt im Medium wurde mittels ELISA bestimmt und als $\mu\text{U}/\text{ml}$ pro Insel berechnet.

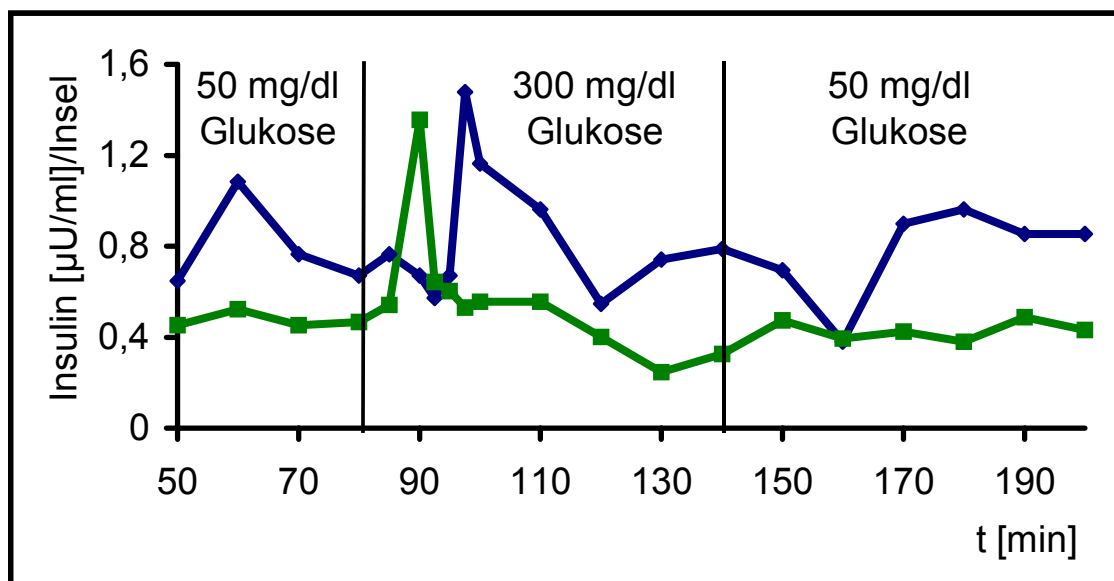


Abb. 16: Dynamische Insulinausschüttung porziner Langerhans-Inseln in vitro. Dargestellt ist der Insulingehalt im Medium nach Glukosestimulation in $\mu\text{U}/\text{ml}$ pro Insel; es wurden Langerhans-Inseln aus zwei unterschiedlichen Isolierungen eingesetzt.

Abb. 16 zeigt beispielhaft die dynamische Insulinausschüttung von zwei unterschiedlichen Inselpräparationen. Nach Stimulation mit hochkonzentrierter Glukoselösung ist ein $2\frac{1}{2}$ -facher Anstieg des Insulingehaltes im Vergleich zur basalen Sekretion sichtbar. Nach erneutem Abfall der Glukosekonzentration erreichte der Insulingehalt im Medium wieder das basale Sekretionsniveau. Isolierte porzine

Langerhans-Inseln reagieren somit *in vitro* auf eine Glukosestimulation mit einem adäquaten Anstieg ihrer Insulinausschüttung.

Im Folgenden sollte der Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die dynamische Insulinausschüttung *in vitro* untersucht werden. Zunächst wurde der Einfluss der in der Perifusion eingesetzten Inselzahl untersucht, weitere Variablen stellten die Dauer der In-Vitro-Kultur sowie die Kulturtemperatur vor Perifusion dar.

3.4.1 Einfluss der Inselzahl auf die dynamische Insulinausschüttung

Es stellte sich zunächst die Frage nach dem Einfluss der in der Perifusion eingesetzten Inselzahl auf die dynamische Insulinausschüttung *in vitro*. Dazu wurden jeweils 5, 10 und 20 Langerhans-Inseln aus der gleichen Inselpräparation unter dem Mikroskop handverlesen und in der Perifusion getrennt untersucht. Das Volumen der Kammer, in der die Langerhans-Inseln dem jeweiligen Medium ausgesetzt waren, betrug 500 μ l. Abb. 17 zeigt beispielhaft das Ergebnis dieser Titrationsversuche. Es zeigt sich, dass das Sekretionsniveau, angegeben als Insulin [μ U/ml] pro Langerhans-Insel, sowohl basal als auch stimuliert umso höher lag, je weniger Langerhans-Inseln eingesetzt wurden. Fünf Langerhans-Inseln wiesen ein insgesamt höheres Sekretionsniveau auf als 10 bzw. 20 Langerhans-Inseln. Der Anstieg des Insulingehaltes im Medium nach Stimulation mit hochkonzentrierter Glukoselösung betrug jedoch stets das zweifache des basalen Sekretionsniveaus.

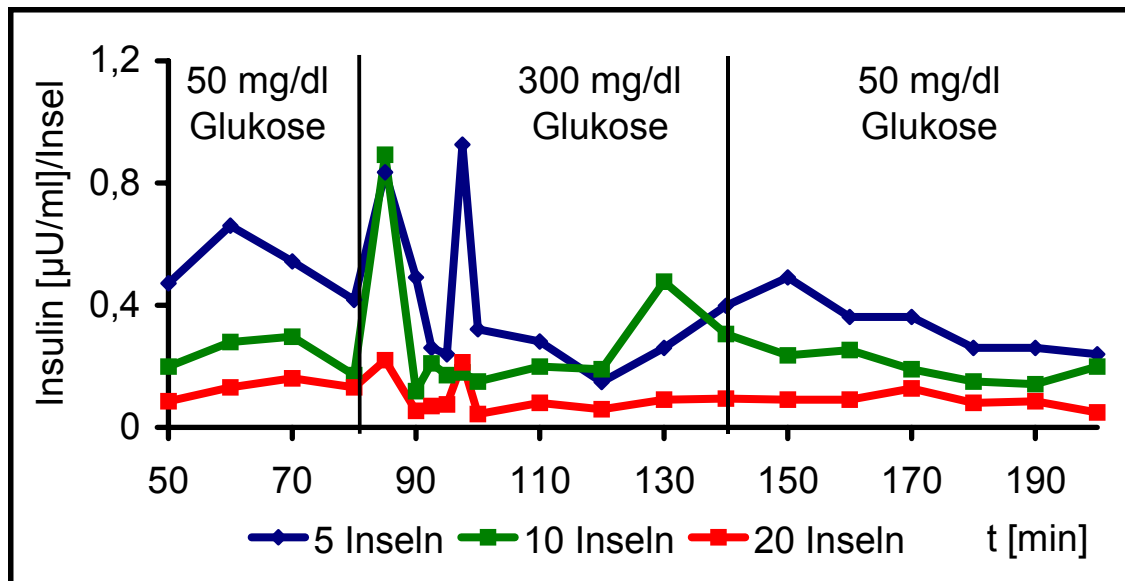


Abb. 17: Dynamische Insulinausschüttung nach Glukosestimulation in Abhängigkeit von der eingesetzten Inselzahl. Dargestellt ist der Insulingehalt im Medium in $\mu\text{U}/\text{ml}$ pro Insel; es wurden 5, 10 bzw. 20 Langerhans-Inseln aus der gleichen Isolierung eingesetzt.

3.4.2 Einfluss der Kulturtemperatur auf die dynamische Insulinausschüttung

Der Einfluss der Kulturtemperatur auf die dynamische Insulinausschüttung *in vitro* wurde untersucht, indem isolierte porcine Langerhans-Inseln über 48 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder bei $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert wurden. Eine Kulturtemperatur von $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird für die Langzeit-Kultivierung porciner Langerhans-Inseln favorisiert, weil gezeigt werden konnte, dass diese Kulturbedingungen die Immunogenität des späteren Transplantates senken können [20, 21]. Die Abb. 18 zeigt beispielhaft die Ergebnisse dieses Temperaturvergleiches. Es konnte kein Unterschied in der Insulinausschüttung ($\mu\text{U}/\text{ml}$ pro Insel) nach Glukosestimulation nachgewiesen werden. Eine Kulturtemperatur von $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ übt somit keinen negativen Effekt auf die In-Vitro-Funktion isolierter porciner Langerhans-Inseln aus.

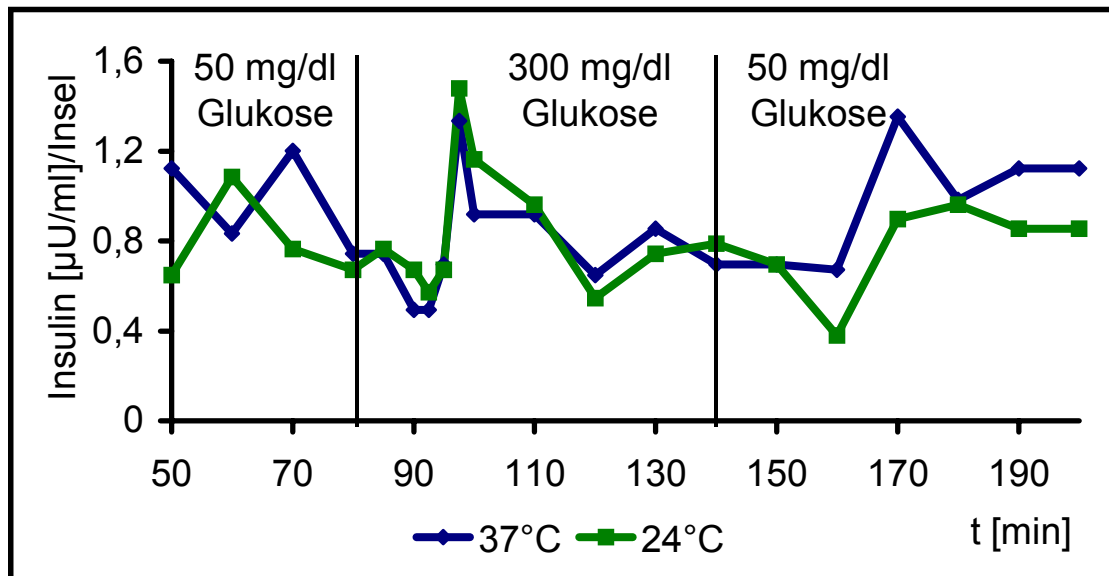


Abb. 18: Dynamische Insulinausschüttung ($\mu\text{U}/\text{ml}$ pro Insel) porciner Langerhans-Inseln aus der gleichen Isolierung; 48h In-Vitro-Kultur bei 37°C und 24°C .

3.4.3 Einfluss der Kulturdauer auf die dynamische Insulinausschüttung

Um den Einfluss der Kulturdauer auf die dynamische Insulinausschüttung zu untersuchen, wurden isolierte porcine Langerhans-Inseln einer Inselpräparation über 11 Tage kultiviert, alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Sowohl nach zwei als auch nach 11 Tagen wurde die dynamische Insulinausschüttung der Langerhans-Inseln in der Perfusion gemessen ($\mu\text{U}/\text{ml}$ pro Insel). Die Abb. 19 zeigt beispielhaft das Ergebnis dieser Untersuchungen: Isolierte porcine Langerhans-Inseln zeigen nach zweitägiger In-Vitro-Kultur eine suffiziente dynamische Insulinausschüttung. Nach 11 Tagen lag jedoch das Niveau der Insulinausschüttung erheblich unter jenem nach einer Kulturdauer von zwei Tagen. Ferner war nach 11 Tagen in Kultur kein Anstieg des Insulingehaltes im Medium nach Glukosestimulation nachweisbar. Daraus folgt, dass die Dauer der In-Vitro-Kultur einen wesentlichen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der isolierten Langerhans-Inseln ausübt.

