Seite 1

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der

Medizinischen Fakultät Charite – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkung von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin auf die extrazelluläre Matrix im Myokard und Thymus von c57bl Mäusen

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charite - Universitätsmedizin Berlin

von

Anke Ludwig

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Stahlmann

2. Prof. Dr. rer. nat. J. Jankowski
3. Prof. Dr. T. Platzek

Datum der Promotion: 20.11.2009

Für die, die mich immer unterstützt haben, meine Eltern, meine Schwester und meine Lena und Liv

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	8
1.1. Allgemeines zu "Dioxinen"	8
1.1.1. Vorkommen und Entstehung der "Dioxine"	8
1.1.2. Chemische und biologische Eigenschaften der "Dioxine"	8
1.1.3. Toxizität der "Dioxine"	9
1.1.4. Grundgerüst der Dibenzo-p-dioxine	10
1.2. Allgemeines zur Substanz 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD)	
1.2.1. Möglicher Wirkungsmechanismus von 2,3,7,8-TCDD	11
1.2.2. Hypothetische Darstellung des Wirkungsmechanismus von	
2,3,7,8-TCDD auf Fibroblasten	
1.2.3. Der Ah-Rezeptor	
1.2.4. TGF-β	
1.3. Toxische Wirkungen von 2,3,7,8–Tetrachlordibenzo-p-dioxin	14
1.3.1. Wirkungen auf die Leber	
1.3.2. Wirkungen auf das endokrine System	15
1.3.3. Wirkungen auf Sexualhormone und Reproduktionstoxizität	15
1.3.4. Neurotoxizität	
1.3.5. Wirkungen auf die Niere	
1.4. Die extrazelluläre Matrix	
1.4.1. Allgemeine Aspekte	17
1.4.2. Funktionen der extrazellulären Matrix	
1.4.3. Basalmembran und Basallamina	
1.4.4. Einzelne Proteine der extrazellulären Matrix	
1.4.4.1. Ein Überblick über die Kollagene	
1.4.4.1.1. Kollagen Typ I	19
1.4.4.1.2. Kollagen Typ IV	19
1.4.4.2. Fibronektin	19
1.4.4.3. Laminin	
1.5. Der Thymus	
1.5.1. Allgemeines zur Entwicklung des Thymus	
1.5.2. Topographie und Anatomie des Thymus	
1.5.3. Histologie des Thymus	

1.5.3.1. Zelltypen des Thymus	
1.5.3.2. "Thymus nurse cells (TNC)"	
1.5.4. Das extraparenchymale Kompartiment	
1.6. Zur Funktion des Thymus	
1.6.1. Reifung der T-Lymphozyten innerhalb des Thymus	
1.7. Die Rolle der extrazellulären Matrix im Thymus	
1.8. Das Immunsystem als Zielorgan für 2,3,7,8–Tetrachlordibenzo-p-dioxin	
1.9. Histologie des Herzens	
1.9.1. Das Herz als Zielorgan von 2,3,7,8–Tetrachlordibenzo-p-dioxin	
1.10. Fragestellungen	
1.10.1.	
1.10.2	
2 Material und Methoden	
2.1. Tiere und Tierhaltung	
2.2. Behandlung	
2.3. Präparation und Fixierung des Gewebes	
2.4. Immunhistochemische Untersuchungen	
2.4.1. Anfertigung von Gefrierschnitten	
2.4.2. Verfahren der indirekten Immunfluoreszenztechnik	
2.4.3. Antikörper	
2.4.4. Vorbereitung der Immunmarkierung	
2.4.5. Aufbringen der Antikörper	
2.4.6. Fluoreszenzmikroskopie und fotografische Dokumentation	
2.4.7. Morphometrische Bildanalyse	
2.4.8. Statistische Berechnungen der Daten	
3 Ergebnisse	
3.1. Untersuchung der Versuchstiere	
3.2. Gewichte von Thymus und Herz	
3.3. Immunhistochemische Untersuchungen der extrazellulären Matrix in Thymus	
und Herz	
3.3.1. Mögliche Artefakte	
3.3.1.1. Anfertigung der Kryostatschnitte	

