



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Pancreatic islet transplantation: studies on the technique and efficacy of islet isolation and transplantation**

Burg, M.P.M. van der

### **Citation**

Burg, M. P. M. van der. (1994, November 9). *Pancreatic islet transplantation: studies on the technique and efficacy of islet isolation and transplantation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3486604>

Version: Publisher's Version

License: [Creative Commons CC BY 4.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3486604>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

### Inleiding (Hoofdstuk 1)

Transplantatie van de eilandjes van Langerhans heeft tot doel de late invaliderende complicaties van insuline-afhankelijke diabetes mellitus (IDDM) te voorkomen, uit te stellen, of te verminderen; en een betere kwaliteit van leven, alsook een langere levensduur voor de patiënt te bewerkstelligen. Ongeveer 0,2–0,4% van de bevolking van de geïndustrialiseerde landen wordt getroffen door IDDM — ook type-1 diabetes genoemd. Deze patiënten hebben chronisch te hoge bloedsuikerspiegels (glucosespiegels), als gevolg van verwoesting van de  $\beta$ -cellen van de eilandjes van Langerhans, welke normaal de nodige insuline produceren om de bloedsuikerspiegel te reguleren. Het normale menselijke pancreas (alvleesklier) bevat, verspreid over het hele orgaan, ruwweg 1 miljoen van deze eilandjes — kleine klompjes cellen met een doorsnede tot 0,5 millimeter. Samen wegen de eilandjes ca. 1 gram.

De traditionele behandeling met dagelijkse insuline injecties voldoet om de IDDM patiënt te laten leven, maar kan gewoonlijk niet een chronisch te hoge bloedglucosespiegel voorkomen. Bij ca. 50% van de patiënten kan dit na 20 tot 30 jaar ernstige schade veroorzaken aan ogen, nieren, zenuwen, en bloedvaten — met als mogelijk gevolg blindheid, uitval van de nierfunctie, waardoor dialyse of niertransplantatie nodig wordt, en amputatie van de onderste ledematen. Door deze complicaties is de verwachte levensduur van de insuline-afhankelijk patiënt 1/3 korter dan normaal. Inmiddels is bij onderzoek in diabetische proefpersonen onomstotelijk aangetoond, dat met een zo intensief mogelijke glucoseregulatie de chronische complicaties voorkomen dan wel uitgesteld kunnen worden. Er dienen echter nieuwe wegen gezocht te worden om een dergelijke uitstekende glucoseregulatie in de gehele diabetische populatie te verwezenlijken. Naast een aanzienlijke aandacht voor

diabeteseducatie en zelfcontrole van patiënten, staat momenteel ook de ontwikkeling van nieuwe apparaten voor injectie of infusie van insuline voor normalisering van de bloedglucose, volop in de belangstelling. De noodzakelijke, vrijwel continue bijregeling van de secretie van insuline en andere hormonen door de eilandjes kan echter vooralsnog onvoldoende nagebootst worden door behandeling met insuline.

Momenteel kan uitsluitend met pancreastransplantatie over langere tijd een normale bloedsuikerregulatie in diabetische patiënten bereikt worden. Bovendien wordt door een geslaagde transplantatie ook de voortschrijding van chronische complicaties tegengegaan of teruggedrongen, en de kwaliteit van leven van de patiënt verbeterd — voornamelijk, doordat injecties met insuline en metingen van de bloedglucose overbodig worden, en het gevaar voor ernstige hypoglycemische incidenten — de soms levensbedreigend lage spiegels van bloedglucose. Echter, omdat de transplantatie van het pancreas een grote operatie is, en ook levenslang afweer-onderdrukkende medicijnen vereist (met mogelijk ernstige bijwerkingen), is deze operatie vrijwel uitsluitend voorbehouden aan de kleine groep van IDDM patiënten die vanwege uitval van de eigen nierfunctie ook een niertransplantatie en dezelfde categorie afweeronderdrukkende medicijnen nodig hebben.

Daar de eilandjes het insuline produceren, en de eilandjes uit het pancreas geïsoleerd (geëxtraheerd) kunnen worden door gedeeltelijke vertering van het orgaan met behulp van een oplossing van collagenase en andere enzymen, zou er mogelijk veel te winnen zijn door in plaats van het gehele pancreas uitsluitend geïsoleerde eilandjes te transplanteren. Ten eerste is implantatie van geïsoleerde eilandjes zeer eenvoudig en veilig, daar volstaan kan worden met een enkele injectie van enkele milliliters van een eilandsuspensie. Voorts kunnen de eilandjes bewaard of opgeslagen worden door ze in kweek te houden of in te vriezen, waardoor het mogelijk wordt (i) eilandjes van meerdere donoren te verzamelen en te transplanteren; (ii) de donor en ontvanger goed op elkaar af te stemmen teneinde het gevaar voor immunologische afstoting van het transplantaat te verkleinen; (iii) voorafgaande aan de transplantatie de eilandjes te manipuleren (zoals door bestraling, of door inkapseling in semi-permeabele membranen) waardoor minder of geen immunosuppressieve medicijnen nodig zijn, en zelfs eilandjes van dieren zoals het varken getransplanteerd zouden kunnen worden, om zo een mogelijk toekomstig tekort aan donoren te voorkomen.

De afgelopen paar jaar zijn meer dan 100 transplantaties van humane eilandjes in patiënten met ernstige diabetische complicaties, uitgevoerd. Bij ongeveer 10–20% van deze patiënten kon na de transplantatie voor korte tijd de

behandeling met insuline gestaakt worden, en drie patiënten bleven zelfs meer dan 2,5 jaar insuline-onafhankelijk. Hiermee is duidelijk aangetoond dat deze behandeling kan werken, maar vooralsnog dienen er nog veel problemen aangepakt te worden voordat op grote schaal eilandjestransplantatie mogelijk wordt in een veelal jeugdige type-1 patiënt — nog voordat de ernstige complicaties optreden. Het is nog een groot probleem om consistent voldoende, en ook voldoende zuivere, eilandjes voor transplantatie uit het pancreas te isoleren. Ook de essentie van eilandjestransplantatie, de stelling dat zo langdurig een uitstekende glucoseregulatie kan worden bewerkstelligd, is nog niet bevestigd. Deze problematiek was het uitgangspunt voor het onderzoek in deze dissertatie.

## **Invloed van donorfactoren op de isolatie van eilandjes (Hoofdstuk 2)**

Hoewel de afgelopen tien jaar de gemiddelde opbrengst aan geïsoleerde eilandjes uit het pancreas van de mens en grote dieren ruwweg met een factor 5–10 is toegenomen, wordt de voortgang van onderzoek en klinische toepassing gefrustreerd door de grote variatie van de opbrengst. Talrijke factoren kunnen hierbij een rol spelen, zoals de omstandigheden (i) vóór en tijdens het uitnemen van het pancreas uit de donor, (ii) tijdens de opslag van het pancreas, en (iii) gedurende de verschillende isolatie-stappen. De oorzaak van de variabele opbrengst is daarom moeilijk te traceren. Kennis van de intrinsieke variabiliteit van het pancreas zoals het eilandjesgehalte, is een essentiële voorwaarde voor verdere analyse van de relatieve invloed van de vele extrinsieke factoren — welke potentieel beheersbaar zijn. Daar de relatieve invloed van het eilandgehalte van het pancreas, en andere donor-gerelateerde factoren op het resultaat na isolatie, nog niet systematisch in grote dieren en de mens onderzocht zijn, hebben wij de impact van deze factoren op de opbrengst aan eilandjes uit het linker deel van het pancreas van 31 honden bestudeerd. Het eilandgehalte bedroeg gemiddeld 16 microliter per gram pancreas, en het varieerde drievoudig (van 8 tot 27 microliter). De opbrengst aan geïsoleerde eilandjes bedroeg gemiddeld 8 microliter, en varieerde negenvoudig (~2–16 microliter). Ook de donor-leeftijd varieerde achtvoudig (8–67 maanden) en het lichaamsgewicht tweevoudig (8–18 kg). Het gecombineerde effect van de interindividuele verschillen in lichaamsgewicht en leeftijd verklaarde ca. 60% van de variabiliteit van het relatieve eilandvolume van het pancreas. Het eilandvolume nam toe met het lichaamsgewicht, en nam af met de leeftijd. Deze factoren, alsook de interindividuele variatie in het eilandgehalte van het

pancreas verklaarden ~50% van de verschillen in eilandopbrengst. De leeftijd en het lichaamsgewicht hadden geen invloed op de effectiviteit van de collagenase vertering van het pancreas. Geconcludeerd wordt, dat het resultaat van isolatie redelijk voorspelbaar kan zijn, wanneer rekening wordt gehouden met het variabele eilandgehalte van een pancreas, en andere donor-afhankelijke variabelen zoals leeftijd en lichaamsgewicht.

