

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologische Chemie

**Optimierung der Kaltlagerung von Inselzellen
- Untersuchungen am Modell der Ratteninsulinomzelllinie RIN-m5F -**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Stefanie Lindner-Straube, geb. Straube,
aus Herne
2016

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. U. Rauen
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Th. Minor

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2017

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Poster:

Straube S., Rauen U. (2008): Optimierung von Protektionslösungen für die Inselzelltransplantation. Erste Untersuchungen an der Ratteninsulinomzelllinie RIN-m5F. 7. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1.	Inselzelltransplantation zur Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus Typ 1	7
1.2.	Inselzell- versus Pankreastransplantation	8
1.3.	Historie der Inselzelltransplantation	9
1.4.	Derzeitiger Stand der Inselzelltransplantation	10
1.5.	Grenzen der Inselzelltransplantation	11
1.6.	Prinzipien der Zell- und Organkonservierung	13
1.6.1.	Schädigungsfaktoren im Rahmen der Konservierung	13
1.6.2.	Hypoxieinduzierte Schädigung	14
1.6.3.	Kälteinduzierte Schädigung	16
1.6.3.1.	Klassischer Mechanismus der kälteinduzierten Schädigung	16
1.6.3.2.	Eisenabhängige Kälteschädigung	17
1.6.3.3.	Chlorid und Kälteschädigung	17
1.6.3.4.	Weitere Ionen und Kälteschädigung	18
1.6.3.5.	Schädigung bei/nach der Wiedererwärmung	18
1.6.4.	Zytotoxizität von Protektionslösungen	19
1.7.	Zell- und Organprotektionslösungen	19
1.7.1.	Etablierung neuer Protektionslösungen	21
1.7.2.	Konservierungsschädigung pankreatischer Inselzellen	24
1.7.3.	Aussichten zur Verbesserung	24
2.	Problemstellung	25
3.	Material und Methoden	25
3.1.	Chemikalien	25
3.2.	Sonstige Materialien	27
3.3.	Versuchszellen	28
3.4.	Experimentelles Vorgehen	28
3.4.1.	Kultivierung der Ratteninsulinomzellen	28
3.4.2.	Allgemeines experimentelles Vorgehen	29

3.4.3.	Bestimmung der Zellschädigung durch Messung der LDH-Freisetzung	29
3.4.4.	Bestimmung der Vitalität mittels Resazurin-Reduktions-Test	30
3.4.5.	Bestimmung thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen	30
3.5.	Zusammensetzung verwendeter Konservierungslösungen	21
3.6.	Zusammensetzung verwendeter Zellkulturmedien	33
3.7.	Beurteilung der Morphologie	35
3.8.	Statistische Auswertung	35
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Kälteinduzierte Schädigung kultivierter Ratteninsulinomzellen in etablierten Konservierungslösungen	36
4.2.	Eisenabhängige Kälteschädigung	37
4.2.1.	Schutzeffekt von Eisenchelatoren	37
4.2.2.	Resazurin-Reduktionstest zur Bestätigung des Schutzeffektes durch Eisenchelatoren	37
4.2.3.	Abhängigkeit der Reversibilität der morphologischen Veränderungen vom Einsatz der Eisenchelatoren	39
4.2.4.	Nachweis einer Lipidperoxidation	41
4.3.	Testung der neuen Zell- und Gewebeprotektionslösungen	43
4.4.	Chloridabhängige Kälteschädigung	45
4.4.1.	Schutzeffekt chloridarmer Protektionslösungen	45
4.4.2.	Untersuchungen zum Mechanismus der chloridabhängigen Kälteschädigungskomponente	46
4.5.	Optimierung der Protektionslösung für Inselzellen	47
4.5.1.	Kationenzusammensetzung: Natrium vs. Kalium	49
4.5.2.	Einfluss verschiedener Eisenchelatoren und deren Konzentration	50
4.5.3.	Einfluss des pH-Wertes	51
4.5.4.	Einfluss von Adenosin und Dextran	51
4.6.	Hemmung der chloridabhängigen Kälteschädigung durch Dextran	52
4.7.	Die optimale Protektionslösung für Ratteninsulinomzellen	53

5.	Zellschädigung während der Wiedererwärmung	54
5.1.	„Wiedererwärmungsschädigung“ in RPMI-Zellkulturmedium	54
5.2.	Weitere Untersuchungen zur „Medienwechselschädigung“ während der Wiedererwärmung	57
5.2.1.	Morphologie in Abhängigkeit vom eingesetzten Medium während der Wiedererwärmung	57
5.2.2.	Testung möglicher toxischer Komponenten von RPMI	58
5.2.3.	Zellschädigung durch spezifischen RPMI-Effekt?	61
5.3.	Protektive Komponenten in den modifizierten Lösungen?	62
5.3.1.	Magnesiumchlorid während der Wiedererwärmung	64
5.3.2.	Bicarbonat-freies Medium während der Wiedererwärmung	64
5.3.3.	Aminosäuren während der Wiedererwärmung	64
5.3.3.1.	Aspartat und Tryptophan ergänzt mit α -Ketoglutarat während der Wiedererwärmung	64
5.3.3.2.	Alanin und Glycin während der Wiedererwärmung	66
5.3.3.3.	Kombinationen von Alanin, Glycin, Saccharose und Azidose	67
5.3.3.4.	Alanin, Glycin und Saccharose in physiologisch modifizierten Lösungen	67
6.	Diskussion	70
7.	Zusammenfassung	83
8.	Literaturverzeichnis	84
9.	Abkürzungsverzeichnis	97
10.	Danksagung	98
11.	Lebenslauf	99

1. Einleitung

1.1. Inselzelltransplantation zur Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus Typ 1

„Diabetes mellitus ist eine Gruppe heterogener Erkrankungen mit dem gemeinsamen Merkmal der chronischen Hyperglykämie“, zugrunde liegt hierbei entweder eine Insulinresistenz, eine Störung der Insulinwirkung oder eine Kombination dieser (Herold, 2014). Der Typ 1 Diabetes beruht auf einem absoluten Mangel an Insulin infolge einer autoimmunologischen (Typ a) bzw. idiopathisch (Typ b) bedingten β -Zelldestruktion in den Langerhans'schen Inseln des Pankreasorgans (Herold, 2014) und tritt bevorzugt in jüngeren Lebensjahren auf (Matthaei und Kellerer, 2011). Der Typ 2 Diabetes hingegen ist durch eine Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis hin zu einem sekretorischen Defekt mit kombinierter Insulinresistenz gekennzeichnet und die Prävalenz steigt altersabhängig sowie mit dem Ausmaß der Überernährung (Herold, 2014). Darüber hinaus wird der Gestationsdiabetes und weitere zumeist genetisch bedingte Diabetesformen unterschieden.

Mit weltweit über 360 Millionen beschriebenen Erkrankten in 2011 und voraussichtlicher Steigerung auf 550 Millionen bis 2030 (Whiting et al., 2011) gehört der Diabetes mellitus zu einer der großen Volkskrankheiten mit einer beträchtlichen Morbidität und Mortalität. Fünf bis zehn Prozent sind Typ 1 Diabetiker, allerdings auch diese mit steigender Tendenz (Jarosz-Chobot et al., 2011). Derzeit ist die lebenslange Insulinsubstitution die Therapie der Wahl (Matthaei und Kellerer, 2011). Um nachweislich die Gefahr diabetesassoziierter Folgeerkrankungen zu mindern, sollte die Senkung der HbA1c-Werte in die Nähe des Normbereiches erfolgen. Im Rahmen der exakten Einstellung steigt allerdings das Risiko schwerer hypoglykämischer Stoffwechsellage. Zudem zeigen Untersuchungen, dass Typ 1-Diabetiker aufgrund der resultierenden Langzeit-Komplikationen sechs- bis siebenfach höhere Gesundheitskosten verursachen als gleichaltrige Nicht-Diabetiker (Jahansouz et al., 2011).

Um die diabetische Stoffwechsellage zu normalisieren, mit dem Ziel der Prävention bzw. Reduktion der Begleitmorbidität und Mortalität sowie zur

Verbesserung der Lebensqualität und Verringerung der Gesundheitskosten, wurden alternative Behandlungsstrategien untersucht und etabliert (Matthaei und Kellerer, 2011). So kam bereits über ein Jahrhundert zuvor O. Minkowski und J. von Mering an der Universität Straßburg die Idee einer chirurgischen Therapie des insulinpflichtigen Diabetes; die erste erfolgreiche Pankreastransplantation wurde allerdings erst 1966 durch Kelly et al. an der Universität von Minnesota als Alternative zur Insulinsubstitution durchgeführt (Jahansouz et al., 2011). Seitdem wurden circa 28.000 Organe transplantiert (Bretzel, 2010), inzwischen mit einer 1-Jahres-Pankreasfunktionsrate von 76-85%. Insbesondere bei zusätzlicher präterminaler Niereninsuffizienz wurde eine kombinierte Nieren- und Pankreastransplantation durchgeführt. Allerdings sind Pankreastransplantationen, trotz aller Fortschritte, große bauchchirurgische Interventionen mit perioperativen Risiken, wie beispielsweise Transplantat-Pankreatitiden.

In den folgenden Jahren entwickelte sich die Inselzelltransplantation als eine neue Therapiemöglichkeit des insulinpflichtigen Diabetes mellitus (Bretzel, 2010). Insbesondere Typ-1-Diabetiker mit Schwierigkeiten der Blutglukoseeinstellung trotz maximaler Therapieausschöpfung und geplanter simultaner Nierentransplantation bei terminaler Niereninsuffizienz sowie mit bereits vorangegangener Organtransplantation stellen ein typisches Kollektiv für die Transplantation der β -Zellen dar.

1.2. Inselzell- versus Pankreastransplantation

Aktuell ist die Pankreastransplantation eine effektive Maßnahme, um die Verbesserung des Glucosestoffwechsels zu erreichen (Agarwal und Brayman, 2012). Die Transplantation des Pankreas ist allerdings mit erheblichen Risiken verbunden. Neben den allgemeinen Operationsrisiken wird zudem über Komplikationen, verbunden mit dem zur Diabetestherapie eigentlich unwesentlichen exokrinen Pankreasgewebe (Agarwal und Brayman, 2012; Vollmar et al., 1999) sowie dem niedrigen mikrozirkulatorischen Blutfluss der Drüse, berichtet (Oberholzer et al., 2010).

Die frühe Transplantat-Pankreatitis ist beispielsweise mit 35 % eine häufige und sehr gefährliche Komplikation nach erfolgter Organtransplantation (Oberholzer et

al., 2010). Sie ist oftmals Folge einer Ischämie-/Reperfusionsschädigung des Transplantats. Insbesondere der exokrine Teil des Pankreas scheint eine hohe Anfälligkeit für diese Art der Schädigung aufzuweisen (Vollmar et al., 1999). So berichteten Vollmar et al. über eine ischämie-/reperusionsbedingte Störung der Mikrozirkulation mit resultierender kapillärer Dysfunktion, gefolgt von einer inflammatorischen Gewebereaktion im exokrinen, nicht aber im endokrinen Teil des Pankreas, welche die Ausbildung einer Transplantat-Pankreatitis triggert. Denn gerade der exokrine Pankreas trägt durch die Sekretion seiner destruktiv wirkenden Enzyme und deren chirurgischem Management zur weiteren Morbiditätssteigerung nach Pankreastransplantation bei (Sutherland et al, 2001). Eine sinnvolle und ideale Therapie des insulinpflichtigen Diabetes ist somit die alleinige Transplantation der endokrinen Komponente, speziell um den Risiken verbunden mit dem exokrinen Pankreas aus dem Weg zu gehen. Aktuell ist die Inselzelltransplantation eine minimalinvasive Alternative zur Pankreas-transplantation, mit deutlich weniger Komplikationen, bei der die Spenderzellen per Seldingertechnik in die Pfortader appliziert werden; vorteilhaft ist zudem die Möglichkeit einer beliebigen Wiederholung des Eingriffes (Matthaei und Kellerer, 2011; Shapiro et al., 2000).

1.3. Historie der Inselzelltransplantation

Die erste Vermutung, dass das Pankreas nicht nur eine exokrine, sondern auch eine endokrine Funktion haben könnte, kam dem Wissenschaftler R. Virchow in der Mitte des 19. Jahrhunderts (Bretzel, 2010). Sein Doktorand P. Langerhans berichtete erstmals 1869 über besondere Zellhaufen im Pankreasgewebe, allerdings noch ohne Kenntnisse über deren Funktion. Später wurden diese nach ihrem Entdecker auch als Langerhansche Inseln bezeichnet.

J. von Mering und O. Minkowski führten Ende des 19. Jahrhunderts an der Universität Straßburg Studien am Hundepankreas durch und bewiesen mittels eines durch eine Pankreatektomie hervorgerufenen Diabetes mellitus, dass die Ursache des Diabetes im Pankreas zu finden ist (Von Mering und Minkowski, 1890). In den folgenden Jahren veröffentlichte O. Minkowski, dass dem durch eine Pankreatektomie erzeugten Diabetes mit Hilfe einer Pankreasfragment-

Inselzelltransplantation unter die Bauchhaut von Hunden entgegengewirkt werden kann, sowie dass eine aus dem Pankreas abgesonderte Substanz die periphere Glukoseaufnahme im Gewebe bewirkt (Minkowski, 1892).

Erst um 1970 wurde die Forschung auf dem Gebiet an verschiedenen Zentren intensiviert und die Idee einer alleinigen Inselzelltransplantation weiter verfolgt. Insbesondere der Visionär P. Lacy beschäftigte sich intensiv mit seiner Arbeitsgruppe an der Universität Washington mit der Isolierung sowie Transplantation von Inselzellen an Nagetieren (Misler, 2010). Ein weiterer Fortschritt war die Feststellung von Kemp et al., dass die Lokalisation des Inseltransplantats eine wichtige Rolle spielt. So konnte tierexperimentell durch eine Injektion der β -Zellen in die Portalvene, im Gegensatz zu intraperitoneal transplantierten Inseln, eine Normoglykämie erreicht werden.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurde von Najarian et al. der Prozess der Inseltransplantation an der Universität von Minnesota weiter entwickelt, bis 1977 die erste erfolgreiche humane Inselzelltransplantation nach Verabreichung von Azathioprin und Kortikosteroiden durchgeführt wurde. Die erste Insulinunabhängigkeit eines Typ-1-Diabetikers wurde allerdings erst 1980 nach Inselzell-Allotransplantation durch Lagiader beschrieben (Lagiader et al, 1980).

1.4. Derzeitiger Stand der Inselzelltransplantation

In der letzten Dekade wurden mehr als 700 Inselzelltransplantationen, in circa 50 Zentren weltweit, durchgeführt (Bretzel, 2013). Eindeutige Fortschritte lieferten die Einführung einer automatisierten Methode zur Inselzellisolierung (Ricordi et al., 1989) sowie der Einsatz eines spezifischen, steroidfreien Transplantationsprotokolls, dem sogenannten Edmonton-Protokoll, im Jahr 1999 (Shapiro et al., 2000) mit erfolgreicher Inseltransplantation und 100% Insulinunabhängigkeit bei 7 Typ 1 Diabetes-Patienten in Edmonton (Kanada).

Durch die umfassenden Daten des internationalen Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) in Rockville (USA) kann eine deutliche Verbesserung der Langzeit-Erfolge von Inselzelltransplantationen in den letzten 15 Jahren belegt werden (Barton et al., 2012). Während das Maximalziel einer Insulinun-

abhängigkeit nach 3 Jahren zwischen 1999 bis 2002 lediglich von jedem Vierten erreicht wurde, ist derzeit nahezu „jeder Zweite insulinunabhängig“ (Bretzel, 2013). Ein Grund für diesen Erfolg scheint insbesondere die Einführung eines neuen Immunsuppressionsprotokolls 2008 mit einer initialen Induktionstherapie zu sein (Barton et al., 2012).

Das wesentliche Ziel einer guten, stabilen Stoffwechsellage mit Vermeidung schwerer Hypoglykämien wird weitaus häufiger erlangt. Nach 1 Jahr beträgt die Erfolgsrate 82%, nach 3 Jahren 75%; in Edmonton sogar 67% nach 8 Jahren; zudem konnte eine stärkere Reduktion diabetischer Sekundärkomplikationen im Gegensatz zur Insulintherapie sowie eine Optimierung der Lebensqualität nachgewiesen werden (Bretzel, 2010).

1.5. Grenzen der Inselzelltransplantation

Die Inselzelltransplantation erfordert wesentliche Schritte wie die Entnahme des Pankreas vom Spender sowie eine erfolgreiche Inselisolation, gefolgt von einer *in vitro* Kultivierung, um die Zellfunktion bis zur Transplantation zu erhalten (Daoud et al., 2010). Den Daten zufolge sind gegenwärtig die Resultate der Inselzelltransplantation jedoch nicht zufriedenstellend. Ursächlich ist ein Verlust der Inselzellmasse und -funktion, insbesondere während der Isolation, der Kultivierung (Jahansouz et al., 2011) sowie postoperativ aufgrund immunologischer und inflammatorischer Prozesse und hoher Stoffwechselforderungen (Bretzel, 2010). Teilweise scheint auch die von vorneherein schlechtere Qualität der β -Zellen zum Misserfolg beizutragen, da höherwertige Organe oft zur Pankreasorgantransplantation verwendet werden. Zudem resultiert ein ungünstiges Spender-Empfänger-Verhältnis von 2 oder mehr Spenderorganen, aufgrund dessen die Inselzelltransplantation derzeit wenigen erfahrenen Zentren im Rahmen klinisch-experimenteller Protokolle vorbehalten ist. Im Rahmen der internationalen Forschung bieten sich somit unterschiedlichste Lösungsstrategien.

Trotz Kontroversen hat sich in verschiedenen Zentren die Kultivierung der Inselzellen vor der Transplantation etabliert (Daoud et al., 2010; Noguchi et al., 2010). Sie bietet ausreichend Zeit zur Qualitätskontrolle, schützt die Zellen

während der Lagerung und des Transportes und bietet Zeit zur Vorbereitung des Empfängers, um ein therapeutisches Niveau der Immunsuppression zu erreichen (Jahansouz et al., 2011).

Auf der anderen Seite zeigte die Edmonton-Gruppe in einer Studie von 104 durchgeführten Inselzelltransplantationen eine signifikante Reduktion der Inselzellmasse nach im Mittel 20 h Kultivierung bei 37 °C (Kin et al., 2008). Bei 37 Präparationen fand sich ein Zellverlust von über 20%, bei 3 von über 50% mit der Konsequenz einer Transplantationsabsage. Zhang et al. (2004) berichteten sogar von einer verbliebenen Inselzellmasse von lediglich 18% nach 48 h Zellkultur.

Eine Reduktion des Zellverlustes sowie eine Verbesserung der Funktion kann laut verschiedener Studien durch die Kaltlagerung von isolierten Inseln während dieser Transportphase erreicht werden. Im Vergleich zur Zellkultivierung sowie Kryokonservierung konnte gezeigt werden, dass die Kaltinkubation von bis zu sieben Tagen mit einem deutlich geringeren Zellverlust sowie einer besseren Funktionsfähigkeit der Inselzellen, insbesondere der Fähigkeit zur Insulinausschüttung, einhergeht (Liu et al., 2014). Zudem wird beispielsweise nach einer Kaltinkubation humaner Inselzellen bei 4°C in University of Wisconsin-Lösung (UW) nach 48 h ein Zellverlust von 5% beobachtet, wohingegen die Standardlagerung in Zellkulturmedium bei 37 °C und 22°C einen Verlust von 24 bzw. 19 % aufweist (Noguchi et al., 2010). Des Weiteren beschreiben Noguchi et al. eine signifikant höhere Erreichbarkeit einer posttransplantären Normoglykämie durch Kaltinkubation der isolierten Inseln als durch Zellkultivierung. Auch Matsumoto et al. zeigen 2001, allerdings an ungewaschenen Inseln, dass diese nach Kaltlagerung in UW-Lösung ergänzt mit dem Trypsin-Inhibitor Pefabloc zur Verhinderung einer Autolyse initiiert von verbliebenem exokrinen Gewebe, eine signifikant höhere Erholungsrate aufweisen, als nach der üblichen Zellkultivierung in Kulturmedium mit Pefabloc bei 37 °C. Somit bietet die Optimierung der Zelllagerung nach erfolgter Isolation durch Kaltlagerung der β -Zellen einen wichtigen Ansatz zur Sicherstellung einer ausreichenden funktionsfähigen Inselzellmasse.

1.6. Prinzipien der Zell- und Organkonservierung

Im Rahmen der Organtransplantation sind die Transplantate zwischen der Spenderorganentnahme und der Wiedereinsetzung des Blutkreislaufes beim Empfänger durch eine fehlende Perfusion (= Ischämie) und folgendem Sauerstoffmangel (= Hypoxie) gefährdet (de Groot, 1998). Um diese durch Hypoxie ausgelöste Gewebeschädigung zu minimieren werden zu transplantierende Organe und Gewebe standardmäßig bei 0 - 4 °C in entsprechenden Konservierungslösungen gelagert. Bei Zelltransplantaten hingegen spielt die Ischämie keine Rolle. Diese sind eher durch einen Sauerstoff- und Substratmangel bedroht und werden ebenfalls zur Reduktion der Zellschädigung hypotherm in speziellen Protektionslösungen inkubiert.

Das Ziel der Hypothermie ist hierbei die Verlangsamung des gesamten Metabolismus im Sinne der Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel mit Senkung des Sauerstoffbedarfs und Verzögerung des Substratmangels (Rauen und de Groot, 2004; Blankensteijn et al., 1991), um Schädigungsprozesse zu verringern.

Die Nutzung einer optimalen Protektionslösung spielt bei der Qualitäts- und Funktionssicherung des konservierten Gewebes bzw. der Zellen eine große Rolle, insbesondere beim derzeitig vorherrschenden Organmangel (Daoud et al., 2010; Kin et al., 2008). Durch verbesserte Kaltlagerung kann der Zeitraum zwischen Pankreasentnahme und Transplantation deutlich verlängert werden, um zum Einen den geeignetsten Empfänger auszusuchen und zum Anderen ein „Inselzellpooling“ für Transplantationen mit einem Spender-Empfänger-Verhältnis von 2:1 oder mehr, zu gewährleisten (Daoud et al., 2010).

1.6.1. Schädigungsfaktoren im Rahmen der Konservierung

Trotz Kaltlagerung der Transplantate in entsprechenden Konservierungslösungen wird eine deutliche Zellschädigung beobachtet, welche die Lagerungsdauer begrenzt. Diese Konservierungsschädigung während der Phase der kalten Ischämie nach Organentnahme sowie der warmen Reperfusion nach Transplantation besteht aus folgenden Komponenten: eine durch Hypoxie

bedingte und lediglich durch Kälte verringerte Schädigung während der Lagerung mit nachfolgender Reoxygenierungsschädigung, ein durch Hypothermie und anschließende Wiedererwärmung selbst herbeigeführter Zelltod sowie eine durch toxisch wirkende Konservierungslösungen induzierte Zellschädigung (Rauen und de Groot, 2004; de Groot 1998). Zudem resultiert nach erfolgter Transplantation eine akute oder chronische inflammatorische Reaktion, als Folge oben genannter schädigender Prozesse (Rauen und de Groot, 2004) (siehe Abbildung 1).

1.6.2. Hypoxieinduzierte Schädigung

Im Rahmen der Transplantation erfolgt eine Phase, in der das Transplantat nicht mehr mit sauerstoffhaltigem Medium versorgt wird. Dieser Zustand der Ischämie hat einen Sauerstoffmangel (Hypoxie) zur Folge, der zu einer Hemmung der mitochondrialen Atmungskette führt. Es resultiert ein Abfall des ATP-Spiegels und somit eine Reduktion aller energieabhängigen Prozesse wie Ionenpumpen und sekundär aktiven Transporter mit Störungen der Ionen-Homöostase (Rauen und de Groot, 2004).

Es werden verschiedenste Störungen diskutiert. Zum Einen soll die Akkumulation von cytosolischem Natrium insbesondere durch Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase sowie durch pH-regulierende Prozesse stattfinden, welche durch Beeinflussung der Calcium-Homöostase zur hypoxischen Zellschädigung beitragen soll. Der Anstieg von cytosolischem Calcium galt lange als ausschlaggebend für den hypoxieinduzierten Zelluntergang. Er erklärt sich durch Hemmung der Ca^{2+} -ATPase im Rahmen des ATP-Mangels und des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters durch einen cytosolischen Natriumanstieg und führt zur Membranschädigung durch Aktivierung calciumabhängiger Hydrolasen (Rauen und de Groot, 2004; de Groot 1998; Blankensteijn et al., 1991).

In aktuellen Studien wird allerdings dem Natrium eine größere Rolle zugeschrieben. So konnte bei Hepatozyten durch den Einsatz eines natriumfreien Mediums die hypoxische Zellschädigung deutlich reduziert werden (Frank et al.,

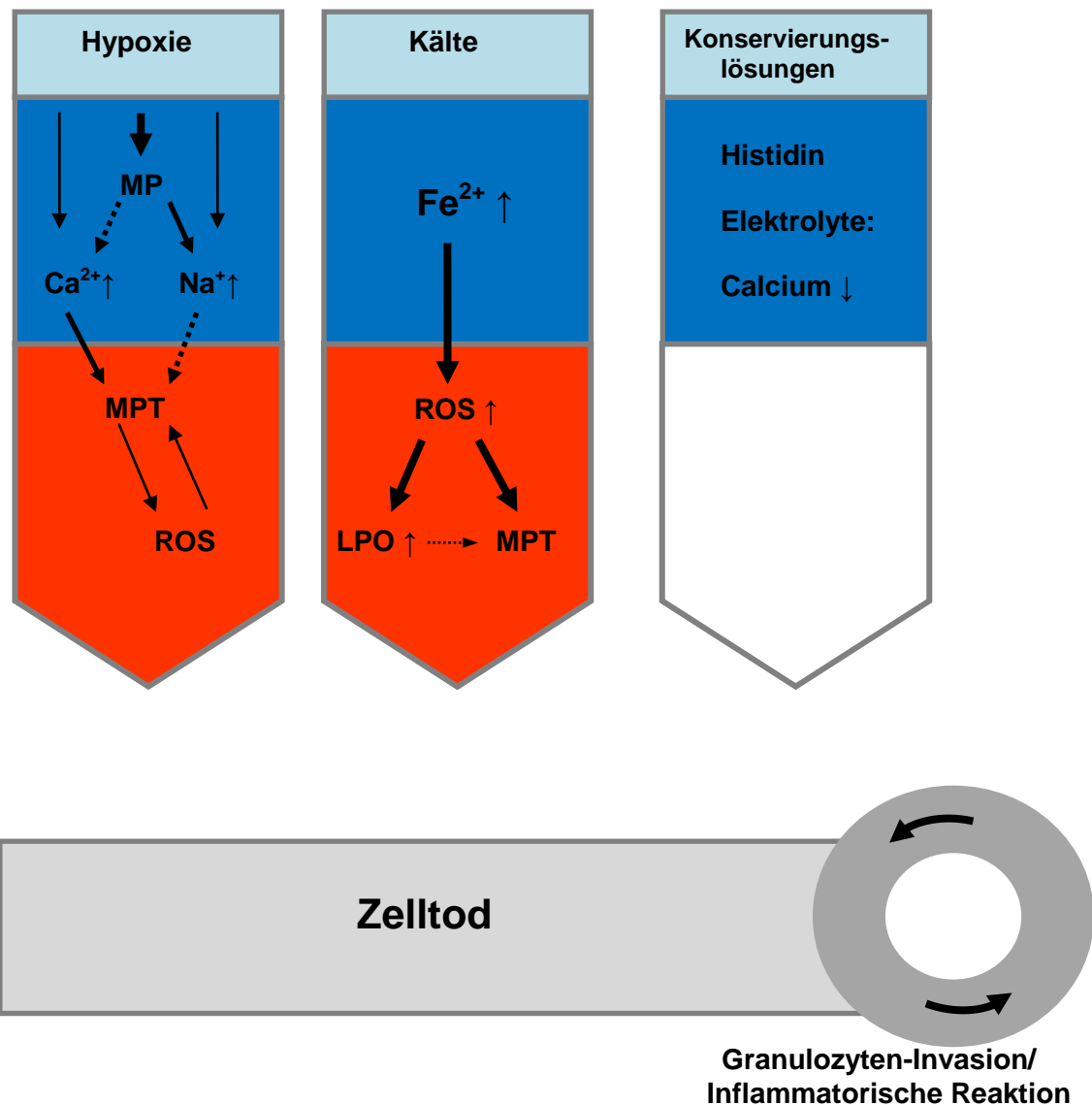


Abbildung 1. Komponenten und Mechanismen der Konservierungsschädigung.

