

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral und
Transplantationschirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer**

**Die Anwendung der Volumenbestimmung und
der Flächendichtemessung zur Bestimmung der
Inselzelldosis für die Inselzelltransplantation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Hans-Michael Hau
aus
Laupheim**

2010

Dekan:

Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1.Berichterstatter:

Privatdozent Dr. W. Steuerer

2.Berichterstatter:

Professor Dr. H.-U. Häring

1. EINLEITUNG	6
1.1 Physiologische Regulation des Blutzuckerspiegels durch Insulin	6
1.1.1 Aufbau und Funktion der Langerhans´schen Inseln	6
1.2 Diabetes Mellitus	9
1.2.1 Definition	9
1.2.2 Epidemiologie.....	9
1.2.3 Formen des Diabetes Mellitus	10
1.3 Therapie des Diabetes Mellitus Typ I	13
1.3.1 Patientenschulung.....	13
1.3.2 Ernährung	13
1.3.3 Medikamente.....	15
1.4 Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus Typ I.....	17
1.4.1 Mikroangiopathie	17
1.4.1.1 Diabetische Retinopathie	17
1.4.1.2 Diabetische Nephropathie.....	18
1.4.2 Diabetische Neuropathie	18
1.4.3 Diabetisches Fußsyndrom.....	19
1.4.4 Makroangiopathie.....	20
1.5. Pankreastransplantation zur Wiederherstellung der körpereigenen Insulinsekretion.....	20
1.6 Inselzelltransplantation zur Wiederherstellung der körpereigenen Insulinsekretion.....	23

1.6.1	Entwicklung der Technik:	23
1.7	Verfahren zur Bestimmung der Inselzellmasse	35
1.7.1	Volumenbestimmung.....	35
1.7.2	Flächendichtemessung	39
1.8	Ziele und Fragestellungen der Arbeit.....	43
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	46
2.1	Das Schwein als Versuchstier	46
2.2	Geräte	48
2.2.1	Schweineinselgewinnung und Purifikation	48
2.3	Chemikalien.....	48
2.3.1	Schweineinselgewinnung, Purifikation und Perfusion	49
2.4	Lösungen zur Schweineinselzellgewinnung	49
2.5	Isolierung der Inselzellen.....	50
2.6	Quantifizierung der Inselausbeute	52
3.	ERGEBNISSE	58
3.1	Gedankenexperiment	58
3.1.1	Bestimmung der Häufigkeitsverteilung der Inselzellen	60
3.2	Praktischer Teil	64
3.2.1	Bestimmung der Inselausbeute	64
3.2.2	Vergleich der Volumenbestimmung mit der Flächendichtemessung .	70

3.2.3	Betrag an IEQ pro Größenklassen mittels Volumenbestimmung	73
3.2.4	Betrag an IEQ pro Größenklassen mittels Flächendichtemessung ...	74
4.	DISKUSSION.....	80
4.1	Volumenbestimmung	82
4.2	Flächendichtemessung	84
4.3	Vergleich der Volumenbestimmung und der Flächendichtemessung im Rechenbeispiel.....	85
4.4.	Die Häufigkeitsverteilung als Korrekturfaktor zwischen beiden Auswertmethoden	87
4.4.1	Einfluss von Spenderalter und Ort der Inseln im Pankreas auf die Häufigkeitsverteilung der Inselzellen	88
4.5	Einschränkung der Anwendbarkeit der Flächendichtemessung in der Praxis	90
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	92
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
7.	LITERATURVERZEICHNIS:	96

1. Einleitung

1.1 Physiologische Regulation des Blutzuckerspiegels durch Insulin

1.1.1 Aufbau und Funktion der Langerhans'schen Inseln

1869 entdeckte der deutsche Medizinstudent *Paul Langerhans*, ein Schüler von Rudolf Virchow, im Pankreas der Ratte blasse eigenartige Zellpopulationen, welche später Langerhans'sche Inseln genannt wurden und die Einteilung des Pankreas in einen endokrinen und exokrinen Anteil begründet haben (*Langerhans 1869, Bretzel 2007*).

Die ca. 1 Million Inseln im menschlichen Pankreas mit einem Durchmesser von 50 bis 500 μm machen nur knapp 1% des Gesamtvolumens des Pankreasgewebes aus (*Hedeskov 1980, Weir 1990*). Die meisten Inselzellen sind durch eine aus Fibrozyten und dünnen kollagenen Fasern bestehende Bindegewebsschicht vom exokrinen Pankreas abgegrenzt (*Bauer 1988, Diehl 1997*). *Bunag und Warner* sprechen von verdichteten Gitterfasern, welche sich in der Grenzzone zum exokrinen Gewebe befinden und so eine Art Pseudokapsel um die Inselzellen bilden. Diese Kapsel stellt ein wichtiges Gerüstsystem für den Isolationsvorgang der Inselzellen dar (*Bunag 1963*). Der Rest des Organs wird vom exokrinen Anteil gebildet, dessen Aufgabe es ist, Verdauungsenzyme zu produzieren und über den Ductus pancreaticus in das Duodenum abzugeben.

Die Inseln liegen im exokrinen Pankreasgewebe und bestehen aus wenigen bis tausend Einzelzellen (*Hellman 1964*). Die Langerhans'sche Inseln sind aus 4 unterschiedlichen Zellen zusammengesetzt, deren Aufgabe es ist jeweils unterschiedliche Hormone zu produzieren. Der Hauptanteil mit ca. 80% stellen die β -Zellen dar, welche in der Mitte der Insel liegen und das Hormon Insulin sezernieren. Die Glukagon-produzierenden α -Zellen zählen anteilig ca. 15% und liegen in der Peripherie. Ebenfalls peripher liegen die Somatostatin-ausschütten-

den δ -Zellen mit einem Anteil von 5%. Zu guter Letzt gibt es noch die γ -Zellen mit einem Anteil von ca. 1%, welche das pankreatische Polypeptid (PP) sezernieren (*Ashcroft 1989*).

Auf Grund der vielfältigen Wechselwirkungen zwischen endo- und exokrinem Pankreasgewebe, welches auch als insulo-azinäre Achse bezeichnet wird, kommt den Gefäßverhältnissen innerhalb der Pankreasläppchen eine besondere Bedeutung zu. So befindet sich innerhalb der Inselzelle ein dichtes Netzwerk an Blutkapillaren (Sinusoide), worüber aufgenommene Nährstoffe schnell in die Inselzelle hintransportiert und ausgeschüttete Hormone abtransportiert werden können. Über die Blutversorgung der Inselzelle gibt es eine Vielzahl von Modellen. Das derzeit am häufigsten Vertretene geht davon aus, dass die Blutversorgung des endokrinen Pankreas aus eins bis fünf Arteriolen besteht, die sich in die oben beschriebenen Kapillaren verzweigen und so ein dichtes kugelförmiges Netzwerk bilden, das strukturell und funktionell einem Glomerulus gleicht. Dabei erreicht der arterielle Blutstrom zuerst die im Kern lokalisierten β -Zellen. Dann erfolgt eine Aufteilung in die Kapillaren, welche den Inselmantel versorgen. Zuletzt erfolgen erst die Versorgung der in der Peripherie gelegenen α - und β -Zellen (*Samols 1988, Menger 1994, Ballian 2007*).

Die vier unterschiedlichen Zellgruppen des Pankreas stehen zusätzlich parakrin miteinander in Kontakt und beeinflussen sich so gegenseitig. So schütten die β -Zellen je nach Blutzuckerspiegel Insulin aus, das die Glukagon- und Somatostatinsekretion hemmt. Das von den α -Zellen sezernierte Glukagon stimuliert wiederum die Insulin- und Somatostatinsekretion und hemmt so seine eigene Sekretion. Somatostatin wiederum hemmt auf gleichem Wege α -, β - und δ -Zellen (*Weir 1990, Leibiger 2002*). Die β -Zelle nimmt in sehr fein gesteuerter Weise das Nahrungs-, insbesondere das Glukoseangebot des Körpers wahr, und stellt durch angepasste Insulinsekretion die Energieversorgung der Körperzellen mit Glukose sicher.

Die Einhaltung eines konstanten Blutzuckerspiegels in einem Bereich zwischen 80 und 120 mg/dl erfordert eine fein regulierte Zusammenarbeit verschiedener Hormone, um die mit der Nahrung zugeführten Kohlenhydratschwankungen auszugleichen. Neben der Glukose gibt es eine Vielzahl weiterer vorkommender Substanzen, welche eine Insulinsekretion auslösen können. Zu nennen wären Kohlenhydrate (Mannose, Fruktose), Aminosäuren, Fettsäuren sowie einige Hormone und Neurotransmitter. Die Hormone Glukagon, Cortisol und Adrenalin führen zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels, wohingegen Insulin das einzige Hormon ist, das zu einer Senkung des Blutzuckerspiegels führt.

Sowohl benachbarte homologe als auch heterologe Inselzellen stehen durch zwei unterschiedliche Arten von Zellkontakten miteinander in Verbindung. Zum einen werden diese Zellen durch sogenannte „gap junctions“ miteinander verbunden, wodurch eine funktionelle Zelleinheit entsteht, welche über elektrophysiologische Koppelung mittels Ionen- oder Nukleotidaustausch eine Kommunikation benachbarter Zellen ermöglicht (*Orci 1975, Unger 1978*).

Zum anderen bilden benachbarte Inselzellen mittels „tight junctions“ Kompartimentierungen aus, was eine gewisse parakrine Beeinflussung sowie einen gerichteten venösen Abstrom gewährleistet (*Orci 1976, Pipeleers 1984*).

Auch das vegetative Nervensystem übt einen Einfluss auf die Inselzellen und ihr Sekretionsverhalten aus. So erreichen Äste des Sympathicus und des Parasympathicus in der Adventitia der Gefäße das Drüsenparenchym. Cholinerge parasymphatische und adrenerge sympathische Nervenfasern gelangen mit dem Kapillarnetz in das Innere der Inselzelle und enden mit ihren Synapsen an den Inselzellen (*Ahrén 2000*).

1.2 Diabetes Mellitus

1.2.1 Definition

„Diabetes Mellitus“ ist die Bezeichnung für eine Gruppe verschiedener metabolischer Erkrankungen unterschiedlicher Genese, bei denen eine fehlerhafte Regulierung des Glukosestoffwechsels im Mittelpunkt steht. Hauptmerkmal dieser Erkrankung ist eine dauerhafte Erhöhung des Blutzuckerspiegels, eine so genannte **Hyperglykämie**. Ursache dieser Hyperglykämie ist ein absoluter oder relativer Mangel des von der Bauchspeicheldrüse produzierten Hormons Insulin. Der Grund für den erhöhten Blutzuckerspiegel besteht unter anderem aus einer gestörten Glukoseaufnahme in die Zelle und der Speicherung als Glykogen, was beides durch das Bauchspeicheldrüsenhormon Insulin gefördert wird. Desweiteren bestehen Störungen im Fett- und Eiweißstoffwechsel, was sich im vermehrten Abbau von Proteinen und Triglyceriden bemerkbar macht und somit zu einem erhöhten Anteil an Fetten im Blut führt.

1.2.2 Epidemiologie

Der Diabetes Mellitus stellt heutzutage eine der häufigsten Stoffwechselerkrankungen dar. Weltweit leiden schätzungsweise mehr als 171 Millionen Menschen in 191 Ländern an Diabetes Mellitus. Diese Zahl wird sich bis zum Jahre 2030 auf bis zu 366 Millionen Menschen erhöhen. Dies entspricht einer weltweiten Prävalenz von 2,8% für das Jahr 2000 und steigt bis zu 4,4% für das Jahr 2020 an (*Wild 2004*). Rund 90% aller kindlichen Diabetes-Fälle belaufen sich auf einen Diabetes Mellitus Typ I, wohingegen nur rund 5-10% der Erwachsenen an Diabetes Mellitus Typ I leiden (*LaPorte 1995, Jahromi 2007*). Rund 90-95% aller Diabetiker leiden dagegen an Diabetes Mellitus Typ II (*Turina 2006, International Diabetes Federation*).

In einer Erhebung wurde die Zahl der an Diabetes Erkrankten in Deutschland in einer großen Versicherten-Stichprobe der Allgemeinen Ortskrankenkasse (AOK) Hessen für den Zeitraum 1998-2001 erfasst. Dabei zeigte sich, dass im Jahr 2001 knapp 7 Prozent aller Deutschen wegen einer Zuckerkrankheit in

Behandlung waren. Das entspricht einer Zahl von ca. 5,7 Millionen Menschen welche in Deutschland an einem Diabetes Mellitus leiden (*Hauner 2003 und 2005*). Die Internationale Diabetesföderation bestimmte für das Jahr 2007 für Deutschland eine Gesamtprävalenz des Diabetes Mellitus von 11,8% innerhalb der Altersgruppe zwischen 20 und 79 Jahren, was einer Gesamtzahl von rund 7,4 Millionen Erkrankter entsprechen würde (*International Diabetes Federation*).

1.2.3 Formen des Diabetes Mellitus

Es werden 2 Hauptformen des Diabetes Mellitus unterschieden:

Beim Diabetes Mellitus Typ I kommt es zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden Langerhans'schen Inseln, in dessen Folge es zu einem absoluten Insulinmangel kommt. Die Bauchspeicheldrüse ist hierbei nicht mehr in der Lage, Insulin zu produzieren. Typ-I-Diabetes tritt bevorzugt vor dem 35. Lebensjahr auf und wird daher auch als juveniler Diabetes bezeichnet (*Jahromi 2007*). Hierfür gibt es nicht nur eine Ursache, sondern es handelt sich dabei um einen multifaktoriellen Prozess, bei dem mehrere Faktoren eine Rolle spielen.

Für einen genetischen Einfluss sprechen, dass circa 20% der Typ-I-Diabetiker eine positive Familienanamnese aufweisen. Die hierfür vererbaren Merkmale befinden sich auf dem Chromosom Nr. 6p21. Mehr als 90% aller Typ-I-Diabetiker tragen die HLA-Merkmale DR3 und DR4 auf ihren weißen Blutkörperchen (*Atkinson 2001, Devendra 2004*).

Auch Umwelteinflüsse spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung eines Diabetes Mellitus. So gibt es zum Beispiel gewisse Agenzien wie Kuhmilch, Getreideprodukte oder Nitrosamine, die vermehrt zur Entwicklung eines Diabetes Mellitus beitragen (*Peng 2006, Jahromi 2007*).

Eine andere Hypothese für die Zunahme des Diabetes Mellitus ist in der Hygienehypothese zu sehen. Die Anhänger dieser Hypothese sind davon überzeugt, dass der frühzeitige, intensive Kontakt mit möglichst vielen Umweltreizen für die

Entwicklung des Immunsystems unabdingbar ist. Je höher der Hygienestandard, desto schwächer entwickelt ist das Immunsystem. Die Folge davon sind immun-vermittelte Krankheiten wie Asthma und Diabetes (*Bach 2002, Gale 2002, Devendra 2004*).

Weiterhin wurde ein Zusammenhang mit bestimmten Viruserkrankungen ermittelt, die zum Ausbruch der Krankheit beitragen. Als auslösende Viren kommen vor allem Mumps-, Masern- und Grippeviren (Coxsackieviren) in Betracht. Bei diesen Viruserkrankungen kann bei bestimmten Personen eine Autoimmunreaktion ausgelöst werden, bei welcher Antikörper gegen körpereigenes Gewebe, also gegen die Inselzellen, gebildet werden. Diese Inselzellantikörper (=ICA) führen zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden Bauchspeicheldrüsenzellen (*Toniolo 1980, Banatvala 1985, Peng 2007*).

Für autoimmunologische Prozesse als Krankheitsursache des Diabetes Mellitus Typ I konnte weiterhin eine T- Zell vermittelte, autoimmunologische Entzündung ermittelt werden. So kommt es bei dieser sogenannten Autoimmuninsulinitis zu einer Infiltration der Langerhans'schen Inselzellen mit autoreaktiven CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen (*Imagawa 1999, Durinovic-Bello 1998*). Im Rahmen der humoralen Immunabwehr spielen Antikörper gegen β -Zellen der Bauchspeicheldrüse eine Rolle. So werden bei ca. 90% der Patienten Antikörper gegen Inselzellkomponente (ICA), gegen die Tyrosinphosphatase IA-2 (IA-2A), gegen die Glutamat-Decarboxylase der β -Zellen (GADA), sowie Insulinautoantikörper (IA-AK) gefunden (*Verge 1996 und 1998, Turner 1997, Kimpimäki 2000*). Erst nachdem etwa 80% der insulinproduzierenden β -Zellen zerstört sind, tritt die Erkrankung in Erscheinung (*Gillespie 2006, Mehers 2008*).

Demgegenüber steht der Diabetes Mellitus Typ II, welcher sich hauptsächlich im Erwachsenenalter manifestiert, und auf einer angeborenen oder erworbenen Unempfindlichkeit gegenüber Insulin (= Insulinresistenz) sowie einer gestörten Insulinsekretion der Bauchspeicheldrüsenzellen beruht. Das Krankheitsbild des

Diabetes Mellitus Typ II entwickelt sich auf dem Boden eines metabolischen Wohlstandssyndroms. Dieses ist gekennzeichnet durch das gehäufte Zusammentreffen der 4 Risikofaktoren Hypertonie, Hyperinsulinämie, Adipositas und Dyslipoproteinämie (Triglyceride \uparrow , HDL-Cholesterin \downarrow). Daraus entwickelt sich mit ansteigendem Lebensalter eine herabgesetzte Insulinwirkung an den wichtigsten Zielgeweben des Körpers für Insulin - also der Skelettmuskulatur, der Leber und des Fettgewebes. Auf Grund des chronischen Überangebotes an Glukose sowie dem ständig erhöhten Insulinspiegel fällt sowohl die Anzahl als auch die Sensibilität der Insulinrezeptoren in diesen Gebieten ab. Die von der Bauchspeicheldrüse produzierte Menge an Insulin reicht nicht mehr aus, um den Überschuss an Glukose abzubauen und die Senkung des Blutzuckerspiegels zu gewährleisten.

Bei der gestörten Insulinsekretion handelt es sich vor allem um quantitative Veränderungen des vom Pankreas sezernierten Hormons Insulin. Nach einer anfänglichen Hypersekretion des Hormons, kommt es zu einer sekretorischen Dekompensation, welche nicht mehr für den eigenen Bedarf ausreichend ist (=relativer Insulinmangel). Die Inselzellen werden über einen längeren Zeitraum vermehrt beansprucht, was zu ihrer Erschöpfung führt und somit zu einem manifesten Diabetes Mellitus führt. Im Gegensatz zum Diabetes Mellitus Typ I geht der Krankheitsverlauf eher schleichend voran.

Zusätzlich zu den zwei genannten Formen gibt es noch weitere Formen des Diabetes Mellitus wie den LADA-Diabetes (Late onset Autoimmunity Diabetes in the Adult), den MODY-Diabetes (Maturity Onset Diabetes in the Young) oder den Gestationsdiabetes.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen neue Aspekte der Behandlung des Diabetes Mellitus Typ I vorgestellt werden. Aus diesem Grund wird auf eine vertiefte Darstellung der Therapie des Typ II Diabetes an dieser Stelle verzichtet.

1.3 Therapie des Diabetes Mellitus Typ I

Das Ziel einer jeden Diabetestherapie ist eine Normalisierung der physiologischen Blutzuckerwerte mit Vermeidung von hypo- und hyperglykämischen Perioden. Dadurch soll die Entwicklung akuter und chronischer Komplikationen verhindert werden und gleichzeitig eine möglichst hohe Lebensqualität erhalten bleiben.

1.3.1 Patientenschulung

Grundlegende Voraussetzung für jede Art der Diabetestherapie stellt die Schulung des Betroffenen dar. Sie vermittelt den Diabetikern die nötigen Informationen über ihre Erkrankung sowie die damit verbundene Behandlung und ermöglicht ihnen somit, ihren Alltag mit der vorhandenen Stoffwechselkrankheit bestmöglich in den Griff zu bekommen. In diesen Schulungen werden Themen wie die Bestimmung des Blutzuckerspiegels zur Kontrolle des Stoffwechsels, Umgang mit Medikamenten (Insulin, Insulindosisanpassung), diabetesgerechte Ernährung sowie Vorbeugung und Umgang mit diabetischen Folgeerkrankungen behandelt. Im Rahmen solcher Schulungen soll der Diabetiker auf die Notwendigkeit eines langfristigen Betreuungskonzeptes aufmerksam gemacht werden, um somit das Ziel einer optimalen Stoffwechseleinstellung zu erreichen und das Auftreten von Folgeerkrankungen zu minimieren. Anbieter für diese Schulungen reichen von niedergelassenen Ärzten, Krankenhäusern, Diabetesfachkliniken bis zu Krankenkassen, Vereinen und Heilpraktikern.

1.3.2 Ernährung

Eine weitere wichtige Säule in der Therapie des Diabetes Mellitus stellt die richtige Ernährung dar. Während in der Vergangenheit strenge Diätvorschriften für den Diabetiker vorherrschten, bei denen 6 bis 8 zeit- und mengengerechte Mahlzeiten pro Tag vorgeschrieben wurden, ist der Diabetiker heutzutage eher in der Lage, seine Ernährung individueller zu gestalten. So unterscheidet sich die Ernährung eines Diabetikers heutzutage kaum mehr von einer ausgewogenen, gesunden Ernährung eines Nicht-Diabetikers.

Der Diabetiker sollte jedoch beachten, dass er ausgewogene, kalorienreiche Nahrungsmittel zu sich nimmt, um bei der Arbeit und in der Freizeit leistungsfähig zu sein und nicht in Unterzucker zu verfallen. Dabei sind mehrere kleinere Mahlzeiten (5-6) auf den Tag verteilt besser als wenige große. Das hat den Vorteil, dass der Insulinbedarf nicht so großen tageszeitlichen Schwankungen unterliegt und die meist noch vorhandene, jedoch geringe Insulinrestproduktion zur Kohlehydratverstoffwechslung ausreicht. Aus diesem Grunde spielen Kohlenhydrate eine wichtige Rolle bei der Ernährung der Diabetiker und stellen die wichtigsten Energielieferanten dar. Rund 50 bis 60 Prozent der Gesamtenergie sollten in Form von Kohlenhydraten aufgenommen werden. Kohlenhydrate stellen bei muskulärer Belastung die wichtigste Energiequelle für den Körper dar und stehen dem Körper als Glykogenspeicher in Muskulatur und Leber zur Verfügung. Es sollten vor allem Nahrungsmittel, die Mehrfachzucker enthalten, aufgenommen werden. Mehrfachzucker werden erst im Darm in ihre Bestandteile - also in Einfachzucker - gespalten und lassen dadurch den Blutzucker erst langsam ansteigen. Mehrfachzucker sind vor allem in Obst und Getreideprodukten wie Getreide (Brot), Bohnen, Reis, Nudeln und Kartoffeln enthalten.

Ungünstig sind schnell resorbierbare Monosaccharide (Glukose) und Disaccharide (Rohrzucker, Milchzucker), da sie extrem schnell ins Blut gelangen und so den Blutzucker schnell ansteigen lassen können. Fette sollten in Maßen gegessen werden und nicht mehr als 30% der Gesamtenergie betragen. Wenn man fetthaltige Nahrungsmittel zu sich nimmt, sollte man Nahrungsmittel mit einem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren (Oliven- oder Rapsöl) und Omega-3-Fettsäuren (Fisch, Nüsse, einige grünblättrige Gemüsesorten) bevorzugen. Diese fetthaltigen Nahrungsmittel sollen die vorzeitige Entwicklung einer Arteriosklerose verzögern.

Bei Eiweißen gelten die gleichen Richtlinien wie bei Nicht-Diabetikern. Einen Proteinanteil von 10-15% an der Gesamtenergiemenge ist ausreichend. Bei einsetzender Mikroalbuminurie sollte die Eiweißzufuhr jedoch dann reduziert werden.

1.3.3 Medikamente

Patienten mit einem Diabetes Mellitus Typ I leiden an einem absoluten Insulinmangel. Daher sind Typ-I-Diabetiker auf eine lebenslange externe Insulinzufuhr angewiesen. Bei der Art der Insulintherapie wird zwischen der konventionellen und der intensivierten Insulintherapie unterschieden sowie der Insulinpumpe, die eine Sonderform der intensivierten Insulintherapie darstellt.

Bei der **konventionellen Insulintherapie** wird kurzwirksames Normalinsulin und langwirksames Verzögerungsinsulin in einem festen Mischverhältnis zwei bis drei Mal am Tag verwendet. Man injiziert hierbei $\frac{2}{3}$ der Tagesdosis vor dem Frühstück und $\frac{1}{3}$ der Dosis vor dem Abendessen. Der Spritz-Essabstand sollte dabei 30 Minuten betragen. Der Vorteil dieses Therapieregimes ist die einfache Handhabung und die Anpassung der Insulindosen nach dem eigenen Bedarf des Patienten. Der Nachteil besteht darin, dass der Patient die Ernährung nach dem schon injizierten Insulin ausrichten muss, d.h., der Patient muss sich an ein starres Mahlzeitem Schema halten. Weil zwischen den Hauptmahlzeiten der Insulinspiegel unphysiologisch hoch ist, muss der Patient mehrere Zwischenmahlzeiten zu sich nehmen, um das Auftreten von Hypoglykämien zu vermeiden. Ebenso sind körperliche Bewegung und andere Aktivitäten, die sich auf den Blutzuckerspiegel auswirken, im Voraus einzuplanen. Diese Art der Therapie führt also zu großen Einschränkungen für die Lebensführung des Patienten.

Die **Intensivierte Konventionelle Insulintherapie** erfolgt nach dem Basis- Bolusprinzip und orientiert sich an der physiologischen Insulinsekretion, d.h. die Insulinzufuhr wird dem wechselnden Bedarf angepasst. Da der Insulinbedarf interindividuell deutlich variieren kann, muss er für jeden Patienten empirisch ermittelt werden. Im Durchschnitt beträgt der tägliche Insulinbedarf eines Typ-I-Diabetikers $0,7$ Insulineinheiten (IE)/kg Körpergewicht.

Grundsätzlich ist zwischen dem basalen, nahrungsabhängigen und dem prandialen, nahrungsunabhängigen Insulinbedarf zu unterscheiden. Der Basalbedarf macht etwa 50% des Gesamtbedarfs aus und soll die kontinuierliche Ver-

sorgung des Körpers mit Insulin unabhängig von der Nahrungsaufnahme sicherstellen. Dies wird in der Regel durch eine mindestens zweimalige Injektion (morgens und abends) eines Verzögerungsinsulins erreicht. Der erhöhte Insulinbedarf zu den Mahlzeiten wird mit der zusätzlichen Injektion von Normalinsulin oder kurzwirksamen Insulinanaloga als Bolus abgedeckt. Die Höhe der Dosis richtet sich dabei nach der Größe der Mahlzeit, dem präprandial gemessenen Blutzuckerspiegel, der Tageszeit und der geplanten körperlichen Belastung. Erhöhte Blutzuckerwerte vor den Mahlzeiten können durch eine zusätzliche Gabe von schnellwirksamen Insulinpräparaten nach einem Korrekturplan behoben werden. Diese Art der Therapie bietet dem Diabetiker die Chance, seine Mahlzeiten frei zu wählen. Voraussetzungen dafür sind Blutzuckermessungen vor den Mahlzeiten und vor dem Schlafengehen sowie eine Schulung des Patienten.

Eine weitere Möglichkeit der Diabetes Therapie stellt die Verwendung einer **Insulinpumpe** dar. Bei dieser Therapie erfolgt mit Hilfe einer externen Pumpe eine kontinuierliche subkutane Zufuhr an Normalinsulin, das den Basalbedarf des Körpers an Insulin abdeckt. Zusätzlich zu den Mahlzeiten - abhängig vom Blutzuckerwert und der Nahrungsmenge - sind Bolusinsulingaben über die Pumpe möglich. Indikationen für eine solche Insulinpumpe stellen ein ausgeprägtes Dawn-Phänomen, ein schwer einstellbarer Diabetes, Schwangerschaft, sowie große Variationen im Tagesablauf, die nicht mit der üblichen intensivierten Therapie bewältigt werden können, dar. Komplikationen dieser Therapie sind lokale Entzündungen, ein erhöhtes Risiko für ketoazidotische Entgleisungen sowie Hypoglykämiegefahr bei ungenügender Blutzuckerselbstkontrolle.