### **De effectiviteit van isolatie van eilandjes (Hoofdstuk 3)**

Het resultaat van eilandisolatie wordt over het algemeen onzeker geacht, enerzijds omdat dit mogelijk door talrijke extrinsieke factoren beïnvloed wordt, en anderzijds vanwege de indrukwekkende variabiliteit van het resultaat, op zich. In het verleden werd de effectiviteit van de procedure indirect geschat, door vergelijking van de hoeveelheid insuline in het pancreas en de suspensie geïsoleerde eilandjes. Echter, omdat, algemeen wordt aangenomen dat de opbrengst aan eilandjes en insuline verschillend worden beïnvloed door de vele variabelen tijdens de isolatie, is de methode van insuline-extractie grotendeels verdrongen door de huidige methode van het opmeten van eilandjes ter bepaling van het totale volume geïsoleerde eilandjes. Morfometrische bepaling van de opbrengst aan eilandjes heeft de onderlinge vergelijking van resultaten in de verschillende laboratoria vergemakkelijkt, en ook een definitie van de kritische hoeveelheid eilandjes voor succesvolle transplantatie opgeleverd. Vooralsnog echter zijn geen pogingen ondernomen om morfometrie ook te gebruiken ter bepaling van de effectiviteit van de isolatiemethode door vergelijking van de hoeveelheid eilandjes vóór en na isolatie — en daarom is ook de recovery van eilandjes en insuline nog niet vergeleken.

Wij hebben door zowel morfometrie als insuline-extractie de effectiviteit van eilandisolatie gemeten, en deze twee methoden vergeleken. Daarbij werd gebruik gemaakt van een eenvoudige, zachte, techniek voor de isolatie van eilandjes uit het linker pancreassegment in 31 honden, teneinde storende extrinsieke factoren en problemen door de ongelijke verdeling van eilandjes in het pancreas zoveel mogelijk uit te sluiten. De isolatie van eilandjes werd verricht, door via de afvoergang van het pancreas collagenase in te spuiten, en de klier zonder schudden te verteren (digestie). Het weefsel werd verder losgemaakt in een koude University of Wisconsin oplossing (UWS), en de eilandjes in het resulterende 'digest' (verteringsproduct) werden gezuiverd door centrifugering in een dichtheidsgradiënt. Monsters van het pancreas, de digest-suspensie, en de zuivere fractie (eilandjes) en onzuivere fractie (acinair

weefsel) van de gradiënt, werden vergeleken door (i) morfometrie van het eilandvolume en de grootte-verdeling van de eilandjes; door (ii) extractie van insuline en amylase (als een maat voor het acinaire weefsel); en (iii) door microscopie van de morfologie en graad van  $\beta$ -cel granulatie als een alternatieve maat voor het insulinegehalte. De kwaliteit van de geïsoleerde eilandjes werd verder onderzocht door stimulatie met glucose, gedurende in vitro perifusie.

In tegenstelling tot een ~90% opbrengst van insuline en amylase na vertering, bedroeg de opbrengst aan geïsoleerde eilandjes 50% van het eilandgehalte van het pancreas. Na scheiding van het weefsel in dichtheidsgradiënten, werden de eilandjes vrijwel uitsluitend in de zuivere fractie aangetroffen — welke vrijwel geen acinair weefsel bevatte. De helft van het insuline werd daarentegen aangetroffen in de onzuivere (acinaire) fractie — wat er (in tegenstelling tot subjectieve microscopische beoordeling) op wees, dat een aanzienlijke hoeveelheid eilandjes gevangen bleef in niet-verteerde pancreasfragmenten. Correlatie-analyse toonde aan dat ~50% van de variatie in eiland- en insuline-opbrengst, te herleiden valt tot de interindividuele verschillen in het gehalte aan eilandjes en insuline van het pancreas. Het insuline-gehalte van het digest correleerde niet met de eiland- en insuline-opbrengst in de zuivere fracties van de gradiënt; in tegenstelling tot het eilandjes-gehalte van het digest, dat zowel met de opbrengst aan eilandjes als de hoeveelheid insuline in de zuivere fracties correleerde. Theoretisch zou ook degranulatie van de  $\beta$ -cellen, tijdens de isolatie en zuivering, een oorzaak kunnen zijn van een slechte correlatie van het insulinegehalte in het digest en de gezuiverde eiland-suspensie. Echter, eenzelfde ratio van de hoeveelheid insuline en het volume eilandjes, in zowel het pancreas, het digest, en de zuivere suspensies, toonde geen verlies van insuline uit de eilandjes. Bij histologisch onderzoek werden eveneens geen aanwijzingen gevonden voor de met insuline-verlies noodzakelijk gepaard gaande degranulatie van de  $\beta$ -cellen. Het relatief grote deel, kleine, eilandjes na isolatie wordt algemeen opgevat als een aanwijzing voor fragmentatie van eilandjes tijdens isolatie. Vergelijking van de grootte-verdeling van eilandjes in het pancreas, en na isolatie, liet echter eenzelfde aandeel kleine eilandjes zien, en wees ook — afgaande op de maximale, en gemiddelde, diameter van de eilandpopulaties — niet op fragmentatie.

Wij concluderen, dat de variabiliteit van de opbrengst, en grootte, van geïsoleerde eilandjes grotendeels kan worden toegeschreven aan de normale variatie van de eilandpopulatie van het pancreas. De effectiviteit van de isolatieprocedure werd het best gedocumenteerd door morfometrie, daar met

insulinemeting geen onderscheid gemaakt kon worden, tussen nog in het pancreasweefsel verblijvende eilandjes, dan wel vrije, geïsoleerde, eilandjes. Echter, de combinatie van morfometrie en insulinemeting gaf aan, dat wij het aandeel gevangen eilandjes hadden onderschat, tijdens het meten en tellen van de eilandjes; en leverde met de berekening van het insulinegehalte van eilandjes een extra maat ter bepaling van de integriteit van eilandjes. Wij stellen voor, dergelijk onderzoek ook bij humane eilandisolatie te verrichten, teneinde de analyse te vergemakkelijken, van andere factoren welke het resultaat van isolatie en transplantatie kunnen bepalen.

### **Preservatie in UWS tijdens eilandisolatie (Hoofdstuk 4)**

Na collagenasevertering van het pancreas, wordt de isolatie traditioneel voortgezet in een op fysiologisch-zout gebaseerde oplossing, zoals de Hanks oplossing (HBBS) en het RPMI kweekmedium, onder hypotherme omstandigheden — teneinde de verdere werking van collagenase en afbraakprocessen te vertragen. De mogelijk negatieve effecten van koude tijdens blootstelling van de cel aan een fysiologisch milieu — zoals opzwellen van de cel, en uiteindelijk beschadiging van de celwand, en afsterven van de cel — zijn overbekend binnen het onderzoek naar de optimale omstandigheden voor het bewaren van organen op ijs voorafgaande aan transplantatie. De University of Wisconsin oplossing (UWS) is in eerste instantie ontwikkeld om de bijwerkingen van hypothermie tijdens koude opslag van het pancreas tegen te gaan.

Wij veronderstelden, dat de UWS ook beter geschikt zou kunnen zijn voor isolatie van eilandjes, en vergeleken het resultaat na isolatie van eilandjes in de UWS en RPMI, en het uiteindelijk resultaat na de hieropvolgende scheiding van eilandjes en ander pancreasweefsel door centrifugering in dichtheidsgradiënten. Monsters afkomstig van het pancreas, het digest, en van de gradiënten, werden vergeleken m.b.v. morfometrie en amylase-extractie om de opbrengst aan eiland- en acinair weefsel, alsook de zuiverheid te bepalen. Het isolatiemedium had geen invloed op de opbrengst aan eilandjes vóór de zuivering, welke overeenkwam met 51% van de oorspronkelijke eilandmassa in het pancreas. In RPMI werd verlies van amylase (30%) en zwelling van de acinaire cellen waargenomen. Geen verlies van amylase, en lichte krimp van de acinaire cellen werden daarentegen waargenomen in de UWS. De veranderingen van het celvolume werden gereflecteerd door de dichtheid en levensvatbaarheid van de eilandjes en acini in de dichtheidsgradiënten.

