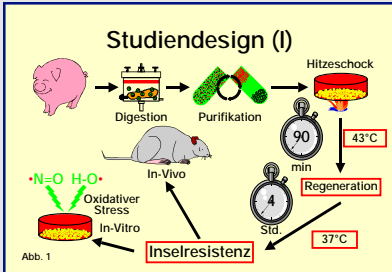


Keine Korrelation zwischen der in vitro Resistenz isolierter Schweineinseln gegenüber Stickoxid und Sauerstoffradikalen und dem Überleben nach Xenotransplantation in Ratten nach kontrollierter HSP-70 Induktion

Brandhorst D, Brandhorst H, Hammes HP, Zwolinski A, Nahidi F, Alt A, Bretzel RG
3. Medizinische Klinik und Poliklinik der Justus-Liebig-Universität Giessen



Hintergrund

Die Synthese von Hitzeschockproteinen (HSP) ist eine universelle Strategie von Zellen, um auf abrupte, möglicherweise tödliche Veränderungen ihrer Umgebung zu reagieren. Die Struktur dieser Stressproteine hat sich von den frühesten Anfängen der Evolution in Prokaryonten bis zu komplexen Säugetierorganismen weitestgehend erhalten (1). Experimente an Ratten zeigten, dass die vorhergehende Induktion von HSP-70 in isolierten Inselzellen mittels Hitzeexposition eine Protektion gegenüber verschiedenen inflammatorischen Mediatoren wie Stickoxid (NO) und Sauerstoffradikalen (H_2O_2) in-vitro bewirkt (2). Bis heute ist nicht geklärt, ob eine gezielte Induktion von HSP in isolierten Inseln aus grossen Säugetieren wie Mensch und Schwein einen signifikanten Schutz gegenüber oxidativem Stress bietet und ob dies möglicherweise eine Relevanz für frühe inflammatorische Reaktionen nach Transplantation hat.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen einer gezielten hitzeinduzierten HSP-70 Expression in isolierten, hochreinen Schweineinseln auf deren in-vitro Viabilität und Funktionalität zu untersuchen und den Effekt eines Hitzeschocks auf die in-vitro Resistenz der Inseln gegenüber hohen Konzentrationen von NO - und O_2^- -Donatoren mit dem frühen Überleben nach Transplantation in nicht-diabetische Lewis-Ratten zu vergleichen.

Studiendesign

Inselisolierung (Abb. 1). Inseln wurden aus dem Pankreas adulter Sauen (2-4 Jahre) mittels hochreiner Kollagenase in einer Digestions-Filtrationseinheit bei Niedrigtemperatur (24-28°C) herausgelöst und in einem Blutzellwaschgerät (Cobe 2991) mit Hilfe eines isosmolaren Monolayer-gradienten aus Ficoll-Natrium-diatrizoat (1082 g/L) vom exokrinen Gewebe separiert (3).

Hitzeschockinduktion (Abb. 1). Zur Titration der Hitzeschock-induktion wurden frisch isolierte Inseln in supplementierten RPM 1640 aliquotiert, über verschiedene Zeiträume (0-120 min) bei 43°C inkubiert und nachfolgend für ca. 20 h bei 37°C kultiviert (Abb. 3). Zur Messung der maximalen Zellantwort auf eine determinierte Hitzeschockinduktion wurden hitzeexponierte Inseln (43°C/90 min) über verschiedenen Zeiträume (0-48 h) bei 37°C kultiviert (Abb. 4). Kontrollinseln wurden kontinuierlich bei 37°C inkubiert.

Qualitätskontrolle. Die glukosestimulierte Insulinsekretion wurde während einer 90 minütigen statischen Inkubation in 1.65 mM und 16.5 mM Glukose erfasst (Abb. 5). Die Membranintegrität (=Viabilität) der Inseln wurde mittels der Trypanblau-Exklusion (0.4%) bestimmt (Abb. 6).

Oxidativer Stress (Abb. 2). Hitzeexponierte Inseln und Kontrollinseln wurden bei 37°C über 20 h in 0.6 mM H_2O_2 (O_2^- -Donator) oder 1.5 mM Natriumnitrosid (NO -Donator) inkubiert. Zur Kalkulation der Zytotoxizität wurde das Überleben (Abb. 7) und die Viabilität (Abb. 8) der HSP- und Kontrollinseln unter oxidativem Stress in Relation zu den jeweiligen Parametern der korrespondierenden experimentellen Gruppe unter Kontrollbedingungen gesetzt.

Transplantatüberleben (Abb. 2). Je 7500 Inselequivalente von hitzegeschockten oder Kontrollinseln wurden simultan unter die jeweils kontralaterale (rechte oder linke) Nierenkapsel (NK) einer nicht-diabetischen männlichen Lewis-Ratte (n=20, Abb. 9) transplantiert oder parallel bei 37°C kultiviert. Zur Abschätzung des frühen Transplantatüberlebens mittels der Insulinwiederfindung wurden nach 48 h die Transplantate entnommen und die simultane Inselkultur beendet, um die transplantierten bzw. kultivierten hitzegeschockten und Kontrollinseln der Insulinextraktion zu zuführen (Abb. 10).

