

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Glanemann)

**Die Auswirkungen von Erythropoese-stimulierenden Substanzen
auf die Revaskularisierung transplantierte Langerhans'scher Inseln**

*Dissertation zum Erlangen des Grades eines Doktors der Medizin der
medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*

2019

vorgelegt von Maximilian Menger
geb. am 25.03.1992 in Homburg

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Die Auswirkungen von Erythropoese-stimulierenden Substanzen auf die Revaskularisierung transplanteder Langerhans'scher Inseln	1
2	SUMMARY	3
2.1	The effects of erythropoiesis-stimulating agents on the revascularization of transplanted islets of Langerhans	3
3	EINLEITUNG	5
3.1	Diabetes mellitus	5
3.2	Transplantation und Revaskularisierung Langerhans'scher Inseln	7
3.3	Erythropoietin (EPO) und Darbepoetin- α (DPO)	10
3.4	Zielstellungen.....	12
4	MATERIAL UND METHODEN	13
4.1	Versuchstiere	13
4.2	Isolierung von Langerhans'schen Inseln	13
4.3	Mikrozirkulationsmodell der Rückenhautkammer	15
4.4	Präparation der Rückenhautkammer.....	15
4.5	Syngene Transplantation der Langerhans'schen Inseln.....	18
4.6	Applikation von Erythropoietin	18
4.7	Applikation von Darbepoetin- α	19
4.8	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	19
4.9	Analyse der Mikrozirkulation	21

4.10	Histologie	21
4.10.1	Histologische Präparate.....	21
4.10.2	Immunhistochemische Färbung	22
4.11	Experimentelle Gruppen	23
4.12	Statistische Analyse	24
5	ERGEBNISSE	25
5.1	Histologische Untersuchung frisch isolierter Langerhans`scher Inseln	25
5.2	Auswirkung einer Erythropoietin-Behandlung auf die Revaskularisierung transplanteder Langerhans`scher Inseln	26
5.2.1	Initiale Inselgröße	26
5.2.2	Funktionelle Kapillardichte	26
5.2.3	Relative Größe des vaskulären Netzwerkes	28
5.2.4	Endokrine Revaskularisierung	28
5.2.5	Mikrozirkulation der transplanteden Inseln	30
5.2.6	Anwachsrate	30
5.2.7	Hämatokrit der Empfängertiere	31
5.2.8	Effekt der EPO-Behandlung auf die GefäÙe im Kammergewebe	32
5.2.9	Histologische Untersuchung der Transplantate.....	33
5.3	Auswirkungen einer Darbepoetin-α-Behandlung auf die Revas-kularisierung transplanteder Langerhans`scher Inseln	35
5.3.1	Initiale Inselgröße	35
5.3.2	Funktionelle Kapillardichte	36
5.3.3	Relative Größe des vaskulären Netzwerkes	37
5.3.4	Endokrine Revaskularisierung	38
5.3.5	Mikrozirkulation der transplanteden Inseln	39
5.3.6	Anwachsrate	41
5.3.7	Hämatokrit der Empfängertiere	42
5.3.8	Histologische Untersuchung der Transplantate.....	43
5.4	Auswirkung einer Erythropoietin-Vorbehandlung auf die Revas-kularisierung transplanteder Langerhans`scher Inseln	45
5.4.1	Initiale Inselgröße	45
5.4.2	Funktionelle Kapillardichte	45
5.4.3	Relative Größe des vaskulären Netzwerkes	47

5.4.4	Endokrine Revaskularisierung	47
5.4.5	Mikrozirkulation der transplantierten Inseln	49
5.4.6	Anwachsrate	50
5.4.7	Hämatokrit der Empfängertiere	50
5.4.8	Effekt der EPO-Vorbehandlung auf die Gefäße im Kammergewebe	51
5.4.9	Histologische Untersuchung der Transplantate	52
6	DISKUSSION.....	56
6.1	Diskussion von Material und Methoden	56
6.1.1	Diskussion des Modells	56
6.1.2	Diskussion der Untersuchungstechniken	58
6.2	Diskussion der Ergebnisse	59
6.3	Schlussfolgerungen.....	65
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	66
8	DANKSAGUNG	83
9	PUBLIKATIONEN.....	84
9.1	Originalarbeiten	84
9.2	Kongressbeiträge.....	84

1 Zusammenfassung

1.1 Die Auswirkungen von Erythropoese-stimulierenden Substanzen auf die Revaskularisierung transplantiertes Langerhans'scher Inseln

Die Transplantation Langerhans'scher Inseln stellt eine vielversprechende Therapiestrategie zur kurativen Behandlung des Diabetes mellitus dar. Sie konnte sich im klinischen Alltag bisher allerdings nicht durchsetzen. Aufgrund der niedrigen Anwachsrate der Transplantate kann eine langfristige Insulinunabhängigkeit der Patienten bisher nicht gewährleistet werden. In den ersten Tagen nach Transplantation sind die Langerhans'schen Inseln durch das fehlende Gefäßnetzwerk hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Dies wiederum führt zu Zellnekrosen und schließlich zum Verlust der Transplantate. Erythropoietin (EPO), der Hauptregulator der Erythropoese, und das langwirksame Analagon Darbepoetin- α (DPO) sind bekannt für ihre pro-angiogenen Eigenschaften. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob diese Erythropoese-stimulierenden Substanzen in der Lage sind, die Revaskularisierung von transplantierten Inseln zu beschleunigen und zu verbessern.

Als Spendertiere dienten FVB/N-TgN (Tie2/ green light fluorescence protein (GFP)) 287 Sato Mäuse, um zusätzlich Erkenntnisse über den Anteil an spendereigenen Endothelzellen am Gefäßnetzwerk der Transplantate zu gewinnen. FVB/N-Wildtyp Mäuse dienten als Empfängertiere. Zur Analyse der Revaskularisierung wurde das Rückenhautkammer Modell verwendet, das repetitive intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Mikrozirkulation transplantiertes Langerhans'scher Inseln ermöglicht. Zusätzlich wurden die Transplantate histologisch und immunhistochemisch untersucht und der Hämatokrit der Empfängertiere bestimmt.

In der ersten Versuchsreihe wurden frisch isolierte Langerhans'sche Inseln in die Rückenhautkammer von Empfängertieren transplantiert, die ab dem Tag der Transplantation täglich mit EPO (500 IU/kg) behandelt wurden. Kontrollen erhielten täglich NaCl. Am Tag 6 nach Transplantation zeigten Inseln der EPO-Gruppe eine erhöhte funktionelle Kapillardichte und ein vergrößertes mikrovaskuläres Netzwerk im Vergleich zu Inseln der Kontrollgruppe. Allerdings hatte die Behandlung keine Auswirkungen auf die Anwachsrate der Transplantate und führte zu einer signifikanten Erhöhung des Hämatokrits in den Empfängertieren.

Da DPO eine größere biologische Aktivität und längere Halbwertszeit als EPO besitzt, wurde in einer zweiten Versuchsreihe die Empfängertiere ab dem Tag der Transplantation alle drei Tage mit DPO (2,5 µg/kg), DPO (10 µg/kg) behandelt. Kontrollen erhielten alle drei Tage NaCl. Die intravital-mikroskopische Analyse zeigte keine Unterschiede in der Revaskularisierung der Transplantate zwischen den drei experimentellen Gruppen. Allerdings kam es in der DPO-Hochdosis-Gruppe zu einem signifikant erhöhten mikrovaskulären Blutvolumenfluss und Hämatokritanstieg an Tag 14 im Vergleich zur DPO-Niedrigdosis-Gruppe und Kontrollgruppe.

Um den Wirkspiegel von EPO in den ersten Tagen nach Transplantation zu erhöhen, wurde in einem dritten Studienabschnitt die Empfängertiere, 6 Tage lang vor der Transplantation täglich mit EPO (500 IU/kg) behandelt. Kontrollen erhielten täglich NaCl. Diese Behandlungsstrategie führte zu einer deutlichen Beschleunigung der Revaskularisierung der Transplantate. Dies war an einer signifikant erhöhten funktionellen Kapillardichte an den Tagen 3-10 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. Auch die relative Größe des Gefäßnetzwerkes, die endokrine Revaskularisierung, der mikrovaskuläre Volumenfluss und die Anwachsrate der Transplantate zeigten signifikante Verbesserungen in der EPO vorbehandelten Gruppe, ohne dabei den Hämatokrit der Empfängertiere zu erhöhen. Interessanterweise zeigte die histologische Untersuchung außerdem einen kleineren Anteil an GFP-positiven Endothelzellen in den Transplantaten der EPO vorbehandelten Tieren, was auf ein zusätzliches Einwachsen von Endothelzellen aus dem umliegenden Gewebe schließen lässt.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann man schlussfolgern, dass die Behandlung der Empfängertiere mit EPO zu einer Beschleunigung der Revaskularisierung führt. Die Behandlung mit DPO erhöht dagegen den mikrovaskulären Blutvolumenfluss der Transplantate. Diese positiven Effekte auf den Anwachsprozess der transplantierten Langerhans'schen Inseln gehen allerdings mit einem erhöhten Hämatokrit der Empfängertiere und damit mit einem erhöhten Thromboserisiko einher. Die EPO-Vorbehandlung dagegen zeigte eine deutliche Beschleunigung der Revaskularisierung mit einer erhöhten Anwachsrate der Transplantate, ohne dabei den systemischen Hämatokrit der Empfänger zu erhöhen. Damit könnte die EPO-Vorbehandlung eine vielversprechende Therapieoption sein, die Erfolgsrate der Transplantation Langerhans'scher Inseln zu verbessern.

2 Summary

2.1 The effects of erythropoiesis-stimulating agents on the revascularization of transplanted islets of Langerhans

Pancreatic islet transplantation is a promising therapeutic approach to cure diabetes mellitus. However, it does not represent a standard procedure in clinical practice. A low take rate of the transplants is most probably the cause for the lack of a long term insulin independency in these patients. During the first days after transplantation the islets lack a vascular supply and are exposed to hypoxic conditions. This in turn leads to cell necrosis and loss of the transplants. Erythropoietin (EPO), the main regulator of erythropoiesis, and its long lasting analogue Darbepoetin- α (DPO) are known for their pro-angiogenic properties. Therefore, the present study examined if these erythropoiesis-stimulating agents are capable of accelerating and improving the revascularization of transplanted islets of Langerhans.

FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato mice were used as donor animals to achieve additional information on the origin of the endothelial cells in the newly formed microvascular networks of the transplants. FVB/N-wildtype mice were used as recipient animals. The revascularization of the islets was analyzed by repetitive intravital fluorescence microscopy using the dorsal skinfold chamber model. Additionally, the transplants were analyzed by histology and immunohistochemistry. Finally, the hematocrit levels of the recipient animals were determined.

In a first set of experiments the freshly isolated islets of Langerhans were transplanted into the dorsal skinfold chamber of recipient animals, treated daily with EPO (500 IU/kg) or NaCl (controls) from the day of transplantation for 14 day. The results showed a significant higher functional capillary density and a greater relative size of the vascular network on day 6 in the EPO-treated animals when compared to controls. However, the treatment had no effect on the take rate of the transplants and, as a side effect, increased the systemic hematocrit levels in the recipient animals.

Because DPO has a greater biological activity and a longer half-time life compared to EPO, a second set of experiments with DPO was performed. In these experiments the recipient animals were treated for a 2 week period every three days, either with DPO low dose (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), DPO high dose (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or NaCl (controls) starting from the day of transplantation. The results showed no differences in islet revascularization between the three experimental groups. However, DPO high dose treatment led to an increased microvascular blood volume

flow and elevated the systemic hematocrit level of the recipient animals on day 14 when compared to DPO low dose animals and controls.

To increase the pro-angiogenic effect of EPO in the first days after transplantation, a third set of experiments was performed. Recipient mice were pretreated daily with EPO (500 IU/kg) or NaCl (controls), starting 6 days prior to islet transplantation. This pretreatment provoked a marked acceleration of the revascularization of the transplants. This was indicated by an increased functional capillary density on days 3-10 when compared to controls. Also, the relative size of the microvascular network, the endocrine revascularization, the microvascular blood volume flow and the take rate of the transplants showed a significant improvement in the EPO-pretreatment group. This was achieved without an increase of the systemic hematocrit levels in the recipient animals. Interestingly, the immunohistological analysis revealed a lower fraction of GFP-positive endothelial cells in the transplants of the EPO-pretreated animals on day 6. This indicates an increased ingrowth of GFP-negative endothelial cells from the surrounding host tissue.

In conclusion, the present data suggest that treatment of recipient animals with EPO slightly accelerates the revascularization of islet transplants. In contrast DPO treatment results in an increased microvascular blood volume flow of the transplants. However, these positive effects on the engraftment of transplanted islets were accompanied by an elevation of the systemic hematocrit levels of the recipient animals. Therefore, the use of these treatment strategies could lead to a higher risk of thromboembolic events. EPO-pretreatment, on the other hand, led to a marked acceleration of the islet revascularization. This was associated with a higher number of successfully engrafted islets, without an increase of the systemic hematocrit levels of the recipients. Therefore, EPO-pretreatment, may represent an interesting therapeutic approach to improve the clinical outcome of islet transplantation.

3 Einleitung

3.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus gehört mit weltweit 442 Millionen Betroffenen zu den bedeutendsten Stoffwechselerkrankungen unserer Zeit [WHO, 2019]. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von metabolischen Erkrankungen, die durch einen erhöhten Blutzuckerspiegel charakterisiert sind. Die beiden häufigsten diabetischen Krankheitsbilder in den westlichen Industriestaaten sind Diabetes mellitus Typ 1 und Diabetes mellitus Typ 2. Weitere Untertypen sind beispielsweise der Gestationsdiabetes oder eine diabetische Stoffwechsellage aufgrund Erkrankungen des exokrinen Pankreas. Die Diagnose des Diabetes mellitus wird durch die Nüchternplasmaglukose (≥ 126 mg/dl, $\geq 7,0$ mmol/l), den oralen Glukosetoleranztest (oGTT (≥ 200 mg/dl, $\geq 11,1$ mmol/l)), den HbA_{1c} ($\geq 6,5$ %, ≥ 48 mmol/mol) oder einen Gelegenheitsblutzucker (≥ 200 mg/dl, $\geq 11,1$ mmol/l) in Kombination mit Symptomen der Hyperglykämie gestellt.

Des Weiteren ist der Prädiabetes von einer manifesten diabetischen Stoffwechsellage zu unterscheiden. Dabei sind die diagnostischen Kriterien des Diabetes nicht erfüllt, aber das Risiko, einen manifesten Diabetes mellitus zu entwickeln, ist sehr hoch. Gemäß der American Diabetes Association liegt bei diesem Krankheitsbild eine Nüchternplasmaglukose von 100-125 mg/dl (5,6-6,9 mmol/L) und eine gestörte Glukosetoleranz mit Werten von 140-199 mg/dl (7,8-11,0 mmol/L) im oGTT vor [Kharroubi und Darwish, 2015].

Weltweit ist der Diabetes mellitus Typ 2 die häufigste Form der Erkrankung. Die Prävalenz in Europa reicht von 2,4 % in Moldawien bis zu 14,9 % in der Türkei. Bei der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 kommt es zu komplexen Störungen im Insulinstoffwechsel. Dies führt zu einer gestörten Insulinsekretion der β -Zellen und gleichzeitig zu einer peripheren Insulinresistenz. Dies wiederum führt zur Entgleisungen im Glukosestoffwechsel und resultiert schließlich in der Hyperglykämie. Überernährung in Kombination mit Adipositas sowie Bewegungsmangel sind die zentralen Risikofaktoren der Erkrankungen. Weiterhin spielen eine genetische Veranlagung, psychosoziale Einflüsse, das Rauchverhalten sowie Umwelttoxinen eine Rolle in der Krankheitsentstehung [Tamayo et al., 2014, Elk und Iwuchukwu, 2017].

Während die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 2 mit dem Alter steigt, ist der Diabetes mellitus Typ 1 zu 80-90 % bei Kinder und Jugendlichen zu finden. Schätzungen aus dem Jahr 2013 gehen von 129,350 Fällen von Typ 1 Diabetes mellitus bei 0 – 14 Jahre alten

Kindern in Europa aus [Tamayo et al., 2014]. Dabei besteht eine höhere Inzidenzrate im Norden und Nordwesten Europas im Vergleich zu zentralen, südlichen und östlichen Regionen des Kontinents [Patterson et al., 2014]. Die Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 1 beruht auf einer autoimmunen Zerstörung der β -Zellen, wodurch kein Insulin mehr produziert wird [Devendra et al., 2004]. Das Vorhandensein von spezifischen Autoantikörpern ist dabei das diagnostische Kennzeichen der Erkrankung, auch wenn deren Rolle in der Pathogenese nicht völlig verstanden ist. Diese Antikörper können gegen Inselzellen, Insulin (IAA), die Glutamat-Decarboxylase (GAD), Tyrosin-Phosphatasen (IA2 und IA2 β) und Zinktransportern (ZnT8A) gerichtet sein [Vermeulen et al., 2011]. Interessanterweise können diese Monate oder sogar Jahre vor dem Ausbruch der Krankheit bei Patienten nachgewiesen werden [Couper und Donaghue, 2009]. Die Entstehung der Antikörper scheint dabei auf genetischen Faktoren zu beruhen. So besteht eine starke Assoziation an das humane Leukozytenantigen (HLA) System in Verbindung mit DR und DQ Genen. Diese HLA-DR/DQ Allele können erstaunlicherweise entweder die Entstehung der Krankheit begünstigen, oder vor dem Ausbruch der Erkrankung schützen. Darüber hinaus scheinen Umwelteinflüsse, virale Erkrankungen, Vitamin-D Mangel und Übergewicht im Kindesalter die Pathogenese der Erkrankung zu fördern [Tamayo et al., 2014].

Das häufigste Symptom des Diabetes mellitus ist die Hyperglykämie, die mit Müdigkeit, Polydypsie und Polyurie einhergeht. Auch hypoglykämische Episoden können auftreten, die mit Unruhe und Schweißausbrüchen bis zu zerebralen Krampfanfällen und Koma einhergehen können. Darüber hinaus sind Diabetiker von einer Reihe von Spätkomplikationen betroffen, die zu einer erhöhten Mortalität führen. Dazu gehören die diabetische Nephropathie, Neuropathie und Retinopathie, das diabetische Fußsyndrom (Mikroangiopathien), die koronare Herzkrankheit, die periphere arterielle Verschlusskrankheit sowie die arterielle Verschlusskrankheit der Hirnarterien mit ischämischem Hirninfarkt (Makroangiopathien) [Herold, 2018].

Bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 wird ein Stufenschema angewandt, das zunächst eine gesteigerte körperlicher Aktivität, Ernährungstherapie und Gewichtsreduktion vorsieht. Sollte diese „Lifestyle“-Therapie keinen Erfolg erzielen, wird zusätzlich mit der Einnahme von oralen Antidiabetika wie Metformin und Sulfonylharnstoffen begonnen. Auch eine Zweifachkombination oraler Antidiabetika kann bei Therapieversagen in Betracht gezogen werden. Eine weiter fortgeschrittene Erschöpfung der endogenen Insulinproduktion erfordert schließlich die Umstellung auf eine Insulintherapie. Dabei stehen verschiedene Schemata zur Verfügung. Sie reichen von der konventionellen Insulintherapie mit Injektionen eines Mischinsulins morgens und abends bis zu einer intensivierten Insulintherapie, bei der

eine Kombination aus schnell und langsam wirkenden Insulin zum Einsatz kommt, die sich streng nach Kaloriengehalt der Mahlzeit, Tageszeit und aktuellem Blutzuckerspiegel orientiert [Herold, 2018].

Die Diagnose des Diabetes mellitus Typ 1 erfordert dagegen ohne Ausnahme die sofortige und lebenslange Insulintherapie. Das erste Mal wurde Insulin 1922 in der humanmedizinischen Praxis eingesetzt und bis heute stellt die Applikation von Insulin das erfolgreichste Vorgehen zur Behandlung des Diabetes mellitus dar [Banting et al., 2007]. Die optimale Einstellung des Blutzuckers des Patienten verlangt allerdings ein aufwendiges, individuell zugeschnittenes Behandlungskonzept, das zwischen verschiedenen Therapieschemata und unterschiedlich langwirksamen Insulinanaloga unterscheidet [Herold, 2018]. Und selbst bei optimaler Einstellung des Blutglukosespiegels scheinen die Spätkomplikationen der Erkrankung unvermeidbar.

Der konservativen, pharmakologischen Therapie in der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 1 steht der chirurgische Ansatz gegenüber. Das erste Pankreas wurde 1966 an der Universität von Minnesota transplantiert und bis heute sind weltweit über 42.000 Pankreastransplantationen durchgeführt worden [Gruessner und Gruessner, 2016]. Aufgrund der hohen Komplikationsrate und der darauffolgenden lebenslangen Therapie mit Immunsuppressiva wird die Transplantation allerdings nur bei diabetischen Patienten mit Nierenversagen in Kombination mit einem Nierentransplantat oder bei Patienten mit schweren hypoglykämischen Entgleisungen in Erwägung gezogen [Dean et al., 2017].

3.2 Transplantation und Revaskularisierung Langerhans´scher Inseln

Die Transplantation Langerhans´scher Inseln ist eine minimal-invasive Therapiestrategie zur kurativen Behandlung des Diabetes mellitus. Die üblicherweise portalvenöse Injektion der isolierten Inseln besticht im Vergleich zur Transplantation des gesamten Pankreas durch ein reduziertes Trauma und damit einer geringeren Komplikationsrate, wie Blutungen und Infektionen [Gallego Ferrero und Crespo Del Pozo, 2018]. In verschiedenen experimentellen Studien konnten diabetische Tiere mittels der Transplantation Langerhans´scher Inseln zeitweise in eine normoglykämische Stoffwechsellage überführt werden [Ballinger und Lacy, 1972, Leonard et al., 1973, van der Vliet et al., 1988, Davalli et al., 1996]. Im Laufe der 80iger Jahre gab es die ersten richtungsweisenden, klinischen Studien, die Aufschluss über die Inseltransplantation bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und Nephropathie [Scharp

et al., 1989], die temporäre Insulinunabhängigkeit nach Transplantation [Scharp et al., 1990] und über die langfristige Funktion der Inselzelltransplantate [Alejandro et al., 1995] brachten. Schließlich kam es im Jahr 2000 zur Etablierung des Edmonton-Protokolls, das erstmalig eine nachhaltige Insulinunabhängigkeit der Patienten bis zu einem Jahr nach Transplantation ermöglichte [Shapiro et al., 2000].

Dennoch bleiben bis heute lediglich 40-50 % der Patienten nach 5 Jahren Insulinunabhängig. Ein entscheidendes Problem der Inseltransplantation ist die hohe Anzahl benötigter Inseln und der aufwendige Isolierungs- und Reinigungsvorgang der Transplantate. So kommt es beim enzymatischen Verdauungsprozess des Pankreasgewebes, bei dem das exokrine Gewebe vom endokrinen Teil des Organs getrennt wird, auch zu Schäden an den Langerhans'schen Inseln [Toso et al., 2002]. Weiterhin ist der Reinheitsgrad der gewonnenen Transplantate von zentraler Bedeutung für den Erfolg der Behandlung, da Verunreinigungen zum Funktionsverlust führen können. Dies hat wiederum zur Konsequenz, dass oftmals mehr als ein Spenderpankreas benötigt wird, um eine ausreichende Anzahl an Inseln zu gewinnen, damit der Patient nach der Transplantation einen physiologischen Blutzuckerspiegel erreicht [Barton et al., 2012, Ahearn et al., 2015].

Eine weitere Hürde der Inseltransplantation ist die niedrige Anwachsrate der Transplantate. Im Gegensatz zur Transplantation ganzer Organe, wie Leber, Herz oder Niere, deren mikrovaskulärer Blutfluss durch Anastomosen der versorgenden Gefäße sofort wiederhergestellt werden, ist bei der Transplantation Langerhans'scher Inseln ein Prozess der Angiogenese und Revaskularisierung erforderlich [Menger et al., 2001, Jansson und Carlsson, 2002]. Dies führt dazu, dass die Inseln in den ersten Tagen nach Transplantation auf die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff aus dem umliegenden Gewebe und Blutgefäßen des Empfängers angewiesen sind [Menger et al., 2001]. Während dieser kritischen Phase kommt es zu Hypoxie-bedingten Apoptosen und Nekrosen und damit auch zum Funktionsverlust der Inseln [Dionne et al., 1993, Davalli et al., 1996, Cui et al., 2005]. Aus diesem Grund wird die schnelle und ausreichende Revaskularisierung als entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Inseltransplantation gesehen [Schramm et al., 2003, Brissova et al., 2004].

Experimentelle Studien konnten mittels fluoreszenzmikroskopischer Analysen zeigen, dass die Revaskularisierung etwa 3 Tage nach Transplantation durch Aussprossung von Kapillaren beginnt und bis Tag 14 abgeschlossen ist. Danach besitzen die transplantierten Inseln ein dichtes glomerulumartiges Gefäßnetzwerk, ähnlich dem Gefäßnetzwerk von Langerhans'schen Inseln in situ [Menger et al., 1989]. Gleichzeitig zeigen histologische

Untersuchungen, dass die neu gebildeten Blutgefäße das für Langerhans'sche Inseln typische diaphragmal fenestrierte Endothel aufweisen [Vajkoczy et al., 1995b].

In den letzten Jahren wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um die Erfolgsrate der Inseltransplantation zu verbessern. So werden neben der Injektion in die Portalvene der Leber neue Empfängergewebe diskutiert, wie beispielsweise Milz, Omentum, Peritoneum, Subkutis oder das gut vaskularisierte Muskelgewebe [Pepper et al., 2013]. Allerdings gilt die intraportale Injektion der Inseln in der Klinik bis heute als Goldstandard, da die Leber eine Schlüsselrolle in der Regulation des Insulinstoffwechsels einnimmt und die direkte Insulinsekretion in das Lebergewebe eine enge Kontrolle über den Blutzuckerspiegel ermöglicht [De Vos et al., 1998].

Um die Abstoßungsreaktion des Empfängers zu minimieren und Nebenwirkungen möglichst zu vermeiden, sind zudem neue immunsuppressive Therapie-Regime Gegenstand intensiver Forschung. So werden monoklonale Antikörper wie Belatacept in klinischen Studien erprobt und könnten die Nieren-, und Inselzelltoxischen Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin und Tacrolimus ersetzen [Posselt et al., 2010]. Auch die Einkapselung der Langerhans'schen Inseln vor Transplantation wird in tierexperimentellen und klinischen Studien untersucht [Tuch et al., 2009, Vegas et al., 2016]. Dabei bleibt die endokrine Funktion der Inseln erhalten, während die Infiltration von Immunzellen verhindert wird. Die Vitalität und Funktionalität der Transplante wird durch die Einkapselung allerdings signifikant geschwächt [Basta et al., 2011]. Um den Mangel an Spenderorganen zu umgehen, wird auch die Xenotransplantation als mögliche Alternative diskutiert. Xenogene Transplantationsversuche vom Schwein zum nicht-humanen Primaten konnten bereits einige Erfolge erzielen [Hering et al., 2006, Bottino et al., 2014], eine unzureichende Immunsuppression im xenogenen Modell hindert jedoch an der Anwendung in der Klinik [Samy et al., 2014].

Ein weiterer Ansatz, die Erfolgsrate der Inseltransplantation zu erhöhen, ist die Revaskularisierung der Transplantate zu verbessern. Dabei setzt die zelltherapeutische Methode auf die Co-Transplantation von Stamm- und Endothelzellen, um die Revaskularisierung zu beschleunigen. Dadurch konnte das angiogene Potential sowie die Funktion der transplantierten Langerhans'schen Inseln verbessert werden [Rackham et al., 2011, Coppens et al., 2013, Quaranta et al., 2014]. Die Handhabung mit verschiedenen, spezifischen Zelltypen gestaltete sich im klinischen Alltag allerdings äußerst problematisch. Neben den administrativen Hürden sollten die zeit- und kostenaufwändigen Isolierungs- und Kultivierungsprozesse in der Standardisierung der Zellqualität und Menge bedacht werden. Staels et al. konnten zudem im gentherapeutischen Modell nachweisen, dass die

Transfektion der messenger ribonucleic acid (mRNA) des vascular endothelial growth factors (VEGF) in die Langerhans'schen Inseln die Angiogenese der Transplantate im tierexperimentellen Modell verstärken konnte [Staels et al., 2018]. Allerdings ist die zusätzliche autonome Produktion von VEGF mit schwerwiegenden Risiken, wie beispielsweise dem Fördern von Neoplasien verbunden. Eine weitere Strategie zur Verbesserung der Vaskularisierung der Inseltransplantate ist die Kultivierung mit pro-angiogenen Proteinen, wie VEGF, dem fibroblast growth factor (FGF), Metalloproteinasen (MMP) [Olsson et al., 2006] oder glucagon-like peptide 1 (GLP-1) Analoga wie Liraglutide [Langlois et al., 2016, Langlois et al., 2016]. Da allerdings die Kultivierung, selbst über einen kurzen Zeitraum, die Funktionalität der Inseln beeinträchtigt [Olsson und Carlsson, 2005, Noguchi et al., 2012], bleibt es fraglich, ob diese Strategie der Transplantation frisch isolierter Inseln überlegen ist.

So ist es bis heute nicht gelungen die Transplantation Langerhans'scher Inseln als ernsthafte Therapieoption des Diabetes mellitus in der Klinik zu etablieren. Der Einsatz eines Proteins mit pro-angiogenen Eigenschaften, das in der Lage wäre, die Anwachsrate der Inseln durch eine Verbesserung und Beschleunigung der Revaskularisierung zu erhöhen, ohne dabei schwere Nebenwirkungen für den Empfänger zu verursachen, wäre dagegen eine praktikable und realisierbare Alternative.

