

Mit dem Wissen wächst der Zweifel.
Goethe, Maximen und Reflexionen

1. Einleitung

Die Schleimhaut des Magendarmtraktes weist undifferenzierte Stammzellen mit der Fähigkeit zur Zellteilung, Differenzierung und Proliferation auf. Ihr Wachstum wird durch ein internes genetisches Programm, luminale Faktoren und endokrine und parakrine Signale geregelt. Die Integrität der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes hängt von einem komplizierten Gleichgewicht einer großen Anzahl von Faktoren ab. Durch den normalen Kontakt mit Nahrungsbestandteilen und mechanische Reize kommt es kontinuierlich zu Mikroläsionen der Schleimhaut. Eine Reihe von Schutzmechanismen, wie z.B. die Bildung von Schleim auf den Epithelzellen, eine intakte Blutversorgung, eine ausreichend rasche Regeneration und Proliferation der Epithelzellen bilden im Zusammenspiel den Garant für die Aufrechterhaltung einer intakten Schleimhaut. Eine Reihe von Wachstumsfaktoren modulieren die Epithelzellfunktion und Anpassung der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes auf Stress und Verletzungen¹. In den letzten Jahren wurde eine Großzahl von Wachstumsfaktoren charakterisiert und beschrieben. Besonders aus Analysen der Wundheilung im Bereich der Haut konnte man feststellen, dass die Wachstumsfaktoren epithelial growth factor (EGF), transforming growth factor α (TGF α), platelet derived growth factor (PDGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) von essentieller Bedeutung^{2,3,4,5,6,7} für die Regulation der Regeneration und Proliferation der Schleimhaut sind. Diese Wachstumsfaktoren wurden z.T. biochemisch und auch immunhistochemisch in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen. Sie besitzen mitogene und angiogene Aktivitäten, welche für die Proliferation von Zellen der normalen Mukosa essentiell sind und welche auch die Wundheilungsmechanismen unterstützen. Obwohl sich die oben genannten Wachstumsfaktoren bezüglich ihrer Stabilität, ihrer Struktur, ihres Bildungsortes und ihrer Verteilung in der Magenschleimhaut unterscheiden, besteht ein gemeinsamer Wirkungsmechanismus in ihrer Interaktion mit spezifischen Tyrosinkinaserzeptoren^{8,9,10,11,12}. So besitzen EGF und TGF α einen gemeinsamen Rezeptor, der sich vor allem im Bereich der Zellen des Drüsenhalses und im Bereich der oberflächlichen Epi-

thelzellen nachweisen lässt und der zur Gruppe der Tyrosinkinaserzeptoren gehört¹³. Für PDGF wurden bislang zwei Tyrosinkinaserzeptoren beschrieben⁹. Für den Wachstumsfaktor bFGF existiert ein hochaffines und ein niedrigaffines Rezeptorsystem, das sich zum einen im Bindegewebe und zum anderen im Bereich der Zellmembranen endothelialer und epithelialer Zellen befindet¹⁰. Das niedrigaffine Rezeptorsystem besteht aus Proteoglykanen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Die hochaffinen transmembranösen Rezeptoren gehören zu den Tyrosinkinaserzeptoren¹⁴.

EGF wurde 1962 von Cohen in den Speicheldrüsen der Maus entdeckt¹⁵. Der Wachstumsfaktor EGF ist ein aus 53 Aminosäuren bestehendes Polypeptid^{8,16}. Das primäre Transkript des EGF Gens hat eine Größe von ca. 110 kb. Die mit der „Northern- Blot“- Methode nachgewiesene mRNA besitzt eine Größe von 4,7 bis 4,9 kb⁸. Im Verdauungstrakt wird EGF in größeren Mengen in den Speicheldrüsen, den Brunnerschen Drüsen und dem Pankreas nachgewiesen^{17,18,19}. Im Rahmen der Speichelsekretion und durch Abgabe von Pankreassekret wird EGF in den Verdauungstrakt sezerniert. EGF lässt sich in normaler Magenschleimhaut immunhistochemisch nachweisen, inwieweit jedoch gesunde Magenschleimhaut EGF lokal produziert oder ob es sich hauptsächlich um aus dem Lumen aufgenommenes EGF handelt, ist nach wie vor nicht geklärt^{13,17,20}. Aus den Speicheldrüsen stammendes EGF wird an EGF- Rezeptoren gebunden und internalisiert. Der Wachstumsfaktor lässt sich später dann mit der Methode der Immunhistochemie in Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes nachweisen^{21,22}.

Im Vergleich zu EGF ist TGF α um den Faktor 10 vermehrt im Gastrointestinaltrakt nachweisbar^{20,23}. TGF α besteht aus 50 Aminosäuren und weist zu EGF eine Sequenzhomologie von 35% auf²⁴. Das primäre Gentranskript besitzt eine Größe von 70 bis 100 kb. Die mit der „Northern- Blot“- Methode nachweisbare mRNA weist eine Größe von ca. 4,8 kb auf^{8,25}. Zusammen mit EGF hat TGF α einen gemeinsamen Rezeptor (EGFR) und besitzt ein mit dem EGF sehr ähnliches Wirkungsspektrum. Eine Schleimhautschädigung führt ebenfalls lokal zu einer vermehrten Expression von TGF α und Abgabe dieses Wachstumsfaktors in das Lumen des Gastrointestinaltraktes^{21,22}. TGF α führt zur Hemmung der Säuresekretion und Stimulation von Zellmigration und Zellproliferation²⁶.

Die Eigenschaften des Wachstumsfaktors in der frühen Phase der Wundheilung bei Magenläsionen aus Thrombozyten und Makrophagen freigesetzt zu werden führte zur Namensgebung des plateled derived growth factors (PDGF)²⁷.

Bei dem PDGF handelt es sich um ein Glykoprotein, welches aus zwei Peptidketten (A und B) besteht, die durch Sulfidbrücken verbunden sind⁹. Insgesamt können drei verschiedene Isoformen auftreten: PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB. Diese Isoformen binden an zwei struktu-

rell ähnliche Tyrosinkinaserzeptoren (α und β), die von Zelltyp zu Zelltyp variieren. Es lassen sich drei Transkripte für die A- Kette von PDGF mit 1,9; 2,3 und 2,8 kb und ein 2,4 kb großes Transkript für die B-Kette von PDGF nachweisen^{9,27}. Gentranskripte für PDGF wurden im Magen nachgewiesen²⁸. Neben einer wichtigen Rolle bei der Embryonalentwicklung spielt PDGF bei der Wundheilung eine zentrale Rolle²⁷. Die topische Applikation von PDGF im Tiermodell hat eine protektive Wirkung auf die Magenschleimhaut und beschleunigt die Abheilung von durch Indomethacin induzierten Magenläsionen³. Die Lokalisation von PDGF Rezeptoren im Magen ist derzeit noch nicht eindeutig geklärt. Generell muss man jedoch auf Grund des derzeitigen Kenntnisstandes davon ausgehen, dass PDGF Rezeptoren auf Bindegewebszellen und nicht auf epithelialen und endothelialen Zellen vorkommen.

Der basische FGF stellt ein sehr leicht und sehr schnell durch Säure und Pepsin im Magen abbaubares Polypeptid dar⁴. bFGF besitzt eine Länge von insgesamt 155 Aminosäuren^{29,30}. Die genomische DNA wird in 7, 3,7 und 1,4 kb große mRNAs überschrieben¹⁰. bFGF besitzt einen sehr starken Einfluß auf die Angiogenese und stellt ein hochpotentes Mitogen für die Zellen mesenchymaler und neuroektodermaler Herkunft dar³¹. Die Rolle von bFGF bei der Abheilung von Magenulzera wurde von der Arbeitsgruppe von Folkman und Szabo erstmalig beschrieben^{4,32}.

Die immunhistochemische Lokalisation von EGF, TGF α , PDGF und bFGF wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen am normalen Gastrointestinaltrakt bisher nur fragmentarisch analysiert. Auch die Verteilung der oben genannten Wachstumsfaktoren bei der Ulkusheilung beim Menschen sind unzureichend bekannt.

Hieraus leitet sich die Zielsetzung dieser Arbeit ab:

1. Bestimmung der Lokalisation der Wachstumsfaktoren EGF, TGF α , PDGF und bFGF in Gefrierschnitten der Schleimhaut des gesamten Gastrointestinaltraktes mit Hilfe der Immunhistochemie
2. Herstellung eines Vergleiches zu Ulzerationen des Magens und Duodenums.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

Mit gesunder Schleimhaut wurden vom Ösophagus 7 Patienten, vom Magen 8, vom Duodenum 8 und vom Kolon 9 Patienten untersucht. Am pathologisch veränderten Gastrointestinaltrakt wurden 7 Patienten mit *Ulcus ventriculi* und 3 Patienten mit *Ulcus duodeni* sowie 3 Patienten mit Magenulkusnarben wurden untersucht. Alle Patienten hatten bei Diagnosestellung gesunde Schleimhaut in allen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes beziehungsweise floride Ulzera im Stadium Forest III und abgeheilte vernarbte Ulzera. Das mittlere Alter betrug bei den Patienten mit normaler Mukosa 53,3 Jahre, bei den Patienten mit Ulzera *ventriculi* 69,7 Jahre, bei den Patienten mit Ulzera *duodeni* 50,3 Jahre und bei den Patienten mit Ulcusnarben 73,6 Jahre. Die Gruppe mit normaler Mukosa bestand aus 15 Frauen und 17 Männern; die Gruppe mit Ulzera aus 4 Frauen und 9 Männern; die Ulzera *ventriculi* aus 4 Frauen und 3 Männern; die Ulzera *duodeni* aus 3 Männern und die Gruppe mit Magenulcusnarben aus 3 Männern. Bei den Patienten mit gesunder Schleimhaut wurden zwei bis vier Biopsien und bei den Patienten mit Ulzerationen wurden insgesamt zwei Biopsien aus Ulkusrand und Ulkusgrund entnommen. Alle Patienten wurden über die Entnahme der Biopsien für wissenschaftliche Zwecke informiert und willigten schriftlich ein. Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt. Durch die Vielzahl der zu untersuchenden Mukosaschichten zum Verhältnis der Anzahl der Färbungen aller untersuchten Wachstumsfaktoren und der relativ geringen Größe der untersuchten Probeexzisionen war es nicht möglich jede zu erforschende Struktur bei jeder Biopsie auf jeden Faktor anzufärben. Aufschluß darüber geben die Tabellen 1 bis 7.

Tabelle 1:

Auflistung der histologisch erfassten Areale in den entnommenen Biopsien mit normaler Ösophagusschleimhaut, da oft nicht sämtliche Strukturen in den Schnittebenen der jeweiligen Biopsien eines Patienten zu sehen und somit nicht für alle Wachstumsfaktoren anzufärben sind.

| Patient | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Epithelzellen | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| Papillen | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| Basalmembran | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| Lamina propria | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Gefäße | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Muskulatur | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Kollagen | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |

Tabelle 2:

Auflistung der histologisch erfassten Areale in den entnommenen Biopsien mit normaler Magenschleimhaut, da oft nicht sämtliche Strukturen in den Schnittebenen der jeweiligen Biopsien eines Patienten zu sehen und somit nicht für alle Wachstumsfaktoren anzufärben sind.

| Patient | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Epithel | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| Drüsen | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Basalmembran | 1 | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Lamina propria | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Gefäße | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Muskulatur | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |

Tabelle 3:

Auflistung der histologisch erfassten Areale in den entnommenen Biopsien mit normaler Duodenalschleimhaut, da oft nicht sämtliche Strukturen in den Schnittebenen der jeweiligen Biopsien eines Patienten zu sehen und somit nicht für alle Wachstumsfaktoren anzufärben sind.

| Patient | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Epithelzellen | 1 | 3 | 3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Becherzellen | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Krypten | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| Basalmembran | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Lamina propria | 0 | 3 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Gefäße | 0 | 1 | 3 | 2 | 2 | 0 | 2 | 1 |
| Muskulatur | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Submukosa | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Brunner Drüsen | 0 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 |

Tabelle 4:

Auflistung der histologisch erfassten Areale in den entnommenen Biopsien mit normaler Colomukosa, da oft nicht sämtliche Strukturen in den Schnittebenen der jeweiligen Biopsien eines Patienten zu sehen und somit nicht für alle Wachstumsfaktoren anzufärben sind

| Patient | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Epithelzellen | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 | 2 |
| Becherzellen | 2 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 | 3 |
| Basalmembran | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Lamina propria | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| Gefäße | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Muskulatur | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 |

Tabelle 5:

Auflistung der histologisch erfassten Areale in den entnommenen Biopsien mit Ulzera ventriculi, da oft nicht sämtliche Strukturen in den Schnittebenen der jeweiligen Biopsien eines Patienten zu sehen und somit nicht für alle Wachstumsfaktoren anzufärben sind.

| Patient | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Ulkusrand | 3 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Ulkusgrund | 2 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 |
| Nekrosezone | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 3 |
| Epithel | 4 | 4 | 4 | 3 | 0 | 4 | 4 |
| Drüsen | 4 | 0 | 4 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| Basalmembran | 4 | 3 | 4 | 1 | 0 | 2 | 4 |
| Lamina propria | 4 | 0 | 4 | 2 | 0 | 4 | 4 |
| Gefäße | 3 | 0 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| Muskulatur | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Kollagen | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 |

Tabelle 6:

Auflistung der histologisch erfassten Areale in den entnommenen Biopsien mit Ulzera duodeni, da oft nicht sämtliche Strukturen in den Schnittebenen der jeweiligen Biopsien eines Patienten zu sehen und somit nicht für alle Wachstumsfaktoren anzufärben sind.

| Patient | 1 | 2 | 3 |
|----------------|---|---|---|
| Ulkusrand | 0 | 1 | 4 |
| Nekrosezone | 4 | 4 | 0 |
| Epithel | 0 | 4 | 4 |
| Becherzellen | 0 | 1 | 4 |
| Krypten | 0 | 2 | 4 |
| Basalmembran | 0 | 1 | 4 |
| Lamina propria | 0 | 3 | 4 |
| Gefäße | 0 | 3 | 4 |
| Muskulatur | 0 | 1 | 4 |
| Kollagen | 0 | 0 | 2 |
| Submukosa | 0 | 0 | 0 |
| Brunner Drüsen | 0 | 0 | 2 |

Tabelle 7:

Auflistung der histologisch erfassten Areale in den entnommenen Biopsien mit Magenulcusnarbe, da oft nicht sämtliche Strukturen in den Schnittebenen der jeweiligen Biopsien eines Patienten zu sehen und somit nicht für alle Wachstumsfaktoren anzufärben sind.

| Patient | 1 | 2 | 3 |
|----------------|---|---|---|
| Cicatrix Rand | 4 | 1 | 2 |
| Kollagen | 3 | 1 | 4 |
| Epithel | 1 | 4 | 4 |
| Drüsen | 4 | 4 | 4 |
| Basalmembran | 1 | 4 | 4 |
| Lamina propria | 4 | 4 | 4 |
| Gefäße | 2 | 4 | 4 |
| Muskulatur | 4 | 3 | 3 |

2.2 Antikörper

Die Antikörper wurden mit 0,2m Phosphat-Buffered-Saline (PBS) verdünnt. Die optimale Verdünnung der verwendeten Antikörper zur Fluoreszenzdarstellung wurde durch Schachbrett-titration an jeweils normaler Ösophagus-, Magen-, Duodenal- und Kolonschleimhaut für jeden Antikörper festgelegt (siehe Tabelle 8).

Tab. 8: Auflistung der primären Antikörper gegen die untersuchten Proteine unter Angabe ihrer Verdünnung und ihres Gewinnungsortes

| Primärer Antikörper gegen | Verdünnung | Gewonnen in |
|---------------------------|------------|-------------|
| EGF | 1:20 | Maus |
| TGF α | 1:5 | Maus |
| PDGF | 1:40 | Ziege |
| bFGF | 1:40 | Kaninchen |

2.2.1 EGF - Primärantikörper

EGF ist ein monoklonaler IgG1 Antikörper von der Maus. Der gegen EGF gerichtete Antikörper entstammt dem Klon 144-8. Dieses wurde von Oncogene Science Incorporation mit rekombinanten menschlichen EGF immunisierten BALB/ c Mäusen und einer Fusion von Mäusemilzzellen mit P3 x 63 AG 8.653 Mäusemyelomzellen hergestellt (Produktinformation 1990 Oncogene Science, Inc., Cat. # GF 01). Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:20 verwendet.

2.2.2 EGF - Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper wurden fluoresceinmarkierte Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat Isomer 1) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet (Dako, Code No. F 261, Lot No. 059).

