

**Wiederherstellung einer physiologischen Blutzuckerregulung
durch Xenotransplantation mikroenkapsulierter
Langerhans-Inseln in zwei
diabetische Mausmodelle.**

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Peter Johannes Feilen
geb. am 09.11.1963 in Trier

Mainz 2004

Tag der mündl. Prüfung: 05. Oktober 2004

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic force microscopy
BZ	Blutzucker
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FCS	Fetal calf serum
FDA/PJ	Fluoresceindiacetat/Propidiumjodid / Live-Dead-Färbung)
GPC	Gel Permeations Chromographie
HSA	Humanes Serum Albumin
IEQ	Insel Äquivalent (1 IEQ entspricht einer Insel mit einem Durchmesser von 150µm)
iP	Intra Peritoneal
iP-GTT	Intraperitonealer Glucose Toleranz Test
ITR	Internationales Inselzell-Transplantations Register
KG	Körpergewicht
LVA	Low viscosity aliginate / niederviskoses Alginat
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOD	Non obese diabetic mouse
RPMI 1640	Kulturmedium
[±SD]	Standardabweichung
Tx	Transplantation
UHV-Alginat	Ultra high viscosity alginate / ultra hochviskoses Alginat (Lehrstuhl für Biotechnologie, Universität Würzburg)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.2	Pankreas- und Inselzelltransplantation	2
1.3	Mikroenkapsulierung	4
1.4	Zielsetzung:	11
2.	Material und Methoden	13
2.1	Tiere	13
2.2	Inselzellisolation und –aufreinigung und Zellkultur	13
2.3	Mikroenkapsulierung von Langerhans-Inseln	17
2.3.1	Alginate	17
2.3.2	Gel Permeations Chromographie (GPC)	17
2.3.3	Thermodynamisch stabilisierter Bariumalginatbead	18
2.3.4	Crystal Gun Verkapselung	21
2.4.	Methoden zur Vitalitäts- und Funktionalitätsmessung	23
2.4.1	Vitalitätstest	23
2.4.2	Funktionalitätsprüfung von Ratteninseln	25
2.5	In vitro und in vivo Testung des Kapselsystems	27
2.5.1	In vitro Serum Zytotoxizitäts-Assay	27
2.5.2	In vivo-Testung von Leerkapseln	28
2.6	Transplantationsuntersuchungen	30
2.6.1	Medikamentöse Diabetesinduktion	30
2.6.2	Autoimmunogene Diabetesmodell	30
2.6.3	Transplantation von verkapselten Inseln	31
2.6.4	„Non-fasting“ Blutzuckerkontrolle	32
2.6.5	Intraperitonealer Glucose Toleranz Test (iP-GTT)	32
2.7	Statistische Testverfahren	33

3.	Ergebnisse	34
3.1	Ultra hoch viskose Alginat (UHVA).....	34
3.1.1	Molekulargewichtsverteilung.....	34
3.2	Thermodynamisch stabilisierter Ba-Alginatbead.....	36
3.2.1	Alginatkonzentration.....	36
3.2.2	Stabilität	37
3.2.3	HSA-Zusatz.....	38
3.3	Immunprotektion gegen xenogene Komplementaktivierung.....	42
3.4	In vivo-Testung von Leerkapseln.....	43
3.5	Transplantation immunisolierter Langerhans-Inseln von Ratten in diabetische Balb/c-Mäuse.....	47
3.5.1	Erste Transplantationsserie mit 1.000 mikroenkapsulierten Ratteninseln in 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 1%igen Zusatz von humanen Serumalbumin	47
3.5.2	Zweite Transplantationsserie mit 1.800 mikroenkapsulierten Ratteninseln in 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 3%igen Zusatz von humanen Serumalbumin	49
3.6	Transplantation immunisolierter Langerhans-Inseln von Ratten in diabetische NOD-Mäuse	53
3.6.1	Dritte Transplantationsserie mit 1.000 mikroenkapsulierten Ratteninseln in 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 1%igen Zusatz von humanen Serumalbumin	53
3.6.2	Vierte Transplantationsserie mit 1.800 mikroenkapsulierten Ratteninseln in 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 3%igen Zusatz von humanen Serumalbumin	54
3.7	Explantation von transplantierten, mikroenkapsulierten Inseln.....	56
3.7.1	Explantationen bei Balb/c-Mäusen	56
3.7.2	Explantationen bei NOD-Mäusen	58
3.8	Crystal Gun Verkapselung	60
4.	Diskussion	62
5.	Zusammenfassung	71

6.	Literatur	73
7.	Originalergebnisse	81
8.	Lebenslauf	97

1. Einführung

1.1 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus stellt für die nationalen Gesundheitssysteme eine besondere Herausforderung dar. Schon heute ist der Diabetes mellitus mit einer Prävalenz von ca. 6-8% die häufigste Stoffwechselerkrankung der Bevölkerung der industrialisierten Länder. Im Rahmen einer weiterhin progressiven Entwicklung soll die Zahl der Erkrankten bis zum Jahr 2025 auf über 12% der Gesamtbevölkerung ansteigen (Cockram CS, 2000). Wie aktuelle Studien belegen ist besonders der Anteil des autoimmunogenen Typ 1-Diabetes in den letzten Jahren stark auf ca. 9% der Erkrankten angestiegen, was überwiegend auf Erstmanifestationen der Erkrankung bei Kindern unter 5 Jahren zurückzuführen ist (EURODIAB ACE Study Group 2000).

Der Typ 1 Diabetes wird konventionell durch eine Insulinersatztherapie behandelt. Trotzdem erkranken die meisten Patienten nach kurzer Zeit, auf Grund einer unzureichenden, nicht physiologischen Blutzuckerregulation, an diabetischen Folgeerkrankungen. Durch die Entwicklung der intensivierten Insulintherapie, neuen Insulinanaloga, Insulinpumpen, Blutzuckermesssysteme etc. stehen dem diabetischen Patienten heute äußerst wirksame Werkzeuge in der Therapie des Diabetes zur Verfügung. Jedoch zeigen viele Untersuchungen, dass nur durch eine strenge und lebenslange, gewissenhafte Einstellung des Blutzuckers, die diabetischen Folgeerkrankungen verlangsamt oder sogar vermieden werden können (The Diabetes Control and Complication Trial Research Group 1993, Agardh et al. 1997, Lepore et al. 2002, The Diabetes Control and Complication Trial Research Group 2002). Für dieses Ziel müssen die Patienten deutliche Einschränkungen ihrer Lebensqualität in Kauf nehmen. Hierbei sind besonders die strikte diätische und gezielte Lebensführung, die täglich mehrmaligen Blutzuckermessungen und Insulininjektionen bei erhöhter Gefahr von hypoglykämischen Entgleisungen zu nennen.

1.2 Transplantation von Pankreata und Langerhans-Inseln

Eine vollständige Heilung des Typ 1 Diabetes dagegen kann nur durch den Ersatz der zerstörten β -Zellmasse erzielt werden. Am 17. Dezember 1966 wurde durch Kelly und Lillehei die erste Pankreas-Transplantation durchgeführt. Die Pankreas-transplantation hat sich in den letzten Jahren von einem Verfahren mit hoher peri- und postoperativer Morbidität und Mortalität zu einem Eingriff mit kalkulierbarem Risiko und akzeptablen Langzeitergebnissen entwickelt. Lag das 1-Jahres Patienten- bzw. Pankreastransplantatüberleben im Jahr 1980 noch bei 67% bzw. 21%, so hat es sich im Zeitraum 1987 - 1997 auf 94% bzw. 82% verbessert. Dies wurde vor allen Dingen durch Optimierung und Standardisierung der Operationstechniken, der immunsuppressiven Therapie, sowie Selektion der für diese Therapie geeigneten Patienten möglich. Trotzdem gehört die Pankreastransplantation heute immer noch zu den technisch aufwendigsten Solidorgantransplantationsverfahren mit einer hohen peri- und postoperativen Komplikationsrate, die nicht zuletzt auf das äußerst sensitive Pankreasgewebe zurückzuführen ist (IPTR Datenbank).

Der Blutzuckerspiegel wird durch den endokrinen Anteil des Pankreasgewebes gesteuert. Die Langerhans-Inseln liegen als 75 bis zu 500 μ m große Gewebekompartimente gleichmäßig im exokrinen Gewebeanteil eingebettet. In ihrer Gesamtheit bilden sie die funktionelle Einheit des Inselorgans. Sie stellen nur etwa 2% des Gesamtpankreasgewebes. Die Langerhans-Inseln lassen sich durch eine Collagenasedigestion aus dem Gewebeverband des Pankreas herauslösen und anschließend durch eine Dichtezentrifugation von dem exokrinen Gewebeanteil abtrennen.

Im Gegensatz zur der Pankreastransplantation werden bei der konventionellen Inselzelltransplantation die aufgereinigten Inselzellen in einem nicht-invasiven Verfahren, perkutan über die Pfortader in die Leber eingespült. Dort setzen sich die

Inseln in den kleinen Leberkapillaren fest und übernehmen in der Leber die Steuerung der Blutzuckerregulierung.

In dem Zeitraum von 1974 bis 2000 wurden weltweit 445 klinische, allogene Inselzelltransplantationen im Rahmen des internationalen Inselzelltransplantationsregister (ITR) erfasst. In Hinblick auf das primäre Transplantationsziel, der Insulinfreiheit des Transplantatempfängers, konnten zu diesem Zeitpunkt nur bescheidene Erfolgsraten von 11% Insulinfreiheit 1 Jahr post-Tx (Tx-Periode: 1990-1999 ITR 2001) dokumentiert werden. Der entscheidende Durchbruch in der klinischen Inselzelltransplantation wurde im Jahre 2000 durch das kanadische Transplantationsteam aus Edmonton um Shapiro und Lakey erzielt (Shapiro et al. NEJM 2000). Diese Erfolge basieren u.a. auf der Einführung einer neuartigen immunsuppressiven Therapie, die ganz auf die diabetogenen Glucocorticoide verzichtete, kombiniert mit multiplen, intraportalen Injektionen einer Gesamtinselmasse von über 9.000 IEQ/ kg KG (Shapiro et al. NEJM 2000). Dadurch erreichten etwa 90% der transplantierten Typ 1 Diabetiker die Insulinfreiheit (Shapiro et al. 2001). Zur Bereitstellung dieser suffizienten Inselzellmasse werden Inselzellpräparationen in adäquater Qualität und Quantität von mindestens 2-3 Spenderorganen benötigt. Sowohl die publizierten Ergebnisse der Edmontoner Inselzelltransplantationscenters (Shapiro et al 2000-2003) als auch die aktuell vorgestellten Daten des Multi-Center-Trials (IDF Paris 2003) zeigen, dass die Transplantation von nativen Inselzellen für ein hochselektiertes Patientenkollektiv in naher Zukunft ein etabliertes Heilverfahren des Diabetes Typ 1 darstellen wird. Analog zur soliden Pankreastransplantation ist jedoch auch hier eine lebenslange Immunsuppressionstherapie obligatorisch. Kürzlich erschienene Arbeiten weisen darauf hin, dass eine längere Immunsuppression zu einem deutlich erhöhten Malignomrisiko führt (Vial et al. 2003, Glover et al. 1997, Preciado et al. 2002). Weiterhin ist eine strenge Befolgung der Therapie durch den Patienten von Nöten, da erst eine fein ausbalancierte Immunsuppression mit regelmäßiger Einnahme der Medikamente das Transplantatüberleben über einen längeren Zeitraum gewährleisten kann. Die Mehrzahl der im ITR aufgeführten Inseltransplantationen sind Simultan- oder Sekundärtransplantationen nierentransplantierte Diabetiker, wohingegen das „Edmonton Pro-

tokoll“ die alleinige Inselzelltransplantation bei einer speziell definierten Patientengruppe vorsieht. Besonders hier führt die Abwägung des Nutzen eines Inselzelltransplantates gegenüber den Risiken einer lebenslangen Immunsuppressionstherapie zur einer drastischen Einschränkung des in Frage kommenden Patientenkollektives. Als weiterer limitierender Faktor ist die Verfügbarkeit ausreichender Spenderorgane zur Inselzellisolation zu nennen. Der Zuständigkeitsbereich von EUROTRANSPLANT in Leiden/NL umfasst die BeNeLux-Länder und Deutschland. Hier werden die verfügbaren Spenderorgane zentral erfasst und entsprechend der Patientenwartelisten an die einzelnen Transplantationszentren der angeschlossenen Länder weitergeleitet. Nach Berücksichtigung des Bedarfs für die Pankreastransplantation standen in den letzten Jahren etwa 150-160 Pankreata pro Jahr zur Isolation von Inseln zur Verfügung (2. humaner Inselisoliationsworkshop in Giessen, 2003). Unter Berücksichtigung der Qualitäts- und Quantitätskriterien für transplantierbare Inselpräparationen können somit insgesamt maximal 30 bis 40 Patienten pro Jahr in diesem Länderverbund transplantiert werden.

1.3 Mikroenkapsulierung

Im Gegensatz zur Transplantation solider Organe besteht jedoch bei Einzelzellen oder begrenzten Gewebeeinheiten, wie z.B. der Langerhans-Insel, die Möglichkeit zur Immunseparation. 1964 hat Chang zum ersten Mal bestätigt, dass lebende Zellen enkapsuliert werden können und anschließend noch biologisch aktiv sind (Chang, 1964). Ende der siebziger Jahre entwickelten Lim und Sun eine Anlage zur Verkapselung von Inselzellen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass durch eine entsprechende Einstellung der Porengröße (Cut off) die Insel umgebende Mikrokapsel eine permselektive Funktion erhält. Bei optimaler Einstellung erlaubt die permselektive Membran die freie Passage von kleinen Molekülen. Somit wird gewährleistet, dass die nutritive Versorgung des enkapsulierten Gewebes sichergestellt und eine definierte Freisetzung therapeutischer Faktoren, wie das Insulin, erfolgen kann. Dagegen aber wird die Passage größerer Moleküle wie Antikörper

und immunkompetenter Zellen verhindert (Lim et al. 1980). Durch die Immobilisation in Makro- oder Mikrostrukturen mit einer semipermeablen Membran, stand erstmals ein Verfahren zur Verfügung, welches eine erfolgreiche Transplantation von allogenen oder sogar xenogenem Gewebe ermöglichte, ohne den Einsatz einer sonst nötigen immunsuppressiven Therapie.

Zum Einschluß des zu transplantierenden Gewebes wurden eine Vielzahl von natürlichen und artifiziellen Polymeren untersucht. Unter dem Aspekt des klinischen Einsatzes haben natürliche Polymere signifikante Vorteile. Natürliche Polymere und ihre Degradationsprodukte sind im Gegensatz zu synthetischen Polymeren im Allgemeinen nicht toxisch oder karzinogen (de Vos et al. 2002).

Alginat, ein Naturstoff aus Braunalgen erwies sich in den Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen als besonders geeignet, um die fragilen Inselzellen schonend zu enkapsulieren, ohne ihre Funktionalität zu beeinträchtigen (Darquy et al. 1985, Grohn et al. 1994, Levesque et al. 1992). Alginate sind unverzweigte, anionische Polysaccharidketten, die vorwiegend aus Braunalgen (Phaeophyceae hauptsächlich Laminaria) gewonnen werden.

Je nach Algenart bestehen sie aus unterschiedlichen Quantitäten homopolymerischer Regionen von β -(1 \rightarrow 4) gebundenen D-Mannuronsäuren [M] und α -(1 \rightarrow 4) gebundenen D-Guluronsäuren [G] (Abb.1 + 2) und dazwischen gelagerten alternierenden Regionen.

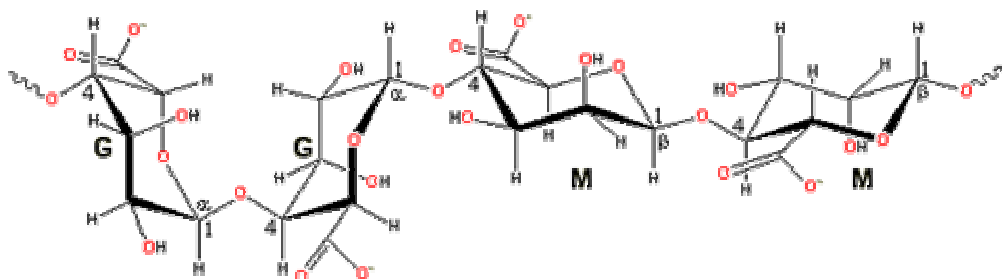


Abb. 1
 Strukturformel der Alginatbausteine: D-Guluronsäure [G] und D-Mannuronsäure [M] (aus www.lsbu.ac.uk/water)

Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit und gelierenden Wirkung werden Alginat seit langem in der Nahrungsmittel- und pharmazeutischen Industrie eingesetzt. Des weiteren besitzen Alginat die Fähigkeit, nach Reaktion mit zwei-, drei- oder multivalenten Kationen, z. B. Calcium oder Barium, Hydrogele zu bilden, die selbst unter physiologischen Bedingungen stabil bleiben. (Zimmermann et. al 2000, Kuo et al. 2001, Schneider et al. 2003).

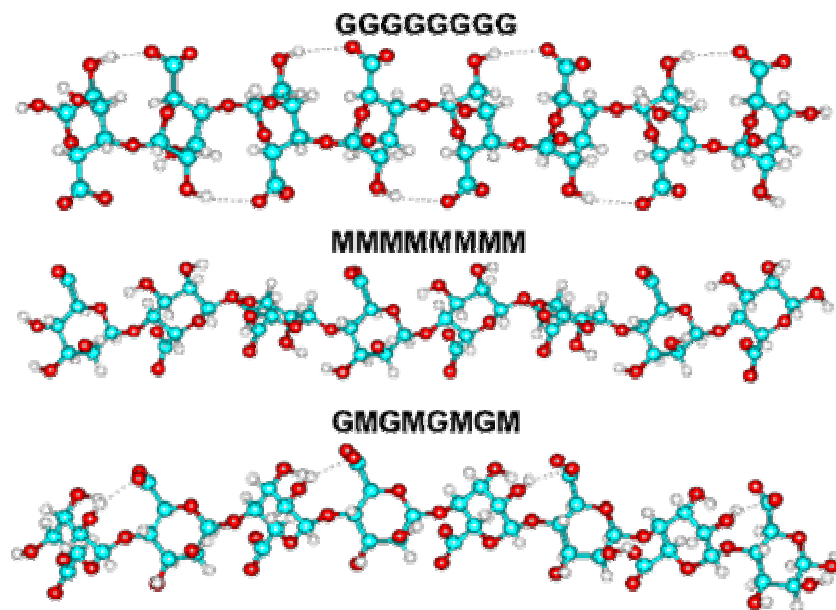


Abb.2

Räumliche Anordnung der D-Mannuronat-; D-Guluronat- und [G]-[M]-Kettenanteile der Alginat (aus www.lsbu.ac.uk/water)

Poly β -(1 \rightarrow 4) verbundene D-Mannuronate formen eine links gedrehte Helix mit schwachen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe (-OH) in Position 3 mit dem Ringsauerstoff. Die α -(1 \rightarrow 4) D-Guluronat-Anteile bilden eine steifere, helikale Kette, die durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxylgruppen und den 2-OH Gruppe des nachfolgenden Moleküls stabilisiert wird (Abb.2). Zwei- oder mehrwertige Kationen können die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen ersetzen und zur Kreuzvernetzung der linearen Polymerketten führen, indem sich ausschließlich die Guluronatkettenanteile mit Hilfe der Kationen in Form einer „egg box“-Konformation untereinander quervernetzen. Die Stärke der Vernetzung der

Alginatepolymere hängt zum Einem vom verwendeten Kation ($Mg^{2+} \ll Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$) und vom M/G-Verhältnis des Alginates ab. Ein höher G-Anteil führt zur einer harten, spröden Kapsel, wohingegen ein hoher M-Anteil eine höhere Elastizität des Alginatbeads zur Folge hat.

Diese Eigenschaften haben dazu geführt, dass Alginate die am häufigsten verwendete Substanz zur Verkapselung von lebenden Zellen und Wirkstoffen ist. Eine Vielzahl der kommerziell erhältlichen Alginat zeigt in Transplantationsuntersuchungen eine reduzierte Biokompatibilität, die sich auf diverse Verunreinigungen zurückführen lassen (Zekorn et al. 1992). Es handelt sich dabei in erster Linie um Proteine, Fettsäuren, Phospholipide, bakterielle Produkte (z. B. Lipopolysaccharide) und sekundäre Produkte wie Polyphenole (Orive et al. 2002). Häufig zeigen derartige Verbindungen immunstimulatorische oder zytotoxische Wirkungen (Tze et al. 1982). Aus diesem Grund lösen sie in vivo eine Fremdkörperreaktion des Empfängerorganismus aus. Die daraus resultierende fibrotische Einschcheidung der implantierten Kapsel führt zu einer eingeschränkten nutritiven Versorgung der enkapsulierten Insel, die schließlich zum völligen Verlust des Transplantates führt (de Vos et al. 2002).

In den letzten Jahren wurde intensiv an der Aufreinigung natürlicher Polymere, unter besonderer Berücksichtigung von Alginaten, gearbeitet (Jork et al. 2000). Durch die Verwendung einer Free-Flow-Elektrophorese konnten kommerzielle Alginat von zytotoxischen und mitogenen Kontaminationen befreit werden und zeigten in vitro und in vivo eine hohe Biokompatibilität (Zimmermann et al. 1992). Dieses Verfahren ermöglicht jedoch nur äußerst geringe Alginatquantitäten aufzureinigen. Berücksichtigt man zusätzlich die hohe Diversität des kommerziellen Ausgangsmaterials sind mit diesem Verfahren keine definierten und reproduzierbaren Alginatpräparationen möglich. Gerade diese Vorgaben wären eine Grundvoraussetzung, um Alginat in der klinischen Transplantation einzusetzen.

Um definierte, reproduzierbare, hoch aufgereinigte Alginatchargen für die klinischen Anwendung im großtechnischen Maßstab herstellen zu können, wurde am

Lehrstuhl für Biotechnologie an der Universität Würzburg ein neues Verfahren entwickelt. Dabei werden im Gegensatz zur Aufreinigung kommerzieller Alginat die Braunalgen als Ausgangsmaterial nicht maschinell gewonnen, sondern frische Braunalgen manuell selektiert und gesammelt. Diese Vorgehensweise schließt Verunreinigungen durch andere Pflanzen, Tiere oder den Menschen aus. Außerdem können selektiv Algen einer bestimmten Gattung und/oder Art gesammelt werden, deren Alginat sich in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden. Schließlich minimiert eine direkt anschließende Trocknung des Algenmaterials die Gefahr mikrobieller Verunreinigungen durch Pilze (Aflatoxine) oder Bakterien (Endotoxine). Dieses vorselektierte und vorgereinigte Ausgangsmaterial ermöglichte erstmals den Verzicht konventioneller, großtechnischer Extraktions- und Fällungsverfahren mittels Phenole, Formaldehyd, Säuren oder Laugen. Die ausschließliche Verwendung von EDTA-Lösung zur Extraktion und Alkohollösungen zur Fällung des Alginates führte zu einem besonders schonenden Verfahren zur Gewinnung der hochmolekularen Ketten des Alginates. Auf diese Art und Weise konnte eine neue hoch reine Alginatklasse, das „ultra hoch viskose“ Alginat (UHVA) dargestellt werden. Dieses Alginat mit der besonders hohen Viskosität zeichnete sich durch beste Biokompatibilität in vitro und in vivo aus (Leinefelder et. al 2003; Jork A et. al 2000; Zimmermann U et al. 2001).

Neben der Reinheit und der Biokompatibilität ist die Stabilität eine entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie mit Hilfe immunisolierter Gewebe oder Zellen. Ein ausschließlich mit zweiwertigen Kationen (Ba^{2+} oder Ca^{2+} -Ionen) vernetzter Bead (vollständig durchpolymerisierte Alginatkugel – ohne äußere Stützmembran) zeigte nach kurzer Zeit ein starkes Quellverhalten. Durch diese starke Wasseraufnahme der Matrix werden immer mehr vernetzte Bereiche wieder aufgespalten und führen somit innerhalb kurzer Zeit zur Instabilisierung bis hin zur vollständigen Wiederverflüssigung des Alginates.

Aus diesem Grund wurden seit Lim und Sun (1980) der vernetzte Alginatbead durch eine äußere Membran stabilisiert, die überwiegend als Dimer aus einem Po-

lykation, meistens Poly-L-Lysin, und Alginat als Polyanion gebildet wurde. Diese als Kapsel bezeichnete Mikrostruktur galt zur Beginn dieser Arbeit als das Standardverfahren zur Immunisation von Inselzellen. In eigenen vorangegangenen Arbeiten konnte eine Weiterentwicklung der Kapsel, die „Multi-Layer Kapsel“ erfolgreich getestet werden. Durch die sukzessive Aufbringung mehrerer Membranlagen konnte eine Kapsel gebildet werden, die eine extrem hohe Stabilität mit einer genau definierten Permeabilität (Cut off) verband (Schneider et al. 2001).

Der heutige Einsatz von Alginat und Verkapselungssystemen in biomedizinischen Anwendungen müssen alle Komponenten genauestens den Kriterien und Auflagen der Amerikanischen Gesellschaft für Testung und Material und der U.S. Food und Drug Administration entsprechen (Dornish et al. 2001). Offensichtlich ist der Einsatz von Polykation, wie z. B. Poly-L-Lysin zur Generierung einer äußeren Membran, auf Grund ihrer geringen Biokompatibilität (Strand et al. 2001), nicht mehr mit den Richtlinien dieser Organisationen vereinbar. Um dem mittel- bis langfristigen Ziel der klinische Realisation der Transplantation mikroenkapsulierter Inseln Rechnung zu tragen, war es von Nöten ein alternatives Verkapselungssystem einzusetzen.

Basierend auf den besonderen Eigenschaften des „ultra hoch viskosen“ Alginats und durch den Einsatz verschiedener Strategien war es dem Lehrstuhl für Biotechnologie an der Universität Würzburg gelungen, eine Langzeitstabilisierung eines reinen Ba^{2+} -Alginatbead ohne äußere Membran zu erzielen. Elektrorotationsuntersuchungen hatten gezeigt, daß innerhalb der Beads das meiste Wasser stark gebunden ist. Das führt zu einer relativ niedrigen elektrischen Leitfähigkeit innerhalb der Kapseln (relativ zum Außenmedium) und einer Dysbalance des (elektro-)chemischen Potentials des Wassers im Verhältnis zum umgebenden Medium (Zimmermann et al. 2001). Thermodynamisch entspricht das der Entwicklung eines kolloid-osmotischen Drucks, der seinerseits zur Wasseraufnahme der Kapsel führt. Werden aber Proteine (z.B. humanes Serum) oder hydrophobe Substanzen

(z.B. Perfluorcarbon) in die Barium Alginatbeads eingeschlossen und erfolgt eine Nachbehandlung der Kapseln mit einer 6 mM Natriumsulfat-Lösung, um freie Ba^{2+} Ionen zu binden, stellt sich wieder ein thermodynamisches Gleichgewicht ein. Dadurch können Schwellen und Desintegration der Alginatbeads verhindert werden (Zimmermann et al. 2000).

1.4 Zielsetzung

Der Einschluß der Langerhans-Insel in einen immunisierenden Alginatbead wird auch als biohybrides oder bioartifizielles Organ bezeichnet und stellt ein neues Konzept der biomedizinischen Therapieentwicklung dar (Zimmermann et al. In: Cell encapsulation technology and therapeutics). Ziel dieses Konzeptes ist es, lebende Zellen oder Wirkstoffe zu therapeutischen Zwecken in den Empfängerorganismus zu transplantieren, ohne den Einsatz einer sonst obligaten immunsuppressiven Therapie. Weiterhin könnte ein sicheres und stabiles Kapselsystem neue Ressourcen insulinproduzierenden Gewebes zur humanen Transplantation, wie xenogene Inseln, gentechnisch veränderte Zellen oder Stammzellen, erschließen. Somit könnte die bisherige Limitierung der Inselzelltransplantation, die begrenzte Verfügbarkeit von Transplantatgewebe, durchbrochen werden. Erste klinische Transplantation von verkapseltes Parathyreoideagewebe zeigten, daß allogenes, mikroenkapsuliertes Gewebe über Monate ohne Immunsuppression erfolgreich transplantiert werden konnte (Hasse et. al 1997).

