



Einfluß der Kulturbedingungen vor Transplantation auf lokale Zytokin Transkripte nach allogener Inseltransplantation

El-Ouaghli A, Jahr H, Pfeiffer G, and Bretzel RG

3. Medizinische Klinik und Poliklinik, Justus-Liebig-Universität Gießen



EINLEITUNG

Bei der allogenen Transplantation Langerhansscher Inseln ist die Anzahl der anwachsenden Inseln entscheidend für den Transplantationserfolg, nicht die Anzahl der transplantierten Inseln. In Nagermodellen lag die Rate für Engraftment und Überleben der transplantierten Inseln nur bei 25-50%. Die Kulturbedingungen vor Transplantation können eine wichtige Rolle für das frühe Engraftment der Inseln spielen. Stressresistenz und Funktion der Inseln *in vitro* konnten durch einen Tag Kultur bei 37°C im Vergleich zu 22°C Kultur oder frischen Inseln verbessert werden. Im Gegensatz dazu zeigten einige *in vivo* Modelle ein verlängertes Transplantatüberleben nach Transplantation von frisch präparierten oder 22°C kultivierten Inseln verglichen mit 37°C kultivierten Inseln. Zur Erklärung dieser Diskrepanz stellten wir die Hypothese auf, daß 37°C kultivierte Inseln *in vivo* eine stärkere lokale Produktion proinflammatorischer Zytokine induzieren. Lokal sezernierten proinflammatorischen Zytokinen wird eine wichtige Rolle bei der frühen Zerstörung von allogenen transplantierten Inseln zugeschrieben.

Unser Ziel war daher, den Einfluß der Kulturbedingungen vor Inseltransplantation auf die Zytokin mRNA Expression nach Inseltransplantation im allogenen Rattenmodell lokal am Transplantationsort zu bestimmen.

MATERIAL UND METHODEN

Lewis-Ratteninseln wurden mittels Kollagenasedigestion und Gradientenzentrifugation präpariert und anschließend Handselektiert. Jeweils 400 Inseln wurden entweder sofort nach der Isolierung oder nach einem Tag Kultur bei 37°C in TCM-199 Medium unter die Nierenkapsel von Wistar Furth Ratten transplantiert. Drei Tage nach Transplantation wurde das Transplantat durch Nephrektomie entnommen und totale RNA wurde extrahiert. Die Zytokin mRNA Expression in diesen Proben wurde in einer Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) bestimmt. Diese semiquantitative Bestimmung beinhaltete die Koamplifizierung eines endogen exprimierten Kontrollgens (β -Aktin) mit dem jeweiligen Zytokinen. Die PCR Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, mit einem Videosystem dokumentiert und über das CUE-2 Image Analyzer Programm (Olympus) ausgewertet. Die Zytokin mRNA wurde relativ zur β -Aktin mRNA einer 100 mg Gewebeprobe angegeben.