2.2.3 TGF α - Primärantikörper

TGF- α ist ein monoklonaler IgG 2a Antikörper von der Maus. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5 verwendet. Er stammt vom Clone 213-4.4. Dieses wurde von Oncogene Science Incorporation mit rekombinanten menschlichen TGF α immunisierten BALB/c Mäusen und einer Fusion von Mäusemilzzellen mit P3 x 63 AG 8.653 Mäusemyelomzellen hergestellt (Produktinformation 1990 Oncogene Science, Inc. Cat. # GF 01).

2.2.4 TGF α - Sekundärantikörper

Es kam derselbe Sekundärantikörper wie für EGF zur Anwendung (siehe auch 2.2.2).

2.2.5 PDGF - Primärantikörper

PDGF ist ein IgG Antikörper von der Ziege. Er neutralisiert spezifisch die biologische Aktivität von natürlichem und rekombinanten menschlichem PDGF-AA und PDGF-BB (Produktinformation Hermann Biermann GmbH Diagnostica, Catalogue Code – BDA 16). Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:40 verwendet.

2.2.6 PDGF - Sekundärantikörper

Als sekundärer Antikörper wurden fluoreszenzmarkierte Kaninchen-Anti-Ziegen-Antikörper (Dichloro-Triazinyl-Amino-Fluorescein) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet (Produktinformation Dianova, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Lot No. 14930, Code No. 305-015-045). Die Antikörper können jedoch eine minimale Kreuzreaktion mit Serumproteinen vom Mensch aufweisen.

2.2.7 bFGF - Primärantikörper

bFGF ist ein IgG Antikörper vom Kaninchen. Der AK wurde in einer Verdünnung von 1:40 verwendet. Er ist gegen hochgereinigtes natives Rinderhirn bFGF gerichtet, dessen Homogenität durch silbergefärbtes SDS-PAGE bestimmt wurde. Der Antikörper ist spezifisch und neutrali-

siert die Aktivität von Rinderhirn bFGF (Produktbeschreibung Hermann Biermann GmbH Diagnostika, Catalogue code – BDA 4).

2.2.8 bFGF - Sekundärantikörper

Als sekundärer Antikörper wurden fluoreszenzmarkierte Maus-Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Die Antikörper können jedoch mit Immunglobulinen von anderen Spezies minimal kreuzreagieren (Produktbeschreibung Dianova, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Lot No. 19927, Code No. 211-005-109).

2.3 Reagenzien

PBS – Puffer – Lösung

Zur Herstellung einer 0,2 m PBS-Puffer-Lösung wurde eine Lösung aus 2.725g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 10,4g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und 35.05g Natriumchlorid (NaCl) mit Aqua destillata auf fünf Liter aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) bzw. Natron (NaOH) auf 7,2 eingestellt.

Einbettmedium nach Kevin McNamee

In 10 ml phosphatgepufferter NaCl ($0,01\text{m PO}_4^{3-}$, $\text{pH}=7,4$ und $0,15\text{m NaCl}$) und 90ml Glycerin wurden 100mg p-Phenylendiamin aufgelöst. Der pH-Wert wurde mit 0,5m Karbonat-Bikarbonatpuffer ($\text{pH} = 9,0$) auf $\text{pH}=8,0$ eingestellt.

2.4 Gewebepräparation

Nach der endoskopischen Entnahme wurden die Biopsien zum Schutz vor Autolyse zunächst in Eiswasser aufgefangen, bevor sie innerhalb kürzester Zeit, 10 Minuten wurden hierbei stets unterschritten, in einem Einbettmedium der Firma Reichelt und Jung horizontal auf Kork ausgerichtet wurden, wobei sie vollständig mit dem Gefriermedium bedeckt waren.

Sofort danach wurden die Biopsien langsam in flüssigen Stickstoff gefroren.

Mit einem Frigocut 2800 der Firma Reichel-Jung wurden 4 mm dicke Kryoschnitte bei einer Objekt- und Boxtemperatur von -25° C angefertigt.

Auf mit 1:100 verdünntem Ponalholzkleber beschichteten Objektträgern wurden die Schnitte aufgetragen. Danach wurden die Präparate 15 Minuten in einer Chloroform-Aceton-Lösung (1:1) bei -20° C fixiert, an der Luft getrocknet und bei -20° C bis zur Antikörperfärbung gelagert.

2.5 Hämatoxylin – Eosin – Färbung (HE-Färbung)

Zur genauen Darstellung von histologischen Details wurde von jeder Biopsie eine HE-Färbung angefertigt. Die fixierten Kryoschnitten wurden sieben Minuten in Hämalaun gebadet und anschließend mindestens eine halbe Stunde in Leitungswasser gebläut, wobei das Wasser zehnmals gewechselt wurde. Für ca. 15 Sekunden wurden die Präparate in Aqua destillata getaucht und danach kurz in mit Eisessig angesäuertem Eosin gespült. Dann folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 prozentiger, 85 prozentiger, 96 prozentiger Alkohol). Zur Differenzierung der Färbung wurde zweimal in 100 prozentigem Alkohol für je 2 Minuten gebadet. Die Präparate wurden dann mindestens fünf Minuten mit Xylol behandelt und anschließend mit Entellan® eingedeckelt.

2.6 Immunhistochemische Färbung

Die Verdünnungen der Primär- und der Sekundärantikörperlösungen waren zu Beginn der Untersuchungen unbekannt. Die geeignete Verdünnung wurde ermittelt, indem das Ergebnis der Anfärbungen bei konstanter Verdünnung der Sekundärantikörperlösung (1:100) und steigender Konzentration der Primärantikörperlösung überprüft wurde.

Der Primärantikörper wurde in der etablierten Verdünnung auf die fixierten und luftgetrockneten Präparate aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 Grad Celsius. Die Objektträger wurden dreimal kurz in PBS getaucht und anschließend weitere 30 Minuten in PBS gebadet. Die PBS Lösung wurde zwischenzeitlich dreimal erneuert. Nun wurde der Sekundärantikörper in der etablierten Verdünnung aufgetragen und im Dunklen in der feuchten Kammer bei 4 Grad Celsius 45 Minuten inkubiert. Der Waschvorgang mit PBS wurde wiederholt. Anschließend wurden die Präparate 15 Minuten in Aqua destillata gewässert, um die vorhandenen NaCl- Kristalle zu lösen. Um ein vorzeitiges Ausbleichen der Präparate beim Mik-

roskopieren zu verhindern, wurde ein Einbettmedium nach Kevin McNamee verwendet. Die Präparate wurden mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop untersucht. Zum Fotografieren wurden Filme von Kodak (Ektachrom 400 ASA) und Agfa (Agfapan 400 ASA) benutzt.

Als negative Kontrollen dienten die PBS- Kontrolle und die Serumkontrolle.

Bei der PBS- Kontrolle wird ein Reaktionsschritt ausgelassen. Anstelle der Schicht der Primärantikörper wird PBS auf die Schnitte aufgetragen. Der weitere Ablauf der Färbung bleibt unverändert. Ziel ist es, den Grad der unspezifischen Bildung des markierten Sekundärantikörpers an das Gewebe zu bestimmen. Es sollte keine Reaktion sichtbar sein. PBS- Kontrollen wurden bei Färbungen regelmäßig mitgeführt.

Bei der Serumkontrolle wird ein Reaktionsschritt modifiziert. Anstelle des primären Antikörpers substituiert man ein Nichtimmun- Serum der Spezies des Primärantikörpers in derselben Verdünnung. An den Präparaten sollte keine Reaktion sichtbar sein³³.

Serumkontrollen führten wir für jeden Wachstumsfaktor durch. Die Kontrollen waren für EGF und TGF α Biopsien, die mit γ - Globulin von der Maus (Mouse Serum, Normal, Dakopatts, Code No. X 910, Lot No. 019) behandelt worden waren, für PDGF Biopsien, die mit γ - Globulin von der Ziege (Normal Goat Serum, Hermann Biermann GmbH Diagnostica, Catalog Number: BDA 56) und für bFGF Biopsien, die mit γ - Globulin vom Kaninchen (Rabbit Gamma Globulin, dianova GmbH, Jackson Immunoresearch Labs, Inc., Code Number: 011-000-002, Lot Number: 13439) behandelt worden waren. Die monoklonalen Antikörper wurden vom Hersteller im ELISA und Immunoblot Assay getestet.

Als Positivkontrolle diente die Absorptionskontrolle.

Die Spezifität der primären Antikörper wurde durch Präinkubation der primären Antikörper nach solider Phasen-Absorption an antigenbeladenen Sepharosekügelchen verifiziert.

Nach Inkubation mit ihrem verwandten Antigen wurde die Färbung für TGF α und für PDGF aufgehoben, die Becherzellen des Duodenums und des Kolons blieben hierbei leicht unspezifisch positiv (Quelle Product Sheet).

2.7 Auswertung

Bei der Auswertung wurde die Intensität und Verteilung der Fluoreszenz im Vergleich zum normalen Gewebe optisch beurteilt. Die Ergebnisse der einzelnen Präparate wurden tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabelle 9).

In folgende Kategorien wurde eingeteilt:

Tab. 9: Bewertung der Ergebnisse

| | |
|------------------|--|
| Struktur fehlend | Die jeweilige Struktur ist auf dieser Biopsie bzw. in dieser Schnittebene nicht vorhanden |
| ungefärbt | Keine Fluoreszenz nach Färbung nachweisbar (von Autofluoreszenz bestimmter Strukturen abgesehen, z.B. Kollagenbündel) |
| + | Intensität der Fluoreszenz ist schwach, aber im Vergleich zum ungefärbten Gewebe deutlich nachweisbar |
| ++ | Intensität der Fluoreszenz ist mittelstark, Verteilungsmuster sind eindeutig abgrenzbar |
| +++ | Intensität der Fluoreszenz ist stark, verschiedene Anfärbegrade der jeweiligen Strukturen untereinander sind differenzierbar |

3. Ergebnisse

3.1 EGF

3.1.1 Normaler Gastrointestinaltrakt

3.1.1.1 Ösophagus

Die flachen Epithelzellen des Stratum spinosum enthielten bis in tiefere Schichten kein EGF positives Material. Eine geringe Immunreaktivität wiesen die relativ kleinen dicht stehenden Basalzellen im Bereich der Papillen auf. Die Basalmembran war nicht mit EGF angefärbt, ebenso ungefärbt blieben das Bindegewebe der Lamina propria, Kapillaren und die Muskularis Mucosae. Eine starke Markierung mit Antikörpern gegen EGF zeigten Kollagenfaserbündel. Eine genaue Auflistung der erfassten und gefärbten Areale zeigt die Tabelle 10.

Tabelle 10: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit EGF an Ösophagusbiopsien, n = 2

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | 2 | | | |
| Papillen | 1 | | 1 | | |
| Basalmembran | 1 | 1 | | | |
| Lamina propria | 1 | 1 | | | |
| Gefäße | 1 | 1 | | | |
| Muskulatur | 1 | 1 | | | |
| Kollagen | 1 | | | | 1 |

3.1.1.2 Magen

An den die Magengruben auskleidenden Epithelzellen und an den Zellen der tiefen Magendrüsen beobachteten wir eine schwache zytoplasmatische Reaktion. Die verbindende Basalmembran und die Lamina propria wiesen kein EGF positives Material auf. Kleine Kapillargefäße und glatte Muskelzellen der Muskularis Mukosae waren schwach gekennzeichnet, siehe auch Tabelle 11.

Tabelle 11: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit EGF an Magenbiopsien, n = 5

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | 1 | | 3 | | 1 |
| Drüsen | 1 | 2 | 2 | | |
| Basalmembran | 2 | 3 | | | |
| Lamina propria | | 5 | | | |
| Gefäße | | 1 | 4 | | |
| Muskulatur | 3 | | 1 | 1 | |

3.1.1.3 Duodenum

An den Epithelzellen der duodenalen Villi wurden überwiegend keine Anfärbung für das EGF Antigens beobachtet. Eine starke Immunreaktivität zeigte sich sowohl an den Becherzellen als auch an den tiefer gelegenen Epithelzellen der Lieberkühnschen Drüsen. Die zwischen Epithel und Bindegewebe gelegenen Basalmembranen waren durchgehend ungefärbt. Am lockermaschigen gefäßreichen Bindegewebe konnte keine Reaktion beobachtet werden. Die Kapillaren der Lamina propria waren mit Antikörpern gegen EGF angefärbt. Ohne Markierung zeigten sich die glatten Muskelzellen der Muskularis Mukosae und Abschnitte der tiefer gelegenen Submukosa. Brunnersche Drüsen waren auf den mit EGF Antikörpern durchgefärbten Schnitten nicht zu identifizieren. Über die Untersuchungsergebnisse gibt die Tabelle 12 im einzelnen Aufschluß.

Tabelle 12: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit EGF an Biopsien des Duodenums, n = 6

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|-----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | 2 | 3 | 1 | | |
| Becherzellen | 2 | | | 2 | 2 |
| Krypten | 1 | 1 | | 3 | 1 |
| Basalmembran | 2 | 4 | | | |
| Lamina propria | | 6 | | | |
| Gefäße | | 1 | 4 | 1 | |
| Muskulatur | 2 | 4 | | | |
| Submukosa | 5 | 1 | | | |
| Brunner´ Drüsen | 6 | | | | |

3.1.1.4 Kolon

Im Kolon enthielten sowohl die absorbierenden Zellen der Kolonschleimhaut als auch die schleimhaltigen Becherzellen immunreaktives Material. Die Basalmembranen und die angrenzende Lamina propria zeigten, daß sie kein Antigen enthalten. Ebenfalls ohne Einfärbung stellten sich kleinere Gefäße der Lamina propria dar. Zellen der Muskularis Mukosae wurden hier nicht beobachtet (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit EGF an Biopsien des Kolons, n = 2

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | | 1 | 1 | |
| Becherzellen | 1 | | 1 | | |
| Basalmembran | | 2 | | | |
| Lamina propria | | 2 | | | |
| Gefäße | 1 | 1 | | | |
| Muskulatur | 2 | | | | |

3.1.2 Ulzerationen

3.1.2.1 Ulcus ventriculi

Am Magen wiesen die Ränder der floriden Ulzera ventriculi weitgehend kein EGF positives Material auf. Nur bei einer Biopsie zeigte sich eine deutliche Anfärbung. In den Grundbereichen ebenso wie bei dem aufgelagerten nekrotischem Material der Detrituszone konnte keine Immunreaktivität beobachtet werden. Die einschichtig formierten Epithelzellen der Foveolae und tiefen Drüsen zeigten deutliche Markierung mit immunreaktivem Material, wobei sich die Zellmembranen deutlicher darstellten. Das Färbemuster der Basalmembran und der Lamina propria unterschied sich in keiner Weise von dem an der Mukosa des übrigen Gastrointestinaltraktes beobachteten. Kapillaren waren deutlich mit EGF angefärbt, Zellen der Muskularis Mukosae färbten sich nicht und ein Kollagenfaserbündel enthielt etwas EGF Antigen. Für die Auflistung der Befunde siehe auch Tabelle 14.

Tabelle 14: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit EGF an Biopsien von Magenulzera, n = 7

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Ulkus Rand | 2 | 4 | | 1 | |
| Ulkus Grund | 3 | 4 | | | |
| Nekrosezone | 3 | 4 | | | |
| Epithel | 1 | | 4 | 2 | |
| Drüsen | 4 | | 1 | 2 | |
| Basalmembran | 3 | 4 | | | |
| Lamina propria | 3 | 4 | | | |
| Gefäße | 1 | | 4 | 2 | |
| Muskulatur | 6 | 1 | | | |
| Kollagen | 6 | | 1 | | |

3.1.2.2 Ulcus duodeni

Im Duodenum enthielt der Randbereich des Ulcus duodeni nicht regelmäßig das EGF Antigen. Das nekrotische Gewebe der Detrituszone war nicht mit Antikörpern angefärbt. Epithelzellen waren lumenwärts im Bereich der Zotten nicht, in der Tiefe der Krypten vereinzelt diffus positiv markiert (siehe Abbildung 1). Keine Anfärbung wurde an den Basalmembranen beobachtet. Das Färbemuster der Lamina propria, ihre Gefäße und das der Muskularis Mukosae war identisch mit den im übrigen Gastrointestinaltrakt für das EGF Antigen beobachteten. Die Biopsien der Ulzera duodeni reichten nicht für alle Schnitte bis in die Tiefe der Submucosa. Eine genaue Analyse der gefärbten Areale zeigt die Tabelle 15.

