

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Angaben

Es wurden die Auswirkungen von insgesamt 5 verschiedenen Konzentrationen TCDD (1 pM – 10 nM) auf Thymusepithelzellen (n=180 Kulturflaschen) untersucht. Zusätzlich wurden die Wirkungen von 100 nM PCB 126 auf Thymusepithelzellen (n=30) untersucht.

Wir haben bei allen Versuchen Zellzahl und Zellvitalität bestimmt, sowie eine Zytokeratinfärbung durchgeführt. Es wurden insgesamt 5 verschiedene Integrine, 3 verschiedene Adhäsionsmoleküle und 2 intrazelluläre Differenzierungsmarker untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nachfolgend dargestellt.

3.2. Zellvitalität und Zellzahl

Die Vitalität der Zellen wie mit Acridin-Orange und Ethidiumbromid untersucht, wurde nicht durch die Behandlung mit TCDD beeinträchtigt und entsprach auch in der höchsten untersuchten Konzentration derjenigen der DMSO-Kontrollen. Sie lag bei allen Versuchen über 95%.

Die mittleren Zellzahlen der DMSO – behandelten Kulturschalen bewegte sich zwischen 10 und 17 Millionen Zellen. Die Behandlung mit 1 pM und 10 pM TCDD führte nur zu geringfügigen Veränderungen der Gesamtzellzahl (unter 10%). Die Behandlung mit höheren Konzentrationen TCDD führte jedoch zu einer ausgeprägten und statistisch signifikanten Verminderung der Zellzahlen in den Kulturschalen. Diese war bei 100 pM TCDD – Konzentration mit einer Abnahme um 57% am ausgeprägtesten. Die Behandlung mit TCDD in Konzentrationen von 1 nM und 10 nM führte zu einer Abnahme der Zellzahl um 49% bzw. 27%. Auch diese Veränderungen waren statistisch signifikant ($p < 0,05$, Wilcoxon-Test).