Eerst werden conventionele, hyperosmotische, dichtheidsgradiënten van

dextraan in HBSS gebruikt voor zuivering van eilandjes — omdat hyperosmolariteit voor de zuivering essentieel gebleken is. De dichtheid van eiland- en acinair weefsel was hoger in de dextraangradiënt na isolatie in de UWS, in vergelijking met RPMI. Echter, de afwezigheid van acinair weefsel in de belangrijkste eilandjesfracties van de gradiënt na isolatie in UWS, en een overlappende dichtheid van eilandjes en acini na isolatie in RPMI, toonden aan dat de acinaire cel meer geneigd is tot zwelling in de fysiologische oplossing. Celscheiding in de dextraangradiënten resulteerde in 15% zuiverheid en 41% recovery van de in RPMI geïsoleerde eilandjes, en 93% zuiverheid en 52% recovery van de in UWS geïsoleerde eilandjes.

Ook de osmolariteit van de dichtheidsvloeistoffen zal de dichtheid van de cel en het resultaat van scheiding op dichtheid beïnvloeden. Teneinde de impact van de UWS op de regulatie van het celvolume en de dichtheid van eilandjes en acini duidelijk te kunnen aangeven, werd daarom de hyperosmotische dextraangradiënt vervangen door een nieuwe normo-osmotische dichtheidsgradiënt van Percoll in UWS. Scheiding op dichtheid in Percoll verbeterde de zuiverheid (99%) en opbrengst (74%) van de in UWS geïsoleerde eilandjes. Deze gegevens tonen aan, dat het impermeabele karakter van de bestanddelen van de UWS zowel noodzakelijk als voldoende is ter voorkoming van celzwelling, en ter verzekering van volledige zuivering in afwezigheid van hyperosmolariteit. Na isolatie in UWS bleek de basale- en glucose-gestimuleerde insulinesecretie door de gezuiverde eilandjes superieur. Electronenmicroscopie liet een goede conservatie van de ultrastructuur van alle eilandcellen zien, zowel na isolatie in UWS als RPMI — afgezien van enigszins gezwollen mitochondria na isolatie in de RPMI oplossing. Ook autotransplantatie van eilandjes in de hond was zowel succesvol na isolatie in UWS als RPMI.

Wij concluderen, dat de dichtheid en levensvatbaarheid van eiland- en acinair weefsel het best bewaard blijven door UWS in plaats van de conventionele op fysiologisch zout gebaseerde oplossingen te gebruiken voor isolatie en zuivering van eilandjes in de kou. Preventie van celzwelling gedurende hypotherme isolatie in UWS, en bijgevolg behoud van de levensvatbaarheid en het dichtheidsverschil van eilandjes en acini kan de reden zijn van de hogere opbrengst, vrijwel zuivere, eilandjes na scheiding op dichtheid. Aldus, kan door celzwelling te voorkomen tijdens eilandisolatie in UWS, (i) eenvoudiger gezocht worden naar andere variabelen welke het resultaat van eilandisolatie kunnen beïnvloeden — zoals gebeurtenissen welke nog voor het uitnemen van het orgaan plaatsvinden, en de omstandigheden waaronder het pancreas bewaard wordt — , en kan voorts (ii) de osmolariteit



en viscositeit van de dichtheidsgradiënten verder aangepast worden om dergelijke resultaten ook bij de mens te bereiken.

## **Glucoseregulatie na ductobliteratie (Hoofdstuk 5)**

Transplantatie van een deel van het pancreas, na opspuiting met een snel uithardende substantie als neopreen via de afvoergang van het pancreas (ductobliteratie van de segmentele pancreas) is een vaak toegepaste methode voor transplantatie van de eilandjes in de diabetische patiënt. De veiligheid van deze pancreastransplantatie techniek is het grootste voordeel, maar de lange-termijn glucoseregulatie is controversiëel. Fibrose, en reductie van de pancreasmassa tengevolge van het afsluiten van de afvoergang van het pancreas, worden benadrukt als de belangrijkste factoren bij de verslechtering van de glucoseregulatie in eerder onderzoek. Het in Hoofdstuk 5 behandelde onderzoek gaat in op de afzonderlijke en gecombineerde effecten van de transplantatie van een geductoblitereerd pancreassegment.

Het nuchtere, postprandiale, en i.v. glucose-gestimuleerde plasma- glucose, insuline, glucagon, pancreas polypeptide (PP), cholecystokinine (CCK), en het i.v. bombesine-gestimuleerde PP werden bestudeerd op drie achtereenvolgende tijdstippen in beagles, in een crossover-proefopzet: eerst 6 weken na ~70% pancreatectomie met behoud van een intacte, normale, exocriene drainage vanuit de duodenale restpancreas, vervolgens 2 weken na omzetting van de veneuze afvoer van de pancreashormonen naar de systemische bloedbaan, en tenslotte op 6 weken na in situ ductobliteratie van het restpancreas. Partiële pancreatectomie resulteerde in 50% reductie van de glucosetolerantie, en insulinerespons op intraveneuze glucosebelasting. Veneuze transpositie, met systemische afgifte van de pancreashormonen, wordt bij pancreastransplantatie verkozen om technische redenen. De perifere insulinespiegels verdubbelden bij veneuze transpositie, wat ongetwijfeld kan worden toegeschreven aan het omzeilen van de ~50% primaire extractie van insuline door de lever. Andere parameters werden niet dramatisch beïnvloed door deze ingrepen. De meest dramatische verandering van de glucoseregulatie trad op na de in situ ductobliteratie. Bij intraveneuze glucosebelasting ging een 50% gereduceerde glucosetolerantie vergezeld van een 50–70% reductie van respectievelijk de totale en acute insulinerespons. Ductobliteratie induceerde een chronisch verhoogde bloedglucose na overnacht vasten, en na de maaltijd (~8 mM). Nuchtere hormoonspiegels, en het postprandiaal glucagon, CCK, alsook — opmerkelijk — het postprandiaal insuline, werden niet beïnvloed. De postprandiale PP respons was ernstig gereduceerd, en een

PP-respons op bombesine bleef uit na ductobliteratie.

Hoewel overtuigend is aangetoond dat ductobliteratie interfereert met de endocriene functie, dient vooralsnog opgehelderd te worden hoe de glucoseregulatie beïnvloed wordt. De postprandiale 'normoinsulinemie' na ductobliteratie, in tegenstelling tot een gemiddeld 50% reductie van de door intraveneus glucose gestimuleerde insulinerespons kan worden verklaard door de verschillende stimuli bij deze testen, alsook door een postprandiale bijdrage van de entero-insulaire as. Daar ductobliteratie — met suppletie van de exocriene enzymen — geen effect had op de postprandiale CCK respons, en daar bekend is dat CCK een progressief stimulerend effect heeft op de insuline-afgifte bij stijging van de glucosespiegel, zou een postprandiaal hyperglycemisch versterkt insulinoatroop effect van CCK (of andere darmhormonen) mogelijk de oorzaak kunnen zijn van de normale- tot verhoogde insulinemie. Daar ductobliteratie het perifere, postprandiale, insuline kwantitatief niet beïnvloedde, terwijl de insuline-afgifte toch onvoldoende bleek met het oog op de hyperglycemie, en daar voorts ook de i.v. glucose gestimuleerde acute insulinesecretie gestoord was, lijkt de fijne regulatie van de insulinesecretie ontregeld. Bij eerder onderzoek was gebleken, dat ductobliteratie naast atrofie van het exocriene weefsel, ook ontwrichting van de normale architectuur van de eilandjes induceert. Met de huidige bevinding, dat na ductobliteratie ook geen PP respons op bombesine meer mogelijk is, lijkt ook intrinsieke denervatie van eilandjes een belangrijk gevolg van obliteratie — wat ondersteund wordt door de opmerkelijke daling van de acute insulinerespons. Daar ductobliteratie eenzelfde functioneel effect als denervatie van de  $\beta$ -cel en PP-cel laat zien, en ook de architectuur van de eilandjes ontwricht is, vermoeden wij dat door denervatie van de  $\beta$ -cellen de pulsatiele insulinesecretie afwijkt — wat de hyperglycemie bij een normale insulinespiegel zou verklaren. Hoewel pancreastransplantatie onvermijdelijk met extrinsieke denervatie gepaard gaat, zou de intrinsieke innervatie van de  $\beta$ -cel, en fijne regeling van de insulinesecretie mogelijk gespaard kunnen blijven na transplantatie van een niet-geoblitereerd pancreas.