Die zum Teil mangelnde Reproduzierbarkeit der positiven Ergebnisse zeigt jedoch auch, dass es trotz allen Fortschrittes auf dem Gebiet der Mikroenkapsulierung Hürden gibt, die die Einführung der Technik in die klinische Routine bisher verhinderten. Diese Hürden bestehen im Wesentlichen in der Schwierigkeit der standardisierten Herstellung der Kapseln und dass daher die meisten Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen, nicht standardisierten Alginaten gearbeitet haben (Orive et al. 2003).

Mit dem ultra hoch viskosen Alginat (UHVA) stand in dem Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal eine neue Alginatklasse zur Verfügung, die alle Voraussetzungen für den klinischen Einsatz erfüllte. Dieses Alginat zeichnete sich auf Grund seiner hohen Viskosität, seiner besonderen Reinheit und durch eine extreme Biokompatibilität in vivo aus (Jork et al. 2000; Zimmermann et al. 2001).

Ziel der Arbeit war es, das UHV-Alginat und das neue, innovative „thermodynamisch-stabilisierte“ Verkapselungssystem an die Erfordernisse der Langerhans-Insel anzupassen und zu optimieren. In der anschließenden Inseltransplantationsstudie sollten xenogene, verkapselte Inseln im diabetischen Tiermodell die in vivo Tauglichkeit des Verkapselungssystem unter Beweis stellen.

In der ersten Phase wurden die Verkapselungsparameter hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Vitalität und Funktionalität der enkapsulierten, adulten Ratteninseln hin untersucht und optimiert. Die Vitalität sowie die Inselzellfunktion mikroenkapsulierter Inseln wurden im Rahmen einer in vitro-Kultur bis einer Kulturdauer von bis zu 3 Wochen bestimmt. In der anschließenden Hauptphase wurden die ermittelten, Insel-adaptierten Verkapselungsparameter umgesetzt und in in-vivo-Versuchsreihen bei zwei unterschiedlichen Mausmodellen erprobt. Hierzu wurden das streptozotozin-induzierte Diabetesmodell der Balb/c-Maus dem des autoimmunogenen Diabetes der NOD (non obese diabetic) Maus gegenübergestellt.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere

Alle Tiere die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, stammten aus eigenen Zuchten der zentralen Tierhaltung der Universität Mainz. Die Durchführung der Transplantationen und die anschließende Haltung der transplantierten Mäuse erfolgten in Räumen der zentralen Tierhaltung. Alle tierexperimentellen Versuche wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsantrages [Bezirksregierung Rheinland-Pfalz (Aktenzeichen 177-07/991-4)] durchgeführt. Zur Gewinnung der Langerhans'schen Inseln wurden etwa 6-8 Wochen alte Sprague-Dawley Ratten (CD-Rats) mit einem Körpergewicht von 250-350g als Organspender herangezogen. Als Transplantatempfänger hingegen wurden zwei unterschiedliche diabetische Mausmodelle eingesetzt. Als erstes Mausmodell diente ein Streptozotocin-induzierter Diabetes bei der Balb/c-Maus, wohingegen der Diabetes des zweiten Modells, der NOD-Maus (non obese diabetic mouse), durch autoimmunogene Genese ähnlich dem humanen Typ 1 Diabetes entsteht (Atkinson et al. 2002).

2.2 Inselzellisolation und –aufreinigung und Zellkultur

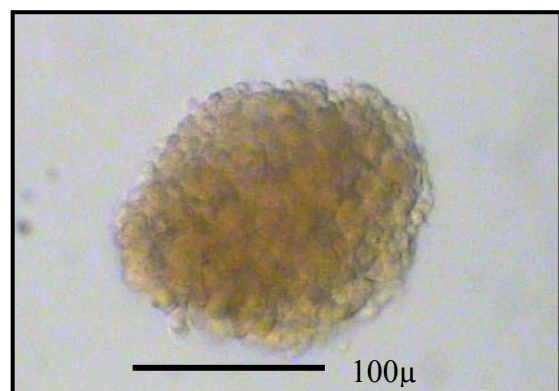
Die Isolation und Aufreinigung von adulten Ratteninseln erfolgte nach einem im Labor etablierten Protokoll (Schneider et al. 2003). Hierzu wurden pro Isolationsdurchgang 3 bis 4 CD-Ratten mit einer intraperitonealen Pentobarbitalinjektion (Narcoren®) [60 mg/kg] narkotisiert. Die Eröffnung des Abdomens der Ratten erfolgte in Rückenlage durch einen Mittelbauchschnitt entlang der Linea alba bis zum Xyphoid und zwei Flankenschnitte. Nach der Entfernung des Xyphoids wird das Tier mit dem Kopf zum Operateur hin positioniert. Eine sterile Kompresse wurde über den Rippenbogen gelegt und, unter leichtem Druck beider Daumen, die Leber darüber luxiert und mit Hilfe der Zeigefinger nach kranial hochgeklappt und durch Einschlagen in die Kompresse in dieser Lage fixiert. Entlang des Duo-

denums wurde nun, unter Zuhilfenahme zweier chirurgischer Pinzetten, das distale Ende des Ductus choledochus aufgesucht, mit einer kleinen, gebogenen Pinzette möglichst nahe an der Darmwand unterfahren und mit einem Seidenfaden abgebunden. Das proximale Ende des Ductus choledochus wurde an der Leberpforte aufgesucht und an der Einmündung des letzten Gallengangs aus der Leber mit Hilfe einer Mikroschere inzidiert. Durch diese Öffnung wurde der feine Venenkatheter eingebracht und einige Millimeter Richtung Pankreas vorgeschoben und anschließend mit einer Pinzette oder kleinen Klemme abgedichtet. Danach wurde eine 20 ml-Einwegspritze mit einer sterilen, eiskalten 15ml Kollagenaselösung (**0,25mg/ml Kollagenase Serva PanPlus, Heidelberg, Germany; 15ml HBSS, Gibco BRL, Long Island, NY, USA**) an den Venenkatheter konnektiert. Unter Tupferabdeckung wurde die Aorta abdominalis im Bereich der Bifurkation durchtrennt. Der Magen wurde mit einer Pinzette gefasst und nun ebenfalls kranial umgeschlagen. Das Pankreas wurde jetzt durch langsame gleichmäßige Injektion der eisgekühlten 12 ml Kollagenaselösung distendiert. Nach vollständiger Distension wurde das Pankreas mit einer scharfen Schere zügig herauspräpariert. Der kraniale Pankreasrand wurde vom Magen gelöst. Vom Pylorus ausgehend streifte man stumpf das Organ von Dünn- und Dickdarm. Das Pankreas wurde mit einer Pinzette gefasst und die Verbindungen zur abdominellen Hinterwand und Milz durchtrennt. Das distendierte Organ wurde nun vorsichtig in ein 15ml konisches Zentrifugenröhrchen (**Falcon®, 50ml Polypropylene Conical Tube**) eingebracht und auf Eis zwischengelagert bis alle Pankreata der übrigen Spendertiere explantiert wurden. Danach wurden die Falconröhrchen in ein 37°C warmes Schüttelwasserbad mit einer Schüttelfrequenz von 80/min gelegt. Nach der Erwärmungsphase wurde das Organ 15 Sekunden auf dem Vortexer bei höchster Stufe (2500/ min) geschüttelt und anschließend wieder ins Wasserbad zurückgestellt für weitere 10 Minuten. Zu den Zeitpunkten 2, 6, 8 und 10 Minuten wurden weitere Vortexschritte durchgeführt. Nach Abschluß des letzten Vortexschrittes wird der Verdau durch Umschütten der Digestionssuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (**Falcon®, 50ml Polypropylene Conical Tube**), mit 15ml eiskalter Hanks (-)-Lösung (**HBSS w/o Ca & Mg, Sigma, Heidelberg**) plus 10% FCS (**Sigma, Heidelberg**) und Auffüllen des Röhrchen mit dieser Lösung bis zur 40 ml Marke, gestoppt. Damit wurde der Verdau des Gewebes be-

endet. Danach zentrifugierte man nach kräftigem Schütteln 3 Minuten bei 1200 U/min (**Megafuge 1.0, Heraeus Instruments**). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet erneut mit kalter Hanks (-)-Lösung resuspendiert und über einem sterilen 500 μ -Filtereinsatz abgefiltert um größere nicht verdaute Gewebefragmente und das Gefäßsystem des Pankreas von der Digestionssuspensionslösung abzutrennen. Die gefilterte Suspensionslösung wurde wieder bis zur 40ml Marke aufgefüllt und bei 700 U/min für 3 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand komplett abgesaugt.

Die Aufreinigung des Digestats erfolgte standardgemäß mit einer Dichtezentrifugation, wo sich die Inselzellen auf Grund ihrer geringeren, spezifischen Dichte von dem exokrinen, pankreatischen Restgewebe abtrennen lassen. Dazu wurde das Pellet mit 10ml Dichtegradient 1,090g/l (**Biocoll Seperating Solution, Biochrom KG, Germany**) resuspendiert. 10ml Dichtegradient 1,077g/l (**Biocoll Seperating Solution, Biochrom KG, Germany**) sowie 5ml Dichtegradient 1,038g/l wurden aufgeschichtet. Bei 2700U/min wurde der Dichtegradient 12 Minuten lang zentrifugiert. Um die Phasen des Gradienten aufrecht zu erhalten, musste eine langsame Beschleunigung erfolgen und die Zentrifugenbremse ausgeschaltet sein. Nach der Zentrifugation wurden die Inseln, die sich in der Zwischenphase von 1,038g/l und 1,077 g/l befanden, mit einer Kanüle aufgesaugt und in ein 50ml Zentrifugenröhrchen mit 25ml Hanks (-) Lsg überführt. Zur Entfernung des Dichtegradienten wurden die separierten Inseln danach noch zweimal mit kalter Hanks (-) Lösung gewaschen und jeweils 3 Minuten lang zentrifugiert [1. Zentrifugation bei 1200 U/min; 2. Zentrifugation bei 700 U/min]. Der Überstand wurde jeweils abgesaugt und verworfen.

Abb. 3
isolierte und aufgereinigte Ratten-Insel. Lichtmikroskopische Aufnahme (100x)



Das Inselzellpellet wurde zum Schluß mit RPMI 1640-Medium (**Spezialanfertigung: Trockenmedium RPMI 1640 mit 1g/l D-Glucose + 25 mM HEPES; Biochrom KG, Berlin, Germany**) plus 10% FCS resuspendiert und bis zur 7,5ml Marke aufgefüllt. Die Inseln wurden auf eine 6-Well Platte (**Falcon[®], 6-Well culture plate**) verteilt, so dass sich in jedem Well 1,25ml Medium mit Inseln (Abb. 3) befanden.

Die Inseln wurden bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und in einem atmosphärisch begasten Inkubator kultiviert. Das RPMI 1640-Kulturmedium enthielt zusätzlich 10% FCS (**Sigma, Heidelberg**), 0,2g/l Glutamax, 200U/ml Penicillin, 200µg/ml Streptomycin (**Gibco BRL, Paisley, Scotland, GB**) und 50µg/ml Ciprofloxacin (**Bayer, Leverkusen, Germany**).

Während der Zellkulturphase wurde alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierzu wurde das Kulturmedium mit den Inseln aus der Kulturplatte aufgesaugt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Wells der Kulturplatte nochmals mit frischem Medium gespült und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen hinein pipettiert. Danach wurden die Zellen für 3 Minuten bei 700 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Zellen 7,5 ml frischem Medium resuspendiert und in eine neue 6 Well-Kulturplatte ausplattiert.

2.3 Mikroenkapsulierung von Langerhans-Inseln

2.3.1 Alginat

Das ultrahochviskose Alginat (UHVA) wurde vom Lehrstuhl für Biotechnologie, Universität Würzburg als gebrauchsfertige, sterile Alginate-Lösung mit dem benötigten humanen Serum Albumin (HSA) als Proteinzusatz geliefert. Dieses Alginat wurde aus ausgesuchten, frischen Algen einer speziellen Laminaria Art (*Laminaria pallida*) aus der Lüderitzbuch in Südwestafrika gewonnen und wies einen 30%igen Guluronsäureanteil auf. Weiterhin zeichnete sich dieses Alginat durch seine sehr hohe Reinheit aus (Jork et al. 2000; Zimmermann et al. 2001; Leinfelder et al. 2003). Bei der Mikroenkapsulierung von Inseln mit Hilfe des Verfahrens zur Herstellung des thermodynamisch stabilisierten Bariumalginatbeads wurden 0,7%ige Alginate-Lösungen mit 1, 3 und 6% HSA-Zusatz verwendet. Bei der „Crystal-Gun“-Vernetzung mussten auf Grund der stärkeren Vernetzung die Alginatkonzentration auf 0,65% mit 1, 3 und 6% HSA-Zusatz verringert werden.

2.3.2 Gel Permeations Chromographie (GPC)

In Kooperation mit dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Mainz wurde die molekulare Gewichtsverteilung der Alginate durch eine Hochdruck Gel Permeations Chromographie ermittelt. Dieses Verfahren ist eine weit verbreitete Methode die molekulare Gewichtsverteilung eines hochmolekularen Polymers zu bestimmen (Berth et al. 1992). Das System war ausgestattet mit einer Gynkotec Pumpe (P580 A, Gynkotec, Germering, Deutschland) und drei seriell geschalteten Säulen [HEMA (Bio) 40, (Molekulargewichtsbereich $<20\text{kg mol}^{-1}$); HEMA (Bio) 1.000, (Molekulargewichtsbereich $20\text{kg}-3.000\text{kg mol}^{-1}$); SUPREMA 3.000, (Molekulargewichtsbereich $20\text{kg}-10.000\text{kg mol}^{-1}$) [Polymer Standard Service (PSS) Mainz, Deutschland] gefolgt von einem Differentialrefraktometer (RI-71 Gynkotec, Germering, Deutschland). Als Elutionslösung wurde eine wässrige 0,05 M

NaHCO₃/ 0,1 M NaNO₃ Lösung verwendet. 50µl der zu untersuchenden Alginatlösung wurden in das System eingespritzt und die Flussrate auf 1,0ml min⁻¹ eingestellt. Zur Untersuchung der unterschiedlichen Alginatproben waren weder die Kuhn-Mark-Houwink-Konstante in der Literatur bekannt, noch Alginat-Kalibrations-Standards kommerziell frei erhältlich. Aus diesem Grund wurden 14 Dextran-Standards mit einem Molekulargewichtsbereich von 0,18- 277kg mol⁻¹ (Polymer Standard Service (PSS) Mainz, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe der WINGPC® Software (PSS Mainz, Deutschland) wurden anschließend die mittlere Anzahl (Mn) und mittlere Molekulargewicht errechnet.

2.3.3 Thermodynamisch stabilisierter Bariumalginatbead

Die besonderen Eigenschaften dieser neuen Alginatklasse erforderten speziell modifizierte Standardapparaturen zur Kapselgenerierung. Aus diesem Grund wurde eine speziell angepasste Apparatur des Lehrstuhls für Biotechnologie der Universität Würzburg zur Herstellung der Alginattropfen verwendet (Abb.4). Diese Apparatur arbeitet nach dem Prinzip des luftbetriebenen Tropfengenerators (Abb.5).



Abb. 4

Abgebildet ist die hier verwendete Mikroenkapsulierungsanlage, konzipiert vom Lehrstuhl für Biotechnologie, Universität Würzburg.

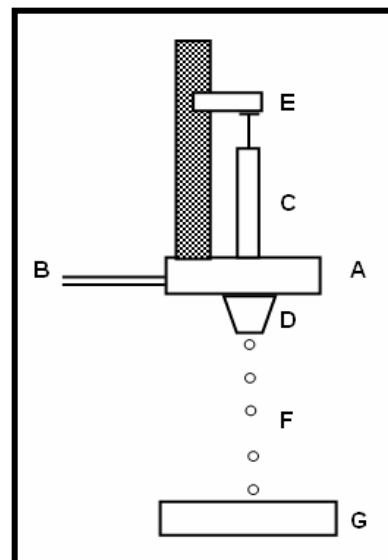


Abb. 5

Abbildung des schematischen Aufbaus der Mikroenkapsulierungsanlage:

Durch Kanal **5A** und durch eine Vorrichtung **5B** kann die Luftmenge stufenlos reguliert werden. Gleichzeitig ist der Stempel **5E** über einen Elektromotor mit stufenlos regulierbarer Geschwindigkeit nach oben oder unten zu bewegen. Durch die Bewegung des Stempels kann aus der eingespannten Spritze **5C (Injekt-F, 1 ml, B. Braun, Melsungen)** die Alginatlösung in den Düse **5D** gedrückt werden. Durch den Luftstrom, der das untere Ende des gemeinsamen Kanals umströmt, werden aus der nach unten fließenden Alginatlösung Tropfen abgerissen, deren Größe abhängig ist von der Geschwindigkeit des Stempels, d.h. der Geschwindigkeit des Alginatstromes durch Düse **5D** und der Menge an Luft, die durch den Kanal **5A** strömt.

Die abgerissenen Tropfen fallen nun 7 cm tief in eine Petrischale **5G**, die mit 25 ml einer 20 mM BaCl₂ Lösung plus der korrespondierenden HSA-Konzentration der Alginatlösung gefüllt ist. Das Alginat wird durch die Bariumionen vernetzt. Alle beschriebenen Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, um ein steriles Arbeiten zu gewährleisten.

Die Mikroenkapsulierung von Inselzellen wurde folgendermaßen durchgeführt:

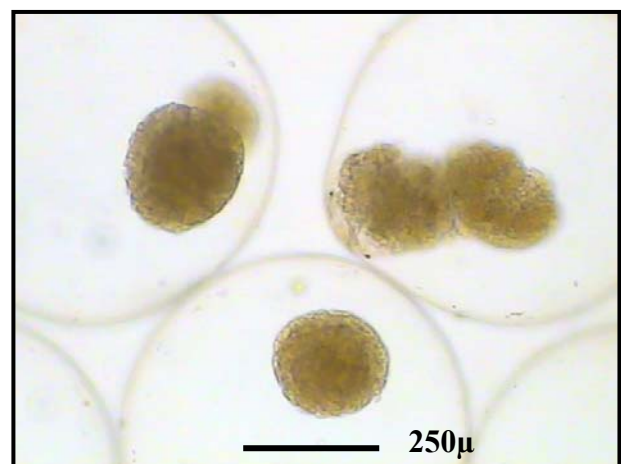
Die Inseln wurden nach der Inselisolation und Aufreinigung zur Regeneration in eine Übernachtskultur überführt. Am nächsten Tag wurden die Inseln aus der Kulturplatte mit dem Medium in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 3min bei 700 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 2mm Flüssigkeitshöhe über dem Pellet abgesaugt, um das Pellet mit dieser Restflüssigkeit zu resuspendieren. Zu dieser Inselsuspension wurde dann 600µl Alginat/HSA-Lösung hinzupipettiert, um durch kurzes Vortexen eine homogene Insel-Alginat-Suspension herzustellen. Nach einem kurzen Anzentrifugieren wurde die Inselsuspension mit einer 1ml Einwegspritze (**Injekt-F, 1 ml, B. Braun, Melsungen**) aufgenommen und dann 45 Minuten zur Entgasung aufrecht aufgestellt.

Anschließend wurde die Einwegspritze in die Vertropfungsapparatur eingespannt und der für das Alginat und die gewünschte Kapselgröße erforderliche Vortrieb des Stempels und das Volumen des Luftstromes eingestellt. Nach der Inbetriebnahme der Vertropfungsanlage wurden kontinuierlich die Tropfenbildung und -größe kontrolliert, um ein gleichmäßiges Vertropfen der Inselalginatsuspension sicherzustellen.

Die gebildeten Alginattropfen fielen in eine BaCl-Fällbad, wo die Tropfen 15 Minuten lang zu einer stabilen Alginat-Gelkugel (500-650 μ) auspolymerisierten. Danach wurden die Alginatbeads mit dem Fällbad in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 Minuten sedimentieren lassen. Nach Absaugen und Verwerfen des Überstandes wurden die Beads zweimal mit je 15ml physiologischer Kochsalzlösung (**B.Braun, Melsungen, Deutschland**) plus des entsprechenden HSA-Zusatzes gewaschen und anschließend einer 30 minütigen Natriumsulfatbehandlung (6mM) unterzogen. Diese Prozedur diente dazu, alle nicht gebundenen Ba²⁺-Ionen des Alginatbeads, durch eine irreversible Fällung zu BaSO₄, osmotisch zu inaktivieren und somit das Quellen des Alginatbeads zu unterbinden. Nach weiteren zwei Waschschritten mit der physiologischer Kochsalzlösung plus HSA-Zusatz, wurden die Alginatbeads in 7,5 ml Medium plus HSA-Zusatz aufgenommen und in eine 6 Wellplatten ausplattiert und analog zu den nicht-verkapselten Inselzellen kultiviert (Abb.5b).

Abb. 5b

Mikroenkapsulierte Ratten-Inseln; Lichtmikroskopische Aufnahme (40x)



2.3.4 Crystal Gun Verkapselung

Parallel zur der Adaptierung der thermodynamisch stabilisierten Alginatbeads an die Langerhans-Inseln wurden federführend durch den Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität in Würzburg, die Dynamik der Vernetzung von Alginattropfen im Fällbad untersucht.

Wie Untersuchungen mit MNR und konfokaler-Lasermikroskopie eindeutig belegten, führte die konventionelle Vernetzung des Alginattropfens im Fällbad zu einem inhomogenen Vernetzungsmuster, welches sich auf die Randbereiche des Alginatbeads beschränkte. Diese ungleichmäßige Verteilung von auspolymerisierten und flüssigen Kapselbereichen können besonders unter den variablen Bedingungen einer in vivo Umgebung, z.B. der peritonealen Leibeshöhle, zu intrakapsulären Spannungen führen. Als Folge können leicht Mikrorisse oder größere Beschädigungen der Alginatbeads auftreten und die Immunseparation des enkapsulierten Gewebes gefährden.

Das Crystal Gun Verfahren stellte eine Weiterentwicklung der thermodynamisch stabilisierten Bariumalginatbeads dar.

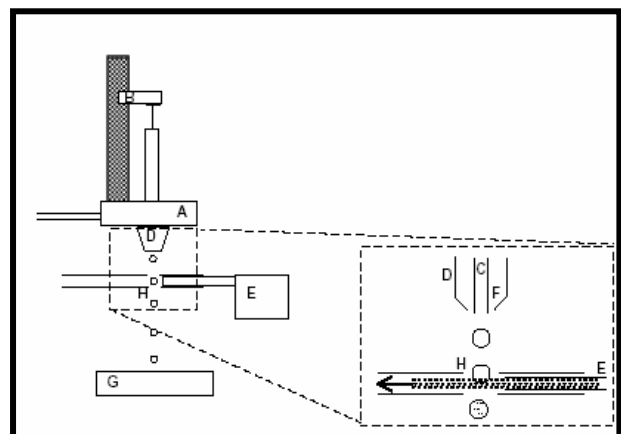


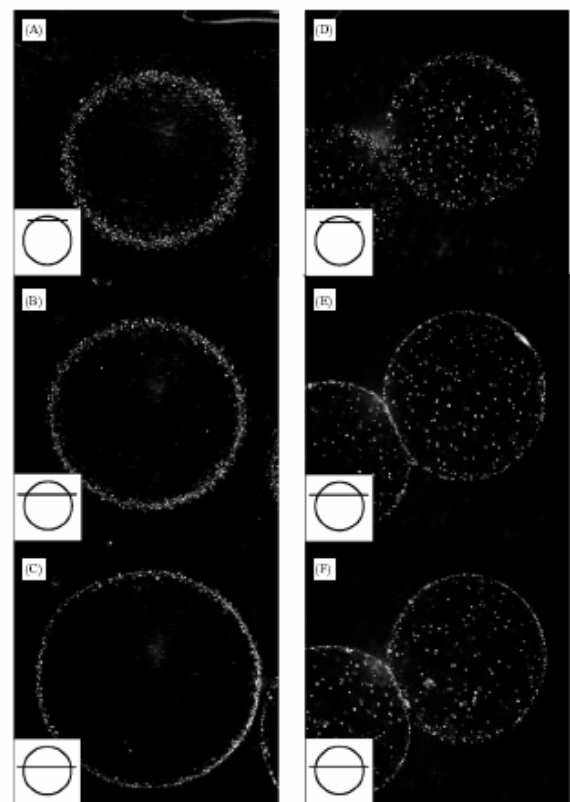
Abb. 6

Abbildung des schematischen Aufbaus der Crystal Gun Verkapselungsanlage: (aus Zimmermann et al.; *Biomaterials* 2003)

Die in 2.3.3 beschriebene Standard-Verkapselungsanlage wurde für das Crystal Gun Verfahren um eine Air-Flow-Einheit **6E** erweitert, die über Druckluft einen kontinuierlichen Bariumchlorid-Salzkristallstrahl generiert und über ein Leitblech **6H** auf die herabfallenden Alginattropfen gelenkt wurde. Damit wurde eine homogene Verteilung von Barium-Ionen im Alginatbead sichergestellt, bevor dieser im Fällbad **6G** vollständig vernetzt.

Abb. 7

Konfokale-Lasermikroskopie Aufnahmen: (A-C) konventionelle Vernetzung; (D-F) Crystal Gun vernetzte Alginatkapsel. Die, durch die Natriumsulfat-Behandlung gebildete, Bariumsulfatkristalle werden in diesen Aufnahmen als weiße Punkte dargestellt. Bei der konventionellen Vernetzung (A-C) polymerisieren zuerst die peripheren Regionen der Alginatkugel. Diese vernetzten Außenschichten verhindern das tiefere Eindringen von Ba-Ionen und unterbinden somit das homogene Vernetzen des Kerns der Alginatkugeln. Wohingegen das Crystal Gun Verfahren eine gleichmäßige Ba-Ionen Verteilung im Bead sicherstellt, wie die homogen verteilten Ba_2SO_4 -Kristalle in den Bildern 7D-F belegen. (aus Zimmermann et al.; *Biomaterials* 2003)



Die einzelnen Schritte zur Crystal Gun Verkapselung entsprechen denen wie unter Punkt 2.3.3 beschrieben.

2.4 Methoden zur Vitalitäts- und Funktionalitätsmessung

2.4.1 Vitalitätstest

Die Vitalität der Inseln wurde mit der dualen Fluoresceindiacetat/Propidiumjodid Färbemethode bestimmt (London et. al 1990; Gröhn et al. 1994). Bei diesem Verfahren ist es möglich durch den gleichzeitigen Einsatz zweier Fluoreszenzfarbstoffe lebende und tote Zellen differenziert anzufärben.

Die lebenden Zellen werden durch Fluoresceindiacetat (FDA) spezifisch angefärbt. FDA wird in die Zellen aufgenommen und dort von unspezifischen Esterasen durch Hydrolyse zu Fluorescein und Acetat aufgespalten. Im Gegensatz zu FDA kann Fluorescein die intakte Zellmembran mit mehr passieren und werden somit in vitalen Zellen angereichert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (**Axiovert 35, XR-X3000, Zeiss, Oberkochen, Germany**) erscheint das Zytosol dieser Zellen in einer Grünfluoreszenz. Das Fluoresceindiacetat-Pulver (**Sigma, Deisenhofen, D, F-7378**) wird in DMSO mit einer Konzentration von 1mg/ml gelöst. Diese Stammlösung wird der zu untersuchenden Zellsuspension in einer 1:100 fachen Verdünnung zugesetzt.

Tote, nekrotische Zellen wurden mit Propidiumjodid (PI) spezifisch angefärbt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass PI nur durch die Membrandefekte nekrotischer Zellen eindringen kann, um dann im Zellkern in die DNA Moleküle zu interskalieren. Diese Zellkerne sind dann im Fluoreszenzmikroskop bei 596 nm ganz deutlich rot/orange fluoreszierend zu erkennen. Zur Herstellung der Propidiumjodid Stammlösung (**Sigma, Deisenhofen, D**) wurden 1mg/ml in PBS gelöst und ebenfalls mit einer 1:100 Verdünnung eingesetzt.

