

D. Ergebnisse

1. Eigene Befunde

Die Ergebnisse werden in drei Abschnitten vorgestellt. Im ersten Abschnitt wird auf die Anzüchtung und Isolierung der Zellen eingegangen. Im zweiten Abschnitt auf die Ergebnisse der verschiedenen Kammersysteme mit unterschiedlichen Membranmaterialien. Im dritten Abschnitt werden die experimentellen Ergebnisse dargestellt.

1.1 Anzüchtung der Zellen

1.1.1 Isolierungen

Insgesamt wurden 20 Isolierungen vorgenommen, wobei 10 nach der von Nebel (2005) beschriebenen Methode durchgeführt wurden und 10 nach einer modifizierten Methode gemäß WUNN et al. (1999), bei der mit dem Enzym Dispase gearbeitet wurde. Da die Ausbeute an Keratinozyten von der nach Nebel (2005) beschriebenen Methode nur sehr gering ausfiel, wurde nach einer neuen Methode gesucht. Es wurden verschiedene Konzentrationen und unterschiedliche Einwirkzeiten untersucht (s. Tab. 2). WUNN, et al. (1999) beschreiben, dass das Enzym Dispase die Dermis von der Epidermis im Bereich der Basalmembran trennen soll. Festgehalten wurde hierbei, in welchem Ausmaß sich Dermis und Epidermis voneinander trennen ließen.

Zeit/Konzentration	7 Units/ml	14 Units/ml
1 Stunde	Nur mit Skalpell	Nur mit Skalpell
2 Stunden	Nur mit Skalpell	Mit Pinzetten, aber schwer
4 Stunden	Nur mit Skalpell	Mit Pinzetten
8 Stunden	Mit Pinzetten, aber schwer	Ablösung ohne Skalpell
24 Stunden	Mit Pinzette ohne Skalpell	Ablösung ohne Skalpell

Tab. 2 Ablösung von Dermis und Epidermis nach verschiedenen Einwirkzeiten von Dispase

Das Wachstum der Zellen wurde, wie in der Abb. 19 gezeigt, nach zwei Tagen beurteilt. In der ersten Abb. sieht man vereinzelt Zellen, deren Zellausläufer noch nicht in Kontakt getreten sind. In Abb. 20 sieht man erste Kontakte von Zellausläufern und ein dichteres Wachstum der Zellen.

	Fibrozyten	Fibrozyten	Keratinocyten	Keratinocyten
Zeit/Konzentration	7 U/ml	14 U/ml	7 U/ml	14 U/ml
1 Stunde	++	++	+	+
2 Stunden	+++	++	0	++
4 Stunden	+++	++	-	++
8 Stunden	++	+	-	++
24 Stunden	+++	+	-	0

Tab. 3 Wachstum der Zellen

Legende :

- = kein Wachstum sichtbar
- 0 = eine Zelle sichtbar
- + = einzelne Zellen sichtbar (s. Abb. 19)
- ++ = zusammengelagerte Zellen sichtbar (s. Abb. 20)
- +++ = mehrere Stellen mit zusammengelagerten Zellen sichtbar

Die Durchführung dieses Versuchs mit Dispase wurde zweimal wiederholt und kam jedesmal zum gleichen Ergebnis. Daher wurde als Optimum eine Konzentration der Dispase mit 14 Units/ml bei einer Einwirkzeit von zwei Stunden festgelegt. Alle weiteren Isolierungen wurden nach diesem Schema durchgeführt.

Es konnten keine völligen Reinkulturen boviner Keratinocyten hergestellt werden. Für die späteren Versuche wurden daher nur Isolierungen verwendet, die nach struktureller und immunhistochemischer Beurteilung den größten Anteil an Keratinocyten aufwiesen.

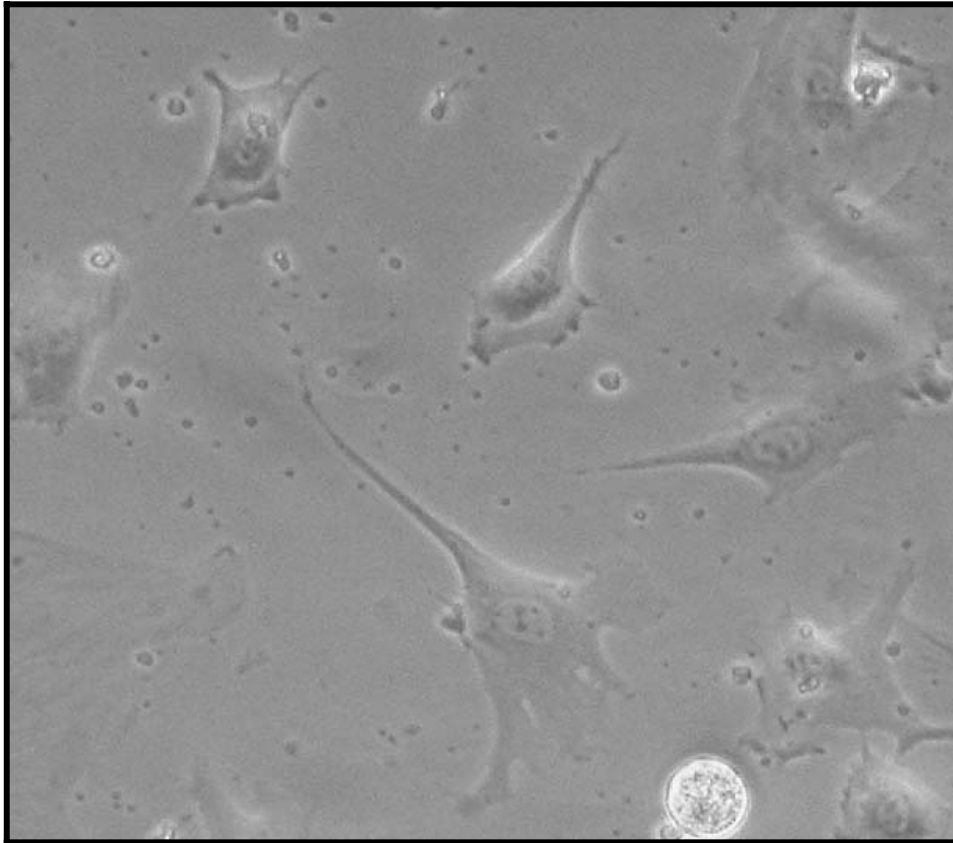


Abb. 19 Einzelne Zellen sichtbar, die noch nicht miteinander in Kontakt getreten sind, Invert-Mikroskop 400fache Originalvergr.

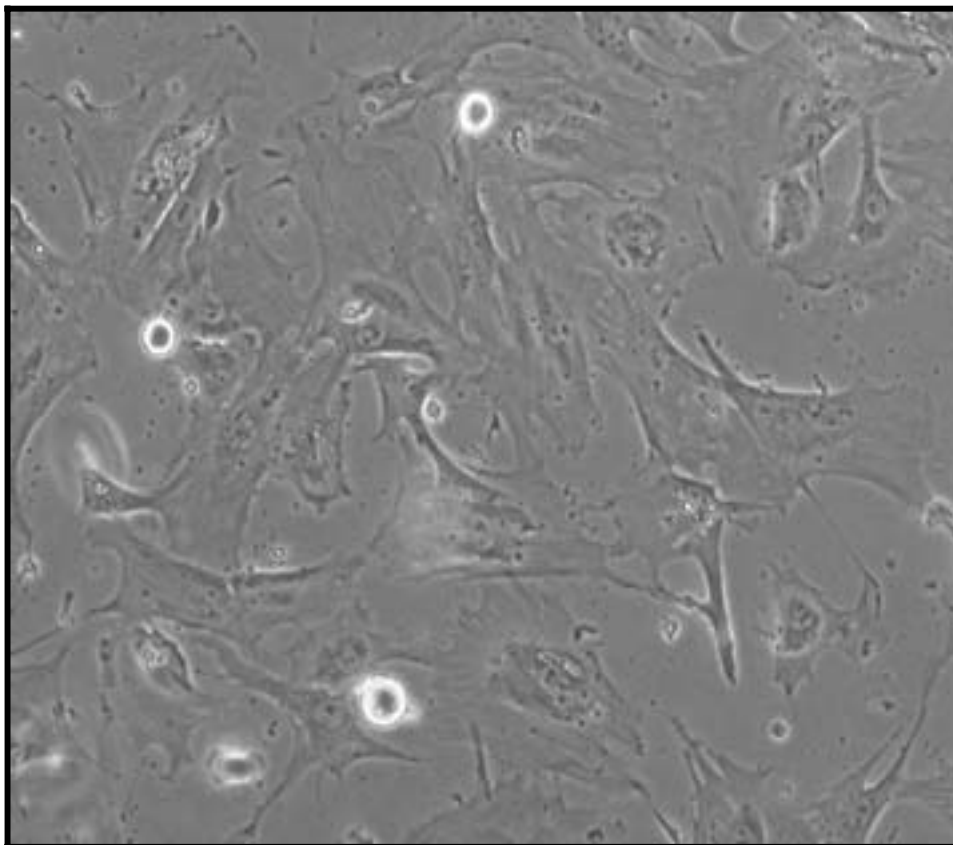


Abb. 20 Mehrere zusammengelagerte Keratinozyten, die mit ihren Ausläufern in Kontakt zueinander treten, Invert-Mikroskop 200fache Originalvergr.

1.1.2 Kontrolle der Isolierungen

1.1.2.1 Immunhistochemie

An allen isolierten Fibrozyten und Keratinozyten wurde ein ELISA durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf 96-Lochplatten angezüchtet. Nachdem sich nach ca. zwei Tagen ein subkonfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen mit 4%igem Formalin für 12 Stunden fixiert. Bei Fibrozyten wurde der Antikörper Vimentin und bei den Keratinozyten die Antikörpern AE1 und AE3 verwendet. Jeder ELISA wurde zweimal wiederholt und digital festgehalten (s. Bsp. Isolierung Frodo Abb. 21a, b). Eine Pufferkontrolle diente bei allen durchgeführten ELISA als Negativkontrolle.



Abb. 21a Positivkontrolle AE3, 200fache Originalvergr.



Abb. 21b Negativkontrolle Puffer, 400fache Originalvergr.

1.1.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Um die Trennungsebene morphologisch darzustellen, wurden Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (s. Abb. 22 a, b).

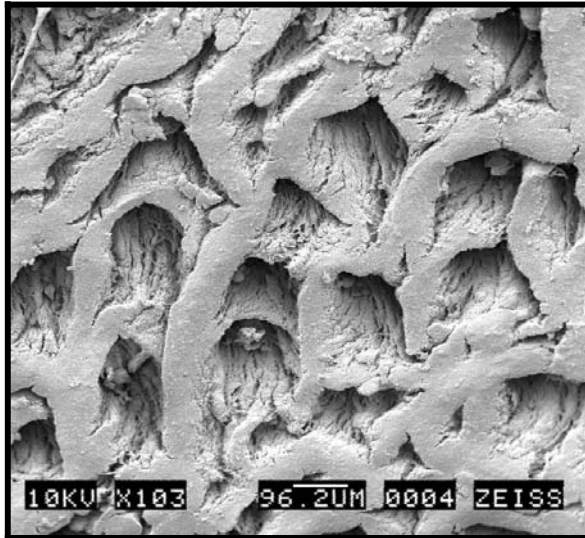


Abb. 22a REM Aufnahme

Oberhaut mit epidermalen Röhrenchen



Abb. 22b REM Aufnahme

Lederhaut mit dermalen Papillen

2. Etablierung eines geeigneten Kammersystems

2.1 Vorversuche mit verschiedenen Kammersystemen

Zu Beginn der Arbeit fanden technische Versuche mit dem Kammersystem PCS3c statt. Diese Vorversuche waren mit mehreren Schwierigkeiten behaftet. Es kam immer wieder zur Luftblasenbildung im Kammersystem, wodurch nicht alle Zellen mit Medium versorgt wurden und die Gefahr einer Kontamination von außen bestand. Durch eine sehr schwere Handhabung dieses Kammersystems kam es insgesamt zu zwei Kontaminationen in den Vorversuchen. Zunächst wurden verschiedene Systeme verwendet und Veränderungen an diesen vorgenommen. Dadurch konnte die Luftblasenbildung reduziert werden. Es wurde nur eine Art von Millicell[®] Einsätzen benutzt, welche aber keine befriedigende Anhaftung der Zellen ergab (Bsp. s. Abb. 23, 24).



Abb. 23 Abgelöste Zellkolonie ohne Haftung an der Membran und kein konfluentes Wachstum sichtbar, Membran NL- 17. HE-Färbung, Lichtmikroskop 100fache Originalvergr.



Abb. 24 Zellkoloniebildung auf einer Membran, kein konfluentes Wachstum sichtbar. Membran ME 25, HE-Färbung, Lichtmikroskop 400fache Originalvergr.

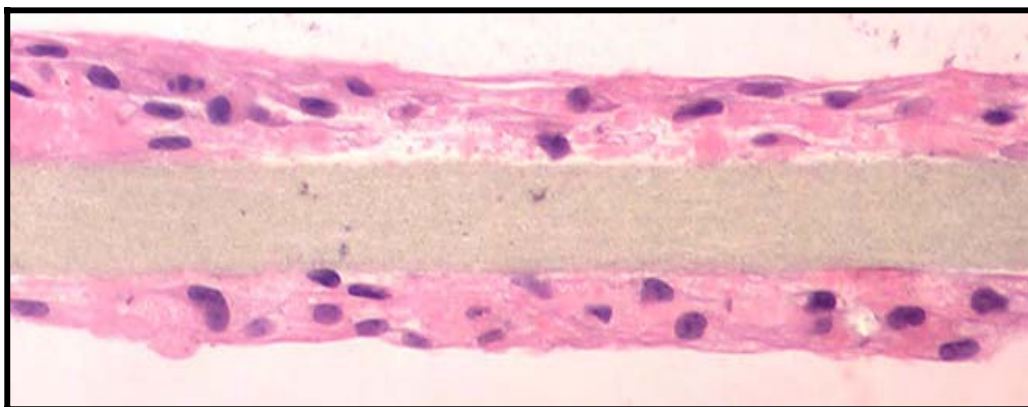


Abb. 25 Konfluentes Wachstum auf der gesamten Fläche der Membran. Membran PC 40, HE-Färbung, Lichtmikroskop 100fache Originalvergr.