3.3 Erythropoietin (EPO) und Darbepoetin- α (DPO)

Das Glykoprotein Erythropoietin (EPO) ist der Hauptregulator der Erythropoese und stimuliert täglich die Produktion von etwa 200 Milliarden neuer Erythrozyten, um ihre limitierte Lebensdauer von 110 bis 120 Tagen zu kompensieren [Zhang et al., 2014]. EPO wird hauptsächlich von der Niere produziert und in den Blutkreislauf abgegeben. Durch die Bindung von EPO an seinem zugehörigen Rezeptor EPO-R auf erythroiden Vorläuferzellen werden Signalwege induziert, die durch Janus kinase 2 (JAK-2) und die Transkriptionsfaktoren STAT gesteuert werden. Diese Signalwege wiederum stimulieren Zellproliferation, Differenzierung und Zellüberleben [Kimakova et al., 2017].

Interessanterweise konnten experimentelle Studien zeigen, dass EPO neben seiner hämatopoetischen Funktion, eine Vielzahl anderer Eigenschaften besitzt. So wirkt EPO anti-apoptotisch und schützt vor akutem, ischämisch-induziertem Zelltod in zahlreichen Geweben. Dazu gehören das Gehirn, die Nieren, das Herz, die Retina und die Blutgefäße [Chong et al., 2002, Grimm et al., 2002, Moon et al., 2003, Vesey et al., 2004]. Weiterhin wirkt das Glykoprotein entzündungshemmend im Ischämie/Reperusionsmodell [Rui et al.,

2005] und reduziert den Gewebeschaden beim hämorrhagischen Schock und im Myokardinfarkt [Abdelrahman et al., 2004]. Darüber hinaus berichten Studien über eine pro-angiogene Wirkung des Glykoproteins in vitro und in vivo [Ribatti et al., 1999]. Tatsächlich ist EPO-R auch auf Endothelzellen exprimiert. Die Bildung des EPO/EPO-R Komplexes induziert pro-angiogene Signalwege über VEGF, Angiopoietin-1 Rezeptor (Tie)-2 und Angiopoietin (Ang)-2 [Alvarez Arroyo et al., 1998, Li et al., 2007] und stimuliert so die Proliferation von Endothelzellen und damit die Bildung neuer Blutgefäße [Carlini et al., 1995, Watanabe et al., 2005]. So zeigten Karschnia et al., dass die Kultivierung von Gefäßfragmenten in EPO ihr angiogenes Potential steigert. Darüber hinaus konnten Rezaeian et al. die pro-angiogene Wirkung des Glykoproteins im Flap-Modell der Rückenhamntammer nachweisen [Rezaeian et al., 2008, Karschnia et al., 2018].

Darbepoetin- α (DPO), ein hyperglykolisiertes Analogon von EPO, wurde für eine verlängerte Wirkdauer und größere Bioverfügbarkeit entwickelt. Die Aminosäuresequenz von DPO unterscheidet sich von endogenem EPO an 5 Positionen, was wiederum die Bindung von 2 zusätzlichen Oligosacchariden an den Asparaginresten erlaubt, ohne dabei die Zusammensetzung des Glykoproteins zu zerstören [Egrie und Browne, 2001, Elliott et al., 2003]. Dadurch verbleibt DPO länger im Blutkreislauf und besitzt so eine größere biologische Aktivität. Der Einsatz der Substanz bei dialysierten Patienten zeigte, dass die Halbwertszeit von intravenös verabreichtem DPO mit 25,3 h ungefähr drei Mal länger ist als die 8 h von EPO. Weiterhin wird die Zeit zur Spitzenkonzentration nach subkutaner Gabe im Vergleich zu EPO verdoppelt (54 h vs. 16-24 h). Dies wiederum erlaubt eine reduzierte Applikationsrate der Substanz [Macdougall et al., 1999, Jelkmann, 2013].

DPO wird im klinischen Alltag in erster Linie zur Behandlung von Anämien eingesetzt. Studien beschreiben den Einsatz des Proteins bei Patienten mit chronischem Nierenversagen [Alsalmiy und Awaisu, 2014, Palmer et al., 2014], myelodysplastischem Syndrom [Park et al., 2016] und Chemotherapie-induzierter Anämie [Pirker et al., 2016]. Analog zu EPO konnten experimentelle Studien belegen, dass DPO neben seiner hämatopoetischen Funktion weitere Eigenschaften besitzt. Johnson et al. zeigten, dass DPO durch anti-apoptotische und zytoprotektive Wirkung vor ischämisch-bedingtem Nierenversagen schützt [Johnson et al., 2006]. Auch bei akutem Leberversagen wirkt DPO anti-apoptotisch und zeigt zudem entzündungshemmende Effekte [Le Minh et al., 2007]. Darüber hinaus ist das Protein in der Lage in vitro und in vivo Angiogenese zu stimulieren. So induziert DPO Gefäßsprouting im isolierten Aortenring der Maus und fördert die Gefäßneubildung von kolorektalen Lebermetastasen und im ischämischen Herz [Broberg et al., 2008, Rupertus et al., 2012].

Die Literatur legt nahe, dass EPO sowie sein lang wirksames Analogon DPO durch ihre pro-angiogenen Eigenschaften die Revaskularisierung Langerhans'scher Inseln verbessern und damit die Anwachsrate der Transplantate erhöhen können.

3.4 Zielstellungen

Langerhans'sche Inseln sind durch die fehlende vaskuläre Versorgung in den ersten Tagen nach Transplantation auf die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen angewiesen. Daher scheint es für eine erfolgreiche Inseltransplantation von entscheidender Bedeutung zu sein, diesen kritischen avaskulären Zeitraum zu verkürzen [Davalli et al., 1996, Schramm et al., 2003, Wittig et al., 2013]. Erythropoietin sowie sein Analogon Darbepoetin- α könnten durch ihre pro-angiogenen Eigenschaften in der Lage sein, das Einsprossen neuer Gefäße zu fördern, den Prozess der Revaskularisierung zu beschleunigen und damit das Überleben der Transplantate zu verbessern.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Einfluss von Erythropoietin und Darbepoetin- α auf die Revaskularisierung transplantiert Langerhans'scher Inseln im Rückenhautkammer-Modell der Maus zu untersuchen. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Kann eine Behandlung der Empfängertiere mit Erythropoietin die Revaskularisierung der transplantierten Langerhans'schen Inseln verbessern?
2. Kann eine Behandlung der Empfängertiere mit Darbepoetin- α die Revaskularisierung der transplantierten Langerhans'schen Inseln verbessern?
3. Kann eine Vorbehandlung der Empfängertiere mit Erythropoietin die Revaskularisierung der transplantierten Langerhans'schen Inseln verbessern?
4. Zu welchem Ausmaß erfolgt die Revaskularisierung transplantiert Langerhans'scher Inseln über Endothelzellen der Spenderinseln, und zu welchem Ausmaß über Endothelzellen des Empfängergewebes.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Bei der Arbeit wurden als Empfängertiere männliche und weibliche FVB/N-Mäuse verwendet. Das Körpergewicht der 10 bis 24 Wochen alten Tiere betrug 22 bis 27 g. Als Spendertiere dienten männliche und weibliche FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Mäuse im Alter von 24-48 Wochen mit einem Gewicht von 25 bis 32 g. Die Haltung erfolgte unter klimatisierten Bedingungen mit einem 12 h/12 h-Tag/Nachtrythmus. Der Zugang zu Trinkwasser und Standardpelletfutter (Altromin, Lage, Deutschland) war jederzeit frei möglich. Der Allgemeinzustand sowie das Schlaf- und Fressverhalten der Tiere wurden während der Experimente kontinuierlich überwacht. Die Versuche wurden gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landesamt Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz (Saarbrücken) genehmigt und alle am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar) durchgeführt.

4.2 Isolierung von Langerhans'schen Inseln

Die Isolierung der Langerhans Inseln orientierte sich an der Methode von Gotoh et al. [Gotoh et al., 1987]. Zur Entnahme des Pankreas wurden die Tiere mit Ketamin (75 mg/kg KG; Urostatin; Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Xylazin (75 mg/kg KG; Rompun; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) durch intraperitoneale (i.p.) Injektion narkotisiert. Das Abdomen der Tiere wurde mit 70 % Alkohol desinfiziert und danach eine mediane Laparotomie durchgeführt. Anschließend wurde der Darm der Tiere ausgelagert und der Ductus choledochus aufgesucht. Dieser wurde möglichst nahe des Ductus cysticus legiert. Es folgte das Aufspannen des Pankreas mittels einer Klemme am Duodenum (Abb. 1 A). Der Ductus choledochus wurde kurz vor der Einmündung in die Papilla Vateri mit einer Mikroschere inzidiert. Danach folgte die Einführung einer Kanüle (34 G, Microfil, World Precision Instruments), die mit einem Faden fixiert wurde (Abb. 1 A-B). Anschließend wurde die Maus durch Eröffnung der Aorta abdominalis ausgeblutet. Gleichzeitig wurden 1 ml einer Kollagenaselösung (1 mg Kollagenase (SERVA, SERVA Elektrophoresis GmbH)/1 ml HBSS und 200 µl Neutralrot) in den Ductus pancreaticus injiziert. Das Neutralrot-gefärbte Pankreas (Abb. 1 C) wurde aus dem Abdomen präpariert, in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit der restlichen eiskalten Kollagenaselösung überführt und schließlich in einem 37 °C warmen Wasserbad 15 min verdaut. Danach wurde der Verdauungsprozess gestoppt, indem das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt wurde. Daraufhin wurde der Inhalt in ein 50 ml

Reaktionsgefäß überführt, dieses mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)/10 % fetales Kälberserum (FCS) aufgefüllt und für 2 min bei Raumtemperatur unter 1600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Falcon erneut mit PBS/10 % FCS aufgefüllt. Durch auf- und abpipettieren mittels einer Pasteurpipette konnten die Langerhans'schen Inseln vom restlichen exokrinen Gewebe getrennt werden. Die entstandene Suspension wurde erneut für 1min unter 1600 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mindestens dreimal wiederholt. Schließlich wurde das Pellet in 20 ml PBS/10 % FCS resuspendiert und in eine 10 cm Petrischale gegeben (Abb. 1 D). Nun konnten die Langerhans'schen Inseln unter dem Mikroskop mit einer Pipette gepickt werden.

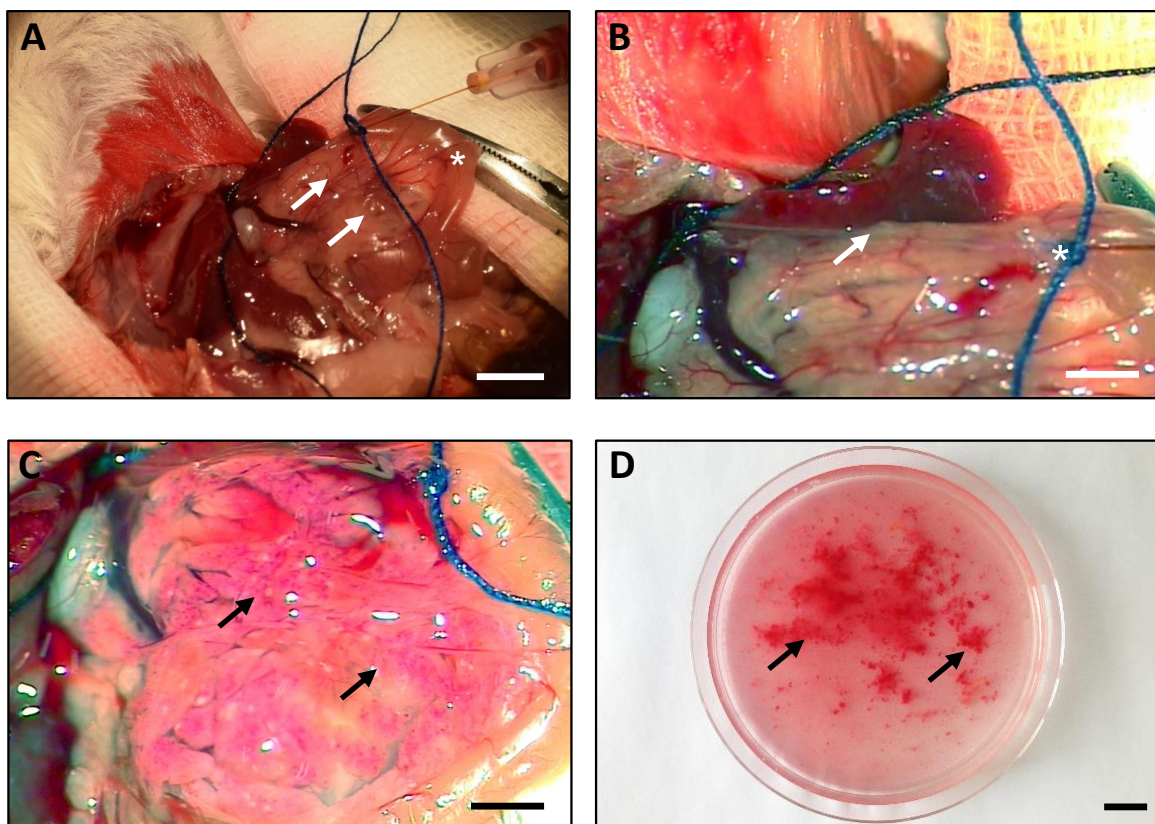


Abbildung 1: Isolation Langerhans'scher Inseln. (A) Mittels Klemme aufgespanntes Pankreas (Pfeile) und Duodenum (Stern): 2 cm. (B) Eingeführte Kanüle auf Höhe der Papilla Vateri (Stern) in den Ductus choledochus (Pfeil), Maßstab: 0,5 cm. (C) Aufgedehntes, Neutralrot-gefärbtes Pankreas (Pfeile) nach retrograder Injektion der Kollagenaselösung in den Ductus pancreaticus major, Maßstab: 0,5 cm. (D) Neutralrot-gefärbtes Pankreasgewebe (Pfeile) nach dem Verdauungsprozess in einer Petrischale, Maßstab: 1cm.

4.3 Mikrozirkulationsmodell der Rückenhautkammer

Das Rückenhautkammer-Modell der Maus ermöglicht die nicht invasive mikrozirkulatorische Analyse von quergestreiftem Muskel und Hautgewebe (Abb. 2 A und B). In Verbindung mit intravitaler Fluoreszenzmikroskopie erlaubt es die quantitative Beurteilung der Mikrozirkulation, aber auch von Entzündung, Angiogenese und vaskulärem Remodelling.

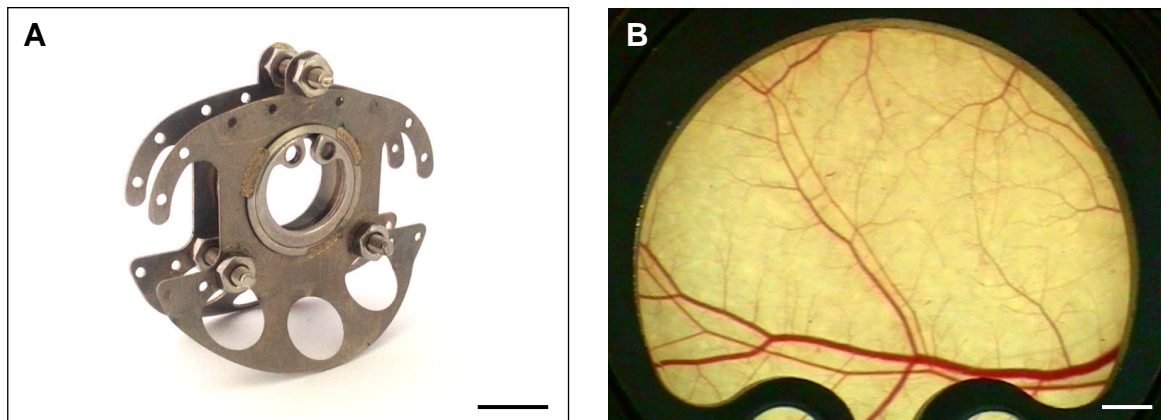


Abbildung 2: Das Modell der Rückenhautkammer: (A) Rückenhautkammer mit zentralem Sprengring, der das Deckglas befestigt. Durch das Deckglas sind repetitive, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen möglich, Maßstab: 1 cm. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme einer implantierten Rückenhautkammer, Maßstab: 1 mm.

4.4 Präparation der Rückenhautkammer

Zur Präparation der Rückenhautkammer wurden die Tiere mit Ketamin (75 mg/kg KG) und Xylazin (75 mg/kg KG) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Der Rücken der Tiere wurde rasiert und danach durch Enthaarungscreme (asid-med; ASID BONZ, Herrenberg, Deutschland) depiliert. Anschließend wurde der enthaarte Rücken der Tiere unter 37 °C warmem Wasser bis zur vollständigen Entfernung der Enthaarungscreme gereinigt.

Nun folgte die Positionierung der Tiere in Bauchlage und die Desinfektion des Rückens mit 70 %igem Alkohol. Die Rückenhaut der Tiere wurde angehoben und die Blutgefäße unter Durchleuchtung in kongruente Position gebracht. Mit Seide-Nähten konnte die Rückenhaut kranial und kaudal entlang der Mittellinie fixiert werden (Abb. 3 A). Der rückwärtige Kammerrahmen wurde am Oberrand der Hautfalte mit 5-0 Seide-Nähten durch die vorgefertigten Bohrlöcher fixiert. Zur Fixierung des zweiten Kammerrahmens erfolgten mittels Skalpell zwei Inzisionen am basalen Teil der Rückenhaut um das Durchführen der Verbindungsschrauben zu ermöglichen (Abb. 3 B). Zuvor wurden mittels Durchleuchtung die Hauptstammgefäße identifiziert um sie bei der Präparation zu schonen. Die Schrauben

wurden anschließend mit zwei Klemmen fixiert und mittels Durchleuchtung das spätere Beobachtungsfenster markiert (Abb. 3 C).

Danach wurden die Haltefäden entfernt und das Tier in laterale Position unter ein Stereo-Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) gebracht. Mithilfe mikrochirurgischer Instrumente wurde entlang der Markierung die Cutis und Subcutis mit darunterliegender quergestreifter Muskulatur sowie die zwei Schichten der Retraktormuskulatur entfernt (Abb. 3 D). Die verbleibenden Hautschichten setzten sich zusammen aus der rückseitigen quergestreiften Hautmuskulatur sowie Subcutis und Cutis. Es war von essentieller Bedeutung die präparierte Fläche (15 mm) größer zu wählen, als das Beobachtungsfenster (10 mm), um eine Kompression des Gewebes und damit einhergehende Zirkulationsstörungen zu vermeiden. Außerdem war bei der Entfernung der zweiten Schicht der Retraktormuskulatur große Vorsicht geboten, da sie in direktem Kontakt mit der rückseitigen quergestreiften Hautmuskulatur steht. Diese diente zur späteren mikroskopischen Bildgebung und sollte deshalb keinesfalls beschädigt werden.

Anschließend wurde der zweite Kammerrahmen auf die Verbindungsschrauben aufgesetzt und mit Schraubenmuttern befestigt (Abb. 3 E). Zwischen den beiden Rahmen befanden sich ebenfalls Schraubenmuttern um einen adäquaten Abstand (400-500 μm) zu gewährleisten. Während der gesamten Operationszeit wurde das Präparationsfeld mit steriler Kochsalzlösung feucht gehalten um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Zum Schluss wurde das Beobachtungsfenster im vorderen Rahmen durch ein Deckglas luftdicht geschlossen und durch einen Sprengring fixiert (Abb. 3 E). Durch Entfernung von Deckglas und Sprengring konnte jederzeit der Zugang zum Beobachtungsfenster ermöglicht werden.

Zwei Tage hatten die Tiere Zeit, um sich von der Anästhesie und dem chirurgischen Trauma zu erholen. Normale Fütterungs-, Reinigungs- und Schlafgewohnheiten zeigten, dass die Tiere die Kammern gut tolerierten (Abb. 3 F).

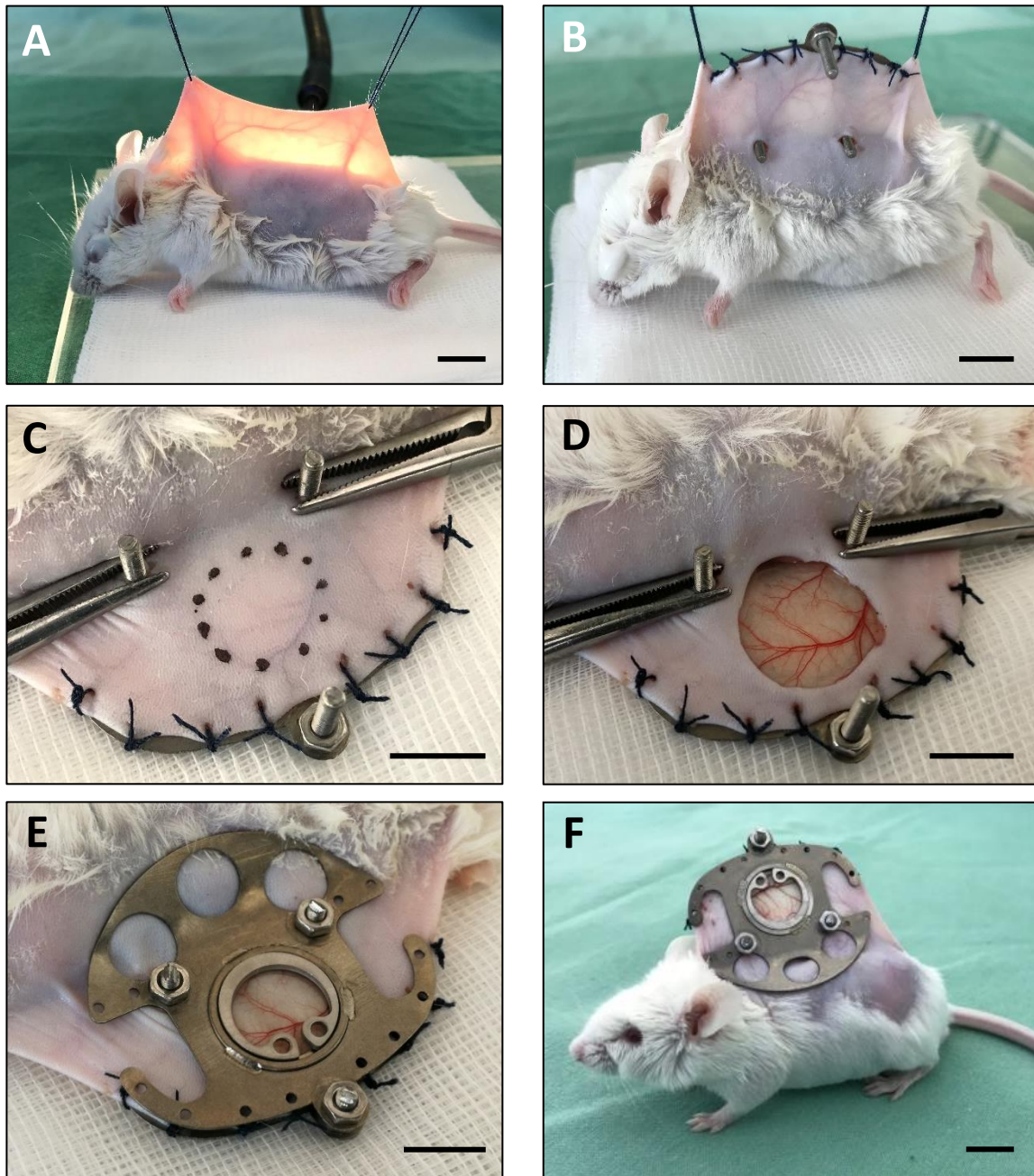


Abbildung 3: Kammerpräparation. (A) Darstellung der Hauptstammgefäße mittels Durchleuchtung. (B) Rückseitiger Kammerrahmen nach Implantation. (C) Zirkuläre Markierung entlang des Beobachtungsfensters. (D) Einseitige Entfernung von Cutis, Subcutis mit darunterliegender quergestreifter Muskulatur sowie die zwei Schichten der Retraktormuskulatur. (E) Implantation des vorderen Titanrahmens und Schließung des Beobachtungsfensters mit Deckglas und Sprengring. (F) Versuchstier mit Rückenhautkammer. Alle Maßstäbe: 1 cm.

4.5 Syngene Transplantation der Langerhans'schen Inseln

Zur Transplantation der Langerhans'schen Inseln wurden die Tiere mit Ketamin (75 mg/kg KG) und Xylazin (75 mg/kg KG) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Danach wurden die Tiere auf einer speziell konstruierten Bühne in Seitenlagen gebracht. Der Sprengring der Rückenhautkammer wurde entfernt und das Deckglas vorsichtig angehoben um Zugang zum Beobachtungsfenster zu erlangen. Unter dem Stereo-Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) wurden ca. 8 frisch isolierte Langerhans'sche Inseln aus der Petrischale mit PBS/10 % FCS-Lösung pipettiert und auf der quergestreiften Muskulatur des Beobachtungsfenster gleichmäßig verteilt (Abb. 4 A). Die Kammer wurde wieder mit einem Deckglas und Sprengring verschlossen. Direkt danach erfolgte die erste fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zur Positions- und Größenbestimmung der transplantierten Langerhans'schen Inseln (Abb. 4 B und C).

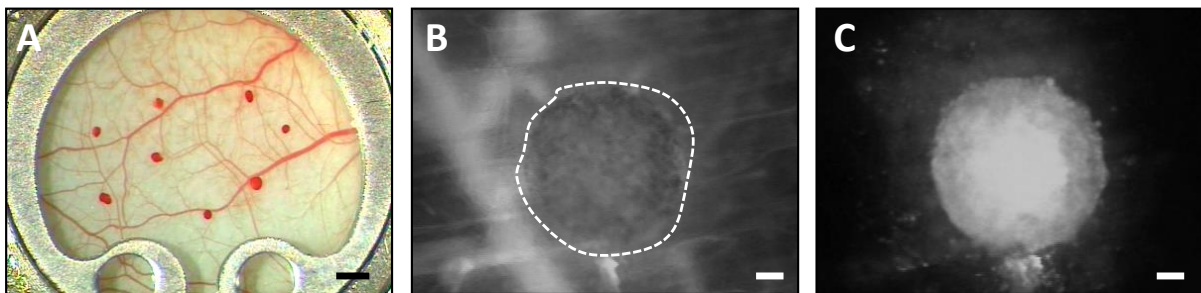


Abbildung 4: (A) Beobachtungsfenster einer Rückenhautkammer mit 8 transplantierten Neutralrot-gefärbten Inseln. Maßstab: 1 mm. (B und C) Intravitale fluoreszenzmikroskopische Bilder im Blaulichtfilter von einer Neutralrot-gefärbten Insel in der Rückenhautkammer an Tag 0. FITC Dextran 150,000 (i.v.) wurde zur Darstellung der die Insel (markiert durch gestrichelte Linien) umgebenden, Blut-perfundierten Mikrogefäße verwendet (B). Die Insel wurde durch die Neutralrotfärbung im Grünlichtfilter erkannt (C). Maßstäbe (B, C): 50 μ m.

4.6 Applikation von Erythropoietin

In den ersten beiden Studienabschnitten dieser Arbeit wurde Epoetin β (rekombinantes humanes EPO, NeoRecormon; Roche, Reinach, Schweiz) verwendet. Die Behandlungsgruppe erhielt die tägliche intraperitoneale Applikation von 500 IU/kg KG Epoetin gelöst in 0,1 ml NaCl, am Tag der Transplantation beginnend, für 14 Tage. Die Vorbehandlungsgruppe erhielt täglich 500 IU/kg KG Epoetin β gelöst in 0,1 ml NaCl intraperitoneal, beginnend fünf Tage vor der Transplantation bis zum Transplantationstag. Die Kontrolltiere erhielten nach den gleichen Applikationsschemata 0,1 ml NaCl.

4.7 Applikation von Darbepoetin- α

Im dritten Studienabschnitt wurde Aranesp® (Amgen, München, Germany) verwendet. Die DPO-Niedrigdosis-Gruppe erhielt 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG und die DPO-Hochdosis-Gruppe 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Aranesp®, jeweils gelöst in 0,1 ml NaCl. Die intraperitoneale Applikation der verdünnten Lösungen erfolgte alle 3 Tage, am Tag der Transplantation beginnend, über 14 Tage. Die Kontrolltiere erhielten nach dem gleichen Applikationsschema 0,1 ml NaCl.

4.8 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung von Angiogenese und Mikrozirkulation erfolgte mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie an den Tagen 3, 6, 10 und 14. Dafür wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kg KG) und Xylazin (75 mg/kg KG) narkotisiert. Daraufhin wurden sie mit der Kammer an einer speziell gefertigten Plexiglasbühne fixiert. Es folgte die Verabreichung von 0,05 ml FITC-Dextran 5 % (MW=150.000 kD; Fluka Biochemika, 46946, Ulm, Deutschland) und 0,05 ml Rhodamin 6G 0,1 % (Rhodamine 6G, MW=479 kD; SIGMA, St. Louis, USA) in den retrobulbären Venenplexus. Aufgrund seines hohen Molekulargewichtes verbleibt FITC-Dextran weitgehend intravaskulär und verteilt sich im Blutplasma. Dies ermöglichte die Darstellung von Arteriolen, Venolen und Kapillaren (Abb. 5 A-D). Rhodamin 6G, ein Farbstoff der spezifisch Mitochondrien färbt [Horikoshi et al., 1987], dient in erster Linie zur Detektion von Leukozyten, extravasiert allerdings auch durch das fenestrierte Endothel des endokrinen Gewebes der Langerhans'schen Inseln (Abb. 6 A-D). Dieses Phänomen kann sowohl bei revaskularisierten, transplantierten Langerhans'schen Inseln, als auch bei Inseln in situ beobachtet werden [Vajkoczy et al., 1995b]. Danach erfolgte die Positionierung der Rückenhautkammer unter einem Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100 W Quecksilber Dampflampe mit einem blauen (Anregungswellenlänge: 450-490nm/ Emissionswellenlänge: >515 nm) und einem grünen (530-560 nm/ > 585 nm) Filterblock. Die mikroskopischen Bilder wurden über eine Videokamera (FK6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und auf einen Monitor (Trinitron; Sony, Tokyo, Japan) und einen DVD-Recorder (DVD-HR775; Samsung, Eschborn, Deutschland) für die spätere off-line Analyse übertragen und aufgezeichnet.

