

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Spendertiere

Zur Gewinnung der Langerhans'schen Inseln wurden neonatale Lewis Ratten mit einem Alter von 5-12 Tagen verwendet. Das Geschlecht der Tiere wurde nicht berücksichtigt.

2.2. Gewinnung der neonatalen Ratteninseln

2.2.1. Inselisolierung

Die neonatalen Ratten wurden mit Äther betäubt und anschließend durch Dekapitation getötet.

2.2.2. Explantation

Das Fell der dekapitierten Ratten wurde unterhalb der Vorderläufe beidseitig eingeschnitten und nach caudal abgezogen.

Unter der sterilen Werkbank wurde jetzt mit einer kleinen Knopfschere (Fa. Eickemeyer; N° 11 10 11) das Abdomen, unter Schonung des Darmes, entlang des linken Rippenbogens keilförmig eröffnet. Mit einer gebogenen Pinzette (Fa. Eickemeyer; N° 13 42 14) faßt man die Milz und zieht sie aus dem Bauchraum. Jetzt kann man mit der Pinzette das am Milzhilus verwachsene Pankreas erfassen und vorsichtig freipräparieren (s. Bild 1). Um das Pankreas von der Milz zu

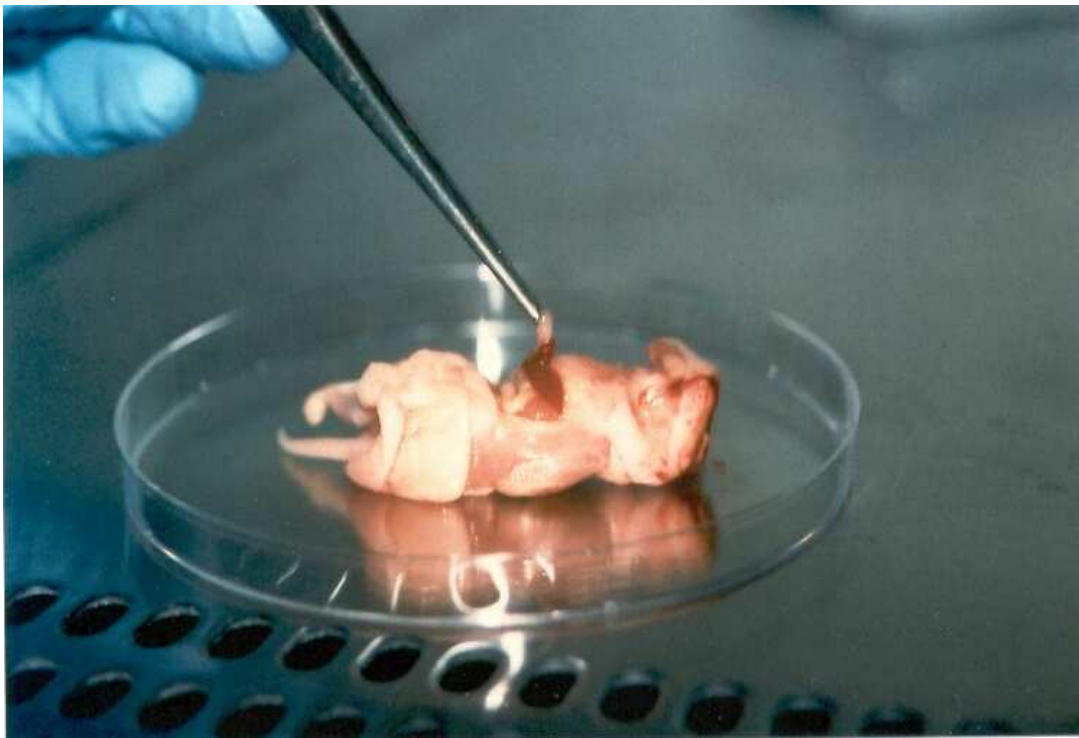


Bild 1: Neonataler Rattenpankreas in situ

trennen, klemmt man es zwischen die beiden Schneideblätter der Schere und versucht durch abstreifende Bewegungen das Pankreas von der Milz zu trennen. Das Pankreas wird in eine mit Hanks[+]-Lösung (Fa. Gibco BRL; N° 14065-049) gefüllte, auf Eis stehende Petrischale (Fa. Falcon; 100x20 mm) überführt. Nach der Präparation von ca. 12-15 Rattenpankreatata erfolgte die Säuberung des leicht rosa erscheinenden Pankreasgewebes vom eventuell vorhandenen weißen Fettgewebe.

2.2.3. Digestion

Die Digestion der Rattenpankreatata erfolgt enzymatisch-mechanisch unter sterilen Bedingungen an der sterilen Werkbank. Zwei Gewebekulturröhrchen (Fa. Sarstedt; N° 62.554.002) dienen als Reaktionsgefäße. Sie wurden mit jeweils 6,5 ml einer auf 37°C im Wasserbad erwärmten, sterilfiltrierten Kollagenase-

lösung (1 mg Kollagenase/ ml Hanks[+]-Lösung) befüllt. Die Kollagenase (Fa. Serva; N° 001745102) wurde aus *Clostridium histolyticum* gewonnen. In das erste der beiden mit Kollagenaselösung gefüllten Gewebekulturröhrchen wurden jetzt mit einer spitzen, langen Pinzette (Fa. Eickemeyer; N° 13 24 16) die 12 - 15 Rattenpankreatata zugegeben. Dieses Röhrchen wurde nun 4 Minuten lang von Hand kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die noch greifbaren, nicht digestierten Gewebestücke mit der langen, spitzen Pinzette in das zweite Gewebekulturröhrchen überführt. Beide Röhrchen wurden dann 1 Minute kräftig geschüttelt, danach 1 Minute ruhig stehen gelassen und wieder 45 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Das Digestat erscheint jetzt milchig trüb und leicht granulös.

Das darauffolgende Abstoppen der enzymatischen Digestion geschah in drei Waschschrritten und wurde mit einer auf Eis stehenden Hanks[-]-Lösung (Fa. Gibco BRL; N° 14185-045), die mit fetalem Kälberserum (Fa. Vitromex; N° 1000500) versetzt war (10 ml fetales Kälberserum/ 100 ml Hanks[-]-Lösung), vorgenommen. Nach dem letzten Waschschrritt wurde der Inhalt des zweiten Gewebekulturröhrchens in das erste Gewebekulturröhrchen gegeben. Dieses Röhrchen wurde 5 Minuten auf Eis gestellt und anschließend die Flüssigkeit über dem entstandenen Digestat soweit wie möglich abgesaugt.

2.2.4. Reinigung im Dichtegradienten

Um im Digestat endokrine Pankreasinseln vom exokrinen Pankreasgewebe (Ausführungsgänge, Bindegewebe, etc.) zu trennen, wurde ein 3 Phasen umfassender isoosmolarer Dichtegradient aus Nycodenz® verwendet. Die Lösungen mit den unterschiedlichen Dichten wurden aus einer 1,15 g/ml Stammlösung (Nycodenz Pulver (Fa. Gibco BRL; N° 1002424) gelöst in Tris-HCl-Puffer) hergestellt. Die Stammlösung wurde mit Hanks[-]-Lösung zum einen auf eine Dichte von 1,08 g/ml verdünnt. Diese Lösung diente zur Aufnahme der neonatalen Ratteninseln. Zum anderen wurde die Stammlösung auf eine Dichte von 1,09 g/ml verdünnt. Sie diente zur Aufnahme des Restpankreasgewebes.

