

Funktionelle Untersuchung humaner primärer nasaler Epithelzellen (hNEpC) von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis

Tobias Albrecht¹, Johanna J Salomon², Ingo Baumann¹, Marcus A Mall²

¹ Hals-Nasen-Ohrenklinik, Universitätsklinikum Heidelberg

² Abteilung Translationale Pneumologie, Zentrum für Translationale Lungenforschung Heidelberg (TLRC-H), Universitätsklinikum Heidelberg

Einleitung

Die chronische Rhinosinusitis (CRS) ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen mit wesentlicher Auswirkung auf die Lebensqualität der Patienten [1]. Die CRS spiegelt ein äußerst heterogenes Krankheitsbild wieder, dessen zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen noch nicht eindeutig identifiziert sind. Das nasale Epithel spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Homöostase. Das Ziel dieser Studie war, den epithelialen Chloridionentransport zweier unterschiedlicher Nasenregionen von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis funktionell zu untersuchen.

Methoden

Probengewinnung: Gewebe nahe des Processus uncinatus (hNEpC-PU) sowie polypöses Gewebe aus dem Siebbein (hNEpC-SBB) wurde während eines Nasennebenhöhlen-eingriffs gewonnen.

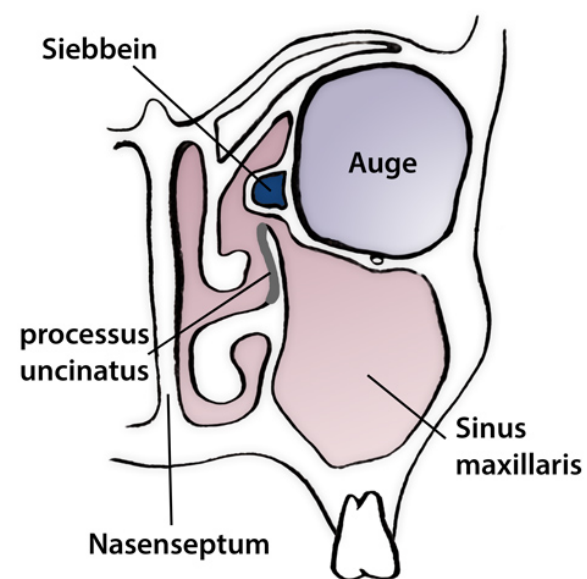


Abbildung 1. coronarer Schnitt der Nasenhaut und -nebenhöhlen mit Regionen der Probengewinnung (Processus uncinatus und Siebbein).

Ussing-Kammer Messungen [3]: Die Messungen wurden mit auf Snapwell Filtermembranen konfluent gewachsenen Zellmonolayern bei 37 °C durchgeführt. Um den Ionentransport für Cl⁻ zu verstärken, wurde ein transepithelialer Cl⁻-Gradient mit einer apikalen Chloridkonzentration von 5 mM angelegt. Die Cl⁻ Ionen wurden durch eine entsprechende Menge an Gluconatsalzen ersetzt. Der Kurzschlussstrom (I_{sc}) wurde mit LabChart 7-Software erfasst.

