

## 4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob Eisen in molekularer Form oder eingebunden in bestimmte körpereigene Proteine zu einer Verbesserung der Funktion und Vitalität mikroenkapsulierter neonataler Langhans'scher Ratteninseln führt. In Anlehnung an die Arbeit von Velten [1], der die Alginatmatrix mit humanem Hämoglobin modifiziert hatte und zu einer deutlichen Verbesserung der Funktion und Vitalität neonataler Ratteninseln gekommen war, wurde in dieser Arbeit das Modifikationsspektrum der Alginatmatrix um einige Stoffgruppen erweitert. Im folgenden wurden die Kationen  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ , die Proteine Transferrin und Hämoglobin sowie humane Erythrozyten bzw. humanes Erythrozytenhämolysat als Agens für die Modifikation der Alginatmatrix verwendet.

Als Kontrollgruppe dienten enkapsulierte neonatale Ratteninseln, deren Alginatmatrix nicht modifiziert wurde (Bariumalginat). Die Modifikation der Alginatmatrix mit dem nicht Eisen beinhaltenden Protein Albumin stellte die Proteinkontrolle dar (Bariumalginat-Albumin).

Es gibt unterschiedliche Wirkungsmechanismen, die die einzelnen Moleküle, Proteine und Blutbestandteile auf die enkapsulierten Ratteninseln ausüben können:

1. Die Abgabe von Sauerstoff
2. Unspezifische Proteineffekte
3. Die katalytische Funktion des Eisens

Anhand folgender Parameter sollte versucht werden zu klären, ob einer, mehrere oder alle Wirkungsmechanismen zu einer Verbesserung der Funktion und Vitalität der neonatalen Ratteninseln geführt haben können:

1. Absolute Insulinsekretion
2. Verlauf der Insulinsekretion über 28 Tage

3. Stimulierbarkeit nach 1 Woche und nach 4 Wochen

4. Vitalität nach insgesamt 33 Tagen in Kultur

Bei Betrachtung der absoluten Insulinsekretion nach 1 wöchiger und der absoluten Insulinsekretion nach 4 wöchiger Kultivierungsdauer (s. Abb. 10) wurde deutlich, daß die absolute Insulinsekretion der 4 Woche bei einigen Kapseltypen um das bis zu 10-fache niedriger war als die Werte in der 1 Woche. Dies war besonders deutlich bei der Kontrollgruppe Bariumalginat und der mit Kationen modifizierten Fällbadgruppen  $Fe^{2+}$  und  $Fe^{3+}$ . Wie ist dieses zu erklären? Es ist anzunehmen, daß es innerhalb der Kultivierungsperiode zu einer mehr oder minder starken Lyse vieler Langerhans'scher Inselzellen gekommen war. Die Inseln waren während der Explantation, der Digestion, der Reinigung und der Enkapsulierung starken mechanischen (durch Schütteln per Hand, zentrifugieren, enkapsulieren) und enzymatischen (durch die Collagenase) Belastungen ausgesetzt. Es ist nicht auszuschließen, daß hierdurch ein nicht unerheblicher Teil an Zellen einen irreparablen Schaden genommen hat und im Laufe der Tage, auch noch weit über den 1 Funktionstest hinaus, zugrunde gegangen ist. Unterstützt wird diese Aussage durch die Stimulierbarkeitswerte (s. Abb. 11). In der 1 Woche war die Stimulierbarkeit bei allen Kapseltypen nicht sehr hoch, da sie durch das aus den lysierten Zellen ausgetretene Insulin verdeckt wurde. Nach 4 Wochen dürfte die Lyse nur noch sehr gering gewesen sein, wenn überhaupt noch vorhanden. Das ausgetretene Insulin ist aus den Kapseln hinausdiffundiert und war durch den ständigen Wechsel des Kulturmediums nicht mehr vorhanden. Die übriggebliebenen funktionstüchtigen und vitalen Inseln zeigten daraufhin in der 4 Woche eine weitaus bessere Stimulierbarkeit als in der 1 Woche. Erschwerend kam hinzu, daß die Inseln vom Zeitpunkt der Entnahme aus dem Spendertier bis zur Kultivierung eine hypoxische Zeitspanne von ca. 3-5 Stunden zu überstehen hatten. Die Gesamtzahl der Inseln war nach 4 Wochen stark zurückgegangen. Dies spiegelte sich in den Vitalitätswerten (s. Abb. 12) wieder.