Auf das gewonnene Digestat (siehe 2.2.3.) wurde mit einer abgebrochenen 5 ml Pipette (Fa. Sarstedt; N° 86.1253.025) 5 ml Nycodenzlösung (1,09 g/ml) auf-

pipettiert und das ganze vorsichtig homogenisiert. Durch das Digestat und einen kleinen Anteil zurückgebliebener Flüssigkeit stellt sich hier eine Dichte von geringfügig unter 1,09 g/ml ein. In ein 50 ml Falconröhrchen (Fa. Sarstedt; N° 62.547.254) wurden 5 ml Nycodenzlösung (1,09 g/ml) vorgelegt (untere Phase des Dichtegradienten) und das Nycodenz-Gewebe-Suspensat vorsichtig mit einer abgebrochenen 5 ml Pipette aufgeschichtet (mittlere Phase des Dichtegradienten). Die obere Phase des Dichtegradienten besteht aus 5 ml Nycodenzlösung (1,08 g/ml), die ebenfalls mit einer abgebrochenen 5 ml Pipette vorsichtig aufgeschichtet wurden. Abschließend wurde auf die obere Phase 5 ml Basalmedium pipettiert. Das Falconröhrchen mit dem Dichtegradienten wurde anschließend für 13 Minuten bei 285 G (ca. 1100 Upm.) ohne Bremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation befinden sich die Ratteninseln hauptsächlich in der oberen Phase des Dichtegradienten, zum Teil noch in der mittleren Phase. Das Restpankreasgewebe befindet sich in der unteren Phase. Die Inseln wurden zusammen mit den 5 ml Basalmedium, den 5 ml der oberen Phase und der Hälfte der mittleren Phase des Gradienten abgesaugt und in ein mit 20 ml Basalmedium gefülltes 50 ml Falconröhrchen gegeben. Das Basalmedium dient zum Auswaschen des Dichtegradienten.

Zur Qualitätskontrolle und zur Hochrechnung der Inselanzahl wurden 500 µl aus dem Falconröhrchen entnommen und eine Vitalfärbung mit Dithizone (Fa. Serva; N° 20733) vorgenommen. Dithizone ist eine zinkbindende Substanz und bindet sich an das Zink der Insulin - bzw. Glucagonspeicherform der Langerhans'schen Inseln. Die Inseln erscheinen leuchtend rot, während das exokrine Gewebe sich nicht anfärbt.

Anschließend wurde das Falconröhrchen für 1 Minute bei 21 G (ca. 300 Upm.) mit Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befinden sich die Inseln als Sediment am Boden des Falconröhrchens. Die Flüssigkeit über dem Sediment wurde so weit wie möglich abpipettiert und die so gewonnenen Inseln wurden ohne Zeitverzögerung sofort mikroverkapselt.

2.3. Enkapsulierung der neonatalen Ratteninseln

2.3.1. Aufbau der Enkapsulierungsanlage

Die gesamte Enkapsulierungsanlage (s. Bild 2) wurde in der sterilen Werkbank aufgebaut. Das Prinzip der Verkapselung beruht darauf, dass in einer Natrium-Alginat-Lösung suspendierte Ratteninseln von einer Perfusorpumpe (Fa. Braun Melsungen; N° 871012) durch eine auf ca. 30 cm gekürzte Perfusorleitung (Fa. Braun Melsungen; N° 872296/0) in die Kanüle einer speziellen koaxialen Luftstromdüse (s. Bild 3) gepreßt wurde. Die Kanüle besaß einen Innendurchmesser von 0,8 mm und einen Außendurchmesser von 1 mm und war in der Höhe verstellbar. Es ließ sich hierdurch die Austrittsöffnung der Kanüle gegenüber der Austrittsöffnung der Düse verstellen. Um die Kanülenaustrittsöffnung genau konzentrisch zur Düsenaustrittsöffnung zu lagern, konnte die Kanüle durch drei Schrauben, die in gleichem Abstand um den Düsenkörper herum eingearbeitet waren, zentriert werden. Ein gleichmäßig an der Kanülenaustrittsöffnung vorbeistreichender Luftstrom führt bei einer bestimmten Tropfengröße zum Abreißen des Tropfens. Die Größe des Tropfens hängt hierbei entscheidend vom Druck, mit dem der koaxiale Luftstrom erzeugt wurde, ab.

Das genaue Zentrieren ist sehr wichtig um gleichgroße, runde Kapseln zu erhalten. Bei einem ungenauen Zentrieren kommt es zu einem unsauberem Abreißen der Tröpfchen an der Kanülenaustrittsöffnung und die Kapseln werden oval bis tropfenförmig.

Die von dem Luftstrom abgetrennten Tropfen fielen in ein unter der Düse stehendes Becherglas (s. Bild 3). Dieses Becherglas war mit einer Bariumchlorid-Lösung (10 mmol in NaCl, isoosmolar) gefüllt. Durch die zweiwertigen Bariumionen kam es beim Eintauchen der Tropfen in die Lösung zu einer schlagartigen Vernetzung der sauren Gruppen des Alginates mit den bivalenten Ba^{2+} -Ionen (Gelbildung). Die Tropfen erhielten somit eine feste, elastische Konsistenz (Bariumalginat-Kapsel).

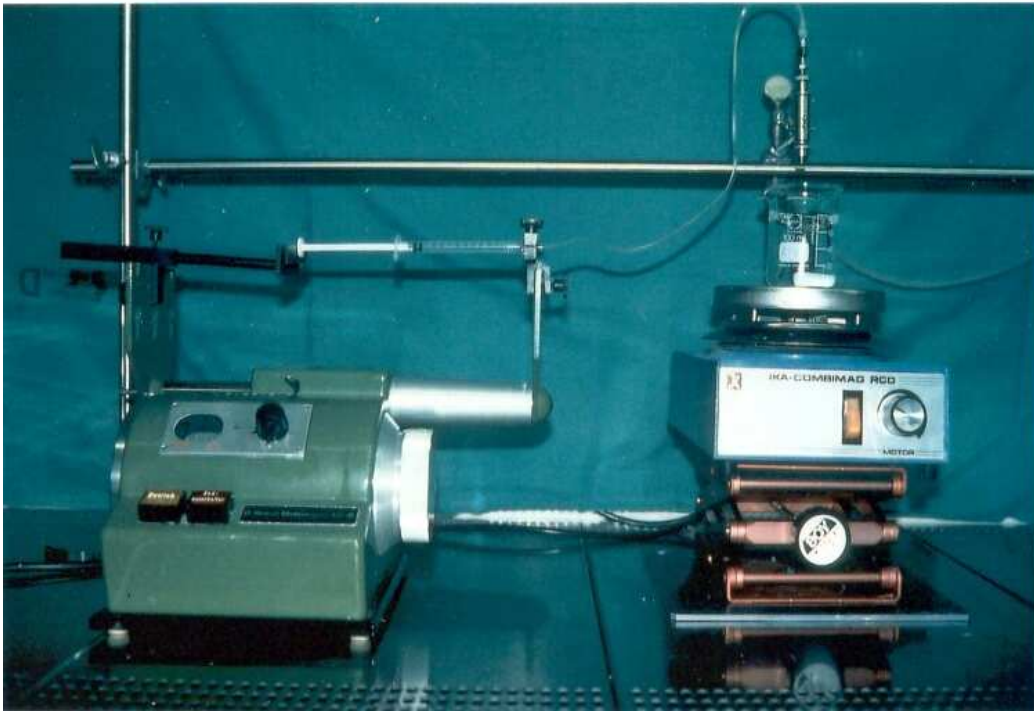


Bild 2: Enkapsulierungsanlage mit Perfusor, Perfusorleitung, Luftstromdüse



Bild 3: Koaxiale Luftstromdüse; Becherglas mit Bariumchlorid auf Magnetrührer

2.3.2. Kapselmodifikationen

Durch Modifikation der BaCl₂-Lösung bzw. des Alginates wurden 8 verschiedene Kapseltypen hergestellt.