Tabelle 15: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit EGF an Biopsien von Duodenalulzera, n = 3

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Ulkus Rand | 1 | 1 | 1 | | |
| Nekrosezone | 1 | 2 | | | |
| Epithel | 1 | 2 | | | |
| Becherzellen | 2 | | 1 | | |
| Krypten | 1 | 1 | | 1 | |
| Basalmembran | 1 | 2 | | | |
| Lamina propria | 1 | 2 | | | |
| Gefäße | 1 | 1 | | 1 | |
| Muskulatur | 1 | 1 | | 1 | |
| Kollagen | 3 | | | | |
| Submukosa | 3 | | | | |
| Brunner´Drüsen | 3 | | | | |

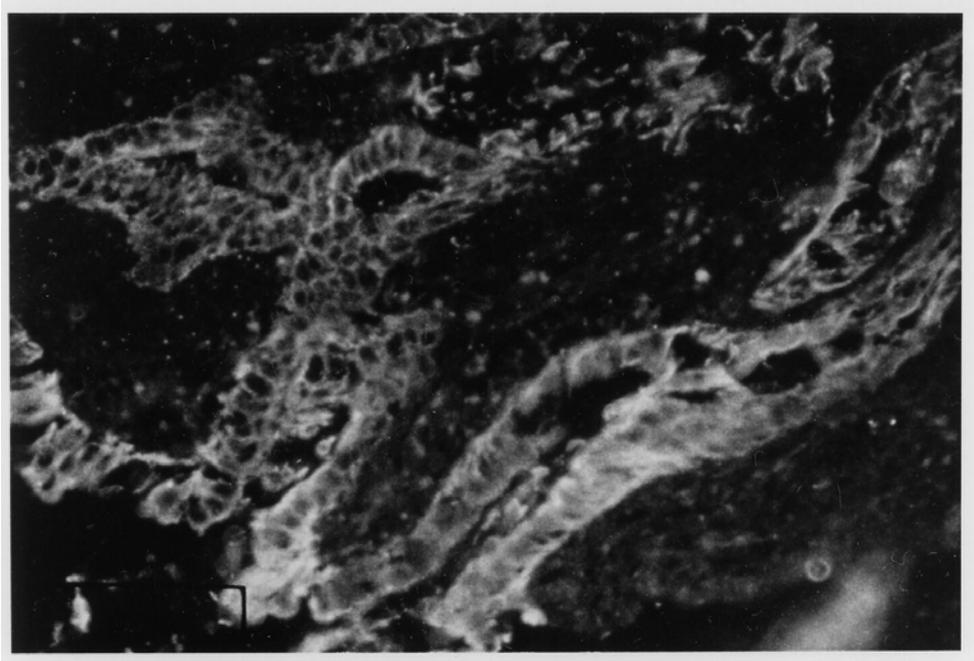


Abbildung 1: EGF Färbung eines Duodenalulkus. Es zeigt sich eine deutliche Färbung des Kryptenepithels, während die Lamina propria und nekrotische Zellen am Rand des Ulkus unmarkiert bleiben. Vergrößerung 25-fach.

3.1.2.3 Narbe

Am Magen präsentierte sich der vernarbte Ulkusrandbereich ohne Immunreaktivität für das EGF Antigen. Kollagenfasern waren nicht eingefärbt. Das Epithel der Foveolae zeigte keine einheitliche, das der Krypten eine deutlich positive Reaktion für EGF. Die Basalmembranen waren bei einer Biopsie schwach markiert und blieben sonst ungefärbt. Das lockere Bindegewebe der Lamina propria war weitgehend ohne Antikörper gegen EGF und zeigte nur einmal eine schwach positive Reaktion. Kleinere Kapillaren im Maschennetz des Bindegewebes enthielten deutlich immunoreaktives Material. Kein einheitliches Färbemuster vermittelten die Zellen der Muskularis Mukosae, welche bei zwei Biopsien ungefärbt blieben und lediglich bei einer Biopsie für EGF angefärbt war (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit EGF an Biopsien mit vernarbten Magengeschwüren, n = 2

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|-----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Cicatrix - Rand | 2 | 1 | | | |
| Kollagen | 2 | 1 | | | |
| Epithel | 1 | 1 | | 1 | |
| Drüsen | | | 2 | 1 | |
| Basalmembran | | 2 | 1 | | |
| Lamina propria | | 2 | 1 | | |
| Gefäße | 1 | | | 1 | 1 |
| Muskulatur | | 2 | 1 | | |

3.2 TGF α

3.2.1 Normaler Gastrointestinaltrakt

3.2.1.1 Ösophagus

Von den flachen oberflächlichen Zellen an zeigte das Epithel der Speiseröhre eine diffuse, aber in Richtung auf die Papillen hin zunehmende Einfärbung mit Antikörpern gegen TGF α . Eine Biopsie ging über das Mucosaepithel in die Tiefe. Hier enthielt die Basalmembran eine stark positive Reaktion auf das Antigen. Das lockere Bindegewebe der Lamina propria selbst zeigte keine Reaktion ebenso wie die in ihm vorhandenen kleine Kapillaren. Eine Anfärbung mit TGF α wurde an den Muskelfasern der Muskularis Mukosae festgestellt. Eine genaue Auflistung der erfassten und gefärbten Areale zeigt die Tabelle 17.

Tabelle 17: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit TGF α an Ösophagusbiopsien, n = 4

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | 2 | 1 | 1 | |
| Papillen | 1 | | 1 | 1 | 1 |
| Basalmembran | 3 | | | | 1 |
| Lamina propria | 3 | 1 | | | |
| Gefäße | 2 | 2 | | | |
| Muskulatur | 3 | | 1 | | |
| Kollagen | 4 | | | | |

3.2.1.2 Magen

Die säulenförmigen oberflächlichen Epithelzellen und die tieferen Drüsenzellen zeigten eine deutliche Immunfärbung des TGF α Antigens (siehe Tabelle 18). Die Basalmembranen brachten kein immunreaktives Material zum Vorschein. Ein schwaches bis fehlendes Färbeverhalten wurde beim Bindegewebe festgestellt. Kleine Gefäße waren nicht gekennzeichnet. Eine sowohl schwach positive wie negative Kennzeichnung mit dem TGF α Antigen zeigten die glatten Muskelzellen der Muskularis Mukosae.

Tabelle 18: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit TGF α an Magenbiopsien, n = 3

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | 2 | | | | 1 |
| Drüsen | 1 | | | | 2 |
| Basalmembran | 2 | 1 | | | |
| Lamina propria | | 2 | 1 | | |
| Gefäße | 1 | 2 | | | |
| Muskulatur | 1 | 1 | 1 | | |

3.2.1.3 Duodenum

An der intakten Dünndarmschleimhaut zeigte die Epithelreihe der Villi verschiedene Intensitäten im Färbeverhalten. Die Palette reichte von mangelnder Markierung bis hin zur starken Immunfärbung des TGF α Antigens. Das tiefe Kryptenepithel brachte kein immunreaktives Material zum Vorschein. An Becherzellen wurde keine Einfärbung festgestellt. TGF α positives Material enthielten die Basalmembranen. Das lockere Bindegewebe der Lamina propria war einmal gefärbt und einmal ungefärbt. Keine Reaktion für den Wachstumsfaktor konnte an kleinen Gefäßen festgestellt werden. Vereinzelt glatte Muskelzellen in der Lamina propria, sowie glatte Muskelzellen der Muskularis Mukosae enthielten kein Antigen. Die Submukosa war nicht gekennzeichnet. Einige in ihr enthaltene Brunner Drüsen zeigten zum Teil eine schwach positive Reaktion für das TGF α Antigen. Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse zeigt die Tabelle 19.

Tabelle 19: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit TGF α an Biopsien des Duodenums, n = 3

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|-----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | 1 | 1 | | 1 |
| Becherzellen | 2 | 1 | | | |
| Krypten | 1 | 2 | | | |
| Basalmembran | 2 | | 1 | | |
| Lamina propria | 1 | 1 | 1 | | |
| Gefäße | 2 | 1 | | | |
| Muskulatur | 2 | 1 | | | |
| Submukosa | 1 | 2 | | | |
| Brunner´ Drüsen | 1 | 1 | 1 | | |

3.2.1.4 Kolon

Am Kolon enthielt das Oberflächenepithel der Krypten überwiegend TGF α positives Material. Becherzellen stellten sich nicht dar. Die Basalmembranen waren nicht mit TGF α markiert.

Weitgehend ohne Kennzeichnung waren Zellen und Fasern der Lamina propria. Keine Reaktion konnte an Gefäßen und glatten Muskelzellen beobachtet werden. Siehe hierfür Tabelle 20.

Tabelle 20: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit TGF α an Biopsien des Kolons, n = 4

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | 1 | 1 | 2 | |
| Becherzellen | 1 | 2 | 1 | | |
| Basalmembran | 2 | 2 | | | |
| Lamina propria | 1 | 2 | 1 | | |
| Gefäße | 2 | 2 | | | |
| Muskulatur | 1 | 3 | | | |

3.2.2 Ulzerationen

3.2.2.1 Ulcus ventriculi

Beim Ulcus ventriculi zeigten sich bei fast allen Schnitten sowohl in den Randbereichen als auch am Ulkusgrund deutliche Immunreaktivität für das TGF α Antigens. Auch in der Detrituszone konnte dieses Färbeverhalten beobachtet werden, wie Abbildung 2 verdeutlicht. Das einschichtige Epithel der Foveolae enthielt bis auf eine Ausnahme immunreaktives Material, das tief gelegene Kryptenepithel war deutlich eingefärbt, wie in Abbildung 3 zu sehen. Die das Epithel mit dem Bindegewebe verbindenden Basalmembranen zeigten in einem Fall basalwärts eine positive Reaktion. An der Lamina propria konnte man kein einheitliches Färbeverhalten feststellen, teilweise war sie schwach markiert. In gleicher Weise präsentierten sich einzelne Kollagenfaserbündel. Kleine Kapillaren enthielten kein TGF α positives Material. Für die Analyse der Befunde siehe Tabelle 21.

Tabelle 21: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit TGF α an Biopsien von Magenulzera, n = 7

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Ulkus Rand | 3 | 1 | | 3 | |
| Ulkus Grund | 2 | 1 | 1 | 3 | |
| Nekrosezone | 4 | 1 | 1 | 1 | |
| Epithel | 2 | 1 | 3 | 1 | |
| Drüsen | 5 | | 1 | 1 | |
| Basalmembran | 4 | 2 | | 1 | |
| Lamina propria | 2 | 2 | 3 | | |
| Gefäße | 4 | 3 | | | |
| Muskulatur | 7 | | | | |
| Kollagen | 5 | 1 | 1 | | |

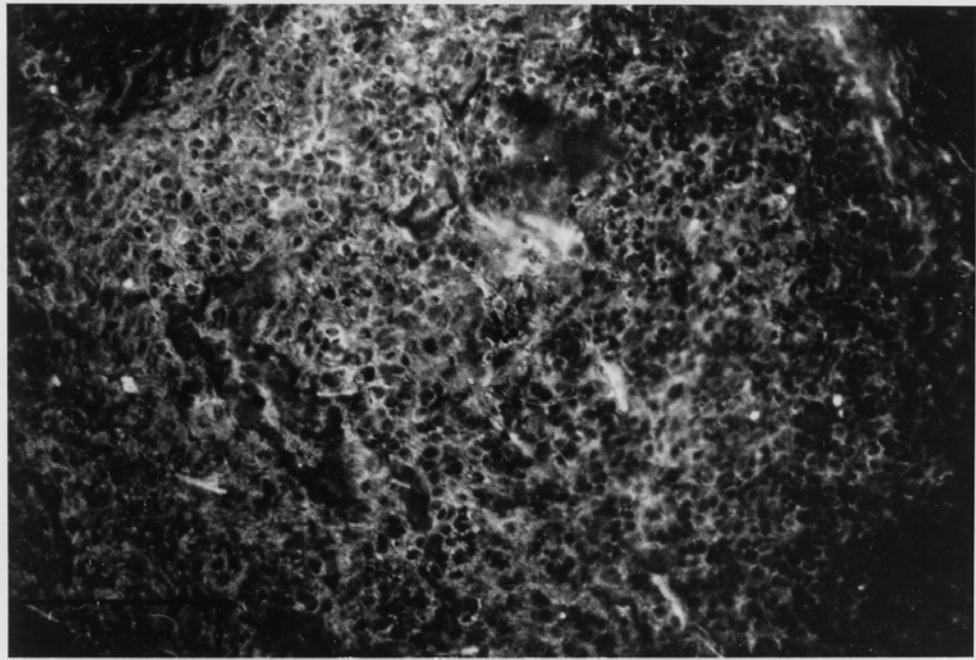


Abbildung 2: TGF α Färbung des Grundes eines Ulcus ventriculi. Nachweis von TGF α in der Nekrosezone. Vergrößerung 25-fach.

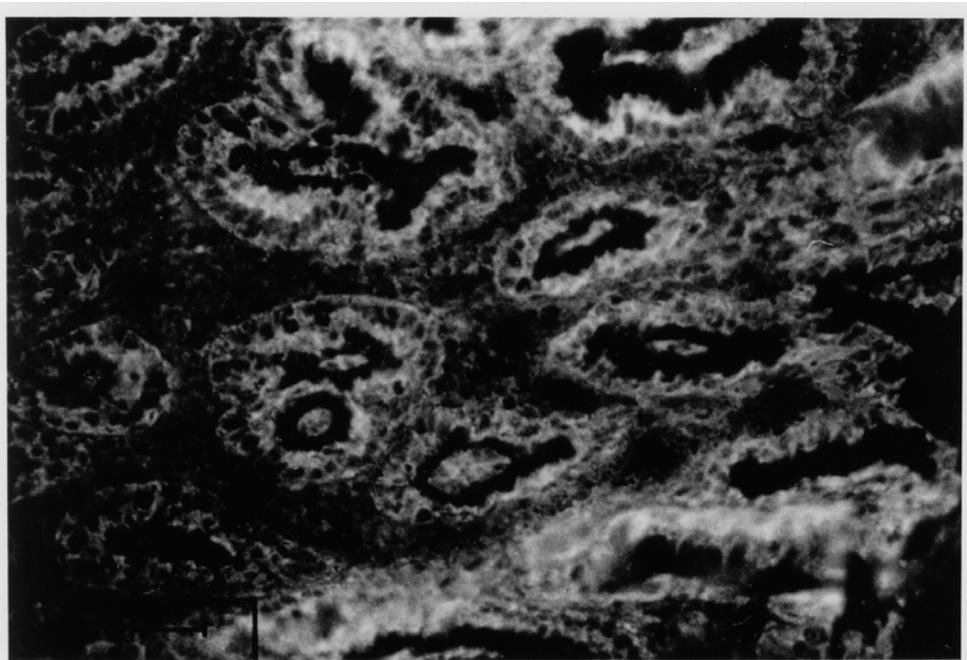


Abbildung 3: TGF α Färbung eines präpylorischen Ulcusrandes. Drüsen und Bindegewebe enthalten positives Material. Vergrößerung 25-fach.

3.2.2.2 Ulcus duodeni

Der Ulkusrand des Ulcus duodeni war einmal nicht und einmal deutlich mit TGF α angefärbt. Die nekrotischen Zellen, Fibrinausschwitzungen und Granulozyteninfiltrationen der Detrituszone zeigten eine diffuse Verteilung von immunoreaktivem Material. Am villösen Oberflächenepithel konnte zum Teil eine positive Markierung des Antigens festgestellt werden. Mit TGF α positivem Material waren Becherzellen und die tief gelegenen Zellen der Lieberkühnschen Drüsen markiert. Basalmembranen und weitere Strukturen der Bindegewebsschicht mit ihren Gefäßen, sowie die Muskularis Mukosae enthielten das Antigen nicht. Die tief gelegene Schicht der Submukosa und die dort gelegenen Brunnerschen Drüsen war auf diesen Gewebeschnitten bei der Anfärbung von TGF α nicht vorhanden. Eine genaue Analyse der Ergebnisse zeigt die Tabelle 22.

Tabelle 22: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit TGF α an Biopsien von Duodenalulzera, n = 3

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Ulkus Rand | 1 | 1 | 1 | | |
| Nekrosezone | 1 | | 2 | | |
| Epithel | 1 | 1 | 1 | | |
| Becherzellen | 2 | | 1 | | |
| Krypten | 2 | | 1 | | |
| Basalmembran | 2 | 1 | | | |
| Lamina propria | 2 | 1 | | | |
| Gefäße | 1 | 2 | | | |
| Muskulatur | 2 | 1 | | | |
| Kollagen | 3 | | | | |
| Submukosa | 3 | | | | |
| Brunner'Drüsen | 3 | | | | |

3.2.2.3 Narbe

Am Randbereich der Narbe der abgeheilten Ulzera ventriculi wurde keine Immunreaktivität für TGF α beobachtet. Einzelne Kollagenfaserbündel erschienen weitgehend nicht oder nur diffus und schwach markiert. Das Epithel der Foveolae und der Drüsen zeigte bei den Ulkusnarben ein zur normalen Magenschleimhaut und zur Mukosa der floriden Ulzera ventriculi völlig identisches Färbemuster. Eine Übereinstimmung im Färbeverhalten wurde ebenso bei der Lamina propria, Kapillaren und glatten Muskelzellen beobachtet, siehe auch Tabelle 23.