1.4 Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus Typ I

1.4.1 Mikroangiopathie

Auf Grund der chronisch erhöhten Blutzuckerwerte beim Diabetes kommt es zu Strukturveränderungen an den kleineren Gefäßen. Dabei kommt es zu einer gesteigerten nichtenzymatischen Glykosylierung von Basalmembranen, was zu einer Verdickung der Membranen führt und letztlich zum Auftreten von Mikro- und Makroangiopathien. Weiterhin kommt es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Gefäßwände, in deren Folge Blutungen auftreten können. Zum anderen entstehen an den Gefäßwänden Plaques, die Gefäßverschlüsse mit entsprechenden Durchblutungsstörungen verursachen können. Gebiete, an denen die diabetische Mikroangiopathie vor allem zu finden ist, sind die Netzhaut des Auges (=Retina) und die Nieren.

1.4.1.1 Diabetische Retinopathie

Bei der diabetischen Retinopathie handelt es sich um eine diabetesspezifische Erkrankung der Retina auf dem Boden einer Mikroangiopathie. Auf Grund von den diabetischen Struktur- und Gefäßveränderungen kommt es zu Durchblutungsstörungen mit Blut- und Eiweißaustritten aus den geschädigten Gefäßen. Die Folge hiervon sind Veränderungen des Augenhintergrundes wie Punkteinblutungen ins Augeninnere, Mikroaneurysmen, Makulaödeme und Narbenbildungen, die zu Sehstörungen bis hin zur Erblindung führen können.

Die Entwicklung der diabetischen Retinopathie hängt maßgeblich von der langfristigen Blutglukoseeinstellung ab. Hypertonie und Rauchen fördern die Progression. Studien zeigen, dass nach 5-jähriger Diabetesdauer 67 % aller Patienten mit Diabetes Mellitus Typ I an einer Retinopathie erkrankt sind (*Malone 2001, Fong 2004*). Nach 15-20 Jahren leiden mehr als 90% aller Diabetiker an einer Retinopathie, wovon rund 60% eine proliferative Retinopathie ist (*Fong 2004, Jawa 2004*).

1.4.1.2 Diabetische Nephropathie

Eine weitere mikroangiopathische Folgerkrankung des Diabetes stellt die Nephropathie dar. Rund 40% aller Diabetiker weltweit leiden an einer diabetischen Nephropathie (Gross 2005). Die Prävalenz von Typ-I-Diabetikern innerhalb von 15 Jahren eine diabetische Nephropathie zu entwickeln, liegt bei ca. 80% (American Diabetes Association 2004).

Der Diabetes Mellitus verursacht eine Schädigung der Nierenstruktur im Sinne einer diabetischen Mikroangiopathie und den damit verbundenen Durchblutungsstörungen. Als Folge davon kommt es zu einer Verdickung der Basalmembran der glomerulären Kapillaren der Niere durch Einlagerung von Proteoglykanen, verbunden mit einer zunehmenden Sklerosierung des umgebenden Gewebes sowie eine Verbreiterung des Mesangiums. Durch Schädigung der glomerulären Gefäße ist deren Permeabilität erhöht und es kommt zu einem Verlust der Filtrationsselektivität, was in einer Mikro- bzw. Makroalbuminurie mündet. Die Folge hiervon ist ein chronisches Nierenversagen, das eine regelmäßige Dialysetherapie notwendig werden lässt. Des Weiteren resultiert aus der Nierenschädigung ein Hypertonus, der in der Regel medikamentös behandelt werden muss. ACE-Hemmer spielen bei der Therapie eine große Rolle, weil sie neben der Blutdrucksenkung auch eine positive Wirkung auf die Nierendurchblutung haben.

1.4.2 Diabetische Neuropathie

Die Prävalenz der Diabetischen Neuropathie variiert von 10% innerhalb eines Jahres nach Feststellung der Diagnose bis zu 50% bei Patienten, die 25 Jahre oder länger an Diabetes leiden (Vinik 1992, Sima 2004). Die Durchschnittsprävalenz liegt bei rund 30% (Tesfaye 1996).

Unter dem Begriff der diabetischen Neuropathie versteht man die Kombination der durch Diabetes mellitus verursachten Störungen des peripheren sensomotorischen und des autonomen Nervensystems. Hierbei spielen sowohl osmotische Zellschädigungen und metabolische Störungen (Bildung von nichtenzyma-

tischen fortgeschrittenen Glykosylierungsprodukten) als auch mikroangiopathische Veränderungen im Bereich der nervenversorgenden Blutgefäße eine große Rolle. So finden sich bei der peripheren Polyneuropathie sensorische Symptome wie Parästhesien, Taubheitsgefühl und Schmerzen („burning feet“). Typisch für die Beschwerdesymptomatik ist, dass sie nachts am stärksten sind und sich beim Gehen bessern. In der klinischen Untersuchung zeigen sich fehlende oder abgeschwächte Muskeigenreflexe, Sensibilitätsstörungen und vermindertes Vibrationsempfinden sowie eine Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit. Die autonome Neuropathie präsentiert sich an Hand einer Reihe von ganz unterschiedlichen Krankheitsbildern an den von den autonomen Nerven innervierten Organen. Dazu zählen Symptome des kardiovaskulären Systems (z.B. Ruhetachykardie, orthostatische Hypotonie, stumme schmerzlose Myokardischämien und Herzinfarkte), Symptome des Magen-Darm-Traktes (Störungen der Ösophagusmotilität, diabetische Gastroparese, Gallenblasenatonie, anorektale Dysfunktion (Inkontinenz)), Symptome des Urogenitalsystems (Erektile Dysfunktion, Blasenatonie), Symptome der Thermoregulation (Vasodilatation, verminderte Schweißsekretion), Symptome der Pupillen (Pupillenreflexstörungen und Minderung der Dunkeladaptation) und schließlich Störungen im neuroendokrinen System wie Reduktion beziehungsweise Fehlen der hormonellen Gegenregulation und Hypoglykämiewahrnehmung oder Minderung der Katecholaminsekretion unter orthostatischer und körperlicher Belastung.

1.4.3 Diabetisches Fußsyndrom

10-20% aller Diabetiker, die älter als 60 Jahre sind, weisen Läsionen im Sinne des diabetischen Fuß-Syndroms auf (*Boulton 2000*). Die Ursache hierfür liegt in der verminderten Durchblutung der Extremitäten und die Schädigung der Nerven verbunden mit Gefühlsstörungen und vermindertem Schmerzempfinden in den Füßen. Die Folge davon sind offene, schlecht heilende Wunden und diabetischer Gangrän mit tiefen kaum oder nicht abheilenden Ulzerationen, die auch heute noch zum Verlust von Extremitäten oder Teilen von Extremitäten führen können. Vorbeugende Maßnahmen und eine entsprechende Aufklärung der

Patienten über die richtige Fußpflege (regelmäßiges Waschen der Füße mit lauwarmem Seifenwasser und gründliches Abtrocknen, Vermeidung von Verletzungen bei der Pediküre), das geeignete Schuhwerk, sowie eine frühzeitige antibiotische Therapie bei infizierten Ulzera sind absolut unumgänglich.

1.4.4 Makroangiopathie

Beim Diabetes mellitus treten auch Veränderungen an den großen Blutgefäßen auf. Hierbei handelt es sich um arteriosklerotische Veränderungen an Zerebral-, Koronar- und Beinarterien. KHK, zerebrale und periphere arterielle Verschlusskrankheiten treten bei Diabetikern in Abhängigkeit vom Krankheitsbeginn früher, stärker und häufiger auf als bei Nichtdiabetikern. Vor allem in Verbindung mit erhöhten Blutfettwerten, Hypertonie, Adipositas und Nikotingenuss sind chronisch erhöhte Blutzuckerwerte wesentliche Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse wie Herzinfarkte und Schlaganfälle.

1.5. Pankreastransplantation zur Wiederherstellung der körpereigenen Insulinsekretion

Die Pankreastransplantation hat sich seit der ersten klinisch erfolgreichen Durchführung im Jahre 1966 an der University of Minnesota durch Kelly zu einem allgemein akzeptierten Verfahren in der Therapie des Diabetes mellitus Typ I entwickelt (*Kelly 1967*). Die Inselzelltransplantation und die Pankreastransplantation stellen die einzigen Möglichkeiten zur Behandlung eines Diabetes Mellitus Typ I dar, welche dauerhaft durch Wiederherstellung der endogenen Insulinsekretion einen konstanten normoglykämischen Zustand ermöglichen. Dadurch wird nicht nur eine positive Beeinflussung der diabetischen Folgeschäden, sondern auch eine Verbesserung der Lebensqualität bei Typ I Diabetikern erzielt (*Robertson 1992, Sutherland 2001a, Sutherland 2001b, Drognitz 2004*).

Hinsichtlich der Technik unterscheidet man bei der Pankreastransplantation drei unterschiedliche Verfahren. Die SPK- (Simultaneous Pancreas Kidney), PAK-

(Pankreas After Kidney) und die PTA-Transplantation (Pancreas Transplantation Alone) (Sutherland 2001a, Sutherland 2001b). Bei der SPK werden gleichzeitig Niere und Pankreas transplantiert, bei der PAK zuerst eine Niere und erst später das Pankreas und bei der PTA wird nur das Pankreas transplantiert.

SPK und PAK sind die häufigsten Pankreastransplantationen und werden bei urämischen Typ I Diabetikern mit terminaler Niereninsuffizienz durchgeführt, bei denen aufgrund einer diabetischen Nephropathie auch eine Indikation zur Nierentransplantation besteht. Es werden dabei Pankreas, ein Teil des Duodenums, Teile von Arteria- und Vena iliaca, Niere und Ureter eines Verstorbenen transplantiert (Sutherland 2001a, Sutherland 2001b). Die PTA wird nur bei nicht urämischen Diabetikern durchgeführt, bei denen schwerwiegende diabetische Komplikationen, Versagen der konventionellen Insulintherapie oder nicht beherrschbare Stoffwechsellagen bestehen (Bretzel 1996, Sutherland 2001a, Sutherland 2001b).

Seit der ersten Pankreastransplantation im Jahre 1966 wurden die Daten der weltweit durchgeführten Pankreastransplantationen an das International Pancreas Transplant Registry (IPTR) und das United Network for Organ Sharing (UNOS) in den USA weitergegeben. Bis zum Jahre 2004 wurden weltweit 32.000 Pankreata transplantiert, 17.000 alleine in Amerika (Gruessner und Sutherland 2005, IPTR).

Während die Pankreastransplantation in ihren Anfängen zwischen den Jahren 1966 bis 1980 mit einer 1-Jahres-Organ-Funktionsrate von 21%, und einer 1-Jahres-Patientenüberlebensrate von 67% keine Alternative (Sollinger 1994, Gruessner und Sutherland 2005) zur exogenen Insulintherapie darstellte, hat sich das Bild in den Jahren danach doch drastisch gewandelt. So wurden sowohl durch Verbesserung der chirurgischen Technik als auch durch die Einführung neuer, verbesserter Immunsuppressionstherapeutika in den Jahren 2002 bis 2004 eine 1-Jahres-Überlebensrate der Empfänger laut International Pancreas Transplant Registry von über 94%, und eine 1-Jahres-Transplantat-

Funktionsrate von 80-85% erreicht. Die Verlustrate innerhalb eines Jahres liegt, aufgrund der Immunsuppression (Tacrolimus, Mycophenomofetil) und der Antikörperinduktionstherapie bei 2% für die SPK , 8% für die PAK und 10% für die PTA (*Gruessner und Sutherland 2005*).

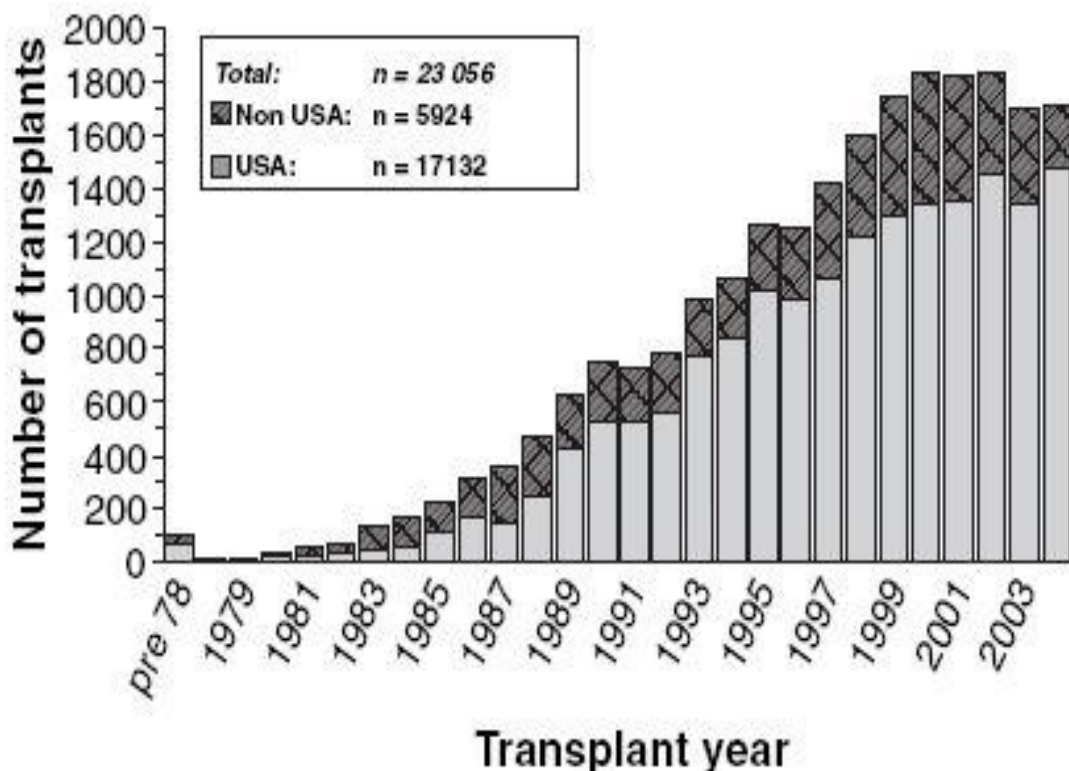


Abb. 1.1 zeigt die Anzahl der Pankreastransplantationen bis 2004 auf der Grundlage der Daten der IPTR (*Gruessner und Sutherland 2005*).

Obwohl die Pankreastransplantation damit zu einer standardisierten Methode in der Behandlung des Diabetes Mellitus Typ I geworden ist, weist sie gegenüber der Inselzelltransplantation doch einige Nachteile auf. So ist die Pankreastransplantation ein aufwendigerer chirurgischer Eingriff, welcher nur an kreislaufstabilen Patienten vorgenommen werden kann, so dass dadurch die Mortalität wie auch die Morbidität im Vergleich zur Inselzelltransplantation erhöht sind (*Sollin-*

ger 1998, Boker 2001, Pileggi 2006). Auf Grund der geringen Organdurchblutung des Pankreas und der Tatsache, dass bei der Gesamtorgantransplantation auch der exokrine Anteil mittransplantiert wird, treten einige Komplikationen bei diesem Eingriff auf. Diese wären Thrombosen des Pankreas, Transplantatpankreatitis, (peri)pankreatische Infektionen, sowie Komplikationen chirurgischer Art wie Anastomoseninsuffizienzen, Blutungen, Hyperinsulinämie mit Hypoglykämie als auch metabolische Azidosen, um nur die häufigsten zu nennen (Stock 2004, Gruessner und Sutherland 2005).

1.6 Inselzelltransplantation zur Wiederherstellung der körpereigenen Insulinsekretion

1.6.1 Entwicklung der Technik:

Neben der Pankreastransplantation stellt die Inselzelltransplantation die einzige dauerhaft kurative Möglichkeit in der Behandlung eines Diabetes dar. Mit ihr hoffte man, den Nutzen der Pankreastransplantation ohne seine möglichen Komplikationen und Risiken zu erhalten. Bei Inselzelltransplantation werden nur die Langerhans'schen Inselzellen der Bauchspeicheldrüse verpflanzt, welche alle zur Regulierung des Blutzuckerhaushaltes erforderlichen endokrinen Zellen enthalten. Dadurch hoffte man den Komplikationen, welche sich durch den exokrinen Pankreasanteil ergeben, zu entkommen (Bretzel 1986 und 1987). Die Inselzellen werden hierbei meistens im Rahmen eines minimal-invasiven Eingriffes durch eine direkte perkutane, transhepatische Punktion der Pfortader (Shapiro 2000, Boker 2001, Rayan 2001 und 2002, Markmann 2003) oder eine Mini-Laparatomie indirekt durch Punktion der mesenterialen Gefäße (Berney 2000) in die Pfortader des Empfängers infundiert. Die Inselzellen werden dann über den portalen Blutstrom in die Leber-Sinusoide eingeschwemmt, von wo aus sie ihre Funktion aufnehmen (Robertson 2004).

Die Infusion der Langerhans'schen Inseln in die Leber stellt bisher die einzige Möglichkeit dar, die beim Menschen dauerhaft erfolgreich zu einer Insulinunabhängigkeit nach Inselzelltransplantation führte (Stock 2004).

Andere Implantationsorte wie zum Beispiel das grosse Netz, die Milz oder die Submukosa des Oberen Gastrointestinaltraktes waren ebenfalls Gegenstand vieler tierexperimenteller Untersuchungen, wiesen jedoch nicht den nötigen Erfolg auf (*Yasunami 1983, Ao 1993, Tchervenivanov 1994*).

Als Pionier auf dem Gebiet der Inselzellisolierung ist *Stanislaw Moskalewski* anzusehen. Er berichtete erstmals im Jahre 1965 über eine erfolgreiche Isolierung und Kultivierung von Langerhans'schen Inseln aus dem Pankreas mittels enzymatischer Methode (Kollagenaselösung) im Schweinemodell (*Moskalewski 1965*). Die von ihm entwickelte Methode der Inselzellisolierung wurde von *Lacy* und *Kostianovsky* 1967 weiterentwickelt und verbessert (*Lacy 1967*). Mit Hilfe dieser Methode wurden schließlich bei verschiedenen Tierspezies – vor allem dem Nagetier - Langerhans'sche Inselzellen isoliert (*Bretzel 1987*). Sie wurde somit zur Standardmethode der Inselzellisolierung beim Nagetier, ließ sich jedoch nicht ohne weiteres auf die Bauchspeicheldrüsen größerer Tiere oder des Menschen anwenden.

Im Jahre 1972 führten *Ballinger und Lacy* die ersten erfolgreichen Transplantationen von intakten pankreatischen Inseln an Ratten durch. Sie zeigten, dass eine Transplantation von circa 400-600 Inseln in die Bauchhöhle oder die Oberschenkelmuskulatur bei diabetisch gemachten Ratten die diabetische Stoffwechsellage wie Hyperglykämie, Glukosurie oder Polyurie signifikant verbesserte und diabetische Spätfolgen verhindert werden konnten (*Ballinger 1972*).

Eine Reihe von weiteren Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse und zeigten einen Benefit in der Verhinderung von diabetischen Spätkomplikationen bei frühzeitiger Inselzelltransplantation. So konnte sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen bewiesen werden, dass bei einer frühzeitigen Inselzelltransplantation eine diabetische Nephropathie verhindert werden kann (*Hu 1989, Fiorina 2003*). Auch die Entwicklung der diabetischen Neuropathie konnte durch eine frühzeitige Inselzelltransplantation verhindert werden, wie an Hand verschiedener Studien gezeigt wurde (*Schmidt 1983, Britland 1991, Lee 2005*).

Hammes und Bretzel zeigten im Jahr 1993, dass durch eine frühzeitige Inselzelltransplantation die diabetische Retinopathie im Rattenmodell verhindert werden kann (*Hammes 1993*).

Durch Abwandlung der bisherigen Methode zu Isolierung der Inselzellen wurden 1975 Inselzelltransplantationen an Rhesusaffen durchgeführt. Dazu wurden die Tiere zuvor durch partielle Pankreatektomie und Streptozotozin diabetisch gemacht. Diese von *Scharp* durchgeführten Transplantationen waren von Erfolg gekrönt. 5 Tiere erhielten Inselzellen von anderen Rhesusaffen über die Pfortader infundiert. Es wurde eine Normoglykämie von bis zu 6 Wochen nach Transplantation sowie eine annähernd normale Glukosetoleranz erreicht (*Scharp 1975*).

In den 70iger Jahren erfolgte in Minnesota die erste erfolgreiche autologe Inselzelltransplantation am Menschen. *Wahoff* berichtete über eine Insulinunabhängigkeit von 74% nach autologer Inselzelltransplantation bei 14 Patienten, die sich einer totalen Pankreatektomie unterzogen haben und mehr als 300.000 Inselzellen in die Pfortader appliziert bekommen haben (*Wahoff 1995*).

Scharp berichtete im Jahre 1990 über die erste erfolgreiche allogene Inselzelltransplantation mit aufgereinigten Inselzellen am Menschen. Er applizierte einem Menschen 800.000 humane Inseln in die Pfortader und konnte eine Insulinfreiheit von 22 Tage nach Transplantation nachweisen (*Scharp 1990*).

Der Schritt zur Anwendung der Inselzelltransplantation im klinischen Bereich für den Menschen wurde erst durch eine Verbesserung und Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Inselzellisolation möglich. Mit Einführung der automatisierten, kontinuierlichen Digestions-Filtrationsmethode zur Isolierung humaner Inselzellen durch *Ricordi et al.* im Jahr 1988 konnte ein Durchbruch auf dem Gebiet der Inselzelltransplantation erreicht werden (*Ricordi 1988 und 1990*). Gemeinsam mit der Verwendung des Enzyms Liberase erhöhte sich die Inselausbeute pro Organ sowie die Menge transplanteder Inseln und führte so zu einer Verbesse-

rung der Transplantationsergebnisse (*Oberholzer 2001*). Die Einführung dieser automatischen Methode erlaubte die Gewinnung einer suffizienten Anzahl an Inselzellen - sogar von nur einem menschlichen Spenderpankreas - um nach einer Allotransplantation bei Typ-I-Diabetikern den Verlust eines Diabetes zu ermöglichen und eine Insulinunabhängigkeit wahrscheinlicher zu erreichen. Mit dieser Methode begann eine neue Ära der klinischen Inselzelltransplantation in den frühen 90iger Jahren (*Bretzel 2007*).

In Deutschland wurde die erste klinische Inselzelltransplantation im Jahre 1992 von *Bretzel* am Zentrum in Gießen durchgeführt. Dabei wurde einer 37-jährigen Patientin, die vier Jahre zuvor im Rahmen einer Lebendspende eine Niere ihrer Mutter bekommen hatte, 350.000 isolierte Langerhans'sche Inselzellen, welche von nur einem Pankreas gewonnen wurden, transplantiert. Diese Inseln wurden in Lokalanästhesie mittels Seldinger-Kathetertechnik transkutan-transhepatisch über das Pfortadersystem in die Leber infundiert. Dabei wurde nach 400 Tagen eine Insulinunabhängigkeit erreicht (*Bretzel 1993*).

Erst durch die Gründung der Internationalen Inselzelltransplantation Registratur (ITR) im Jahre 1980 in Lyon konnten weltweit in größerem Umfang Daten und Informationen über Einflussfaktoren auf das Transplantatüberleben, Dauer des Diabetes sowie Ursachen des Transplantatversagens gesammelt und ausgetauscht werden.

Zwischen den Jahren 1990 und 2000 wurden am Zentrum in Gießen 66 allogene Inselzelltransplantationen durchgeführt, weltweit waren es 355 Transplantationen (*Brendel 2001*). Nach der Erfahrung mit mehr oder weniger schlechten Ergebnissen bei Inselzelltransplantationen in den frühen 90iger Jahren, wurde von der Gruppe in Giessen ein neues Immunsuppressionsprotokoll für Simultane Nieren-/Inselzelltransplantationen (SIK) und Inselzell- nach Nierentransplantation (IAK) eingeführt (*Hering 1994, Bretzel 1999*). Es beruhte im Regelfall auf einer vierfachen Immunsuppressionstherapie. Prä- bzw intraoperativ wurde eine ATG-Bolustherapie angewandt, die im Vergleich zur konventionellen ATG-

Therapie nach Transplantation Vorteile bezüglich des Transplantatüberlebens, Abstoßung und verzögerter Funktion liefert. Postoperativ wurden Steroide, Cyclosporin A, Azathioprin oder Mycophenomofetil gegeben (*Kaden 2002, Bretzel 2007*). Mit Hilfe dieser Immunsuppressionstherapie konnte eine 1-Jahres-Insulinunabhängigkeit von bis zu 26% bei Patienten, die eine simultane Nieren-/Inselzelltransplantation (SIK) erhielten, am Zentrum in Giessen erreicht werden. Dabei wurde eine 3-Monats-Inselzellfunktionsrate von 75% für Inselzell-/nach Nierentransplantation (IAK) und von 100% für simultane Nieren-/Inselzelltransplantationen (SIK) beobachtet (*Hering 1994, Bretzel 1999, Bretzel 2007*). Weltweit variierte die 1-Jahres-Insulinunabhängigkeitsrate zu diesem Zeitpunkt zwischen 8 und 14% bis zum Jahre 1999. Die 1-Jahres-Patientenüberlebensrate betrug dabei 96% und das 1-Jahres-Transplantatüberleben 35%. Die maximale Insulinunabhängigkeit lag bei 70 Monaten (*Brendel 2001, Bretzel 2007*).

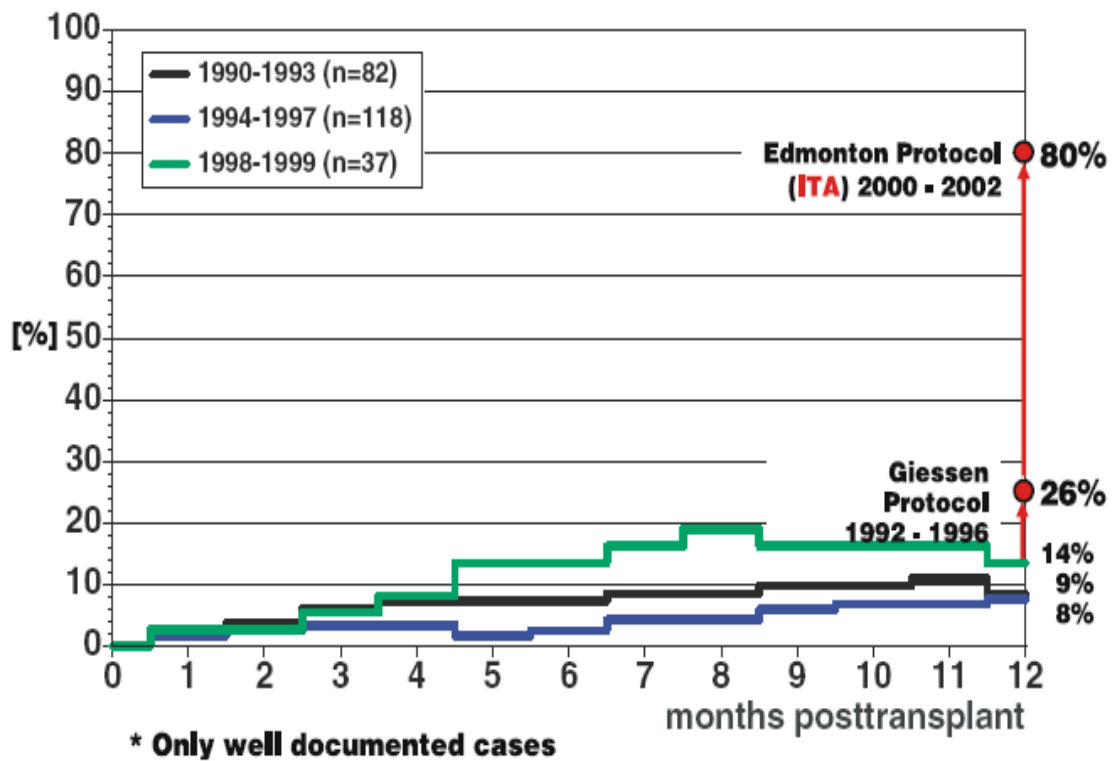


Abb. 1.2: Dargestellt ist die 1-Jahres Insulinunabhängigkeitsrate (Daten vom ITR, 1990-1999) bei C-Peptid negativen SIK/IAK-Empfängern behandelt am Zentrum in Gießen (*Bretzel 1999*) und von ITA-Empfängern behandelt am Zentrum in Edmonton (*Bretzel 2007*).