Fällbadmodifikationen:

1. Bariumalginat-Kapseln
2. Barium-Eisen-II-Alginatkapseln
3. Barium-Eisen-III-Alginatkapseln

Matrixmodifikationen:

4. Bariumalginat-Albumin-Kapseln
5. Bariumalginat-Hämoglobin-Kapseln
6. Bariumalginat-Transferrin-Kapseln
7. Bariumalginat-Erythrozyten-Kapseln
8. Bariumalginat-Erythrozytenhämolysat-Kapseln

Alle Modifikationen, außer die Bariumalginat-Kapseln und die Bariumalginat-Albumin-Kapseln, enthalten unterschiedliche eisenhaltige Kationen, Proteine oder rote Blutkörperchen bzw. deren Hämolysat. Die Bariumalginat-Kapseln dienten als Kontrolle für die Gruppen mit Fällbadmodifikationen, während die Bariumalginat-Albumin-Kapseln mit dem beigemengten Albumin als nicht Eisen beinhaltendes Eiweiß die Kontrollgruppe für die Matrixmodifikationen darstellte.

Das eisenhaltige Hämoglobin diente als Richtwert für die anderen eisenhaltigen Kapseltypen in Bezug auf die Eisenmenge. In Vorversuchen wurden die zum Teil in unterschiedlichen, wahllos ausgesuchten Mischungsverhältnissen hergestellten Kapseln mittels Salpetersäure (HNO₃), Perchlorsäure (HClO₄) und Wärme lysiert. Anschließend wurde mit einem Atomabsorptionsspektrometer der Eisengehalt gemessen. Ausgehend von einem Hämoglobingehalt von 7,5 % in der Kapsel (s. 2.3.4.3.) wurden die Mischungsverhältnisse des Eisens genommen, die dem Eisengehalt des Hämoglobins am nächsten kamen (s. Abb. 1). Die Konzentration des Transferrins in den Kapseln mußte daraufhin verdreifacht werden, die der Erythrozyten um zweidrittel vermindert werden und die des Erythrozytenhämolysates konnte unverändert bleiben, um den gleichen Eisengehalt wie die Hämoglobin-Kapseln zu erreichen (s. Abb. 1).

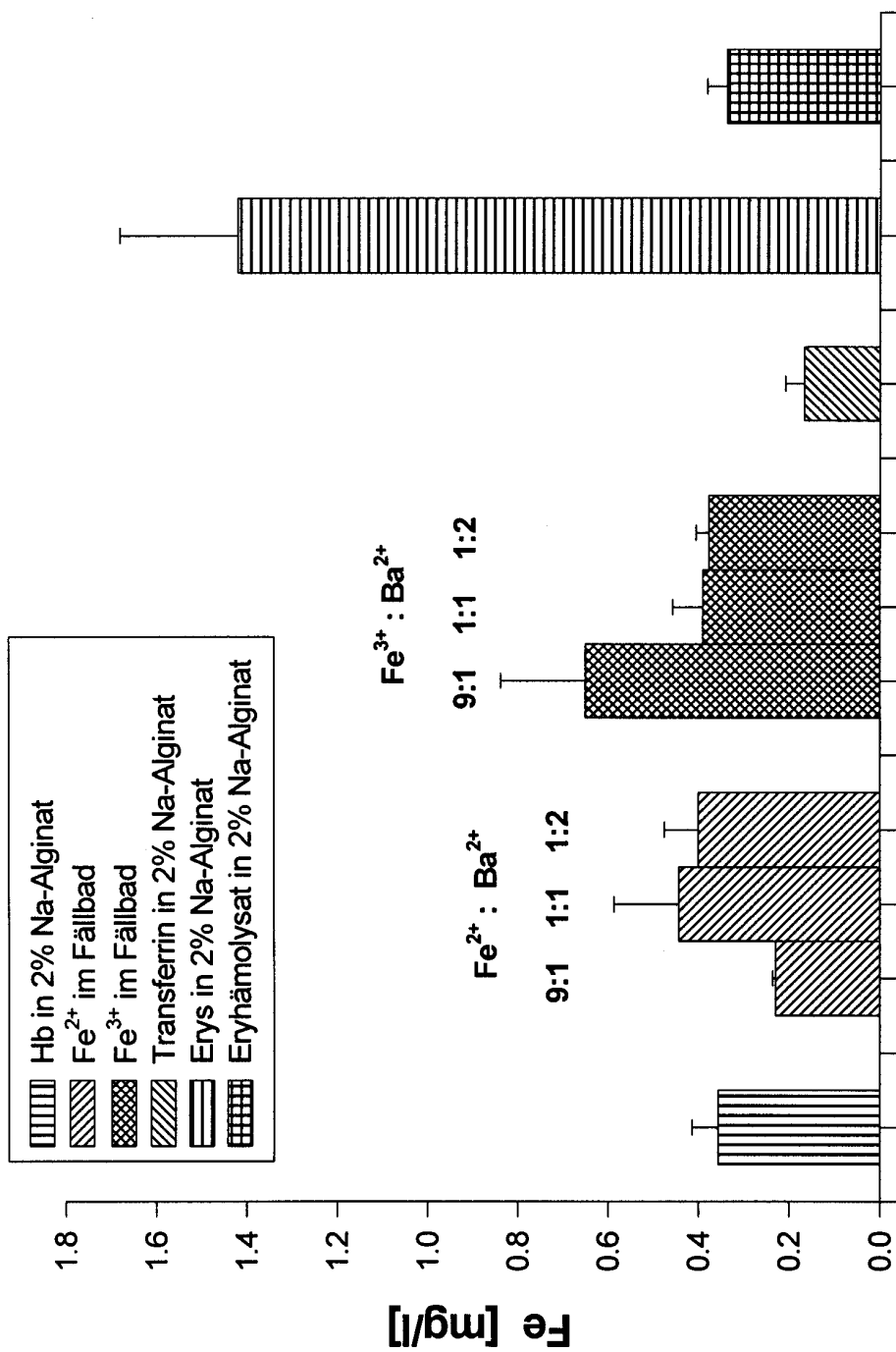


Abb. 1: Eisengehalt von Na-Alginat Kapseln nach Einbau verschiedener Fe-Träger und Lyse der Kapsel durch sauren Aufschluß.

2.3.3. Ansatz der Alginat-Lösung

Das Alginat (Fa. Pronova Biopolymer; N° 52514) besteht aus sauren Polysaccharidketten, die aus den Bausteinen D-Mannuronat und L-Guluronat aufgebaut sind. In physiologischer NaCl-Lösung wurde das Alginatpulver gelöst. Um eine vollständige Lösung zu gewährleisten, wurde das Gemisch bei Raumtemperatur ca. 2-3 Stunden auf einem Magnetrührer gerührt. Für die Versuche wurden Alginat-Lösungen in den Konzentrationen 2 % und 4 % angesetzt. Die 2%ige Lösung wurde verwendet um optimale Kapseln (rund, gleiche Größe) herzustellen. Die 4%ige Lösung wurde durch die verschiedenen Modifikationen auf 2 % herunterverdünnt, um hier ebenfalls optimale Kapselergebnisse zu erzielen.

Anschließend wurden die Lösungen aufeinanderfolgend mit Einmalfiltern (Fa. Schleicher & Schuell) in den Porengrößen 1,2 µm (N° FP 030/6), 0,8 µm (N° FP 030/5) und 0,45 µm (N° FP 030/2) sterilfiltriert. Die 2%ige Alginat-Lösung wurde zusätzlich mit einem Einmalfilter in der Porengröße 0,2 µm (N° FP 030/3) sterilfiltriert.

2.3.4. Modifikationen der Alginat-Lösung

2.3.4.1. Alginat-Lösung versetzt mit Albumin

Um ein einwandfreies Eintauchen der Alginat-Albumin Tröpfchen in die BaCl₂-Lösung zu gewährleisten, wurde ein fettsäurenfreies Human-Albumin-Trockensubstrat (Fa. Sigma; N° A 3782, Lot Nr. 32 H 9300) verwendet. 150 mg Albumin wurden in einem kleinen Becherglas in 1 ml phys. NaCl-Lösung gelöst. Nach vollständiger Auflösung wurde das Gemisch mit einem Einmalfilter in der Porengröße 0,2 µm in ein zweites, kleines, steriles Becherglas sterilfiltriert. Durch den Verlust in der Spritze und in dem Einmalfilter blieben ca. 0,8 ml sterile Albumin-Lösung über. Diese wurde wiederum mit ca. 0,8 ml 4%ige Alginat-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde, unter sterilen Bedingungen, auf einem Magnetrührer zu einer homogenen Lösung vermischt.