Wie schon erwähnt erzielte Velten deutlich bessere Ergebnisse in den Insulinsekretionswerten und in der Vitalität durch Zugabe von Hämoglobin in die Alginatematrix. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit nur zum Teil reproduziert werden.

Die Insulinsekretion der mit Hämoglobin enkapsulierten neonatalen Ratteninseln war im Vergleich zur Kontrollgruppe Bariumalginat außer in der 1 Woche basal signifikant höher. In der 4 Woche waren die Werte um das 2-3 fache höher (s. Abb. 10). In der Stimulierbarkeit und in der Vitalität gab es jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von Velten keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 11 u. 12). Es gibt mehrere Punkte zu bedenken, die diesen Unterschied erklären könnten. Velten benutzte Hohlfasermembranen in denen in Hämoglobinalginat suspendierte neonatale Ratteninseln enkapsuliert waren. Da das Alginat nicht durch Kationen stabilisiert wurde, ist das Hämoglobin im Alginat mobiler gewesen und konnte so Kontakt zum Inselgewebe herstellen und seine positive Wirkung auf die Zellen ausüben. In dieser Arbeit war das Hämoglobin fest in die Kationen-Polysaccharidstruktur eingefügt und hatte daher größere Schwierigkeiten Kontakt zum Inselgewebe herzustellen. Alginat-Kapseln haben gegenüber Hohlfasermembranen gewisse Vorteile, wie einen geringeren Totraum, eine geringere Diffusionsstrecke und eine relativ große Oberfläche in Relation zum Volumen, aber diese Vorteile sind anscheinend nicht zum Tragen gekommen.

Ein weiterer Punkt ist das Hämoglobin selbst. Velten benutzte zwar auch ein Humanhämoglobin-Trockensubstrat, es ist aber höchstwahrscheinlich anders hergestellt und behandelt worden als das in dieser Arbeit verwendete. Dieses konnte jedoch nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden.

Mit vielen Schwierigkeiten war auch die Herstellung der Hämoglobin-Kapseln verbunden. Beim Vermengen des gelösten und filtrierten Hämoglobins mit dem Alginat kam es zu einer leichten Aufschäumung. Durch 24 stündiges Ruhen konnte die Lösung entgasen. Trotzdem kam es beim Herstellungsprozeß immer wieder zum

Verklumpen einiger Kapseln und die Form der meisten Kapseln war oval bis tropfenförmig.

Inwieweit die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen des Hämoglobins zu einer Verbesserung der Insulinsekretionsleistung geführt haben, konnte mit dieser Arbeit nicht geklärt werden. Velten und Vreden [2] haben gezeigt, daß eine alleinige Verbesserung der Sauerstoffversorgung durch das Hämoglobin ausgeschlossen werden kann. Da Hämoglobin aufgrund seiner hohen Konzentration und seiner Histidylreste ein sehr wichtiges Puffersystem darstellt, ist anzunehmen, daß es seinen Sauerstoff durch die sich entwickelnde Laktatazidose im Sinne des Bohreffektes [14] abgab und gleichzeitig Protonen und Kohlendioxid aufgenommen hat. Somit wurden die Inseln vor hypoxisch bzw. azidotisch bedingten Zellschäden bewahrt. Ob dieser Effekt jedoch ausreicht, die Vitalität und Funktion der Inseln zu verbessern, scheint fraglich. Es gibt sicherlich noch andere unspezifische Proteineffekte die mit ausschlaggebend sind.

Diese Theorie unterstützt das nicht Eisen beinhaltende Protein Albumin. Da Albumin eine wesentlich geringere Pufferkapazität als Hämoglobin hat [1], muß hier vor allem ein unspezifischer Proteineffekt angenommen werden. Die Albumin-Kapseln wiesen in ihrer absoluten Insulinsekretion in der 1 Woche nahezu die gleichen Werte wie die der Bariumalginat-Kapseln auf. In der 4 Woche jedoch waren die Werte um das 2-3 fache gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höher. Die Stimulierbarkeit wies ebenfalls einen signifikant höheren Wert auf. In der Vitalität hatte Albumin mit 32,5 % den höchsten Wert aller Kapseltypen. Sie war zwar nicht signifikant höher als die der Bariumalginat-Kapseln. Es zeigt sich aber, daß die Zugabe von Albumin zum Alginat eine durchaus positive Wirkung auf die Funktion und Vitalität enkapsulierter neonataler Ratteninseln hat. Ähnliche Studien haben ergeben, daß schon bei der Digestion der Pankreata eine 10%ige Zugabe von Albumin zum Digestionsmedium die proteolytischen Substanzen aus dem exokrinen Gewebe unterdrückt wurden und die gewonnene Inselanzahl erhöht

wurde [3]. Zugleich verbessert Albumin den Schutz der Inseln [4]. Ebenfalls steigert es im Kulturmedium das Überleben von nicht enkapsulierten Ratteninselzellen [5] und verbessert deren Insulinsekretion [6].