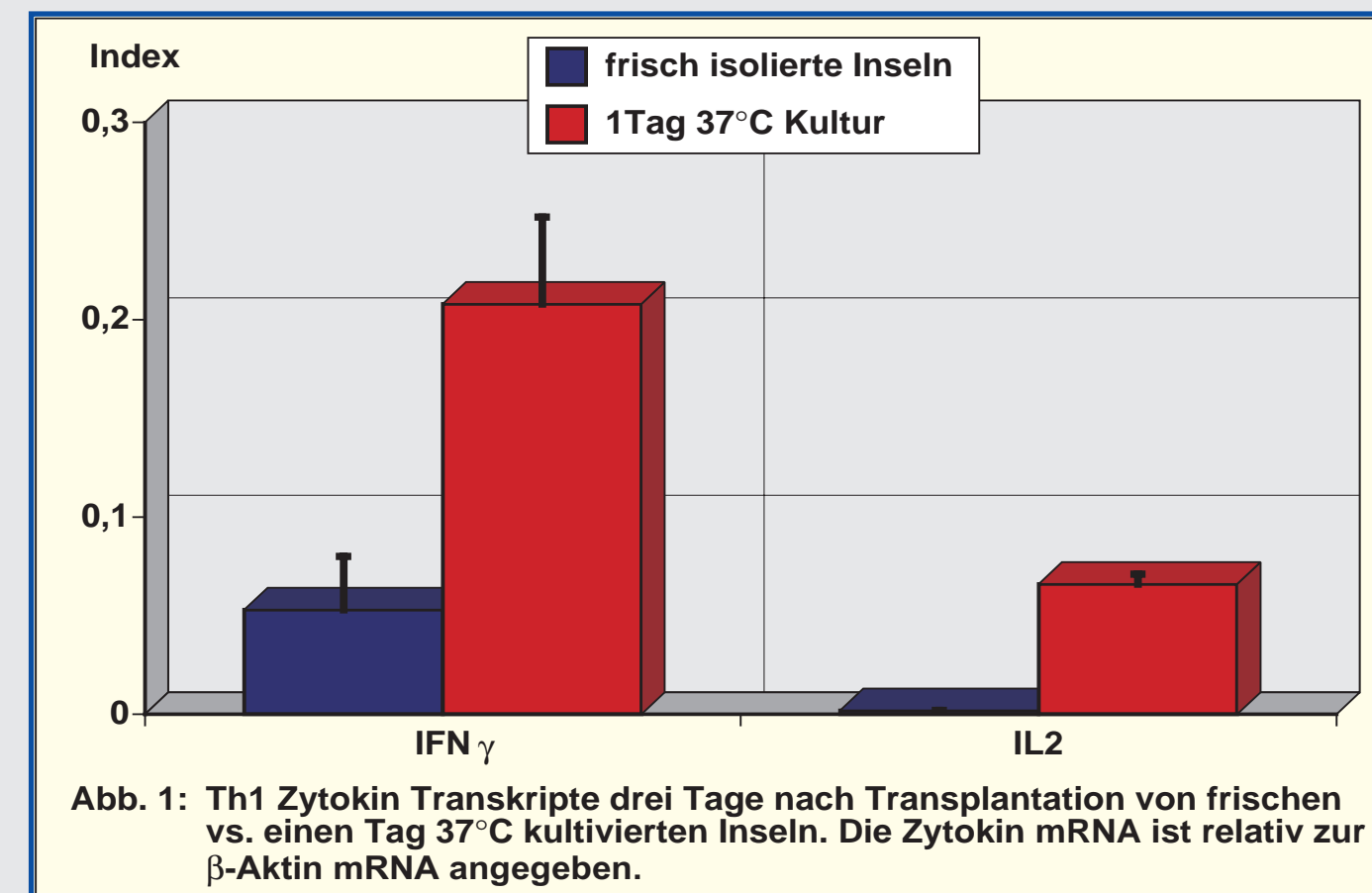


Abb. 1: Th1 Zytokin Transkripte drei Tage nach Transplantation von frischen vs. einen Tag 37°C kultivierten Inseln. Die Zytokin mRNA ist relativ zur β -Aktin mRNA angegeben.