Tabelle 23: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit TGF α an Biopsien vernarbter Magenulzera, n = 3

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|-----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Cicatrix - Rand | 1 | 2 | | | |
| Kollagen | | 2 | 1 | | |
| Epithel | 1 | | 2 | | |
| Drüsen | | | 3 | | |
| Basalmembran | 1 | 2 | | | |
| Lamina propria | | 2 | 1 | | |
| Gefäße | 1 | 2 | | | |
| Muskulatur | | 3 | | | |

3.3. PDGF

3.3.1 Normaler Gastrointestinaltrakt

3.3.1.1 Ösophagus

Die Epithelzellen des mehrschichtigen Plattenepithels bringen deutlich immunreaktives Material zum Vorschein, wobei eine Betonung der suprabasalen Zellen und der Papillen beobachtet werden konnte, wie Abbildung 4 verdeutlicht. Die epitheliale Basalmembran zeigte kein einheitliches Färbeverhalten. Eine Ösophagusbiopsie enthielt tieferes Gewebe. Das ungefärbte lockere Bindegewebe der Lamina propria enthielt markierte Gefäße. Die Muscularis Mucosae war mit Antikörpern gegen PDGF angefärbt. Eine genaue Auflistung der erfassten und gefärbten Areale zeigt die Tabelle 24.

Tabelle 24: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit PDGF an Ösophagusbiopsien, n = 5

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | | 1 | 4 | |
| Papillen | 3 | | | | 2 |
| Basalmembran | 1 | 2 | 1 | | 1 |
| Lamina propria | 3 | 2 | | | |
| Gefäße | 3 | | | 1 | 1 |
| Muskulatur | 4 | | 1 | | |
| Kollagen | 5 | | | | |

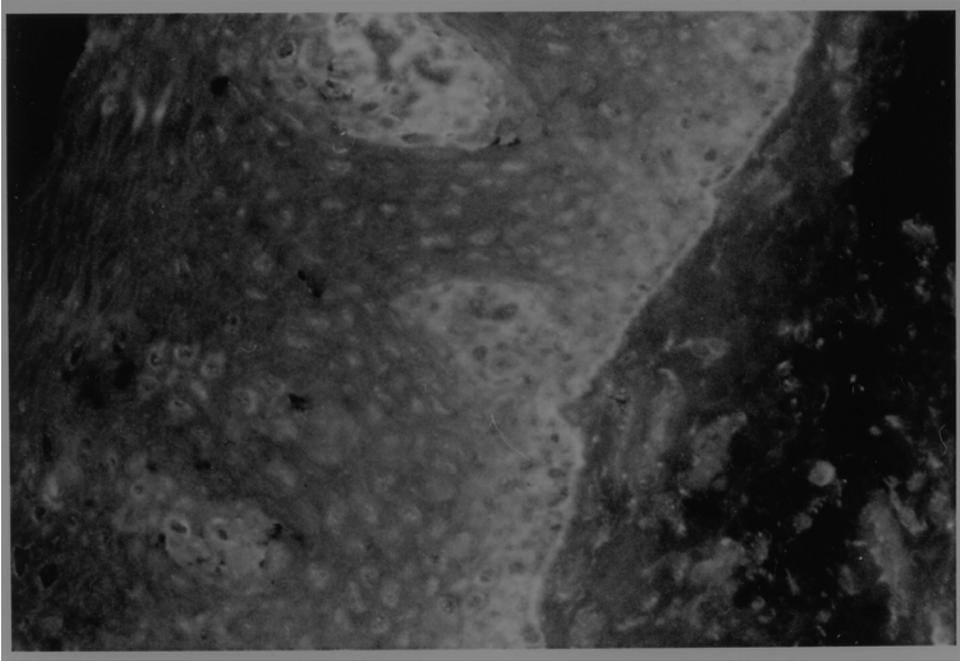


Abbildung 4: PDGF Färbung am gesunden Ösophagus. Deutliche Markierung des Epithels mit Betonung der Papillen, sowie Anfärbung der Basalmembran und der Gefäße der Lamina propria. Vergrößerung 25-fach.

3.3.1.2 Magen

Am Magen enthielten die Epithelzellen der in die Magendrüsen ziehenden Foveolae deutlich gekennzeichnetes PDGF positives Material bei apikaler Betonung, wie die Abbildung 5 zeigt. Die meist gefärbten Drüsenzellen wiesen sowohl basal als auch zum Lumen hin eine stärkere Kennzeichnung auf. Die zwischen den Epithel- und Drüsenzellen und dem Bindegewebe der Lamina propria gelegene Schicht der Basalmembran stellte sich überwiegend nicht oder nur, wie bei einem Patienten, diskontinuierlich dar. Kein immunreaktives Material brachte das Bindegewebe der Lamina propria zum Vorschein. Eine Einfärbung der kleinen Gefäße konnte festgestellt werden. Die Zellen der Muscularis Mucosae enthielten das PDGF Antigen. Über die Untersuchungsergebnisse im einzelnen gibt die Tabelle 25 Auskunft.

Tabelle 25 : Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit PDGF an Magenbiopsien, n = 4

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | | | 2 | 2 |
| Drüsen | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Basalmembran | | 3 | | 1 | |
| Lamina propria | | 4 | | | |
| Gefäße | | | 2 | 2 | |
| Muskulatur | 2 | | | 2 | |

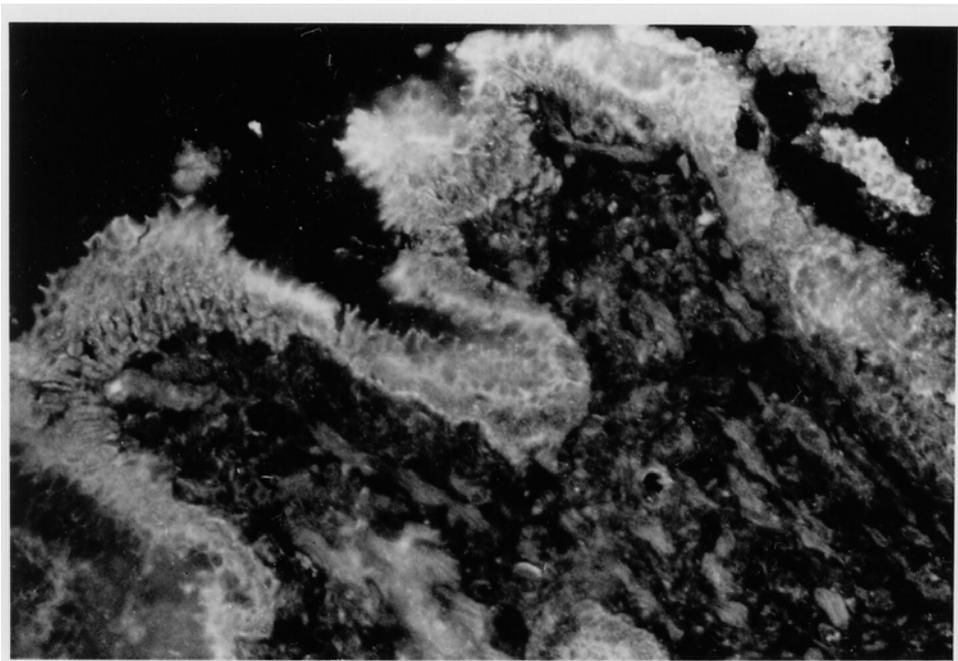


Abbildung 5: PDGF Färbung normaler Magenmukosa. Markierung mit diesem Wachstumsfaktor an Epithel, Basalmembran, Gefäßen und glatter Muskulatur. Vergrößerung 25-fach.

3.3.1.3 Duodenum

Am Duodenum war das hochprismatische Epithel entlang der Zotten stark mit Antikörpern gegen PDGF angefärbt, wie in Abbildung 6 verdeutlicht wird. Die apikalen Bereiche der Saumzellen schienen betont. Immunreaktives Material brachten die Becherzellen zum Vorschein. Das Epithel der tiefer gelegenen Krypten zeigte deutliche Immunfärbung mit PDGF. Die Basalmembranen blieben weitgehend ungefärbt. Zum überwiegenden Teil frei von PDGF oder nur diffus positiv schien das lockermaschige Bindegewebe der Lamina propria zu sein. Seine in ihm verlaufenden Gefäße und seine vereinzelt glatten Muskelzellen waren deutlich mit Antikörpern gegen diesen Wachstumsfaktor markiert. Eine Einfärbung der Muscularis Mucosae wurde festgestellt. An den tiefen Schichten der Submukosa und an den dortigen Brunnerschen Drüsen konnte eine diffuse Anfärbung mit PDGF- positivem Material beobachtet werden. Eine genaue Analyse der gefärbten Strukturen liefert die Tabelle 26.

Tabelle 26: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit PDGF an Biopsien des Duodenums, n = 2

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|-----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | | 1 | 2 | 3 |
| Becherzellen | | 1 | 2 | 2 | 1 |
| Krypten | 3 | | | 1 | 2 |
| Basalmembran | | 5 | 1 | | |
| Lamina propria | | 5 | 1 | | |
| Gefäße | 1 | | 3 | 2 | |
| Muskulatur | 2 | 1 | 2 | 1 | |
| Submukosa | 4 | 1 | 1 | | |
| Brunner' Drüsen | 3 | 1 | 2 | | |

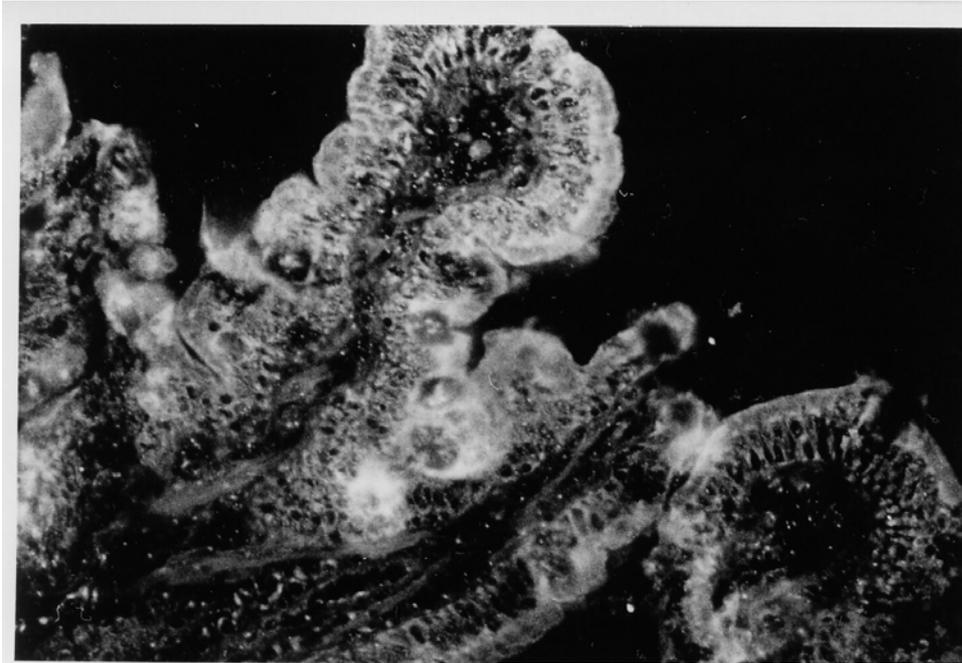


Abbildung 6: PDGF Färbung gesunder Duodenalschleimhaut. Epithel und Kapillaren enthalten positives Material. Vergrößerung 40-fach.

3.3.1.4 Kolon

Das Kolon präsentierte die Epithelzellen seiner dicht nebeneinanderstehenden geraden tubulären Drüsen deutlich mit PDGF reaktivem und vor allem basal markiertem Material. Die subepitheliale Basalmembran enthielt kein Antigen. Weitgehend ungefärbt oder nur diffus positiv war die Lamina propria. Keine Kennzeichnung wurde an den Kapillaren festgestellt. Die glatten Zellen der Muskularis Mukosae zeigten, daß sie deutlich PDGF positives Material enthalten. Siehe hierfür Tabelle 27.

Tabelle 27: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit PDGF an Biopsien des Kolons, n = 5

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | | | 3 | 2 |
| Becherzellen | 4 | | | 1 | |
| Basalmembran | 3 | 2 | | | |
| Lamina propria | | 4 | | 1 | |
| Gefäße | | 5 | | | |
| Muskulatur | 2 | | 2 | 1 | |

3.3.2 Ulzerationen

3.3.2.1 Ulcus ventriculi

Die floriden Geschwüre des Magens enthielten sowohl am Ulkusrand als auch am Ulkusgrund deutlich PDGF positives Material. Die Detrituszone mit ihrer Fibrinausschwitzung, ihrem Granulozyteninfiltrationen und nekrotischem Zellschrott ließ eine diffus positive Einfärbung zum Vorschein bringen, wie in Abbildung 7 zu sehen. Das Epithel der Foveolae war stark mit Antikörpern gegen den Wachstumsfaktor gekennzeichnet. Die Epithelzellen der tiefer gelegenen tubulären Magendrüsen dagegen etwas weniger deutlich angefärbt. Keine Reaktion wurde an den Basalmembranen beobachtet. Die Lamina propria und kleinere Gefäße zeigten ein der normalen Magenmukosa völlig identisches Färbemuster. Ein vereinzelt Kollagenfaserbündel zeigte eine positive Reaktion für PDGF. Die bei den Magengeschwüren entnommenen Gewebeproben erreichten die Tiefe der Muskularis Mukosae nicht. Eine genaue Auflistung der Ergebnisse zeigt die Tabelle 28.

Tabelle 28: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit PDGF an Biopsien von Magenulzera, n = 7

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Ulkus Rand | 3 | | 1 | 3 | |
| Ulkus Grund | 4 | | 1 | 1 | 1 |
| Nekrosezone | 4 | 1 | 1 | 1 | |
| Epithel | 1 | | 2 | 4 | |
| Drüsen | 3 | 1 | 1 | 2 | |
| Basalmembran | 1 | 6 | | | |
| Lamina propria | 2 | 4 | 1 | | |
| Gefäße | 4 | | 1 | 2 | |
| Muskulatur | 7 | | | | |
| Kollagen | 6 | | | 1 | |

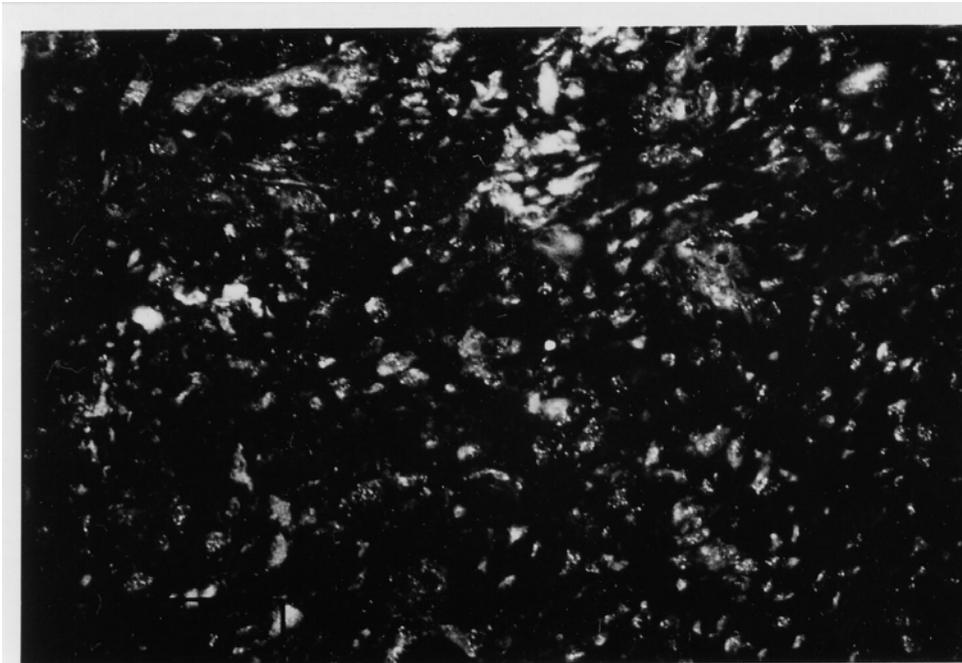


Abbildung 7: PDGF Färbung eines Ulcus ventriculi. PDGF Vorkommen im Ulkusgrund an Detritus und Entzündungszellen sowie in Fibrin und Kapillaren. Vergrößerung 25-fach.