Ähnlich der Einteilung der Pankreastransplantation gibt es auch für den klinischen Bereich der Inselzelltransplantation derzeit 6 verschiedene Transplantationsarten für Typ-I-Diabetiker:

- Simultane allogene Nieren-Inselzelltransplantation bei Typ-I-Diabetikern (SIK = Simultaneous Islet Kidney) (*Bretzel 1999*)
- Allogene Inselzelltransplantation nach Nierentransplantation bei Typ-I-Diabetikern (IAK = Islet after Kidney) (*Bretzel 1999*)

- Alleinige allogene Inselzelltransplantation (ITA = Islet Transplant Alone)
 - Bei schwerer autonomer (kardialer) Neuropathie
 - Bei starken Blutzuckerschwankungen (Brittle Diabetes) oder schwerer Insulinresistenz
 - Bei schwerer diabetischer Nephropathie
 - Bei ausgeprägten Hypoglykämiewahrnehmungs- und gegenregulationsstörungen (*Federlin 1999, Marzorati 2007*)
- Autologe Inselzelltransplantation nach Pankreatektomie wegen chronisch rezidivierender Pankreatitis oder benignen Tumoren (*Pyzdrowski 1992*)
- Simultane allogene Leber-Inselzelltransplantation (SIL = Simultaneous Islet Liver) nach oberer abdominaler Exenteration bei malignen Abdominaltumoren (*Ricordi 1990*)
- Kombinierte Insel-Lungentransplantation bei Patienten mit Cystischer Fibrose (*Bühler 1996*)

Der entscheidende Durchbruch in der Inselzellforschung erfolgte im Jahre 2000 durch das sogenannte Edmonton Protokoll. Eine Arbeitsgruppe um den kanadischen Forscher *Shapiro* konnte an der Universität von Alberta nachweisen, dass eine Insulinunabhängigkeit von 80% nach einem Jahr nach allogener Inselzelltransplantation bei sieben Patienten mit Hilfe einiger Ab- und Veränderungen des Präparationsprotokolls, des Zelltransplantationsprotokolls, der immunologischen Induktionstherapie und der Folgebehandlung reproduzierbar und dauerhaft erreicht werden kann (*Shapiro 2000*). Während das Gießener Immunsuppressionsprotokoll aus Steroiden, Cyclosporin A, Azathioprin und ATG bestand, wurde hier auf Steroide gänzlich verzichtet. Es wurde ein Immunsuppressionsschema benutzt, das aus einer Induktionstherapie mit dem Interleukin-2-Rezeptor Daclizumab bestand und einer Erhaltungstherapie, die in geringer Dosis Tacrolimus und Sirolimus beinhaltet (*Shapiro 2000*).

Desweiteren wurde die Menge der in die Leber infundierten Inselzellen zum Erreichen einer Insulinunabhängigkeit auf mindestens 11.000 Inselzell-

äquivalente (IEQ) pro kg Körpergewicht erhöht - der Standard lag bis zu diesem Zeitpunkt bei 6.000 IEQ pro kg Körpergewicht wie die Gruppe in Gießen berichtete (*Bretzel 1993*). Um dies zu erreichen, wurden Inselzellen von zwei bis drei Spendern für die Transplantation verwendet (*Shapiro 2000*).

Ausserdem wurden frisch isolierte Inselzellen transplantiert ohne vorherige mehrtägige Zellkultur oder Kryokonservierung wie es bei früheren Transplantationsschematas gängig war (*Bretzel 1993, Bretzel 2007*). Dadurch konnte der Inselverlust während der Kulturphase vermieden werden und eine maximale Anzahl an Inseln konnte transplantiert werden (*Shapiro 2000*).

Darüber hinaus wurde auf früher oft verwendetes fetales Kalbsserum während des Isolationsprozesses verzichtet, welches die Immunogenität der Inseln steigert. Stattdessen wurde Humanalbumin während der Purifikation verwendet (*Shapiro 2000, Bretzel 2007*).

Zusätzlich wurde zur Reduzierung von hypoxischen Inselzellschäden versucht die kalte Ischämiezeit unter 8 Stunden zu halten (*Shapiro 2000*).

Nach dem Durchbruch in der klinischen Inselzelltransplantation durch das Edmonton-Protokoll wurde im Jahr 1999 vom Immune Tolerance Network (ITN) des National Institutes of Health (NIH) und der Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF) eine internationale, multizentrische Studie ins Leben gerufen. Diese wird derzeit an insgesamt neun Zentren - wovon sechs in der USA/Canada und drei in Europa (darunter Gießen in Deutschland) sind - nach dem so genannten Edmonton-Protokoll durchgeführt. Dabei beschränkte sich jedes Zentrum darauf, die Isolationstechnik und das Immunsuppressionsprotokoll der Edmontongruppe zu verwenden. Ziel dieser Studie ist eine konstante Reproduzierung und Durchführbarkeit des Verfahrens, welches vom Transplantationszentrum der Universitätsklinik in Edmonton entwickelt wurde und letztendlich zu einer Insulinunabhängigkeit des Patienten führt.

Des Weiteren soll eine Optimierung des Präparations- und Isolationsvorganges, der Immunsuppressionstherapie und der Patientennachbetreuung angestrebt werden (*Berney 2001, Oberholzer 2001, Jaeckel 2004, Shapiro 2006*).

Die Ergebnisse dieser ersten internationalen, multizentrischen Studie für Inselzelltransplantation wurde vor kurzem vom Immune Tolerance Network (ITN) veröffentlicht. 36 Patienten wurden in dieser Studie mit dem Edmonton Protokoll an neun Zentren in Nordamerika und Europa behandelt. 11 der Empfänger (31%) erhielten eine Inselzellinfusion, 9 (25%) zwei und 16 (44%) erhielten drei Inselzellinfusionen. Die Insulinunabhängigkeitsrate 1 Jahr nach Transplantation betrug bei diesen Patienten 44%. 28% der Fälle zeigten zwar eine Inseltransplantat-Funktion (signifikante C-Peptidspiegel) aber keine Insulinunabhängigkeit („Partielle Funktion“). Mit anderen Worten wurde die Inseltransplantatfunktion innerhalb eines Jahres in 72% der Fälle aufrechterhalten, wohingegen sich bei 28% der Empfänger ein komplettes Transplantatversagen innerhalb eines Jahres zeigte (*Shapiro 2006, Bretzel 2007*).

In einer Studie von *Warnock* aus dem Jahr 2008 wurde bei 43 Patienten das Outcome der Inselzelltransplantation mit der medikamentösen Insulintherapie in Bezug auf diabetisch bedingte Komplikationen wie Glukose-Stoffwechsel (HbA1c), Entwicklung einer Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie verglichen. Die Inselzelltransplantation wurde nach dem Edmonton-Protokoll durchgeführt. Die Dauer der Studie betrug durchschnittlich 38 ± 18 Monate. Dabei zeigte sich, dass mit Hilfe der Inselzelltransplantation eine signifikante Verbesserung des C-Peptidspiegels im Vergleich zur Insulintherapie erzielt werden konnte (HbA1c in (%) von $7,5 \pm 0,9$ mit Insulintherapie versus $6,6 \pm 0,7$ mit Hilfe der Inselzelltransplantation). Desweiteren wurde durch die Inselzelltransplantation ein geringeres Voranschreiten der Retinopathie erreicht (10 von 82 betroffenen Augen nach Behandlung mit Insulin versus 0 von 51 nach Inselzelltransplantation). In der Entwicklung einer Nephropathie und Neuropathie konnten keine signifikante Unterschiede zwischen den beiden zu vergleichenden Verfahren gefunden werden. Unter beiden Behandlungen kam es zu einem

Rückgang sowohl von Nephropathie wie auch Neuropathie. Insgesamt konnte mit dieser Studie gezeigt werden, dass durch die Inselzelltransplantation die Insulinabhängigkeit reduziert und die Stoffwechseleinstellung bei vielen Patienten verbessert werden kann. Zusätzlich kommt es durch die Inselzelltransplantation zu einer signifikanten Verhinderung des Voranschreitens der diabetischen Retinopathie (*Warnock 2008*).

Nach der Einführung des Edmonton-Protokolls folgte ein noch nie dagewesenes exponentielles Wachstum an klinischen Inselzelltransplantationen. So wurden von 1999 bis 2005 652 Patienten mit einem Diabetes Typ I an 47 Zentren weltweit behandelt. Das repräsentiert einen signifikanten Meilenstein, da jetzt mehr Patienten mit einem Diabetes Typ I in den letzten 6 Jahren Inselzellimplantate erhalten haben als in der gesamten 30jährigen Geschichte der Inselzelltransplantation.

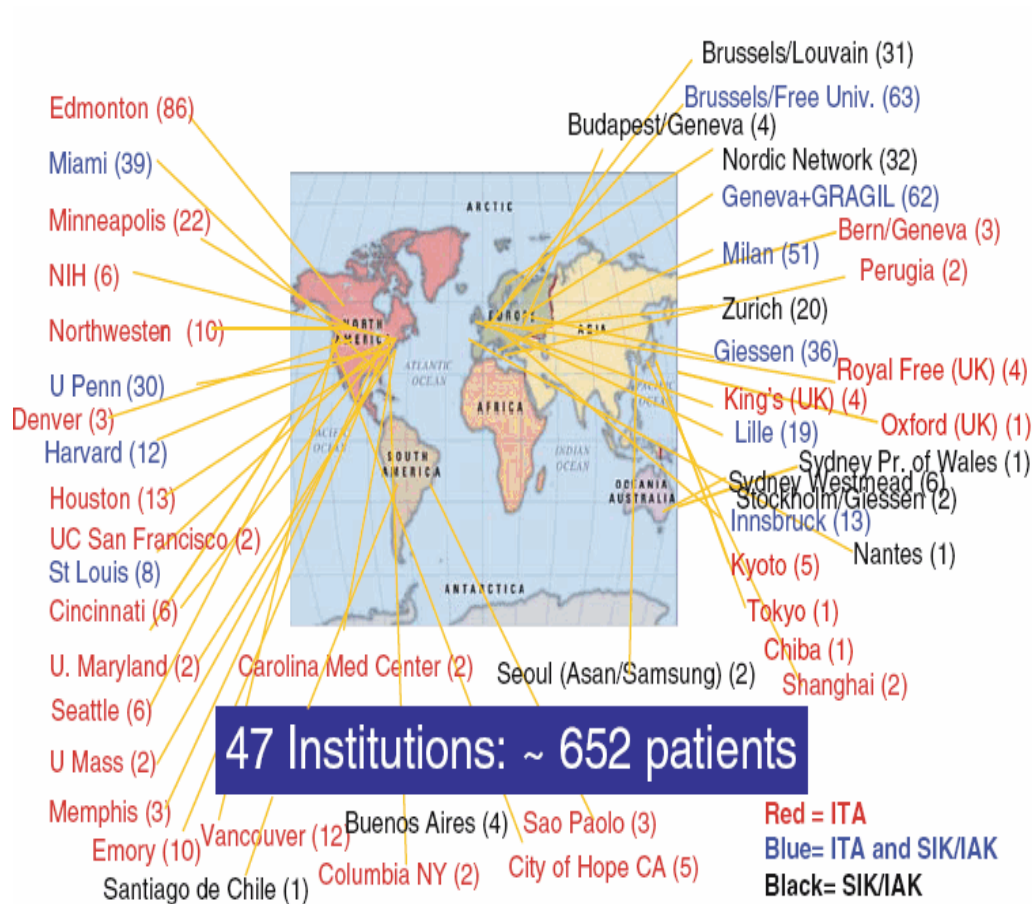


Abb. 1.3: Dargestellt sind die Inseltransplantationszentren mit der Anzahl der beim Menschen durchgeführten allogenen Inselzelltransplantationen zwischen 1999-2005 (Bretzel 2007).

Zwischen Januar 1990 und Dezember 2004 wurden der ITR 458 gut dokumentierte Inselzelltransplantationsfälle gemeldet, die in eine Follow-Up-Studie eingingen. An Hand dieser Fälle zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Inseltransplantatfunktion auf 82% und der Insulinunabhängigkeit auf 43% durch die Einführung des Edmonton-Protokolls. Besonders die kumulative 1-Jahres-Patientenüberlebensrate betrug 97%, mit 96% in der IAK-, 96% in der SIK- und 100% in der ITA-Empfängergruppe (Bretzel 2007).

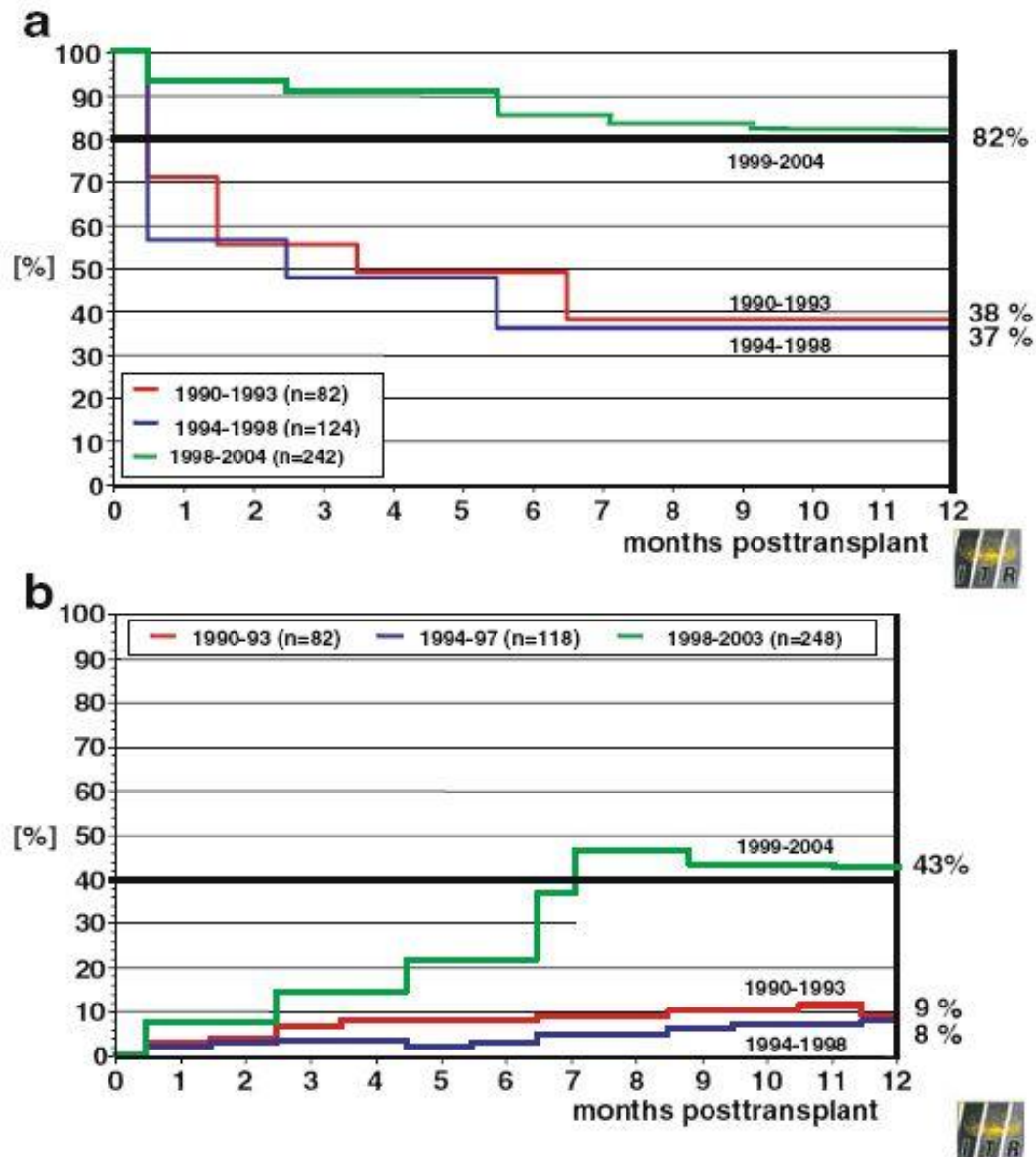


Abb. 1.4: Dargestellt ist in **(a)** das kumulative 1-Jahres Inseltransplantatüberleben und in **(b)** die Insulinunabhängigkeitsraten bei 458 gut dokumentierten C-Peptid negativen Typ-I-diabetischen Empfängern nach allogener Inselzelltransplantation (*Bretzel 2007*).

Demgegenüber steht die Gruppe der autologen Inselzelltransplantationen. So wurden zwischen den Jahren 1990 und 2005 der ITR weltweit 275 Inselauto-transplantationen gemeldet. Einschliesslich historischer Fälle betrug die Gesamtzahl an Inselzellautotransplantationen 375 (*Brendel 2001, Bretzel 2007*). Transplantiert wurden Patienten, die auf Grund anderer Ursachen ihr ursprüng-

liches Pankreas (z.B. durch eine Pankreatitis ohne Verlust des β -Zellapparates) verloren haben. Bei diesen Patienten betrug die Insulinunabhängigkeit länger als eine Woche 75% und die Insulinunabhängigkeit größer als ein Jahr 48% bei einer transplantierten Inselmenge von mehr als 300.000 Inselzelläquivalenten (IEQ). Die längste Insulinunabhängigkeit nach totaler Pankreatektomie wurde in einem Zeitraum von mehr als 16 Jahre beobachtet (*Brendel 2001, Bretzel 2007*).

1.7 Verfahren zur Bestimmung der Inselzellmasse

1.7.1 Volumenbestimmung

Über Jahre hinweg wurden zahlreiche Verfahren zur Inselmassenbestimmung bei Menschen und großen Tieren entwickelt und weiterentwickelt. Da es zu diesem Zeitpunkt jedoch noch keine standardisierten Kriterien zur Bestimmung der Isolationsergebnisse gab, waren eine Interpretation und ein Vergleich der Ergebnisse schier unmöglich. Bis zu diesem Zeitpunkt war die Kenntnis der Anzahl an transplantierten Inselzellen zur Festlegung einer Dosis für Transplantationszwecke nicht ausreichend genug, da Inselzellpräparationen aus Zellclustern variierender Größen bestanden. So wurde ein Workshop auf dem 2. Kongress für Pankreas- und Inselzelltransplantation in Minneapolis im Jahre 1989 veranstaltet, um ein gemeinsames und standardisiertes Konzept zur Inselbestimmung bei großen Säugetieren, einschließlich des Menschen, zu entwickeln.

Die Suche nach einer gemeinsamen Basis zum Ausdruck der Inselmenge für Transplantationszwecke führte zur weltweiten Einführung des Inselzelläquivalentes (IEQ) als Standardeinheit des Inselzellvolumens (*Stegemann 1998*). Bei einem Inselzelläquivalent (IEQ) handelt es sich um eine fast kugelförmige Insel mit einem Durchmesser von 150 μm (*Scharp 1992*).

An Hand der kugelförmigen Gestalt der Inselzellen lautet die Formel zur Berechnung des Inselvolumens (V) wie folgt:

$$V = 4/3 \times \pi \times r^3$$

r = Radius der Inselzelle

Die hier beschriebene konventionelle manuelle Methode zur Bestimmung der Inselzellausbeute mittels Volumenbestimmung stellt eine visuelle Methode dar. Zu Beginn der Auswertung erhält der Beobachter eine Probe an isolierten Inselzellen mit einem bekannten Verhältnis der Gesamtmenge an isoliertem Gewebe (*Stegemann 1998*). Es ist wichtig mehrere Proben zu sammeln und auszuwerten, um Zählfehler zu minimieren - so z. B. 5 Aliquots von 50 µl nach Suspension der Inselpräparation in einem 200 ml Behälter (*Ricordi 1990*).

Um eine Inselzelle von einem Klumpen exokrinen Gewebes, von Ganglien, Lymphknoten oder so genannten Membranbällen zu unterscheiden, wird die Platte mit Dithizon (DTZ) bedeckt. DTZ färbt Zink in den Insulin-Granula in ein charakteristisches Rot ein. Nach dem Anfärben der Probe ist es dann möglich, die nun rot erscheinenden Inseln zu erkennen und zu zählen (*Latif 1988, Ricordi 1990*).

Mit Hilfe eines Hellfeldmikroskops, welches im Objektträger eingebaute Gitternetzlinien enthält, beginnt der Beobachter nun mit der Auswertung der Inselzellausbeute. Durch dieses Gitternetz ist der Beobachter in der Lage, einen Durchschnittsradius der Inselzelle zu bestimmen. Der Beobachter wählt nun 20 zufällige Felder aus und zählt die mit DTZ gefärbten Objekte darin, die einen Durchmesser größer als 50 µm haben, aus (*Ricordi 1990, Stegemann 1998*). Objekte, welche einen kleineren Durchmesser als 50 µm besitzen werden bei der Methode der Volumenbestimmung ignoriert, da ihr Anteil am Gesamtvolumen des isolierten Gewebes signifikant gering ist (*Ricordi 1990*).

An Hand des so ermittelten Durchmessers werden diese Inselzellen nun in verschiedene Größenklassen aufgeteilt (**Tabelle 1.1**). Um nun die Gesamtausbeute einer Präparation ausgedrückt in Anzahl an Inselzelläquivalenten (IEQ) zu erhalten, wird folgendes Prinzip angewendet: Die in jeder Größenklasse befindlichen Inselzellen, wurden mit den für ihre Größenklasse unterschiedlichen Umrechnungsfaktoren multipliziert. Diese Umrechnungsfaktoren der einzelnen Durchmesserklassen in Inselzellen von 150 µm Durchmesser (= Inselzelläquivalente) basieren auf dem Durchschnittsvolumen dieser Klasse geteilt durch das Volumen einer Inselzelle mit 150 µm Durchmesser. So beträgt zum Beispiel der Umrechnungsfaktor für die Durchmessergrößenklasse 50-100 µm:

$$0,5(4/3 \pi 25^3 + 4/3 \pi 50^3) / 4/3 \pi 75^3 = \mathbf{0,167}$$

(*van der Burg 1997*).

Mit Hilfe dieser Umrechnungsfaktoren ist es somit nun möglich, die Gesamtinselfanzahl jeder Präparation in die Zahl an Inselzelläquivalente (IEQ) auszudrücken. Die dann ermittelte Anzahl an IEQ der Probe kann dann hochgerechnet werden, um die Ausbeute der gesamten Inselzellisolation anzugeben (*Stegemann 1998*).

Tab. 1.1: Klassische Internationale Methode der IEQ - Bestimmung

Dargestellt ist die Bestimmung des Inselzellvolumens für jede 50 µm Durchmessergrößenklasse und der relative Umrechnungsfaktor in Inseln von 150 µm Durchmesser.

Inseldurchmesser in µm	Durchschnittsvolumen in µ³	Umrechnung in In- seln von 150 µm Durchmesser
50-100	294,525	0,16
100-150	1,145,373	0,66
150-200	2,977,968	1,7
200-250	6,185,010	3,5
250-300	11,159,198	6,3
300-350	18,293,231	10,4
350-400	27,979,808	15,8
400-450	40,611,628	23,0
450-500	56,581,390	32,0

Neben der oben beschriebenen manuellen Methode der Volumenbestimmung wurden auch computergestützte Methoden zur Bestimmung der Inselzellausbeute beschrieben (Niclauss 2008). Die isolierten und gereinigten Inselzellen wurden dabei wie bei der Standardmethode mit DTZ angefärbt und im Anschluss mit Hilfe einer Digitalkamera abgebildet. Im Anschluss erfolgt dann ein Vergleich der Inselzellausbeute berechnet nach dem manuellen oben beschriebenen Verfahren, der manuellen Analyse von Digitalbildern sowie auch computergestützten Auswertungen. Die manuelle Analyse erfolgte durch Verwendung des Adobe Photoshop Programms, mit dessen Hilfe Gitternetzlinien über die Digitalbilder gelegt wurden. Die computergestützte Auswertung dagegen erfolgte mit Hilfe der MetaMorph und der ImageJ -Software.

Die Ausbeute an IEQ wurde dann auf zwei Arten ermittelt. Zum einen indem die Inselzellen gemäß ihrem Durchmesser nach dem Ricordi-Algorithmus mit Hilfe der verwendeten Umrechnungsfaktoren multipliziert wurden. Zum anderen, indem das individuelle Volumen jeder Inselzelle zur Berechnung der Ausbeute an Inselzelläquivalenten (IEQ) verwendet wurde.

Alternativ dazu wurde das längliche Volumen der Inselzellen bestimmt, indem man sich ein zigarrenartiges sphäroidales Objekt vorstellte, gleich einer um ihre Hauptachse drehenden Ellipse.

Im Vergleich der Ergebnisse zwischen der digital manuellen und der computergestützten Analyse zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Auswertung der Mittelwerte von Inselzellanzahl und Anzahl an IEQ. Bei der konventionellen manuellen Methode dagegen ergaben sich höhere Werte für die Inselzellanzahl. Die Verteilung der Anzahl an IEQ gemäß den Inseldurchmessern war für die standardisierte manuelle, digital manuelle und computergestützte Analyse ähnlich. Es zeigte sich jedoch eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der computergestützten Analyse im Vergleich zur manuellen Analyse. Die Anzahl an IEQ war um 16% höher bei der Auswertung der Digitalbilder mit Hilfe des Ricordi-Algorithmus im Vergleich zur Auswertung mit Hilfe der Bestimmung des individuellen Inselzellvolumens gemäß ihrer arithmetischen Summe aus den einzelnen IEQ- Werten.

Im Vergleich zur Berechnung mit Hilfe der Bestimmung des länglichen Inselvolumens und der Bestimmung der individuellen Inselvolumina ergab sich eine 40% höhere Anzahl an IEQ- Werten (*Niclauss 2008*).

1.7.2 Flächendichtemessung

An Hand von einigen Studien, auf welche im Anschluss noch näher eingegangen wird, konnte gezeigt werden, dass Inselzellen nicht immer kugelförmige runde Organellen verstreut in einem dreidimensionalen Raum darstellen. Daher wurde von unserer Arbeitsgruppe zur Bestimmung der Inselausbeute die Methode der Flächendichtemessung eingeführt. Diese Methode stellt eine Anwendung des *Delesse*-Prinzips dar, welches gewöhnlich zur Volumendichtebestimmung

mung bei morphometrischen Analysen benutzt wird (*Delesse 1847, Weibel 1979*).

Delesse, ein französischer Geologe, untersuchte im Jahre 1847 die quantitative Zusammensetzung eines Gesteines, indem er die Volumina der einzelnen Gesteinskomponenten bestimmte. Dazu legte er Papier auf den Schliff des Gesteines, zeichnete die Konturen der Gesteinskomponenten nach, schnitt diese Teile aus dem Papier heraus und wog das Papier des Gesteins sowie das der einzelnen Komponenten. Er folgerte, dass sich das Verhältnis der Anschnittsflächen der Komponenten zur Anschnittsfläche des Referenzkörpers genauso verhält, wie das Verhältnis des Volumens der Komponenten zum Volumen des Referenzkörpers (*Weibel 1979, Voith 2002*). Er formulierte demnach folgende Beziehung:

$$\mathbf{Vv = Aa} \qquad \mathbf{(1)}$$

Vv: Volumendichte der Komponenten

Aa: Flächendichte der Komponenten

Diese von *Delesse* formulierte Aussage stellte eines der fundamentalsten Prinzipien in der Stereologie dar. Er zeigte zum ersten Mal damit, dass ein zufälliger Schnitt mengenmäßig repräsentativ sein kann für die Anordnung des Materials, von dem er abstammt (*Weibel 1979, Voith 2002*).

Rosival benutzte im Jahre 1898 ein aus Linien bestehendes Messsystem. Er setzte die Länge der Linien, welche die Komponenten trafen ins Verhältnis zur Gesamtlänge der Linien, die den Referenzkörper trafen. Daraus ergab sich folgende Relation:

$$\mathbf{Vv = LI} \quad (2)$$

LI: Längendichte der Komponente

Dieses Prinzip wurde im Jahre 1933 von Glagolev modifiziert. Er führte ein Punktraster ein und setzte die Anzahl der Punkte, welche die Komponenten trafen in Beziehung zur Gesamtzahl der Punkte, welche den Referenzkörper trafen.

$$\mathbf{Vv = Pp} \quad (3)$$

Pp: Punktdichte der Komponenten

Das Verhältnis des Volumens der Komponente zum Volumen des Referenzkörpers verhält sich genauso wie das Verhältnis der Punkte, welche die Komponente treffen zur Gesamtzahl der Punkte, die den Referenzkörper treffen.

Aus der Verknüpfung der Formeln 1, 2 und 3 ergab sich die Formel des *Delesse*-Prinzipes zur Volumendichtemessung/ Flächendichtemessung:

$$\mathbf{Vv = Aa = LI = Pp}$$

(*Weibel 1979, Voith 2002*).

Das Delesse- Prinzip besagt demnach, dass eine dreidimensional Struktur als Fläche in einem Satz von zweidimensionalen Schnitten betrachtet werden kann (*Nyengaard 1999*).