2.3.4.2. Alginat-Lösung versetzt mit Transferrin

Zur Herstellung einer Alginat-Transferrin-Lösung wurde ein bovines Transferrin-Trockensubstrat (Fa. Life Technologies; N° 11107018, Lot Nr. 3017062) verwendet, welches lyophilisiert und steril war. 300 mg Transferrin wurden, unter sterilen Bedingungen, in einem kleinen Becherglas mit 1 ml phys. NaCl-Lösung versetzt und auf einem Magnetprüher aufgelöst. Nach vollständiger Auflöfung wurde 1 ml 4%ige Alginat-Lösung hinzugegeben und dieses zu einer homogenen Lösung vermengt.

2.3.4.3. Alginat-Lösung versetzt mit Hämoglobin

Zur Herstellung einer Alginat-Hämoglobin-Lösung wurde ein lyophilisiertes Human-Hämoglobin-Trockensubstrat (Fa. Sigma; N° H 7379, Lot Nr. 104 H 9302) verwendet. 750 mg Hämoglobin wurden mit 5 ml phys. NaCl-Lösung versetzt (15%ige Lösung) und auf einem Magnetprüher aufgelöst. Das gelöste Hämoglobin wurde aufeinanderfolgend mit Einmalfiltern in den Porengrößen 5,0- (N° FP 030/1), 1,2-, 0,8-, 0,45-, 0,2 µm sterilfiltriert. Durch die Verluste in den Spritzen und in den Einmalfiltern wurden 1-1,5 ml sterile Hämoglobin-Lösung gewonnen. 1 ml der Lösung wurde, unter sterilen Bedingungen, mit 1 ml 4%ige Alginat-Lösung versetzt und vorsichtig auf einem Magnetprüher zu einer homogenen Lösung vermengt. Die Hämoglobinkonzentration in dem Gemisch betrug jetzt 7,5 %. Durch das Vermengen entstanden viele kleine Bläschen, die sich negativ bei der Kapselherstellung auswirkten. Um dieses zu vermeiden, wurde die Alginat-Hämoglobin-Lösung bis zu ihrer weiteren Verwendung 24 Stunden stehen gelassen damit sie entgasen konnte.

2.3.4.4. Alginat-Lösung versetzt mit Erythrozyten

Zur Herstellung einer Alginat-Erythrozyten-Lösung wurden humane Erythrozyten verwendet. Das frisch entnommene heparinisierte Blut (5 ml) wurde mit dergleichen Menge an phys. NaCl-Lösung aufgefüllt und auf 25 ml Lymphoprep

(Fa. Nycomed; N° 10002120) aufgeschichtet. Die Lymphoprep-Lösung war in ein 50 ml Falconröhrchen gefüllt, daß anschließend für 30 Min. bei 400 g zentrifugiert wurde. Danach wurde der Überstand abgesogen und das Sediment (Erythr.) mit phys. NaCl-Lösung auf das doppelte Volumen aufgefüllt und durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurde das Sediment mit Erypuffer (Zusammensetzung siehe unten) auf das doppelte Volumen aufgefüllt, durchmischt und 12 Min. bei 400 g und 4°C zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde einmal wiederholt, der Überstand abgesogen und die so gewonnenen Erythrozyten mit der zweifachen Menge phys. NaCl-Lösung verdünnt. 1 ml verdünnte Erythrozyten wurden mit 1 ml 4%ige Alginat-Lösung versetzt und auf dem Magnetrührer zu einer homogenen Lösung vermengt.

Der Erythrozytenpuffer setzte sich je Liter wie folgt zusammen (Einwaage für 280 mOsmol, pH 7,6):

Tris	50 mM	6,06 g
Hepes	50 mM	11,92 g
EDTA	2 mM	0,74 g
MgCl ₂	10 mM	2,03 g
CaCl ₂	10 mM	1,47 g
NaCl	33,2 mM	1,94 g
KCl	5 mM	0,37 g
Glucose	10 mM	1,98 g
humanes Serumalbumin	0,1%	1,0 g
		ad 1000 ml

2.3.4.5 Alginat-Lösung versetzt mit Erythrozytenhämolysat

Die gewonnenen Erythrozyten (siehe 2.3.4.4.) wurden mit dem gleichen Volumen an dest. Wasser versetzt und 1 Stunde in den Kühlschrank zum lysieren gestellt. Anschließend wurden die lysierten Erythrozyten 40 min. bei 15.000 U/pm

zentrifugiert (RC5C Ultrazentrifuge, Rotor SS-34, Fa. Du Pont). Nach der Zentrifugation war ein Bodensatz aus Membranbestandteilen und ein Überstand aus Erythrozytenhämolysat sichtbar. 1 ml des Überstandes wurde mit 1 ml 4%iger Alginat-Lösung versetzt und auf dem Magnetrührer zu einer homogenen Lösung vermischt.

2.3.5. Ansatz der Bariumchlorid-Lösung

Um eine gute Polymerisation des Alginates zu gewährleisten wurde eine 10 mM isoosmolare BaCl₂-Lösung (Fa. Merck; N° 1.01716) in NaCl verwendet. Vor Gebrauch wurde die Lösung autoklaviert.

2.3.6. Modifikationen der Bariumchlorid-Lösung

Die mit Eisen-II und Eisen-III modifizierten BaCl₂-Lösungen sollten eine Gesamtmolarität von 10 mmol haben, um eine optimale Komplexbildung der Alginat-Lösung mit den Bariumionen und einer Einlagerung der Eisenionen in die Hülle zu gewährleisten.

2.3.6.1. Bariumchlorid-Lösung versetzt mit Eisen II

Eisen(II)-gluconat Hydrat (Fa. Fluka, N° 44948) und BaCl₂ wurden in einem Molaritätsverhältnis von 1:2 (3,3 mmol Fe²⁺: 6,6 mmol BaCl₂) in phys. NaCl-Lösung gelöst. Die BaCl₂-Eisen-Lösung wurde mit Einmalfiltern in der Porengröße 0,2 µm sterilfiltriert und konnte auch als Vorratslösung angelegt werden.

2.3.6.2. Bariumchlorid-Lösung versetzt mit Eisen III

Die sterile Eisen-(III)-natrium-gluconat-Lösung (Fa. Nattermann & Cie. GmbH; Handelsname Ferrlecit®) wurde in zuvor autoklavierter 6,6 mmolarer BaCl₂-

Lösung gelöst. Die Menge der Eisen-III-Lösung wurde so berechnet, daß sich eine Molarität von 3,3 mmol in der Bariumchlorid-Lösung ergab.

2.3.7. Durchführung der Einkapsulierung

Auf das in 2.2.4. isolierte Inselfragment wurde ohne Zeitverzögerung die vorgeschriebene Menge sterile 2%ige Alginat- oder modifizierte Alginat-Lösung gegeben. Mit einer langen, sterilen Einmalkanüle (Fa. Ehrhardt-Söhne GmbH; N° 99-H-10) die auf einer Insulinspritze (Fa. Braun-Melsungen; N° 17086 D 0701) aufgesetzt war, wurden die Inseln mit der Alginat-Lösung durch vorsichtiges Rühren vermengt. Nach dem Homogenisieren wurde die Insel-Alginat-Suspension mit einer bzw. zwei Insulinspritzen aufgenommen, in den Perfusor eingespannt und an die Perfusorleitung angeschlossen.