Wie man in den Abb. 23 und 24 sehen kann, kam es immer wieder zu Ablösungen der Zellen. Aufgrund dieser Tatsachen wurden zwei eigene Kammersysteme entwickelt. Zum einen das Metallkammersystem (s. Bauplan 1a, b) und das Acrylkammersystem (s. Bauplan 2a, b).

Vorteile dieser beiden Kammersysteme waren die einfache Handhabung und die Vermeidung von Luftblasen im System. An diesen Kammersystemen konnten nun mehrere Filtermaterialien getestet werden, um ein besseres Anhaften und ein konfluentes Wachstum der Zellen zu erreichen (s. Abb. 25). Gleichzeitig wurde versucht, auf einer Seite der Membran Fibrozyten (s. Bauplan 3 Metallhalterung für Millicell®-Einsätze) und auf der anderen Seite Keratinozyten anzuzüchten. Dies stellte in der Acrylkammer und der Metallkammer kein Problem dar (s. Abb. 26), während beim PCS3c System die Fibrozyten von der Unterseite durch den Perfusionsstrom weggeschwemmt wurden. Auch eine Änderung der Perfusionsflussrate zeigte hier keine Verbesserung.

Aufgrund dieser Sachverhalte wurde dazu übergegangen, beide Zelllinien auf der Oberseite der Einsätze anzuzüchten. Um ein Überwuchern durch die schneller wachsenden Fibrozyten zu verhindern, wurden diese zunächst auf den Einsätzen ausgesät und nach zwei Tagen mit Mitomycin (Sigma, Taufkirchen) behandelt, um einen „feeder layer“ für die Keratinozyten zu schaffen und um das Wachstum der Fibrozyten zu stoppen, ohne ihre Vitalität zu stören.

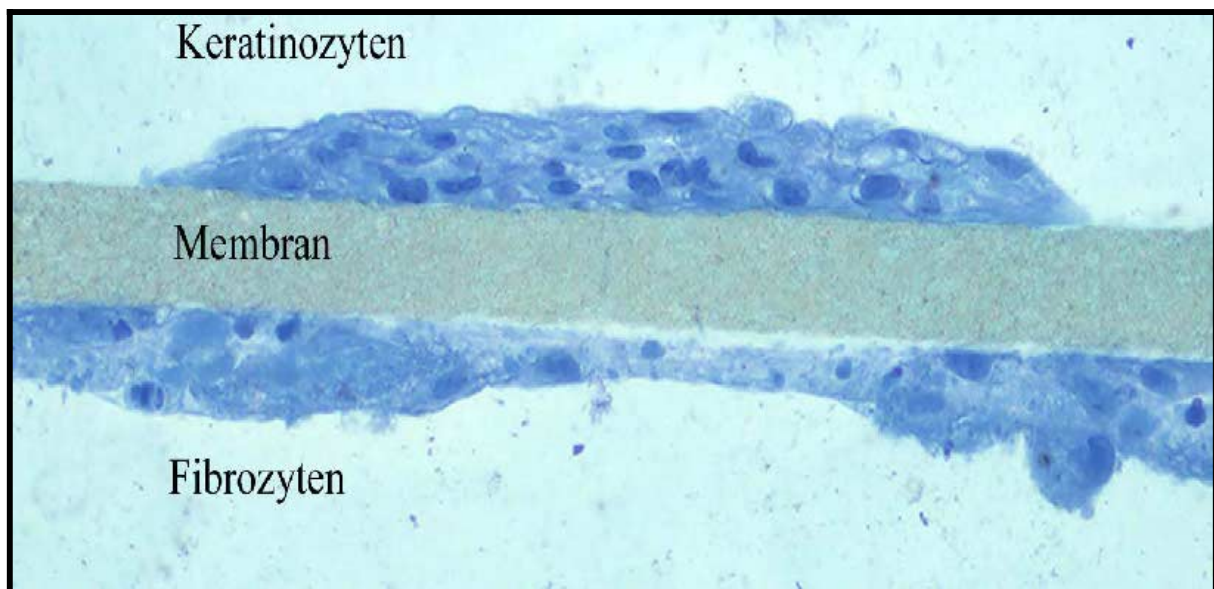
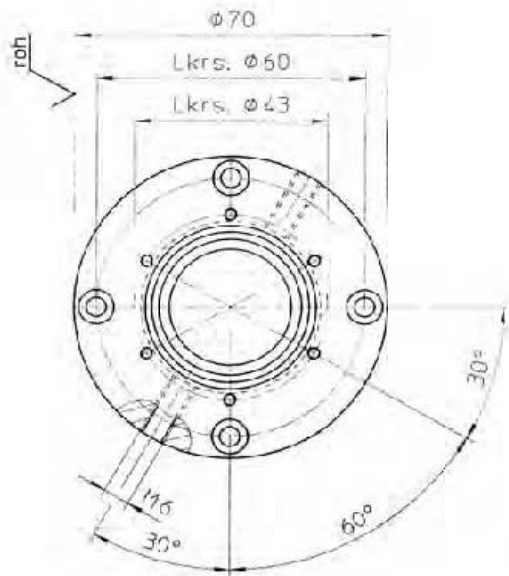
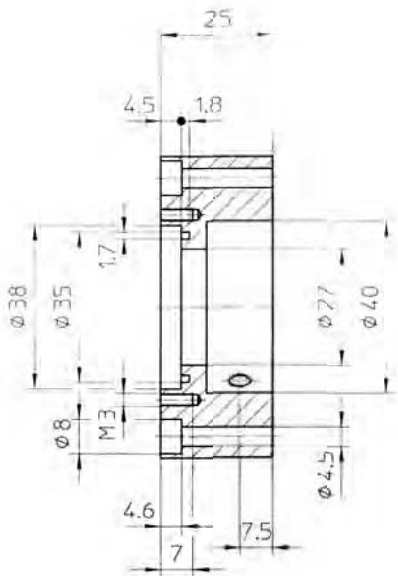


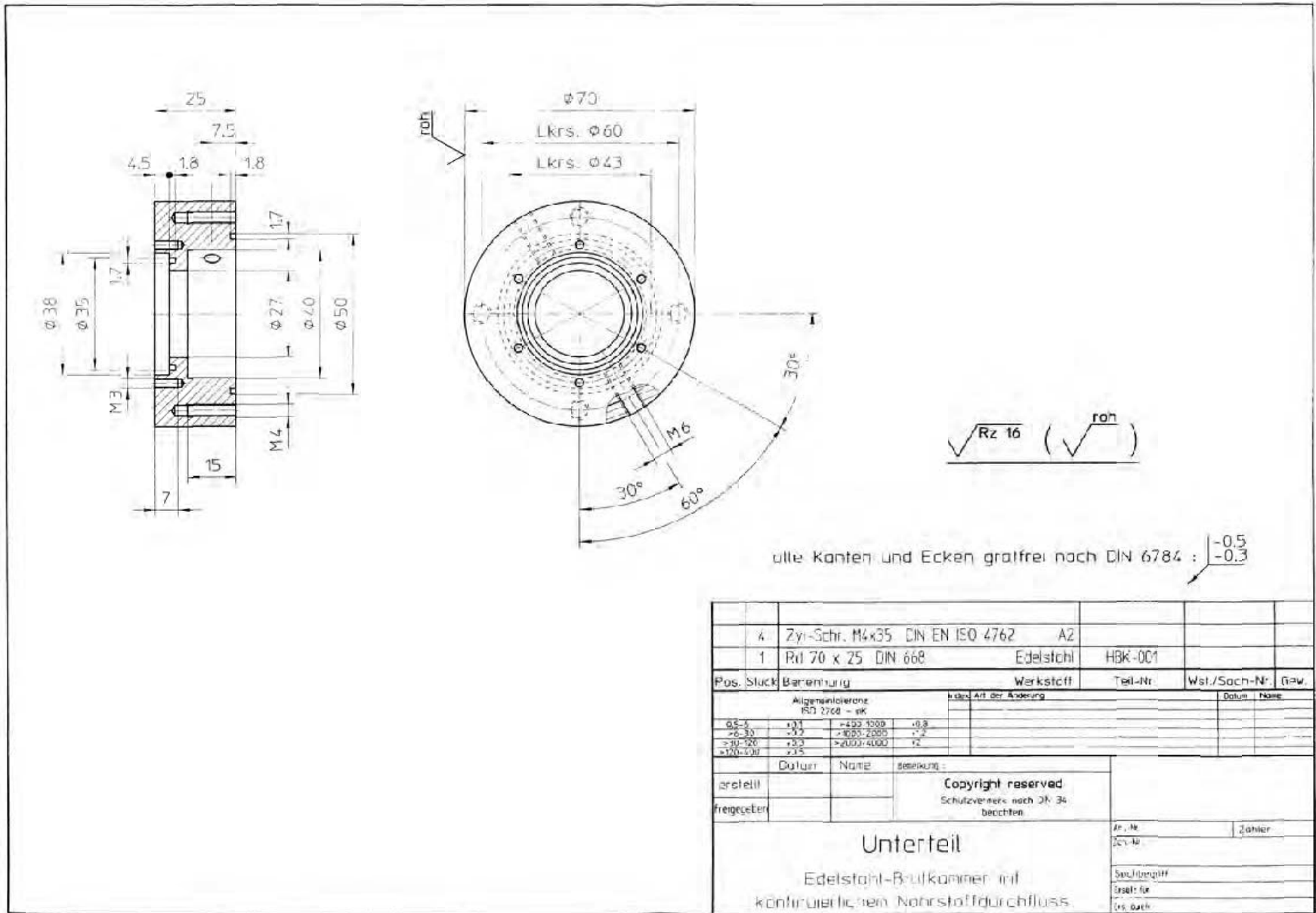
Abb. 26 Anzüchtung der Zellen auf beiden Seiten. Technovit 7100, Membran PC40, Methyleneblau Färbung, Lichtmikroskop 100fache Originalvergr.



$\sqrt{Rz\ 16}$ ($\sqrt{\text{roh}}$)

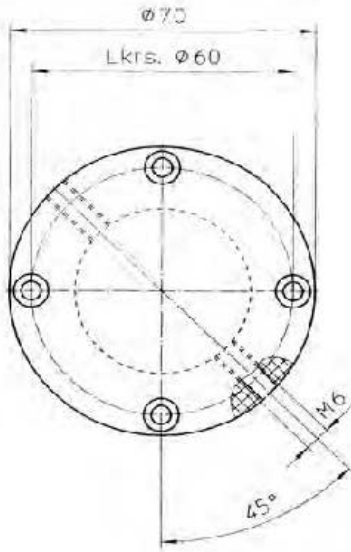
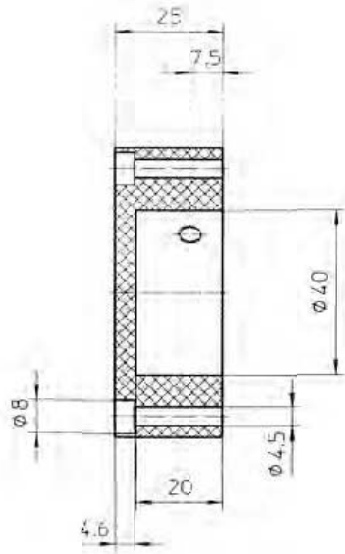
alle Kanten und Ecken griffrei nach DIN 6784 : $\begin{matrix} -0.5 \\ -0.3 \end{matrix}$

4	Zyl-Schr. M4x35	DIN EN ISO 4762	A2			
1	Rd 70 x 25	DIN 668	Edelstahl	HBK-002		
Pos.	Stück	Benennung	Werkstoff	Teil-Nr.	Wst./Such-Nr.	Gew.
Allgemeintoleranz ISO 2768 - mK		Index Art der Änderung		Datum Name		
0,5 - 6	+0,1	-0,05 - 0,00	-0,8			
>6 - 30	+0,2	> 0,00 - 0,00	+1,2			
>30 - 120	+0,3	> 0,00 - 0,00	+2			
>120 - 480	+0,5					
	Datum	Name	Bemerkung			
erstellt			Copyright reserved			
freigegeben			Schutzvermerk nach DIN 34 beachten			
Oberteil Edelstahl-Brutkammer mit kontinuierlichem Nährstoffdurchfluss				Art-Nr.	Zähler	
				Z.Nr.		
				Suchbegriff		
				Ersatz für		
			Ers. Nr.			