### **Insulino trope eigenschappen van darmhormonen gedurende perifusie van geïsoleerde eilandjes (Hoofdstuk 6)**

De postprandiale afgifte en insulino trope werking van darmhormonen — welke "incretins" genoemd worden — wordt verantwoordelijk gesteld voor de bij voeding versterkte insulinerespons op glucose. Ons functieonderzoek in de hond suggereert dat het incretin effect — dat, normaal ruwweg de helft van de

insulinerepons op de maaltijd verzorgt — mogelijk 80–90% van de insulinerespons verzorgt bij milde postprandiale hyperglycemie na transplantatie van het pancreas en eilandjes. Insulinotrope effecten van fysiologische spiegels van de darmhormonen CCK (cholecystokinine), GIP (gastric inhibitory polypeptide), en GLP-1 (glucagon-like peptide-1) zijn aangetoond in vivo, en in vitro, in het geperfundeerde pancreas — maar effecten van fysiologische spiegels van deze peptiden op geïsoleerde eilandjes zijn nog niet duidelijk vastgesteld. Wij hebben daarom het insulinotroop effect van fysiologische spiegels van deze hormonen tijdens perifusie van kortdurend (2 dagen) gekweekte, geïsoleerde, honde-eilandjes onderzocht bij glucosespiegels zoals die worden waargenomen na eilandjestransplantatie. Dosis-respons studies met CCK en GIP tijdens perifusie bij een 7.5 mM glucosespiegel liet een tijdelijke insulinerespons op farmacologische CCK spiegels zien, en een dosis-afhankelijke respons op fysiologische tot farmacologische stimulatie met GIP. Bij perifusie met fysiologische spiegels CCK, GIP, en GLP-1 bij 2,5-7,5- en 10 mM glucose spiegels bleek geen effect van CCK, een 1,1 en 1,2-voudige GIP-versterkte insulinesecretie bij resp. 7,5 en 10 mM glucose, en reeds een maximum effect van GLP-1 vanaf 7,5 mM glucose, resulterend in een tweevoudig versterkte afgifte van insuline.

Farmacologische, maar niet fysiologische CCK spiegels stimuleerden de insuline-afgifte in ons model, in overeenstemming met recente in vivo studies in de hond en mens. Onze bevinding, dat fysiologische spiegels GIP en GLP-1 de glucose-gestimuleerde insulinesecretie versterken ondersteunt in vivo werk in de mens en experimenten met het geperfundeerde rattepancreas. GLP-1 was een aanzienlijk krachtiger incretin dan GIP in ons onderzoek. De waarneming dat GLP-1, in tegenstelling tot GIP, reeds effectief is bij een lage glucosespiegel steunt recente publicaties dat een (vrijwel) fysiologische dosis GLP-1, in tegenstelling tot GIP, effect heeft bij basale glycemie in de mens. Dit, en onze bevinding dat een maximum effect van GLP-1 eveneens bereikt werd bij een lagere glucosespiegel dan met GIP, draagt bij aan de overtuiging dat GLP-1 een belangrijk incretin is onder normale omstandigheden — bij euglycemie.

Bij eerder onderzoek waren — in tegenstelling tot onze bevindingen — farmacologische concentraties GIP en GLP-1 nodig om de insulinesecretie van geïsoleerde eilandjes te stimuleren. In onze experimenten, werden de eilandjes echter eerst 2 dagen gekweekt voorafgaande aan perifusie — wat lijkt aan te geven dat kortdurende kweek van groot belang is voor een effect van fysiologische stimulatie met deze hormonen. Geconcludeerd wordt dat geïsoleerde eilandjes kunnen reageren op fysiologische stimulatie van de  $\beta$ -cel met darmhormonen. De gegevens duiden erop dat CCK niet belangrijk is als

een incretin in de hond, en ondersteunen het idee dat GLP-1 een belangrijk incretin is bij euglycemie. Aan het fysiologisch belang van GIP bij euglycemie wordt algemeen getwijfeld, echter zowel GIP als GLP-1 kunnen bijdragen aan een hyperglycemische versterkte activering van de entero-insulaire as na transplantatie van het endocriene pancreas, en onder andere omstandigheden (zoals type-2 diabetes) waarbij hyperglycemie optreedt.

## **De functie en overleving van getransplanteerde eilandjes (Hoofdstuk 7)**

Er is nog relatief weinig onderzoek gedaan naar de kwaliteit van de glucoseregulatie door een transplantaat van geïsoleerde eilandjes. Daarom werd door ons de glucoseregulatie onderzocht na vasten, i.v. glucose, een gemengde maaltijd, en een i.v. arginine bolus bij een door glucose-infusie op 35 mM gehouden glucosespiegel, vóór de operatie en tot drie jaar na autotransplantatie van geïsoleerde eilandjes in de milt bij zes honden. Bovendien werd de pancreas polypeptide (PP) respons op i.v. insuline-geïnduceerde hypoglycemie gemeten — een vagaal gemedieerde stimulus — teneinde eventuele cholinergische reïnnervatie van het transplantaat te kunnen registreren.

De eilandddosis bij transplantatie varieerde van 1588–9065 eilandjes per kg lichaamsgewicht (gestandaardiseerde eilandjes met een 150  $\mu$ m diameter). Een ontvanger van slechts 1588 gezuiverde eilandjes per kg, werd binnen enkele dagen ernstig hyperglycemisch. Alle andere dieren ontvingen steeds meer dan 3000 eilandjes per kg (wat overeenkomt met >20% van de gemiddelde, normale, eilandmassa in het pancreas) door de zuiverheid van het transplantaat te variëren van ~5 tot 100%, wat resulteerde in een transplantaat-volume (sediment) van 14 tot <0,3 ml. Vier ontvangers van een transplantaat met een volume van minder dan 6 ml werden nuchter normoglycemisch binnen 2 weken. De ontvanger van een 14 ml transplantaat werd pas na 5 weken normoglycemisch. Microscopisch onderzoek van de milt toonde een normaal beeld in ontvangers van de ~100% zuivere transplantaten, maar uitgebreid lidtekenweefsel en een fibrotische reactie rond de eilandjes werden waargenomen bij onderzoek na falen van de onzuivere transplantaten. De insulinogene index (de verhouding van de insuline- en glucosespiegel 2 uur na de maaltijd) over de eerste maand na transplantatie voorspelde ( $r=0.99$ ) de tijd tot het functioneel falen van het transplantaat (6–175 weken). Bij functieonderzoek na 6 maanden in vier honden, bleken normale nuchtere spiegels voor glucose en de hormonen, met uitzondering van gereduceerde PP

spiegels. De door intraveneus glucose en arginine gestimuleerde insulinerespons was tot 15% van de preoperatieve waarden gereduceerd. Daarentegen werd een normale insulinerespons op de maaltijd waargenomen, zij het bij een matige hyperglycemie (~10 mM). Het postprandiaal glucagon en GIP waren verhoogd. Bij vergelijking na transplantatie, van de insuline respons op een maal en intraveneus arginine bleek eenzelfde — vrijwel maximale — stimulatie van het transplantaat door de maaltijd. Geen PP-respons op de i.v. insuline-geïnduceerde hypoglycemie werd waargenomen — wat wijst op uitblijven van cholinergische reïnnervatie.

Belangrijke factoren voor overleving van de geïsoleerde eilandjes in het autotransplantatie-model zijn de dosis en zuiverheid van het preparaat, en de metabole status van de ontvanger. De langdurige nuchtere normoglycemie na transplantatie van >3000 eilandjes per kg lichaamsgewicht bevestigt eerdere publicaties over de noodzakelijke drempeldosis eilandjes voor succesvolle autotransplantatie in de hond. Het belang van zuivering van een eiland-autotransplantaat is controversieel. Onze aanwijzingen, dat een kleiner transplantaatvolume gepaard gaat met een langere levensduur van het transplantaat, en dat fibrose beperkt blijft tot de gedeeltelijke gezuiverde transplantaten, ondersteunt het idee dat verontreiniging met acinair weefsel de ingroei en functie van eilandjes kan belemmeren. Het is bekend dat arginine bij een ~35 mM glucosespiegel de insulinesecretie maximaal stimuleert. Daar na eilandtransplantatie (i) een maaltijd minstens zo sterk de insulinesecretie stimuleerde als de arginine test op de maximale secretiecapaciteit, en (ii) de postprandiale insulinespiegel zowel van de insulinesecretie capaciteit afhangt, alsook van de dan heersende glucosespiegel, en (iii) ernstige hyperglycemie op zich tenslotte de directe aanleiding kan zijn voor het vroegtijdig falen van een transplantaat: is het niet verwonderlijk, dat er een sterke correlatie bleek van de postprandiale insulinogene index zoals gemeten gedurende de eerste maand na transplantatie, en de tijdsduur tot het falen van het transplantaat.