Gänzlich andere Ergebnisse wurden bei den Transferrin-Kapseln ermittelt. Bei allen gemessenen Parametern zeigte dieser Kapseltyp durchweg schlechtere Ergebnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe Bariumalginat. Besonders die absolute Insulinsekretion in der 1. Woche und die Vitalität waren signifikant niedriger. Die ermittelte Vitalität von 10,9 % war die niedrigste aller Kapseltypen überhaupt. Im histologischen Schnitt durch eine Transferrin-Kapsel (s. Bild 14) ließ sich erkennen, daß es zu einer massiven Bildung kleinster Vakuolen gekommen war. Diese feinen Vakuolen waren gleichmäßig über die Schnittfläche verteilt und ließen die Kapsel wie ein feinschwammiges Gebilde aussehen. Transferrin hat ein Molekulargewicht von 90.000 und liegt damit über dem anderthalbfachen von Hämoglobin. Aufgrund der Größe der Moleküle erscheint es möglich, daß es nicht zu einer Einbindung in die Bariumionen-Polysaccharidstruktur des Alginates gekommen war, sondern zu einer Zusammenballung der Moleküle und somit zum Entstehen der Vakuolen geführt hat. Auf die Diffusion von Sauerstoff und Nahrungsstoffen aus dem umgebenden Kulturmedium hat die Vakuolenbildung vermutlich negative Auswirkungen in der Versorgung der neonatalen Ratteninseln. Zusätzlich bewirkt Transferrin im Kulturmedium nicht enkapsulierter Ratteninselzellen keine Aufrechterhaltung der Glucose induzierten Sekretion und verbessert nicht die Insulinsekretion [6].

Im Gegensatz zu einem Hämoglobinmolekül, welches 4 zweiwertige Eisenionen enthält, besitzt ein Transferrinmolekül 2 dreiwertige Eisenionen. Beim Vergleich der Ergebnisse des Transferrin-Kapseltyps mit den Ergebnissen des Eisen-III-Kapseltyps war auffällig, daß sie nahezu identisch sind. Die absolute Insulinsekretion in der 1. Woche und die Vitalität waren, wie schon beim Transferrin, signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe. Die Stimulierbarkeit unterschied

sich nicht. Da ein unspezifischer Proteineffekt, wie er beim Hämoglobin vermutet wird, beim Transferrin nicht vorhanden war oder nicht zum Tragen gekommen ist, hat sich offensichtlich die dreiwertige Form des Eisens negativ auf die Funktion und Vitalität der Ratteninseln ausgewirkt. Einmalige Injektionen von  $\text{Fe}^{3+}$ -Nitrilotriacetat in Ratten hatten z.B. innerhalb kürzester Zeit einen toxischen Effekt auf den Glucosemetabolismus [7] und wiederholte Injektionen führten nach längerer Zeit zu einer Schädigung und zum teilweisen Absterben der Inselzellen [8]. Eine andere Studie besagt, daß sich Eisen ungünstig auf die Funktion von Ratteninseln auswirkt und in der Ätiologie der Hämochromatose als ein Auslöser für den sogenannten Bronzediabetes gilt [9].

Etwas bessere Ergebnisse wurden bei der Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$ -Kationen in die Alginatematrix erreicht. Die Insulinsekretionswerte und die Stimulierbarkeit unterschieden sich jedoch nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe. Die Vitalität war zwar geringer als die der Bariumalginate-Kapseln, unterschieden sich aber nicht signifikant voneinander. Vorhergehende Studien kamen zu den gleichen Ergebnissen. Eine Inkubation des Kulturmediums nicht enkapsulierter Ratteninseln mit Eisensulfat ( $\text{FeSO}_4$ ) bewirkte ebenfalls keine signifikante Änderung der basalen Insulinsekretion, aber eine Abnahme der Glucose stimulierten Sekretion [10]. Beim Vorhandensein von  $\text{Fe}^{2+}$ -Kationen im Kulturmedium stellte sich keine Änderung der basalen Insulinsekretion ein, sondern eine Reduktion der Glucose stimulierten Hormonausschüttung (Gluthation) [11]. Alle gewonnenen Erkenntnisse in dieser Arbeit und in den erwähnten Studien zeigen somit die Tendenz, daß eine Modifizierung des Fällbades mit Eisenionen im Hinblick auf die Funktion und Vitalität enkapsulierter neonataler Ratteninseln nicht erfolgversprechend zu sein scheint. Der katalytische Effekt des Eisens im Hinblick auf eine beschleunigte Anbindung und Weitergabe von Sauerstoffmolekülen zu den Inseln und auch der oxidative Effekt des Eisens sind in keinsten Weise erkennbar geworden. Beim Vergleich der Ergebnisse der Eisen-II-Kapseln mit den Ergebnissen der