Auf unsere Methode zur Bestimmung der Inselzellausbeute angewandt, handelt es sich bei der Flächendichte demzufolge um diejenige Fläche, welche von den Inselzellen besetzt wird, ausgedrückt in % im Verhältnis zur Gesamtfläche (*Lembert 2003*). Hierbei spielt die bei der Volumenbestimmung wichtige reguläre kugelförmige Inselgestalt zur Ermittlung der Inselzellausbeute keine Rolle mehr. Dieses Vorgehen nach dem Prinzip der Flächendichtemessung gibt Informationen über das Gesamtvolumen in mm^3 oder die Volumenverteilung in % der Inselzellen im Pankreas oder in der Inselfraktion nach der Purifikation. Sie wurde bisher noch nicht routinemäßig zur Berechnung der IEQ angewandt, da die verschiedenen Inselgrößenklassen unterschiedlich viel zur Bestimmung der Inselausbeute als IEQ beitragen. Erst die Kenntnis aller einzelnen Inselgrößen ist für die Berechnung nötig (*Lembert 2003*).

1.8 Ziele und Fragestellungen der Arbeit

Die Aufschlüsselung der Isolationsergebnisse nach Transplantationszentren zeigte, dass der Transplantationserfolg sehr stark von der Erfahrung der Transplantationszentren in der Inselzellisolierung und somit der Gewinnung der Inselzellen als Inselzelläquivalente (IEQ) abhängt. So konnten die erfahrenen Zentren mit einem hundertprozentigen Erfolg zur Studie beitragen, wohingegen die unerfahrenen mit einem hundertprozentigen Misserfolg beitrugen (*Stock 2004, Shapiro 2006*).

Ein kritischer Schritt in der Gewinnung von Inselzellen zur Transplantation stellt nach klinischen Kriterien die Berechnung der Inselzelldosis in Anzahl an Inselzelläquivalenten (IEQ) dar. Nach der heute gültigen Definition handelt es sich bei einem Inselzelläquivalent um eine fast kugelförmige Inselzelle mit einem Durchmesser von 150 μm (*Ricordi 1990*). Da wie bereits erwähnt die isolierten Inseln meistens nicht kugelförmig und auch nicht symmetrisch geformt sind, muss der Operator eine grobe Einteilung der Inseln gemäß ihrem Durchmesser in Größenklassen vornehmen. Im Anschluss wird dann für jede Klasse die Anzahl an IEQ berechnet, indem die Inselzellen mit Umrechnungsfaktoren multipliziert werden, welche auf dem Durchschnittsvolumen der einzelnen Klassen basieren. Diese Art der Berechnung ist zwangsweise stark fehlerbehaftet und vor allem nicht reproduzierbar. Nach der initialen mikroskopischen Bewertung besteht keine Möglichkeit einer unabhängigen retrospektiven Berechnung des Inselertrages (*Stegemann 1998, Fernandez 2005*).

Um die genannten Nachteile in der Berechnung der Inselzellausbeute als Inselzelläquivalente (IEQ) zu beseitigen, wurde von unserer Arbeitsgruppe 2003 ein alternatives Auswertungsverfahren zur Inselzellberechnung mittels Flächendichtemessung entwickelt (*Lembert 2003*). Diese Methode erlaubt im Gegensatz zur konventionellen Methode eine benutzerunabhängige retrospektive Analyse des Inselertrages. Diese retrospektive reproduzierbare Berechnung des Inselertrages ist vor allem wichtig zur Herstellung von Inselzelltransplantaten nach GMP-Kriterien, auf welche im Anschluss noch näher eingegangen wird.

In der hier vorliegenden Arbeit soll nun dieses entwickelte Verfahren der Flächendichtebestimmung mit dem konventionellen Verfahren zur Volumenbestimmung in der Berechnung der Inselzellausbeute als Inselzelläquivalente (IEQ) verglichen werden. Es soll untersucht werden, ob die Flächendichtemessung eine zuverlässige Untersuchungsmethode zur Bestimmung der Inselzelldosis für die klinische Anwendung darstellt.

Die derzeitige Verwendung der Flächendichtemessung basiert auf der empirischen Beobachtung, dass das klassische und das neu entwickelte Verfahren zu sehr ähnlichen Ergebnissen bei der Berechnung der Inselmenge führen. Die zugrunde liegende Vermutung ist, dass die Häufigkeitsverteilung der Inseln nach der Isolation so beschaffen ist, dass sie bei der Berechnung des Inselvolumens durch die Flächendichte den stetig steigenden Einfluss des Volumens in der klassischen Berechnung der IEQ genau kompensiert. Diese Hypothese wird im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht. Damit soll diese Arbeit dazu dienen, die bereits in der klinischen Anwendung befindliche Technik der Flächendichtemessung experimentell und rechnerisch zu untermauern.

Im Einzelnen sollen folgende Schwerpunkte in dieser Arbeit abgehandelt werden:

- Die klassische Berechnung der Inselmenge basiert auf einer zweidimensionalen Größenbestimmung und einer dreidimensionalen Extrapolation. Die neue entwickelte Flächendichteberechnung basiert nur auf einer zweidimensionalen Analyse. An Hand eines Rechenbeispieles soll untersucht werden, ob bei Anwendung über kleinen und großen Inselzellen die Flächendichtemessung systematisch größere oder kleinere Ergebnisse liefert?
- Kann es eine theoretische Größenverteilung von Inselzellen geben, die zu gleichen Ergebnissen bei Anwendung beider Auswertmethoden führt?

Gefordert ist dabei ein mathematischer Zusammenhang, der aus der Größenverteilung der Inseln/ Häufigkeitsverteilung eine Gerade über alle Größenklassen macht (konstanter Beitrag der Inseln jeder Größenklassen zur Berechnung der Anzahl an Inselzelläquivalenten).

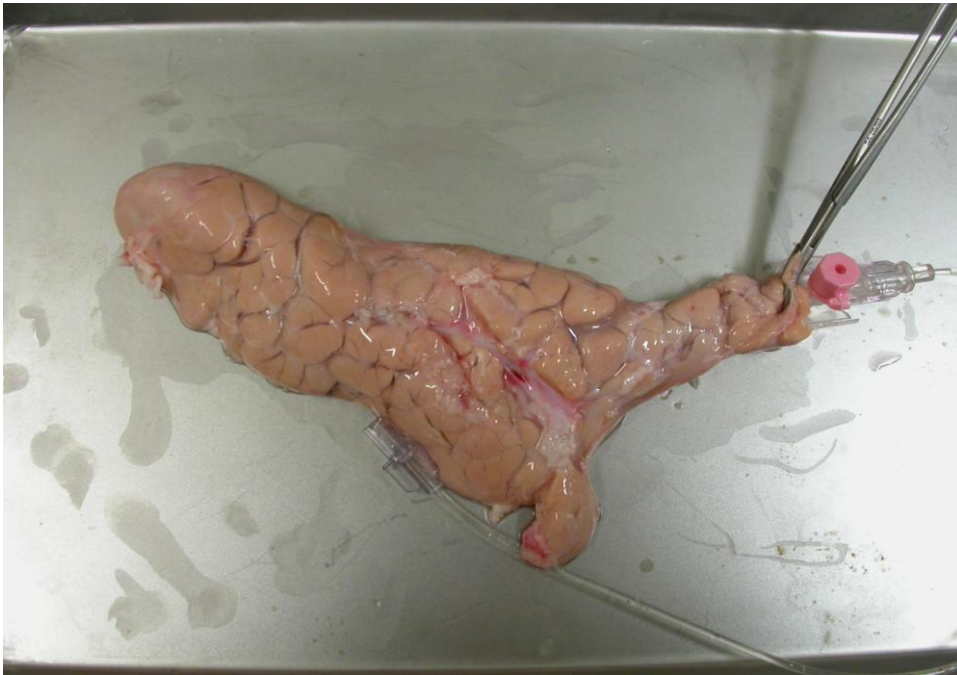
- Im praktischen Teil soll die tatsächliche Größenverteilung von porzinen Inselzellen nach der Purifizierung ermittelt werden. Dazu werden 12 reale Inselzellpräparationen untersucht. Zur manuellen Auswertung dient das Adobe Photoshop Programm. Die Größenverteilung von porzinen Inselzellen soll bestimmt werden und mit Literaturwerten verglichen werden.
- Die natürliche Größenverteilung soll mit der theoretisch zu fordernden verglichen werden und Fehlergrenzen sollen erarbeitet werden, welche die Anwendbarkeit der Flächendichte in der Praxis festlegen.

2. Material und Methoden

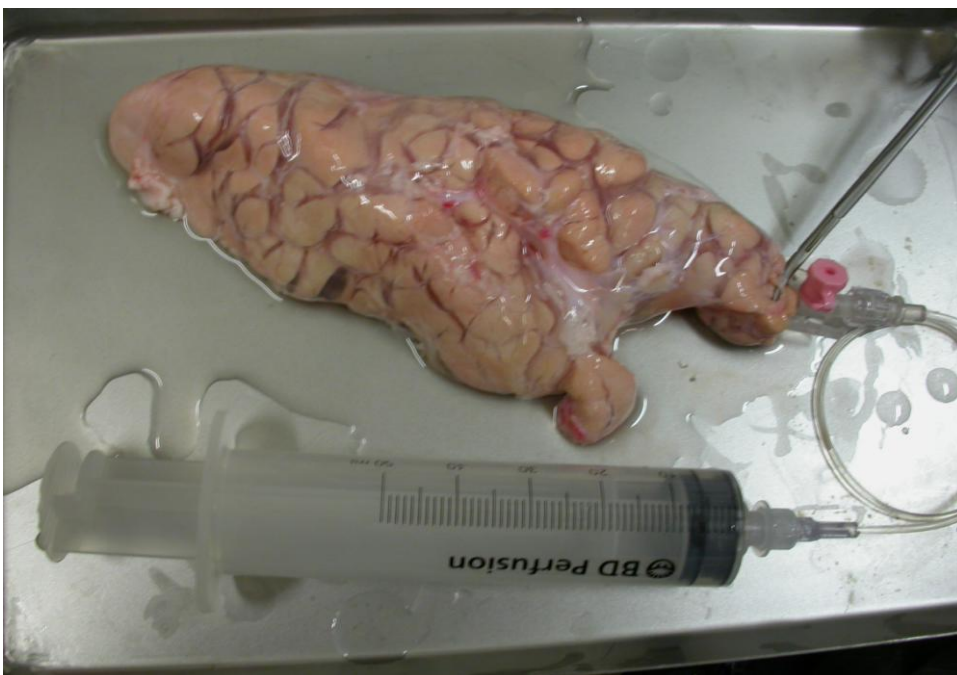
2.1 Das Schwein als Versuchstier

Man verwendete zur Isolierung von Langerhans'schen Inseln die Pankreata junger Hybrid-Schlachtschweine beiderlei Geschlechts. Die Pankreata der Versuchstiere wurden am Schlachthof in Rottenburg und Gärtringen entnommen. Die Tiere waren bei der Schlachtung ca. 6 Monate alt und wogen ungefähr 100 kg.

Zur Präparation wurden nur unverletzte und nicht ödematöse Organe verwendet und komplett auf dem Schlachthof entnommen. Dazu wurde das Schwein durch einen medianen Bauchschnitt eröffnet und das Pankreas mitsamt seiner umgebenden Bindegewebskapsel vorsichtig von Darm und Milz abgetrennt. Die warme Ischämiezeit betrug dabei 20 Minuten. Das Pankreas wurde dann sofort von seiner Bindegewebskapsel und von umgebendem Fett- und anderem Gewebe befreit. Danach wurde es gewogen. Der duodenale Lappen des Pankreas wurde abgetrennt und in kalter HBSS Lösung für spätere biochemische Analysen aufbewahrt. Im Anschluss wurde der Milzlappen des Schweinepankreas präpariert und der Ductus pancreaticus aufgesucht. In diesen wurde eine Kanüle (20G x 32mm) eingeführt, welche mit chirurgischem Nahtmaterial fixiert wurde. Über eine 50-ml-Perfusionsspritze, an die ein Schlauch befestigt war, wurden etwa 50 ml eiskalte UW Lösung infundiert, um das Organ haltbar zu machen und die Organintegrität zu demonstrieren (*Brandhorst 2005, Klaffschenkel 2007*). Beide Pankreasteile wurden dann in kaltem HBSS Medium gelagert und auf schnellstem Wege ins Labor befördert, um sogleich weiterverarbeitet zu werden. Der Verdauungsschritt begann ungefähr 3 Stunden nach der Organentnahme, was einer kalten Ischämiezeit von 3 Stunden entsprach. Der Desintegrationsvorgang wurde eingeleitet, indem über den kanülierten Ductus pancreaticus major das 150 ml Liberase-Medium vollständig infundiert wurde. Das Organ wurde durch das Injizieren der Enzymlösung komplett aufgebläht (*Ricordi 1988*).



A



B

Abb. 2.1: Dargestellt ist in **(A)** ein typischer Schweinepankreas nach Präparation und Einführen der Perfusionsspritze zur Integritätsprüfung und in **(B)** nach Beginn des Desintegrationsvorganges durch Injektion der Kollagenaselösung.

2.2 Geräte

Alle im Folgenden nicht aufgeführten Geräte entsprachen der üblichen Ausstattung in wissenschaftlichen Labors.

2.2.1 Schweineinselgewinnung und Purifikation

Edelstahl-Verdaukammer mit Sieb (1mm Maschenweite) mit 750 ml Füllvolumen	Eigenbau (nach Ricordi et al. 1988)
Kamera	Nikon Collpix 4500
Membran-Einsätze für Zellkultur	Millicell; Porengröße: 3 µm Millipore
Schlauchpumpe	MCP- Standard, ISM 404, Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Mikroskop	Olympus Stereo IM, Olympus, Japan
Software	Adobe Photoshop 6.0
Zellseparator	COBE 2991, Blood Cell Processor
Zentrifuge	Sorvall, RC 5C plus
Analysenwaage:	Sartorius Handy, Sartorius Schweiz
Brutschrank mit CO ₂ - Regler	B 5060 E, Heraeus, Hanau
Gamma Counter Cobra	Packard
Software:	Graph Pad Prism Version 2.0, San Diego, CA, USA

2.3 Chemikalien

Alle im Folgenden nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p.a.-Qualität bezogen.

2.3.1 Schweineinselgewinnung, Purifikation und Perfusion

Dithizon	Sigma, Taufkirchen
Enterokinase	EC 3.4.21.9, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (spezif. Aktivität 2,4 U/mg)
Biocoll	Biochrom AG, Berlin, Germany
HBSS-Puffer	Biochrom AG, Berlin, Germany
HEPES-Puffer	Biochrom AG, Berlin, Germany, 25 mM
Liberase PI zur Inselzellisolierung	Boehringer Mannheim, Deutschland
UW-Lösung, Viaspan	DUPONT Pharma, Niederlande

2.4 Lösungen zur Schweineinselzellgewinnung

Kammermedium

Zur Herstellung des Kammermediums wurde steriler HBSS-Puffer mit 25mM HEPES versetzt.

Liberase Medium

Zur Herstellung des Liberase Mediums wurde 1,5 mg pro g Pankreasgewebe der gefriergetrocknet gelieferten Liberase in 150 ml Kammermedium, das vorher auf 37°C erwärmt wurde, vollständig gelöst.

Elutionsmedium

Zur Herstellung des Elutionsmediums wurde HBSS-Puffer mit 25mM HEPES versetzt.

Waschmedium

Zur Herstellung des Waschmediums wurde HBSS-Puffer mit 25mM HEPES versetzt.

Dithizonlösung

10 mg Dithizon wurden in 1ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. 500 µl dieser Lösung wurden mit 10 ml Kammermedium verdünnt, 10 Minuten bei 1100 g zentrifugiert und der Überstand anschließend durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße filtriert. Die Lösung muss am Versuchstag frisch zubereitet werden.

Gradient-Lösung

Zur Reinigung der Inselzellen wurde ein diskontinuierlicher Gradient mit Biocollfertigungsmittel und UW- Lösung verwendet.

Um die Bodenschicht der Gradientenlösung herzustellen, wurden 200 ml der Biocollösung (Dichte 1,2 g/ml) mit 50 ml der UW-Lösung vermischt.

Die mittlere Schicht des Gradienten bestand aus 50 ml der Biocollösung und 50 ml der UW-Lösung (Dichte 1,09 g/ml).

Als oberste Schicht dienten 100/120 ml der UW-Lösung (Dichte 1,05 g/ml).

2.5 Isolierung der Inselzellen

Die Inselisolierung erfolgte in drei Schritten in einem modifizierten geschlossenen System. Man wendete die kontinuierliche Digestions-Filtrationsmethode an (modifiziert nach *Ricordi 1988*) (**Schritt I**). Vor dem Digestionsvorgang wurde das System auf 37°C vorerwärmt, indem 1L HBSS mit HEPES versetzt durch das System gepumpt wurden. Im Anschluss wurde der geblähte Pankreaschwanz in die aus Edelstahl bestehende Verdaukammer eingebracht. Diese wurde dann mit ca. 600 ml Kammermedium aufgefüllt. Die Verdaukammer weist 2 Schlauchanschlußstücke auf und eine Öffnung zur Entnahme von Proben mit Hilfe einer Insulinspritze. Bereits verdautes Gewebe wurde mit Hilfe der 8 Stahlkugeln - und regelmäßigem, vorsichtigem manuellen Schütteln - oder mit einem sich stetig drehenden Rührfisch aus dem Gesamtverband gelöst. Nachdem der Deckel der Kammer mit dem eingesetzten Metallsieb aufgesetzt wurde, füllte man das System komplett mit dem Kammermedium auf und stoppte die Zeit. Das grobmaschige Sieb, das die Ricordi-Kammer unterteilt, erlaubt nur Gewebeteilen, die 500 µm oder kleiner sind, den Durchtritt und dient so zum

Filtern größerer Gewebstücke. Das Kammermedium wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe mit einer Flussrate von 200ml/min im Kreis gepumpt und dabei mit einer Heizschlange auf 37°C temperiert. Die Kammertemperatur muss während der Liberation konstant zwischen 36,5°C und 37°C (optimaler Wirkungsgrad der Liberase) gehalten werden. Nach circa 10 Minuten wurden dann alle 3 bis 5 Minuten mit Hilfe einer Insulinspritze aus der Kammer Proben genommen. Diese werden dann mit der Dithizonlösung auf einen Objektträger gegeben und unter dem Stereomikroskop wird dann der Isolationsvorgang beurteilt. Dithizon bindet an die Zinkionen des Insulins und färbt so die Inselzellen in ein charakteristisches rot ein (*Latif 1988, Ricordi 1990*). Sowie dann unter dem Mikroskop die ersten freien Inseln, also Inseln ohne exokrinem Anhang mit einem Durchmesser >100 µm, gefunden wurden, wurde der Digestions-Filtrationsschritt gestoppt.

Als **II. Schritt** folgte der Waschschrift (**Elution**) der Inseln. Dazu benutzte man 2 Liter des Elutionsmediums und spülte das System mit einer Flussrate von 100 ml/min. Das Eluat wurde über zwei dazwischengeschaltete Kühlplatten, die direkt mit der COBE 2991 verbunden waren, in den Beutel des COBE transportiert und dort zentrifugiert (2 min bei 2000 U/min). Der COBE 2991 Cell- Processor wird in der Transfusionsmedizin routinemäßig zur Trennung von Blutzellen verwendet. Ein Maximum von 600 ml Digest/Eluat (10°C) wurde sofort zentrifugiert (1min bei 1500 U/min). Der Beutel des COBE, in der sich das Eluat/Digest befand, wurde komplett ausgeleert und ein konzentriertes Digest/Eluat von 50 ml wurde in dem Beutel zurückgelassen. Mittels Dithizonfärbung überprüfte man das Effluat (14°C), ob sich in ihm noch Inselzellen befinden. Im Anschluss wurde die Ricordi-Kammer mit frischem HBSS Puffer gespült und das gekühlte Effluat wurde wieder in der COBE zentrifugiert. Dieses Verfahren wiederholte man bis eine Gesamtmenge von 3 Litern Puffer die COBE passiert hatten.

Die Reinigung der Langerhans'schen-Inselzellen (**Schritt III**) von exokrinen Gewebeteilen (**Purifizierung**) wurde als Dichtegradientenzentrifugation im

COBE 2991 Cell Processor durchgeführt (*Robertson 1993*). Hierzu benutzte man einen diskontinuierlichen Gradienten, hergestellt aus Biocollmedium und UW-Lösung (*Krickhahn 2002*). Bei der Dichtegradientenzentrifugation nutzte man die Differenz der gewebespezifischen Dichte zwischen Inselgewebe und exokrinem Gewebe aus. Die exokrinen Partikel bleiben auf Grund ihrer höheren Dichte in den Schichten mit der höchsten Dichte hängen, während die leichteren Inseln in die Schicht ihrer Dichte wandern und von dort aus isoliert werden können. Die Bodenschicht des Gradienten wurde in den COBE hinzugefügt und über einen Zeitraum von 15 Minuten mit Hilfe der Mixfunktion des COBE gemixt, um das konzentrierte Gewebe zu lösen. Danach wurde die mittlere Schicht zu dem sich drehenden COBE (1000 rpm) hinzugefügt, gefolgt von der obersten Schicht. Im Anschluß fügte man das Digest hinzu, in dem es auf den Gradienten aufgetragen wurde (*Krickhahn 2002, Klaffschenkel 2007*). In den folgenden 5 Minuten des Zentrifugierens (1000 U/min) wanderten die Inseln innerhalb des Gradienten zu der Schicht ihrer spezifischen Dichte. Anschließend wurde der Gradient mit erhaltenem Gewebe und Inseln in 20-ml-Fractionen in Zentrifugenröhrchen abgepumpt. Aus jedem der Röhrchen wurden 100 µl entnommen und mit 300 µl Dithizon gefärbt. Die Fractionen in den Röhrchen, die über die meisten Inselzellen verfügten, wurden mit Waschmedium versetzt und zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet noch einmal gewaschen und auf 5 ml pro Fraction eingengt.

2.6 Quantifizierung der Inselausbeute

Die Bestimmung der Inselausbeute erfolgte auf zwei Arten - nach dem konventionellen Prinzip mit Hilfe der **Volumenbestimmung** als auch nach dem Prinzip der neu entwickelten **Flächendichtemessung**.

Dem praktischen Teil wurde ein **Rechenbeispiel** vorangestellt, in welchem diese beiden Verfahren über die üblichen Größenverhältnisse der Inselzellen angewendet wurden. Als Grundlage hierfür dienten 10 imaginäre Inselzellen verschiedener Durchmessergrößen. Es sollte die Anzahl an Inselzelläquivalenten

(IEQ) sowohl mit der Methode der Volumenbestimmung als auch mit der Flächendichtemessung ermittelt werden.

Bei der Bestimmung der Inselzellausbeute nach der Methode der **Volumenbestimmung** wurden diese 10 Inselzellen gemäß ihrer Durchmessergröße auf die jeweiligen konventionellen Größenklassen aufgeteilt. Für jede Größenklasse wurde im Anschluss die Anzahl an Inselzelläquivalenten (IEQ) berechnet, indem die Inselzellen mit Umrechnungsfaktoren multipliziert wurden. Diese Umrechnungsfaktoren beruhten auf dem mittleren Durchschnittsvolumen jeder Größenklasse (*van der Burg 1997*).

Zur Bestimmung der Inselausbeute nach dem Prinzip der **Flächendichtemessung** wurde zuerst die Bildfläche ermittelt, in welcher sich diese 10 imaginären Inselzellen befinden sollten. Diese Bildfläche war auch für den experimentellen Teil von Bedeutung. Hierzu wurde als Referenz ein Inselzelläquivalent (IEQ) verwendet, das bei den einzelnen Präparationen mitabgebildet wurde. Wie schon erwähnt, handelt es sich bei einem Inselzelläquivalent um eine standardisierte Inselzelle mit einem Durchmesser von 150 μm , das eine Fläche von 0,0177 mm^2 einnimmt. Mit Hilfe der Histogramm-Funktion des Adobe Photoshop Programms ließ sich ein prozentualer Anteil von 7,2% dieses Inselzelläquivalentes an der Bildfläche ermitteln. Das entsprach einer Gesamtbildfläche von 0,25 mm^2 für die einzelnen Präparationsbilder.

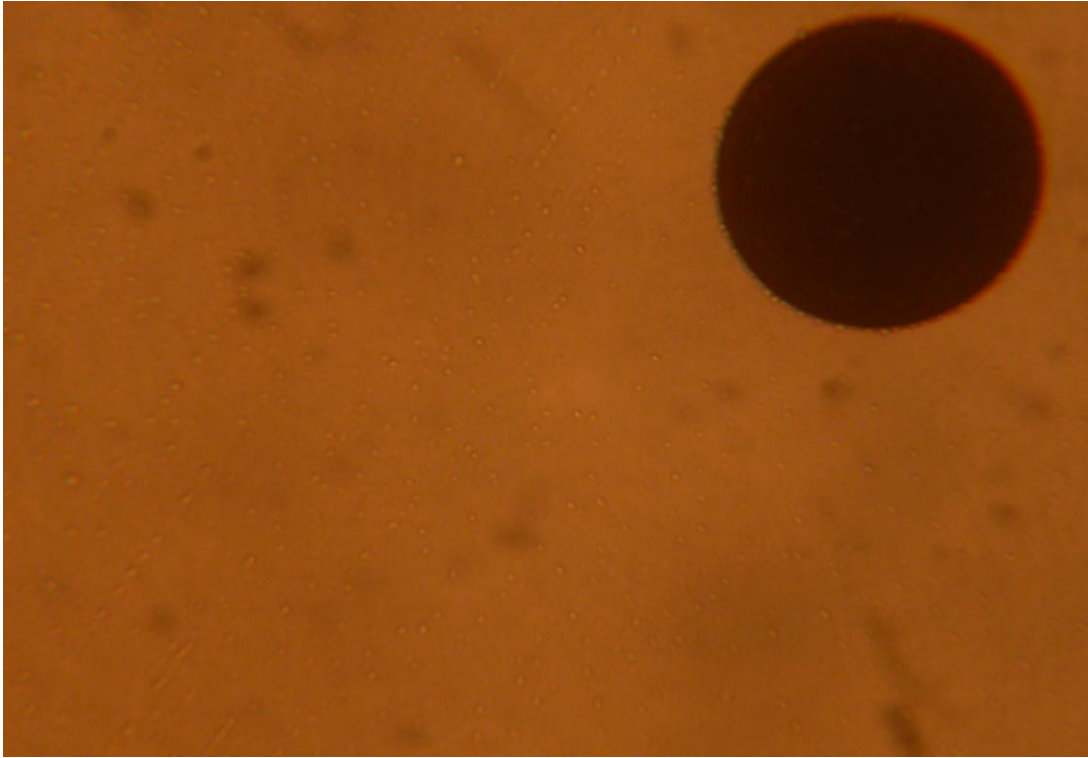


Abb. 2.2: Dargestellt ist eine geeichte Inselzelle von $150\ \mu\text{m}$ - ein Inseläquivalent (IEQ) - welche zur Bestimmung der Bildfläche verwendet wurde

Im Anschluss konnte nun die Flächendichte (AD) - die von diesen 10 Inselzellen besetzte Fläche - ermittelt werden. Dazu wurden die Flächen (A) der 10 Inselzellen der verschiedenen Durchmessergrößen durch die Bildfläche ($0,25\ \text{mm}^2$) dividiert. Mit Hilfe der Flächendichte war man nun in der Lage, die Anzahl an Inselzelläquivalenten zu bestimmen. Dazu wurde die Flächendichte mit dem Faktor 14,1 multipliziert. Dieser setzte sich zusammen, indem die Gesamtbildfläche durch die Fläche eines IEQ dividiert wurde.

Beispielrechnung:

Berechnung der *Fläche (A)* der 10 Inselzellen mit einem Durchmesser von 50 μm :

$$\begin{aligned} A &= \text{Radius } (r^2) \times \pi \times 10 \\ &= (d/2)^2 \times \pi \times 10 \\ &= 25^2 \mu\text{m} \times \pi \times 10 \\ &= 19,6 \mu\text{m}^2 \\ &= 0,0196 \text{ mm}^2 \end{aligned}$$

Berechnung der *Flächendichte (AD)*:

$$\begin{aligned} AD &= \text{Fläche der 10 Inseln/ Gesamtbildfläche} \\ &= 0,0196 \text{ mm}^2 / 0,25 \text{ mm}^2 \\ &= 0,0784 \\ &= 7,84 \% \end{aligned}$$

Berechnung der *Anzahl an IEQ pro beobachteter Fläche*:

$$\begin{aligned} IEQ &= \text{Flächendichte } (AD) * \text{Gesamtbildfläche/ Fläche eines} \\ &\text{IEQ} \\ &= 7,84 \% \times 0,25 \text{ mm}^2 / 0,0177 \text{ mm}^2 \\ &= 7,84 \% \times 14,1 \\ &= 1,11 \text{ IEQ} \end{aligned}$$

Im Anschluss an dieses Gedankenexperiment erfolgte die **experimentelle praktische** Inselzellquantifizierung nach Purifikation aus 12 verschiedenen realen Schweineinselzellpräparationen. Hierzu pipettierte man 300 µl aufgereinigte Inselzellen aus der auf 5 ml eingeeengten Fraktion zusammen mit 300 µl Dithizon in ein Microwell, das eine Fläche von 190 mm² besaß. Mit 100-facher Vergrößerung wurden die gereinigten und angefärbten Inselzellen für jede Präparation unterschiedlich oft fotografiert, wobei jeweils eine Bildfläche von 0,25 mm² getroffen wurde.