De postprandiale normo-insulinemie, in tegenstelling tot een ~85% gereduceerde insulinerespons op intraveneus glucose en -arginine in de autotransplantaten, kan zowel verklaard worden uit de verschillende stimuli bij deze testen, alsook door een postprandiale bijdrage van de entero-insulaire as. Onze recente in vitro perifusiestudies toonden aan, dat fysiologische spiegels — zoals die in plasma worden gemeten — van de insulintrope darmhormonen GIP en GLP-1 de glucose-gestimuleerde insulinesecretie stimuleren tijdens perifusie van geïsoleerde honde-eilandjes. En daar het postprandiale GIP (hoog-) normaal was na eilandtransplantatie, zou de normo-insulinemie goed verklaard kunnen worden als het gevolg van een

postprandiaal hyperglycemisch-versterkte activering van de entero-insulaire as.

Hoewel postprandiale hyperglycemie, zoals boven beschreven, de normo-insulinemie zou kunnen verklaren, dienen deze glucose-afwijkingen nog verklaard te worden. Naast een gereduceerde  $\beta$ -cel massa, kan zowel een ontregelde insulinesecretie als een PP-gebrek mede tot de verminderde glucosetolerantie geleid hebben. Ten eerste, is de geheel of grotendeels cholinergisch-gemedieerde pre-absorptieve insulinerespons — waarvan het belang voor de postprandiale glucosetolerantie vaststaat — afwezig of drastisch beperkt, daar cholinergische reïnnervatie van de transplantaten uitbleef, zoals bleek uit de afwezigheid van een PP-respons op hypoglycemie. Ten tweede, is eerder uit onderzoek door anderen gebleken, dat de periodiciteit van pulsatiele insulinesecretie door geïsoleerde eilandjes afwijkt van normaal — wat volgens in vivo onderzoek tot insulineresistentie en glucose-intolerantie leidt. Tenslotte, is uit eerder onderzoek met exogene PP-toediening in PP-deficiënte diermodellen gebleken dat de postprandiale PP-respons van belang kan zijn voor een remmend effect van insuline op de glucoseproductie door de lever.

Geconcludeerd wordt, dat zowel de eilanddosis, de zuiverheid van het transplantaat, en de resulterende bloedglucosespiegel op zich, de transplantaatoverleving mede kunnen bepalen. De maaltijdtest bleek zowel de insulinesecretiecapaciteit, de levensverwachting van het transplantaat, alsook de kwaliteit van de glucoseregulatie goed te documenteren. Een postprandiaal door hyperglycemie versterkt insulinoïd effect van GIP en andere darmhormonen zou een goede verklaring kunnen geven voor het opmerkelijke verschil van de insulinerespons op intraveneus glucose en een maaltijd; en zowel een verminderde insulinesecretiecapaciteit, een ontregelde pulsatiele insuline-afgifte, alsook een PP-gebrek kunnen bijgedragen hebben tot de matige postprandiale hyperglycemie. De oorzaak van het spontaan functioneel falen van een transplantaat na enkele jaren, in dit en ander onderzoek, is onduidelijk, maar verwacht wordt dat grotere doses gezuiverde eilandjes de transplantaatoverleving zullen verlengen.

### **Insulinesecretiecapaciteit, insulinewerking, en de entero-insulaire as na eilandtransplantatie (Hoofdstuk 8)**

Ons eerder onderzoek suggereerde, dat na eilandtransplantatie zowel een gereduceerde insulinesecretiecapaciteit — als gevolg van een subnormale eilanddosis — alsmede een verminderde insulinewerking — door een

ontregelde neuraal-gemedieerde fijne regulatie van de insulinesecretie — kan leiden tot postprandiale hyperglycemie. De vraag naar de relatieve bijdrage van de insulinesecretiecapaciteit (ISC) en de insulinerwerking bij de postprandiale glucoseregulatie, bleef nog onbeantwoord. Voorts veronderstelden wij, dat de normo-insulinemische respons van het transplantaat op de maaltijd, in tegenstelling tot een hypo-insulinemische respons op intraveneuze belasting, eerder dient te worden toegeschreven aan stimulering van de entero-insulaire as, dan aan een effect van de hyperglycemie op zich. GLP-1 (glucagon-like peptide-1 7–36amide) wordt momenteel beschouwd als de mogelijk belangrijkste insulintrope darmfactor in de entero-insulaire as, en van GLP-1 en andere darmhormonen, zoals GIP (gastric inhibitory polypeptide), is bekend dat de potentiëring van de glucose-gestimuleerde insulinesecretie versterkt wordt bij stijging van de heersende glucosespiegel. Eerder toonden wij aan dat fysiologische spiegels GIP en, vooral, GLP-1 de insulinesecretie van pas geïsoleerde (kortdurend gekweekte) honde-eilandjes versterken, tijdens in vitro perifusie bij glucosespiegels zoals die postprandiaal worden waargenomen na eilandjestransplantatie. Vooralsnog echter, zijn nog geen in vivo effecten van darmhormonen na transplantatie van geïsoleerde eilandjes gepubliceerd.

Wij hebben daarom (i) de insulinesecretiecapaciteit (ISC) op een i.v. arginine bolus bij een 35 mM glucosespiegel, (ii) de insulinerwerking gedurende euglycemische insuline-infusie, en (iii) fysiologische maaltijdstimulatie onderzocht in 8 honden op 6 maanden na autotransplantatie van gezuiverde eilandjes in de milt, in vergelijking met 30 normale honden. Na transplantatie werd de entero-insulaire as onderzocht door een vrijwel-fysiologische infusie van GLP-1 tijdens glucose-infusie tot een ~8.5 mM spiegel — vergelijkbaar met de 8–9 mM postprandiale glycemie welke in de eilandjes-ontvangers werd waargenomen. De dosis getransplanteerde eilandjes kwam gemiddeld overeen met ca. 25% van de normale eilandmassa in het pancreas, en de zuiverheid van het eilandjespreparaat bedroeg ~70%. Na transplantatie was de ISC gemiddeld ~25% van de controlewaarden. De postprandiale insulinerespons was, daarentegen, na transplantatie toegenomen tot 140% — zij het dat ook de postprandiale glucose toenam tot ~8.5 mM. Na transplantatie nam de insulinerwerking gemiddeld met 45% af. In de getransplanteerde honden werd een significante negatieve correlatie tussen de ISC en zowel de postprandiale glucosetename ( $r = 0.9$ ) alsook de insulinerwerking ( $r = 0.7$ ) waargenomen. Infusie van GLP-1 verhoogde (175%) de insulinespiegel bij een 8.5 mM glucosespiegel.

Het is bekend dat de intraveneuze argininetest — onder vergelijkbare

hyperglycemische omstandigheden — een vrijwel maximale stimulatie van de  $\beta$ -cel bewerkstelligt, en dat deze ISC-test ook een gevoelige maat levert voor de reductie van de  $\beta$ -cel massa, in andere modellen. De gemiddeld vergelijkbare afname van de eilandmassa na autotransplantatie en de insulinesecretiecapaciteit, tot ~25% van normale waarden, wees erop dat de ISC ook een goede indicatie van de eilandmassa in ons model geeft. De insulinemie tijdens de ISC-en maaltijdtest was vergelijkbaar na transplantatie; wat er op wijst dat de getransplanteerde  $\beta$ -cellen ook vrijwel maximaal werden gestimuleerd na de maaltijd. Deze conclusie wordt verder onderbouwd door de (negatieve) correlatie van de insulinesecretiecapaciteit versus de postprandiale glucosetoeename. Deze gegevens bevestigen en completeren onze eerdere publicaties over het opmerkelijke verschil tussen de insulinerespons op intraveneuze glucose en een maaltijd — zowel na eilandtransplantatie, als na de in vivo functionele isolatie van eilandjes als gevolg van obliteratie van de afvoergang van het pancreas.