Unter die Luftstromdüse wurde ein Magnetrührer mit einem darauf befindlichen autoklavierten Becherglas (150 ml) mit „Rührfisch“, welches zu ca. 2/3 mit BaCl₂- oder modifizierter BaCl₂-Lösung gefüllt war (Fällbad), gestellt (s. Bild 2 und 3). Der Abstand der Kanülenaustrittsöffnung zur Oberfläche des Fällbades variierte (siehe Tab. 1 in 3.1.).

Nach dem Zentrieren der Kanüle in der Luftstromdüse wurde der Luftdruck (siehe Tab. 1 in 3.1.), der an einem digitalen Luftdruckmeßgerät (Fa. Greisinger; N° GDH 12 AN) abgelesen werden konnte, eingestellt. Der Magnetrührer und der Perfusor wurden eingeschaltet. Die Insel-Alginat-Suspension wurde jetzt durch die Perfusorleitung in die Kanüle der Luftstromdüse gepreßt. Am Ende der Kanüle wurde die Suspension durch den Luftstrom in Tropfenform abgerissen und fiel in das durchrührte Fällbad, in der sich die Insel-Alginat-Tropfen zu einer elastischen Gelkugel verfestigten (sogenannte Mikrokapsel).

Die hergestellten Kapseln wurden so schnell wie möglich durch mehrmaliges Waschen mit RPMI 1640 Kulturmedium vom Fällbad gereinigt, da Bariumchlorid zelltoxisch wirkt. Anschließend wurden sie in 6-Well-Gewebekulturplatten (Fa. Sarstedt; N° 83.1839) überführt und in Kultur genommen. Die Kapselgröße wurde unter dem Mikroskop gemessen (siehe Tab. 1 in 3.1.).