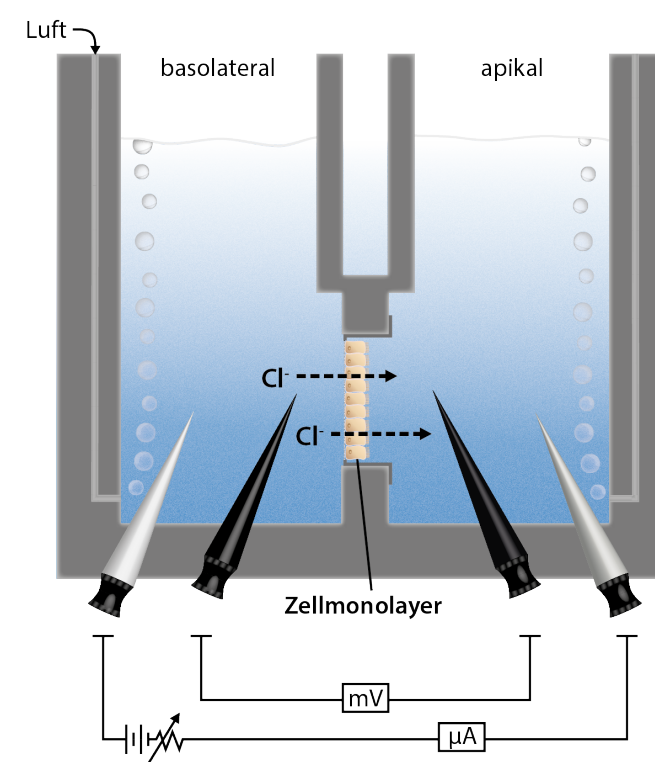


Abbildung 2. Aufbau einer Ussing-Kammer Messung. Bei transepithelialer Potentialdifferenz von 0.0 mV wird der Kurzschlussstrom (I_{sc}) gemessen.

Isolation und Zellkultur von hNEpC: Das zerkleinerte Gewebe wurde in Dissoziationsmedium (PBS; 0.1 mg/ml Dnase I, 1.4 mg/ml Pronase E) bei 4 °C über Nacht verdaut. Nach erneuter Inkubation bei 37 °C wurde die Zellsuspension durch ein 100 μm Zellsieb gegeben. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in Medium resuspendiert, in einer Dichte von 600.000 Zellen/cm² auf kollagenbeschichteten Snapwell Filtermembranen ausgesät und unter air-liquid-interface Bedingungen [2] für 14 Tage kultiviert.

Ergebnisse

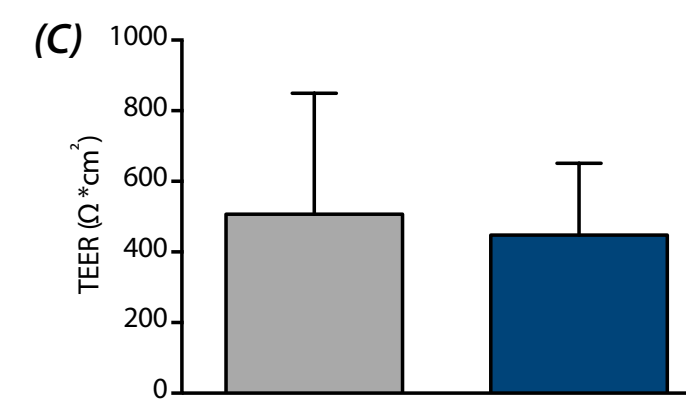
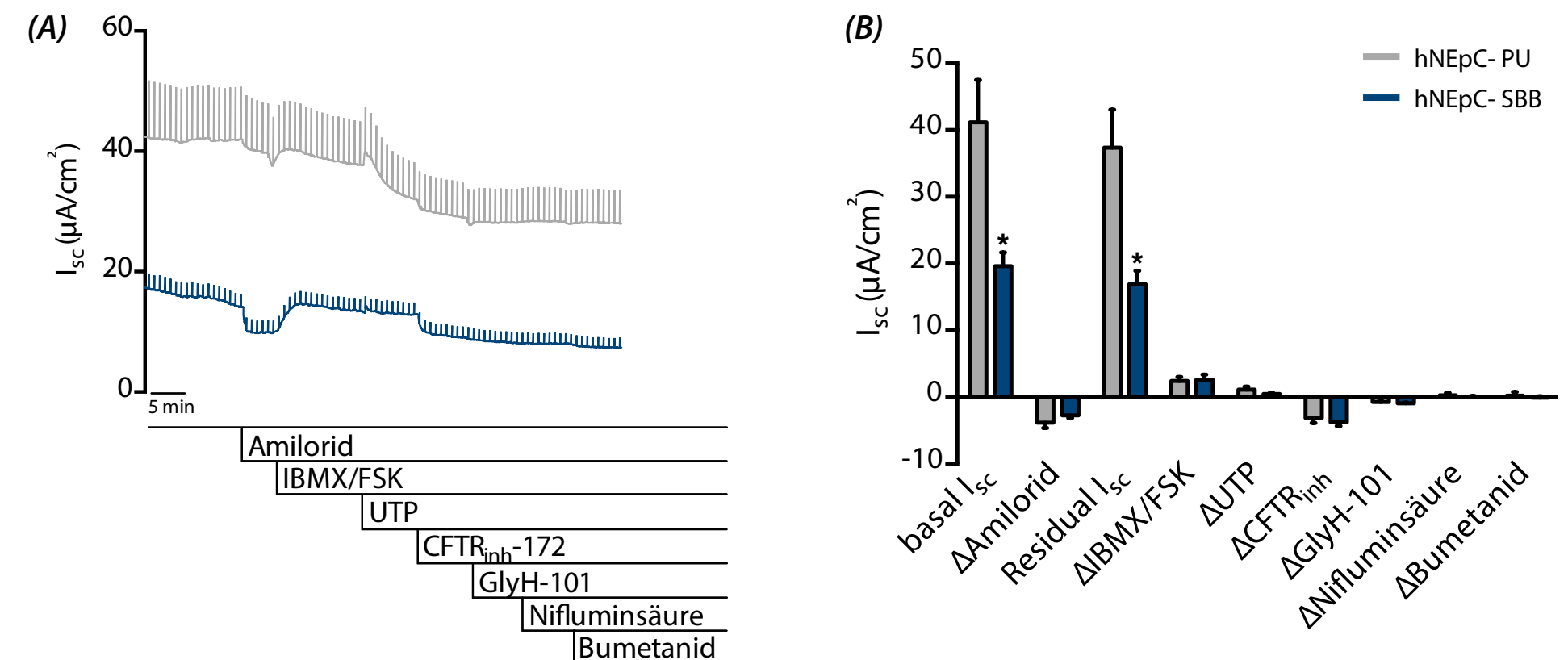