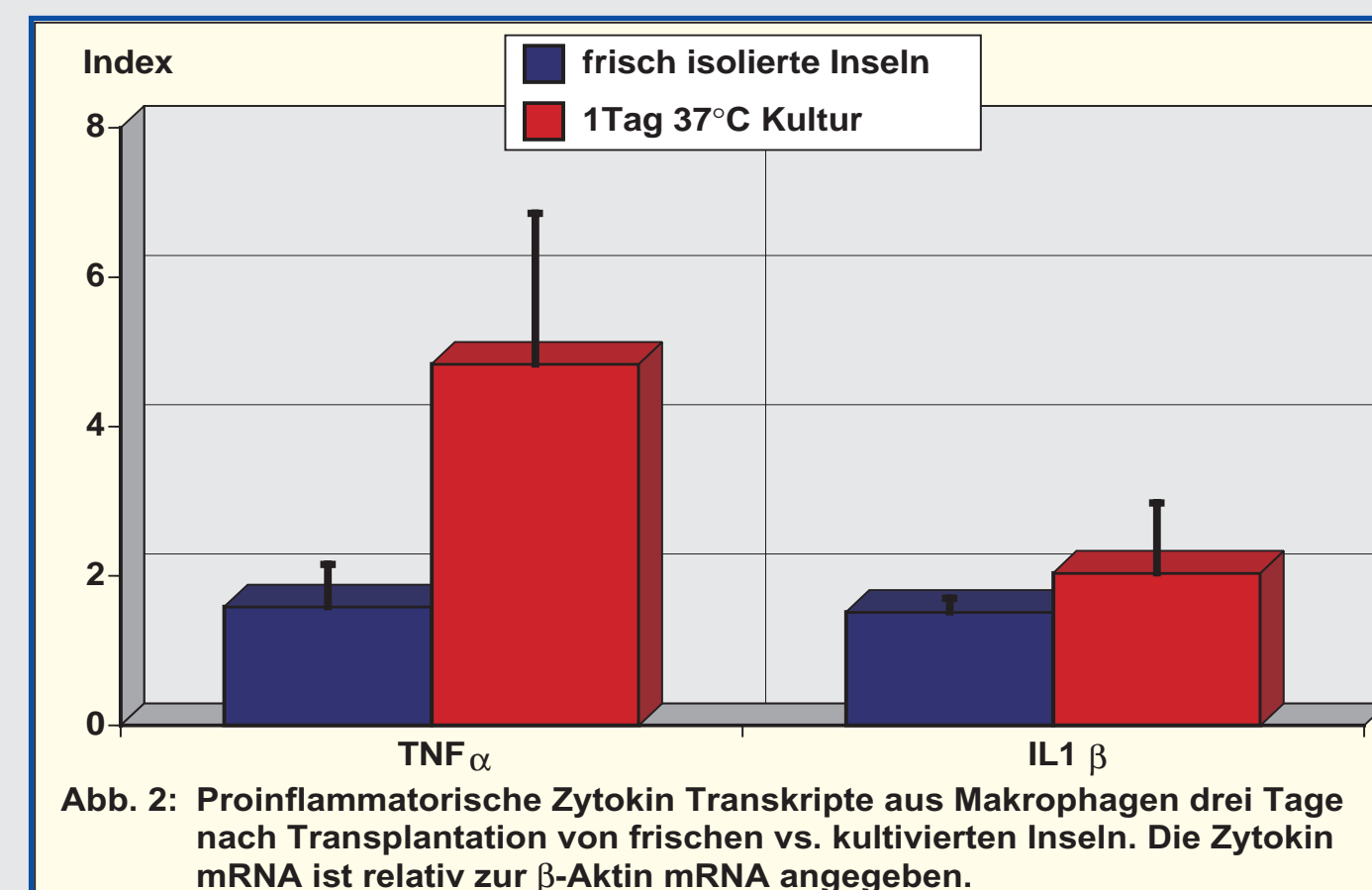


Abb. 2: Proinflammatorische Zytokin Transkripte aus Makrophagen drei Tage nach Transplantation von frischen vs. kultivierten Inseln. Die Zytokin mRNA ist relativ zur β -Aktin mRNA angegeben.