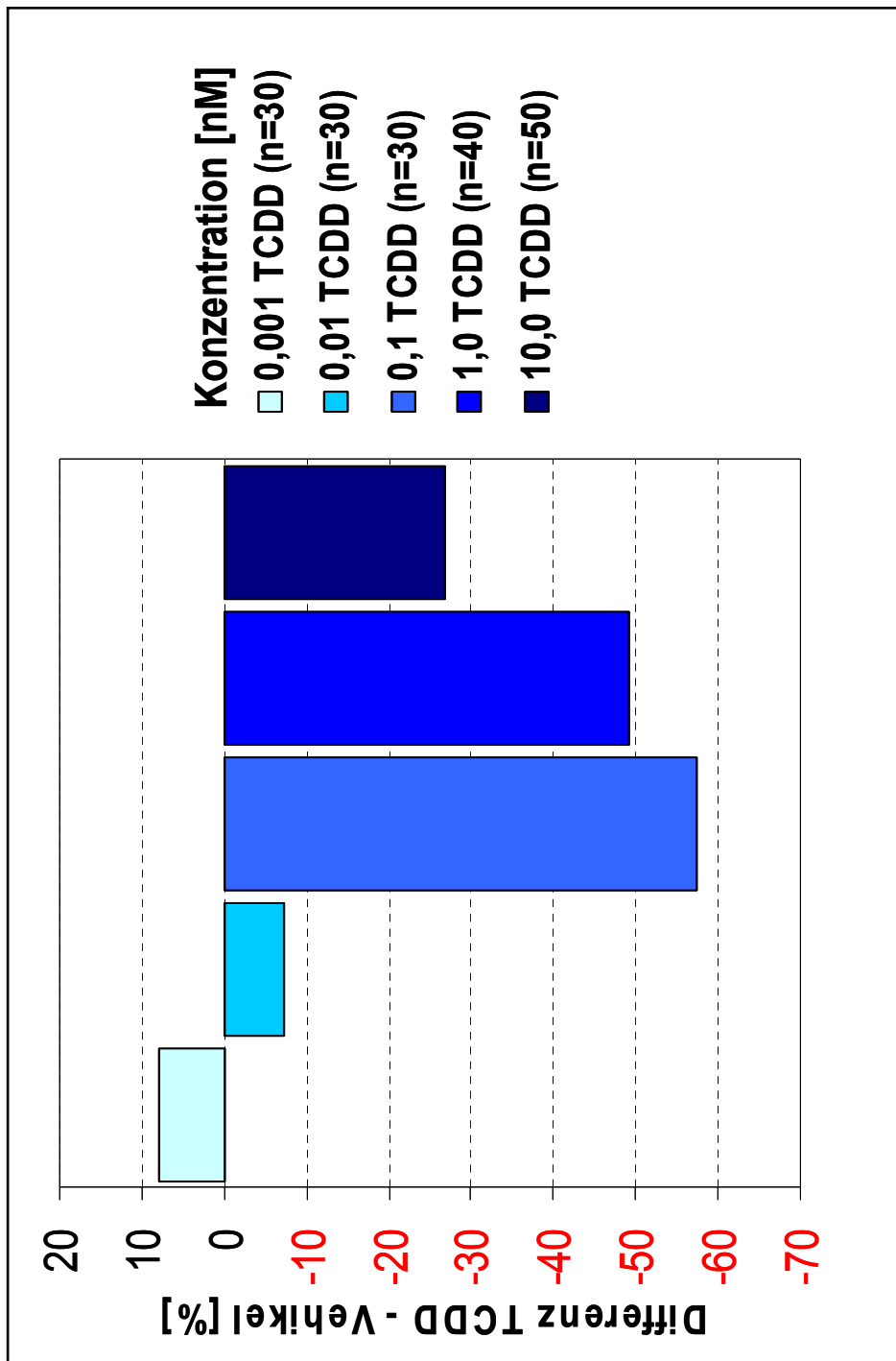


Abbildung 3.1.: Veränderung der Zellzahlen in Abhängigkeit von der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen TCDD. (* $p < 0,05$ Wilcoxon-Test)

3.3. Elektronenmikroskopie

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen zeigen nach dreitägiger Behandlung mit 3,3',4,4',5-Pentachlorbiphenyl (PCB 126) in einer Konzentration von 100 nM deutliche Veränderungen gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Die unbehandelten Zellen stellen sich in den Aufnahmen gleichmäßig aneinanderliegend dar. Sie zeigen eine einheitliche, langgezogene schmale Form mit einem gleichmäßigen Zellkern (Abb. 3.2.).

Im Gegensatz dazu stellen sich die Zellen nach Behandlung mit PCB 126 deutlich deformiert dar. Die einzelnen Zellen zeigen eine rund-ovale Form mit einer Vielzahl einzelner Ausläufer. Der Zellkern stellt sich ebenfalls verformt und vergrößert dar (Abb 3.3. und 3.4.) Es fällt eine ausgeprägte Bildung von Vakuolen innerhalb der behandelten Zellen auf (Abb. 3.3.). Auch eine Vermehrung intrazellulärer Bestandteile ist zu sehen. Weiterhin fällt eine deutliche Anreicherung extrazellulärer Matrix in der Umgebung der Zellen auf (Abb. 3.3. und 3.4.).

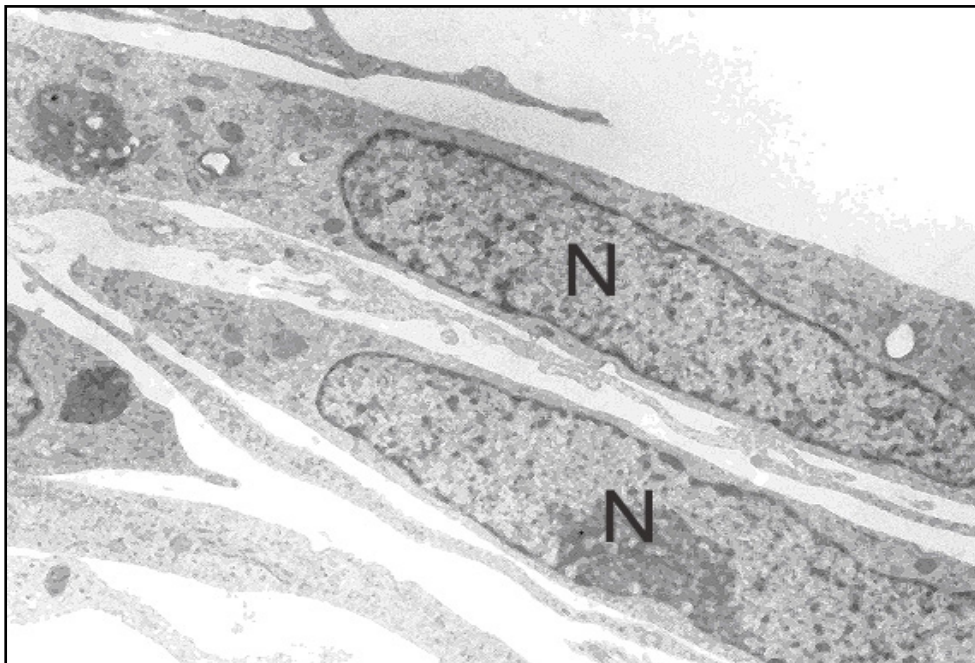


Abbildung 3.2.: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (x3000) kultivierter Thymusepithelzellen vom Menschen, unbehandelt. Gleichmäßig geformte, nebeneinanderliegende Zellen (N=Nukleus).