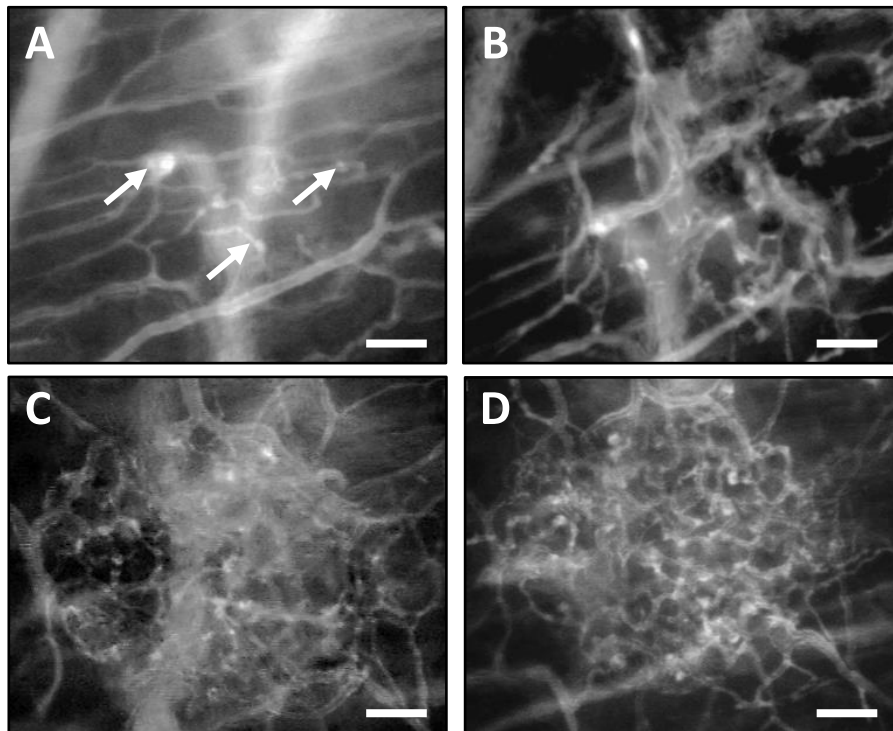


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Langerhans'schen Insel im Blaulichtfilter. An Tag 3 (A) sind Sprouts (Pfeile) als erste Zeichen der Angiogenese zu sehen. An Tag 6 (B) haben sich die ersten Gefäße gebildet, die bis Tag 10 (C) an Dichte deutlich zunehmen und an Tag 14 (D) das charakteristische glomerulartige Gefäßnetzwerk ausgebildet hatten. Das Gefäßsystem wurde mit Hilfe von FITC-Dextran 150,000 (i.v.) kontrastiert. Alle Maßstäbe: 50 µm.

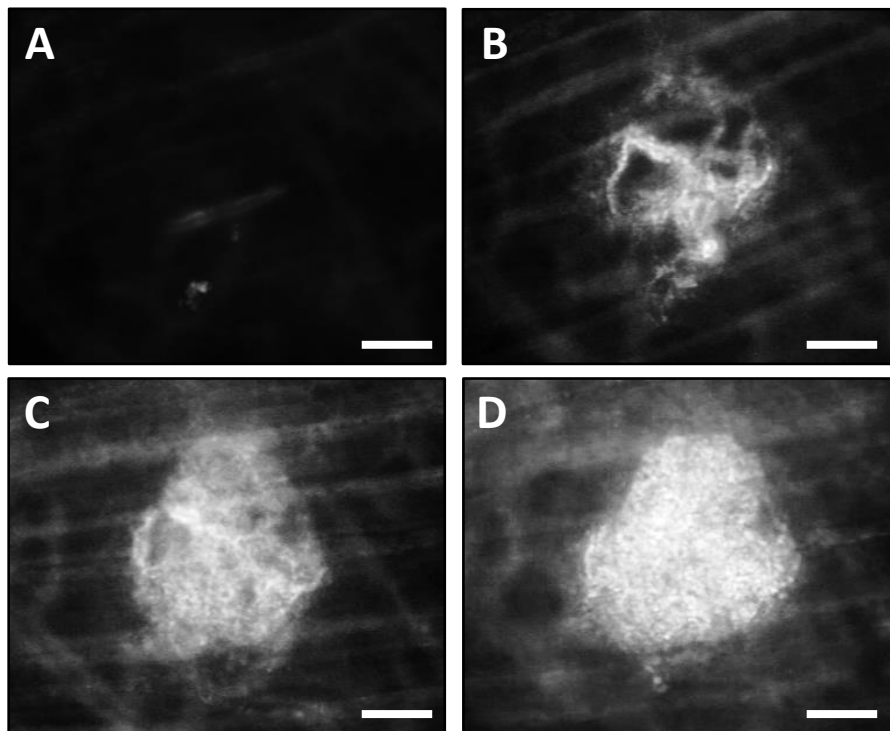


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Langerhans'schen Insel im Grünlichtfilter. An Tag 3 (A) ist noch keine Extravasation von Rhodamin 6G in das endokrine Gewebe der Inseln zu erkennen. An Tag 6 (B) ist die erste Extravasation von Rhodamin 6G durch das fenestrierte Endothel der neu gebildeten Kapillaren der Inseln zu beobachten. Diese Fläche nimmt bis Tag 10 (C) und Tag 14 (D) weiter zu. Alle Maßstäbe: 100 µm.

4.9 Analyse der Mikrozirkulation

Die Analyse der Mikrozirkulation transplanteder Langerhans'scher Inseln erfolgte mit einem digitalem Bildverarbeitungssystem (CapImage; Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland). Am Tag 0 wurde die initiale Größe der einzelnen Langerhans'schen Inseln bestimmt und für jedes Versuchstier ein Mittelwert errechnet. Die Bestimmung der mikrozirkulatorischen Parameter erfolgte an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation. Die vaskuläre Fläche beschreibt die Fläche des neu gebildeten Kapillarnetzwerks pro Insel in (mm²). Die funktionelle Kapillardichte ergibt sich aus der Länge der neu gebildeten und perfundierten Kapillaren pro Fläche des vaskulären Gefäßnetzwerkes der Insel, angegeben in (cm/cm²). Zusätzlich wurde die Fläche der Rhodamin Anreicherung jeder Insel in (mm²) bestimmt. Um den potentiellen Einfluss unterschiedlicher initialer Inselgrößen zwischen den Versuchsgruppen bei der Beurteilung der vaskulären Fläche und der Rhodamin Anreicherung zu vermeiden, wurden die Messwerte jeder einzelnen Insel ins Verhältnis zur initialen Inselgröße gesetzt. Daraus ergaben sich die relative Größe des vaskulären Netzwerkes und die relative Größe der Rhodamin Anreicherung. Letzteres wird im Weiteren als endokrine Revaskularisierung bezeichnet. Der Durchmesser (d) und die Flussgeschwindigkeit (v) von ca. 7 neu gebildeten Kapillaren wurden jeweils in (mm) und (µm/s) quantifiziert und auf jede Insel gemittelt. Schließlich wurde der mikrovaskuläre Volumenfluss in jedem Gefäß mittels der Formel: $\pi \cdot v \cdot (d/2)^2 / K$ bestimmt und in (pl/s) quantifiziert. Dabei bezeichnet K den Baker-Wayland Faktor [Lipowsky und Zweifach, 1978].

4.10 Histologie

4.10.1 Histologische Präparate

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Abschnitte der Rückenhautkammer, die transplantierte Inseln enthielten, sorgfältig mit einem Skalpell exzidiert. Die Proben des Inseln enthaltenden Rückenhautkammerngewebes wurden für 24 h in 4 % Formalin fixiert. Des Weiteren wurde für die Fixierung der frisch isolierten Inseln ein Gemisch aus 100 µl HepatoQuick®, 50 µl humanem Citratplasma und 10 µl 10% CaCl₂ Lösung in den Deckel eines Eppendorf-Gefäßes pipettiert und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 40 bis 50 Inseln mit 10 µl HepatoQuick®, 5 µl humanem Citratplasma und 1 µl 10 % CaCl₂ Lösung auf die gelatinöse Schicht gegeben und für 15 min bei 37 °C aushärten lassen. Zum Schluss wurde eine weitere Schicht aus den drei Komponenten dazugegeben. Das fest gewordene

Gerinnsel wurde aus dem Deckel des Eppendorf-Gefäßes gelöst und ebenfalls für 24 h in 4% Formalin fixiert. Daraufhin wurden die Proben der transplantierten und isolierten Inseln nach histologischem Standardprotokoll in Paraffin eingeblockt und 3 µm dicke Schnitte angefertigt.

4.10.2 Immunhistochemische Färbung

Um die transplantierten Langerhans'schen Inseln auf ihre zelluläre Zusammensetzung zu untersuchen, wurden die Schnitte auf Insulin, Glucagon, Somatostatin, CD31 und GFP gefärbt. Als Primärantikörper dienten monoklonale Antikörper. Verwendet wurden ein Kaninchen anti-Maus-Insulin Antikörper (1:100; Abcam, Cambridge, UK), ein Maus anti-Maus-Glucagon Antikörper (1:100; Abcam, Cambridge, UK), ein Ratte anti-Maus-Somatostatin Antikörper (1:100; Abcam, Cambridge, UK), ein Ratte anti-Maus-CD31 Antikörper (1:100; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) und ein Ziege anti-Maus-GFP Antikörper (1:50; Rocland Immunochemical Inc., Limerick, USA). Die Präparate wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten polyklonale Antikörper. Verwendet wurden ein Ziege anti-Kaninchen Antikörper (1:100; Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA), ein Ziege anti-Maus Antikörper (1:100; Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) ein Ziege anti-Ratte Antikörper (1:100; Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) und ein Esel anti-Ziege Antikörper (1:100; Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) in Kombination mit Streptavidin (1:50; Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA).

Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops (BX60F; Olympus, Hamburg, Deutschland). Die Anzahl der Insulin-, Glucagon-, Somatostatin-, CD31- und GFP-positiven Zellen wurde unter Verwendung der ImageJ Software (NIH, Bethesda, MD, USA) ermittelt und ist in % aller sichtbaren Zellen angegeben.

4.11 Experimentelle Gruppen

Gemäß den Fragestellungen wurden die Versuchstiere sieben verschiedenen experimentellen Gruppen zugeordnet.

Um den Einfluss einer EPO Behandlung der Empfänger auf die Revaskularisierung frei transplantierte Langerhans'scher Inseln zu bestimmen, wurden zwei experimentelle Gruppen untersucht.

- Die erste Gruppe, die Kontrollgruppe (CON, n=8), erhielt täglich vom Tag der Transplantation an für 14 Tage 0,1 ml NaCl i.p. verabreicht.
- Die zweite Gruppe, die EPO-Gruppe (EPO, n=8), erhielt täglich vom Tag der Transplantation an für 14 Tage 500 UI/kg KG i.p. verabreicht.

Die Experimente zur Untersuchung der Auswirkungen der DPO Behandlung der Empfänger auf die Revaskularisierung frei transplantierte Langerhans'scher Inseln bestand aus drei unterschiedlichen Gruppen.

- Die erste Gruppe, die Kontrollgruppe (CON-DPO, n=9), erhielt alle 3 Tage beginnend am Tag der Transplantation über 14 Tage 0,1 ml NaCl i.p. verabreicht.
- Die zweite Gruppe, die DPO-Niedrigdosis-Gruppe (DPO 2,5 µg, n=9), erhielt alle 3 Tage beginnend am Tag der Transplantation über 14 Tage 2,5 µg/kg KG DPO i.p. verabreicht.
- Die dritte Gruppe, die DPO-Hochdosis-Gruppe (DPO 10 µg, n=9), erhielt alle 3 Tage beginnend am Tag der Transplantation über 14 Tage 10 µg/kg KG DPO i.p. verabreicht.

Um den Einfluss einer EPO Vorbehandlung der Empfänger auf die Revaskularisierung frei transplantierte Langerhans'scher Inseln zu bestimmen, wurden zwei experimentelle Gruppen untersucht.

- Die erste Gruppe, die Kontroll-Vorbehandlungs-Gruppe (CON-Pre, n=8), erhielt täglich beginnend 6 Tage vor der Transplantation 0,1 ml NaCl i.p. verabreicht.
- Die zweite Gruppe, die EPO-Vorbehandlungs-Gruppe (EPO-Pre, n=8), erhielt täglich beginnend 6 Tage vor der Transplantation 500 UI/kg KG i.p. verabreicht.

- Zusätzlich wurden die transplantierten Langerhans'schen Inseln an Tag 6 in der Kontroll- und EPO-Vorbehandlungs-Gruppe (jeweils n=3) auf ihre zelluläre Zusammensetzung untersucht.

4.12 Statistische Analyse

Die ermittelten mikrozirkulatorischen Parameter der Transplantate wurden auf jedes Versuchstier gemittelt. Diese wurden in der jeweiligen Gruppe erneut zu einem Mittelwert zusammengefasst und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet. Zu jeweiligen Beobachtungszeitpunkten wurden die Werte zwischen den experimentellen Gruppen verglichen. Nach Testung auf Normalverteilung und gleicher Varianz wurden bei zwei zu vergleichenden Gruppen der ungepaarte Student's t-Test und bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen eine Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Student-Newman-Keul-Test angewendet. Lag keine Normalverteilung vor, wurde ein Mann-Whitney-U-Test bzw. eine Kruskal-Wallis-Analyse mit entsprechenden post-hoc Tests durchgeführt. Um auf Zeiteffekte in den einzelnen Gruppen zu untersuchen, wurde bei Normalverteilung eine Einweg-Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA), ansonsten eine Friedman-Analyse und entsprechende post-hoc Tests durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ akzeptiert. Alle Berechnungen erfolgten mittels SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

5 Ergebnisse

5.1 Histologische Untersuchung frisch isolierter Langerhans'scher Inseln

Um einen Vergleich zwischen der zellulären Zusammensetzung frisch isolierter und transplanteder Inseln ziehen zu können, wurden zu Beginn frisch isolierte Inseln immunhistochemisch auf Insulin-, Glucagon-, Somatostatin-, und CD31-positiven Zellen gefärbt (Abb. 7 A-D). Eine Analyse von 10 Inseln ergab, dass 70 % der Inselzellen positiv für Insulin waren, während 10 % Glucagon, 5 % Somatostatin und weitere 10 % den Endothelzell-Marker CD31 exprimierten (Abb. 7 E).

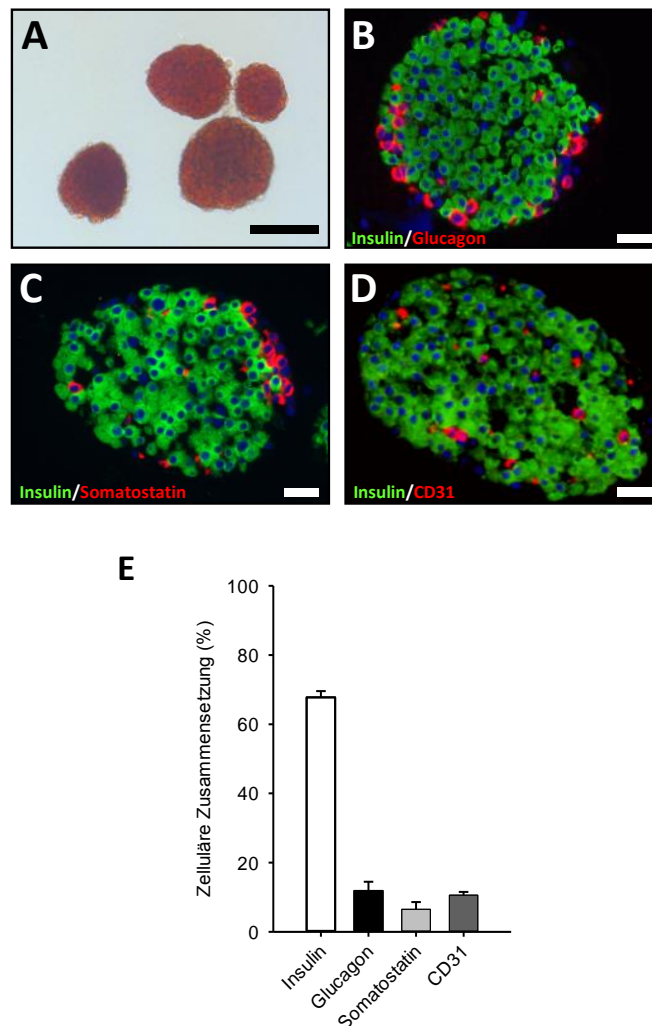


Abbildung 7: (A) Lichtmikroskopische Aufnahme von Neutralrot-gefärbten frisch isolierten Inseln von GFP+/Tie+ FVB/N Spendermäusen. Maßstab: 200 μ m. (B-D) Immunfluoreszenzfärbung auf Insulin/Glucagon (B), Insulin/Somatostatin (C) und Insulin/CD31 (D) in frisch isolierten Inseln. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (blau). Alle Maßstäbe: 25 μ m. (E) Quantifizierung von Insulin- (weiße Säule), Glucagon- (schwarze Säule), Somatostatin- (hellgraue Säule) und CD31- (dunkelgraue Säule) positiven Zellen (in % aller sichtbaren Zellen) in frisch isolierten Inseln (n=10). Mittelwerte \pm SEM.

5.2 Auswirkung einer Erythropoietin-Behandlung auf die Revaskularisierung transplanteder Langerhans'scher Inseln

5.2.1 Initiale Inselgröße

Die ersten beiden experimentellen Gruppen wurden ab dem Tag der Transplantation entweder mit EPO (EPO-Gruppe) oder NaCl (CON-Gruppe) täglich über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen behandelt.

Die initiale Inselgröße, die durch die Neutralrot-Fluoreszenz ermittelt wurde, erreichte Mittelwerte von 0,081 mm² bis 0,107 mm² in den beiden Versuchsgruppen. Einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gab es nicht (Abb. 8).

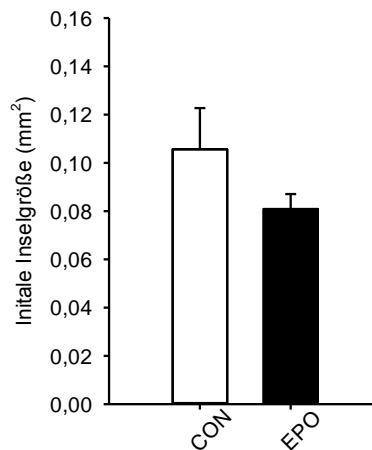


Abbildung 8: Quantitative Bestimmung der initialen Inselgröße (mm²) der transplantierten Langerhans'schen Inseln am Tag der Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe (n=8, weiße Säule) und der EPO-Gruppe (n=8, schwarze Säule). Mittelwerte \pm SEM.

5.2.2 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte errechnet sich aus der Länge der perfundierten, neugebildeten Mikrogefäßen im Verhältnis zur vaskularisierten Fläche der transplantierten Inseln. In beiden Gruppen stieg die funktionelle Kapillardichte über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich an und erreichte an Tag 14 Werte von ca. 380 cm/cm² (CON-Gruppe) bzw. 420 cm/cm² (EPO-Gruppe). Interessanterweise zeigte sich in der EPO-Gruppe an Tag 6 eine signifikant höhere funktionelle Kapillardichte im Vergleich zur CON-Gruppe (Abb. 9 und Abb. 10).

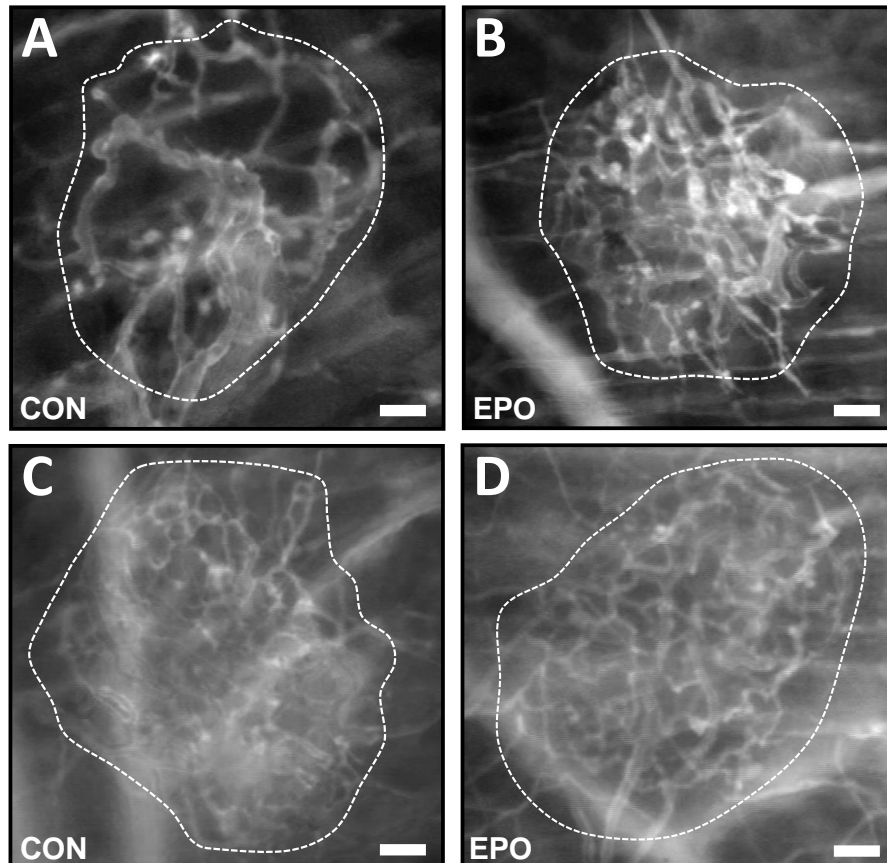


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von frei transplantierten Langerhans'schen Inseln (markiert mit gestrichelten Linien) an den Tagen 6 und 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe (A und C) und der EPO-Gruppe (B und D). Das Gefäßsystem wurde mit Hilfe von FITC-Dextran 150,000 (i.v.) kontrastiert. Alle Maßstäbe: 50 µm.

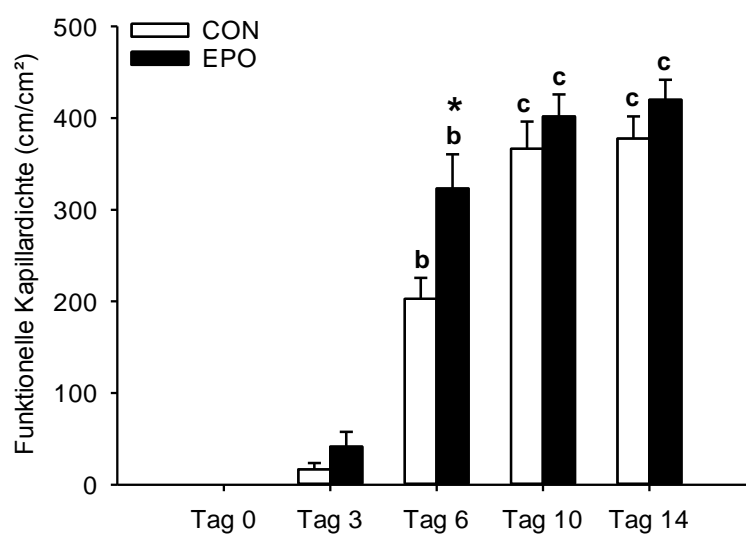


Abbildung 10: Quantitative Bestimmung der funktionellen Kapillardichte (cm/cm²) an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe (n=8, weiße Säulen) und der EPO-Gruppe (n=8, schwarze Säulen). Mittelwerte ± SEM. ^bP < 0.05 vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^cP < 0.05 vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^{*}P < 0.05 vs. CON.

5.2.3 Relative Größe des vaskulären Netzwerkes

Die relative Größe des vaskulären Netzwerkes bezeichnet die Fläche des vaskulären Netzwerkes im Verhältnis zur initialen Inselgröße. Die Mittelwerte dieses Parameters stiegen in beiden Gruppen bis Tag 6 an und veränderten sich daraufhin bis Tag 14 nur marginal. Die relative Größe des vaskulären Netzwerkes war in der EPO-Gruppe an Tag 6 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 11).

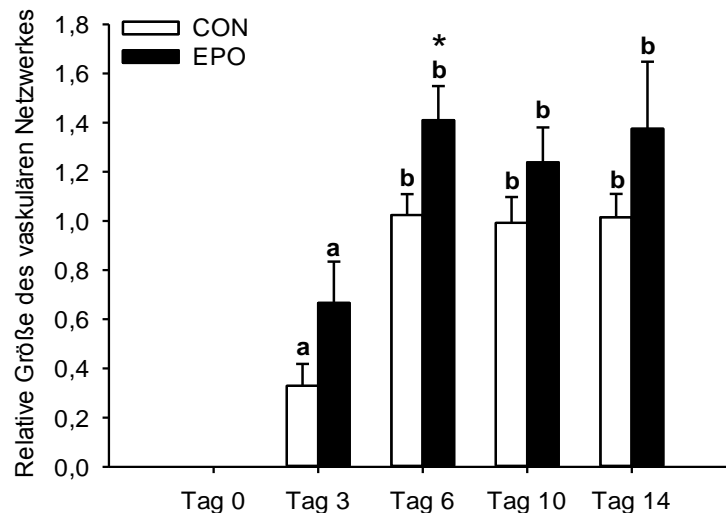


Abbildung 11: Quantitative Bestimmung der relativen Größe des vaskulären Netzwerkes an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe ($n=8$, weiße Säulen) und der EPO-Gruppe ($n=8$, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM. ^a $P < 0.05$ vs. Tag 0 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^b $P < 0.05$ vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^{*} $P < 0.05$ vs. CON.

5.2.4 Endokrine Revaskularisierung

Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G ist in der Lage das fenestrierte Endothel der Langerhans'schen Inseln zu überwinden, und sich in den Mitochondrien der Inselzellen anzulagern. Dies war in der Fluoreszenzmikroskopie als kontrastverstärkte Fläche im Bereich der Transplantate zu erkennen (Abb. 12). Die endokrine Revaskularisierung, das Verhältnis von der Rhodamin-positiven Fläche zur initialen Inselfläche, stieg bis Tag 10 an und erreichte in der CON-Gruppe Werte von 0,47 (Tag 10) und 0,46 (Tag 14). In der EPO-Gruppe war das Verhältnis mit Werten von ca. 0,80 an den Tagen 10 und 14 zwar deutlich größer, allerdings war der Unterscheid zur CON-Gruppe nicht signifikant (Abb.13).

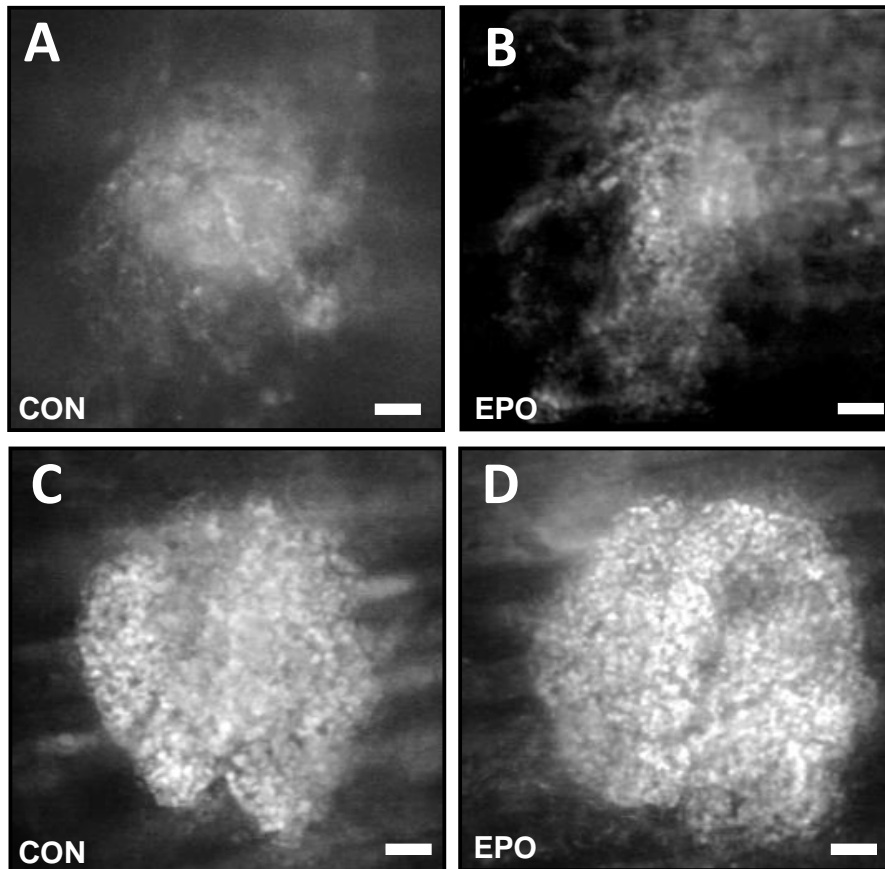


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von frei transplantierten Langerhans'schen Inseln an den Tagen 6 und 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe (A und C) und der EPO-Gruppe (B und D). Darstellung der zunehmenden endokrinen Revaskularisierung der Inseln durch mitochondriale Aufnahme von Rhodamin 6G. Alle Maßstäbe: 50 μ m.

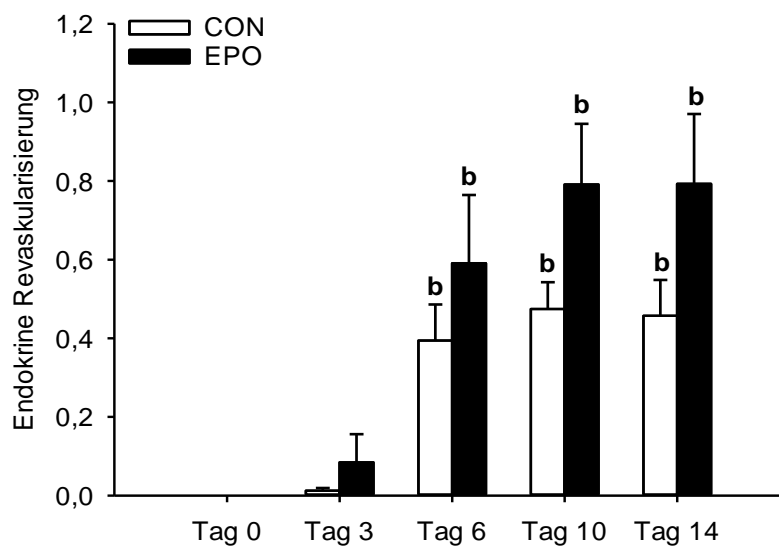


Abbildung 13: Quantitative Bestimmung der endokrinen Revaskularisierung an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe ($n=8$, weiße Säulen) und der EPO-Gruppe ($n=8$, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM. ^b $P < 0,05$ vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe.