Die Bestimmung der abgebildeten Inselzellen basierte auf der Analyse von Digitalbildern, welche mit Hilfe des Adobe Photoshop Programms bearbeitet wurden. Mittels digitaler Bildbearbeitung konnte man die auf dem Bild rot erscheinenden Inselzellen in einen schwarzen Flächenanteil umwandeln. Im Anschluss wurde die Inselmenge als Anzahl von Inselzelläquivalenten (IEQ) sowohl mit der Methode der Volumenbestimmung als auch mit der Methode der Flächendichtemessung bestimmt.

Bei der Methode der **Volumenbestimmung** wurden die einzelnen Inselzellen ausgewählt und in einen neuen leeren Rahmen der gleichen Grösse des Adobe Photoshop Programms kopiert. Mit Hilfe der Histogramm-Funktion des Programms wurde dann die Größe jeder einzelnen Inselzelle in % der Bildgröße angegeben und als Fläche in mm² umgerechnet. Aus dieser ermittelten Fläche wurde der Durchmesser (d) der Inselzellen berechnet, indem angenommen wird, dass jede Inselzelle eine perfekte runde Insel darstellt (*Lembert 2003*). So lautet die Formel zur Berechnung des Durchmessers der Inselzellen folgendermaßen:

$$d = 2 [\text{Fläche (A) jeder Insel} / \pi]^{1/2}$$

Nachdem die Durchmesser aller Inselzellen bestimmt waren, wurden sie gemäß ihren Durchmessern auf die verschiedenen Durchmessergrößen-klassen aufgeteilt. Zur Berechnung der Anzahl an IEQ wurde die Anzahl der Langerhans'schen Inseln jeder Durchmessergruppe mit den entsprechenden Umrechnungsfaktoren multipliziert (*Ricordi 1990, van der Burg 1997*).

Der gesamte Inselertrag der Fraktion ergab sich dann aus der Summe der IEQ pro Bild multipliziert mit einem speziellen Faktor. Dieser setzt sich zusammen, indem die Fläche eines Microwell (190 mm^2) durch die Gesamtbildfläche der ausgewerteten Präparationsbilder ($0,25 \text{ mm}^2 \times X$ -Bilder) dividiert wird. Das Ergebnis wird dann mit der auf 5 ml einengten Inselfraktion, welche durch die entnommene Menge von $300 \mu\text{l}$ ($0,3 \text{ ml}$) aufgereinigter Inselzellen dividiert wurde, multipliziert.

Bei der **Flächendichtemessung** wurde mit Hilfe der Histogramm-Funktion des Photoshop Programms aus dem schwarzen Flächenanteil die Flächendichte - der prozentuale Anteil der mit Inseln belegten Fläche - bestimmt. Aus dieser Fläche konnten nun die Inselzelläquivalente bestimmt werden. Dazu wurde die Flächendichte mit dem Faktor $14,1$ ($0,25 \text{ mm}^2/0,0177 \text{ mm}^2$) multipliziert und so die Anzahl an IEQ pro beobachteter Fläche berechnet. Bei dem Faktor $14,1$ handelt es sich um die maximal mögliche Anzahl an IEQ pro Bildfläche (*Lembert 2003*).

Der gesamte Inselertrag der Fraktion ergab sich dann aus der Summe der IEQ pro Bild multipliziert mit einem speziellen Faktor. Dieser setzt sich zusammen, indem die Fläche eines Microwell (190 mm^2) durch die Gesamtbildfläche der ausgewerteten Präparationsbilder ($0,25 \text{ mm}^2 \times X$ -Bilder) dividiert wird. Das Ergebnis wird dann mit der auf 5 ml einengten Inselfraktion, welche durch die entnommene Menge von $300 \mu\text{l}$ ($0,3 \text{ ml}$) aufgereinigter Inselzellen dividiert wurde, multipliziert.

3. Ergebnisse

3.1 Gedankenexperiment

Die Resultate aus der Berechnung der Ausbeute an IEQ sowohl mit der Methode der **Volumenbestimmung** als auch der **Flächendichtemessung** sind im Folgenden nun dargestellt. Als Grundlage hierfür dienten zehn Inselzellen unterschiedlicher Durchmessergröße.

Tab. 3.1: Anzahl der Inselzelläquivalente (IEQ)

Dargestellt ist die Anzahl an IEQ von zehn Inselzellen in den verschiedenen Größenklassen nach der Methode der **Volumenbestimmung** und der **Flächendichtemessung** sowie das Verhältnis dieser beiden Auswertmethoden.

Inseldurchmesser in μm	Anzahl an Inselzelläquivalenten (IEQ) von 10 Inseln		Verhältnis Flächendichtemessung/Volumenbestimmung
	Volumenbestimmung	Flächendichtemessung	
0-50	0,18	0,27	1,5
50-100	1,6	2,48	1,55
100-150	6,5	6,88	1,06
150-200	16,85	13,5	0,8
200-250	35	22,4	0,64
250-300	63	33,5	0,53
300-350	104	46,8	0,45
350-400	158	62,3	0,34
400-450	230	80	0,35
450-500	320	99,9	0,31
500-550	430	122	0,28
Summe	1365,1	490	

Wie aus **Tab. 3.1** zu entnehmen ist, liefert die Flächendichtemessung im Vergleich zur Volumenbestimmung in den Größenklassen bis 150 μm zuerst größere Werte an Inselzelläquivalenten (IEQ). So beträgt die Anzahl an IEQ bei der angenommenen Menge von 10 Inselzellen in der Größenklasse 0-50 μm 0,27 bei der Flächendichtemessung im Gegensatz zu 0,18 bei der Volumenbestimmung, zwischen 50 und 100 μm 2,48 bei der Flächendichtemessung zu 1,6 bei der Volumenbestimmung und zwischen 100 und 150 μm 6,88 bei der Flächendichte zu 6,5 bei der Volumenbestimmung.

Ab einem Durchmesser von 150 μm jedoch liefert die Volumenbestimmung im Gegensatz zur Flächendichtemessung systematisch höhere Werte an IEQ.

So ist die Anzahl an IEQ zwischen 150 und 200 μm 16,85 bei der Volumenbestimmung im Gegensatz zu 13,5 IEQ bei der Flächendichte, zwischen 200 und 250 μm 35 bei der Volumenbestimmung zu 22,4 bei der Flächendichte, zwischen 250 und 300 μm 63 bei der Volumenbestimmung zu 33,5 bei der Flächendichte, zwischen 300 und 350 μm 104 bei der Volumenbestimmung zu 46,8 bei der Flächendichte, zwischen 350 und 400 μm 158 bei der Volumenbestimmung zu 62,3 bei der Flächendichtemessung, zwischen 400 und 450 μm 230 bei der Volumenbestimmung zu 80 bei der Flächendichte, zwischen 450 und 500 μm 320 bei der Volumenbestimmung zu 99,9 bei der Flächendichte und zwischen 500 und 550 μm 430 bei der Volumenbestimmung zu 122 bei der Flächendichtemessung.

Im Anschluss wurde nun das Verhältnis dieser beiden Auswertmethoden bei der angenommenen Menge an zehn Inselzellen in jeder Größenklasse ermittelt. Dabei zeigte sich folgendes Bild: So beträgt das Verhältnis von Flächendichte und Volumendichte 1,5 in der Größenklasse 0-50 μm , 1,55 zwischen 50-100 μm , 1,06 zwischen 100 und 150 μm , 0,8 zwischen 150 und 200 μm , 0,64 zwischen 200 und 250 μm , 0,53 zwischen 250 und 300 μm , 0,45 zwischen 300 und 350 μm , 0,39 zwischen 350 und 400 μm , 0,35 zwischen 400 und 450 μm , 0,31 zwischen 450 und 500 μm und 0,28 zwischen 500 und 550 μm .

Im Anschluss soll nun geklärt werden, ob unter diesen Umständen die Methode der Flächendichtemessung sowohl in der Theorie als auch in der Praxis zur Berechnung der Ausbeute an IEQ verwendet werden kann. Bisher wurde in diesem Gedankenexperiment nur gezeigt, dass die Volumenbestimmung die Inselmessung einteilt, ohne die Häufigkeiten der Inselverteilung in den verschiedenen Durchmesserklassen zu berücksichtigen. An Hand der im nachfolgenden praktischen Teil ausgeführten experimentellen Auswertung von 12 Schweineinselzellpräparationen soll nun untersucht werden, ob die Häufigkeitsverteilung aus 12 Inselzellisolationen einen natürlichen Korrekturfaktor zwischen den zwei unterschiedlichen Methoden darstellt.

3.1.1 Bestimmung der Häufigkeitsverteilung der Inselzellen

Die Bestimmung der Häufigkeiten der Inselverteilung basierte auf Grundlage der Auswertung von 168 Digitalbildern aus 12 Schweineinselzellisolationen. Die dabei beobachtete Inselzellanzahl betrug 3518. Aufgeteilt auf die sechs verschiedenen Durchmesserklassen zeigte sich folgendes Bild:

Tab. 3.2: Häufigkeitsverteilung der Inselzellanzahl

Dargestellt sind die prozentualen Häufigkeiten der Inselzellen jeder Größenklasse von Schweineinselzellisolationen (n=12) sowie die ermittelte mittlere Häufigkeit der Inselzellen dieser Inselzellisolationen (n=12).

n	Durchmesser in μm						
	0-50	50-100	100-150	150-200	200-250	250-300	300-350
1	91,19	6,29	1,26	1,26	0,00	0,00	0,00
2	77,33	15,51	6,44	0,48	0,24	0,00	0,00
3	80,27	14,35	4,04	0,90	0,45	0,00	0,00
4	74,81	19,92	2,63	1,13	0,75	0,75	0,00
5	89,09	7,27	3,64	0,00	0,00	0,00	0,00
6	70,39	13,41	7,26	3,91	5,03	0,00	0,00
7	81,88	13,77	3,62	0,72	0,00	0,00	0,00
8	77,66	20,81	1,02	0,25	0,00	0,25	0,00
9	86,50	12,40	1,10	0,00	0,00	0,00	0,00
10	75,00	11,82	7,27	2,73	1,82	1,36	0,00
11	58,13	17,24	12,32	5,91	4,93	0,99	0,50
12	82,63	14,79	1,64	0,70	0,23	0,00	0,00
Mittlere Häufigkeiten in %	78,74	13,96	4,35	1,5	1,12	0,28	0,04

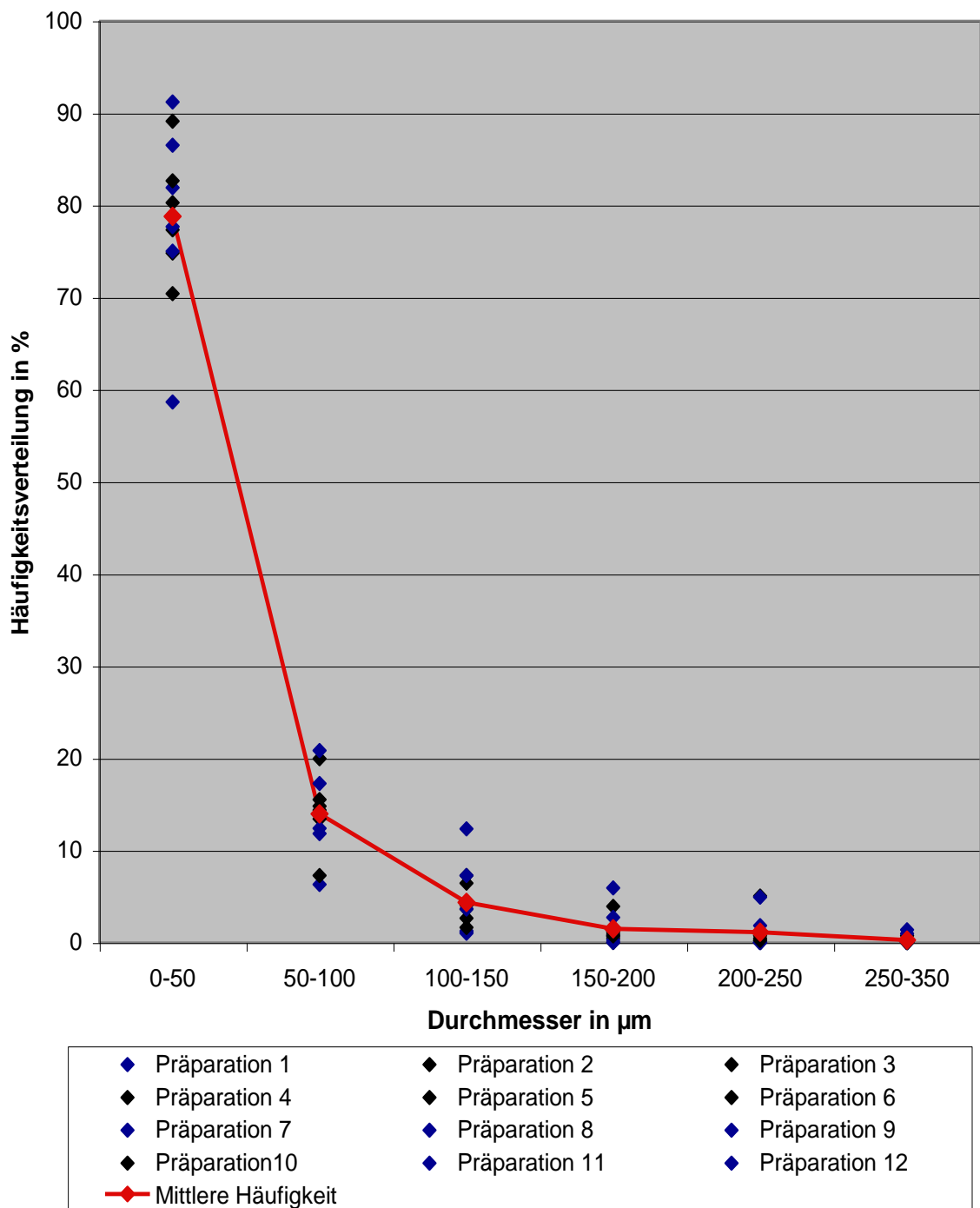


Abb. 3.1: Dargestellt sind die prozentualen Häufigkeiten der Inselzellen in den sechs Durchmessergrößenklassen (nach Zusammenfassung der Größenklassen 250-300 µm und 300-350 µm zu einer Größenklasse (6)) sowie die ermittelte mittlere Häufigkeitsverteilung von 12 Inselzellisolationen (*rote Kurve*).

Damit zeigte sich bei Betrachtung von **Abb. 3.2**, dass die Häufigkeitsverteilung der Inselzellen auf der Grundlage der Auswertung dieser 12 Schweineinselzellisolationen eine exponentielle Verteilung widerspiegelt.

Nach Zusammenfassung der Größenklassen 250-300 μm und 300-350 μm zu einer Größenklasse (6) ergibt sich folgendes Bild für die Häufigkeitsverteilung der Inselzellen:

78,74% der Inselzellen befanden sich in der Größenklasse **1** (0-50 μm), **13,96%** in der Größenklasse **2** (50-100 μm), **4,35%** in der Größenklasse **3** (100-150 μm), **1,5%** befanden sich in der Klasse **4** (150-200 μm), **1,12%** in der Größenklasse **5** (200-250 μm) und **0,32%** in der Größenklasse **6** (250-350 μm).

3.2 Praktischer Teil

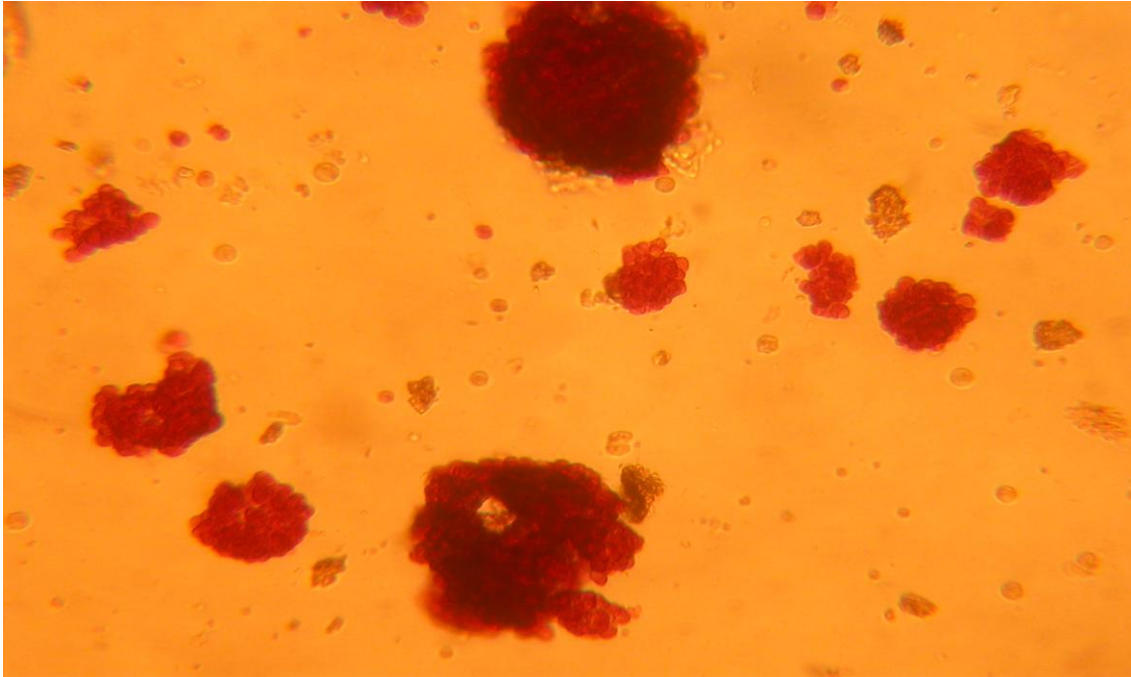
Die nachfolgenden Ergebnisse beruhen auf der Grundlage von 12 verschiedenen Schweineinselzellisolationen über einen Zeitraum von ca. neun Monaten. Die Schweine waren bei der Schlachtung ca. sechs Monate alt und wogen ungefähr 100 kg.

3.2.1 Bestimmung der Inselausbeute

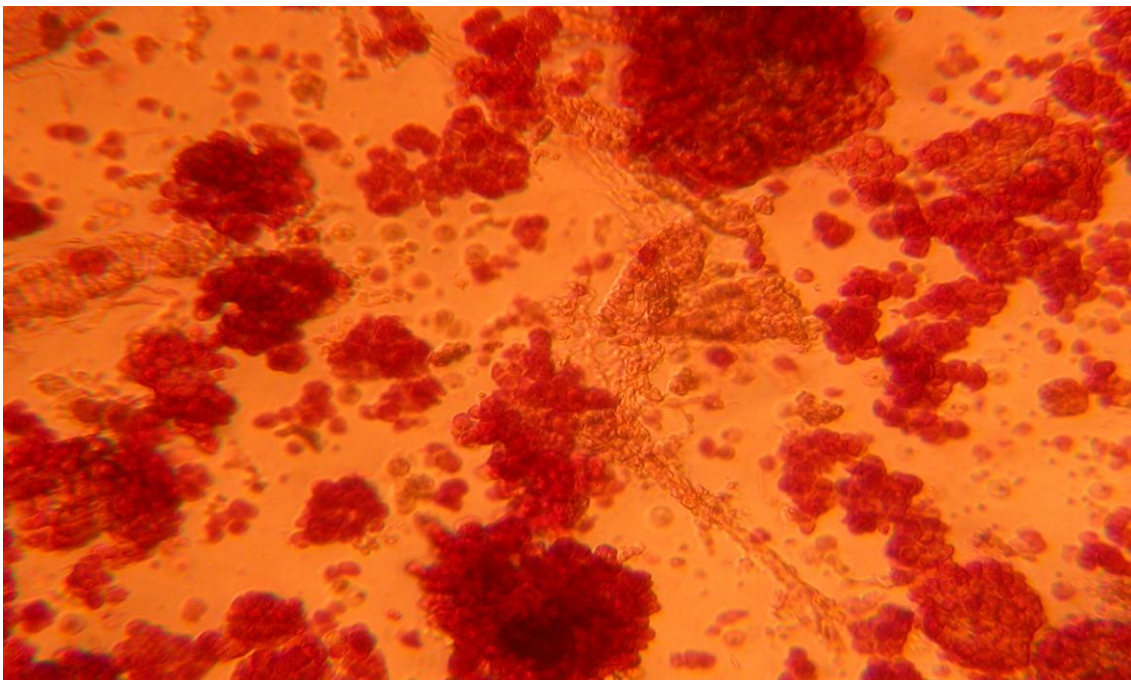
Die Auswertung der Bestimmung der Inselzellausbeute in Inselzelläquivalente (IEQ) einer charakteristischen Inselzellisolation wurde wie im Materialteil bereits besprochen sowohl mit der Methode der Volumenbestimmung als auch der Flächendichtemessung durchgeführt und ist im Folgenden nun dargestellt. Die Auswertung der Inselzellausbeute basierte auf der Grundlage von mikroskopisch ausgewerteten Digitalbildern. Dabei wurden gereinigte und angefärbte Inselzellen der einzelnen Präparationen unterschiedlich oft mit einer 100er Vergrößerung fotografiert.

In **Abb. 3.2** sind isolierte Schweineinselzellen nach der Purifizierung dargestellt. Dabei zeigte sich eine nicht komplette Verteilung der Inselzellen. Die Inselzellen waren von unterschiedlicher Gestalt und Grösse mit einer Minderheit an runden Inselzellen. Neben unregelmässigen, zergliederten Inselzellen, erkennt man kompakte, runde, einheitliche Inseln. Die Grösse variierte von 10 μm bis 300 μm .

Die mit Dithizon rot angefärbten Strukturen innerhalb der Fläche wurden allesamt markiert und nach Umwandeln in einen schwarzen und weissen Flächenanteil in einen neuen leeren Rahmen der gleichen Grösse des Adobe Photoshop Programms kopiert (**Abb. 3.3**).

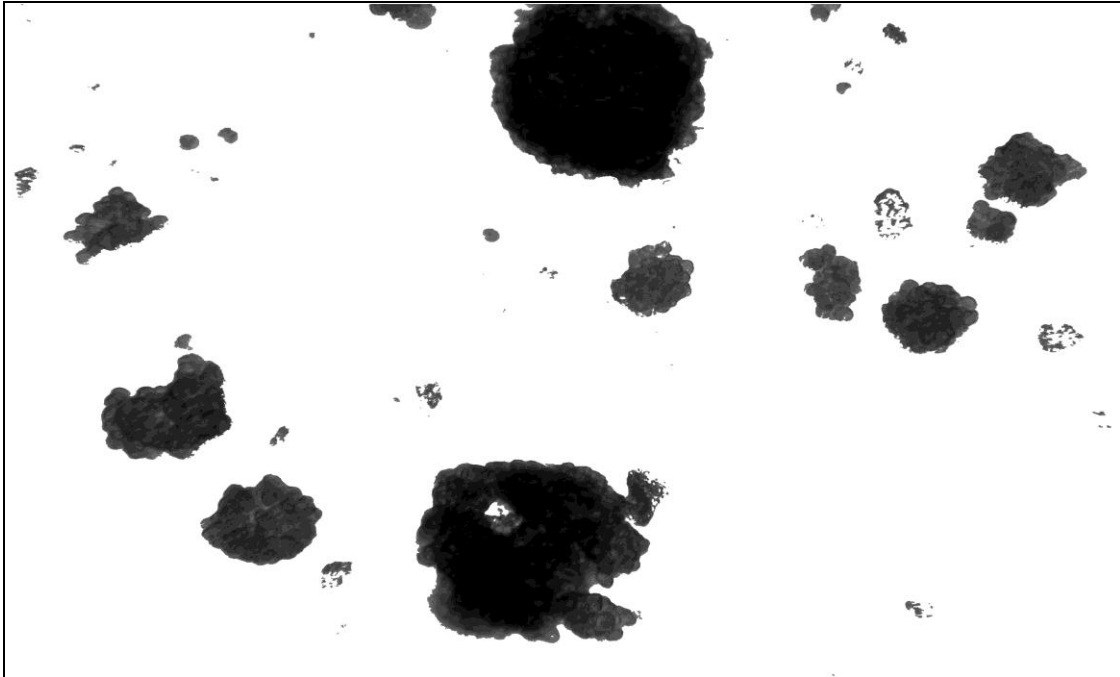


A

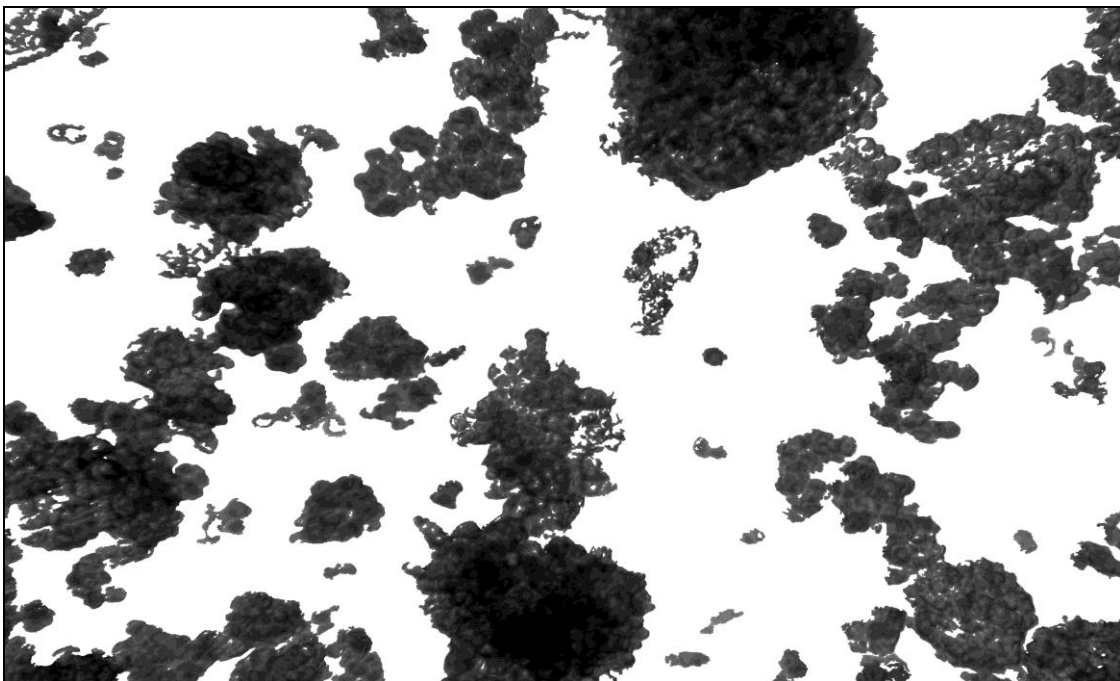


B

Abb. 3.2: Dargestellt sind in **(A)** isolierte Schweineinselzellen nach Purifikation, bei denen aus 20 ml 100 μ l einpipettiert wurde (vor der Abtrennung des Gradientenmediums) und in **(B)** isolierte Inseln nach Purifikation, bei denen aus 1 ml 300 μ l einpipettiert wurde (nach Abtrennung des Gradientenmediums).