3.3.2.2 Ulcus duodeni

Die Ulzera duodeni enthielten im Randbereich PDGF positives Material. In der Fibrin, Thrombozyten und Zelltrümmer enthaltenden Nekrosezone wurde eine zum Teil sehr starke Immunreaktivität für PDGF verzeichnet. Die epitheliale Zelllinie der duodenalen Villi zeigte eine deutliche Kennzeichnung mit dem Wachstumsfaktor, wobei sich die Zellkerne nicht darstellten. Die tiefer gelegenen Epithelzellen der duodenalen Krypten waren ebenso mit Antikörpern gegen PDGF angefärbt wie die das Epithel mit dem Bindegewebe verbindenden Basalmembranen, deren Färbemuster jedoch diskontinuierlich war und Unterbrechungen zeigte (siehe Abbildung 8). Gegenüber der Lamina propria, ihren Kapillaren und den glatten Muskelzellen der Muscularis Mucosae gab es keine Abweichungen zum schon beschriebenen Färbeverhalten im übrigen Gastrointestinaltrakt. Ein Kollagenfaserbündel brachte deutlich immunreaktives Material zum Vorschein. Die unter der Muscularis Mucosae gelegene tiefe Schicht der Submucosa mit ihren Brunnerschen Drüsen blieb PDGF gegenüber ungefärbt. Siehe Tabelle 29.

Tabelle 29: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit PDGF an Biopsien von Duodenalulzera, n = 3

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Ulkus Rand | 1 | | 2 | | |
| Nekrosezone | 1 | | 1 | | 1 |
| Epithel | 1 | | 1 | | 1 |
| Becherzellen | 2 | | 1 | | |
| Krypten | 2 | | | 1 | |
| Basalmembran | 1 | | 2 | | |
| Lamina propria | 1 | 1 | 1 | | |
| Gefäße | 1 | | 1 | 1 | |
| Muskulatur | 2 | 1 | | | |
| Kollagen | 2 | | 1 | | |
| Submukosa | 2 | 1 | | | |
| Brunner-Drüsen | 2 | 1 | | | |

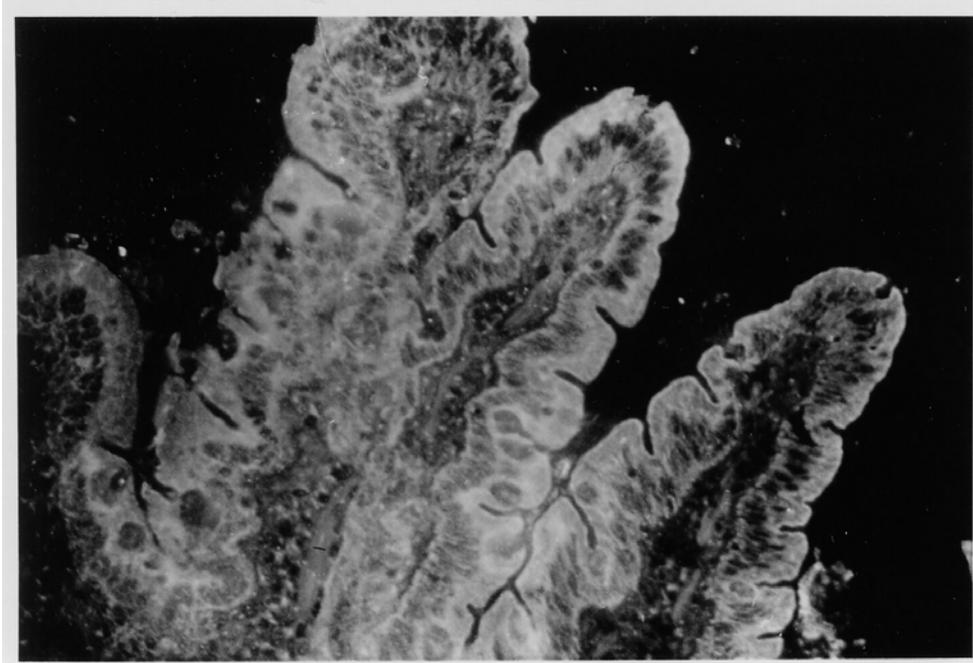


Abbildung 8: PDGF Färbung eines Ulcus duodeni. Anfärbung des Oberflächenepithels mit Basalmembran, sowie der Kapillaren. Vergrößerung 25-fach.

3.3.2.3 Narbe

Die vernarbten Ulzera des Magens enthielten in ihren zell- und kapillararmen Bindegewebe PDGF positives Material. Vereinzelt Kollagenfaserbündel waren mit Antikörpern gegen den Wachstumsfaktor gekennzeichnet. Das foveolare Epithel färbte sich stark, am tiefer liegenden Kryptenepithel konnte man weniger immunreaktives Material beobachten. Die Basalmembranen waren nicht mit Antikörpern gegen bFGF markiert. Die Bindegewebsstrukturen der Lamina propria, ihre kleinen Gefäße und die glatten Muskelzellen der Muscularis Mucosae wiesen ein der normalen Magenschleimhaut identisches Färbemuster auf. Siehe hierfür Tabelle 30.

Tabelle 30: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit PDGF an Biopsien vernarbter Magenzulzera, n = 3

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|-----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Cicatrix - Rand | 2 | | 1 | | |
| Kollagen | 2 | | 1 | | |
| Epithel | 1 | | | | 2 |
| Drüsen | | | 2 | 1 | |
| Basalmembran | 1 | 2 | | | |
| Lamina propria | | 1 | 2 | | |
| Gefäße | | | 1 | 1 | 1 |
| Muskulatur | 2 | | | 1 | |

3.4 bFGF

3.4.1 Normaler Gastrointestinaltrakt

3.4.1.1 Ösophagus

Die Zellen des mehrschichtigen Plattenepithels der Speiseröhre waren durchgehend mit Antikörpern gegen bFGF angefärbt. Die Intensität nahm von den flachen Zellen der oberflächlichen Lagen zum mittleren Drittel des Epithels hin zu und war bei den suprabasalen Epithelzellen am stärksten. Eine starke Markierung zeigte die epitheliale Basalmembran, wie in Abbildung 9 verdeutlicht wird. Das Gewebe der Lamina propria unter der Basalmembran zeigte eine diffuse und schwächer werdende Immunreaktivität. Eine deutliche Kennzeichnung wurde an den kleinen Blutgefäßen der Bindegewebsschicht beobachtet. Die Muscularis Mucosae, welche lange glatte Muskelfasern und dünnes elastisches Netzwerk umfaßt, war stark mit Antikörpern gegen bFGF angefärbt. Eine genaue Auflistung der erfassten und gefärbten Areale zeigt die Tabelle 31.

Tabelle 31: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit bFGF an Ösophagusbiopsien, n = 6

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | | 2 | 2 | 2 |
| Papillen | | | | 3 | 3 |
| Basalmembran | 3 | | | 2 | 1 |
| Lamina propria | 4 | 1 | 1 | | |
| Gefäße | 4 | | 2 | | |
| Muskulatur | 4 | | | | 2 |
| Kollagen | 6 | | | | |

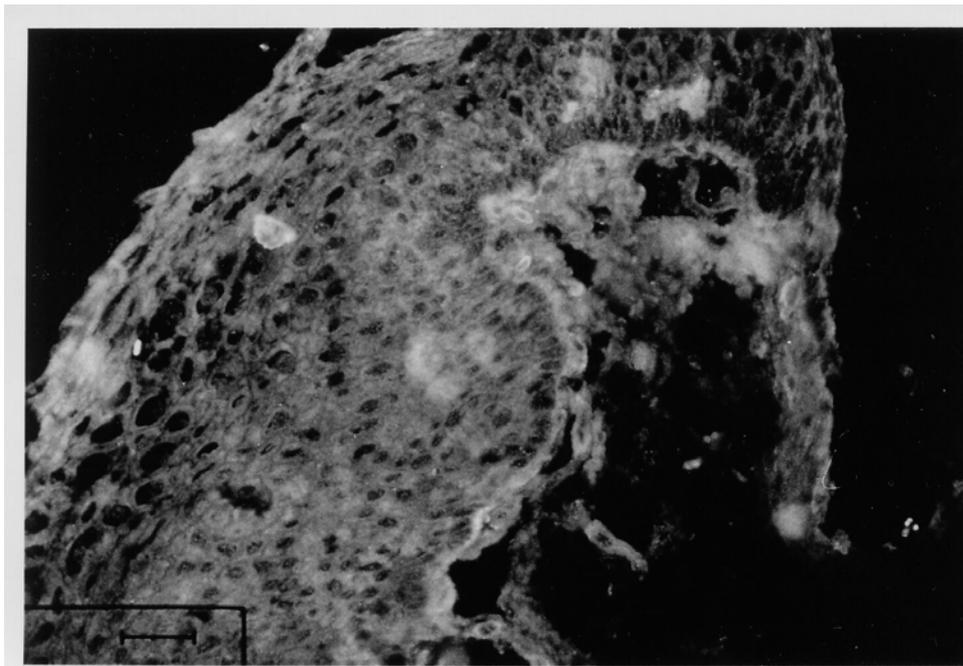


Abbildung 9: bFGF Färbung an gesunder Ösophagismukosa. Anfärbung des Plattenepithels und der Basalmembranen. Vergrößerung 25-fach.

3.4.1.2 Magen

Am Magen zeigten die Zellen des hochprismatischen Oberflächenepithels, welche die gastralen Gruben auskleiden, im apikalen Gebiet unter dem Schleim eine deutliche und im unteren Anteil eine schwächere Anfärbung. Dieses Färbemuster setzte sich an den tiefer gelegenen Drüsenzellen fort. Die epitheliale Basalmembran zeigte eine stark positive Reaktion für bFGF, während im Gegensatz dazu die der gastralen Drüsen eine unterbrochene und schwache Anfärbung aufwiesen. Die Lamina propria enthielt ein diffuses Maschenwerk positiv gekennzeichnete Mikrofibrillen quer durch das Stroma, wie in Abbildung 10 verdeutlicht wird. Gefäßstrukturen zeigten eine deutliche Immunreaktivität. Die Muscularis Mucosae wies eine stark positive Anfärbung für bFGF auf. Über die Untersuchungsergebnisse im einzelnen gibt die Tabelle 32 Auskunft.

Tabelle 32 : Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit bFGF an Magenbiopsien, n = 8

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | 4 | | 1 | 1 | 2 |
| Drüsen | | 3 | 1 | 1 | 3 |
| Basalmembran | 3 | 3 | 2 | | |
| Lamina propria | | 4 | 3 | 1 | |
| Gefäße | | | | 5 | 3 |
| Muskulatur | 3 | 1 | | 2 | 2 |

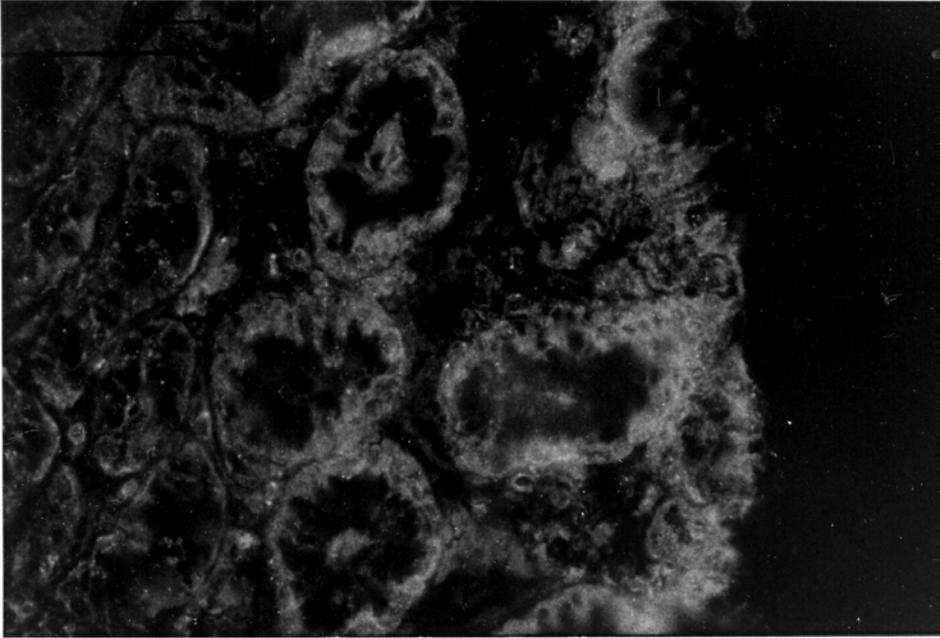


Abbildung 10: bFGF Färbung von gesunder Magenmukosa. Das Epithel ist positiv und das Bindegewebe ist diffus markiert. Vergrößerung 40-fach.

3.4.1.3 Duodenum

Die epitheliale Zelllinie der duodenalen Villi war deutlich mit bFGF- reaktivem Material gekennzeichnet, wobei eine apikale Betonung der Zellen festgestellt werden konnte. Die epithelialen Basalmembranen wiesen eine starke Immunreaktivität für das Antigen auf. Die Verteilung war zum Teil diskontinuierlich und die Anfärbung nahm ab oder verschwand in den Basalmembranen der Lieberkühnschen Krypten. Die Zellen der Glandulae intestinales zeigten, daß sie weniger Antigen enthalten. Die Lamina propria brachte diffuses immunoreaktives Material zum Vorschein. Die Kapillaren im Bindegewebe waren deutlich positiv gekennzeichnet. Wie in Abbildung 11 zu sehen zeigten die glatten Muskelzellen der Muskularis Mucosae ebenfalls eine starke positive Reaktion für bFGF. In den Brunnerschen Drüsen war eine schwache zytoplasmatische Reaktion zu beobachten. Die Submukosa enthielt keine bFGF- Antigene. Siehe Tabelle 33.

Tabelle 33: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit bFGF an Biopsien des Duodenums, n = 7

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|-----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | | | 2 | 4 | 1 |
| Becherzellen | 1 | 4 | | 1 | 1 |
| Krypten | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| Basalmembran | | 1 | 2 | 1 | 3 |
| Lamina propria | | 5 | 2 | | |
| Gefäße | | | 2 | 4 | 1 |
| Muskulatur | 2 | | 1 | 3 | 1 |
| Submukosa | 4 | 3 | | | |
| Brunner´ Drüsen | 4 | | 3 | | |



Abbildung 11: bFGF Färbung normaler Duodenalschleimhaut. Reaktives Material zeigt sich in Epithel, apikalen Krypten, Basalmembran und in der Muskularis Mukosae. Vergrößerung 25-fach.

3.4.1.4 Colon

Im Colon enthielten die Saumzellen des einschichtigen Oberflächenepithels bei apikaler Betonung deutlich immunreaktives Material. Zur Tiefe der langen unverzweigten Drüsen hin nahm die Färbintensität ab. Diesem Färbemuster folgte die Kennzeichnung der epithelialen Basalmembranen, an denen sich das Antigen diskontinuierlich und mit Unterbrechungen immunreaktiv darstellen ließ (siehe Abbildung 12). Die Becherzellen erschienen negativ für bFGF. Diffus und schwach positiv markiert waren die Zellen und Fasern des lockeren Bindegewebes der Lamina propria. Die kleinen Gefäße und die glatten Muskelzellen der Muskularis Mucosae brachten viel immunreaktives Material zum Vorschein. Siehe Tabelle 34.