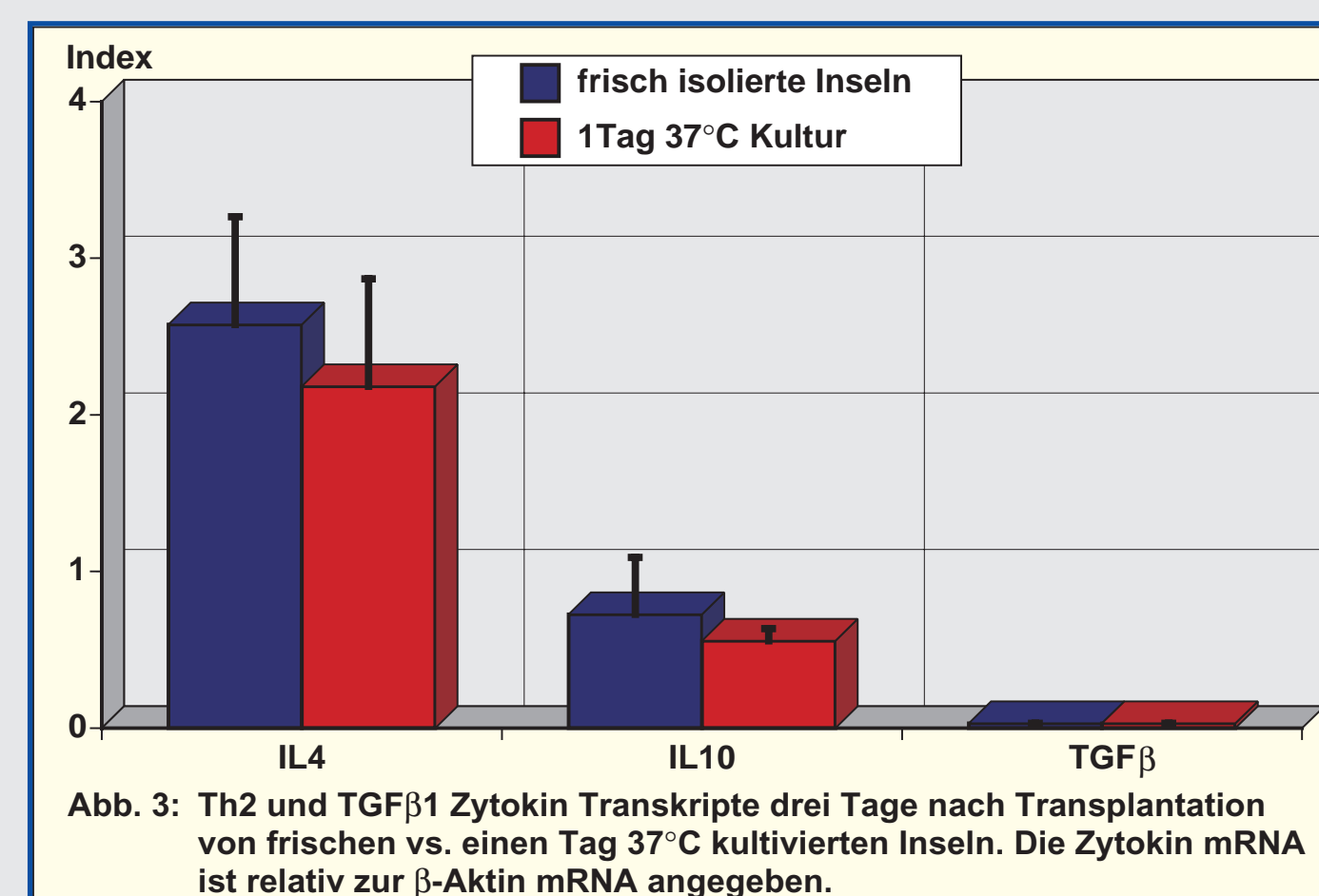


Abb. 3: Th2 und TGF β 1 Zytokin Transkripte drei Tage nach Transplantation von frischen vs. einen Tag 37°C kultivierten Inseln. Die Zytokin mRNA ist relativ zur β -Aktin mRNA angegeben.