5.2.5 Mikrozirkulation der transplantierten Inseln

Der Durchmesser der neu gebildeten Mikrogefäße wurde in beiden Gruppen von Tag 6 an kleiner und erreichte an Tag 14 vergleichbare Werte von 9,1 μm in der CON-Gruppe und 9,5 μm in der EPO-Gruppe (Tab. 1). Die RBZ-Geschwindigkeit nahm in beiden Gruppen bis Tag 10 zu und erreichte in der CON-Gruppe 431,0 $\mu\text{m/s}$ und in der EPO-Gruppe 337,8 $\mu\text{m/s}$ (Tab. 1). Der mikrovaskuläre Volumenfluss erreichte in beiden Gruppen sein Maximum an Tag 6 mit 30,3 pl/s in der CON-Gruppe und 25,4 pl/s in der EPO-Gruppe. Bis zum Tag 14 nahm der Volumenfluss wieder ab. Es fanden sich Werte von 23,0 pl/s in der CON-Gruppe und 12,5 pl/s in der EPO-Gruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied des Gefäßdurchmessers, der RBZ-Geschwindigkeit und des Volumenflusses gab es zwischen den beiden Gruppen nicht (Tab.1).

Tabelle 1: Quantitative Bestimmung von Durchmesser (μm), RBZ-Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) und Volumenfluss (pl/s) der neu gebildeten Mikrogefäße an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Inseln in die Rückenmarkkammer von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe ($n=8$) und der EPO-Gruppe ($n=8$).

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Durchmesser (μm)				
CON	11,8 \pm 1,8	12,1 \pm 0,8	9,4 \pm 0,5 ^b	9,1 \pm 0,2 ^b
EPO	12,4 \pm 0,7	10,7 \pm 0,6 ^a	9,6 \pm 0,4 ^a	9,5 \pm 0,5 ^a
RBZ Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)				
CON	51,9 \pm 31,7	330,6 \pm 54,8 ^a	431,0 \pm 67,1 ^a	425,9 \pm 69,4 ^a
EPO	73,0 \pm 40,6	322,8 \pm 57,5 ^a	337,8 \pm 75,7 ^a	236,0 \pm 74,7 ^a
Volumenfluss (pl/s)				
CON	3,1 \pm 1,8	30,3 \pm 5,7 ^a	28,7 \pm 6,8 ^a	23,0 \pm 3,8 ^a
EPO	7,6 \pm 4,3	25,4 \pm 4,7 ^a	21,5 \pm 3,7 ^a	12,5 \pm 4,1 ^a

Alle Daten sind Mittelwerte \pm SEM. ^a $P < 0.05$ vs. Tag 3; ^b $P < 0.05$ vs. Tag 6.

5.2.6 Anwachsrate

Die Anwachsrate (%) beschreibt den prozentualen Anteil der Inseln, die spätestens an Tag 14 in der Intravitalmikroskopie neu gebildete Mikrogefäße gezeigt haben. In der CON-Gruppe zeigten 84 %, in der EPO-Gruppe 87% der transplantierten Langerhans'schen Inseln

die Ausbildung neuer Gefäße. Ein statistisch signifikanter Unterschied gab es zwischen den beiden Gruppen nicht (Abb. 14).

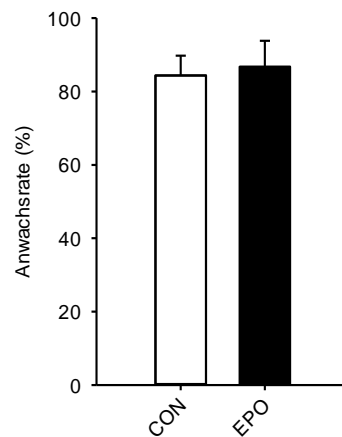


Abbildung 14: Quantitative Bestimmung der Anwachsrate (in % der Anzahl transplantierte Langerhans'scher Inseln) an Tag 14 nach Transplantation der Langerhans'schen in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe (weiße Säule, $n=8$) und der EPO-Gruppe (schwarze Säule, $n=8$). Mittelwerte \pm SEM.

5.2.7 Hämatokrit der Empfängertiere

Um die hämatopoetische Wirkung von EPO beurteilen zu können, wurde der Hämatokrit der Empfängertiere am Ende des Beobachtungszeitraums aus Blutproben der Vena Cava bestimmt. Die statistische Analyse zeigte, dass der Hämatokrit in der EPO Gruppe mit 44,9% gegenüber der CON-Gruppe mit 33,3% signifikant erhöht war (Abb. 15).

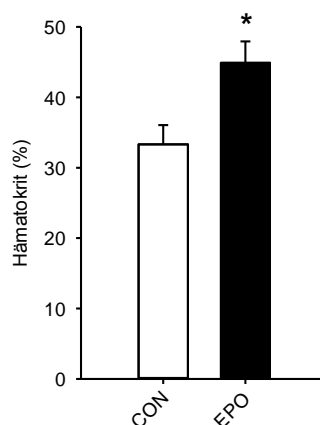


Abbildung 15: Quantitative Bestimmung des Hämatokrits (%) der FVB/N Empfängertiere an Tag 14 der CON-Gruppe (weiße Säule, $n=8$) und der EPO-Gruppe (schwarze Säule, $n=8$). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. CON.

5.2.8 Effekt der EPO-Behandlung auf die Gefäße im Kammergewebe

Um den Effekt von EPO auf die Gefäße des Kammergewebes zu bestimmen, wurde der Durchmesser der Arteriolen und Venolen ermittelt. An den Tagen 0 und 3 gab es keinen signifikanten Unterschied der Gefäßdurchmesser zwischen der EPO- und CON-Gruppe. Interessanterweise konnte ein vasodilativer Effekt des Glykoproteins ab 6 Tage nach Transplantation beobachtet werden. So war der Durchmesser der Gefäße in der EPO-Gruppe ab Tag 6 signifikant im Vergleich zur CON-Gruppe vergrößert und erreichte an Tag 14 Werte von 79 μm in Arteriolen, bzw. 126 μm in Venolen. Dagegen blieb der Gefäßdurchmesser in der CON-Gruppe mit 45-50 μm in Arteriolen und 68-74 μm in Venolen über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu konstant (Abb. 16 A und B).

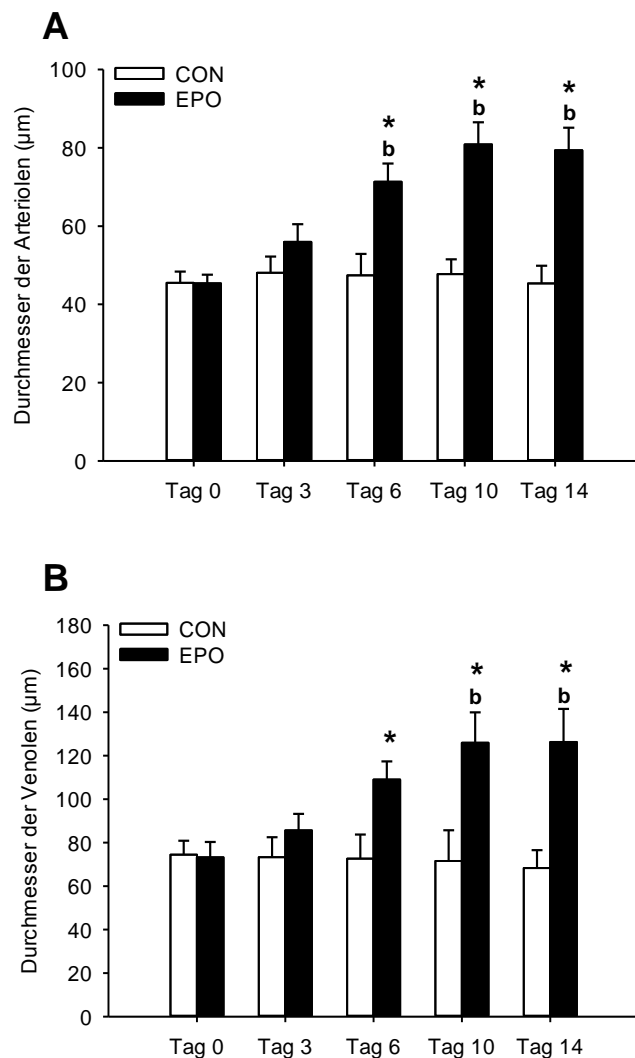


Abbildung 16: Quantitative Bestimmung des Durchmessers der Arteriolen (A) und Venolen (B) an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe (weiße Säulen, $n=8$) und der EPO-Gruppe (schwarze Säulen, $n=8$). Mittelwerte \pm SEM. ^b $P < 0.05$ vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^{*} $P < 0.05$ vs. CON.

5.2.9 Histologische Untersuchung der Transplantate

Am Ende des 14-tägigen Beobachtungszeitraums wurde Kammergewebe entnommen und die Inseln histologisch und immunhistochemisch untersucht, um zusätzliche Erkenntnisse über die zelluläre Zusammensetzung der transplantierten Langerhans'schen Inseln zu gewinnen.

Die Analyse zeigte, dass 45-50 % der Inselzellen positiv für Insulin waren, während 4-8 % der Zellen Glucagon, 7-8 % der Zellen Somatostatin und 29-34 % der Zellen CD-31 exprimierten. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der CON- und der EPO-Gruppe gab es nicht (Abb. 17 und Abb. 18).

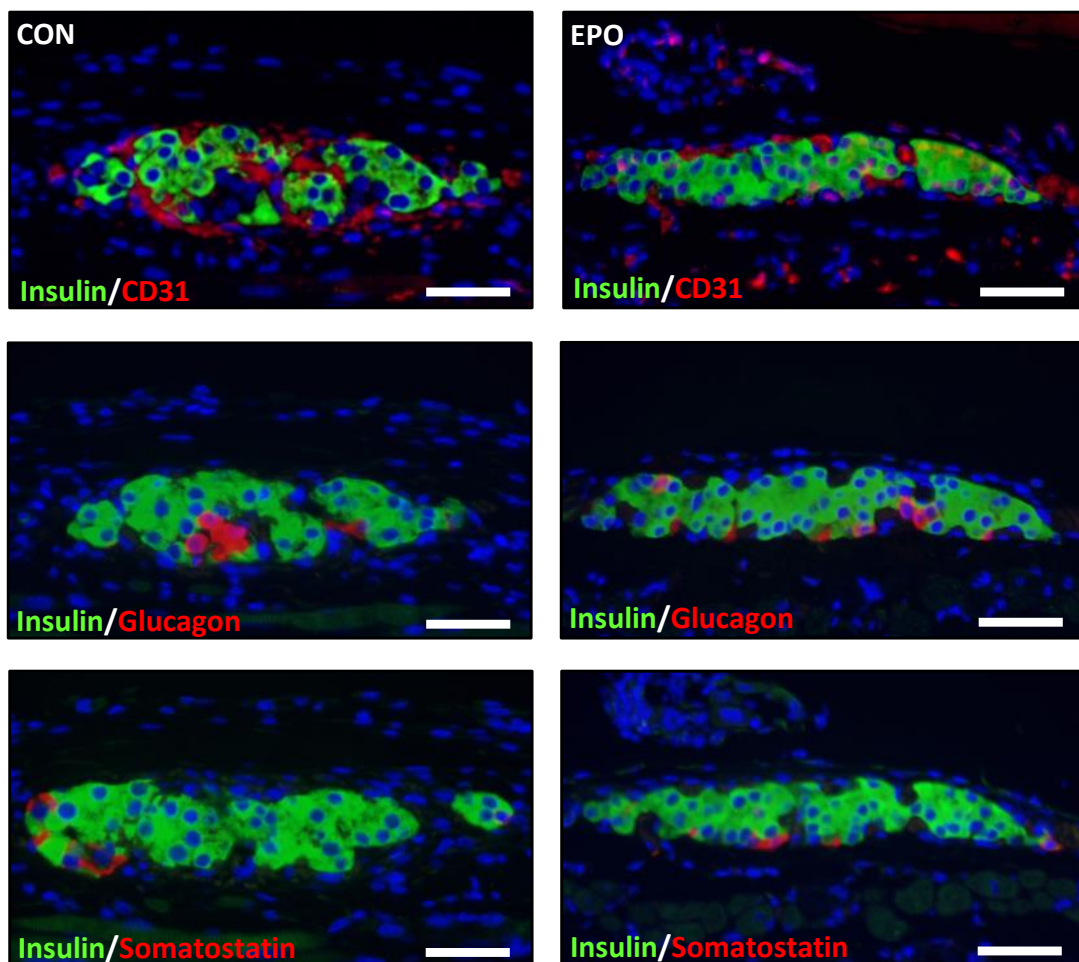


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von Insulin/CD31, Insulin/Glucagon und Insulin/Somatostatin in transplantierten Langerhans'schen Inseln an Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammern von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe und der EPO-Gruppe. Alle Maßstäbe: 50 μ m.

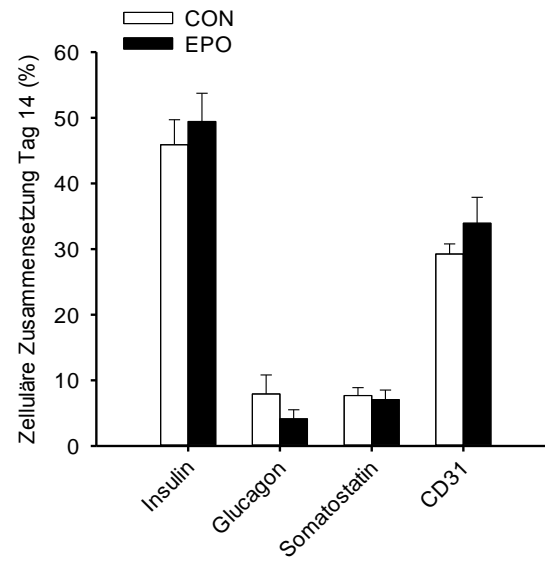


Abbildung 18: Quantitative Bestimmung des Anteils von Insulin-, Glucagon-, Somatostatin- und CD31-positiven Zellen (in % aller Zellen) der Langerhans'schen Inseln an Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammern von FVB/N Mäusen der CON-Gruppe (n=8, weiße Säulen) und der EPO-Gruppe (n=8, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM.

5.3 Auswirkungen einer Darbepoetin- α -Behandlung auf die Revaskularisierung transplantierter Langerhans'scher Inseln

Eine Behandlung der Empfängertiere mit EPO konnte die Revaskularisierung der transplantierten Langerhans'schen Inseln nur geringfügig beschleunigen. DPO besitzt im Vergleich zu EPO eine größere biologische Aktivität und längere Halbwertszeit. Aus diesem Grund wurde im zweiten Studienabschnitt untersucht, ob eine Behandlung mit DPO die Angiogenese der Transplantate mehr fördern kann. Darüber hinaus wurde in diesem Studienabschnitt eine Hochdosis-Gruppe eingeschlossen, um das angiogene Potential von DPO voll ausschöpfen zu können.

5.3.1 Initiale Inselgröße

Die Mittelwerte der initialen Inselgröße zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen der CON-DPO-Gruppe, der DPO-Niedrigdosis-Gruppe und der DPO-Hochdosis-Gruppe (Abb. 19).

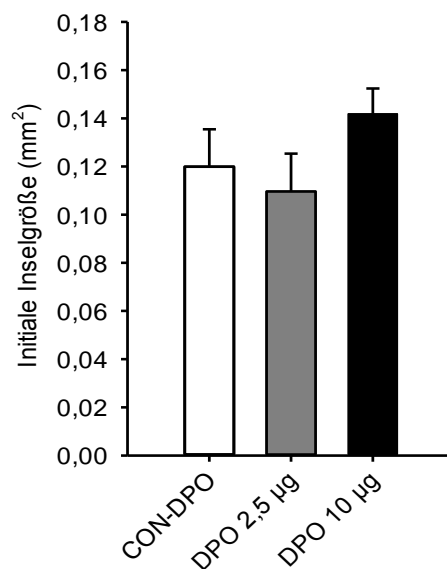


Abbildung 19: Quantitative Bestimmung der initialen Inselgröße (mm²) der transplantierten Langerhans'schen Inseln am Tag der Transplantation der CON-DPO-Gruppe (n=9, weiße Säule), der DPO-Niedrigdosis-Gruppe (n=9, graue Säule) und der DPO-Hochdosis-Gruppe (n=9, schwarze Säule). Mittelwerte \pm SEM.

5.3.2 Funktionelle Kapillardichte

Auch im dritten Studienabschnitt wurde die funktionelle Kapillardichte der transplantierten Langerhans'schen Inseln analysiert und zwischen den drei experimentellen Gruppen verglichen. Diese nahm in allen drei Gruppen während des Beobachtungszeitraums bis Tag 14 zu und erreichte Werte von 392,5 cm/cm² in der CON-DPO-Gruppe, 422,2 cm/cm² in der DPO-Niedrigdosis-Gruppe und 352,57 cm/cm² in der DPO-Hochdosis-Gruppe. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen (Abb. 20 und Abb. 21).

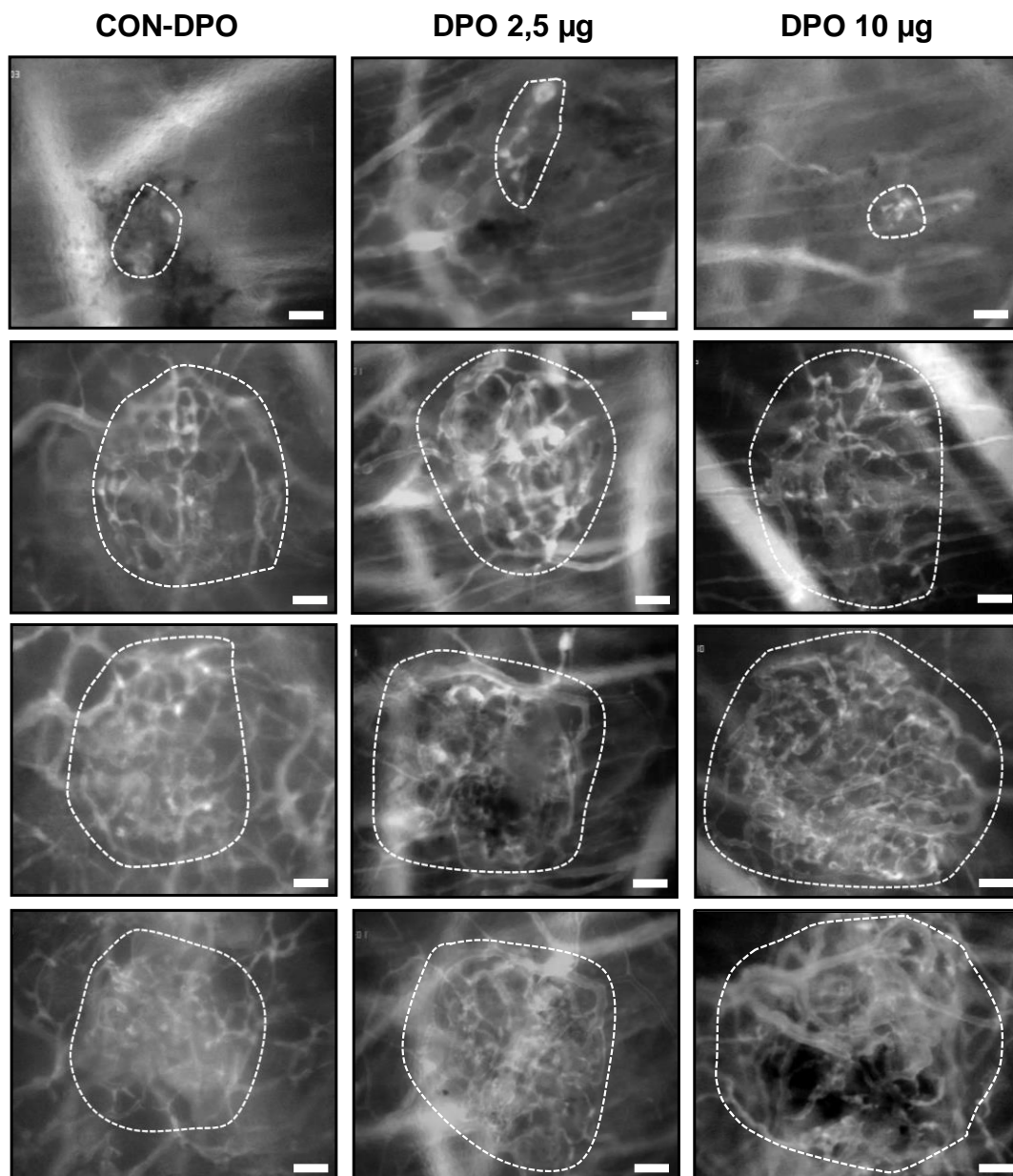


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Langerhans'schen Inseln (markiert mit gestrichelten Linien) an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe, der DPO-Niedrigdosis-Gruppe und der DPO-Hochdosis-Gruppe. Das Gefäßsystem wurde mit Hilfe von FITC-Dextran 150,000 (i.v.) kontrastiert. Alle Maßstäbe: 50 µm.

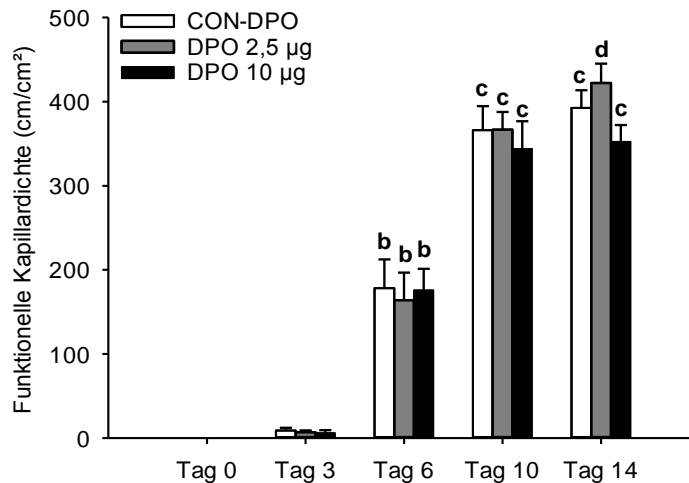


Abbildung 21: Quantitative Bestimmung der funktionellen Kapillardichte (cm/cm²) an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe (n=9, weiße Säulen), der DPO-Niedrigdosis-Gruppe (n=9, graue Säulen) und der DPO-Hochdosis-Gruppe (n=9, schwarze Säulen). Mittelwerte ± SEM; ^bP < 0.05 vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^cP < 0.05 vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^dP < 0.05 vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb der jeweiligen Gruppe.

5.3.3 Relative Größe des vaskulären Netzwerkes

Auch die relative Größe des vaskulären Netzwerkes zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3 Gruppen. In der CON-DPO-Gruppe stieg das Verhältnis auf einen Wert von 1,0 an Tag 6 und erreichte in der DPO-Niedrigdosis-Gruppe und DPO-Hochdosis-Gruppe seinen Maximalwert mit 1,4 bzw. 1,2 an Tag 10 (Abb. 20 und Abb. 22).

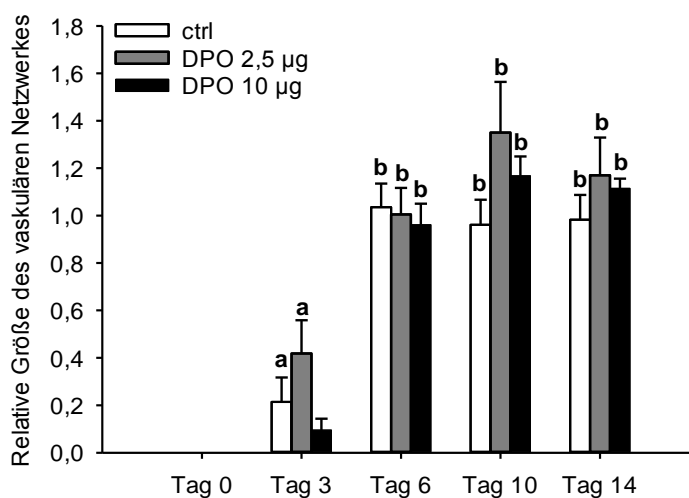


Abbildung 22: Quantitative Bestimmung der relativen Größe des vaskulären Netzwerkes an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe (n=9, weiße Säulen), der DPO-Niedrigdosis-Gruppe (n=9, graue Säulen) und der DPO-Hochdosis-Gruppe (n=9, schwarze Säulen). Mittelwerte ± SEM; ^aP < 0.05 vs. Tag 0; ^bP < 0.05 vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe.

5.3.4 Endokrine Revaskularisierung

Die endokrine Revaskularisierung der transplantierten Inseln stieg in allen 3 Gruppen bis Tag 10 an. Dabei erreichte das Verhältnis der Rhodamin-gefärbten Fläche zur initialen Inselgröße Werte von 0,54 in der Kontrollgruppe, 0,90 in der DPO-Niedrigdosis-Gruppe und 0,69 in der DPO-Hochdosis-Gruppe. Es gab jedoch zu keinem Untersuchungszeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen (Abb. 23 und Abb. 24).

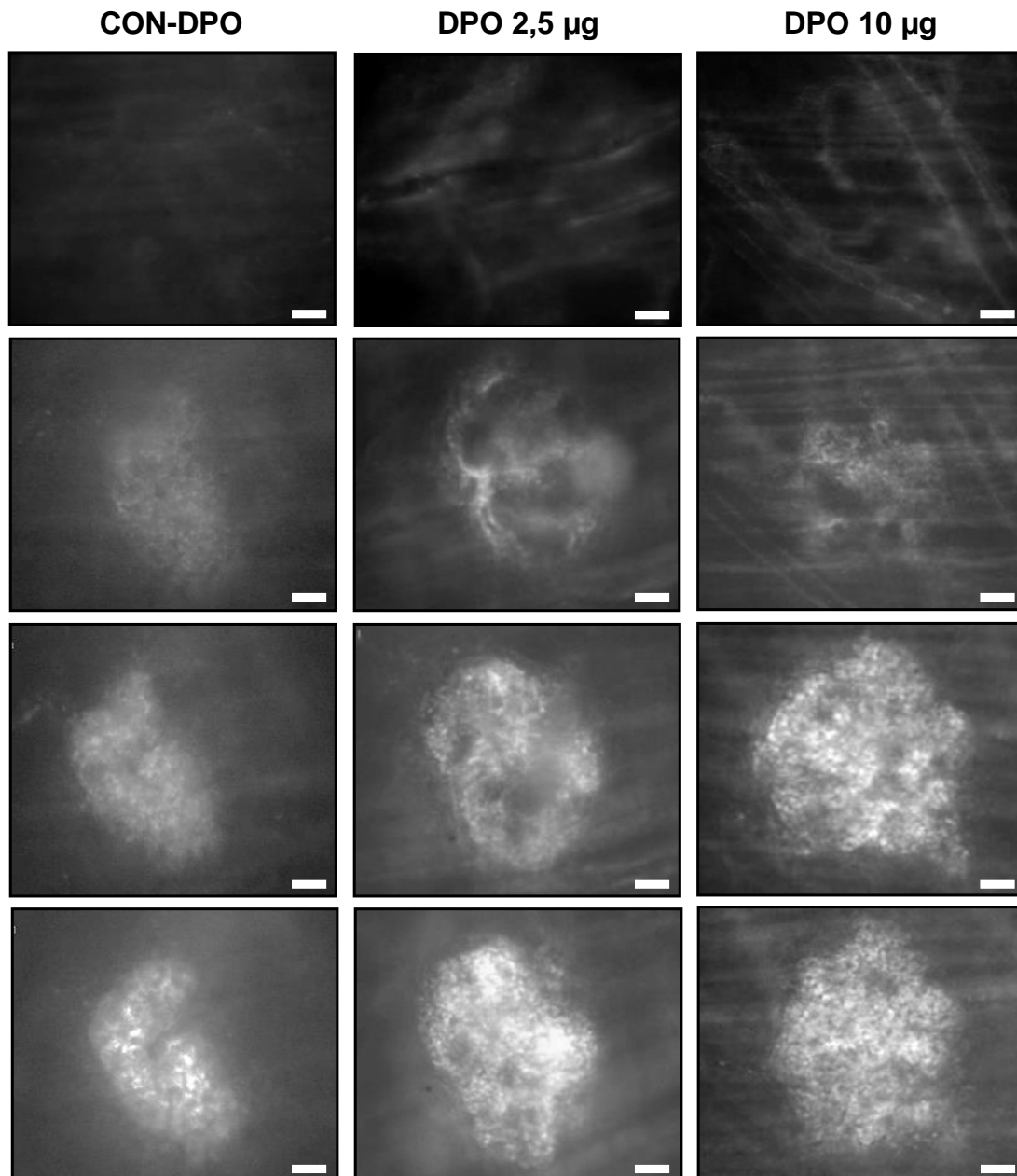


Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Langerhans'schen Inseln an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe, der DPO-Niedrigdosis-Gruppe und der DPO-Hochdosis-Gruppe. Darstellung der zunehmenden endokrinen Revaskularisierung der Inseln durch die mitochondriale Aufnahme von Rhodamin 6G. Alle Maßstäbe: 50 µm.