4	Zyl-Schr. M4x35	DIN EN ISO 4762	A2			
1	Roh 70 x 25	DIN 668	Edelstahl	HBK-001		
Pos.	Stück	Benennung	Werkstoff	Teil-Nr.	Wst./Sach-Nr.	Qnw.
		Änder. Art der Änderung			Datum	Name
Allgemeintoleranz ISO 2768 - mK						
0,5-5	+0,1	+0,05/0,000	+0,8			
>6-30	+0,2	+0,05/0,000	+1,2			
>30-120	+0,3	+0,05/0,000	+1,6			
>120-500	+0,5					
	Datum	Name	Änderung			
Herstell.				Copyright reserved Schutzvermerk nach DR. 34 beachten		
Freigegeben						
Unterteil				Ar. Nr.	Zähler	
Edelstahl-Brulkammer mit kontinuierlichem Nährstoffdurchfluss.				Sachbezugsnr.		
				Erstellt für		
				Drs. durch		

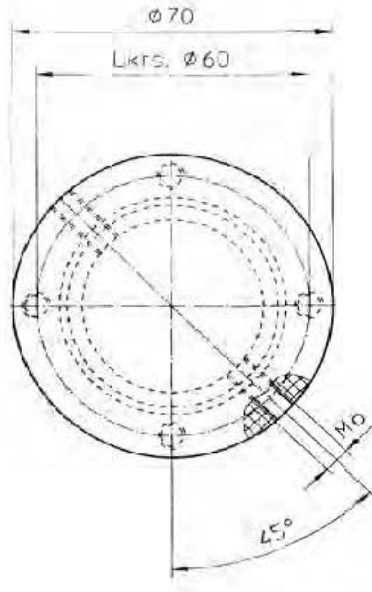
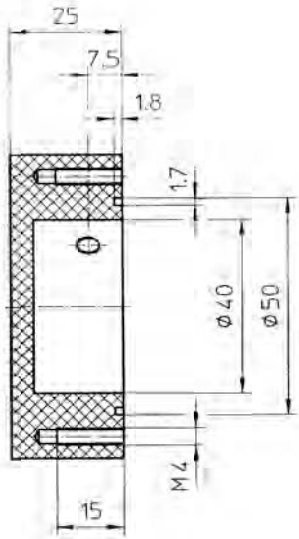
Bauplan 1b Edelstahl-Perfusionskammer-System Unterteil (Zeichnung Ulrich Hoffmann)



Außer Bohrungen alle Oberflächen nach dem Bearbeiten poliert

alle Kanten und Ecken gratfrei nach DIN 6784 : $\begin{matrix} -0.5 \\ -0.3 \end{matrix}$

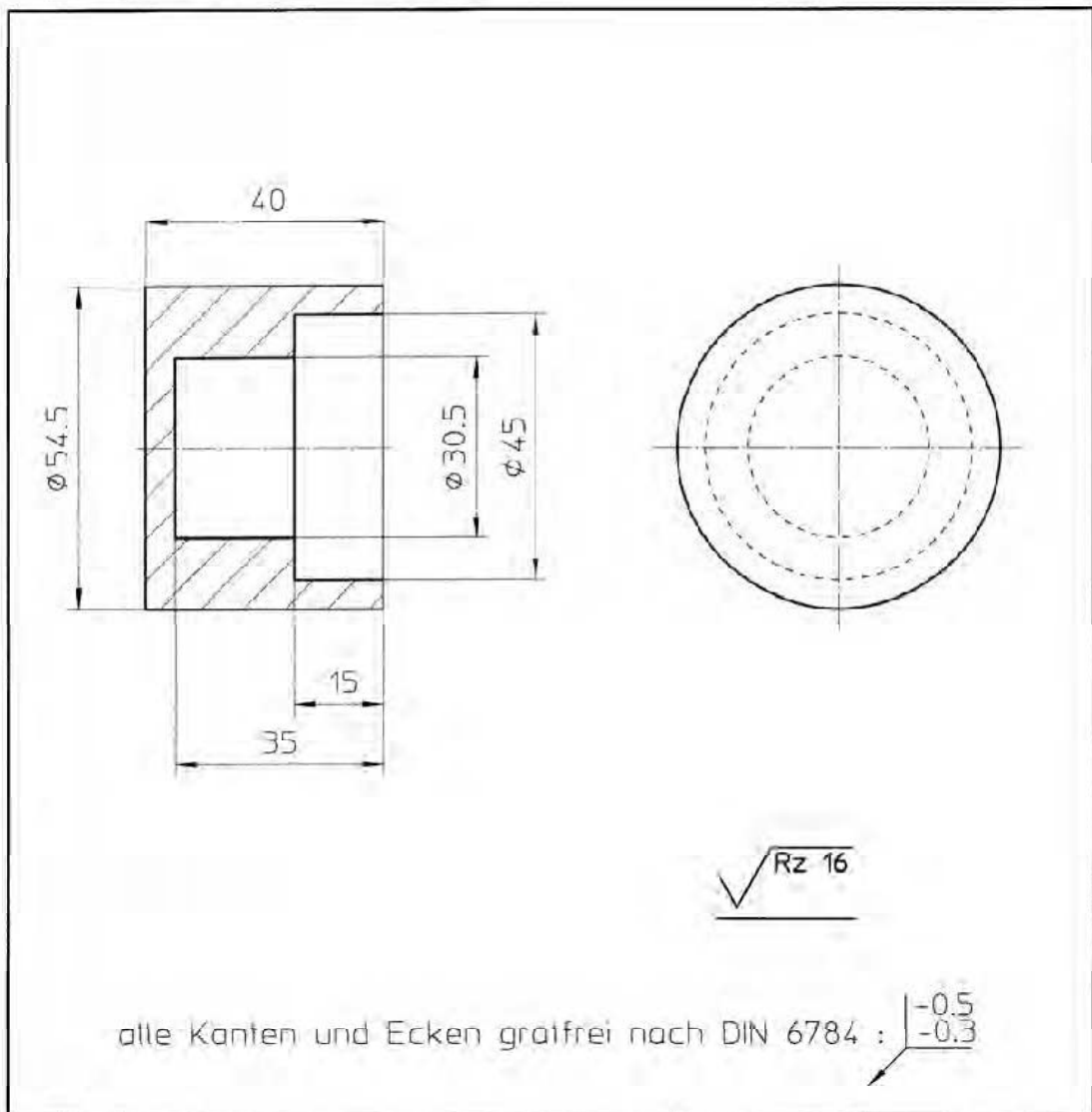
4	Zyl-Schr. M4x35	DIN EN ISO 4762	A2						
1	Rd 70 x 75	Acrylglas GS	HBK-012						
Pos.	Stück	Benennung	Werkstoff	Teil-Nr.	Wst./Sach-Nr.	Gew.			
		Allgemeintoleranz ISO 2768 - mK		Index		Art der Änderung			
0.5-6	+0.1	>400-1000	+0.8						
6-30	+0.2	>1000-2000	+1.2						
>30-120	+0.3	>2000-4000	+2						
>120-400	+0.5								
Datum	Name	Bemerkung							
erstellt		Copyright reserved Schutzvermerk nach DIN 34 beachten							
freigegeben									
Oberteil Acrylglas-Brutkammer mit kontinuierlichem Nahrungsdurchfluss				Art.-W.	Zähler				
				Zeh.-N.					
				Suchbegriff:					
				EISO 2 für					
Ers. Buch									



Außer Nut und Gewinden alle Oberflächen nach dem Bearbeiten poliert

alle Kanten und Ecken grätfrei nach DIN 6784 : $\begin{matrix} -0.5 \\ -0.3 \end{matrix}$

	1	Rd 70 x 25	Acrylglas GS	HBK-011				
Pos.	Stück	Benennung	Werkstoff	Teil-Nr.	Wsl./Such-Nr.	Gew.		
Allgemeintoleranz ISO 7768 - mk			Reiz		Art der Änderung		Datum	Name
D 5-6	+0,1	> 400-1000	+0,8					
~ 6-30	+0,2	> 1000-2000	+1,2					
+ 30-120	+0,3	> 2000-4000	+2					
> 120-400	+0,5							
erstellt								
freigegeben								
Copyright reserved Schutzvermerk nach DIN 34 beachten				Art.-Nr.	Zähler			
Unterteil				Zch.-Nr.				
Acrylglas-Brutkammer mit kontinuierlichem Nährstoffdurchfluss				Suchbegriff				
				Ersatz für				
				Ers. durch				



1		Rd 55 x 40 DIN 668		Edelstahl		HBK-023	
Pos.	Stück	Benennung		Werkstoff		Teil-Nr.	Wst./Sach-Nr. Gew.
Allgemeintoleranz ISO 2768 - mK				index Art der Änderung		Datum	Name
0.5-6	+0.1	>400-1000	+0.8				
>6-30	+0.2	>1000-2000	+1.2				
>30-120	+0.3	>2000-4000	+2				
>120-400	+0.5						
	Datum	Name	Bemerkung :				
erstellt			Copyright reserved Schutzvermerk nach DIN 34 beachten				
freigegeben							
				Art.-Nr.		Zähler	
				Zch.-Nr.			
				Suchbegriff			
				Ersatz für			
				Ers. durch			

Bauplan 3 Metallhalterung für Millicell®-Einsätze (Zeichnung Ulrich Hoffmann)

2.2 Versuche mit unterschiedlichen Filtermaterialien

Um ein geeignetes Filtermaterial für bovine Fibrozyten und Keratinozyten zu finden, wurden mehrere Filtermaterialien in den verschiedenen Kammersystemen getestet (s. Tab. 4).

2.2.1 Versuche in der Metallkammer und der Acrylkammer

Kammerart	Filterart	Anzahl Perfusionen
Acrylkammer	ME 25	2
Acrylkammer	PC 40	2
Acrylkammer	NL 17	4
Metallkammer	ME 25	2
Metallkammer	PC 40	2
Metallkammer	NL 17	2

Tab. 4 Untersuchung verschiedener Filtermaterialien

Im lichtmikroskopischen Bild stellen sich die Filtermaterialien im Querschnitt unterschiedlich dar (s. Abb. 27 a, b, c)

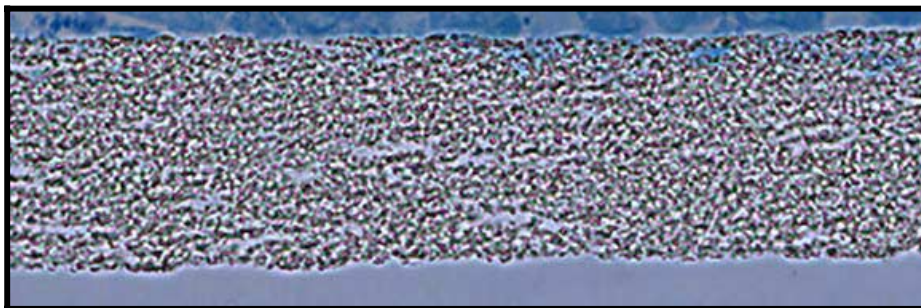


Abb. 27a Filter ME 25 Mischester Lichtmikroskop 200fache Originalvergr.

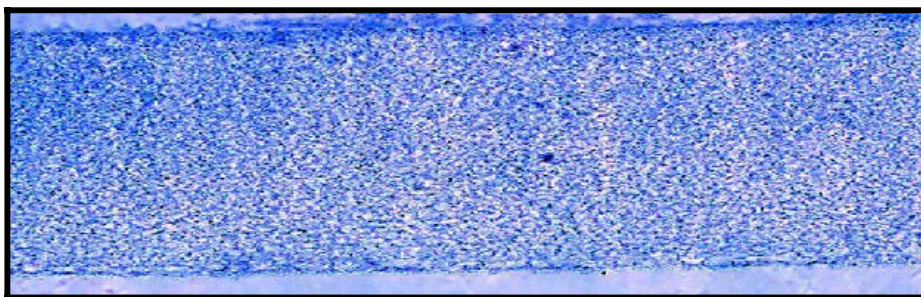


Abb. 27b Filter PC 40 Polycarbonat Lichtmikroskop 200fache Originalvergr.

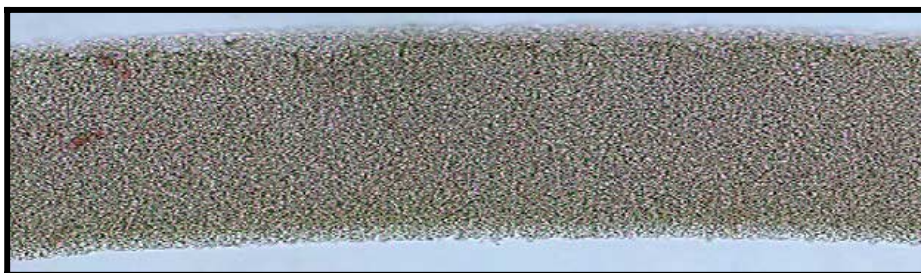


Abb. 27c Filter NL 17 Nylon Lichtmikroskop 200fache Originalvergr.

2.2.2 Versuche mit der PCS3c (Oligene, Berlin)

Mit der PCS3c Kammer wurden, wie in Tab. 5 aufgezeigt, die unten aufgeführten Filtermaterialien getestet.

Filterart	Anzahl Perfusionen
Millicell CM	23
Millicell PCF	10

Tab. 5 Filtereinsätze

2.2.2.1 Verläufe des Wachstums in der PCS3c

In diesem Beispiel wurde die Keratinozyten-Isolierung „Gollum“ auf einem Millicell[®] Insert CM angezüchtet und durch ein Invert-Mikroskop das Wachstum beobachtet. Es wurden digitale Aufnahmen am Tag 1 (Abb. 28), 6 (Abb. 29), 12 (Abb. 30) und 18 (Abb. 31) angefertigt. Wie man am Tag 18 sieht, bildeten die Zellen einzelne Kolonien und keinen konfluenten Zellrasen, da man das Filtermaterial immer noch deutlich erkennt. Vorteil dieses Filtermaterials ist, dass man die Beobachtungen durch das Invert-Mikroskop durchführen konnte, während bei den Polycarbonat Millicell Inserts PCF diese Beobachtungen nicht möglich waren.

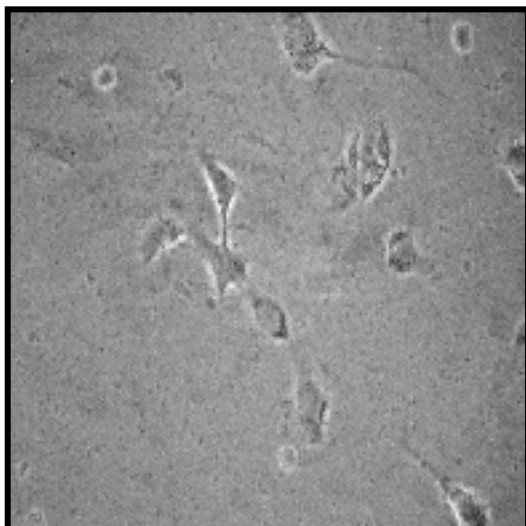


Abb. 28 Keratinozyten am ersten Tag
Einzelne Zellen, die teilweise über Zellfortsätze in Verbindung treten.
Invert-Mikroskop, 400fache Originalvergr.