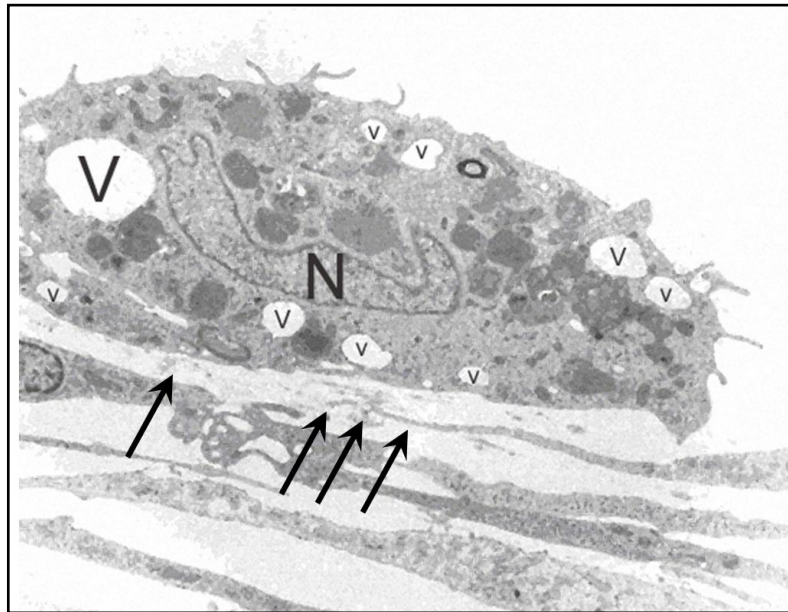


Abbildung 3.3.: Elektronenmikroskopische Aufnahme (x3000) kultivierter Thymusepithelzellen, behandelt mit PCB 126 über insgesamt drei Tage. Ausgeprägte Bildung von Vakuolen (V), deformierter Zellkern (N) sowie Anreicherung von extrazellulärer Matrix in der Zellumgebung (Pfeile).



Abbildung 3.3.: Elektronenmikroskopische Aufnahme (x3000) kultivierter Thymusepithelzellen, behandelt mit PCB 126 über insgesamt drei Tage. Deutlich sichtbare extrazelluläre Matrix (Pfeile), großer deformierter Zellkern (N) sowie zahlreiche unregelmäßige Zellausläufer.

3.4. Zytokeratinfärbung

Es wurden nur Kulturschalen in die Auswertung eingeschlossen, bei denen mindestens 95% der Zellen Zytokeratin – positiv, also Thymus-Epithelzellen waren (Abb. 3.4.).