Gezeigt werden die drei in der Literatur beschriebenen Wege der Konservierungsschädigung (blau = Kaltinkubation, rot = Wiedererwärmung): die durch Kälte und Wiedererwärmung hervorgerufene Schädigungskomponente, vermittelt v. a. über eine eisenvermittelte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit resultierender massiver Lipidperoxidation (LPO) sowie dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (MPT); die durch Hypoxie und Reoxygenierung aufgelöste Schädigungskomponente, welche, vermittelt über eine hypoxieinduzierte Plasmamembranpore (MP), zu einer intrazellulären Akkumulation von Natrium (und anderen Ionen) führt; die Zellschädigung durch die Toxizität der Protektionslösungen beispielsweise über den Puffer Histidin sowie der Ionenkomposition der Lösung. Einzelheiten siehe Abschnitt 1.6.1. Modifiziert nach Rauen et al. (Rauen et al., 2004).

2000; Fuckert et al., 2000). Als Hauptmechanismus scheinen unspezifische Membranporen zu einem Einstrom von Natrium und anderen Ionen zu führen. Diese hypoxie-bedingte Bildung von Membranporen kann durch die Aminosäure Glycin und dem strukturähnlichen Alanin gehemmt werden. Im Rahmen der Reperfusion ist zudem eine Reoxygenierungsschädigung durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Folge hypoxiebedingter Vorschädigungen beschrieben (Rauen und de Groot, 2004; de Groot 1998).

1.6.3. Kälteinduzierte Schädigung

Hypothermie bietet Schutz vor hypoxisch bedingter Konservierungsschädigung durch Verlangsamung des Metabolismus und Reduktion des Energiebedarfs. Laut dem van't Hoff'schen Gesetz kann die Enzymaktivität bzw. metabolische Rate durch eine Reduktion der Temperatur von 37 °C auf 0 °C um das 12- bis 13-fache gesenkt werden (Belzer et al., 1988). Allerdings zeigen sich neben der protektiven Wirkung auch durch Kälte selbst induzierte Schädigungsmechanismen, welche während der Wiedererwärmung noch verstärkt werden.

1.6.3.1. Klassischer Mechanismus der kälteinduzierten Schädigung

Als klassischer Mechanismus der Kälteschädigung wird die kälteinduzierte Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase mit folgendem Natrium- und Chlorideinstrom in die Zelle sowie anschließender Zellschwellung mit resultierendem Zelltod beschrieben (Belzer et al. 1988; Hochachka et al., 1986). Aufgrund dessen sind bis heute Protektionslösungen vom intrazellulären Typ mit niedriger Natrium- und Chloridkonzentration wie beispielsweise die University of Wisconsin-Lösung etabliert, obwohl schon in früheren Studien gezeigt wurde, dass verschiedene Zelltypen keinen intrazellulären Natriumanstieg aufweisen (Fuckert et al., 2000; Gizewski et al., 1997).

1.6.3.2. Eisenabhängige Kälteschädigung

Studien an diversen Zelltypen wie beispielsweise Hepatozyten (Rauen et al., 1999; Vairetti et al., 2005), Leberendothelzellen (Rauen et al., 1999) und Nierentubuluszellen (Salahudeen et al., 2003) belegen eine ausgeprägte Kälteschädigung in Protektionslösungen sowie physiologischen Medien ohne Hinweise auf eine intrazelluläre Natriumakkumulation und Zellschwellung (Rauen et al., 1997; Rauen et al., 2000; Salahudeen et al., 2001; Pless-Petig et al., 2012). Ausschlaggebend scheint eine durch Hypothermie induzierte eisenabhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu sein (Rauen und de Groot 2004). Bei der kälteinduzierten Zellschädigung wird ein rascher Anstieg des zellulären, chelatisierbaren, redox-aktiven Eisenpools beobachtet (Kerkweg et al., 2002; Huang und Salahudeen, 2002; Rauen et al., 2000). Durch das redox-aktive Eisen werden schon kurz nach Beginn der Kaltinkubation niedrig reaktive Sauerstoffspezies in hoch reaktive Sauerstoffspezies, wie das bei der Fenton-Reaktion gebildete Hydroxyl-Radikal ($\cdot\text{OH}$) sowie diverse Eisen-Sauerstoff-Spezies ($\text{Fe-O}\cdot$), umgewandelt. Diese Spezies greifen anschließend die Zellmembranen an und verursachen so eine massive Lipidperoxidation ($\text{L}\cdot$, $\text{LOO}\cdot$, LOOH). Kritisch ist hierbei die eisenabhängige Schädigung der Mitochondrien mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, welche in diversen Zelltypen nachgewiesen wurde (Rauen et al., 2003; Salahudeen et al., 2003). Dieser Mechanismus konnte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*, durch den Einsatz von Eisenchelatoren gehemmt werden (Rauen et al., 2004). Im Gegenzug konnte die Kälteschädigung durch eine experimentelle Eisenüberladung imitiert werden (Rauen et al., 2004).

1.6.3.3. Chlorid und Kälteschädigung

Das Anion Chlorid scheint eine wichtige Rolle bei der Kälteschädigung zu spielen. So wirkt sich eine hohe Chloridkonzentration während der Kaltinkubation bei humanen Hepatozyten (Pless et al., 2012), Schweine-Aorten-Endothelzellen sowie Schweine-Aorten-Segmenten (Wille et al., 2008), als deutlich protektiv gegenüber

der Kälteschädigung aus. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse bei kultivierten Ratten-Hepatozyten. Diese erfahren eine chloridabhängige Zellschädigung in der Kälte (Rauen et al., 2007 a).

Zudem wird bei Ratten-Hepatozyten eine Cathepsin B-vermittelte Kälteschädigung besonders in chloridhaltigen Konservierungsmedien beschrieben (Knoop, 2011). Diese führt zur Permeabilisierung der Lysosomen und kann durch den Einsatz eines Cathepsin B-Inhibitors gehemmt werden.

1.6.3.4. Weitere Ionen und Kälteschädigung

Die Kälteschädigung von humanen Hepatozyten (Pless et al., 2012) und Schweine-Aorten-Endothelzellen (Wille et al., 2008) kann durch Konservierungslösungen mit Kalium als Hauptkation reduziert werden. Allerdings wird Kalium auch als zytotoxisch beschrieben (Mankad et al., 1991) und birgt, gerade bei Zelltransplantationen, durch Zellinfusionen mit hohem Kaliumgehalt die Gefahr von kardialen Arrhythmien.

Das Kation Natrium scheint, entgegen dem klassischen Mechanismus (siehe oben), nicht zur Kälteschädigung zu führen, d.h. natriumarme Konservierungslösungen besitzen keinen besonderen Schutzeffekt (Gizewski et al. 1997). Des Weiteren scheint die Abwesenheit von Calcium (Rauen und de Groot, 2008) zellschädigend zu wirken.

1.6.3.5. Schädigung bei/nach der Wiedererwärmung

Eine anschließende Wiedererwärmung der Zellen auf Körpertemperatur verstärkt diese kälteinduzierte Schädigung deutlich. Diese Wiedererwärmungsschädigung wird durch bereits erfolgte Zellveränderungen während der Kaltinkubation getriggert und weist Anzeichen einer Apoptose auf, wie Chromatin- und Kernkondensation, die Ausbildung von Membranausstülpungen (Blebs) und apoptotischen Körperchen sowie eine partielle DNA-Fragmentation. Offensichtlich ist die Wiedererwärmung für die Induktion des programmierten Zelltodes unabdingbar. Nicht-wiedererwärmte Zellen weisen eine geringere Schädigung auf

und tendieren zum nekrotischen Zelltod oder zu Mischformen (Salahudeen et al., 2001; Kerkweg et al., 2002; Rauen und de Groot 2004).

1.6.4. Zytotoxizität von Protektionslösungen

Es wurden spezielle Konservierungslösungen entwickelt, um Organe vor den verschiedenen Komponenten der Konservierungsschädigung zu schützen. Allerdings bestätigt sich in neueren Untersuchungen eine Zytotoxizität ausgehend von den Protektionslösungen selbst. Zum Einen zeigt sich eine eisenabhängige Zellschädigung durch den Puffer Histidin, welche möglicherweise durch die Bildung eines redox-aktiven Eisen-Histidin-Komplexes bedingt ist (Rauen et al., 2007 b). Zum Anderen spielt die Ionenkomposition der Konservierungslösung eine wichtige Rolle bei der Zellschädigung (siehe 1.6.3.3).

1.7. Zell- und Organprotektionslösungen

Vor Jahrzehnten wurden Konservierungslösungen (Tabelle 1) entsprechend den damaligen physiologischen und pathophysiologischen Erkenntnissen entwickelt, um der hypoxischen und kälteinduzierten Schädigung entgegenzuwirken. Die „optimale“ Protektionslösung sollte die Entstehung einer intrazellulären Azidose verhindern, die Veränderungen der Ionenhomöostase mit Zellschwellung abschwächen, Zellschäden durch freigesetzte Sauerstoffradikale vermindern und Substrate zur Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels bereitstellen (Belzer und Southard, 1988; Belzer, 1993).

Um die Bildung eines Zellödems speziell durch die Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase mit Natrium und Wasserinflux zu verhindern, wurden Konservierungslösungen vom intrazellulären Typ entwickelt, deren Ionenzusammensetzung der des Intrazellularraumes entspricht. Zudem sollte durch den Zusatz impermeabler Substanzen wie Raffinose, Dextran und Mannitol die Zellschwellung reduziert werden, da diese durch ihr hohes Molekulargewicht auch durch eventuell vorgeschädigte Zellmembranen mit erhöhter Permeabilität nicht durchtreten und

Tabelle 1. Konservierungslösungen.

	UW	HTK	Custodiol-N	TiProtec®
Cl ⁻	-	50	30	103
α-Ketoglutarat	-	1	2	2
Aspartat	-	-	5	5
Lactobionat	100	-	-	-
H ₂ PO ₄ ⁻	25	-	-	1
SO ₄ ²⁻	5	-	-	-
Na ⁺	29	15	16	16
K ⁺	125	10	10	93
Mg ²⁺	5	4	8	8
Ca ²⁺	-	0,015	0,02	0,05
Glycin	-	-	10	10
Alanin	-	-	5	5
Tryptophan	-	2	2	2
Histidin	-	198	124	-
<i>N</i> -Acetylhistidin	-	-	57	30
Mannitol	-	30	-	-
Saccharose	-	-	33	30
Glucose	-	-	-	10
HAES (g/l)	50	-	-	-
Adenosin	5	-	-	-
Allopurinol	1	-	-	-
Raffinose	30	-	-	-
GSH	3	-	-	-
Desferal	-	-	0,0153	0,082
LK614	-	-	0,0062	0,017
Insulin (U/l)	40	-	-	-
Dexamethason (mg/l)	16	-	-	-
Penicillin (U/l)	200 000	-	-	-
Osmolarität (mosm/l)	320	310	305	305
pH-Wert	7,4	7,2	7,0	7,0

Alle Konzentrationen sind, soweit nicht anders gekennzeichnet, in mmol/l angeben.

damit den osmotischen Druck aufrechterhalten (Kelly, 2000, Blankensteijn et al, 1991).

Bei Sauerstoffmangel in den Zellen erfolgt die Energiegewinnung mehr oder weniger durch Glykolyse unter vermehrter Laktatbildung mit der Folge einer möglichen intrazellulären Azidose. Zur Vermeidung wurden den Lösungen Puffersubstanzen wie anorganische Phosphatverbindungen oder Histidin zugefügt (Belzer et al., 1988; Bretschneider et al., 1988).

Zur Abpufferung hypoxie- bzw. reperfusionsbedingter freier Radikale wurden zudem Antioxidantien, wie Glutathion und kompetitive Inhibitoren der Xanthinoxidase wie Allopurinol eingesetzt. Zudem wird die Bereitstellung von Ausgangsstoffen zur ATP-Bildung beispielsweise durch den Einsatz von Adenosin oder α -Ketoglutarat gewährleistet (Kelly, 2000).

Durch Bretschneider et al. erfolgte in den 1970ern die Entwicklung einer kardioplegischen Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) (Bretschneider, 1980; Tabelle 1). Der Einsatz von HTK wurde im Laufe der Zeit auf die Leber- und Nierenkonservierung ausgedehnt (Bretschneider et al., 1988).

Belzer et al. entwickelten in den achtziger Jahren eine Konservierungslösung vom intrazellulären Typ, wodurch die Bildung eines Zellödems durch Verminderung des osmotischen Gradienten zwischen intra- und extrazellulärem Kompartiment verhindert werden soll. Die so genannte University of Wisconsin-Lösung (UW) enthält (siehe Tabelle 1) zudem das impermeable Anion Lactobionat, das Trisaccharid Raffinose und Hydroxyethylstärke zu weiteren Minimierung der Zellschwellung (Belzer, 1988). Weitere Komponenten sind Adenosin als Energielieferant und Allopurinol und Glutathion als Antioxidantien. In den folgenden Jahren konnte der experimentelle und klinische Einsatz von UW auf die Konservierung verschiedener Organe und auch Zellen ausgedehnt werden (Liu et al., 2014; Belzer et al., 1993; Blankensteijn et al., 1991; Swanson et al., 1988).

1.7.1. Etablierung neuer Protektionslösungen

Entsprechend dem klassischen Mechanismus der Kälteschädigung (siehe 1.6.3.1.) sind bis heute Protektionslösungen vom intrazellulären Typ mit niedriger Natrium- und Chloridkonzentrationen wie beispielsweise UW etabliert. Allerdings

konnten in diversen Studien neue Pathomechanismen der Konservierungsschädigung als Grundlage neuer Lösungen gezeigt werden. Zum einen wurde eine kälteinduzierte Schädigung als Folge eines Anstiegs des intrazellulären chelatisierbaren Eisenpools mit folgender Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) an diversen Zelltypen beobachtet (Rauen et al., 2000; Rauen und de Groot, 2002; Rauen und de Groot 2004; Zieger und Gupta, 2009). Des Weiteren zeigte sich eine hypoxieinduzierte Zellschädigung mit Ausbildung einer Plasmamembranpore und anschließendem Natriuminflux, welche durch Alanin und Glycin inhibierbar ist (Dong et al., 1998; Frank et al., 2000). Zudem wurde eine Zytotoxizität ausgehend von den etablierten Protektionslösungen selbst, durch die Pufferzusätze Histidin sowie Phosphat, nachgewiesen (Rauen et al., 2007 b; Rauen und de Groot, 2008).

In Anbetracht der genannten aktuellen mechanistischen Gesichtspunkte wurde die neue Organprotektionslösung Custodiol-N basierend auf der klassischen Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) entwickelt (Rauen et al., 2008; Pless et al., 2012). Im Vergleich zu HTK wurde Custodiol-N um die Eisenchelatoren Desferal und LK 614 zur Hemmung der eisenabhängigen Kälteschädigung (Wu et al., 2009), sowie um Alanin und Glycin zum Schutz vor hypoxischer Zellschädigung durch Blockierung der hypoxieinduzierten Membranporenbildung (Frank et al., 2000), ergänzt. Zudem wurde Histidin zum Teil durch das nicht toxische Histidin-Derivat *N*-Acetylhistidin ausgetauscht (Rauen et al., 2007 b; Rauen und de Groot, 2008). Da sich eine moderate Azidose als vorteilhaft herausstellte, weist Custodiol-N einen pH von 7,0 auf (Gores et al., 1988). Weiterhin wurde Mannitol durch die impermeablere Saccharose ersetzt (Wahlberg et al., 1986), α -Ketoglutarat wurde allerdings aus der originalen HTK-Lösung übernommen.

Die neue Organprotektionslösung Custodiol-N zeigte in verschiedenen zellulären Studien eine signifikante Reduktion der kälte- und hypoxieinduzierten Zellschädigung sowie eine Verringerung der Toxizität der Protektionslösung selbst im Gegensatz zu HTK und UW (Rauen et al., 2008). In ersten Transplantationsmodellen weist sie ebenfalls vielversprechende Ergebnisse auf (Wu et al., 2011).

Zur weiteren Optimierung der Konservierung speziell von Zellen und Geweben wurden ausgehend von Custodiol-N als Basislösung weitere Modifizierungen vorgenommen (Wille et al., 2008). Für kleinere Gewebe ist eine niedrigere

Pufferkapazität ausreichend, so dass diese gesenkt und zudem Histidin vollständig durch *N*-Acetylhistidin ersetzt wurde; Glukose wurde als weiteres Energiesubstrat ergänzt (Wille und Rauen, 2010).

Die richtige Ionenkomposition ist eine weitere wichtige Komponente der Basislösung, da diese maßgeblich an der Zytotoxizität der Protektionslösungen beteiligt ist (Rauen et al., 2007 a; Rauen und de Groot, 2008). Aufgrund dessen wurden verschieden modifizierte Lösungen mit zum Teil unterschiedlichen Ergebnissen abhängig vom Zelltyp erprobt. So verringert Chlorid als Hauptanion die kälteinduzierte Zellschädigung in humanen Hepatozyten (Pless et al., 2012), Schweine-Aorten-Endothelzellen sowie Schweine-Aorten-Segmenten (Wille et al., 2008), in kultivierten Rattenhepatozyten (Rauen et al., 2007 a) wirkt es allerdings zytotoxisch und wird daher durch das Anion Lactobionat ersetzt.

Zudem konnte durch den Einsatz von Kalium als Hauptkation, obwohl in früheren Studien als zellschädigend beschrieben (Mankad et al., 1991), eine signifikant geringere Kälteschädigung bei Rattenhepatozyten (Pless et al., 2012) und Schweine-Aorten-Endothelzellen, als in Gegenwart von Natrium als Hauptkation, beobachtet werden, am ehesten aufgrund der Hemmung eines zellulären Kaliumaustroms (Wille et al., 2008). Zum anderen stellte sich heraus, dass ionenreiche Lösungen zum Ausgleich der osmotischen Lücke ionenarmen, saccharosehaltigen Lösungen überlegen sind (Wille et al., 2008) sowie die Abwesenheit von Calcium zellschädigend wirkt. Des Weiteren wurde Adenosin als Additiv diskutiert und in den modifizierten Basislösungen ergänzt, da es das Zellüberleben tendenziell, wenn auch nicht signifikant in Rattenhepatozyten, verbessert (Pless et al., 2012).

Somit zeigen sich neue vielversprechende mechanistische Ansätze zur Verbesserung der Zell- und Gewebekonservierung durch verschiedenste Modifikationen ausgehend von der Basislösung Custodiol-N. Die neue Gefäßlösung TiProtec (Tabelle 1), welche bereits in Europa zur Gefäßkonservierung zugelassen ist, basiert auf den oben genannten Untersuchungen (Wille und Rauen, 2010).

1.7.2. Konservierungsschädigung pankreatischer Inselzellen

Bedauerlicherweise gibt es aktuell keine Protektionslösung, welche speziell auf die Kaltlagerung pankreatischer Inselzellen abgestimmt ist. Die derzeitige Lagerung erfolgt in den eigentlich für solide Organe entwickelten Collins- und University of Wisconsin-Lösungen mit kleineren Modifikationen (Liu et al, 2014; Shirouzu et al., 2006).

Allerdings führt auch diese zur Konservierungsschädigung. Studien zufolge tritt bereits nach 24 h bis 48 h Kaltinkubation ein deutlicher Verlust der Funktionsfähigkeit von Inselzellen in UW-Lösung auf (Kimura et al., 2013; Negishi et al., 2011). Eine Langzeitlagerung ist aktuell nicht möglich. Eine optimale Lagerung der Inseln ist aber gerade aufgrund der wenig verfügbaren Organe und einem Spender-Empfänger-Verhältnis von 2:1 und mehr sehr wichtig (Jahansouz et al., 2011; Kin et al, 2008). Somit kommt der Entwicklung einer optimierten Konservierungslösung für Inselzellen im Rahmen der Inselzelltransplantation große Bedeutung zu.

1.7.3. Aussichten zur Verbesserung der Inselzellkonservierung

Seit den Studien zur Kaltlagerung der Inselzellen in den modifizierten klinisch etablierten Konservierungslösungen (siehe 1.7.2.) sind mehr und mehr neue Erkenntnisse zur Kälteschädigung bekannt geworden (Wille et al., 2008; Rauen et al., 2006; Rauen et al., 1999). Durch eine speziell auf die β -Zellen abgestimmte Konservierungslösung, beispielsweise durch den Einsatz von Eisenchelatoren sowie die Modifizierung der Ionenkonzentration, könnte die Inselzellschädigung möglicherweise deutlich gesenkt werden.

2. Problemstellung

Aktuell können β -Zellen nur kurzzeitig gelagert werden, sei es im Rahmen einer Kultivierung bei 37°C oder der Kaltinkubation, bis es zu einem Funktionsverlust und anschließendem Zelltod kommt. Doch trotz der Lagerung aufgrund des „Organpooling“ vor der Transplantation wird eine große Masse an qualitativ hochwertigen Inseln benötigt. Somit stellt sich in dieser Arbeit die Frage, ob die Kaltlagerung von Inselzellen durch den Einsatz von Eisenchelatoren oder besonderen Ionenkompositionen der Konservierungslösungen optimiert werden kann. Dies erfolgt hier am Modell der Ratteninsulinomzelllinie RIN-m5F.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

Hersteller	Chemikalie
Acros	Lactobionsäure
AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	Dextran 40
Biochrom (Berlin, Deutschland)	Benzylpenicillin
Bristol-Myers Squibb (Princeton, USA)	University of Wisconsin (UW)-Lösung Markenname: ViaSpan
Dr. F. Köhler Chemie (Bensheim, Deutschland)	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK)- Lösung LK 614 N-Acetylhistidin
Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)	z-FA-fmk

Gibco BRL Life Technologies
(Eggenstein, Deutschland)

L-Glutamin
M199-Medium
Penicillin/Streptomycin
Leibovitz-L15-Medium
RPMI 1640-Medium

Merck (Darmstadt, Deutschland)

Alanin
Calciumchlorid
Calciumchlorid-Dihydrat
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-
ethansulfonsäure (HEPES)
Glycin
Insulin
Kaliumchlorid
Kaliumdihydrogenphosphat
Kaliumhydroxid
L-Glutamin
Magnesiumsulfat-Heptahydrat
Magnesiumchlorid-Hexahydrat
Natriumchlorid
Natriumhydroxid
Triton X-100
Trichloressigsäure
2-Thiobarbitursäure
Dimethylsulfoxid (DMSO)

Novartis Pharma (Nürnberg,
Deutschland)

Deferoxaminmesilat (Desferal)

Roche (Mannheim, Deutschland)

NADH

Serva (Heidelberg, Deutschland)

Dexamethason

Saccharose

Glycin

Natriumchlorid

Sigma-Aldrich (Taufkirchen,
Deutschland)

Fötale Kälberserum

Resazurin

Nifluminsäure

Adenosin

Penicillin G

Glukose

Lactobionsäure

L-Arginin

L-Aspartat-Hemimagnesiumsalz

Magnesiumoxid

Natrium-Pyruvat

Tryptophan

α -Ketoglutarat-Natriumsalz

3.2. Sonstige Materialien

Hersteller	Material
------------	----------

Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	Zentrifugen-Röhrchen
	Zellkulturflaschen
	6-well-Platten

3.3. Versuchszellen

In dieser Arbeit wurde die Ratteninsulinomzelllinie RIN-m5F, erworben von der American Type Culture Collection (ATCC), verwendet. Sie entstammt der Ratteninsulinomzelllinie RIN-m, welche Insulin und L-Dopa-Decarboxylase produziert und sezerniert. Anders als die Elternzellen produzieren RIN-m5F-Zellen kein Somatostatin (ATCC Produkt Information).

Die RIN-m-Zelllinie wurde aus einem durch hochdosierte Röntgenstrahlung induzierten Inselzelltumor aus NEDH-Ratten (Inbred New England Deaconess Hospital Rats) isoliert (Gazdar et al., 1980). Bereits Anfang der 80er Jahre wurde diese durch Bhatena et al. (1982) sowie Oie et al. (1983) in insulinsezernierende, somatostatinsezernierende und Zellen ohne Hormonsekretion subkloniert.

Im Folgenden wurde der Klon RIN-m5F von diversen Autoren beschrieben und etablierte sich als Modell der β -Zellen des Pankreas für verschiedenste Fragestellungen (Skelin et al., 2010; Ding et al., 2012). Der größte Unterschied zur β -Zelle liegt allerdings in der fehlenden physiologischen glukose-induzierten Insulinsekretion (Halban et al., 1983).

3.4. Experimentelles Vorgehen

3.4.1. Kultivierung der Ratteninsulinomzellen

Die RIN-m5F-Zelllinie wurde in RPMI-Zellkulturmedium, ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum, L-Glutamin (2 mM), Natriumpyruvat (1 mM), Glukose (25 mM) und Penicillin (50 U/ml)/Streptomycin(50 μ g/ml) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ / 95% Raumluft bei 37 °C (Brutschrank Heraeus Hera cell 240, Hanau; Deutschland) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Zellen wurden durch Trypsinisierung mit 3 ml 0,25 %igem Trypsin in einem 4-5 Tage-Rhythmus subkultiviert und 1:3 auf unbeschichteten Zellkulturflaschen und Platten gesplittet. Die Zellen wurden 4-5 Tage nach der Subkultivierung für die nachfolgenden Experimente genutzt.

3.4.2. Allgemeines experimentelles Vorgehen

Am Anfang aller Versuche wurden die Zellen dreimal mit der „physiologischen“ Pufferlösung Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS) gewaschen und anschließend mit der Inkubationslösung bei Raumtemperatur bedeckt. Versuchsansätze in Bicarbonat-gepufferten Medien wurden in Begasungstöpfen mit einer Atmosphäre aus 5% CO₂, 21% O₂ und 74% N₂ inkubiert. Im Folgenden wurden die Versuchsgefäße für die gewünschte Zeitspanne bei 4°C gelagert.

Am Ende der Kaltlagerung wurden die Zellen einmal sehr vorsichtig mit HBSS gewaschen und teilweise für 3-5 h in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ / 95% Raumluft bei 37°C in verschiedenen Medien wiedererwärmt und anschließend die Zellvitalität bestimmt.

Tabelle 2. Zusammensetzung der Pufferlösung HBSS.

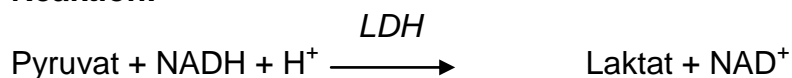
HBSS	
NaCl	137,0 mM
KCl	5,3 mM
MgCl₂	0,5 mM
Na₂HPO₄	0,3 mM
KH₂PO₄	0,4 mM
MgSO₄	0,4 mM
CaCl₂	1,0 mM
HEPES	25,0 mM
Glukose	10,0 mM
pH-Wert	7,35

3.4.3. Bestimmung der Zellschädigung durch Messung der LDH-Freisetzung

Der Verlust der Plasmamembranintegrität und die resultierende Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) in das extrazelluläre Medium wurden als Parameter der Zellschädigung festgelegt. Zur Bestimmung der LDH-Freisetzung wurde zu definierten Zeitpunkten eine Mediumprobe entnommen und die Aktivität der LDH mit Hilfe des Vitalab Selectra E Analyseautomaten

photometrisch bestimmt. Zur Bestimmung der Gesamt-LDH wurden die Zellen am Versuchsende 20 Minuten bei 37°C mit einer Endkonzentration von 1% Triton X-100 in HBSS lysiert. Die Zellschädigung wurde als Prozentsatz der extrazellulären Enzymaktivität der cytosolischen Laktatdehydrogenase bezogen auf die Gesamtaktivität bestimmt. Die Veränderungen der Volumina nach den Probeentnahmen wurden bei der Berechnung berücksichtigt (Rauen et al., 1999).

Reaktion:



3.4.4. Bestimmung der Vitalität mittels Resazurin-Reduktions-Test

Beim Resazurin-Reduktions-Test wird der blaue, nicht fluoreszierende Farbstoff Resazurin durch metabolisch aktive Zellen zu dem pinken Farbstoff Resorufin reduziert. Die Zellen wurden auf 6-wells kultiviert. Die Kontrollzellen (Zeitpunkt 0), sowie die in diversen Medien kalt gelagerten und teilweise 3 h wiedererwärmten Versuchszellen, wurden mit HBSS vorsichtig gewaschen und mit HBSS plus 10 mM Glukose für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Resazurin in einer Endkonzentration von 40 µM zugefügt. Die Reduktion zum Farbstoff Resorufin wurde kontinuierlich bei $\lambda_{\text{exc.}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 590 \text{ nm}$ für 12 min bei 37°C mit dem FLUOstar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Germany gemessen (Perrot et al., 2003). Das Maß des Fluoreszenzanstiegs (Resazurin-Reduktion) als Ausdruck der Vitalität der Versuchszellen wurde prozentual dem Anstieg der Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen zum Zeitpunkt 0 bestimmt.