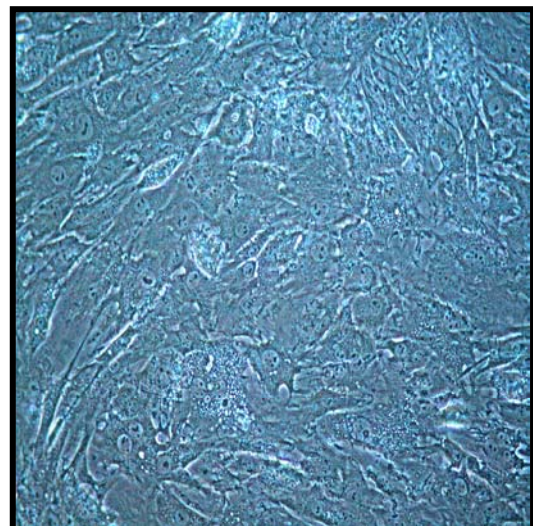


Abb. 29 Keratinozyten nach 6 Tagen
Zellen haben sich zu ersten konfluenten Kolonien zusammengeschlossen. Invert-Mikroskop, 200fache Originalvergr.

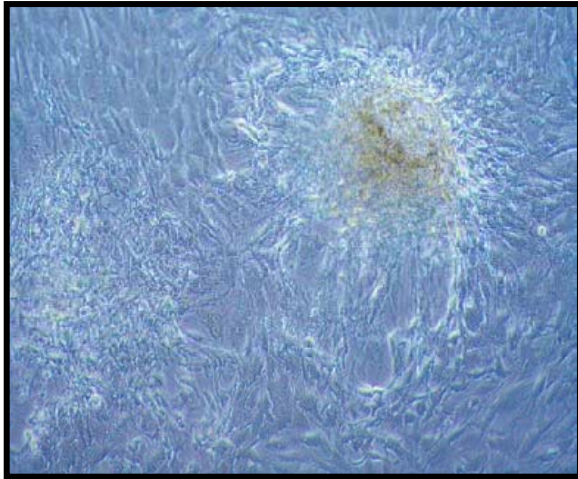


Abb. 30 Erste Zellkolonien beginnen am 16. Tag mit dreidimensionalem Wachstum Invert-Mikroskop 100fache Originalvergr.

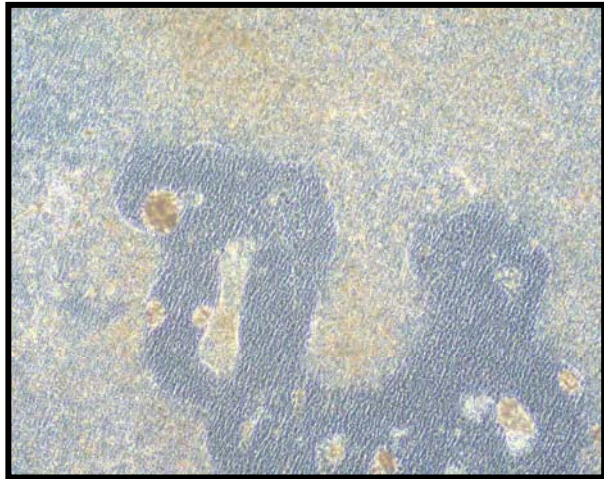


Abb. 31 Mehrere Schichten von Zellen am 24. Tag Blau zu erkennen ist der Filter Invert-Mikroskop 50fache Originalvergr.

2.2.3 Ergebnis Filtermaterialuntersuchungen

Um das am besten geeignete Filtermaterial zu finden, wurden alle Einsätze in Paraffin eingebettet und Schnittserien von 5µm Dicke angefertigt. Um transmissionselektronische mikroskopische Aufnahmen anfertigen zu können, wurden insgesamt 15 Einsätze in Agar 100 eingebettet.

Die beste Anhaftung der Fibrozyten zeigte sich auf den Polycarbonat Einsätzen (s. Abb. 32).

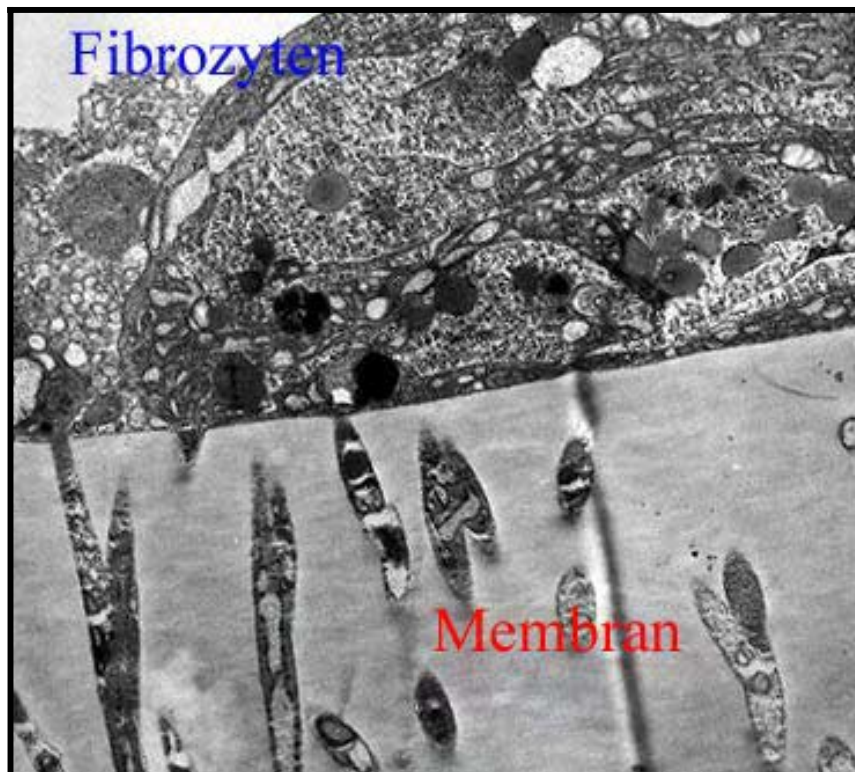


Abb. 32 TEM Aufnahme: Polycarbonat Membran mit Fibrozyten auf der Oberseite, deren Ausläufer in die Poren der Membran einwachsen Originalvergr. 6100fach

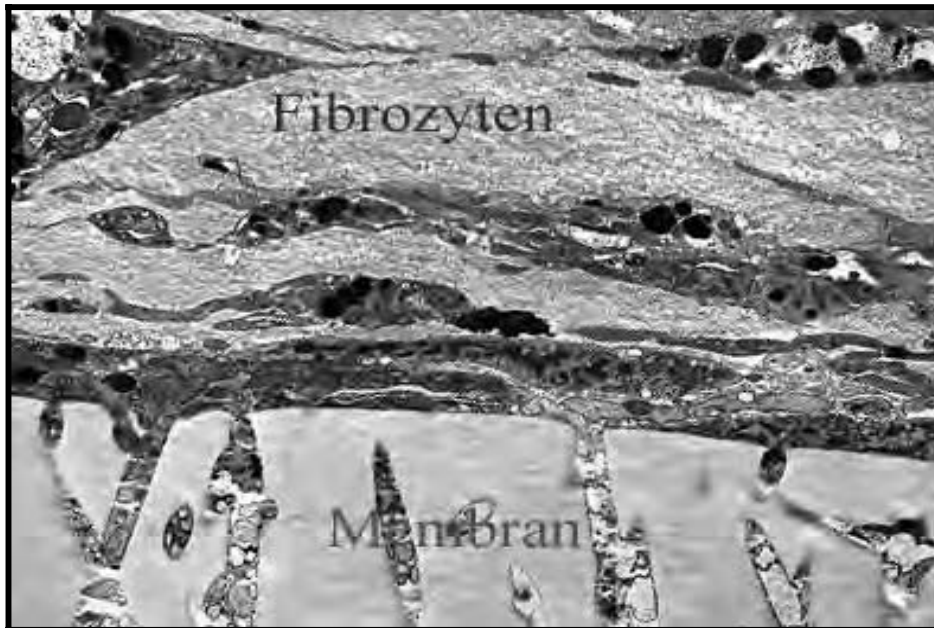


Abb. 33 TEM Aufnahme: Polycarbonat Membran mit eingewachsenen Fibrozytenausläufern Originalvergr. 5000fach

2.3 Immunhistochemische Charakterisierung der Zellen

Um die Zellen weiter charakterisieren zu können, wurden Proben mit fünf Antikörpern getestet (s. Tab 6). Diese immunhistochemischen Nachweise waren methodenunabhängiger, wurden also an unterschiedlichen Filtermaterialien und Zelltypen getestet.

Antikörper	Klon	Hersteller	Katalognummer
Mouse Anti Keratin	AE1	Chemicon (Hampshire, UK)	MAB 1612
Mouse Anti Keratin	AE3	Chemicon (Hampshire, UK)	MAB 1611
Mouse Anti-Pan Cadherin	CH-19	Sigma (Taufkirchen)	C 1821
Mouse Anti Vimentin	V 9	NeoMarkers (Freemont, USA)	MS-129-P0
Mouse Anti Human CK 19	CK 19	Dako (Hamburg)	M 0772

Tab. 6 Verwendete Antikörper

2.3.1 Zytokeratinnachweis

Um saure Keratine immunhistochemisch nachzuweisen wurde mit einem Mouse Anti Keratin AE1 gearbeitet und um die basischen Keratine nachzuweisen mit einem Antikörper Mouse Anti Keratin AE3.

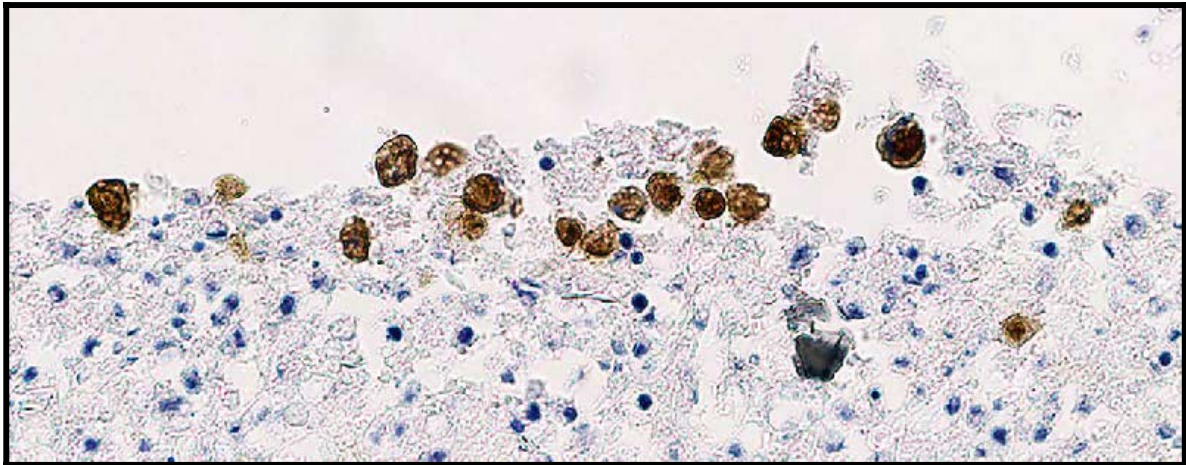


Abb. 34 Zytokeratinnachweis AE3 positive Zellen sind bräunlich angefärbt, 100fache Originalvergr.

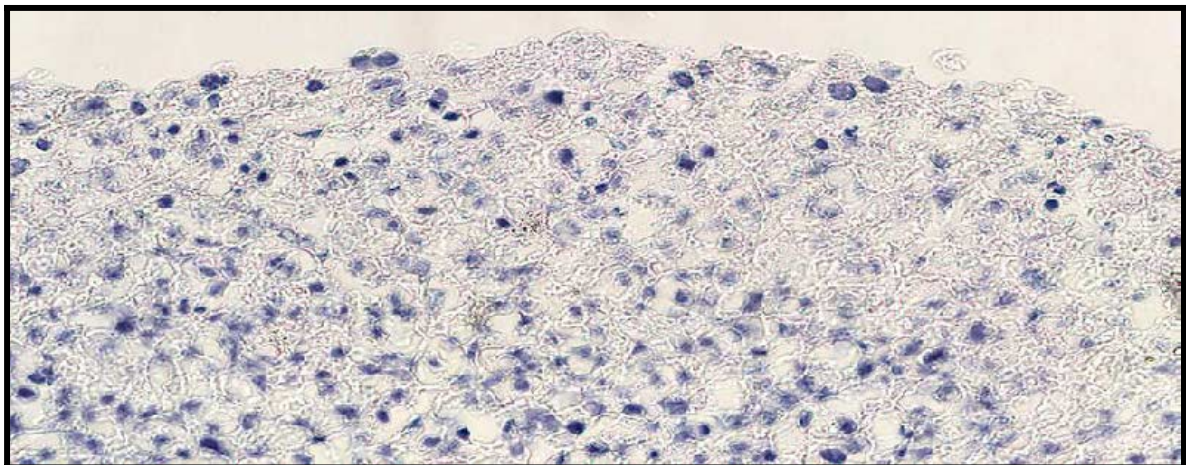


Abb. 35 Zytokeratinnachweis Negativkontrolle, 100fache Originalvergr.

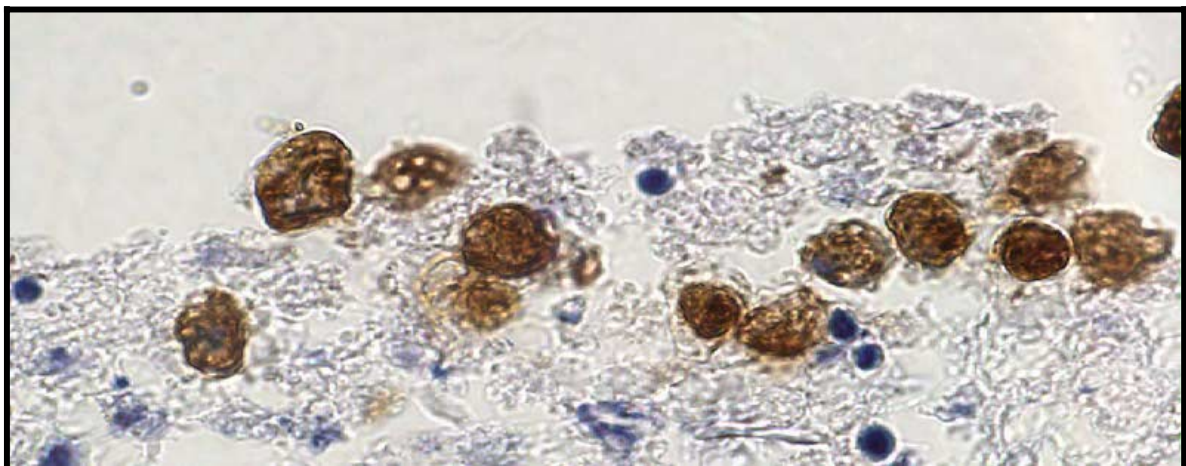


Abb. 36 Zytokeratinnachweis AE3, 400fache Originalvergr.