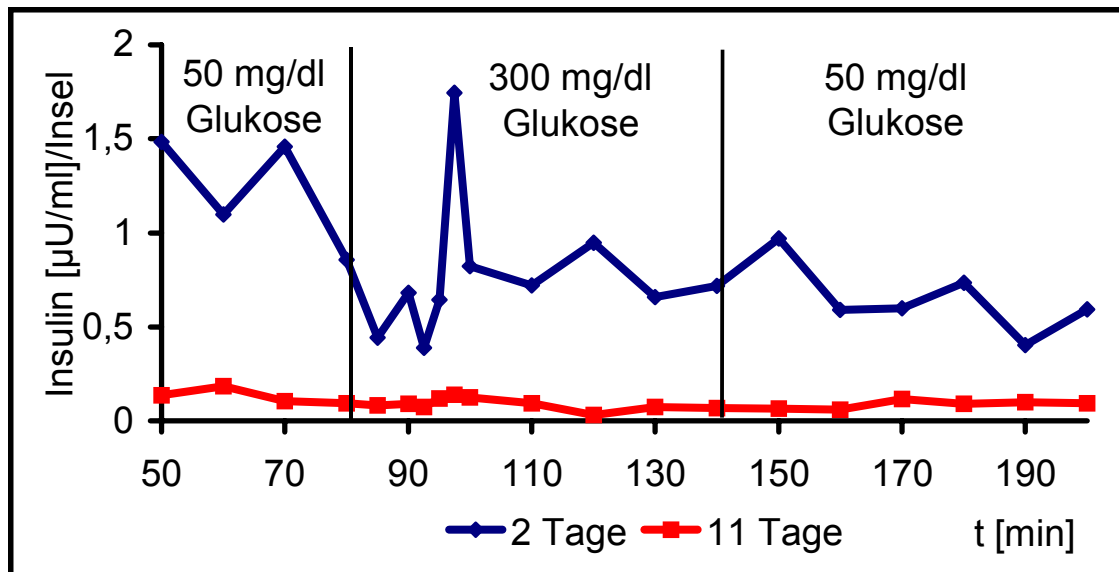


Abb. 19: Dynamische Insulinausschüttung isolierter porziner Langerhans-Inseln nach einer Kulturdauer von zwei bzw. 11 Tagen, dargestellt in $\mu\text{U}/\text{ml}$ pro Insel.

3.4.4 Einfluss von Nicotinamid auf die Langzeit-Kultivierung isolierter porziner Langerhans-Inseln

Die Langzeit-Kultivierung isolierter porziner Langerhans-Inseln ist, wie aus Abb. 19 ersichtlich, noch verbesserungswürdig. Im Folgenden sollte untersucht werden, in wie weit die Zugabe von Nicotinamid zum Kulturmedium die Bedingungen für eine Langzeit-Kultivierung der Langerhans-Inseln verbessert. Nicotinamid ist ein Vitamin, dass in der Zelle für die Biosynthese der wasserstoffübertragenden Coenzyme NAD^+ und NADP^+ nötig ist [83]. In der vorliegenden Arbeit wurden Langerhans-Inseln ($20 \mu\text{l}$ gereinigte Inselsuspension) aus der gleichen Isolierung über 12 Tage kultiviert, als Kulturmedium diente Ham's F12. In einem Fall wurden dem Medium 15 mM Nicotinamid zugesetzt. Alle ein bis zwei Tage wurde das Medium gewechselt und der Insulingehalt im Medium bestimmt. Abb. 20 zeigt beispielhaft den Insulingehalt im Kulturmedium in $\mu\text{U}/\text{ml}$. Es zeigte sich, dass die Insulinausschüttung von Langerhans-Inseln, deren Kulturmedium kein Nicotinamid enthielt, bereits am 2. Tag in Kultur um das zehnfache abnahm, bis zum 12. Tag folgte dann eine kontinuierliche Reduktion des Insulingehaltes bis auf $340 \mu\text{U}/\text{ml}$ am 12. Tag in Kultur. Langerhans-Inseln in einem Medium mit 15 mM Nicotinamid zeigten zwar am dritten Tag in Kultur einen Abfall des Insulingehaltes im Medium, insgesamt konnte jedoch über acht Tage eine sechsfach

höhere Insulinmenge im Kulturmedium erreicht werden. Am 12. Tag in Kultur lag der Insulingehalt um mehr als das 3½fache über dem von Langerhans-Inseln, die keine Nicotinamid erhielten (1.285 vs. 340 $\mu\text{U}/\text{ml}$). Das bedeutet, dass die Zugabe von Nicotinamid die Bedingungen für eine Langzeit-Kultur isolierter porziner Langerhans-Inseln erheblich verbessert.

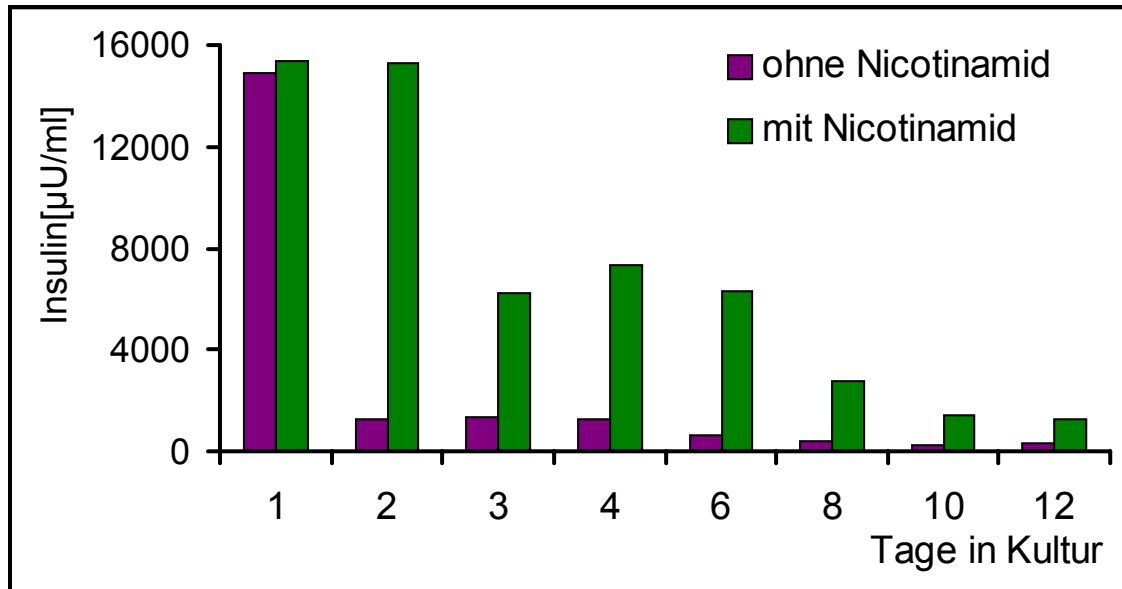


Abb. 20: Einfluss von Nicotinamid auf die Insulinausschüttung [$\mu\text{U}/\text{ml}$] isolierter porziner Langerhans-Inseln ins Kulturmedium. Es wurden jeweils 20 μl Inselsuspension aus der gleichen Isolierung eingesetzt.

4 Diskussion

Die Isolierung von Langerhans-Inseln aus dem porzinen Pankreas ist bis heute kein Standardverfahren. Es gestaltet sich als ausserordentlich schwierig, regelmässig Langerhans-Inseln von ausreichender Menge und sehr guter Qualität zu isolieren. Die Gründe dafür liegen zum einen auf Seiten des Spendertieres [55, 80, 81] sowie der verwendeten Kollagenase [38, 66], zum anderen im Verfahren der Isolierung und Reinigung selbst [34, 45, 48, 65]. Insbesondere die Analyse der rassen- und altersspezifischen morphologischen Unterschiede der Spenderschweine und deren Auswirkung auf das Ergebnis der Inselisolierung aus dieser Arbeit liefern zum Teil völlig neue Erkenntnisse und einen wesentlichen Beitrag für die Verbesserung des Verfahrens der porzinen Inselisolierung. Im Hinblick auf die Anreicherung des endokrinen Gewebes mittels Dichtegradienten-Zentrifugation sind unterschiedliche Verfahren in der Literatur beschrieben [45, 46, 50, 67, 79]. Es existiert aber bisher kein Verfahren, welches zuverlässige Ergebnisse hinsichtlich Reinheit und Ausbeute der Langerhans-Inseln gewährleistet. Der Vergleich zweier unterschiedlicher Dichtegradienten in dieser Arbeit zeigt, dass mittels OptiPrep-Dichtegradienten-Zentrifugation zwar regelmässig Inselpräparationen von sehr guter Reinheit zu erhalten sind, die Ausbeute ist jedoch trotz Verbesserungen nach wie vor ein biotechnologisches Problem, das es zu lösen gilt. Widersprüchliche Angaben in der Literatur finden sich zur In-Vitro-Funktion der isolierten Langerhans-Inseln. Die dynamische Insulinausschüttung porziner Langerhans-Inseln nach Glukosestimulation scheint im Gegensatz zu der von humanen Langerhans-Inseln problematisch zu sein [72, 73, 76]. Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass isolierte porzine Langerhans-Inseln ausreichend vital sind [87]. Ferner konnte gezeigt werden, dass isolierte porzine Langerhans-Inseln bei Perifusion mit einem Medium, das unterschiedliche Glukosekonzentrationen aufwies, auf Glukosestimulation mit einer suffizienten Insulinausschüttung reagieren.

Tab. 3: Zusammenfassende Darstellung der aktuellen Literatur zur Inselisolierung aus dem porcinen Pankreas.

Literaturstelle	Spenderschwein	Enzym	Dichtegradient	Inselzahl nach enzymatischer Desintegration	Ergebnis nach Reinigung
Finke et al. 1991 [43]	1-2 Jahre alt	Kollagenase (Boehringer)	EuroFicoll	3,264 IEQ/g	2,515 IEQ/g
Marchetti et al. 1991 [42]	1-2 Jahre alt; Yorkshire-Hamshire	Kollagenase (Boehringer)	EuroFicoll	4,903 IEQ/g	3,551 IEQ/g
Toomey et al. 1993 [45]	6-8 Monate; Large White x Welsh	Pan Plus (Serva)	BSA	manuelle Technik : 1,766 IEQ/g Ricordi- Technik : 5,875 IEQ/g	#
Heiser et al. 1994 [54]	junge Hybridschweine (≤ 14 Monate)	Kollagenase (Serva)	nicht durchgeführt	837 \pm 326 Inseln/g	#
	alte Hybridschweine (2-3 Jahre)			2,930 \pm 1,450 Inseln/g	
	Deutsche Landrasse			606 \pm 379 Inseln/g	
	Pietrain			2,180 \pm 317 Inseln/g	
	Münchner Miniaturschweine „Troll“			691 \pm 357 Inseln/g	
Villani et al. 1994 [48]	?	Kollagenase XI (Sigma)	HSS-Ficoll	Ricordi-Technik: 2,987 IEQ/g	45% Ausbeute
			Euro-Ficoll	Ricordi-Technik, vorher 20min Inkubation bei 37 °C: 3,212 IEQ/g	65% Ausbeute
			Histopaque	statische Inkubation: 3,313 IEQ/g	71% Ausbeute
Marchetti et al. 1994 [46]	6 Monate alt	Kollagenase IX (Sigma)	Histopaque	3,424 IEQ/g	2,558 IEQ/g
Giannarelli et al. 1994 [47]	6 Monate alt	Kollagenase IX (Sigma)	Histopaque	3,534 IEQ/g	2,615 IEQ/g
Prevost et al. 1995 [50]	2 Jahre alt; Large White	Kollagenase (Boehringer)	Nycodenz (kontinuierlich)	3,700 IEQ/g	3,000 IEQ/g (67% Ausbeute)

Literaturstelle	Spenderschwein	Enzym	Dichtegradient	Inselzahl nach enzymatischer Desintegration	Ergebnis nach Reinigung
Ulrichs et al. 1995 [55]	Deutsche Landrasse	Kollagenase (Serva)	nicht durchgeführt	687 ± 515 Inseln/g	#
	Duroc			1,538 ± 329 Inseln/g	
	Pietrain			2,173 ± 301 Inseln/g	
	Göttinger Miniaturschwein			691 ± 357 Inseln/g	
	Hybridschwein			996 ± 1,542 Inseln/g	
White et al. 1995 [65]	?	Kollagenase (Boehringer)	#	HBSS: 3,006 IEQ/g UW: 3,489 IEQ/g UW unmittelbar nach Organentnahme: 9,358 IEQ/g	#
Miyamoto et al. 1998 [51]	18 Monate alt (n=10)	Kollagenase P + Kollagenase S-1 + DNase	Euro-Collins Dextran (diskontinuierlich)	#	2,900 IEQ/g
Brandhorst et al. 1999 [66]	Zuchtsauen (17-60 Monate alt)	LiberaseHI vs Kollagenase (Serva)	Ficoll-sodium-diatrizoate	#	4,210 IEQ/g (LiberaseHI) vs 2640 IEQ/g (Serva)
Cui et al. 1999 [52]	2 Jahre alt (n=18)	Kollagenase P + Kollagenase S-1 + Dnase + Dispase	Euro-Collins- Dextran (diskontinuierlich)	#	3,294 IEQ/g
Ching et al. 2001 [103]	jung; Yorkshire	Kollagenase P + desoxyribonuclease	Ficoll	3,115 IEQ/g	2,398 IEQ/g
O'Neil et al. 2001 [89]	Yorkshire	Liberase PI	EuroFicoll	#	3,571 IEQ/g

4.1 Einfluss von Rasse und Alter des Spenderschweines auf das Ergebnis der Inselisolierung

Die aktuelle Literatur zur porzinen Inselisolierung ist in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Verfahren der Isolierung von Langerhans-Inseln sind prinzipiell ähnlich und werden in Anlehnung an die Originalmethode von C. Ricordi [34] durchgeführt. Es werden jedoch eine Vielzahl kleiner Modifikationen durchgeführt, die z.T. nicht in der Literatur beschrieben werden, wie z.B. die Grösse der Kammer, die Konzentration der Kollagenase bezogen auf das Gewicht des eingesetzten Organs und Angaben über Temperatur und Dauer des Verdauvorganges. Auch Hinweise über einen zusätzlichen mechanischen Verdau, z.B. durch manuelles Schütteln der Verdaukammer (wie oft? wie schnell?) oder die zusätzliche Verwendung von Stahlkugeln in der Kammer, finden sich häufig nicht. Bezüglich der Zahl der durchgeführten Versuche bleiben ebenfalls Fragen offen: Wie viele Versuche wurden als technische Versager deklariert und nicht gewertet? Als Spendertiere dienten Schweine unterschiedlichen Alters sowie unterschiedlicher Rasse/Kreuzungen, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zusätzlich erschwert.