3.4.5. Bestimmung thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen

Als Maß für eine stattgehabte Lipidperoxidation in der Zelle gelten thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) wie beispielsweise Malondialdehyd (MDA), welche im Rahmen der durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufenen Lipidperoxidation der Zellmembran entstehen. MDA bildet

zusammen mit Thiobarbitursäure (TBA) ein Chromogen, Trimethin, dessen Absorption bei 532 nm am Photometer bestimmt werden kann (Noll et al., 1987). Zur Bestimmung der TBARS wurden die Zellen zunächst unter verschiedenen Bedingungen bei 4°C kaltinkubiert. Anschließend wurden Aliquots des Zellüberstandes mit 30%iger Trichloressigsäure versetzt und ausgefällte Proteine bei 3000 rpm abzentrifugiert. Danach wurde 1 ml des Überstandes in Schliffzentrifugenröhrchen mit eisgekühlter 1%iger Thiobarbitursäure versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C im Wasserbad erhitzt und abermals bei 3000 rpm zentrifugiert. Im Weiteren wurde die Absorption des gebildeten Farbstoffes Trimethin bei 532 nm gegen den Probenleerwert bestimmt (Lambda 40, Perkin Elmer). Zur Quantifizierung der TBARS wie beispielsweise Malondialdehyd wurden gleichbehandelte Standards mit 1,1,3,3 Tetramethoxypropan genutzt (Noll et al., 1987).

3.5. Zusammensetzung verwendeter Konservierungslösungen

Basierend auf der neuen TiProtec-Lösung (Tabelle 1 und 3), eine nach aktuellen mechanistischen Gesichtspunkten modifizierte Konservierungslösung, wurden verschiedenste Derivate (Lösungen 1-9, Tabelle 3) von der Arbeitsgruppe entwickelt (vergleiche Wille et al., 2008). Sie variieren hauptsächlich in der Ionenkonstellation sowie dem pH-Wert und wurden experimentell mit diversen Zusätzen getestet. Ein Teil der Lösungen wurde bereits mit anderen Bezeichnungen veröffentlicht und ist in Tabelle 4 entsprechend erklärt.

Tabelle 3. Verwendete Konservierungslösungen.

	HTK	UW	Lös. 1	Lös. 2 = Ti Protec	Lös. 3	Lös. 4	Lös. 5*	Lös. 6*	Lös. 7	Lös. 8	Lös. 9	KH
H ₂ PO ₄ ⁻	-	25	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1,2
SO ₄ ²⁺	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2
HCO ₃ ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
Magnesiumoxid	-	-	1	-	5,5	5,5	-	5,5	-	-	-	-
Cl ⁻	50	-	8,1	103,1	8,1	8,1	103,1	8,1	97,1	104,1	112,1	128
Lactobionat	-	100	86	-	95	95	-	89	-	-	-	-
Na ⁺	15	29	14	16	14	104	104	102	16	16	103,4	144
K ⁺	10	125	93	93	93	5	5	5	93	93	5	5,9
Mg ²⁺	4	5	1	8	8	8	8	8	8	8	8	1,2
Ca ²⁺	0,015	-	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	2,5
Glycin	-	-	5	10	10	10	10	10	10	10	-	-
Alanin	-	-	-	5	5	5	5	5	5	5	-	-
Tryptophan	2	-	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-
Aspartat	-	-	8	5	5	5	5	5	5	-	-	-
α-Ketoglutarat	1	-	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-
Histidin	198	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	37	20	20	20	20	26	26	20	-	-
Glukose	-	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
N - Acetylhistidin	-	-	30	30	30	30	30	30	30	30	-	-
HAES (g/l)	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adenosin	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Allopurinol	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSH	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Insulin (U/l)	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dexamethason (mg/l)	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillin (U/l)	-	200000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HEPES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	20
weitere Komponenten	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Osmolarität (mosm/l)	310	320	305	305	305	305	305	305	305	305	-	-
pH-Wert	7,2	7,4	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,4	7,4	7,0	7,0	7,4

Alle Konzentrationen sind, soweit nicht anders gekennzeichnet, in mmol/l angegeben. Als Orientierungshilfe wurden die in dieser Arbeit wichtigsten Unterschiede zwischen den einzelnen Lösungen grau hinterlegt. **Zudem befindet sich eine herausnehmbare Tabelle am Ende der Arbeit.**

* Einige Lösungen wurden bereits verwendet in Wille et al., 2008 und Pless et al., 2012, mit unterschiedlicher Bezeichnung siehe Tabelle 4.

Tabelle 4. Bezeichnung bereits verwendeter Lösungen.

Lösung	Entsprechend Wille et al., 2008	Entsprechend Pless et al., 2012
1		
2	8	6
3		
4		
5	9	9
6	10	10
7		
8		
9		

3.6. Zusammensetzung verwendeter Zellkulturmedien

Tabelle 5. Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

	RPMI	DMEM	L15	M199
Na ⁺	139,0	157,0	145,1	144,1
K ⁺	5,3	5,8	5,8	5,4
Mg ²⁺	0,4	0,8	1,8	0,8
Ca ²⁺	0,4	1,8	1,3	1,8
Cl ⁻	109,5	120,9	146,8	125,8
SO ₄ ²⁻	0,4	0,8	0,8	0,8
HCO ₃ ⁻	24	44	14,3	26,2
H ₂ PO ₄ ⁻ / HPO ₄ ²⁻	5,6	0,9	2,0	0,9
NO ₃ ⁻	0,9	0,07*10 ⁻³	-	4*10 ⁻³
Glukose	11,1	25,0	8,3	5,6
D-Galaktose	-	-	5,0	-
Deoxyribose	-	-	-	4*10 ⁻³
Ribose	-	-	-	3*10 ⁻³
Vitamin A	-	-	-	3*10 ⁻⁵
Calciferol	-	-	-	0,3*10 ⁻³
Menadion	-	-	-	6*10 ⁻⁵
α-Tocopherolphosphat	-	-	-	2*10 ⁻⁵
Ascorbinsäure	-	-	-	0,3*10 ⁻³
ATP	-	-	-	2*10 ⁻³
AMP	-	-	-	0,6*10 ⁻³
Adeninsulfat	-	-	-	30*10 ⁻³
Guanin	-	-	-	2*10 ⁻³
Hypoxanthin	-	-	-	2*10 ⁻³

Thymin	-	-	-	2*10 ⁻³
Uracil	-	-	-	3*10 ⁻³
Xanthin	-	-	-	2*10 ⁻³
Pyridoxal	-	-	-	1*10 ⁻⁴
Cholesterol	-	-	-	5*10 ⁻⁴
L-Alanin			2,5	0,3
L-Arginin	1,2	0,4	2,9	0,3
L-Asparagin	0,4	-	1,9	-
L-Aspartat	0,2	-	-	0,5
Cystin	0,207	0,201	-	0,083
L-Cystein	-	-	1,0	1*10 ⁻³
L-Glutamat	0,1	-	-	0,9
L-Glutamin	2,1	4,0	2,1	0,7
Glycin	0,1	0,4	2,7	0,7
L-Histidin	0,1	0,2	1,6	0,1
L-Hydroxyprolin	0,2	-	-	0,1
L-Isoleucin	0,4	0,8	1,0	0,3
L-Leucin	0,4	0,8	1,0	0,9
L-Lysin	0,218	0,8	0,51	0,383
L-Methionin	0,1	0,2	0,5	0,2
L-Phenylalanin	0,1	0,4	0,8	0,3
L-Prolin	0,2	-	-	0,4
L-Serin	0,3	0,4	1,9	0,5
L-Threonin	0,2	0,8	2,5	0,5
L-Tryptophan	25*10 ⁻³	0,1	0,1	0,1
L-Tyrosin	0,1	0,4	1,7	0,2
L-Valin	0,2	0,8	0,9	0,4
P-Aminobenzoessäure	7*10 ⁻³	-	-	0,4*10 ⁻³
Biotin	0,8*10 ⁻³	-	-	4*10 ⁻⁵
Cholin	20*10 ⁻³	29*10 ⁻³	10*10 ⁻³	4*10 ⁻³
Folsäure	2*10 ⁻³	9*10 ⁻³	2*10 ⁻³	2*10 ⁻⁵
i-Inositol	0,2	40*10 ⁻³	10*10 ⁻³	0,3*10 ⁻³
Nikotinsäure	-	-	-	0,2*10 ⁻³
Nikotinamid	8*10 ⁻³	33*10 ⁻³	10*10 ⁻³	0,2*10 ⁻³
D-Pantothensäure	0,5*10 ⁻³	8*10 ⁻³	4*10 ⁻³	2*10 ⁻⁵
Pyridoxin	5*10 ⁻³	20*10 ⁻³	5*10 ⁻³	0,1*10 ⁻³
Riboflavin	5*10 ⁻⁴	1*10 ⁻³	-	3*10 ⁻⁵
Thiamin	3*10 ⁻³	12*10 ⁻³	3*10 ⁻³	3*10 ⁻⁵
Vitamin B12	4*10 ⁻⁶	-	-	-
Glutathion (reduziert)	3*10 ⁻³	-	-	2*10 ⁻³
Natriumpyruvat	-	1,0	5,0	-
Phenolrot	13*10 ⁻³	40*10 ⁻³	30*10 ⁻³	50*10 ⁻³

Alle Konzentrationen sind, soweit nicht anders gekennzeichnet, in mmol/l angegeben.

3.7. Beurteilung der Morphologie

Die Beurteilung der zellulären Morphologie erfolgte in 10- und 20-facher Vergrößerung mit Hilfe des Phasenkontrast Mikroskops Eclipse Ti-U (Nikon, Düsseldorf, Deutschland). Sie wurde visuell beschrieben und bewertet sowie mittels einer digitalen Kamera (Typ EOS D30, Canon, Tokio, Japan) dokumentiert.

3.8. Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden als Doppelansätze mit Zellen aus mindestens vier unterschiedlichen Subkulturen durchgeführt. Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte mit +/- Standardabweichung (SD) dar. Die Daten aus mehreren Versuchsgruppen wurden durch eine Multivarianzanalyse (ANOVA) mit dem Bonferroni post-hoc-Vergleich gegenüber gestellt. Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Kälteinduzierte Schädigung kultivierter Ratteninsulinomzellen in etablierten Konservierungslösungen

Kultivierte Ratteninsulinomzellen weisen bereits nach einer 72-stündigen Kaltinkubation in etablierten Konservierungslösungen sowie in RPMI 1640-Zellkulturmedium eine eindeutige Zellschädigung auf (Abbildung 2). Bei der Kaltlagerung in RPMI 1640-Zellkulturmedium zeigte sich ein Vitalitätsverlust von ca. 30%, der sich während einer dreistündigen Wiedererwärmungsphase geringfügig steigerte. Bei der Kaltinkubation in den klinisch eingesetzten Konservierungslösungen University of Wisconsin-(UW)-Lösung und Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) kommt es sogar zu einem Vitalitätsverlust

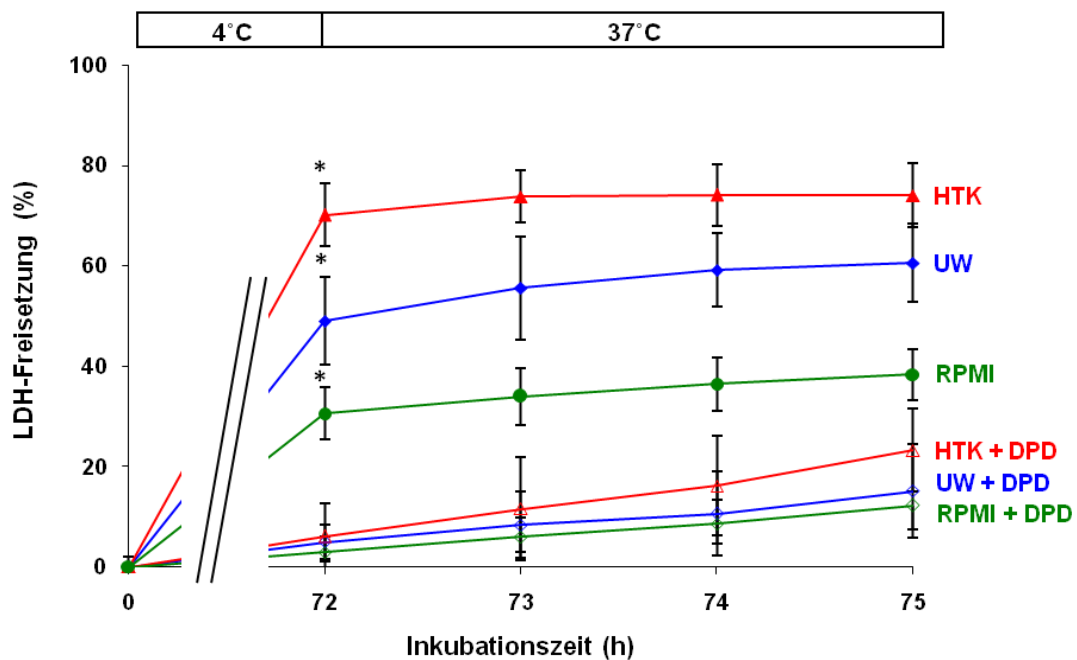


Abbildung 2. Kälteschädigung in Konservierungslösungen und Schutzeffekt des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 72 h bei 4°C in RPMI-Zellkulturmedium, University of Wisconsin-Lösung (UW) und Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert und für 3 h in RPMI-Zellkulturmedium auf 37°C wiedererwärmt. Einige Ansätze wurden mit 100 µM 2,2'-Dipyridyl (DPD) versetzt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

* signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung ohne Eisenchelator, $p < 0,05$.

von 50% bzw. 70%. Die Kaltlagerung in Zellkulturmedium zeigt somit im Gegensatz zu den etablierten Protektionslösungen eine deutlich geringere Zellschädigung.

4.2. Eisenabhängige Kälteschädigung

4.2.1. Schutzeffekt von Eisenchelatoren

Durch den Einsatz des Eisenchelators 2,2'-Dipyridyl (DPD) konnte die kälteinduzierte Zellschädigung, unabhängig vom eingesetzten Inkubationsmedium, nahezu vollständig und signifikant gehemmt werden (Abbildung 2). Nach 72-stündiger Kaltlagerung in UW- und HTK-Lösung wurde der Vitalitätsverlust durch den Zusatz des Eisenchelators von über 50 % auf unter 10 % deutlich reduziert. Auch in RPMI-Zellkulturmedium betrug die Schädigung nach Zusatz von DPD nur 3%. Lediglich die geringe Zellschädigungszunahme während der Wiedererwärmungsphase blieb unbeeinflusst.

Zur Bestätigung dieser eisenabhängigen Kälteschädigung wurde ein weiterer Eisenchelator, Deferoxaminmesilat (Desferal), in der Lösung mit den zuvor höchsten (RPMI) bzw. den geringsten Schutzeigenschaften (HTK) zugefügt. Es zeigte sich ein ähnlicher Schutzeffekt mit einer signifikanten Verminderung des Vitalitätsverlustes in allen eingesetzten Medien nach 72 h Kaltinkubation und anschließender Wiedererwärmung (Abbildung 3).

4.2.2. Resazurin-Reduktions-Test zur Bestätigung des Schutzeffektes durch Eisenchelatoren

Das Auftreten einer eisenabhängigen Zellschädigung während der Kaltlagerung wurde durch den Resazurin-Reduktions-Test bestätigt. Insbesondere in den Konservierungslösungen UW und HTK konnte die Vitalität nach 72 h Kaltlagerung und anschließender Wiedererwärmung durch den Einsatz des Chelators Desferal signifikant erhöht werden (Abbildung 4). Da in RPMI die Zellschädigung von vorne

herein vergleichsweise gering war, stellte sich entsprechend ein geringerer Schutzeffekt eines Eisenchelators dar (Abbildung 4).

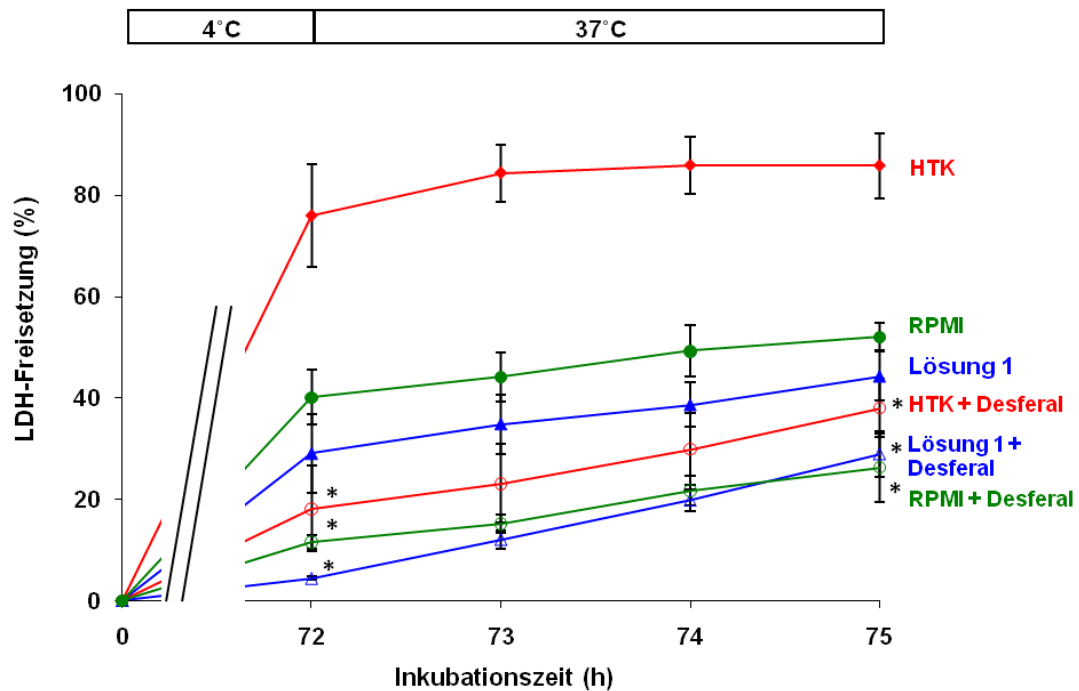


Abbildung 3. Kälteschädigung in Konservierungslösungen und Schutzeffekt des Eisenchelators Desferal.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 72 h bei 4°C in RPMI-Zellkulturmedium, Lösung 1 und Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert und für 3 h in RPMI-Zellkulturmedium auf 37°C wiedererwärmt. Einige Ansätze wurden mit 1 mM Desferal versetzt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

* signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung ohne Desferal nach 72 h bei 4 °C und nach 3 h Wiedererwärmung, $p < 0,05$.

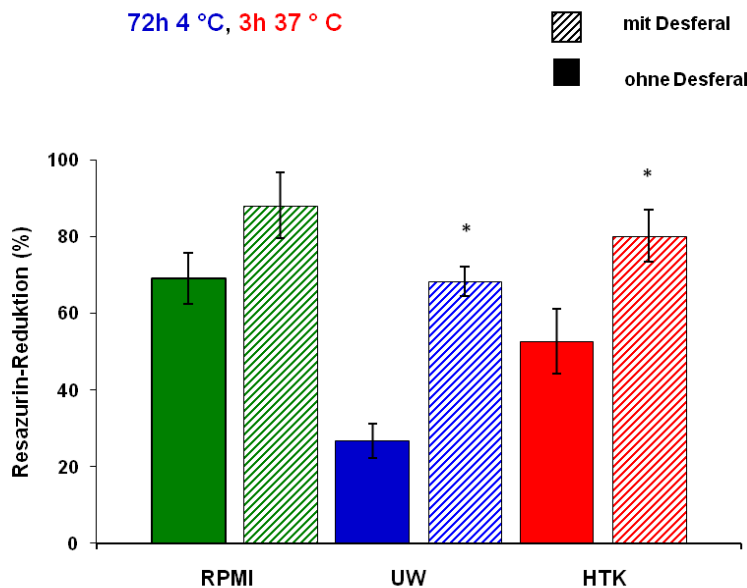


Abbildung 4. Vitalitätsbestimmung mittels Resazurin-Reduktions-Test und Schutzeffekt des Eisenchelators. Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 72 h bei 4°C in RPMI-Zellkulturmedium, University of Wisconsin-Lösung (UW) und Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) inkubiert und danach für 3 h in RPMI-Zellkulturmedium auf 37°C wiedererwärmt. Einige Ansätze wurden mit 1 mM Desferal versetzt. Die Zellvitalität wurde durch die Messung der metabolischen Aktivität der Zellen durch Reduktion des Farbstoffes Resazurin bestimmt. 100 % beziehen sich auf nicht kalt gelagerte Kontrollzellen. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

* signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung ohne Desferal, $p < 0,05$.

4.2.3. Abhängigkeit der Reversibilität der morphologischen Veränderungen vom Einsatz der Eisenchelatoren

Kultivierte Ratteninsulinomzellen lagern sich zu flachen Inseln zusammen, welche sich nach und nach ausspreizen und durch Zellausläufer verbinden (Wärmekontrolle, Abbildung 5 A). Nach Kaltinkubation mit und ohne den Zusatz eines Eisenchelators und anschließender Wiedererwärmung zeigten sich in den Protektionslösungen morphologisch deutliche Unterschiede.

Insbesondere nach 72 h Kaltinkubation in chelatorfreier HTK- und UW-Lösung (Abbildung 5 B, F) fanden sich vermehrt abgelöste Zellen sowie deutliche Zellabrundungen mit Aufhebung der Inselstruktur. Auch in RPMI-Zellkulturmedium (Abbildung 5 J) zeigten sich ohne Zusatz eines Chelators Zellabrundungen,

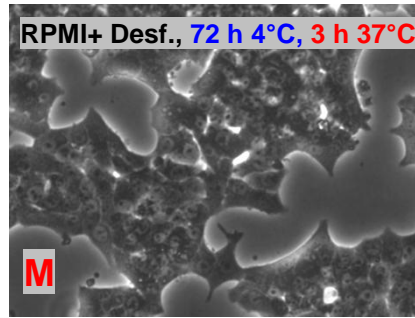
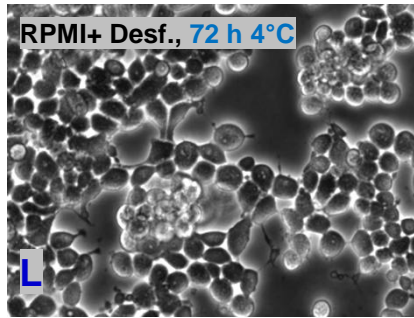
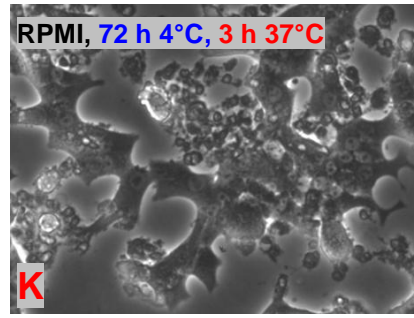
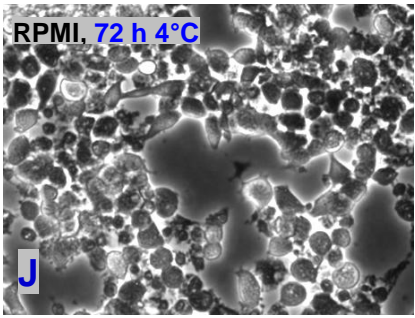
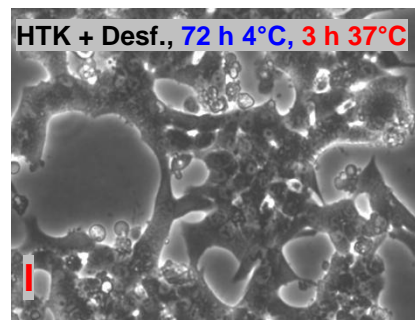
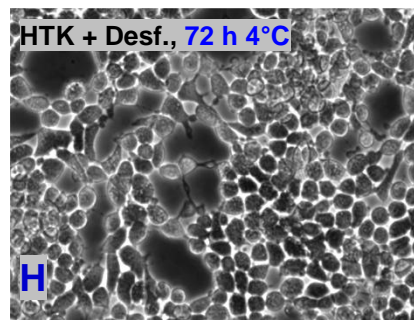
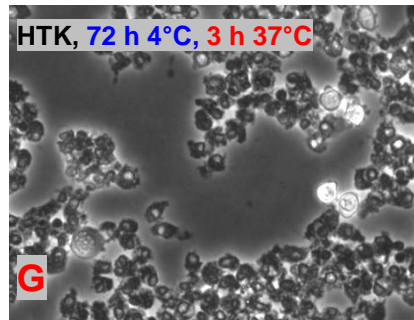
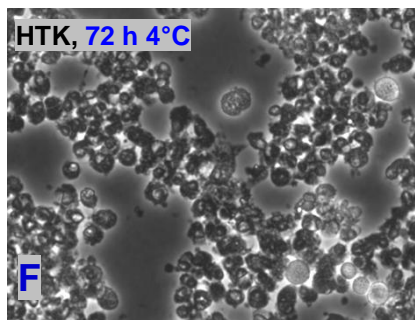
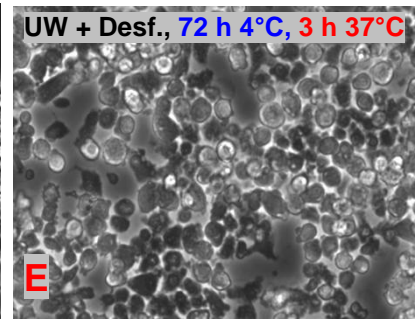
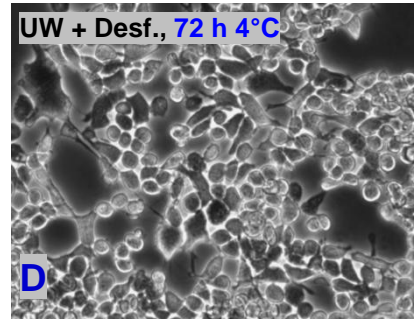
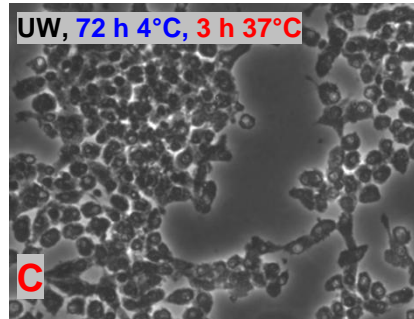
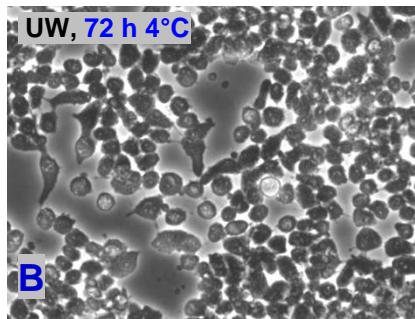
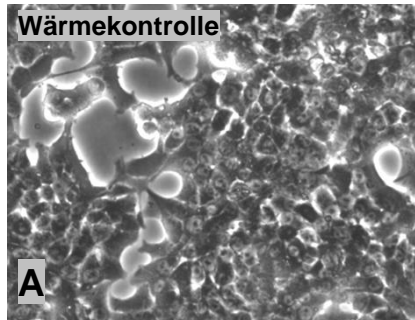


Abbildung 5. Wärmekontrolle und morphologische Veränderungen nach Kaltinkubation und Wiedererwärmung.

Die Ratteninsulinomzellen wurden 5 d bei 37 °C in RPMI-Zellkulturmedium kultiviert (Kontrolle A). Ein Teil der Zellen wurde für 72 h bei 4°C (blau) in RPMI-Zellkulturmedium (J - M), University of Wisconsin - (UW, B - E) und Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK, F - I) inkubiert und für 3 h in RPMI Zellkulturmedium auf 37°C (rot) wiedererwärmt (C, E, G, I, K, M). Einige Ansätze wurden mit 1 mM Desferal (D, E, H, I, L, M) versetzt. Die Beurteilung erfolgte durch eine 20-fache Vergrößerung mit einem Phasenkontrast-Mikroskop und anschließender Dokumentation mit Hilfe einer Digitalkamera.

allerdings kaum Ablösungen. In Gegenwart eines Eisenchelators wurden in allen Medien (Abbildung 5 D, H, L) sehr wenig Zellablösungen, aber eine reduzierte Anzahl an Zellausläufern mit Aufhebung der Inselstruktur beobachtet.