De insulinespiegels verdubbelden bijna gedurende GLP-1 infusie in onze getransplanteerde dieren; en eerder onderzoek toont aan, dat eenzelfde GLP-1 dosis minder insulinoatroop is onder milder hyperglycemische omstandigheden in normale honden. Daarom wordt geconcludeerd, dat een hyperglycemisch-versterkt insulinoatroop effect van GLP-1 — en waarschijnlijk eveneens andere insulino trope hormonen zoals GIP — grotendeels de hyperinsulinemische respons op de maaltijd na eilandtransplantatie kunnen verklaren.

Postprandiale hyperglycemie kan, zoals boven aangegeven, de postprandiale insulinemie verklaren — vervolgens dienen wij nog een verklaring te vinden voor het feit dat de insulinesecretie nochtans onvoldoende bleek om normale glucosespiegels te bewerkstelligen. Het is zondermeer duidelijk dat de afnomen insulinerwerking heeft bijgedragen aan de postprandiale hyperglycemie. De correlatie van de insulinesecretiecapaciteit van de transplantaten met zowel de postprandiale glucosetoeename en de insulinerwerking in de getransplanteerde dieren, gaf aan dat de  $\beta$ -cel massa van de transplantaten de meest bepalende factor voor glucose-intolerantie was. Deze data steunen eerder onderzoek in dieren met een gedeeltelijk verwijderd pancreas, en patiënten met recent-vastgestelde insuline-afhankelijke diabetes, dat suggereert dat een verminderde insulinesecretiecapaciteit gepaard gaat met insulineresistentie en dat de resistentie zelfs toeneemt met een verdere afname van de secretiecapaciteit. Naast een verminderde insulinesecretiecapaciteit, kan ook een veranderd insulinesecretiepatroon als gevolg van het ontbreken van de fijne neurale regeling van de afgifte van insuline door de geïsoleerde eilandjes geleid hebben tot een verslechterde glucosetolerantie en insulineresistentie in



de getransplanteerde dieren. Ten eerste, is de geheel of gedeeltelijk neuraal gemedieerde pre-absorptieve insulinerespons belangrijk voor de postprandiale glucosetolerantie, en afwezig of gereduceerd na transplantatie van geïsoleerde eilandjes. Ten tweede, is aangetoond dat na isolatie van eilandjes de pulsatiele insulinesecretie ontregeld is — en bekend is, dat dit tot insulineresistentie leidt.

Wij concluderen, dat een verminderde  $\beta$ -cel massa en ook een kwalitatief mindere insulinesecretie kunnen bijdragen aan insulineresistentie en een milde postprandiale hyperglycemie na eilandtransplantatie. De verminderde  $\beta$ -cel massa leek de belangrijkste oorzaak van deze afwijkingen. De insulintrope effecten van GLP-1 en waarschijnlijk ook andere darmhormonen lijken grotendeels verantwoordelijk voor het opmerkelijke verschil van de insuline respons na intraveneuze en orale belasting. Aldus, zouden na transplantatie van een suboptimale dosis eilandjes, afwijkingen van het postprandiale bloedglucose waarschijnlijk grotendeels worden beperkt door een, met een stijgende glucosespiegel tevens actiever wordende, entero-insulaire as — wat tot maximale stimulatie van de insulinesecretie, en uiteindelijk mogelijk tot definitief falen van het transplantaat kan leiden. Transplantatie van een grotere eilandmassa moet langdurige vrijwel-normale glucoseregulatie mogelijk maken.

## Conclusies en toekomstverwachtingen

De afgelopen jaren heeft men zich veel inspanning getroost om transplantatie van eilandjes in de praktijk te brengen. Zoals in de introductie werd opgemerkt, is de haalbaarheid van deze techniek in de mens aangetoond, maar de hindernissen welke klinisch succesvolle toepassing op grote schaal in de weg staan zijn vrijwel hetzelfde als bij de eerste experimenten in ratten — twintig jaar geleden — namelijk: de isolatietechniek en afstoting [1]. Verbetering van de techniek van isoleren is nodig om consistent, voldoende, en ook voldoende zuivere, eilandjes voor transplantatie te kunnen verkrijgen. Bovendien, hoewel een nauwkeurige glucoseregulatie in het vaandel van eilandjestransplantatie staat, is eigenlijk nog maar weinig aandacht besteed aan de haalbare kwaliteit van de metabole controle na transplantatie van geïsoleerde eilandjes [2, 3]. Dit proefschrift handelt over enige technische aspecten van de isolatieprocedure, en de glucoseregulatie na eilandtransplantatie in de hond. Een autotransplantatie-model werd gekozen, om de storende neveneffecten van afstoting en immunosuppressieve medicijnen te vermijden [3–5].

Het onderzoek met betrekking tot technische aspecten van de isolatie,

bestaat enerzijds uit een studie van de oorzaken van de gewoonlijk extreme variatie van de resultaten met betrekking tot de opbrengst, integriteit, en zuiverheid van de eilandjes na isolatie; en introduceert anderzijds nieuwe methoden, ter verklaring en vermindering van deze variabiliteit — welke niet slechts klinische toepassing, maar ook technologische vernieuwing in de weg staat. In ons onderzoek kon het merendeel van de variabiliteit van de resultaten toegeschreven worden aan reeds bij de donor aanwezige variabiliteit — vóór de isolatieprocedure. Donor-gerelateerde variabelen zoals lichaamsgewicht, leeftijd, en — opmerkelijk — een drievoudige variatie in het eilandgehalte van het pancreas verklaarde de helft van de variabiliteit van onze resultaten na isolatie. Bepaling van de effectiviteit van isolatie van eilandjes door morfometrie zou daarom onderzoek naar andere factoren welke een rol kunnen spelen bij het uiteindelijke resultaat, eenvoudiger en minder kostbaar kunnen maken. Voorts — in tegenstelling tot de vrij algemene opvatting dat fragmentatie van eilandjes bij isolatie in grote zoogdieren helaas onvermijdelijk is — werd morfometrisch aangetoond dat eilandjes vrijwel intact geïsoleerd kunnen worden — tenminste in de hond, door een zachtaardige isolatietechniek te gebruiken. Door naast morfometrie ook de insuline-opbrengst te meten — als een mogelijk eenvoudig alternatief ter bepaling van de effectiviteit van isoleren — kon worden aangetoond dat deze biochemische methode niet voldoet, omdat zo geen onderscheid gemaakt kan worden tussen enerzijds eilandjes welke schoon (zonder aanhangend exocrien weefsel) geïsoleerd zijn, en anderzijds eilandjes welke gevangen blijven in nog onverteerde brokken pancreasweefsel. Echter, door beide meetmethoden toe te passen, kwam deze waardevolle informatie boven water, en kon ook behoud van het insuline-gehalte van de eilandjes tijdens isolatie worden aangetoond.

Spannender, was de vondst — door serendipiteit — van het effect van de UWS als isolatievloeistof op de dichtheid van het weefsel en de zuivering van eilandjes in een dichtheidsgradiënt. De mogelijk nadelige effecten van het koud houden van weefsel — uiteraard bij uitstek bekend terrein bij orgaanpreservatie onderzoek — waren nog onbekend binnen het eilandjes-isolatie onderzoek. Ons verder onderzoek naar het voordeel en de werking van UWS tijdens isolatie en zuivering van eilandjes in dichtheidsgradiënten, bevestigde de veronderstelling, dat consistente, vrijwel volledige zuiverheid het gevolg moet zijn, van het tegengaan van celzwellings — wat tijdens het verwerken van weefsel in de kou bevordert wordt, door het werken in een traditionele oplossing gebaseerd op fysiologisch zout. Bovendien bleek, dat zo ook een hogere opbrengst aan levensvatbare eilandjes bereikt werd. Geconcludeerd wordt, dat zo tenminste onder experimentele omstandigheden