A



B

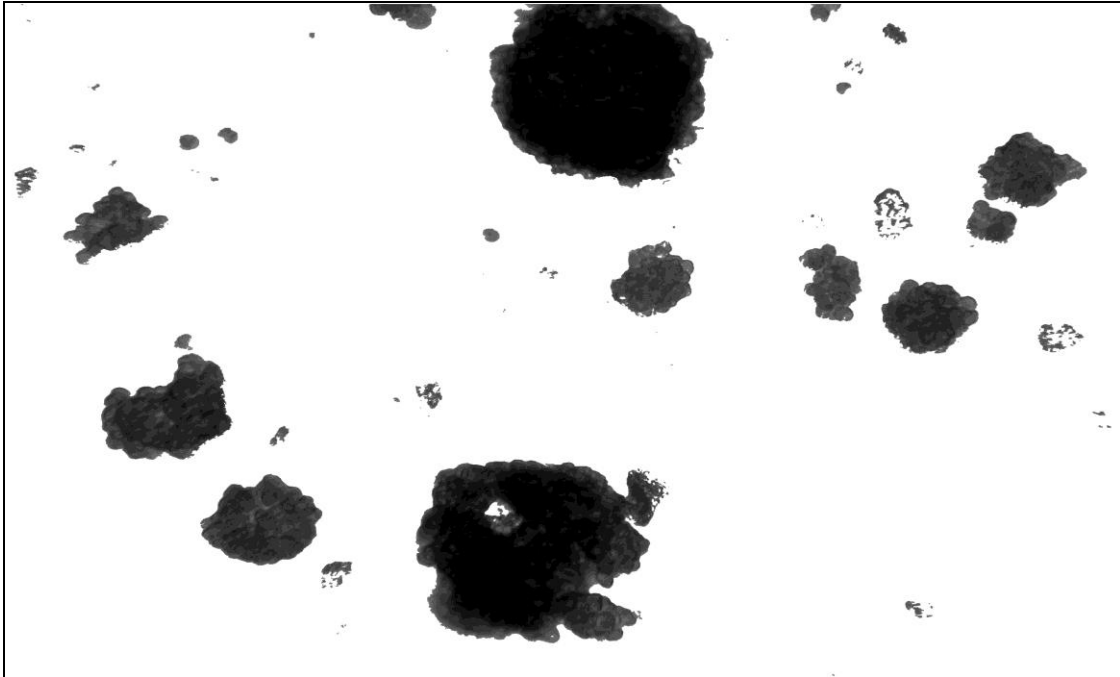
Abb. 3.3: Dargestellt sind die Inselzellen in **(A)**, bei denen aus 20 ml 100 μ l einpipettiert wurde und in **(B)** bei denen aus 1 ml 300 μ l einpipettiert wurde nach Umwandeln in einen schwarzen und weissen Flächenanteil mit dem Adobe Photoshop.

Bei der **Volumenbestimmung** wurden die Inselzellen einzeln aus dem Präparationsbild ausgewählt und in einen neuen leeren Rahmen der gleichen Größe des Adobe Photoshop Programms kopiert (**Abb. 3.4**). Anschließend wurde ihre Größe bestimmt und sie wurden auf die 50 µm Größenklassen aufgeteilt. Nach Umwandeln des Volumens in jeder Klasse zu einem Standardvolumen eines Inselzelläquivalents, konnte die Gesamtmenge an Inselzelläquivalenten dieser Präparation pro 5 ml Fraktion ermittelt werden.

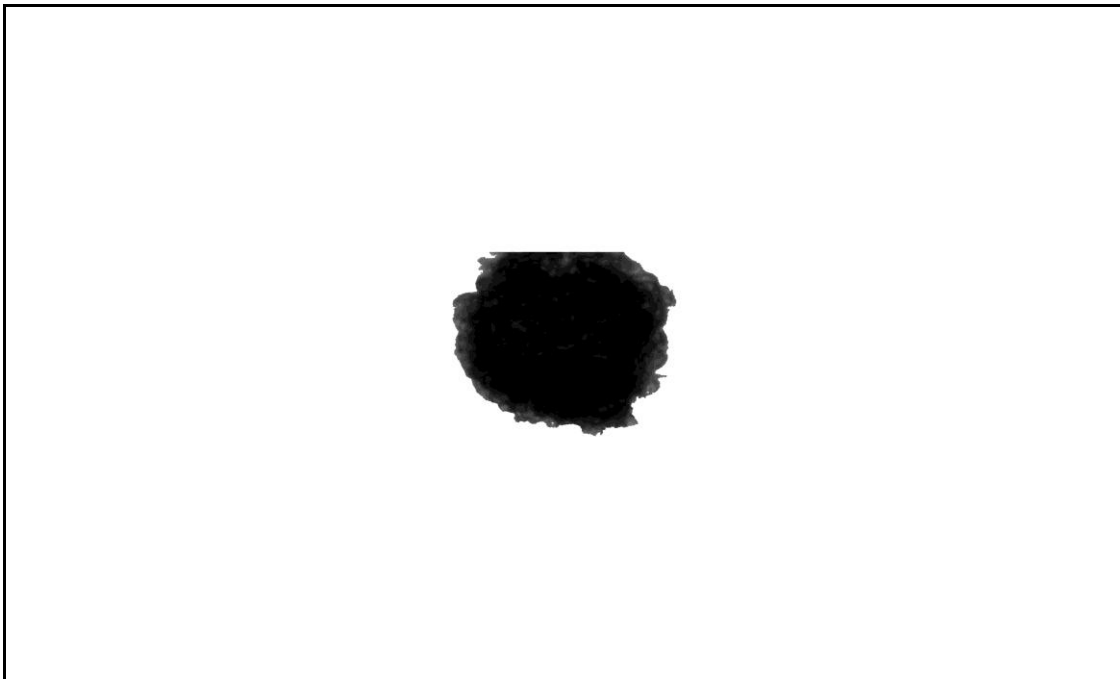
Tab. 3.3: Bestimmung der Inselzelläquivalentenanzahl nach der konventionellen Methode der Volumenbestimmung

Dargestellt ist die Anzahl an Inselzelläquivalenten sowie die Häufigkeitsverteilung der Inselzellen in den Größenklassen einer charakteristischen Schweineinselzellpräparation auf der Grundlage von 15 ausgewerteten Digitalbildern sowie die Gesamtausbeute der Isolation nach Berücksichtigung der Microwellgröße und Fraktionsgröße.

Durchmesser in µm	Häufigkeitsver- teilung der Inseln in %	Insel- anzahl	Umrechnungs- faktor	Anzahl an IEQ
0-50	74,81	199	0.018	3,6
50-100	19,92	53	0.16	8,5
100-150	2,63	7	0.65	4,6
150-200	1,13	3	1.685	5,1
200-250	0,75	2	3.5	7
250-300	0,75	2	6.3	12,6
Summe				41,4
Gesamtaus- beute				34943



A



B

Abb. 3.4: Dargestellt sind in **(A)** die Inseln nach Umwandeln in einen schwarzen Flächenanteil und in **(B)** das Vorgehen der Volumenbestimmung mit Auswählen der einzelnen Inseln und kopieren in einen neuen Rahmen zur Durchmesserbestimmung.

Im Anschluss wurde nun die gleiche Schweineinselzellpräparation mit Hilfe der Methode der **Flächendichtemessung** ausgewertet. Dabei wurde die Anzahl an Inselzelläquivalenten (IEQ) auf Basis der beobachteten Inselzellen in der **Abb. 3.4** ermittelt. Aus der mit Inselzellen belegten Fläche (Flächendichte) konnte durch Multiplikation mit dem Faktor 14,1 ($0,25 \text{ mm}^2 / 0,0177 \text{ mm}^2$) die Anzahl der Inselzelläquivalente pro beobachteter Fläche berechnet werden. Bei diesem Faktor handelt es sich um die Anzahl von IEQ pro Bildfläche.

Tab. 3.4: Bestimmung der Anzahl an IEQ nach der Methode der Flächendichtemessung

Dargestellt ist die Anzahl an Inselzelläquivalenten (IEQ) und die Flächendichte in % der oben genannten Schweineinselzellisolation auf der Grundlage von 15 ausgewerteten Digitalbildern mit dem Adobe Photoshop Programm. Die Gesamtausbeute errechnet sich aus Berücksichtigung der Microwellgröße und Fraktionsgröße.

Bild	Flächendichte in %	Anzahl an IEQ
1	5.8	0.8
2	3.3	0.5
3	6.5	0.9
4	6.5	0.9
5	17.5	2.5
6	26	3.7
7	27	3.8
8	12.8	1.8
9	17.4	2.5
10	26.5	3.7
11	41.1	5.8
12	27.1	3.9
13	9.4	1.3
14	18	2.5
15	30	4.3
Summe		38.9
Gesamtausbeute		32833

3.2.2 Vergleich der Volumenbestimmung mit der Flächendichtemessung

Im Anschluss soll nun die Methode der Volumenbestimmung zur Inselzellquantifizierung in Inselzelläquivalente (IEQ) mit der Flächendichtebestimmung an Hand der Ergebnisse der 12 ausgewerteten Schweineinselzellisolationen verglichen werden. Dabei wurden insgesamt 168 Digitalbilder ausgewertet.

Tab. 3.5: Vergleich der Volumenbestimmung mit der Flächendichtemessung

Dargestellt ist die ermittelte Anzahl an Inselzelläquivalenten (IEQ) nach Auswertung von Schweineinselzellpräparationen (n=12) ohne Umrechnung auf den gesamten Inselertrag dieser Präparationen - berechnet sowohl mit der Methode der Volumenbestimmung als auch der Flächendichtemessung - an Hand von 168 ausgewerteten Digitalbildern.

n	Inselanzahl in IEQ mittels Volumenbestimmung	Inselanzahl an IEQ mittels Flächendichtemessung
1	9	7,2
2	41,7	40,4
3	21,2	20,4
4	41,4	38,9
5	8,4	9,6
6	40,4	33,1
7	10	9,7
8	29,2	30,4
9	30,9	35,5
10	56,7	44,3
11	102,2	76
12	29,6	31,2

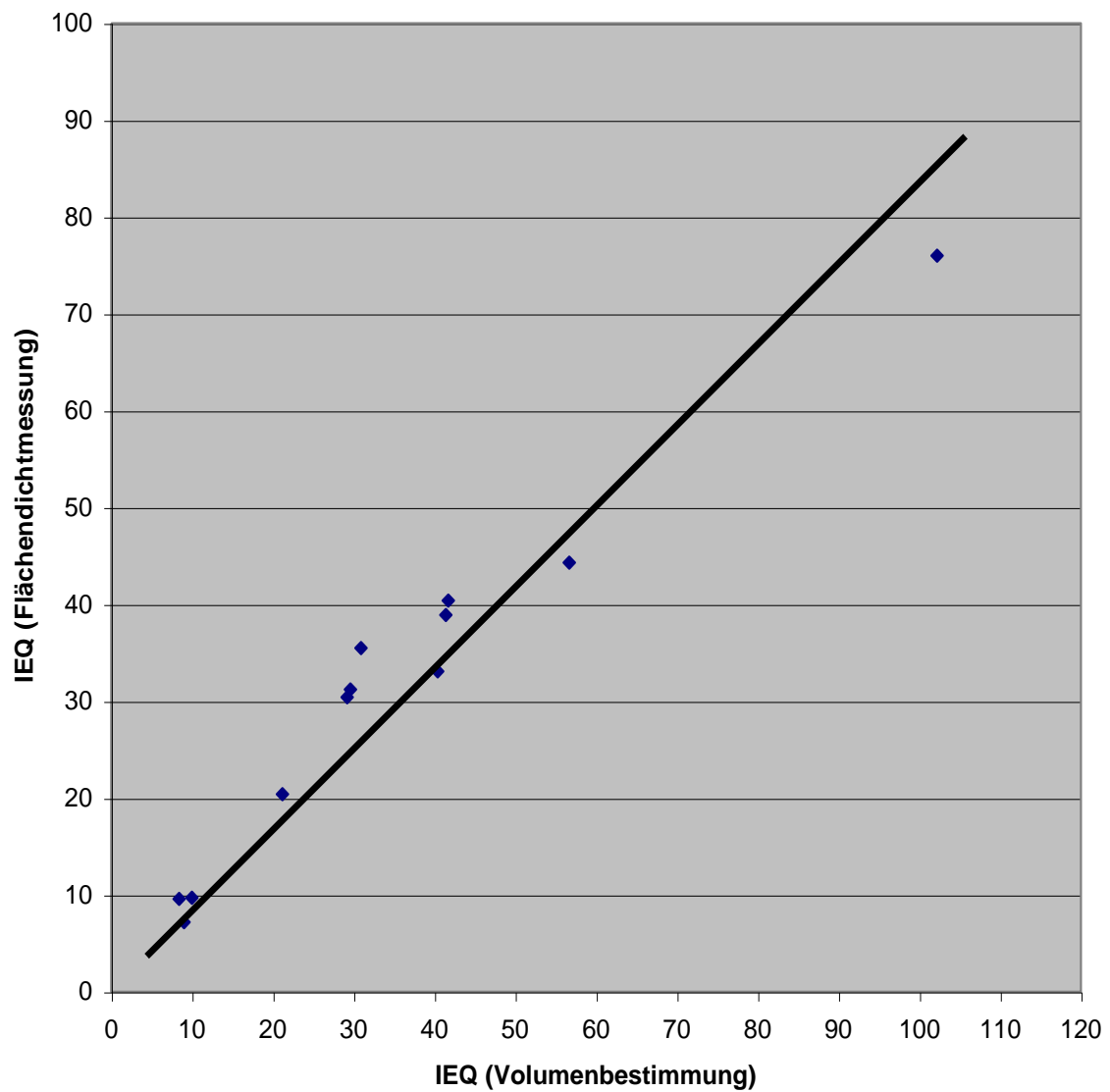


Abb. 3.5: Vergleich zwischen der Volumenbestimmung und der Flächendichtmessung zur Bestimmung der Anzahl an Inselzelläquivalenten (IEQ) von 12 verschiedenen Inselzellpräparationen.

Statistik:

Verglichen wurde die Anzahl an Inselzelläquivalenten (IEQ) berechnet mit der Volumenbestimmung und der Flächendichtemessung auf der Grundlage der Auswertung von 12 Inselzellisolationen. Dabei wurde die Ausgleichsgerade durch den Ursprung gezwungen, da bei 0 vorkommenden Inselzellen im Blickfeld die beiden Methoden 0 Inselzelläquivalente liefern. Bei Betrachtung der **Abb. 3.5** zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen dem Verfahren der Volumenbestimmung und der Flächendichtemessung zur Inselzellquantifizierung über einen breiten Bereich an IEQ aus diesen 12 Inselzellisolationen. Der Korrelationskoeffizient betrug dabei 0,94, und der Regressionskoeffizient $0,97 \pm 0,03$.

→ Die **Abb. 3.5** als Zusammenfassung aus 12 Inselzellpräparationen zeigt die Gleichwertigkeit der beiden Methoden in der Bestimmung der Inselzellausbeute in Inselzelläquivalente (IEQ).

3.2.3 Betrag an IEQ pro Größenklassen mittels Volumenbestimmung

Es wurde nun der Beitrag jeder Durchmessergrößenklasse als Inseläquivalente (IEQ) aus diesen 12 Schweineinselzellpräparationen dargestellt. Die Gesamtanzahl aller ermittelten Inselzelläquivalente in den sieben Größenklassen betrug 420,7 IEQ.

Tabelle 3.6: Übersicht über den Betrag an IEQ pro Größenklasse

Dargestellt ist der Beitrag jeder Größenklasse als IEQ von 12 Inselzellisolationen sowie ihr Mittelwert \pm Varianzkoeffizient (VK) (Standardabweichung/Mittelwert) nach der Methode der klassischen Volumenberechnung.

N	0-50 μm	50-100 μm	100-150 μm	150-200 μm	200-250 μm	250-300 μm	300-350 μm
1	2,6	1,6	1,4	3,4	0	0	0
2	6,8	10,4	17,6	3,4	3,5	0	0
3	3,3	5,1	5,9	3,4	3,5	0	0
4	3,6	8,5	4,6	5,1	7	12,6	0
5	2,6	1,9	3,9	0	0	0	0
6	2,3	3,8	8,5	11,8	14	0	0
7	2	3	3,3	1,7	0	0	0
8	5,5	13,1	2,6	1,7	0	6,3	0
9	11,3	14,4	5,2	0	0	0	0
10	3	4,2	6,5	10,1	14	18,9	0
11	2,1	5,6	16,3	20,2	35	12,6	10,4
12	6,3	10,1	4,6	5,1	3,5	0	0
Mittelwert \pm VK	4,28 \pm 0,64	6,81 \pm 0,64	6,70 \pm 0,77	5,49 \pm 1,07	6,71 \pm 1,53	4,20 \pm 1,61	0,87 \pm 3,45

3.2.4 Betrag an IEQ pro Größenklassen mittels Flächendichtemessung

An Hand der empirisch ermittelten Häufigkeitsverteilung (dargestellt in **Tab. 3.2**) dieser 12 hier analysierten Inselzellisolationen soll nun untersucht werden, ob für die Korrelation der beiden Auswertmethoden die Verwendung der Häufigkeiten bei der Berechnung der Inselzellausbeute als IEQ verantwortlich sein könnte. Aus diesem Grunde wurden nun für die Methode der Flächendichtemessung gleich der Volumenbestimmung Formfaktoren ermittelt, welche zur Berechnung der Anzahl an IEQ pro Größenklasse verwendet werden. Hierzu wurde der mittlere Durchmesser der einzelnen Größenklassen für die Berechnung dieser Formfaktoren verwendet. So ist zum Beispiel eine Inselzelle mit einem Durchmesser von 25 μm der 25 μm /150 μm -Teil eines Inselzelläquivalents (IEQ). Somit ergibt sich ein Formfaktor von **0,16** in der Größenklasse 1 (0-50 μm). Nach demselben Prinzip wird nun für die restlichen Größenklassen verfahren. In der Klasse 2 (50-100 μm) beträgt der Formfaktor **0,5**; in der Klasse 3 (100-150 μm) **0,8**; in der Klasse 4 (150-200 μm) **1,16**; in der Klasse 5 (200-250 μm) **1,5**; in der Klasse 6 (250-300 μm) **1,83** und in der Klasse 7 (300-350 μm) **2,17**.

Nach Multiplikation dieser Formfaktoren mit den empirisch ermittelten Häufigkeiten von diesen 12 Inselzellisolationen aus **Tab. 3.2** ergibt sich folgender Betrag an IEQ pro Größenklasse mit Hilfe der Methode der Flächendichtemessung:

Tabelle 3.7: Übersicht über den Betrag an IEQ pro Größenklasse mit Hilfe der Flächendichtemessung

Dargestellt ist der Beitrag jeder Größenklasse als IEQ (Häufigkeiten x Formfaktor) von 12 Inselzellisolationen sowie ihr Mittelwert \pm Varianzkoeffizient (VK) (Standardabweichung/Mittelwert) nach der Methode der Flächendichtemessung.

N	0-50 μm	50-100 μm	100-150 μm	150-200 μm	200-250 μm	250-300 μm	300-350 μm
1	14,59	3,15	1,01	1,46	0,00	0,00	0,00
2	12,37	7,76	5,15	0,56	0,36	0,00	0,00
3	12,84	7,18	3,23	1,04	0,68	0,00	0,00
4	11,97	9,96	2,10	1,31	1,13	1,37	0,00
5	14,25	3,64	2,91	0,00	0,00	0,00	0,00
6	11,26	6,71	5,81	4,54	7,55	0,00	0,00
7	13,10	6,89	2,90	0,84	0,00	0,00	0,00
8	12,43	10,41	0,82	0,29	0,00	0,46	0,00
9	13,84	6,20	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00
10	12,00	5,91	5,82	3,17	2,73	2,49	0,00
11	9,30	8,62	9,86	6,86	7,40	1,81	1,09
12	13,22	7,40	1,31	0,81	0,35	0,00	0,00
Mittelwert \pm VK	12,60 \pm 0,11	6,98 \pm 0,31	3,48 \pm 0,78	1,74 \pm 1,2	1,68 \pm 1,67	0,51 \pm 1,75	0,09 \pm 3,44

Die hiermit ermittelte Anzahl an IEQ in den einzelnen Größenklassen wurde im Anschluss nun den oben errechneten Werten an IEQ mit der Methode der Volumenbestimmung (**3.2.3**) gegenübergestellt. Dabei zeigte sich folgendes Bild:

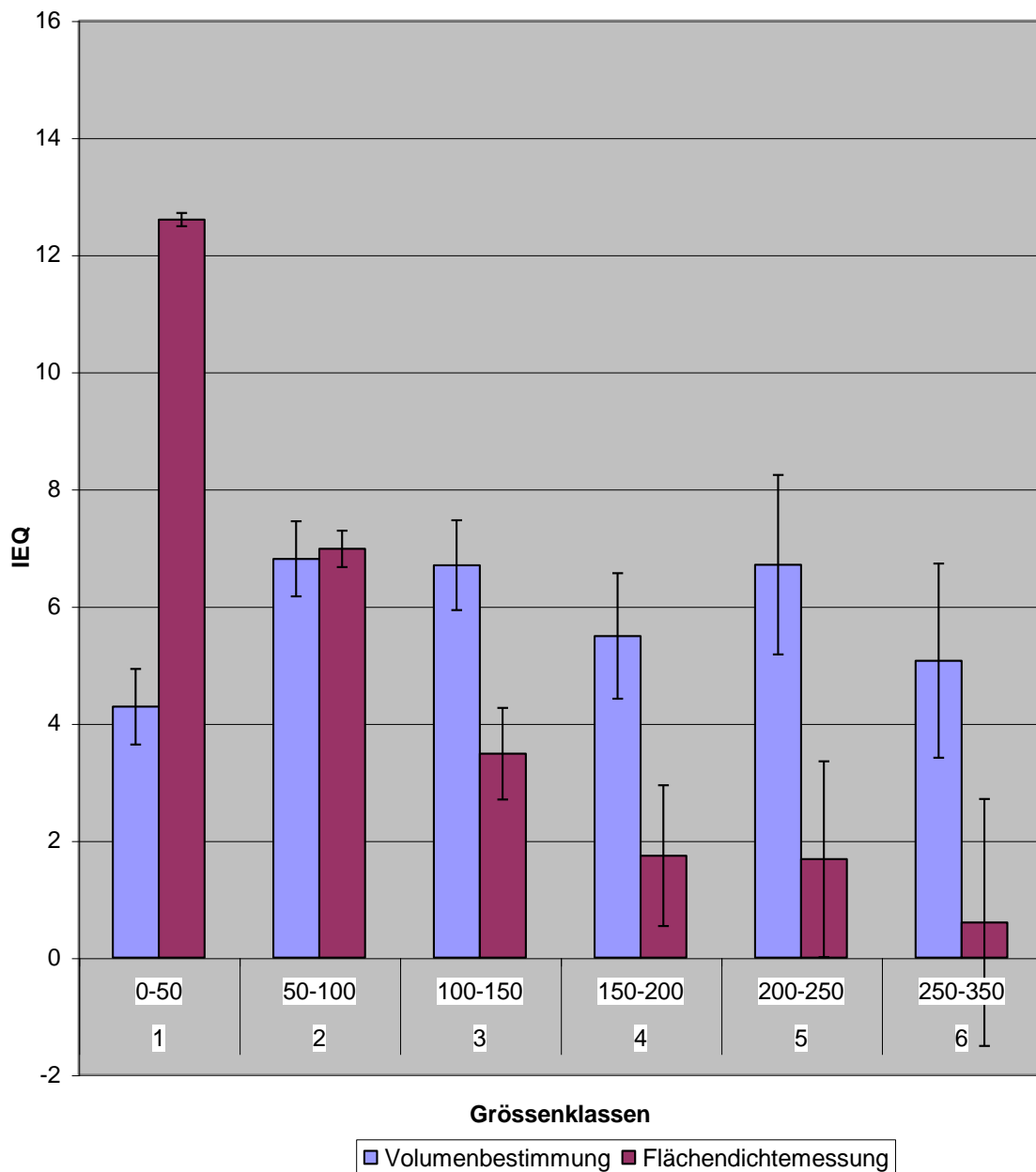


Abb. 3.6: Dargestellt ist die Anzahl an IEQ in den Größenklassen nach Volumenbestimmung (blaue Kurve) und Flächendichtemessung (rote Kurve) inklusive Varianzkoeffizient (Standardabweichung/Mittelwert) aus 12 Inselzellisolationen. Dabei wurden die Durchmesserklassen 250-300 μm und 300-350 μm zu einer Größenfraktion (6) zusammengefasst.

Bei Betrachtung von **Abb. 3.6** zeigte sich, dass bei Verwendung der Methode der Flächendichtemessung eine deutliche exponentielle Abnahme der Anzahl an IEQ von Größenklasse 1 bis zu Größenklasse 5 nachgewiesen wurde. So resultierte der Hauptbeitrag (**46,5%**) der mit der Flächendichte ermittelten Anzahl an Inselzelläquivalenten aus den häufigsten Ereignissen - nämlich kleine Inselzellen in der Klasse 1 mit einer Durchmessergröße von 0-50 μm .

25,8 % der ermittelten IEQ befanden sich in der Klasse 2 (50-100 μm), **12,84%** in der Klasse 3 (100-150 μm), **6,35%** in der Klasse 4 (150-200 μm), **6,2%** in der Klasse 5 (200-250 μm). Lediglich eine Minderheit (**2,36%**) resultierte aus den seltensten Ereignissen - grosse Inselzellen in der Klasse 6 mit einer Durchmessergröße von 250-350 μm .

Demgegenüber steht die Methode der Volumenbestimmung. Hierbei müsste bei einer homogenen Inselzellverteilung über diese 6 Größenklassen jede Klasse mit **16,66%** an ermittelten Inselzelläquivalenten zur Gesamtausbeute an IEQ beitragen.

An Hand der **Abb. 3.6** zeigte sich jedoch, dass die Verteilung der Inselzellen als IEQ in den einzelnen Größenklassen keiner homogenen Verteilung entspricht. So siedelte sich eine Minderheit (**12,2%**) an ermittelten Inselzelläquivalenten in der Klasse 1 (0-50 μm) an. **19,4%** befanden sich in der Klasse 2 (50-100 μm), **19,1%** in der Klasse 3 (100-150 μm), **15,7%** in der Klasse 4 (150-200 μm), **19,1%** in der Klasse 5 (200-250 μm) sowie **14,5%** in der zusammengefassten Klasse 6 (250-350 μm). Zusammenfassend ist demnach zu sagen, dass bei der Volumenbestimmung im Vergleich zur Flächendichtemessung der Hauptbetrag an Inselzelläquivalenten aus den seltensten Ereignissen (große Inseln) resultiert.

Im Anschluss erfolgte nun eine Fehleranalyse dieser beiden zu vergleichenden Auswertmethoden der Inselzelldosisbestimmung an Hand des Varianzkoeffizienten (VK) in den einzelnen Durchmesserklassen (**Tab. 3.6** und **Tab. 3.7**). Dieser setzt sich zusammen aus der Standardabweichung (S) dividiert durch den Mittelwert (MW). So war der Varianzkoeffizienten (VK) in den unteren Grö-

ßenklassen bei der Flächendichtemessung im Vergleich zur Volumenbestimmung geringer. In der Klasse 1 (0-50 μm) betrug der Varianzkoeffizient (VK) 0,11 bei der Flächendichtemessung zu 0,64 bei der Volumenbestimmung, in der Klasse 2 (50-100 μm) 0,31 bei der Flächendichtemessung zu 0,64 bei der Volumenbestimmung. Ab der Durchmesserklasse 3 (100-150 μm) war der Varianzkoeffizient bei der Flächendichtemessung im Vergleich zur Volumenbestimmung größer. So betrug der Varianzkoeffizient (VK) in der Klasse 3 (100-150 μm) 0,77 bei der Volumenbestimmung im Gegensatz zu 0,78 bei der Flächendichtemessung, in der Klasse 4 (150-200 μm) 1,07 bei der Volumenbestimmung zu 1,2 bei der Flächendichtemessung, in der Klasse 5 (200-250 μm) 1,53 bei der Volumenbestimmung zu 1,67 bei der Flächendichtemessung und in der zusammengefassten Klasse 6 (250-350 μm) 1,66 bei der Volumenbestimmung zu 2,11 bei der Flächendichtemessung.

Im Mittel über diese 6 Klassen war der Varianzkoeffizient (VK) von Volumenbestimmung (**1,05**) und Flächendichtemessung (**1,03**) annähernd gleich.

→ 1. Bei Anwendung der Volumenbestimmung nach dem ursprünglich verwendeten Ricordi- Algorithmus werden Inselzellen, welche einen Durchmesser <50 μm besitzen, nicht berücksichtigt, da sie auf Grund ihrer Größe wohl nur einen kleinen Gesamtbetrag an IEQ liefern. Somit wären die Ergebnisse bei Verwendung der Volumenbestimmung durch den Wegfall der Klasse 1 (0-50 μm) um ca. 12 % zu niedrig angesetzt.

Weiterhin ist die Fehlergröße - gemessen mit Hilfe des Varianzkoeffizienten - bei Betrachtung aller 6 Klassen zwischen den beiden Verfahren gleich, bei Betrachtung von Klasse 1 und 6 jedoch deutlich unterschiedlich.

→ 2. Es scheint keinen mathematischen Zusammenhang zwischen diesen beiden Methoden der Inselquantifizierung zu geben. Die Summe der beobachteten Inseln bei beiden Methoden in Abb. 3.6 ist bei Verwendung aller Klassen von Volumenbestimmung unterschiedlich, bei Auslassen der kleinsten Klasse bei Volumenbestimmung annähernd gleich.