Bild 4: Bariumalginat-Kapsel mit neonataler Ratteninsel

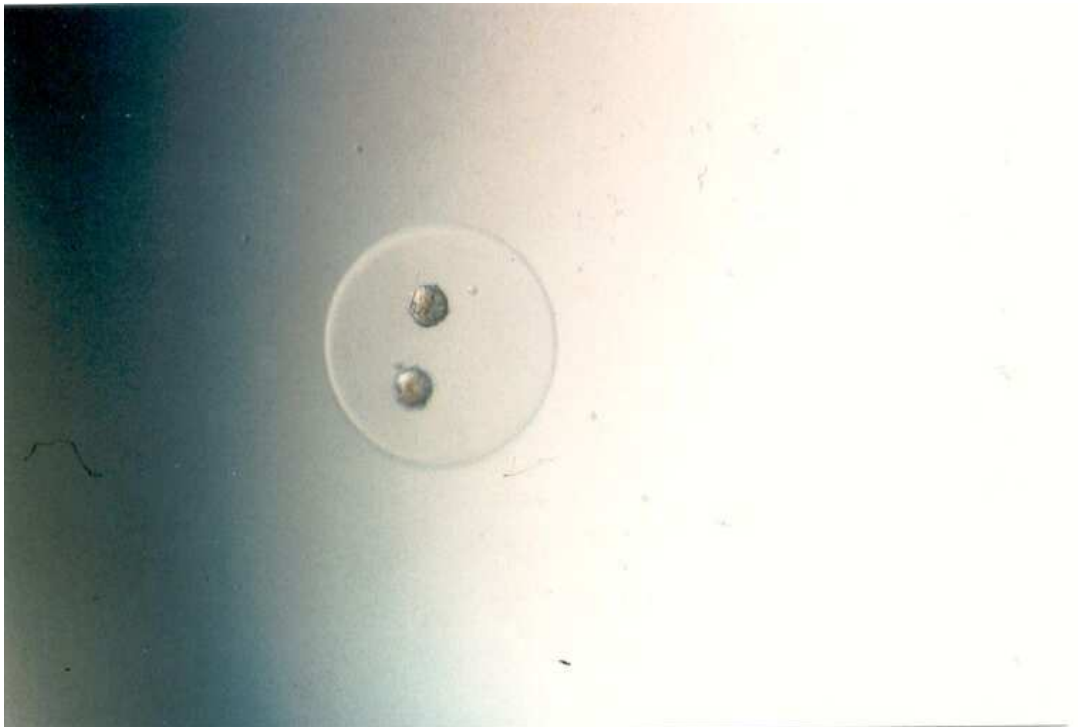


Bild 5: Barium-Eisen-II-Alginat-Kapsel mit zwei neonatalen Ratteninseln

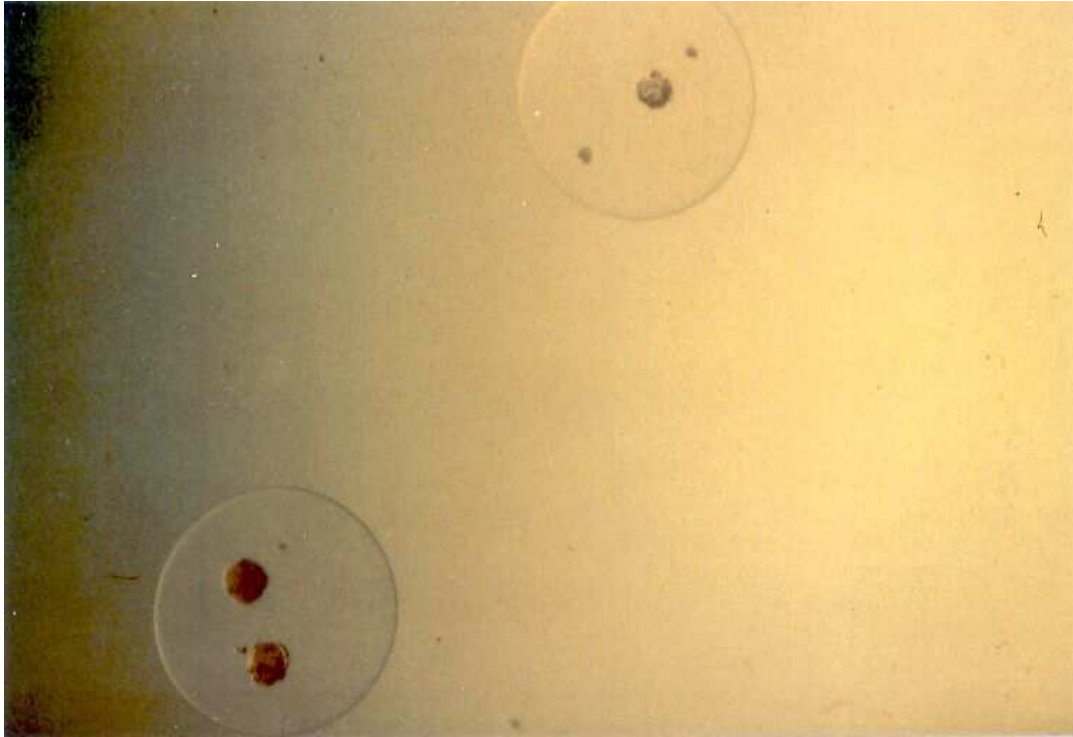


Bild 6: Bariumsalginat-Albumin-Kapseln mit neonatalen Ratteninseln

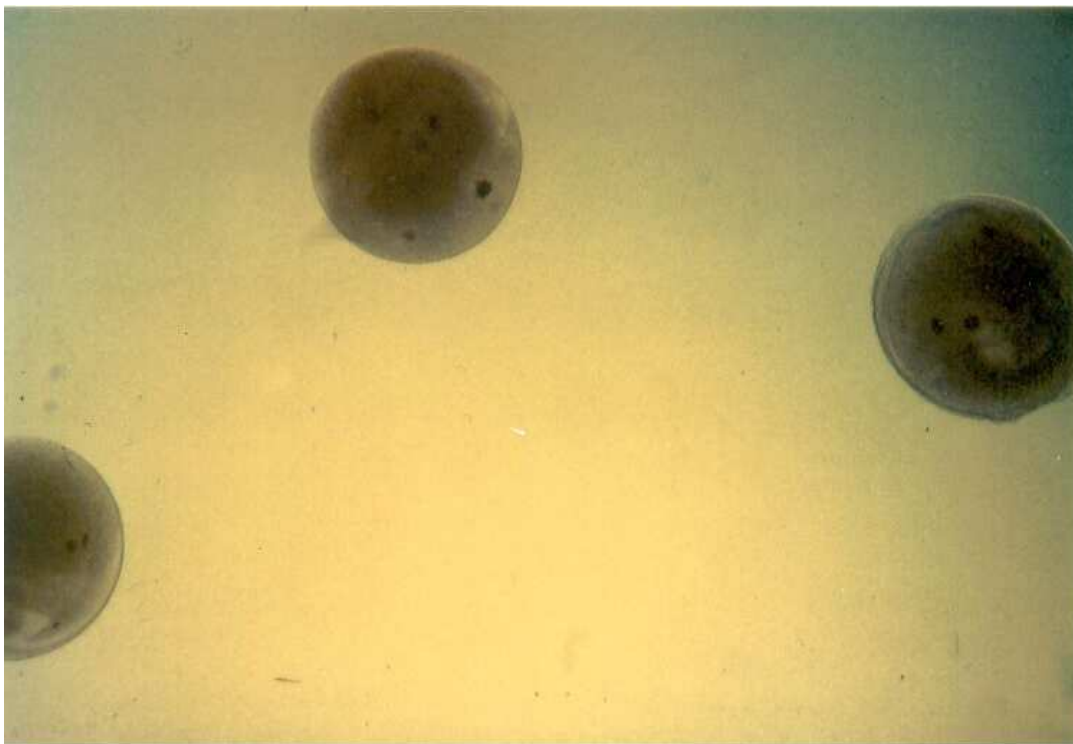


Bild 7: Bariumsalginat-Hämoglobin-Kapsel mit neonataler Ratteninsel

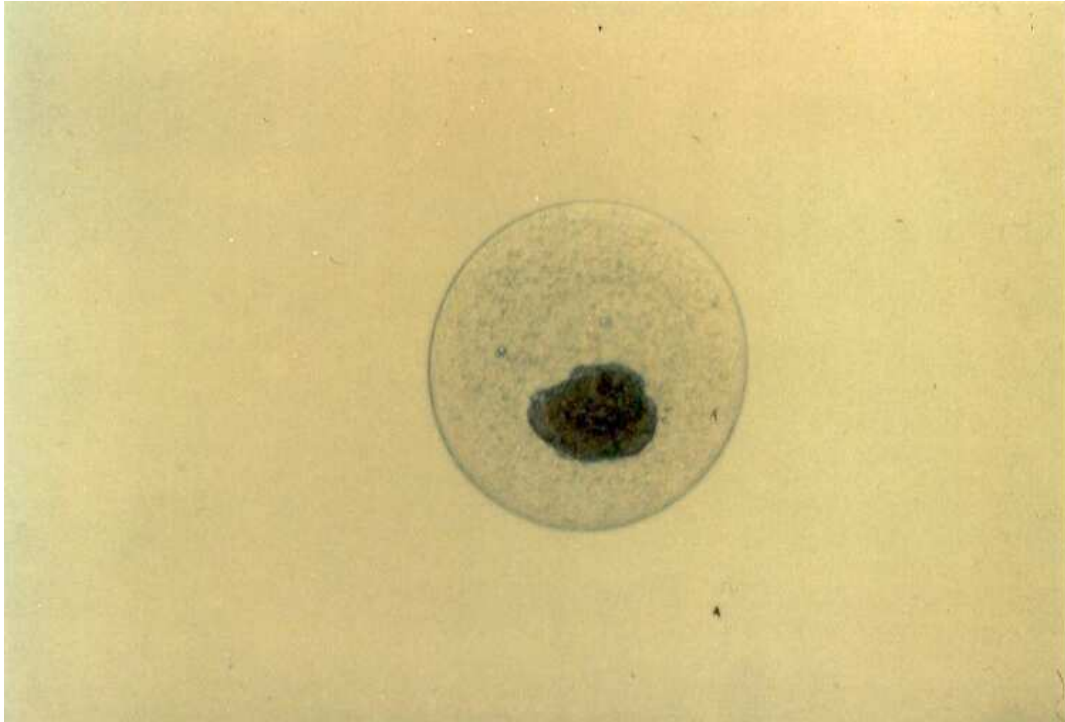


Bild 8: Bariumalginat-Transferrin-Kapsel mit großer neonataler Ratteninsel

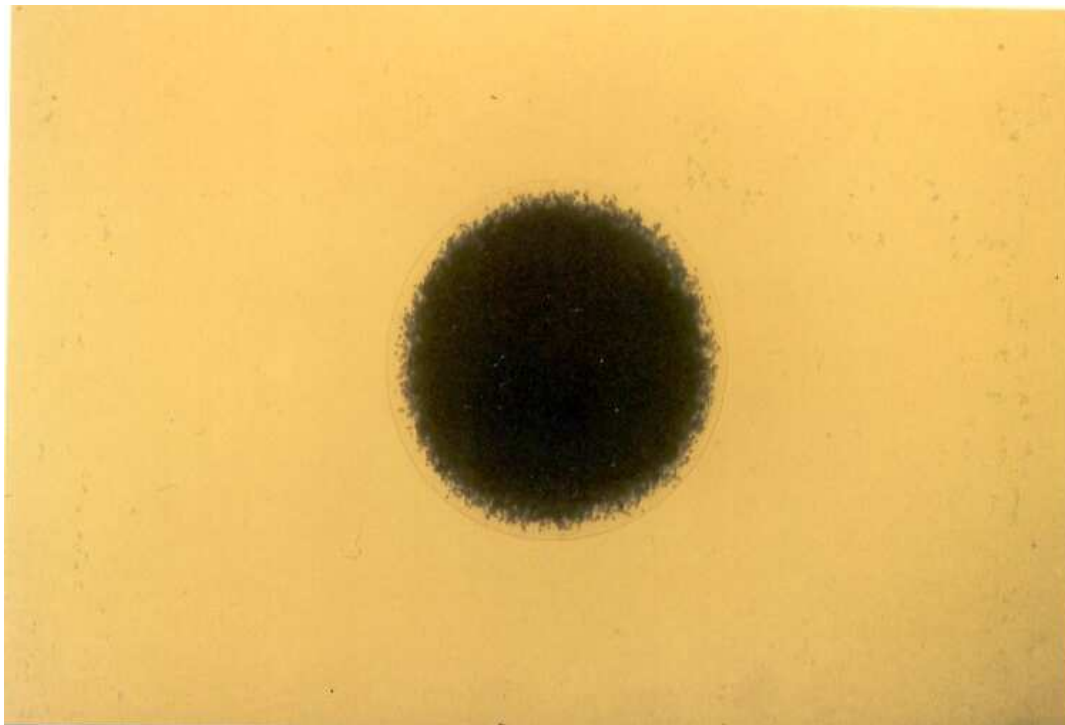


Bild 9: Bariumalginat-Erythrozyten-Kapsel

Bild 4-9 wurden unmittelbar nach dem Herstellungsprozeß aufgenommen.