Zur Durchführung des Live/Dead-Testes wurden etwa 10 repräsentative, verkapselte bzw. unverkapselte Inseln in ein Well einer Kulturplatte überführt. Im ersten Färbeschritt wurde in 1:100facher Verdünnung die FDA-Stammlösung hinzup-

pettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit der Propidiumjodid Stammlösung gegengefärbt und im UV-Invertmikroskop die Vitalität bestimmt. Hierzu wurde die Vitalität jeder Insel auf Grund des Verhältnisses der toten zu lebenden Zellen ermittelt. Auf Grund der dreidimensionalen Kugelform der Langerhans'schen Inseln musste hierbei jede Inseln durchfokussiert werden, um die genaue Anzahl PI-positiver Zellkerne zu erfassen, da PI-positive Zellkern außerhalb der fokussierten Ebene die anderen Zellen durch ihre starke, konzentrierte Fluoreszenz überstrahlten.

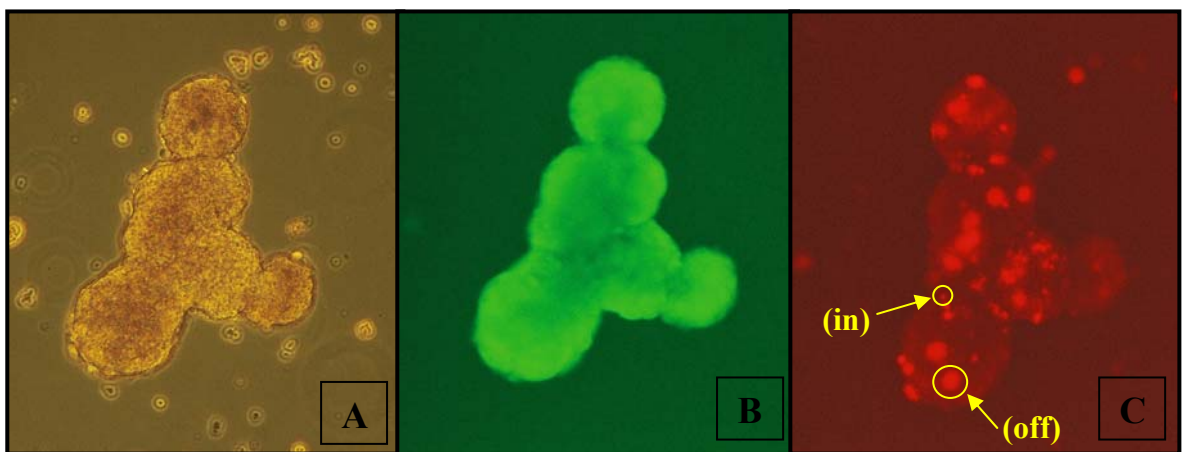


Abb. 8

Vitalitätsbestimmung mittels dualer Fluoresceindiacetat/Propidiumjodid Färbemethode Methode:

[A] Lichtmikroskopische Aufnahme mehrerer zusammenliegender Inseln

[B] Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Triplefilter) gleichzeitige Darstellung: FDA => Grünfluoreszenz des Zytosols vitaler Zellen plus PJ => rot/orange Färbung nekrotischer Zellkerne (hier z.T. durch FDA überlagert!)

[C] Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (PJ-Filter) selektive Darstellung der PJ-positiven Zellkerne nekrotischer Zellen. [!!! Cave: kleine rote Punkte => ZK in der Focusebene (in); große leuchtende Fläche => PJ positiver ZK außerhalb der Focusebene (off)]

Bewertung: nur vereinzelt PJ positive Kerne; eindeutig FDA positiv => Vitalität: 95-98%

2.4.2 Funktionalitätsprüfung von Ratteninseln

Zur Messung der Insulinsekretionskapazität, d.h. der Funktionalität der Inseln, wurde ein statischer Glukosestimulationstest durchgeführt.

Zur Durchführung des Stimulationstestes wurden in eine 24 Well-Kulturplatte (**BD Falcon**) mit sechs Membran-Kultureinsätze mit 12 μ Porengröße (**Millicell® PIXP 012 50; Millipore**) bestückt. Über die Kultureinsätze wurden die Wells jeweils mit 600 μ l Medium befüllt. In jedes Well wurde nun 6 verkapselte bzw. unverkapselte Inseln hinein pipettiert. In der 1. Kulturphase sollte die basale, nicht stimulierte Insulinfreisetzung durch ein normoglykämischen Kulturmedium mit 100mg/dl D-Glucose bestimmt werden. Hierzu wurden die Kultureinsätze mit den Inseln vom 1. Well in das zweite, noch leere Well umgesetzt und mit dem normalen Kulturmedium mit 100mg/dl D-Glucose [600 μ l] befüllt und für 1,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Nach Ablauf dieser Kulturphase wurde das Kulturmedium komplett abgesaugt und in Eppendorf-Caps bei -20°C bis zur Insulinbestimmung zwischengelagert.

Die Einsätze mit den Inseln wurden dann in das 3. Well überführt und mit 600 μ l des Stimulationsmediums [Standardmedium aber mit **300mg/dl** D-Glucose] befüllt und für weitere 1,5 Stunden kultiviert. In dieser 2. Phase des Stimulationstestes sollte die stimulierte Insulinfreisetzung der Inseln auf einem hyperglykämischen Glucosereiz erfasst werden. Nach Abschluß der 2. 1,5 stündigen Kulturphase wurde auch hier das Kulturmedium vollständig abgenommen und bis zur Insulinbestimmung bei -20°C gelagert.

Die Proben der Stimulationstests wurden dann mit dem High Range Rat Insulin Elisa Kit (**Firma Mercodia, Uppsala, Schweden**) auf ihren Insulingehalt bestimmt. Dazu wurden auf einer 96-Well Platte, die mit monoklonalen Antiinsulinantikörpern von Mäusen beschichtet war jeweils 10 μ l der Proben pro Well als Dublette

pipettiert. Dazu wurden 50µl einer Konjugatlösung (Peroxidase gebundener monoklonaler Antiinsulinantikörper der Maus) pipettiert. Auf einem Schüttler wurden die Proben jetzt bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden in jedes Well 350µm einer Waschlösung pipettiert und wieder abgesaugt, dieser Vorgang wurde 5 mal wiederholt und die 96-Wellplatte dann vorsichtig umgedreht auf saugfähiges Papier gelegt. 200µm des Peroxidasesubstrates wurden in jedes Well pipettiert und 15 Minuten lang inkubiert. Zum Abschluß wurden 50µm der Stopplösung in jedes Well pipettiert, 5 Sekunden geschüttelt und die 96-Wellplatte bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA READER gemessen.

Die im Test-Kit befindlichen Standards [0; 3; 7,5; 30; 75 und 150 ng/ml] wurden zur Erstellung einer Standardkurve mit auf die 96-Well Platte aufgetragen.

Mit Hilfe der Software des ELISA READERS wurde aus diesen Daten zuerst die Standardkurve errechnet, mit deren Hilfe die gemessenen Extinktionswerte der Einzelproben automatisch in den Insulingehalt der Proben in ng/600µl/1,5h umgesetzt wurden.

Der Stimulationsindex wird als Quotient der stimulierten Insulinsekretion zur basalen, nicht stimulierten Insulinfreisetzung bestimmt.

$$[\text{Stimulationsindex}] = \frac{[\text{stimulierte Insulinsekretion}]}{[\text{basale Insulinsekretion}]}$$

Dieser Stimulationsindex ist ein Maß der Funktion, d.h. der spezifischen, physiologischen Leistungsfähigkeit der untersuchten Inseln.

2.5 In vitro und in vivo Testung des Kapselsystems

2.5.1 In vitro Serum Zytotoxizitäts-Assay

Im Rahmen dieses in-vitro-Versuchs sollten unterschiedliche Kapselvarianten ihre Wirksamkeit zum Schutz des enkapsulierten Gewebes vor einer xenogenen Komplementaktivierung unter Beweis stellen (nach Gröhn et al. 1994). Adulte Ratteninseln wurden gemäß dem oben beschriebenen Protokoll isoliert, aufgereinigt und verkapselt. Nach einer Übernachtskultur wurden die verkapselten Inseln in zwei Gruppen aufgeteilt und mit einem 50% xenogenem Serumzusatz in einer 18 stündigen Expositionsdauer unter Standardbedingungen kultiviert.

Das xenogene Serum wurde durch Zentrifugation [3000 U/min für 15min] einer humanen Blutprobe [20ml] und Abnahme der Serumfraktion gewonnen. Die eine Hälfte des Serums wurde durch eine 20 minütige Erwärmung auf 65°C hitzeinaktiviert. Somit wurde eine Gruppe der enkapsulierten Inseln mit dem unbehandelten, aktiven xenogenen Serum und die Zweite mit dem hitze-inaktivierten Serum inkubiert. Als weitere Kontrollgruppen dienten unverkapselte Inseln, die analog zu den Verkapselten, die beschriebenen Übernachtsinkubationen durchliefen. Zur Quantifizierung der, durch das aktive, xenogene Serum, induzierten Effekte wurde nach der Inkubation, wie unter 3.5 beschrieben, die Inselvitalität und –funktionalität bestimmt.

2.3.5 In vivo-Testung von Leerkapseln

In einem Vorversuch wurden UHVA-Leerkapseln mit 1% HSA-Zusatz in Balb/c bzw. NOD-Tiere transplantiert, um die Biokompatibilität des HSA-Zusatzes in den beiden Tiermodellen zu beurteilen. Nach einer Transplantationsperiode von 14 Tagen wurden die transplantierten Leerkapseln durch eine Spülung der Leibeshöhle entfernt und unter Lichtmikroskop bezüglich einer induzierten Fremdkörperreaktion, u.a. fibrotische Einscheidung, hin untersucht.

Um eine ausreichende Stabilität des thermodynamisch stabilisierten Ba-Alginatbead in der peritonealen Leibeshöhle sicherzustellen, muß die Konzentration des HSA-Zusatzes den kolloidosmotischen Druck des Transplantationsortes auszugleichen. Zur Ermittlung der benötigten HSA-Konzentration wurden Leerkapseln mit 0,7% UHV-Alginat plus HSA-Zusatz von 1, 3 und 6% hergestellt. Die Verkapselung erfolgte nach der unter 2.4.3 beschriebenen Prozedur. Die Alginatbeads wurden über Nacht in physiologischer Kochsalzlösung plus entsprechenden HSA-Zusatz gelagert. Vor der Transplantation wurde zuerst die Kapselgröße mit Hilfe eines Invertmikroskops (**Wilovert, Hundt, Wezlar Deutschland**) mit Messokular bestimmt. Anschließend wurden die Alginatbeads dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung **ohne** HSA-Zusatz gespült, um die Leerkapseln in Flüssigkeit ohne xenogene Proteinzusätze transplantieren zu können.

Die Leerkapseln wurden dann in 2ml Einwegspritzen aufgenommen und anschließend das Volumen der zu transplantierenden Alginatbeads bestimmt. Die zu transplantierenden Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion einer 2-fachen Narkose (**Ketanest®, 65mg/kg KG, Pfizer Karlsruhe, Deutschland** und **Rompun®, 13mg/kg KG, Bayer Leverkusen, Deutschland**) sediert. Die Bauchseite wurde mit 70% Alkohol eingesprüht und desinfiziert. Anschließend wurde die Haut im Bauchbereich mit einer Pinzette angehoben und mit einer Braunüle (**Vasofix®, 20G B.Braun,**

Melsungen, Deutschland) die peritoneale Leibeshöhle perkutan punktiert. Nach erfolgreicher Punktion wurde die Hohnadel entfernt, so dass über die Plastikkanüle die resuspendierten Alginatkapseln injiziert werden konnten. Danach wurde die Plastikkanüle entfernt.

Nach Ablauf des Transplantationszeitraumes von 21 Tagen wurden die transplantierten Tiere abgetötet und der Peritonealraum eröffnet. Als erstes wurden mit einer Pipette Bauchraumflüssigkeit mit einzelnen Kapseln aufgesaugt und auf einen Objektträger zur Größenbestimmung pipettiert. Danach wurden, durch eine mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführten Spülung, alle verbliebenen Alginatbeads aus dem Peritonealraum herausgespült. Anschließend wurden die wiedergewonnenen Beads dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und schließlich über eine Mikroskop-CDD-Camera digital fotografiert. Zum Abschluss wurde das Alginatvolumen der wiedergewonnenen Kapseln bestimmt.

2.6 Transplantationsuntersuchungen

2.6.1 Medikamentöse Diabetesinduktion

Weibliche Balb/c Mäuse (**Zentrale Tierhaltung der Universität Mainz**), 6-8 Wochen alt und mit einem Körpergewicht von 18 – 20 g wurden als ein exogen induziertes Diabetesmodell benutzt. Bei ihnen wurde der Diabetes durch Injektion von 250 mg/kg KG Streptozotocin (**Sigma, St. Louis, MO**), gelöst in Zitratpuffer, induziert. Als diabetische Tiere wurden diejenigen betrachtet, die nach der Injektion 6 Tage lang eine konstante Hyperglykämie entwickelten ($>350\text{mg/dl}$). Die Blutglukosespiegel wurden jeweils um 10:00 Uhr morgens bestimmt, indem die Schwanzvene punktiert wurde und die Blutprobe mittels Glukometer (**Accutrend sensor, Roche Diagnostics, Deutschland**) gemessen wurde.

2.6.2 Autoimmunogene Diabetesmodell

Bei der NOD-Maus (**Zentrale Tierhaltung der Universität Mainz**) entwickelte sich der Diabetes autoimmunogen, ähnlich dem humanen Diabetes Typ 1. Bei etwa 70% der weiblichen und etwa 30% der männlichen Tiere tritt die diabetische Erkrankung mit zunehmenden Alter spontan auf. Weibliche NOD-Mäuse ab einem Alter von 8 Wochen wurden regelmäßig bezüglich ihres Blutzuckers hin untersucht. Auch hier war eine 6 Tage lange konstante Hyperglykämie ($>350\text{mg/dl}$) das Einschlusskriterium zur Transplantation.

2.6.3 Transplantation von verkapselten Inseln

Adulte Ratteninseln wurden gemäß den oben beschriebenen Protokollen isoliert, aufgereinigt und verkapselt. Nach einer Übernachtskultur wurden 10 verkapselte Inseln mit einer Pipette aus der 6-Wellplatte gepickt und mittels der Propidiumiodid / FDA-Färbung auf ihre Vitalität hin überprüft. Um eine ausreichende standardisierte Vitalität der zu transplantierenden Inseln sicherzustellen, wurden zur Transplantation nur enkapsulierte Inselpräparationen verwendet, deren Vitalitätsprüfung eine Mindestvitalität von >80% ergab.

Anschließend wurden die enkapsulierten Inseln ebenfalls dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um das nicht im Bead gebundene xenogene HSA aus der Kapselpräparation zu entfernen. Die verkapselten Inseln wurden dann in einer 2ml Einwegspritze aufgenommen. Analog zu Punkt 2.6.2 wurden die zu transplantierenden Mäuse ebenfalls durch eine intraperitoneale Injektion einer 2-fachen Narkose (**Ketanest®**, 65mg/kg KG, Pfizer Karlsruhe, Deutschland und **Rompun®**, 13mg/kg KG, Bayer Leverkusen, Deutschland) sediert. Die Bauchseite wurde mit 70% Alkohol eingesprüht und desinfiziert. Anschließend wurde die Haut im Bauchbereich mit einer Pinzette angehoben, um mit einer Braunüle (**Vasofix®**, 20G B.Braun, Melsungen, Deutschland) die peritoneale Leibeshöhle perkutan punktieren zu können. Nach erfolgreicher Punktion wurde die Hohnadel entfernt, so dass über die Plastikkanüle die resuspendierten, verkapselten Inselzellen injiziert werden konnten. Danach wurde die Plastikkanüle entfernt.

Als Kontrollgruppe dienten diabetische Tiere, die ausschließlich unverkapselte Inseln appliziert bekamen.

2.6.4 „Non-fasting“ Blutzuckerkontrolle

Der Erfolg der Transplantation wurde primär an Hand einer regelmäßigen „non fasting“ Blutzuckerkontrolle ermittelt. Hierzu wurden zweimal pro Woche, hauptsächlich Montag und Freitag um die gleiche Tageszeit (10:00 bis 11:00 Uhr) der Blutglukosespiegel, durch Punktion der Schwanzvene und Messung der Glukosekonzentration mittels Glukometer (**Accutrend sensor, Roche Diagnostics, Deutschland**), bestimmt. Als physiologische Blutzuckerwerte wurden Werte $<200\text{mg/dl}$ definiert. Bei zwei aufeinander folgenden Blutzuckerwerten von $> 350\text{mg/dl}$ war von einem totalen Verlust des Transplantates auszugehen.

2.6.5 Intraperitonealer Glucose Toleranz Test (iP-GTT)

Zusätzlich zu den normalen Blutzuckerbestimmungen wurden zu den Zeiten 3, 9, 16 Wochen nach Transplantation ein intraperitonealer Glucose-Toleranz-Test (iP-GTT) durchgeführt. Hierzu wurden den Versuchstieren am Vortag das Futter entzogen. Nach einer Fastenperiode von 17 Stunden wurden den Versuchstieren eine definierte Glucosemenge [1mg/kg KG] (**5% Glucoseinfusionslösung, B.Braun**) intraperitoneal appliziert. Zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 60, 120 Minuten nach Glukoseinjektion, wurde der Blutzucker der Versuchstiere durch Punktion der Schwanzvene mittels Glukometer bestimmt. Die entsprechenden Blutzuckerlaufkurven sind wesentlich sensitiver für die Funktion des mikroenkapsulierten Transplantates in vivo als die einfache tägliche BZ-Bestimmung. Hier wird nach einem definierten Glucosereiz die genaue zeitliche Glucose-Clearance durch das Transplantat dokumentiert. Der direkte Vergleich der BZ-Verlaufskurven mit normoglykämischen (gesunden) und diabetischen Kontrollen gaben weiterhin Auskunft, in wie weit die Insulinantwort des Transplantates der physiologischen Norm entsprach.

2.7 Statistische Testverfahren

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Verwendete Test zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse waren der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-U-Test. Die Ergebnisse waren höchstsignifikant, wenn der p-Wert $< 0,001$, hochsignifikant bei $p < 0,01$ und einfach signifikant bei $p < 0,05$. Diese Tests wurden mit der Sigma Plot- bzw. Sigma Stat Software (SPSS Inc. Chicago, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Ultra hoch viskoses Alginat (UHVA)

3.1.1 Molekulargewichtsverteilung

Wie unter Punkt 1.1.3 und 2.3.2 beschrieben, stellt das zur Transplantation verwendete UHVA eine ganz neue Alginatklasse dar. Die Viskosität einer UHV Alginatlösung von 0.1% (w/v) in destilliertem Wasser betrug 20 – 30 mPas im Gegensatz zu einer Viskosität von nur 1-5 mPas einer 0.1% (w/v) Alginatlösung eines kommerziell erhältlichen Alginats.(MVG, Pronova, Norwegen ca. 5mPas) (Zimmermann U et. al 2001). Eine Gel Permeations Chromographie (GPC) sollte Aufschluss über die Molekulargewichtsverteilung des UHVAs gegenüber den kommerziell erhältlichen mittel viskosen und niederviskosen Alginaten geben.

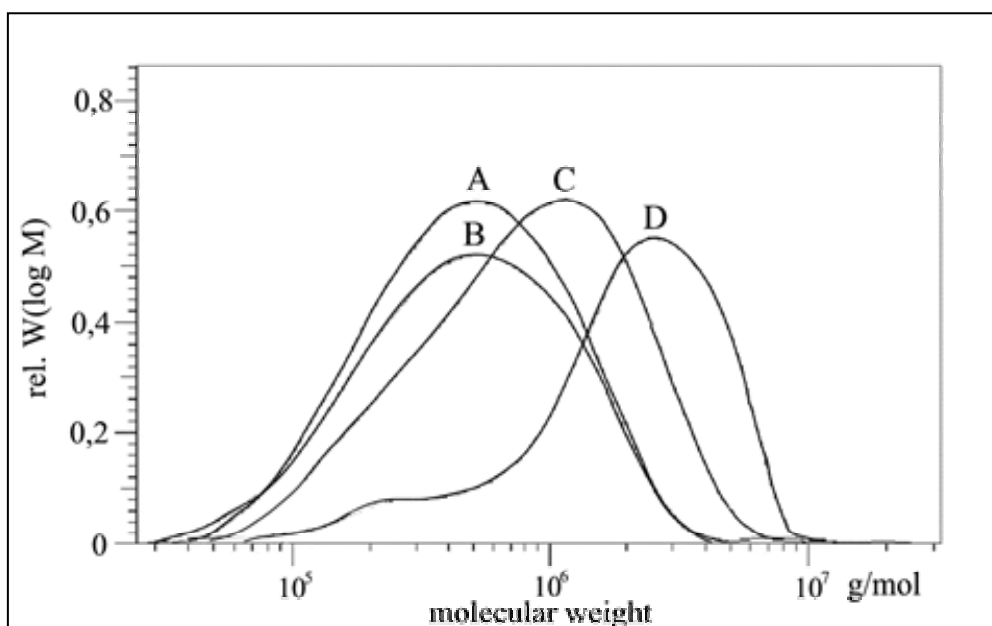


Abb. 9

Repräsentative Molekulargewichtsverteilung unterschiedlicher Alginate bestimmt durch eine Gel-Permeation-Chromatographie (GPC). (A) & (B) niederviskoses Alginat [LVA]. (C) Kommerziell erhältliches, aufgereinigtes medium viskoses Alginat (MVG, Pronova, Norwegen). (D) Ultra-hoch viskoses Alginat [UHVA] (Lehrstuhl f. Biotechnologie, Würzburg) (aus P.J. Feilen, et al.; *Diabet. Res. Clin Prac. Suppl.1*, Vol. 50, Sept. 2000)

In Rahmen einer Gel-Permeation-Chromatographie (GPC) wurden unterschiedliche Alginatproben auf die Verteilung ihrer Kettenlängen hin untersucht. Alginat **9A & B** sind niederviskose Alginatproben (LVA). Sie wurden aus dem kommerziell erhältlichen mittelviskosen Alginat **9C** (MVG, Pronova, Norwegen), durch Hitze induzierte, randomisierte Strangbrüche hergestellt. **9D** war das UHVA, welches zur Mikroenkapsulierung der Langerhansschen Inseln verwendet wurde.

Tab. 1

Relatives, mittleres Molekulargewicht der Alginatproben (zu den Dextranstandards) ermittelt durch GPC-Analyse (aus P.J. Feilen, et al.; Diabet. Res. Clin Prac. Suppl.1, Vol. 50, Sept. 2000)

Alginat	Relatives, mittleres Molekulargewicht [kDa]
LVA [A & B]	720
MVG [C]	1.560
UHVA [D]	2.640

Die GPC-Analyse der Alginatproben zeigte, dass das UHVA einen deutlich höheren Anteil an langen Alginatketten besitzt als das mittel- und die niederviskosen Alginatproben. Hieraus resultiert auch der hohe Wert des relativen mittleren molekulargewicht des UHVAs mit 2.640 kDa vs. 1.560kDa (MVG) und 720 kDa (LVA).

An Hand dieser Daten lässt sich die ultrahohe Viskosität des UHVAs auf das hohe Molekulargewicht seiner Molekülketten zurückführen. Die technische Voraussetzung zur Gewinnung solcher langen Molekülketten bildete das neuartige Verfahren zur Gewinnung und Aufreinigung des Alginates (Zimmermann et al. 2001), welches die artifiziellen Brüche der Alginatketten der konventionellen Verfahren vermied.

3.2 Thermodynamisch stabilisierter Ba-Alginatbead

3.2.1 Alginatkonzentration

Die kommerziellen mittelviskosen Alginat, wie das MVG von Pronova, Norwegen, wurden als Alginatlösungen von mindestens 1,5% zur Immunisation von Inselzellen verwendet (Schneider et. al 2003b). Die besonderen physikalischen Eigenschaften des UHVAs machten eine Reduktion der Arbeitskonzentration der Alginatlösung notwendig. Auf der einen Seite musste die Viskosität durch die Reduktion der Alginatlösung verringert werden, um überhaupt apparativ eine Vertropfung des Alginates zu gewährleisten. Auf der anderen Seite musste der Grad der Vernetzung über die Alginatkonzentration so einzustellen werden, dass der Cut Off des umgebenden Alginatbeads noch eine ausreichende nutritive Versorgung des enkapsulierten Gewebes ermöglicht. Vitalität und Funktionalität mikroenkapsulierter Inseln beruhen direkt auf einer ausreichenden Permeabilität der Mikrokapself (Kühlreiber et al. 1999, Hunkeler et al. 2001).

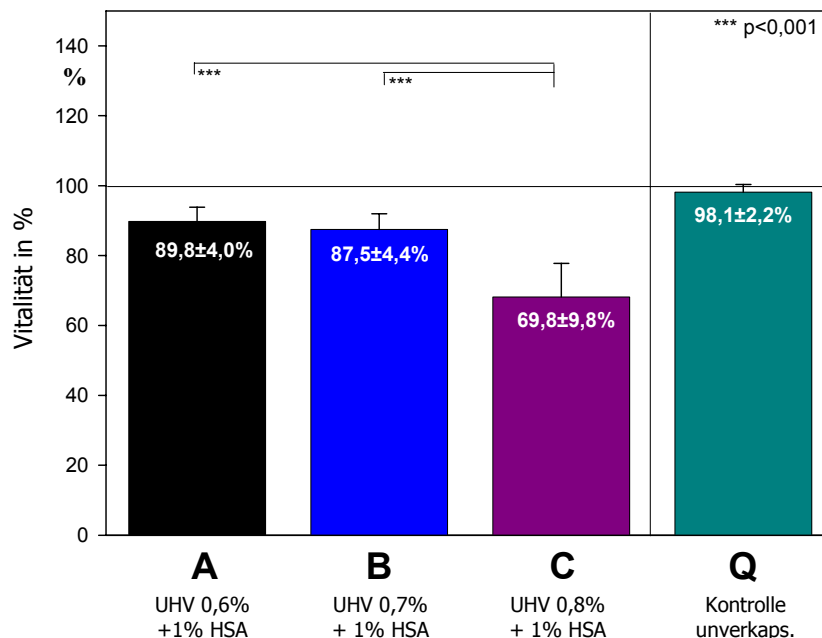


Abb. 10

Vitalität mikroenkapsulierter Inseln nach Verkapselung mit variabler UHV-Alginatkonzentration 0,6%; 0,7% und 0,8% und konstantem HSA-Zusatz (1%) ermittelt nach einer Übernachtskultur. (Angaben = Mittelwert \pm SD) bei (n=24) Einzelwerten je Gruppe.

In einem Vorversuch wurden Inseln mit 3 unterschiedlichen UHV-Alginatkonzentrationen (Abb.10: **A** 0,6%; **B** 0,7%; **C** 0,8%) mit jeweils 1% HSA Zusatz enkapsuliert und nach einer Übernachtskultur auf ihre Vitalität hin untersucht. Als Qualitätskontrolle dienten unverkapselte Inseln gleicher Isolation. Die Verkapselung von Inseln führt immer zur einer höchstsignifikanten Beeinträchtigung der Vitalität (**A-C** vs. **Q**).

Die Versuchsgruppe **A + B** zeigten mit $\pm 10\%$ einen moderaten Vitalitätsverlust, wohingegen die Erhöhung der Alginatkonzentration auf 0,8% eine weitere höchstsignifikante Reduktion der Vitalität auf $69,8 \pm 9,8\%$ verursachte. Die Verteilung der PJ-positiven nekrotischen Zellen war bei den Versuchsgruppen **A + B** eher randständig oder homogen über die Inseln verteilt. Im Gegensatz dazu waren bei der Gruppe **C** deutlich Zentralnekrosen ausgebildet, die ein klares Indiz für eine nutritive Unterversorgung des enkapsulierten Gewebes darstellen.

3.2.2 Stabilität

In Rahmen der engen Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biotechnologie wurden in Würzburg die Stabilitätsuntersuchungen mittels vor Ort etablierten in vitro-Quellversuchen von Leerkapseln (Hillgärtner et al. 1999) durchgeführt.