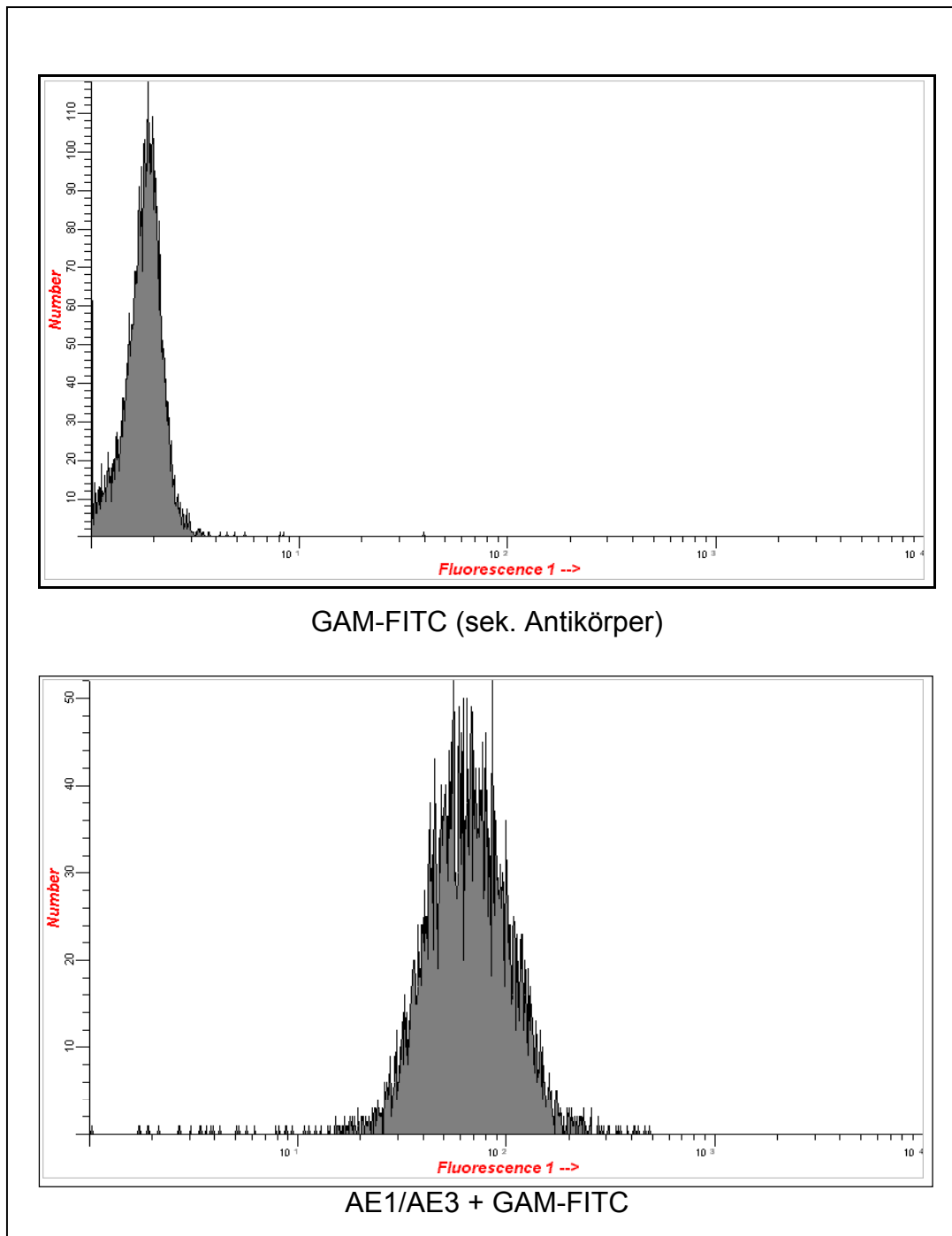


Abb. 3.4. Zytokeratinfärbung mit AE1/AE3

3.5. Integrinexpression

Integrin β 1 (CD 29)

Integrin β 1 (CD 29) war auf über 99% der Thymusepithelzellen nachweisbar, unabhängig von einer Behandlung der Zellen.

Integrin β 3 (CD61)

Integrin β 3 (CD61) wurde bei sehr unterschiedlichen Anteilen der Thymusepithelzellen gefunden. So war der Anteil der CD61 – positiven Zellen in einigen DMSO-behandelten Kulturen unter 5%, in den meisten dieser Kulturen jedoch im Bereich zwischen 30% und 40%. Unter der Behandlung mit TCDD zeichnete sich eine tendenzielle Zunahme der CD61 – positiven Zellen ab, diese Zunahme war jedoch statistisch nicht signifikant.

Bei Zugabe von 100 nM PCB 126, eine Konzentration die, entsprechend dem WHO TEF von 0,1, einer TCDD-Konzentration von 10 nM Toxizitätsäquivalent ist, ergab sich ein signifikanter Anstieg um etwa 7%.

Integrin α 2 (CD49b)

Integrin α 2 (CD49b) war auf 35% bis 70 % der DMSO – behandelten Thymusepithelzellen nachweisbar. Durch die Behandlung mit TCDD zeigte sich ab einer Konzentration von 1 nM eine statistisch signifikante Zunahme des Anteils CD49b – positiver Zellen. Auch nach Behandlung mit TCDD in 10 nM Konzentration konnte eine statistisch signifikante Zunahme des Anteils CD49b-positiver Zellen festgestellt werden, diese war jedoch deutlich geringer ausgeprägt als bei 1 nM TCDD.

Eine ähnliche Veränderung ergab sich mit PCB 126 in einer Konzentration von 100 nM.