2.4. Kultivierung

Nach dem mehrmaligen Waschen mit dem Kulturmedium RPMI 1640 (Zusammensetzung siehe unten) wurde jedes Well der Gewebekulturplatten mit ca. 30-50 Mikrokapseln und 2 ml Kulturmedium befüllt. Die Gewebekulturplatten wurden bei 37°C in normaler Luftatmosphäre im Brutschrank (Fa. Heraeus; Typ B 5061, EK-02) belassen. Jeden zweiten Tag wurde 1 ml Kulturmedium durch 1 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

Das Kulturmedium RPMI 1640 setzte sich wie folgt zusammen (Angaben pro Liter):

- RPMI 1640 Pulver Instamed 14,39 g/l; ohne NaHCO₃, mit 100 mg/dl D-Glucose und 25 mM Hepes
(Fa. Seromed/Biochrom; N° TZ 121-B; Lot Nr. X 073; Sonderanfertigung)
- 10 mg Penicillin-Streptomycin (10.000 IU/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)
(Fa. Boehringer Mannheim; N° 210 404)
- 5 ml Ciprobay 200-Infusionslösung (10 mg Ciprofloxacin)
(Fa. Bayer; Leverkusen)
- 100 ml fötales Kälberserum
(Fa. Vitromex; N° 1000500)
- 10 ml L-Glutamin, Stammlösungskonz.: 30 g/l
(Fa. Gibco BRL; N° 21051-018; Lot Nr. 71 Q 4552)
- reinst H₂O

Der pH-Wert wurde durch Titration mit HCL bzw. NaOH (jeweils 1 Mol/l) auf den gewünschten Wert von 7,3 eingestellt.

2.5. Funktionstest

Um die Vitalität neonataler Ratteninseln unter gegebenen Kulturbedingungen zu beurteilen, wurde am 4. und 5. sowie vier Wochen später am 32. und 33. Tag nach der Inselisolierung ein standartisierter Funktionstest durchgeführt.

Dabei wurde so verfahren, daß eine Hälfte der enkapsulierten Inseln für jeweils 24

Stunden zunächst in 2 ml RPMI 1640 Kulturmedium, versetzt mit 100 mg/dl Glucose (Basalmedium), und anschließend 24 Stunden in 2 ml RPMI 1640 Kulturmedium, versetzt mit 300 mg/dl Glucose und 2,2 mg/dl 3-Isobuthyl-1-Methylxanthin (Fa. Sigma; N° 17018)(Stimulationsmedium), inkubiert wurde. Mit der anderen Hälfte der enkapsulierten Inseln wurde umgekehrt verfahren. Die Reihenfolge wurde hierbei randomisiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde aus jedem Well der Gewebekulturplatten 2 Portionen Testmedium zu je 300 µl in Eppendorf-Caps pipettiert und bis zur Insulinbestimmung (s. 2.6.) bei -30°C eingefroren.

2.6. Insulinbestimmung

Die Bestimmung des Insulingehaltes im basalen und stimulierten Kulturmedium wurde mit dem Radioimmunoassay der Firma Biochem Immunosystems (Insulin Kit, 125 Tubes/Kit, Code 10624) durchgeführt.

Das Testprinzip beruht darauf, daß unmarkiertes Antigen (Probeninsulin) und radioaktiv markiertes Antigen um die Antikörperbindungsstellen eines spezifischen Antikörpers konkurrieren. Je mehr unmarkiertes Antigen im Komplex vorhanden ist, desto weniger markiertes Antigen wird gefunden.

Die Trennung von freiem und gebundenem Antigen erfolgte mittels dextran-beschichteter Holzkohle (25 ml/Insulin-Kit), die als Phosphat gepufferte Lösung eingesetzt wurde.

25 ml Holzkohle-Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

- 25 ml Na-P-Puffer (59,3 mg Na_2HPO_4 + 92,0 mg NaH_2PO_4 ad 25 ml Aqua dest,
pH 6,5)
- 0,50 ml GIP-freies Plasma
- 0,25 ml Trasylol (200.000 KIE. Aprotinin pro 10 ml Ampulle)
- 62,5 mg Dextran T 70 (Fa. Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden)
- 312,5 mg Holzkohle (Fa. Serva; Aktivkohle)

Das entstandene Holzkohlesediment wurde abzentrifugiert und mit dem Überstand das gebundene Antigen abgesaugt. Die Radioaktivität des im Röhrchen verbliebenen

Niederschlags wurde in einem Gammacounter gemessen. Ein angeschlossener Computer berechnete daraus anhand der Standardreihe die komplementäre Insulin-konzentration der Proben und gab sie in $\mu\text{U/ml}$ an.

2.7. Histologie

2.7.1. Fixierung

Nach Beendigung des letzten Funktionstestes am 33. Tag wurden die Mikrokapseln in einem 50 ml Falconröhrchen gesammelt, das restliche Kulturmedium abgesaugt und anschließend mit mehreren Millilitern 2%iger Alginatlösung (kann unsteril sein) überschichtet und vermengt.

Mit einer Pipette (1 ml), deren Spitze abgeschnitten wurde, wurde die Alginatlösung mit den darin befindlichen Mikrokapseln aufgenommen und große Tropfen in ein Becherglas mit BaCl_2 -Lösung (10 mmolar) pipettiert. Es bildeten sich ca. 5 mm große festelastische Kugeln (Makrokapseln). Die Makrokapseln mit den darin befindlichen Mikrokapseln wurden nach ca. 30 Sekunden aus der BaCl_2 -Lösung genommen und 24 Stunden in 4 %iger gepufferter Formaldehyd-Lösung (Fa. Merck; N° 1.03999.1000) fixiert.

Nach der Fixierung wurden die Makrokapseln kurz mit Leitungswasser gespült, in ein Flies eingewickelt und danach in einem Tissue-Tek (Fa. Miles; N° 4157) eingeschlossen. Die Tissue-Teks kamen in die Histokinette, in der die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe und Histol über 12 Stunden entwässert wurden. Die entwässerten Makrokapseln wurden aus den Tissue-Teks und dem Flies genommen und in Paraffin eingebettet. Ca. 6-8 Makrokapseln befanden sich in einem Paraffinblock, die bis zum Schneiden (s. 2.7.2.) in einem Kühlschrank aufbewahrt wurden.

2.7.2. Schneiden

Die in einem Paraffinblock eingebetteten Makrokapseln wurden mit einem

Mikrotom (Fa. Vogler; N° AS 500) geschnitten. Es wurden 3,5 µm dünne Schnitte angefertigt, die auf mit Poly-L-Lysine Lösung (Fa. Sigma; N° 8920) beschichtete Objektträger gezogen wurden. Die Schnitte wurden getrocknet und anschließend wie unter 2.7.3. beschrieben gefärbt.

2.7.3. Färben

Die geschnittenen Makrokapseln auf den Objektträgern wurden zur Vitalitätsbestimmung der enkapsulierten neonatalen Ratteninseln mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Hämatoxylin als positiv geladener Farbstoff ist geeignet basophile Strukturen wie Zellkerne und Alginat blau zu färben. Eosin färbt das azidophile Zytoplasma blaßrot.

Verwendete Lösungen und Materialien:

1. Rotihistol (Fa. Roth; N° 2-6640)
2. Isopropanol (70 %, 96 %, 100 %)
3. saures Hämalaun nach Mayer (Fa. Merck; N° 9249)
4. Eosin G: 1%ige Lösung (Fa. Merck; N° 15935)
5. Entellan (Fa. Merck; N° 7961)

Durchführung:

- Entparaffinieren in 3 Portionen Histol á 10 Minuten
- Absteigende Alkoholreihe, insgesamt 10 Minuten
- Spülen in destilliertem Wasser
- Hämalaunfärbung: 3 Minuten
- Spülen unter fließendem Leitungswasser
- Eosinfärbung: 60 Sekunden
- Spülen unter fließendem Leitungswasser
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe, insgesamt 2 Minuten
- Histol: 5 Minuten
- Eindecken mit Entellan

2.7.4. Mikroskopie und Photographie

Die Vitalitätsbestimmung der neonatalen Ratteninseln wurde unter einem Mikroskop der Marke Olympus (N° 20 27 91) vorgenommen. Einige der Inseln wurden mit einer Kamera (Olympus; N° OM 2N) fotografiert, die an einem inversen Forschungsmikroskop (Olympus IMT-2; N° 23 056) installiert war.