4. Diskussion

Die Schwierigkeit beim Isolieren von Inselzellen sowohl für Transplantationszwecke als auch für die Forschung besteht im Fehlen einer automatisierten und genauen Methode zur Bestimmung der Inselausbeute und Reinheit der Inselzellen. Mit der Umrechnung der Anzahl an Inselzellen in Inselzelläquivalente (IEQ) wurde ein Versuch unternommen, die Inselpräparationen weltweit zu standardisieren (*Ricordi 1990*). Denn der Begriff des Inselzelläquivalentes (IEQ) verbindet die Idee des Gewebevolumens mit dem Konzept der Anzahl an Zellverbänden. Zusätzlich bietet dieser Begriff den Vorteil, dass er auf direkter Beobachtung isolierter Zellen basiert und eine intuitiv einfache Ausdrucksweise der Gesamtgewebemenge liefert. Solch eine Bestimmungseinheit ist um einiges genauer als der Begriff der Inseldosis in Einheiten wie Insulin, Milligramm pro DNA oder Picomol pro Zink (*Stegemann 1998*). Daher sind konstante und zuverlässige Qualitätskontrollverfahren wichtig in der Entwicklung und Erhaltung eines klinischen Inselzellprogramms.

Nach den Richtlinien der Europäischen Union (EU Verordnung 2001/83 und 1394/2007) werden Inselzellen als somatische Zelltherapeutika und damit als Arzneimittel angesehen, wodurch sie den Vorschriften des Arzneimittelgesetzes (AMG) unterliegen. Ab dem Jahr 2012 müssen Zelltherapeutika in Europa zugelassen sein, um sie am Patienten anwenden zu dürfen. Zukünftig müssen diese Arzneimittel vor ihrer Zulassung dann nach §40 AMG eine klinische Prüfung durchlaufen haben. So unterliegt die klinische Anwendung der Inselzellen am Menschen speziellen Richtlinien, den sogenannten ICH-Leitlinien für Gute Klinische Praxis (GCP). Diese Zulassungsprüfungen fordern für die Isolation und Anwendung der Inselzellen am Menschen eine Validierung der Methodik, bei welcher die Genauigkeit (Abweichung von der Zellgröße) und Reproduzierbarkeit bei Wiederholungsmessungen (Streuung bei einer Person oder zwischen mehreren) bekannt ist. Zusätzlich muss bei allen biochemisch analytischen Me-

thoden im Rahmen der Validierungsuntersuchungen der lineare Messbereich der verwendeten Methoden bekannt sein.

Um die oftmals doch unterschiedlich vorherrschende Qualität und Sicherheit der Inselzelltransplantate an den unterschiedlichen Transplantationszentren zu erhöhen, wurden sogenannte GMP-Kriterien (Good Manufacturing Practice) eingeführt. An Hand dieser Kriterien ist es nun möglich, Inselzellen nach einem gemeinsamen standardisierten Vorgehen zu isolieren, um somit ein gemeinsames gleich hohes Maß an Qualität und Sicherheit der Transplantate zu erzielen. Mit Hilfe dieser Kriterien können nun qualitativ gleichwertige Inselzell-Transplantate zwischen den einzelnen Transplantationszentren ausgetauscht werden, wodurch das Outcome nach Transplantation wesentlich verbessert werden konnte (*Hengster 2005*). Denn wie im Edmonton-Protokoll beschrieben, ist neben der Reinheit der transplantierten Inselzellen vor allem eine festgeschriebene Menge an transplantierten Inselzellen entscheidend für den Langzeitverlauf und das Ergebnis der Transplantation in Bezug auf eine Insulinunabhängigkeit der Patienten. Daher fordern GMP-Kriterien in Bezug auf die Qualität der Inselzellen, dass die genau applizierte Zellmenge bekannt ist. Bisher steht jedoch für diese Bestimmung noch keine befriedigende Methode zur Verfügung.

Auf Grund dieser genannten Anforderungen sowie den doch bis dahin unbefriedigenden Methoden zur genauen Bestimmung der applizierten Inselmenge bei der Transplantation besteht der Wunsch nach einer konstanten und retrospektiv reproduzierbaren, automatisierten und beobachterunabhängigen Berechnung des Inselertrages als IEQ (*Fernandez 2005*). Hierzu sollten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Ergebnisse beim Vergleich der zwei am häufigsten verwendeten Methoden in der Inselbestimmung – der konventionellen Methode der **Volumenbestimmung** und der **Flächendichtemessung** – wichtige Erkenntnisse liefern.

4.1 Volumenbestimmung

Um die Ermittlung der Inselausbeute als IEQ bei der Volumenbestimmung zu vereinfachen und einen Standard zwischen unterschiedlichen Laboren zu etablieren, wurde von *Ricordi* (1990) der Ricordi-Algorithmus eingeführt.

So wurden seitdem pankreatische Inselzellen als eine Gruppe von kugelförmigen Partikeln verschiedener Größe betrachtet, die sich mehr oder minder vom exokrinen Gewebe abgrenzen und sich zufällig verstreut in einem dreidimensionalen Raum befinden (*Saito 1978*).

Aber verfügen Inselzellen wirklich immer über eine kugelförmige Gestalt? An Hand der Betrachtung von Inselzellgestalt und -form in neueren Literaturangaben zeigte sich, dass Inselzellen in der Regel nicht immer eine kugelförmige runde Gestalt aufweisen, sondern des Öfteren über irreguläre Gestalten verfügen.

So zeigte *Bonnevie-Nielsen*, dass mindestens 40% der Inselzellen flache irreguläre Scheiben darstellen und variabler in Gestalt und Form sind als kugelförmige oder ellipsoidale Organellen (*Bonnevie-Nielsen 1984*).

Ulrichs untersuchte (1994) nach histologischer Analyse Schweinepankreatata sowohl junger (<1 Jahr) als auch älterer (3 Jahre oder älter) Versuchstiere. Dabei wurde festgestellt, dass lediglich 42% der Inselzellen bei den jugendlichen Tieren eine kugelige Form aufwiesen, 63% bei erwachsenen Tieren, 50% der jugendlichen Inseln oval waren, 43% der erwachsenen, 6% der jugendlichen Tiere wie Trommelschlägel aussahen, nur 2,5% der erwachsenen und 1,6% der jugendlichen Tiere über eine dreieckige Gestalt verfügten - aber nur 0,2% der erwachsenen Tiere.

Diehl lieferte in seiner Arbeit einen Überblick über Gestalt und Form porciner Inselzellen nach Untersuchung von zweidimensionalen Schnitten und dreidimensionaler Rekonstruktion der Inselzellen. Durch diese dreidimensionale Rekonstruktion der Inselzellen sollte eine Zuordnung der Inselzellen zu bestimmten verbal beschreibbaren Formklassen, wie kugelig, ovoid, hantelförmig, sanduhrförmig oder irregulär vorgenommen werden und somit ein umfassender

Überblick über die tatsächliche Inselgestalt gewonnen werden. Da die Inselzellen jedoch ausserordentlich vielgestaltig sind und fließende Übergänge zwischen den einzelnen Formen bestehen, hat es sich als sinnvoll erwiesen, eine Kategorisierung der Inseln in nur zwei Klassen, nämlich kompakt und gelappt vorzunehmen. Unter kompakten wurden Langerhans'sche Inseln verstanden, die nach Anlegen eines beliebigen Schnittes stets eine singuläre Schnittfläche ergaben. Gelappte Inseln hingegen sind jene Inseln, bei denen die Möglichkeit besteht, dass ein Zufallsschnitt mehrere, voneinander separierte Schnittflächen ergibt. Bei der Auswertung von 8 Schweinepankreatata betrug hierbei der Anteil gelappter Inselzellen 10,5% (*Diehl 1997*).

An Hand dieser neuen in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse von Inselzellgestalt und -form kommt es immer wieder zu einer ungenauen Bestimmung der Inselgröße und einer Über- oder Unterschätzung des Inselvolumens und somit des Inselertrages als IEQ (*Bonnevie-Nielsen 1984*). Denn die Beobachter richten ihren Fokus bei der Ermittlung des Durchmesser einer irregulären Inselzelle nur auf die Hauptachse der vorliegenden Fläche und ignorieren die irregulären Umfänge des Objektes. Das führt dann dazu, dass oftmals Inselzellen kleiner Größe in größere Klassen eingeteilt werden, was zu einer Überschätzung des Inselvolumens als IEQ führt (*Stegemann 1998*). Wie in unserem Ergebnisteil gezeigt werden konnte, tragen die einzelnen Inselzellgrößenklassen bei der Volumenbestimmung jedoch unterschiedlich viel zur Gesamtausbeute an IEQ bei. Somit ist diese genaue Größenbestimmung und Aufteilung auf die verschiedenen Größenklassen von entscheidender Bedeutung für die Bestimmung der Gesamtausbeute an IEQ.

Um dieser Problematik zu entkommen, wurden digitale Bildanalysen entwickelt (*Stegemann 1998*). Damit sollte versucht werden, das zeitintensive und subjektive Bestimmen der Inselzellen, ihrer Größe und anschließenden Einteilung in die entsprechende Größenklasse durch ein schnelleres, genaueres und reproduzierbareres Verfahren zu ersetzen. Das von *Stegemann (1998)* verwendete Programm unterschied jedoch nicht zwischen exokrinen und endokrinen Struk-

turen. Aus diesem Grunde konnten nur ganz reine Inselzellpräparationen analysiert werden - eine Situation, die nicht der Routine in der klinischen Inselzelltransplantation entsprach. Darüber hinaus bestand bei diesem entwickelten Programm - gleich wie bei der konventionellen manuellen Methode der Inselzellquantifizierung - eine signifikante Einschränkung in der Zuverlässigkeit bei der Messung einer zweidimensionalen Fläche zur Ermittlung eines dreidimensionalen Volumens.

4.2 Flächendichtemessung

Neben der Volumenbestimmung wurde in dieser Arbeit die von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode der Flächendichtemessung zur Bestimmung der Inselzellausbeute untersucht. Wie schon erwähnt, basiert diese Methode im Gegensatz zu der konventionellen Methode auf einer zweidimensionalen Analyse der Inselzellen ohne Einberechnung einer nicht sichtbaren dritten Ebene wie bei der Volumenbestimmung (*Lembert 2003*).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Adobe Photoshop Programms eine Berechnung des Inselertrages in einer Einzelschritt Analyse ohne die Verwendung von speziellen Computerprogrammen durchgeführt (*Lembert 2003*). Zusätzlich ermöglichte dieses Programm die Durchführung einer Online-Bestimmung des Inselertrages, was für eine anstehende Transplantation von entscheidender Bedeutung ist.

Der große Vorteil der Flächendichtemessung im Vergleich zur Volumenbestimmung liegt in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (durch Verwendung des Photoshop Programms) und in dem Wegfall der bis dahin beobachterabhängigen Subjektivität in der Bestimmung der Inselgröße. So konnten die bei der Volumenbestimmung doch oft beobachterabhängigen Fehler in der Größenbestimmung und anschließenden Aufteilung der Inseln auf die unterschiedlichen Größenklassen, welche oftmals zwischen 20-50% bei den einzelnen Beobachtern variierten, vermieden werden (*Stegemann 1998*).

Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in ihrem Zeitvorteil. Während bei der Volumenbestimmung rund 40 Minuten für eine Präparation veranschlagt wurden, benötigte die Flächendichtemessung im Schnitt nur 4 Minuten für die gleiche Präparation (*Lembert 2003*).

4.3 Vergleich der Volumenbestimmung und der Flächendichtemessung im Rechenbeispiel

An Hand einer Berechnung, die dem praktisch experimentellen Teil vorangestellt wurde, konnten bei einer angenommenen Menge von 10 Inselzellen die Unterschiede dieser beiden Verfahren in der Inselzellquantifizierung als IEQ aufgezeigt werden.

Hierbei zeigte sich, dass die Flächendichtemessung bei der Bestimmung der Inselzellausbeute als IEQ bei Verwendung von Inselzellen mit kleinerer Durchmessergröße gegenüber der klassischen Methode systematisch höhere Werte lieferte. So lieferte die Flächendichtemessung bis zu einem Durchmesser von 150 μm im Mittel 37% grössere Werte an IEQ als die Volumenbestimmung. Als Grund hierfür kann die in den unteren Größenklassen sehr stark wirksame Korrektur der Volumenrechnung (Radius hoch 3) zur Ermittlung der Anzahl an IEQ gesehen werden. Diese Korrektur fehlt in der Flächenbestimmung, hier trägt jedes Flächenfragment immer gleich viel zum Inselanteil bei.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei ansteigender Durchmessergröße die Flächendichtemessung gegenüber der Volumenbestimmung systematisch kleinere Werte an Inselzelläquivalente lieferte. Der Grund hierfür ist einerseits der bereits oben besprochene dreidimensionale Charakter der Volumenbestimmung (das Volumen verändert sich mit der 3. Potenz des Radius (**1.7.1**)) und andererseits die Verwendung des Ricordi-Algorithmus. Wie bereits erwähnt wurde, handelt es sich bei diesem Algorithmus um Umrechnungsfaktoren der einzelnen Inselzellgrößenklassen in Inselzelläquivalente (IEQ), welche auf dem Durchschnittsvolumen der Inselzellen in jeder Größenklasse beruhen und nicht

auf dem exakten Inselzellvolumen der ermittelten Inselzellen (*van der Burg 1997*). Die Berechnung mit diesem Durchschnittsvolumen ist jedoch zu ungenau und kann zu einer extremen Unter- oder Überbewertung der ermittelten Anzahl an IEQ führen. Denn Inselzellen, welche sich bis zu einem Durchmesser von 50 µm unterscheiden, werden in die gleiche Größenklasse eingeteilt und mit dem gleichen Faktor berechnet. Beispielsweise werden Inselzellen mit einer Größe von 151 µm und 200 µm mit dem gleichen Umrechnungsfaktor multipliziert, der Unterschied im Volumen dieser beiden Inseln beträgt aber 230% (*Niclauss 2008*). Somit kann eine nicht erkannte Überlagerung von Inselzellen zu einer fehlerhaften Zuordnung der Inseln auf die falsche Größenklasse führen und dadurch zu einer extremen Überbewertung der Ergebnisse, eine Fraktionierung in den Größenklassen zu einer Unterbewertung der Ergebnisse.

Ein weiterer Nachteil der Volumenbestimmung für die Bestimmung der Inselzelldosis liegt, wie im praktischen Teil gezeigt werden konnte, in ihrer extremen Abhängigkeit von seltenen Ereignissen und der hohen Fehleranfälligkeit beim Auftreten von Inselzellen in sehr großen Größenklassen. So wurde bei der Volumenbestimmung auf der Grundlage der Auswertung von 12 Schweineinselzellisolierungen in der neu zusammengefassten Größenklasse 6 (250-350 µm) eine Fehlergröße (gemessen mit Hilfe des Varianzkoeffizienten) von +/- **40%** vom Mittelwert (was **14,5 %** der ermittelten Inselzelläquivalenten dieser Klasse entspricht) festgestellt. Auf Grund der Tatsache, dass die Volumenbestimmung ihren Hauptanteil an ermittelten Inselzelläquivalenten (IEQ) aus den seltenen Ereignissen (große Inselzellen) bezieht, kann bei Betrachtung dieser hohen Fehlergröße nicht von einer genauen und zuverlässigen Methode zur Inselzellquantifizierung gesprochen werden. Im Vergleich hierzu die Fehlergröße von nur +/- **11%** bei der Flächendichtemessung, welche den Hauptteil (**46,5%**) an ermittelten Inselzelläquivalenten aus den häufigsten Ereignissen (kleine Inselzellen) bezieht.

Weiterhin konnte an Hand dieser Arbeit und von Literaturangaben gezeigt werden, dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei der Methode der Volumenbestimmung deutlich eingeschränkt ist. So kann es bei Betrachtung eines

anderen Bildausschnittes, welcher bei der Ablichtung der Inselzellen getroffen wurde, zu einer Über- oder Unterschätzung der Inselzellausbeute als IEQ einer Präparation kommen (*Lembert 2003*).

Auf Grund von den hier aufgezeigten Unterschieden in Methodik und Ergebnisteil (Rechenbeispiel) dieser beiden Verfahren in der Berechnung der Inselzellmasse als IEQ, muss man sich nun die Frage stellen, ob die in der Praxis bereits verwendete Methode der Flächendichtemessung überhaupt zur Quantifizierung von Inselzellen als IEQ verwendet werden kann.

Wie jedoch aus dem praktischen Ergebnisteil und aus Literaturangaben zu entnehmen ist, stimmt die mit der Methode der Flächendichtemessung ermittelte Anzahl an IEQ nach Inselzellisolierung sehr gut mit den Ergebnissen der Volumenbestimmung überein (*Lembert 2003*). So konnte im praktischen Teil gezeigt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Methode der Flächendichtemessung und der Volumenbestimmung an Hand der Auswertung von 12 verschiedenen Schweineinselzellpräparationen existiert. Der hier ermittelte Korrelationskoeffizient in der Berechnung der Ausbeute an IEQ zwischen diesen beiden Methoden betrug dabei 96% bei einem Regressionskoeffizienten von $0,97 \pm 0,03$.

4.4. Die Häufigkeitsverteilung als Korrekturfaktor zwischen beiden Auswertmethoden

Im folgenden soll nun geklärt werden, woher die Korrelation dieser beiden doch unterschiedlichen Verfahren in der Inselzellquantifizierung kommt. Es muss folglich ein Korrekturfaktor zwischen diesen beiden Auswertmethoden existieren, welcher die Abweichungen zwischen den Methoden ausgleicht. Dieser Korrekturfaktor konnte in der Häufigkeitsverteilung der Inselzellen in den unterschiedlichen Grössenklassen gefunden werden.

Die in unserer Arbeit ermittelte Inselgrößenverteilung auf der Grundlage aus 12 Inselzellisolierungen ist mit denen von anderen Arbeitsgruppen vergleichbar. So berichtete *Stegemann (1998)* bei einer Serie von 140 Schweine-

inselzellisolationen über eine Inselverteilung von 75-80% in der Größenklasse bis 100 µm und einer Minderheit an Inselzellen größer als 100 µm (20-30%).

White (1999) berichtete über eine Größenverteilung von ca. 73% an Inselzellen in der Größenklasse < 100 µm bei jungen Hybridschweinen (6-12 Monate). *Jay* (1999) berichtete über eine Größenverteilung von Inselzellen bei jungen Hybridschweinen (<5 Wochen) von 75% in der Durchmesserklasse bis 50 µm, 18% in der Klasse 50-100 µm und einer Minderheit (ca. 7%) in den größeren Klassen.

4.4.1 Einfluss von Spenderalter und Ort der Inseln im Pankreas auf die Häufigkeitsverteilung der Inselzellen

Es ist bekannt, dass viele Faktoren die Isolierung von Schweineinselzellen und somit die Inselgrößenverteilung beeinflussen und beeinträchtigen können. Dazu gehören das Alter der Tiere, die Rasse der Tiere, die kalte und warme Ischämiezeit und der Bereich der Inselzellen innerhalb des Pankreas. Hier soll nur die Auswirkung von zwei wichtigen Punkten auf die Flächendichtemessung diskutiert werden: nämlich das Alter der Versuchstiere und der Bereich der Inselzellen im Pankreas.

Das Alter der verwendeten Spendertiere ist einer der meist diskutierten Punkte bei Schweineinselzellisolationen. Mehrere Arbeitsgruppen (*Jay 1999, Brandhorst 1999*) beschreiben eine höhere Ausbeute an Inselzellen mit einem größeren Durchmesser (>100 µm) bei älteren Versuchstieren (2-3 Jahre) im Vergleich zu jüngeren Versuchstieren (6 Monate). So zeigte *Dufrane* (2005), dass bei Pankreata von älteren Schweinen (>2 Jahre) nach der Isolierung eine Minderheit an Inselzellen (32%) in der Größenklasse bis zu 100 µm enthalten sind, die Mehrheit an Inseln (68%) sich dagegen zwischen 100 und 350 µm befindet.

Ulrichs (1994) berichtete über eine Größenverteilung der Inselzellen bei Hybridschweinen von 59,84% bei einem Durchmesser kleiner als 100 µm, 24,41% zwischen 100-150 µm, 7,87% zwischen 150-200 µm, 6,3% zwischen 200-250 µm, 0,79% zwischen 250-300 µm und 0,79% > 300 µm. Dabei zeigten sich auch Unterschiede in der Ausbeute bei Verwendung unterschiedlicher Rassen.

Das Wildschwein zeigte hierbei den größten Prozentanteil an kleinen Inselzellen nämlich 86% $<100\ \mu\text{m}$, wohingegen das deutsche Landrace-Schwein den höchsten Anteil an großen Inselzellen aufwies - nämlich 2,5% $>300\ \mu\text{m}$. Diese erhöhte Ausbeute an Inselzellen mit einem größeren Durchmesser wird unter anderem dadurch erklärt, dass größere Inselzellen vermehrt von einer Kollagenkapsel geschützt sind als kleinere Inselzellen (*Ulrichs 1994*).

Von in der Literatur entnommenen Ergebnissen bei Verwendung von älteren Versuchstieren (>2 Jahren) und dem damit verbundenen höheren Anteil an Inselzellen mit einem Durchmesser $>100\ \mu\text{m}$ kann davon ausgegangen werden, dass die Verwendung von älteren Versuchstieren die Methode der Flächendichtemessung beeinflusst. Diese Behauptung kann durch Betrachtung der **Abb. 3.6** im Ergebnisteil bestätigt werden, wonach der Hauptbetrag zur Bestimmung der Anzahl an IEQ bei der Flächendichtemessung aus den häufigsten Ergebnissen - also aus Inselzellen mit einer Größe bis zu $100\ \mu\text{m}$ resultiert und nicht aus Inselzellen mit einem Durchmesser $>100\ \mu\text{m}$.

In welcher Form der Ort der Inselzellen innerhalb des Pankreas die Flächendichtemessung beeinträchtigt, wird ebenfalls erörtert. *Jay (1999)* untersuchte die Größenverteilung von Inselzellen im Pankreas von 5, 12 und 24 Wochen alten Schweinen. Hierbei zeigte sich, dass der Anteil an Inselzellen mit einem Durchmesser $<100\ \mu\text{m}$ bei 5 Wochen alten Schweinen im vorderen oder hinteren Pankreasbereich ungefähr identisch ist und sich mit dem Alter der Tiere verändert. So befindet sich der höchste Anteil an Inselzellen mit einem Durchmesser zwischen 50 und $150\ \mu\text{m}$ von 12 und 24 Wochen alten Tieren im hinteren Pankreasanteil.

Folglich kommt es durch eine Veränderung des Alters zu einer Verschiebung der Inselzellen in den hinteren Pankreasanteil und dadurch zu einer Beeinträchtigung der Methode der Flächendichtemessung.

4.5 Einschränkung der Anwendbarkeit der Flächendichtemessung in der Praxis

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Methode der Flächendichtemessung und die der Volumenbestimmung unter Berücksichtigung der Inselgrößenverteilung zu den gleichen Ergebnissen bei der Bestimmung der Inselzellausbeute als IEQ gekommen sind. Aber wie müsste nun die Größenverteilung einer Inselpopulation aussehen, bei welcher die beiden Verfahren nicht mehr zum gleichen Ergebnis kommen und die Flächendichtemessung der Volumenbestimmung unterlegen ist?

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich machen, liegt der entscheidende Faktor in der Häufigkeitsverteilung der Inselzellen, welcher die Fehler - resultierend aus der unterschiedlichen Methodik der beiden Auswertverfahren - korrigiert. So konnte in **Abb. 3.6** gezeigt werden, dass die Flächendichtemessung **72,3%** der ermittelten Anzahl an IEQ aus den Größenklassen 1 (0-50 µm) und 2 (50-100) µm bezieht, während bei der Volumenbestimmung lediglich **31,6%** der ermittelten IEQ aus diesen beiden Klassen stammen. Daher müsste für die Fehlerbeurteilung der Anwendbarkeit der Flächendichtemessung eine Schweinepräparation mit einer Mehrheit an Inselzellen, die über einen Durchmesser >100 µm verfügen, analysiert werden. Als Beispiel können die oben bereits erwähnten Ergebnisse der Schweineinselzellisolationen von *Dufrane* (2005) herangezogen werden, bei denen eine Minderheit (32%) an Inselzellen in der Größenklasse bis zu 100 µm enthalten sind und einer Mehrheit (68%) an Inseln zwischen 100 und 350 µm. Hierbei sind die Grenzen der Flächendichtemessung deutlich erkennbar.

Eine weitere Einschränkung der Anwendbarkeit der Flächendichtemessung liegt in der Belegung der maximal zur Verfügung stehenden Beobachtungsfläche im mikroskopischen Bild. Wird durch eine zu hohe Zelldichte oder durch einen in der Präparation vorkommenden Hauptanteil an großen Inselzellen eine sehr hohe Flächendichte generiert, korreliert die Flächendichtemessung nicht mehr mit der prozentualen Bildfüllung und es kommt somit zu einer extremen Unter-

bewertung der Inselzeldosis ausgedrückt als Inselzelläquivalente (IEQ). Der Grund liegt wahrscheinlich darin, dass sehr viele Inselzellen übereinanderliegen und man nicht mehr in der Lage ist, die individuellen Inselränder zuverlässig zu erkennen.

Schlussfolgerung:

An Hand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine lineare positive Korrelation zwischen der Methode der Volumenbestimmung und der von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Methode der Flächendichtemessung in der Bestimmung der Inselzellmasse als IEQ existiert **(3.1.1)**.

Der Korrekturfaktor zwischen diesen beiden unterschiedlichen Verfahren in der Inselzellquantifizierung konnte in der Häufigkeitsverteilung der Inselzellen in den unterschiedlichen Grössenklassen gefunden werden. In wieweit jetzt andere Faktoren in der Inselisolierung wie Ischämiezeit, Rasse und Geschlecht der Tiere oder Gewicht der Tiere die Inselzellgrößenverteilung und somit die Flächendichtemessung beeinflussen können, muss sicherlich in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Genauso muss sicherlich auch der Einfluss von Geschlecht und Alter bei humanen Spendern auf die Inselzellisolierung und ihre Auswirkung auf die Flächendichtemessung untersucht werden.

Auf die Frage, ob die Flächendichtemessung nun als Standardmethode zur Bestimmung der Inselzeldosis als IEQ für die klinische Inselzelltransplantation betrachtet werden kann, sind die Ergebnisse dieser Arbeit allein sicherlich nicht aussagekräftig. Fakt ist jedoch sicherlich, dass die Flächendichtemessung auf der Grundlage unserer Ergebnisse (Hauptanteil der Inselzellen mit kleinerer Durchmessergröße) der Volumenbestimmung überlegen ist und ein genaueres, schnelleres und vor allem retrospektiv reproduzierbareres Verfahren darstellt.