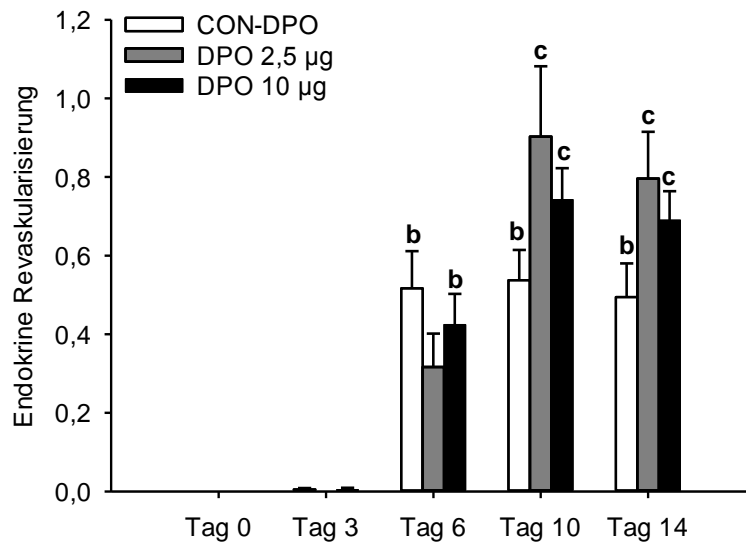


Abbildung 24: Quantitative Bestimmung der endokrinen Revaskularisierung an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe ($n=9$, weiße Säulen), der DPO-Niedrigdosis-Gruppe ($n=9$, graue Säulen) und der DPO-Hochdosis-Gruppe ($n=9$, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM; ^b $P < 0.05$ vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^c $P < 0.05$ vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb der jeweiligen Gruppe.

5.3.5 Mikrozirkulation der transplantierten Inseln

Wie im Studienabschnitt zuvor wurden die mikrohäodynamischen Parameter der transplantierten Langerhans'schen Inseln über den Beobachtungszeitraum quantifiziert. Der mittlere Durchmesser der Gefäße des mikrovaskulären Netzwerkes der transplantierten Inseln wurde im Laufe des Beobachtungszeitraums kontinuierlich kleiner und erreichte an Tag 14 in der Kontrollgruppe $9,2 \mu\text{m}$, in der DPO-Niedrigdosis-Gruppe $9,4 \mu\text{m}$ und in der DPO-Hochdosis-Gruppe $10,4 \mu\text{m}$. Dabei war an Tag 14 der Durchmesser in der DPO-Hochdosis-Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant vergrößert (Abb. 25 und Abb. 26).

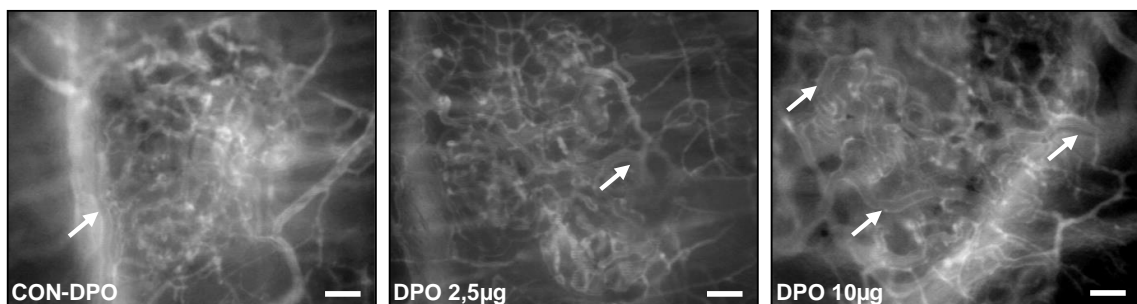


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Langerhans'schen Inseln an Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe, der DPO-Niedrigdosis-Gruppe und der DPO-Hochdosis-Gruppe. Weiße Pfeile markieren größere Gefäße innerhalb des vaskulären Netzwerkes. Das Gefäßsystem wurde mit Hilfe von FITC-Dextran 150,000 (i.v.) kontrastiert. Alle Maßstäbe: $50 \mu\text{m}$.

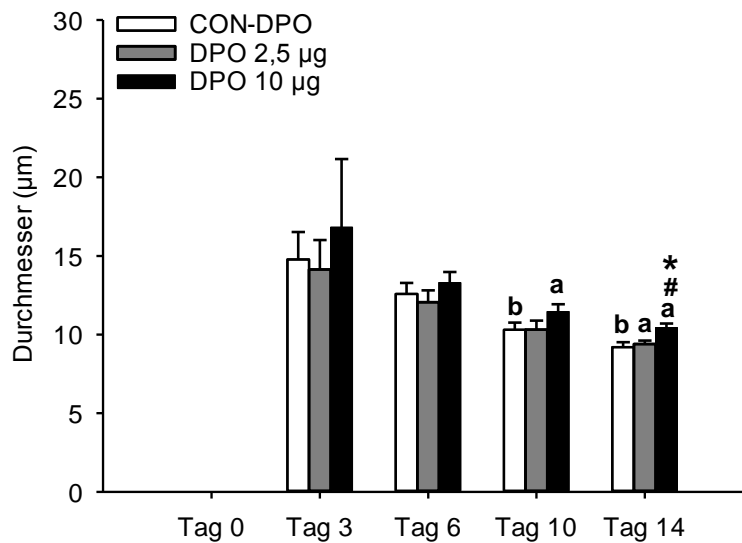


Abbildung 26: Quantitative Bestimmung des Durchmessers der Gefäße des mikrovaskulären Netzwerkes an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe ($n=9$, weiße Säulen), der DPO-Niedrigdosis-Gruppe ($n=9$, graue Säulen) und der DPO-Hochdosis-Gruppe ($n=9$, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM; ^a $P < 0.05$ vs. Tag 3; ^b $P < 0.05$ vs. Tag 3 und 6 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^{*} $P < 0.05$ vs. CON-DPO; [#] $P < 0,05$ vs. DPO-Niedrigdosis-Gruppe.

Die RBZ-Geschwindigkeit nahm bis Tag 10 in der DPO-Niedrigdosis-Gruppe auf 466 $\mu\text{m/s}$ zu, in der CON-DPO- und DPO-Hochdosis-Gruppe stieg die RBZ-Geschwindigkeit bis Tag 14 auf Werte von 465 $\mu\text{m/s}$ bzw. 553 $\mu\text{m/s}$ an. Ein statistisch signifikanter Unterschied fand sich zwischen den drei Gruppen nicht (Abb. 27).

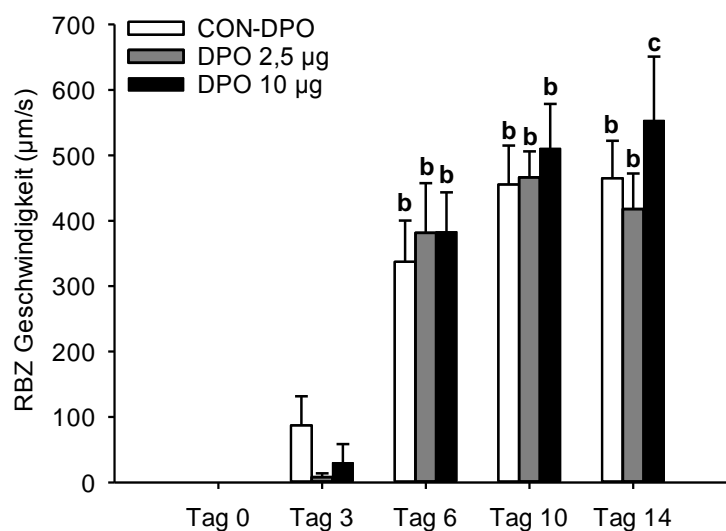


Abbildung 27: Quantitative Bestimmung der RBZ-Geschwindigkeit in den Gefäßen des mikrovaskulären Netzwerkes an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe ($n=9$, weiße Säulen), der DPO-Niedrigdosis-Gruppe ($n=9$, graue Säulen) und der DPO-Hochdosis-Gruppe ($n=9$, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM; ^b $P < 0.05$ vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^c $P < 0.05$ vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb der jeweiligen Gruppe.

Der Volumenfluss in den Gefäßen des mikrovaskulären Netzwerkes erreichte in der CON-DPO-Gruppe an Tag 10 sein Maximum von 33,4 pl/s und fiel an Tag 14 wieder auf 25,5 pl/s ab. In der DPO-Niedrigdosis-Gruppe stieg der Volumenfluss bis Tag 6 auf einen Maximalwert von 40,9 pl/s an und sank bis Tag 14 wieder auf 24 pl/s ab. Der Volumenfluss in der DPO-Hochdosis-Gruppe hatte am Tag 10 sein Maximum mit 48,4 pl/s und erreichte an Tag 14 noch 40,3 pl/s. In der DPO-Hochdosis-Gruppe zeigte sich an Tag 14 ein statistisch signifikant höherer Volumenfluss im Vergleich zur CON-DPO- und DPO-Niedrigdosis-Gruppe (Abb. 28).

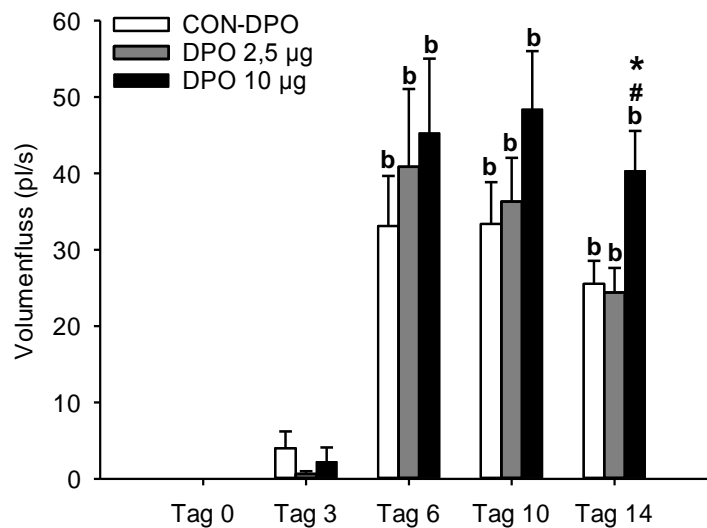


Abbildung 28: Quantitative Bestimmung des Volumenflusses der Gefäße des mikrovaskulären Netzwerkes an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO ($n=9$, weiße Säulen), der DPO-Niedrigdosis-Gruppe ($n=9$, graue Säulen) und der DPO-Hochdosis-Gruppe ($n=9$, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. CON-DPO; # $P < 0,05$ vs. DPO-Niedrigdosis-Gruppe; $^bP < 0.05$ vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe.

5.3.6 Anwachsrate

Vergleichbar wie nach der EPO-Behandlung im ersten Studienabschnitt führte auch die DPO-Behandlung zu keinem signifikanten Anstieg der Anwachsrate (%). Der prozentuale Anteil erfolgreich angewachsener Inseln reichte von 79 % in der CON-DPO-Gruppe und 84 % in der DPO-Hochdosis-Gruppe bis 94 % in der DPO-Niedrigdosis-Gruppe (Abb. 29). Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

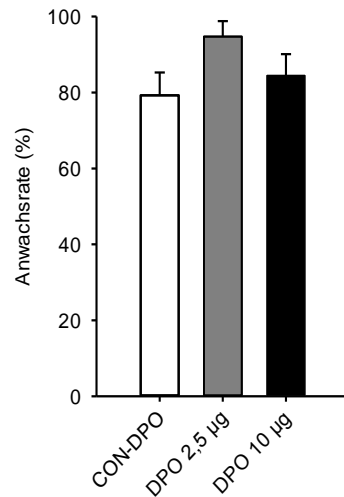


Abbildung 29: Quantitative Bestimmung der Anwachsrate (in % aller transplantierten Langerhans'schen Inseln) an Tag 14 nach Transplantation der Langerhans'scher Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe (n=9, weiße Säule), der DPO-Niedrigdosis-Gruppe (n=9, graue Säule) und der DPO-Hochdosis-Gruppe (n=9, schwarze Säule). Mittelwerte \pm SEM.

5.3.7 Hämatokrit der Empfängertiere

Der Hämatokrit der Empfängertiere wurde am Ende des Beobachtungszeitraums aus Blutproben, die aus der Vena Cava entnommen wurden, bestimmt. Dabei war der systemische Hämatokrit mit 57,3% in der DPO-Hochdosis-Gruppe im Vergleich zur CON-DPO-Gruppe mit 34,3% und zur DPO-Niedrigdosis-Gruppe mit 41,3% signifikant erhöht (Abb. 30).

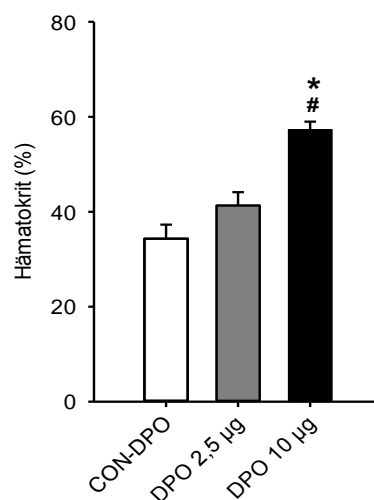


Abbildung 30: Quantitative Bestimmung des Hämatokrits (%) an Tag 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe (n=9, weiße Säule), der DPO-Niedrigdosis-Gruppe (n=9, graue Säule) und der DPO-Hochdosis-Gruppe (n=9, schwarze Säule). Mittelwerte \pm SEM. *P < 0,05 vs. CON-DPO; #P < 0,05 vs. DPO-Niedrigdosis-Gruppe.

5.3.8 Histologische Untersuchung der Transplantate

Wie im Studienabschnitt zuvor wurde am Ende des Beobachtungszeitraums Kammergewebe entnommen und die Langerhans'schen Inseln immunhistochemisch auf ihre zelluläre Zusammensetzung untersucht. Abbildung 31 zeigt immunhistochemische Färbungen der transplantierten Langerhans'schen Inseln an Tag 14. Der Anteil von Insulin-positiven Zellen reichte von 46 bis 49 % und der Anteil von CD31-positiven Zellen von 29 bis 36 % ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen. Dabei waren 9 bis 14 % der CD31-positiven Zellen auch GFP-positiv. Auch hier gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den drei experimentellen Gruppen (Abb. 31 und Abb. 32).

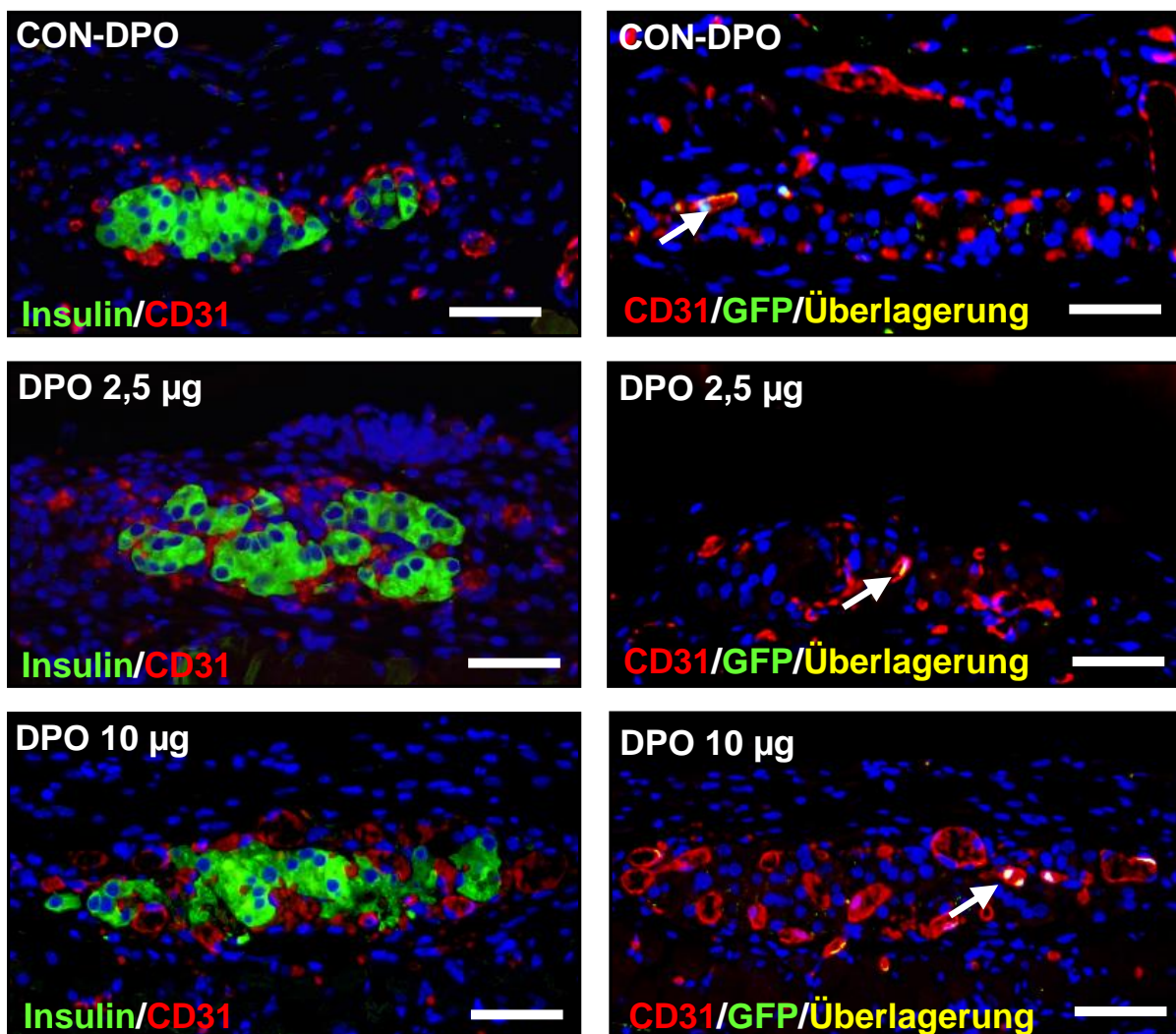


Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung von Insulin/CD31 und CD31/GFP/Überlagerung in Langerhans'schen Inseln an Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe, der DPO-Niedrigdosis-Gruppe und der DPO-Hochdosis-Gruppe. Alle Maßstäbe: 50 µm.

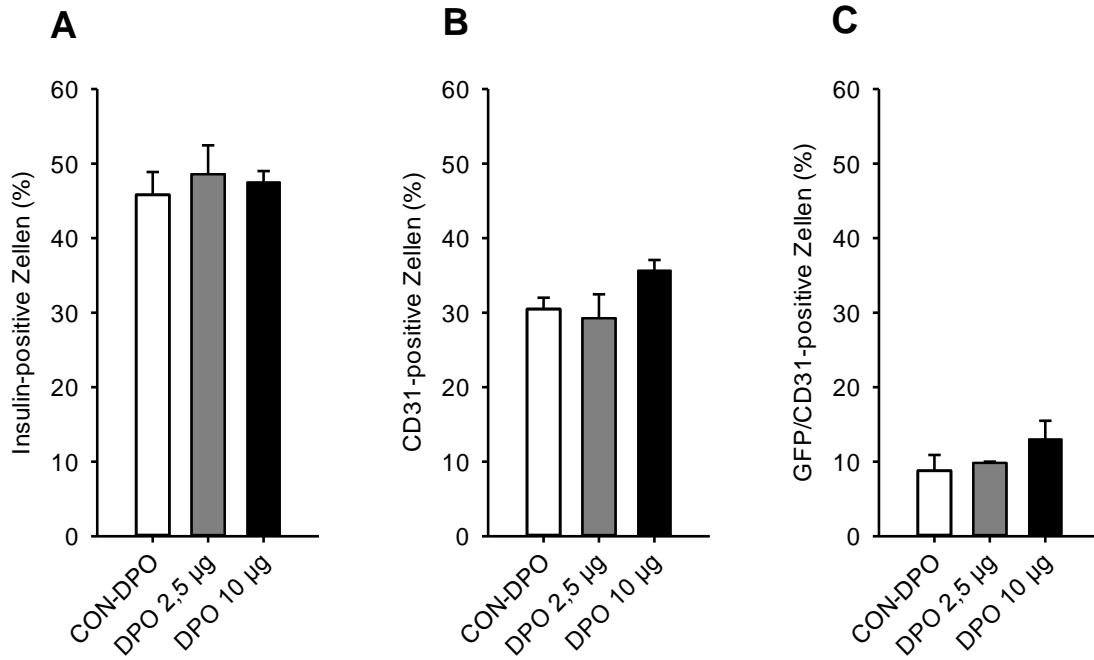


Abbildung 32: Quantitative Bestimmung von Insulin- (A) und CD31- (B) positiven Zellen (in % aller Inselzellen) und von GFP- (C) positiven Zellen (in % aller CD31-positiven Zellen) in Langerhans'schen Inseln an Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-DPO-Gruppe, der DPO-Niedrigdosis-Gruppe und der DPO-Hochdosis-Gruppe. Mittelwerte \pm SEM.

5.4 Auswirkung einer Erythropoietin-Vorbehandlung auf die Revascularisierung transplantierter Langerhans'scher Inseln

5.4.1 Initiale Inselgröße

Im dritten Studienabschnitt wurden die Empfängertiere 6 Tage vor Transplantation täglich mit EPO (EPO-Pre) oder mit NaCl (CON-Pre) bis zum Tage der Transplantation behandelt. Dadurch sollte der Wirkspiegel des Glykoproteins die ersten Tage nach Transplantation erhöht werden. Durch die Neutralrot-Fluoreszenz wurde, wie in den ersten beiden Studienabschnitten, zu Beginn die Ausgangsgröße der Inseln bestimmt. Die mittlere Inselgröße betrug in der CON-Pre-Gruppe, sowie in der EPO-Pre-Gruppe $\sim 0,1 \text{ mm}^2$ (Abb. 33).

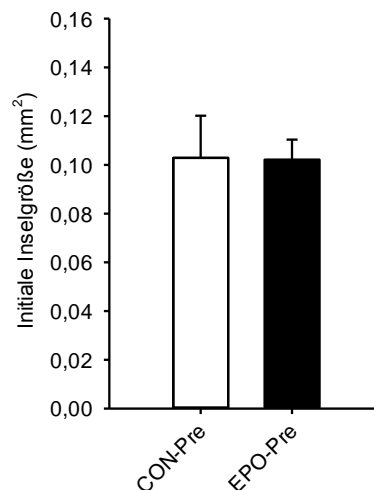


Abbildung 33: Quantitative Auswertung der initialen Inselgröße (mm²) der transplantierten Langerhans'schen Inseln am Tag der Transplantation der CON-Pre-Gruppe (n=8, weiße Säule) und der EPO-Pre-Gruppe (n=8, schwarze Säule). Mittelwerte \pm SEM.

5.4.2 Funktionelle Kapillardichte

Auch im dritten Studienabschnitt wurde die funktionelle Kapillardichte aus der Länge der neugebildeten Mikrogefäße pro vaskularisierter Fläche bestimmt. Diese stieg in der CON-Pre-Gruppe während des Beobachtungszeitraums kontinuierlich an und erreichte ihren Maximalwert von 350 cm/cm^2 an Tag 14. Die EPO-Pre-Gruppe dagegen zeigte an den Tagen 3, 6, und 10 eine signifikant erhöhte Kapillardichte im Vergleich zur CON-Pre-Gruppe. (187 cm/cm^2 in der CON-Pre-Gruppe vs. 393 cm/cm^2 in der EPO-Gruppe an Tag 6). An Tag 14 glich sich die funktionelle Kapillardichte in beiden Gruppen wieder an (Abb. 34 und Abb. 35).

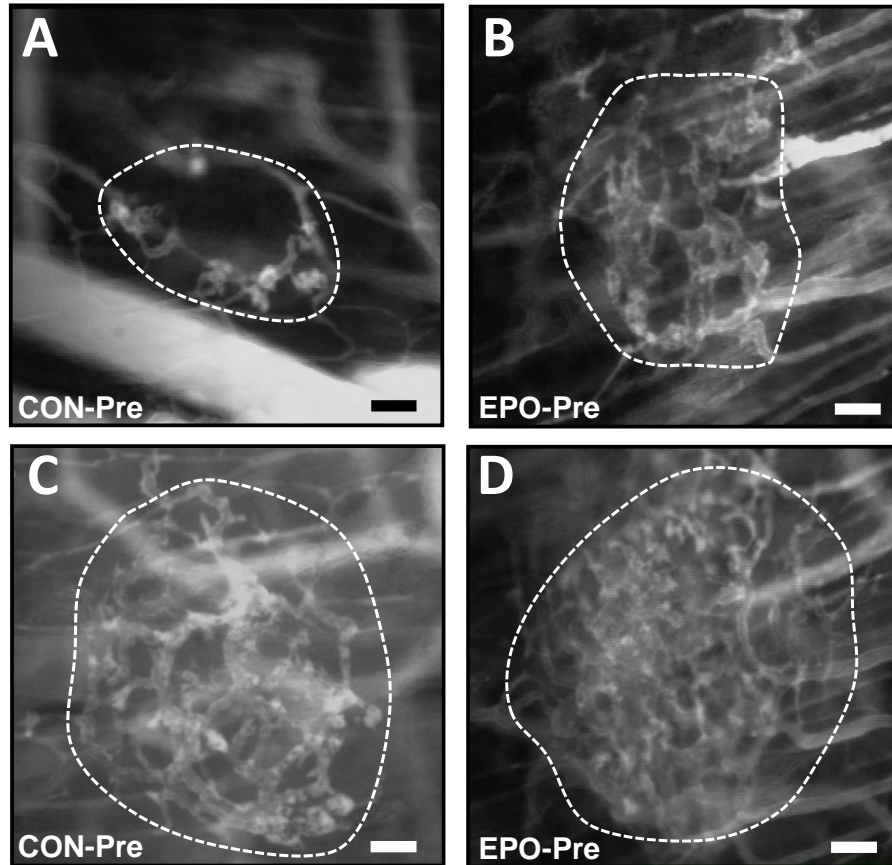


Abbildung 34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Langerhans'schen Inseln (markiert mit gestrichelten Linien) an den Tagen 3 (A und B) und 6 (C und D) nach Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe und der EPO-Pre-Gruppe. Das Gefäßsystem wurde mit Hilfe von FITC-Dextran 150,000 (i.v.) kontrastiert. Alle Maßstäbe: 50 µm

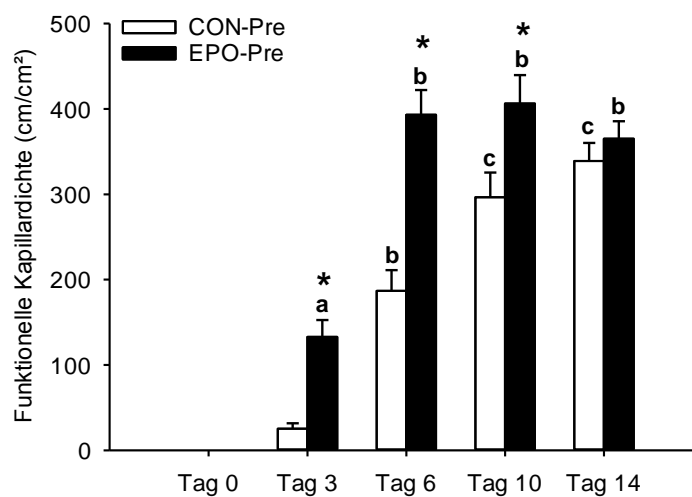


Abbildung 35: Quantitative Bestimmung der funktionellen Kapillardichte (cm/cm²) an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe (n=8, weiße Säulen) und der EPO-Pre-Gruppe (n=8, schwarze Säulen). Mittelwerte ± SEM. *P < 0.05 vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^bP < 0.05 vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^cP < 0.05 vs. CON-Pre.

5.4.3 Relative Größe des vaskulären Netzwerkes

Die relative Größe des vaskulären Netzwerkes, also das Verhältnis zwischen der Fläche des vaskulären Netzwerkes und der initialen Inselgröße, erreichte ebenfalls in beiden Gruppen seinen Maximalwert an Tag 6 mit 0,96 in der CON-Pre-Gruppe und 1,23 in der EPO-Pre-Gruppe. Die relative Größe des vaskulären Netzwerkes war über den gesamten Beobachtungszeitraum in der EPO-Pre-Gruppe im Vergleich zur CON-Pre-Gruppe erhöht. Dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen war an Tag 3 signifikant (Abb. 36).

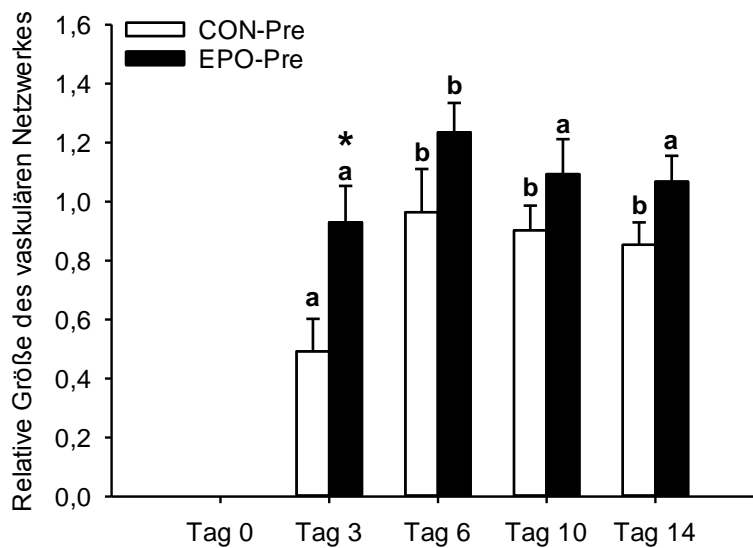


Abbildung 36: Quantitative Bestimmung der relativen Größe des vaskulären Netzwerkes an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe ($n=8$, weiße Säulen) und der EPO-Pre-Gruppe ($n=8$, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM. ^a $P < 0.05$ vs. Tag 0 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^b $P < 0.05$ vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe; * $P < 0.05$ vs. CON-Pre.

5.4.4 Endokrine Revaskularisierung

Die endokrine Revaskularisierung der Transplantate war messbar als die kontrastverstärkte Fläche, die sich durch Aufnahme von Rhodamin 6 G in den Mitochondrien des endokrinen Gewebes der Langerhans'schen Inseln ausgebildet hat, im Verhältnis zur jeweiligen initialen Inselgröße direkt nach der Transplantation. Sie erreichte in der CON-Pre-Gruppe den Höchstwert von 0,37 erst an Tag 10, in der EPO-Pre-Gruppe dagegen schon an Tag 6 mit einem deutlich höheren Wert von 0,84. Zu jedem Beobachtungszeitpunkt war die endokrine Revaskularisierung in der EPO-Pre-Gruppe im Vergleich zur CON-Pre-Gruppe signifikant erhöht (Abb. 37 und Abb. 38).

