

4 Ergebnisse

Zunächst wird die Morphologie des epithelialen Restitutionsmechanismus anhand von konfokalen Immunfluoreszenzbildern beschrieben (Abschnitt 4.1). Mit Hilfe der Laserscanning-Technik und eines angeschlossenen Bildverarbeitungsprogramms war es möglich, die Anordnung der Tight junction-Proteine ZO-1 und Occludin dreidimensional darzustellen. Hieraus konnten nachfolgend sowohl Aufsichts- als auch Seitenansichtsbilder berechnet und abgebildet werden.

Danach werden die Ergebnisse aus Versuchen mit EGF und TGF- β 1 gezeigt (Abschnitt 4.2). EGF und TGF- β 1 wurden als Positivkontrolle benutzt, da aus der Literatur bekannt ist, dass sie einen beschleunigenden Effekt auf die Restitution in vergleichbaren Modellen haben (Ciacci et al., 1993; Dignass et al., 1996; Kato et al., 1999).

Nachfolgend wird der Einfluss von TNF- α auf die Restitution von HT-29/B6-Zellen dargestellt (Abschnitt 4.3). TNF- α wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen in Restitutionsmodellen untersucht (Dignass und Podolsky, 1993; Kato et al., 1999; Florian et al., 2001). Da die Ergebnisse konzentrations- und zelllinienabhängig waren, wird TNF- α im neu entwickelten HT-29/B6-Restitutionsmodell getestet.

Außerdem wird der Effekt von IL-13, einem Zytokin, das bei der Pathogenese von Colitis ulcerosa eine entscheidende Rolle spielt (Heller et al., 2002), gezeigt (Abschnitt 4.3).

Danach werden die Restitutionsversuche unter Verwendung von HIV-typischen Zytokinen (TNF- α + IFN- γ , IFN- γ , IFN- α , IL-1 β) (Schmitz et al., 2002) dargestellt (Abschnitt 4.4).

Im Anschluss daran wird der Einfluss von HIV-typischen Zytokinen in Kombination (TNF- α , IL-1 β , IFN- α , IFN- γ) beschrieben.

Eine Übersichtstabelle liefert eine Zusammenfassung der im Restitutionsmodell erhobenen Daten (Abschnitt 4.5).

4.1 Morphologie der epithelialen Restitution

Durch mikroskopische Kontrolle konnte im Versuchsstand unmittelbar vor Versuchsdurchführung die Morphologie des intakten Monolayers überprüft werden. Die Zellen der konfluenten Monolayer, sowohl die Kontrollen als auch die Zytokin-behandelten, zeigten ein für HT-29/B6-Zellen typisches polygonales Aussehen. Der mittlere Zelldurchmesser lag bei ca. 5 -7 μm . Die für diese Zelllinie charakteristische Eigenschaft der Mukussekretion behinderte den Versuchsablauf nicht.

Um einen definierten Defekt zu erzeugen, wurde die Spitze einer fein ausgezogenen Glaskapillare (Spitzendurchmesser ca. 2 - 3 μm) benutzt und damit aus einem konfluenten Monolayer ein Epithelstreifen definierter Größe herausgeschnitten (Abb. 13). Dabei wurde die Glaskapillare so eingestellt, dass sie die gesamte Epithelschicht in Höhe der Filtermembran durchschneidet. Es wurde so eine annähernd senkrecht zur Filtermembran verlaufende, gerade Schnittkante (Abb. 16, linke Spalte) mit intakten randständigen Epithelzellen erzeugt (Abb. 15, linke Spalte). Der Monolayer wurde nun entweder sofort oder nach einer 2-stündigen Inkubation fixiert und angefärbt. Die sofort fixierten Monolayer dienten zur Bestimmung der Breite des frisch gesetzten Defekts (Abb. 14). Mit der Inkubation begann die Restitution des Epithels, mit der sich ebenfalls die Morphologie der Zellen veränderte. Die randständigen Epithelzellen flachten ab (Abb. 16, rechte Spalte) und streckten sich in Defektrichtung aus (Abb. 15, rechte Spalte), um die Wunde zu verschließen. Diese Verschiebung der Zellen (Migration) und die Ausbildung von Lamellipodien konnte auch mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie dargestellt werden. Es fand eine Umverteilung der Tight junction-Proteine ZO-1 und Occludin statt. Unmittelbar an den sich in Defektrichtung ausstreckenden Lamellipodien konnten, trotz Durchfokussierung bis auf die Filtermembranebene, nur vereinzelt fluoreszenzmarkierte ZO-1- und Occludin-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 15, rechte Spalte). Nach 2-stündiger Inkubation war der Epitheldefekt zum Teil geschlossen (Abb. 26, rechte Spalte).