5. Zusammenfassung

Die Transplantation von Inselzellen stellt neben der Pankreastransplantation die einzige kurative Möglichkeit zur Behandlung eines insulinabhängigen Diabetes mellitus dar. Hierfür stellt jedoch die genaue und reproduzierbare Bestimmung der Inselzelldosis in Anzahl an Inselzelläquivalente (IEQ) einen entscheidenden Faktor dar. So wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Methoden in der Inselquantifizierung - die konventionelle Methode der Volumenbestimmung und die von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode der Flächendichtemessung miteinander verglichen. Als Grundlage hierfür diente die Auswertung von 12 experimentellen Schweineinselzellisolationen. Schweineinselzellen wurden mittels kontinuierlicher Digestions-Filtrationsmethode isoliert und als Dichtegradientenzentrifugation im COBE 2991 Cell Processor gereinigt. Die gereinigten Inselzellen wurden dann mit Dithizon angefärbt und mehrmals mit dem Mikroskop fotografiert, wobei jeweils eine unterschiedliche Bildfläche getroffen wurde. Insgesamt wurden 168 Bilder von den 12 verschiedenen Präparationen gemacht und im Anschluss mit Hilfe des Adobe Photoshop Programms analysiert. In dem experimentellen Teil vorangestellten Rechenbeispiel konnte bei einer angenommenen Mengen von 10 Inselzellen gezeigt werden, dass ohne Verwendung der in einer Präparation vorkommenden natürlichen Inselgrößenverteilung keine lineare Beziehung zwischen beiden Auswertmethoden besteht. Im praktischen Teil wurde eine lineare Beziehung zwischen den beiden Verfahren über einen breiten Bereich an IEQ aus 12 verschiedenen Schweineinselzellpräparationen gefunden. Hierbei betrug der Korrelationskoeffizient 0,94 bei einem Regressionskoeffizienten von $0,97 \pm 0,03$. Ein mathematischer Zusammenhang zwischen beiden Methoden konnte hierbei nicht festgestellt werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeitsverteilung der Inselzellen bei der Berechnung des Inselvolumens durch die Flächendichte den stetig steigenden Einfluss des Volumens in der klassischen Berechnung der IEQ kompensiert und als Korrekturfaktor dieser beiden Methoden dient. Damit gelingt der Nachweis der grundsätzlichen Anwendbarkeit der Flächendichtemessung zur Dosisbes-

timmung von Inselzellen. Zusätzlich liefert diese Arbeit auch Daten zu den Anwendungsgrenzen der Technik, die in der Praxis von Bedeutung sein können. So konnte gezeigt werden, dass bei einem erhöhten Vorkommen von großen Inselzellen in der Präparation die Flächendichtemessung nicht mehr mit der prozentualen Bildfüllung korreliert und so zu einer extremen Unterbewertung der Inselzeldosis als IEQ führt. Weitere Fehlermöglichkeiten der Flächendichtemessung durch den Einfluß des Alters der Versuchstiere sowie des Bereichs der Inselzellen innerhalb des Pankreas wurden diskutiert.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
Abb.	Abbildung
AD	Flächendichte
AMG	Arzneimittelgesetz
ATG	Antithymozytenglobulin; polyklonales Antilymphozytenserum
D	Durchmesser
GCP	Gute Klinische Praxis
GMP	Good Manufacturing Practice
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEPES	N2-Hydroxyethyl-piperazin-ethanolsulfonsäure
IAK	Islet After Kidney
IEQ	Inseläquivalent (=standardisierte Inselzelle mit einem Durchmesser von 150 µm)
IPTR	International Pancreas Transplant Registry
ITA	Islet Transplantation Alone
ITN	Immune Tolerance Network
ITR	International Islet Transplant Registry
JDRF	Juvenile Diabetes Research Foundation
LI	Längendichte
MW	Mittelwert
NIH	National Institutes of Health
PAK	Pankreas After Kidney
Pp	Punktdichte
PTA	Pancreas Transplantation Alone
R	Radius der Inselzelle
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
SIK	Simultaneous Islet Kidney
SIL	Simultaneous Islet Liver

SPK	Simultaneous Pankreas Kidney
Tab.	Tabelle
UNOS	United Network for Organ Sharing
UW	University Wisconsin-Lösung
V	Volumen
π	Pi (3,14)

7. Literaturverzeichnis:

- Ahrén B.
Autonomic regulation of islet hormone secretion-implications for health and disease.
Diabetologia. 2000; 43(4):393-410.
- American Diabetes Association (ADA):
Nephropathy in Diabetes.
Diabetes Care. 2004; Vol 27(4):S79-83.
- Ao Z, Matayoshi K, Lakey JR, Rajotte RV, Warnock GL.
Survival and function of purified islets in the omental pouch site of outbred dogs.
Transplantation. 1993; 56(3):524-9.
- Ashcroft FM, Rorsman P.
Electrophysiology of the pancreatic beta-cell.
Prog Biophys Mol Biol. 1989; 54(2):87-143.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS.
Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment.
Lancet. 2001; 358(9277):221-9.
- Bach JF.
The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases.
N Engl J Med. 2002; 347(12):911-20.
- Ballian N, Brunnicardi FC.
Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function.
World J Surg. 2007; 31(4):705-14.
- Ballinger WF, Lacy PE.
Transplantation of intact pancreatic islets in rats.
Surgery. 1972; 72(2):175-86.
- Banatvala JE, Bryant J, Schernthaner G, Borkenstein M, Schober E, Brown D, De Silva LM, Menser MA, Silink M.
Coxsackie B, mumps, rubella, and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria, and Australia.
Lancet. 1985; 1(8443):1409-12.
- Bauer GE.
Islets of Langerhans.
In: L.Weiss (ed.): *Cell and Tissue Biology*.
Urban und Schwarzenberg, Wien, 1988:739-749.

- Berney T, Ricordi C.
Islet cell transplantation: the future?
Langenbecks Arch Surg. 2000; 385(6):373-8.
- Berney T, Bühler L, Caulfield A, Oberholzer J, Toso C, Alejandro R, Cooper DK, Ricordi C, Morel P.
Transplantation of islets of Langerhans: new developments.
Swiss Med Wkly. 2001; 131(47-48):671-80.
- Boker A, Rothenberg L, Hernandez C, Kenyon NS, Ricordi C, Alejandro R.
Human islet transplantation: update.
World J Surg. 2001; 25(4):481-6.
- Bonnevie-Nielsen V, Skovgaard LT.
Pancreatic islet volume distribution: direct measurement in preparations stained by perfusion in situ.
Acta Endocrinol (Copenh). 1984; 105(3):379-84.
- Boulton AJ.
The diabetic foot: a global view.
Diabetes Metab Res Rev. 2000; 16 (Suppl 1):S2-5.
- Brandhorst D, Brandhorst H, Hering BJ, Bretzel RG.
Long-term survival, morphology and in vitro function of isolated pig islets under different culture conditions.
Transplantation. 1999; 67(12):1533-41.
- Brandhorst D, Iken M, Tanioka Y, Brendel MD, Bretzel RG, Brandhorst H.
Influence of collagenase loading on long-term preservation of pig pancreas by the two-layer method for subsequent islet isolation.
Transplantation. 2005; 79(1):38-43.
- Brendel MD, Hering BJ, Schultz AO, Bretzel RG (Eds.).
International Islet Transplant Registry Report, Newsletter 9, Vol 8 (No 1), 2001.
University of Giessen, Germany.
(<http://www.med.uni-giessen.de/itr/newsletter>).
- Bretzel R, Slijepovic M, Federlin K.
Experimental and clinical islet transplantation.
Z Exp Chir Transplant. 1986; 19(4):243-6.
- Bretzel R, Federlin K.
Pancreas and islands of langerhans transplantation in diabetes mellitus.
Internist (Berl). 1987; 28(4):254-61.

Bretzel RG, Browatzki CC, Schultz A, Brandhorst H, Klitscher D, Bollen CC, Raptis G, Friemann S, Ernst W, Rau WS, Hering BJ.

Clinical islet transplantation in diabetes mellitus—report of the Islet Transplant Registry and the Giessen Center experience.
Diab Stoffw. 1993; 2:378–390.

Bretzel RG.
Insel- und Pankreastransplantation bei Diabetes.
Ther Umsch. 1996; 53(12):889-901.

Bretzel RG, Brandhorst D, Brandhorst H, Eckhard M, Ernst W, Friemann S, Rau W, Weimar B, Rauber K, Hering BJ, Brendel MD.
Improved survival of intraportal pancreatic islet cell allografts in patients with type-1 diabetes mellitus by refined peritransplant management.
J Mol Med. 1999; 77(1):140-3.

Bretzel RG, Jahr H, Eckhard M, Martin I, Winter D, Brendel MD.
Islet cell transplantation today.
Langenbecks Arch Surg. 2007; 392(3):239-53.

Britland ST, von Zimmermann O, Sharma AK, Bretzel RG, Federlin K.
The effect of pancreatic islet transplantation on experimental diabetic neuropathy.
J Neurol Sci. 1991; 105(2):168-74.

Bühler L, Anderegg E, Deng S, Spiliopoulos A, Nicod L, Rochat T, Tschopp JM, Cretin N, Fournier B, Conrad B, Mentha G, Morel P.
Combined islet-lung transplantation in a cystic fibrosis patient.
Schweiz Med Wochenschr. 1996; 79:73S-75S.

Bunag S, Warner NE.
Microcirculation in the islets of langerhans of the mouse.
Anat. Rec. 1963; 146:117-124.

Delesse MA.
Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches.
C.R. Acad. Sci. 1847; 25:544-545.

Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS.
Type 1 diabetes: recent developments.
BMJ. 2004; 328(7442):750-4.

Diehl R.
Computergestützte dreidimensionale Morphometrie des Inselorganes von Rind und Schwein.
Shaker-Verlag, Aachen, 1997.

Dufrane D, Goebbels RM, Fdilal I, Guiot Y, Gianello P.
Impact of porcine islet size on cellular structure and engraftment after transplantation: adult versus young pigs.
Pancreas. 2005; 30(2):138-47.

Durinovic-Bello I.
Autoimmune diabetes: the role of T cells, MHC molecules and autoantigens.
Autoimmunity. 1998; 27(3):159-77.

Drognitz O, Benz S, Pfeffer F, Fischer C, Makowiec F, Schareck W, Hopt UT.
Long-term follow-up of 78 simultaneous pancreas-kidney transplants at a single-center institution in Europe.
Transplantation. 2004; 78(12):1802-8.

Federlin K, Pozza G.
Indications for clinical islet transplantation today and in the foreseeable future--the diabetologist's point of view.
J Mol Med. 1999; 77(1):148-52.

Fernandez LA, Hatch EW, Armann B, Odorico JS, Hullett DA, Sollinger HW, Hanson MS.
Validation of large particle flow cytometry for the analysis and sorting of intact pancreatic islets.
Transplantation. 2005; 80(6):729-37.

Fiorina P, Folli F, Zerbini G, Maffi P, Gremizzi C, Di Carlo V, Socci C, Bertuzzi F, Kashgarian M, Secchi A.
Islet transplantation is associated with improvement of renal function among uremic patients with type 1 diabetes mellitus and kidney transplants.
J Am Soc Nephrol. 2003; 14:2150-2158.

Fong DS, Aiello LP, Ferris FL 3rd, Klein R.
Diabetic retinopathy.
Diabetes Care. 2004; 27(10):2540-53.

Gale EA.
A missing link in the hygiene hypothesis?
Diabetologia. 2002; 45(4):588-94.

Gillespie KM.
Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention.
CMAJ. 2006; 175(2):165-70.

Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T.
Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment.
Diabetes Care. 2005; 28(1):164-76.

Gruessner AC, Sutherland DE.
Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004.
Clin Transplant. 2005; 19(4):433-55.

Hammes HP, Klinzing I, Wiegand S, Bretzel RG, Cohen AM, Federlin K.
Islet transplantation inhibits diabetic retinopathy in the sucrose-fed diabetic Cohen rat.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993; 34(6):2092-6.

Hauner H, Köster I, von Ferber L.
Prevalence of diabetes mellitus in Germany 1998-2001. Secondary data analysis of a health insurance sample of the AOK in Hesse/KV in Hesse.
Dtsch Med Wochenschr. 2003; 128(50):2632-7.

Hauner H.
Epidemiology and costs of diabetes mellitus in Germany.
Dtsch Med Wochenschr. 2005; (130 Suppl 2):S64-5.

Hedeskov CJ.
Mechanism of glucose-induced insulin secretion.
Physiol Rev. 1980; 60(2):442-509.

Hellman B, Petersson B, Hellerström C.
The Growth Pattern Of The Endocrine Pancreas In Mammals.
In: Brolin, S., Hellman, B., Knutson, H.(Eds): *Structure And Metabolism Of The Pancreatic Islets*.
Pergamon Press,Oxford, 1964:45-60.

Hengster P, Hermann M, Pirkebner D, Draxl A, Margreiter R.
Islet isolation and GMP, ISO 9001:2000: what do we need--a 3-year experience.
Transplant Proc. 2005; 37(8):3407-8.

Hering BJ, Bretzel RG, Hopt UT, Brandhorst H, Brandhorst D, Bollen CC, Raptis G, Helf F, Grossmann R, Mellert J, et al.
New protocol toward prevention of early human islet allograft failure.
Transplant Proc. 1994; 26(2):570-1.

Hu YF, Cheng RL, Shao AH, Ye RS, Gu ZF, Zhang HD, Zhang ZG, Hen LR, Bi HF, Shi GF.
The influences of islet transplantation on metabolic abnormalities and diabetic complications.
Horm Metab Res. 1989; 21(4):198-202.

Imagawa A, Hanafusa T, Itoh N, Waguri M, Yamamoto K, Miyagawa J, Moriwaki M, Yamagata K, Iwahashi H, Sada M, Tsuji T, Tamura S, Kawata S, Kuwajima M, Nakajima H, Namba M, Matsuzawa Y.

Immunological abnormalities in islets at diagnosis paralleled further deterioration of glycaemic control in patients with recent-onset Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus.

Diabetologia. 1999; 42(5):574-8.

International Diabetes Federation.

Diabetes-Atlas, IDF, 3.-Auflage, 2006.

(<http://www.eatlas.idf.org>).

International Pancreas Transplant Registry (IPTR): Updated September 2006.

(<http://www.med.umn.edu/IPTR/home.html>).

Jaeckel E, Becker T, Manns MP.

Organ transplantation in endocrinology. Islet cells and pancreas.

Internist (Berl). 2004; 45(11):1268-80.

Jahromi MM, Eisenbarth GS.

Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes.

Cell Mol Life Sci. 2007; 64(7-8):865-72.

Jawa A, Kcomt J, Fonseca VA.

Diabetic nephropathy and retinopathy.

Med Clin North Am. 2004; 88(4):1001-36.

Jay TR, Heald KA, Carless NJ, Topham DE, Downing R.

The distribution of porcine pancreatic beta-cells at ages 5, 12 and 24 weeks.

Xenotransplantation. 1999; 6(2):131-40.

Kaden J, Eichler S, May G, Strobelt V.

The ATG bolus does not induce a persistent inversion of the CD4/8 ratio.

Transplant Proc. 2002; 34(6):2379-81.

Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC.

Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy.

Surgery. 1967; 61(6):827-37.

Kimpimäki T, Kulmala P, Savola K, Vähäsalo P, Reijonen H, Ilonen J, Akerblom HK, Knip M.

Disease-associated autoantibodies as surrogate markers of type 1 diabetes in young children at increased genetic risk. Childhood Diabetes in Finland Study Group.

J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85(3):1126-32.

Klaffschenkel RA, Biesemeier A, Waidmann M, Northoff H, Steurer W, Königsrainer A, Lembert N.

A closed system for islet isolation and purification using the COBE2991 cell processor may reduce the need of clean room facilities.
Cell Transplant. 2007; 16(6):587-94.

Krickhahn M, Bühler C, Meyer T, Thiede A, Ulrichs K.

The morphology of islets within the porcine donor pancreas determines the isolation result: successful isolation of pancreatic islets can now be achieved from young market pigs.
Cell Transplant. 2002; 11(8):827-38.

Lacy PE, Kostianovsky M.

Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes. 1967; 16(1):35-9.

Langerhans P.

Beiträge Zur Mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse.
Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät der Friedrich Wilhelm Universität; Berlin; 1869.

LaPorte RE, Matsushima M, Chang Y-F.

Prevalence and incidence of insulin-dependent diabetes.
In: Harris MI et al. (eds.). Diabetes in America 2nd edition – National Diabetes Data Group. National Institutes of Health, Diabetes and Kidney Diseases (NIH Publication No. 951468).
US Government Printing Office, Washington (DC): 1995:p37–45.

Latif ZA, Noel J, Alejandro R.

A simple method of staining fresh and cultured islets.
Transplantation. 1988; 45(4):827-30.

Lee TC, Barshes NR, O'Mahony CA, Nguyen L, Brunicardi FC, Ricordi C, Alejandro R, Schock AP, Mote A, Goss JA.

The effect of pancreatic islet transplantation on progression of diabetic retinopathy and neuropathy.
Transplant Proc. 2005; 37(5):2263-5.

Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO.

Insulin feedback action on pancreatic beta-cell function.
FEBS Lett. 2002; 532(1-2):1-6.

Lembert N, Wesche J, Petersen P, Doser M, Becker HD, Ammon HP.

Areal density measurement is a convenient method for the determination of porcine islet equivalents without counting and sizing individual islets.
Cell Transplant. 2003; 12(1):33-41.

Malone JI, Morrison AD, Pavan PR, Cuthbertson DD.
Prevalence and significance of retinopathy in subjects with type 1 diabetes of less than 5 years' duration screened for the diabetes control and complications trial.

Diabetes Care. 2001; 24(3):522-6.

Markmann JF, Deng S, Huang X, Desai NM, Velidedeoglu EH, Lui C, Frank A, Markmann E, Palanjian M, Brayman K, Wolf B, Bell E, Vitamaniuk M, Doliba N, Matschinsky F, Barker CF, Najj A.

Insulin independence following isolated islet transplantation and single islet infusions.

Ann Surg. 2003; 237(6):741-9.

Marzorati S, Pileggi A, Ricordi C.

Allogeneic islet transplantation.

Expert Opin Biol Ther. 2007; 7(11):1627-45.

Mehers KL, Gillespie KM.

The genetic basis for type 1 diabetes.

Br Med Bull. 2008; 88(1):115-29.

Menger MD, Vajkoczy P, Beger C, Messmer K.

Orientation of microvascular blood flow in pancreatic islet isografts.

J Clin Invest. 1994; 93(5):2280-5.

Moskalewski S.

Isolation and culture of the islets of langerhans of the guinea pig.

Gen Comp Endocrinol. 1965; 44:342-53.

Niclauss N, Sgroi A, Morel P, Baertschiger R, Armanet M, Wojtusciszyn A, Parnaud G, Muller Y, Berney T, Bosco D.

Computer-assisted digital image analysis to quantify the mass and purity of isolated human islets before transplantation.

Transplantation. 2008; 86(11):1603-9.

Nyengaard JR.

Stereologic methods and their application in kidney research.

J Am Soc Nephrol. 1999; 10(5):1100-23.

Oberholzer J, Toso C, Ris F, Bucher P, Triponez F, Demirag A, Lou J, Morel P.
Beta cell replacement for the treatment of diabetes.

Ann N Y Acad Sci. 2001; 944:373-87.

Orci L, Malaisse-Lagae F, Ravazzola M, Rouiller D, Renold AE, Perrelet A, Unger R.

A morphological basis for intercellular communication between alpha- and beta-cells in the endocrine pancreas.

J Clin Invest. 1975; 56(4):1066-70.

- Orci L.
The microanatomy of the islets of Langerhans.
Metabolism. 1976; 25(11 Suppl 1):1303-13.
- Peng H, Hagopian W.
Environmental factors in the development of Type 1 diabetes.
Rev Endocr Metab Disord. 2006; 7(3):149-62.
- Pileggi A, Alejandro R, Ricordi C.
Clinical islet transplantation.
Minerva Endocrinol. 2006; 31(3):219-32.
- Pipeleers D.
Islet cell interactions with pancreatic B-cells.
Experientia. 1984; 40(10):1114-26.
- Pyzdrowski KL, Kendall DM, Halter JB, Nakhleh RE, Sutherland DE, Robertson RP.
Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts.
N Engl J Med. 1992; 327(4):220-6.
- Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW.
Automated method for isolation of human pancreatic islets.
Diabetes. 1988; 37(4):413-20.
- Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, Kaufman DB, Warnock GL, Kneteman NM, Lake SP, London NJ, Socci C, Alejandro R, et al.
Islet isolation assessment in man and large animals.
Acta Diabetol Lat. 1990; 27(3):185-95.
- Robertson RP, Sutherland DE.
Pancreas transplantation as therapy for diabetes mellitus.
Annu Rev Med. 1992; 43:395-415.
- Robertson GS, Chadwick DR, Contractor H, James RF, London NJ.
The optimization of large-scale density gradient isolation of human islets.
Acta Diabetol. 1993; 30(2):93-8.
- Robertson RP.
Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress.
N Engl J Med. 2004; 350(7):694-705.
- Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM.
Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol.
Diabetes. 2001; 50(4):710-9.

Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, Imes S, Korbitt GS, Kneteman NM, Bigam D, Rajotte RV, Shapiro AM.

Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control.

Diabetes. 2002; 51(7):2148-57.

Saito K, Iwama N, Takahashi T.

Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas.

Tohoku J Exp Med. 1978; 124(2):177-86.

Samols E, Stagner JI, Ewart RB, Marks V.

The order of islet microvascular cellular perfusion is B----A----D in the perfused rat pancreas.

J Clin Invest. 1988; 82(1):350-3.

Scharp DW, Murphy JJ, Newton WT, Ballinger WF, Lacy PE.

Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys.

Surgery. 1975; 77(1):100-5.

Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, Marchetti P, Gingerich RL, Jaffe AS, Cryer PE, et al.

Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient.

Diabetes. 1990; 39(4):515-8.

Scharp DW.

Islet quality control testing and the islet isolation laboratory.

In: Ricordi C. (ed.). Pancreatic islet cell transplantation.

R.G. Landes Company, Austin (Texas), 1992:82-88.

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV.

Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen.

N Engl J Med. 2000; 343(4):230-8.

Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation.

N Engl J Med. 2006; 355(13):1318-30.

Schmidt RE, Plurad SB, Olack BJ, Scharp DW.

The effect of pancreatic islet transplantation and insulin therapy on experimental diabetic autonomic neuropathy.

Diabetes. 1983; 32 (6):532-40.

- Sima AA.
Diabetic neuropathy in type 1 and type 2 diabetes and the effects of C-peptide.
J Neurol Sci. 2004; 220(1-2):133-6.
- Sollinger HW, Geffner SR.
Pancreas transplantation.
Surg Clin North Am. 1994; 74(5):1183-95.
- Sollinger HW, Odorico JS, Knechtle SJ, D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Pirsch JD.
Experience with 500 simultaneous pancreas-kidney transplants.
Ann Surg. 1998; 228(3):284-96.
- Stegemann JP, O'Neil JJ, Nicholson DT, Mullon CJ.
Improved assessment of isolated islet tissue volume using digital image analysis.
Cell Transplant. 1998; 7(5):469-78.
- Stock PG, Bluestone JA.
Beta-cell replacement for type I diabetes.
Annu Rev Med. 2004; 55:133-56.
- Sutherland DE, Gruessner RW, Gruessner AC.
Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus.
World J Surg. 2001a; 25(4):487-96.
- Sutherland DE, Gruessner RW, Dunn DL, Matas AJ, Humar A, Kandaswamy R, Mauer SM, Kennedy WR, Goetz FC, Robertson RP, Gruessner AC, Najarian JS.
Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution.
Ann Surg. 2001b; 233(4):463-501.
- Tchervenivanov N, Metrakos P, Kokugawa Y, Rosenberg L.
Submucosal transplantation of pancreatic islets.
Transplant Proc. 1994; 26(2):680-1.
- Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, Fuller JH, Plater M, Ionescu-Tirgoviste C, Nuber A, Pozza G, Ward JD.
Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study.
Diabetologia. 1996; 39(11):1377-84.
- Toniolo A, Onodera T, Yoon JW, Notkins AL.
Induction of diabetes by cumulative environmental insults from viruses and chemicals.
Nature. 1980; 288(5789):383-5.

- Turina M, Christ-Crain M, Polk HC Jr.
Diabetes and hyperglycemia: strict glycemic control.
Crit Care Med. 2006; 34(9 Suppl):S291-300.
- Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay IR, Shattock M, Bottazzo GF, Holman R.
UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group.
Lancet. 1997; 350(9087):1288-93.
- Ulrichs K, Bosse M, Wacker HH, Heiser A, Müller-Ruchholtz W.
Histologic analysis of the porcine pancreas to improve islet yield and integrity after collagenase digestion.
Transplant Proc. 1994; 26(2):610-2.
- Unger RH, Dobbs RE, Orci L.
Insulin, glucagon, and somatostatin secretion in the regulation of metabolism.
Annu Rev Physiol. 1978; 40:307-43.
- Van der Burg M, Scheringa M, Basir I, Bouwman E.
Assesment of isolated islet equivalents.
Transplant Proc. 1997; 29(4):1971-3.
- Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS.
Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies.
Diabetes. 1996; 45(7):926-33.
- Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, Colman PG, Pilcher C, Bingley PJ, Eisenbarth GS.
Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop.
Diabetes. 1998; 47(12):1857-66.
- Vinik AI, Holland MT, Le Beau JM, Liuzzi FJ, Stansberry KB, Colen LB.
Diabetic neuropathies.
Diabetes Care. 1992; 15(12):1926-75.
- Voith S.
Morphometrische Untersuchung der Basalganglien bei Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson
Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität; Institut für Neuropathologie; München; 2002.

Wahoff DC, Papalois BE, Najarian JS, Kendall DM, Farney AC, Leone JP, Jessurun J, Dunn DL, Robertson RP, Sutherland DE.
Autologous islet transplantation to prevent diabetes after pancreatic resection.
Ann Surg. 1995; 222(4):562-79.

Warnock GL, Thompson DM, Meloche RM, Shapiro RJ, Ao Z, Keown P, Johnson JD, Verchere CB, Partovi N, Begg IS, Fung M, Kozak SE, Tong SO, Alghofaili KM, Harris C.
A multi-year analysis of islet transplantation compared with intensive medical therapy on progression of complications in type 1 diabetes.
Transplantation. 2008; 86(12):1762-6.

Weibel ER.
Stereological Methods. Vol.1: Practical methods for biological morphometry.
Academic Press, London, 1979.

Weir GC, Bonner-Weir S, Leahy JL.
Islet mass and function in diabetes and transplantation.
Diabetes. 1990; 39(4):401-5.

White SA, Hughes DP, Contractor HH, London NJ.
A comparison of cross sectional surface area densities between adult and juvenile porcine islets of Langerhans.
Horm Metab Res. 1999; 31(9):519-24.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.
Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.
Diabetes Care. 2004; 27(5):1047-53.

Yasunami Y, Lacy PE, Finke EH.
A new site for islet transplantation--a peritoneal-omental pouch.
Transplantation. 1983; 36(2):181-2.

8. Danksagungen

Herrn PD Dr. Nicolas Lemberg danke ich für die Überlassung des Themas, die stets zur Verfügung stehende Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei den unterschiedlichsten Problemen und Fragestellungen und zuletzt die Geduld, die er mit mir haben musste.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Steurer danke ich, dass ich über ihn diese Arbeit anmelden konnte. Durch seine freundliche und menschliche Art im transplantationschirurgischen Alltag wurde ich in den Bann der Transplantationschirurgie gezogen, der mich nun in die Chirurgische Abteilung des Universitätsklinikums Leipzig verschlagen hat.

Ein sehr herzliches Dankeschön an das Laborteam (Roland Klaffschenkel und Maria Seifert) für die netten Stunden im Labor und die Hilfestellung bei den unterschiedlichsten Problemen der Laborarbeit.

Einen ganz großen Dank möchte ich an meine Eltern und meine Schwester richten, die mir durch das Studium der Medizin erst diese Dissertation ermöglicht haben. Ohne ihre permanente Unterstützung und die vielen aufmunternden Gespräche hätte ich die Bewältigung dieser Arbeit nie so gut geschafft.

Ein großer Dank geht an Haluk Morgül, der mir bei statistischen und formalen Problemen immer zur Seite stand. Vor allem durch seinen Humor und seine Hilfe konnte ich diese Arbeit so schnell neben dem stressigen Klinikalltag zu Ende bringen.

Zum Schluß möchte ich mich bei Carolin Höschele bedanken, daß sie immer für mich da war und an mich und die Zukunft geglaubt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name : Hans Michael Hau
Geburtsdatum : 07.04.1981
Geburtsort : Laupheim
Familienstand : ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1987 – 1991 Besuch der Grundschule in Riedlingen
1991 – 2000 Besuch des Kreisgymnasiums Riedlingen
2000 Abschluss: Abitur
Note: - gut (2,3) –

Zivildienst:

2000-2001 Kreisklinikum Riedlingen, Abteilung für Chirurgie

Weiterer Lebensweg:

2001 – 2001 Ausbildung zum Staatlich geprüften Rettungssanitäter in Kempten
2001 Abschluss: Examen
Note: - gut (2,0) -
2002 – 2002 Ableistung eines freiwilligen Praktikums auf der Chirurgischen Pflegestation und als Assistent im OP im Kreisklinikum Riedlingen

Medizinstudium:

2002 - 2008 Studium der Humanmedizin
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
25.03.2004 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
Note: -befriedigend (3,0) –

Famulaturen:

08/04 - 09/04	Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgische Abteilung des Kreisklinikums Biberach
09/04 – 10/04	Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgische Abteilung des Kreisklinikums Riedlingen
03/05 – 04/05	Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgische Abteilung des Kreisklinikums Riedlingen
03/06 – 04/06	Abteilung für Radiologische Diagnostik am Universitätsklinikum Tübingen
09/06 - 10/06	Abteilung für Urologie am Universitätsklinikum Tübingen

Praktisches Jahr:

02/07 – 06/07	Innere Medizin: Abteilung für Gastroenterologie am Universitätsklinikum Tübingen
06/07 – 08/07	Chirurgie: Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie am Universitätsklinikum Tübingen
08/07 – 10/07	Chirurgie: Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie am St. Lukes University Hospital auf Malta
11/07 - 01/08	Urologie: Universitätsspital Zürich

Examen:

30.10.2008	Ärztliche Prüfung (2. Staatexamen) an der Universität Tübingen
------------	--

Klinische Tätigkeit:

12/08	Beginn der Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie am Uniklinikum Leipzig
-------	---