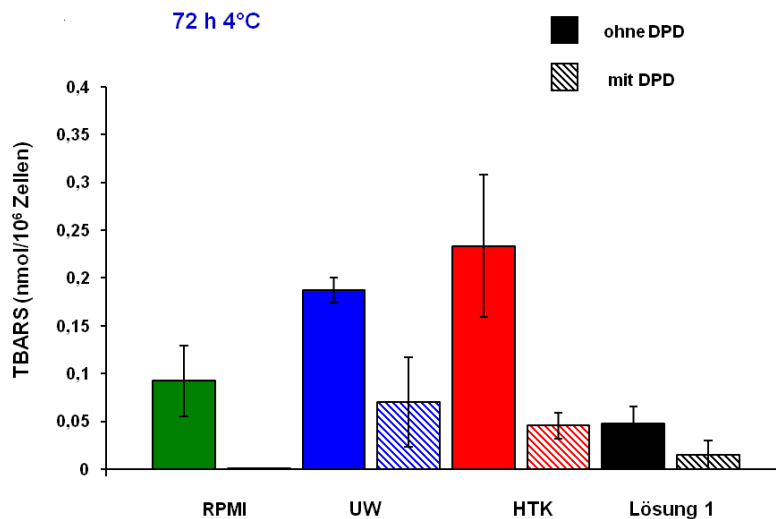
Nach dreistündiger Wiedererwärmung konnte in RPMI (Abbildung 5 K, M), unabhängig vom Zusatz eines Eisenchelators, während der Wiedererwärmung eine Reversibilität der Zellveränderungen beobachtet werden. So lagerten sich die Zellen erneut zu verbundenen Inseln zusammen. Ein ähnliches reversibles Bild fand sich bei den zuvor in HTK plus Desferal (Abbildung 5 I) gelagerten Zellen. Die in UW plus Desferal (Abbildung 5 E) inkubierten Inseln zeigten hingegen weniger Zellverbindungen. Wurden die etablierten Konservierungslösungen nicht mit einem Eisenchelator (Abbildung 5 C, G) versetzt, so zeigte sich keine Wiederausspreitung, die Zellen waren weiterhin zusammengezogen und abgerundet.

4.2.4. Nachweis einer Lipidperoxidation

Die Hemmung der kälteinduzierten Schädigung von Ratteninsulinomzellen durch Eisenchelatoren lässt auf eine Zellschädigung in Folge einer eisenabhängigen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) schließen. Nach Kaltinkubation und Wiedererwärmung in UW- und HTK-Lösung konnte ein deutlicher Anstieg thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBARS), als Indikator einer Lipidperoxidation, nachgewiesen werden (Abbildung 7 A). In chelatorfreien RPMI-Zellkulturmedium zeigte sich nach 72 h Kaltlagerung eine geringere Bildung von TBARS. Durch Verminderung des redox-reaktiven Eisens mittels DPD konnte die

Lipidperoxidation in allen eingesetzten Lösungen deutlich verringert werden. Die mitbestimmten LDH-Kontrollen (Abbildung 7 B) lieferten analoge Ergebnisse zum Schutzeffekt des Eisenchelators.

A



B

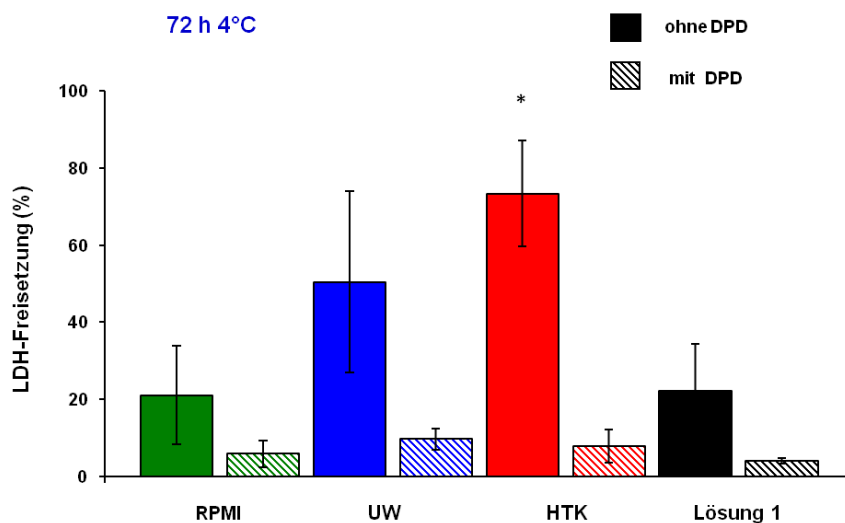


Abbildung 7. Lipidperoxidation und Zellschädigung nach der Kaltlagerung.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 72 h bei 4°C in RPMI, University of Wisconsin- Lösung (UW), Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) und Lösung 1 inkubiert. Einige Ansätze wurden mit 100 µM 2,2'-Dipyridyl (DPD) versetzt. Als Indikator einer oxidativen Schädigung wurden TBARS bestimmt (A). Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt (B). Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

* signifikant zur Kaltlagerung in RPMI und Lösung 1, $p < 0,05$.

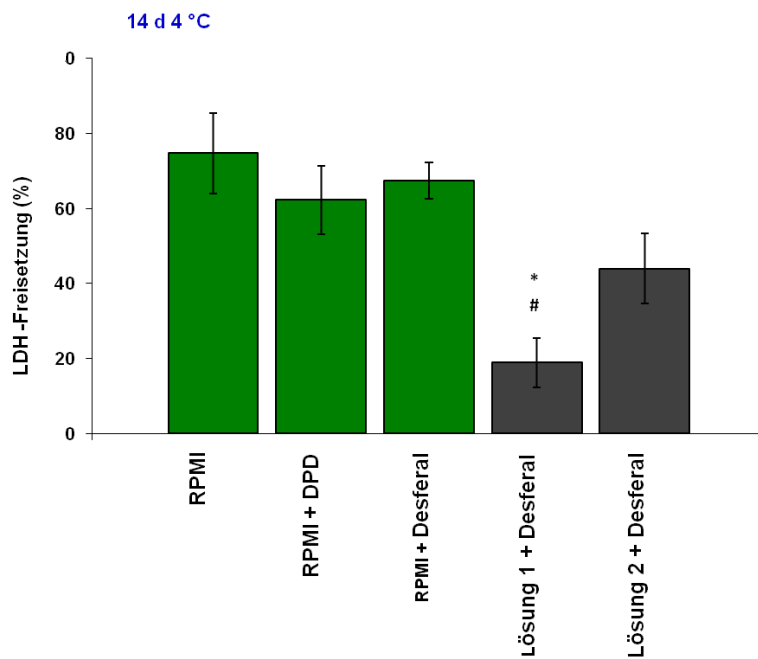
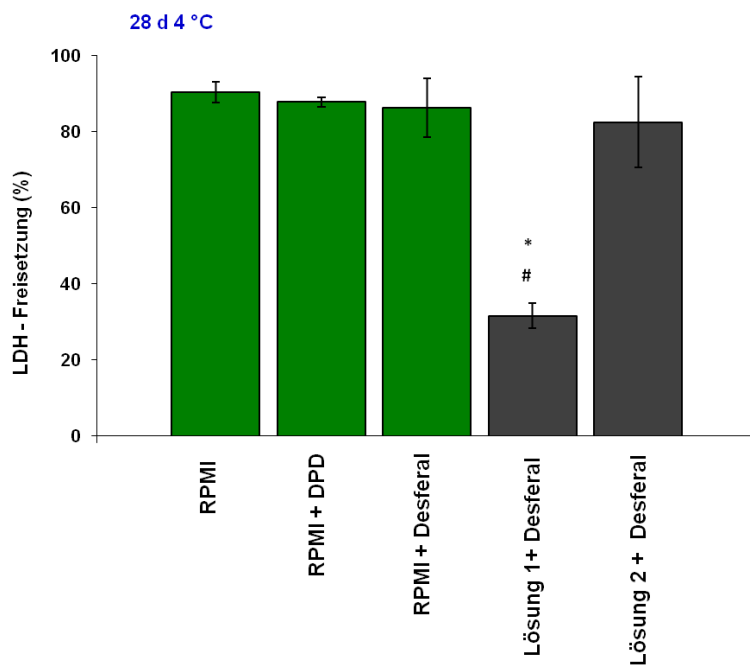
4.3. Testung der neuen Zell- und Gewebeprotektionslösungen

Wie bereits beschrieben, wurden basierend auf der klassischen HTK-Lösung neu modifizierte Konservierungslösungen (Tabellen 1, 3; Kapitel 1.7.1) mit Erfolg entwickelt und für die Gefäßlagerung (TiProtec) etabliert (Rauen et al., 2008; Rauen et al., 2008; Wille et al., 2008; Pless et al., 2012). Im Folgenden wurden verschiedene TiProtec-Varianten an den Ratteninsulinomzellen getestet und weiter optimiert, um die bestmögliche Kaltlagerung zu erreichen.

Zunächst wurden die Inselzellen mit der in experimentellen Studien zu diesem Zeitpunkt besten Protektionslösung für kultivierte Rattenhepatozyten (Rauen et al., unpublizierte Daten 2007) für 72 h kaltinkubiert und mit RPMI sowie etablierten Organkonservierungslösungen verglichen. Diese chloridarme Lösung 1 (Tabelle 3) ist eine Vorläuferlösung von TiProtec und wurde, wie diese, entsprechend den Anforderungen an die Kaltlagerung von Zellen und kleinen Geweben mit einer, im Vergleich zu Organprotektionslösungen, reduzierten Pufferkapazität ausgestattet. Nach 72 h Kaltlagerung in Lösung 1 zeigte sich, im Gegensatz zu den etablierten Protektionslösungen UW und HTK, ein vergleichbar guter Schutz wie in RPMI-Zellkulturmedium (Abbildung 3). Entsprechend fand sich eine sehr geringe Bildung von TBARS als Zeichen einer geringen Lipidperoxidation nach 72 h Kaltinkubation in Lösung 1 (Abbildung 7 A). Durch den Einsatz des Eisenchelators Desferal konnte auch in Lösung 1 die Zellschädigung nahezu vollständig gehemmt werden (Abbildung 3). Der Zusatz des Eisenchelators DPD bestätigte ein ähnlich gutes Ergebnis (Abbildung 7 B).

Aufgrund der guten Ergebnisse wurde die Inkubationszeit zur weiteren Optimierung auf 14 und 28 Tage verlängert. Zudem wurde neben den beiden vielversprechendsten Medien nach 72 h, RPMI und Lösung 1, eine weitere neue Lösung getestet. Die chloridreiche Ionenkomposition dieser Lösung 2 (Tabelle 3) zeigte deutliche protektive Effekte in verschiedenen Studien an anderen Zelltypen (Rauen et al., 2007, Wille et al., 2008).

Nach 14 Tagen Kaltlagerung in RPMI wurde ein Vitalitätsverlust von ca. 75%, nach 28 Tagen von 90% unabhängig vom Einsatz eines Eisenchelators beobachtet, dies galt sowohl für den Einsatz des Eisenchelators Desferal, als auch für den Einsatz des Eisenchelators DPD (Abbildung 8 A, B). Es bestätigte sich

A**B****Abbildung 8. Schutzeffekt der chloridarmen Protektionslösung 1.**

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 2 und 4 Wochen bei 4°C in RPMI, Lösung 1 (chloridarm) und 2 (chloridreich) inkubiert. Einige Ansätze wurden mit 1 mM Desferal oder 100 µM DPD versetzt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

* signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung in RPMI + Desferal, $p < 0,05$.

signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung in der chloridreichen Lösung 2 + Desferal, $p < 0,05$.

nach der Langzeitinkubation eine neue eisenunabhängige Komponente der Kälteschädigung.

Durch Kaltlagerung in der chloridarmen Lösung 1 mit dem Zusatz des Eisenchelators Desferal ließ sich hingegen die Zellschädigung nach 14 Tagen auf 18 %, nach 28 Tagen auf 30 % senken. In der chloridreichen Lösung 2 supplementiert mit Desferal fand sich nach 14 Tagen ein Vitalitätsverlust von 45 %, nach 28 Tagen von 80 %. In beiden modifizierten Konservierungslösungen konnte damit nach 14 Tagen Kälte eine weitaus höhere Zellvitalität als in RPMI-Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Nach 28 Tagen Kaltlagerung in Lösung 1 (mit Eisenchelator) konnte die Zellschädigung deutlich reduziert werden, wohingegen in Lösung 2 (mit Eisenchelator) eine massive Zellschädigung ähnlich wie in RPMI (mit Eisenchelator) beobachtet wurde. Somit konnte die eisenunabhängige Kälteschädigung durch die chloridarme Lösung 1 effektiv gesenkt werden (Abbildung 8 A, B).

4.4. Chloridabhängige Kälteschädigung

4.4.1. Schutzeffekt chloridarmer Protektionslösungen

Bei der Kälteschädigung von Ratteninsulinomzellen scheint Chlorid eine Rolle zu spielen (Abbildung 8). Aufgrund dessen wurde im Weiteren die chloridreiche Lösung 2 direkt mit der entsprechenden chloridarmen Lösung 3 (Tabelle 3), beide ergänzt mit einem Eisenchelator, verglichen. In Lösung 3 wurde Chlorid durch Laktobionat ersetzt (Restchloridgehalt: 8,1 mM): durch diese chloridarme Lösung, wurde die eisenunabhängige Kälteschädigung signifikant gesenkt (Abbildung 9). Im Gegensatz zu Lösung 2 konnte der Vitalitätsverlust nach 28 Tagen Kaltinkubation deutlich von 80 % auf 20 % reduziert und somit eine chloridabhängige Kälteschädigung nachgewiesen werden.

Der Einfluss von Chlorid auf die Zellschädigung in der Kälte konnte durch das Lösungspärchen 4 (chloridarm, natriumreich) und 5 (chloridreich, natriumreich) (Tabelle 3) bestätigt werden. Es unterscheidet sich durch das Natriumkation von Lösung 2 (chloridarm, kaliumreich) und 3 (chloridreich, kaliumreich). Durch den Einsatz der chloridarmen Lösung 4 (natriumreich) konnte die Kälteschädigung im

Vergleich zur chloridreichen Lösung 5 (natriumreich) signifikant gesenkt werden (Abbildung 9).

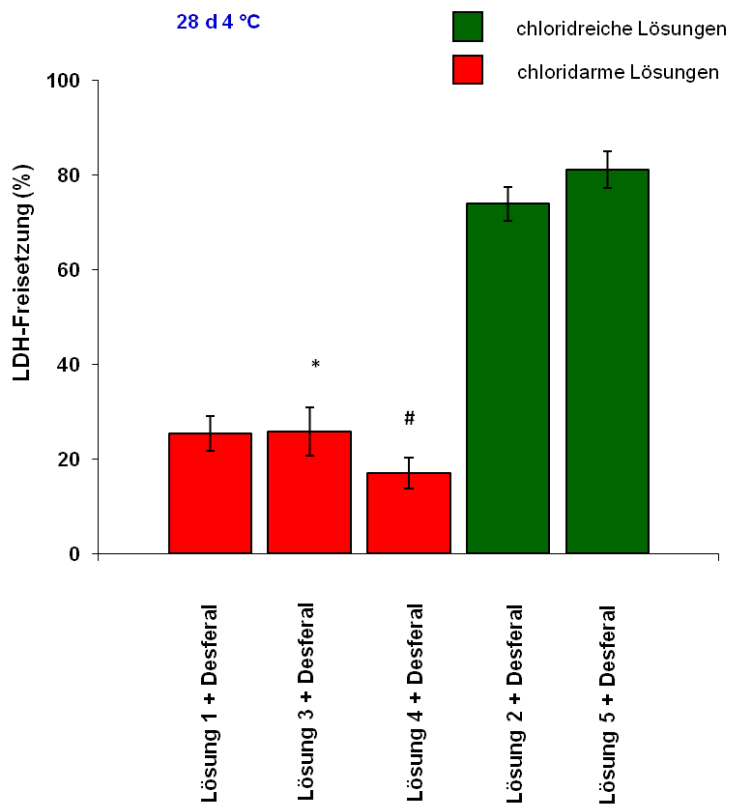


Abbildung 9. Chloridabhängige Zellschädigung in modifizierten Protektionslösungen.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 4 Wochen bei 4°C in den chloridarmen Lösungen 1, 3 und 4 sowie den chloridreichen Lösungen 2 und 5 inkubiert. Alle Ansätze wurden mit 1 mM Desferal versetzt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

* signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung in der chloridreichen Lösung 2, $p < 0,05$.

signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung in der chloridreichen Lösung 5, $p < 0,05$.

4.4.2. Untersuchungen zum Mechanismus der chloridabhängigen

Kälteschädigungskomponente

Aufgrund der kälteabhängigen Zellschädigung in chloridreichen Protektionslösungen wurden die Chloridkanalblocker Nifluminsäure und 5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure (NPPB), der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Co-Transporter-Hemmstoff Furosemid sowie der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher-Hemmstoff 4-Acetamido-

4'-Isothiocyanato-Stilben-2,2'-Disulfonsäure (SITS), als mögliche Inhibitoren der Kälteschädigung getestet. Nifluminsäure, SITS, NPPB sowie Furosemid wurden in der chloridreichen Lösung 5 eingesetzt, um einen möglichen Chlorideinstrom in die Zelle zu hemmen. Nach 28 Tagen Kaltlagerung zeigte sich allerdings kein Schutzeffekt der genannten Substanzen im Vergleich zu Lösung 5 bzw. zur respektiven Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 10).

Zudem wurde in der Literatur bereits bei kultivierten Rattenhepatozyten eine spezielle, durch Cathepsin B vermittelte, hypotherme Zellschädigung in chloridreichen Lösungen beschrieben (Knoop, 2011). Diese konnte durch Hemmung von Cathepsin B inhibiert werden. Aufgrund dessen erfolgte auch bei Ratteninsulinomzellen die Testung des Cathepsin B-Inhibitors *N*-Benzyloxycarbonyl-Phenylalanin-Alanin Fluoromethylketon (z-FA-fmk) während der Kaltlagerung in der chloridreichen Lösung 5. Es konnte jedoch kein Schutzeffekt beobachtet werden (Abbildung 11).

4.5. Optimierung der Protektionslösung für Inselzellen

Durch den Einsatz der modifizierten Konservierungslösungen ergänzt mit einem Eisenchelator konnte die Lagerung der Inselzellen deutlich verbessert werden. Insbesondere chloridarme Lösungen wiesen einen signifikanten Schutzeffekt auf. Daher wurden Komponenten wie die Kationenzusammensetzung, die Optimierung der Eisenchelatorkonzentration, der pH-Wert sowie der Einsatz von Adenosin oder Dextran zur weiteren Verbesserung getestet.

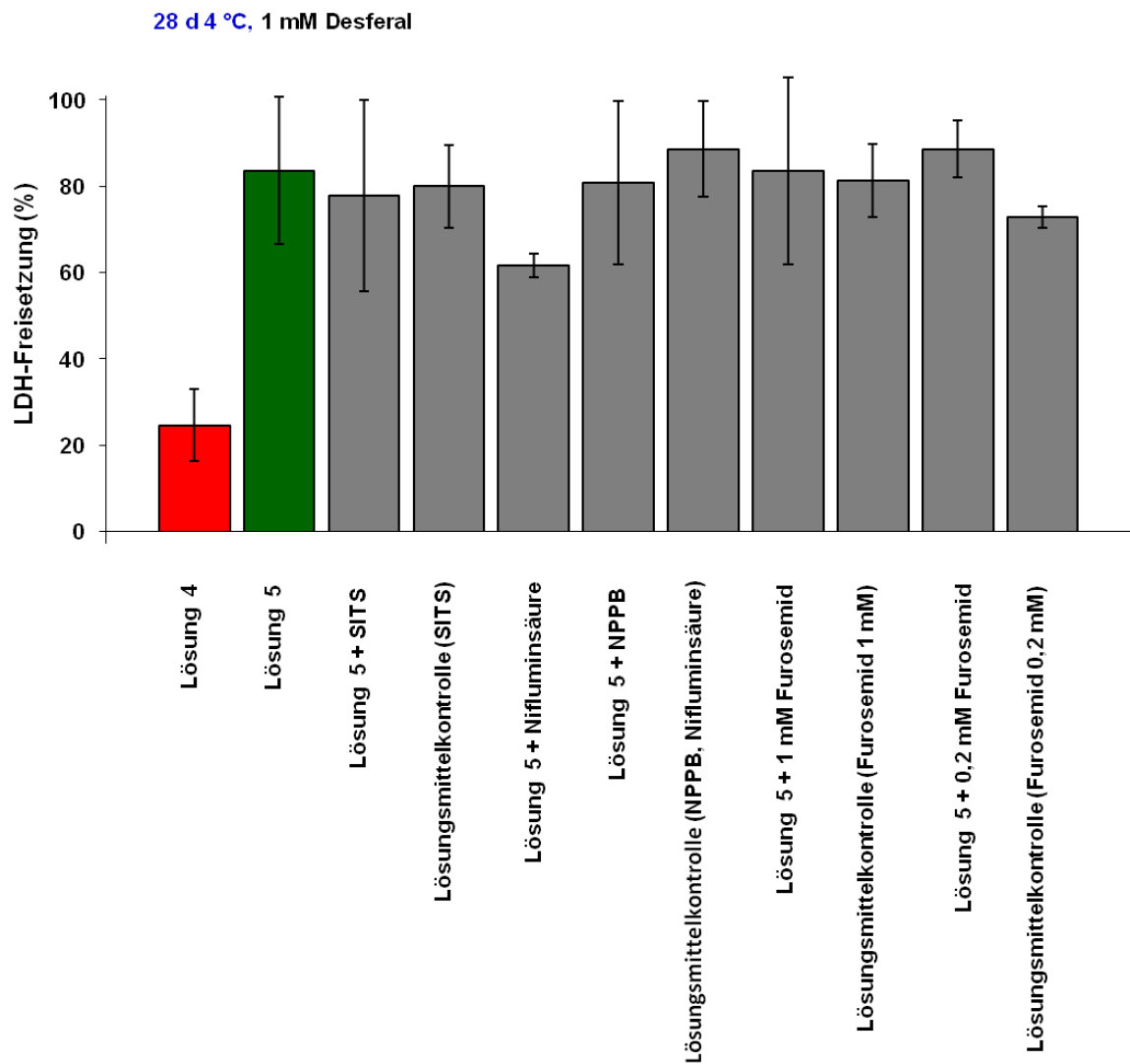


Abbildung 10. Mechanismus der chloridabhängigen Kälteschädigung. Effekt von Chloridkanalblockern und Transporterhemmstoffen.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden 4 Wochen bei 4°C in Lösung 4 (chloridarm, rot) und Lösung 5 (chloridreich, grün) mit 1 mM Desferal inkubiert. Die Ansätze wurden zum Teil mit den Chloridkanalblockern Nifluminsäure (100 µM) und NPPB (100 µM) sowie den Transporterhemmstoffen SITS (0,25 mM) und Furosemid (1 mM; 0,2 mM) versetzt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 3 Versuchen.

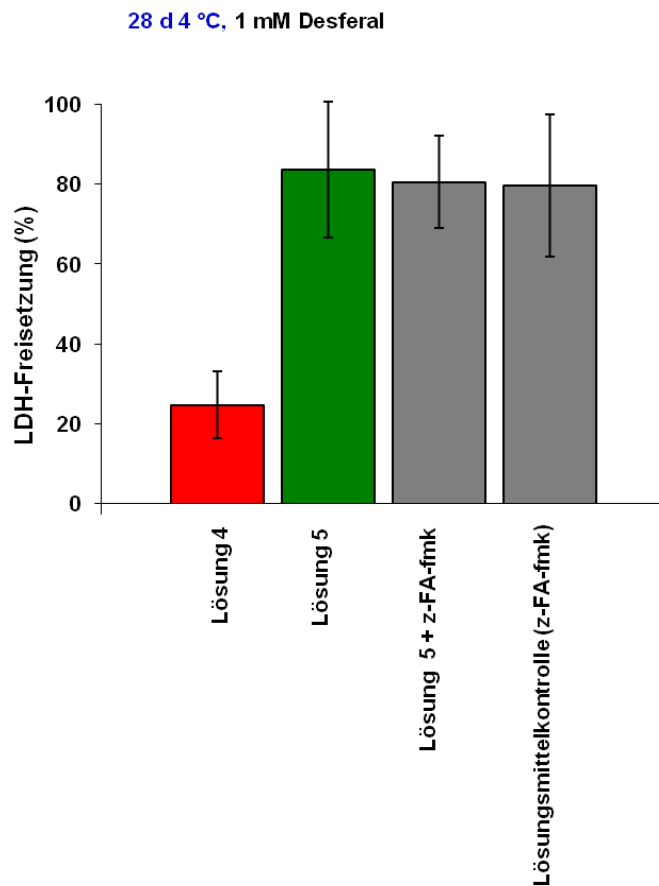


Abbildung 11. Mechanismus der chloridabhängigen Kälteschädigung. Effekt des Cathepsin B-Inhibitors.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden 4 Wochen bei 4°C in Lösung 4 (chloridarm, rot) und Lösung 5 (chloridreich, grün) mit 1 mM Desferal inkubiert. Die Ansätze wurden zum Teil mit dem Cathepsin B-Inhibitor z-FA-fmk (10 µM) versetzt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 3 Versuchen.

4.5.1. Kationenzusammensetzung: Natrium vs. Kalium

Um die Frage der optimalen Kationenzusammensetzung zu klären, wurde bereits oben die chloridarme, kaliumreiche Lösung 3 mit der direkt vergleichbaren chloridarmen, natriumreichen Lösung 4 eingesetzt (Abbildung 9). Nach 28 Tagen Kaltinkubation fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Lösung 3 und 4. In der natriumreichen Lösung 4 zeigte sich allerdings tendenziell die geringste Zellschädigung mit etwa 20 %. Aufgrund dessen erfolgten alle weiteren

Untersuchungen in der chloridarmen, natriumreichen Lösung 4, als zu diesem Zeitpunkt beste Basislösung zur Inselzellkonservierung.

Auch in den chloridreichen Lösungen wurde Kalium durch Natrium ersetzt (Abbildung 9). Auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der kaliumreichen Lösung 2 und natriumreichen Lösung 5.

4.5.2. Einfluss verschiedener Eisenchelatoren und deren Konzentration

Zur weiteren Optimierung wurde der Einfluss verschiedener Eisenchelatoren und deren Konzentrationen verglichen. Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften des Eisenchelators Desferal sowie seiner Größe ist dieser nur schwer membranpermeabel. Somit wurde zudem das lipophile Hydroxamsäure-Derivat 3,4-Dimethoxy-*N*-Methyl-Benzhydroxamsäure (LK 614) getestet.

Allerdings wurde nach 28 d Kaltinkubation in Lösung 4 ergänzt mit jeweils 1 mM Desferal, 0,5 mM Desferal + 0,2 µM LK 614 oder 0,5 mM Desferal + 0,2 µM LK 614 kein signifikanter Unterschied der Zellschädigung beobachtet. Der alleinige Einsatz von Desferal zeigte tendenziell die geringste Zellschädigung, so dass die beste Basislösung (Lösung 4) im Weiteren mit 1 mM Desferal supplementiert wurde (Tabelle 6).

Tabelle 6. Verschiedene Chelatorkonzentrationen in der Kälte.

Chelatorkonzentration		LDH-Freisetzung (%)
	1 mM Desferal	22 ± 5
Lösung 4 +	0.5 mM Desferal + 20 µM LK614	25 ± 3
	0.2 mM Desferal + 20 µM LK614	33 ± 4

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 4 Wochen bei 4°C in der chloridarmen, natriumreichen Lösung 4 inkubiert. Alle Ansätze wurden mit den Eisenchelatoren Desferal und/oder LK614 in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

4.5.3. Einfluss des pH-Wertes

Es wurden verschiedene pH-Werte in Verbindung mit einer chloridreichen und chloridarmen Variante getestet. Nach 14 und 28 Tagen zeigte sich kein Unterschied zwischen dem pH-Wert 7,4 in der chloridarmen Lösung 6 sowie den pH-Wert 7,0 in der korrespondierenden chloridarmen Lösung 4 (Tabelle 7). Im Vergleich zwischen der chloridreichen Lösung 5 mit dem sauren pH 7,0 und der chloridreichen Lösung 7 mit dem pH 7,4 konnte jedoch eine leicht geringere Zellschädigung bei einem pH-Wert von 7,4 beobachtet werden (Tabelle 7).