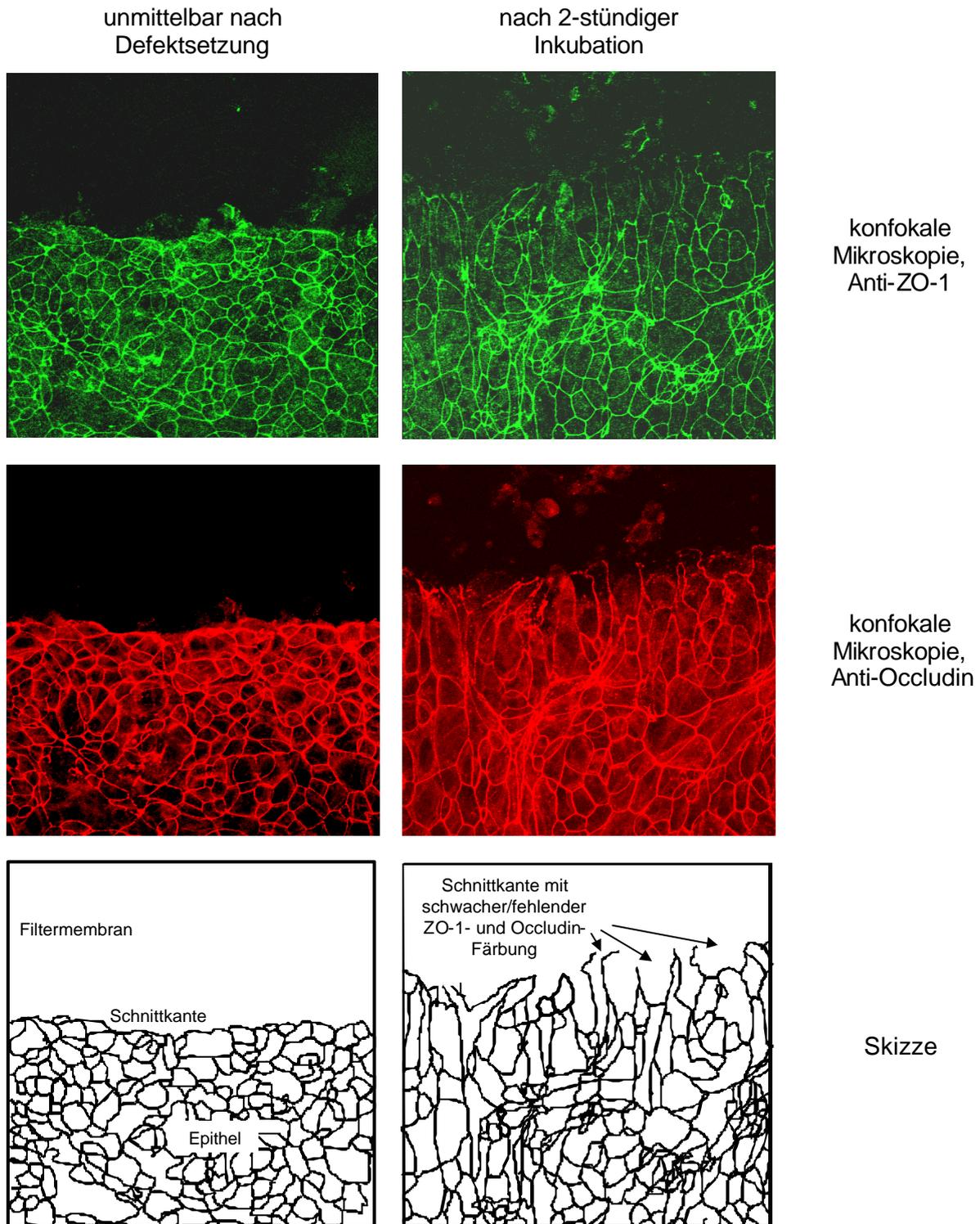


Abb. 15: Zellmigration (Aufsicht)

Zur besseren Darstellung der Zellgrenzen des Kontrollmonolayers wurden Fluoreszenzfärbungen gegen die Tight junction-Proteine ZO-1 (obere Zeile) und Occludin (mittlere Zeile) angewandt.

Die linke Spalte zeigt den frischen Defekt unmittelbar nach Herauspräparieren des Epithelstreifens. Die erzeugte Schnittkante ist gerade. Die Zellen zeigen eine für HT-29/B6-Zellen typische polygonale Morphologie.

Die rechte Spalte zeigt den Monolayer nach einer 2-stündigen Inkubation. Mit einsetzender Restitution strecken sich die Zellen und bilden Lamellipodien aus, um so die Läsion schließen zu können.

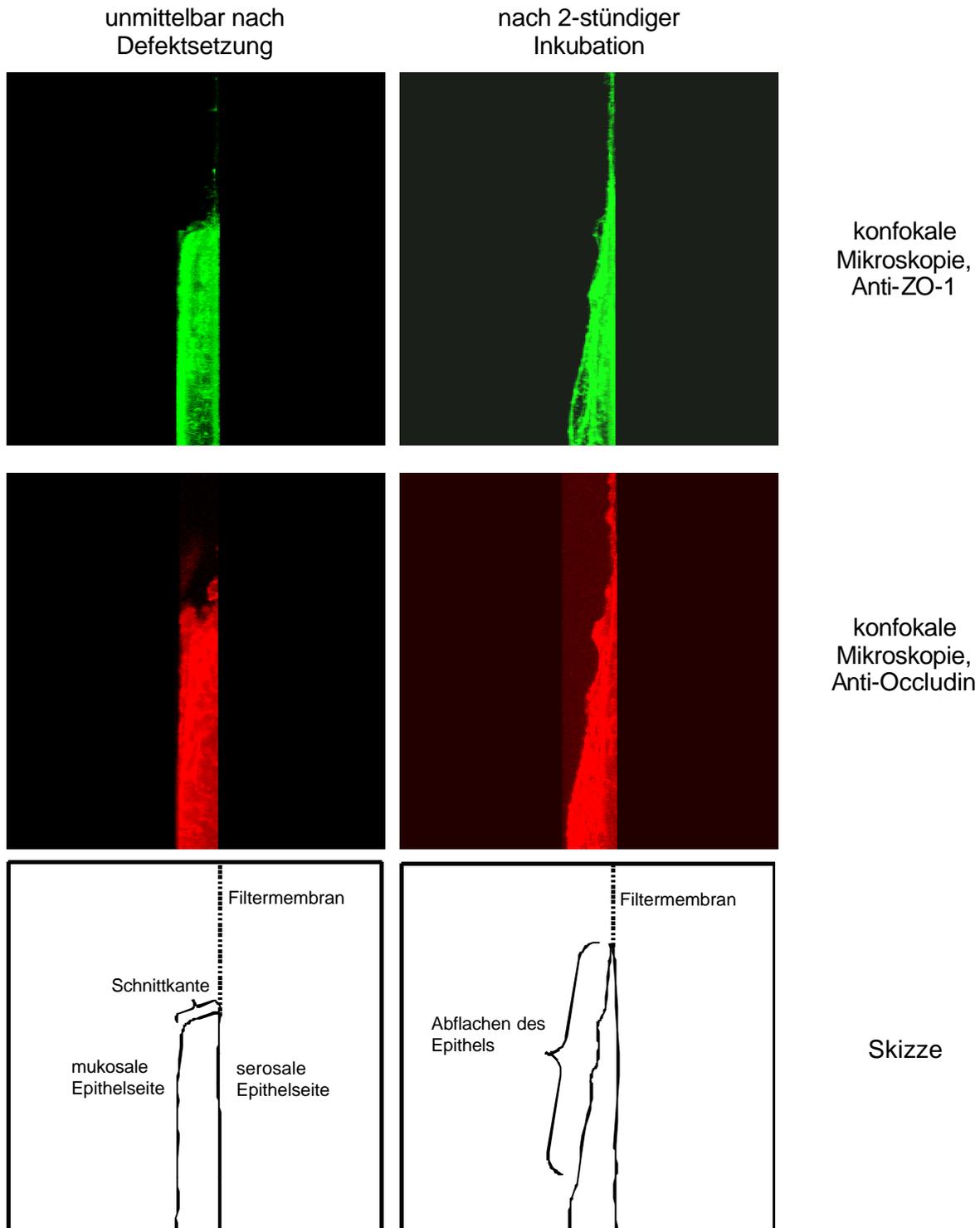


Abb. 16: Zellmigration (Seitenansicht)

Diese Abbildungen stellen die Seitenansichten der bereits in Abb. 15 gezeigten Aufsichtsbilder dar. Auch hier sind die Tight junction-Proteine ZO-1 (obere Zeile) und Occludin (mittlere Zeile) des Kontrollmonolayers fluoreszenzmarkiert.

Die linke Spalte zeigt eine Seitenansicht der Schnittkante unmittelbar nach Defektsetzung. Die Höhe des Epithels ist einheitlich. Die Schnittkante verläuft annähernd senkrecht zur Filtermembran (Skizze).

In der rechten Spalte ist der Monolayer nach einer 2stündigen Inkubation dargestellt. Die Höhe der Zellen nimmt zum Defekt hin ab. Die Zellen flachen ab und migrieren um den Defekt zu schließen.

4.2 EGF und TGF- β 1 als Positivkontrolle

Wie bereits erwähnt, haben verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine, insbesondere EGF und TGF- β 1, einen fördernden Einfluss auf die epitheliale Restitution von geschädigten Magen- und Darm-Zelllinien (Ciacci et al., 1993; Dignass et al., 1996; Kato et al., 1999). Der hier verwendete Versuchsaufbau wurde mit Hilfe von EGF und TGF- β 1 als Positivkontrollen geprüft.