Der Zusatz von 1% HSA zur Alginatlösung konnte bei konventionell vernetzten Mikrokapseln das übliche Schwellverhalten ganz oder zum größten Teil unterbinden. Mit den niedrigen Alginatkonzentrationen 0,42% und 0,49% und 1% HSA-Zusatz blieben zwar einige Kapseln über 80 Tage stabil, jedoch wurden zum Teil drastische Gewichtschwankungen (Schwellen) beobachtet, die zur Desintegration eines Teil der Kapseln schon nach 6 Tagen führte. Eine ausreichende Stabilität der Mikrokapsel war erst mit einer Alginatkonzentration von 0,6% und 0,7% zu erzielen. Hier konnten nach einer 80 tägigen Inkubationsdauer noch über 90% intakte Alginatkapseln wiedergefunden werden. Eine weitere Erhöhung der HSA-Konzentration bis auf 6% brachte keine weitere Verbesserung der Stabilität (Daten aus S Schneider, P. Feilen et. al. 2003 J. Microencapsulation).

3.2.3 HSA-Zusatz

Um den Einfluss des HSA-Zusatzes auf die enkapsulierten Inseln zu studieren, wurden Inseln mit einer konstanten Alginatekonzentration 0,6% und variabler HSA-Konzentration (1, 3 und 6%) verkapselt und nach einer Übernachtskultur auf Vitalität und Funktionalität hin untersucht.

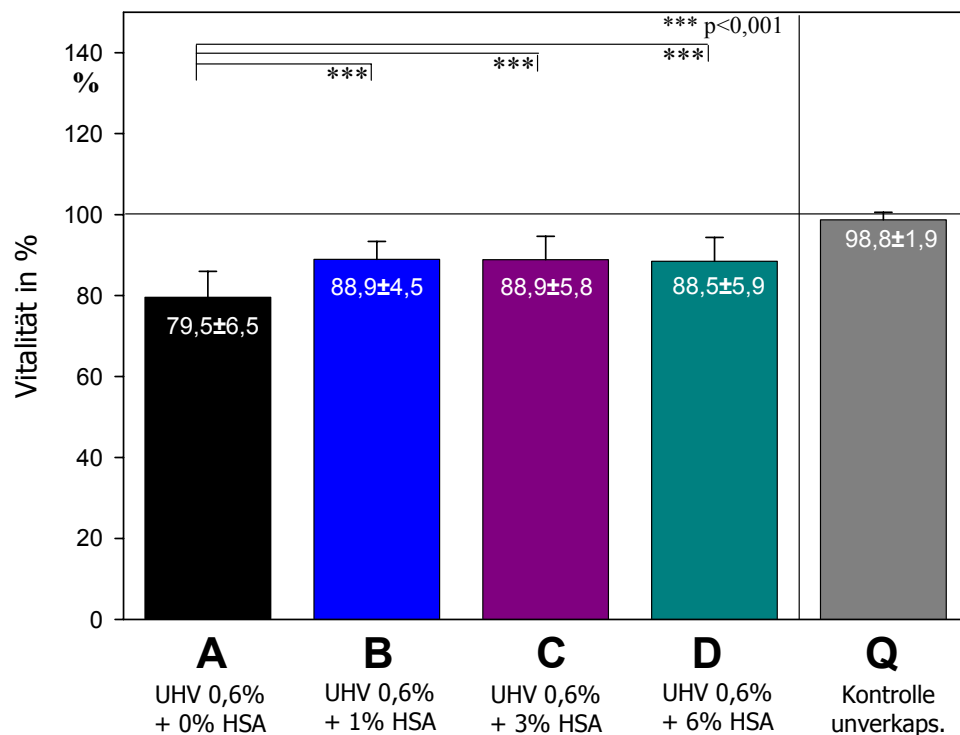


Abb. 11a

Vitalität mikroenkapsulierter Inseln nach Verkapselung mit konstanter ultrahochviskoser Alginatekonzentration (0,6%) und variabler Konzentration des HSA-Zusatzes (0%; 1%; 3% und 6%) ermittelt nach einer Übernachtskultur. (Angaben = Mittelwert ±SD) bei (n=46) Einzelwerten je Gruppe

Aus der Graphik 11a geht eindeutig hervor, dass die Mikroenkapsulierung von Inseln generell mit einer höchstsignifikanten Reduktion ($p < 0,001$) [A-D vs. Q] der Vitalität einhergeht, wie die unverkapselte Kontrollgruppe (11a Q) mit $\approx 99\%$ Vitalität anzeigt. Die Verkapselung der Inseln ohne HSA-Zusatz (11a A) führte zur einer Reduktion der Vitalität unter 80%. Durch den Zusatz von HSA (11a B-D) hingegen konnte jedoch eine höchstsignifikante ($p < 0,001$) Steigerung der Vitalität der enkapsulierten Inseln auf einen mittleren Vitalitätswert von etwa 89% zu der Kontrollgruppe (11a A) erzielt werden. Einen zusätzlichen Effekt durch eine ansteigende HSA-Konzentration bis auf 6% (11a B->D) konnte dagegen nicht beobachtet werden.

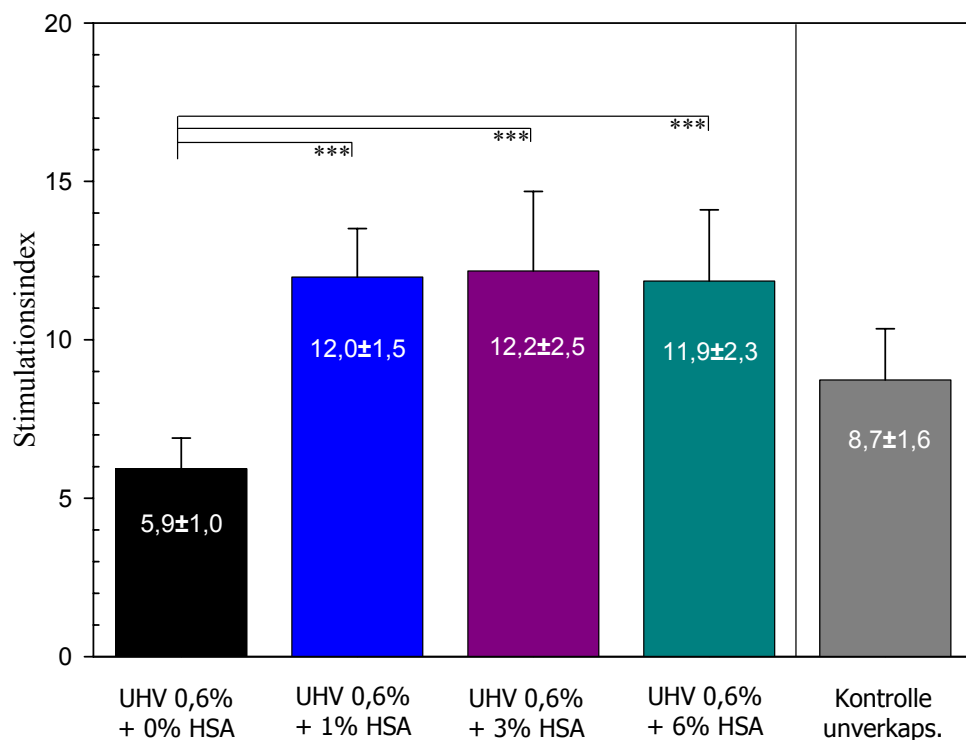


Abb. 11b

Funktionalität mikroenkapsulierter Inseln nach Verkapselung mit konstanter Konzentration (0,6%) des ultrahochviskosen Alginates und variabler Konzentration des HSA-Zusatzes (0%; 1%; 3% und 6%) ermittelt nach einer Übernachtskultur. (Angaben = Mittelwert \pm SD) bei (n=12) Einzelwerten je Gruppe. *** $p < 0,001$

Analog zu den Vitalitätsdaten (Abb. 11a) zeigten auch hier die Gruppen mit HSA-Zusatz (11b **B-D**) eine höchstsignifikante Steigerung des Stimulationsindex um etwa 100% von $5,9 \pm 1,0$ der Kontrollgruppe (11b **A**) ohne HSA-Zusatzes auf etwa 12,0 bei den Versuchsgruppen mit HSA-Zusatz (11b **B-D**). Auch hier sind bei den Gruppen (11b **B-D**) keine signifikanten Konzentrationseffekte des HSA beim Stimulationsindex zu beobachten.

Tab. 2

Basale und stimulierte Insulinsekretion isolierter Inseln nach Verkapselung mit 0,6% ultrahochviskosem Alginat und variablen humanem Serum Albumin-Zusatz (0%; 1%; 3% und 6%) und einer Übernachtskultur, (Angaben = Mittelwert \pm SD) mit (n=12) (**a/b**) $p < 0,05$

		Basale Insulinsekretion [ng/Insel/1,5Std]	Stimulierte Insulinsekretion [ng/Insel/1,5Std]
A	UHV 0,6% 0% HSA	0,8\pm0,2	4,7\pm1,5
B	UHV 0,6% 1% HSA	0,7\pm0,2 (a)	8,3\pm1,3 (b)
C	UHV 0,6% 3%HSA	0,9\pm0,3	10,2\pm2,8
D	UHV 0,6% 6% HSA	1,2\pm0,6 (a)	13,7\pm7,2 (b)
Q	unverkaps.	1,6\pm0,8	14,6\pm9,7

In der Tabelle 2 sind die gemessenen Insulinwerte für die basale und stimulierte Insulinsekretion des in Abb. 11b dargestellten Funktionstests aufgetragen. Im Vergleich zur unverkapselten Insel schränkt der Alginatbead allgemein die an das umgebende Kulturmedium freigesetzte Insulinmenge ein (**Q** vs. **A-D**).

Durch den HSA-Zusatz konnte eine deutliche Zunahme der stimulierten Insulinfreisetzung beobachtet werden (**A** vs. **B-D**)

Mit Zunahme des HSA-Zusatzes stieg sowohl die basale als auch die stimulierte Insulinfreisetzung an (**B**=>**D**). Zwischen den Versuchsgruppen **B** (1% HSA) und **D** (6% HSA) wurde dieser Anstieg signifikant ($p < 0,05$) bei fast gleichem Stimulationsindex (Abb.11b).

Diese Einflüsse des HSA-Zusatzes auf die enkapsulierten Inseln konnten bei weiteren UHVA-Konzentrationen (0,42 %-0,7%) in gleicher Weise beobachtet werden.

3.3 Immunprotektion gegen xenogene Komplementaktivierung

Wie unter 3.4.1 beschrieben sollten die immunisierenden Eigenschaften des thermodynamischen stabilisierten Kapselsystems mittels eines xenogenem Serum-Zytotoxizitätsassays untersucht werden.

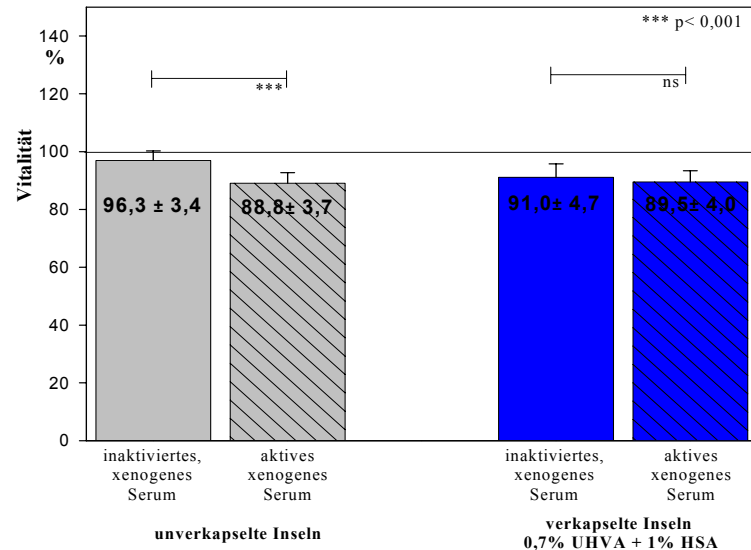


Abb. 12a

Vitalität unverkapselter und verkapselter Inseln in Prozent ermittelt durch FDA/PJ-Färbung nach 18stündiger Inkubation in aktiven und hitzeinaktivierten xenogenem Serum. (Angaben = Mittelwert ±SD) bei (n=36) Einzelproben pro Gruppe. *** p<0,001

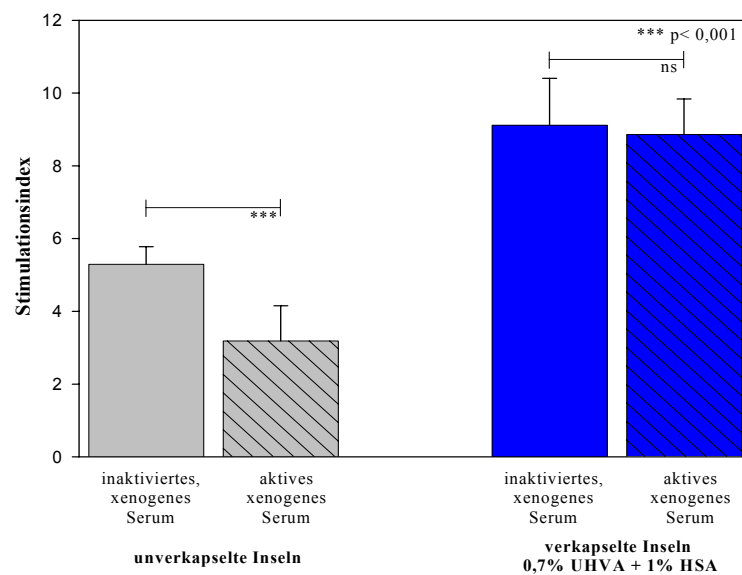


Abb. 12b

Funktionalität unverkapselter und verkapselter Inseln nach 18stündiger Inkubation in aktiven und hitzeinaktivierten xenogenem Serum ermittelt mit Hilfe des Glucose-Stimulationstests. (Angaben = Mittelwert ±SD) bei (n=10) Einzelproben pro Gruppe. *** p<0,001

Die unverkapselten Inseln, die dem aktiven, xenogenem Serum ausgesetzt waren, erfuhren eine höchstsignifikante Reduktion ($p < 0,001$) sowohl der Vitalität ($88,8\% \pm 3,7\%$ vs. $96,3\% \pm 3,4\%$) als auch der Funktionalität (Stimulationsindex: $3,2 \pm 1,0$ vs. $5,3 \pm 0,5$), im Vergleich zu der internen Kontrollegruppe mit dem hitzeinaktiviertem Serum. Diese Effekte beruhen vermutlich auf einer, Komplement vermittelten, Zell-Lyse (Gröhn et al. 1994; Heald et al. 1994). Die Mikroenkapsulierung führte zu einem Schutz der eingeschlossenen Inseln vor dem aktiven, xenogenem Serum. Hier zeigten die mikroenkapsulierten Inseln weder in der Vitalitätsuntersuchung (Abb. 12a $89,5\% \pm 4,0\%$ vs. $91,0\% \pm 4,7\%$) noch hinsichtlich der Funktion (Stimulationsindex $8,9 \pm 1,0$ vs. $9,1 \pm 1,3$) signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe.

3.4 In vivo-Testung von Leerkapseln

Wenn man die bisher beschriebenen Vitalitäts- und Funktionalitätsdaten mit den am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg gewonnenen Daten zur in vitro Kapselstabilität korrelierte, so eröffnete eine Konzentration von 0,7% des ultrahochviskosen Alginats den besten Kompromiss zur Mikroenkapsulierung von Inseln. Mit dieser Alginatkonzentration war die Bildung eines hinreichend stabilen Alginatbeads bei gleichzeitiger ausreichenden nutritiven Versorgung des enkapsulierten Gewebes möglich. Um die Stabilität der Alginatkapsel auch in vivo zu gewähren musste die optimale Konzentration des HSA-Zusatzes bestimmt werden, der den kolloidosmotischen Druck des intraperitonealen Raumes kompensieren konnte. Leerkapseln mit 0,7% UHVA mit drei unterschiedlichen HSA-Konzentrationen (1%, 3% & 6%) wurden gemäß 2.6.2 hergestellt und für 3 Wochen in gesunde Balb/c-Mäuse transplantiert. Die Größenveränderung (Schrumpfung oder Quellung) der Leerkapseln in der Leibeshöhle und die Wiederfindungsrate der transplantierten Kapseln sollten Auskunft über die optimale Konzentration des zugesetzten Proteins geben. Mit ansteigenden HSA-Gehalt der Leerkapseln

verringerte sich die Größendifferenz der Leerkapseln (Abb.13a: $88,2\% \pm 0,6\%$ vs. $91,5\% \pm 1,6\%$ vs. $97,6\% \pm 5,4\%$) vor zu nach der Transplantation.

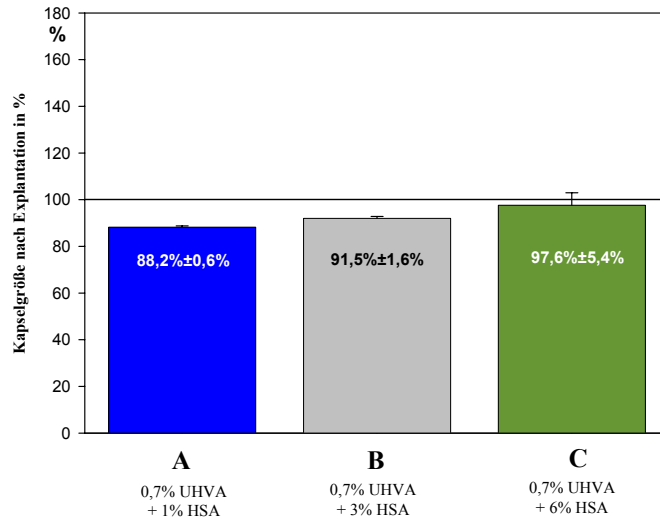


Abb. 13a

Größe der transplantierten Leerkapseln (0,7% ultrahochviskoses Alginat mit variablen HSA-Zusätzen (1%, 3% und 6%)) in % nach Explantation zum Abschluß einer 14tägigen Transplantationsdauer. (100% = mittlere Kapselgröße vor Transplantation) (Angaben = Mittelwert \pm SD) bei (n=36) Einzelproben pro Gruppe.

Jedoch erreichten die Größenveränderungen bei keiner der drei Leerkapselgruppen die Signifikanzgrenze von $p < 0,05$. Wie die Abb. 13b darstellt lagen die Mediane der Kapselgrößen vor und nach der Transplantation bei allen drei untersuchten Gruppen auf fast gleichem Niveau.

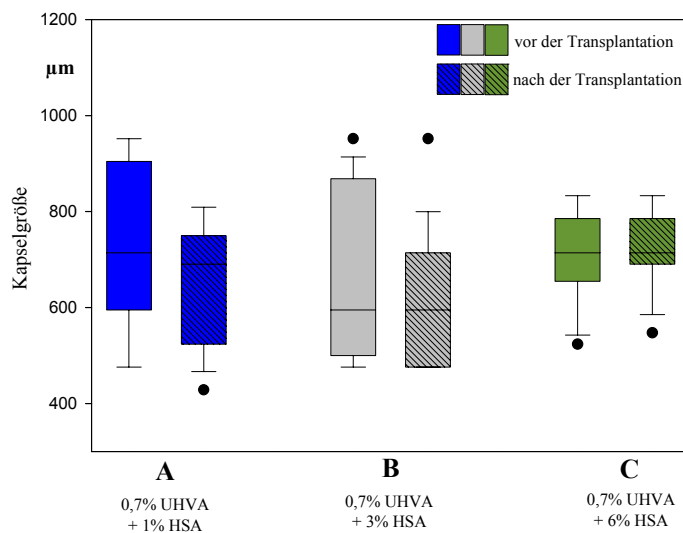


Abb. 13b

Darstellung der Varianzen (5%-95%) der Kapselgrößen und ihren Mediane vor der Transplantation und nach der Explantation der Kapseln. (n=36) Einzelproben pro Gruppe

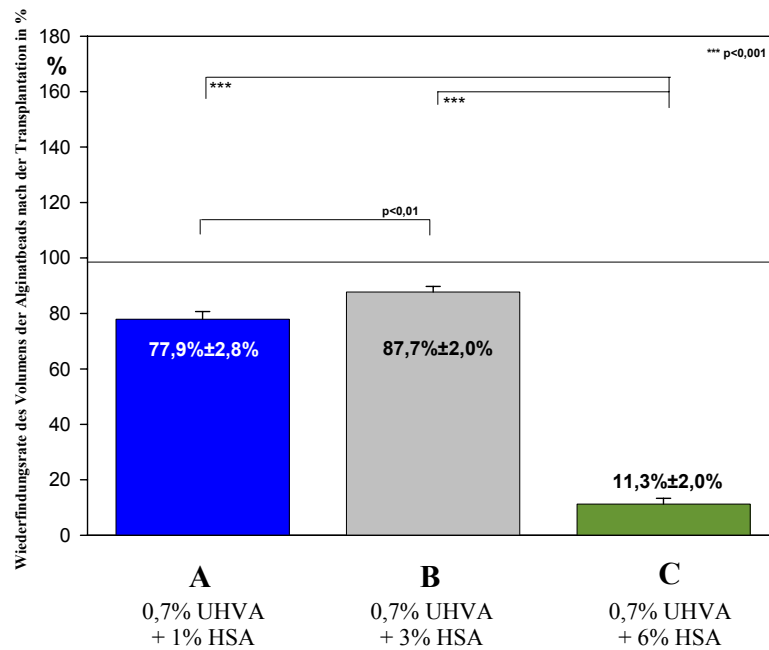


Abb. 13c

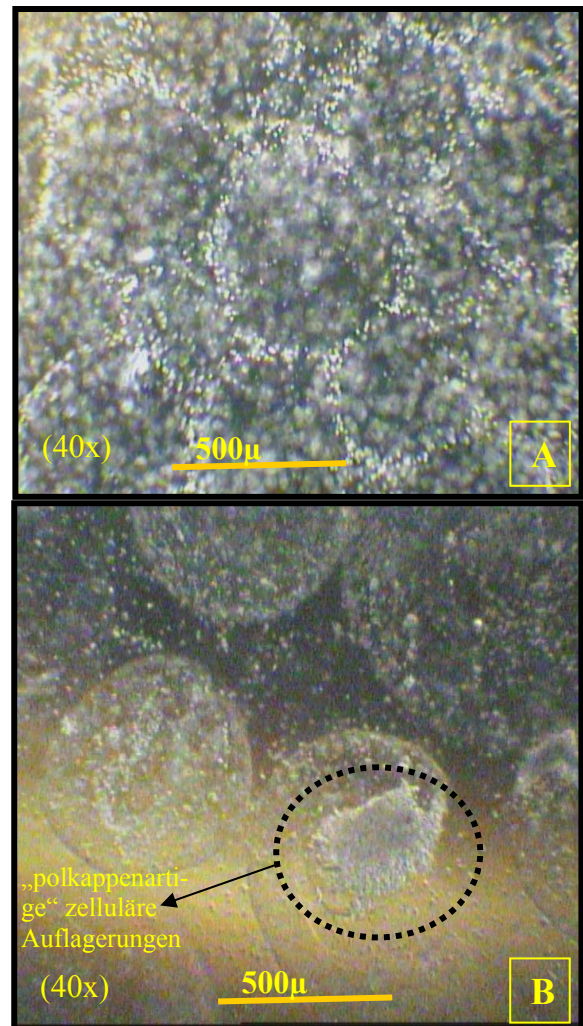
Wiederfindungsrate des Volumens der transplantierten Alginatbeads (0,7% ultrahochviskoses Alginat mit variablen HSA-Zusätzen (1%, 3% und 6%)) explantiert nach einer 14tägigen Transplantationsdauer. (100% = Kapselvolumen vor Transplantation); (Angaben = Mittelwert ±SD) bei (n=4) transplantierten Tiere pro Gruppe.

Vor der Transplantation der Leerkapseln wurde das Volumen der transplantierten Alginatkapseln bestimmt. Zum Ende des 14tägigen Transplantationszeitraumes wurden die Kapseln durch eine Spülung des Bauchraumes wieder entfernt und das Volumen der wiedergewonnenen Alginatbeads bestimmt. Die Wiederfindungsrate des Leerkapseln mit 6% HSA-Zusatz (Abb. 13c C) zeigten eine höchstsignifikante Reduktion ($p < 0,001$ vs. 13c A & B) des wiedergewonnenen Alginatvolumens auf nur $11,3\% \pm 2,0\%$ des transplantierten Kapselvolumens. Die höchste Wiederfindungsrate erzielten die Alginatbeads mit 3% HSA-Zusatz (13c B) mit $87,7\% \pm 2,0\%$ und waren damit hochsignifikant besser ($p < 0,01$) als die Gruppe 13c A mit $77,9\% \pm 2,8\%$. Auf Grund dieser Daten wurden für die anschließenden Transplantationsversuche mikroenkapsulierter Inseln zwei Varianten des thermodynamisch stabilisierten Barium-Alginatbeads auf ihre Verwendbarkeit zur Immunisation von xenogenen Inseln in vivo untersucht: [A] 0,7% UHVA + 1% HSA; vs. [B] 0,7% UHVA + 3% HSA;

Parallel zu diesen Leerkapseltransplantationen in die Balb/c Tiere wurden ebenfalls Leerkapseln (0,7% UHVA + 1% HSA) in NOD-Mäuse transplantiert. Ziel dieser Transplantationen war es, die Biokompatibilität des (xenogenen) HSA-Zusatzes in vivo zu evaluieren. Die Leerkapseln wurden ebenfalls nach 3 Wochen explantiert und lichtmikroskopisch auf Fremdkörperreaktionen in Form von fibrotischen Einscheidungen oder Kapselfragmentierungen hin untersucht.

Abb. 14

Explantierte Leerkapseln nach 3 Wochen Transplantation in [A] Balb /c -Maus und [B] in NOD-Maus. Die Leerkapseln wurden aus 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 1% HSA-Zusatz konventionell vernetzt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer 40fachen Vergrößerung gemacht.



Die transplantierten Leerkapseln zeigten weder in Balb/c- noch im NOD-Mausmodell Anzeichen höhergradiger Fremdkörperreaktionen. In beiden Tiermodellen wurden weder komplette fibrotische Einscheidungen einzelner Kapseln, noch durch fibrotische Auflagerungen zusammengehaltene Kapselkonglomerate gefunden. Es konnten nur graduelle Unterschiede zellulärer Auflagerungen festgestellt werden: z.B. die Auflagerungen von vereinzelt Zellen wie bei Balb/c [A] oder zu größeren, kompakten, zellulären „Polkappen“ bei NOD [B].

3.5 Transplantation immunisolierter Langerhans-Inseln von Ratten in diabetische Balb/c-Mäuse

3.5.1 Erste Transplantationsserie mit 1.000 mikroenkapsulierten Ratteninseln in 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 1%igen Zusatz von humanen Serumalbumin

Die ersten Transplantationen wurden mit Inseln, die konventionell mit 0,7% ultrahochviskosem Alginat und 1 %igen HSA-Zusatz enkapsuliert wurden, durchgeführt. Pro Maus wurden etwa 1000 enkapsulierte, adulte Ratteninseln intraperitoneal appliziert. Als Kontrolle dienten ebenfalls streptozotocin-diabetische Balb/c Mäuse (n=3), denen im Gegensatz zu den Versuchstieren *BI% 1-3*, ca. 1000 **un**verkapselte Ratteninseln appliziert wurden. Wie aus Abb.15 ersichtlich, konnten die Tiere der Kontrollgruppe (schwarze Kurve) nach der Transplantation (Zeitpunkt 0) für 4 bis maximal 7 Tage eine normoglykämische Stoffwechsellage erreichen, bevor Sie nach einem drastischen Transplantatverlust etwa 10 Tage nach der Transplantation wieder ihre hyperglykämischen Ausgangswerte erreichten. Dagegen konnten die Versuchstiere (*BI% 1*; *BI% 2* und *BI% 3*) mit den mikroenkapsulierten Inseln über 4-5 Wochen nach der Transplantation normoglykämische Blutzuckerwerte aufrechterhalten. Jedoch zeigten die Blutzuckermessungen nach der 6. Woche, dass auch diese Tiere einen vollständigen Verlust des Transplantates erlitten hatten.