2.7.5. Vitalitätsbestimmung der verkapselten Inselzellen

Zur Vitalitätsbestimmung der verkapselten Inselzellen wurde bei der Mikroskopie der mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Inseln ein histologischer Vitalitätsscore angewandt. Dabei wurden die entsprechenden Flächenanteile der vitalen Einzelzellen im Inselverband mit 100 %, die mit pyknotischem Zellkern und/oder herausgelöstem Zytoplasma mit 50 % und die Flächenanteile nekrotischer Zellen mit 0 % Vitalität bewertet. Die Gesamtvitalität wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtvitalität [\%]} = x \% \cdot 100 + y \% \cdot 50 + z \% \cdot 0$$

x = Fläche der ungeschädigten, vitalen Zellen mit intakter Chromatinstruktur der Zellkerne

y = Fläche der Zellen mit pyknotischem Zellkern und/oder herausgelöstem Zytoplasma

z = Fläche der nekrotischen Zellen mit fehlendem Zellkern

2.8. Statistische Analyse

Als Rohdaten lagen die Werte der gemessenen Insulinsekretionen [$\mu\text{U}/24\text{h}/\text{well}$] unter Basal- bzw. Stimulationsbedingungen vor. Aus diesen wurde für jede Versuchsgruppe der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und der

Standardfehler des Mittelwertes (SEM) bestimmt. Die Stimulierbarkeit wurde als Änderung der Sekretionsleistung in Prozent der Basalsekretion nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Stimulierbarkeit} = \frac{\text{Stimulationswert} - \text{Basalwert}}{\text{Basalwert}} \times 100$$

Aus den ermittelten einzelnen Stimulierbarkeitswerten wurden wiederum der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet. Die so ermittelten Daten wurden, wenn es sich um verbundene Stichproben handelte mittels Student's t-test paired und wenn es sich um nicht verbundene Stichproben handelte mittels Student's t-test unpaired auf Unterschiedlichkeit geprüft. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einer Abweichung von $p < 0,05$ festgelegt.



Bild 10: Bariumalginat-Albumin-Kapsel mit vitalen neonatalen Ratteninseln



Bild 11: Bariumalginat-Hämoglobin-Kapsel mit vitalen neonatalen Ratteninseln

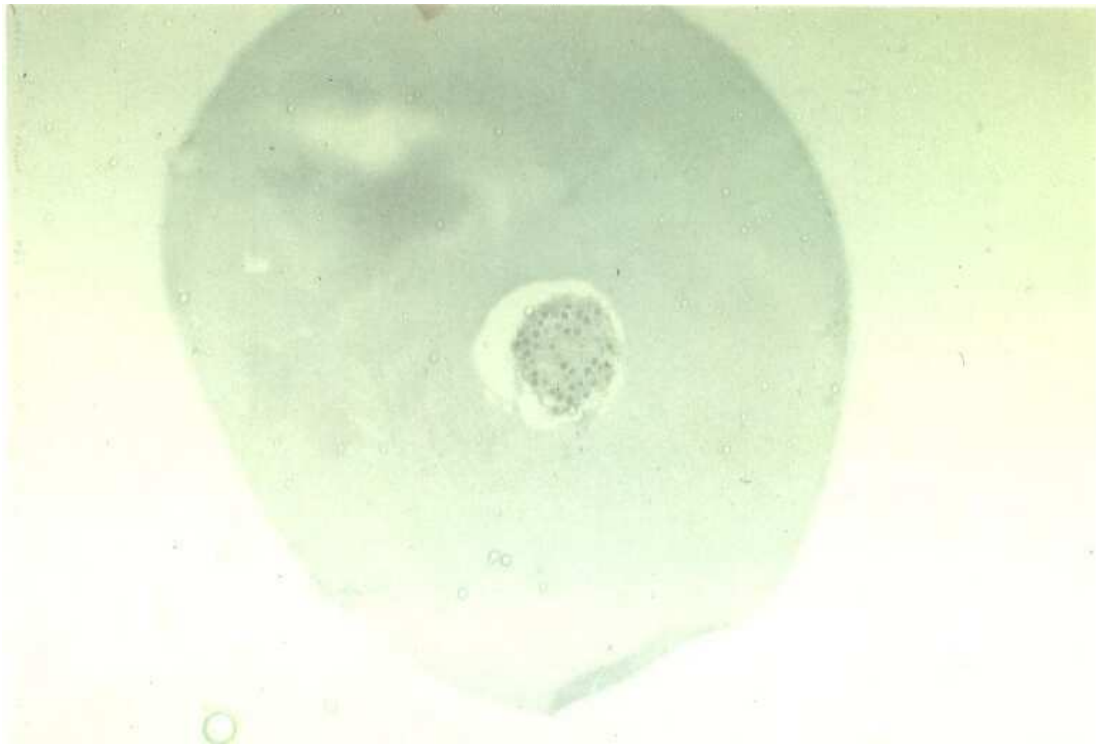


Bild 12: Barium-Eisen-III-Alginat-Kapsel: Insel mit beginnender Zentralnekrose



Bild 13: Bariumalginat-Erythrozytenhämolysat-Kapsel: Insel mit fortgeschrittener Zentralnekrose (Vitalität ca. 15%)

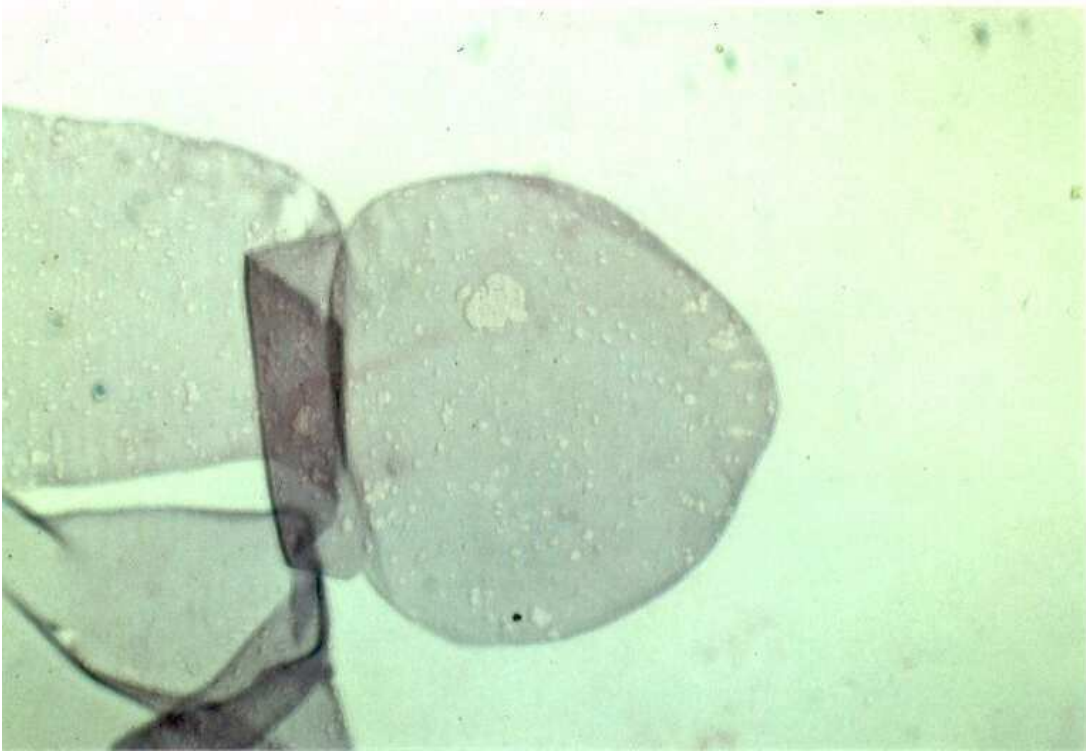


Bild 14: Bariumalginat-Transferrin-Kapsel: Nekrotische Insel und massive Vakuolenbildung



Bild 15: Bariumalginat-Erythrozyten-Kapsel mit massiver Bildung kleinster Vakuolen