EGF

Zellen der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6 wurden mit einer Zelldichte von $3,5 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ausgesät, 4 bzw. 5 Tage kultiviert und dann für 24 Stunden mit EGF in einer Konzentration von $1,24 \cdot 10^3$ U/ml (entspricht 20 nM) auf der basolateralen Seite inkubiert. Danach durchlief der Monolayer das Restitutionsexperiment und wurde anschließend sofort bzw. nach einer weiteren 2-stündigen Inkubation fixiert und gefärbt. Die Restitutionsgeschwindigkeit (v) der Kontrollfilter ($n = 10$) betrug $10,7 \pm 5,1$ $\mu\text{m/h}$ (Max.: 18,9 $\mu\text{m/h}$, Min.: 2,2 $\mu\text{m/h}$). Im Gegensatz dazu verlief die Restitution der mit EGF behandelten Filter ($n = 8$) mit einer Restitutionsgeschwindigkeit (v) von $19,8 \pm 3,1$ $\mu\text{m/h}$ (Max.: 25,7 $\mu\text{m/h}$, Min.: 15,0 $\mu\text{m/h}$). Es konnte gezeigt werden, dass die Restitution unter dem Einfluss von EGF um 85 % beschleunigt wurde ($p < 0,001$) (Abb. 17).

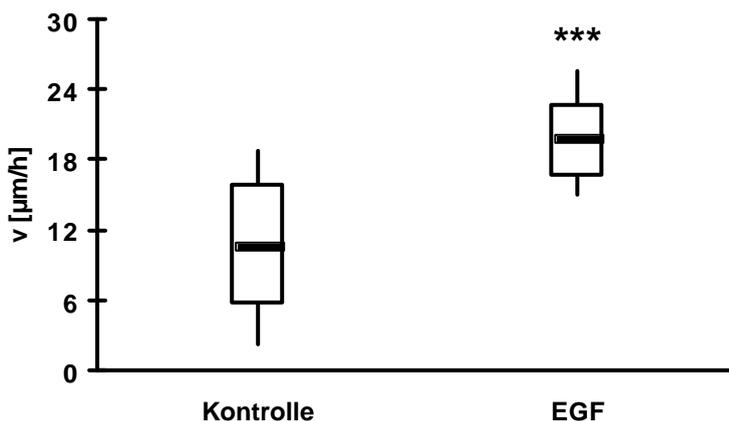


Abb. 17: Mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) von Kontrolle und EGF

Die mittlere Geschwindigkeit (v) ist als breite horizontale Linie dargestellt. Die schmalen horizontalen Linien geben die jeweilige Standardabweichung an. Die Maximal- und Minimalwerte werden durch vertikale Linien verdeutlicht.

Mit EGF vorinkubierte Filter ($n = 8$) zeigten eine deutliche Geschwindigkeitssteigerung (***: $p < 0,001$) im Vergleich zu Kontrollen ($n = 10$).

TGF- β 1

HT-29/B6-Zellen wurden mit einer Zelldichte von $3,5 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ausgesät. Nach einer Wachstumsphase von 4 bzw. 5 Tagen wurde TGF- β 1 in einer Konzentration von 40 U/ml (entspricht 2 ng/ml) in das basolaterale Kompartiment des Kulturmediums appliziert. Nach einer 24-stündigen Inkubationsphase durchlief der Monolayer das Restitutionsexperiment.

Die Restitutionsgeschwindigkeit (v) der Kontrollen ($n = 11$) betrug $14,1 \pm 1,9$ μ m/h (Max.: 17,0 μ m/h, Min.: 11,2 μ m/h). Verglichen mit der Restitutionsgeschwindigkeit (v) der TGF- β 1-Filter ($n = 17$), die bei $18,3 \pm 4,0$ μ m/h (Max.: 22,4 μ m/h, Min.: 11,1 μ m/h) lag, bewirkte die Zugabe von TGF- β 1 eine deutliche ($p < 0,01$) Beschleunigung der Zellrestitution um 29 % (Abb. 18).

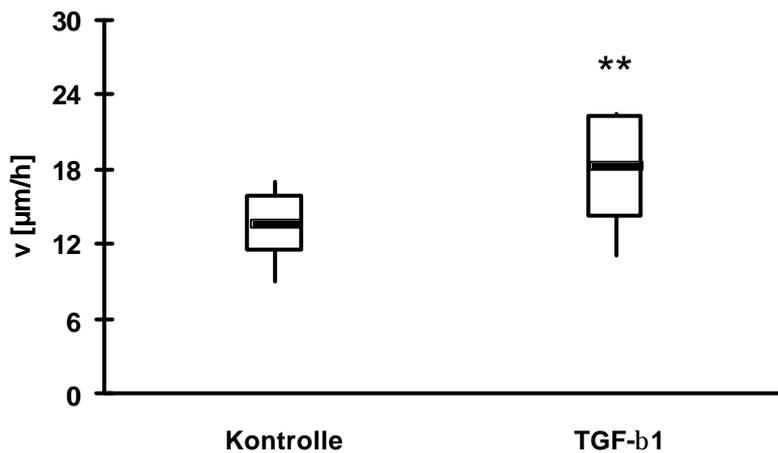


Abb. 18: Mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) von Kontrolle und TGF- β 1

Die mittlere Geschwindigkeit (v) ist als breite horizontale Linie dargestellt. Die schmalen horizontalen Linien geben die jeweilige Standardabweichung an. Die Maximal- und Minimalwerte werden durch vertikale Linien verdeutlicht.

Mit TGF- β 1 vorinkubierte Filter ($n = 17$) zeigten eine Geschwindigkeitssteigerung (**: $p < 0,01$) im Vergleich zu Kontrollen ($n = 11$).

4.3 TNF- α und IL-13 im Restitutionsmodell

TNF- α

HT-29/B6-Zellen wurden mit einer Zelldichte von $7 \cdot 10^5$ Zellen/cm² auf PCF-Zellfilter ausgesät und 7 bzw. 8 Tage bis zur Konfluenz angezchtet. In den Zellrasen wurde nach einer 24-stündigen Inkubation mit 10000 U/ml (entspricht 100 ng/ml) TNF- α ein künstlicher Defekt gesetzt und die Restitutionsgeschwindigkeit anhand nachfolgender Immunfluoreszenzbilder errechnet. Die Kontrollzellen (n = 14) zeigten eine Restitutionsgeschwindigkeit (v) von $8,2 \pm 2,7$ $\mu\text{m/h}$ (Max.: 12,4 $\mu\text{m/h}$, Min.: 4,1 $\mu\text{m/h}$). Im Vergleich zu den mit Zytokin behandelten Filtern (n = 16), deren Geschwindigkeit (v) $9,8 \pm 2,3$ $\mu\text{m/h}$ (Max.: 14,0 $\mu\text{m/h}$, Min.: 6,1 $\mu\text{m/h}$) betrug, konnte keine signifikante Veränderung der Geschwindigkeit festgestellt werden ($p > 0,05$) (Abb. 19).