Tabelle 7. Verschiedene pH-Werte in der Kälte.

	pH-Wert	LDH-Freisetzung (%)	
		14 d	28 d
Lösung 4 (Cl ⁻ ↓) + Desferal	pH 7,0	8 ± 1	16 ± 2
Lösung 6 (Cl ⁻ ↓) + Desferal	pH 7,4	9 ± 2	16 ± 5
Lösung 5 (Cl ⁻ ↑) + Desferal	pH 7,0	17 ± 10	81 ± 5
Lösung 7 (Cl ⁻ ↑) + Desferal	pH 7,4	13 ± 1	65 ± 6

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 2 und 4 Wochen bei 4°C in den chloridarmen Lösungen 4 (pH 7,0) und 6 (pH 7,4) sowie den chloridreichen Lösungen 5 (pH 7,0) und 7 (pH 7,4) inkubiert. Alle Ansätze wurden mit 1 mM Desferal versetzt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

4.5.4. Einfluss von Adenosin und Dextran

Darüber hinaus wurde der Effekt von Adenosin und Dextran auf die Konservierung kultivierter Ratteninsulinomzellen untersucht. Die Zellen wurden für 28 Tage in der optimierten Basislösung mit dem Zusatz von Adenosin und/oder Dextran 40 inkubiert.

Der alleinige Einsatz von Adenosin zeigte keinen, der alleinige Einsatz von Dextran 40 einen nicht signifikanten Effekt (Tabelle 8). Nach Kaltinkubation in

Gegenwart von Dextran 40 und Adenosin konnte der Vitalitätsverlust tendenziell weiter reduziert werden.

Um den Dextraneffekt weiter zu evaluieren wurde die Inkubationszeit auf 42 Tage verlängert. In Lösung 4 ergänzt mit Desferal betrug die Zellschädigung $31 \pm 7\%$, wurde Dextran 40 ergänzt, konnte der Vitalitätsverlust um etwa 10 %, allerdings nicht signifikant, reduziert werden (Abbildung 12).

Tabelle 8. Zusatz von Adenosin und Dextran in der Kälte.

Zusätze	LDH-Freisetzung (%)
Desferal	22 ± 3
Desferal + Adenosin	21 ± 3
Lösung 4 +	
Desferal + Adenosin + Dextran	12 ± 1
Desferal + Dextran	15 ± 2

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 4 Wochen bei 4°C in der chloridarmen Lösung 4 inkubiert. Alle Ansätze wurden mit 1 mM Desferal versetzt. In einem Teil der Experimente wurden 5 mM Adenosin oder 50 g/l Dextran 40 zugefügt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 3 Versuchen.

4.6. Hemmung der chloridabhängigen Kälteschädigung durch Dextran

Zur Vollständigkeit wurde Dextran ebenfalls der chloridreichen Lösung 5 zugesetzt. Dabei fand sich überraschenderweise nach 42 Tagen Kaltlagerung kultivierter Ratteninsulinomzellen eine Hemmung der chloridabhängigen Zellschädigung. Der Vitalitätsverlust konnte signifikant, auf circa 20%, gesenkt werden (Abbildung 12).

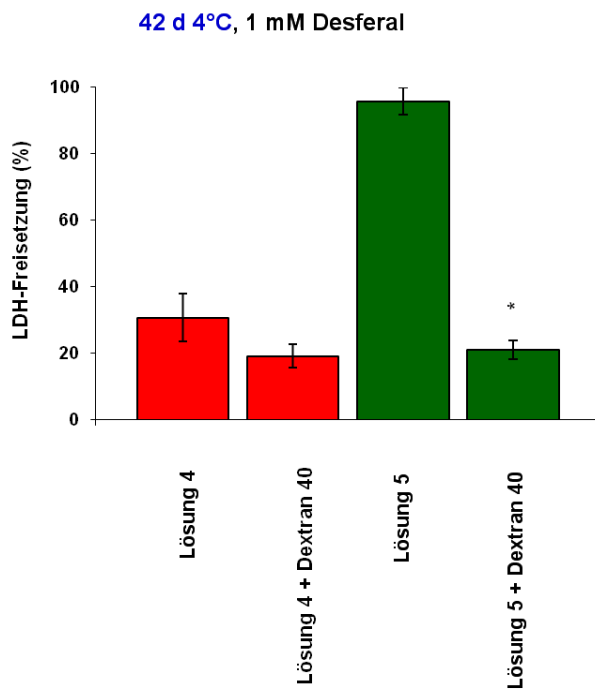


Abbildung 12. Weitere Modifikationen der Basislösung.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 6 Wochen bei 4°C in der chloridarmen Lösung 4 (rot) und der chloridreichen 5 (grün) inkubiert. Alle Ansätze wurden mit 1 mM Desferal versetzt. In einem Teil der Experimente wurde 50 g/l Dextran 40 zugefügt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

* signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung in Lösung 5 ohne Dextran 40, p < 0,05.

4.7. Die optimale Protektionslösung für Ratteninsulinomzellen

Den besten Zellschutz vor der beschriebenen eisen- und chloridabhängigen Kälteschädigung bietet somit die chloridarme Lösung 4 mit einer optimalen Chelatorkonzentration von 1 mM Desferal.

5. Zellschädigung während der Wiedererwärmung

5.1. „Wiedererwärmungsschädigung“ in RPMI-Zellkulturmedium

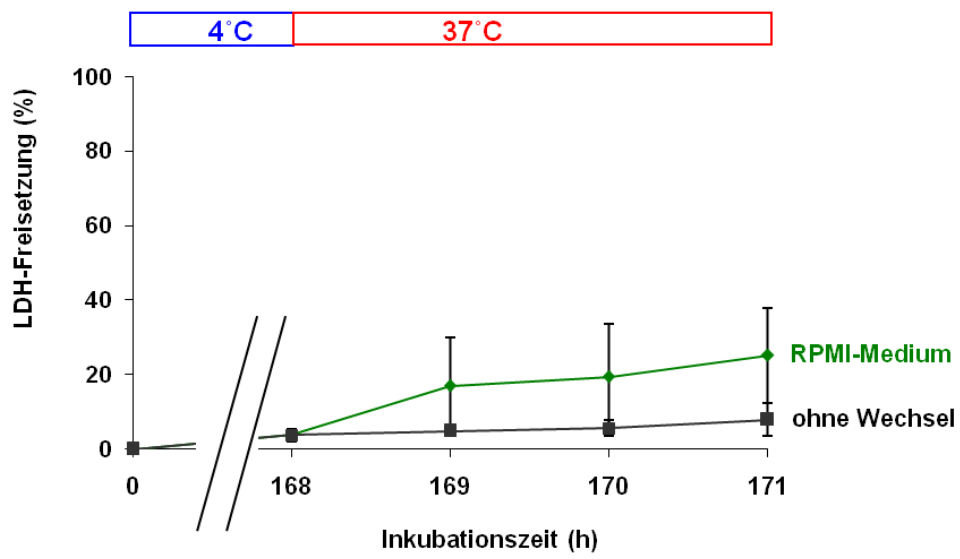
Nach erfolgter Transplantation werden die zuvor kaltgelagerten Zellen wieder auf Körpertemperatur erwärmt. Entsprechend dessen wurden die Versuchszellen nach der Kaltinkubation auf 37°C für 3 h in RPMI-Zellkulturmedium erwärmt. Allerdings zeigte sich mit zunehmender Kaltlagerungsdauer eine verstärkte Zellschädigung während der Wiedererwärmung in RPMI. Nach 72 h Kaltlagerung in verschiedenen Konservierungsmedien fand sich im Mittel ein unproblematischer zusätzlicher Vitalitätsverlust während der Wiedererwärmung von etwa 10 % (Abbildung 2). Als die Kaltinkubationszeit jedoch auf 7, 14 und 28 Tage verlängert wurde, stieg die Wiedererwärmungsschädigung deutlich auf etwa 20 %, 60 % und 90 % an (Abbildung 13 A, B, C).

Wurden die Ratteninsulinomzellen hingegen 7 oder 14 Tage kaltgelagert und für 3 h ohne einen Medienwechsel, d.h. in dem vorhandenen Konservierungsmedium Lösung 4 mit 1 mM Desferal wiedererwärmt, bestätigte sich eine deutlich geringere Zellschädigung als in RPMI (Abbildung 13 A, B). Auch ein Medienwechsel nach 14 Tagen Kaltlagerung vor der Erwärmung auf Lösung 4 mit und ohne Desferal bewirkte, *unabhängig* vom Eisenchelator, eine eindeutige Verringerung der Zellschädigung (Abbildung 13 B). Nach 28 Tagen Kaltinkubation und 6 stündiger Wiedererwärmungsphase in Lösung 4 bestätigten sich die positiven Eigenschaften der modifizierten Protektionslösung im Gegensatz zu RPMI-Zellkulturmedium (Abbildung 13 C).

Wurde allerdings nach 3 h bei 37 °C ein Medienwechsel von Lösung 4 auf RPMI-Zellkulturmedium durchgeführt, konnte unmittelbar ein Anstieg der Zellschädigung um etwa 55 % beobachtet werden (Abbildung 13 C). Somit ist die oben beschriebene Zellschädigung bei der Wiedererwärmung nicht durch die Wiedererwärmung als solche bedingt, sondern durch den Medienwechsel auf RPMI-Zellkulturmedium.

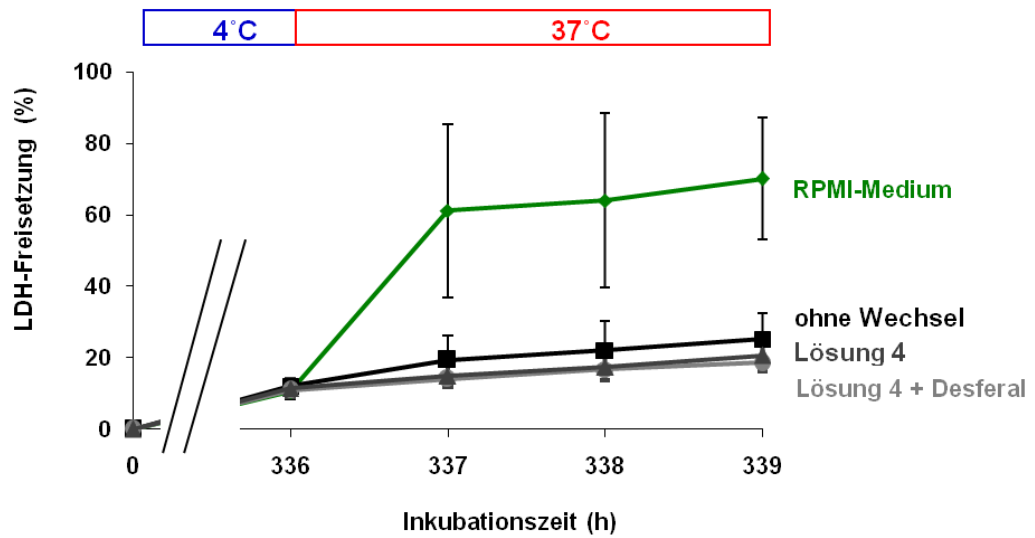
A

7 Tage Kaltinkubation



B

14 Tage Kaltinkubation



C

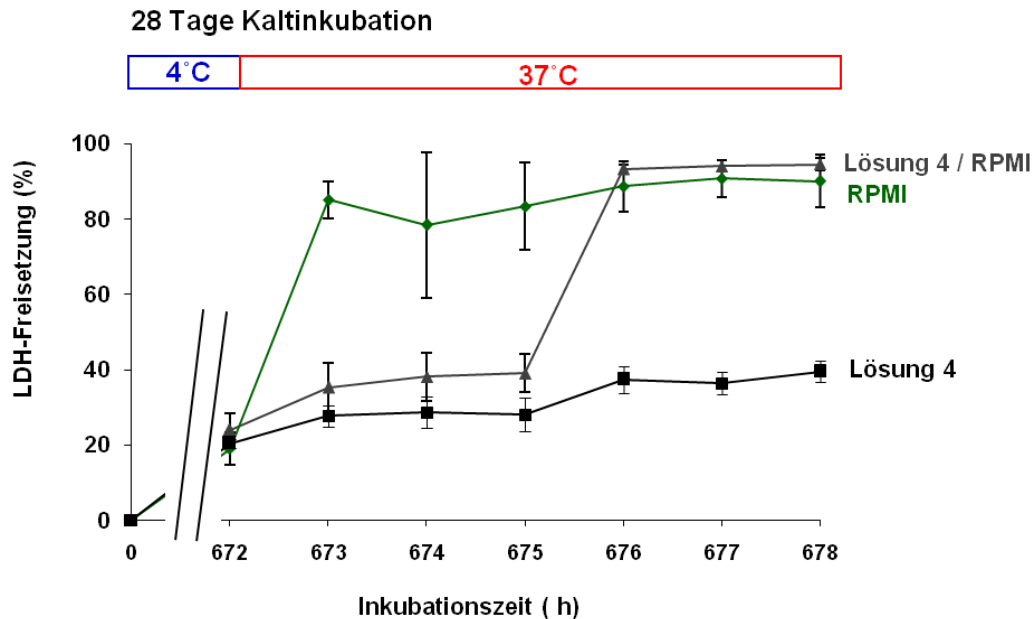


Abbildung 13. Wiedererwärmungsschädigung in RPMI-Zellkulturmedium nach 7, 14 und 28 Tagen Kaltlagerung.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 7 (A), 14 (B) und 28 (C) Tage bei 4°C in der chloridarmen Lösung 4 mit 1 mM Desferal inkubiert und für 3 h (A, B) oder 6 h (C) in RPMI-Zellkulturmedium, ohne einen Medienwechsel, in Lösung 4 + 1 mM Desferal oder in Lösung 4 auf 37°C wiedererwärmt. Zum Teil erfolgte ein Medienwechsel von Lösung 4 auf RPMI nach 3 h Wiedererwärmung (C). Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von 3-4 Versuchen.

Durch weitere parallele Ansätze in der chloridreichen, kaliumreichen Lösung 2 und der chloridarmen, kaliumreichen Lösung 3 konnte der schützende Effekt der modifizierten Konservierungslösungen, unabhängig von der Ionenzusammensetzung, während der Wiedererwärmung bestätigt werden (Tabelle 9). Trotz chloridabhängiger Kälteschädigung in Lösung 2, blieb die Zunahme der Schädigung während der Erwärmung ähnlich der in der chloridarmen Lösung 3, so dass Chlorid lediglich in der Kälte einen Unterschied ausmacht. Somit scheint eine weitere noch unbekannte Komponente bzw. unbekannte Komponenten der modifizierten Lösungen die Zellvitalität während der Wiedererwärmung zu begünstigen und RPMI zellschädigend zu wirken.

Tabelle 9. Wiedererwärmung in modifizierten Konservierungslösungen.

		LDH-Freisetzung (%)			
		4 °C	37 °C	14 d, 4 °C	3 h, 37 °C
Lösung 3 (Cl⁻↓)	Lösung 3 + Desferal	19 ± 4	32 ± 8*		
	Lösung 3	19 ± 6	33 ± 11*		
	ohne Medienwechsel	23 ± 12	48 ± 12		
	RPMI	20 ± 4	67 ± 8		
Lösung 2 (Cl⁻↑)	Lösung 2 + Desferal	33 ± 6	47 ± 9		
	Lösung 2	28 ± 7	43 ± 7		
	ohne Medienwechsel	31 ± 8	52 ± 8		
	RPMI	33 ± 8	66 ± 20		

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für zwei Wochen bei 4°C in der chloridreichen Lösung 2 und der chloridarmen Lösung 3 inkubiert und für 3 h in RPMI-Zellkulturmedium, Lösung 2, Lösung 3, Lösung 2 + 1 mM Desferal, Lösung 3 + 1 mM Desferal und ohne Medienwechsel auf 37°C wiedererwärmt. Alle Ansätze wurden in der Kälte mit 1 mM Desferal versetzt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

* signifikant unterschiedlich zur Wiedererwärmung in RPMI, p < 0,05.

5.2. Weitere Untersuchungen zur Medienwechselschädigung während der Wiedererwärmung

5.2.1. Morphologie in Abhängigkeit vom eingesetzten Medium während der Wiedererwärmung

Die morphologischen Veränderungen während der Wiedererwärmung wurden zum einen nach 7 Tagen Kaltlagerung in der chloridarmen, kaliumreichen Lösung 3 und der entsprechenden chloridreichen, kaliumreichen Lösung 2 beurteilt (Abbildung 14). Wurden die β -Zellen nach der Kaltinkubation im chloridarmen

Medium Lösung 3 in RPMI (C) wiedererwärmt, zeigten sich entsprechend dem höheren Vitalitätsverlust deutlich mehr abgelöste Inselzellen als nach der Wiedererwärmung in Lösung 3 (D). Allerdings konnte in beiden Medien ein ähnliches Bild nicht abgelöster Zellen beobachtet werden, teilweise mit erhaltenen Zellverbänden, teilweise mit Zellausläufern. Die Bildung membranständiger Blebs zeigte sich nicht.

Die Wiedererwärmung in RPMI nach Kaltlagerung in der chloridreichen Lösung 2 (F) bot einen überraschenden Befund. Während die Inselzellen nach der Kaltinkubation kontrahiert und abgerundet vorlagen (E), lagerten sich die Zellen durch die Erwärmung in RPMI erneut zusammen und verbanden sich zu einer Art „Zellnetz“ (F). Am Rand dieser Inselverbände zeigte sich eine Bleb-Bildung. Erfolgte die Erwärmung in der chloridreichen Lösung 2 (G), blieben die Zellen abgerundet und kontrahiert, es lösten sich allerdings weniger Inseln ab.

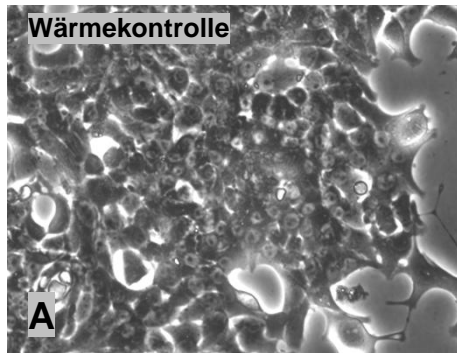
Aufgrund dieser Beobachtungen scheint die Wiedererwärmung in RPMI, insbesondere in Verbindung mit einer Kaltlagerung in chloridreichem Medium, für die Regeneration des Cytoskeletts wichtig zu sein. Dies korreliert jedoch nicht mit dem Vitalitätszustand (Tabelle 9) der Inselzellen.

5.2.2. Testung möglicher toxischer Komponenten von RPMI

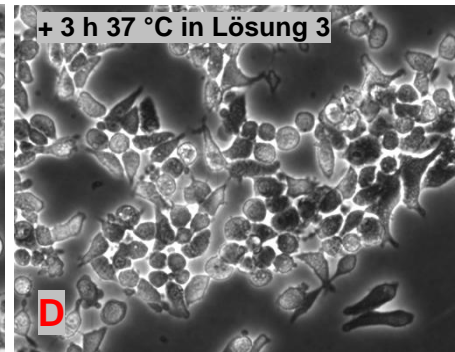
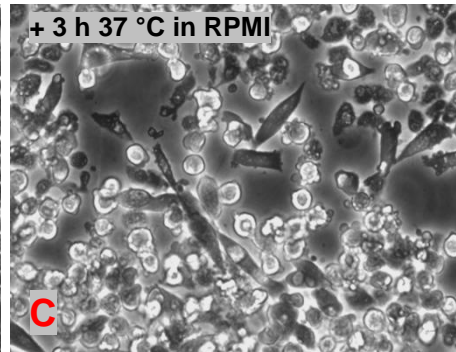
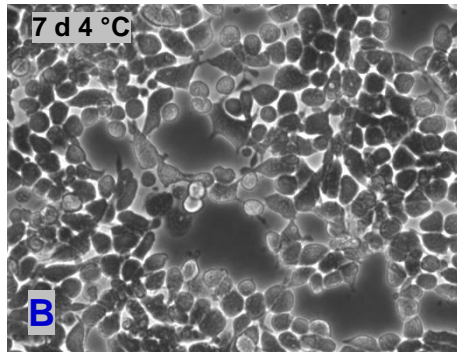
Im Folgenden wurden durch den Vergleich der Zusammensetzung des RPMI-Zellkulturmediums mit der Basislösung 4, verschiedene Komponenten als mögliche Ursache der Zellschädigung identifiziert und getestet:

- Fötale Kälberserum (FKS)
- Calcium
- Chlorid
- Bicarbonat
- pH-Wert (pH 7,4)

Alle Versuche erfolgten nach 14 Tagen Kaltinkubation in Lösung 4 mit 1 mM Desferal. Während der Wiedererwärmung in Lösung 4 ergänzt mit Calcium oder



Kaltlagerung in chloridarmer Lösung 3



Kaltlagerung in chloridreicher Lösung 2

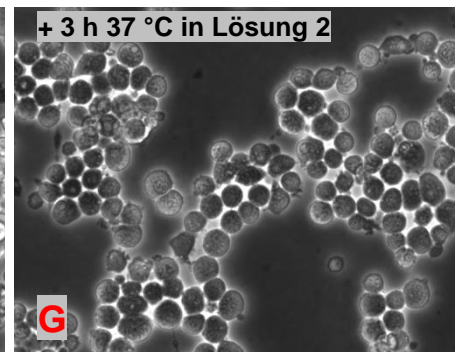
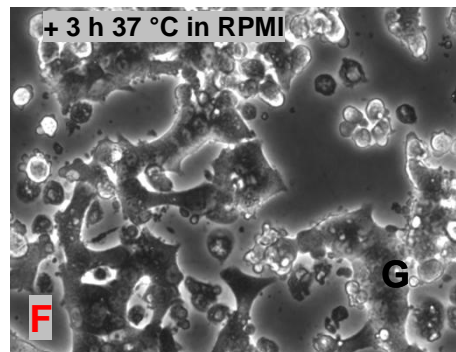
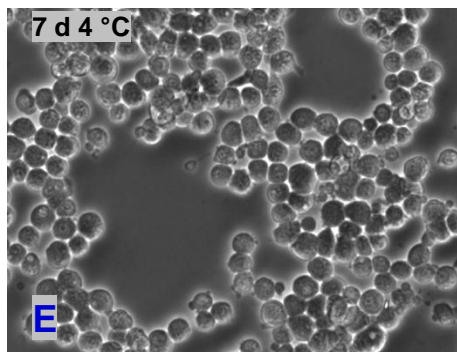


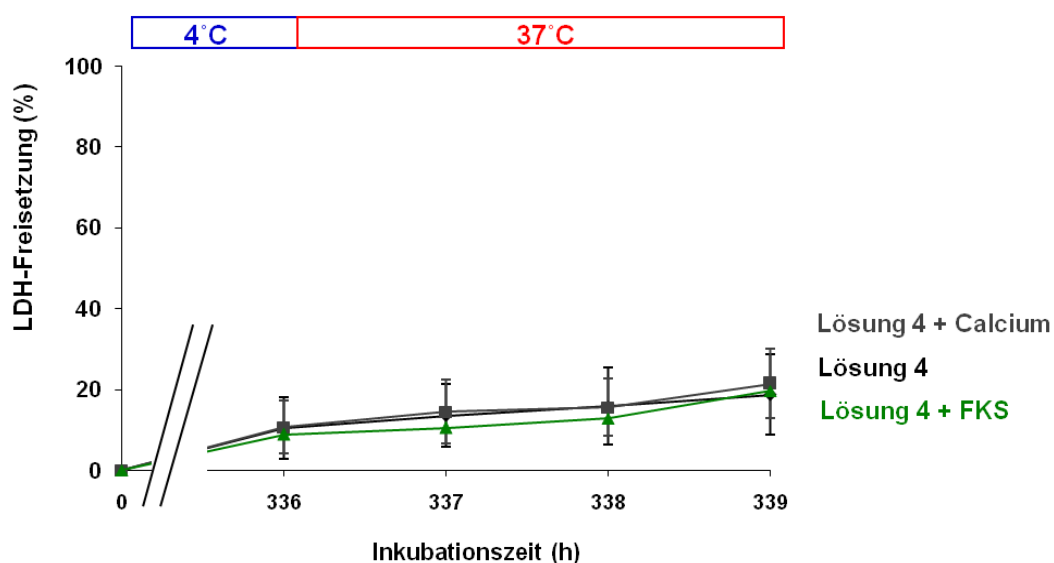
Abbildung 14. Wärmekontrolle und morphologische Veränderungen in Abhängigkeit des Kaltinkubations- und Wiedererwärmungsmediums.

Die Ratteninsulinomzellen wurden 5 d bei 37 °C in RPMI-Zellkulturmedium kultiviert (Kontrolle A). Ein Teil der Zellen wurde für 7 Tage bei 4°C in der chloridarmen Lösung 3 (B-D) und der chloridreichen Lösung 2 (E-G) mit 1 mM Desferal inkubiert und für 3 h in RPMI-Zellkulturmedium (C, F) oder ohne einen Medienwechsel (D, G) auf 37°C wiedererwärmt. Die Beurteilung erfolgte durch eine 20-fache Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop und anschließender Dokumentation mit Hilfe einer Digitalkamera. Die entsprechenden Vitalitätsergebnisse sind in Tabelle 9 zu finden.

FKS konnte keine erhöhte Zellschädigung beobachtet werden (Abbildung 15 A). Auch der Einsatz von Bicarbonat blieb ohne Einfluss (Abbildung 15 B). Chlorid konnte zudem als Schädigungskomponente in der Wiedererwärmung durch den Einsatz der chloridreichen Lösung 5, wie schon in Tabelle 8 beschrieben, definitiv ausgeschlossen werden (Abbildung 15 B).

Des Weiteren wurde die chloridreiche Lösung 5 mit einem pH-Wert von 7,0 mit der chloridreichen Lösung 7 mit einem pH-Wert von 7,4 verglichen (Abbildung 15 B). Hierbei zeigte sich kein signifikanter, aber tendenzieller Vorteil des azidotischen pH-Wertes von Lösung 5.

A



B

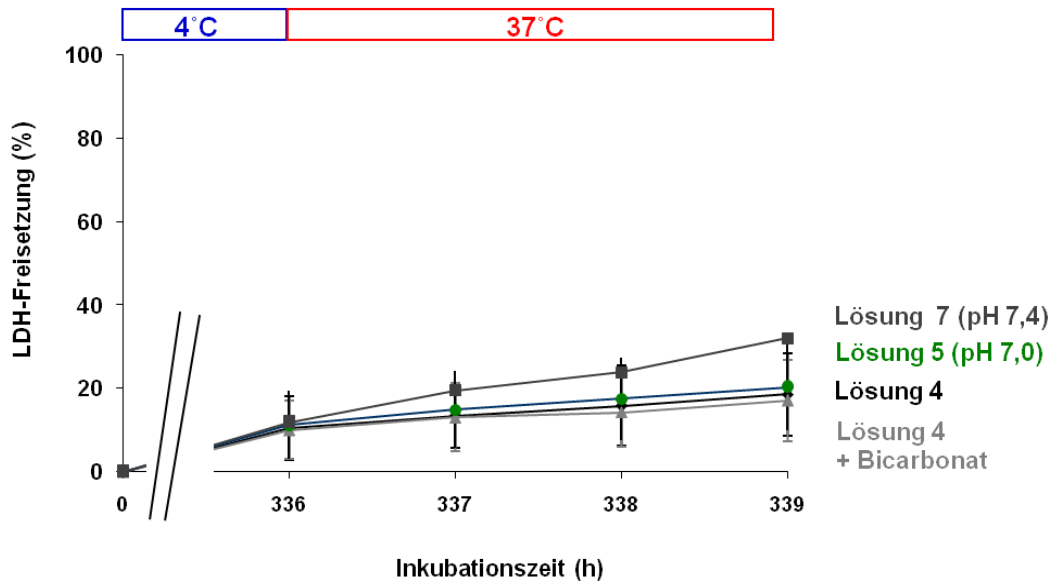


Abbildung 15. Testung einzelner Medium-Komponenten während der Wiedererwärmung.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 14 Tage bei 4°C in der chloridarmen Lösung 4 + 1 mM Desferal inkubiert und danach für 3 h in Lösung 4 mit FKS (A), Calcium 0,421 mM (B), Bicarbonat 25 mM (B) ergänzt sowie in der chloridreichen Lösung 5 mit pH 7,0 (B) und der chloridreichen Lösung 7 mit pH 7,4 (B) auf 37°C wiedererwärmt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

5.2.3. Zellschädigung durch spezifischen RPMI-Effekt?

Zum Ausschluss eines spezifischen RPMI-Effektes wurden verschiedenste Zellkulturmedien (Tabelle 5) während der Wiedererwärmung verglichen. Die Medien M199, DMEM sowie RPMI zeigten alle, im Gegensatz zu Lösung 4, einen ähnlich hohen Vitalitätsverlust. Das Zellkulturmedium L15 hingegen weist mit einer Zellschädigung von 39 % ± 8,9 % eine Mittelstellung auf. Eine mögliche Ursache könnten diverse Aminosäuren sein, welche zusätzlich sowie in höherer Konzentration im Vergleich zu den anderen Zellmedien in L15 vorkommen (Abbildung 16).