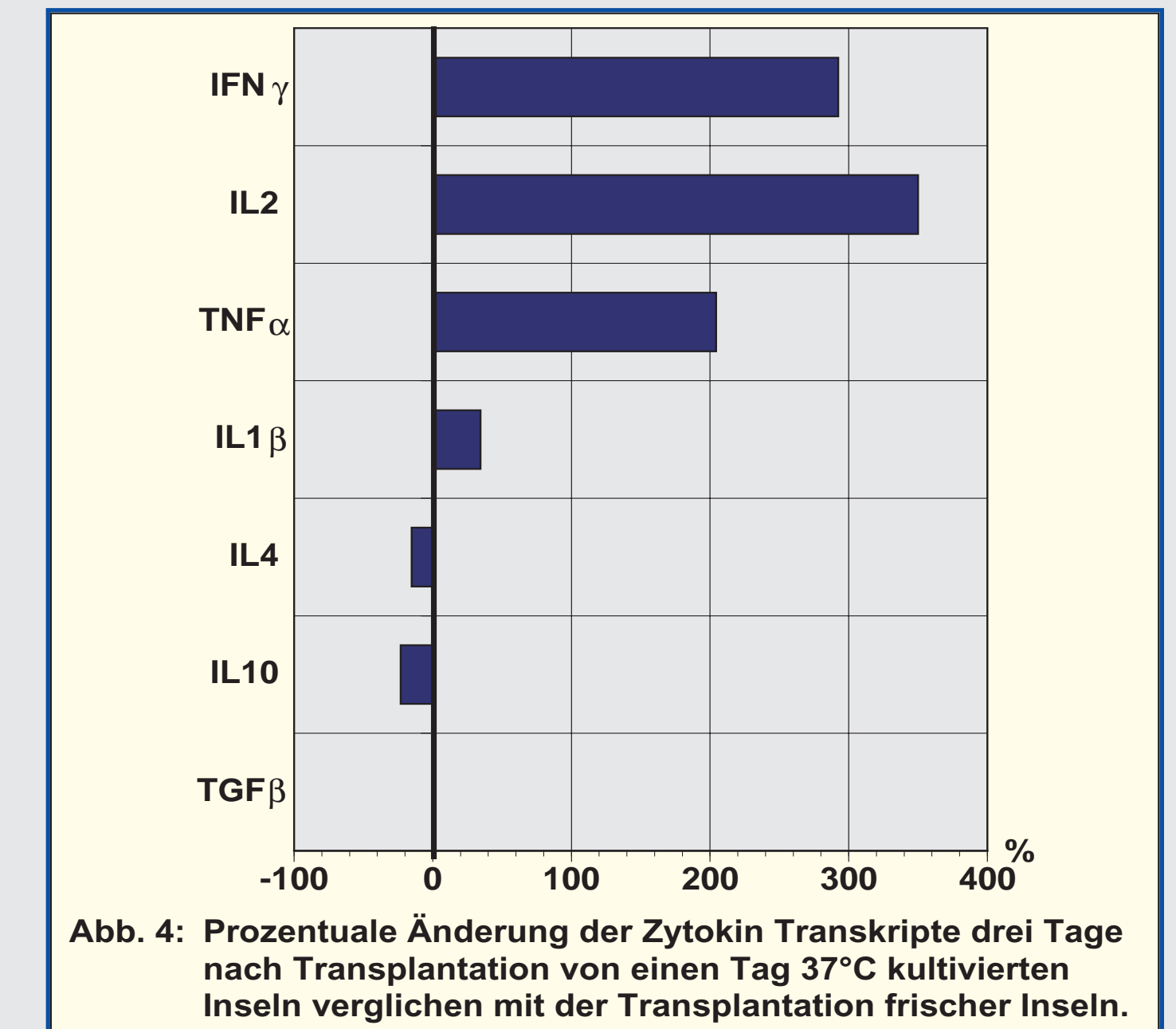


Abb. 4: Prozentuale Änderung der Zytokin Transkripte drei Tage nach Transplantation von einen Tag 37°C kultivierten Inseln verglichen mit der Transplantation frischer Inseln.

ERGEBNISSE

Die Expression proinflammatorischer/Th1 Zytokin Transkripte war geringer nach Transplantation von frisch präparierten vs. einen Tag kultivierten Inseln (IFN γ : 0.053 ± 0.027 vs. 0.208 ± 0.044 , IL-2: 0.000 ± 0.000 vs. 0.066 ± 0.005 , TNF α : 1.590 ± 0.564 vs. 4.839 ± 2.018) (Abb. 1 und 2). Für Th2 Zytokin und IL1 β mRNA fand sich kein Unterschied zwischen frischen und kultivierten Inseln (IL-4: 2.576 ± 0.689 vs. 2.182 ± 0.686 , IL-10: 0.726 ± 0.363 vs. 0.558 ± 0.078 , TGF β 1: 0.000 ± 0.000 vs. 0.000 ± 0.000 , IL1 β : 1.519 ± 0.182 vs. 2.042 ± 0.934) (Abb. 2 und 3).

Abbildung 4 zeigt den relativen Unterschied von 37°C kultivierten Inseln verglichen mit frisch präparierten Inseln in einem prozentualen Maßstab.

SCHLUSSFOLGERUNG

Das frühe Engraftment der Inseln wird durch das Gleichgewicht zwischen der Stärke der inflammatorischen Reaktion einerseits (höher nach Transplantation 37°C kultivierter Inseln) und der Empfindlichkeit der Inseln gegenüber der inflammatorischen Schädigung andererseits (höher in frisch präparierten oder 22°C kultivierten Inseln) bestimmt.