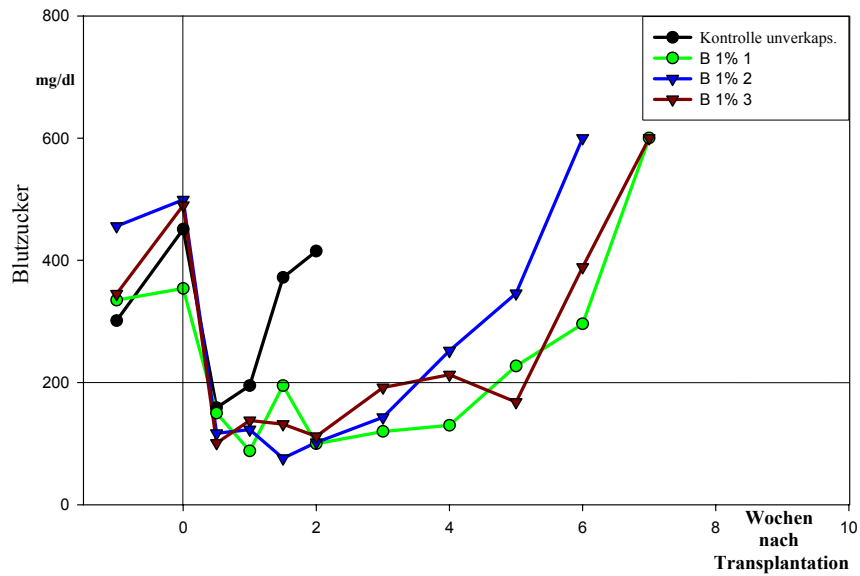


Abb. 15

„Non Fasting“ Blutzuckerlauf streptozotocin-diabetischer Balb/c Mäuse nach Transplantation von konventionell mikroenkapsulierten Inseln (1000 adulte Ratteninseln pro Maus mit 0,7%UHVA und 1% HSA-Zusatz verkapselt); B1% 1-3 [B = Balb; 1% = HSA-Konzentration; 1-3 = fortlaufende Nummer der Versuchstiere]; In allen Fällen hatte die Transplantation eine Normalisierung des Blutzuckerspiegels zur Folge, der allerdings bei den Kontrollen (Transplantation unverkapselter Inseln) nur kurz anhielt (≤ 10 Tage). Bei den Tieren, die verkapselte Inseln erhielten, ging der Effekt nach etwa 4 Wochen verloren.

3.5.2 Zweite Transplantationsserie mit 1.800 mikroenkapsulierten Ratteninseln in 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 3%igen Zusatz von humanen Serumalbumin

Wegen der begrenzten Erfolge der ersten Transplantationsreihe wurde die Zahl der zu transplantierten Inseln von 1000 auf 1800 erhöht. Ansonsten wurde die zweite Transplantationsreihe, mit Ausnahme der Erhöhung der HSA-Zusatzes auf 3%, wie zuvor durchgeführt. Die Erhöhung der Zahl der transplantierten Inseln auf 1800 führte bei der Kontrollgruppe (unverkapselte Inseln) (n=3 Tiere) (Abb. 14 schwarz) zu keiner länger anhaltenden Senkung des Blutzuckerspiegels nach Transplantation. Wie unter 3.5.1 erreichen die Kontrolltiere auch hier spätestens nach 10 Tagen wieder ihre hyperglykämischen Ausgangswerte. Die Transplantation der mikroenkapsulierten Inseln hatten bei allen Versuchstiere (n=8) eine länger andauernde Normoglykämie (Abb. 16) zur Folge.

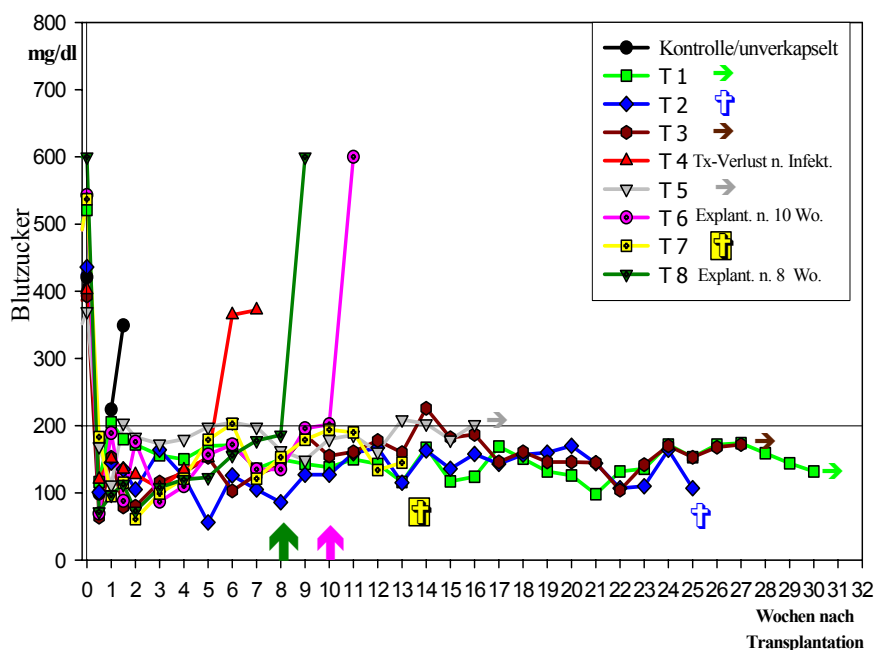


Abb. 16:

„Non Fasting“ Blutzuckerverlauf streptozotocin-diabetischer Balb/c Mäuse nach Transplantation von konventionell mikroenkapsulierten Inseln (1800 adulte Ratteninseln pro Maus mit 0,7%UHVA und 3% HSA-Zusatz verkapselt); *T 1-8* [*T* = Balb; *1-3* = fortlaufende Nummer der Versuchstiere]; ☒ Maus verstorben, → Maus mit anhaltender Normoglykämie, ↑ Explantation der Inseln, In allen Fällen hatte die Transplantation eine Normalisierung des Blutzuckerspiegels zur Folge, der allerdings bei den Kontrollen (Transplantation unverkapselter Inseln) nur kurz anhielt (≤10 Tage). Bei den Tieren, die verkapselte Inseln erhielten, konnte eine lang anhaltende Normoglykämie erzielt werden.

Von den acht Versuchstieren verlor nur Tier T4 nach einer schweren Wundinfektion am Schwanz das Transplantat. Die Tiere T2 (26. Woche) und T7 (14. Woche) starben während des Versuchs ohne Verlust des Transplantats. Zwei Versuchstieren (T8 8. Woche; T6 10. Woche) wurden das Transplantat durch eine Lavage des Intraoperitonealraumes entfernt. Beide Tiere zeigten danach Blutzuckerwerte von $> 600\text{mg/dl}$ (= „High“-Anzeige des Glucometer). Als weiteres Indiz für die Wirksamkeit der mikroenkapsulierten Inselimplantate kann gewertet werden, daß alle Versuchstiere über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich an Gewicht zunahmten (z.B. T1 über einen Zeitraum von 26 Wochen von 20g auf 26g Körpergewicht $\approx 30\%$ Gewichtszunahme).

Beim Vergleich (Abb. 17) der gemittelten Blutzuckerläufe der Tiere beider Transplantationsreihen verursachten die beiden Modifikationen HSA-Zusatz und erhöhte Zahl transplantierte Inseln eine und anhaltende Normoglykämie der diabetischen Versuchstiere (Abb.17 grün).

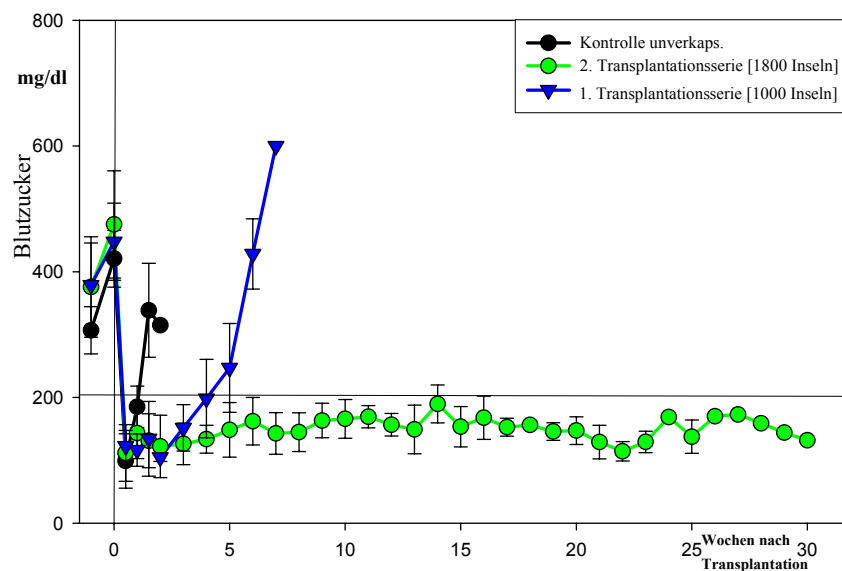


Abb. 17

Vergleich der gemittelten „Non Fasting“ Blutzuckerläufe diabetischer Balb/c Mäuse nach Transplantation mit konventionell mikroenkapsulierten Inselzellen (2. Transplantationsserie [1800 Inseln verkapselt mit 0,7%UHVA + 3%HSA] vs. 1. Transplantationsserie [1000 Inseln verkapselt mit 0,7%UHVA + 1%HSA]) (Angaben = Mittelwert \pm SD) bei 1. Serie (n=3) & 2. Serie (n=8) transplantierten Tiere pro Gruppe. In allen Fällen hatte die Transplantation eine Normalisierung des Blutzuckerspiegels zur Folge, der allerdings bei den Kontrollen (Transplantation unverkapselter Inseln) nur kurz anhielt (≤ 10 Tage). Bei den Tieren, die verkapselte Inseln erhielten, ging der Effekt bei der 1. Transplantationsserie nach etwa 4 Wochen verloren, wohin gegen bei der 2. Transplantationsserie eine anhaltende Normoglykämie zu erzielen war.

Wie schon unter 2.6.5 ausgeführt, geben die Verlaufskurven eines intraperitonealen Glucose-Toleranztestes (iP-GTT) wesentlich besser die Funktion der mikroenkapsulierten Transplantate wider, da durch sie nach einem definierten Glucosereiz die Glucose-Clearance durch das Transplantat dokumentiert wird.

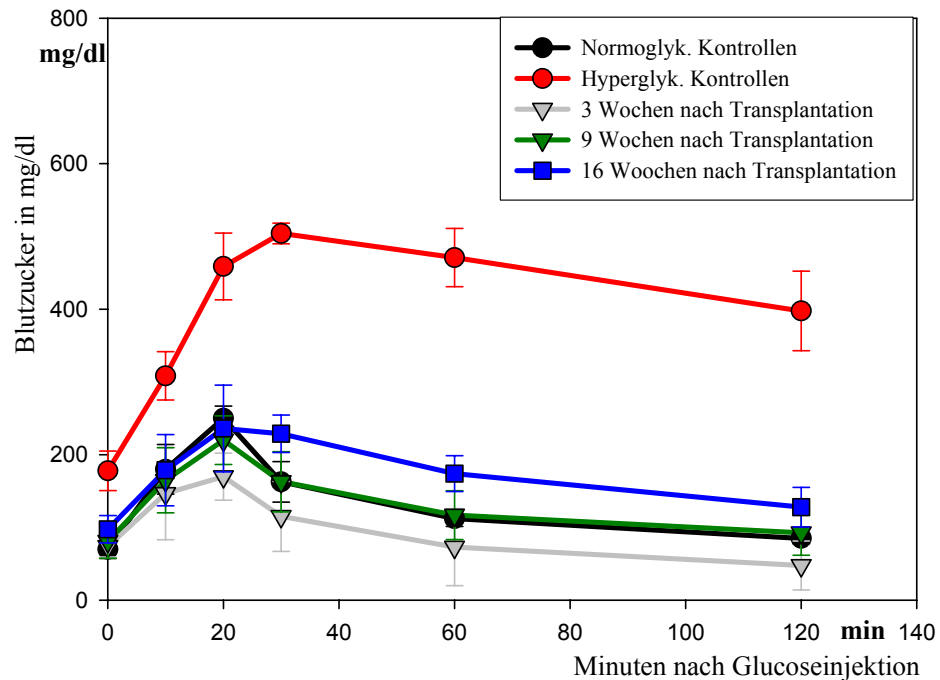


Abb. 18

Vergleich der gemittelten Blutzuckerläufe im Rahmen der iP-GTT Untersuchungen diabetischer Balb/c Mäuse nach Transplantation mit konventionell mikroenkapsulierten Inselzellen (2. Transplantationsserie [1800 Inseln verkapselt mit 0,7%UHVA + 3%HSA] nach 3, 9 & 16 Wochen nach Transplantation. (Angaben = Mittelwert \pm SD)] 2. Transplantationsserie mit (n=6, 5, 5 & 3) transplantierten Tiere

Zur Bewertung der Blutzuckerlaufkurven der Versuchstiere dienten gesunde sowie diabetische Balb/c-Mäuse (je n=6) als Kontrollen. Die normoglykämische Kontrollgruppe (Abb.18 schwarz) startete nach der 17 stündigen Nahrungskarenz mit einem Nüchternblutzuckerwert von $69,8 \pm 12,4$ mg/dl und erreichte 20 Minuten nach der Glucose-Injektion den Maximalwert von $250,2 \pm 16,6$ mg/dl, dem ein rapider Blutzuckerrückgang auf $162,7 \pm 27,9$ mg/dl zum Zeitpunkt 30 Minuten folgte. Bei Abschluß des 2 stündigen Versuchs wurde mit $85,0 \pm 7,5$ mg/dl ein Blutzuckerwert kurz oberhalb des Nüchternwerts erreicht.

Dagegen startete die diabetische Kontrollgruppe (Abb.18 rot) mit einem Nüchternblutzuckerwert von $177,8 \pm 12,4$ mg/dl und erreichte erst nach 30 Minuten ihren Maximalwert von $504,2 \pm 14,2$ mg/dl. Ein rapider Rückgang des Blutzuckerwertes, wie bei den gesunden Kontrollen, wurde hier nicht beobachtet, sondern eher eine äußerst geringe, stetige Blutzuckerclearance mit einem hohen Restwert von $397,5 \pm 54,6$ mg/dl nach 120 Minuten.

Der erste iP-GTT drei Wochen nach Transplantation (Abb.18 grau) zeichnete sich durch eine hyperphysiologische Glucoseclearance aus. Die Tiere gingen mit einem Nüchternwert von $74,0 \pm 14,6$ mg/dl in den iP-GTT. Sie erreichten ihr Maximum der Blutglucose zwar ebenfalls nach 20 Minuten, jedoch lag dieses mit $169,8 \pm 32,4$ mg/dl etwa 32% unter dem Maximalwert der gesunden Kontrolltiere. Nach 60 Minuten wurde mit $73,0 \pm 52,9$ mg/dl der Nüchternwert unterschritten und nach 120 Minuten waren bei nur $47,8 \pm 33,6$ mg/dl vorhanden.

Die Blutzuckerverlaufskurve des iP-GTTs 9 Wochen nach Transplantation (Abb. 18 dunkelgrün) entsprach weitgehend mit denjenigen gesunder Kontrollen.

Der 16 Wochen post-Tx iP-GTT (Abb.18 blau) hingegen wies eine besondere Charakteristik auf. Die Blutzuckerkurve verlief 20 Minuten wie die, gesunder Kontrollen. Es wurde hier ein Maximum von $236,0 \pm 59,6$ mg/dl erreicht, das noch unterhalb der normoglykämischen Tiere lag. Aber statt einer starken Reduktion des Blutzuckerwertes, bildete sich mit dem 30 Minutenwert von $228,8 \pm 25,8$ mg/dl ein Plateau, welches dann parallel zu den anderen Kurven nach 120 Minuten einen Endwert von $128,0 \pm 27,1$ mg/dl erreichte.

3.6 Transplantation immunisolierter Langerhans-Inseln von Ratten in diabetische NOD-Mäuse

3.6.1 Dritte Transplantationsserie mit 1.000 mikroenkapsulierten Ratteninseln in 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 1%igen Zusatz von humanen Serumalbumin

Wie bei der Versuchsreihe unter 3.5.1 wurden ebenfalls 1000 mikroenkapsulierte (0,7% UHVA + 1% HSA) adulte Ratteninseln transplantiert, allerdings nicht in Balb/c Mäuse, sondern in spontan diabetische NOD-Mäuse. Wie zuvor zeigte die Kontrollgruppe, transplantiert mit unverkapselten Inseln, nach einer halben Woche noch normoglykämische Blutzuckerwerte, nach einer Woche jedoch wieder Hyperglykämie. Selbst die mikroenkapsulierten Inseln konnten wegen der hohen immunologischen Kompetenz der NOD-Mäuse, in den Versuchstieren (N1%1-6) die Funktion nur 2 Wochen aufrechterhalten.

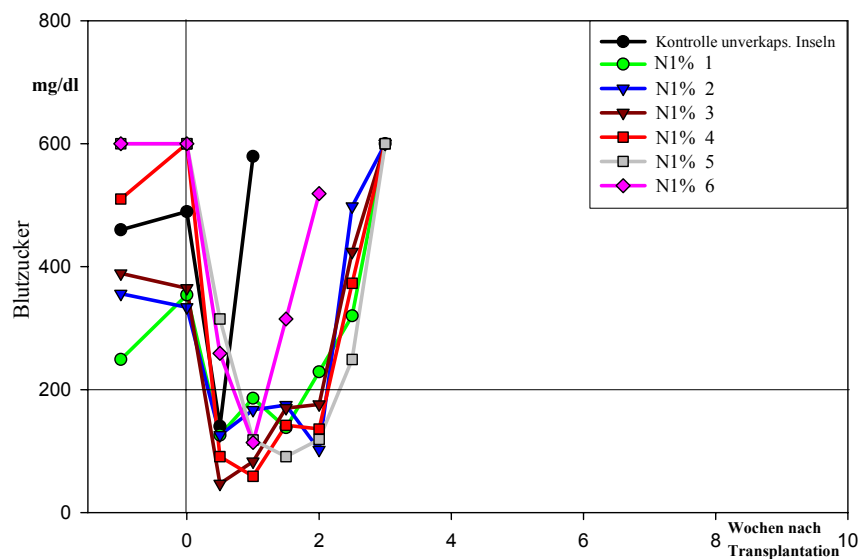


Abb. 19:

„Non Fasting“ Blutzuckerungsverlauf spontan-diabetischer NOD-Mäuse nach Transplantation mit konventionell mikroenkapsulierten Inselzellen (1000 adulte Ratteninseln pro Maus mit 0,7% UHVA und 1% HSA-Zusatz verkapselt); N1% 1-6 [N = NOD; 1% = HSA-Konzentration; 1-6 = fortlaufende Nummer der Versuchstiere]; In allen Fällen hatte die Transplantation eine Normalisierung des Blutzuckerspiegels zur Folge, der allerdings bei den Kontrollen (Transplantation unverkapselter Inseln) nur kurz anhielt (≤ 10 Tage). Bei den Tieren, die verkapselte Inseln erhielten, ging der Effekt nach etwa 2-3 Wochen verloren.

3.6.2 Vierte Transplantationsserie mit 1.800 mikroenkapsulierten Ratteninseln in 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 3%igen Zusatz von humanen Serumalbumin

Wie in den Balb/c Mäusen konnte auch hier durch die Erhöhung der Zahl transplantierter Inseln (1800 Inseln) und des HSA-Zusatzes (3%) eine Verlängerung des Transplantatüberlebens in vivo erzielt werden. Im Gegensatz zu den Balb/c-Tieren fiel dieser Erfolg mit 7 bis 10 Tage recht bescheiden aus. Eine Ausnahme war ein Versuchstier (Abb.20 [N3% 3] braun) mit einer Transplantatfunktionsdauer von > 6,5 Wochen. Jedoch war diese NOD-Maus etwa 2 Monate älter und wog mit 30g bei der Transplantation etwa 50% mehr als die übrigen Versuchstiere. Aus diesen Gründen muß die autoimmunogene Genese des Diabetes dieses Versuchstieres in Frage gestellt werden und eher die Entwicklung der Erkrankung nach dem Typ 2 in Betracht gezogen werden.

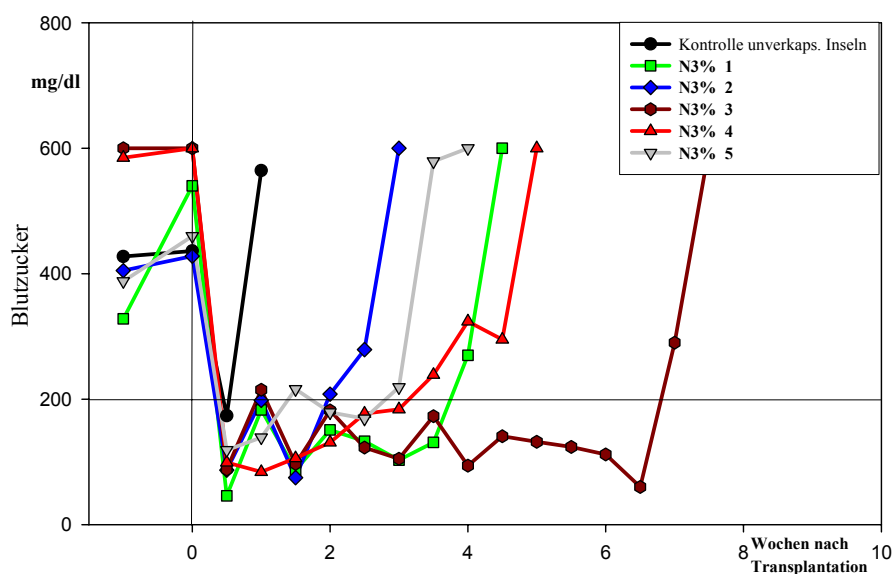


Abb. 20

„Non Fasting“ Blutzuckerungsverlauf spontan-diabetischer NOD-Mäuse nach Transplantation mit konventionell mikroenkapsulierten Inselzellen (1800 adulte Ratteninseln pro Maus mit 0,7% UHVA und 3% HSA-Zusatz verkapselt); N3% 1-5 [N = NOD; 3% = HSA-Konzentration; 1-5 = fortlaufende Nummer der Versuchstiere]; In allen Fällen hatte die Transplantation eine Normalisierung des Blutzuckerspiegels zur Folge, der allerdings bei den Kontrollen (Transplantation unverkapselter Inseln) nur kurz anhielt (≤ 10 Tage). Bei den Tieren, die verkapselte Inseln erhielten, ging der Effekt überwiegend nach etwa 2-4 Wochen verloren.

Im direkten Vergleich (Abb.21) der gemittelten Blutzuckerverläufe der Tiere beider Transplantationsreihen war in NOD-Mäusen der Kapseltyp **B** (Abb.21 grün), anders als im Balb/c-Modell (Abb.17), dem Kapseltyp **A** nicht deutlich überlegen.

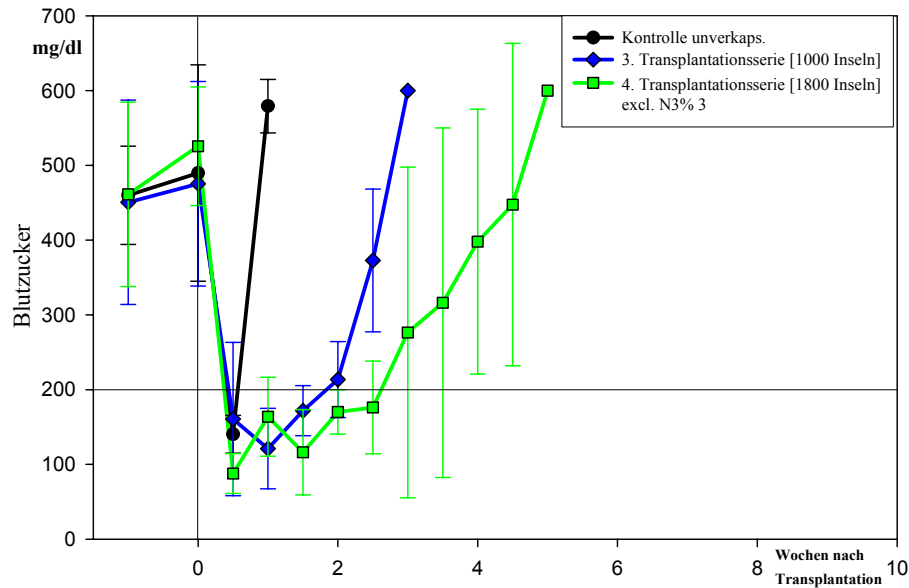


Abb. 21

Vergleich der gemittelten „Non Fasting“ Blutzucker verläufe spontan-diabetischer NOD-Mäuse nach Transplantation mit mit konventionell mikroenkapsulierten Inselzellen (3. Transplantationsserie [1000 Inseln verkapselt mit 0,7%UHVA + 1%HSA] vs. 4. Transplantationsserie [1800 Inseln verkapselt mit 0,7%UHVA + 3%HSA]) (Angaben = Mittelwert \pm SD) bei 3. Serie (n=6) & 4. Serie (n=5) transplantierten Tiere pro Gruppe. In allen Fällen hatte die Transplantation eine Normalisierung des Blutzuckerspiegels zur Folge, der allerdings bei den Kontrollen (Transplantation unverkapselter Inseln) nur kurz anhielt (≤ 10 Tage). Bei den Tieren, die verkapselte Inseln erhielten, ging der Effekt bei der 3. Transplantationsserie nach etwa 2 Wochen und bei der 4. Transplantationsserie nach etwa 3 Wochen verloren.

3.7 Explantation von transplantierten, mikroenkapsulierten Inseln

Im Rahmen der durchgeführten Transplantationsserien wurden Insel-Transplantate von definierten Versuchstieren durch eine Spülung der Leibeshöhle entfernt. Ebenso wurden nach eindeutigem Transplantatversagen oder Versuchsabbruch die mikroenkapsulierten Inseln entnommen und ebenfalls einer mikroskopischen Untersuchung zu geführt.

3.7.1 Explantationen bei Balb/c-Mäusen

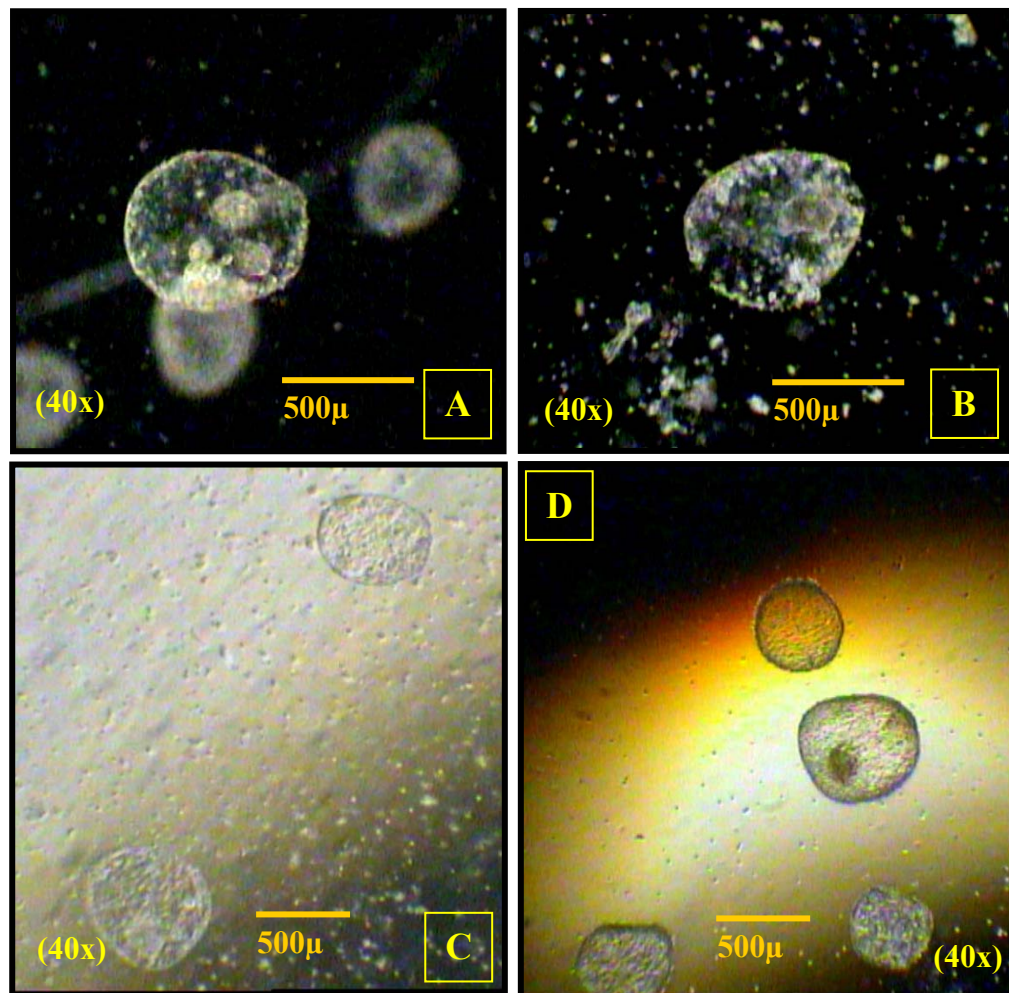


Abb. 22

Lichtmikroskopische Aufnahmen mikroenkapsulierter Langerhans-Inseln von Ratten, die in Balb/c Mäuse transplantiert worden waren und nach 8 bzw. 10 Wochen wiedergewonnen wurden. Inseln mikroenkapsuliert in 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 3%igen HSA-Zusatz. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 40 facher Vergrößerung. Kapseln in **A, B** waren 8 Wochen transplantiert, **C & D** 10 Wochen.

