

Thiamine and benfotiamine prevent apoptosis induced by high glucose-conditioned extracellular matrix in human retinal pericytes

Beltramo E, Nizheradze K, Berrone E, Tarallo S, Massimo P

Diabetes Metab Res Rev; 2009; 25: 647-656

Zusammenfassung / Fazit

In in-vitro-Zellversuchen wurden aus humanen Nabelschnur-Endothelzellen unter physiologischer oder hoher Glukose (NG/HG) und unter Zusatz von Benfotiamin oder Thiamin extrazelluläre Matrix (ECM) gebildet. Darauf wurden humane retinale Perizyten ebenfalls in NG- oder HG-Lösung kultiviert. Gemessen wurden Adhäsion der Perizyten auf der Matrix, Anzahl der Zellen und korrekte DNA-Synthese. Als Apoptose-Marker dienten DNA-Fragmentation und die Expression von Bcl-2 und Bax bzw. der Bcl-2/Bax Quotient.

Die Adhäsion der Perizyten auf HG-konditionierter ECM ist geringer als auf NG-konditionierter ECM. Die DNA-Synthese ist bei Vermehrung auf HG-ECM beeinträchtigt. Die Kultur der Zellen auf HG-ECM zeigt eine starke Erhöhung der Apoptose.

Erfolgt die Bildung der HG-ECM unter Zusatz von Benfotiamin oder Thiamin, wird die vermehrte Apoptose komplett verhindert.

Im Zellversuch dient die extrazelluläre Matrix als Modell für die retinale Basalmembran. Unter hyperglykämischen Bedingungen führt die erhöhte AGE-Bildung zu strukturellen Veränderungen der Matrix. Diese beeinträchtigen das Perizyten-Wachstum. Benfotiamin und Thiamin heben diesen Effekt auf.

Einleitung / Problemstellung

Die diabetische Retinopathie geht im Frühstadium einher mit einer Verdickung der extrazellulären Matrix der retinalen Basalmembran und dem Verlust von retinalen Perizyten, gefolgt von einer stärkeren Anfälligkeit der Kapillaren in Bezug auf die Bildung von Mikroaneurismen. Frühere Arbeiten befassten sich mit Zellversuchen mit bovinen retinalen Perizyten, kultiviert auf extrazellulärer Matrix (ECM), die in Glucose-reichem Milieu (HG) gebildet wurde. Diese Versuche ergaben auf eine verringerte Adhäsion der Perizyten auf der Matrix, jedoch keine Veränderung der Apoptose. Erfolgte die Bildung von ECM (HG) unter Zusatz von Thiamin oder Benfotiamin, zeigte sich keine Verminderung der Perizytenadhäsion. Es war bislang nicht bekannt, ob sich humane Perizyten ebenso verhalten.

Gegenstand / Ziel der Arbeit

Untersucht wurde das Verhalten von humanen Netzhautperizyten aus zwei verschiedenen Zelllinien (Wild-Typ und immortalisiert), kultiviert auf extrazellulärer Matrix. Die Matrix wiederum wurde von Endothelzellen in einem Medium mit physiologischer/hocher Glukosekonzentration mit oder ohne Zusatz von Thiamin (T) oder Benfotiamin (BT) gebildet.

Studiendesign / Methodik

- ◆ Experimentelles Studiendesign
Aus humaner Nabelschnur wurden Endothelzellen (HUVEC) gewonnen, die in (1) Glucose-reichem Milieu (HG) oder (2) normalem, physiologischem Milieu (NG) extrazelluläre Matrices bildeten. Auf den Matrices wurde dann das Wachstum humaner retinaler Perizyten gemessen. Eingesetzt wurden Perizyten aus zwei verschiedenen Zelllinien: Wild-Typ (WT-HRP) oder immortalisierte Zellen (Bmi-HRP).
- ◆ Matrixproduktion
 - 1.Serie: HUVEC kultiviert in NG
HUVEC kultiviert in HG
 - 2.Serie: HUVEC kultiviert in NG
HUVEC kultiviert in HG
HUVEC kult. in HG + T
(50 oder 100 Mikromol/L)
HUVEC kult. in HG + BT
(50 oder 100 Mikromol/L)
- ◆ Zell-Adhäsion
Perizyten wurden 18 Stunden in Nährlösung (NG) auf konditionierter ECM oder auf einer Unterlage aus Kunststoff (Kontrolle) kultiviert und dann gezählt (Bürker-Kammer)

- ◆ Zell-Vermehrung (Replikation)
Perizyten wurden 7 Tage lang in Nährlösung (NG oder HG) vermehrt, entweder auf konditionierter ECM oder Kunststoffunterlage.
 - ◆ Prüfparameter:
 - Anzahl der Zellen (Bürker-Kammer)
 - Abweichungen in der DNA-Synthese (ELISA)
 - DNA-Fragmentation (ELISA)
 - Expression und Konzentration von mRNA folgender Proteine:
 - Bax (pro-apoptotisch)
 - Bcl-2 (anti-apoptotisch)
 - P53(DNA-Fragmentation und das Verhältnis Bax/Bcl-2 gelten als Apoptose-Marker).
- Studienergebnisse**
- ◆ Zell-Adhäsion:
Beide Zelllinien zeigen auf HG-konditionierter ECM und auf Kunststoff eine geringere Haftung als auf NG-konditionierter ECM (jeweils $p < 0,05$)
 - ◆ Anzahl der Zellen:
Bei beiden Zelllinien ergeben weder verschiedene Unterlagen noch die Variation der Nährlösung einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Zellen.
- ◆ Abweichungen in der DNA-Synthese:
Erfolgt das Wachstum der Perizyten auf verschiedenen Unterlagen (HG-ECM, NG-ECM, Kunststoff) in HG-Kulturmedium, ist die korrekte DNA Synthese beeinträchtigt.
 - ◆ DNA-Fragmentation:
Beide Zelllinien zeigen auf HG-konditionierter ECM verglichen mit NG-ECM stark erhöhte DNA-Fragmentation, sowohl bei Kultur in NG als auch in HG.
Der Zusatz von BT oder T bei der Bildung von HG-ECM verhindert in beiden geprüften Konzentrationen die erhöhte DNA-Fragmentation komplett.
 - ◆ Expression mRNA von Bax, Bcl-2 und p53:
Beide Zelllinien zeigen bei Kultur auf HG-ECM stark erhöhte Expression von p53 und Bax und verminderte Expression von Bcl-2.
Dies gilt für die Vermehrung in NG- und in HG-Nährlösung.
Daraus ergibt sich für den Bcl2/Bax Quotient (Maß für die Apoptose) eine drastische Verringerung.
Der Zusatz von BT oder T bei der Produktion von HG-ECM verhindert diesen Effekt vollständig.