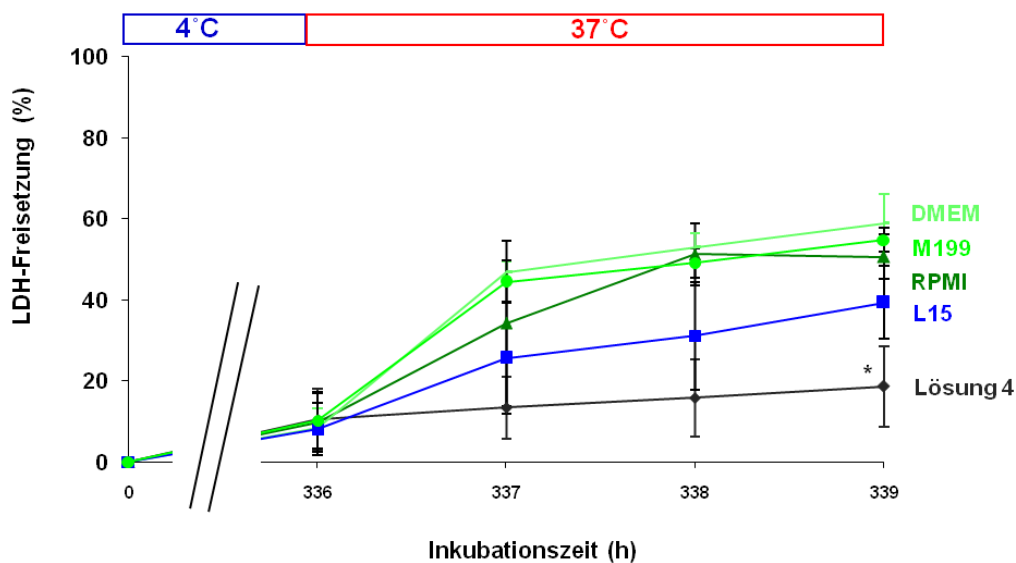


Abbildung 16. Wiedererwärmung in verschiedenen Zellkulturmedien.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 14 Tage bei 4°C in der chloridarmen Lösung 4 + 1 mM Desferal inkubiert und danach für 3 h in den Zellkulturmedien DMEM, M199, RPMI, L15 und Lösung 4 auf 37°C wiedererwärmt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 4 Versuchen.

* signifikant unterschiedlich zur Wiedererwärmung in RPMI, $p < 0,05$.

5.3. Protektive Komponenten in den modifizierten Lösungen?

Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen stellte sich nun die Frage, ob spezielle Komponenten bzw. deren Konstellation, der modifizierten Basislösung 4 in der Wiedererwärmung einen Schutzeffekt ausüben. Insbesondere war der Einfluss von Aminosäuren und deren Vorstufen auf die Zellschädigung während der Wiedererwärmung zu klären, da diese sowohl im Zellkulturmedium, als auch in den modifizierten Konservierungslösungen, in verschiedensten Konzentrationen und Kombinationen vorhanden sind.

Dem zufolge wurden Magnesiumchlorid, bicarbonat-freies, azidotisches Medium sowie verschiedene Aminosäuren während der Wiedererwärmung hinsichtlich ihrer protektiven Eigenschaften geprüft.

Um die einzelnen Zusätze der modifizierten Lösung 4 auf ihren Schutzeffekt hin zu prüfen, wurden die verschiedenen Substanzen dem „physiologischen“ Krebs-Henseleit-Puffer (KH, Tabelle 3) zugefügt. Dieser führte wie erwartet nach 3 h Wiedererwärmung ohne Zusätze, vergleichbar mit RPMI, zu einer massiven Zellschädigung (Abbildung 17). In allen Versuchen wurden die Zellen 4 Wochen in Lösung 4 mit 1 mM Desferal kaltgelagert. Den verschiedenen KH- Varianten in der Wiedererwärmung wurde in allen nachfolgenden Versuchen zusätzlich 10 mM Glukose zugesetzt. Zudem wurde die Osmolarität durch entsprechende Zugaben von Natriumchlorid ausgeglichen.

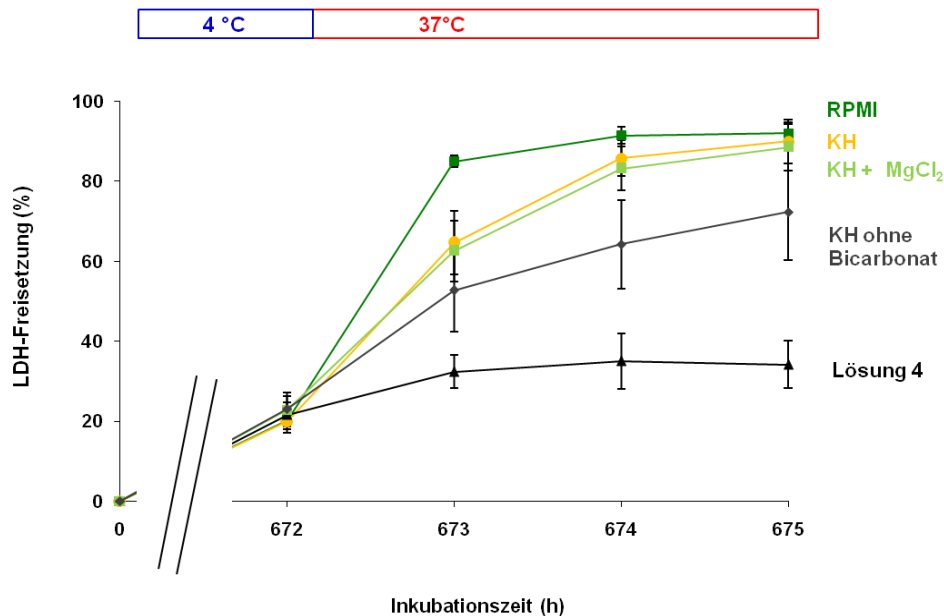


Abbildung 17. Magnesiumchlorid und bicarbonat-freies Medium während der Wiedererwärmung.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 4 Wochen bei 4°C in der chloridarmen Lösung 4 + 1 mM Desferal inkubiert und danach für 3h in Lösung 4, RPMI, KH mit und ohne Bicarbonat teilweise ergänzt mit Aspartat (5 mM, Abbildung 18), α -Ketoglutarat (2 mM, Abbildung 18), Tryptophan (2 mM, Abbildung 18), Alanin (5 mM, Abbildung 18), Glycin (10 mM, Abbildung 18) und Magnesiumchlorid (8 mM) auf 37°C wiedererwärmt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 3 Versuchen.

5.3.1. Magnesiumchlorid während der Wiedererwärmung

Wurde KH mit Magnesiumchlorid zu einer Gesamtkonzentration wie in Lösung 4 ergänzt, zeigte sich eine ähnlich hohe Zellschädigung wie in KH ohne Zusatz und RPMI nach 3 h Wiedererwärmung (Abbildung 17).

5.3.2. Bicarbonat-freies Medium während der Wiedererwärmung

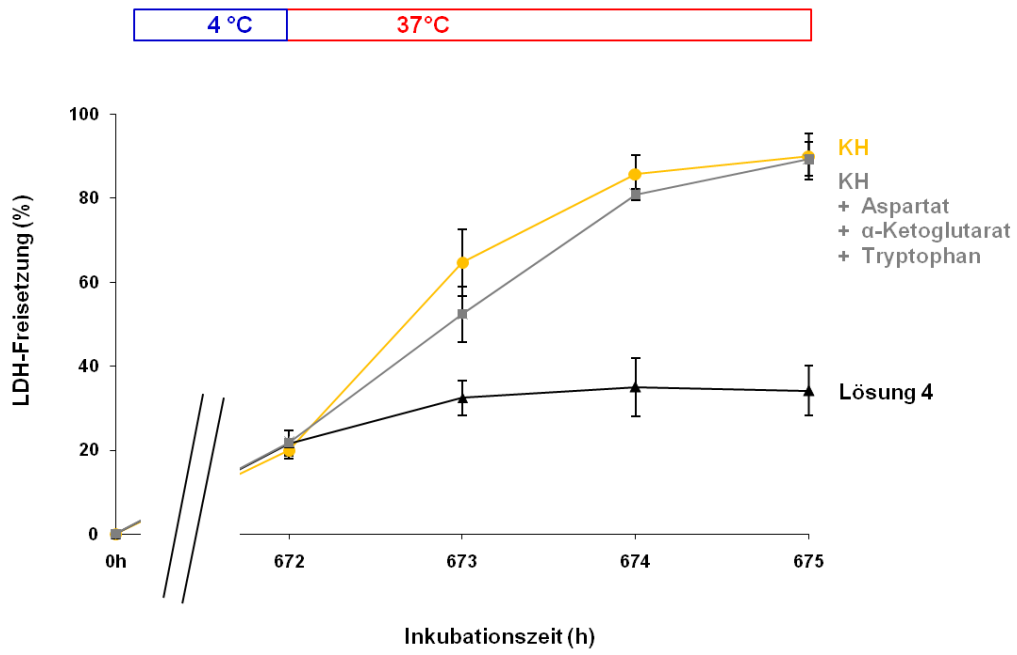
Zudem wurde KH ohne Bicarbonat während der Wiedererwärmung eingesetzt. Es konnte eine Reduktion der Zellschädigung in KH ohne Bicarbonat um etwa 20% gegenüber RPMI und KH mit Bicarbonat nachgewiesen werden (Abbildung 17).

5.3.3. Aminosäuren während der Wiedererwärmung

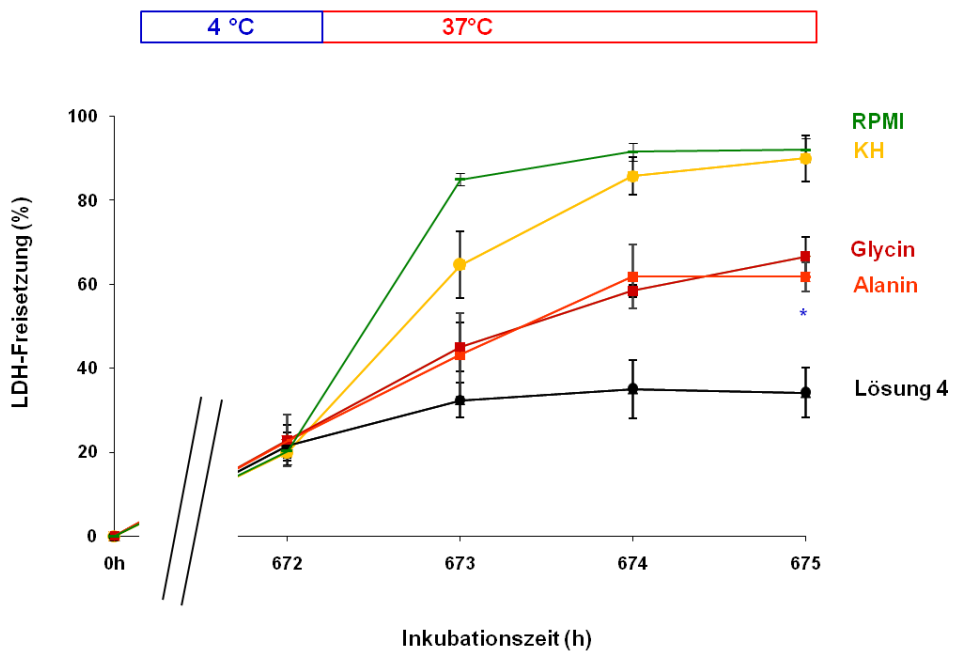
5.3.3.1. Aspartat und Tryptophan ergänzt mit α -Ketoglutarat während der Wiedererwärmung

Wurden die Inselzellen in KH mit Aspartat und Tryptophan ergänzt mit α -Ketoglutarat in einer Endkonzentration wie in Lösung 4 nach 4 Wochen wiedererwärmt, so zeigte sich ein hoher Vitalitätsverlust von ca. 90 % (Abbildung 18 A). Somit konnte ein positiver Einfluss dieser Aminosäurenkombination, die in den protektiven modifizierten Lösungen zu finden ist, ausgeschlossen werden.

A



B



C

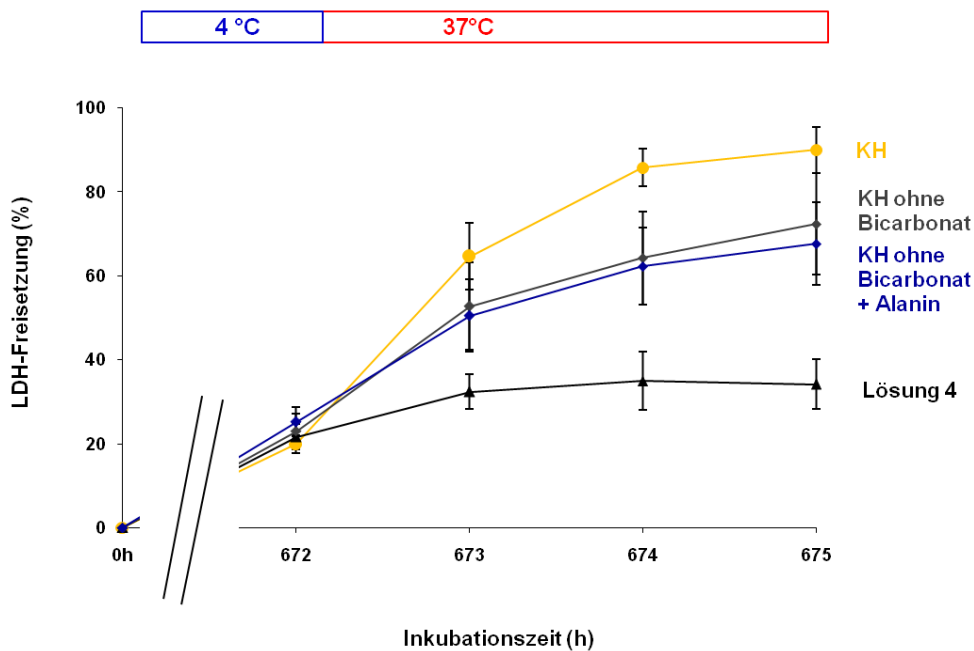


Abbildung 18. Verschiedene Lösungskomponenten während der Wiedererwärmung.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 4 Wochen bei 4°C in der chloridarmen Lösung 4 + 1 mM Desferal inkubiert und danach für 3h in Lösung 4, RPMI, KH mit und ohne Bicarbonat teilweise ergänzt mit Aspartat (5 mM), α -Ketoglutarat (2 mM), Tryptophan (2 mM), Alanin (5 mM), Glycin (10 mM) und Magnesiumchlorid (8 mM, Abbildung 17) auf 37°C wiedererwärmt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD von 3 Versuchen.

* signifikant unterschiedlich zur Kaltlagerung in RPMI, $p < 0,05$.

5.3.3.2. Alanin und Glycin während der Wiedererwärmung

Wurde KH mit 5 mM Alanin ergänzt, so zeigte sich eine deutliche Reduktion der Zellschädigung nach der Wiedererwärmung gegenüber KH bzw. eine signifikante Reduktion gegenüber RPMI-Zellkulturmedium (Abbildung 18 B). In KH mit 10 mM Glycin supplementiert fand sich ebenfalls ein zellprotektiver Effekt. Weiterhin wurde KH ohne Bicarbonat mit Alanin versetzt, wobei dadurch keine weitere Verbesserung der Zellschädigung erreicht werden konnte (Abbildung 18 C).

Trotz des Schutzes durch Alanin und Glycin sowie dem Vorteil eines Bicarbonat-freien Mediums gegenüber RPMI, weist die Wiedererwärmung in Lösung 4 einen noch geringeren Vitalitätsverlust auf (Abbildung 18). Daher wurden nachfolgend verschiedene Kombinationen dieser Komponenten getestet.

5.3.3.3. Kombinationen von Alanin, Glycin, Saccharose und Azidose

In der immer noch besten, bicarbonat-freien Lösung 4 liegen diverse Aminosäuren parallel vor, so dass aufgrund der guten Ergebnisse von Alanin und Glycin nun die Kombination der Aminosäuren mit 20 mM Saccharose untersucht wurde. Zudem wurde KH als Wiedererwärmungsmedium nicht nur ohne Bicarbonat, sondern entsprechend der modifizierten Lösung 4 ebenfalls auf den pH 7,0 eingestellt. Hierbei wurde der Puffer HEPES durch MOPS ersetzt. Wurde nun Alanin, Glycin und Saccharose ergänzt, konnte die Wiedererwärmungsschädigung tendenziell weiter reduziert werden, obwohl die Unterschiede im Vergleich zu KH mit oder ohne Bicarbonat und pH 7,4 supplementiert mit dem Zucker und den beiden Aminosäuren nicht signifikant waren (Abbildung 19).

5.4.3.4. Alanin, Glycin und Saccharose in physiologisch modifizierten Lösungen

Das Ziel sollte eine erfolgreiche Wiedererwärmung in physiologischen Elektrolytkonzentrationen wie in Zellkulturmedium sein, daher wurde ausgehend von der modifizierten Lösung 4 die neue Lösung 8 entwickelt, welche mit einer Chloridkonzentration von 104,1 mmol/l bereits angepasst wurde und nur noch die protektiven Aminosäuren Alanin und Glycin beinhaltet. Ein Effekt von Chlorid auf die Wiedererwärmung konnte bereits zuvor ausgeschlossen werden (Abbildung 15 B). Während der Inkubation in Lösung 8 wurde eine Zellschädigung von etwa 50%, ähnlich wie in der modifizierten KH-Lösung beobachtet (Abbildung 20). Zudem wurde eine weitere, lediglich auf Elektrolyte und Glucose reduzierte Lösung 9 hergestellt, in der sowohl Chlorid (112,1 mmol/l), Kalium (5 mmol/l) als

auch Natrium (103,4 mmol/l) physiologischen Bereichen angenähert wurden. Der Puffer Acetylhistidin wurde durch HEPES ersetzt. Durch den Einsatz von Lösung 9 ergänzt mit Alanin, Glycin und Saccharose während der Wiedererwärmung konnte die Inselzellschädigung auf etwa 35 % gesenkt werden (Abbildung 20). Es zeigt sich somit ein nahezu identischer Schutzeffekt wie in Lösung 4.

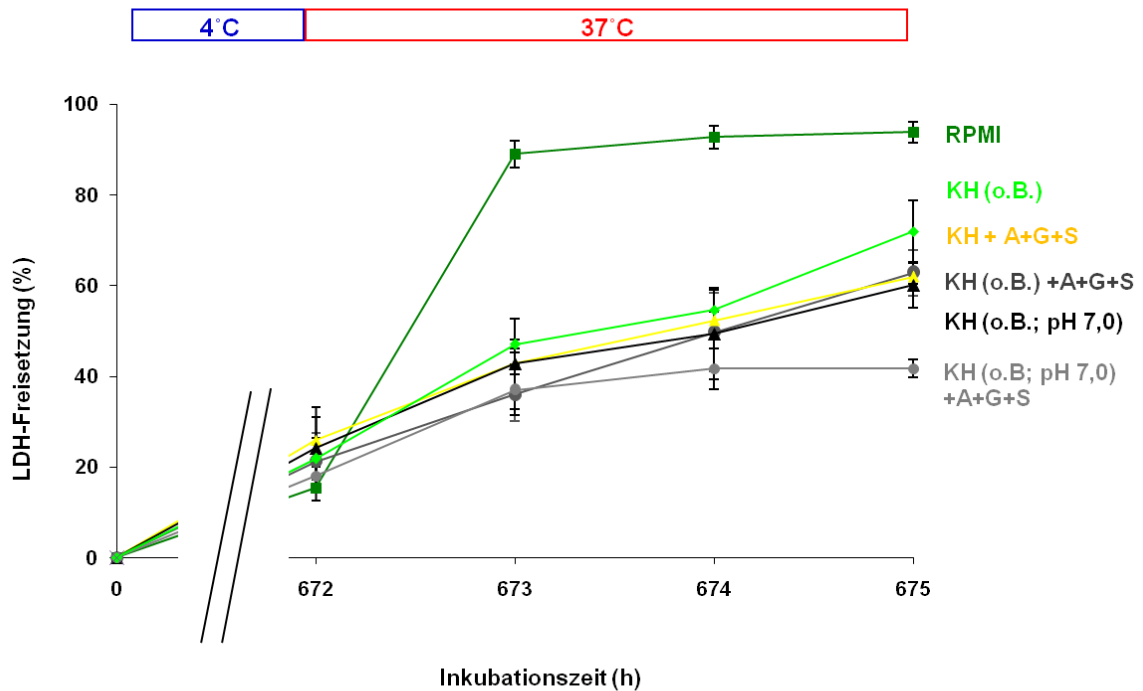


Abbildung 19. Alanin, Glycin, Saccharose und Azidose während der Wiedererwärmung.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 4 Wochen bei 4°C in Lösung 4 + 1 mM Desferal inkubiert und danach für 3 h in Lösung 4, 8 (Abbildung 20), 9 (Abbildung 20), RPMI, KH mit und ohne Bicarbonat (o. B.) teilweise mit den Zusatz der Kombination von 5 mM Alanin (A), 10 mM Glycin (G) und 20 mM Saccharose (S) auf 37°C wiedererwärmt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 3 Versuchen.

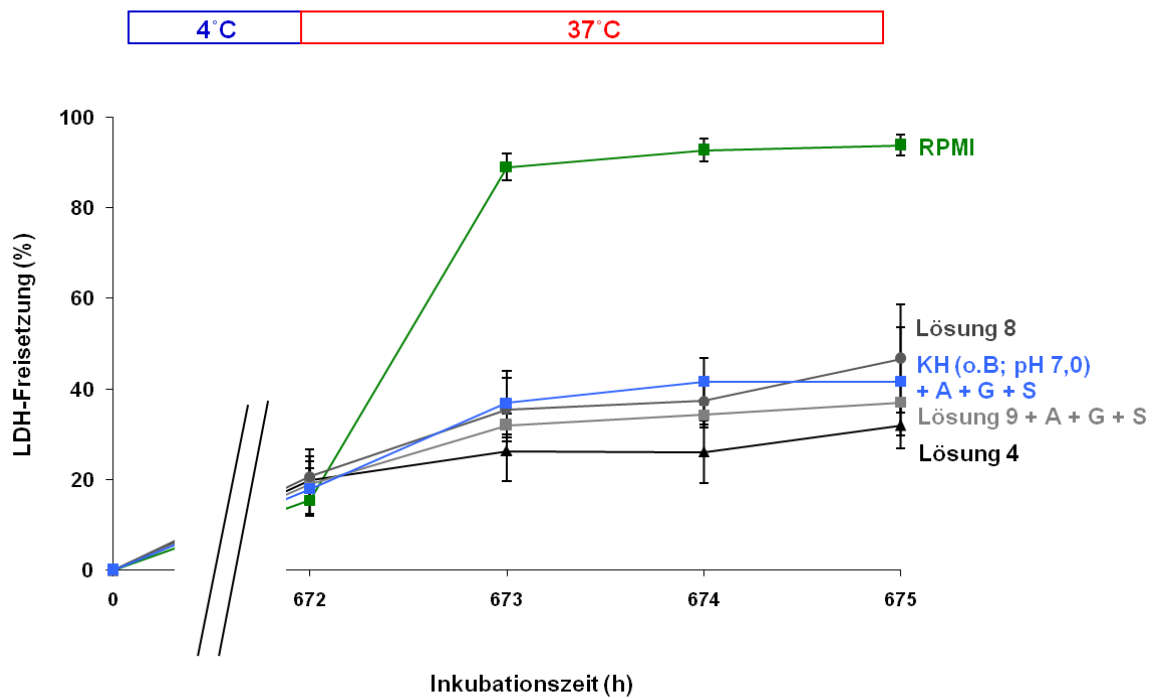


Abbildung 20. Alanin, Glycin und Saccharose in physiologisch modifizierten Lösungen während der Wiedererwärmung.

Kultivierte Ratteninsulinomzellen wurden für 4 Wochen bei 4°C in Lösung 4 + 1 mM Desferal inkubiert und danach für 3 h in Lösung 4, 8, 9, RPMI, KH mit und ohne Bicarbonat (o. B.) teilweise mit den Zusatz der Kombination von 5 mM Alanin (A), 10 mM Glycin (G) und 20 mM Saccharose (S) auf 37°C wiedererwärmt. Über die Freisetzung des cytosolischen Enzyms Lactatdehydrogenase wurde der Vitalitätsverlust ermittelt. Die Daten zeigen die Mittelwerte +/- SD von 3 Versuchen.

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ratteninsulinomzellen in den etablierten Protektionslösungen eine ausgeprägte Kälteschädigung erfahren (Abbildung 2 und 3) und dass diese durch den Einsatz eines Eisenchelators in einer optimierten, chloridarmen Protektionslösung erheblich reduziert werden kann (Abbildung 9, 21). Zudem wurde eine weitere Zellschädigung während der Wiedererwärmungsphase in Zellkulturmedium (Abbildung 13) beobachtet. Dieser konnte durch eine alanin-, glycin- und saccharosehaltige, bicarbonatfreie Elektrolytlösung mit einem azidotischen pH von 7,0 entgegengewirkt werden (Abbildung 20, 21).

Zellschädigung in etablierten Konservierungslösungen

Die klinisch etablierten Konservierungslösungen UW und HTK führten bei Ratteninsulinomzellen zu einer beträchtlichen kälteinduzierten Zellschädigung (Abbildungen 2 und 3). Nach nur 72 h Kaltlagerung zeigte sich bereits ein Vitalitätsverlust von bis zu 70 % in den Lösungen UW und HTK, wohingegen die Zellschädigung selbst nach 4 Wochen Kaltinkubation in der neu optimierten Protektionslösung 4 mit etwa 20 % nicht annähernd so hoch war (Abbildung 9).

Auch wenn die Kaltlagerung in UW-Lösung nach aktuellem Stand als eine der besten Lagerungsmethoden für Inselzellen beschrieben wurde (Liu et al., 2014), wird in der Literatur deutlich, dass ein massiver Verlust der Funktionsfähigkeit von Inselzellen bereits nach 24 – 48 h Kaltinkubation in UW auftritt (Kimura et al., 2013; Negishi et al., 2011).

Erstaunlich ist zudem, dass selbst Zellkulturmedium einen besseren Schutz vor der Kälteschädigung bot als UW - Lösung (Abbildung 2). Dies unterstützt die Tatsache, dass nach Kaltinkubation in UW - Lösung ergänzt mit Serum eine bessere Funktionsfähigkeit der β -Zellen beobachtet wurde (Kimura et al., 2013). Somit scheinen nach dem derzeitigen Goldstandard angewendete Protektionslösungen Ratteninsulinomzellen nicht ausreichend Schutz vor der kälteinduzierten Schädigung zu bieten, sondern diese teilweise sogar zu verstärken.