Tabelle 34: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit bFGF an Biopsien des Kolons, n = 9

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Epithelzellen | 2 | | 1 | 4 | 2 |
| Becherzellen | 3 | 5 | | | 1 |
| Basalmembran | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 |
| Lamina propria | | 6 | 1 | 2 | |
| Gefäße | | | 6 | 2 | 1 |
| Muskulatur | 2 | | | 5 | 2 |

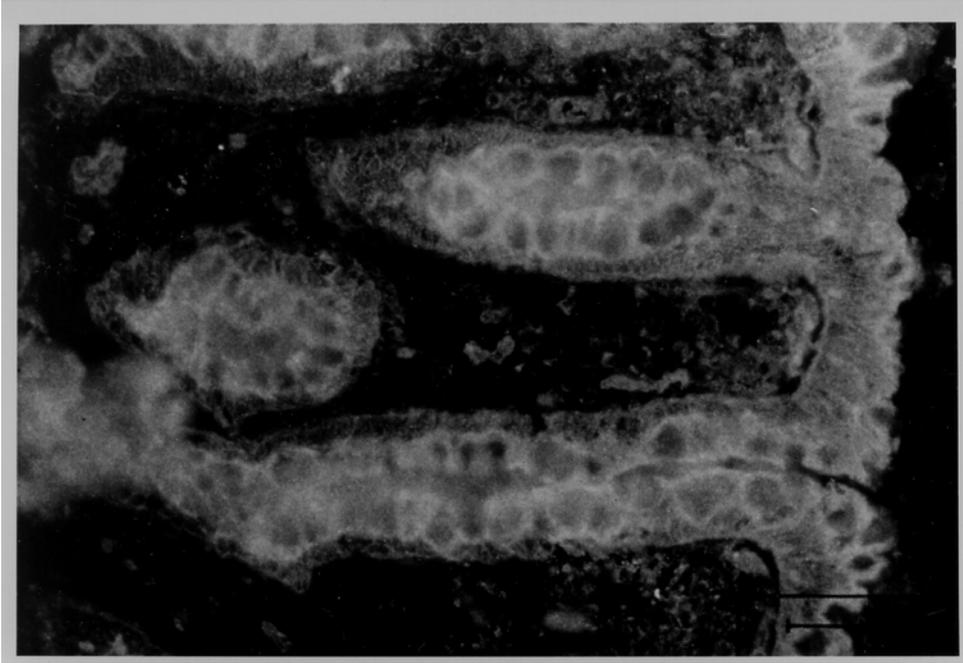


Abbildung 12: bFGF Färbung an gesunder Kolonschleimhaut. Deutlich angefärbt sind das Epithel, Abschnitte der Basalmembran und Gefäße. Vergrößerung 25-fach.

3.4.2 Ulzerationen

3.4.2.1 Ulcus ventriculi

Am Magen waren die Randgebiete der Ulzerationen bei vier Biopsien nicht und bei zwei Biopsien schwach mit bFGF- positivem Material gekennzeichnet. An der Granulationsgewebszone des Ulkusgrundes konnten wir eine Immunreaktivität nachweisen, in einem Fall war sie diffus. Der nekrotische Zellschutt im Bereich der Detrituszone zeigte zweimal keine und einmal eine schwache Anfärbung (siehe Abbildung 13). Das foveolare Epithel und die tiefen tubulären Einzeldrüsen wiesen überwiegend eine deutliche Anfärbung für bFGF auf. Die Basalmembranen waren in diesen Bereichen meist ungefärbt. Bei der Lamina propria, den Gefäßen und der Muskulatur ließen sich die von der normalen Magenschleimhaut bekannten Reaktionen beobachten. In einer Biopsie zeigte sich ein Kollagenfaserbündel, welches sich mit Antikörpern gegen bFGF anfärbte. Eine genaue Analyse der gefärbten Areale zeigt die Tabelle 35.

Tabelle 35: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit bFGF an Biopsien von Magenulzera, n = 7

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Ulkus Rand | 1 | 4 | 2 | | |
| Ulkus Grund | 4 | | 2 | 1 | |
| Nekrosezone | 4 | 2 | 1 | | |
| Epithel | 1 | 1 | 3 | 2 | |
| Drüsen | 4 | 1 | 1 | 1 | |
| Basalmembran | 2 | 4 | | 1 | |
| Lamina propria | 3 | 3 | 1 | | |
| Gefäße | 3 | | 2 | 2 | |
| Muskulatur | 6 | | | 1 | |
| Kollagen | 6 | | 1 | | |

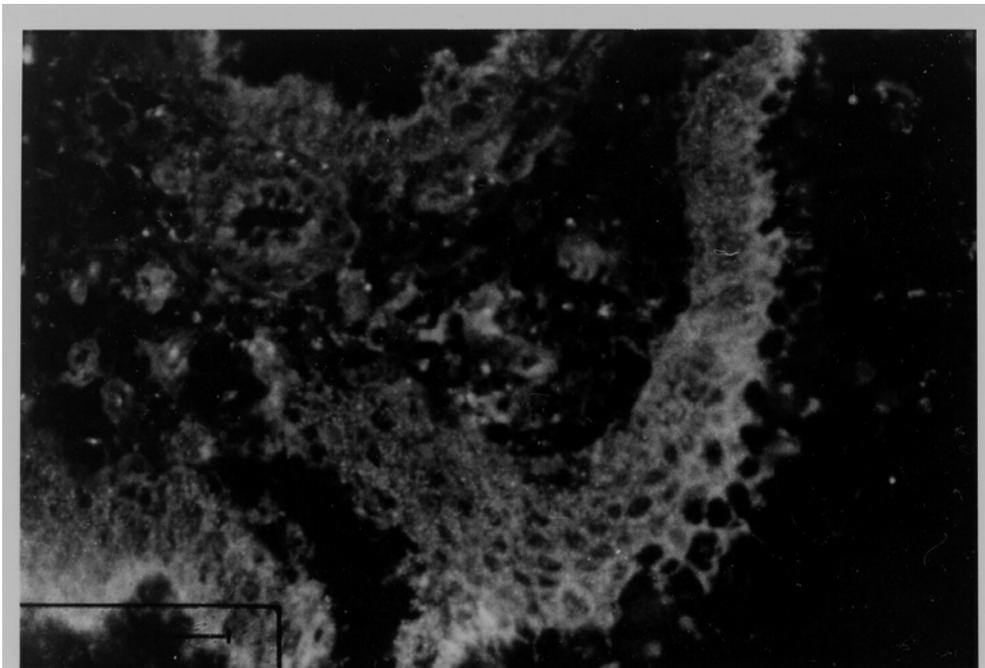


Abbildung 13: bFGF Färbung eines Ulcus ventriculi. Im Randbereich des Ulkus zeigen sich Anfärbungen von Epithel, Nekrose, Foveolae und Gefäßen des Bindegewebes. Vergrößerung 25-fach.

3.4.2.2 Ulcus duodeni

Die Randbereiche der Duodenalulzera zeigten einmal eine schwache und einmal keine Anfärbung für bFGF. Eine deutliche Immunreaktivität wies die fibrinoide Nekrosezone auf. Die Epithelzellen der Villi enthielten viel bFGF-reaktives Material. An den Zotten waren die Basalmembranen bei einer Biopsie partiell stark gekennzeichnet. Die subepithelialen Strukturen, welche neben der Lamina propria auch Gefäße, Muskelzellen der Muscularis Mucosae und einzelne Kollagenfasern enthalten, zeigten ein der normalen Duodenalmukosa identisches Färbemuster. Submukosa und Brunnersche Drüsen färbten sich nicht mit Antikörpern gegen bFGF an. Für die Auflistung der Befunde siehe auch Tabelle 36.

Tabelle 36: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit bFGF an Biopsien von Duodenalulzera, n = 3

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Ulkus Rand | 1 | 1 | 1 | | |
| Nekrosezone | 1 | | 1 | | 1 |
| Epithel | 1 | | | 2 | |
| Becherzellen | 2 | | | 1 | |
| Krypten | 2 | | 1 | | |
| Basalmembran | 2 | | | | 1 |
| Lamina propria | 1 | 1 | | 1 | |
| Gefäße | 2 | | | | 1 |
| Muskulatur | 2 | | | | 1 |
| Kollagen | 2 | | 1 | | |
| Submukosa | 2 | 1 | | | |
| Brunner-Drüsen | 2 | 1 | | | |

3.4.2.3 Narbe

Die vernarbten Ulzera ventriculi zeigten in ihren Randbereich am Übergang zum normalen Gewebe, daß ihr faserreiches Bindegewebe bFGF positives Material enthält. An Kollagenfasern war keine Einfärbung festzustellen. Das foveale Epithel und die tiefen Drüsenzellen zeigten mit ihren Basalmembranen eine lumenwärts verstärkte Markierung. Lamina propria, Kapillaren und glatte Muskelzellen hatten zu dem im übrigen Gastrointestinaltrakt beobachteten ein identisches Färbemuster. Siehe Tabelle 37.

Tabelle 37: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit bFGF an Biopsien vernarbter Magenulzera, n = 3

| Gewebestruktur | Struktur fehlend | ungefärbt | Färbeintensität | | |
|-----------------|------------------|-----------|-----------------|----|-----|
| | | | + | ++ | +++ |
| Cicatrix - Rand | | | 3 | | |
| Kollagen | 2 | 1 | | | |
| Epithel | | | 2 | 1 | |
| Drüsen | | 1 | 2 | | |
| Basalmembran | 1 | 1 | 1 | | |
| Lamina propria | | 1 | 2 | | |
| Gefäße | 1 | | 1 | | 1 |
| Muskulatur | 2 | | | 1 | |

4. Diskussion

4.1 EGF

1992 untersuchte Jankowski et al gesunde menschliche Schleimhaut der Speiseröhre immunhistochemisch nach Schockfrostung. Er fand Positivität für EGF als zytoplasmatisches Färbemuster fast im gesamten Papillenepithel. Gefärbt waren sowohl die Zellen der squamösen Ösophagasmukosa, als auch das Kapillarendothel in der Nähe der Basalzellen der Papillen³⁴. Wir können diese Ergebnisse bestätigen, jedoch zeigte sich bei unseren Untersuchungen das Ösophagusepithel nur im Bereich der Papillen positiv. Im Gegensatz zu TGF α , welches in sämtlichen Oberflächenepithelzellen des menschlichen Magen-Darm-Traktes immunhistochemisch nachweisbar ist, und auch dort gebildet wird²², findet sich EGF bei unseren Untersuchungen nur sehr diskret in den oberflächlichen Epithelschichten der Magenschleimhaut, aber deutlich in den Krypten des Duodenums. In der Kolonschleimhaut war EGF bei uns ebenfalls stark positiv in den oberflächlichen Epithelzellen nachweisbar. Unsere Ergebnisse bestätigen die von Thomas et al 1992³⁵ nachgewiesenen Verteilungsmuster für EGF. Dieser wies EGF an menschlicher Mukosa im Magen an der Lumenoberfläche und in den Foveolae, am Duodenum im villösen Epithel und im Kolon im oberen Drittel der Krypten nach. Seine Proben waren formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Die Brunnerschen Drüsen waren bei unseren EGF Färbungen in den Biopsien nicht vorhanden. Interessanterweise wird EGF in den Speicheldrüsen und in den Brunnerschen Drüsen gebildet²² und findet sich im Magensaft angereichert. Das heißt, man muß davon ausgehen, daß die oberflächlichen Epithelzellen EGF vom Lumen her aufnehmen und nicht selbst EGF in größeren Mengen bilden. Im Verdauungstrakt wird EGF in größeren Mengen in den Brunnerschen Drüsen und in den Speicheldrüsen und im Pankreas nachgewiesen^{36,17,18,37,38}, es wird dort in den Tubuluszellen gespeichert und im Rahmen der Sekretion von Speichel und Pankreassaft in das Verdauungssystem abgegeben. Derzeit besteht Übereinstimmung, dass die im Magen gefundenen Mengen an EGF hauptsächlich aus der Speichelsekretion stammen^{37,38,39}. EGF wird immunhistochemisch in oberflächlichen Epithelzellen des Ösophagus und Magen nachgewiesen, aber es ist derzeit noch nicht klar, ob es lokal in der Mukosa produziert wird oder aus dem Lumen absorbiert wird^{18,19,37}. 1989 gelang Beauchamp et al der Nachweis von EGF mRNA bei menschlicher Magenschleimhaut nicht. Da er jedoch Patienten mit benignen Ulzera und Magentumore untersuchte, erachtete er dieses Ergebnis als nicht repräsentativ für normale menschliche Magenmukosa. Der Nachweis gelang bei gesunder Magenschleimhaut vom Hund²³. Nur mit Hilfe der PCR- Methode lässt sich in Magenbiopsien mRNA nachweisen. Nachdem

keine nennenswerte mRNA von EGF in Schleimhautproben des Magens nachgewiesen werden konnte²¹ stammt das immunhistochemisch nachweisbare EGF vorwiegend aus dem Speichel⁴⁰. 1994 erarbeitete Nishihara et al quantitative Daten der Bindungslevel bei Mäusen in vivo mittels der Ganzkörperradiographie. Der Bindungsnachweis von EGF an EGF-R gelang in geringen Mengen in Magendrüsen, Magensaft, Dünndarm, Pankreasgewebe, Pankreassaft und im Dickdarm, jedoch nicht in den Anteilen des Magens, welche keine Drüsenstrukturen aufweisen⁴¹.

Whrigt et al⁴² wiesen nach, dass die Ulzerationen des Epithels im gesamten Verdauungstrakt die Entwicklung einer neuen Zelllinie aus den Stammzellen induziert und dass diese Zelllinie vermehrt EGF enthält und sezerniert. Man nimmt an, dass eine der Funktionen von EGF darin besteht die lokale Regeneration von Schleimhautzellen am Ulkusrand sowie die Ulkusheilung zu fördern. Der Nachweis spezifischer EGF Rezeptoren in basolateralen und apikalen Membranen Zellen der Proliferationszonen des Gastrointestinaltraktes zeigt, dass diese Zellen möglicherweise Zielzellen der restitutions- und proliferationsstimulierenden Wirkung von EGF darstellen⁴⁰. 1996 untersuchte Konturek et al immunhistologisch die Expression von EGF an Ratten nach Induktion eines Magenulkuses durch Essigsäure. Diese war in normaler Magenmukosa schwach, fiel nach Ulkusinduktion kurzfristig ab, anschließend kam es zu einem vorübergehenden, wenige Tage anhaltenden Anstieg am Ulkusrand, wo die Entdifferenzierung der Zellen entlang der Magendrüsen stattfindet⁴³. Wir konnten das Vorkommen von EGF im Ulkusrandbereich bestätigen.

4.2 TGF α

In der vorliegenden Arbeit wurde an Gefrierschnitten TGF α in den Epithelzellen des Ösophagus, Magens, Duodenums und Kolons nachgewiesen. Das Maximum der Färbeintensität fand sich in den apikalen Abschnitten der Epithelzellen. Dies deckt sich mit der Arbeit von Thomas et al von 1992, der damals am Paraffinschnitt TGF α ubiquitär in Epithelzellen nachwies³⁵. Im Gegensatz zur Arbeit von Thomas arbeiteten wir an Gefrierschnitten, das heißt, wir haben versucht mit diesem Nachweisverfahren noch gezielter TGF α Reaktivität im Gastrointestinaltrakt nachzuweisen. Ebenso wie Thomas konnten wir zeigen, dass die TGF α Reaktivität besonders Oberflächenepithel, nicht jedoch in den Krypten des Duodenums und Kolons nachweisbar war. Im Gegensatz zu Thomas konnten wir eine zusätzliche Immunreaktivität im Bereich der Basalmembranen von Ösophagus und Duodenum nachweisen. Außerdem fand sich eine diffuse Immunreaktivität für TGF α in der Lamina propria und in den Brunnerschen Drüsen. In der Submukosa fand sich kein

TGF α - positives Material. Die Befunde decken sich mit den von Konturek und Ernst 1996 im Rattenmagen nachgewiesenen Verteilungsmuster für TGF α , welches einen abnehmenden Gradienten für TGF α von der Lumenoberfläche zur Basis der Magendrüsen aufwies²². Die Bildung des TGF α findet nach einer Untersuchung von Beauchamp im oberflächlichen Epithel der Schleimhaut statt. Diese Arbeitsgruppe konnte 1989 an tierischer und menschlicher Magenschleimhaut mittels der Northern Blot- Methode TGF α mRNA nachweisen. In der Submukosa fand sich keine mRNA Aktivität. Im Bereich des Magens gibt es unterschiedliche Expressionsmuster von TGF α , welche allein vom Zelltyp abhängen. So konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel Parietalzellen eine im Vergleich zu Hauptzellen vermehrte Expression von TGF α aufweisen²³. Auch die ultrastrukturelle Analyse für TGF α Verteilung mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie konnte zeigen, dass dieser Wachstumsfaktor vor allem in den oberflächlichen Epithelzellen vorhanden ist⁴⁴.

TGF α war sowohl am Ulkusrand als auch im Ulkusgrund des Magens und in der gastralen Nekrosezone deutlich vorhanden.

Dies deckt sich mit den Untersuchungen von Shingo Tsuji von 1995, der in fortgeschrittenen Ulkustadien einen deutlichen Anstieg von TGF α gegenüber geringeren TGF α Level bei aktiven Ulkustadien beschrieb. Er fand heraus, dass die Intensität der Färbung für TGF α am Ulkusrand niedriger ist als in der normalen Magenmukosa und dass die TGF α Immunreaktivität im Verlauf der Ulkusheilung nach dem Epithelschluß und einer Abnahme der S-Phase Zellen konstant bleibt⁴⁵. Bei unseren Ergebnissen fanden wir eine schwächere Färbung im Bereich des Ulkusrandes des Duodenalulkus. Das Duodenalulkus wies auch in der Nekrosezone eine etwas schwächere Anfärbarkeit für TGF α auf. Der Randbereich der Magenulkusnarbe zeigte keine Anfärbarkeit, während Kollagenfasern hier schwache Anfärbarkeit zeigten.