Hämoglobin-Kapseln liegt außerdem die Erkenntnis nahe, daß sie, da sie keine Proteinkomponente besaßen, die Theorie des unspezifischen Proteineffektes unterstützen.

Am technisch aufwendigsten war der Herstellungsprozeß der Erythrozyten- bzw. Erythrozytenhämolysat-Kapseln. Hier mußte die Gewinnung der Erythrozyten und die Isolation der neonatalen Ratteninseln parallel ablaufen, um eine unnötige Verlängerung der Hypoxiezeit zu verhindern. Da die hergestellten Kapseln intensiv rot erschienen, war es nicht möglich unter dem Mikroskop Inseln in den Kapseln zu begutachten (s. Bild 9). Die beiden Kapseltypen waren in ihren Ergebnissen sehr unterschiedlich. Während die Erythrozyten-Kapseln in der absoluten Insulinsekretion in der 1. Woche signifikant niedriger und in der 4. Woche stimuliert signifikant höher waren, wiesen die Erythrozytenhämolysat-Kapseln in der 1. wie in der 4. Woche signifikant höhere Ergebnisse gegenüber der Kontrollgruppe auf. Die Vitalitätswerte der Erythrozyten-Kapseln waren sichtbar geringer als die der Erythrozytenhämolysat-Kapseln, trotzdem unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Bei der histologischen Betrachtung einer Erythrozyten-Kapsel ist das gleiche Phänomen wie bei den Transferrin-Kapseln zu entdecken. Es kam zu einer massiven Bildung kleinster Vakuolen im Alginat (s. Bild 15). Die humanen Erythrozyten, mit einer Größe von 7-9 µm wesentlich größer als ein Albumin- oder Hämoglobinmolekül, verteilten sich anscheinend nicht gleichmäßig im Alginat, sondern ballten sich wie beim Transferrin in kleinen Vakuolen zusammen. In diesen Vakuolen war ein Großteil der Erythrozyten hämolytisch und nekrotisch. Da die Lebensdauer der Erythrozyten ca. 120 Tage beträgt, geht schon in den ersten Tagen ein erheblicher Prozentteil aufgrund seines Alters zugrunde. Die Lebensdauer der verbleibenden jungen, vitalen Erythrozyten wurde verkürzt, da, wie schon beim Transferrin zu vermuten, die schwammige, poröse Struktur des Alginates ein Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen behindert. Erschwerend kommt hinzu, daß enkapsulierte Erythrozyten ein Glucose-

verbrauch haben, der  $\frac{1}{3}$  höher ist als normal [12]. Ebenfalls problematisch für die Versorgung der Inseln mit Sauerstoff ist das in den Erythrozyten vorkommende Hämoglobin. Es war weniger geeignet als das käuflich zu erwerbende Humanhämoglobin-Trockensubstrat, da es eine wesentlich geringere Sauerstoffaffinität hat. Diese wird durch ein in den Erythrozyten vorkommendes Molekül, 2,3-Biphosphoglycerat, welches sich ans Hämoglobin bindet, gesenkt [13, 14].

Versuche mit enkapsulierten Erythrozyten in Alginat-Chitosan-Polyethylen Glycol Kapseln haben gezeigt, daß es hier ebenfalls zu einer, jedoch geringeren Hämolyse gekommen war, aber auch zu einer verbesserten Stabilität und Biokompatibilität [15]. Reines Bariumalginat ist somit nicht als optimal für die Verkapselung mit Erythrozyten anzusehen. Zu bedenken ist auch, daß die Inhaltsstoffe der hämolysierten Erythrozyten aus den Kapseln hindusdiffundieren können und einen Pool an Antigenen darstellen [17]. Als Kapseltransplantat würde es in einem Körper zu einer nicht unerheblichen Immunantwort kommen. Zwar sind die enkapsulierten Erythrozyten und somit auch die Inseln gegen die hämolytische Aktivität von Ig G und Komplementfaktoren geschützt [16], aber durch die starke Immunantwort würde es zu einer vermehrten Ausbildung von Fibrosegewebe rund um die Kapseln und somit zu einer weiteren Verschlechterung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung kommen.