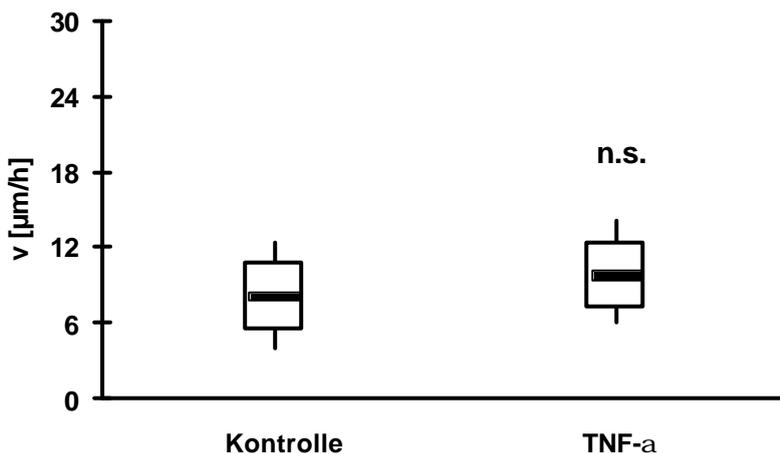


Abb. 19: Mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) von Kontrolle und TNF- α

Die mittlere Geschwindigkeit (v) ist als breite horizontale Linie dargestellt. Die schmalen horizontalen Linien geben die jeweilige Standardabweichung an. Die Maximal- und Minimalwerte werden durch vertikale Linien verdeutlicht.

Mit TNF- α vorinkubierte Filter (n = 16) zeigten keine signifikante Geschwindigkeitsänderung (n.s.: $p > 0,05$) im Vergleich zu Kontrollen (n = 14).

IL-13

Aus Wundheilungsversuchen des Lungenepithels ist bekannt, dass IL-13 in vitro die Funktion der epithelialen Barriere erniedrigt (Ahdieh et al., 2001) und die Zellmigration herabsetzt. Außerdem spielt IL-13 eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Colitis ulcerosa (Heller et al., 2002).

HT-29/B6-Zellen wurden mit einer Zelldichte von $7 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ausgesät, 7 bzw. 8 Tage kultiviert und dann für 48 Stunden mit IL-13 in einer Konzentration von 10 ng/ml auf der basolateralen Seite inkubiert. Der Monolayer durchlief hiernach das Restitutionsexperiment. Die Restitutionsgeschwindigkeit (v) der Kontrollfilter ($n = 12$) betrug $15,1 \pm 2,2$ $\mu\text{m/h}$ (Max.: 19,0 $\mu\text{m/h}$, Min.: 11,3 $\mu\text{m/h}$). Die mit IL-13 behandelten Filter ($n = 11$) zeigten eine Geschwindigkeit (v) von $10,6 \pm 1,8$ $\mu\text{m/h}$ (Max.: 13,2 $\mu\text{m/h}$, Min.: 7,2 $\mu\text{m/h}$). IL-13 verzögerte die Restitution um 29 % ($p < 0,001$) (Abb. 20).

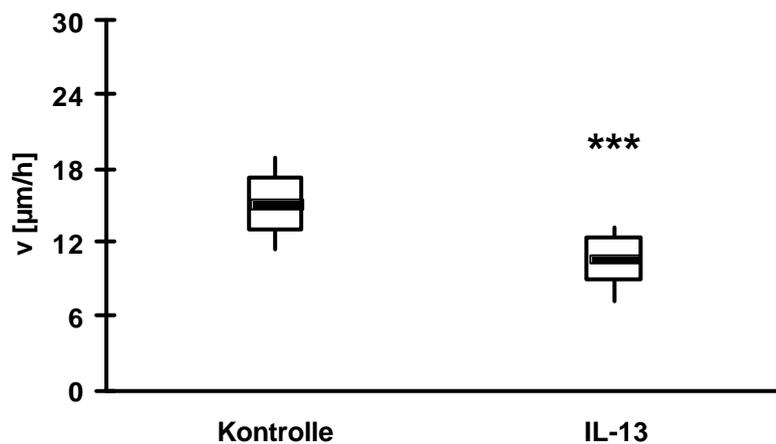


Abb. 20: Mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) von Kontrolle und IL-13

Die mittlere Geschwindigkeit (v) ist als breite horizontale Linie dargestellt. Die schmalen horizontalen Linien geben die jeweilige Standardabweichung an. Die Maximal- und Minimalwerte werden durch vertikale Linien verdeutlicht.

Mit IL-13 vorinkubierte Filter ($n = 11$) zeigten einen starken Geschwindigkeitsabfall (***: $p < 0,001$) im Vergleich zu Kontrollen ($n = 12$).

4.4 Einfluss von HIV-typischen Zytokinen auf die epitheliale Restitution

Schmitz et al. infizierten von Monozyten stammende Makrophagen mit einem HIV-1 (IIIB)-Stamm und kokultivierten diese mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Hierbei konnte im gewonnenen Überstand ein spezifisches Zytokinmuster detektiert werden. Man fand heraus, dass dieses Zytokinmuster den transepithelialen Widerstand von HT-29/B6-Zellen erniedrigt und somit die Barrierefunktion der Zellen beeinflusst (Schmitz et al., 2002).

Dieses Zytokinmodell und auch seine Einzelkomponenten wurden nun hinsichtlich ihrer Einflüsse auf die epitheliale Restitution von HT-29/B6-Zellen untersucht.

Wie in den Untersuchungen von Schmitz et al. (2002) wurden für die nachfolgenden Versuche 7 bzw. 8 Tage alte HT-29/B6-Zellen verwendet, die mit einer Zelldichte von $7 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ausgesät wurden. Sie wurden über die basolaterale Seite für jeweils 24 h mit den Testsubstanzen vorinkubiert, um dann, wie in Abschnitt 3.7.2 beschrieben, zuerst präpariert und nachfolgend fixiert und gefärbt zu werden.

HIV-typische Zytokine:

Zunächst wurden alle vier zu testenden Zytokine als Einzelzytokine und im Anschluss daran als Zytokinkombination angewendet.

Die Einzelkonzentrationen betragen (nach Schmitz et al. 2002):

TNF- α	$3 \cdot 10^2$ U/ml
IFN- γ	6 U/ml
IFN- α	75 U/ml
IL-1 β	$1,5 \cdot 10^2$ U/ml

4.4.1 Kombination von TNF- α und IFN- γ

Niedrige TNF- α -Konzentrationen von $3 \cdot 10^2$ U/ml wurden nur in Kombination mit 6 U/ml IFN- γ im Restitutionsexperiment getestet, da, wie weiter oben bereits gezeigt, eine hohe TNF- α -Konzentration von 10000 U/ml (100 ng/ml) keinen signifikanten Einfluss auf die Zellrestitution ausübte. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Synthese des TNF- α -Rezeptors durch IFN- γ stimuliert wird (Aggarwal et al., 1985; Ruggiero et al., 1986) und so möglicherweise niedrige TNF- α -Konzentrationen zu einer Veränderung der Restitutionsgeschwindigkeit führen.