Konturek und Ernst fanden 1996 mittels immunhistochemischer Untersuchungen an formalinfixierten Biopsien von Ratten an normaler Magenschleimhaut und an Magenschleimhaut nach Stressexposition, dass es zu einem Expressionsanstieg von TGF α zwölf Stunden nach Stressexposition in der gesamten Magenmukosa kommt, speziell aber im Oberflächenepithel²².

In einer anderen Untersuchung selbigen Jahrganges untersuchte Konturek et al immunhistologisch normale und ulzerierte Magenmukosa von Ratten auf TGF α Expression. Hierbei fand man in normaler Schleimhaut eine deutliche TGF α Expression, welche nach Ulkusinduktion nach kurzfristigem Abfall vorübergehend einige Tage lang unter vielfachem Expressionsanstieg anhielt⁴³.

Als wesentliche Unterschiede gegenüber ulzerierter Schleimhaut im Magen gegenüber der normalen Magenmukosa zeigte sich bei unserer Untersuchung eine schwächere Färbung oberflächlicher Epithelialzellen sowie eine Anfärbarkeit der Basalmembran beim Magenulkus.

Das Duodenalulcus wies an den oberflächlichen Epithelzellen kein verändertes Färbeverhalten auf, jedoch zeigten sich die Becherzellen und die Krypten am Ulkus im Gegensatz zur normalen Duodenalmukosa schwach angefärbt, während sich die Basalmembranen ebenso wie der Magenulkusnarbenbereich nicht angefärbt zeigte. Der Magenulkusnarbenbereich zeigte eine schwache Färbbarkeit bei den benachbarten Epithelzellen und im Drüsenbereich.

Wesentliche Unterschiede der ulzerierten zur normalen Mukosa zeigten sich sowohl für den Magen als auch den Duodenalbereich oder der Narbe bezüglich der Lamina propria nicht.

Die Submukosa war bei den ulzerierten Biopsien nicht vorhanden, so dass hierzu keine Aussagen möglich sind.

4.3 PDGF

PDGF ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für die Stimulation der Wundheilung des Bindegewebes^{46,47}. Unser Wissen über PDGF kommt von in vitro Studien an verschiedenen Zelltypen, welche wichtig für die Wundheilung sind, von Untersuchungen zur Expression von PDGF und PDGF- Rezeptoren während des Heilungsprozesses von Wunden und von Studien nach exogener Zugabe von PDGF auf heilende Wunden. In vitro Studien haben gezeigt, dass PDGF ein potentes Mitogen für Bindegewebszellen darstellt und chemotaktisch auf Fibroblasten⁴⁸ und glatte Muskelzellen⁴⁹, Neutrophile und Makrophagen wirkt^{50,51,52}. Auf die Bedeutung von PDGF bei der Wundheilung im Gastrointestinaltrakt weisen auch unsere immunhistochemischen Lokalisationen von PDGF im Ulkusgrund hin. Hier werden Bindegewebszellen und Entzündungszellen durch das Vorhandensein des PDGFs chemotaktisch angelockt. Außerdem stimuliert PDGF Makrophagen zu aktivierten Makrophagen, welche dann wieder Wachstumsfaktoren produzieren, welche für verschiedene Effekte der Wundheilung von Bedeutung sind. Zusätzlich zur Chemotaxis und Proliferation von Zellen wirkt PDGF (neben TGF β) stimulierend auf die Produktion von Fibronectin⁵³ und Hyaluronsäure⁵⁴. Fibronectin wurde von unserer Arbeitsgruppe ebenfalls im Ulkusgrund nachgewiesen⁵⁵. Weiterhin wird PDGF im Abheilungsprozeß wichtig bei der Kontraktion von Kollagenfibrillen^{56,57}. Im Bereich der Ulkusnarbe haben wir an geheilten Magenulzerationen ebenfalls PDGF im Bereich der Narbe nachweisen können. PDGF wird zu Beginn der Wundheilung in großen Mengen aus Thrombozyten und aktivierten Makrophagen

freigesetzt und verteilt sich diffus im Bereich der Wunde⁵⁸. Bei uns konnte PDGF im Bereich vom Ulkusgrund und Ulkusrand in der Nekrosezone nachgewiesen werden. Außerdem wird PDGF von Endothelzellen⁵⁹, von glatten Muskelzellen geschädigter Arterien⁶⁰ und aktivierten Fibroblasten⁶¹ sowie von Epithelzellen⁶² gebildet. Ein weiterer wichtiger Punkt für die Wundheilung ist die Bildung von Blutgefäßen. Es konnte gezeigt werden, dass PDGF eine schwache angiogene Aktivität besitzt⁶³. Die Bedeutung von PDGF für die Abheilung von Indometazin induzierten Läsionen im Magen konnte von Guglietta 1992 gezeigt werden. Er konnte nachweisen, dass PDGF mRNA in der Magenschleimhaut nachweisbar war³. In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass PDGF immunhistochemisch in den oberflächlichen Epithelzellen des gesamten Gastrointestinaltraktes fein homogen nachweisbar ist. Diese Tatsache weist darauf hin, dass PDGF, der über seine PDGF-A und PDGF-B Rezeptoren die Tyrosinkinase aktiviert^{64,65}, durchaus in der Lage ist Zellwachstum zu stimulieren⁶⁶. Daraus kann spekuliert werden, dass endogen vorhandenes PDGF im Epithel des Gastrointestinaltraktes für die Aufrechterhaltung der Schleimhautdifferenzierung mitverantwortlich ist.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Immunreaktivität im Bereich der Nekrosezone des Ulkus zeigt auch hier die von anderen Arbeitsgruppen bereits beschriebene^{3,27} Rolle des PDGF in der Initialphase der Wundheilung. Hier nimmt man an, dass PDGF initial aus Thrombozyten freigesetzt wird und sich diffus in einer Wundregion verteilen kann. Dies bestätigt auch die intensive Reaktivität nicht nur im Grund, sondern auch im Ulkusrandbereich. PDGF ist wichtig für eine effiziente Wundheilung und die Produktion einer provisorischen Wundmatrix. Die immunhistochemische Verteilung von PDGF in normaler Schleimhaut und im Ulkus des Duodenums und Magens weist darauf hin, dass die allgemeinen Prinzipien der Wundheilung und die postulierten Mechanismen für PDGF auch für die Ulkusheilung im Magen anzunehmen sind⁶⁷.

4.4 bFGF

Es hat sich gezeigt, dass der bFGF als einer der am stärksten angiogenen Faktoren agiert⁶⁸. Die biologische Aktivität von bFGF umfasst die Stimulation der Zellmigration und die Proliferation von verschiedensten Zellen des Bindegewebes einschließlich der Fibroblasten und glatten Muskelzellen und der Endothelzellen⁶⁸.

In unserer Arbeit wurde erstmalig die immunhistochemische Lokalisation von bFGF im gesamten Gastrointestinaltrakt analysiert und es konnte gezeigt werden, dass bFGF im gesamten Gastrointestinaltrakt vorhanden ist. Eine besonders starke Expression fand sich in den oberfläch-

lichen Epithelzellen, in den Basalmembranen, dem Bindegewebe, der Lamina propria und den Blutgefäßen der Muskularis Mukosae. Im Bereich der Proliferationszone der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes wurde hingegen eine nur geringe Immunreaktivität nachgewiesen.

Das Vorhandensein der Immunreaktivität in oberflächlichen Epithelzellen lässt eine Rolle für bFGF in der Aufrechterhaltung der feingeweblichen Architektur vermuten. bFGF konnte in der Arbeitsgruppe von Cordon-Cardo 1990 in Epithelzellen des Kolons nachgewiesen werden. Diese Studie wurde mit Mono- und Polyklonalen Antikörpern durchgeführt ⁶⁹.

In unserer Studie wurde am Gefrierschnitt gearbeitet, was in der Detektion von immunreaktivem Material von der weniger ausgeprägten Denaturierung durch die Einbettungsmethoden zu einer geringeren Veränderung der Antikörperepitope führt. Blutgefäße waren immer deutlich angefärbt. Ebenso fanden wir bFGF positives Material unter den oberflächlichen Epithelzellen in der Region der Basalmembranen. Diese Membranen zeigten keine durchgehende Anfärbung. In der Region der Magendrüsen und in den Krypten der duodenalen und der Kolonschleimhaut war die Anfärbung der Basalmembranen entweder nicht vorhanden oder sehr schwach. Bis heute wurde bFGF in Basalmembranen außerhalb der Blutgefäße in der Rinderkornea ⁷⁰, in quergestreiften Muskelzellen von Hühnerembryonen ⁷¹, und in der Herzmuskulatur von Rindern nachgewiesen ⁷².

Über die Rolle, welche bFGF in vivo bei der Angiogenese und der Neovaskularisation spielen könnte, wurden Vermutungen angestellt^{31,70}. Verletzungen der Gefäßendothelzellen und der Gefäßbasalmembranen könnten, ähnlich dem Mechanismus hydrolytischer Enzyme, eine Freisetzung von bFGF aus seinen Speichern bewirken und anschließend zu einer autokrinen Stimulation der Angiogenese führen. Somit erscheint eine Rolle von bFGF bei der Wundheilung und der Angiogenese als naheliegend.

Die starke angiogenetische und mitogene Wirksamkeit von bFGF lässt außerdem eine therapeutische Verabreichung dieses Peptides bei Läsionen des Gastrointestinaltraktes als möglich erscheinen. Die biologische Aktivität von bFGF wird bei einem pH-Wert von 7 oder weniger zerstört ⁷³. Folkman ⁷⁴ zeigte an einem Tiermodell, dass die orale Verabreichung von bFGF-CS 23, ein säureresistentes bFGF Derivat, über 21 Tage die Angiogenese in der Ulkusregion mit einem Faktor von 9 verbesserte. Diese Ergebnisse, die man mit Experimenten an Ratten gewann, zeigten auch, dass die Ulkusheilung signifikant schneller stattfindet als nach Behandlung mit H2-Rezeptor Antagonisten, oder nach Spontanheilung. Ob diese Substanz zu einem therapeutischen Zweck genutzt werden kann, bleibt abzuwarten.

Ein ungewöhnlicher Aspekt der bFGF Struktur ist das Fehlen einer Signalsequenz, welche gewöhnlich für die Sekretion gemäß einem der bekannten Mechanismen nötig ist. Im ganzen bleibt

der Mechanismus der Freisetzung von bFGF unklar. Die Entdeckung von bFGF in den epithelialen Basalmembranen deutet auf eine basalwärts gerichtete Sekretion durch die oberflächlichen Epithelzellen hin.

In den epithelialen Basalmembranen der gastralen Gruben und in den Krypten von Duodenum und Kolon, wurde bFGF positives Material entweder überhaupt nicht entdeckt, oder nur in extrem kleinen Mengen. Immuno- elektronenmikroskopische Untersuchungen in der Region der Basalmembranen könnten weitere Informationen liefern. Die Ursache für den Mangel an Aktivität in der Region der gastralen Drüsen und Krypten im Duodenum und Kolon könnte daran liegen, dass, an diesen Stellen, bFGF Konzentrationen unter den Nachweisgrenzen der immunhistochemischen Reaktionen liegt. Dementsprechend wird die Beobachtungsmöglichkeit für das Entdecken der Intensität einer Aktivität von bFGF in den Zellen der gastralen Gruben und von duodenalen und kolonalen Krypten klar eingeschränkt.

In den Basalmembranen der oberflächlichen Epithelzellen entdecktes bFGF positives Material könnte bei Verletzungen freigesetzt werden, die sich am oberflächlichen Epithel ereignen, und auf diese Art die Wundheilung starten. bFGF stimuliert nicht nur die Angiogenese, sondern wirkt sich ebenso auf die Proliferation, die Migration und die Differenzierung von Zellen des mesenchymalen und neuroektodermalen Ursprungs aus.

Zusätzlich zum bFGF wurden inzwischen sechs weitere Mitglieder der bFGF Familie identifiziert (aFGF, INT 2, und HST 1, FGF 5, FGF 6 und FGF 7) ⁷⁵. Zwei Rezeptorsysteme von bFGF sind bekannt¹⁴. Ein hoch affines System der transmembranösen Rezeptoren und ein weniger verwandtes Rezeptoren System, nämlich das der heparin sulfat Proteoglykane. Proteoglykane sind Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM), und sind Proteine, die eine Carbohydratkette enthalten.

Zahlreiche Proteoglykane agieren als Modulatoren von Wachstumsfaktoren ⁷⁶. Die Bindung von bFGF an Heparin oder an die Heparin Sulfat Ketten von Proteoglykanen schützt den Wachstumsfaktor vor Abbau. Freigesetzt von Heparinasen aus aktivierten Thrombozyten oder neutrophilen Granulozyten, kann bFGF durch Proteolyse von Proteoglykan Kern Proteinen oder durch den teilweisen Abbau der Heparin Sulfat Ketten erzeugt werden. Im menschlichen Gastrointestinaltrakt enthält die Lamina propria des Ösophagus, des Magens, des Duodenums und des Kolons bFGF positives Material, welches sich als feines Netzwerk darstellt. Dieses immunreaktive Material in der ECM ist möglicherweise an Proteoglykane gebunden, und stellt ein Speicherdepot dar. Entzündungsprozesse, das Auftreten von Läsionen und die damit verbundene Anwesenheit von proteolytischen Enzymen kann bFGF in seine aktive Form umwandeln. Ebenso möglich ist es, dass, durch Freisetzung proteolytischer Enzyme, gastrointestinale Tumoren in

der Lage sein könnten, die Speicher, die von bFGF in der Lamina propria vorhanden sind, auf demselben Weg zu nutzen um dadurch Einfluß auf die Angiogenese des Tumors zu nehmen. Auf diese Art freigesetztes bFGF braucht entweder Heparin Seitenketten oder freies Heparinsulfat um sich an hochaffine Zellrezeptoren zu binden. Es wird vermutet, dass auf diese Art eine Änderung in der Konformation stattfinden könnte, und dass allein dann eine Bindung zum Zellrezeptor möglich sein könnte¹⁴. Eine andere Erklärung ist, dass die Bindung an Glykosaminoglykane Einfluß auf die Oligomerisation von bFGF nehmen könnte, welche notwendig ist für die Signaltransmission, wie es der Fall mit anderen Tyrosinkinase ist⁷⁶. Obwohl auf der Basis immunhistochemischer Studien eine Produktion von bFGF im Epithel, Endothel und in den glatten Muskelzellen angenommen werden kann, kann dieser Punkt nur unter Verwendung von der In Situ Hybridisierung endgültig geklärt werden. Die stark positive Immunreaktivität von bFGF, die sich an Epithelzellen, der ECM der Lamina propria und an den glatten Muskelzellen zeigt, legt nahe, dass bFGF eine Rolle bei der Wachstumsregulation und der Differenzierung im Gastrointestinaltrakt haben könnte. Es ist möglich, dass bFGF auf seine Zielzellen über kurze Distanz wirkt, und dass seine Immobilisation auf Zelloberflächen und in der ECM durch Bindung an Proteoglykane diesem Zweck dient.

Bei unserer Untersuchung zeigte sich, dass bFGF am Ulkusgrund und in der gastralen Narbe deutlich vorhanden ist, aber an den Ulkusrändern nur spärlich vorkommt. In der Studie von Ernst et al 2001⁶⁸ fand man heraus, dass bFGF im Ulkusgebiet durch spezifische neutralisierende Antikörper die Heilung gastraler Ulzerationen verzögert, die Angiogenese am Ulkusgrund reduziert, und die mikrozirkulatorischen Effekte von diesem Wachstumsfaktor am Ulkusrand beeinträchtigt, was anzeigt, dass die Verfügbarkeit von bFGF im Ulkusgebiet eine entscheidende Rolle bei der Ulkusheilung durch die Induktion der Angiogenese spielt. Des weiteren fand man heraus, dass dieser bedeutende Anti- Ulkus Effekt von lokal appliziertem bFGF schließlich zum Teil von der Hemmung der Säuresekretion durch dieses Peptid abhängt. Man führte hierbei die Versuche mit Ratten mit chronischen gastralen Ulzerationen, die durch subserosale Applikation von Essigsäure hervorgerufen wurden und man maß die Magensäuresekretion bei der Ulkusheilung an Tieren mit chronischen Magen fisteln.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Verteilungsmuster der Wachstumsfaktoren EGF, TGF α , PDGF und bFGF konnte das spezifische Färbeverhalten und Ablagerungen an charakteristischen Gewebestrukturen der einzelnen Wachstumsfaktoren an vorbestehenden Arbeiten bestätigt werden.