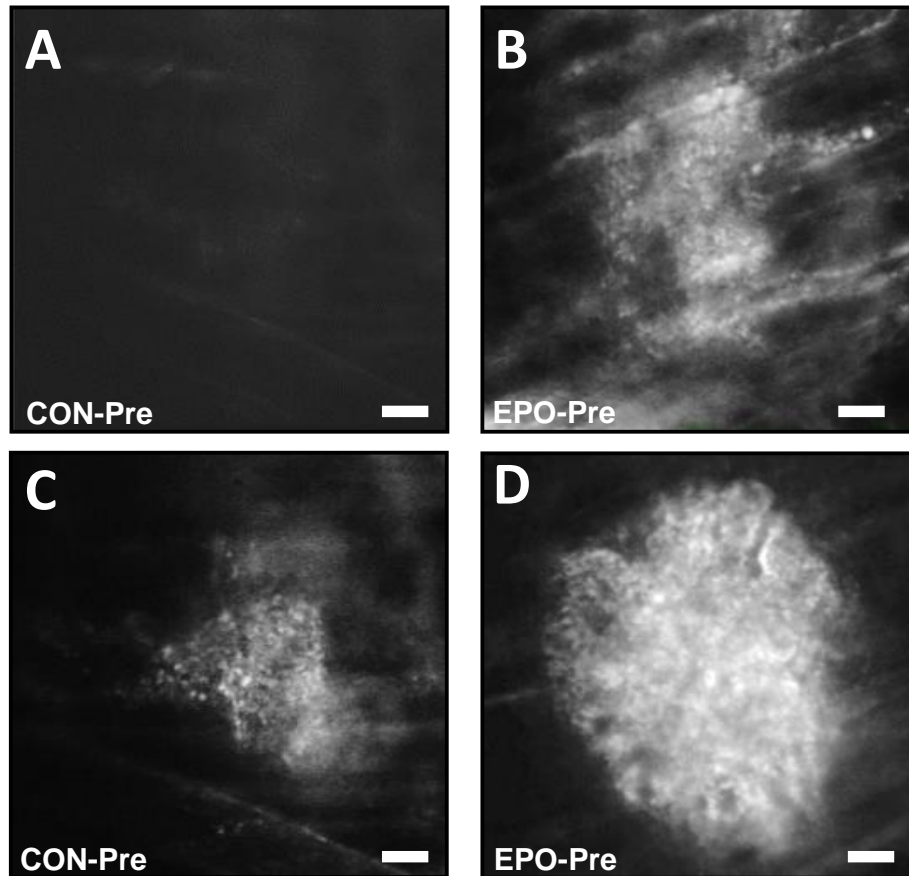


Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Langerhans'schen Inseln an den Tagen 3 (A und B) und 6 (C und D) nach Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe und der EPO-Pre-Gruppe. Darstellung der zunehmenden endokrinen Revaskularisierung der Inseln durch mitochondriale Aufnahme von Rhodamin 6G. Alle Maßstäbe: 50 µm.

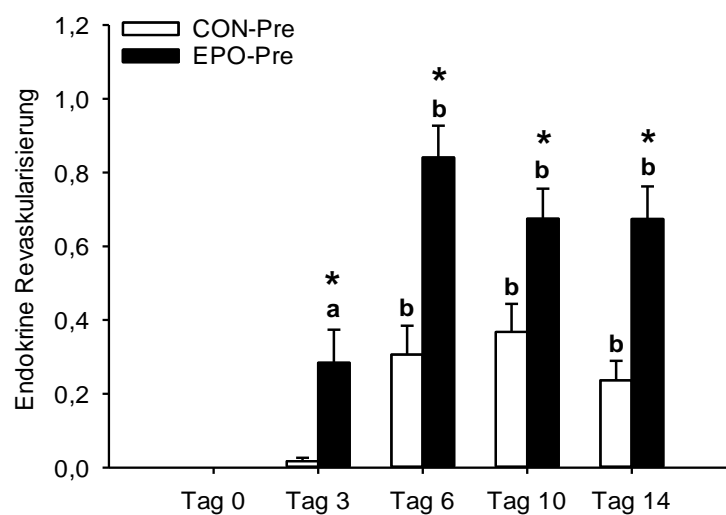


Abbildung 38: Quantitative Bestimmung der endokrinen Revaskularisierung an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Langerhans'schen Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe (n=8, weiße Säulen) und der EPO-Pre-Gruppe (n=8, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM. ^aP < 0.05 vs. Tag 0 innerhalb der jeweiligen Gruppe; ^bP < 0.05 vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe; *P < 0.05 vs. CON-Pre.

5.4.5 Mikrozirkulation der transplantierten Inseln

In der CON-Pre-Gruppe wurde der mittlere Durchmesser der neu gebildeten Mikrogefäße von Tag 6 an kleiner bis er an Tag 14 einen Wert von ~ 8,8 μm erreichte. Die Durchmesser der Mikrogefäße in der EPO-Pre-Gruppe reduzierten sich zwischen Tag 3 und 10 auf einen Wert von 8,2 μm . An Tag 6 war der mittlere Gefäßdurchmesser in der EPO-Pre-Gruppe im Vergleich zur CON-Pre-Gruppe signifikant verringert. Die RBZ-Geschwindigkeit nahm in der CON-Pre-Gruppe bis Tag 14 zu und erreichte einen Höchstwert von 379 $\mu\text{m/s}$. In der EPO-Pre-Gruppe stieg die RBZ-Geschwindigkeit bis Tag 10 auf 672 $\mu\text{m/s}$ an. Dabei waren die Werte in der EPO-Pre-Gruppe an den Tagen 3, 6 und 10 im Vergleich zur CON-Pre-Gruppe signifikant erhöht. Der mikrovaskuläre Volumenfluss erreichte in der CON-Pre-Gruppe einen Wert von 18,5 pl/s an Tag 6 und verringerte sich nur geringfügig bis Tag 14 auf 17,4 pl/s . In der EPO-Pre-Gruppe erreichte der Volumenfluss bereits an Tag 3 einen Wert von 30,9 pl/s und blieb über den restlichen Beobachtungszeitraum vergleichbar hoch. Dabei war der Volumenfluss an den Tagen 3 und 6 in der EPO-Pre-Gruppe im Vergleich zur CON-Pre-Gruppe signifikant erhöht (Tab. 2).

Tabelle 2: Quantitative Bestimmung von Durchmesser (μm), RBZ-Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) und Volumenfluss (pl/s) der neu gebildeten Mikrogefäße an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Inseln in die Rückenmarkkammer von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe ($n=8$) und der EPO-Pre-Gruppe ($n=8$).

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Durchmesser (μm)				
CON-Pre	11.2 \pm 1.6	11.9 \pm 0.6	9.0 \pm 0.5 ^b	8.8 \pm 0.4 ^b
EPO-Pre	12.0 \pm 0.6	9.0 \pm 0.3 ^{a*}	8.2 \pm 0.4 ^a	8.7 \pm 0.7 ^a
RBZ Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)				
CON-Pre	73.1 \pm 31.9	240.5 \pm 28.4 ^a	366.4 \pm 62.4 ^a	379.2 \pm 96.0 ^a
EPO-Pre	295.6 \pm 72.4 [*]	571.2 \pm 75.6 ^{a*}	671.5 \pm 78.2 ^{a*}	551.8 \pm 61.3 ^a
Volumenfluss (pl/s)				
CON-Pre	6.6 \pm 4.0	18.5 \pm 1.7 ^a	18.0 \pm 2.9	17.4 \pm 3.6
EPO-Pre	30.9 \pm 8.1 [*]	32.0 \pm 5.1 [*]	32.2 \pm 7.1	31.7 \pm 6.6

Alle Daten sind Mittelwerte \pm SEM. ^a $P < 0.05$ vs. Tag 3; ^b $P < 0.05$ vs. Tag 3 und 6; ^{*} $P < 0.05$ vs. CON-Pre.

5.4.6 Anwachsrate

Die Anwachsrate gibt den Anteil der erfolgreich angewachsenen transplantierten Langerhans'schen Inseln an Tag 14 an. Sie war in der EPO-Pre-Gruppe mit 98,4% im Vergleich zur CON-Pre-Gruppe mit 83,2 % signifikant erhöht. (Abb. 39).

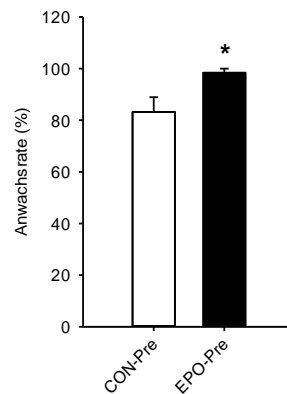


Abbildung 39: Quantitative Bestimmung der Anwachsrate (in % der Anzahl transplantierte Langerhans'scher Inseln) an Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe (weiße Säule, n=8) und der EPO-Pre-Gruppe (schwarze Säule, n=8). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. CON-Pre.

5.4.7 Hämatokrit der Empfängertiere

Der Hämatokrit der Empfängertiere wurde am Ende des Beobachtungszeitraums aus Blutproben, die der Vena Cava entnommen wurden, bestimmt. Dabei zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem systemischen Hämatokrit der CON-Pre-Gruppe (30,7%) und der EPO-Pre-Gruppe (32,0%) (Abb. 40).

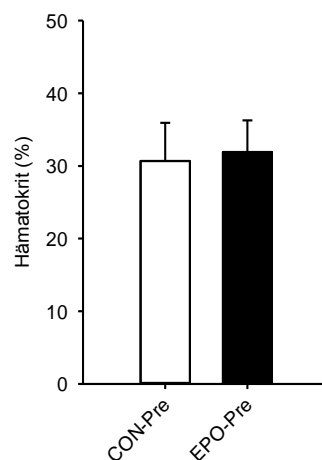


Abbildung 40: Quantitative Bestimmung des Hämatokrits (%) der FVB/N Empfängertiere an Tag 14 nach Transplantation der Langerhans'schen in der CON-Pre-Gruppe (weiße Säule, n=8) und in der EPO-Pre-Gruppe (schwarze Säule, n=8). Mittelwerte \pm SEM.

5.4.8 Effekt der EPO-Vorbehandlung auf die Gefäße im Kammergewebe

Die EPO-Vorbehandlung vergrößerte signifikant den Durchmesser von Arteriolen und Venolen im Kammergewebe. Dieser vasodilatierende Effekt war vom Tag der Transplantation bis 6 Tage danach zu beobachten. Die Durchmesser der Arteriolen bzw. Venolen an Tag 0 waren in der EPO-Pre-Gruppe mit 57 μm bzw. 122 μm im Vergleich zur CON-Pre-Gruppe mit 41 μm bzw. 73 μm deutlich vergrößert. Der vasodilatierende Effekt ließ im Laufe des Beobachtungszeitraums nach und die Durchmesser der Gefäße in der CON-Pre-Gruppe und der EPO-Pre-Gruppe glichen sich an den Tagen 10 und 14 nach Transplantation wieder an (Abb. 41 und Abb. 42).

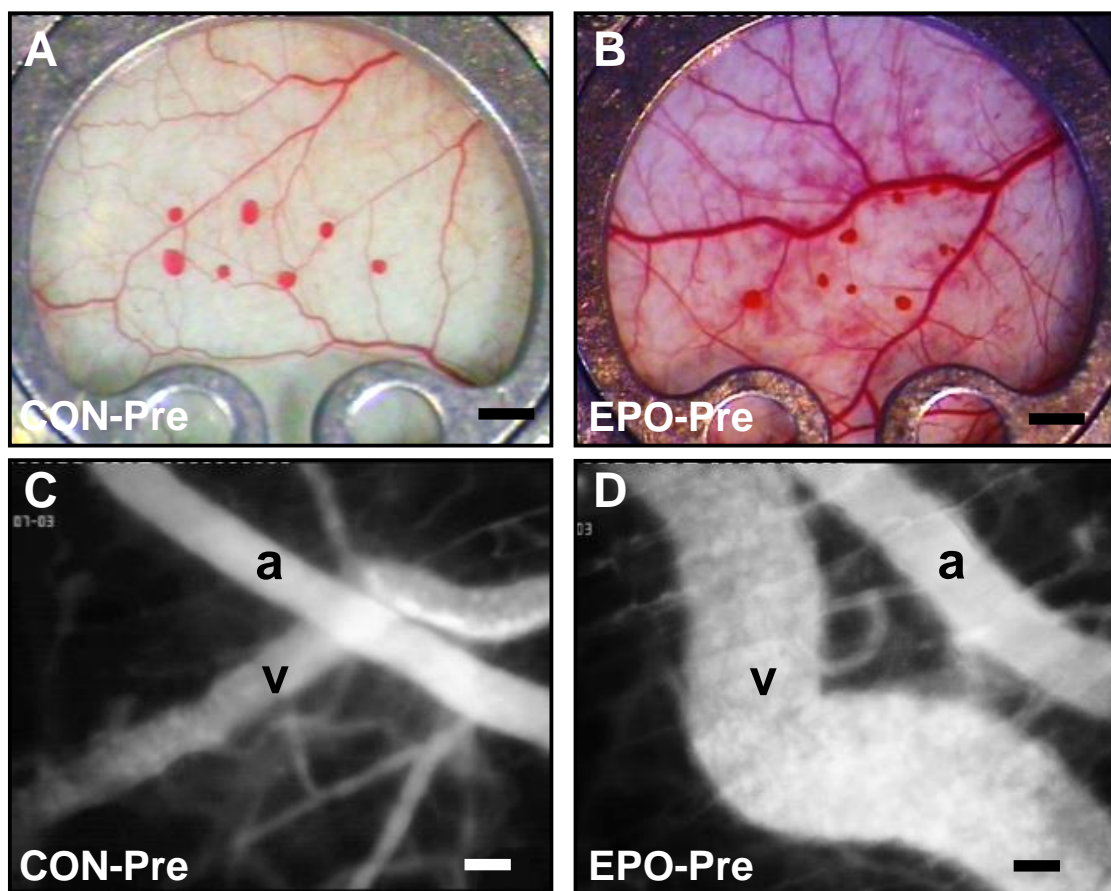


Abbildung 41: Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer mit transplantierten Inseln der CON-Pre-Gruppe (A) und der EPO-Pre-Gruppe (B) an Tag 0. Maßstäbe: 1mm. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Arteriolen (a) und Venolen (v) an Tag 0 der CON-Pre-Gruppe (C) und der EPO-Pre-Gruppe (D). Das Gefäßsystem wurde mit Hilfe von FITC-Dextran (i.v.) kontrastiert. Maßstäbe: 50 μm .

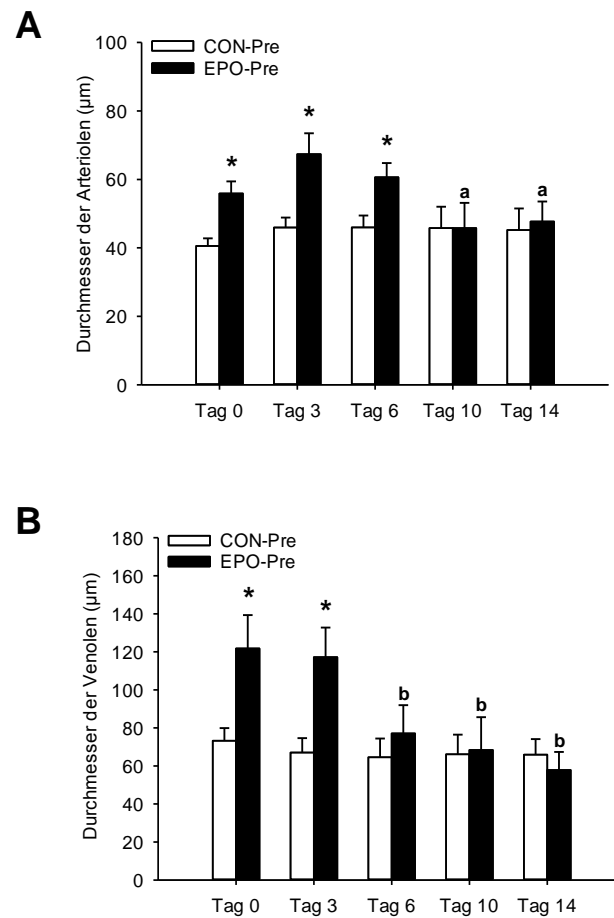


Abbildung 42: Quantitative Bestimmung des Durchmessers der Arteriolen (A) und Venolen (B) an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation Langerhans'scher Inseln in die Rückenhautkammer von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe (weiße Säulen, n=8) und der EPO-Pre-Gruppe (schwarze Säulen, n=8). Mittelwerte \pm SEM. ^a $P < 0.05$ vs. Tag 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe ^b $P < 0.05$ vs. Tag 0 und 3 innerhalb der jeweiligen Gruppe; * $P < 0.05$ vs. CON-Pre.

5.4.9 Histologische Untersuchung der Transplantate

Die transplantierten Langerhans'schen-Inseln wurden an Tag 6 und Tag 14 durch immunhistochemische Färbungen auf ihre zelluläre Zusammensetzung untersucht. Dabei bestätigte die histologische Auswertung die intravitalmikroskopische Analysen. An Tag 6 zeigten die transplantierten Inseln in Tieren der EPO-Pre-Gruppe mit 36,9% einen signifikant höheren Anteil CD31-positiver Zellen im Vergleich zur CON-Pre-Gruppe mit 17,6% (Abb. 43). Dieser Unterschied war an Tag 14 nicht mehr vorhanden und der Anteil CD31-positiver Zellen war mit 32,3% und 35,1% zwischen den beiden Gruppen vergleichbar (Abb. 44). Die Anteile der verschiedenen endokrinen Zellen der transplantierten Langerhans'schen Inseln zeigte zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede (Abb. 43 und Abb. 44). Zusätzlich wurde in diesem Experiment der Anteil von GFP-positiven Endothelzellen innerhalb der transplantierten Inseln bestimmt. Dabei zeigte sich ein signifikant erhöhter

Anteil von GFP-positiven Zellen an Tag 6 in der CON-Pre-Gruppe im Vergleich zur EPO-Pre-Gruppe. An Tag 14 zeigten beide Gruppen wieder einen vergleichbaren Anteil an GFP-positiven Zellen (Abb. 45).

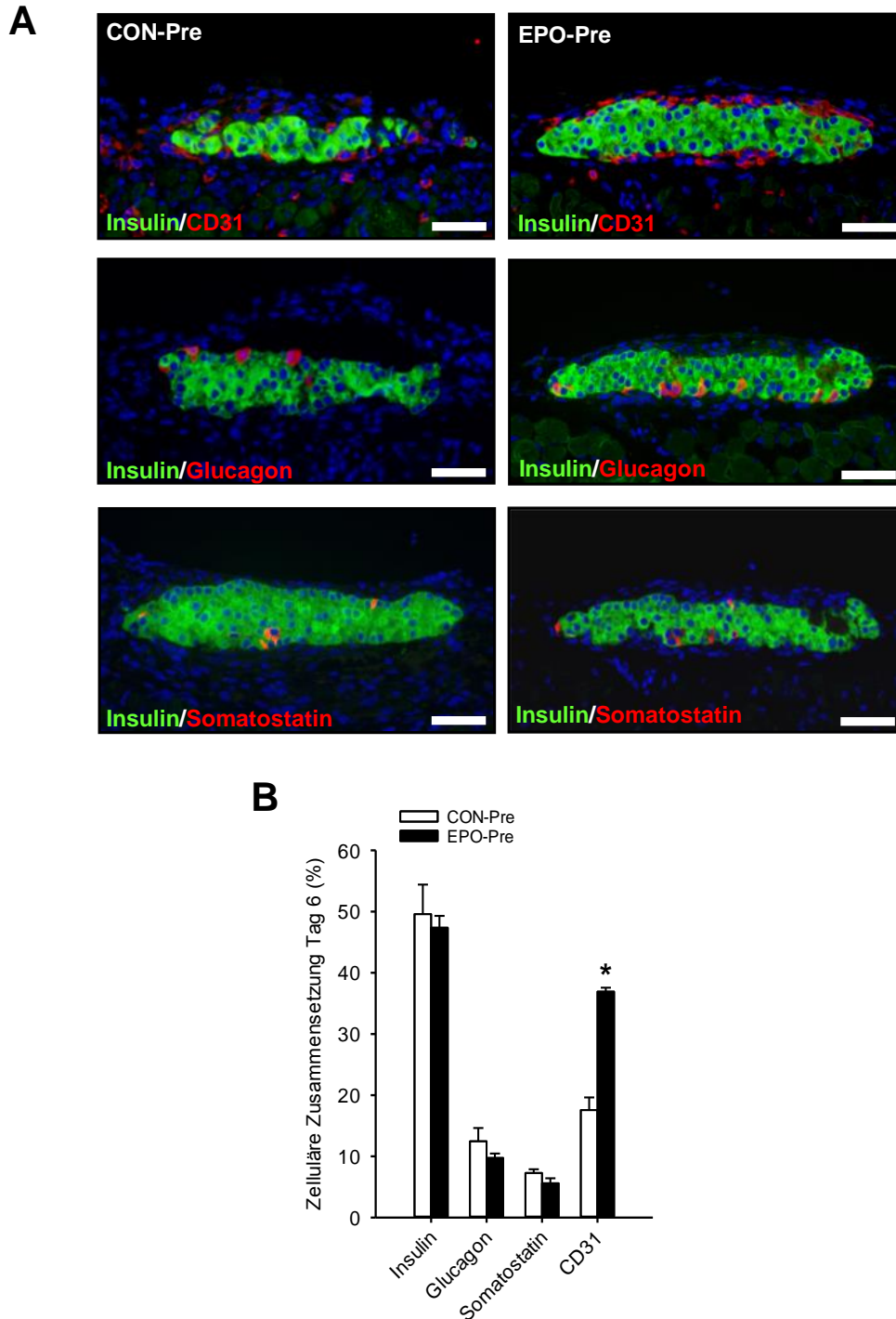


Abbildung 43: (A) Immunfluoreszenzfärbung von Insulin/CD31, Insulin/Glucagon und Insulin/Somatostatin in transplantierten Langerhans'schen Inseln an Tag 6 nach Transplantation in die Rückenhautkammern von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe und der EPO-Pre-Gruppe. Alle Maßstäbe: 50 μ m. (B) Quantitative Bestimmung des Anteils von Insulin-, Glucagon-, Somatostatin- und CD31-positiven Zellen (in % aller Insel-Zellen) der Langerhans'schen Inseln an Tag 6 nach Transplantation in die Rückenhautkammern von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe ($n=8$, weiße Säulen) und der EPO-Pre-Gruppe ($n=8$, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. CON-Pre.

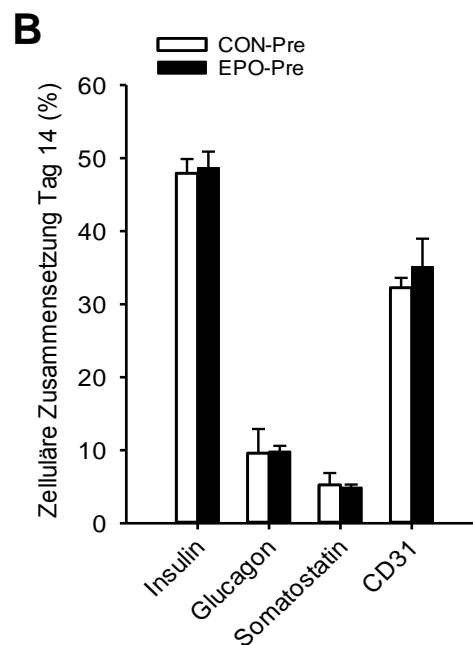
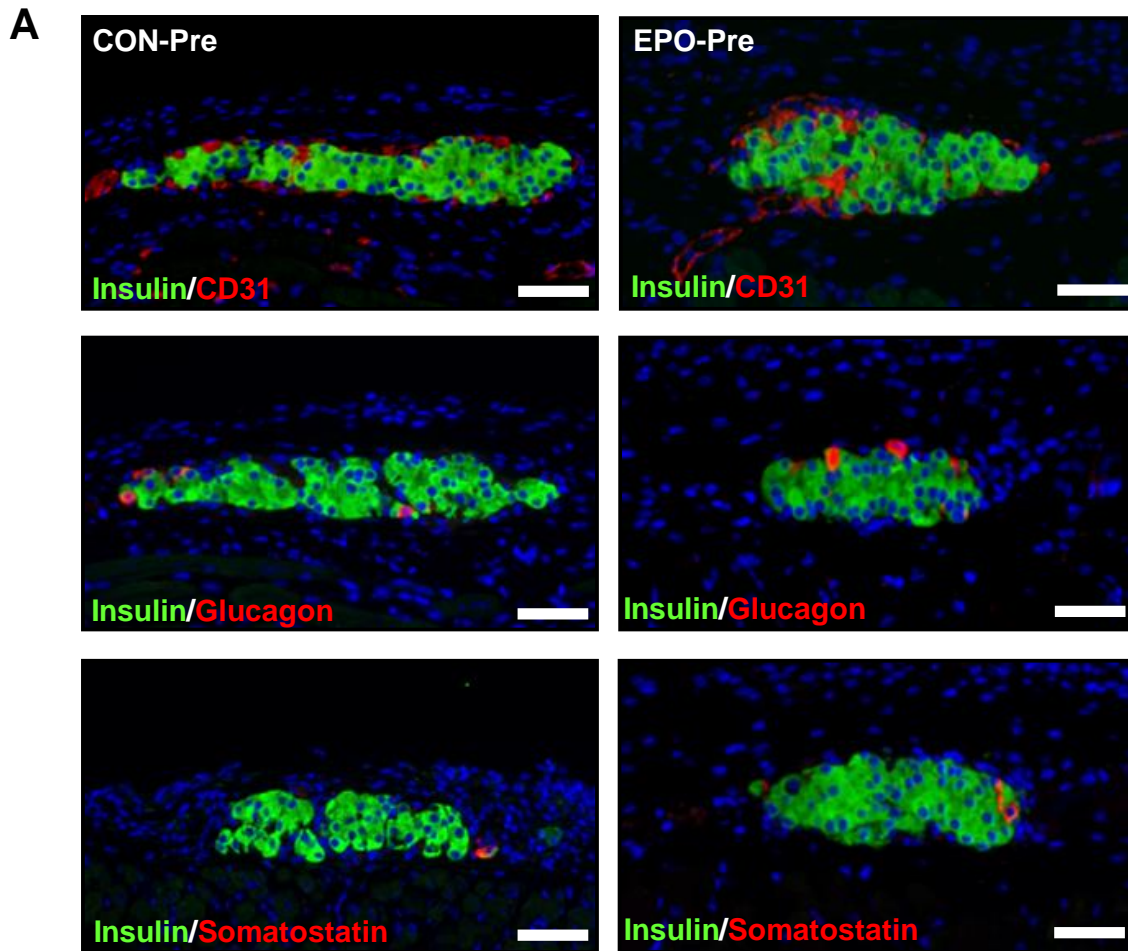
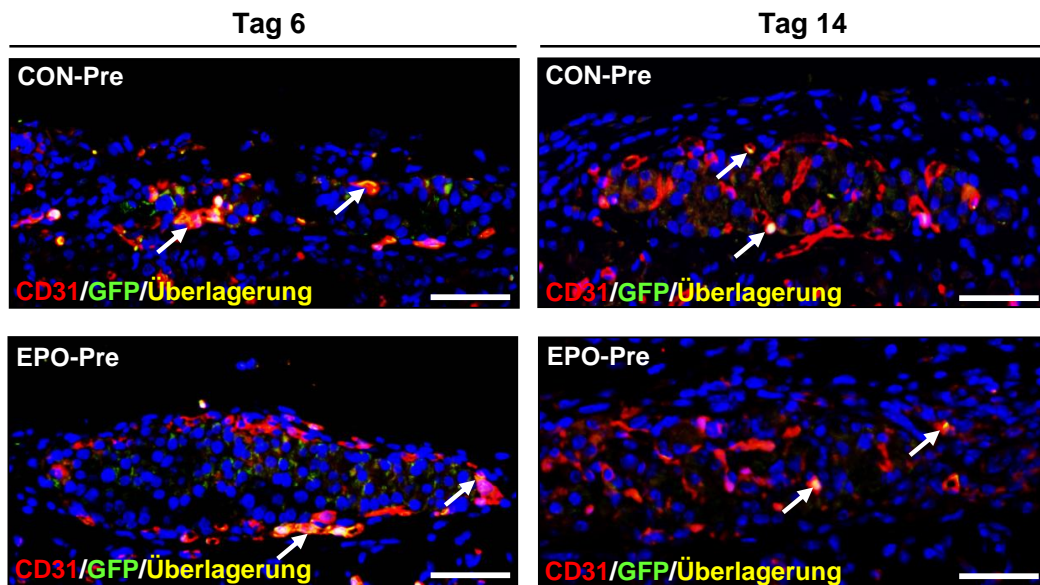


Abbildung 44: (A) Immunfluoreszenzfärbung von Insulin/CD31, Insulin/Glucagon und Insulin/Somatostatin in transplantierten Langerhans'schen Inseln an Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammern von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe und der EPO-Pre-Gruppe. Alle Maßstäbe: 50 μ m. (B) Quantitative Bestimmung des Anteils von Insulin-, Glucagon-, Somatostatin- und CD31-positiven Zellen (in % aller Insel-Zellen) der Langerhans'schen Inseln an Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammern von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe (n=8, weiße Säulen) und der EPO-Pre-Gruppe (n=8, schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM.