In der vorliegenden Arbeit wurden 99 konsekutive Inselisolierungen aus vier verschiedenen Spenderschweinen ausgewertet; nur 3 Versuche wurden nicht in die Berechnungen eingeschlossen, da sie wegen eines ungeeigneten FCS unbefriedigende Isolierungsergebnisse lieferten.

Überraschend war, dass ausgewachsene, 2-3 Jahre alte Göttingen Minipigs (GMS) für die Isolierung von Langerhans-Inseln völlig ungeeignet sind. Dies ist insofern unbefriedigend, als diese Tiere als Versuchstiere in der experimentellen chirurgischen Forschung etabliert sind und häufig verwendet werden. Bei der Präparation der Pankreata der GMS zeigte sich ein hoher Fettanteil. Dies könnte eine mögliche Ursache für die schlechten Isolierungsergebnisse aus diesen Tieren sein, zumal dieses Phänomen aus der Isolierung humaner Langerhans-Inseln bereits bekannt ist [85]. Alle anderen verwendeten Rassen zeigten zufriedenstellende bis sehr gute Isolierungsergebnisse und dürften somit für die Inselisolierung grundsätzlich gut geeignet sein.

Der Vergleich junger und alter Spenderschweine zeigte den deutlichen Einfluss des Alters auf das Isolierungsergebnis: 2 Jahre alte Zuchtsauen (ZS) zeigten auf den ersten Blick signifikant bessere Isolierungsergebnisse als 4-6 Monate junge Hybridschweine (HY). Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse der Isolierungen an der Universität Kiel [54, 55] und ist auch in der Literatur wiederholt beschrieben worden [80, 81]. Eine mögliche Erklärung könnte die stärkere Expression extrazellulärer Matrixproteine im Pankreas der alten Schweine sein; insbesondere eine bessere Ausbildung der „Inselkapsel“, d.h. der extrazellulären Matrixproteine, welche die Langerhans-Inseln umgeben und deren Integrität während der enzymatischen Desintegration der Organs bewahren [86]. Allerdings bleibt ein Phänomen zunächst noch ungelöst: die immer wieder in beiden Spendergruppen beobachteten sehr schlechten, aber auch sehr guten Isolierungsergebnisse (s. u.).

4.2 Einfluss der verwendeten Liberase PI-Charge auf das Ergebnis der Inselisolierung

Jahrzehntelange Erfahrungen mit Kollagenasen in der Isolierung von Langerhans-Inseln sowohl aus Klein- [87] und Grosstieren [37, 48,] als auch aus dem humanen Spenderorgan [38] haben gezeigt, dass diese vornehmlich aus dem Bakterium *Clostridium histolyticum* gewonnenen Enzyme starke Qualitäts- und Aktivitätsschwankungen aufweisen. Diese insbesondere chargenabhängig auftretenden Qualitätsunterschiede stellten ein erhebliches Problem dar, da sie das Isolierungsergebnis entscheidend beeinflussten und die Zuverlässigkeit des Verfahrens deutlich beeinträchtigten. Jede neue Charge musste zunächst auf ihre Eignung getestet werden, die optimale Konzentration der Kollagenase sowie ihr Temperaturoptimum unterschieden sich dabei z.T. erheblich [62, 66]. Diese Austestungen sind nicht nur zeit- sondern auch sehr kostenintensiv. Zusätzlich spielen während der enzymatischen Desintegration endogen freigesetzte pankreatische Enzyme, wie z.B. Trypsin oder Neutrale Proteasen [56], aber auch Carboxypeptidasen, Lipase und Elastase [88] eine entscheidende Rolle für das Isolierungsergebnis. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Isolierungen mit der spezies-spezifischen Liberase PI, einem neuen speziell für die Isolierung porziner Langerhans-Inseln entwickelten Enzymgemisch, durchgeführt. Laut Angaben der Firma Roche Diagnostics soll Liberase PI im Vergleich zu anderen

handelsüblichen Kollagenasen keine chargenabhängigen Qualitäts- und Aktivitätsschwankungen aufweisen. Diese äussern sich in Schwankungen der Inselzahl nach enzymatischer Desintegration, in einer Fragmentierung der Langerhans-Inseln und/oder einem unvollständigen Verdau der Pankreata. Es zeigte sich jedoch, dass auch dieses Enzymgemisch chargenabhängige Qualitätsunterschiede aufweist, besonders deutlich zeigte sich dies bei der vierten eingesetzten Charge. Hier musste die Konzentration verdoppelt werden, erst dann konnten erfolgreiche Inselisolierungen durchgeführt werden. Warum sich chargenabhängige Unterschiede insbesondere dann auswirkten, wenn alte Spenderschweine verwendet wurden, bedarf weiterer Untersuchungen. Die in dieser Arbeit dargestellten chargenabhängigen Unterschiede stehen im Gegensatz zu den kürzlich veröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe um O'Neil et al. [89], die derartige Unterschiede bezogen auf das Ergebnis der porzinen Inselisolierung nicht zeigen konnten. Da sich jedoch der gesamte Vorgang der Inselisolierung methodisch zum Teil erheblich von dem in dieser Arbeit angewendeten Versuchsaufbau unterscheidet (statische Inkubation, kein manuelles Schütteln der Verdaukammer, Auszählung des Isolierungsergebnisses erst nach Reinigung im Ficoll-Dichtegradienten, etc.), stellt sich die Frage nach der unmittelbaren Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse.

Neuste Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten jetzt zeigen, dass die verwendete Charge nicht nur das numerische Isolierungsergebnis beeinflusst, sondern auch die Viabilität der isolierten Langerhans-Inseln. Ursächlich könnte dabei eine mögliche Aktivierung endogenen Trypsins durch Verunreinigungen der Liberase PI sein, da der Zusatz des irreversiblen Trypsininhibitors Pefabloc zu der verwendeten Enzymlösung sowohl eine Verbesserung des Isolierungsergebnisses als auch eine verbesserte Viabilität der isolierten Langerhans-Inseln bewirkt [unveröffentlichte Daten]. Ein weiterer wichtiger Aspekt scheint auch die Temperatur während der Isolierung zu sein. Arbeiten von Brandhorst et al. [66] zeigten, dass eine Inselisolierung bei niedrigerer Temperatur als allgemein üblich, statt 35-37 °C wurde bei 24-28 °C isoliert, zu deutlich besseren Isolierungsergebnissen führte. In jener Arbeit wurde als Enzym Liberase HI, ein ebenfalls von der Firma Roche Diagnostics entwickeltes Enzymgemisch, speziell für die Isolierung humaner Langerhans-Inseln, verwendet; auch hier zeigten sich

chargenabhängige Qualitätsunterschiede hinsichtlich des numerischen Isolierungsergebnisses, nicht aber hinsichtlich der Viabilität der isolierten Langerhans-Inseln. Inwieweit dies auch für Liberase PI gilt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass bezüglich des optimalen Enzyms für die porcine Inselisolierung weiterhin Entwicklungsbedarf besteht. Einen möglichen Lösungsansatz bietet die Herstellung rekombinanter Kollagenasen [90].

4.3 Unterschiede der Pankreasmorphologie bei jungen und alten

Spenderschweinen und deren Auswirkungen auf das Isolierungsergebnis

Obwohl der Prozentsatz sehr guter Isolierungen bei alten Zuchtsauen mit 48% deutlich höher war, resultierten immerhin 15% aller Isolierungen aus jungen Hybridschweinen in sehr guten Isolierungen. In Einzelfällen konnten auch mit jungen Spenderschweinen weit überdurchschnittliche Ergebnisse von mehr als 10.000 IEQ/g erzielt werden. Die Hypothese dieser Arbeit war, dass u. a. morphologische Unterschiede der eingesetzten Pankreata für diese Beobachtung verantwortlich sind. Die retrospektive histologische Analyse der für die Inselisolierung verwendeten Pankreata zeigte, dass die Mehrzahl der Organe von alten Spenderschweinen (83%) überwiegend grosse Langerhans-Inseln mit einem Durchmesser $> 200 \mu\text{m}$ aufwies, während die Mehrzahl der Pankreata von jungen Spenderschweinen (64%) überwiegend kleine Langerhans-Inseln aufwies. Neben den bereits in der Literatur beschriebenen morphologischen Unterschieden zwischen jungen und alten Spenderschweinen, die sich in einer stärkeren Expression extrazellulärer Matrixproteine bei alten Zuchtsauen [86] sowie einer höheren Anzahl runder Langerhans-Inseln zugunsten einer niedrigeren Zahl irregulärer Formen [91] äussern, konnte in dieser Arbeit nun erstmals ein weiterer morphologischer Unterschied zwischen beiden Altersgruppen aufgezeigt werden. Das Pankreas alter Zuchtsauen zeigt danach häufiger grosse Langerhans-Inseln als das Pankreas junger Hybridschweine.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse konnte ein deutlicher, in der Literatur bisher nicht beschriebener Zusammenhang zwischen der Inselgrösse und dem Isolierungsergebnis gezeigt werden. Inselisolierungen aus einem Spenderorgan mit überwiegend grossen Langerhans-Inseln zeigten signifikant bessere Ergebnisse als Isolierungen aus Pankreata mit überwiegend kleinen Langerhans-Inseln. Bei vergleichbaren Inselgrössen zeigten

sich hinsichtlich des Isolierungsergebnisses keine signifikanten Unterschiede zwischen jungen und alten Spenderschweinen. Mit anderen Worten nicht das Alter, sondern auch die Grösse der Langerhans-Inseln im Spenderorgan ist ein essentieller Parameter für eine erfolgreiche porzine Inselisolierung.

Die Ursache für die stark variierenden Inselgrössen ist bisher nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung könnten Unterschiede in der Fütterung der Spenderschweine bieten. Der Einfluß bestimmter Nahrungszusätze, wie z.B. Sojaöl, auf die Kultivierbarkeit und Immunogenität isolierter porziner Langerhans-Inseln ist bereits aus der Literatur bekannt [92]. Eine weitere wichtige Rolle könnten genetische Faktoren spielen. Die ausgemusterten Zuchtsauen waren zu 70% reinrassig (Deutsche Landrasse (DL)) und zu 30% Kreuzungen (entweder DL gekreuzt mit Deutschem Edelschwein oder DL gekreuzt mit Piétrain), während die Züchtungen der jungen Hybridschweine auf mindestens vier verschiedenen Rassen basierten. Morphologische Untersuchungen von Pankreata reinrassiger Spenderschweine im Hinblick auf die Grösse der Langerhans-Inseln könnten in naher Zukunft zeigen, welche Rasse überwiegend grosse Inseln aufweist. Diese Rasse sollte dann für die Inselisolierung bevorzugt verwendet werden. Das Augenmerk sollte hier insbesondere auf Deutscher Landrasse und Pietrain liegen, da in der Literatur bereits gezeigt werden konnte, dass reinrassige Pietrain-Schweine besonders gute Isolierungsergebnisse aufwiesen [56]. Schweine der Deutschen Landrasse gefolgt von Pietrain zeigten bereits in einer vergleichenden histologischen Analyse unterschiedlicher Rassen den höchsten Prozentsatz grosser Langerhans-Inseln [91].