Die Abbildungen **22 A** und **22 B** zeigen jeweils einen intakten Alginatbead (0,7% UHVA + 3%HSA) mit kleineren Inseln/ bzw Inselfragmenten ohne fibrotische Einscheidung mit nur leichter zellulärer Auflagerung.

In den Aufnahmen von Abb. **22 C** und **22 D** sind mikroenkapsulierte Inseln und Leerkapseln (0,7% UHVA + 1%HSA), ohne **22 C** und mit etwas stärkeren zellulären Auflagerungen (**22 D**) zu erkennen.

Die Wiederfindungsrate betrug für den Alginatbead-Typ 1 (0,7% UHVA + 1%HSA) ca. 30 – 40%, für Alginatbead-Typ 2 (0,7% UHVA + 3%HSA) war sie 50 - 60%;

hier ein verlängertes Transplantatüberleben bis etwa 6,5 Wochen festgestellt werden. Die Explantation erfolgte etwa 7,5 Wochen nach Transplantation.

Abb. **23 C** und **23 D** stellen kleinere Konglomerate fibrotisierter Alginatbeads der dritten Transplantationsserie (0,7% UHVA + 1%HSA) dar, die etwa nach 3 Woche in vivo explantiert wurden.

Die Wiederfindungsraten der enkapsulierten Inseln waren bei NOD-Mäusen höher als bei den Balb/c Mäusen, wahrscheinlich weil sie in den NOD-Tieren, durch die fibrotischen Auflagerungen stabilisiert worden waren. Ihre physiologische Effizienz war jedoch (wie unter 3.6 beschrieben) geringer.

3.8 Crystal Gun Verkapselung

Wie unter Punkt 2.3.4 beschrieben stellt die Crystal Gun Verkapselung eine Weiterentwicklung des thermodynamisch stabilisierten Alginatbeads dar. Neben der homogenen Vernetzung des Alginatbeads konnte eine verringerte Permeabilität beobachtet werden. In direkten Vergleich zeigten Crystal Gun enkapsulierte Inseln, bei gleicher Alginat- und HSA-Konzentration, eine um 4-5% geringere Vitalität als konventionell verkapselte Inseln (Tab.3).

Tab. 3

Direkter Vergleich der Vitalität in % von mikroenkapsulierten Inseln, die mit der Crystal Gun Technik oder konventionell mit 0,7% UHV-Alginat und 0%; 1%; 3% & 6% HSA-Zusatz verkapselt wurden. (Mittelwert[%]±SD[%], n=21); Methode siehe unter 2.4.1

HSA-Konz.	Konvent. Vernetzung	Crystal Gun
0 %	76,9±6,2	74,5±4,7
1 %	87,0±6,0	82,6±4,4
3 %	86,8±6,4	82,9±5,1
6 %	87,1±5,1	82,1±7,5
	Vitalität [%]	Vitalität [%]

3.7.2 Explantationen bei NOD-Mäusen

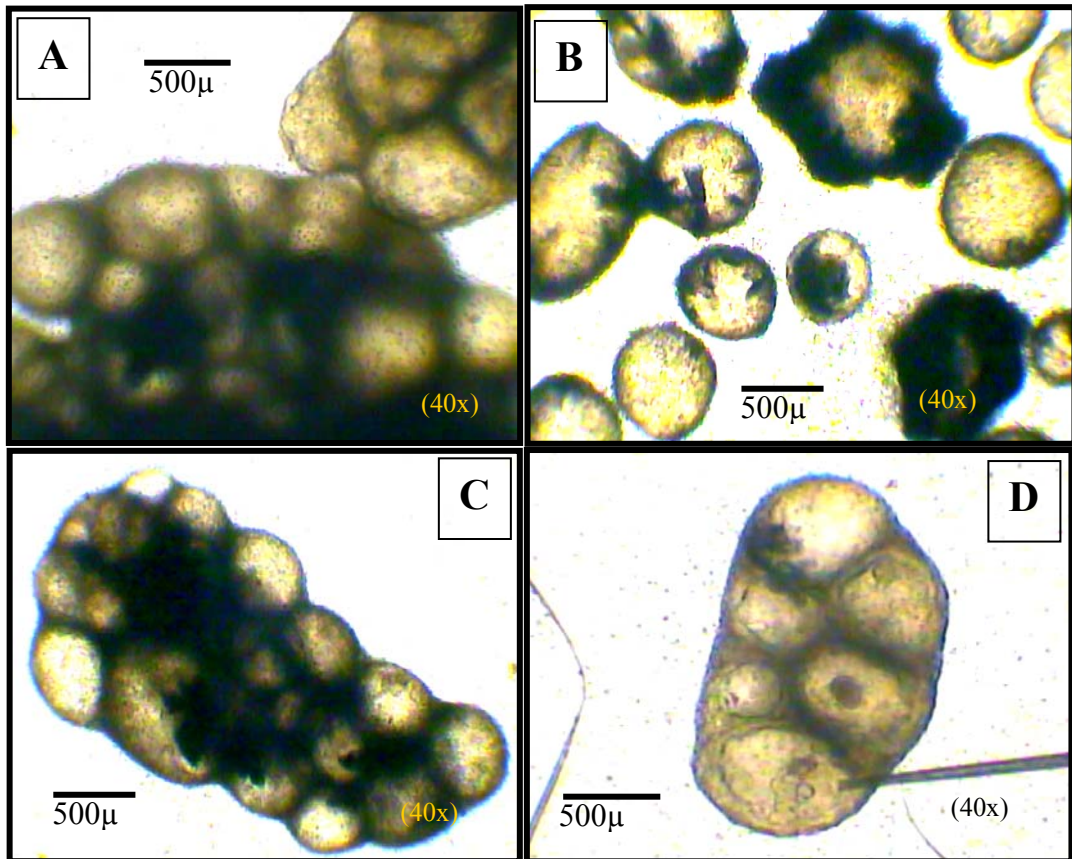


Abb. 23

Lichtmikroskopische Aufnahmen mikroenkapsulierter Langerhans-Inseln von Ratten, die in NOD Mäuse transplantiert worden waren und nach Verlust der Transplantatfunktion wiedergewonnen wurden. Inseln mikroenkapsuliert in 0,7% ultrahochviskosem Alginat mit 3%igen HSA-Zusatz. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 40 facher Vergrößerung.

Abb. 23 A zeigt eine Ansammlung stark fibrotisierter Alginatbeads (0,7% UHVA + 3% HSA) aus dem Versuchstier N3% 2 (siehe Abb. 20). Bei diesem Versuchstier trat nach etwa 2 Wochen ein Transplantatversagen auf und die Transplantatentnahme erfolgte eine Woche später.

Abb.23 B zeigt einzelne, freie Alginatbeads (0,7% UHVA + 3%HSA) mit weniger bis starker fibrotischer Einscheidung aus dem Versuchstier N3% 3. Es konnte

Der Stimulationsindex (definiert als stimulierte / basale Insulinsekretion) der konventionell verkapselten Inseln war jeder Testzeit höher als derjenige der Crystal Gun-verkapselten Inseln (Tab.4).

Tab. 4

Vitalität und Insulinantwort von adulten Ratteninseln enkapsuliert in (x% Alginat) + 1% HSA, gemessen nach 1-, 7- und 21-Tagen Kultur. Die Inseln wurden entweder konventionell (siehe 2.3.3) oder mit dem Crystal Gun-Verfahren (siehe 2.3.4) verkapselt. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD (Vitalität: n=24; Stimulationsindex: n=9)

Versuchsgruppen	Kulturdauer	Vitalität (%)	Stimulationsindex
Unverkapselt	[1 Tag]	98,0 \pm 6,2	6,6 \pm 0,3
Konv. verkaps. (0,7%)	[1 Tag]	87,5 \pm 4,4	9,2 \pm 0,8
Crystal Gun-verk. (0,7%)	[1 Tag]	83,8 \pm 5,0	5,6 \pm 0,8
Crystal Gun-verk. (0,65%)	[1 Tag]	85,6 \pm 4,5	6,5 \pm 0,6
Unverkapselt	[7 Tage]	98,5 \pm 2,2	5,8 \pm 0,4
Konv. verkaps. (0,7%)	[7 Tage]	90,3 \pm 5,6	7,9 \pm 0,7
Crystal Gun-verk. (0,7%)	[7 Tage]	78,1 \pm 3,6	4,9 \pm 0,9
Crystal Gun-verk. (0,65%)	[7 Tage]	82,3 \pm 5,3	5,9 \pm 0,6
Unverkapselt	[21 Tage]	92,8 \pm 6,4	4,3 \pm 0,4
Konv. verkaps. (0,7%)	[21 Tage]	86,5 \pm 4,5	6,0 \pm 0,6
Crystal Gun-verk. (0,7%)	[21 Tage]	30,6 \pm 6,0	1,6 \pm 0,3
Crystal Gun-verk. (0,65%)	[21 Tage]	76,9 \pm 5,9	4,7 \pm 0,4

Der Stimulationsindex zeigte bei allen Inseln die Tendenz, mit der Kulturdauer abzusinken. Seine Reduktion war nach dem 1.Kulturtag noch nicht deutlich ausgeprägt. Nach drei Wochen Kultur zeichnete sich bei den Crystal Gun-verkapselten Inseln ein drastischer Verlust von Vitalität (auf 30,6 \pm 6,0) und Funktion (Stimulationsindex 1,6 \pm 0,3) ab. Diese drastische Verringerung der Insulinfreisetzung wurde jedoch bei der Versuchsgruppe mit 0,7% UHVA beobachtet, nicht bei den Inseln, die mit der verringerten Alginatkonzentration von 0,65% verkapselt worden waren (Tab. 4). Dies könnte ein Indiz sein, dass der höhere Vernetzungsgrad durch die Crystal Gun-Methode die Permeabilität reduziert, so daß selbst das relativ kleine Insulinmolekül nicht mehr frei diffundieren kann.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das speziell für die klinische Anwendung hergestellte ultrahochviskose Alginat (UHVA) mit dem neuartigen Verkapselungsverfahren (thermodynamisch stabilisierten Bariumalginatbead), an die Langerhans-Insel, zu adaptieren und ihre Eignung für die Inseltransplantation bei zwei Typen diabetischer Mäuse zu prüfen.

Dieses Verfahren hat potentiell große Vorteile, da die eingekapselten Inseln nicht als Antigene das Immunsystem des Empfängers stimulieren. Dadurch ist die obligate, lebenslange Immunsuppressionstherapie unnötig. Eine lebenslange Immunsuppression vermindert Lebensqualität und Lebenserwartung und begünstigt maligne Erkrankungen (Joralemon et al. 1997). Zudem entstehen erhebliche Kosten durch die sehr teuren Immunsuppressiva (Dunn et al. 1990, Nicholson et al. 1994, Mihalov et al. 1996, Behrend et al. 1997, Schommer et al. 1996).

Weiter könnten mit sicheren und stabilen Kapselsystemen nicht nur xenogene Inseln, sondern auch gentechnisch veränderte Zellen oder Stammzellen transplantiert werden. Die Vorteile wären nicht auf die Transplantation von Inseln beschränkt, sondern vielfältig nutzbar. Als Beispiele könnten die Transplantation verkapselten Nebenschilddrüsengewebes zur Therapie des Hypoparathyreoidismus, catecholaminproduzierender Chromaffinzellen zur Schmerztherapie sowie isolierte Hepatocyten als bioartifizielle Leber genannt werden.

Dass das Verfahren prinzipiell nutzbar ist („proof of principle“) wurde nicht nur mit Langerhans-Inseln in Tierexperimenten gezeigt (Lanza et al. 1992), sondern auch im Menschen, da es gelang in Alginat verkapseltes Parathyreoideagewebe nach Transplantation über Monate ohne Immunsuppression überleben zu lassen (Hasse et al. 1997).

Ein routinemäßiger klinischer Einsatz mikroenkapsulierten Gewebes konnte bisher wegen folgender Probleme nicht verwirklicht werden (Orive et al. 2003).

1. Es mangelt an einheitlichem, für medizinische Anwendungen geeignetem Alginat.
2. Einheitliche, definierte Alginatkapseln sind schwer herzustellen.
3. Die bisher allgemein verwendeten Alginat- und Verkapselungsverfahren bedürfen einer Außenmembran zur Stabilisierung der Alginatkapseln. Hierzu werden Poly-Kationen (wie Poly-L-Lysin) zur Bildung der externen Stützmembranen verwendet. Diese Substanzen sind jedoch hinsichtlich ihrer Biokompatibilität nicht unbedenklich und können bei Membraninperfektionen und -beschädigungen das Immunsystem des Transplantatempfängers zu verstärkten Abwehrreaktionen stimulieren.
4. Der molekulare Cut Off der Alginathülle ist entscheidend für das Überleben des enkapsulierten Gewebes in vivo. Der Cut off muss so gewählt werden, dass eine ausreichende nutritive Versorgung des enkapsulierten Gewebes bei gleichzeitiger vollständiger Immunseparation und Kapselstabilität gewährleistet bleibt. Bisher war die genaue Einstellung des Cut offs auf Grund des verwendeten, nicht definierten, kommerziellen Alginates nur unzureichend möglich.

In den letzten Jahren wurde durch die mit uns kooperierende Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg eine neue Alginatklasse (UHVA) speziell für den medizinisch-klinischen Einsatz entwickelt (Jork et. al 2000; Zimmermann et. al 2001). Durch die besondere Auswahl des Algenrohmaterials und die schonenden Aufschluss- und Reinigungsverfahren war es möglich, ein Alginat herzustellen, das reproduzierbar hochrein und ultrahochviskos war. Die Viskosität einer UHV Alginatlösung von 0.1% (w/v) in destilliertem Wasser beträgt 20 – 30 mPascal, gegenüber 5 mPascal bei einer 0.1% (w/v) Alginatlösung des kommerziell erhältlichen MVG Alginats vom Pronova aus Norwegen (Zimmermann U et. al 2001). Die sehr hohe Viskosität wurde der schonenden Extraktion und Aufreinigung zugeschrieben, die deutlich weniger Strangbrüche verursa-

chen als das konventionelle Verfahren. Diese Annahme konnte durch die durchgeführte Gel-Permeation-Chromatographie (GPC) bewiesen werden. Die ermittelten molekularen Größenverteilungen unterschiedlicher Alginat zeigen, daß das ultrahochviskose Alginat einen entscheidend höheren Anteil an langkettigen Alginatmolekülen aufwies als kommerzielle (nieder- und mittelviskose) Alginat (Abb. 9). Auf Grund der besonderen physikalischen Eigenschaften stellte das UHV-Alginat eine neue Alginatklasse dar, die auf der einen Seite zur Verarbeitung einer besonderen apparativen und verfahrenstechnischen Anpassung bedurfte, aber gleichzeitig ein neues Verkapselungsverfahren ermöglichte.

Der thermodynamisch stabilisierte Bariumalginatbead ermöglichte eine Abkehr von der bis dahin allgemein etablierten Standardkapsel nach Lim und Sun (Lim et. al 1980). Die interne Stabilisierung des polymerisierten Alginatbead durch Proteinzusatz gestattete auf die, bezüglich der Biokompatibilität nicht unbedenklichen Polymere, wie das Poly-L-Lysin (Omer et. al 2003) zu verzichten. Humanes Serumalbumin als interner Stabilisationszusatz dagegen entspricht den klinischen Zulassungskriterien der FDA und würde damit die klinische Umsetzung entscheidend erleichtern. Neben der Langzeitstabilität der Alginatbeads ist der Zusatz vom menschlichen Serumalbumin wichtig, die Vitalität und Funktionalität der enkapsulierten Inseln zu steigern (Abb. 11a & 11b). Die Effekte konnten unabhängig von der verwendeten HSA- bzw. Alginatkonzentration reproduziert werden.

Um die Stabilität der thermodynamisch stabilisierten Alginatbeads auch in vivo langfristig zu gewährleisten, musste das Alginat mit einem adäquaten HSA-Zusatz versehen werden, der den kolloid-osmotischen Druck der intraperitonealen Leibeshöhle ausgleichen kann. In einer Transplantationsreihe von Leerkapseln mit unterschiedlichen HSA-Zusatz, zeigten Leerkapseln mit 1% und 3% Albumin-Zusatz die besten Stabilitätswerte (Abb. 13a-c) in vivo, wohingegen Leerkapseln mit 6% HSA nach der 3 wöchigen Transplantation nur zu etwa 10% wiedergefunden werden konnten (Abb. 13c).

Die explantierten Leerkapseln zeichneten sich durch eine hohe Biokompatibilität aus (Abb. 14). Es konnten keine (Abb. 14a) oder nur sehr leichte Fremdkörperreaktionen (Abb. 14b), in Form von vereinzelt, zellulären Auflagerungen beobachtet werden. An Hand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass das für den Mausorganismus xenogene HSA, keine negativen Effekte auf die Biokompatibilität der Leerkapseln hatte.

Eine 0,7%ige Lösung des ultrahochviskosen Alginats mit HSA-Zusatz erwies sich hinsichtlich der Langzeitstabilität der Beads (s. 3.2.2) und der Vitalität der enkapsulierten Inseln (Abb. 10), als die optimale Alginatkonzentration zur Immunseparation. Eine weitere Erhöhung der Alginatkonzentration (auf 0,8%) führte zu einem drastischen Verlust der Vitalität der eingeschlossenen Inseln (Abb. 10). Die Erhöhung der Alginatkonzentration führte zur Verringerung der Porengröße (CUT OFF) der Alginatbeads, so dass keine ausreichende Nährstoffversorgung des enkapsulierten Gewebes mehr möglich war. Somit wurden für die anschließenden Transplantationsversuche zwei Varianten des thermodynamisch stabilisierten Barium-Alginatbeads auf ihre Verwendbarkeit zur Immunisolierung von xenogenen Inseln *in vivo* untersucht: **[A]** 0,7% UHVA + 1% HSA; vs. **[B]** 0,7% UHVA + 3% HSA.

In der ersten Transplantationsserie wurden 1000 mikroenkapsulierte (Kapselvariation 0,7% UHVA + 1% HSA), Ratteninseln in Streptozotocin-diabetische Balb/c Mäuse transplantiert. Alle Versuchstiere konnten nach Erhalt des Transplantats eine normoglykämische Stoffwechsellage erreichen. Die Tiere der Kontrollgruppe (unverkapselte Inseln) wiesen spätestens nach 7 Tagen wieder ihre hyperglykämischen Ausgangswerte auf. Mit einer durchschnittlichen Transplantatfunktion *in vivo* von etwa 4 Wochen zeigten die mikroenkapsulierten Inseln weniger als ein Drittel, der in der Literatur beschriebenen Funktionsdauer von >100 Tagen für mikroenkapsulierte (mit Poly-L-Lysin Membran) Ratteninseln in Streptozotocin-diabetischen Mäuse (Weber et al. 1990). Die 1000 transplantierten Ratteninseln entsprachen etwa nur 50%, der (in der Literatur beschriebenen) standardmäßig transplantierten 2000 verkapselten Ratteninseln/Maus (Kobayashi et. al 2003; Ta-

tarkiewicz et. al 2001). In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) konnten Transplantate von 700-800 mikroenkapsulierten Inseln keine Normoglykämie in diabetischen Balb/c Mäusen wiederherstellen. Somit müssen die 1000 Inseln als minimale Inselmasse angesehen werden, die in einer diabetische Maus zur Normalisierung des Blutzuckerspiegels benötigt werden. Das wiedergewonnene Kapselvolumen nach Abbruch der Transplantation von nur ca. 30 – 40% (3.7.1) wies auf eine nicht befriedigende Langzeitstabilität dieser Kapselvariante in vivo hin. Wie die lichtmikroskopischen Aufnahmen der lavagierten, mikroenkapsulierten Inseln (Abb. 22 C + D) zeigten, konnte ein Transplantatversagen durch Fibrose ausgeschlossen werden. Eher ist hier ein sukzessiver Verlust der Inseln, durch eine zunehmende Fragilität und Instabilität der Alginatbeads in vivo, zu vermuten.

Einen entscheidenden Durchbruch brachte die zweite Transplantationsserie, durch die Transplantation von 1800 Inseln/Maus, enkapsuliert in 0,7% UHVA mit 3% HSA-Zusatz. Mit diesem Transplantat konnten die diabetischen Balb/c Mäuse eine Normoglykämie über einen Zeitraum von mehr als 30 Wochen wiedererlangen. Analog zur ersten Transplantationsserie erreichten alle transplantierten Tiere eine normoglykämische Stoffwechsellaage. Nur ein Tier (Abb. 16 T4) erlitt in der Versuchswoche 6, nach einer schweren Infektion des Schwanzes, einen spontanen Verlust der Transplantatfunktion. Zwei Tieren wurde im Rahmen der Versuchsplanung nach 8 Wochen bzw. 10 Wochen (bei normoglykämischer Stoffwechsellaage) das Transplantat durch eine Spülung der intraperitonealen Leibeshöhle entfernt. Beide Versuchstiere zeigten danach konstante hyperglykämische Blutzuckerwerte (BZ>600 mg/dl). Diese Daten schließen eindeutig eine Neubildung von Inselgewebe im Pankreas der diabetischen Versuchstiere aus.

Im Rahmen des intraperitonealen Glukose Toleranz Testes (iP-GTT) ist es möglich einen genauen zeitlichen Verlauf des Glukose-Abbaus durch das Transplantat zu bestimmen. Der erste iP-GTT (3 Wochen nach der Transplantation) zeigte einen hyperglykämischen Blutzuckerlauf mit durchgehend etwa 30% niedrigeren Blutzuckerwerten als die normoglykämische Kontrolle. Ähnliche hyperphysiologische Glukoseclearance-Verläufe verkapselter, xenogener Inseltrans-

plantationen (porcin auf Maus bzw. Ratte auf Maus) wurden in der Literatur schon häufiger beschrieben (Omer et al., 2003; Kobayashi et al. 2003, Tatarkiewicz et al. 2001). Dieser beobachtete Effekt wird unterschiedlichen Nüchtern- und den Sättigungsschwellenwerten des Blutzuckers zwischen den einzelnen Tierarten zugeschrieben. So wurde der Sättigungswert mit $6,9 \pm 0,2$ mmol/l [123,2 mg/dl] (Maus) vs. $4,4 \pm 0,1$ mmol/l [78,6mg/dl] (Ratte) (Tatarkiewicz et al. 2001) angegeben. Diese Differenz war wahrscheinlich der Grund, dass die mikroenkapsulierten, Ratteninseln schon bei niedrigeren Blutzuckerkonzentrationen eine Glukose induzierte Insulinfreisetzung auslösten und so zur einer relativen Hyperinsulinisierung der Balb/c Mäuse (Omer et al., 2003) führten.

Die zweite iP-GTT Verlaufskurve lag mehr oder weniger deckungsgleich **auf** der Verlaufskurve der normoglykämischen Kontrollen. Eine deutliche Beeinträchtigung des Blutzuckerverlaufs konnte in der 16. Woche nach Transplantation festgestellt werden. Im Gegensatz zu den iP-GTTs der Woche 3 und 9 konnte nach der zwanzigsten Testminute nicht die charakteristische starke Reduktion des Blutzuckers beobachtet werden. Nach dem unverändert hohen 30 Minuten-Blutzuckerwert fiel der Blutzuckerspiegel anschließend parallel zu den übrigen Kurvenverläufen, jedoch auf einem höheren Niveau. Die Entwicklung vom hyper- hin zum hypophysiologischen Blutzuckerverlauf mit zunehmender Transplantationsdauer kann nur mit einem sukzessiven Verlust der β -Zellmasse erklärt werden. So konnte der partielle Verlust der Transplantatfunktion im iP-GTT der 9. Woche noch durch die hyperphysiologische Grundkapazität des xenogenen Inselgewebes kompensiert werden und einen physiologischen Verlauf vortäuschen. Erst ein weiterer sukzessiver Verlust an Inselmasse ließ dieses Phänomen in dem iP-GTT der 16. Woche evident werden.

Anders als bei den Balb/c-Mäusen entwickeln die NODs spontan Diabetes. Ab der dritten Lebenswoche kann ihr hochkompetentes Immunsystem beginnen, autoimmunogene Antikörper gegen das eigene Inselgewebe zu bilden. Makrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten infiltrieren in Folge die Inseln und führen, durch die Zerstörung der β -Zellen, zur Ausbildung der Hyperglykämie (Haskins et

al. 1988). Der NOD-Diabetes ist T-Lymphozyten abhängig (Haskins et al. 1988) und assoziiert mit den (MHC) Klasse II Genen (Podolin et al. 1993). Analog zur Genese des humanen Typ I-Diabetes stellt auch hier das Auftreten der Th1 Immunantwort auf die Glutaminsäuredecarboxylase ein primäres Autoantigen bei der Diabetesgenese dar (Tisch et al. 1993). Es wurde vermutet, dass T-Helfer Zellen CD8⁺-Zellen aktivieren, welche die β -Zellen durch einen direkten zytotoxischen Angriff schädigen. Andere Arbeiten diskutieren hingegen, dass die Vernichtung der β -Zellen vielleicht doch indirekt sein könnte, als Resultat einer nicht-spezifischen inflammatorischen Antwort. Initial sollen CD4⁺-Makrophagen involviert sein, die Zytokine und freie Sauerstoffradikale (speziell Stickoxide), ein bekanntes β -Zell-Toxin, freisetzen (Weber et al. 1999).

Analog zu den Balb/c wurden den NOD-Mäusen in der dritten Transplantationsserie 1000 adulte Ratteninseln (mikroenkapsuliert in 0,7 % UHVA + 1% HSA) und in der vierten Serie 1800 mikroenkapsulierte Inseln (0,7% UHVA + 3% HSA) übertragen. Die Versuchstiere der Transplantationsserie 3 zeigten einen recht einheitlichen Blutzuckerverlauf (Abb.17). Eine normoglykämische Stoffwechsellage konnte nur über \pm 2 Wochen aufrechterhalten werden. Auch die NOD-Mäuse konnten durch die Erhöhung der Inselmasse und des HSA-Zusatzes eine Verlängerung der Transplantfunktion erzielen. Im Gegensatz zu Balb/c-Tiermodell fiel dieser Erfolg im Allgemeinen mit 1,0 bis 1,5 Wochen recht bescheiden aus. Als Ausnahme zeigte sich das Versuchstier (Abb.18 [N3% 3] braun) mit einer Transplantationsfunktionsdauer von > 6,5 Wochen. Jedoch war diese diabetische NOD-Maus etwa 2 Monate älter und wog mit 30g zum Zeitpunkt der Transplantation etwa 50% mehr als die übrigen Versuchstiere. Aus diesen Gründen muß die autoimmunogene Entstehung des Diabetes dieses Versuchstieres kritisch gesehen werden. Hier wäre dann eine Diabetesgenese analog zum humanen Typ 2 ebenfalls denkbar. Dies würde die fast doppelte Funktionsdauer des Transplantates auf Grund fehlender autoimmunogener, β -Zell spezifischer Vorprägung des Immunsystems erklären.