Integrin $\alpha 5$ (CD49e)

Integrin $\alpha 5$ (CD49e) war auf 25% bis 65% der DMSO – behandelten Zellen nachweisbar. Nach Behandlung mit TCDD in Konzentrationen von 0,1 nM und 1,0 nM konnten wir eine statistisch signifikante Zunahme des Anteils der CD49e – positiven Zellen um 4 – 5% feststellen (Abb. 3.5.). Die Behandlung mit 1,0 pM TCDD ergab quantitativ fast identische Effekte wie die nächst höhere Konzentration auf den Anteil der CD49e – positiven Zellen.

Auch bei Zusatz von 100 nM PCB 126 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CD49e – positiven Zellen um etwa 5%.

Integrin $\alpha 6$ (CD49f)

Integrin $\alpha 6$ (CD49f) war auf 10% bis 20% der DMSO – exponierten Zellen nachweisbar. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Integrin – Untereinheiten fanden wir nach Behandlung mit TCDD eine **Abnahme** des Anteils der CD49f – positiven Zellen. Diese war am ausgeprägtesten unter 1 nM TCDD – Exposition und auch nur unter dieser Konzentration statistisch signifikant.

Unter Zusatz von 100 nM PCB 126 zeigte sich ebenfalls eine deutliche Abnahme der CD49f – positiven Zellen, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

Integrin αv (CD51)

Integrin αv (CD51) war auf 65% bis 98% der DMSO – behandelten Zellen nachweisbar. Nach Behandlung mit TCDD in 1,0 nM Konzentrationen konnten wir eine statistisch signifikante Zunahme des Anteils der CD51 – positiven Zellen um 7% feststellen.

Zugabe von 100 nM PCB 126 hatte eine leichte, statistisch nicht signifikante Zunahme der CD51 – positiven Zellen zur Folge.