Abbildung 3. (A) Repräsentative Ussing-Kammer Messung des Chloridstroms in hNEpC- Monolayern isoliert von Processus uncinatus sowie Siebbein. (B) Zusammenfassung der Effekte auf Amilorid (100 μM; apikal), IBMX/Forskolin (100 μM/1 μM; apikal/basolateral) und UTP (100 μM; apikal). Darüber hinaus wurden Chloridkanalblocker wie CFTR_{inh}-172 (20 μM; apikal), GlyH-101 (50 μM; apikal), Nifluminsäure (100 μM; basolateral) und Bumetanid (100 μM; apikal/basolateral) getestet. Darstellung als Mittelwerte ± SEM; n= 10, *p<0,01; (C) Die transepithelialen Widerstandswerte (TEER) der hNEpC- Monolayer betrugen zwischen 250-900 Ω*cm² und unterscheiden sich nicht zwischen den Geweben unterschiedlicher Lokalisation. Darstellung als Mittelwert ± SD; n=10.

Schlussfolgerung

Zusammengefasst konnte ein Unterschied in den Chloridionentransporteigenschaften entlang der nasalen Epithelbarriere gezeigt werden. Ussing-Kammer Messungen des Chloridionentransports am Nasenepithel von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis bieten eine vielversprechende Methode zur weiteren Aufklärung einer potentiellen Dysregulation der epithelialen Ionen- und Flüssigkeitstransporte in der Pathogenese der CRS.

Referenzen

1. Chaaban M.R., E.M. Walsh, B.A. Woodworth, *Epidemiology and differential diagnosis of nasal polyps*. Am J Rhinol Allergy, 2013. 27(6): p. 473-8.
2. Muller, L., et al., *Culturing of human nasal epithelial cells at the air liquid interface*. J Vis Exp, 2013(80).
3. Li, H., D.N. Sheppard, and M.J. Hug, *Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber*. J Cyst Fibros, 2004. 3 Suppl 2: p. 123-6.