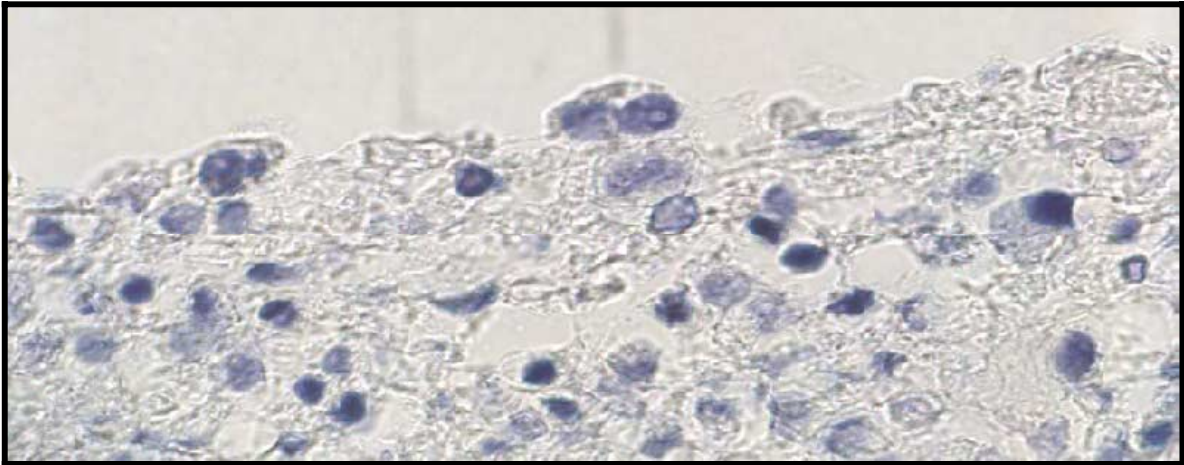


Abb. 37 Zytokeratinnachweis Negativkontrolle, 400fache Originalvergr.

2.3.2 Expressionen von Cadherinen

Wie man anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen erkennen kann, zeigten die angezüchteten Zellen eine positive Reaktion gegen den Anti-Pan Cadherin Antikörper. Die Zellkerne reagierten nicht auf den Antikörper, dagegen aber das umliegende Gewebe.

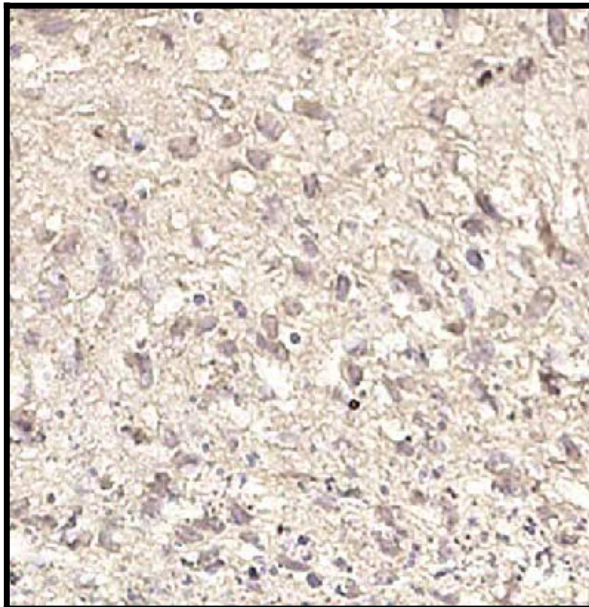


Abb. 38 Immunhistochemischer Nachweis von Cadherin, 100fache Originalvergr.

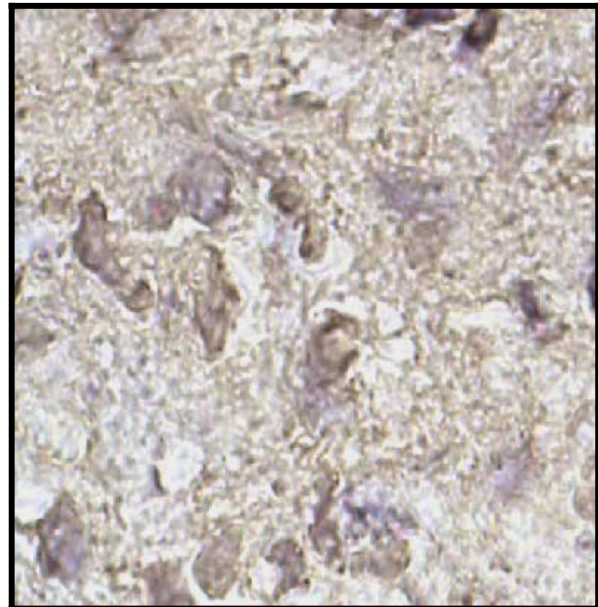


Abb. 39 Immunhistochemischer Nachweis von Cadherin, 400fache Originalvergr.

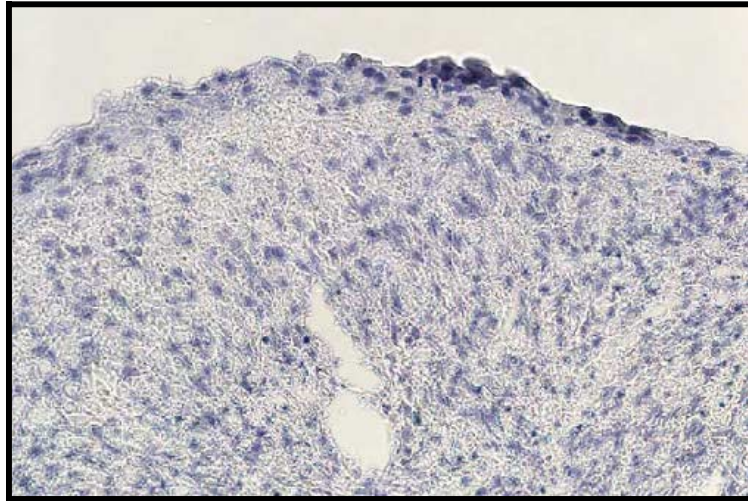


Abb. 40 Negativkontrolle Cadherin, 100fache Originalvergr.

2.3.3 Fibroblastennachweis Vimentin

Der Antikörper gegen Vimentin wurde hier zum Nachweis von Fibroblasten eingesetzt.

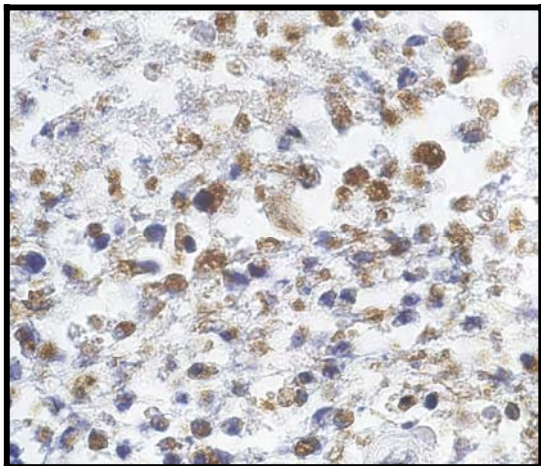


Abb. 41 Fibroblastennachweis mit Vimentin,
100fache Originalvergr.

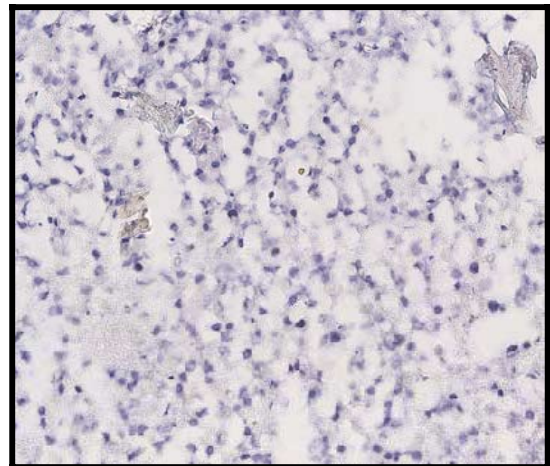


Abb. 42 Fibroblastennachweis Negativkontrolle,
80fache Originalvergr.

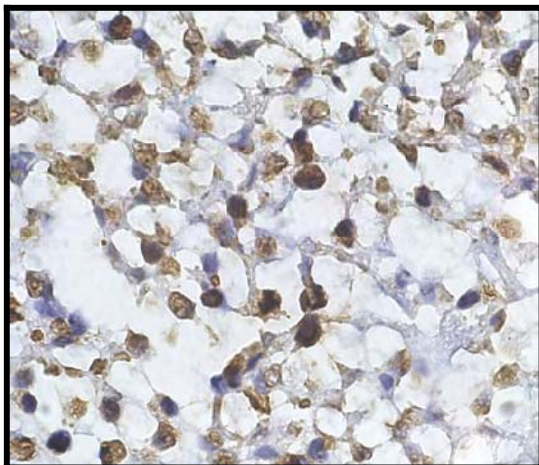


Abb. 43 Fibroblastennachweis mit Vimentin,
200fache Originalvergr.

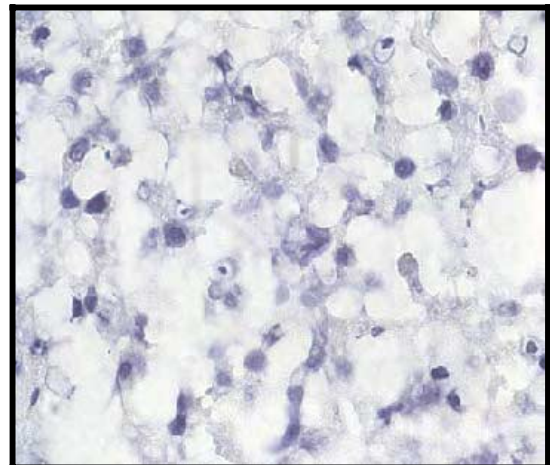


Abb. 44 Fibroblastennachweis Negativkontrolle,
200fache Originalvergr.

2.3.4 Detektion von Stammzellen in den Isolaten mit Cytokeratin CK 19

Cytokeratin 19 gilt in der Humanmedizin als ein Marker für undifferenzierte epidermale Stammzellen und wird weiterhin in der Tumordiagnostik eingesetzt. BIRKNER et al. (2004) stellten eine Produktion von Cytokeratin 19 auch in bovinen Zellkulturen fest.

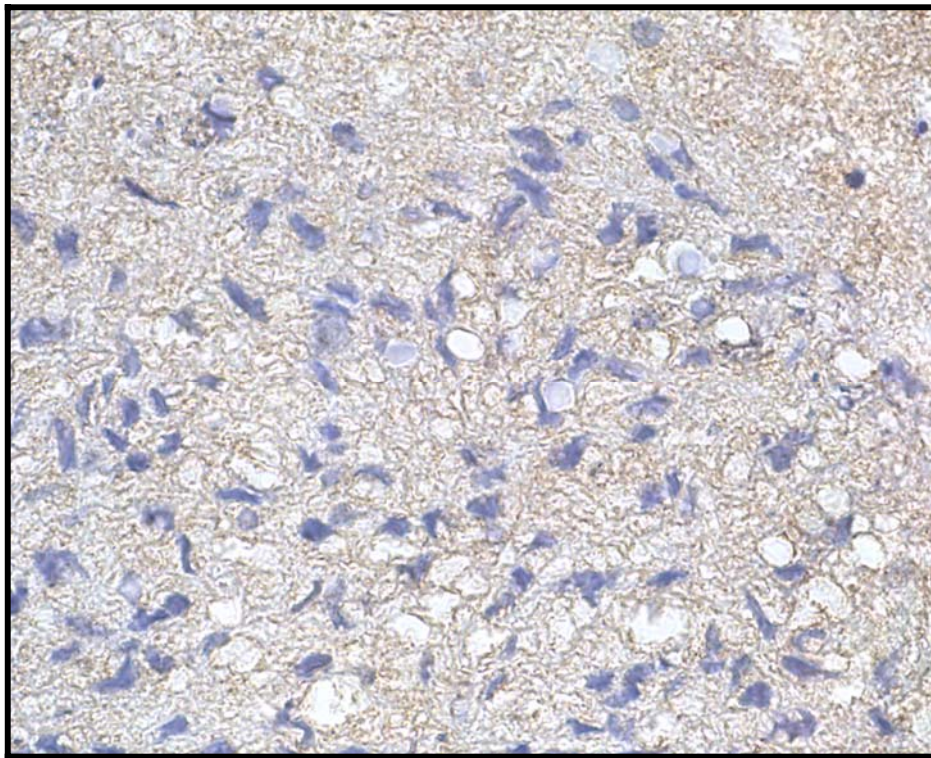


Abb. 45 Cytokeratinnachweis CK 19, 200fache Originalvergr.

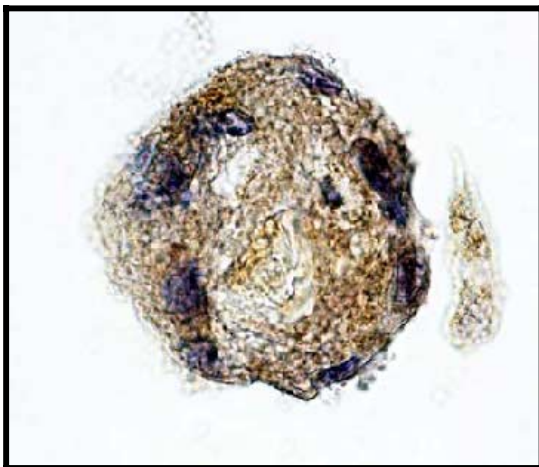


Abb. 46 Cytokeratinnachweis mit CK 19,
1000fache Originalvergr.