Als Konsequenz aus den Ergebnissen der morphologischen Retrospektive werden in unserer Arbeitsgruppe nun vor jeder Inselisolierung 3-4 Pankreata in histologischen Schnellschnitten auf ihre Inselgrösse geprüft und nur Organe mit überwiegend grossen Langerhans-Inseln für eine Inselisolierung verwendet. Dabei werden Gefrierschnitte mit Dithizon gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Dieser zusätzliche Schritt vor der eigentlichen Isolierung dauert ca. 30 Minuten und hat bereits zu deutlich konstanteren Isolierungsergebnissen geführt. Für die Zukunft darf man erwarten, dass die in Abb. 3 dargestellten Unterschiede im Isolierungsergebnis zwischen alten Zuchtsauen und jungen Hybridschweinen zunehmend geringer werden.

Interessanterweise zeigte die morphologische Auswertung der Grösse der isolierten Langerhans-Inseln nach enzymatischer Desintegration der Pankreata ein unerwartetes Bild. Die Mehrzahl der isolierten Langerhans-Inseln sowohl aus alten Zuchtsauen als auch aus jungen Hybridschweinen weisen einen Durchmesser von 50 – 200 μm auf. Man kann also schlussfolgern, dass die Langerhans-Inseln während des Verdauvorganges fragmentieren. Weitere Analysen haben dieses Ergebnis bestätigt; dabei wurden nur Isolierungen ausgewertet, bei denen die Spenderpankreatata überwiegend grosse Langerhans-Inseln aufwiesen. Auch dabei zeigte sich, dass die überwiegende Mehrzahl der isolierten Langerhans-Inseln einen Durchmesser von 50 – 200 μm aufwiesen [93]. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Literaturberichte, welche über eine erhebliche Fragilität porziner Langerhans-Inseln im Vergleich zu den „stabileren“ humanen Inseln berichten [94]. Die Ursache dafür liegt in der im Vergleich zu humanen Pankreata schlechter ausgebildeten Inselkapsel im porzinen Pankreas. Nach Ulrichs et al. sind nur 25% der porzinen Langerhans-Inseln von einer Kapsel umgeben, die mehr als 75% der Inseloberfläche bedeckt [55], die Arbeitsgruppe um White et al. berichtet, dass die überwiegende Mehrheit der porzinen Langerhans-Inseln eine Kapsel aufweist, die weniger als 50% der Inseloberfläche bedeckt [95]. Aufgrund der schwachen Expression der extrazellulären Matrixproteine der Inselkapsel kommt es zunehmend auch zu einem Verdau der die Inselzellen umgebenden bindegewebigen Matrix, so dass der strukturelle Zusammenhalt der Langerhans-Insel nicht mehr gegeben ist. Ob dieser strukturelle Zerfall der Langerhans-Inseln Auswirkungen auf die Funktionalität des Inseltransplantates hat, ist derzeit nicht bekannt. Interessanterweise zeigen die In-Vitro-Funktionstests dieser Arbeit, dass die Fragmentierung der Langerhans-Inseln keine negativen Auswirkungen auf die Insulinausschüttung hat.

4.4 Reinheit und Ausbeute der Langerhans-Inseln nach Dichtegradienten-Zentrifugation

In der Literatur werden unterschiedliche Methoden zur Anreicherung endokrinen Gewebes beschrieben. Methode der Wahl ist die Reinigung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation, meist im Ficoll-, Histopaque- oder Rinderserumalbumin-Dichtegradienten [43, 45-48]. Daneben wird die Anreicherung mittels magnetischer

Gewebeseparation [77] beschrieben, die im Anschluß an die Reinigung mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt wurde. Damit wurden deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich der Reinheit erzielt. Eine hohe Reinheit der Inselpräparation ist für die Funktion des späteren Transplantates von grosser Bedeutung. Eine Reinheit von 100% wird angestrebt, um die Immunantwort gegen das Transplantat zu verringern [68] und das Volumen des Inseltransplantates so gering wie möglich zu halten. Einzig mittels Handverlesen der isolierten Langerhans-Inseln werden Reinheiten von 100% erreicht; diese Methode ist für zukünftige Inseltransplantationen aufgrund der benötigten grossen Inselmenge nicht praktikabel. Die vorliegende Arbeit vergleicht drei unterschiedliche Verfahren der Anreicherung isolierter porziner Langerhans-Inseln. Alle beruhen dabei auf dem Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation, wobei Ficoll als ein kontinuierlicher Dichtegradient im COBE Cell Processor durchgeführt wurde. OptiPrep hingegen stellt einen diskontinuierlichen Dichtegradienten dar, der sowohl manuell in 50 ml Falcon-Röhrchen als auch erstmals im COBE Cell Processor durchgeführt wurde. Mit OptiPrep konnten dabei hinsichtlich der Reinheit der Inselpräparationen deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden als mit Ficoll, die Streubreite der Ergebnisse (Abb. 12) zeigt ferner, dass die Anreicherung mittels OptiPrep weitaus zuverlässiger ist, die überwiegende Mehrheit der Experimente resultierte in sehr guten Reinheiten von 75 – 100%. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen somit die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von van der Burg et al. [79]; diese berichtet von Reinheiten um 86%. Unsere Arbeitsgruppe bevorzugt die Anreicherung mittels OptiPrep-Dichtegradienten-Zentrifugation im COBE Cell Processor, da dieses technisch einfacher ist, weil grössere Mengen an Gewebesuspension in einem Arbeitsschritt gereinigt werden können und die Sterilität im Hinblick auf eine spätere Inseltransplantation erheblich besser gewährleistet werden kann [96].

Die Ausbeute nach Dichtegradienten-Zentrifugation ist im Gegensatz zur Reinheit noch immer unbefriedigend, in der Regel werden Ausbeuten zwischen 45 und 80% erreicht [43, 45-48]. Ziel ist jedoch eine Ausbeute von 100%; d.h. die Zellverluste während des Reinigungsprozesses sollten möglichst gering sein. Vereinzelt konnten in der vorliegenden Arbeit Ausbeuten von 100% erreicht werden, im Mittel zeigten jedoch alle untersuchten Gradienten eine Ausbeute von maximal 48%. Auch bezüglich der

Streubreite der Ergebnisse zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den verwendeten Dichtegradienten. Diese Untersuchungen stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von van der Burg et al., die mittels OptiPrep von einer 100%igen Ausbeute berichten [79]. Die Gründe für die ungenügende Ausbeute nach Dichtegradienten-Zentrifugation können vielfältig sein. Zum einen können Ursachen auf Seiten des Spendertieres liegen: Durch die Verwendung von Schlachthofmaterial ist die Qualität des Spenderorgans nicht optimal, die warme Ischämie von 20 Minuten sowie die kalte Ischämie von bis zu 2 Stunden kann zur Zellschwellung führen, dieses verändert die Dichte der Zellen und kann die normalerweise vorhandenen Dichteunterschiede zwischen endokrinen und exokrinen Zellen aufheben. Auch während der enzymatischen Desintegration kann es zu Zellödemen und damit Aufhebungen der Dichteunterschiede kommen. Die Verwendung von UW-Lösung als Medium soll diesen Effekt verringern, kann ihn aber nicht aufheben [63, 97]. Durch die Verwendung eines Enzyms ungenügender Qualität kann es zu einem inkompletten Verdau des Organs kommen. Das bedeutet, dass endokrines und exokrines Gewebe nicht komplett voneinander getrennt werden und folglich eine Auftrennung im Dichtegradienten dann auch nur inkomplett erfolgt. Durch die Verbesserungen auf dem Gebiet der Inselisolierung auch aus dieser Arbeit können nun weitere biotechnologische Analysen folgen, welche die Anreicherung endokrinen Gewebes für eine spätere Inseltransplantation verbessern. Unter optimalen Bedingungen würden zur Zeit mindestens drei porzine Inselisolierungen benötigt, um die geschätzte Zahl von 1 Mio. Langerhans-Inseln für eine klinische Inseltransplantation bereitzustellen.

4.5 Viabilität und In-Vitro-Funktion isolierter Langerhans-Inseln

Die Viabilität isolierter porziner Langerhans-Inseln 24 Stunden nach Isolierung betrug in den meisten Fällen ca. 80% (FDA/PI-Färbung). Dieser Prozentsatz wird auch von anderen Gruppen bestätigt [50, 66]; kurze Zeit nach Isolierung sind die Langerhans-Inseln somit ausreichend vital. Neue Versuche unserer Arbeitsgruppe ergeben jedoch Hinweise darauf, dass die Viabilität der isolierten Langerhans-Inseln von der Qualität der verwendeten Liberase PI-Charge abhängig ist (siehe dazu Kapitel 4.2.). Trotz einer warmen Ischämie von 20 – 30 Minuten und den negativen Begleitumständen des Schlachtvorganges, wie z.B. dem Transport der Tiere zum Schlachthof, der eine

zusätzliche Stress-Pankreatitis mit der Freisetzung von Enzymen begünstigen dürfte, ist eine Viabilität der isolierten Langerhans-Inseln von mehr als 80% äusserst zufriedenstellend.

Neben einer ausreichenden Viabilität ist eine suffiziente In-Vitro-Funktion eine wichtige Vorbedingung für eine erfolgreiche xenogene Inseltransplantation. Üblicherweise wird für die Bewertung der In-Vitro-Funktion isolierter Langerhans-Inseln die Insulinsekretion der Inseln nach Stimulation mit Glukoselösung herangezogen. Diese kann sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Bedingungen erfolgen [71]. Wird unter dynamischen Bedingungen getestet, erfolgt das Experiment in Form der Perifusion. Der Vorteil im Gegensatz zum statischen Ansatz ist eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Bedingungen, die in vivo vorliegen. In der Literatur finden sich nur wenige, z.T. unvollständige und auch widersprüchliche Angaben zur Insulinausschüttung unter dynamischen Bedingungen [41, 42, 73-76]. Eine mögliche Ursache für die oft unzureichende In-Vitro-Funktion isolierter porziner Langerhans-Inseln könnte in der noch nicht ausgereiften Isolierungsmethode liegen. Auch die Methode der Perifusion erfordert längeres Training, bevor aussagekräftige Ergebnisse produziert werden können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass isolierte porzine Langerhans-Inseln auf eine Stimulation mit Glukoselösung mit einem Anstieg der Insulinsekretion reagieren und bei Abfall der Glukosekonzentration im Medium auf das basale Sekretionsniveau zurückkehren. Dieser Anstieg ist geringer als er aus Experimenten mit humanen Inseln berichtet wird [72]. Man erwartet einen biphasischen Verlauf der Insulinsekretion mit einem starken Anstieg der Insulinsekretion in einer ersten Phase (ca. 10 Minuten) gefolgt von einer zweiten Phase (Plateauphase) über den gesamten Zeitraum der Stimulation, in der die Insulinsekretion auf einem niedrigeren Niveau als in der ersten Phase relativ konstant gehalten wird [98]. Während die erste Phase in der Regel gut nachweisbar war, konnte die zweite Phase der Insulinsekretion nicht immer gezeigt werden (Abb. 18 zeigt dies andeutungsweise). Da insbesondere diese Plateauphase einen stark energieabhängigen Prozess darstellt [98], lässt sich schlussfolgern, dass die Bedingungen der In-Vitro-Kultur noch verbesserungswürdig sind, und optimale Kulturbedingungen für das Transplantat bislang nicht erreicht worden sind. Hier ist in der Zukunft noch Entwicklungsarbeit zu leisten. Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Dichte der zu

untersuchenden Langerhans-Inseln eine wichtige Rolle für die dynamische Insulinausschüttung spielt. Wurden isolierte Langerhans-Inseln aus der gleichen Inselpräparation eingesetzt, zeigte sich, dass die Insulinsekretion pro Insel sowohl basal als auch nach Glukosestimulation grösser war, wenn weniger Langerhans-Inseln eingesetzt wurden. Dieses Ergebnis spricht für eine gegenseitige Beeinflussbarkeit der β -Zellen, und ist ein wichtiger, in der Vergangenheit eventuell zu wenig beachteter Faktor für die Bewertung der Insulinausschüttung *in vitro*. In der Vergangenheit konnte mittels Perfusion bereits sowohl für Ratten- [99] als auch humane Langerhans-Inseln [100] gezeigt werden, dass die Zugabe von Insulin zum Kulturmedium die Insulinsekretion nach Glukosestimulation hemmt. Interessanterweise zeigen Ergebnisse der amerikanischen Arbeitsgruppe um O'Neil et al. ebenfalls einen hemmenden Effekt einer hohen Inseldichte auf die Insulinausschüttung nach Stimulation mit Glukose [89]. In dieser Arbeit handelt es sich um Experimente unter statischen Bedingungen, welches die Bedeutung unserer Ergebnisse unterstreicht. Im Hinblick auf eine klinische Inseltransplantation sollte das Augenmerk demnach auch auf der zu transplantierenden Inselmenge liegen, da dies möglicherweise mitentscheidend für die Funktion des Transplantates ist. Möglicherweise sind Misserfolge von in der Vergangenheit durchgeführten Inseltransplantationen auch auf eine zu grosse Inselmenge zurückzuführen.