Sehr zurückhaltend waren auch die Ergebnisse der Erythrozytenhämolysat-Kapseln zu bewerten. Ca 1-2 Stunden nach der Kapselherstellung kam es zu einer sichtbaren Entfärbung der Kapseln. Zuerst ging die Entfärbung sehr schnell voran, mit zunehmender Zeit wurde es immer weniger. Nach einer Woche waren die Kapseln vollständig entfärbt und hatten danach ein milchig weißes, trübes Aussehen. Da das Hämoglobin bzw. die im Hämoglobin enthaltene prosthetische Gruppe Häm für die rötliche Färbung und die Sauerstoffbindung verantwortlich ist, muß davon ausgegangen werden, daß das Hämoglobin nahezu vollständig aus den Kapseln hindusdiffundiert ist und es dadurch nicht zu einer Verbesserung der Sauerstoff-



versorgung kommen konnte. Warum es zu dieser Entfärbung gekommen ist, konnte mit dieser Arbeit nicht geklärt werden. In einer vorangegangenen Studie wurde hämolysiertes Vollblut (rote und weiße Blutkörperchen) mit Alginat vermengt, Kapseln hergestellt und über einen Zeitraum von 24 Tagen kultiviert [2]. Hier zeigte sich keine Entfärbung. Da die Konzentration des Alginates, die Sterilfiltration und die Herstellung der Kapseln identisch mit dieser Arbeit waren, gab es möglicherweise Unterschiede im verwendeten Alginat.

Wie schon erwähnt, hatten die Erythrozytenhämolysat-Kapseln signifikant höhere Insulinsekretionsergebnisse. Wie ist dieses zu erklären? Eine Verbesserung der Funktion und Vitalität der Inseln war nicht anzunehmen, da die niedrige Stimulierbarkeit und die nicht signifikant geringere Vitalität der Erythrozytenhämolysat-Kapseln das Gegenteil bewiesen. Am wahrscheinlichsten war die im Gegensatz zu allen anderen Kapseltypen erhöhte Anzahl von Inseln pro Kapsel. Bei der histologischen Begutachtung der Präparate aller Kapseltypen wurden konstante Werte (Inseln/Kapsel) festgestellt. Nur bei den Erythrozytenhämolysat-Kapseln wurden ca. doppelt so viele Inseln pro Kapsel gefunden. Hier ist es wahrscheinlich Digestions- und/oder Isolationsbedingt zu einer erheblich besseren Ausbeute von Inseln gekommen, obwohl nicht mehr neonatale Ratten als Spendertiere genommen wurden als bei allen anderen Kapseltypen. Einen unspezifischen Proteineffekt durch die im Hämolysat zahlreich vorkommenden Proteine (Carboanhydrase, Superoxid-dismutase, Gluthation, etc.) muß ausgeschlossen werden, da die sehr niedrigen Insulinsekretionsergebnisse, die schlechte Stimulierbarkeit und die Vitalität der Erythrozyten diesen haben nicht erkennen lassen. Welche sonstigen Wirkungsmechanismen die Proteine und Enzyme im Hämolysat auf die Inselzellen ausgeübt haben, müßte durch weitergehende Forschungsarbeit noch herausgefunden werden.

Die abschließende Beurteilung der Ergebnisse zeigt die Tendenz, daß zumindest einige der hergestellten Kapseltypen durchaus zu einer Verbesserung der Funktion

und Vitalität enkapsulierter neonataler Ratteninseln beigetragen haben. Besonders die Ergebnisse der Langzeitkultivierung der Albumin- und Hämoglobin-Kapseln unterstützen diese Aussage. Es gibt jedoch noch eine Reihe von Fragen die nicht beantwortet sind. Wie sind z. B. die in dieser Arbeit erwähnten Wirkungsmechanismen zu erklären? Wie wirken sich die unterschiedlichen Kapseltypen nach einer Transplantation im Hinblick auf ihre Funktion und das immunologische Geschehen aus? Hier besteht noch dringender Forschungsbedarf.