Nach einer 24-stündigen Inkubation mit $3 \cdot 10^2$ U/ml TNF- α in Kombination mit 6 U/ml IFN- γ zeigten die Zellen ($n = 15$) eine Restitutionsgeschwindigkeit (v) von $12,0 \pm 1,8 \mu\text{m/h}$ (Max.: $14,0 \mu\text{m/h}$, Min.: $9,0 \mu\text{m/h}$). Im Vergleich zu den Kontrollzellen ($n = 10$) die eine Restitutionsgeschwindigkeit (v) von $10,3 \pm 2,0 \mu\text{m/h}$ (Max.: $14,2 \mu\text{m/h}$, Min.: $7,0 \mu\text{m/h}$) aufwiesen, erbrachte die Zytokinkombination eine Zunahme ($p < 0,05$) der Migrationsgeschwindigkeit um 16 % (Abb. 21).

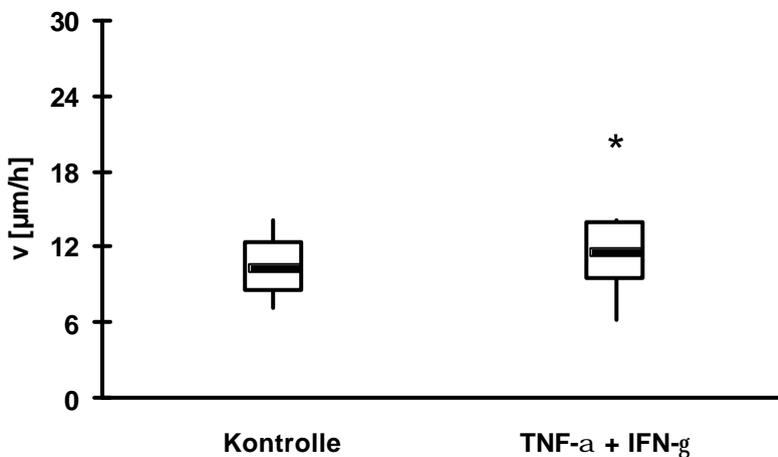


Abb. 21: Mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) von Kontrolle und TNF- α + IFN- γ in Kombination

Die mittlere Geschwindigkeit (v) ist als breite horizontale Linie dargestellt. Die schmalen horizontalen Linien geben die jeweilige Standardabweichung an. Die Maximal- und Minimalwerte werden durch vertikale Linien verdeutlicht.

Die mit TNF- α und IFN- γ behandelten Filter ($n = 15$) zeigten eine geringe Geschwindigkeitserhöhung (*: $p < 0,05$) im Vergleich zu Kontrollfiltern ($n = 10$).

4.4.2 IFN- γ

Die Monolayer wurden mit einer IFN- γ -Konzentration von 6 U/ml für 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf des Restitutionsexperimentes zeigten die Kontrollzellen ($n = 19$) eine Restitutionsgeschwindigkeit (v) von $10,8 \pm 1,8 \mu\text{m/h}$ (Max.: $14,1 \mu\text{m/h}$, Min.: $7,3 \mu\text{m/h}$). Die IFN- γ behandelten Filter zeigten mit einer Geschwindigkeit (v) von $10,1 \pm 2,2 \mu\text{m/h}$ (Max.: $13,9 \mu\text{m/h}$, Min.: $5,8 \mu\text{m/h}$) keine signifikante Veränderung ($p > 0,05$) der epitheliale Restitutionsgeschwindigkeit (Abb. 22).

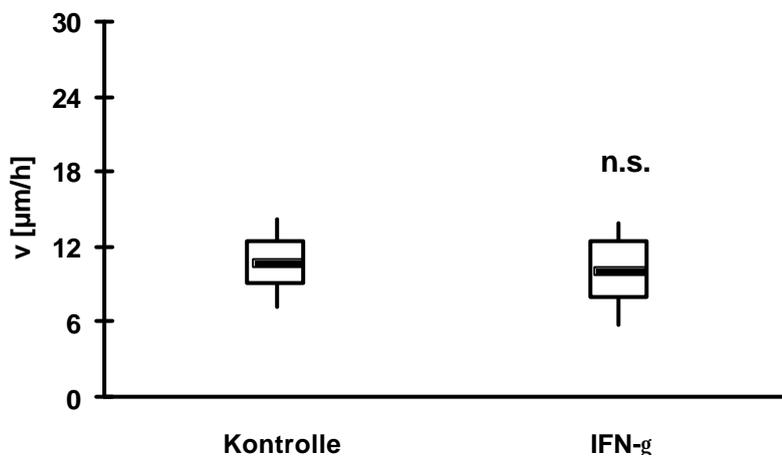


Abb. 22: Mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) von Kontrolle und IFN- γ

Die mittlere Geschwindigkeit (v) ist als breite horizontale Linie dargestellt. Die schmalen horizontalen Linien geben die jeweilige Standardabweichung an. Die Maximal- und Minimalwerte werden durch vertikale Linien verdeutlicht.

Mit IFN- γ vorinkubierte Filter ($n = 25$) zeigten keine signifikante Geschwindigkeitsveränderungen (n.s.: $p > 0,05$) im Vergleich zu Kontrollen ($n = 19$).

4.4.3 IFN- α

Nach einer 24-stündigen basolateralen Vorinkubation mit 75 U/ml IFN- α durchliefen die Monolayer das Restitutionsexperiment. Die mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) der Kontrollmonolayer ($n = 14$) betrug $15,2 \pm 3,2 \mu\text{m/h}$ (Max.: $20,3 \mu\text{m/h}$, Min.: $9,6 \mu\text{m/h}$). Die mit IFN- α vorinkubierten Filter ($n = 19$) zeigten eine Restitutionsgeschwindigkeit (v) von $13,3 \pm 3,4 \mu\text{m/h}$ (Max.: $19,0 \mu\text{m/h}$, Min.: $6,9 \mu\text{m/h}$). Es konnte keine signifikante Veränderung der Restitutionsgeschwindigkeit ($p > 0,05$) unter dem Einfluss von IFN- α gemessen werden (Abb. 23).

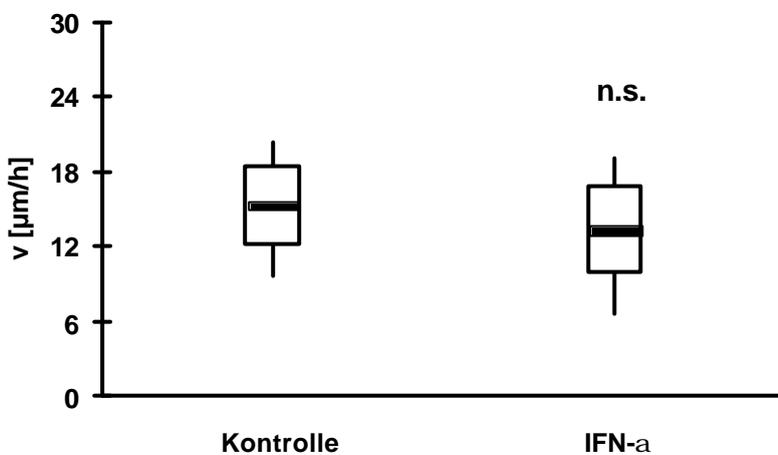


Abb. 23: Mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) von Kontrolle und IFN- α

Die mittlere Geschwindigkeit (v) ist als breite horizontale Linie dargestellt. Die schmalen horizontalen Linien geben die jeweilige Standardabweichung an. Die Maximal- und Minimalwerte werden durch vertikale Linien verdeutlicht.