Im Gegensatz zu anders lautenden Berichten [101] konnte in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss der Kulturtemperatur auf die dynamische Insulinausschüttung *in vitro* nachgewiesen werden. Ursache dafür können Unterschiede in den Kulturbedingungen, z.B. das verwendete Kulturmedium [75] und andere Zusätze (FCS, Antibiotika, Insulin etc.), sein, da diese die In-Vitro-Funktion isolierter Langerhans-Inseln entscheidend beeinflussen können. Eine Kulturtemperatur von 24 °C ist jedoch für die Langzeit-Kultivierung vor einer möglichen Transplantation in jedem Fall anzustreben, da sie die Immunogenität des Transplantates senken kann [21].

Eine Langzeit-Kultivierung isolierter porziner Langerhans-Inseln ist im Hinblick auf mögliche Manipulationen am Transplantat anzustreben. Die In-Vitro-Funktion isolierter porziner Langerhans-Inseln nach 11 Tagen in Kultur ist jedoch unbefriedigend (Abb.

19), so dass Verbesserungen der Kulturbedingungen weiterhin nötig sind. Eine Möglichkeit stellt die Zugabe von Nicotinamid zum Kulturmedium dar. Dieses Vitamin ist für die Biosynthese der energiereichen Coenzyme NAD^+ und NADP^+ in der Zelle essentiell [83]. Diese sind an einer Vielzahl von Redoxreaktionen und Wasserstoffübertragungen des Intermediärstoffwechsels beteiligt, was die ausserordentliche Bedeutung von Nicotinamid für den zellulären Stoffwechsel widerspiegelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zugabe von Nicotinamid zum Kulturmedium einen protektiven Effekt auf isolierte humane Langerhans-Inseln ausübt [84]. Insbesondere die peripheren Zellen der Langerhans-Inseln werden durch den langen Prozess der enzymatischen und mechanischen Desintegration potentiell geschädigt, ihre Regeneration könnte mit Hilfe von Nicotinamid unterstützt werden [102]. Auch die Injektion von Empfängertieren mit Nicotinamid nach xenogener Inseltransplantation konnte bereits eine Verbesserung der Transplantatfunktion zeigen [104]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass die Insulinausschüttung in das Kulturmedium unter statischen Bedingungen verbessert werden kann, wenn Nicotinamid dem Kulturmedium zugesetzt wird. Weitere Versuche im Hinblick auf die optimale Konzentration von Nicotinamid sowie den Zusatz weiterer Stoffe, z. B. von homologem Serum, die zu einer Verbesserung der Kulturbedingungen führen könnten, müssen nun folgen.

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden mit der enzymatischen Desintegration porziner Langerhans-Inseln sowie deren Anreicherung im Dichtegradienten unterschiedliche Variablen der Inselisolierung analysiert. Ferner zeigten isolierte Langerhans-Inseln nach Stimulation mit Glukose eine suffiziente Insulinausschüttung in vitro. Zukünftig müssen weitere histologischen Analysen der Spenderpankreatata zeigen, welche der Schweinerassen aufgrund der Inselgrösse sowie gegebenenfalls weiterer morphologischer Gesichtspunkte die für die Inselisolierung am besten geeignete Rasse ist. Gegenwärtig werden bis zu drei Organe entnommen und im histologischen Schnellschnitt im Hinblick auf ihre Inselgrösse untersucht; das Pankreas mit dem höchsten Anteil grosser Langerhans-Inseln wird dann für die Inselisolierung verwendet. Fände man eine Schweinerasse, die besonders viele grosse Langerhans-Inseln aufweist, würde man Zeit und Kosten sparen. Dies wäre ein weitreichender Fortschritt in der porzinen Inselisolierung. Der Vergleich unterschiedlicher Chargen von Liberase PI hat gezeigt, dass auch hier unverändert biotechnologischer Entwicklungsbedarf besteht. Neuste Daten unsere Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass nicht nur das numerische Ergebnis der Inselisolierung, sondern auch die Viabilität der isolierten Langerhans-Inseln von der verwendeten Liberase-Charge abhängig ist. In Zukunft könnte eine detaillierte Analyse der Aktivitäten der bei der Inselisolierung beteiligten endogenen Enzyme, wie zum Beispiel Elastase, Phospholipase A₂, Neutrale Protease, hilfreich sein, um ein optimales Enzymgemisch gegebenenfalls unter Zuhilfenahme von Inhibitoren entwickeln zu können. Die Herstellung rekombinanter Kollagenasen bietet ebenfalls einen interessanten Lösungsansatz, um die chargenabhängigen Aktivitätsschwankungen der bisher aus *Clostridium histolyticum* gewonnenen Kollagenasen zu verringern. Den Verbesserungen der Isolierung müssen nun biotechnologische Weiterentwicklungen der Reinigungsverfahren folgen, um insbesondere die Ausbeute nach Dichtegradienten-Zentrifugation zu erhöhen. Die in der Vergangenheit wiederholt berichtete unzureichende In-Vitro-Funktion isolierter porziner Langerhans-Inseln ist auch durch die unzureichend analysierten Verfahren der Isolierung und Anreicherung erklärbar. Aufbauend auf den in dieser Arbeit dargestellten und sicher noch nicht optimalen Perifusionskurven sollte sowohl das Verfahren der Perifusion optimiert, als auch der Einfluss weiterer Parameter auf die Insulinausschüttung in vitro analysiert werden.

Ferner sollten die Kulturbedingungen isolierter Langerhans-Inseln zukünftig weiter optimiert werden. Die Zugabe von Nicotinamid zum Kulturmedium bietet einen ersten fruchtbaren Ansatz. Weitere Forschungsanstrengungen erscheinen nötig, um in naher Zukunft eine ausreichende Menge vitaler porciner Langerhans-Inseln für die klinische Inseltransplantation bereitgestellt werden können.

6 Zusammenfassung

Die Transplantation vitaler, isolierter Langerhans-Inseln stellt neben anderen Forschungsansätzen ein attraktives Konzept zur Therapie des insulinabhängigen Diabetes mellitus dar. Durch Verbesserungen der klinischen Inseltransplantation ist mit einer Steigerung des Organbedarfs zu rechnen, dieses Problem könnte durch die Verwendung tierischen Gewebes gelöst werden. Insbesondere das Schwein bietet aufgrund der vergleichbaren Organgrösse, physiologischer Ähnlichkeiten sowie umfangreicher klinischer Erfahrungen mit porzinem Insulin in der Substitutionstherapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus gute Voraussetzungen für eine xenogene Inseltransplantation. Die Isolierung und Anreicherung ausreichend vitaler Langerhans-Inseln aus dem porzinen Pankreas ist bis heute jedoch kein Standardverfahren. Ferner ist eine suffiziente In-Vitro-Funktion des späteren Inseltransplantates nicht regelmässig gewährleistet. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse spenderspezifischer Variablen und deren Einfluss auf das Ergebnis der porzinen Inselisolierung, sowie der Vergleich zweier Verfahren zur Anreicherung der isolierten Langerhans-Inseln mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Abschliessend erfolgten Untersuchungen zur In-Vitro-Funktion der isolierten Langerhans-Inseln. Die wichtigsten Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst:

1. Göttingen Minipigs zeigten unbefriedigende Isolierungsergebnisse. Gute Ergebnisse wurden nach Isolierungen aus jungen Hybridschweinen sowie aus Kreuzungen von Deutscher Landrasse x Pietrain erzielt, sehr gute Ergebnisse mit reinrassigen Duroc-Schweinen sowie 2-3 Jahre alten Zuchtsauen. Es ergaben sich somit Rassen-, bzw. Kreuzungs-spezifische Unterschiede im Hinblick auf die Ergebnisse der porzinen Inselisolierung. Aus dem Vergleich junger und alter Spenderschweine wurde zunächst deutlich, dass 2 Jahre alte Zuchtsauen signifikant bessere Isolierungsergebnisse zeigten als 4-6 Monate alte Hybridschweine.
2. Der Vergleich der Isolierungsergebnisse, die mit vier unterschiedlichen Chargen von Liberase PI, einem speziell für die Isolierung porziner Langerhans-Inseln entwickeltem Enzymgemisch, erzielt wurden, zeigte z.T. erhebliche chargenabhängige Schwankungen der Isolierungsergebnisse. Eine Charge mit unzureichender Qualität konnte durch eine Erhöhung der eingesetzten

Konzentration auf das Niveau einer Charge mit zufriedenstellender Qualität angehoben werden.

3. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass Pankreata von 2-3 Jahre alten Zuchtsauen deutlich häufiger grosse Langerhans-Inseln mit einem Durchmesser $>200 \mu\text{m}$ aufwiesen als 4-6 Monate alte Hybridschweine. Die retrospektive Analyse ergab, dass Inselisolierungen aus Pankreata mit überwiegend grossen Langerhans-Inseln signifikant bessere Isolierungsergebnisse zeigten, als Isolierungen aus Pankreata mit überwiegend kleinen (Durchmesser $50\text{-}200 \mu\text{m}$) Langerhans-Inseln. Dieses gilt sowohl für junge Hybridschweine als auch für alte Zuchtsauen. Unter identischen morphologischen Gegebenheiten jedoch zeigten die Isolierungsergebnisse aus jungen Hybridschweinen und alten Zuchtsauen keine signifikanten Unterschiede.
4. Die Verwendung von Spenderschweinen unterschiedlichen Alters zeigte hinsichtlich Reinheit und Ausbeute nach Dichtegradienten-Zentrifugation keine signifikanten Unterschiede. Mittels OptiPrep-Dichtegradienten-Zentrifugation betrug die Reinheit der Inselpräparation über 80%, die Ausbeute nach Dichtegradienten-Zentrifugation ist jedoch nach wie vor unbefriedigend, auch wenn in Einzelfällen sehr gute Ausbeuten von 100% erzielt werden konnten.
5. Die Viabilität isolierter porziner Langerhans-Inseln betrug in den meisten Fällen 24h nach Isolierung 80%. Berücksichtigt man eine nicht zu umgehende warme Ischämie von 20-30 Minuten, ist dieses Ergebnis äusserst zufriedenstellend.
6. Isolierte porzine Langerhans-Inseln zeigen in der Perifusion mit einem Medium, welches unterschiedliche Glukosekonzentrationen aufwies, eine suffiziente dynamische Insulinausschüttung in vitro. Die Dichte der zu untersuchenden Langerhans-Inseln spielt eine wichtige Rolle für die dynamische Insulinausschüttung in vitro, je weniger Langerhans-Inseln eingesetzt wurden, desto höher war die Insulinsekretion pro Insel. Dies sollte in Zukunft für die Berechnung der zu transplantierenden Inselmenge berücksichtigt werden. Ferner zeigte sich, dass eine Kulturtemperatur von $24 \text{ }^\circ\text{C}$, welche aus immunologischen Gründen bevorzugt wird, keinen negativen Einfluss auf die In-Vitro-Funktion der isolierten Langerhans-Inseln ausübt.

7. Die Kulturbedingungen für isolierte porcine Langerhans-Inseln können durch die Zugabe von Nicotinamid zum Kulturmedium verbessert werden.