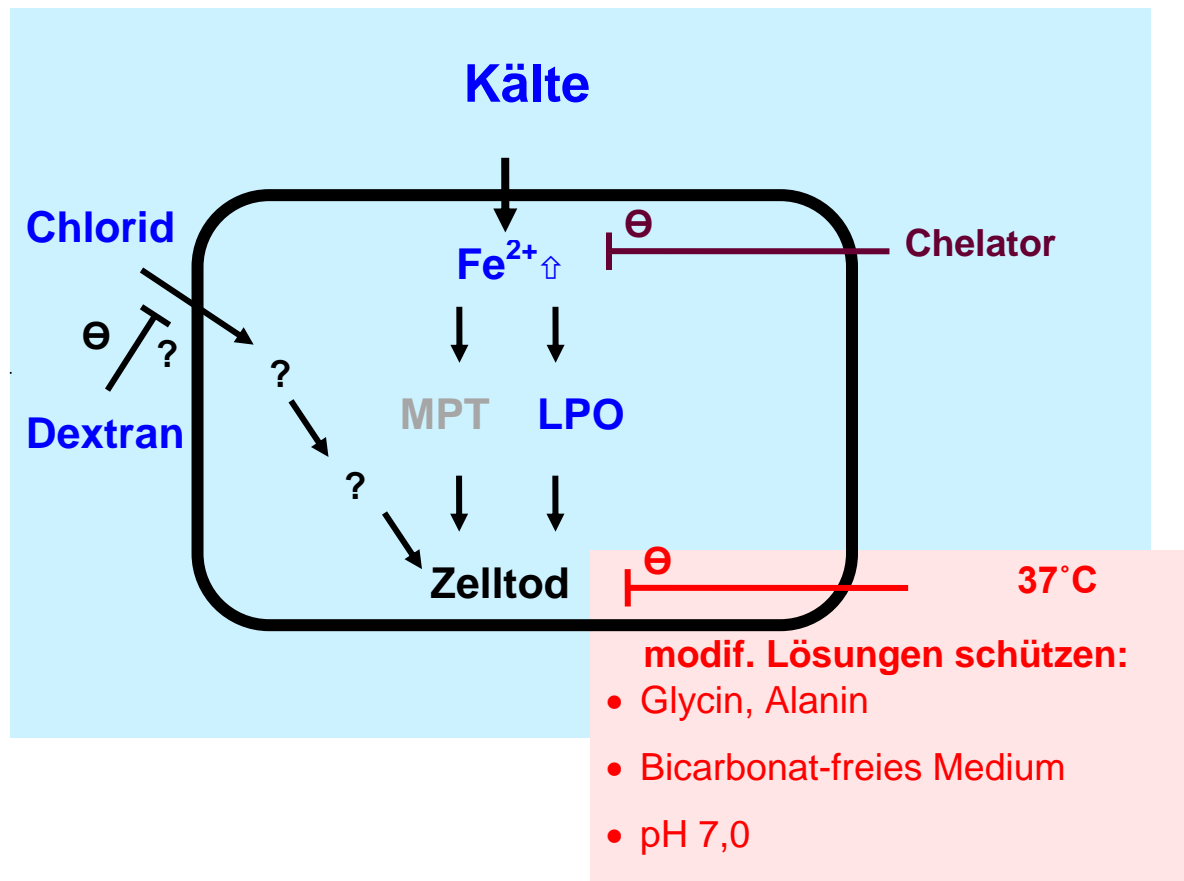


Abbildung 21. Mechanismus der Zellschädigung in der Kälte/Wiedererwärmung kultivierter Ratteninsulinomzellen

Die Kälteschädigung der Zellen ist eisenabhängig und wird vermutlich - wie bei anderen Zelltypen gezeigt - durch einen akuten Anstieg des intrazellulären Fe²⁺ verursacht und geht nachweislich mit einem Anstieg der Lipidperoxidation (LPO) und mutmaßlich mit einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (MPT) einher. Die Chelatisierung des Eisens wirkt der Schädigung entgegen. Der Mechanismus der chloridabhängigen Kälteschädigung ist noch ungeklärt. Die Wiedererwärmung kann durch modifizierte Lösungen optimiert werden, der zellprotektive Effekt beruht auf den Zusatz von Alanin, Glycin und bicarbonat-freiem Medium mit pH 7,0.

Eisenabhängige Kälteschädigung von Ratteninsulinomzellen

In Studien an verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise an Rattenhepatozyten (Rauen et al., 1999; Rauen et al., 2000), Rattenleber-Endothelzellen (Rauen et al., 1999; Rauen et al., 2000), Schweineaorten-Endothelzellen (Wille et al., 2008), oder Schweinecornea-Endothelzellen (Rauen et al., 2006), konnte eine durch

chelatisierbares Eisen und reaktive Sauerstoffspezies vermittelte Kälteschädigung nachgewiesen werden. Die Hypothermie führte zu einem Anstieg des zellulären „redox-aktiven“ Eisens, welches die anschließende Bildung hoch reaktiver Sauerstoffspezies, beispielsweise hervorgerufen durch die klassische Fenton-Reaktion, triggerte. Diese Radikale führten zu einer massiven Lipidperoxidation. Erstmals konnte auch bei Ratteninsulinomzellen diese, eisenabhängige Kälteschädigung nachgewiesen werden. Während der Kaltlagerung konnte durch den Einsatz von Eisenchelatoren in Konservierungslösungen die Zellschädigung nach 72 h Kaltinkubation nahezu vollständig gehemmt werden (Abbildung 2,3,4). Auch das Auftreten einer Lipidperoxidation im Rahmen der eisenabhängigen Kälteschädigung von Ratteninsulinomzellen konnte durch die Bildung von TBARS, als Indikator einer stattfindenden Lipidperoxidation, in Abwesenheit eines Eisenchelators, bestätigt werden (Abbildung 7). Durch den Zusatz eines Eisenchelators in der Protektionslösung konnte diese oxidative Komponente eindeutig verringert werden.

Ein genauer Mechanismus der Kälteschädigung von Inselzellen wurde bis jetzt in der Literatur noch nicht beschrieben. Allerdings wurde über eine hohe Empfindlichkeit von β -Zellen gegenüber ROS berichtet, welche insbesondere durch einen extrem limitierten antioxidativen Schutz, aufgrund einer sehr niedrigen Aktivität H_2O_2 -inaktivierender Enzyme, wie der Catalase oder Glutathion-Peroxidase, hervorgerufen wird (Mechlovich et al., 2010; Lenssen et al., 2008). Es resultiert ein Ungleichgewicht zu Gunsten ROS-vermittelter schädigender Prozesse, welche beispielsweise durch autoimmune oder inflammatorische Reaktionen getriggert werden können. Eine intrazelluläre Eisenüberladung, beispielsweise durch eine krankheitsbedingte Erhöhung der Eisenspeicher, unterstütze diese Zellschädigung weiter (Cooksey et al., 2010).

Zudem wurde an diversen Zelltypen durch die kälteinduzierte Freisetzung des zellulären redox-aktiven Eisens eine Schädigung der Mitochondrien mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials nachgewiesen, welche im weiteren während der Wiedererwärmungsphase zur Einleitung eines apoptotischen Zelltodes führte (Rauen und de Groot, 2004; Rauen et al., 2003; Salahudeen et al., 2003). Insbesondere morphologisch zeigte sich beispielsweise bei kultivierten Rattenhepatozyten (Rauen et al., 2007 a) und humanen Hepatozyten (Pless et al.,

2012) die Bildung von Blebs und Apoptosekörperchen, eine Zellschrumpfung und Kernkondensation als Zeichen der kälteinduzierten Apoptose.

Morphologisch zeigte sich bei den β -Zellen in der Kälte eine Zellkontraktion und Abrundung mit Aufhebung der Inselstruktur unabhängig vom Einsatz eines Eisenchelator (Abbildung 5). In Abwesenheit von Desferal wurde jedoch eine vermehrte Zellablösung beobachtet. Bei kultivierten Schweineaorten-Endothelzellen wurde kürzlich eine ähnliche Morphologie beobachtet, so zeigten diese ebenfalls eine eisenunabhängige Zellkontraktion mit Bildung interzellulärer Lücken im endothelialen Monolayer während der Kaltlagerung, das „Zusammenziehen“ der Zellen war durch den Zusatz eines Eisenchelators eher verstärkt (Knoop, 2011).

Nach der Wiedererwärmung waren die eisenunabhängigen morphologischen Veränderungen der Inselzellen nach Inkubation in chelatorhaltigem Konservierungsmedium sowie in RPMI chelatorunabhängig zum größten Teil reversibel. Dies korreliert ebenfalls mit Beobachtungen bei kultivierten Schweineaorten-Endothelzellen, bei denen die Veränderungen des Cytoskeletts nach Kaltinkubation in Gegenwart eines Eisenchelators und anschließender Wiedererwärmung reversibel waren (Knoop, 2011).

Nach Kaltlagerung in HTK sowie UW ohne Zusatz eines Eisenchelators zeigte sich im Sinne der eisenabhängigen Kälteschädigung nach der Wiedererwärmung keine erneute Wiederausspreitung der Zellen. Die Zellen waren weiterhin zusammengezogen und lösten sich vermehrt ab. Blebs oder Apoptose-Körperchen konnten nicht nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen, wie ein Verlust der Zelladhäsion und Schwellung der Inselzellen in UW-Lösung, wurden von Kimura et al. (2013) beschrieben. Eindeutige Hinweise auf einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod der Ratteninsulinomzellen ergaben sich somit morphologisch nicht.

Mechlovich et al. (2010) berichteten jedoch über eine eisenvermittelte Schädigung der Mitochondrien mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und anschließender Induktion des apoptotischen Zelltodes im Rahmen der β -Zellschädigung bei Diabetes. Dieser Mechanismus zeigt deutliche Parallelen zur kälteinduzierten Apoptose. Zudem wurden beispielsweise von Shirouzu et al. (2005) apoptotische β -Zellen nach Kaltlagerung in UW-Lösung sowie in steigender Anzahl nach entsprechender Wiedererwärmung nachgewiesen.

Chloridabhängige Kälteschädigung von Ratteninsulinomzellen

Abhängig von der Dauer der Kaltinkubation wurde bei Ratteninsulinomzellen, trotz Inhibition der eisenabhängigen hypothermen Schädigung, eine weitere, nicht-eisenabhängige Kälteschädigung sichtbar (Abbildung 8). Diese konnte durch den Einsatz einer chloridarmen Protektionslösung signifikant reduziert werden (Abbildung 9). Es stellte sich eine, ebenfalls bis jetzt bei Ratteninsulinomzellen noch nicht bekannte, neue chloridabhängige kälteinduzierte Schädigung dar (Abbildung 21).

Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen an kultivierten Rattenhepatozyten (Rauen et al., 2007 a; Rauen et al., 1999) sowie an Rattenhepatozyten in einer Zellsuspension (Pless et al., 2012) überein, welche ebenfalls durch Kaltlagerung in chloridarmen Protektionslösungen einen Schutzeffekt erfuhren. In der Literatur wurde die Kälteschädigung von β -Zellen bis jetzt nicht in den Zusammenhang mit Chlorid gebracht, jedoch könnte die Tendenz, dass die Konservierung in der chloridfreien UW-Lösung als beste Lösung bis jetzt diskutiert wurde (Liu et al., 2014; Kimura et al., 2013; Negishi et al., 2011; Wahlberg et al., 1986) ein Hinweis sein. Im Gegensatz dazu wurde eine Kaltlagerung von Pankreata in der chloridhaltigen HTK-Lösung mit einem schlechteren Outcome nach Inselzelltransplantation beschrieben (Salehi et al., 2006).

Allerdings wurde kürzlich von unserer Arbeitsgruppe ein zellprotektiver Effekt von Chlorid während der Kaltinkubation, beispielsweise von Schweineaorten-Endothelzellen (Wille et al., 2008), humanen Hepatozyten (Pless et al., 2012) oder von Mäuse-Muskelgewebe (Wille et al., 2011), bestätigt.

Abhängig vom Zelltyp zeigt sich somit auf der einen Seite eine chloridabhängige Kälteschädigung, auf der anderen Seite ein Schutzeffekt durch Chlorid vor der kälteinduzierten Zellschädigung. Für beide ist der Mechanismus noch unklar.

Im Rahmen der chloridabhängigen Kälteschädigung wird nach dem klassischen Mechanismus der Kälteschädigung eine kälteinduzierte Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase mit folgendem Natrium- und Chlorideinstrom in die Zelle sowie eine anschließende Zellschwellung mit resultierendem Zelltod diskutiert (Belzer et al. 1988; Hochachka et al., 1986). Aufgrund dessen sind bis heute noch Protektionslösungen vom intrazellulären Typ mit niedriger Natrium- und Chloridkonzentration wie beispielsweise die University of Wisconsin-Lösung

etabliert. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass diese keinen ausreichenden Schutz für β -Zellen vor der Kälteschädigung bietet. Zudem wurde schon in früheren Studien nachgewiesen, dass verschiedene Zelltypen keinen intrazellulären Natriumanstieg aufweisen (Fuckert et al., 2000; Gizewski et al., 1997). Das Kation Natrium scheint zudem, entgegen dem klassischen Mechanismus (siehe oben), nicht zur Kälteschädigung zu führen, d.h. natriumarme Konservierungslösungen besitzen keinen besonderen Schutzeffekt (Fuckert et al., 2000), im Gegenteil, die optimierte Protektionslösung für Ratteninsulinomzellen ist eine chloridarme und natriumreiche Variante (Abbildung 9).

Im Rahmen der chloridabhängigen Kälteschädigung wurde weiterhin ein möglicher ungünstiger Einfluss von Chlorid auf die Osmo- und pH-Regulation der Zellen sowie die Induktion apoptotischer Signalwege diskutiert (Rauen et al., 2006). In verschiedenen Apoptose-Modellen wurde über beteiligte Chlorid-Plasmamembrankanäle berichtet, welche beispielsweise zur apoptotischen Zellvolumenabnahme (Lang et al., 2005) oder pH-Modulation mit anschließender Aktivierung von Caspasen (Fujita et al., 1999) beitrugen. Speziell der Effekt einer erhöhten extrazellulären Chloridkonzentration wurde hingegen nur in wenigen Studien erwähnt. Heimlich und Cidlowski (2006) beschrieben eine chloridabhängige Aktivierung der Signaltransduktion der intrinsischen Apoptose, welche beispielsweise durch einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher-Blocker (SITS) oder chloridarmes Medium minimiert werden konnte. Auch Tsukimoto et al. (2005) schilderten eine erhöhte extrazelluläre Chloridkonzentration als Ursache einer durch einen Chloridinflux vermittelten Porenbildung im Rahmen der rezeptor-induzierten Apoptose.

Die hypotherme Kälteschädigung von kultivierten Ratteninsulinomzellen in chloridreichen Konservierungslösungen konnte jedoch nicht durch die Hemmung des oben genannten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers mittels SITS beeinflusst werden (Abbildung 10). Somit fanden sich auch keine Hinweise auf chloridabhängige pH-regulierende Prozesse. Auch durch den Einsatz des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Co-Transporter-Hemmstoffes Furosemid sowie der Chloridkanalblocker NPPB und Nifluminsäure zeigte sich kein protektiver Effekt vor chloridreichen Medien in der Kälte (Abbildung 10).

Zudem wurde in der Literatur bereits bei kultivierten Rattenhepatozyten eine spezielle, durch Cathepsin B vermittelte, hypotherme Zellschädigung in

chloridreichen Lösungen beschrieben (Knoop, 2011), welche im Folgenden zur Permealisation der Lysosomen mit anschließendem Zelltod führte. Diese konnte durch Hemmung von Cathepsin B inhibiert werden. Aufgrund dessen erfolgte auch bei Ratteninsulinomzellen die Testung des Cathepsin B-Inhibitors z-FA-fmk während der Kaltlagerung. Allerdings bestätigte sich keine Verminderung der Kälteschädigung (Abbildung 11), so dass ein Cathepsin B-vermittelter Schädigungsprozess ausgeschlossen werden konnte.

Die Klärung des Mechanismus der chloridabhängigen Schädigung während der Kaltlagerung ist somit weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. Erschwert wird diese durch die bereits erwähnten widersprüchlichen Ergebnisse im Bezug auf Chlorid. Es scheint zwei Wege der nicht-eisenabhängigen, schwächeren hypothetischen Zellschädigung zu geben, welche zelltypspezifisch auftreten.

Auch morphologisch fanden sich ungewöhnliche Ergebnisse in Bezug auf Chlorid. So wurde die erneute Zusammenlagerung der β -Zellen zu größeren Inseln mit Zell-Verbindungen während der Wiedererwärmung, teilweise allerdings mit Blebbildung an der Zellmembran, lediglich nach der Kaltlagerung in der chloridreichen Lösung 2 und nach anschließender Wiedererwärmung in Zellkulturmedium beobachtet (Abbildung 14 F). Wurden die Inseln auch in einer chloridreichen Lösung erwärmt, fanden sich weiterhin abgerundete Zellen (Abbildung 14 G). Somit scheint die Gegenwart von extrazellulärem Chlorid während der Kaltlagerung, in Verbindung mit einer Wiedererwärmung in Zellkulturmedium, die Ausspreitung der β -Zellen während der Erwärmung zu begünstigen. Dies korrelierte mit Ergebnissen bei Schweineaorten-Endothelzellen, wonach eine hohe Chloridkonzentration bei der Kaltinkubation die Mitochondrien schützt und aufgrund des verbesserten Energiestatus in der Wiedererwärmung den Wiederaufbau des in der Kälte degradierten Zytoskeletts erlaubt (A. Dlugos, S. Klüsener, N. Lohaus, T. Wille, U. Rauen, unveröffentlichte Ergebnisse). Demzufolge kann Chlorid sowohl von Vorteil als auch nachteilig sein. Obwohl Chlorid eine beträchtliche Kälteschädigung bei Ratteninsulinomzellen hervorruft, könnte es sich vermutlich günstig in Bezug auf den Energiestatus der Zelle auswirken und damit zu einer verbesserten Regeneration des Zytoskeletts während der Wiedererwärmung in RPMI führen.

Optimierte Basislösung zur Konservierung von Ratteninsulinomzellen

Um die Kaltlagerung von Inselzellen zu optimieren, sollte, im Gegensatz zu den eigentlich zur Organkonservierung hergestellten Lösungen UW und HTK, eine Protektionslösung speziell an die Bedürfnisse von Zellen angepasst sein. Die auf der klassischen HTK-Lösung basierenden neu entwickelten Protektionslösungen (siehe Abschnitt 1.7.1.) wurden daher weitestgehend unter Beachtung der neuesten mechanistischen Gesichtspunkte der Kälteschädigung auf die Bedürfnisse der β -Zellen abgestimmt.

Das oftmals als Puffer eingesetzte natürliche Histidin besitzt mit einem pK-Wert von 6,2 zwar optimale Eigenschaften als Puffer, ruft allerdings während der Kaltlagerung sowie bei Erwärmung einen deutlichen zellschädigenden Effekt hervor (Rauen et al., 2007 b). Als ursächlich scheint die Eigenschaft des Histidins, als mäßiger Eisenchelator mit einer Stabilitätskonstante für 2:1 Komplexe mit Fe^{2+} : $\log\beta_2 = 10,43$ (Williams, 1970), einen redoxaktiven Eisen-Histidin-Komplex mit zellulären chelatisierbaren Eisenionen einzugehen. Es folgt eine Verstärkung der eisenabhängigen Zellschädigung. Aufgrund dieser Toxizität wurde der Puffer Histidin durch das *N*-substituierte, nicht toxische Derivat *N*-Acetylhistidin (pK 7,2) ersetzt (Rauen et al., 2007 b). Zudem wurde die Pufferkapazität gesenkt, da diese für Zellen und Gewebe in geringerem Maße ausreichend war (Wille et al., 2008). Die resultierende osmotische Lücke wurde mit Ionen aufgefüllt.

Weitere Modifizierungen, wie bereits von Wille et al. (2008) beschrieben, waren der Zusatz von Glukose als Energiesubstrat, der Zusatz von Aspartat und das Beibehalten von α -Ketoglutarat als Vorläufer eines Intermediat bzw. Intermediat des Citratzyklus, der Ersatz von Mannitol durch die impermeablere Saccharose sowie der Zusatz von Alanin und Glycin zur Verhinderung einer hypoxie-induzierten Porenbildung (Rauen und de Groot, 2004; Petrat et al., 2011).

Ionenzusammensetzung. In der optimierten Protektionslösung 4 für Inselzellen wurde das zellschädigende Chlorid durch Laktobionat als Hauptanion ersetzt (Tabelle 3). Als Hauptkation wurde Natrium bevorzugt. Im direkten Vergleich zu Kalium nach Ausschaltung der chlorid- und eisenabhängigen Kälteschädigung durch chloridarmes, chelatorhaltiges Medium, zeigte Natrium eine tendenziell, allerdings nicht signifikant höhere Zellprotektion (Abbildung 9). Aufgrund dieser

Ergebnisse scheint Natrium nur eine geringe Rolle bei der hypothermen Zellschädigung der Inselzellen zu spielen.

Allerdings korrelierte diese Tendenz mit einer bereits in der Literatur beschriebenen reduzierten Zellschädigung und verbesserten Inselzellfunktion nach erfolgter Transplantation, wenn die β -Zellen zuvor in der natriumreichen, kaliumarmen ET-Kyoto-Konservierungslösung, im Gegensatz zur kaliumreicheren und natriumärmeren UW-Lösung, kaltgelagert wurden (Negishi et al., 2011). In der ET-Kyoto-Lösung wurde als Hauptanion Gluconat anstatt Laktobionat eingesetzt, so dass der Vorteil nicht eindeutig dem Kation zugeschrieben werden kann.

Im Gegensatz zur klassischen Hypothese der Kälteschädigung mit Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase und folgendem Natriuminflux mit intrazellulärer Natriumakkumulation (Hochachka et al., 1987) könnten diese Ergebnisse eher mit den Annahmen von Fuckert et al. (2000) korrelieren. Demnach findet ein Natriuminflux lediglich getriggert durch Hypoxie, aber nicht durch Hypothermie, statt, so dass ein natriumfreies Medium nicht, wie oftmals angenommen, vor der eigentlichen Kälteschädigung schützt. Es wird sogar ein durch Hypothermie induzierter Natriumefflux beschrieben (Gizewski et al., 1997).

Eisenchelatoren. Als mögliche bessere Alternative wurde neben dem bekannten hydrophilen Eisenchelator Desferal der neue Chelator LK 614 getestet. Das deutlich kleinere, lipophile Hydroxamsäurederivat soll aufgrund seiner Eigenschaften besser und schneller membrangängig sein als das große hydrophile Desferalmolekül, und damit bereits während der frühen Phase der Kälteschädigung intrazelluläres Eisen binden (Wille et al., 2008). Allerdings besitzt Desferal auch mehr Koordinationsstellen für Eisenionen und ist ein deutlich stärkerer Ligand, so dass eine Kombination beider Chelatoren sinnvoll erscheint. Während der Kaltlagerung von Schweine-Aortensegmenten konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Konzentrationen von LK 614 (20 $\mu\text{mol/l}$) allein sowie in Kombination mit einer geringen Konzentration von Desferal einen protektiven Effekt aufweisen (Wille et al., 2008). Auch humane Hepatozyten reagieren in ähnlicher Weise (Pless et al., 2012).

Dagegen konnte während der Kaltinkubation von Inselzellen keine verbesserte Protektion durch den Einsatz von LK 614 beobachtet werden (Tabelle 6). Die tendenziell beste Protektionslösung ist die chloridarme Lösung 4 mit dem Zusatz

von 1 mmol/l Desferal. Eine Kombination der beiden Chelatoren in verminderter Konzentration bestätigte ähnliche Effekte.

pH-Wert. Zudem wurde der pH-Wert der neu modifizierten Lösungen auf 7,0 gesenkt, da sich eine leichte Azidose als Schutz vor verschiedenen zellschädigenden Mechanismen herausstellte (Nishimura et al., 1998; Gores et al., 1988). Dagegen scheint ein moderat azidotischer pH-Wert im Gegensatz zu Schweine-Aortensegmenten (Wille et al., 2008) sowie humanen Hepatozyten (Pless et al., 2012) bei der Kaltlagerung von Ratteninsulinomzellen in chloridarmem Medium keine Rolle zu spielen (Tabelle 7). Ein geringer, nicht signifikanter Unterschied fand sich lediglich in chloridhaltigem Medium, in dem sich ein gegenteiliges Ergebnis von einem vorteilhafteren pH von 7,4 zeigte.

Weitere Additive. Als Ergänzung der optimierten Basislösung wurden weitere Zusätze getestet. Zum einen das Nukleosid Adenosin, dem in verschiedenen Studien, jedoch unter hypoxischen Bedingungen, rezeptor-vermittelte zellprotektive Effekte zugesprochen wurden (Fredholm et al., 2007; Modis et al., 2009). Ein positiver Effekt auf die kälteinduzierte Zellschädigung wurde bereits bei humanen Hepatozyten berichtet (Pless et al., 2012). Die Kaltlagerung der Inselzellen wurde jedoch durch den alleinigen Zusatz von Adenosin nicht verbessert (Tabelle 8).

Zudem wurde das natürliche, aus verzweigten Glucose-Einheiten bestehende Polysaccharid Dextran 40 eingesetzt. Das Makromolekül mit einem Molekulargewicht von etwa 40 000 Da wird beispielsweise zur Verbesserung der Lungen- (Pizanis et al., 2012) oder Nierenkonservierung (Gallinat et al., 2013) verwendet bzw. diskutiert.

Auch die Inselzellkonservierung konnte durch den Einsatz von Dextran 40 in der optimierten Protektionslösung nach einer Langzeitinkubation von 6 Wochen um circa 10 % weiter verbessert werden (Abbildung 12). Darüber hinaus zeigte die Kombination von Dextran und Adenosin einen leicht positiven Effekt (Tabelle 8). Überraschend und mechanistisch interessant war vor allem die Aufhebung der chloridinduzierten Zellschädigung durch den Zusatz von Dextran 40 in einem chloridhaltigen Medium. Der Wirkmechanismus von Dextran ist hierbei noch völlig ungeklärt. Eine Möglichkeit wäre eine Interaktion des Makromoleküls mit der

Zelloberfläche oder eventuell den Einstromwegen bzw. Interaktionspartnern der Chloridionen. Ein Grund zu der Annahme ist die beschriebene antithrombotische Wirkung des Dextrans beispielsweise durch Umhüllung und Interaktion mit der Endothel- bzw. Thrombozytenoberfläche (Keshavje et al., 1992). Zudem ist ein Volumeneffekt nicht auszuschließen, allerdings ist dieser aufgrund einer sehr geringen Erhöhung des osmotischen Druckes eher unwahrscheinlich.

Prinzipien der Zellschädigung bei der Wiedererwärmung

Während die Wiedererwärmung der Inselzellen in RPMI-Zellkulturmedium eine beträchtliche Zellschädigung verursachte, führte hingegen die Erwärmung in der Protektionslösung 4 zu einem signifikant geringeren Vitalitätsverlust der Zellen (Abbildung 13 A, B; Tabelle 9). Morphologisch fand sich allerdings in beiden Lösungen ein ähnliches Bild der noch vitalen Zellen (Abbildung 14), mit wenigen Zellverbindungen, aber intakter Zellmembran. Eine erneute Zusammenlagerung zu Inseln war nicht möglich.

Die Zellschädigung der Ratteninsulinomzellen imponierte zunächst als „Wiedererwärmungsschädigung“, vor welcher Lösung 4 schützte (Abbildung 13 A, B). Hingegen konnte durch einen erneuten Medienwechsel nach 3 h Wiedererwärmung in Lösung 4 auf RPMI gezeigt werden, dass die Schädigung nicht grundsätzlich durch die Wiedererwärmung als solche bedingt ist, sondern bei Medienwechsel nach der Wiedererwärmung stattfand (Abbildung 13 C). Lösung 4 schützte somit nicht während der Wiedererwärmung, sondern vor einer zellulären Dysfunktion, die auch nach der Erwärmung weiter besteht und höchstwahrscheinlich durch eine Störung im Energiehaushalt bereits durch die Kaltlagerung verursacht worden ist.

Diese Überlegungen wurden durch die Tatsache unterstützt, dass ein spezifischer RPMI-Effekt sowie diverse Komponenten des Mediums als Verursacher der „Wiedererwärmungsschädigung“ ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 15 und 16). Auch ein denkbarer eisen- und chloridabhängiger „Wiedererwärmungsschädigungsmechanismus“ konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 13 B und 15).

Die Zellschädigung bei der Wiedererwärmung konnte durch Glycin und Alanin deutlich reduziert werden (Abbildung 18 B). Dieser zellprotektive Effekt wurde ebenfalls bei L929-Zellen beobachtet (B. Akyildiz, U. Rauen, unveröffentlichte Daten). Darüber hinaus wurde bereits bei isolierten Hepatozyten ein deutlich verringerter Vitalitätsverlust durch den Einsatz von Glycin, als einfachste, neutrale Aminosäure, im Wiedererwärmungsmedium beschrieben (Marsh et al., 1993). Auch die strukturverwandte Aminosäure Alanin sowie in geringerer Konzentration Alanin und Serin kombiniert wiesen einen ähnlichen Schutz vor Hypoxie und warmer Reperfusion nach Kaltlagerung auf (Marsh et al., 1993).

Die Annahme, dass die Zellschädigung der Ratteninsulinomzellen während der Wiedererwärmung durch einen Energiemangel verursacht wurde, liegt nahe, da in der Literatur ein Schutzeffekt von Glycin, insbesondere vor einem durch einen ATP-Mangel induzierten Zelltod, beschrieben wurde (Brecht et al., 1994; Carini et al., 1997; Nishimura et al., 1998). Glycin verhindert einen durch Energiemangel getriggerten intrazellulären Natriumanstieg (Frank et al., 2000; Carini et al., 1997). Weitere Untersuchungen in Richtung Energiestoffwechsel und Mitochondrien sollten erfolgen, um den genauen Mechanismus der Zellschädigung während/nach der Wiedererwärmung zu klären.