Mit IFN- α vorinkubierte Filter ($n = 19$) zeigten keine signifikante Geschwindigkeitsveränderung (n.s.: $p > 0,05$) im Vergleich zu Kontrollen ($n = 14$).

4.4.4 IL-1b

HT-29/B6-Zellen wurden mit einer IL-1 β -Konzentration von $1,5 \cdot 10^2$ U/ml für 24 Stunden inkubiert. Die Restitutionsgeschwindigkeit (v) der Kontrollmonolayer ($n = 31$) konnte mit $8,4 \pm 1,7 \mu\text{m/h}$ (Max.: $11,1 \mu\text{m/h}$, Min.: $5,0 \mu\text{m/h}$) bestimmt werden. IL-1 β -Monolayer ($n = 30$) konnten mit einer Restitutionsgeschwindigkeit (v) von $10,2 \pm 2,1 \mu\text{m/h}$ (Max.: $13,3 \mu\text{m/h}$, Min.: $6,3 \mu\text{m/h}$) gemessen werden, was eine Beschleunigung ($p < 0,001$) von 23 % gegenüber den Kontrollmonolayern bedeutet (Abb. 24).

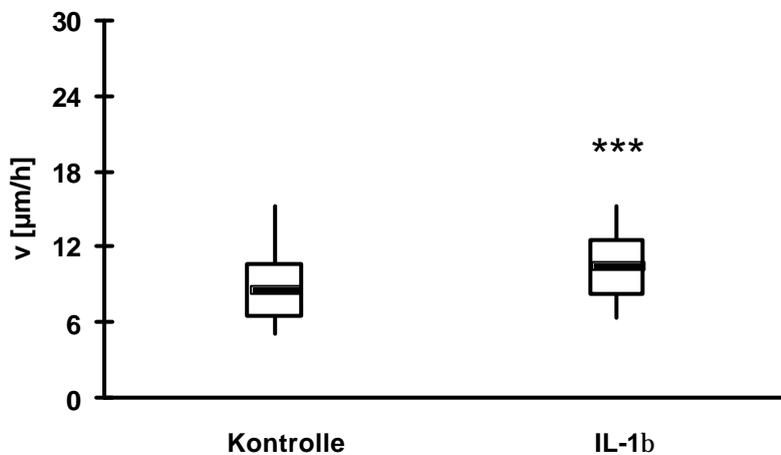


Abb. 24: Mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) von Kontrolle und IL-1b

Die mittlere Geschwindigkeit (v) ist als breite horizontale Linie dargestellt. Die schmalen horizontalen Linien geben die jeweilige Standardabweichung an. Die Maximal- und Minimalwerte werden durch vertikale Linien verdeutlicht.

Mit IL-1 β vorinkubierte Filter ($n = 30$) zeigten eine Geschwindigkeitssteigerung (***: $p < 0,001$) im Vergleich zu Kontrollen ($n = 31$).

4.4.5 Kombination von HIV-typischen Zytokinen

Für die Experimente wurden HT-29/B6-Zellen auf PCF-Kulturfilter mit einer Zelldichte von $7 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ausgesät und 7 bzw. 8 Tage bis zur Konfluenz angezchtet. Nach Vitalitätskontrolle wurden die Monolayer von basolateral mit 300 U/ml TNF- α , 150 U/ml IL-1 β , 6 U/ml IFN- γ und 75 U/ml IFN- α für 24 Stunden vorinkubiert und anschließend dem Restitutionsexperiment unterzogen. Aus labortechnischen Gründen wurden zwei unterschiedliche Zellpassagen (29. bzw. 30.) verwendet. Da verschiedene Zellpassagen der Zelllinie HT-29/B6 unterschiedliche Restitutionsgeschwindigkeiten aufwiesen, was anhand der Ergebnisse der Kontrollmonolayer ersichtlich war, wird die folgende Auswertung in Ergebnisse des 1. Versuchs und Ergebnisse des 2. Versuchs unterteilt. Durch eine Varianzanalyse der beiden Versuche konnte kein Unterschied nachgewiesen werden (Tab. 4 im Anhang).

1. Versuch:

Die Kontrollzellen (n = 15) der 29. Passage zeigten eine Restitutionsgeschwindigkeit (v) von $6,3 \pm 2,3$ $\mu\text{m/h}$ (Max.: 9,0 $\mu\text{m/h}$, Min.: 2,1 $\mu\text{m/h}$). Die mit HIV-typischen Zytokinen behandelten HT-29/B6-Zellen (n = 22) wiesen eine Restitutionsgeschwindigkeit (v) von $10,1 \pm 3,4$ $\mu\text{m/h}$ (Max.: 15,7 $\mu\text{m/h}$, Min.: 2,6 $\mu\text{m/h}$) auf. Dies stellt eine deutliche Restitutionsbeschleunigung (***: p < 0,001) von 61 % dar (Abb. 25).

2. Versuch:

Die Epithelzellen der 30. Passage zeigten allgemein eine höhere Restitutionsgeschwindigkeit (v). Sie lag bei den Kontrollzellen (n = 15) bei $11,5 \pm 1,5$ $\mu\text{m/h}$ (Max.: 13,6 $\mu\text{m/h}$, Min.: 9,2 $\mu\text{m/h}$), was im Vergleich zu den mit HIV-typischen Zytokinen vorinkubierten Zellen (n = 18), die eine Geschwindigkeit (v) von $13,4 \pm 1,7$ $\mu\text{m/h}$ (Max.: 15,8 $\mu\text{m/h}$, Min.: 10,3 $\mu\text{m/h}$) aufwiesen, eine Beeinflussung der Restitution (**: p < 0,01) erbrachte. Die Restitution wurde um 16 % beschleunigt (Abb. 25).

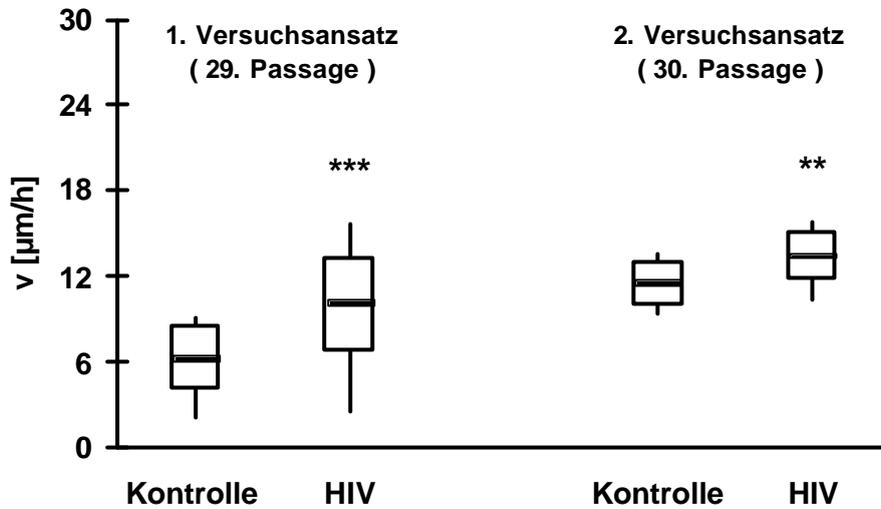


Abb. 25: Mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v) von Kontrolle und HIV-typischen Zytokinen

Die mittlere Geschwindigkeit (v) ist als breite horizontale Linie dargestellt. Die schmalen horizontalen Linien geben die jeweilige Standardabweichung an. Die Maximal- und Minimalwerte werden durch vertikale Linien verdeutlicht.