Die hier erarbeiteten Ergebnisse bieten insbesondere bezüglich der Wahl des geeigneten Spendertieres einen ganz erheblichen Kenntniszuwachs. Weiterer Forschungsbedarf besteht hinsichtlich des optimalen Enzyms; und auch die Anreicherung der Langerhans-Inseln mittels Dichtegradienten-Zentrifugation benötigt weiterhin biotechnologische Entwicklungsarbeit, um insbesondere die Ausbeute nach Reinigung noch zu verbessern. Die hier dargestellten Ergebnisse bieten dafür essentielle Voraussetzungen. Zukünftig sollten insbesondere die Kulturbedingungen weiter verbessert werden, um die In-Vitro-Funktion der isolierten Langerhans-Inseln zu optimieren. Darauf basierend können in naher Zukunft ausreichende Mengen vitaler porciner Langerhans-Inseln für die xenogene Inseltransplantation zunächst im experimentellen Klein- und Grosstiermodell, und - als Fernziel - im humanen Empfänger zur Verfügung stehen.

7. Literaturverzeichnis

- 1 J. F. Bach. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* 15 (4): 516-542, 1994.
- 2 R. Lendrum, G. Walker, D. R. Gamble. Islet-cell antibodies in juvenile diabetes mellitus of recent onset. *Lancet* 1(7912): 880-882, 1975.
- 3 A. G. Cudworth, G. B. White, J. C. Woodrow, D. R. Gamble, R. Lendrum, A. Bloom. Aetiology of juvenile-onset diabetes. A prospective study. *Lancet* 1(8008): 385-388, 1977.
- 4 T. Wilkin, P. J. Hoskins, M. Armitage, M. Rodier, C. Casey, J.L. Diaz, D. A. Pyke, R. D. Leslie. Value of insulin autoantibodies as serum markers for insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1(8427): 480-481, 1985.
- 5 G. Schernthaner, J. E. Banatvala, W. Scherbaum, J. Bryant, M. Borkenstein, E. Schober, W. R. Mayr. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses, complement-fixing islet-cell antibodies, HLA DR antigens, and C-peptide secretion in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 2(8456): 630-632, 1985.
- 6 C. Y. Pak, H. M. Eun, R. G. McArthur, J. W. Yoon. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 2(8601): 1-4, 1988.
- 7 J. Besse, L. Billaud, F. Battistelli, P. Tric, F. Lestradet. Long term study of mortality and vascular complications in juvenile-onset (type I) diabetes. *Diabetes* 30: 175-179, 1981.
- 8 J. E. Tooke. Microvascular function in human diabetes. A physiological perspective. *Diabetes* 44 (7): 721-726, 1995.
- 9 M. D. Davies. Diabetic retinopathy, diabetes control and blood pressure. *Transplant. Proc.* 18: 1565-1568, 1986.
- 10 C. E. Morgensen, M. W. Steffes, T. Deckert, J. Sandahl-Christiansen. Functional and morphological renal manifestations in diabetes mellitus. *Diabetologia* 21: 89-93, 1981.
- 11 B. F. Clarke, D. J. Ewing, I. W. Campbell. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetologia* 17: 195-212, 1979.

- 12 T. Deckert, J. E. Poulsen. Diabetic neuropathy: Fault or destiny? *Diabetologia* 21: 178-183, 1981.
- 13 M. Brownlew, A. Cerami, H. Vlassara. Advanced glycolisation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* 318: 1315-1321, 1988.
- 14 The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in the insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 329: 977-986, 1993.
- 15 G. Tyden, J. Bolinder, G. Solders, C. Brattström. A. Tibell, C. Groth. Improved survival in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and end-stage diabetic nephropathy 10 years after combined pancreas and kidney transplantation. *Transplantation* 67 (5): 645-648, 1999.
- 16 R. Langraf. Impact of pancreas transplantation on diabetic secondary complications and quality of life. *Diabetologia* 39: 1415-1424, 1996.
- 17 K. F. Federlin, R. G. Bretzel, B. J. Hering. Experimental and clinical islet transplantation. Present status. *Zentralbl. Chir.* 117: 670-676, 1992.
- 18 J. Mellert, B. J. Hering, X. Liu, D. Brandhorst, H. Brandhorst, M. Brendel, E. Ernst, D. Gramberg, R. G. Bretzel, U. T. Hopt. Successful islet auto- and allotransplantation in diabetic pigs. *Transplantation* 66 (2): 200-204, 1998.
- 19 C. T. Spadella, S. A. Schellini, C. E. Bacchi. Pancreas Transplantation versus islet transplantation versus insulin therapy in the prevention of nephropathy in alloxan-induced diabetic rats. *Transplant. Proc.* 30: 327-329, 1998.
- 20 M. Kedingler, K. Haffen, J. Grenier, R. Eloy. In vitro culture reduced immunogenicity of pancreatic endocrine islets. *Nature* 270: 736-738, 1977.
- 21 P. E. Lacy, J. M. Davie, E. H. Finke. Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24°C) and a single injection of ALS. *Science* 204: 312-313, 1979.
- 22 R. P. Lanza, D. H. Butler, K. M. Borland, J. E. Staruk, D. L. Faustman, B. A. Solomon, T. E. Muller, R. G. Rupp, T. Maki, A. P. Monaco. Xenotransplantation of canine, bovine, and porcine islets in diabetic rats without immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88 (24): 11100-11104, 1991.

- 23 R. P. Lanza, W. M. Kühtreiber, D. Ecker, J. E. Staruk, W. L. Chick. Xenotransplantation of porcine and bovine islets without immunosuppression using uncoated alginate microspheres. *Transplantation* 59 (10): 1377-1384, 1995.
- 24 Y. L. Sun, X. Ma, D. Zhou, I. Vacek, A. M. Sun. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J. Clin. Invest.* 98 (6): 1417-1422, 1996.
- 25 L. Chaillous, S. Darquy, S. Maugendre, A. S. Rivereau, G. Reach, P. Sai. Xenografts of porcine islets immunoprotected in hollow fibres reduce the incidence of diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 39 (5): 523-529, 1996.
- 26 K. Jain, S. Asina, H. Yang, E. D. Blount, B. H. Smith, C. H. Diehl, A. L. Rubin. Glucose control and long-term survival in biobreeding/Worcester rats after intraperitoneal implantation of hydrophilic macrobeads containing porcine islets without immunosuppression. *Transplantation* 68 (11): 1693-1700, 1999
- 27 J. F. Begemann, J. M. Pollok, P. M. Kaufmann, D. Kluth, C. E. Broelsch, X. Rogiers. In vitro demonstration of survival and secretory function of islets of langerhans encapsulated with a membrane of tissue-engineered chondrocytes for immunoisolation. *Transplant. Proc.* 31: 3250-3252, 1999.
- 28 R. P. Lanza, R. Jackson, A. Sullivan, J. Ringeling, C. McGrath, W. Kühtreiber, W. L. Chick. Xenotransplantation of cells using biodegradable microcapsules. *Transplantation* 67 (8): 1105-1111, 1999.
- 29 M. Brendel, B. J. Hering, A. O. Schultz, R. G. Bretzel. The International Islet Transplant Registry. Justus-Liebig-Universität, Giessen. Newsletter No. 9, 8(1):1-20, 2000.
- 30 E. A. Ryan, J. R. T. Lakey, R. V. Rajotte, G. S. Korbitt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J. F. Elliot, D. Bigam, N. M. Kneteman, G. L. Warnock, I. Larsen, A. M. J. Shapiro. Islet Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 50(4): 710-719, 2001.
- 31 S. Moskalewski. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen. Comp. Endocrinol.* 5: 342-353, 1965.
- 32 P. E. Lacy, M. Kostianovsky. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39, 1967.

- 33 D. W. Scharp, J. J. Murphy, W. T. Newton, W. F. Ballinger, E. T. Lacy. Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys. *Surgery* 77: 100-105, 1975.
- 34 C. Ricordi, C. Socci, A. M. Davalli, C. Staudacher, P. Baro, A. Vertova, I. Sassi, F. Gavazzi, G. Pozza, Carlo Di, V. Isolation of the elusive pig islet. *Surgery* 107 (6): 688-694, 1990.
- 35 C. Ricordi, C. Socci, A. M. Davalli, C. Staudacher, A. Vertova, P. Baro, I. Sassi, S. Braghi, N. Guizzi, G. Pozza. Application of the automated method to islet isolation in swine. *Transplant. Proc.* 22 (2): 784-785, 1990.
- 36 C. Ricordi, C. Rastellini. Automated method for pancreatic islet separation. In: C. Ricordi (Ed). *Methods in Cell Transplantation*. R. G. Landes Company, Austin (USA); p.433-438, 1995.
- 37 F. Pattou, J. Kerr-Conte, C. Hober, M. C. Vantyghem, J. Petit, J. Lefebvre, C. Proye. Mass isolation of human islets of Langerhans favored by the prior development of a semiautomatic technique in the pig model. *Transplant. Proc.* 27 (2): 1751-1752, 1995.
- 38 P. R. Johnson, S. A. White, N. J. London. Collagenase and human islet isolation. *Cell Transplant.* 5 (4): 437-452, 1996.
- 39 D. Brandhorst, H. Brandhorst, M. Brendel, R. G. Bretzel. Problems of islet isolation from the human and porcine pancreas for islet transplantation into men. *Zentralbl. Chir.* 123 (7): 814-822, 1998.
- 40 D. Brandhorst, H. Brandhorst, B. J. Hering, K. Federlin, R. G. Bretzel. Islet isolation from the pancreas of large mammals and humans: 10 years of experience. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 103 Suppl 2: 3-14, 1995.
- 41 R. Calafiore, F. Calcinaro, G. Basta, M. Pietropaolo, A. Falorni, M. Piermattei, P. Brunetti. A method for the massive separation of highly purified, adult porcine islets of Langerhans. *Metabolism* 39 (2): 175-181, 1990.
- 42 P. Marchetti, E. H. Finke, A. Gerasimidi-Vazeou, L. Falqui, D. W. Scharp, P. E. Lacy. Automated large-scale isolation, in vitro function and xenotransplantation of porcine islets of Langerhans. *Transplantation* 52 (2): 209-213, 1991.

- 43 E. Finke, P. Marchetti, L. Falqui, C. Swanson, M. McLear, B. Olack, D. Scharp, P. Lacy. Large scale isolation, function, and transplantation of islets of Langerhans from the adult pig pancreas. *Transplant. Proc.* 23 (1): 772-773, 1991.
- 44 T. Yamaguchi, Y. Mullen, Y. Watanabe, Y. Nomura, D. Cass, C. Brunicardi. Isolation and function of islets from young adult pig pancreas. *Transplant. Proc.* 24 (3): 1010-1012, 1992.
- 45 P. Toomey, D. R. Chadwick, H. Contractor, P. R. Bell, R. F. James, N. J. London. Porcine islet isolation: prospective comparison of automated and manual methods of pancreatic collagenase digestion. *Br. J. Surg.* 80 (2): 240-243, 1993.
- 46 P. Marchetti, R. Giannarelli, G. Villani, M. Andreozzi, L. Cruschelli, S. Cosimi, P. Viacava, A. di Carlo, R. Navalesi, G. Bevilacqua. Collagenase distension, two-step sequential filtration, and histopaque gradient purification for consistent isolation of pure pancreatic islets from the market-age (6-month-old) pig. *Transplantation* 57 (10): 1532-1535, 1994.
- 47 R. Giannarelli, P. Marchetti, G. Villani, A. di Carlo, S. Cosimi, M. Andreozzi, L. Cruschelli, P. Masiello, A. Coppelli, R. Navalesi. Preparation of pure, viable porcine and bovine islets by a simple method. *Transplant. Proc.* 26 (2): 630-631, 1994.
- 48 G. Villani, P. Marchetti, R. Giannarelli, L. Cruschelli, M. Andreozzi, S. Cosimi, R. Navalesi. Comparison of different digestion techniques and density gradient purification procedures to prepare viable pancreatic islets from market age pigs. *Transplant. Proc.* 26 (2): 621-622, 1994.
- 49 L. Bühler, S. Deng, R. Mage, C. Bubloz, A. Rohner, P. Morel. Pig islet isolation: new aspects. *Transplant. Proc.* 26 (2): 628-629, 1994.
- 50 P. Prevost, E. Rolland, C. Veriot, C. Collier, E. Muscat. Large-scale isolation of porcine pancreatic islets: significant improvement of the process. *Transplant. Proc.* 27 (6): 3396-3398, 1995.
- 51 M. Miyamoto, K. Inoue, Y. Gu, T. Tun, W. Cui, I. Fujiwara, H. Ohyanagi, H. Hayashi, T. Yamazaki, H. Setoyama, Y. Kawakami, J. Ida, M. Kogire, M. Imamura, H. Iwata, Y. Ikada. Improved large-scale isolation of breeder porcine islets: possibility of harvesting from nonheart-beating donor. *Cell Transplant.* 7 (4): 397-402, 1998.