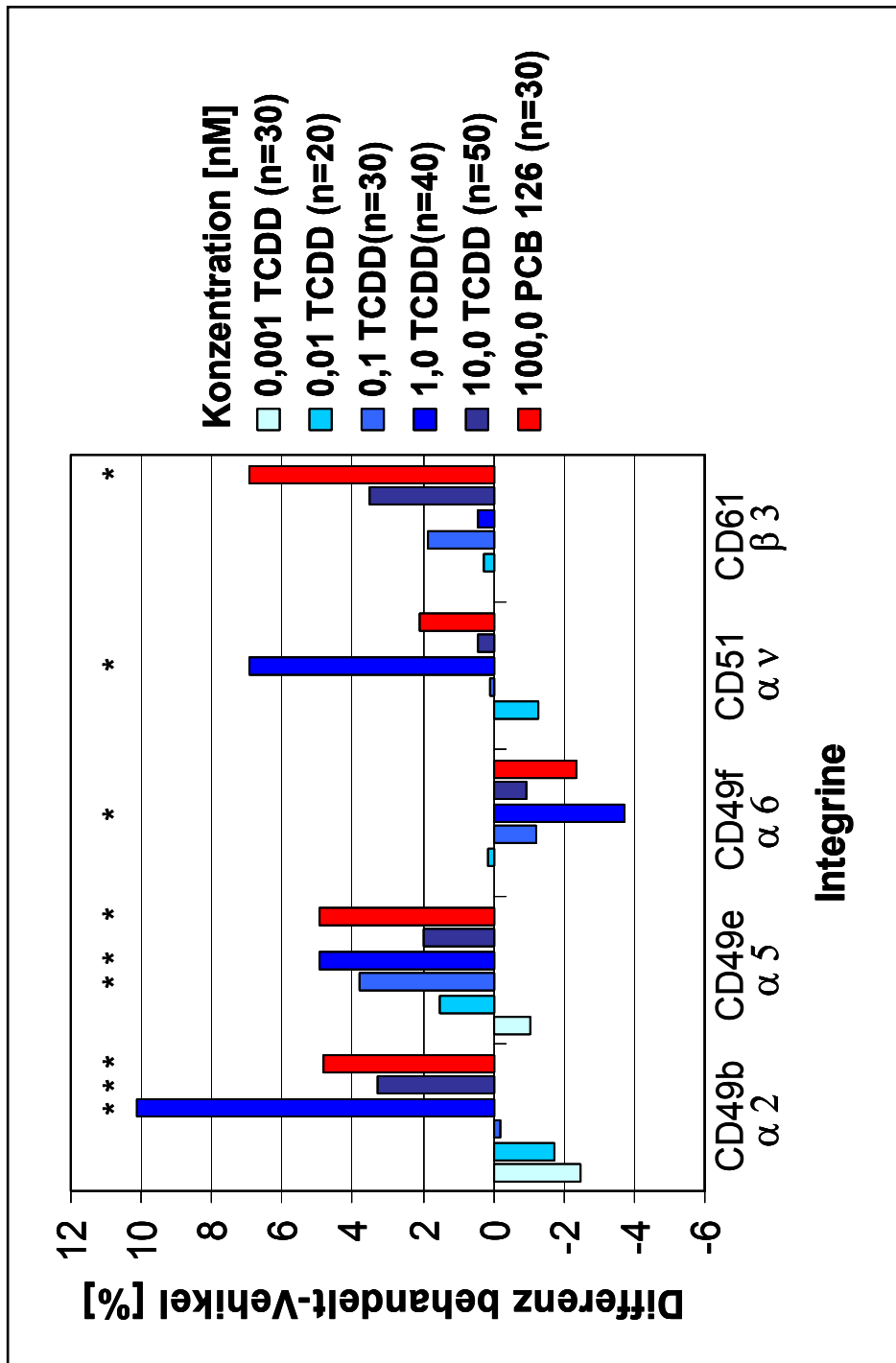


Abbildung 3.5.: Veränderung der Integrinexpression durch die Behandlung mit TCDD. Zum Vergleich wurden einige Kulturen mit PCB 126 in einer Konzentration von 100 nM (entspricht ungefähr 10 nM TCDD) behandelt (* $p < 0,05$ Wilcoxon-Test).

3.6. Expression von Adhäsionsmolekülen vom Immunglobulin-Typ

LFA-3 (CD58)

LFA-3 (CD58) bindet als Rezeptor das auf allen Thymozyten nachweisbare CD2. Unter der Behandlung mit TCDD – und auch mit PCB 126 – veränderte sich der Anteil der CD58 – positiven Zellen (75-90%) gegenüber den mit DMSO behandelten Kontrollen nicht (Abb. 3.6.).

ICAM-I (CD54)

Der Anteil der ICAM-I (CD54) – positiven Thymusepithelzellen nahm unter der Behandlung mit TCDD in 1 nM Konzentration um 19% von 43% auf 62% zu. Unter Behandlung mit 10 nM TCDD beobachteten wir eine geringere doch weiterhin statistisch signifikante Zunahme des Anteils der ICAM-I – positiven Zellen um knapp 5%. Die Behandlung mit 100 nM PCB 126 ergab fast identische Veränderungen mit einer statistisch signifikanten Zunahme des Anteils der ICAM-I – positiven Zellen um gut 5%. Nach Behandlung mit TCDD in Konzentrationen von 1 pM bis 100 pM wurden keine Veränderungen des Anteils der CD54 – positiven Zellen gefunden (Abb. 3.6.).

VCAM-1 (CD106)

VCAM-1 (CD106) war auf rund einem Viertel bis einem Drittel der DMSO – behandelten Thymusepithelzellen nachweisbar. Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Adhäsionsmolekülen führte die Behandlung der Thymusepithelzellkulturen mit TCDD zu einer Abnahme des Anteils der VCAM-1 – positiven Zellen. Diese Abnahme war statistisch signifikant bei TCDD – Konzentrationen von 1 nM (-8%) und 10 nM (-18%, Abb. 3.6.).

Nach Behandlung mit PCB 126 kam es, abweichend von den nach TCDD – Behandlung beobachteten Veränderungen, nicht zu einer Abnahme, sondern zu

einer statistisch signifikanten Zunahme des Anteils der VCAM-1 – positiven Zellen um 7% (Abb. 3.6.).

