

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die prädiabetische Inselentzündung bei BB-Ratten in Hinsicht auf die mRNA-Expression bestimmter Zytokine und der induzierbaren NO-Synthase untersucht sowie die Modulierbarkeit der Insulinitis durch Bakterienbestandteile und Insulin geprüft werden. Die Quantifizierung der mRNA-Expression im Pankreas mit RT-PCR in Zusammenhang mit histologischer Analyse des Insulinitis-Grades erlaubte Aussagen über den zeitlichen Verlauf und die Art der an der prädiabetischen Insulinitis der BB-Ratte beteiligten Immunzellen und Entzündungsprodukte.

Die vorgelegten Befunde zeigen, daß schon im Alter von 50 Tagen, noch vor einer lichtmikroskopisch erkennbaren Insulinitis, die Pankreas-mRNA-Expression sowohl proinflammatorischer (Interferon gamma, $IFN\gamma$, induzierbare NO-Synthase, iNOS) als auch suppressorischer (Interleukin-10, IL-10, Transforming Growth Factor beta, $TGF\beta$) Zellprodukte gesteigert ist. Diese Beobachtung unterstützt das Konzept einer lichtmikroskopisch unauffälligen frühen Phase der Inselinfiltration mit einzelnen Zellen, der sog. "single cell insulinitis".

Es konnte außerdem erstmals beschrieben werden, daß der Beginn der histologischen Insulinitis bei BB-Ratten im Alter von 70 Tagen durch mononukleäre Infiltration eng mit der vermehrten Produktion von $IFN\gamma$ - und iNOS-mRNA und der Herunterregulation von IL-10- und $TGF\beta$ -mRNA im Pankreas korreliert. Diese Befunde zeigen eine im Alter von 70 Tagen durch TH1-ähnlichen Zellen und zytotoxischen Makrophagen beherrschte Situation im Pankreas an.

Aus diesen Erkenntnissen zur Immunpathogenese des Typ 1 Diabetes leitet sich das Konzept ab, die β -Zelldestruktion durch Modulation des TH1/TH2-Gleichgewichtes zu beeinflussen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz bestimmter Bakterienbestandteile versucht.

Für die BB-Ratte war bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt, ob die Bakterienpräparate BCG, Diphtherie-Toxoid, Tetanus-Toxoid, OM-89 sowie LPS eine Veränderung des mRNA-Musters im Pankreas und der Insulinitis bewirken können und welche Art von Veränderungen induziert werden würden. Um diese immunregulatorischen Vorgänge bei der BB-Ratte durch Immunmodulation näher zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit molekularbiologische Untersuchungen des mRNA-Musters im Pankreas und histologische Untersuchungen der Inselinfiltration vorgenommen. Besondere Fragestellung dieser Arbeit war, ob die in Frage kommenden immunmodulierenden Substanzen, auch wenn sie relativ spät im Krankheitsprozeß gegeben werden, eine normalerweise destruktive Insulinitis verändern können.

Es konnte beobachtet werden, daß eine bei beginnender Insulinitis erfolgte Behandlung mit immunmodulatorischen Bakterienbestandteilen bei der BB-Ratte Veränderungen im mRNA-

Muster des Pankreas bewirken kann, wobei die Infiltration der Inseln nicht reduziert wird. Die einmalige subkutane Injektion von BCG und Diphtherie-Toxoid steigerte die mRNA-Menge für die TH2-Zytokine IL-10 und TGF β im Vergleich zur NaCl-behandelten Kontrolle, senkte die mRNA-Menge für iNOS und ließ diejenige für das TH1-Zytokin IFN γ unbeeinflusst. Durch IL-10 und TGF β könnte es zu einer Suppression diverser Effektorzellfunktionen der zellvermittelten Immunität, besonders der proinflammatorischen Makrophagenfunktion kommen (BROMBERG, 1995; RENNICK et al., 1992), erkennbar an der gesunkenen iNOS-Expression. Im Gegensatz zur deutlichen Beeinflussung durch BCG und Diphtherie-Toxoid wurde durch eine Injektion von Tetanus-Toxoid das mRNA-Muster des Pankreas nicht verändert.

Die mehrmalige orale Applikation von OM-89 und LPS führte verglichen mit der Kontrollgruppe, vermutlich durch Hemmung der TH1-ähnlichen Zellen, zu einem Absinken der mRNA-Menge für IFN γ . Gleichzeitig steigerten diese beiden oral gegebenen Substanzen, ebenso wie injizierte Substanzen, die mRNA-Menge für TGF β , unterschieden sich aber in ihrer Wirkung auf iNOS- und IL-10-Expression. Durch OM-89 konnte auch die iNOS-Expression gesenkt werden, und die IL-10-Transkription stieg an, während diese Beobachtungen nach LPS-Behandlung nicht gemacht werden konnten. Mehrmalige orale OM-89-Gabe scheint also zu einer Induktion oraler Toleranz zu führen und ist daher möglicherweise in der Lage eine unspezifische Suppression im Pankreas und damit auf die für den Typ 1 Diabetes pathogenetisch entscheidenden Infiltratzellen auszuüben. Im Gegensatz dazu kann eine LPS-Desensibilisierung, wie sie in vitro gesehen wird, hier nicht ausgelöst werden, denn es wird weder die iNOS-Expression gehemmt und noch die IL-10-Expression gesteigert.