- 52 W. Cui, Y. Gu, M. Miyamoto, M. Tanaka, B. Xu, M. Imamura, H. Iwata, Y. Ikada, K. Inoue. Novel method for isolation of adult porcine pancreatic islets with two-stage digestion procedure. *Cell Transplant.* 8 (4): 391-398, 1999.
- 53 J. R. T. Lakey, G. L. Warnock, M. Brierton, Z. Ao, B. J. Hering, N. J. M. London, C. Ricordi, F. Corbin, R. V. Rajotte. Development of an automated computer-controlled islet isolation system. *Cell Transplant.* 6 (1): 47-57, 1997.
- 54 A. Heiser, K. Ulrichs, W. Müller-Ruchholtz. Influence of porcine strain, age, and pH of the isolation medium on porcine pancreatic islet isolation success. *Transplant. Proc.* 26 (2): 618-620, 1994.
- 55 K. Ulrichs, M. Bosse, A. Heiser, V. Eckstein, H.-H. Wacker, A. Thiede, W. Müller-Ruchholtz. Histomorphological characteristics of the porcine pancreas as a basis for the isolation of islets of Langerhans. *Xenotransplantation* 2: 176-187, 1995.
- 56 K. Ulrichs, A. Heiser. Recent approaches to the isolation of adult porcine islets of Langerhans. In: D. K. C. Cooper, E. Kemp, J. L. Platt, D. J. White (Eds.). *Xenotransplantation. The transplantation of organs and tissue between species.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, p.565-579, 1997.
- 57 T. Meyer, C. Bühler, S. Debus, U. Beutner, C. Otto, W. Timmermann, N. Tsapenko, W. Hamelmann, A. Thiede, K. Ulrichs. Traumatized pigs are unsuitable as organ donors for pancreatic islet isolation. *Transplant. Proc.* 30 (5): 2475-2477, 1998.
- 58 E. Linetsky, G. Selvaggi, R. Bottino, S. S. Kong, T. Qian, R. Alejandro, C. Ricordi. Comparison of Collagenase Type P and Liberase during human islet isolation using the automated method. *Transplant. Proc.* 27 (6): 3264, 1995.
- 59 P. T. R. van Suylichem, P. R. V. Johnson, G. H. Vos-Scheperkeuter, M. W. A. Vonk, D. L. Roberts, N. J. M. London, R. van Schilfgaarde. Purified enzymes in pig pancreas dissociation for islet isolation: preliminary observations. *Xenotransplantation* 2: 172-175, 1995.
- 60 G. Klöck, M. B. Kowalski, B. J. Hering, M. E. Eiden, A. Weidemann, S. Langer, U. Zimmermann, K. Federlin, R. G. Bretzel. Fractions from commercial collagenase preparations: use in enzymic isolation of the islets of Langerhans from porcine pancreas. *Cell Transplant.* 5 (5): 543-551, 1996.

- 61 G. Villani, P. Marchetti, L. Giusti, R. Giannarelli, M. Andreozzi, L. Cruschelli, C. Martini, S. Cosimi, A. Lucacchini, R. Navalesi. Optimization of the use of collagenase in porcine islet isolation. *Transplant. Proc.* 26 (3): 1125-1126, 1994.
- 62 D. Zhou, B. Yang, Y. Sun, I. Vacek, A. M. Sun. Effects of collagenase concentration on the purity and viability of isolated porcine pancreatic islets for use in xenotransplantation studies. *Xenotransplantation* 3: 11-17, 1996.
- 63 H. H. Contractor, P. R. Johnson, D. R. Chadwick, G. S. Robertson, N. J. London. The effect of UW solution and its components on the collagenase digestion of human and porcine pancreas. *Cell Transplant.* 4 (6): 615-619, 1995.
- 64 S. A. White, H. H. Contractor, D. P. Hughes, P. R. Johnson, H. A. Clayton, P. R. Bell, N. J. London. Influence of different collagenase solvents and timing of their delivery on porcine islet isolation. *Br. J. Surg.* 83 (10): 1350-1355, 1996.
- 65 S. A. White, D. P. Hughes, H. H. Contractor, P. R. Johnson, H. A. Clayton, P. R. Bell, N. J. London. The intraductal administration of collagenase in University of Wisconsin solution at the time of harvesting significantly improves porcine islet isolation. *Transplant. Proc.* 27 (6): 3366, 1995.
- 66 H. Brandhorst, D. Brandhorst, B. J. Hering, R. G. Bretzel. Significant progress in porcine islet mass isolation utilizing liberase HI for enzymatic low-temperature pancreas digestion. *Transplantation* 68 (3): 355-361, 1999.
- 67 N. J. London, G. S. M. Robertson, D. R. Chadwick, R. F. L. James, P. R. F. Bell. Adult islet purification. In: C. Ricordi (Ed). *Methods in Cell Transplantation*. R. G. Landes Company, Austin (USA); p.439-454, 1995.
- 68 K. Ulrichs, W. Hamelmann, C. Bühler, U. Beutner, T. Meyer, C. Otto, G. Klöck, A. Thiede. Transplantation of porcine pancreatic islets for therapy of diabetes type I. The way to clinical application. *Zentralbl. Chir.* 124 (7): 628-635, 1999.
- 69 J. Tollemar, C. G. Groth, O. Korsgren, A. Anderson, M. Blombäck, P. Olsson. Injection of xenogenic endocrine pancreatic tissue into the portal vein – effects on coagulation, liver function, and hepatic hemodynamics. A study in the pig-to-dog model. *Transplantation* 53 (1): 139-142, 1992.
- 70 D. W. R. Gray, P. J. Morris. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. *Stain Technology* 62 (6): 373-381, 1987.

- 71 R. G. Bretzel, B. J. Hering, and K. F. Federlin. Assessment of adult islet preparations. In: C. Ricordi Ed). *Methods in Cell Transplantation*. R. G. Landes Company, Austin (USA); p.455-463, 1995.
- 72 G. L. Warnock, D. Ellis, R. V. Rajotte, I. Dawidson, S. Baekkeskov, J. Egebjerg. Studies of the isolation and viability of human islets of Langerhans. *Transplantation* 45 (5): 957-963, 1988.
- 73 M. A. Holmes, H. A. Clayton, D. R. Chadwick, P. R. Bell, N. J. London, R. F. James. Functional studies of rat, porcine, and human pancreatic islets cultured in ten commercially available media. *Transplantation* 60 (8): 854-860, 1995.
- 74 A. M. Davalli, F. Bertuzzi, C. Socci, L. Scaglia, F. Gavazzi, M. Freschi, V. DiCarlo, A. E. Pontiroli, G. Pozza. Paradoxical release of insulin by adult pig islets in vitro. Recovery after culture in a defined tissue culture medium. *Transplantation* 56 (1): 148-154, 1993.
- 75 P. Marchetti, D. W. Scharp, K. Pfiffner, C. J. Swanson, E. H. Finke, B. J. Olack, A. Gerasimidi-Vazeou, M. McLearn, P. E. Lacy. Cryogenic storage of isolated, purified porcine pancreatic islets. *Transplantation* 57 (3): 340-346, 1994.
- 76 S. Deng, L. Bühler, E. Anderegg, R. Mage, D. Janjic, C. B. Wollheim, A. Rohner, P. Morel. Islet isolation from slaughterhouse pig pancreata: evidence of in vitro and in vivo function. *Transplant. Proc.* 26 (6): 3396-3398, 1994.
- 77 A. Heiser. Reindarstellung der Langerhans-Inseln aus dem Pankreas von Schweinen und ihre immunbiologische Charakterisierung. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 1994.
- 78 Z. A. Latif, J. Noel, R. Alejandro. A simple method of staining fresh and cultured islets. *Transplantation* 45 (4): 827-830, 1988.
- 79 M. P. van der Burg, I. Basir, E. Bouwman. No porcine islet loss during density gradient purification in a novel iodixanol in University of Wisconsin solution. *Transplant. Proc.* 30 (2): 362-363, 1998.
- 80 C. Socci, C. Ricordi, A. M. Davalli, C. Staudacher, P. Baro, A. Vertova, M. Freschi, F. Gavazzi, S. Braghi, G. Pozza. Selection of donors significantly improves pig islet isolation yield. *Horm. Metab. Res.* 25: 32-34, 1990.

- 81 N. Kirchoff, B. J. Hering, V. Geiss, K. Federlin, R. G. Bretzel. Evidence for breed-dependent differences in porcine islets of Langerhans. *Transplant. Proc.* 26 (2): 616-617, 1994.
- 82 D. Drenckhahn, K. Fleischhauer. Bauchspeicheldrüse. In: D. Drenckhahn, W. Zenker (Ed). Benninghof Anatomie (Band1, 15. Auflage). Urban & Schwarzenberg, München; p.927-938, 1994.
- 83 G. Löffler. Vitamine. In: G. Löffler, P. E. Petrides (Ed). Biochemie und Pathobiochemie (5. Auflage). Springer Berlin; p.647-676, 1997.
- 84 D. L. Eizirik, S. Sandler, N. Welsh, K. Bendtzen, C. Hellerstrom. Nicotinamide decreases nitric oxide production and partially protects human pancreatic islets against the suppressive effects of combinations of cytokines. *Autoimmunity* 19(3): 193-198, 1994.
- 85 D. Brandhorst, B. J. Hering, H. Brandhorst, K. Federlin, R. G. Bretzel. Influence of donor data and organ procurement on human islet isolation. *Transplant. Proc.* 26: 592-593, 1994.
- 86 T. Meyer, S. Czub, I. Chodnewska, U. Beutner, W. Hamelmann, G. Klöck, U. Zimmermann, A. Thiede, K. Ulrichs. Expression pattern of extracellular matrix proteins in the pancreas of various domestic pig breeds, the Goettingen Minipig and the Wild Boar. *Ann. Transplant.* 2 (3): 17-26, 1997.
- 87 G. H. Wolters, G. H. Vos-Scheperkeuter, J. H. van Deijnen, R. van Schilfgaarde. An analysis of the role of collagenase and proteinase in the enzymatic dissociation of the rat pancreas for islet isolation. *Diabetologia* 35: 735-742, 1992.
- 88 S. A. White, H. Djaballah, D. P. Hughes, D. L. Roberts, H. H. Contractor, S. Pathak, N. J. London. A preliminary study of the activation of endogenous pancreatic exocrine enzymes during automated porcine islet isolation. *Cell Transplant.* 8(3): 265-276, 1999.
- 89 J. J. O'Neil, J. P. Stegemann, D. T. Nicholson, K. A. Gagnon, B. A. Solomon, C. J.-P. Mullon. The isolation and function of porcine islets from market weight pigs. *Cell Transplant.* 10: 235-246, 2001
- 90 F. Hesse, H. Butscher, F. Popp, D. Ambrosius. Recombinant enzymes for islet isolation: Purification of a collagenase from *Clostridium histolyticum* and cloning/expression of the gene. *Transplant. Proc.* 27(6): 3287-3289, 1995.