A



B

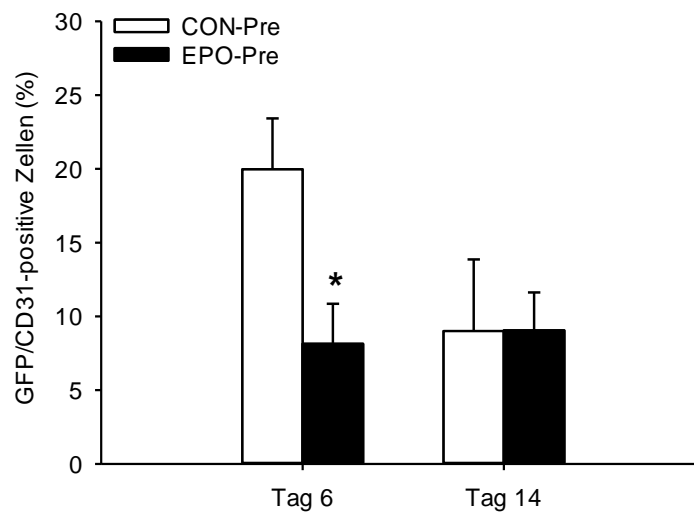


Abbildung 45: Immunfluoreszenzfärbung von CD31 und GFP in transplantierten Langerhans'schen Inseln an Tag 6 und Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammern von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe und der EPO-Pre-Gruppe. Alle Maßstäbe: 50 μ m. Quantitative Bestimmung des Anteils an GFP-positiven Zellen (in % aller CD31-positiven Zellen) in Langerhans'schen Inseln an Tag 6 (n=3) und Tag 14 (n=8) nach Transplantation in die Rückenhautkammern von FVB/N Mäusen der CON-Pre-Gruppe (weiße Säulen) und der EPO-Pre-Gruppe (schwarze Säulen). Mittelwerte \pm SEM. *P < 0.05 vs. CON-Pre.

6 Diskussion

6.1 Diskussion von Material und Methoden

6.1.1 Diskussion des Modells

Das Modell der Rückenhautkammer der Maus erlaubt mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die nicht-invasive repetitive Analyse der Mikrozirkulation der quergestreiften Hautmuskulatur und die Quantifizierung von Vaskularisierungsparametern wie Gefäßdurchmesser, Gefäßdichte und mikrovaskulärer Volumenfluss. Damit hat dieses in vivo Modell ein großes und breit gefächertes Anwendungsspektrum. Es findet beispielsweise Verwendung in der Analyse von Entzündung und Sepsis [Hillgruber et al., 2014, de Miranda et al., 2015], hämorrhagischem Schock [Ortiz et al., 2014], Thrombose und Thrombolysen [Boulaftali et al., 2012, Ampofo et al., 2015], Ischämie und Reperfusion [Menger et al., 2003, Ampofo et al., 2016] und in der Gewebe- und Organtransplantation [Funk et al., 1986, Bordel et al., 2006, Wittig et al., 2013].

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Modelle zur Untersuchung des mikrovaskulären Blutstromes entwickelt. Erwähnenswert sind hierbei tierexperimentelle Studien am Mesenterium [Faleiros et al., 2002], Omentum [Intaglietta et al., 1970] und Kremastermuskel [Prewitt und Johnson, 1976]. Bei diesen Ansätzen handelt es sich allerdings um Akut-Modelle. Sie besitzen den Nachteil, dass das unmittelbare chirurgische Trauma und die Anästhesie sich auf den Durchmesser und Fließgeschwindigkeit der Mikrogefäße auswirken können [Lindbom et al., 1982]. Außerdem beschränkt sich der Beobachtungszeitraum nur auf wenige Stunden. Eine Messung über mehrere Tage oder Wochen ist hierbei nicht möglich. Beim Rückenhautkammer Modell der Maus dagegen wird den operierten Tieren eine Regenerationszeit von 2-3 Tagen eingeräumt um eine Erholung vom chirurgischen Trauma und der Anästhesie zu gewährleisten. Zusätzlich erlaubt die Rückenhautkammer einen Beobachtungszeitraum von 2-3 Wochen, in dem repetitive Untersuchungen der Mikrozirkulation möglich sind [Laschke et al., 2011].

Sandison [Sandison, 1924] gelang es 1924 zum ersten Mal eine transparente Beobachtungskammer in ein Kaninchenohr zu implantieren, was die intravitalmikroskopische Studie von lebenden Zellen ermöglichte. Algire gelang es 1943 diese Kammertechnik in der Maus zu etablieren, um die Revaskularisierung von Tumorimplantaten zu untersuchen [Algire, 1943]. Allerdings hatten diese frühen Modelle den Nachteil, dass sich im Beobachtungsfeld lediglich ausgeprägtes Granulationsgewebe untersuchen ließ. Damit war die

Analyse der Physiologie der Mikrozirkulation und Revaskularisierung von Tumoren und Implantaten durch das überwachsene Granulationsgewebe beeinträchtigt. Weitere Entwicklungen zielten deshalb auf eine Kammertechnik, die einerseits ein unverändertes Präparationsfeld gewährleistete und andererseits das Gewebe weder von der Kammer selbst, noch von dem Implantationsvorgang beeinflusst wurde. Dies gelang schließlich mit der Einführung der Rückenhautkammer für Ratten, Mäusen und Hamstern, die intravitalmikroskopische Aufnahmen der Mikrozirkulation der quergestreiften Muskulatur erlaubte [Cardon et al., 1970, Papenfuss et al., 1979, Endrich et al., 1980, Lehr et al., 1993].

Das Modell der Rückenhautkammer der Maus hat gegenüber Ratte und Hamster den Vorteil, dass in der Maus deutlich mehr genetische Manipulationen etabliert sind. Dies gestattet die Zucht von knock-out und transgenen Tieren, wie beispielsweise der FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato Maus, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde [Motoike et al., 2000, Menger et al., 2002].

Durch den Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, neben der Bestimmung von mikrohämodynamischen Parametern auch zelluläre Aspekte im Rückenhautkammer Modell zu analysieren. Dafür erfolgt die intravenöse Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen in die Jugularvene oder in den retrobulbären Venenplexus. Beispielsweise wird Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-Dextran zur Kontrastverstärkung von Blutplasma eingesetzt. Aufgrund seines hohen Molekulargewichts von 150 kDa kommt es nur bei Störungen der Endothelzellintegrität zum Austritt von FITC aus dem Gefäßsystem. Dieses Phänomen kann als vaskuläre Extravasation während inflammatorischen und angiogenen Prozessen beobachtet werden [Menger et al., 1990]. Rhodamin 6G ermöglicht dagegen das Anfärben von Leukozyten in situ, indem der Farbstoff in den Mitochondrien der Zellen akkumuliert [Horikoshi et al., 1987]. Damit lässt sich auch deren Interaktion mit dem mikrovaskulären Endothel untersuchen [Batz et al., 1995]. Interessanterweise reichert sich Rhodamin 6G auch in den Mitochondrien der endokrinen Zellen von transplantierten Langerhans'schen Inseln an [Vajkoczy et al., 1995b] und lässt so indirekt Rückschlüsse auf ihre endokrine Funktion zu. Darüber hinaus lassen sich die Kerne nekrotischer Zellen mit Propidium-Iodid anfärben [Harris et al., 1997], während sich die Kerne vitaler, aber auch apoptotischer Zellen mit Hilfe von Bisbenzimid sichtbar gemacht werden können [Vollmar et al., 2001].

Ein weit verbreiteter experimenteller Ansatz zur Untersuchung der Vaskularisierung und Funktion der Langerhans'schen Inseln ist deren Transplantation unter die Nierenkapsel [Pepper et al., 2013]. Die gewonnenen Daten basieren auf histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen. Das Modell der Rückenhautkammer ermöglicht

dagegen die repetitive Untersuchung der Revaskularisierung der Transplantate und erlaubt dadurch Aussagen über die Entwicklung des Gefäßnetzwerkes der Langerhans'schen Inseln über einen definierten Zeitraum. Dadurch wird die Menge an gewonnenen Daten für jedes Versuchstier optimiert und damit statistische Abweichungen und die Anzahl benötigter Versuchstiere verringert. Außerdem ermöglicht die Rückenhautkammer die Untersuchung der Angiogenese einzelner Langerhans'scher Inseln. Im Modell der Nierenkapsel werden Inseln als zusammenhängendes „Cluster“ transplantiert, was die Revaskularisierung der Transplantate negativ beeinflussen kann [Heuser M, 1997].

6.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

In dieser Arbeit wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der Revaskularisierung der transplantierten Langerhans'schen Inseln verwendet. Diese Untersuchungstechnik ermöglicht die direkte Visualisierung der Mikrozirkulation im neu gebildeten mikrovaskulären Netzwerk der Inseln und im umliegenden Kammergewebe [Menger et al., 1990]. Der Intravitalmikroskopie stehen weitere nicht-invasive Untersuchungstechniken gegenüber, die eine Analyse der Mikrozirkulation in der Rückenhautkammer ermöglichen. Dazu gehören die Laser-Doppler-Flowmetrie zur Analyse der mikrovaskulären Gewebepfusion [Menger et al., 1992] oder das Phosphoreszenz-Quenching zur Messung der Gewebeoxygenierung [Kerger et al., 1996]. Allerdings erlauben diese Verfahren lediglich eine indirekte Messung der Mikrozirkulation und ermöglichen nicht die direkte Darstellung der Sprossenbildung und des Einwachsens von neuen Blutgefäßen in die transplantierten Langerhans'schen Inseln. Aufgrund der Größe der Transplantate von nur ca. 0,1 mm² erlauben es diese Verfahren auch nicht, die Mikrozirkulation einzelner Inseln zu erfassen.

Die zweidimensionale intravitalmikroskopische Aufnahme des dreidimensionalen mikrovaskulären Netzwerkes der transplantierten Inseln erfordert eine sorgfältige Mikroskopiertechnik und Interpretation der Daten. So ist es beim Mikroskopieren der Inseln von besonderer Bedeutung, durch das gesamte Gefäßnetzwerk durch zu fokussieren, um alle Ebenen des Netzwerkes erfassen zu können und der Dreidimensionalität der Struktur gerecht zu werden. Des Weiteren gilt es die Adhäsion- und Scherkräfte innerhalb der Kammer zu beachten, die auch auf die transplantierten Inseln einwirken. So kommt es bei dem Parameter der relativen Größe des vaskulären Netzwerkes teilweise zu Werten größer als 1 (siehe Abbildungen 11, 22 und 36). Dies könnte ein Wachsen des vaskulären Netzwerkes über die initiale Inselgröße hinweg suggerieren. Tatsächlich werden die Inseln

durch die erwähnten Adhäsionskräfte von ihrem ursprünglichen rund-ovalen Erscheinungsbild in eine flach gestreckte Form deformiert. Dieses Phänomen ist an den histologischen Schnitten der transplantierten Inseln zu erkennen (siehe Abbildungen 17, 31, 43, 44 und 45). Bei der Interpretation von Parametern wie der relativen Größe des vaskulären Netzwerkes und der endokrinen Revaskularisierung gilt es diese Tatsache zu berücksichtigen.

Um die zelluläre Zusammensetzung der transplantierten Inseln zu analysieren, wurde an Tag 6 und 14 nach Transplantation das exzidierte, Insel-enhaltende Rückenhautkammergebe immunhistochemisch auf Insulin-, Glucagon-, Somatostatin-, CD31- und GFP-positiven Zellen untersucht. Von besonderem Interesse war dabei das GFP der transgenen Tie2-GFP Spendermäuse. Das Tie2 Gen wird in nahezu allen Endothelzellen exprimiert. Bei den Tie2-GFP Spendermäusen besteht dabei eine Fusion zwischen dem Tie2 Promotor und der GFP cDNA. Dies führt dazu, dass das GFP spezifisch in Endothelzellen exprimiert wird und erlaubt damit die Untersuchung von vaskulärer Morphogenese und Genexpression in Endothelzellen [Motoike et al., 2000]. In der vorliegenden Arbeit konnten so GFP-positive Spenderendothelzellen innerhalb des vaskulären Netzwerkes der transplantierten Langerhans'schen Inseln identifiziert und von aus dem Empfänger eingewachsenen Endothelzellen unterschieden werden. Allerdings zeigte Nyquist et al., dass nur 81% aller Inselendothelzellen das GFP-Signal exprimieren [Nyqvist et al., 2005]. Diese Tatsache sollte bei der histologischen Analyse des Anteils der Endothelzellen der Spenderinseln am mikrovaskulären Netzwerk berücksichtigt werden.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass Erythropoietin den Revaskularisierungsprozess transplantiert Langerhans'scher Inseln beschleunigt. Dies führt zu einer verbesserten endokrinen Revaskularisierung und einer erhöhten Anwachsrate. Interessanterweise wirkte das Glykoprotein pro-angiogener, also effektiver wenn es vor der Inseltransplantation verabreicht wurde.

Insuffiziente Revaskularisierung der Transplantate ist der Hauptgrund für die schlechte Erfolgsrate der Inseltransplantation als kurative Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 [Schramm et al., 2003]. Um dieses Problem zu überwinden, verwendeten vorherige Studien die simultane Transplantation von Stamm- oder Endothelzellen, um das angiogene Potential und die Funktionalität der Inseln zu verbessern [Figliuzzi et al., 2009, Rackham et al., 2011, Coppens et al., 2013, Oh et al., 2013]. Allerdings erschweren komplexe Isolierungsvorgänge,

aufwändige Standardisierungsprotokolle und administrative Hürden den Umgang mit spezifischen Zelllinien im klinischen Alltag. Dementsprechend wäre die Verwendung von pharmakologischen Substanzen, die in der Lage sind, angiogene Signalwege zu stimulieren, eine pragmatische und elegante Alternative. Damit gilt es, neue pro-angiogene Wirkstoffe zu finden, die keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auslösen.

Das hämatopoetische Zytokin EPO ist für die Produktion von Erythrozyten zuständig, um niedrige Sauerstoffwerte innerhalb des Organismus und des Gewebes auszugleichen [Zhang et al., 2014]. EPO bindet an seinen zugehörigen Rezeptor EPOR auf erythroiden Vorläuferzellen und stimuliert so ihr Überleben, Proliferation und Differenzierung [Kimakova et al., 2017]. Interessanterweise konnte Fenjves et al. den EPO-Rezeptor auch auf Langerhans'schen Inseln nachweisen und zeigen, dass die Kultivierung der Inseln in EPO sie vor zytokininduzierter Apoptose schützt [Fenjves et al., 2003]. Zudem ist EPO in der Lage, durch die Stimulation von anti-oxidativen Prozessen den Schaden an β -Zellen zu reduzieren [Chen et al., 2015], über die Janus Kinase 2 (JAK2) vermittelt vor Diabetes Typ 1 und Typ 2 zu schützen [Choi et al., 2010] und den Blutglukosespiegel in diabetischen Mäusen zu senken [Katz et al., 2010]. Weiterhin bewirkt die virale Transfektion des EPO-Gens in Langerhans'sche Inseln einen anti-apoptotischen Effekt in vitro und vielversprechende Ergebnisse im diabetischen Transplantationsmodell. So zeigten die EPO produzierenden, transfizierten Inseln eine überlegene in vivo Funktion im Vergleich zu Kontrollinseln. Allerdings verursachte die daraus resultierende zusätzliche EPO-Ausschüttung erhöhte Hämatokritwerte, Splenomegalie und eine Verschlechterung des Allgemeinzustands der Empfängertiere [Fenjves et al., 2004].

Darüber hinaus konnten experimentelle Arbeiten die pro-angiogenen Eigenschaften von EPO belegen [Anagnostou et al., 1990, Heeschen et al., 2003]. Beispielsweise konnten Ribatti et al. nachweisen, dass EPO die Bildung von neuen Blutgefäßen in der Chorion-Allantois Membran des Hühnerembryos fördert [Ribatti et al., 1999]. Allerdings scheint diese pro-angiogene Funktion von EPO Dosis-abhängig zu sein. Tatsächlich zeigen Studien, dass nur eine niedrige Dosis (500 IU/kg KG), aber keine Hochdosis (5000 IU/kg KG) von EPO in der Lage ist, Angiogenese zu induzieren [Harder et al., 2009]. Deshalb wurde auch in der vorliegenden Arbeit die niedrige Dosis von 500 IU/kg KG benutzt um die Revaskularisierung der Inseln zu beschleunigen.

Im ersten experimentellen Ansatz wurde EPO täglich vom Tag der Inseltransplantation an verabreicht. Dieses Behandlungsprotokoll führte zu einer erhöhten funktionellen Kapillardichte und einer vergrößerten relativen Fläche des vaskulären Netzwerkes an Tag 6.

Es zeigten sich allerdings keine weiteren pro-angiogenen Effekte durch die EPO Therapie, auch die Anwachsrate konnte nicht verbessert werden. Die funktionelle Kapillardichte der Transplantate glich sich an Tag 14 in der CON- und EPO-Gruppe wieder an. Dies belegte auch die immunhistochemische Untersuchung der transplantierten Langerhans'schen Inseln. Es gab keinen signifikanten Unterschied an CD31-positiven Zellen zwischen den beiden Gruppen. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die EPO-Behandlung in der Lage ist, die Revaskularisierung der transplantierten Langerhans'schen Inseln geringfügig zu beschleunigen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Tatsache, dass es einige Tage dauert bis EPO die VEGF Expression im ischämischen Gewebe hochregulieren kann [Rezaeian et al., 2010]. Daher unterscheidet sich an Tag 3 die funktionelle Kapillardichte und das vaskuläre Netzwerk der EPO-behandelten Tiere nicht von den Kontrolltieren.

Die EPO-Behandlung im ersten Studienabschnitt verbesserte die Angiogenese der transplantierten Langerhans'schen Inseln nur in geringem Ausmaß. DPO besitzt im Vergleich zu EPO eine größere biologische Aktivität und längere Halbwertszeit [Hörl, 2013]. Aus diesem Grund wurde im zweiten Studienabschnitt dieser Arbeit untersucht, ob eine DPO-Behandlung in der Lage ist, die Revaskularisierung der Transplantate stärker zu fördern, als die Behandlung mit EPO.

DPO ist ein lang wirksames Analogon von EPO und wird gewöhnlich zur Behandlung von Anämien eingesetzt [Overbay und Manley, 2002, Cersosimo und Jacobson, 2006, Hörl, 2013], besitzt aber ähnlich wie EPO auch pro-angiogene Eigenschaften [Rupertus et al., 2010, Senger et al., 2014]. Als Niedrigdosis dienen 2,5 µg/kg KG, was der Peptidmasse von 500 UI/kg KG EPO des vorherigen Studienabschnitts entspricht [Hörl, 2013]. Als Hochdosis wurden 10 µg/kg KG eingesetzt, um die potentielle pro-angiogene Wirkung von DPO voll auszuschöpfen. Jedoch führte keines der Therapieregime zu einer Beschleunigung oder Verbesserung der Revaskularisierung der transplantierten Langerhans'schen Inseln. So waren die funktionelle Kapillardichte, die relative Größe des vaskulären Netzwerkes und die endokrine Revaskularisierung zwischen den drei experimentellen Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum vergleichbar groß. Auch die histologische Auswertung der transplantierten Langerhans'schen Inseln konnte keine Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der Transplantate nachweisen. Allerdings zeigten die mikrohämodynamischen Parameter einen signifikant vergrößerten Gefäßdurchmesser und Volumenfluss, bei leicht erhöhter Fließgeschwindigkeit der Transplantate an Tag 14. Dieses Phänomen kann auf die vasodilatierende Wirkung von DPO zurückzuführen sein, bei der durch eine verstärkte Expression von eNOS wiederum erhöhte NO-Spiegel entstehen [Lindenblatt et al., 2007]. Eine ähnliche Beobachtung machte Rupertus et al. die in einer experimentellen Studie

die Auswirkungen von DPO auf die Angiogenese von extrahepatischen kolorektalen Tumoren im Modell der Rückenhautkammer untersuchte. Auch dort führte DPO zu einem vergrößerten Gefäßdurchmesser der Tumorkapillaren [Rupertus et al., 2010]. Weiterhin konnte in einem experimentellen Modell der fin-related kinase (FKR) transgenen Maus eine gestörte Insulinsekretion der Langerhans'schen Inseln mit einem verlangsamten Blutvolumenfluss in Verbindung gebracht werden [Anneren et al., 2007]. Daher ist im Umkehrschluss davon auszugehen, dass der erhöhte Volumenfluss der Transplantate in der DPO-Hochdosis-Gruppe sich auch positiv auf deren Vitalität und Funktion ausübt. Allerdings führt DPO, ähnlich wie die EPO-Behandlung im ersten Studienabschnitt, zu erhöhten Hämatokritwerten in den Empfängertieren.

Die primäre biologische Funktion von DPO ist die Stimulierung der Erythropoese, was zu einer Erhöhung der Erythrozyten, des Hämoglobins und des systemischen Hämokrits führt [Hörl, 2013, Alsalmiy und Awaisu, 2014]. Gleichzeitig zeigen experimentelle und klinische Studien, dass DPO die Produktion und Aktivierung von Thrombozyten steigert [Wolf et al., 1997, Beguin, 1999, Stohlawetz et al., 2000]. Diese Effekte gehen wiederum mit einem größeren Risiko für thromboembolische Geschehnisse einher. Widersprüchlich zu diesen Arbeiten konnten Cadroy et al. im Tiermodell nachweisen, dass erhöhte Hämatokrit Werte nicht gleichzeitig mit einem vergrößerten Thromboserisiko einhergehen [Cadroy und Hanson, 1990]. Darüber hinaus steigert die Überexpression von EPO zwar deutlich die Erythropoese, führt aber kompensatorisch zu einer geringeren Blutviskosität [Vogel et al., 2003] und verringert die Blutgerinnsel Bildung in der in vitro Thromboelastographie [Shibata et al., 2003]. Lindenblatt et al. zeigten zudem, dass die DPO-induzierte Erythropoese das Thromboserisiko nicht vergrößert, solange die NO Produktion als protektiver Mechanismus dagegen wirkt [Lindenblatt et al., 2007]. Dennoch sind weitere Untersuchungen über die Auswirkung der Erythropoese-stimulierenden Substanzen auf das Thromboserisiko notwendig, um bedenkenlos erhöhte systemische Hämatokritwerte als Nebenwirkung in der Klinik, auch bei der Inseltransplantation zu tolerieren.

Zusammenfassend konnte der zweite Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit zeigen, dass DPO die Revaskularisierung der transplantierten Langerhans'schen Inseln nicht beschleunigt. Dennoch führte die Hochdosis-Behandlung zu einem vergrößerten Gefäßdurchmesser und einem erhöhten mikrovaskulären Volumenfluss in den transplantierten Inseln, was sich positiv auf die Funktionalität der Transplantate auswirken könnte. Bedauerlicherweise erhöhte DPO gleichzeitig auch die Hämatokrit-Werte der Empfängertiere, was wiederum das Risiko für thromboembolische Komplikationen erhöht.

Da die DPO-Behandlung keinen pro-angiogenen Effekt zeigte, wurde im dritten Studienabschnitt erneut EPO verwendet, das zumindest zu einer geringfügigen Beschleunigung der Revaskularisierung der Transplantate geführt hatte. Um diesen pro-angiogenen Effekt von EPO weiter zu verstärken, wurden in einem dritten experimentellen Ansatz die Empfängermäuse mit dem Glykoprotein 6 Tage vor der Inseltransplantation behandelt. Im ischämischen Gewebe konnte gezeigt werden, dass es einige Tage dauert bis EPO die VEGF Expression hochreguliert [Rezaeian et al., 2010]. Entsprechend dieser Hypothese beschleunigte die EPO-Vorbehandlung die Revaskularisierung der Transplantate deutlich wirkungsvoller, was sich in einer signifikant erhöhten funktionellen Kapillardichte zwischen den Tagen 3-10 im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte. Dies ging einher mit einer erhöhten endokrinen Revaskularisierung über den gesamten Beobachtungszeitraum sowie einer größeren Anzahl erfolgreich angewachsener Inseln an Tag 14. Außerdem enthielten die Inseln einen signifikant niedrigeren Anteil an GFP/CD31-positiven Endothelzellen, was auf ein verstärktes Einwachsen von GFP-negativen Endothelzellen aus dem umliegenden Empfängergewebe in der initialen Revaskularisierungsphase der Transplantate schließen lässt. Das ausgereifte mikrovaskuläre Netzwerk der transplantierten Inseln besteht sowohl aus Endothelzellen des mikrovaskulären Gewebes des Empfängers [Vajkoczy et al., 1995a] als auch aus den ursprünglichen Endothelzellen der Spenderinseln [Nyqvist et al., 2005]. Über deren genauen Anteil am neugebildeten Gefäßnetzwerk der Transplantate herrscht in der Literatur Uneinigkeit. So berichtet Brissova et al. [Brissova et al., 2004] von einer Beteiligung der Endothelzellen der Spenderinseln bis zu 40%, während neuere Studien [Nyqvist et al., 2011, Henriksnas et al., 2012] den Anteil deutlich geringer einschätzen. Letztere wurden durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. So lag der Anteil an CD31/GFP-positiven Zellen in sämtlichen Gruppen zwischen 8 und 13%.

Interessanterweise verstärkt EPO die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS), was einen erhöhten NO Spiegel bewirkt [Burger et al., 2006]. Dies wiederum erhöht die Entstehung von cGMP, das zu einer Muskelrelaxation in Blutgefäßen führt und damit eine verbesserte Gewebepерfusion bewirkt [Katsuki und Murad, 1977]. Gleichzeitig zeigte Chen et al., dass NO die Expression von EPOR hochreguliert und dadurch zum EPO-vermittelten Schutz vor Hypoxie-induzierter Apoptose beiträgt [Chen et al., 2010]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher zusätzlich der Einfluss von EPO auf die Arteriolen und Venolen des Kammergewebes der Empfängertiere untersucht. Tatsächlich bewirkte die EPO Vorbehandlung eine Vasodilatation innerhalb der ersten 6 Tage nach Transplantation, während die EPO Behandlung den Gefäßdurchmesser zwischen Tag 6 und 14 nach Transplantation vergrößerte. Die Ursache dafür könnte sein, dass es einige Tage dauert, bis die repetitive Applikation von niedrig dosiertem EPO (500 IU/kg) in ausreichend

großen NO Spiegeln resultiert, um die Vasodilatation auszulösen. NO selbst stimuliert auch die Angiogenese [Ziche und Morbidelli, 2000]. Dies würde ebenfalls unsere Beobachtung stützen, dass die EPO-Vorbehandlung deutlich effektiver die Revaskularisierung der transplantierten Langerhans'schen Inseln verbessert im Vergleich zur Behandlung mit EPO in der Post-Transplantationsphase.

EPO erhöht durch seine hämatopoetische Aktivität den Hämoglobinspiegel und fördert die Produktion und Reaktivität von Thrombozyten, was wiederum zu einem erhöhten Thromboserisiko führt [Fisher, 1997, Wolf et al., 1997, Stohlawetz et al., 2000, Kato et al., 2010]. In der vorliegenden Arbeit wurden an Tag 14 Blutproben der Empfängertiere entnommen und analysiert. Die EPO-Behandlung erhöhte im Vergleich zur Kontrollgruppe den systemischen Hämatokrit. Diese Blutbildveränderung war in der EPO-Vorbehandlungs-Gruppe nicht nachzuweisen. Galeano et al. untersuchten die Auswirkungen von EPO auf die Wundheilung und konnten interessanterweise zeigen, dass eine tägliche Applikation von 400 IU/kg EPO den Hämatokrit nicht vor Tag 14 erhöhte [Galeano et al., 2006]. Ein ähnliche Beobachtung machten Harder et al. [Harder et al., 2009], die bei einer täglichen EPO Gabe von 500 IU/kg nach 3 Tagen keine Erhöhung des Hämatokrits nachweisen konnten. Das stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Die kurzzeitige EPO-Vorbehandlung triggert keine hämatopoetischen Kaskaden, ist aber sehr wohl in der Lage, Angiogenese zu stimulieren. Diese Tatsache ist vor allem in der klinischen Anwendung von EPO bedeutsam, da die Portalvenenthrombose ohnehin eine Komplikation der Inseltransplantation darstellt [Kawahara et al., 2011].

Zusammenfassend konnte im dritten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine EPO-Vorbehandlung den Revaskularisierungsprozess von transplantierten Langerhans'schen Inseln beschleunigt, ohne dabei den systemischen Hämatokrit der Empfängertiere zu erhöhen. Diese neuen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die EPO-Vorbehandlung eine vielversprechende therapeutische Strategie darstellen könnte, um die Erfolgsrate der Inseltransplantation zu verbessern.

6.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine 6 tägige Vorbehandlung der Empfänger mit Erythropoietin die Angiogenese transplanteder Langerhans'scher Inseln deutlich beschleunigt und die Anwachsrate erhöht. Dagegen zeigte die Behandlung der Empfänger mit EPO oder DPO ab dem Tag der Transplantation nur geringfügige pro-angiogenen Effekte auf die Transplantate. Das Modell der Rückenhautkammer erlaubte dabei die repetitive in vivo Analyse der Revaskularisierung der transplantierten Langerhans'schen Inseln. Dabei stellte die Vorbehandlung der Empfängertiere ein vielversprechendes pro-angiogenes Therapieregime dar, um die Erfolgsrate der Inseltransplantation zu verbessern. Allerdings müssen weitere experimentelle Studien, beispielsweise im Modell der Inseltransplantation unter die Nierenkapsel, Aufschluss über die Funktionalität und Viabilität der Inseln liefern. Damit kann der definitive Nutzen für den Patienten bewiesen, und eine Etablierung der EPO-Vorbehandlung im klinischen Alltag ermöglicht werden. Darüber hinaus könnte man die Vorbehandlung mit EPO mit anderen Therapiestrategien, wie zum Beispiel der Co-Transplantation von Endothelzellen oder endothelialen Progenitorzellen verbinden, um das angiogene Potential der Langerhans'schen Inseln zusätzlich zu erhöhen und die Anwachsrate der Transplantate weiter zu optimieren.