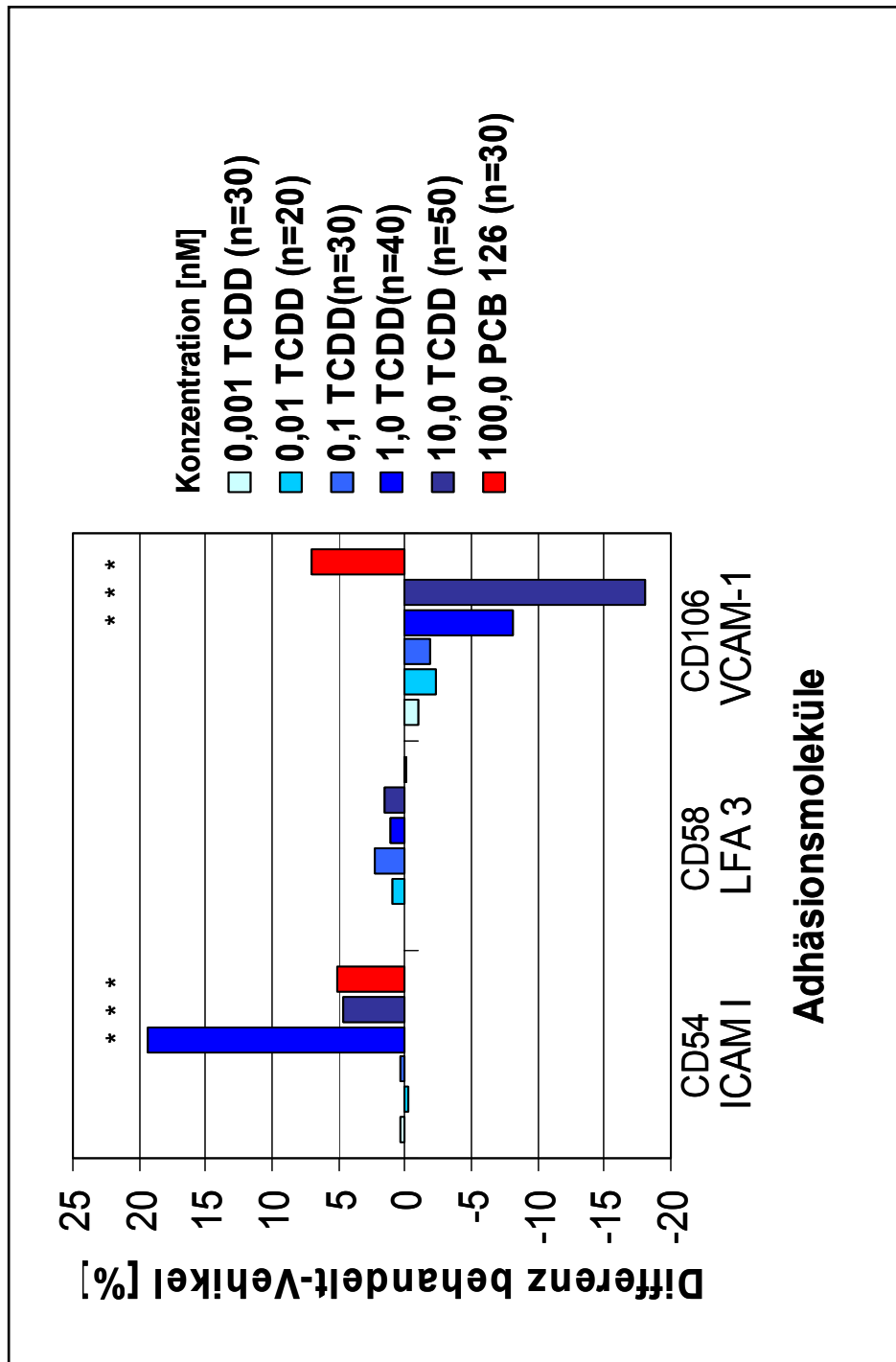


Abbildung 3.6.: Veränderung von Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin – Superfamilie unter der Behandlung mit TCDD (*p<0,05 Wilcoxon-Test).

3.7. Expression der Differenzierungsmarker TE-8 und TE-16

TE-8 und TE-16 sind zwei monoklonale Antikörper, die terminal differenziertes Thymusepithel markieren. In Gefrierschnitten des Thymus färben sie Hassall'sche Körper an. Der Anteil der TE-8- und der TE-16-positiven Zellen erwies sich als äußerst variabel und lag jeweils zwischen 10% und 55% bei den mit DMSO behandelten Kontrollkulturen.

Die Behandlung mit TCDD ergab ab einer 10 pM TCDD-Konzentration einen statistisch signifikanten Anstieg des Anteils der TE-16 – positiven Zellen (+4,4%). Nach Behandlung mit 1 nM TCDD wurden die ausgeprägtesten Effekte mit einer Zunahme des Anteils der TE-16 – positiven Zellen um 14% auf insgesamt 68% beobachtet. In noch höherer TCDD – Konzentration (10 nM) war dieser Effekt nicht so ausgeprägt (+8%). Die Behandlung mit PCB 126 führte zu einer geringfügigen und statistisch nicht – signifikanten Zunahme des Anteils TE-16 – positiver Zellen um 3,4% (Abbildung 3.7.).