Ergebnisse

Die stimulierte Insulinsekretion während einer statischen Glukoseinkubation ist in hitzegeschockten Inseln signifikant erniedrigt (Abb. 5). Die Viabilität frisch isolierter Inseln wird durch Hitzeschock nicht verändert (Abb. 6).

Obwohl das Überleben hitzeexponierter Inseln nach oxidativem Stress signifikant höher als bei Kontrollinseln ist, sind die Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen als marginal zu betrachten (Abb. 7).

Die Induktion von HSP-70 scheint eine signifikante Protektion auf die Viabilität von Inseln während einer H_2O_2 -Behandlung aber nicht während einer NO -Inkubation auszuüben (Abb. 8).

Die Wiederfindung von initial transplantiertem Insulin aus hitzegeschockten Inseln ist im Vergleich zur Wiederfindung aus transplantierten Kontrollinseln deutlich erniedrigt (Abb. 9).

Dagegen ist die Insulinwiederfindung nach einer 48 h-Kultur bei hitzeexponierten Inseln im Vergleich zu Kontrollinseln mehr als verdoppelt (Abb. 10).

Schlussfolgerungen

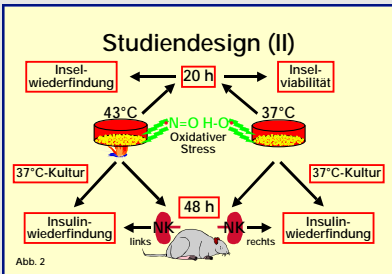
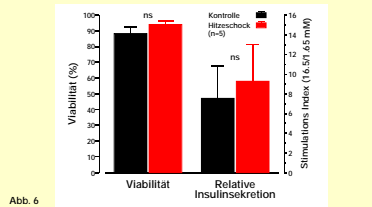
Im Gegensatz zu Nagerinseln (2) hat die Induktion von Hitzeschockproteinen, gemessen an der Expression von HSP-70, nur einen geringfügigen Einfluss auf die in-vitro Protektion von Schweineinseln gegenüber oxidativem Stress.

Die vorliegende Untersuchung zeigt anhand eines diskordanten Transplantationsmodells erstmalig, dass die HSP-70 Induktion in isolierten Inseln einen negativen Effekt auf das frühe Überleben nach Transplantation in immunkompetente Empfänger zu haben scheint.

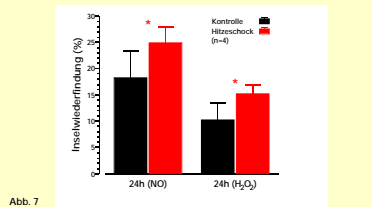
Literatur

- Welch WJ. Mammalian stress response: Cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Reviews* 72: 1063, 1992.
- Bellmann K, Wenz A, Radons J, Burkart V, Kleemann R, Kolb H. Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro. *J Clin Invest* 95: 2840, 1995.
- Brandhorst H, Brandhorst D, Hering BJ, Bretzel RG. Significant progress in porcine islet mass isolation utilizing Liberase HI for enzymatic low temperature pancreas digestion. *Transplantation* 1999 (in press)

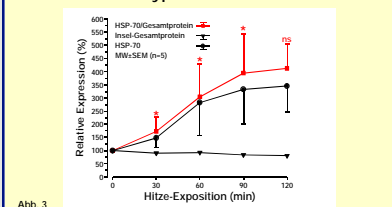
Viabilität und relative Insulinsekretion von hitzeexponierten Schweineinseln



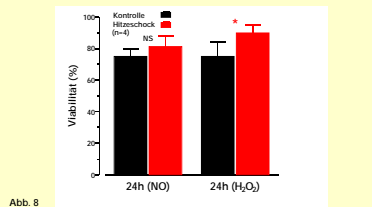
Wiederfindung hitzeexponierter Schweineinseln nach 20 h oxidativem Stress



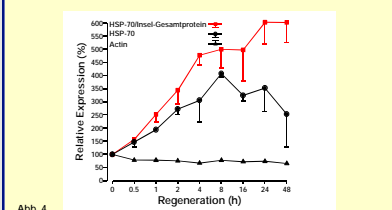
HSP-70 Expression in isolierten Schweineinseln nach hyperthermischem Schock



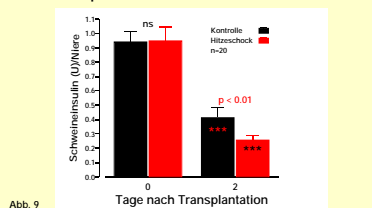
Viabilität hitzeexponierter Schweineinseln nach 20 h oxidativem Stress



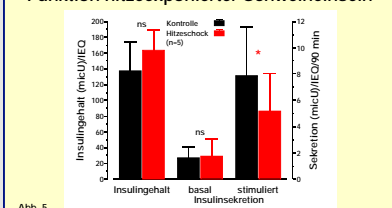
HSP-70 Expression in hitzegeschockten Schweineinseln nach normothermischer Regeneration



Schweineinsulingehalt 48 h nach TX unter die Nierenkapsel nicht-diabetischer Lewis-Ratten



Intrazellulärer Insulingehalt und in vitro Funktion hitzeexponierter Schweineinseln



Wiederfindung von Schweineinsulin 48 h nach TX in normale Ratten und simultaner Inselkultur