- 91 K. Ulrichs, M. Bosse, H.-H. Wacker, W. Müller-Ruchholtz. Histologic analysis of the porcine pancreas to improve islet yield and integrity after collagenase digestion. *Transplant. Proc.* 26 (2): 610-612, 1994.
- 92 D. Brandhorst, B. J. Hering, H. Brandhorst, N. Kirchoff, V. Dzapo, F. Federlin, R. G. Bretzel. Dietary treatment with soybean oil improves porcine islet culture and reduces islet immunogenicity. *Transplant. Proc.* 26(2): 613, 1994.
- 93 M. Krickhahn, T. Meyer, C. Bühler, A. Thiede, K. Ulrichs. Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation: Numbers, Purity, Yield and in vitro function. *Ann. Transplant.* 6 (3): 48-54, 2001.
- 94 C. Ricordi, E. H. Finke, P. E. Lacy. Method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. *Diabetes* 35: 649, 1986.
- 95 S. A. White, D. P. Hughes, H. H. Contractor, N. J. London. An investigation into the distribution of different collagen types within adult and juvenile porcine pancreata. *J. Mol. Med.* 77 (1): 79-82, 1999.
- 96 L. G. Weide, M. Damon-Burke, P. I. Warkentin. Semiclosed system for human and porcine islet isolation using the COBE 2991 cell processor with the triple-bag processing sets. *Transplant. Proc.* 26 (2): 608-609, 1994.
- 97 M. P. van der Burg, I. Basir, R. P. Zwaan, E. Bouwman. Porcine islet preservation during isolation in University of Wisconsin solution. *Transplant. Proc.* 30 (2): 360-361, 1998.
- 98 P. Rorsman, L. Eliasson, E. Renström, J. Gromada, S. Barg, S. Göpel. The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News Physiol. Sci.* 15: 72-77, 2000.
- 99 B. Draznin, M. Goodman, J. W. Leitner, K. E. Sussman. Feedback inhibition of insulin on insulin secretion in isolated pancreatic islets. *Endocrinology* 118(3): 1054-1058, 1986.
- 100 P. Marchetti, D. W. Scharp, M. McLearn, E. H. Finke, B. Olack, C. Swanson, R. Giannarelli, R. Navalesi, P. E. Lacy. Insulin inhibits its own secretion from isolated, perfused human pancreatic islets. *Acta Diabetol.* 32(2): 75-77, 1995.
- 101 D. Brandhorst, H. Brandhorst, B. J. Hering, R. G. Bretzel. Long-term survival, morphology and in vitro function of isolated pig islets under different culture conditions. *Transplantation* 67 (12): 1533-1541, 1999.

- 102 H. Ohgawara, T. Shikano, K. Fukunaga, M. Yamagishi, S. Miyazaki. Establishment of monolayer culture of pig pancreatic endocrine cells by use of nicotinamide. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 42(1): 1-8, 1998.
- 103 C. D. Ching, R. C. Harland, B. H. Collins, W. Kendall, H. Hobbs, E. C. Opara. A reliable method for isolation of viable porcine islet cells. *Arch. Surg.* 136: 276-279, 2001.
- 104 D. Brandhorst, H. Brandhorst, A. Zwolinski, F. Nahidi, R. G. Bretzel. High-dose nicotinamide decreases early graft failure after pig to nude rat intraportal islet transplantation. *Transplantation* 73(1): 74-79, 2002.

Anhang – Einzelergebnisse

Tab. 4: Isolierungsergebnisse

Dargestellt sind die IEQ/g Organ unmittelbar nach enzymatischer Gewebedigestion. Es wurden Pankreata aus unterschiedlichen Spendertieren verwendet: Göttinger Miniaturschweine (GMS), Duroc-Schweine (DU), Kreuzungen aus Deutscher Landrasse und Pietrain (DL x PI), junge Hybridschweine (HY) und alte Zuchtsauen (ZS).

Rasse	Isolierungsnummer	IEQ/g	Rasse	Isolierungsnummer	IEQ/g
GMS	1	72	HY	60	1.151
GMS	2	111	HY	61	1.462
GMS	3	153	HY	62	2.270
DU	15	5.725	HY	64	1.903
DU	33	3.056	HY	75	4.274
DL x PI	32	1.428	HY	76	2.983
DL x PI	35	1.847	HY	77	6.080
DL x PI	55	5.771	HY	79	1.252
DL x PI	98	417	HY	80	1.238
HY	4	345	HY	81	1.024
HY	5	6.032	HY	82	1.531
HY	6	5.606	HY	84	3.173
HY	7	4.197	HY	85	3.765
HY	8	2.607	HY	86	1.131
HY	9	3.780	HY	87	2.258
HY	10	3.866	HY	88	961
HY	11	4.754	HY	89	3.487
HY	17	4.843	HY	90	3.287
HY	19	2.267	HY	92	2.194
HY	21	2.218	HY	93	1.488
HY	22	1.597	HY	99	15.121
HY	23	1.972	HY	101	2.651
HY	24	2.327	HY	104	5.378
HY	25	1.589	HY	105	1.996
HY	27	3.604	ZS	16	10.866
HY	28	3.845	ZS	18	2.239
HY	29	1.457	ZS	20	2.953
HY	30	1.551	ZS	26	3.304
HY	31	3.087	ZS	38	3.798

Rasse	Isolierungsnummer	IEQ/g	Rasse	Isolierungsnummer	IEQ/g
HY	34	3.225	ZS	46	1.993
HY	36	3.023	ZS	48	7.520
HY	37	3.581	ZS	63	12.822
HY	39	2.434	ZS	65	7.648
HY	40	1.473	ZS	66	4.987
HY	41	1.715	ZS	67	6.053
HY	42	2.056	ZS	68	4.500
HY	43	1.514	ZS	69	1.070
HY	44	1.181	ZS	70	330
HY	45	1.792	ZS	71	10.476
HY	47	3.948	ZS	72	3.394
HY	49	1.897	ZS	74	4.939
HY	50	3.482	ZS	91	1.620
HY	51	1.148	ZS	94	7.372
HY	52	2.681	ZS	95	1.330
HY	53	3.125	ZS	96	1.790
HY	54	6.619	ZS	97	1.701
HY	56	2.877	ZS	100	7.558
HY	57	2.064	ZS	102	719
HY	58	1.393	ZS	103	9.166
HY	59	1.615			

Tab. 5: Zusammenfassung der Isolierungsergebnisse

Es wurden 99 Isolierungen aus Pankreata unterschiedlicher Spendertiere durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Isolierungsergebnisse für die einzelnen Rassen.

	GMS	DU	DL x PI	HY	ZS
n	3	2	4	65	25
IEQ/g	112 \pm 41	4.391 \pm 1.888	2.366 \pm 2.348	2.868 \pm 2.065	4.806 \pm 3.454

Tab. 6: Zusammenfassung der Isolierungsergebnisse aus HY

Es wurden 65 Isolierungen aus jungen Hybridschweinen durchgeführt. Dargestellt sind die Anzahl und der prozentuale Anteil von Isolierungen mit einem definierten Isolierungsergebnis.

Isolierungsergebnis [IEQ/g]	< 1.000	1.000 - 3.999	> 4.000
Anzahl Isolierungen	2	53	10
Isolierungen [%]	4	82	15

Tab. 7: Zusammenfassung der Isolierungsergebnisse aus ZS

Es wurden 25 Isolierungen aus alten Zuchtsauen durchgeführt. Dargestellt sind die Anzahl und der prozentuale Anteil von Isolierungen mit einem definierten Isolierungsergebnis.

IEQ/g Organ	< 1.000	1.000 - 3.999	> 4.000
Anzahl Isolierungen	2	11	12
Isolierungen [%]	8	44	48

Tab. 8: Isolierungen mit unterschiedlichen Liberase PI-Chargen

Dargestellt sind die Anzahl der Versuche, die verwendeten Enzymkonzentrationen in mg/ml und in mg/g eingesetztes Organ sowie die Isolierungsergebnisse (IEQ/g). Dabei wurde zwischen Isolierungen aus jungen Hybridschweinen (HY) und Isolierungen aus alten Zuchtsauen (ZS) differenziert.

	Chargen- nummer	84582830	84658520	851530-20	85195820
HY	n	31	14	12	7
	Konzentration [mg/ml]	0,51 ± 0,03	0,37 ± 0,09	0,54 ± 0,25	1,09 ± 0,57
	Konzentration [mg/g Organ]	0,70 ± 0,39	0,65 ± 0,10	0,79 ± 0,32	1,38 ± 0,95
	IEQ/g Organ	2.822 ± 1.357	2.406 ± 1.365	2.473 ± 1.549	4.801 ± 4.363
ZS	n	9	7	3	8
	Konzentration [mg/ml]	0,41 ± 0,09	0,35 ± 0,16	0,33 ± 0,09	0,76 ± 0,22
	Konzentration [mg/g Organ]	0,50 ± 0,00	0,45 ± 0,12	0,47 ± 0,07	1,14 ± 0,29
	IEQ/g Organ	4.124 ± 2.769	5.164 ± 3.972	2.089 ± 2.020	3.907 ± 3.248

Tab. 9: Reinigung der Inselpräparationen

Dargestellt sind die Inseläquivalente vor sowie Ausbeute und Reinheit nach Dichtegradienten-Zentrifugation. Dabei wurde zwischen Versuchen mit jungen Hybridschweinen (HY) und Versuchen mit alten Zuchtsauen (ZS) differenziert.

	Ficoll COBE		OptiPrep manuell		OptiPrep COBE	
	HY	ZS	HY	ZS	HY	ZS
n	28	5	6	5	11	8
IEQ gesamt vor Reinigung	230.739 ± 105.838	539.904 ± 507.189	110.985 ± 69.782	266.513 ± 238.792	190.010 ± 186.436	261.681 ± 232.269
IEQ gesamt nach Reinigung	71.823 ± 55.310	146.724 ± 125.114	36.389 ± 18.825	125.954 ± 114.589	73.535 ± 63.359	99.829 ± 78.788
IEQ/g vor Reinigung	2.785 ± 1.298	6.535 ± 4.926	2.809 ± 1.869	4.876 ± 3.104	3.491 ± 3.796	3.907 ± 3.248
IEQ/g nach Reinigung	871 ± 686	1.736 ± 1.432	890 ± 455	2.217 ± 1.498	1.336 ± 1.206	1.444 ± 1.230
Ausbeute [%]	36 ± 32	48 ± 51	36 ± 14	47 ± 16	47 ± 30	42 ± 16
Reinheit [%]	62 ± 12	73 ± 17	81 ± 12	77 ± 17	86 ± 7	84 ± 15

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Experimentelle Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Klinik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. K. Ulrichs angefertigt. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großzügige finanzielle Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik, bedanken.

Für die Vergabe des Themas, die konstruktive Betreuung und Unterstützung sowie die aus zahlreichen Diskussionen hervorgegangenen Anregungen bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. K. Ulrichs.

Mein besonderer Dank gilt Frau I. Chodnewska und Herrn A. Engel für die hervorragende technische und sehr freundschaftliche Zusammenarbeit, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Im Übrigen möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantations-Immunologie danken, die mir jederzeit mit ihrer Hilfe unterstützend zur Seite standen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Mareike Krickhahn
Geburtsdatum	26. November 1975
Geburtsort	Neumünster
Familienstand	ledig, keine Kinder

Schul Ausbildung

08/1982 – 06/1986	Grundschule, Neumünster
08/1986 – 06/1995	Gymnasium, Neumünster <i>Abitur</i> mit der Durchschnittsnote 1,9, Leistungskurse: Mathematik und Chemie
07/1994	Teilnahme an der Bundesschülerakademie in der Schule Schloss Salem, Verein Bildung und Begabung e.V.

Hochschulausbildung

WS 1995/96 – SS 1997	Vorklinisches Studium an der Medizinischen Universität Lübeck
08/1997	<i>Physikum</i> mit der Note befriedigend (2,66)
WS 1997/98 – WS 2000/01	Klinisches Studium an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg
03/1999	<i>Erstes Staatsexamen</i> mit der Note gut (2,0)
03/2001	<i>Zweites Staatsexamen</i> mit der Note gut (1,66)
SS 2001 – WS 2001/02	Praktisches Jahr (Dermatologie, Chirurgie, Innere Medizin)
05/2002	<i>Drittes Staatsexamen</i> mit der Note gut (2,0)

Praktische Erfahrungen

08/1998 - 09/1998	Famulatur: Chirurgie, Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster unter der Leitung von Prof. Dr. med. E. Deltz
04/1999	Famulatur: Gynäkologie, Praxis für Gynäkologie und Geburtshilfe, Dr. med. B. Fischer, Würzburg

- 09/1999 Famulatur: Chirurgie, Department of Vascular and Transplant Surgery, Southmead Hospital, Bristol, U.K. unter der Leitung von P. Lear, M.D.
- 08/2000 – 10/2000 Famulatur: Plastische Chirurgie, Department of Plastic Brigham and Women's Hospital, Boston, U.S.A. unter der Leitung von Prof. E. Eriksson, M.D., PhD.
- 04/2001 – 08/2001 1. Tertial des Praktischen Jahres, Dermatologie, Universitäts-Hautklinik, Würzburg
- 08/2001 – 12/2001 2. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Chirurgische Universitätsklinik und Poliklinik, Würzburg
- 12/2001 – 03/2002 3. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Medizinische Universitätsklinik, Würzburg sowie Department of Nephrology and Transplantation, Guy's Hospital, London, U.K.
- Seit 07/2002 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum an der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik, Würzburg

Würzburg, Oktober 2003