de problemen met betrekking tot het zuiveren van geïsoleerde eilandjes (zoals inconsistente zuiverheid, en verlies van eilandjes) vrijwel zijn opgelost. Hierbij dient wel te worden opgemerkt, dat de bijkomende problemen rond het verkrijgen en bewaren van menselijke organen omzeild werden in ons hondemodel. Echter, een eerste verkenning suggereerde dezelfde grote voordelen van het werken in de UWS bij isolatie van humane eilandjes [6, 7], en eveneens uitgesproken betere resultaten bij vervanging van een fysiologische isolatie-oplossing door UWS tijdens humane eilandisolatie, werden recent gerapporteerd door de Leicester groep [8]. De meeste groepen zijn inmiddels overgegaan op het gebruik van de UWS voor isolatie van eilandjes uit het pancreas van de mens en dieren [8–18], of, zijn de EuroCollins preservatievloeistof gaan gebruiken voor isolatie [19, 20], en zuivering [21]. Een betere beheersing van de omstandigheden tijdens isolatie, door werken in de UWS, maakt het eenvoudiger om andere factoren welke van invloed kunnen zijn op het uiteindelijk resultaat, op te sporen en te beheersen. Momenteel lijkt het voorkómen en terugdringen van celzwellings tijdens isolatie en zuivering van eilandjes de belangrijkste bijdrage van een preservatievloeistof. Wij hebben eerder al — voor zover bekend, voor het eerst — er de aandacht op gevestigd, dat de handige (commercieel verkrijgbare) FSD (Ficoll-natrium-diatrizoaat) dichtheidsgradient — welke met andere contrastmiddelen reeds de voorkeur geniet bij celzuivering binnen andere onderzoeksgebieden — een anion bevat met een hoog molecuulgewicht, dat zoals het 'impermeant' lactobionate in de UWS vrijwel onmogelijk het celmembraan passeert en evenals de UWS celzwellings zou helpen voorkomen [7]. Onze eerste, voorlopige, ervaring met deze eenvoudige zeer efficiënte (~100% zuiverheid, en 80% opbrengst) zuiveringstechniek, waarbij van slechts één (1.119 g/ml) FSD dichtheidsoplossing gebruik gemaakt werd, wordt bevestigd door ons recente werk in varkens (niet gepubliceerde gegevens) en recent publicaties van anderen [22, 23]. Waarschijnlijk zal een combinatie van eilandisolatie in een orgaan-bewaarvloeistof, met zuivering in FSD of een soortgelijke oplossing de komende jaren een standaard methode worden. Andere belangrijke onderwerpen op het gebied van de orgaanpreservatie, zoals een hoge buffercapaciteit van de bewaarvloeistof om acidose van het weefsel te voorkomen [24] en eventuele toevoeging van stoffen welke mogelijk vrije radicalen wegvangen, of op andere wijze de cel beschermen zoals — misschien door 'coating' — polyethyleen glycol [25, 26] kunnen in de toekomst mogelijk ook waardevol blijken bij isolatie van eilandjes. Momenteel is er grote behoefte aan het ontwerp van een gemodificeerde UWS welke zowel geschikt is tijdens de warme (fysiologische) en koude omstandigheden, welke onvermijdelijk,

afwisselend, optreden tijdens het uithalen en bewaren van het pancreas, de vertering met collagenase bij  $\sim 37^{\circ}\text{C}$ , en verdere isolatie, zuivering, en opwarmingsstappen — alsook, bij voorkeur, tijdens een eventuele cryopreservatie-procedure. Momenteel dienen meestal nog verschillende oplossingen tijdens deze verschillende fasen gebruikt te worden, en de verschillende oplossingen zijn moeilijk tijdig en volledig uit te wisselen, en bovendien waarschijnlijk ongeschikt tijdens overgangsfasen van de temperatuur. Cel- en orgaan-preservatieonderzoek met oplossingen op basis van fysiologische concentraties natrium en kalium, in plaats van de omgekeerde concentratie-verhouding van deze kationen in de standaard UWS [26–28], en ook de gegevens met op een fysiologische natriumconcentratie gebaseerde FSD-oplossingen, wijzen erop dat de concentraties van deze kationen ook niet cruciaal zijn voor de celvolume-regulatie bij eilandisolatie. Overgaan op een fysiologische  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  verhouding is waarschijnlijk de eerste stap in de juiste richting bij het ontwerp van een op lactobionate gebaseerde 'basale' UWS, welke zowel onder warme als koude omstandigheden tijdens eilandisolatie gebruikt kan worden.

Onze eerste aanwijzingen, dat de isolatie van eilandjes een nadelig effect op de glucoseregulatie kan hebben, werden verkregen in een onderzoek naar de effecten van ductobliteratie van het pancreas. De overlevende eilandjes na door ductobliteratie geïnduceerde atrofie van het exocriene pancreas — zijn niet slechts anatomisch geïsoleerd van het exocriene weefsel, maar raken ook intrinsiek gedenerveerd. De relatieve bijdrage van een kwantitatief geringere insulinesecretiecapaciteit als gevolg van verlies van eilandjes enerzijds, en nadelige kwalitatieve effecten als gevolg van de denervatie en ontwrichting van de eilandarchitectuur na obliteratie anderzijds, is vooralsnog onopgehelderd. Hoe dan ook — het opmerkelijke verschil tussen een kwantitatief normale insulinerespons op de maaltijd, en een sterk gereduceerde respons op intraveneuze glucosebelasting, gaf aan dat insulintrope darmhormonen een belangrijke rol kunnen spelen bij de glucoseregulatie onder de mild hyperglycemische omstandigheden zoals die na transplantatie van het pancreas en eilandjes worden waargenomen. De entero-insulaire as werd daarom gedetailleerd onderzocht bij het volgende in vitro en in vivo onderzoek met geïsoleerde eilandjes.

Bij eerder onderzoek naar een direct insulintroop effect van darmhormonen op geïsoleerde eilandjes door anderen, werden eerder farmacologische dan fysiologische concentraties van de potentiële 'incretins' (d.w.z. onder fysiologische omstandigheden insulintrope darmhormonen) gerapporteerd. Daarom werd door ons na een verkennend dosis-respons

onderzoek, eerst in vitro — in perifusie experimenten — het directe effect van fysiologische concentraties GIP en met name GLP-1 op vers geïsoleerde eilandjes aangetoond. Vervolgens werd in vivo aangetoond — door infusie van een lage dosis GLP-1 tijdens een glucose-infusie welke de glucosespiegel op het niveau hield dat postprandiaal resulteerde na eilandtransplantatie — dat GLP-1 ook op lange-termijn na transplantatie van de geïsoleerde eilandjes nog een insulinoatroop effect kan uitoefenen na de maaltijd. Deze gegevens tonen vrijwel zeker aan, dat de hormonale tak van de entero-insulaire as het belangrijkste fysiologische controlemechanisme is bij de glucoseregulatie na eilandtransplantatie.

Een andere interessante conclusie uit het functieonderzoek was, dat postprandiale hyperglycemie tot een chronische vrijwel-maximale druk op de insulinesecretiecapaciteit van de transplantaten leidt, voor zover deze uit een duidelijk subnormale eilandmassa bestaan — wat dan aanleiding zou kunnen zijn tot functioneel falen van het transplantaat. Deze data impliceren, dat blootstelling van intraportaal getransplanteerde eilandjes — de voorkeurslocatie bij klinisch transplantatie — aan de intraportaal hoge spiegels van voedingsstoffen en darmhormonen — naast de eveneens hoge intraportale spiegels van immunosuppressieve medicijnen en toxische voedingsbestanddelen — kan bijdragen tot het eerder falen na transplantatie in de lever [3, 29–31]. Het onvoldoende volume eilandjes, en het tamelijk geïsoleerd functioneren van getransplanteerde eilandjes, mede door uitblijven van (cholinergische) reïnnervatie, droeg bij aan een gestoorde insulinesecretie, glucosetolerantie, en insulinerwerking. Reeds vanaf het ductobliteratieonderzoek werd steeds door ons de nadruk gelegd op een verminderde insulinerwerking als gevolg van gestoorde pulsatiele insulinesecretie door intrinsieke denervatie van de eilandjes, als een mogelijk belangrijke oorzaak van het optreden van postprandiale hyperglycemie. De huidige gegevens wijzen er echter eerder op, dat de eiland-dosis de belangrijkste bepalende factor is voor de glycemie, en de insulinerwerking. Nochtans, zou insulineresistentie op zich de doorslag kunnen geven voor het al-dan-niet kunnen functioneren van de ruwweg in een drempeldosis getransplanteerde eilandjes — welke ongeveer overeenkwam met 25% van de normale eilandmassa in het pancreas. Deze bevindingen onderstrepen het belang van streven naar een optimale metabole controle in type-1 diabetische ontvangers van een eilandtransplantaat, zoals onlangs naar voren werd gebracht door de Giessen groep [32], en ook werd afgeleid uit de gegevens van de internationale registratie van klinische resultaten (Islet Transplant Registry te Giessen). De verzamelde gegevens in deze databank suggereren, dat perifere

insulineresistentie het optreden van insuline-onafhankelijkheid in veel type-1 ontvangers van allo-getransplanteerde eilandjes verhinderd — als een mogelijke verklaring voor de insuline-onafhankelijkheid één jaar na transplantatie bij 23% van de IDDM-ontvangers versus 43% van de patiënten welke eilandjes ontvingen ter voorkoming van diabetes secundair aan pancreatetectomie ten tijde van de transplantatie [33].