Mit HIV-typischen Zytokinen behandelte Filter ($n = 22$) zeigten im ersten Versuch (29. Passage) eine deutliche Geschwindigkeitssteigerung (***: $p < 0,001$) im Vergleich zu Kontrollen ($n = 15$).

Bei den mit HIV-typischen Zytokinen vorinkubierten Zellen der 30. Passage ($n = 18$) konnte ebenfalls eine Erhöhung der Restitutionsgeschwindigkeit (**: $p < 0,01$) gegenüber den Kontrollen ($n = 15$) festgestellt werden.

Immunfluoreszenzbilder des Epitheldefektes

Nach einer 2-stündigen Inkubationsphase ist der künstlich erzeugte Epitheldefekt teilweise durch migrierende Zellen abgedeckt. HIV -typische Zytokine in Kombination appliziert beeinflussen die Restitution von intestinalen epithelialen HT-29/B6-Zellen positiv (Abb. 26).

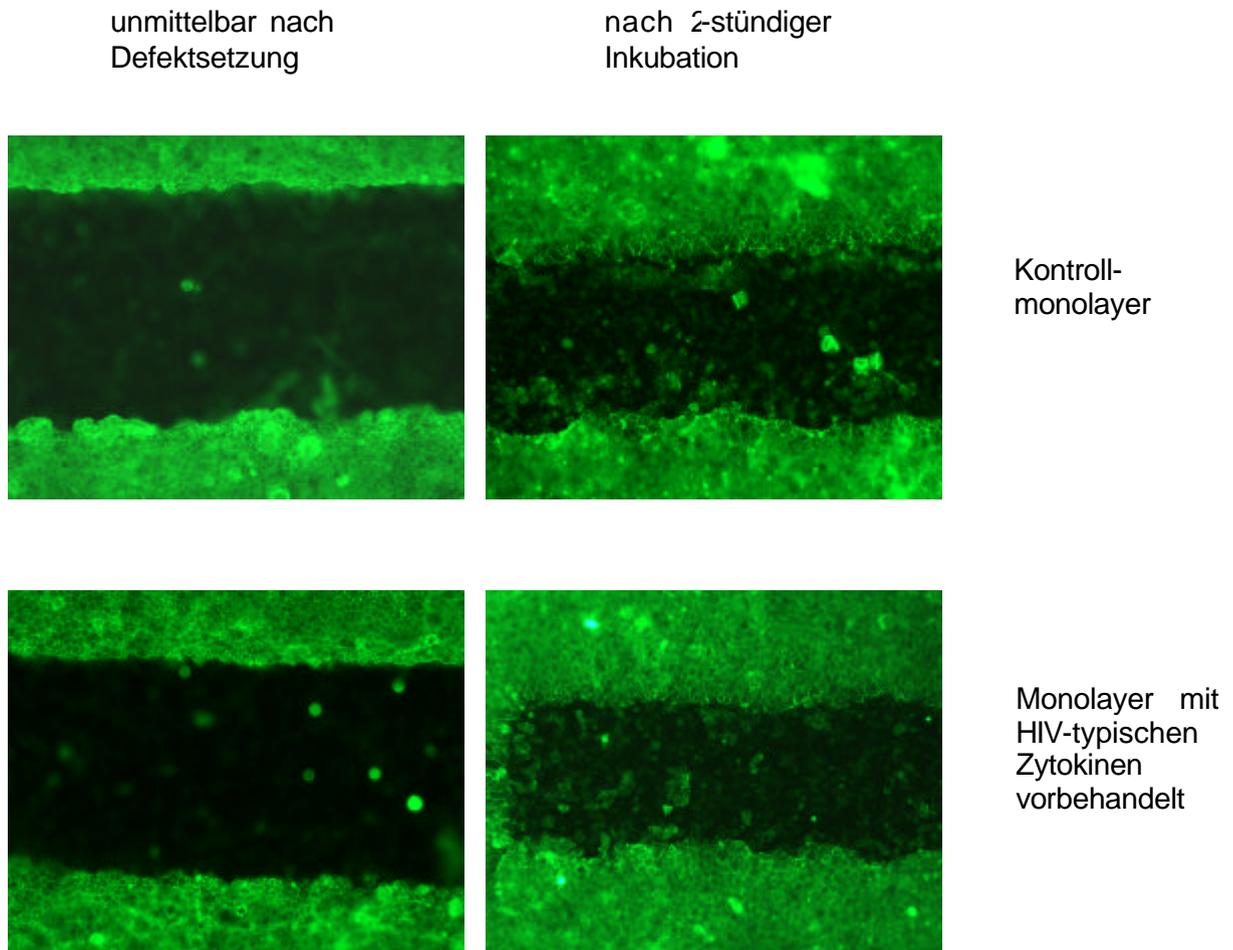


Abb. 26 Immunfluoreszenzbilder des Epitheldefektes

Der Monolayer wurde mit einem Antikörper gegen das Tight junction-Protein ZO-1 angefärbt, um die Zellgrenzen besser darstellen zu können.

Die Immunfluoreszenzbilder der oberen Reihe zeigen Kontrollmonolayer, Bilder der unteren Reihe zeigen Monolayer, die mit HIV-typischen Zytokinen vorinkubiert wurden.

In der linken Spalte sind die Objekte unmittelbar nach Setzen des Epitheldefektes abgebildet. Der Defektspace hat eine Breite von 200 µm.

Die rechte Spalte zeigt die Monolayer nach einer 2-stündigen Inkubation. Man kann erkennen, dass die Zellmigration unter dem Einfluss HIV-typischer Zytokine beschleunigt wurde und der Defektspace schmaler ist als unter Kontrollbedingungen.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren auf die Restitutionsgeschwindigkeit von HT-29/B6-Zellen untersucht.

Die nachfolgenden Grafiken (Abb. 28 u. Abb. 29) stellen eine Übersicht über die getesteten Zytokine und deren Einflussnahme auf die Geschwindigkeit dar. Es wurden zunächst die mittleren Restitutionsgeschwindigkeiten (v [$\mu\text{m}/\text{h}$]) der Kontroll- bzw. Substanzfilter ermittelt (Abb. 27 A). Um die Mittelwerte besser vergleichen zu können, wurden diese ihren Kontrollgeschwindigkeiten (= 100 %) gegenübergestellt und prozentual umgerechnet (Abb. 27 B). Das Signifikanzniveau wurde aus den zuvor dargestellten Grafiken übernommen und errechnete sich aus den Einzelwerten.