Die explantierten, mikroenkapsulierten Inseln der NOD-Transplantationsserien (Abb. 23) zeigten im Gegensatz zu denen aus den Balb/c starke Fremdkörperreaktionen in Form massiver Fibrose. Diese führte zu einer immer stärker eingeschränkten nutritiven Versorgung, die wahrscheinlich im Zusammenspiel mit immunologisch freigesetzten Zytokinen und Stickoxiden, ein frühes Transplantatversagen in vivo zur Folge hatten. Wie die Transplantation von Leerkapseln in Balb/c- (Abb. 14a) und NOD-Mäusen (Abb. 14b) oder in autoimmunogen-diabetische BB/OK Ratten (Hillgärtner et al. 1999; Jork et al. 2000) belegen, zeichneten sich UHVA-Leerbeads durch eine exzellente Biokompatibilität in vivo aus. Die massive Fibrose der Kapseln und die zelluläre Infiltration des Intraoperitonealraums, muss folglich als eine Reaktion auf freigesetzte β -zellspezifische und/oder xenogene Reize des enkapsulierten, xenogenen Inselzellgewebes angesehen werden.

Der konventionell vernetzte, thermodynamisch stabilisierte Ba-Alginatbead konnte im normal immunkompetenten Organismus der Balb/c-Maus die Immunprotektion des mikroenkapsulierten, xenogenen Inselzellgewebes über ein Zeitraum von mehr als 7 Monaten aufrecht erhalten (Abb. 16). Die geringen Wiederfindungsraten deuten hingegen auf eine eingeschränkte Langzeitstabilität des Kapselsystems in vivo hin. Die beschriebenen, exzellenten Kapselstabilitäten in vitro (Zimmermann et al. 2001) wurden unter exakt eingestellten und konstanten in vitro Bedingungen erzielt. Diese spiegelten aber nur unzureichend die physiologische Variabilität des Milieus und Interaktionen des Immunsystems eines in vivo Systems wider. Weiterhin zeigten die aktuellsten Grundlagenuntersuchungen zur Vernetzungsdynamik von Alginatkapseln (Zimmermann et al. 2003), dass eine zentrale Prämisse zur Stabilität des thermodynamisch stabilisierten Kapselsystems, die homogene Vernetzung der gesamten Alginatbeads, durch die weltweit standardmäßig verwendete Fällbad-Vernetzung nicht erzielt werden konnte. In Folge eines inhomogenen Vernetzungsmusters (Abb.7), kann es im variablen in vivo-Milieu zwischen den vernetzten und unernetzten Kapselarealen, durch Spannungen zur Mikrorissbildung bis hin zur Fragmentation der Alginathülle kommen. Schon Mikrorisse jedoch könnten die eingestellte Semipermeabilität und damit die immunprotektive Funktion der Alginathülle zerstören. Besonders im hyperkompetenten

und vorgeprägten (β -Zell Autoimmunogenität) NOD Immunsystem würden schon geringe freigesetzte xenogene- und/oder β -Zell-spezifische, immunologische Reize zur der beobachteten massiven Immunantwort führen.

Im Rahmen dieser Arbeit war es noch möglich die Weiterentwicklung des thermodynamisch stabilisierten Kapselsystems, die „Crystal Gun Verkapselung“ an die Langerhans-Insel zu adaptieren. Der Einschuss feiner Bariumsalzkristalle in die noch nicht polymerisierten Alginattropfen verhinderte im Fällbad die Ausbildung eines Vernetzungsgradienten. Dies ermöglichte erstmals eine komplette homogene Vernetzung eines Alginatbeads, wie NMR-, CLSM- und AFM-Verfahren bewiesen (Zimmermann et al. 2003). Wie die Daten aus Tabelle 4 + 5 ausweisen, führte die homogene Crystal Gun Vernetzung bei gleicher Alginatkonzentration zu einer niedrigeren Permeabilität, die selbst Auswirkungen auf ein kleines Molekül wie das Insulin zeigten. Diese verringerte Permeabilität führte dazu, dass nach 3 Wochen einer in vitro Kultur die Inseln mit 0,7% UHVA + 1%HSA und Crystal Gun Enkapsulierung einen drastischen Einbruch der Vitalität und Funktionalität mit Vergleich zur konventionell vernetzten Gruppe erlitten (Tab.5). Eine Verringerung der Alginatkonzentration auf 0,65% zur Crystal Gun Verkapselung konnte in Folge eine ausreichende nutritive Versorgung des enkapsulierten Gewebes sicherstellen und zeigten dann ähnliche Vitalitäts- und Funktionalitätsverläufe, wie Inseln mit 0,7% UHVA + 1%HSA konventionell vernetzt.

Das Crystal Gun Verfahren konnte somit seine Fähigkeit zur Mikroenkapsulierung von Langerhans-Inseln in vitro unter Beweis stellen. Die vollständige, homogene Vernetzung des Alginatbeads ermöglicht erstmals das Prinzip eines intern, thermodynamisch stabilisiert Alginatbeads vollständig umzusetzen. Daher ist zu erwarten, dass mit Hilfe der „Crystal Gun“-Verfahrens auch ein Durchbruch bei der Transplantation von Inseln in NOD-Mäuse zu erreichen sein wird.

5. Zusammenfassung

Es wäre ein großer Fortschritt, wenn man transplantierte Inseln im Empfänger von dessen Immunsystem abschirmen könnte. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß es möglich ist, funktionsfähige Inseln von Ratten in Alginatkapseln einzuschließen und in dieser Form in diabetische Mäuse zu transplantieren. Die Inseltransplantation ist ein vielversprechendes Verfahren zur Behandlung des Typs 1 Diabetes. Das Verfahren ist nicht invasiv erfordert jedoch eine lebenslange Immunsuppression der Patienten. Zudem sind nur begrenzte Spenderorgane verfügbar.

Mit dem ultrahochviskosem Alginat stand erstmals ein speziell für die klinische Anwendung konzipiertes und hergestelltes Alginat zur Verfügung. Im Gegensatz zu den kommerziell erhältlichen Alginaten konnte dieses Alginat in hoher Reinheit reproduzierbar produziert werden. Zudem war es erstmals möglich, durch eine interne Kapselstabilisierung auf die bislang benötigte, äußere Stützmembran zu verzichten.

Ziel der Arbeit war es, das ultrahochviskose Alginat und das neue „thermodynamisch-stabilisierte“ Verkapselungssystem für die Transplantation der Langerhans-Inseln zu optimieren. In der anschließenden Studie sollten verkapselte Inseln von Ratten in zwei Typen diabetische Mäuse transplantiert werden und Tauglichkeit des Verfahrens in vivo geprüft werden.

In vitro wurden die Parameter (insbesondere die Alginatkonzentration) zur Verkapselung der Langerhans-Inseln optimiert. Die Vitalität (Überleben der Inseln) und die Funktionalität (Sekretion von Insulin) des enkapsulierten Gewebes dienen zur Bewertung der Verkapselungsmethode.

Die Zugabe von humanem Serumalbumin führte sowohl zur Langzeitstabilisierung der Alginatbeads als auch zur Verbesserung der Nährstoffversorgung des enkapsulierten Gewebes. Durch Transplantationen von Leerkapseln mit verschie-

denen Albumin-Konzentrationen wurde die benötigte Albumin-Supplementation bestimmt. Als Empfänger dienten Streptozotozin-diabetische Balb/c- und spontan diabetische NOD-Mäuse. Die intraperitoneale Transplantation von 1.800 mikroenkapsulierten, adulten Ratteninseln bewirkten in Streptozotozin-diabetischen Balb/c-Mäusen eine langanhaltende (>30 Wochen) Normalisierung des Blutzuckerspiegels. Die Glucose-Clearance-Raten des intra peritonealen-Glucose-Toleranz-Tests in der 3., 9. und 16. Woche zeigten aber einen sukzessiven Verlust der Transplantfunktion, der in den „non fasting“ Blutzuckerwerten nicht evident wurde.

Der Diabetes der NOD-Maus wird durch eine autoimmunogene Zerstörung der β -Zellmasse durch ein hyperkompetentes Immunsystem ausgelöst, so dass die NOD-Tiere schon auf β -zellspezifische Antigene konditioniert waren. Auch hier führte die Alginatkapsel zu einem deutlich verlängerten Überleben des Transplantates im Vergleich zu den unverkapselten Kontrollen. Jedoch trat dann nach 4-5 Wochen ein spontanes Transplantatversagen auf. Konventionell polymerisierte Kapseln zeigten inhomogene Vernetzungen des Alginates. Dies führte mit zunehmender Transplantationsdauer zu Instabilitäten der Alginatbeads, so daß schließlich Inselgewebe oder β -Zell-spezifischen Antigene frei würden. Diese Antigene induzierten im hyperkompetenten Immunsystem der NOD-Mäuse eine massive Abwehrreaktion mit rascher Zerstörung der transplantierten Inseln.

Im Rahmen der Weiterentwicklung der Verkapselungstechnik konnte mit Hilfe der neuen „Crystal Gun Verkapselung“ erstmals eine homogene Vernetzung des gesamten Alginatbeads sichergestellt werden. Gegen Ende dieser Arbeit konnte bei einer dreiwöchigen Kultur in vitro gezeigt werden, dass das „Crystal Gun Verfahren“ zur Mikroenkapsulierung von Langerhans-Inseln geeignet ist. Daher ist zu erwarten, daß mit Hilfe des „Crystal Gun Verfahrens“ auch ein Durchbruch bei der Transplantation von Inseln in NOD-Mäusen zu erreichen sein wird.

6. Literaturverzeichnis

Agardh, C.D., Agardh, E., Torffvit O. (1997) The association between retinopathy, nephropathy, cardiovascular disease and long-term metabolic control in type1 diabetes mellitus: a 5 year follow-up study of 442 adult patients in routine care. *Diabetes Research and Clinical Practice* **35**: 113-121

Atkinson M.A., Leiter E. H. (1999) The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets. *Nature Medicine* Vol. **5**: 601-02

Behrend, M., Kolditz, M., Kliem, V. et al. (1997) Malignancies in patients under long-term immunosuppression after kidney transplantation. *Transplantation Proceedings* **29**: 834-835

Berth, G. (1992) Methodical aspects of characterization of alginate and pectate by light scattering and viscometry coupled with GPC. *Carbohydrate Polymers*, **19**:1-9

Bertuzzi, F., Maffi, P., Nano, R. et al. (2003) Islet allotransplantation in type 1 diabetic patients. *Minerva endocrinologica* **28**: 103-109

Calafiore, R., Basta, G., Luca, G. et al. (1999) Transplantation of pancreatic islets contained in minimal volume microcapsules in diabetic high mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences* **875**: 219-232

Cappai, A., Petruzzo, P., Ruiu, G. et al. (1995) Evaluation of new small barium alginate microcapsules. *The International Journal of Artificial Organs* **18**: 96-102

Chang, T. M. S. (1964) Semipermeable microcapsules. *Science* **146**: 524-525

Cockram C.S. (2000) Diabetes mellitus: perspective from the Asia-Pacific region, *Diabetes Research and Clinical Practice* **50**, Suppl. 2: S3-S7.

Clayton, H. A., London, N. J., Bell, P. R. et al. (1992) The transplantation of encapsulated islets of Langerhans into the peritoneal cavity of the biobreeding rat. *Transplantation* **54**: 558-560

Darquy, S., Reach, G. (1985) Immunoisolation of pancreatic B cells by microencapsulation. An in vitro study. *Diabetologia* **28**: 776-780

De Vos, P., De Haan, B. J., Wolters, G. H, et al. (1997) Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* **40**: 262-270

De Vos, P., Hamel, A. F., Tatarkiewicz, K. (2002) Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* **45**: 159-173

De Vos, P., Hoogmoed, C. G., Busscher, H. J. (2002) Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells. *Journal of Biomedical Materials Research* **60**: 252-259

De Vos, P., van Hoogmoed, C. G., de Haan, B. J. et al. (2002) Tissue responses against immunoisolating alginate-PLL capsules in the immediate posttransplant period. *Journal of Biomedical Materials Research* **62**: 430-437

De Vos, P., Van Straaten, J. F., Nieuwenhuizen A. G. et al. (1999) Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth? *Diabetes* **48**: 1381-1388

Deak, D., Baumann, U. (1989) Compliance of children and adolescents with type 1 diabetes (juvenile diabetes mellitus). *Psychotherapie, Psychosomatik, medizinische Psychologie* **39**: 404-410

Dunn, D. L. (1990) Problems related to immunosuppression. Infection and malignancy occurring after solid organ transplantation. *Critical Care Clinics* **6**: 955-977

EURODIAB ACE Study Group (2000) Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet* **355**: 873-876

Glover, M. T., Deeks, J. J., Raftery, M. J. et al. (1997) Immunosuppression and risk of non-melanoma skin cancer in renal transplant recipients. *Lancet* **349**: 398

Grohn, P., Klock, G., Schmitt, J. et al. (1994) Large-scale production of Ba(2+)-alginate-coated islets of Langerhans for immunoisolation. *Experimental Clinical Endocrinology and Diabetes* **102**: 380-387

Hasse, C., Klock, G., Schlosser, A. et al. (1997) Parathyroid allotransplantation without immunosuppression *Lancet* **350**: 1296-1297

Joralemon, D., Fujinaga, K. M. (1997) Studying the quality of life after organ transplantation: research problems and solutions. *Social Science & Medicine* **44**: 1259-69

Jork, A., Thurmer, F., Cramer, H. et al. (2000) Biocompatible alginate from freshly collected *Laminaria pallida* for implantation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**: 224-229

Klock, G., Frank, H., Houben, R. et al. (1994) Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **40**: 638-643

Klock, G., Pfeffermann, A., Ryser, C. et al. (1997) Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. *Biomaterials* **18**: 707-713

Kuo, C. K., Ma, P. X. (2001) Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* **22**: 511-521

Lanza, R. P., Borland, K. M., Staruk, J. E. et al. (1992) Transplantation of encapsulated canine islets into spontaneously diabetic BB/Wor rats without immunosuppression. *Endocrinology* **131**: 637-642

Lauder, I., Abascal, J., Cartwright, R. A. et al. (1982) Alleviation of diabetic microangiopathy in rats by pancreatic islet cell transplantation. *Journal of Pathology* **137**: 205-215

Leinfelder, U. et al. (2003) A highly sensitive cell assay for validation of purification regimes of alginates. *Biomaterials*, **24**: 4161-4172

Lepore, G., Bruttomesso D., Nosari I. et al. (2002) Glycaemic control and microvascular complications in a large cohort of Italian Type 1 diabetic out-patients. *Diabetes, Nutrition & Metabolism* **15**: 232-239

Levesque, L., Brubaker, P. L., Sun, A. M. (1992) Maintenance of long-term secretory function by microencapsulated islets of Langerhans. *Endocrinology* **130**: 644-650

Lim, F., Sun, A. M. (1980) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* **210**: 908-910

London N.J. et al (1990) A fluorometric viability assay for single human and rat islets. *Horm Metab Res Suppl.* **25** :82-7.

McConnell, E. M., Harper, R., Campbell, M., et al. (2001) Achieving optimal diabetic control in adolescence: the continuing enigma. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **17**: 67-74

Mihalov, M. L., Gattuso, P., Abraham, K. et al. (1996) Incidence of post-transplant malignancy among 674 solid-organ-transplant recipients at a single center. *Clinical Transplants* **10**: 248-255

Nicholson, V., Johnson, P. C. (1994) Infectious complications in solid organ transplant recipients. *The Surgical Clinics of North America* **74**: 1223-1245

Orive, G., Hernandez, R. M., Gascon, A. R., et al. (2003) Cell encapsulation: promise and progress. *Nature Medicine* **9**: 104-107

Orive, G., Ponce, S., Hernandez, R. M. et al. (2002) Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials* **23**: 3825-3831

Picariello, L., Benvenuti, S., Recenti, R., et al. (2001) Microencapsulation of human parathyroid cells: an "in vitro" study. *The Journal of Surgical Research* **96**: 81-89

Preciado, D. A., Matas, A., Adams, G. L. (2002) Squamous cell carcinoma of the head and neck in solid organ transplant recipients. *Head Neck* **24**: 319-325

Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy **Diabetes Control and Complications Trial (2000)** Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *The New England Journal of Medicine* **342**: 381-389.

Ryan, E. A., Lakey, J. R., Paty, B. W. et al. (2002) Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* **51**: 2148-2157

Ryan, E. A., Lakey, J. R., Rajotte, R. V. et al. (2001) Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* **50**: 710-719

Ryan, E. A., Lakey, J. R., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., Kin, T., Imes, S., Rabinovitch, A., Elliott, J. F., Bigam, D., Kneteman, N. M., Warnock, G. L., Larsen, I., and Shapiro, A. M. (2001) Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* **50**: 710-719

Schommer, J. C., Pathak, D. S., Grauer, D. W. (1996) Economic evaluation of immunosuppressive drugs: an empirical example using a secondary database of hospital charges. *Transplantation Proceedings* **28**: 906

Schneider S, Feilen P. J, Slotty V, et al. (2001) Multilayer capsules: a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets. *Biomaterials* **22**: 1961-1970

Schneider S, Feilen P. J., Cramer H. et al. (2003) Beneficial effects of human serum albumin on stability and functionality of alginate microcapsules fabricated in different ways. *Journal of Microencapsulation*, in press.

Schneider S, von Mach M. A, Kraus O, et al. (2003) Intraportal transplantation of allogenic pancreatic islets encapsulated in barium alginate beads in diabetic rats. *Artif Organs*. **27**: 1053-6.

Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A. et al. (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England Journal of Medicine* **343**: 230-238

Shapiro, A. M., Ryan, E. A. , Lakey, J. R., (2001) Diabetes: Islet cell transplantation. *Lancet* **358** Suppl: 21

Shapiro, A. M., Ryan, E. A., Lakey, J.R. (2001) Pancreatic islet transplantation in the treatment of diabetes mellitus. Best practice & research. Clinical Endocrinology & Metabolism **15**: 241-264

Siebers, U., Horcher, A., Bretzel, R. G. et al. (1993) Transplantation of free and microencapsulated islets in rats: evidence for the requirement of an increased islet mass for transplantation into the peritoneal site. The International Journal of Artificial Organs **16**: 96-99

The Diabetes Control and Complication Trial Research Group (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The New England Journal of Medicine **329**: 977-986

Tze, W. J., Tai, J. (1982) Biocompatibility and immunological studies of microencapsulation with cross-linked alginate capsules. Transplantation **33**: 563-564

Vial, T., Descotes, J. (2003) Immunosuppressive drugs and cancer. Toxicology **185**: 229-240

Weber, C. J., et al. (1999) Evaluation of Graft-Host Response for Various Tissue Sources and Animal Models. Ann NY Acad Sci **875**: 233-254

Weber, C. J., et al. (1990) The role of CD4⁺ helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in nod mice. Transplantation; **49**: 396-404

Wolters, G. H., Fritschy, W. M., Gerrits, D., et al. (1991) A versatile alginate droplet generator applicable for microencapsulation of pancreatic islets. Journal of Applied Biomaterials **3**: 281-286

Zekorn, T., Klock, G., Horcher, A. et al. (1992) Lymphoid activation by different crude alginates and the effect of purification. *Transplantation Proceedings* **24**: 2952-2953

Zimmermann U. et al. (1992) Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis*; **13**: 269-74

Zimmermann, U., Mimietz, S., Zimmermann, H., et al. (2000) Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy. *Biotechniques* **29**: 564-572

Zimmermann, U., Thurmer, F., Jork, A., et al. (2001) A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **944**: 199-215

Zimmermann H, Hillgärtner M, Manz B, et al. (2003) Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging. *Biomaterials* **24**: 2083-2096.

7. Originalergebnisse

Vitalität mikroenkapsulierter Inseln nach Verkapselung mit variabler UHV-Alginatkonzentration 0,6%; 0,7% und 0,8% und konstantem HSA-Zusatz (1%) ermittelt nach einer Übernachtkultur.

UHVA 0,6% / 1 % HSA Konv	UHVA 0,7% / 1 % HSA Konv	UHVA 0,8% / 1 % HSA Konv	Kontrolle unverkaps.	
90,00%	85,00%	55,00%	100,00%	
85,00%	90,00%	60,00%	98,00%	
90,00%	90,00%	65,00%	100,00%	
90,00%	80,00%	85,00%	95,00%	
95,00%	95,00%	75,00%	100,00%	
80,00%	85,00%	80,00%	100,00%	
85,00%	85,00%	70,00%	95,00%	
90,00%	85,00%	80,00%	100,00%	
90,00%	90,00%	75,00%	98,00%	
90,00%	90,00%	80,00%	100,00%	
95,00%	95,00%	60,00%	95,00%	
90,00%	90,00%	70,00%	95,00%	
90,00%	90,00%	70,00%	95,00%	
95,00%	85,00%	80,00%	100,00%	
85,00%	85,00%	85,00%	100,00%	
90,00%	85,00%	60,00%	100,00%	
95,00%	90,00%	70,00%	98,00%	
90,00%	90,00%	50,00%	100,00%	
90,00%	80,00%	55,00%	95,00%	
85,00%	80,00%	75,00%	100,00%	
85,00%	90,00%	60,00%	98,00%	
90,00%	85,00%	70,00%	98,00%	
95,00%	85,00%	75,00%	100,00%	
95,00%	95,00%	70,00%	95,00%	
89,79%	87,50%	69,79%	98,13%	Mw
4,03%	4,42%	9,83%	2,19%	+/- SD

Vitalität mikroenkapsulierter Inseln nach Verkapselung mit konstanter ultrahochviskoser Alginatkonzentration (0,6%) und variabler Konzentration des HSA-Zusatzes (0%; 1%; 3% und 6%) ermittelt nach einer Übernachtkultur.

UHVA 0,6% w/o HSA	UHVA 0,6% / 1 % HSA	UHVA 0,6% / 3 % HSA	UHVA 0,6% / 6% HSA	Kontrolle unverkaps.
85,00%	90,00%	95,00%	98,00%	98,00%
80,00%	85,00%	95,00%	95,00%	98,00%
85,00%	90,00%	98,00%	90,00%	100,00%
80,00%	90,00%	95,00%	90,00%	95,00%
85,00%	95,00%	90,00%	80,00%	100,00%
75,00%	80,00%	85,00%	95,00%	100,00%
90,00%	85,00%	90,00%	80,00%	95,00%
90,00%	85,00%	90,00%	75,00%	100,00%
75,00%	80,00%	85,00%	80,00%	98,00%
80,00%	95,00%	80,00%	85,00%	100,00%
85,00%	95,00%	90,00%	90,00%	95,00%
85,00%	90,00%	80,00%	90,00%	100,00%
95,00%	90,00%	90,00%	80,00%	95,00%
80,00%	90,00%	85,00%	90,00%	100,00%
80,00%	90,00%	80,00%	85,00%	100,00%
75,00%	90,00%	80,00%	80,00%	100,00%
75,00%	95,00%	85,00%	95,00%	98,00%
75,00%	90,00%	85,00%	90,00%	100,00%
80,00%	90,00%	90,00%	90,00%	95,00%
80,00%	85,00%	95,00%	85,00%	100,00%
70,00%	85,00%	85,00%	80,00%	98,00%
70,00%	90,00%	85,00%	85,00%	100,00%
70,00%	95,00%	85,00%	95,00%	100,00%
80,00%	95,00%	85,00%	95,00%	98,00%
70,00%	90,00%	80,00%	90,00%	100,00%
85,00%	85,00%	90,00%	90,00%	100,00%
75,00%	85,00%	80,00%	80,00%	100,00%
90,00%	90,00%	90,00%	85,00%	100,00%
90,00%	95,00%	85,00%	80,00%	95,00%
75,00%	95,00%	90,00%	80,00%	100,00%
80,00%	90,00%	95,00%	85,00%	98,00%
75,00%	80,00%	90,00%	95,00%	100,00%
90,00%	85,00%	85,00%	95,00%	95,00%
80,00%	85,00%	90,00%	95,00%	100,00%
80,00%	95,00%	95,00%	98,00%	95,00%
80,00%	85,00%	95,00%	95,00%	100,00%
75,00%	85,00%	95,00%	95,00%	100,00%
75,00%	90,00%	98,00%	90,00%	100,00%
70,00%	90,00%	90,00%	85,00%	98,00%
85,00%	85,00%	90,00%	90,00%	100,00%
85,00%	80,00%	95,00%	90,00%	95,00%
70,00%	90,00%	95,00%	90,00%	100,00%
80,00%	90,00%	95,00%	95,00%	98,00%
75,00%	95,00%	90,00%	90,00%	100,00%
75,00%	90,00%	90,00%	90,00%	100,00%
70,00%	90,00%	85,00%	90,00%	95,00%

79,46%	88,91%	88,93%	88,50%	98,52%	Mw
6,52%	4,46%	5,27%	5,96%	2,03%	+/- SD

Funktionalität mikroenkapsulierter Inseln nach Verkapselung mit konstanter Konzentration (0,6%) des ultrahochviskosen Alginates und variabler Konzentration des HSA-Zusatzes (0%; 1%; 3% und 6%) ermittelt nach einer Übernachtskultur.

UHVA 0,6% ohne HSA			UHVA 0,6% + 1% HSA				
Basal-sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.-sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.-Index	Basal-sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.-sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.-Index		
0,98	5,87	6,00	0,63	8,14	12,81		
1,18	6,27	5,31	0,78	7,32	9,43		
1,18	6,37	5,39	0,63	7,28	11,46		
0,62	5,20	8,46	0,56	7,55	13,46		
0,58	3,35	5,83	0,83	9,18	11,06		
0,66	3,31	4,99	0,65	7,66	11,85		
0,71	4,09	5,78	0,51	7,02	13,81		
0,81	5,20	6,41	0,46	6,79	14,87		
1,19	7,37	6,18	0,73	8,99	12,25		
0,72	4,93	6,84	1,00	10,73	10,72		
0,53	3,07	5,74	0,92	9,98	10,84		
0,70	4,63	6,57	0,83	9,33	11,24		
0,52	2,44	4,71					
0,76	3,67	4,83					
0,80	4,70	5,93	Mw	0,71	8,33	11,98	Mw
0,24	1,45	0,97	+/- SD	0,17	1,28	1,53	+/- SD

UHVA 0,6% + 3% HSA			UHVA 0,6% + 6% HSA				
Basal-sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.-sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.-Index	Basal-sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.-sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.-Index		
1,28	13,49	10,54	0,61	7,56	12,44		
0,59	8,32	13,99	0,75	6,77	9,04		
0,86	8,48	9,82	0,58	8,57	14,75		
0,80	8,36	10,42	0,84	7,61	9,10		
0,66	8,00	12,12	0,63	7,92	12,61		
0,79	9,83	12,42	1,13	13,31	11,83		
0,58	11,04	19,10	2,48	21,47	8,68		
1,10	13,15	11,99	1,47	16,41	11,16		
0,61	6,60	10,78	1,82	27,35	15,00		
0,83	10,31	12,42	1,66	24,88	14,99		
0,66	8,28	12,49	1,00	11,19	11,22		
1,59	15,88	9,97	1,04	11,87	11,47		
0,86	10,15	12,17	Mw	1,17	13,74	11,86	Mw
0,31	2,76	2,52	+/- SD	0,58	7,21	2,25	+/- SD

Kontrolle unverkapselt			
Basal-sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.-sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.-Index	
1,07	7,84	7,32	
1,10	7,74	7,08	
0,94	6,82	7,26	
0,93	6,76	7,25	
0,80	6,92	8,62	
0,94	7,49	8,00	
0,80	7,72	9,61	
0,93	7,52	8,09	
2,45	28,57	11,64	
2,79	30,90	11,05	
2,68	31,18	11,62	
2,13	18,13	8,53	
2,61	20,89	8,00	
1,94	15,96	8,21	
1,58	14,60	8,73	Mw
0,80	9,65	1,61	+/- SD

Vitalität unverkapselter und verkapselter Inseln in Prozent ermittelt durch FDA/PJ-Färbung nach 18stündiger Inkubation in aktiven und hitzeinaktivierten xenogenem Serum.