Für einige Strukturen des gesamten menschlichen Gastrointestinaltraktes und bei pathologisch veränderter Schleimhaut florider Ulzerationen des Magens und des Zwölffingerdarmes sowie bei vernarbten Magengeschwüren liefert diese Studie neue Daten.

Im Gegensatz zu anderen Nachweismethoden bei der Detektion der Wachstumsfaktoren zeichnet sich die Immunhistochemie einerseits durch eine höhere Empfindlichkeit beispielsweise gegenüber der Northern-Blot Methode, die Schockfrostung und Verarbeitung der Gewebe am Gefrierschnitt andererseits durch eine geringere Veränderung der Antikörperepitope gegenüber beispielsweise der Paraffineinbettung aus.

Der Nachteil der Methode liegt wohl in der begrenzten Anzahl und Größe der Gewebeproben, so dass bei der Anzahl der Färbungen aller untersuchten Wachstumsfaktoren, der Vielzahl der zu untersuchenden Mukosaschichten und neben einem methodisch bedingten Materialverbrauch bei der Herstellung der 0,4 µm dünnen Schnitte, es nicht möglich war, jede zu erforschende Struktur bei jeder Biopsie auf jeden Faktor anzufärben.

Dennoch dürften die gefundenen Daten weitere Erkenntnisse zur Produktion und Sekretion, der Signalübertragung und Wirkungsmechanismen sowie zur Rolle von Gewebehormonen bei der Aufrechterhaltung der Mukosaintegrität und bei Wundheilungsvorgängen liefern.

6. Literatur

-
- ¹ Harty RF, Ren J. Gastrointestinal hormones, growth factors, and neurotransmitters. *Current Opinion in Gastroenterology* 1992;8:927-33.
- ² Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Dembinski A, Slomiany A, Slomiany BL. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in protection and healing of gastric mucosal injury. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:649-55.
- ³ Guglietta A, Hervada T, Nardi C, Lesch A. Effect of platelet-derived growth factor-BB on indomethacin-induced gastric lesions in rats. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:673-6.
- ⁴ Folkman J, Szabo S, Stoffroff M, Mc Neil P, Li W, Shing Y. Duodenal ulcer-discovery of a new mechanism and development of angiogenic therapy that accelerates healing. *Ann Surg* 1991;214:414-27.
- ⁵ Ernst H, Konturek P, Hahn EG, Brzozowski T, Konturek SJ. Acceleration of wound healing in gastric ulcers by lokal injection of neutralising antibody to transforming growth factor b 1. *Gut* 1996;39:172-5.
- ⁶ Tarnawski A, Lu SY, Stachura J, Sarfek IJ. Adaptation of Gastric Mucosa to Chronic Alcohol Administration Is Associated with Increased Mucosal Expression of Growth Factors and Their Receptor. *Scand J Gastroenterol* 1992;27 (suppl):59-63.
- ⁷ Szabo S, Sandor Z. Basic fibroblast growth factor and PDGF in GI diseases. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996; 10:97-112.
- ⁸ Carpenter G, Wahl MJ. The Epidermal Growth Factor Family. In: Sporn MB, Roberto AB, eds. *Peptide Growth Factors and Their Receptors*. New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer Verlag, 1991:69-113.
- ⁹ Raines EW, Bowen-Pope DF, Ross R. Platelet- Derived Growth Factor. In: Sporn MB, Roberts AB, eds. *Peptide Growth Factors and Their Receptors*. New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer Verlag, 1991:173-242.
- ¹⁰ Baird A, Böhlen P. Fibroblast Growth Factors. In: Sporn MB, Roberts AB., eds. *Peptide Growth Factors and Their Receptors*. New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer Verlag, 1991:369-403.
- ¹¹ Roberts AB, Sporn MB. The Transforming Growth Factor-bs. In: Sporn MB, Roberts AB, eds. *Peptide Growth Factors and Their Receptors*. New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer Verlag, 1991:419-58.
- ¹² Chen WS, Lazar CS, Poenie M, Tsien RY, Gill GN, Rosenfeld MG. Requirement for intrinsic protein tyrosin kinase in the immediate and late actions of the EGF-receptor. *Nature* 1987; 328:820-3.
- ¹³ Karnes WE. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. In: Walsh JH, Dockray GJ, eds. *Biochemistry and Physiology. Gut peptides*, 1995:137-42.

- ¹⁴ Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991; 64:841-8.
- ¹⁵ Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein acceleration eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 1962;237:1555-62.
- ¹⁶ Cohen S, Carpenter G: Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological activities, *Proc Natl Acad Sci* 1975;72:1317-21.
- ¹⁷ Kasselber AG, Orth DN, Gray MN, Stuhlman MT. Immunocytochemical localization of human epidermal growth factor / urogastrone in several human tissues. *J Histochem Cytochem* 1985;35:315-22. In: Domschke W, Konturek SJ, eds. *Der Magen: Physiologie-Pathophysiologie-Klinik*. Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer, 1993.
- ¹⁸ Poulsen SS, Nexø E, Olsen PS, Hess J, Kirkegaard J. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in rat and man. *Histochemistry* 1986;85:389-94. In: Domschke W, Konturek SJ, eds. *Der Magen: Physiologie-Pathophysiologie-Klinik*. Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer 1993.
- ¹⁹ Cartledge SA, Elder JB. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor levels in normal human gastrointestinal mucosa. *Br J Cancer* 1989;60:657-60.
- ²⁰ Konturek PC, Ernst H, Konturek SJ, et al. Mucosal expression and luminal release of epidermal and transforming growth factors in patients with duodenal ulcer before and after eradication of *Helicobacter pylori*. *Gut* 1997;40:463-9.
- ²¹ Polk WH, Jr., Dempsey PJ, Russell EW, et al. Increased production of transforming growth factor alpha following acute gastric injury. *Gastroenterology* 1992;102:1467-74.
- ²² Konturek PC, Ernst H, Brzozowski T, Ihlm A, Hahn EG, Konturek SJ. Expression of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- α after Exposure of Rat Gastric Mucosa to Stress. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:209-16.
- ²³ Beauchamp RP, Barnard JA, McCutchen CM, Cherner JA, Coffey RJ. Localization of transforming growth factor α and its receptor in gastric mucosa cells. *J Clin Invest* 1989;84: 1017-23.
- ²⁴ Derynck R, Roberts AB, Eaton DH, Winkler ME, Goeddel DV. Human transforming growth factor- α : precursor sequence, gene structure, and heterologous expression. *Cancer Cells* 1985;3:79-86.
- ²⁵ Malden LT, Novack U, Burges AW. Expression of transforming growth factor alpha mRNA in the normal and neoplastic gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 1989;43:593-5.
- ²⁶ Beauchamp RD, Barnard JA, McCutchen CM, Cherner JA, Coffey RJ. Localization of TGF- α and its receptor in gastric mucosal cells: implications for the regulatory in acid secretion and mucosal renewal. *J Clin Invest* 1990;84:1017-23.

-
- ²⁷ Heldin CH, Westermark B. Role of Platelet- Derived Growth Factor in Vivo. In: Clark RAF, ed. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. New York London: Plenum Press, 1996:249-56.
- ²⁸ Bennett C, Paterson JM, Corbishley CM, Luqmani YA. Expression of growth factor and epidermal growth factor encoded transcripts in human gastric tissues. *Cancer Res* 1989;49:2104-11.
- ²⁹ Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, et al. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO* 1986;5:2523-8.
- ³⁰ Abraham JA, Mergia A, Whang JL, et al. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 1986;233:545-8.
- ³¹ Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
- ³² Szabo S, Folkman J, Vattay P, Morales RE, Pinkus GS, Kato K. Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutein of basic fibroblast growth factor in rats. *Gastroenterology* 1994;106:1106-11.
- ³³ Van Noorden S. Tissue Preparation and Immunostaining Techniques for Light Microscopy. In: *Immunocytochemistry-Modern Methods and Applications*. Polak IM and Van Noorden S, eds. 2th ed. Bristol: Wright, 1986:26-53.
- ³⁴ Jankowski J, Coghill G, Tregaskis B, Hopwood D, Wormsley KG. Epidermal growth factor in the oesophagus. *Gut* 1992;33:1448-53.
- ³⁵ Thomas DM, Nasim MM, Gullik WJ, Alison MR. Immunoreactivity of transforming growth factor alpha in the normal adult gastrointestinal tract. *Gut* 1992;33:628-31
- ³⁶ Heitz PV, Kasper M, Noorden SV, Polak JM, Gregory H, Pearse AGE. Immunohistochemical localization of urogastrone to human submandibular glands. *Gut* 1978;19:408-43. In: Domschke W, Konturek SJ, eds. *Der Magen: Physiologie-Pathophysiologie-Klinik*. Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer-Verlag, 1993:173-92.
- ³⁷ Olsen PS, Kirkegaard P, Poulsen SS. Adrenergic effects on exocrine secretion of rat submandibular epidermal factor. *Gut* 1984;25:1234-40. In: Domschke W, Konturek SJ, eds. *Der Magen: Physiologie-Pathophysiologie-Klinik*. Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer, 1993.
- ³⁸ Konturek JW, Bielanski W, Konturek SJ, Bogdal J, Oleksy J, Rovati L. Distribution and release of epidermal growth factor in humans. *Gut* 1989;30:1189-1200. In: Domschke W, Konturek SJ, eds. *Der Magen: Physiologie-Pathophysiologie-Klinik*. Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer-Verlag 1993:173-92.
- ³⁹ Konturek SJ, Bielanski W, Konturek JW, Oleksy J, Yamazaki J. Release and action of epidermal growth factor on gastric secretion in humans. *Scand J Gastroenterol* 1989;24:485-92. In: Domschke W, Konturek SJ, eds. *Der Magen: Physiologie-Pathophysiologie-Klinik*. Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer-Verlag, 1993:173-92.

- ⁴⁰ Domschke W, Konturek SJ, eds. *Der Magen: Physiologie-Pathophysiologie-Klinik*. Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer-Verlag, 1993:176.
- ⁴¹ Nishihara T, Watanabe M, Shimada M, Ooshiba S. Use of in Vivo Whole-Body Autoradiography to Identify the Distribution of Epidermal Growth Factor Binding Sites Under Normal Conditions in the Mouse Digestive System. *Acta Histochem Cytochem* 1994;27:33-44.
- ⁴² Wright NA, Pike C, Elia G. Induction of a novel epidermal growth factor: secretin cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. *Nature (Lond)* 1990;343:82-5. In: Domschke W, Konturek SJ, eds. *Der Magen: Physiologie-Pathophysiologie-Klinik*. Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer-Verlag, 1993:173-92.
- ⁴³ Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Stachura J. Growth Factors and Gastric Ulcer Healing. In: Domschke W, ed. *Bindegewebe und Innere Erkrankungen*. Urban und Schwarzenberg, 1996:57-65.
- ⁴⁴ Pérez-Tomás R, Culleré X, Asbert M, Diaz-Ruiz C. Immunoelectronmicroscopic localisation of transforming growth factor alpha in rat colon. *Gut* 1994;35:1086-89.
- ⁴⁵ Tsuji S, Kawano S, Sasayama Y. Gastric Mucosal Cell Proliferation and TGF α in the Healing of Peptic Ulcers in Human Subjects. *J Clin Gastroenterol* 1995;21(Suppl.1):30-5.
- ⁴⁶ Deuel TF, Kawahara RS, Mustoe TA and Pierce GF. Growth factors and wound healing: Platelet-derived growth factor as a model cytokine. *Annu Rev Med* 1991;42:567-84. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.
- ⁴⁷ Pierce GF, Berg JV, Rudolph R, Tarpley J, Mustoe TA: Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta 1 selectively modulate glykosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. *Am J Pathol* 1991;138:629-46. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.
- ⁴⁸ Seppä HEJ, Grotendorst GR, Seppä SI, Schiffman E, Martin GR. Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 1982;92:584-8. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.
- ⁴⁹ Grotendorst GR, Seppä HEJ, Kleinman HK, Martin GR. Attachment of smooth muscle cells to collagene and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3669-72.
- ⁵⁰ Deuel TF, Senior RM, Huang JS, Griffin GL. Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 1982;69:1046-9. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.

-
- ⁵¹ Senior RM, Griffin GL, Huang JS, Walz DA, Deuel TF. Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts. *J Cell Biol* 1983;96:382-5. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.
- ⁵² Siegbahn A, Hammacher A, Westermark B, and Heldin CH: Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes and granulocytes. *J Clin Invest* 1990;85:916-20. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.
- ⁵³ Blatti SP, Foster DN, Ranganathan G, Moses HL, Getz MJ. Induction of fibronectin gene transcription and m RNA is a primary response to growth-factor stimulation of AKR-2B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1119-23. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York and London: Plenum Press, 1996.
- ⁵⁴ Heldin P, Laurent TC, Heldin CH. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J* 1989;258:919-22. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York and London: Plenum Press, 1996.
- ⁵⁵ Dohmen B, Hahn EG. Die immunhistochemische Lokalisation von Kollagen III, IV, VI, Laminin und Fibronectin in Ulzerationen des Magens und Dünndarms. Inaugural-Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg, 1997.
- ⁵⁶ Clark RAF, Folkvord JM, Hart CE, Murray MJ, Pherson JM. Platelet isoforms of platelet-derived growth factors stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. *J Clin Invest* 1989;84:1036-40. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.
- ⁵⁷ Gullberg D, Tingström A, Thuresson AC et al. $\beta 1$ Integrin-mediated collagen gel contraction is stimulated by PDGF. *Exp Cell Res* 1990;186:264-72. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.
- ⁵⁸ Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP, Ross R. A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 1985;43:277-86. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.
- ⁵⁹ Harlan JM, Thompson PJ, Ross R, Bowen-Pope DF. α -Thrombin induces release of PDGF-like molecule(s) by cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* 1986;103:1129-33. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.
- ⁶⁰ Walker LN, Bowen-Pope DF, Ross R, Reidy MA. Production of PDGF-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7311-15. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.
- ⁶¹ Paulsson Y, Hammacher A, Heldin C-H, Westermark B. Possible positiv autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature* 1987;328:715-17. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.

⁶² Ansel JC, Tiesman JP, Olerud JE. Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 1993;92:671-8. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.

⁶³ Risau W, Drexler H, Mironov V. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors* 1992;7:261-6. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.

⁶⁴ Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul* 1990;1:555-660. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.

⁶⁵ Raines EW, Bowen-Pope DF, Ross R. Platelet-derived growth factor. In: Sporn MB, Roberts AB, eds. *Handbook of experimental pharmacology: Peptide growth factors and their receptors*. Heidelberg: Springer, 1990:173-262. In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of wound repair*. 2nd ed. New York London: Plenum Press, 1996.

⁶⁶ Nicos A Nicola, ed. *Guidebook to Cytokines and Their Receptors*. Oxford New York Tokyo: Oxford University Press, 1994:199-222.

⁶⁷ Sporn MB, Roberts AB, eds. *Peptid Growth Factors and Their Receptors I*. New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest: Springer Verlag, 1991:2-400.

⁶⁸ Ernst H, Konturek PC, Hahn EG, Stosiek HP, Brzozowski T, Konturek SJ. Effect Of Local Injection With Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) And Neutralizing Antibody To bFGF On Gastric Ulcer Healing, Gastric Secretion, Angiogenesis And Gastric Blood Flow. *Journal Of Physiology And Pharmacology* 2001;52,3:377-90.

⁶⁹ Cordon-Cardo C, Vlodaysky I, Haimovitz-Friedman A, Hicklin D, Fuks Z. Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab Invest* 1990;63:832-40.

⁷⁰ Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodaysky I. A heparin-binding angiogenic protein, basic fibroblast growth factor, is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 1988;130:393-400.

⁷¹ Silverstein J, Consigli SA, Lyser KM, Ver Pault C. Basic fibroblast growth factor in the chick embryo: immunolocalization to striated muscle cells and their precursors. *J Cell Biol* 1989;108:2459-62.

⁷² Kardami E, Fandrich RR. Basic fibroblast growth factor in atria and ventricles of the vertebrate heart. *J Cell Biol* 1989;109:1865-70.

⁷³ Seno K, Sasada R, Iwane K. Stabilizing basic fibroblast growth factor using protein engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151:701-8.

⁷⁴ Folkman J, Szabo S, Vattay P, Morales RE, Pinkus G, Kato K. Effect of oral administration of bFGF on healing of chronic duodenal ulcers, gastric secretion and acute mucosal lesions in rats. *Gastroenterology* 1990;98:45.

⁷⁵ Lemoine NR, Leung HY, Gullick WJ. Growth factors in the gastrointestinal tract. *Gut* 1992;33:1297-1300.

⁷⁶ Ruoslakti E, Yamaguchi YU. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991;64:867-9.