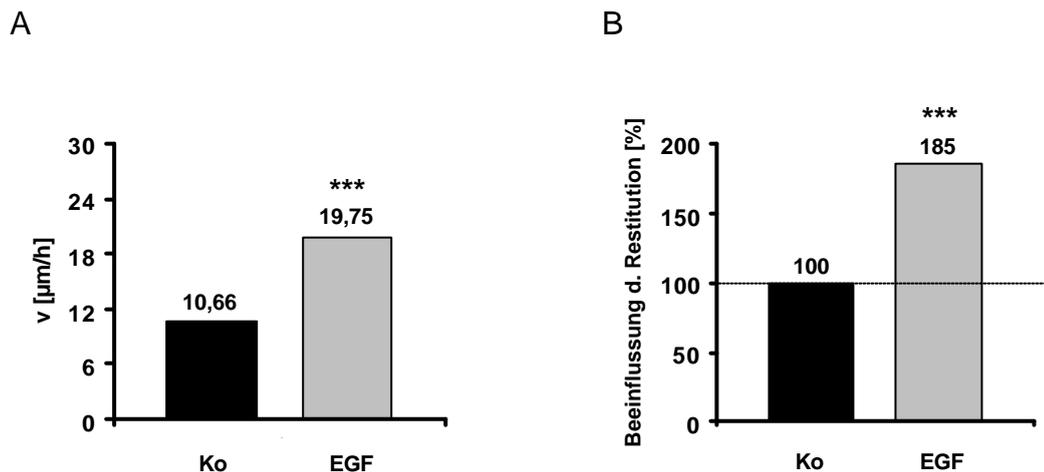


Abb. 27: Beeinflussung der Restitutionsgeschwindigkeit am Beispiel EGF

Diese Abbildung erläutert die Berechnung der Restitutionsbeeinflussung in Prozent.

A: Es wurde die mittlere Restitutionsgeschwindigkeit (v [$\mu\text{m}/\text{h}$]) von Kontrollzellen und zytokinbehandelten Zellen ermittelt.

B: Die Kontrollgeschwindigkeit wurde gleich 100 % gesetzt und der, mit EGF-behandelten Zellen gegenübergestellt.

EGF erbrachte im Vergleich der Mittelwerte eine deutliche Restitutionsbeschleunigung um 85 %.

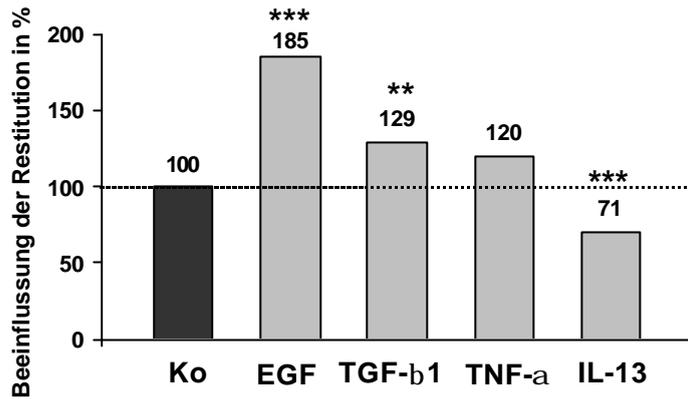


Abb. 28: Einfluss von EGF, TGF-β1, TNF-α, IL-13 auf die Restitution

Die mittlere Restitutionsgeschwindigkeit der Kontrollzellen wurde gleich 100 % gesetzt und den mittleren Geschwindigkeiten der Versuchszellen gegenübergestellt. Im Vergleich der Mittelwerte erbrachte EGF eine beachtliche Beschleunigung der Restitution um 85 %. TGF-β1 führte zu einer Restitutionsbeschleunigung um 29 %. TNF-α veränderte die Geschwindigkeit der Restitution nicht signifikant. Die Restitution wurde durch IL-13 deutlich um 29 % verlangsamt.

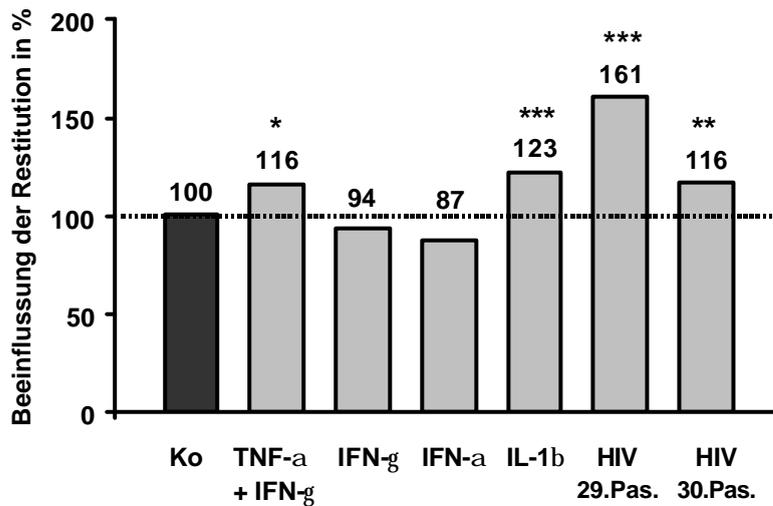


Abb. 29: Einfluss von HIV-typischen Zytokinen auf die Restitution

Die mittlere Geschwindigkeit der Kontrollzellen wurde gleich 100 % gesetzt und den mittleren Geschwindigkeiten der Versuchszellen gegenübergestellt. Im Vergleich der Mittelwerte beschleunigte die Zytokinkombination TNF-α + IFN-γ die Restitution um 16 %. IFN-γ als Einzelzytokin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Restitution. IFN-α veränderte die Geschwindigkeit der Restitution nicht signifikant. IL-1β beschleunigte die Restitution deutlich um 23 %. HIV-typische Zytokine in Kombination verabreicht, beschleunigten die Restitutionsgeschwindigkeit im ersten Versuchsansatz (29. Passage) um beachtliche 61 %. Im zweiten Versuchsansatz (30. Passage) wurde die Restitution um 16 % beschleunigt.

Substanz	Konzentration pro ml	Anzahl (n) von Kontrolle/ Substanz	Beeinflussung der Restitutionsgeschwindigkeit
EGF	$1,24 \cdot 10^3$ U	10/8	positiv
TGF- β 1	$0,4 \cdot 10^2$ U	11/17	positiv
TNF- α	10^4 U	14/16	keine
IL-13	10 ng	12/11	negativ

HIV-typische Zytokine

TNF- α + IFN- γ	$3 \cdot 10^2$ U + 6 U	10/15	positiv
IFN- γ	6 U	19/25	keine
IFN- α	75 U	14/19	keine
IL-1 β	$1,5 \cdot 10^2$ U	32/31	positiv
HIV-typische Zytokine in Kombination (29. Passage): TNF- α IFN- α IFN- γ IL-1 β	$3 \cdot 10^2$ U 75 U 6 U $1,5 \cdot 10^2$ U	15/23	positiv
HIV-typische Zytokine in Kombination (30. Passage): TNF- α IFN- α IFN- γ IL-1 β	$3 \cdot 10^2$ U 75 U 6 U $1,5 \cdot 10^2$ U	16/19	positiv

Tab. 3: Übersicht

Die Tabelle zeigt eine Übersicht aller Restitutionsversuche. Es ist die Konzentration der Zytokine/Wachstumsfaktoren angegeben, die pro ml in das basolaterale Nährmedium appliziert wurden, sowie die Anzahl (n) der Testfilter und das Ergebnis der Restitutionsbeeinflussung. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde ein t-Test verwendet.