Serum aktiv

	F
	UHVA 0,7%
unverkaps.	/ 1 % HSA
	K
90,00%	85,00%
85,00%	85,00%
90,00%	95,00%
85,00%	98,00%
90,00%	90,00%
85,00%	90,00%
95,00%	95,00%
85,00%	85,00%
95,00%	85,00%
90,00%	85,00%
90,00%	85,00%
90,00%	90,00%
95,00%	90,00%
85,00%	90,00%
90,00%	95,00%
90,00%	90,00%
85,00%	85,00%
85,00%	90,00%
85,00%	95,00%
85,00%	90,00%
90,00%	85,00%
90,00%	90,00%
85,00%	90,00%
95,00%	95,00%
90,00%	90,00%
95,00%	90,00%
85,00%	85,00%
85,00%	85,00%
90,00%	85,00%
85,00%	90,00%
90,00%	85,00%
90,00%	90,00%
85,00%	90,00%
95,00%	95,00%
95,00%	95,00%
90,00%	90,00%
90,00%	90,00%

Serum inaktiv

	F
	UHVA 0,7%
unverkaps.	/ 1 % HSA
	K
95,00%	80,00%
95,00%	98,00%
98,00%	95,00%
98,00%	90,00%
95,00%	90,00%
90,00%	90,00%
90,00%	85,00%
95,00%	85,00%
98,00%	90,00%
100,00%	95,00%
98,00%	95,00%
90,00%	95,00%
95,00%	85,00%
90,00%	98,00%
98,00%	90,00%
98,00%	90,00%
100,00%	90,00%
98,00%	98,00%
95,00%	90,00%
100,00%	85,00%
100,00%	95,00%
98,00%	85,00%
98,00%	90,00%
100,00%	95,00%
100,00%	95,00%
98,00%	95,00%
100,00%	90,00%
100,00%	90,00%
98,00%	95,00%
100,00%	90,00%
100,00%	85,00%
100,00%	95,00%
98,00%	85,00%
98,00%	90,00%
100,00%	95,00%
100,00%	90,00%
90,00%	95,00%
95,00%	90,00%

88,75%	89,51%	Mw	Mw	96,33%	91,06%
3,69%	3,95%	+/- SD	+/- SD	3,38%	4,67%

Funktionalität unverkapselter und verkapselter Inseln nach 18stündiger Inkubation in aktiven und hitzeinaktivierten xenogenem Serum ermittelt mit Hilfe des Glucose-Stimulationstests.

aktives xenogenes Serum			
UHV 0,7% + 1% HSA			
	Basal- sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.- sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.- Index
	0,67	5,55	8,32
	0,90	7,83	8,66
	0,98	7,62	7,81
	0,76	6,45	8,47
	1,89	20,15	10,69
	2,08	20,27	9,76
	2,14	21,50	10,03
	0,60	4,81	7,98
	0,56	4,52	8,01
	0,56	4,94	8,89
Mw	1,11	10,36	8,86
+/- SD	0,65	7,19	0,98

hitzeinaktiviertes xenogenes Serum			
UHV 0,7% + 1% HSA			
	Basal- sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.- sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.- Index
	1,17	7,57	6,49
	0,81	7,14	8,82
	0,81	7,69	9,50
	0,74	7,00	9,48
	1,97	21,65	11,01
	2,12	21,66	10,20
	2,04	20,96	10,29
	0,81	7,14	8,86
	0,74	6,19	8,38
	0,74	6,02	8,14
Mw	1,20	11,30	9,12
+/- SD	0,60	7,01	1,29

aktives xenogenes Serum			
unverkapselte Inseln			
	Basal- sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.- sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.- Index
	1,60	6,55	4,10
	1,55	5,71	3,69
	1,50	5,38	3,59
	1,45	5,48	3,77
	2,71	10,67	3,93
	3,10	10,89	3,52
	2,82	10,76	3,82
	0,94	1,64	1,75
	0,80	1,66	2,08
	0,90	1,44	1,60
Mw	1,74	6,02	3,19
+/- SD	0,84	3,77	0,97

hitzeinaktiviertes xenogenes Serum			
unverkapselte Inseln			
	Basal- sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.- sekretion ng/Insel/1,5h	Stimul.- Index
	1,71	8,43	4,92
	1,69	9,19	5,44
	1,79	8,67	4,85
	1,93	10,17	5,27
	3,38	19,03	5,63
	3,26	19,43	5,97
	3,50	20,91	5,97
	1,27	6,06	4,78
	1,33	6,16	4,62
	1,40	7,66	5,47
Mw	2,13	11,57	5,29
+/- SD	0,89	5,83	0,49

Transplantation von Leerkapseln (0,7% ultrahochviskoses Alginat mit variablen HSA-Zu-sätzen (1%, 3% und 6%))
 Kapselgröße und Volumen des Transplantats vor und nach der Transplantation (Dauer: 14 Tage)

V1a/b				V2a/b				V1a/b				V2a/b			
WüA 0,7%+1% HSA		WüA 0,7%+1% HSA		WüA 0,7%+1% HSA		WüA 0,7%+1% HSA		WüA 0,7%+3% HSA		WüA 0,7%+3% HSA		WüA 0,7%+3% HSA		WüA 0,7%+3% HSA	
pre-Tx	post-Tx	pre-Tx	post-Tx	pre-Tx	post-Tx	pre-Tx	post-Tx	pre-Tx	post-Tx	pre-Tx	post-Tx	pre-Tx	post-Tx	pre-Tx	post-Tx
µm	µm	µm	µm	µm	µm	µm	µm	µm	µm	µm	µm	µl	µl	µl	µl
904,4	499,8	618,8	571,2	595,0	476,0	595,0	476,0	595,0	476,0	595,0	476,0	400,0	350,0	400,0	350,0
952,0	595,0	595,0	618,8	571,2	547,4	595,0	618,8	476,0	595,0	476,0	595,0	470,0	420,0	470,0	420,0
833,0	737,8	595,0	571,2	833,0	595,0	595,0	571,2	904,4	571,0	904,4	571,0	550,0	490,0	550,0	490,0
714,0	714,0	833,0	714,0	904,4	714,0	904,4	714,0	904,4	571,0	904,4	571,0	530,0	450,0	530,0	450,0
476,0	809,2	833,0	618,8	714,0	714,0	714,0	714,0	523,6	761,0	523,6	761,0				
595,0	547,4	476,0	476,0	666,4	476,0	666,4	476,0	714,0	595,0	714,0	595,0				
714,0	809,2	714,0	595,0	904,4	714,0	904,4	714,0	833,0	618,8	833,0	618,8				
904,0	666,4	476,0	714,0	547,4	547,4	547,4	547,4	476,0	761,6	476,0	761,6				
952,0	690,2	595,0	714,0	571,2	547,4	571,2	547,4	904,0	714,0	904,0	714,0				
714,0	737,8	666,4	499,8	547,4	523,6	547,4	523,6	476,0	666,4	476,0	666,4				
595,0	761,6	714,0	476,0	618,8	476,0	618,8	476,0	714,0	595,0	714,0	595,0				
523,6	476,0	476,0	547,4	476,0	547,4	476,0	547,4	833,0	618,8	833,0	618,8				
904,4	809,2	904,4	833,0	571,2	833,0	571,2	833,0	476,0	761,6	476,0	761,6				
666,4	714,0	666,4	547,4	547,4	547,4	547,4	547,4	904,0	714,0	904,0	714,0				
785,4	595,0	785,4	523,6	571,2	499,8	571,2	499,8	523,6	714,0	523,6	714,0				
476,0	476,0	476,0	476,0	618,8	476,0	618,8	476,0	476,0	666,4	476,0	666,4				
904,4	428,4	952,0	523,6	952,0	523,6	952,0	523,6	714,0	476,0	714,0	476,0				
Mw	742,0	651,0	87,7%	Mw	649,2	575,2	88,6%	Mw	666,4	617,3	92,6%				
+/- SD	166,6	128,2		+/- SD	141,1	96,3		+/- SD	174,0	132,3					
Volumen				Volumen				Volumen				Volumen			
pre-Tx		post-Tx		pre-Tx		post-Tx		pre-Tx		post-Tx		pre-Tx		post-Tx	
µl		µl		µl		µl		µl		µl		µl		µl	
%		%		%		%		%		%		%		%	
V1a	450,0	350,0	77,8%	V1a	450,0	350,0	77,8%	V1	400,0	350,0	87,5%				
V1b	470,0	360,0	76,6%	V1b	470,0	360,0	76,6%	V1b	470,0	420,0	89,4%				
V2a	550,0	450,0	81,8%	V2a	550,0	450,0	81,8%	V2	550,0	490,0	89,1%				
V2b	530,0	400,0	75,5%	V2b	530,0	400,0	75,5%	V2	530,0	450,0	84,9%				
V1&V2		Mw		V1&V2		Mw		V1&V2		Mw		V1&V2		Mw	
+/- SD		2,8%		+/- SD		2,8%		+/- SD		+/- SD		+/- SD		2,0%	

**„Non Fasting“ Blutzuckerwerte streptozotozin-diabetischer Balb/c Mäuse
nach Transplantation von konventionell mikroenkapsulierten Inseln
(1000 adulte Ratteninseln pro Maus mit 0,7%UHVA und 1% HSA-Zusatz verkapselt)**

Wochen post Tx	B1% 1	B1% 2	B1% 3
-1	335,0	456,0	345,0
0	354,0	499,0	490,0
0,5	150,0	117,0	101,0
1	88,0	123,0	138,0
1,5	195,0	76,0	132,0
2	100,0	102,0	112,0
3	120,0	143,0	192,0
4	130,0	252,0	213,0
5	227,0	346,0	168,0
6	296,0	600,0	389,0
7	600,0		600,0
8			

Mw	+/- SD
378,7	67,2
447,7	81,2
122,7	25,0
116,3	25,7
134,3	59,5
104,7	6,4
151,7	36,8
198,3	62,3
247,0	90,7
428,3	155,8
600,0	0,0

Kontrolle unverkapselte Inseln [1000] ip transplantiert

Wochen post Tx	K 1	K 2	K 3
-1	321,0	298,0	285,0
0	475,0	421,0	457,0
0,5	149,0	155,0	173,0
1	189,0	173,0	223,0
1,5	307,0	385,0	424,0
2		415,0	

Mw	+/- SD
301,3	18,2
451,0	27,5
159,0	12,5
195,0	25,5
372,0	59,6
415,0	

**„Non Fasting“ Blutzuckerwerte streptozotizin-diabetischer Balb/c Mäuse
nach Transplantation von konventionell mikroenkapsulierten Inseln
(1800 adulte Ratteninseln pro Maus mit 0,7% UHVA und 3% HSA-Zusatz verkapselt)**

Wochen post Tx	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8
-1	431,0	381,0	362,0	358,0	280,0	285,0	309,0	600,0
0	521,0	436,0	393,0	402,0	370,0	543,0	537,0	600,0
0,5	116,0	101,0	64,0	120,0	169,0	69,0	183,0	72,0
1	205,0	145,0	153,0	151,0	112,0	189,0	95,0	97,0
1,5	180,0	135,0	79,0	135,0	204,0	88,0	115,0	113,0
2	172,0	105,0	80,0	127,0	183,0	176,0	61,0	73,0
3	156,0	164,0	116,0	107,0	173,0	87,0	99,0	108,0
4	150,0	124,0	130,0	134,0	180,0	110,0	121,0	120,0
5	170,0	56,0	153,0	152,0	198,0	157,0	179,0	123,0
6	171,0	126,0	103,0	*365,0	205,0	172,0	203,0	156,0
7	136,0	105,0	127,0	*372,0	198,0	135,0	121,0	178,0
8	150,0	86,0	141,0	Infektion	163,0	135,0	153,0	186,0
9	143,0	127,0	186,0		149,0	196,0	179,0	Hi (>600)
10	138,0	127,0	155,0		180,0	202,0	194,0	Hi (>600)
11	150,0	159,0	161,0		186,0	Hi (>600)	190,0	Explantation
12	143,0	167,0	178,0		161,0	Hi (>600)	134,0	nach
13	116,0	115,0	160,0		209,0	Explantation	145,0	8 Wochen
14	167,0	163,0	226,0		203,0	nach	TOD	
15	117,0	136,0	182,0		179,0	10 Wochen		
16	124,0	158,0	187,0		202,0			
17	169,0	143,0	146,0		↓			
18	151,0	157,0	161,0					
19	132,0	160,0	146,0					
20	126,0	170,0	146,0					
21	98,0	144,0	145,0					
22	132,0	107,0	104,0					
23	136,0	110,0	142,0					
24	172,0	164,0	170,0					
25	153,0	107,0	153,0					
26	172,0	TOD	168,0					
27	174,0		172,0					
28	159,0		↓					
29	144,0							
30	132,0							
	↓							

Mw	+/- SD
375,8	104,0
475,3	85,2
111,8	45,1
143,4	40,5
131,1	42,9
122,1	49,8
126,3	32,9
133,6	22,1
148,5	43,3
162,3	37,7
142,9	33,0
144,9	30,8
163,3	27,4
166,0	30,7
169,2	17,7
156,6	17,9
149,0	38,7
189,8	30,1
153,5	32,2
167,8	34,4
152,7	14,2
156,3	5,0
146,0	14,0
147,3	22,0
129,0	26,9
114,3	15,4
129,3	17,0
168,7	4,2
137,7	26,6
170,0	2,8
173,0	1,4
159,0	
144,0	
132,0	

Kontrolle unverkapselte Inseln [1800] ip transplantiert

Wochen post Tx	x 1	x 2	x 3
-1	350,0	285,0	285,0
0	435,0	370,0	457,0
0,5	49,0	125,0	123,0
1	169,0	163,0	223,0
1,5	307,0	285,0	424,0
2		315,0	

Mw	+/- SD
306,7	37,5
420,7	45,2
99,0	43,3
185,0	33,0
338,7	74,7
315,0	

Vergleich der gemittelten Blutzuckerverläufe im Rahmen der iP-GTT Untersuchungen diabetischer Balb/c Mäuse nach Transplantation mit konventionell mikroenkapsulierten Inselzellen (2. Transplantationsserie [1800 Inseln verkapselt mit 0,7%UHVA + 3%HSA] nach 3, 9 & 16 Wochen nach Transplantation.

	K 1	K 2	K 3	K 4	K 5	K 6	Normoglykämische Kontrollen	
Gewicht [g]	16	18	22	19	19	19		
Vol. 5% Glucose [µl]	320	360	440	380	380	380		
Zeit [min]							Mw	SD +/-
0	87	73	73	74	61	51	69,8	12,4
10	151	175	153	164	195	241	179,8	34,0
20	241	255	224	265	269	247	250,2	16,6
30	163	161	196	191	124	141	162,7	27,9
60	126	103	117	111	97	119	112,2	10,7
120	76	82	85	98	81	88	85,0	7,5

	HG 1	HG 2	HG 3	HG 4	HG 5	HG 6	Hyperglykämische Kontrollen	
Gewicht [g]	20	18	18	21	15	17		
Vol. 5% Glucose [µl]	400	360	360	420	300	340		
Zeit [min]							Mw	SD +/-
0	173	214	165	167	142	206	177,8	27,2
10	331	300	326	254	293	346	308,3	33,2
20	509	417	493	390	467	476	458,7	45,9
30	503	522	519	487	491	503	504,2	14,2
60	451	547	444	443	458	483	471,0	40,0
120	407	487	370	320	398	403	397,5	54,6

	T1	T2	T3	T4	T5		3 Wochen post-Tx	
Gewicht [g]	23	21	21	20	20			
Vol. 5% Glucose [µl]	460	420	420	400	400			
Zeit [min]							Mw	SD +/-
0	90	84	63	55	78		74,0	14,6
10	253	155	98	107	120		146,6	63,3
20	216	155	142	191	145		169,8	32,4
30	196	77	94	121	88		115,2	48,0
60	166	62	45	36	56		73,0	52,9
120	106	40	37	19	37		47,8	33,6

	T1	T2	T3	T4	T5		9 Wochen post-Tx	
Gewicht [g]	24	22	22	21	21			
Vol. 5% Glucose [µl]	480	440	440	420	420			
Zeit [min]							Mw	SD +/-
0	66	55	103	108	73		81,0	23,3
10	198	104	191	201	130		164,8	44,7
20	264	170	225	223	218		220,0	33,4
30	206	95	161	180	172		162,8	41,4
60	142	62	109	131	141		117,0	33,5
120	95	41	94	120	114		92,8	31,1

	T1	T2	T3		T5		16 Wochen post-Tx	
Gewicht [g]	24	23	21*		22			
Vol. 5% Glucose [µl]	480	460	420		440			
Zeit [min]							Mw	SD +/-
0	78	89	101		122		97,5	18,8
10	160	170	136		249		178,8	49,0
20	228	206	188		322		236,0	59,6
30	192	241	251		231		228,8	25,8
60	148	207	166		175		174,0	24,7
120	124	166	102		120		128,0	27,1

„Non Fasting“ Blutzuckerwerte spontan-diabetischer NOD-Mäuse nach Transplantation mit konventionell mikroenkapsulierten Inselzellen (1000 adulte Ratteninseln pro Maus mit 0,7% UHVA und 1% HSA-Zusatz verkapselt)

Wochen post Tx	N1%	N1%	N1%	N1%	N1%	N1%	N1%	N1%	N1%		+/- SD
									3	4	
-1	249,0	356,0	389,0	510,0	600,0	600,0	600,0	600,0	450,7	136,7	
0	354,0	334,0	365,0	600,0	600,0	600,0	600,0	600,0	475,5	136,8	
0,5	126,0	126,0	47,0	91,0	91,0	315,0	259,0	102,5	160,7	102,5	
1	186,0	167,0	83,0	59,0	59,0	118,0	114,0	53,9	121,2	53,9	
1,5	138,0	175,0	170,0	142,0	142,0	91,0	315,0	33,5	171,8	33,5	
2	229,0	102,0	176,0	136,0	136,0	119,0	519,0	50,9	213,5	50,9	
2,5	320,0	498,0	424,0	373,0	373,0	249,0		95,4	372,8	95,4	
3	600,0	600,0	600,0	600,0	600,0	600,0		0,0	600,0	0,0	
3,5											
4											

Kontrollgruppe 1000 unverkaps. Inseln					
Wochen post Tx	NK	NK	NK	NK	+/- SD
-1	498,0	498,0	384,0	460,0	65,8
0	584,0	562,0	323,0	489,7	144,8
0,5	121,0	131,0	169,0	140,3	25,3
1	600,0	538,0	600,0	579,3	35,8

„Non Fasting“ Blutzuckerverlauf spontan-diabetischer NOD-Mäuse nach Transplantation mit konventionell mikroenkapsulierten Inselzellen (1800 adulte Ratteninseln pro Maus mit 0,7% UHVA und 3% HSA-Zusatz verkapselt)

Wochen post Tx	N3%	N3%	N3%	N3%	N3%	Mw	+/- SD
	1	2	3	4	5		
-1	328,0	405,0	600,0	585,0	388,0	461,2	123,3
0	540,0	428,0	600,0	600,0	460,0	525,6	79,2
0,5	46,0	87,0	88,0	99,0	119,0	87,8	26,7
1	183,0	198,0	215,0	84,0	139,0	163,8	52,8
1,5	87,0	75,0	97,0	106,0	216,0	116,2	57,0
2	151,0	208,0	182,0	131,0	179,0	170,2	29,8
2,5	133,0	279,0	123,0	177,0	169,0	176,2	61,9
3	103,0	600,0	*105	184,0	219,0	276,5	221,1
3,5	131,0		*173	239,0	579,0	316,3	233,8
4	270,0		*94	324,0	600,0	398,0	177,0
4,5	600,0		*141	295,0		447,5	215,7
5			*132	600,0		600,0	
5,5			*124				
6			*112				
6,5			*60				
7			*290				
7,5			*600				
8							

Kontrollgruppe 1800 unverkaps. Inseln					
Wochen post Tx	NK	NK	NK	Mw	+/- SD
	1	2	3		
-1	398,0	600,0	284,0	427,3	160,0
0	584,0	402,0	323,0	436,3	133,8
0,5	221,0	131,0	169,0	173,7	45,2
1	590,0	538,0	565,0	564,3	26,0

Vitalitätswerte in % von mikroenkapsulierten Inseln, die mit der Crystal Gun Technik oder konventionell mit 0,7% UHV-Alginat und 0%; 1%; 3% & 6% HSA-Zusatz verkapselt wurden.

konventionelle Vernetzung					Crystal Gun Vernetzung				
nackt	UHVA 0,7% w/o HSA	UHVA 0,7% / 1 % HSA	UHVA 0,7% / 3% HSA	UHVA 0,7% / 6% HSA	nackt	UHVA 0,7% w/o HSA	UHVA 0,7% / 1 % HSA	UHVA 0,7% / 3% HSA	UHVA 0,7% / 6% HSA
100,00%	85,00%	85,00%	90,00%	90,00%	98,00%	85,00%	80,00%	85,00%	70,00%
98,00%	70,00%	95,00%	95,00%	95,00%	100,00%	75,00%	90,00%	85,00%	85,00%
100,00%	70,00%	95,00%	85,00%	85,00%	100,00%	70,00%	75,00%	80,00%	70,00%
95,00%	85,00%	90,00%	85,00%	80,00%	95,00%	70,00%	80,00%	80,00%	80,00%
100,00%	80,00%	95,00%	80,00%	85,00%	100,00%	75,00%	85,00%	90,00%	80,00%
100,00%	80,00%	95,00%	90,00%	90,00%	100,00%	80,00%	80,00%	85,00%	70,00%
95,00%	70,00%	80,00%	90,00%	90,00%	95,00%	75,00%	85,00%	85,00%	75,00%
100,00%	70,00%	98,00%	80,00%	85,00%	100,00%	80,00%	85,00%	90,00%	75,00%
98,00%	70,00%	90,00%	75,00%	85,00%	98,00%	70,00%	90,00%	75,00%	90,00%
100,00%	70,00%	80,00%	90,00%	85,00%	100,00%	80,00%	90,00%	90,00%	90,00%
100,00%	70,00%	90,00%	85,00%	90,00%	95,00%	65,00%	80,00%	90,00%	95,00%
100,00%	85,00%	85,00%	95,00%	90,00%	100,00%	70,00%	85,00%	80,00%	95,00%
95,00%	80,00%	80,00%	95,00%	80,00%	95,00%	75,00%	85,00%	80,00%	90,00%
100,00%	80,00%	90,00%	80,00%	80,00%	100,00%	80,00%	85,00%	75,00%	80,00%
100,00%	80,00%	85,00%	80,00%	95,00%	90,00%	70,00%	80,00%	90,00%	85,00%
100,00%	85,00%	85,00%	95,00%	95,00%	100,00%	75,00%	75,00%	85,00%	80,00%
98,00%	75,00%	80,00%	98,00%	85,00%	98,00%	75,00%	80,00%	80,00%	80,00%
100,00%	75,00%	80,00%	85,00%	85,00%	100,00%	75,00%	80,00%	75,00%	85,00%
100,00%	70,00%	80,00%	85,00%	80,00%	95,00%	75,00%	85,00%	80,00%	85,00%
100,00%	80,00%	85,00%	80,00%	85,00%	100,00%	70,00%	80,00%	80,00%	85,00%
98,00%	80,00%	85,00%	85,00%	85,00%	98,00%	75,00%	85,00%	80,00%	80,00%

Mw	98,90%	76,90%	87,05%	86,81%	87,14%	Mw	82,62%	82,86%	82,14%
± SD	1,81%	6,22%	6,05%	6,42%	5,14%	± SD	4,72%	5,14%	7,51%

Insulinsekretion (Stimulationsassay) adulter Ratteninseln enkapsuliert in (x% Alginat) + 1% HSA (konventionell vs. Crystal Gun verkapselt), gemessen nach 1-, 7- und 21-Tagen Kultur.

WUA 0,65% / 1 % HSA		1 Tag Kultur		
CG		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		1,7	10,0	5,9
		1,4	7,8	5,6
		1,4	8,1	5,8
		1,7	11,6	6,8
		2,0	12,3	6,2
		1,7	11,6	6,8
		1,8	11,3	7,1
		1,8	13,3	7,4
		2,1	14,1	6,7
Mw ± SD		1,7 ± 0,2	11,1 ± 2,1	6,5 ± 0,6

WUA 0,65% / 1 % HSA		7 Tage Kultur		
CG		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		1,5	7,6	5,1
		1,3	7,0	5,4
		1,5	7,3	4,9
		1,8	11,3	6,5
		1,6	9,8	6,1
		1,5	9,0	6,0
		1,5	9,6	6,4
		1,4	9,0	6,4
		1,3	8,4	6,5
Mw ± SD		1,5 ± 0,1	8,8 ± 1,4	5,9 ± 0,6

WUA 0,65% / 1 % HSA		21 Tage Kultur		
CG		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		1,1	5,8	5,3
		1,1	5,3	4,8
		1,4	6,8	4,9
		1,3	6,2	4,8
		1,2	6,2	5,2
		1,2	5,8	4,8
		1,4	6,3	4,5
		1,3	5,5	4,2
		1,2	5,0	4,2
Mw ± SD		1,2 ± 0,1	5,9 ± 0,6	4,7 ± 0,4

WUA 0,7% / 1 % HSA		1 Tag Kultur		
CG		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		1,3	6,9	5,3
		1,3	7,2	5,5
		1,3	6,3	6,4
		1,4	9,3	6,6
		1,3	6,7	5,2
		1,5	6,9	4,6
		1,4	7,3	5,2
		1,6	7,6	4,8
		1,4	9,6	6,9
Mw ± SD		1,4 ± 0,1	7,8 ± 1,1	5,6 ± 0,8

WUA 0,7% / 1 % HSA		7 Tage Kultur		
CG		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		1,7	6,9	4,1
		1,5	6,1	4,1
		1,4	6,5	4,6
		1,5	7,0	4,7
		1,0	7,1	7,1
		1,4	7,8	5,6
		1,5	6,5	4,3
		1,3	6,6	5,1
		1,5	7,1	4,7
Mw ± SD		1,4 ± 0,2	6,8 ± 0,5	4,9 ± 0,9

WUA 0,7% / 1 % HSA		21 Tage Kultur		
CG		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		0,5	0,6	1,2
		0,4	0,8	2,0
		0,5	0,6	1,2
		0,4	0,7	1,6
		0,5	0,6	1,2
		0,4	0,7	1,8
		0,5	0,8	1,6
		0,4	0,7	1,8
		0,6	1,2	2,0
Mw ± SD		0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,6 ± 0,3

WUA 0,7% / 1 % HSA		1 Tag Kultur		
konv		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		1,9	17,9	9,4
		1,7	14,4	8,5
		2,2	20,7	9,4
		2,1	18,4	8,6
		2,7	23,4	8,7
		2,5	22,3	8,9
		1,7	18,6	10,9
		2,2	21,6	9,8
		2,3	19,8	8,6
Mw ± SD		2,1 ± 0,3	19,7 ± 2,7	9,2 ± 0,8

WUA 0,7% / 1 % HSA		7 Tage Kultur		
konv		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		2,2	19,0	8,6
		1,9	13,0	6,8
		1,6	13,4	8,4
		1,6	12,9	8,1
		2,3	16,4	7,1
		2,3	19,1	8,3
		1,9	16,8	8,8
		2,3	17,3	7,5
		2,4	17,3	7,2
Mw ± SD		2,1 ± 0,3	16,1 ± 2,4	7,9 ± 0,7

WUA 0,7% / 1 % HSA		21 Tage Kultur		
konv		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		1,4	8,7	6,2
		1,5	9,7	6,5
		2,3	11,9	5,2
		1,3	9,3	7,2
		1,5	9,4	6,3
		1,9	10,9	5,7
		1,8	11,3	6,3
		2,1	11,4	5,4
		2,3	12,5	5,4
Mw ± SD		1,8 ± 0,4	10,6 ± 1,3	6,0 ± 0,6

		1 Tag Kultur		
unverkaps.		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		5,4	38,9	7,2
		5,4	35,2	6,5
		5,4	35,1	6,5
		6,1	38,5	6,3
		3,5	23,4	6,7
		3,1	20,0	6,5
		3,8	24,5	6,4
Mw ± SD		4,7 ± 1,2	30,8 ± 7,9	6,6 ± 0,3

		7 Tage Kultur		
unverkaps.		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		3,6	23,2	6,4
		3,9	22,9	5,9
		6,3	33,0	5,2
		3,4	19,4	5,7
		3,0	17,7	5,9
		3,1	17,4	5,6
Mw ± SD		3,9 ± 1,2	22,3 ± 5,8	5,8 ± 0,4

		21 Tage Kultur		
unverkaps.		Basal-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-sekretion ng/insel/1 Sh	Stimul.-Index
		3,1	13,3	4,3
		3,8	14,1	3,7
		2,4	11,6	4,8
		3,3	14,2	4,3
		2,4	11,0	4,6
		2,2	9,1	4,1
Mw ± SD		2,9 ± 0,6	12,2 ± 2,0	4,3 ± 0,4