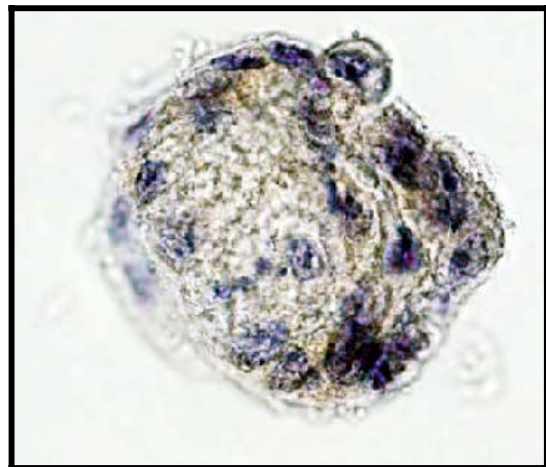


Abb. 47 Cytokeratinnachweis Negativkontrolle,
1000fache Originalvergr.

2.4 Ultrastruktur der angezüchteten Zellen

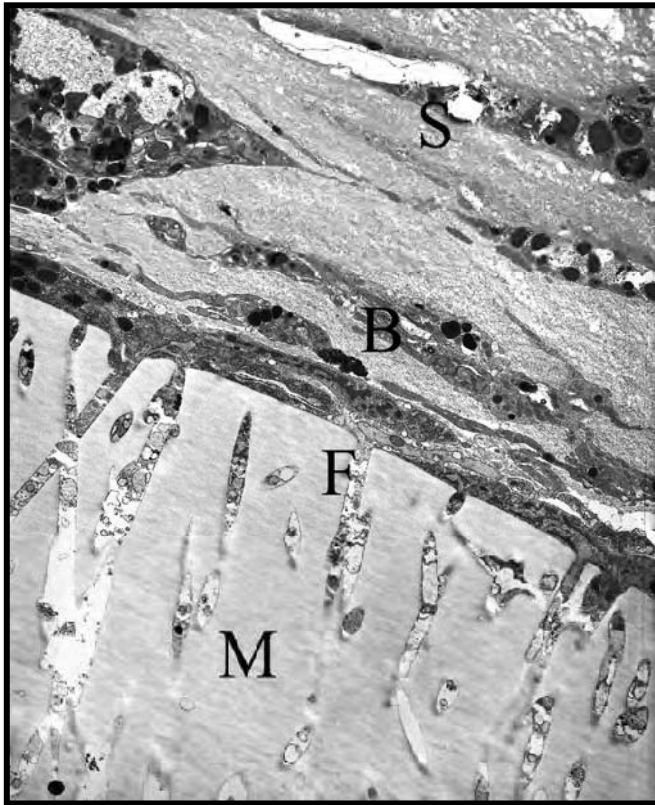


Abb. 48 Mehrschichtiges Zellwachstum auf einer Polycarbonat Membran (M). Deutlich erkennbar sind die Fortsätze (F), die in die Membran (M) eingewachsen sind. Weiter oben erkennt man ein Stratum basale (B) und ein Stratum superficiale (S). Ausgehend von diesem Befund sieht man ein organotypisches mehrschichtiges Zellwachstum. MCGs konnten nicht gefunden werden.

TEM Aufnahme OSO_4 -Fixierung

Originalvergr. 1500 x

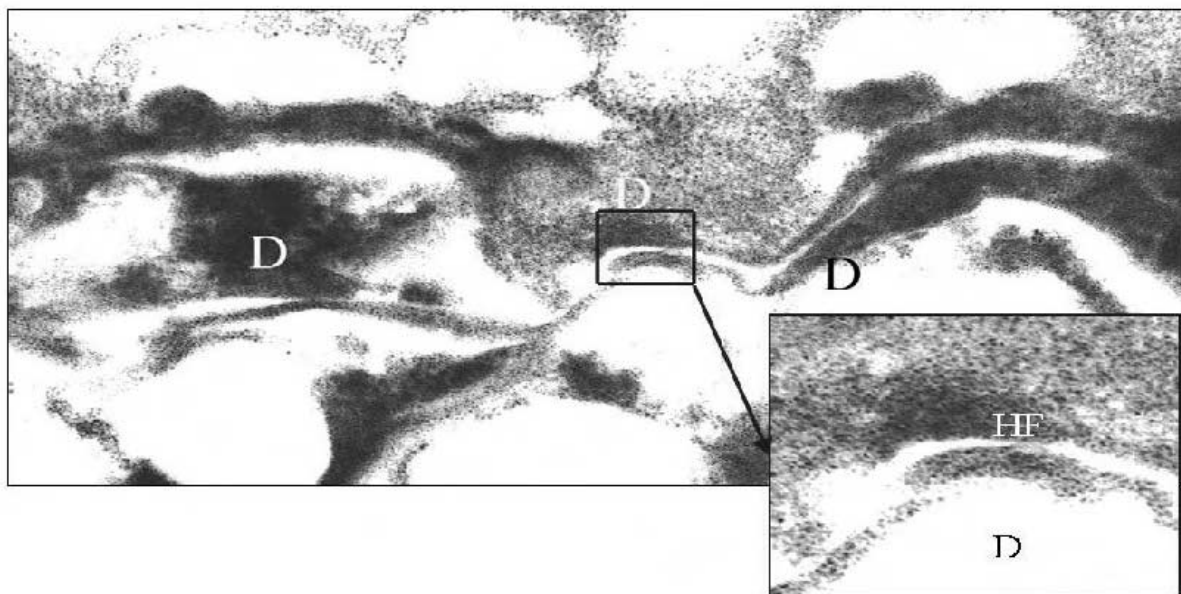


Abb. 49 Diese Aufnahme stammt vom gleichen Schnitt s. o. bei einer höheren Vergrößerung. Zu sehen sind Desmosomen (D) mit ihren intrazytoplasmatischen Haftplatten (HF), welche charakteristisch für Keratinozyten sind. TEM Aufnahme OSO_4 -Fixierung Originalvergr. 31500x

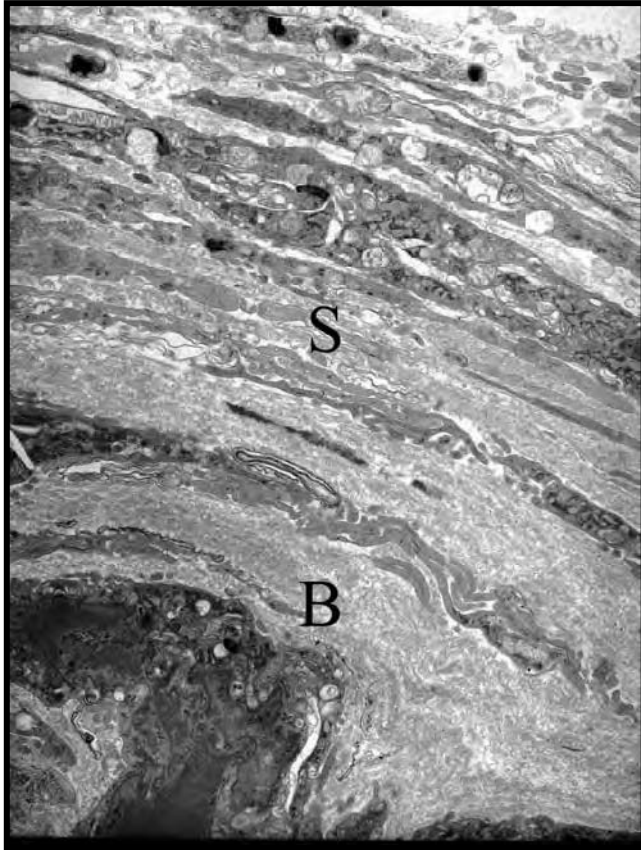


Abb. 50 Mehrschichtiges Wachstum der Zellen, mit einem Stratum basale (B) und einem Stratum superficiale (S).

TEM Aufnahme OSO_4 -Fixierung

Originalvergr. 5000 x



Abb. 51 Fibrozyt mit einem charakteristisch gelappten Zellkern (Z). Weitere Strukturen wie Mitochondrien (M) und ein Golgifeld (G) sind zu erkennen.

TEM Aufnahme OSO_4 -Fixierung

Originalvergr. 8000 x

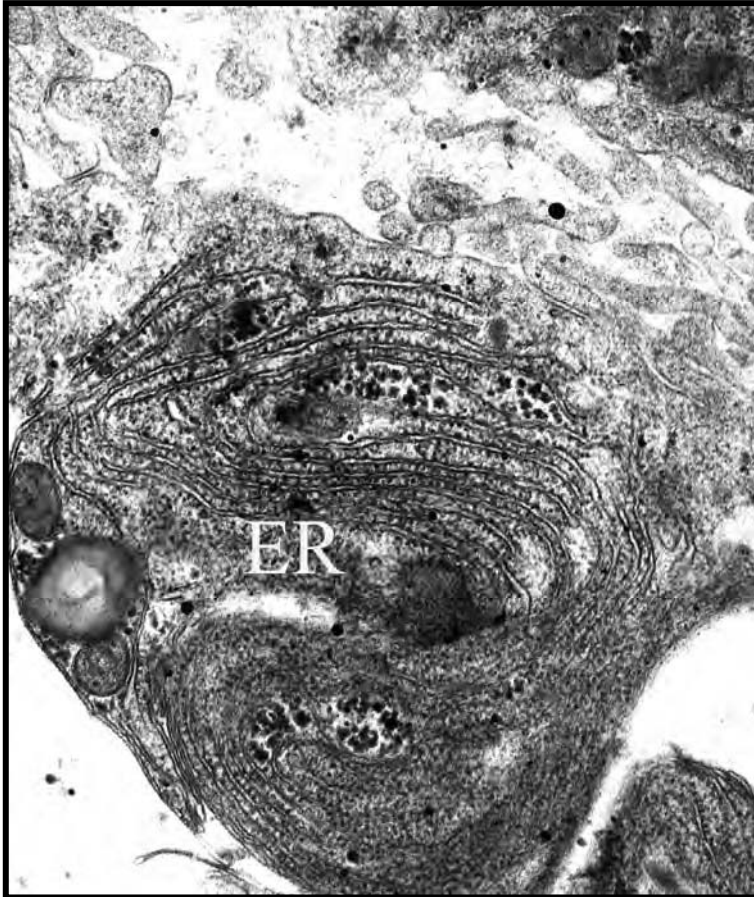


Abb. 52 Rauhes endoplasmatisches Retikulum (ER).
TEM Aufnahme OSO_4 -Fixierung
Originalvergr. 20000 x

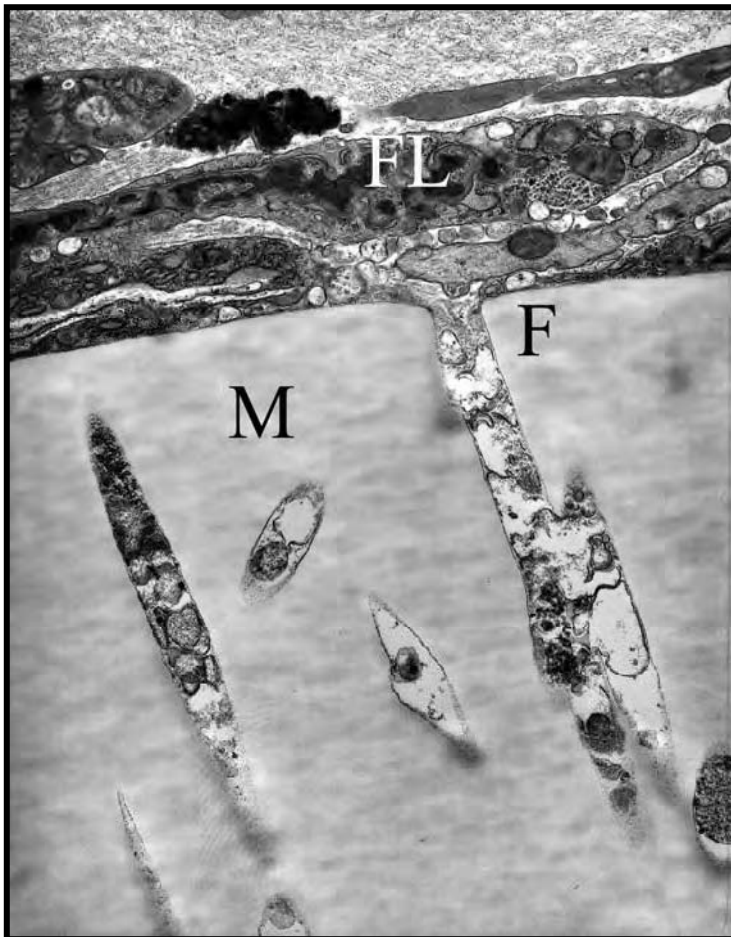


Abb. 53 Fibrozyten „feeder layer“ (FL), dessen Fortsätze (F) in die Membran (M) eingewachsen sind.
TEM Aufnahme OSO_4 -Fixierung
Originalvergr. 10000 x

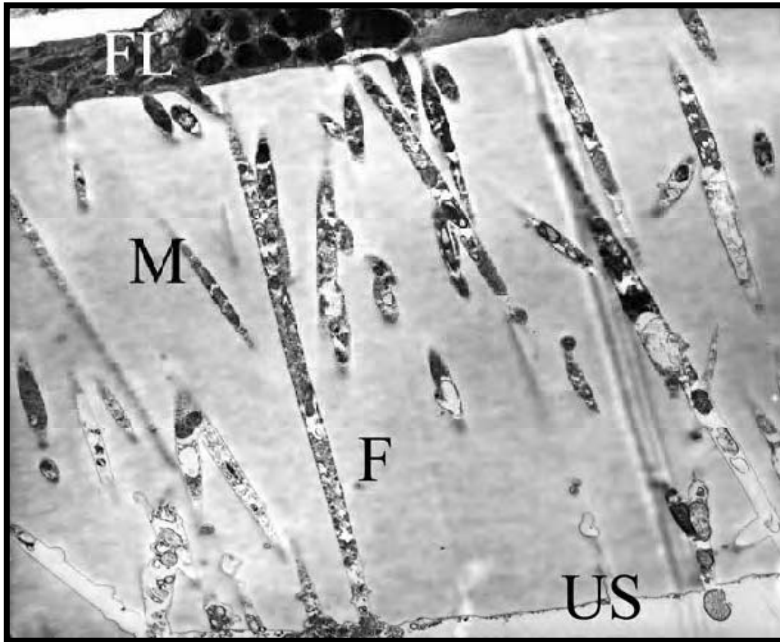


Abb. 54 Fibrozyten „feeder layer“ zu erkennen, dessen Fortsätze (F) durch die Membran (M) gewachsen sind und auf der Unterseite der Membran (US) weiter wachsen.