7 Literaturverzeichnis

1. **Abdelrahman M, Sharples EJ, McDonald MC, Collin M, Patel NS, Yaqoob MM, Thiemermann C** (2004). Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia. Shock 22: 63-69.
2. **Ahearn AJ, Parekh JR, Posselt AM** (2015). Islet transplantation for Type 1 diabetes: where are we now? Expert Rev Clin Immunol 11: 59-68.
3. **Alejandro R, Angelico MC, Ricordi C, Burke G, Nery J, Miller J, Esquenazi V, Mintz DH** (1995). Long-term function of islet allograft in type I diabetes mellitus. Transplant Proc 27: 3158.
4. **Algire GH** (1943). An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. Journal of the National Cancer Institute 4: 1-11.
5. **Alsalmiy N, Awaisu A** (2014). Methoxy polyethylene glycol-epoetin beta versus darbepoetin alfa for anemia in non-dialysis-dependent CKD: a systematic review. Int J Clin Pharm 36: 1115-1125.
6. **Alvarez Arroyo MV, Castilla MA, Gonzalez Pacheco FR, Tan D, Riesco A, Casado S, Caramelo C** (1998). Role of vascular endothelial growth factor on erythropoietin-related endothelial cell proliferation. J Am Soc Nephrol 9: 1998-2004.
7. **Ampofo E, Muller I, Dahmke IN, Eichler H, Montenarh M, Menger MD, Laschke MW** (2015). Role of protein kinase CK2 in the dynamic interaction of platelets, leukocytes and endothelial cells during thrombus formation. Thromb Res 136: 996-1006.
8. **Ampofo E, Widmaier D, Montenarh M, Menger MD, Laschke MW** (2016). Protein Kinase CK2 Regulates Leukocyte-Endothelial Cell Interactions during Ischemia and Reperfusion in Striated Skin Muscle. Eur Surg Res 57: 111-124.
9. **Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M** (1990). Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 5978-5982.

10. **Anneren C, Welsh M, Jansson L** (2007). Glucose intolerance and reduced islet blood flow in transgenic mice expressing the FRK tyrosine kinase under the control of the rat insulin promoter. Am J Physiol Endocrinol Metab 292: E1183-1190.
11. **Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F** (1995). Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. Int J Microcirc Clin Exp 15: 85-91.
12. **Ballinger WF, Lacy PE** (1972). Transplantation of intact pancreatic islets in rats. Surgery 72: 175-186.
13. **Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA** (2007). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. 1922. Indian J Med Res 125: 141-146.
14. **Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, Oberholzer J, Odorico JS, Garfinkel MR, Levy M, Pattou F, Berney T, Secchi A, Messinger S, Senior PA, Maffi P, Posselt A, Stock PG, Kaufman DB, Luo X, Kandeel F, Cagliero E, Turgeon NA, Witkowski P, Naji A, O'Connell PJ, Greenbaum C, Kudva YC, Brayman KL, Aull MJ, Larsen C, Kay TW, Fernandez LA, Vantyghem MC, Bellin M, Shapiro AM** (2012). Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. Diabetes Care 35: 1436-1445.
15. **Basta G, Montanucci P, Luca G, Boselli C, Noya G, Barbaro B, Qi M, Kinzer KP, Oberholzer J, Calafiore R** (2011). Long-term metabolic and immunological follow-up of nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes treated with microencapsulated islet allografts: four cases. Diabetes Care 34: 2406-2409.
16. **Beguín Y** (1999). Erythropoietin and platelet production. Haematologica 84: 541-547.
17. **Bordel R, Laschke MW, Menger MD, Vollmar B** (2006). Nicotine does not affect vascularization but inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis. Hum Reprod 21: 610-617.
18. **Bottino R, Wijkstrom M, van der Windt DJ, Hara H, Ezzelarab M, Murase N, Bertera S, He J, Phelps C, Ayares D, Cooper DK, Trucco M** (2014). Pig-to-monkey islet xenotransplantation using multi-transgenic pigs. Am J Transplant 14: 2275-2287.

19. **Boulaftali Y, Lamrani L, Rouzaud MC, Loyau S, Jandrot-Perrus M, Bouton MC, Ho-Tin-Noe B** (2012). The mouse dorsal skinfold chamber as a model for the study of thrombolysis by intravital microscopy. Thromb Haemost 107: 962-971.
20. **Brissova M, Fowler M, Wiebe P, Shostak A, Shiota M, Radhika A, Lin PC, Gannon M, Powers AC** (2004). Intra-islet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets. Diabetes 53: 1318-1325.
21. **Broberg AM, Grinnemo KH, Genead R, Danielsson C, Andersson AB, Wardell E, Sylven C** (2008). Erythropoietin has an antiapoptotic effect after myocardial infarction and stimulates in vitro aortic ring sprouting. Biochem Biophys Res Commun 371: 75-78.
22. **Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, Lu X, Xenocostas A, Feng Q** (2006). Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. Cardiovasc Res 72: 51-59.
23. **Cadroy Y, Hanson SR** (1990). Effects of red blood cell concentration on hemostasis and thrombus formation in a primate model. Blood 75: 2185-2193.
24. **Cardon SZ, Oestermeyer CF, Bloch EH** (1970). Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. Microvasc Res 2: 67-76.
25. **Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M** (1995). Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. Kidney Int 47: 740-745.
26. **Cersosimo RJ, Jacobson DR** (2006). Epoetin alfa versus darbepoetin alfa in chemotherapy-related anemia. Ann Pharmacother 40: 58-65; quiz 169-170.
27. **Chen LN, Sun Q, Liu SQ, Hu H, Lv J, Ji WJ, Wang M, Chen MX, Zhou J** (2015). Erythropoietin improves glucose metabolism and pancreatic beta-cell damage in experimental diabetic rats. Mol Med Rep 12: 5391-5398.

28. **Chen ZY, Wang L, Asavaritkrai P, Noguchi CT** (2010). Up-regulation of erythropoietin receptor by nitric oxide mediates hypoxia preconditioning. J Neurosci Res 88: 3180-3188.
29. **Choi D, Schroer SA, Lu SY, Wang L, Wu X, Liu Y, Zhang Y, Gaisano HY, Wagner KU, Wu H, Retnakaran R, Woo M** (2010). Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic beta cells. J Exp Med 207: 2831-2842.
30. **Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K** (2002). Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. Circulation 106: 2973-2979.
31. **Coppens V, Heremans Y, Leuckx G, Suenens K, Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, Verdonck K, Lahoutte T, Luttun A, Heimberg H, De Leu N** (2013). Human blood outgrowth endothelial cells improve islet survival and function when co-transplanted in a mouse model of diabetes. Diabetologia 56: 382-390.
32. **Couper J, Donaghue KC** (2009). Phases of diabetes in children and adolescents. Pediatr Diabetes 10: 13-16.
33. **Cui YF, Ma M, Wang GY, Han DE, Vollmar B, Menger MD** (2005). Prevention of core cell damage in isolated islets of Langerhans by low temperature preconditioning. World J Gastroenterol 11: 545-550.
34. **Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC** (1996). Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. Diabetes 45: 1161-1167.
35. **de Miranda ML, Pereira SJ, Santos AO, Villela NR, Kraemer-Aguiar LG, Bouskela E** (2015). Milrinone attenuates arteriolar vasoconstriction and capillary perfusion deficits on endotoxemic hamsters. PLoS One 10: e0117004.
36. **De Vos P, De Haan BJ, Vegter D, Hillebrands JL, Strubbe JH, Bruggink JE, Van Schilfgaarde R** (1998). Insulin levels after portal and systemic insulin infusion differ in a dose-dependent fashion. Horm Metab Res 30: 721-725.

37. **Dean PG, Kukla A, Stegall MD, Kudva YC** (2017). Pancreas transplantation. BMJ 357: j1321.
38. **Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS** (2004). Type 1 diabetes: recent developments. BMJ 328: 750-754.
39. **Dionne KE, Colton CK, Yarmush ML** (1993). Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. Diabetes 42: 12-21.
40. **Egrie JC, Browne JK** (2001). Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). Br J Cancer 84: 3-10.
41. **Elk N, Iwuchukwu OF** (2017). Using Personalized Medicine in the Management of Diabetes Mellitus. Pharmacotherapy 37: 1131-1149.
42. **Elliott S, Lorenzini T, Asher S, Aoki K, Brankow D, Buck L, Busse L, Chang D, Fuller J, Grant J, Hernday N, Hokum M, Hu S, Knudten A, Levin N, Komorowski R, Martin F, Navarro R, Osslund T, Rogers G, Rogers N, Trail G, Egrie J** (2003). Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. Nat Biotechnol 21: 414-421.
43. **Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K** (1980). Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. Res Exp Med (Berl) 177: 125-134.
44. **Faleiros RR, Macoris DG, Alessi AC, Saquetti CH, Rasera L** (2002). Effect of intraluminal distention on microvascular perfusion in the equine small colon. Am J Vet Res 63: 1292-1297.
45. **Fenjves ES, Ochoa MS, Cabrera O, Mendez AJ, Kenyon NS, Inverardi L, Ricordi C** (2003). Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors. Transplantation 75: 1356-1360.
46. **Fenjves ES, Ochoa MS, Gay-Rabinstein C, Molano RD, Pileggi A, Mendez AJ, Inverardi L, Ricordi C** (2004). Adenoviral gene transfer of erythropoietin confers cytoprotection to isolated pancreatic islets. Transplantation 77: 13-18.

47. **Figliuzzi M, Cornolti R, Perico N, Rota C, Morigi M, Remuzzi G, Remuzzi A, Benigni A** (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. Transplant Proc 41: 1797-1800.
48. **Fisher JW** (1997). Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects. Proc Soc Exp Biol Med 216: 358-369.
49. **Funk W, Endrich B, Messmer K** (1986). A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. Res Exp Med (Berl) 186: 259-270.
50. **Galeano M, Altavilla D, Bitto A, Minutoli L, Calo M, Lo Cascio P, Polito F, Giugliano G, Squadrito G, Mioni C, Giuliani D, Venuti FS, Squadrito F** (2006). Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. Crit Care Med 34: 1139-1146.
51. **Gallego Ferrero P, Crespo Del Pozo J** (2018). Imaging in pancreas transplantation complications: Temporal classification. J Med Imaging Radiat Oncol 62: 504-511.
52. **Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Bonner-Weir S, O'Hara CJ, Monaco AP** (1987). Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. Transplantation 43: 725-730.
53. **Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, Reme CE** (2002). HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. Nat Med 8: 718-724.
54. **Gruessner AC, Gruessner RW** (2016). Pancreas Transplantation of US and Non-US Cases from 2005 to 2014 as Reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). Rev Diabet Stud 13: 35-58.
55. **Harder Y, Amon M, Schramm R, Contaldo C, Metzkwow E, Matzen A, Rucker M, Vollmar B, Menger MD** (2009). Erythropoietin reduces necrosis in critically ischemic myocutaneous tissue by protecting nutritive perfusion in a dose-dependent manner. Surgery 145: 372-383.

56. **Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K** (1997). Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol 273: H989-996.
57. **Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S** (2003). Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. Blood 102: 1340-1346.
58. **Henriksnas J, Lau J, Zang G, Berggren PO, Kohler M, Carlsson PO** (2012). Markedly decreased blood perfusion of pancreatic islets transplanted intraportally into the liver: disruption of islet integrity necessary for islet revascularization. Diabetes 61: 665-673.
59. **Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hardstedt M, Aasheim TC, Jie T, Ansite JD, Nakano M, Cheng J, Li W, Moran K, Christians U, Finnegan C, Mills CD, Sutherland DE, Bansal-Pakala P, Murtaugh MP, Kirchoff N, Schuurman HJ** (2006). Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. Nat Med 12: 301-303.
60. **Herold G** (2018). Innere Medizin. Köln, Gerd Herold.
61. **Heuser M, Wolf B, Vollmar B, Menger MD** (1997). Die Transplantation Langerhans'scher Inseln als "OrganCluster" beeinträchtigt die Vaskularisierung in vivo und führt zu signifikantem Transplantatverlust. Langenbecks Arch Chir 97:229.
62. **Hillgruber C, Steingraber AK, Poppelmann B, Denis CV, Ware J, Vestweber D, Nieswandt B, Schneider SW, Goerge T** (2014). Blocking von Willebrand factor for treatment of cutaneous inflammation. J Invest Dermatol 134: 77-86.
63. **Horikoshi T, Yoshioka T, Kubota Y, Yanagisawa K** (1987). Fluorescent dye monitoring of mitochondrial changes associated with malignant cell transformation. Cell Struct Funct 12: 525-537.
64. **Hörl WH** (2013). Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents: an update to selection for anaemia of chronic kidney disease. Drugs 73: 117-130.

65. **Intaglietta M, Tompkins WR, Richardson DR** (1970). Velocity measurements in the microvasculature of the cat omentum by on-line method. Microvasc Res 2: 462-473.
66. **Jansson L, Carlsson PO** (2002). Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. Diabetologia 45: 749-763.
67. **Jelkmann W** (2013). Physiology and pharmacology of erythropoietin. Transfus Med Hemother 40: 302-309.
68. **Johnson DW, Pat B, Vesey DA, Guan Z, Endre Z, Gobe GC** (2006). Delayed administration of darbepoetin or erythropoietin protects against ischemic acute renal injury and failure. Kidney Int 69: 1806-1813.
69. **Karschnia P, Scheuer C, Hess A, Spater T, Menger MD, Laschke MW** (2018). Erythropoietin promotes network formation of transplanted adipose tissue-derived microvascular fragments. Eur Cell Mater 35: 268-280.
70. **Kato S, Amano H, Ito Y, Eshima K, Aoyama N, Tamaki H, Sakagami H, Satoh Y, Izumi T, Majima M** (2010). Effect of erythropoietin on angiogenesis with the increased adhesion of platelets to the microvessels in the hind-limb ischemia model in mice. J Pharmacol Sci 112: 167-175.
71. **Katsuki S, Murad F** (1977). Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. Mol Pharmacol 13: 330-341.
72. **Katz O, Stuble M, Golishevski N, Lifshitz L, Tremblay ML, Gassmann M, Mittelman M, Neumann D** (2010). Erythropoietin treatment leads to reduced blood glucose levels and body mass: insights from murine models. J Endocrinol 205: 87-95.
73. **Kawahara T, Kin T, Kashkoush S, Gala-Lopez B, Bigam DL, Kneteman NM, Koh A, Senior PA, Shapiro AM** (2011). Portal vein thrombosis is a potentially preventable complication in clinical islet transplantation. Am J Transplant 11: 2700-2707.

74. **Kerger H, Saltzman DJ, Menger MD, Messmer K, Intaglietta M** (1996). Systemic and subcutaneous microvascular Po₂ dissociation during 4-h hemorrhagic shock in conscious hamsters. Am J Physiol 270: H827-836.
75. **Kharroubi AT, Darwish HM** (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. World J Diabetes 6: 850-867.
76. **Kimakova P, Solar P, Solarova Z, Komel R, Debeljak N** (2017). Erythropoietin and its angiogenic activity. Int J Mol Sci 18: 1519.
77. **Langlois A, Dal S, Vivot K, Mura C, Seyfritz E, Bietiger W, Dollinger C, Peronet C, Maillard E, Pinget M, Jeandidier N, Sigrist S** (2016). Improvement of islet graft function using liraglutide is correlated with its anti-inflammatory properties. Br J Pharmacol 173: 3443-3453.
78. **Langlois A, Mura C, Bietiger W, Seyfritz E, Dollinger C, Peronet C, Maillard E, Pinget M, Jeandidier N, Sigrist S** (2016). In Vitro and In Vivo Investigation of the Angiogenic Effects of Liraglutide during Islet Transplantation. PLoS One 11: e0147068.
79. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD** (2011). The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. Eur Cell Mater 22: 147-164.
80. **Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B** (2007). Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice. Am J Pathol 170: 1954-1963.
81. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K** (1993). Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. Am J Pathol 143: 1055-1062.
82. **Leonard RJ, Lazarow A, Hegre OD** (1973). Pancreatic islet transplantation in the rat. Diabetes 22: 413-428.

83. **Li Y, Lu Z, Keogh CL, Yu SP, Wei L** (2007). Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab 27: 1043-1054.
84. **Lindbom L, Tuma RF, Arfors KE** (1982). Blood flow in the rabbit tenuissimus muscle. Influence of preparative procedures for intravital microscopic observation. Acta Physiol Scand 114: 121-127.
85. **Lindenblatt N, Menger MD, Klar E, Vollmar B** (2007). Darbepoetin-alpha does not promote microvascular thrombus formation in mice: role of eNOS-dependent protection through platelet and endothelial cell deactivation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27: 1191-1198.
86. **Lipowsky HH, Zweifach BW** (1978). Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. Microvasc Res. 15: 93-101.
87. **Macdougall IC, Gray SJ, Elston O, Breen C, Jenkins B, Browne J, Egrie J** (1999). Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. J Am Soc Nephrol 10: 2392-2395.
88. **Menger MD, Jaeger S, Walter P, Feifel G, Hammersen F, Messmer K** (1989). Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. Diabetes 38 Suppl 1: 199-201.
89. **Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K** (1990). Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. Thorac Cardiovasc Surg 38: 139-145.
90. **Menger MD, Jäger S, Walter P, Hammersen F, Messmer K** (1990). A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. Int J Microcirc Clin Exp 9: 103-117.
91. **Menger MD, Barker JH, Messmer K** (1992). Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle. Plast Reconstr Surg 89: 1104-1114.

92. **Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B** (2001). Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. World J Surg 25: 509-515.
93. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B** (2002). Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. Eur Surg Res 34: 83-91.
94. **Menger MD, Laschke MW, Amon M, Schramm R, Thorlacius H, Rucker M, Vollmar B** (2003). Experimental models to study microcirculatory dysfunction in muscle ischemia-reperfusion and osteomyocutaneous flap transfer. Langenbecks Arch Surg 388: 281-290.
95. **Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI** (2003). Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 11612-11617.
96. **Motoike T, Loughna S, Perens E, Roman BL, Liao W, Chau TC, Richardson CD, Kawate T, Kuno J, Weinstein BM, Stainier DY, Sato TN** (2000). Universal GFP reporter for the study of vascular development. Genesis 28: 75-81.
97. **Noguchi H, Naziruddin B, Jackson A, Shimoda M, Ikemoto T, Fujita Y, Chujo D, Takita M, Peng H, Sugimoto K, Itoh T, Kobayashi N, Onaca N, Levy MF, Matsumoto S** (2012). Fresh islets are more effective for islet transplantation than cultured islets. Cell Transplant 21: 517-523.
98. **Nyqvist D, Kohler M, Wahlstedt H, Berggren PO** (2005). Donor islet endothelial cells participate in formation of functional vessels within pancreatic islet grafts. Diabetes 54: 2287-2293.
99. **Nyqvist D, Speier S, Rodriguez-Diaz R, Molano RD, Lipovsek S, Rupnik M, Dicker A, Ilegems E, Zahr-Akrawi E, Molina J, Lopez-Cabeza M, Villate S, Abdulreda MH, Ricordi C, Caicedo A, Pileggi A, Berggren PO** (2011). Donor islet endothelial cells in pancreatic islet revascularization. Diabetes 60: 2571-2577.

100. **Oh BJ, Oh SH, Jin SM, Suh S, Bae JC, Park CG, Lee MS, Lee MK, Kim JH, Kim KW** (2013). Co-transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells improves revascularization and organization in islet grafts. Am J Transplant 13: 1429-1440.
101. **Olsson R, Carlsson PO** (2005). Better vascular engraftment and function in pancreatic islets transplanted without prior culture. Diabetologia 48: 469-476.
102. **Olsson R, Maxhuni A, Carlsson PO** (2006). Revascularization of transplanted pancreatic islets following culture with stimulators of angiogenesis. Transplantation 82: 340-347.
103. **Ortiz D, Barros M, Yan S, Cabrales P** (2014). Resuscitation from hemorrhagic shock using polymerized hemoglobin compared to blood. Am J Emerg Med 32: 248-255.
104. **Overbay DK, Manley HJ** (2002). Darbepoetin-alpha: a review of the literature. Pharmacotherapy 22: 889-897.
105. **Palmer SC, Saglimbene V, Craig JC, Navaneethan SD, Strippoli GF** (2014). Darbepoetin for the anaemia of chronic kidney disease. Cochrane Database Syst Rev: CD009297.
106. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA** (1979). A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. Microvasc Res 18: 311-318.
107. **Park S, Fenaux P, Greenberg P, Mehta B, Callaghan F, Kim C, Tomita D, Xu H** (2016). Efficacy and safety of darbepoetin alpha in patients with myelodysplastic syndromes: a systematic review and meta-analysis. Br J Haematol 174: 730-747.
108. **Patterson C, Guariguata L, Dahlquist G, Soltesz G, Ogle G, Silink M** (2014). Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 103: 161-175.
109. **Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, Shapiro AM** (2013). Revascularization of transplanted pancreatic islets and role of the transplantation site. Clin Dev Immunol 2013: 352315.

110. **Pirker R, Hedenus M, Vansteenkiste J, Hernandez E, Belton L, Terwey JH** (2016). Effectiveness of Darbepoetin Alfa for Chemotherapy-induced Anemia When Initiated at Hemoglobin ≤ 10 g/dL. Clin Ther 38: 122-135.e6.
111. **Posselt AM, Szot GL, Frassetto LA, Masharani U, Tavakol M, Amin R, McElroy J, Ramos MD, Kerlan RK, Fong L, Vincenti F, Bluestone JA, Stock PG** (2010). Islet transplantation in type 1 diabetic patients using calcineurin inhibitor-free immunosuppressive protocols based on T-cell adhesion or costimulation blockade. Transplantation 90: 1595-1601.
112. **Prewitt RL, Johnson PC** (1976). The effect of oxygen on arteriolar red cell velocity and capillary density in the rat cremaster muscle. Microvasc Res 12: 59-70.
113. **Quaranta P, Antonini S, Spiga S, Mazzanti B, Curcio M, Mulas G, Diana M, Marzola P, Mosca F, Longoni B** (2014). Co-transplantation of endothelial progenitor cells and pancreatic islets to induce long-lasting normoglycemia in streptozotocin-treated diabetic rats. PLoS One 9: e94783.
114. **Rackham CL, Chagastelles PC, Nardi NB, Hauge-Evans AC, Jones PM, King AJ** (2011). Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. Diabetologia 54: 1127-1135.
115. **Rezaeian F, Wettstein R, Amon M, Scheuer C, Schramm R, Menger MD, Pittet B, Harder Y** (2008). Erythropoietin protects critically perfused flap tissue. Ann Surg 248: 919-929.
116. **Rezaeian F, Wettstein R, Egger JF, Sandmann F, Rucker M, Tobalem M, Vollmar B, Menger MD, Harder Y** (2010). Erythropoietin-induced upregulation of endothelial nitric oxide synthase but not vascular endothelial growth factor prevents musculocutaneous tissue from ischemic damage. Lab Invest 90: 40-51.
117. **Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F** (1999). Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. Blood 93: 2627-2636.

118. **Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M, Abel ED, Xenocostas A, Kvietys PR** (2005). Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. Cardiovasc Res 65: 719-727.
119. **Rupertus K, Sperling J, Corsten M, Scheuer C, Nickels RM, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O** (2010). Darbepoetin-alpha enhances hepatectomy-associated stimulation of colorectal liver metastatic growth. Ann Surg 252: 131-141.
120. **Rupertus K, Senger S, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O** (2012). Darbepoetin-alpha promotes neovascularization and cell proliferation in established colorectal liver metastases. J Surg Res 176: 517-523.
121. **Samy KP, Martin BM, Turgeon NA, Kirk AD** (2014). Islet cell xenotransplantation: a serious look toward the clinic. Xenotransplantation 21: 221-229.
122. **Sandison JC** (1924). The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behavior of living cells and tissues seen with the microscope. The American Journal of Anatomy 41: 447-472.
123. **Scharp D, Lacy P, Ricordi C, Boyle P, Santiago J, Cryer P, Gingerick R, Jaffe A, Anderson C, Flye W** (1989). Human islet transplantation in patients with type I diabetes. Transplant Proc 21: 2744-2745.
124. **Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, Marchetti P, Gingerich RL, Jaffe AS, Cryer PE, et al.** (1990). Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. Diabetes 39: 515-518.
125. **Schramm R, Yamauchi J, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD** (2003). Blockade of in vivo VEGF-KDR/flk-1 signaling does not affect revascularization of freely transplanted pancreatic islets. Transplantation 75: 239-242.
126. **Senger S, Kollmar O, Menger MD, Schilling MK, Rupertus K** (2014). Darbepoetin-alpha accelerates neovascularization and engraftment of extrahepatic colorectal metastases. Eur Surg Res 53: 25-36.

127. **Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV** (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med 343: 230-238.
128. **Shibata J, Hasegawa J, Siemens HJ, Wolber E, Dibbelt L, Li D, Katschinski DM, Fandrey J, Jelkmann W, Gassmann M, Wenger RH, Wagner KF** (2003). Hemostasis and coagulation at a hematocrit level of 0.85: functional consequences of erythrocytosis. Blood 101: 4416-4422.
129. **Staels W, Verdonck Y, Heremans Y, Leuckx G, De Groef S, Heirman C, de Koning E, Gysemans C, Thielemans K, Baeyens L, Heimberg H, De Leu N** (2018). Vegf-A mRNA transfection as a novel approach to improve mouse and human islet graft revascularisation. Diabetologia 61: 1804-1810.
130. **Stohlawetz PJ, Dzirlo L, Hergovich N, Lackner E, Mensik C, Eichler HG, Kabrna E, Geissler K, Jilma B** (2000). Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. Blood 95: 2983-2989.
131. **Tamayo T, Rosenbauer J, Wild SH, Spijkerman AM, Baan C, Forouhi NG, Herder C, Rathmann W** (2014). Diabetes in Europe: an update. Diabetes Res Clin Pract 103: 206-217.
132. **Toso C, Oberholzer J, Ris F, Triponez F, Bucher P, Demirag A, Anderegg E, Buehler L, Cretin N, Fournier B, Majno P, Hong Y, Lou J, Morel P** (2002). Factors affecting human islet of Langerhans isolation yields. Transplant Proc 34: 826-827.
133. **Tuch BE, Keogh GW, Williams LJ, Wu W, Foster JL, Vaithilingam V, Philips R** (2009). Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans. Diabetes Care 32: 1887-1889.
134. **Vajkoczy P, Olofsson AM, Lehr HA, Leiderer R, Hammersen F, Arfors KE, Menger MD** (1995a). Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin. Am J Pathol 146: 1397-1405.

135. **Vajkoczy P, Menger MD, Simpson E, Messmer K** (1995b). Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. Transplantation 60: 123-127.
136. **van der Vliet JA, Meloche RM, Field MJ, Chen DJ, Kaufman DB, Sutherland DE** (1988). Pancreatic islet isolation in rats with ductal collagenase distention, stationary digestion, and dextran separation. Transplantation 45: 493-495.
137. **Vegas AJ, Veiseh O, Gurtler M, Millman JR, Pagliuca FW, Bader AR, Doloff JC, Li J, Chen M, Olejnik K, Tam HH, Jhunjhunwala S, Langan E, Aresta-Dasilva S, Gandham S, McGarrigle JJ, Bochenek MA, Hollister-Lock J, Oberholzer J, Greiner DL, Weir GC, Melton DA, Langer R, Anderson DG** (2016). Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. Nat Med 22: 306-311.
138. **Vermeulen I, Weets I, Asanghanwa M, Ruige J, Van Gaal L, Mathieu C, Keymeulen B, Lampasona V, Wenzlau JM, Hutton JC, Pipeleers DG, Gorus FK, Belgian Diabetes R** (2011). Contribution of antibodies against IA-2beta and zinc transporter 8 to classification of diabetes diagnosed under 40 years of age. Diabetes Care 34: 1760-1765.
139. **Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobe G, Johnson DW** (2004). Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. Nephrol Dial Transplant 19: 348-355.
140. **Vogel J, Kiessling I, Heinicke K, Stallmach T, Ossent P, Vogel O, Aulmann M, Frietsch T, Schmid-Schonbein H, Kuschinsky W, Gassmann M** (2003). Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. Blood 102: 2278-2284.
141. **Vollmar B, Laschke MW, Rohan R, Koenig J, Menger MD** (2001). In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. Am J Pathol 159: 1661-1670.
142. **Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, Suzuma I, Ohashi H, Ojima T, Murakami T, Kobayashi T, Masuda S, Nagao M, Yoshimura N, Takagi H** (2005). Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. N Engl J Med 353: 782-792.

143. **WHO** (2019). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
144. **Wittig C, Laschke MW, Scheuer C, Menger MD** (2013). Incorporation of bone marrow cells in pancreatic pseudoislets improves posttransplant vascularization and endocrine function. PLoS One 8: e69975.
145. **Wolf RF, Peng J, Friese P, Gilmore LS, Burstein SA, Dale GL** (1997). Erythropoietin administration increases production and reactivity of platelets in dogs. Thromb Haemost 78: 1505-1509.
146. **Zhang Y, Wang L, Dey S, Alnaeeli M, Suresh S, Rogers H, Teng R, Noguchi CT** (2014). Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism. Int J Mol Sci 15: 10296-10333.
147. **Ziche M, Morbidelli L** (2000). Nitric oxide and angiogenesis. J Neurooncol 50: 139-148.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und allen danken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein Dank gilt im Besonderen:

Herrn Prof. Dr. Matthias Glanemann, der mir die Möglichkeit gegeben hat, über dieses spannende und herausfordernde Forschungsgebiet an der Universität des Saarlandes zu promovieren.

Herrn Dr. Emmanuel Ampofo für die ausgezeichnete Betreuung, die konstruktive Kritik, das persönliche Engagement, die wissenschaftlichen Diskussionen und die stetige Motivation, diese Arbeit weiter voranzubringen. Sein Enthusiasmus hat in mir großes Interesse an wissenschaftlichem Arbeiten geweckt, besonders in der chirurgischen Forschung.

Herrn Prof. Dr. Matthias Laschke für die zahlreichen Ratschläge und die umfangreiche Beratung während des Projektes. Seine jahrelange Erfahrung in der experimentellen Forschung hat wesentlich zur erfolgreichen Planung dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Jeannette Rudzitis-Auth, Thomas Später, Lisa Nalbach und Beate Schmitt, die mir jederzeit bei Fragen und Problemen zur Seite standen und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Caroline Bickelmann für die exzellente Arbeit bei den immunhistochemischen Analysen.

Kati Jordan, Julia Schakat und allen Tierpflegerinnen für die exzellente Betreuung meiner Versuchstiere.

.

9 Publikationen

9.1 Originalarbeiten

Menger MM, Nalbach L, Glanemann M, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. Erythropoietin accelerates the revascularization of transplanted pancreatic islets. Br J Pharmacology, under revision.

9.2 Kongressbeiträge

Menger MM, Nalbach L, Glanemann M, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. (2018). Erythropoietin pretreatment accelerates the revascularization of transplanted pancreatic islets. Eur Surg Res 59: 191-192.

Menger MM, Nalbach L, Glanemann M, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. (2019). Erythropoietin accelerates the revascularization of transplanted pancreatic islets. Langenbecks Arch Surg, in press.