Insgesamt führt die Immunmodulation durch bakterielle Produkte in dieser Arbeit nicht zu einer Reduktion der Zahl von Inselinfiltratzellen (Quantität), sondern verändert die mRNA-Expression von Entzündungsprodukten im Pankreas (Qualität).

Im Vergleich dazu wurde eine prophylaktische kontinuierliche Verabreichung von Insulin bei der BB-Ratte durchgeführt, von der bereits bekannt war, daß dadurch eine fast vollständige Hemmung der Insulinitis bewirkt wird, was sich in diesen Untersuchungen bestätigte. Zudem zeigte die Analyse der mRNA im Pankreas, daß die Genexpression aller untersuchten Zytokine und der iNOS auf das Niveau gesunder Ratten abgesunken war. Damit bewirkt die frühzeitige Insulingabe sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Hemmung der Inselentzündung bei BB-Ratten

8. Summary

Wörz-Pagenstert, U. (1996):

"Analysis of prediabetic insulinitis in the BB rat: Gene expression of cytokines and nitric oxide synthase plus their modulation by bacterial vaccines and insulin"

In the present study the prediabetic islet inflammation in BB rats was examined for the mRNA expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase. Furthermore, it was tried to modulate the insulinitis by administration of bacterial compounds and insulin. Pancreatic mRNA expression was analysed by RT-PCR in parallel with histological grading of insulinitis. The results obtained show that at 50d of age, prior to light-microscopic recognizable insulinitis, there was already an enhanced mRNA expression of both, proinflammatory (interferon gamma, IFN γ ; inducible NO synthase, iNOS) and suppressive (interleukin-10, IL-10; transforming growth factor beta, TGF β) immune cell products. This observation supports the concept of an inconspicuous early phase of islet infiltration by single cells, called "single cell insulinitis". Secondly, the obtained data show that the onset of insulinitis in BB rats by the age of 70d was associated with increased production of IFN γ - and iNOS-mRNA and downregulation of IL-10- and TGF β -mRNA. These results indicate that pancreatic lesions in BB rats are dominated by TH1 cells and cytotoxic macrophages.

From these findings the concept is derived that the β cell destruction may be influenced by modulation of the TH1/ TH2 balance. In the present study this was tried by application of bacterial components. Experiences with the impact of the bacterial preparations BCG, diphtheria toxoid, tetanus toxoid, OM-89 and LPS on cytokine mRNA patterns in the pancreas of BB rats were not available. After treatment with the vaccines the BB rat pancreas was analysed by RT-PCR for mRNA expression pattern and by histological analysis of islet infiltration. It was of particular interest in this study whether these immunomodulating substances could change the usually destructive insulinitis even when given relatively late in the disease process.

It was noticed that treatment with immunomodulatory bacterial components during the beginning insulinitis caused changes in the pancreatic mRNA pattern of BB rats while the degree of insulinitis was not decreased. A single subcutaneous injection of BCG and diphtheria toxoid enhanced the mRNA amount for the TH2 cytokines IL-10 and TGF β in comparison to the saline-treated controls, reduced the mRNA amount for iNOS and did not affect IFN γ mRNA levels. IL-10 and TGF β are known to cause the suppression of different effector functions in

cell mediated immunity, especially of the proinflammatory function of macrophages (BROMBERG, 1995; RENNICK et al., 1992), which was evident from the reduced iNOS expression. In contrast to the marked influence of BCG and diphtheria toxoid on the pancreas mRNA pattern there was no change by the injection of tetanus toxoid. The repeated oral administration of OM-89 and LPS led to a decrease of IFN γ -mRNA presumably through inhibition of TH1 cells. At the same time both of these orally given substances, like the injected substances, increased the mRNA amount of TGF β but differed in their influence on iNOS and IL-10 expression. OM-89 was able to decrease iNOS expression and to enhance IL-10 expression, whereas LPS was unable to induce such changes. Hence repeated oral administration of OM-89 possibly induces oral tolerance and, thus, exerts unspecific suppression of pathogenetically relevant islet infiltrating cells. In contrast, LPS desensibilisation was not induced by oral treatment, because iNOS expression was not inhibited and IL-10 expression not enhanced.

All together, the immunomodulation by bacterial products in this study did not lead to a decrease of the number of infiltrating cells (quantity) but changed the mRNA expression of inflammatory products in the pancreas (quality).

For comparison, a prophylactic continuous administration of insulin was carried out, which was known to result in almost complete inhibition of insulinitis and has been confirmed here. The pancreatic mRNA analysis showed downregulation of all examined cytokines and of the iNOS to the level of healthy rats. Thus prophylactic administration of insulin inhibits the development of insulinitis in BB rats by quantitative and qualitative means.