TEM Aufnahme OSO₄-
Fixierung
Originalvergr. 4000 x

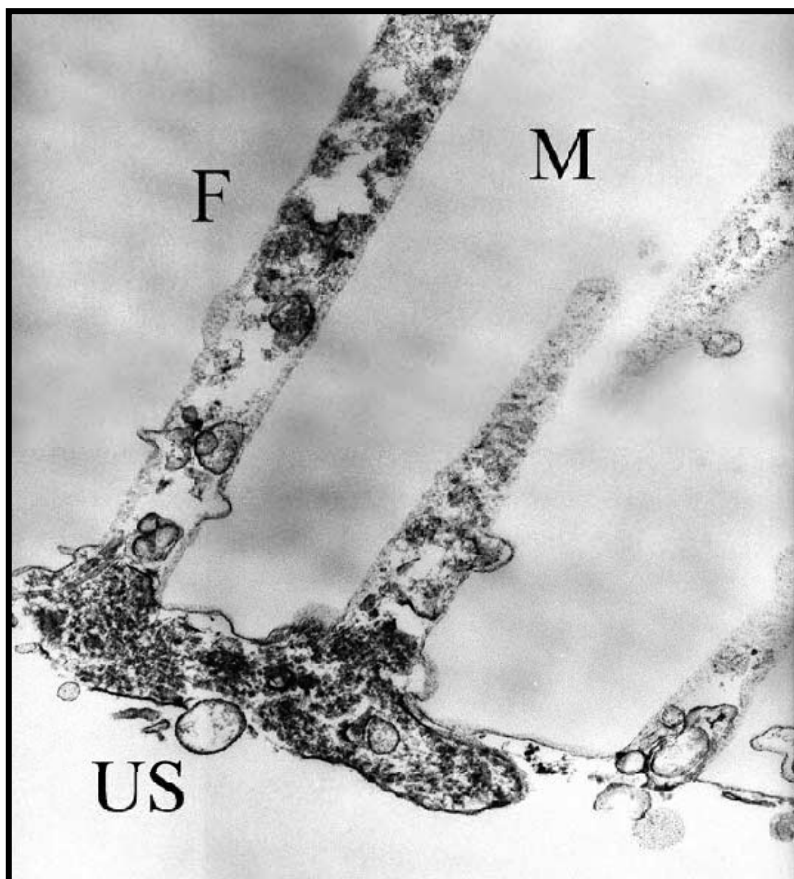


Abb. 55 Höhere Vergrößerung der Abb. 54 oben. Die Zellfortsätze (F) sind durch die Membran (M) gewachsen und treten auf der Unterseite der Membran (US) wieder aus.

TEM Aufnahme OSO₄-
Fixierung Originalvergr.
12000 x

3. Auswirkung verschiedener Faktoren auf die Zellproliferation

Untersucht wurden insgesamt vier Faktoren:

- 3.1 *Keratinocyte growth factor* (KGF) = FGF 7
- 3.2 *Granulocyte macrophage – colony stimulating factor* (GM-CSF)
- 3.3 *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α)
- 3.4 *Interleukin 1 alpha* (IL-1 α)

In einem Vorversuch wurden Keratinozyten der Isolierung „Gollum“ in der Perfusionskammer Minuth für sechs Tage angezchtet und das Wachstum mikroskopisch dokumentiert (s. Abb. 56).

Bereits am ersten Tag nach dem aussähen der Zellen, beginnen diese mit der Ausbildung von Zellfortsätzen, die sich bereits am zweiten Tag an Zellfortsätze der Nachbarzellen annähern. Am vierten Tag erkennt man erste Koloniebildungen, die sich am fünften Tag zu einem konfluenten Zellrasen zusammenfügen. Am sechsten Tag erkennt man erste Differenzierungsanzeichen bei den Keratinozyten.

Dieser Vorversuch zeigte gegenüber der herkömmlichen Anzchtung in Petrischalen ein wesentlich schnelleres Wachstum der Zellen. In den Versuchen in Petrischalen, also in statischen Kulturen, zeigte sich mit der gleichen Zelllinie erst nach 12 Tagen ein konfluentes Zellwachstum.

Innerhalb von sechs Tagen wurde jeden Tag nach 24 Stunden ein Plättchen aus dem Versuch und aus der Kontrolle entnommen. Die Zellen wurden abtrypsiniert und ihre Zellzahl pro Milliliter mit einer Zählkammer bestimmt. Die Ergebnisse wurden in Excel Tabellen und Diagramme übertragen. In den Diagrammen sind die Mittelwerte dargestellt (s. Diagramm 1, 2, 3, 4).

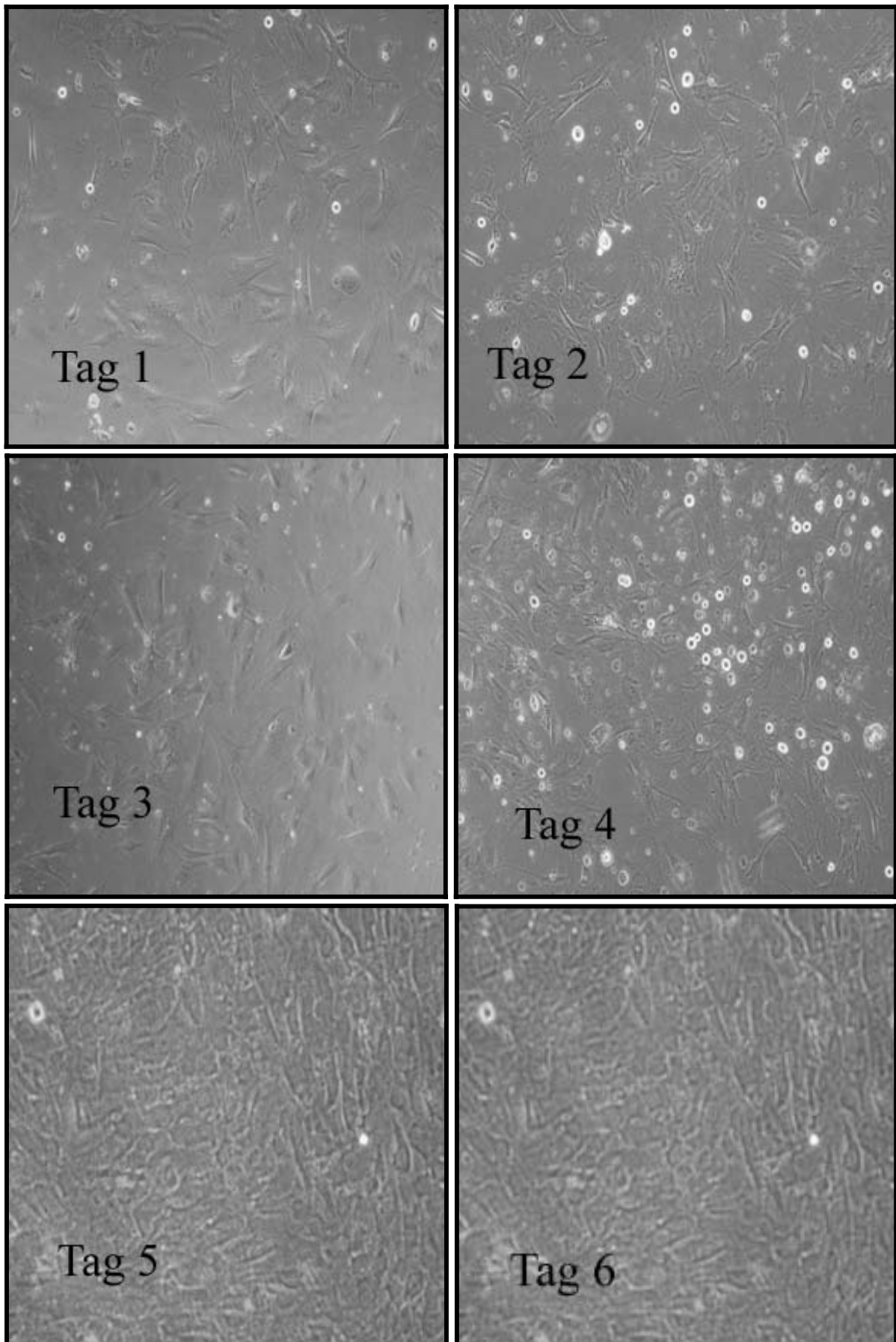


Abb. 56 Verlauf des Zellwachstums auf den Glasplättchen, hier die Isolierung Gollum nach sechs Tagen, Invert Mikroskop, 100fache Originalvergr.

3.1 Einfluss von *Keratinocyte growth factor* (KGF) auf das Zellwachstum

Im folgenden erkennt man, dass es im Verlauf der Proliferation unter dem Einfluss von KGF zu einem wesentlich schnelleren Wachstum, welches teilweise linear verläuft (s. Diagramm 1) führt. Es kommt zunächst unter der Zufuhr von KGF zu einer höheren Proliferationsrate. Bei beiden Versuchsdurchgängen zeigt sich gegen Ende eine Abnahme der Proliferationsrate und damit mit einer Gesamtzellzahl Abnahme.

3.1.1 Versuchsdurchgang 1 KGF

Zeit / Tagen	mit KGF Zellzahl 10^4 / ml	ohne KGF Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	4,5	4,5
Tag 1	7,7	5,5
Tag 2	9,25	6,25
Tag 3	9,25	7,5
Tag 4	12,1	8,75
Tag 5	16	13
Tag 6	18	14

3.1.2 Versuchsdurchgang 2 KGF

Zeit / Tagen	mit KGF Zellzahl 10^4 / ml	ohne KGF Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	4,3	4,3
Tag 1	7,6	5,3
Tag 2	10,7	7,8
Tag 3	15,1	12,8
Tag 4	16,7	13,3
Tag 5	20,3	15,5
Tag 6	18	14

3.1.3 Mittelwerte aus Versuchsdurchgang 1 und 2 KGF

Zeit / Tagen	mit KGF Zellzahl 10^4 / ml	ohne KGF Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	4,4	4,4
Tag 1	7,7	5,4
Tag 2	10	7
Tag 3	12,2	10,2
Tag 4	14,4	11
Tag 5	18,2	14,3
Tag 6	18	14

3.1.4 Graphische Darstellung der Mittelwerte KGF

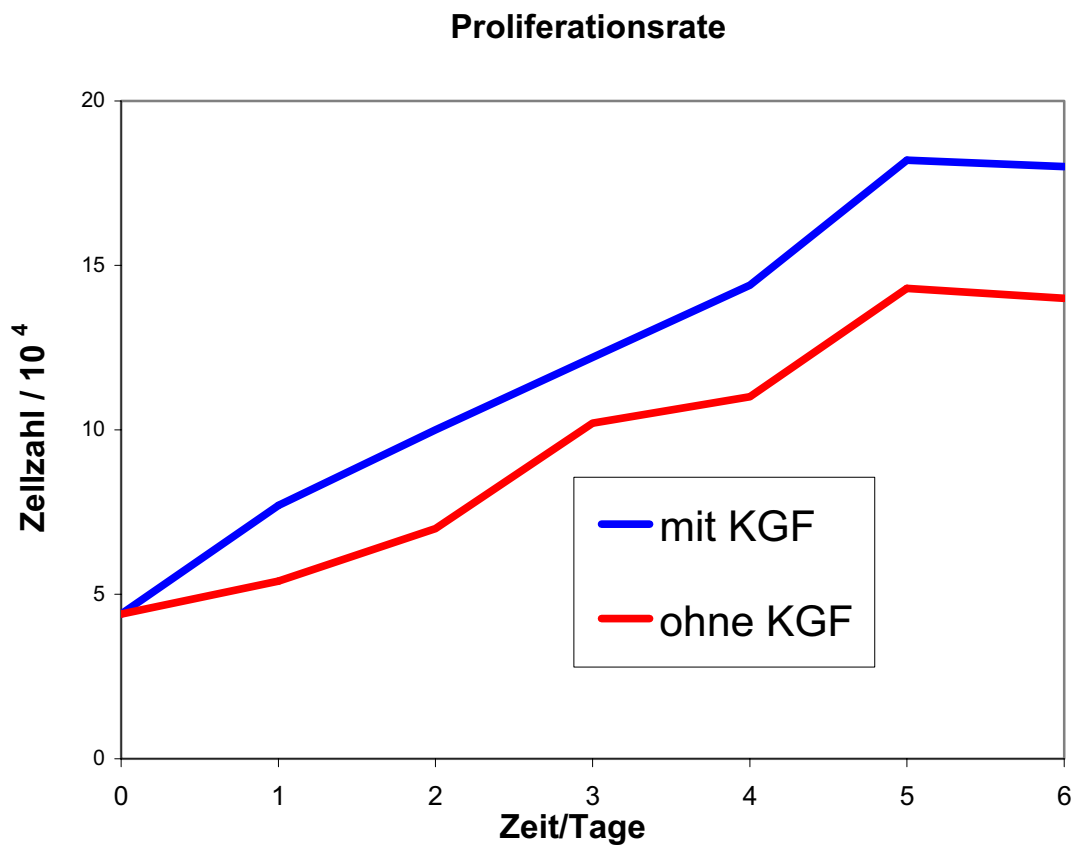


Diagramm 1 KGF

3.2 Einfluss von *Granulocyte macrophage–colony stimulating factor* (GM-CSF) auf das Zellwachstum

Bei der Zugabe von GM-CSF zeigt sich eine höhere Proliferationsrate als ohne Zusatz. Besonders am dritten Tag kam es zu einem hohen Anstieg (s. Diagramm 2). Ab dem fünften Tag zeigt sich bei beiden Durchgängen mit und ohne GM-CSF keine Veränderung in der Proliferationsrate. Bei den Versuchsdurchgängen mit GM-CSF stellt man aber insgesamt eine höhere Zellzahl an Keratinozyten fest.