Der glycin-vermittelte zytoprotektive Effekt in hypoxischen Zellen wurde durch eine Stabilisierung der Zellmembranstruktur (Baines et al., 1990) und weiterer Verhinderung der Bildung einer pathologischen Plasmamembranpore diskutiert (Frank et al., 2000; Petrat et al., 2011). Venkatachalam et al. (1996) vermuteten, dass ein glycin-abhängiger Chloridkanalrezeptor die zentrale Rolle eines Proteinkomplexes in der Plasmamembran spiele, welcher unter hypoxischen Bedingungen eine Plasmamembran-Pore ausbilde. Durch Bindung von Glycin an diesen Rezeptor sowie weitere Membranstrukturen solle, unabhängig von der Chlorid-Kanalaktivität, die Bildung dieser Pore verhindert werden (Petrat et al., 2011). Als weitere Schutzmechanismen von Glycin vor der Hypoxie- und Reoxygenierungs-Schädigung wurde eine Reduktion der Proteolyse in betroffenen Zellen sowie eine Inhibition der inflammatorischen Reaktionen *in vivo* beschrieben (Petrat et al., 2011).

Des Weiteren wurde eine geringere Zellschädigung der Ratteninsulinomzellen während der Wiedererwärmung in bicarbonatfreiem, azidotischem Medium beobachtet (Abbildung 19). Auch in der Literatur wurde eine milde Azidose als

protektiv gegenüber einer Anoxie bzw. einem ATP-Mangel beschrieben (Nishimura et al., 1998).

Die nach diesen Ergebnissen zu vermutende ATP-Depletion der Ratteninsulinomzellen nach längerer Kaltlagerung und Wiedererwärmung konnte kürzlich in der Arbeitsgruppe bestätigt werden (I. Michele, U. Rauen, unveröffentlichte Ergebnisse).

Ausblick

Die Kaltlagerungsfähigkeit von Inselzellen beträgt in Konservierungslösungen, angewendet nach dem derzeitigen Goldstandard, lediglich bis zu 72 h. Aktuell konnte die Kaltlagerung von kultivierten Ratteninsulinomzellen durch verschiedene Ansätze zur Optimierung der Kaltinkubation sowie der Wiedererwärmung (Abbildung 21) von 3 Tagen auf mehrere Wochen deutlich verlängert werden.

Bis jetzt wurden die oben genannten Faktoren der Kälteschädigung lediglich an Ratteninsulinomzellen, einem etablierten *in-vitro*-Zellkulturmodell der β -Zellen, untersucht. RIN-m5F-Zellen kommen der Funktion der humanen Inselzelle durch die Produktion von Insulin und L-Dopa-Decarboxylase sehr nahe und wurden bereits für diverse Fragestellungen als Modell der β -Zellen des Pankreas etabliert (Skelin et al., 2010; Ding et al., 2012).

Nach der erheblichen Verbesserung der Kaltlagerung der β -Zelllinie sollten im Folgenden die verschiedenen Ansätze und Ansatzkombinationen an relevanten primären humanen Inselzellen getestet werden. Selbst die Bestätigung nur einzelner Schädigungsmechanismen würde die Lagerung von β -Zellen vor der Transplantation deutlich verbessern.

Diese bieten ein großes Potential zur Optimierung der Lagerungsbedingungen mit der Möglichkeit die Lagerungszeit zu expandieren und trotzdem das benötigte Zellmaterial an funktionsfähigen Inselzellen zur Transplantation beachtlich zu reduzieren, um so das Problem des sehr hohen Spender-Empfänger-Verhältnisses von 2:1 und mehr Pankreata zu lösen.

7. Zusammenfassung

Für die Inselzelltransplantation müssen isolierte Langerhans'sche Inseln, u. a. während des Transportes sowie der Vorbereitung des Empfängers, gelagert werden. Bei dieser kalt oder auch warm durchgeführten Lagerung kommt es zu einem erheblichen Verlust der Inselquantität und -qualität. Neue Erkenntnisse über Zellschädigungsmechanismen bei Kaltlagerung führten kürzlich zur Verbesserung der Konservierung anderer Zelltypen, und diese Maßnahmen sollten in der vorliegenden Arbeit am Modell der Ratteninsulinomzelllinie RIN-m5F zur Optimierung der Inselzellkonservierung getestet werden.

RIN-m5F-Zellen zeigten nach 72 h Kaltinkubation (4°C) in Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK), University of Wisconsin-Lösung (UW) und Zellkulturmedium (RPMI) eine erhebliche Zellschädigung [Laktatdehydrogenase-(LDH)-Freisetzung: HTK: $74 \pm 6\%$, UW: $60 \pm 8\%$, RPMI: $38 \pm 5\%$]. Die Schädigung war begleitet von einer Lipidperoxidation. Der Zusatz von Eisenchelatoren führte zur Hemmung der Schädigung und Lipidperoxidation in allen Medien (unter Einsatz von 1 mM 2,2'-Dipyridyl: $23 \pm 8\%$, $15 \pm 9\%$ bzw. $12 \pm 4\%$ LDH-Freisetzung). Modifizierte chloridarme Protektionslösungen plus Eisenchelator bewirkten eine weitere Abnahme der Schädigung, der Vitalitätsverlust betrug nach 28 d Kaltlagerung lediglich $17 \pm 3\%$ ($81 \pm 4\%$ in einer analogen chloridreichen Lösung). Nach 3 h Wiedererwärmung in Zellkulturmedium zeigte sich trotz Kaltinkubation in optimierter, chloridarmer Protektionslösung ein weiterer Vitalitätsverlust (nach 28 d 4°C und 3 h 37°C: $92 \pm 3\%$). Dieser Zellschädigung bei der Wiedererwärmung konnte durch eine alanin-, glycin- und saccharosehaltige, bicarbonatfreie Elektrolytlösung mit einem azidotischen pH von 7,0 entgegengewirkt werden (nach 28 d 4°C und 3 h 37°C: $35 \pm 3\%$).

Somit zeigte die Kälteschädigung von RIN-m5F-Zellen eine eisen- und eine chloridabhängige Komponente. Die Zellschädigung bei der Wiedererwärmung wurde durch Alanin, Glycin sowie eine milde Azidose deutlich gesenkt. Durch modifizierte Kälte- und Wiedererwärmungslösungen konnte die Schädigung massiv verringert und die Lagerungszeit erheblich verlängert werden. Die diversen Ansätze stellen im Einzelnen sowie in Kombination ein großes Potential zur Verbesserung der Kaltlagerung von Langerhans'schen Inseln dar und sollten im Folgenden an relevanten primären humanen Inselzellen erprobt werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Agarwal, A., Brayman, K.L. (2012): Update on islet cell transplantation for type 1 diabetes. *Semin. Intervent. Radiol.* 29, 90-98.
2. Baines, A.D., Shaikh, N., Ho, P. (1990): Mechanisms of perfused kidney cytoprotection by alanine and glycine. *Am. J. Physiol.* 259, 80-87.
3. Barton, F.B., Rickels, M.R., Alejandro, R., et al. (2012): Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes care* 35, 1436-1445.
4. Bhathena, S.J., Oie, H.K., Gazdar, A.F., Voyles, N.R., Wilkins, S.D., Recant, L. (1982): Insulin, glucagon, and somatostatin receptors on cultured cells and clones from rat islet cell tumor. *Diabetes* 31, 521-531.
5. Belzer, F.O., Southard, J.H. (1988): Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45, 673-676.
6. Belzer, F.O. (1993): Evaluation of preservation of the intra-abdominal organs. *Transplant. Proc.* 25, 2527-2530.
7. Blankensteijn, J.D., Terpstra, O.T. (1991): Liver preservation: the past and the future. *Hepatology* 13, 1235-1250.
8. Brecht, M., de Groot, H. (1994): Protection from hypoxic injury in cultured hepatocytes by glycine, alanine, and serine. *Amino Acids* 6, 25-35.
9. Bretschneider, H.J. (1980): Myocardial protection. *Ann. Thorac. Surg.* 28, 295-302.
10. Bretschneider, H.J., Helmchen, U., Kehrer, G. (1988): Nierenprotektion. *Klin. Wochenschr.* 66, 817-827.

11. Bretzel, R.G. (2010): Inselzelltransplantation bei Diabetes mellitus - ein Prototyp translationaler Forschung. *Diabetologie und Stoffwechsel* 5(4), 232-241.
12. Bretzel, R.G. (2013): Inselzelltransplantation - Indikation und Ergebnisse. In: Berger, H.G. et al.: *Erkrankungen des Pankreas*. S.486-491. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
13. Carini, R., Bellomo, G., Grazia de Cesaris, M., Albano, E. (1997): Glycine protects against hepatocyte killing by KCN or hypoxia by preventing intracellular Na⁺ overload in the rat. *Hepatology* 26, 109-112.
14. Cooksey, C., Jones, D., Gabrielsen, S., Huang, J., Simcox, A., Luo, B., Soesanto, Y., Rienhoff, H., Abel, D., McClain, D. (2010): Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of β -cell function in the obese (*ob/ob lep^{-/-}*) mouse. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 298, 1236-1243.
15. Daoud, J., Rosenberg, L., Tabrizian, M. (2010): Pancreatic islet culture and preservation strategies: Advances, Challenges, and Future Outlook. *Cell transplantation* 19, 1523-1535.
16. de Groot, H. (1998): Ein Zusammenspiel vieler Variablen. *Essener Unikate* 10, 62-75.
17. Ding, Y., Zhang, Z.F., Dai, X.Q., Li, Y. (2012): Myricetin protects against cytokine-induced cell death in RIN-m5F β -cells. *J. Med. Food.* 15 (8), 733-740.
18. Dong, Z., Patel, Y., Saikumar, P., Weinberg, J. M., Venkatachalam, M. A. (1998): Development of porous defects in plasma membranes of adenosine triphosphate-depleted Madin-Darby canine kidney cells and its inhibition by glycine. *Lab Invest.* 78, 657-668.

19. Frank, A., Rauen, U., de Groot, H. (2000): Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. *J. Hepatol.* 32, 58-66.
20. Fredholm, B.B. (2007): Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell. Death. Differ.* 14, 1315-1323.
21. Fuckert, O., Rauen, U., de Groot, H. (2000): A role for sodium in hypoxic but not in hypothermic injury to hepatocytes and LLC-PK₁ cells. *Transplantation* 70, 723-730.
22. Fujita, H., Ishizaki, Y., Yanagisawa, A., Morita, I., Murota, S. I., Ishikawa, K. (1999): Possible involvement of a chloride-bicarbonate exchanger in apoptosis of endothelial cells and cardiomyocytes. *Cell Biol. Int.* 23, 241-249.
23. Gallinat, A., Lüer, B., Swoboda, S., Rauen, U., Paul, A., Minor, T. (2013): Use of the new preservation solution Custodiol-N supplemented with dextran for hypothermic machine perfusion of the kidney. *Cryobiology* 66, 131-135.
24. Gazdar, A.F., Chick, W.L., Oie, H.K., Sims, H.L., King, D.L., Weir, G.C., Lauris V. (1980): Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell line established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3519.
25. Gizewski, E.R., Rauen, U., Kirsch, M., Reuters, I., Diederichs, H., de Groot, H. (1997): Rapid decrease in cellular sodium and chloride content during cold incubation of cultured liver endothelial cells and hepatocytes. *Biochem. J.* 322, 693-699.

26. Gores, G.J., Nieminen, A.L., Fleischman, K.E., Dawson, T.L., Herman, B., Lemasters, J.J. (1988): Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP-depleted hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 255, 315-322.
27. Halban, P.A., Praz, G.A., Wollheim, C.B. (1983): Abnormal glucose metabolism accompanies failure of glucose to stimulate insulin release from a rat pancreatic cell line (RINm5F). *Biochem. J.* 212, 439.
28. Heimlich, G., Cidlowski J.A. (2006): Selective role of intracellular chloride in the regulation of the intrinsic but not extrinsic pathway of apoptosis in Jurkat T-cells. *J. Biol. Chem.* 281, 2232-2241.
29. Herold, G. (2014): *Innere Medizin*. Köln: Herold G.; s. bes. S. 719.
30. Hochachka, P.W. (1986): Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231, 234-241.
31. Huang, H., Salahudeen, A.K. (2002): Cold induces catalytic iron release of cytochrome P-450 origin: a critical step in cold storage-induced renal injury. *Am. J. Transplant.* 2, 631-639.
32. Jahansouz, C., Kumer, S.C., Brayman, K.L.: Evolution of β -Cell Replacement Therapy in Diabetes Mellitus: Islet Cell Transplantation. *J. Transplant.* 2011, Online Publikation; www.hindawi.com/journals/jtran/2011/247959/.
33. Jarosz-Chobot, P., Polanska, J., Szadkowska, A., Kretowski, A., Bandurska-Stankiewicz, E., Ciechanowska, M., Deja, G., Mysliwiec, M., Peczynska, J., Rutkowska, J., Sobel-Maruniak, A., Fichna, P., Chobot, A., Rewers, M. (2011): Rapid increase in the incidence of type 1 diabetes in polish children from 1989 to 2004, and predictions for 2010 to 2025. *Diabetologia* 54, 508-515.

34. Kelly, R.F. (2000): Current strategies in lung preservation. *J. Lab. Clin. Med.* 136, 427-440.
35. Kemp, C.B., Knight, M.J., Scharp, D.W. (1973): Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia* 9(6), 486-491.
36. Kerkweg, U., Li, T., de Groot, H., Rauen, U. (2002): Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: the central role of chelatable iron. *Hepatology* 35, 560-567.
37. Keshavjee, S.H., Yamazaki, F., Yokomis, H., Cardoso, P.F., Mullen, J.B., Slutsky, A.S., Patterson, G.A. (1992): The role of dextran 40 and potassium in extended hypothermic lung preservation for transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 103, 314-325.
38. Kimura, Y., Okitsu, T., Xibao, L., Teramae, H., Okonogi, A., Toyoda, K., Uemoto, S., Fukushima, M. (2013): Improved hypothermic short-term storage of isolated mouse islets by adding serum to preservation solutions. *Islet.* 5(1), [Epub ahead of print]
39. Kin, T., Senior, P., O'Gorman, D., Richer, B., Salam, A., Shapiro, A.M. (2008): Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transpl. Int.* 21, 1029-1035.
40. Knoop, S. (2011): Untersuchungen zur Beteiligung der Lysosomen und des Cytoskeletts an der kälteinduzierten Zell- und Gewebeschädigung. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen.
41. Largiader, F., Kolb, E., Binswanger, U. (1980): A long-term functioning human pancreatic islet allotransplant. *Transplantation* 29(1), 76-77.

42. Lang, F., Föller, M., Lang, K.S., Lang, P.A., Ritter, M., Gulbins, E., Vereninov, A., Huber, S.M. (2005): Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J. Membr. Biol.* 205, 147-157.
43. Lenzen, S. (2008): Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 343-347.
44. Liu, F., Tian, W., Yang, Y., Zhang, Q., Zhu, M., Yang, L., Yang, L., Li, J., Liu, J., Wu, P., Yang, K., Wang, X., Shen, Y., Qi, Z. (2014): Optimal method for short-term or long-term islet preservation: comparison of islet culture, cold preservation and cryopreservation. *J. Artif. Organs.* 17(4), 337-343.
45. Mankad, P.S., Chester, A.H., Yacoub, M.H. (1991): Role of potassium concentration in cardioplegic solutions in mediating endothelial damage. *Ann.Thorac. Surg.* 51, 89-93.
46. Marsh, D.C., Vreugdenhil, P.K., Mack, V.E., Belzer, F.O., Southard, J.H. (1993): Glycine protects hepatocytes from injury caused by anoxia, cold ischemia and mitochondrial inhibitors, but not injury caused by calcium ionophores or oxidative stress. *Hepatology* 17, 91–98.
47. Matsumoto, S., Lawrence, O., Rigley, T.H., Lakey, J.R., Stevens, R.B., Strong, D.M. (2001): University of Wisconsin solution with trypsin inhibitor pefabloc improves survival of viable human and primate impure islets during storage. *Cell Tissue Bank.* 2, 15-21.
48. Matthaei, S., Kellerer, M.: S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes - Version 1.0. Deutsche Diabetes Gesellschaft 2011, Online Publikation; http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/AktualisierungTherapieTyp1Diabetes_1_20120319_TL.pdf

49. Mechlovich, D., Amit, T., Mandel, S.A., Bar-Am, O., Bloch, K., Vardi, P., Youdim, M.B. (2010): The novel multifunctional, iron-chelating drugs M30 and HLA20 protect pancreatic beta-cell lines from oxidative stress damage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333, 874-882.
50. Minkowski, O. (1892): Weitere Mittheilungen über den Diabetes mellitus nach Exstirpation des Pankreas. *Berliner Klinische Wochenschrift* 29, 90-94.
51. Mislser, S. (2010): The isolated pancreatic islet as a micro-organ and its transplantation to cure diabetes: celebrating the legacy of Paul Lacy. *Islets*, 2(4), 210–224.
52. Modis, K., Gero, D., Nagy, N., Szoleczky, P., Toth, Z.D., Szabo, C. (2009): Cytoprotective effects of adenosine and inosine in an in vitro model of acute tubular necrosis. *Br. J. Pharmacol.* 158, 1565-1578.
53. Najarian, J.S., Sutherland, D.E., Matas, A.J., Steffes, M.W., Simmons, R.L., Goetz F.C. (1977): Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplant. Proc.* 9, 233-236.
54. Negishi, K., Teratani, T., Iwasaki, J., Kanazawa, H., Kasahara, N., Lefor, A., Uemoto, S., Fujimoto, Y., Kobayashi, E. (2011): Luminescence technology in preservation and transplantation for rat islet. *Islets* 3, 111-117.
55. Nishimura, Y., Romer, L.H., Lemasters, J.J. (1998): Mitochondrial dysfunction and cytoskeletal disruption during chemical hypoxia to cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells: the pH paradox and cytoprotection by glucose, acidotic pH, and glycine. *Hepatology* 27, 1029-1039.
56. Noguchi, H., Naziruddin, B., Jackson, A., Shimoda, M., Ikemoto, T., Fujita, Y., Chujo, D., Takita, M., Kobayashi, N., Onaca, N., Levy, M.F., Matsumoto, S. (2010): Low-temperature preservation of isolated islets is superior to

- conventional islet culture before islet transplantation. *Transplantation* 89, 47-54.
57. Noll, T., de Groot, H., Sies, H. (1987): Distinct temporal relation among oxygen uptake, malondialdehyde formation, and low-level chemiluminescence during microsomal lipidperoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 252, 284-291.
 58. Oberholzer, J., Tzvetanov, I.G., Benedetti, E. (2010): Surgical complications of pancreas transplantation. *In*: Hakim, N.S., Stratta, R.J., Gray, D., Friend, P., Coleman, A.: *Pancreas, Islet and Stem Cell Transplantation for Diabetes*. 2.Ed. New York: Oxford University press; s. bes. S.179 und S.185-186.
 59. Oie, H.K., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Weir, G.C., Baylin, S.B. (1983): Clonal analysis of insulin and somatostatin secretion and L-dopa decarboxylase expression by a rat islet cell tumor. *Endocrinology* 112, 1070-1075.
 60. Perrot, S., Dutertre-Catella, H., Martin, C., Rat, P., Warnet, J.M. (2003): Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. *Toxicol. Sci.* 72,122-129.
 61. Petrat, F., Boengler, K., Schulz, R., de Groot, H. (2011): Glycine, a simple physiological compound protecting by yet puzzling mechanism (s) against ischemia-reperfusion injury: current knowledge. *Br. J. Pharmacol.* 165, 2059-2072.
 62. Pizanis, N., Petrov, A., Heckmann, J., Wiswedel, I., Wohlschläger, J., de Groot, H., Jakob, H., Rauen, U., Kamler, M. (2012): A new preservation solution for lung transplantation: evaluation in a porcine transplantation model. *J. Heart. Lung. Transplant.* 31, 310-307.

63. Pless, G., Sauer, I.M., Rauen, U. (2012): Improvement of the cold storage of isolated human hepatocytes. *Cell Transplant.* 21, 23-37.
64. Pless-Petig, G., Singer, B., Rauen, U. (2012): Cold storage of rat hepatocyte suspensions for one week in a customized cold storage solution - preservation of cell attachment and metabolism. *PLoS One* 7 (7), e40444.
65. Rauen, U., Elling, B., Gizewski, E.R., Korth, H.G., Sustmann, R., de Groot, H. (1997): Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 17-24.
66. Rauen, U., Polzar, B., Stephan, H., Mannherz, H.G., de Groot, H. (1999): Cold induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 13, 155-168.
67. Rauen, U., Petrat, F., Li, T., de Groot, H. (2000): Hypothermia injury/cold-induced apoptosis-evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury inspite of low O₂-/H₂O₂ formation. *FASEB J.* 14, 1953-1964.
68. Rauen, U., de Groot, H. (2002): Mammalian cell injury induced by hypothermia - the emerging role of reactive oxygen species. *Biol. Chem.* 383, 477-488.
69. Rauen, U., Kerkweg, U., Weisheit, D., Petrat, F., Sustmann, R., de Groot, H. (2003): Cold-induced apoptosis of hepatocytes: mitochondrial permeability transition triggered by nonmitochondrial chelatable iron. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1664-1678.
70. Rauen, U., Petrat, F., Sustmann, R., de Groot, H. (2004): Iron-induced mitochondrial permeability transition in cultured hepatocytes. *J. Hepatol.* 40, 607-615
71. Rauen, U., de Groot, H. (2004): New insights into the cellular and molecular

- mechanisms of cold storage injury. *J. Invest. Med.* 52, 299-309.
72. Rauen, U., Kerkweg, U., Wusteman, M. C., de Groot, H. (2006): Cold-induced injury to porcine corneal endothelial cells and its mediation by chelatable iron: implications for corneal preservation. *Cornea* 25, 68-77.
 73. Rauen, U., Kerkweg, U., de Groot, H. (2007 a): Iron-dependent vs. iron-independent cold-induced injury to cultured rat hepatocytes: a comparative study in physiological media and organ preservation solutions. *Cryobiology* 54, 77-86.
 74. Rauen, U., Klempt, S., de Groot, H. (2007 b): Histidine-induced injury to cultured liver cells, effects of histidine derivatives and of iron chelators. *Cell. Mol. Life. Sci.* 64, 192-205.
 75. Rauen, U., de Groot, H. (2008): Inherent toxicity of organ preservation solutions to cultured hepatocytes. *Cryobiology* 56, 88-92.
 76. Rauen, U., Wu, K., Witzke, O., de Groot, H. (2008): Custodiol-N – a new, mechanism-based organ preservation solution. *Cryobiology* 57, 331.
 77. Ricordi, C., Lacy, P. E., Scharp, D.W. (1989): Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes* 38, 140-142.
 78. Salahudeen, A.K., Joshi, M., Jenkins, J.K. (2001): Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal proximal tubular cells. *Transplantation* 72, 798-804.
 79. Salahudeen, A.K., Huang, H., Joshi, M., Moore, N.A., Jenkins, J.K. (2003): Involvement of the mitochondrial pathway in cold storage and rewarming associated apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Am. J. Transplant.* 3, 273-280.

80. Salehi, P., Hansen, M.A., Avila, J.G., Barbaro, B., Gangemi, A., Romagnoli, T., Wang, Y., Qi, M., Murdock, P., Benedett, E., Oberholzer, J.(2006): islet isolation outcomes from pancreata preserved with Histidine- Tryptophan Ketoglutarate versus University of Wisconsin solution. *Transplantation* 15, 983-985.
81. Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Rya, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Rajotte, R.V. (2000): Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 343, 230-238.
82. Shirouzu, Y., Gu, Y., Koga, M., Sakurai, T., Qi, M., Hiura, A., Sumi, S., Inoue, K. (2006): Cold preservation of islets in UW solution- with special references to apoptosis. *J. Surg. Res.* 133, 167-75.
83. Skelin, M., Rupnik, M., Cencic, A. (2010): Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *ALTEX.* 27(2), 105-13.
84. Sutherland ,D.E., Gruessner, R.W., Dunn, D.L., et al. (2001): Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution. *Ann. Surg.* 233, 463–501.
85. Swanson, D.K., Pasaoglu, I., Berkoff, H.A., Southard, J.A., Hegge, J.O. (1988): Improved heart preservation with UW preservation solution. *J Heart Transplant.* 7, 456-67.
86. Tsukimoto, M., Harada, H., Ikari, A., Takagi, K. (2005): Involvement of chloride in apoptotic cell death induced by activation of ATO-sensitive P^uX7 purinoreceptor. *J. Biol. Chem.* 280, 2653-2658.

87. Vairetti, M., Ferrigno, A., Bertone, R., Richelmi, P., Bertè, F., Freitas, I. (2005): Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1740, 367-374.
88. Venkatachalam, M.A., Weinberg, J.M., Patel, Y., Saikumar, P., Dong, Z. (1996): Cytoprotection of kidney epithelial cells by compounds that target amino acid gated chloride channels. *Kidney Int.* 49, 449–460.
89. Vollmar, B., Janata, J., Yamauchi, J., Wolf, B., Heuser, M., Menger, M.D. (1999): Exocrine, but not endocrine, tissue is susceptible to microvascular ischemia/reperfusion injury following pancreas transplantation in the rat. *Transpl. Int.* 12, 50-55.
90. Von Mering, J., Minkowski, O. (1890): Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 26, 371-387.
91. Wahlberg, J.A., Southard, J.H., Belzer, F.O. (1986): Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology.* 23, 477-482.
92. Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C., Shaw, J. (2011): IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 94, 311 - 321.
93. Wille, T., Gonder, S., Thiermann, H., Seeger, T., Rauen, U., Worek, F. (2011): Evaluation of functional and structural alterations in muscle tissue after short-term cold storage in a new tissue preservation solution. *Cells Tissues Organs* 194, 501-509.
94. Wille, T., de Groot, H., Rauen, U. (2008): Improvement of cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments. *J. Vasc. Surg.* 47, 422-431.

95. Wille, T., Rauen, U. (2010): Eine neue Lösung zur kalten Lagerung von Blutgefäßen. *Gefäßchirurgie* 15, 442-447.
96. Williams, D.R. (1970): Thermodynamic considerations in co-ordination. Part VII. Solubility of the histidine-H⁺ system and stability constants, free energies, enthalpies, and entropies of the protonation of histidine and tryptophan and of formation of their manganese(II), iron(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes. *J. Chem. Soc.*, 1550-1555.
97. Wu, K., Türk, T.R., Rauen, U., Su, S., Feldkamp, T., de Groot, H., Wiswedel, I., Baba, H.A., Kribben, A., Witzke, O. (2011): Prolonged cold storage using a new histidine-tryptophan-ketoglutarate-based preservation solution in isogeneic cardiac mouse grafts. *Eur. Heart J.* 32, 509-516.
98. Wu, S., Wohlschlaeger, J., de Groot, H., Rauen, U. (2009): Evaluation of a modified HTK solution containing the new iron chelator LK 614 in an isolated rat liver perfusion model. *J. Invest. Surg.* 22, 340-347.
99. Zhang, G., Matsumoto, S., Hyon, S.H., Qualley, S.A., Upshaw, L., Strong, D.M., Reems, J.A. (2004): Polyphenol, an extract of green tea, increases culture recovery rates of isolated islets from nonhuman primate pancreata and marginal grade human pancreata. *Cell Transplant.* 13, 145-152.
100. Zieger, M.A., Gupta, M.P. (2009): Hypothermic preconditioning of endothelial cells attenuates cold-induced injury by a ferritin-dependent process. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 680-691.

9. Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection
CITR	Collaborative Islet Transplantation Registry
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Desferal	Deferoxaminmesilat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPD	2,2'-Dipyridyl
FKS	Fetales Kälberserum
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung
KH	Krebs-Henseleit-Lösung
L15	Leibovitz-15-Zellkulturmedium
LDH	Laktatdehydrogenase
LK 614	3,4-Dimethoxy- <i>N</i> -Methyl-Benzhydroxamsäure
LPO	Lipidperoxidation
MDA	Malondialdehyd
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MP	Membranpore
MPT	Mitochondriales Membranpotential
NPPB	5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoesäure
pK	Negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante
UW-Lösung	University of Wisconsin-Lösung
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SITS	4-Acetamido-4'-Isothiocyanato-Stilben-2,2'-Disulfonsäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
z-FA-fmk	<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-Phenylalanin-Alanin- Fluoromethylketon

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich in den letzten Jahren bei der Erstellung dieser Dissertation begleitet haben.

Besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ursula Rauen, Leiterin der Arbeitsgruppe am Institut für physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen, bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen. Auch für die hervorragende fachliche Unterstützung sowie die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Vielen Dank auch an die Arbeitsgruppe, insbesondere an Dr. Gesine Pless-Petig und Sven Knoop für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft speziell bei technischen Fragen sowie an Frau Birgit Podleska für die Einarbeitung in die Labortätigkeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und meinem Mann, die mich in den letzten Jahren mit viel Geduld, vielseitig und liebevoll unterstützt haben.

11. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.