## Literatuur

1. Hering BJ, Browatzki CC, Schultz A, Bretzel RG, Federlin KF: Clinical islet transplantation — registry report, accomplishments in the past and future research needs. *Cell Transplant* 2: 269–282, 1993
2. Van der Burg MPM, Gooszen HG: The metabolic efficiency of islet grafts: an overview. In *Islet transplantation — current status of clinical application and experimental results.* Hesse UJ, Pichlmaier H, Eds. Lengerich, Germany, Wolfgang Pabst Verlag, 1992, p. 93–99
3. Luzi L, Secchi A, Pozza G: Metabolic assessment of posttransplant islet function in humans. In *Pancreatic islet cell transplantation.* Ricordi C, Ed. Austin, Landes Company, 1992, p. 361–382
4. Alejandro R, Mintz DH: Effect of cyclosporine and FK506 on insulin secretion in normal dogs and dogs with intraportal islet cell autografts. In *Pancreatic islet cell transplantation.* Ricordi C, Ed. Austin, Landes Company, 1992, p. 352–360
5. Van Schilfgaarde R, Van der Burg MPM, Van Suijlichem PTR, Frölich M, Gooszen HG, Moolenaar AJ: Interference by cyclosporine with the endocrine function of the canine pancreas. *Transplantation* 44: 13–16, 1987
6. Van der Burg MPM, Guicherit OR, Prins FA, Scherft JP, Frölich M, Gooszen HG: Percoll in UW: efficient iso-osmotic canine and human islet purification. *3<sup>d</sup> International Congress on Pancreatic and Islet Transplantation, Symposium on Artificial Insulin Delivery Systems*, Lyon, 1991
7. Van der Burg MPM, Guicherit OR, Frölich M, Bruijn JA, Gooszen HG: Islet preservation during isolation: a new concept in cell transplantation. *Transplant Proc* 24: 2840–2841, 1992
8. Robertson GSM, Chadwick D, Contractor H, Rose S, Chamberlain R, Clayton H, Bell PRF, James RFL, London NJ: Storage of human pancreatic digest in University of Wisconsin solution significantly improves subsequent islet purification. *Br J Surg* 79: 899–902, 1992
9. Gray DWR, Leow CK: Non-automated methods for islet isolation. In *Pancreatic islet cell transplantation.* Ricordi C, Ed. Austin, Landes Company, 1992, p. 89–98
10. Altman JJ, Race JM, Legrelle M, Drevillon C, Bethoux JP, Chapa O, Cugnenc PH: Islet graft in man: influence of site and cotransplantation. In *Pancreatic islet cell transplantation.* Ricordi C, Ed. Austin, Landes Company, 1992, p. 434–438
11. Arbet-Engels C, Darquy S, Capron F, Reach G: Use of intracellular solution (University of Wisconsin) for all steps of the isolation of pancreatic islets. *Transplant Proc* 24: 2791, 1992
12. Kerr-Conte J, Pattou F, Hober C, Ple A, Riquier M, Proye C, Lefebvre J: Induction of cerebral death in slaughterhouse pigs facilitates pancreas harvesting for islet isolation. *Transplant Proc* 26: 614–615, 1994
13. Mellert J, Hering BJ, Hopt UT, Pfeffer F, Bretzel RG, Brandhorst H, Hessmer I, Klitscher D, Federlin K: Functional outcome after porcine islet autotransplantation beneath the kidney capsule and into the portal vein. *Transplant Proc* 26: 682–683, 1994

14. Robertson GSM, Chadwick D, Contractor H, Thirdborough S, Bell PRF, James RFL, London NJM: Improvements in human islet purification by inclusion of a colloid in cold storage solutions. *Transplant Proc* 26: 644–644, 1994
15. Brandhorst D, Hering BJ, Brandhorst H, Kirchoff N, Dzapo V, Federlin K, Bretzel RG: Dietary treatment with soybean oil improves porcine islet culture and reduces islet immunogenicity. *Transplant Proc* 26: 613–613, 1994
16. Kenmochi T, Miyamoto M, Nakagawa Y, Une S, Benhamou PY, Mullen Y: Improved yield and survival of porcine islets with basic UW solution (Abstract). *Cell Transplant* 3: 244–244, 1994
17. Korbitt GS, Pipeleers DG: Cold-preservation of pancreatic beta cells. *Cell Transplant* 3: 291–297, 1994
18. Casanova D, Ramos C, Mendez I, Rodriguez A, Herrera L, Perojo I, Amado JA: Cold storage preservation with University of Wisconsin solution of the pancreatic gland combined with islets in a dog model. *Transplant Proc* 24: 1021–1022, 1992
19. Behboo R, Carroll PB, Ukah F, Gao W, Kirsch D, Dedousis N, Phipps J, Ricordi C: One-hour of hypothermic incubation in Euro-Collins improves islet purification. *Transplant Proc* 26: 645–645, 1994
20. Giannarelli R, Marchetti P, Villani G, di Carlo A, Andreozzi M, Cosimi S, Cruschelli L, Masiello P, Coppelli A, Navalesi R: Preparation of pure, viable porcine and bovine islets by a simple method. *Transplant Proc* 26: 630–631, 1994
21. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, Marchetti P, Gingerich RL, Jaffe AS, Cryer PE, Anderson CB, Flye MW: Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes* 39: 515–518, 1990
22. Ansara MF, Saudek F, Newton M, Raynor AC, Cryer PE, Scharp DW: Pancreatic islet transplantation prevents defective glucose counter-regulation in diabetic dogs. *Transplant Proc* 26: 664–665, 1994
23. Villani G, Marchetti P, Giannarelli R, Cruschelli L, Andreozzi M, Cosimi S, Navalesi R: Comparison of different digestion techniques and density gradient purification procedures to prepare viable pancreatic islets from market age pigs. *Transplant Proc* 26: 621–622, 1994
24. Sumimoto R, Kamada N, Jamieson NV, Fukuda Y, Dohi K: A comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and eurocollins for rat liver preservation. *Transplantation* 51: 589–593, 1991
25. Marsh DC, Lindell SL, Fox LE, Belzer FO, Southard JH: Hypothermic preservation of hepatocytes. *Cryobiology* 26: 524–534, 1989
26. Daniel MR, Wakerley CL: Factors influencing the survival of cell monolayers during storage at 4°C. *Br J Exp Path* 57: 137–147, 1976
27. Ploeg RJ, Goossens D, Sollinger HW, Southard JH, Belzer FO: Preservation of the dog pancreas using the UW solution with a high-sodium and low-potassium content. *Transplantation* 47: 940, 1989
28. Urushihara T, Sumimoto R, Sumimoto K, Jamieson NV, Ito H, Ikeda M, Fukuda Y, Dohi K: A comparison of some simplified lactobionate preservation solutions with standard UW solution and EuroCollins solution for pancreas preservation. *Transplantation* 53: 750–754, 1992
29. Alejandro R, Mintz DH: Experimental and clinical methods of islet transplantation. In *Transplantation of the endocrine pancreas in diabetes mellitus*. Van Schilfgaarde R, Hardy MA, Eds. Amsterdam, Elsevier Science, 1988, p. 217–223
30. Suzuki K, Aoyagi K, Ogawa Y, Katayama Y, Abe Y, Tazawa Y, Ishigame M, Kimura M, Takebe K: Recurrence of diabetes in a short time after intraportal but not spleen

- subcapsular islet transplantation in rats. *Transplant Proc* 26: 684, 1994
31. Warnock GL, Ao Z, Cattral MS, Dabbs KD, Rajotte RV: Experimental islet transplantation in large animals. In *Pancreatic islet cell transplantation*. Ricordi C, Ed. Austin, Landes Company, 1992, p. 261–78
  32. Hering BJ, Bretzel RG, Hopt UT, Brandhorst H, Brandhorst D, Bollen CC, Raptis G, Helf F, Grossmann R, Mellert J, Ernst W, Scheuermann EH, Schoeppe W, Rau W, Federlin K: New protocol toward prevention of early human islet allograft failure. *Transplant Proc* 26: 570–571, 1994
  33. Hering BJ, Browatzki CC, Schultz AO, Watz B, Bretzel RG, Federlin K: Islet Transplant Registry. *ITR Newsletter* No. 5 Vol.4 (No.1), Giessen, Germany, 1994