Auch der Anteil der TE-8 – positiven Zellen nahm unter der Behandlung mit TCDD zu, jedoch erst bei einer um zwei Größenordnungen höheren Konzentration, also ab 1 nM. Erneut war nach Behandlung mit 1 nM TCDD ein maximaler Effekt mit einer Zunahme des Anteils der TE-8 – positiven Zellen um 16% auf 67% zu beobachten. Nach Behandlung mit 10 nM TCDD oder 100 nM PCB 126 erhöhte sich der Anteil der TE-8 – positiven Zellen weniger ausgeprägt - doch statistisch signifikant - um 9,5% (Abbildung 3.7.).

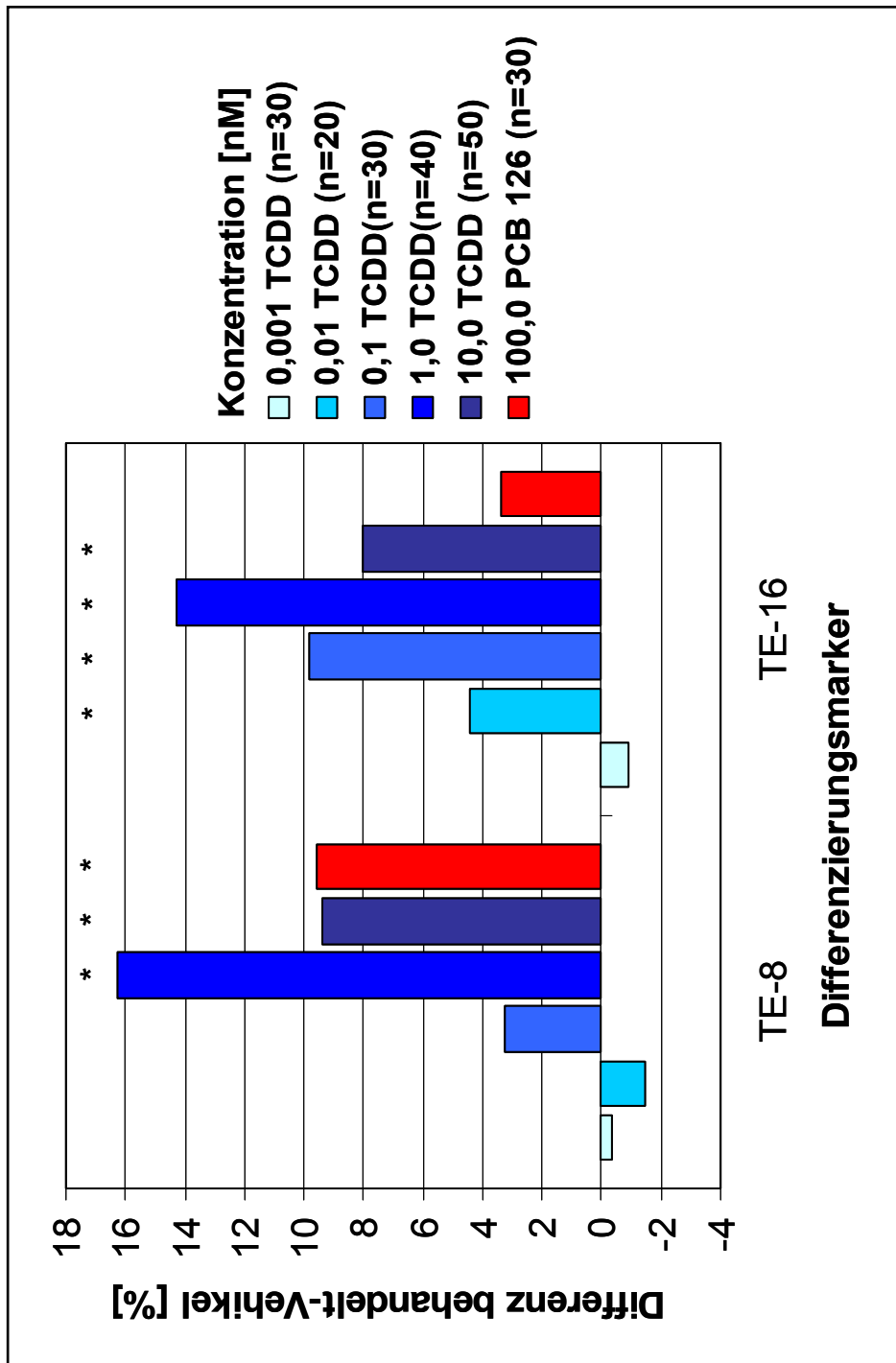


Abbildung 3.7.: Veränderung der terminalen Differenzierung des Thymusepithels nach Behandlung mit TCDD und PCB (* $p < 0,05$ Wilcoxon-Test)