3.2.1 Versuchsdurchgang 1 GM-CSF

Zeit / Tagen	mit GM-CSF Zellzahl 10^4 / ml	ohne GM-CSF Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	4	4
Tag 1	8,3	4,7
Tag 2	11,1	6,8
Tag 3	11,2	6,7
Tag 4	11,1	8,9
Tag 5	11,3	9,5
Tag 6	11,2	9,2

3.2.2 Versuchsdurchgang 2 GM-CSF

Zeit / Tagen	mit GM-CSF Zellzahl 10^4 / ml	ohne GM-CSF Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	4,5	4,5
Tag 1	9,2	5,7
Tag 2	12,3	6
Tag 3	12,8	6,7
Tag 4	12,7	8,5
Tag 5	12,9	10,5
Tag 6	13	11,2

3.2.3 Mittelwerte aus Versuchsdurchgang 1 und 2 GM-CSF

Zeit / Tagen	mit GM-CSF Zellzahl 10^4 / ml	ohne GM-CSF Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	4,3	4,3
Tag 1	8,8	5,2
Tag 2	11,7	6,4
Tag 3	12	6,7
Tag 4	11,9	8,7
Tag 5	12,1	10
Tag 6	12,1	10,2

3.2.4 Graphische Darstellung der Mittelwerte GM-CSF

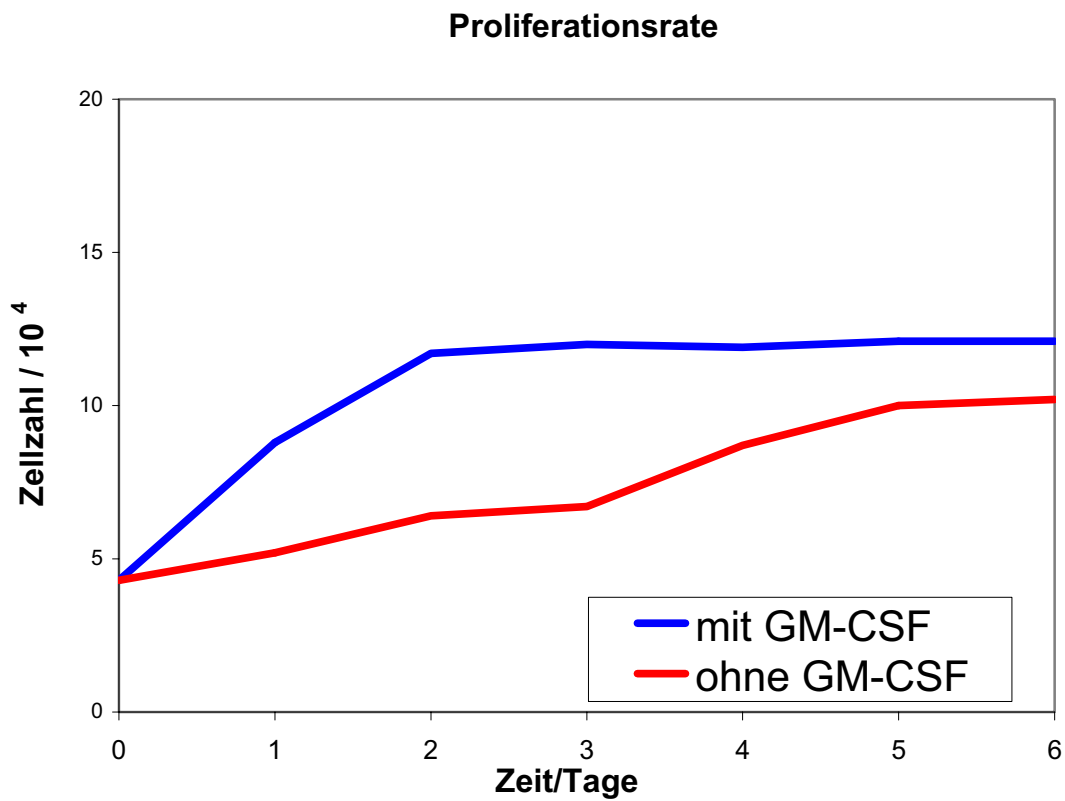


Diagramm 2 GM-CSF

3.3 Einfluss von *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) auf das Zellwachstum

Bei der Zugabe von TNF- α zeigt sich ein negativer Einfluss auf die Proliferationsrate von bovinen Keratinozyten. Die beiden Durchgänge ohne TNF- α zeigen eine höhere Gesamtzellzahl nach den sechs Tagen der Versuchsdauer (s. Diagramm 3).

3.3.1 Versuchsdurchgang 1 TNF- α

Zeit / Tagen	mit TNF- α Zellzahl 10^4 / ml	ohne TNF- α Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	3,5	3,5
Tag 1	3,7	11,8
Tag 2	6,4	12,1
Tag 3	6,5	12,2
Tag 4	7,5	12,2
Tag 5	8,1	11,8
Tag 6	8,4	12,9

3.3.2 Versuchsdurchgang 2 TNF- α

Zeit / Tagen	mit TNF- α Zellzahl 10^4 / ml	ohne TNF- α Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	3,2	3,2
Tag 1	3,8	6,8
Tag 2	4,7	7,5
Tag 3	5,7	8,6
Tag 4	6,3	9,1
Tag 5	7,3	10,5
Tag 6	6,9	11,1

3.3.3 Mittelwerte aus Versuchsdurchgang 1 und 2 TNF- α

Zeit / Tagen	mit TNF- α Zellzahl 10^4 / ml	ohne TNF- α Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	3,4	3,4
Tag 1	3,8	7,3
Tag 2	5,6	9,8
Tag 3	6,1	10,4
Tag 4	6,9	10,7
Tag 5	7,7	11,2
Tag 6	7,7	12

3.3.4 Graphische Darstellung der Mittelwerte TNF- α

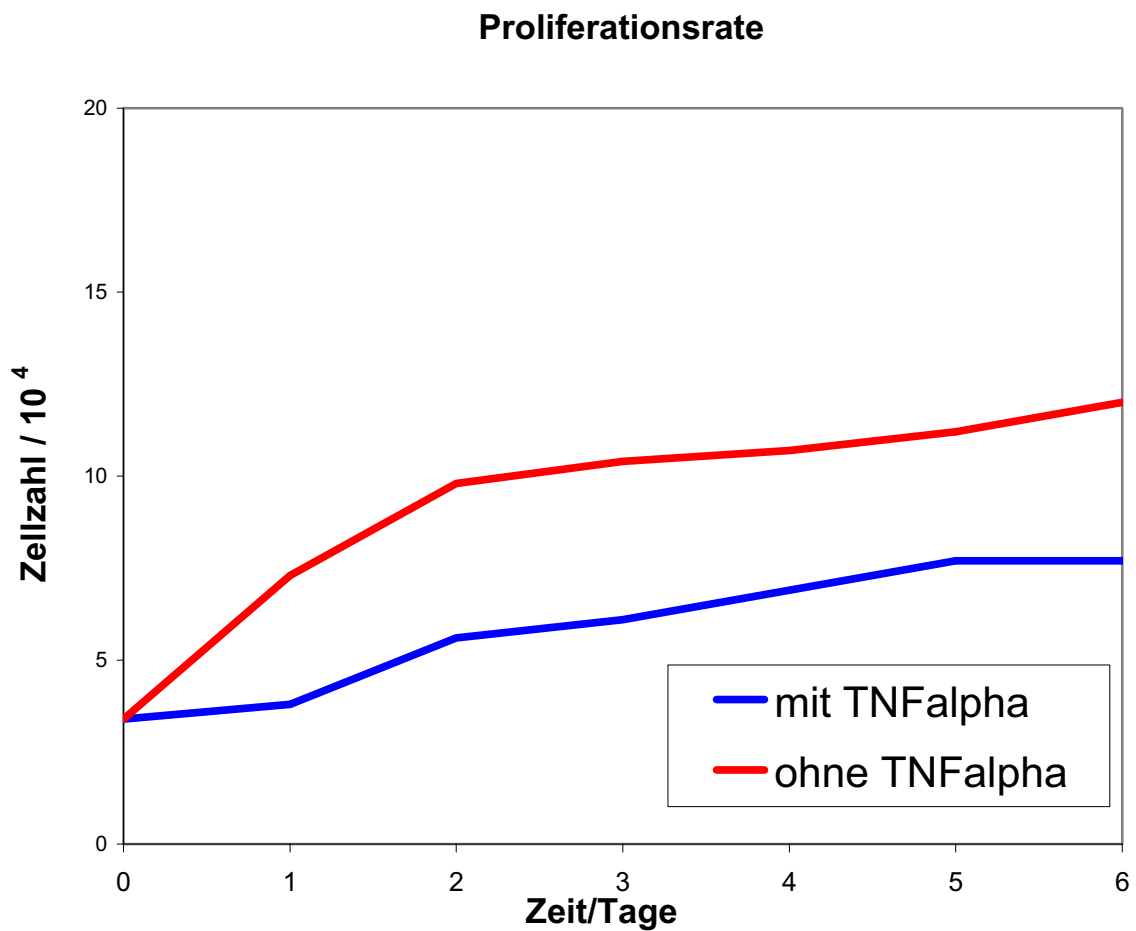


Diagramm 3 TNF alpha

3.4 Einfluss von *Interleukin 1 alpha* (IL-1 α) auf das Zellwachstum

Bei der Verwendung des konditionierten Mediums zeigte sich bei allen Versuchsdurchgängen ein zu vernachlässigender Unterschied in der Proliferationsrate und der Gesamtzellzahl nach sechs Tagen (s. Diagramm 4).

3.4.1 Versuchsdurchgang 1 IL-1 α

Zeit / Tagen	mit IL-1 α Zellzahl 10^4 / ml	ohne IL-1 α Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	3	3
Tag 1	3,8	6,8
Tag 2	4,7	7,5
Tag 3	5,7	8,6
Tag 4	7,3	10,5
Tag 5	7,3	10,5
Tag 6	6,9	11,1

3.4.2 Versuchsdurchgang 2 IL-1 α

Zeit / Tagen	mit IL-1 α Zellzahl 10^4 / ml	ohne IL-1 α Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	3,5	3,5
Tag 1	4	4,5
Tag 2	5,6	6,5
Tag 3	6	7
Tag 4	7	8,2
Tag 5	8	8,9
Tag 6	7,9	9

3.4.3 Mittelwerte aus Versuchsgang 1 und 2 IL-1 α

Zeit / Tagen	mit IL-1 α Zellzahl 10^4 / ml	ohne IL-1 α Zellzahl 10^4 / ml
Tag 0	3,3	3,3
Tag 1	3,9	5,7
Tag 2	5,2	7
Tag 3	5,9	7,8
Tag 4	6,7	8,7
Tag 5	7,7	9,8
Tag 6	7,4	10

3.4.4 Graphische Darstellung der Mittelwerte IL-1 α

Proliferationsrate

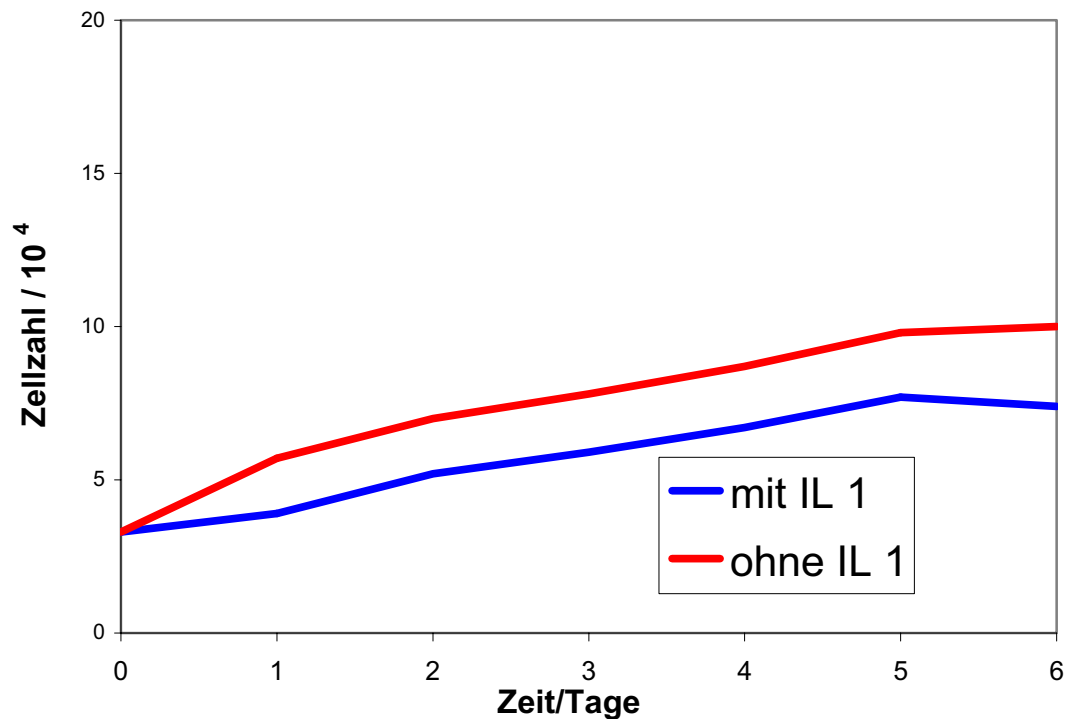


Diagramm 4 Interleukin 1 alpha