3.3.1.2. Durchführung der Färbung	39
3.4. Ergebnisse der Färbungen mit Antikörpern gegen vier Bestandteile der	
extrazellulären Matrix im Thymus	40
3.4.1. Fibronektin	40
3.4.1.1. Die Auswertung der Färbung von Fibronektin	40
3.4.2. Laminin	40
3.4.2.1. Auswertung der Färbung von Laminin	46
3.4.3. Kollagen Typ I	46
3.4.3.1. Die Auswertung der Färbungen von Kollagen Typ I	46
3.4.4. Kollagen Typ IV	53
3.4.4.1. Die Auswertung der Färbung von Kollagen Typ IV	53
3.5. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen im Myokard	61
3.5.1. Allgemeines zur Auswertung	61
3.5.2. Auswertung der Färbungen der einzelnen Bestandteile der extrazellulären Matrix	61
3.5.2.1. Fibronektin	61
3.5.2.2. Laminin	61
3.5.2.3. Kollagen Typ I	69
3.5.2.4. Kollagen Typ IV	69
4 Diskussion	73
4.1. 2,3,7,8-TCDD Exposition und Entwicklung von kardiovaskulären Veränderungen	73
4.1.1. Epidemiologische Daten	73
4.1.2. Experimentelle Daten	74
4.1.2.1. Untersuchungen bei unterschiedlichen Spezies	74
4.1.2.2. Untersuchungen bei Nagetieren	74
4.1.2.3. Untersuchungen bei nicht-menschlichen Primaten	75
4.2. Spezielle histologische Aspekte	76

4.3. Lassen sich auch bei anderen Organen Veränderungen der	
extrazellulären Matrix nachweisen?	
4.3.1. Allgemeine Aspekte einer 2,3,7,8-TCDD Exposition und	
Veränderungen der Funktion des Thymus	
4.3.2. Histologische Aspekte der Thymusatrophie	77
4.3.2.1. Bei Nagetieren	77
4.3.2.2. Bei nicht-menschlichen Primaten und menschlichen Zellen	
4.3.3. Aspekte zum Zeitpunkt der Exposition	
4.3.4. Auswirkungen von 2,3,7,8-TCDD auf die Morphologie des Th	ymus80
4.4. Aspekte zu Auswirkungen der morphologischen Veränderungen im Thy	rmus
4.4.1. Funktion der extrazellulären Matrix im Thymus	
4.4.2. Rezeptoren der extrazellulären Matrix im Thymus	
4.4.3. EZM/ EZM- Rezeptoren vermittelte Interaktionen im Thymus	
4.5. Mögliche Angriffspunkte für 2,3,7,8-TCDD	
5 Zusammenfassung	
6 Literaturverzeichnis	
7 Danksagung	

1 Einleitung

1.1. Allgemeines zu "Dioxinen"

1.1.1. Vorkommen und Entstehung der "Dioxine"

"Dioxine" ist der Überbegriff für eine große Gruppe von Substanzen, die als Nebenprodukte bei der Verbrennung von kohlenstoffhaltigen Verbindungen in Anwesenheit von Chlor-Ionen entstehen können. Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine entstehen darüber hinaus auch in der chemischen Industrie, z. B. bei der Herstellung und Verarbeitung chlorierter organischer Verbindungen sowie durch den Endverbrauch verunreinigter Chemikalien und bei Verbrennungsprozessen, z. B. bei der Verbrennung von Haus- und Sondermüll und Hochtemperaturprozessen. Durch Umstellung von Produktionsverfahren in der chemischen Industrie und zahlreichen Umweltschutzmaßnahmen ist es in den vergangenen Jahren zunehmend gelungen, die Exposition von Arbeitern und Allgemeinbevölkerung deutlich zu reduzieren. Schon früh beschäftigte man sich mit den so genannten "Umweltgiften" der Gruppe der chlorierten Dibenzo-p-dioxine und der chlorierten Dibenzofurane, die ähnliche Eigenschaften und biologische Bedeutung besitzen, und deren toxischer Wirkung. Weltweites Aufsehen erregte ein Unfall im Juli 1976 in der Fabrik Icmesa (Industrie Chimiche Meda Societa Anonima) in Seveso (Italien), bei dem relativ große Mengen des "Dioxins" 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) freigesetzt wurden und einen weiten Bereich in diesem Gebiet kontaminierten. Die dort lebende Bevölkerung wurde zum Teil hohen Konzentrationen an 2,3,7,8-TCDD ausgesetzt (Krüger et al., 1991). Zu diesem Zeitpunkt war das Wissen über die Substanz 2,3,7,8-TCDD noch sehr beschränkt.

1.1.2. Chemische und biologische Eigenschaften der "Dioxine"

Als "Dioxine" bezeichnet man die Gruppe der chlorierten Dibenzo-p-dioxine. Sie bestehen aus zwei Benzolringen, die über Ätherbrücken miteinander verbunden sind. Freie Valenzen sind an acht C-Atomen vorhanden, an denen Chloratome binden können. Durch Variationen der Bindungsstellen und Anzahl der gebundenen Chloratome ergeben sich bei den chlorierten "Dioxinen" 75 Strukturisomere. Als chemisch und biologisch sehr stabile Substanzen mit lipophilem Charakter zeichnen sich "Dioxine" durch eine lange Persistenz in der Umwelt aus, in der sie ubiquitär vorhanden sind. Mit einer biologischen Halbwertszeit von 6-10 Jahren sind sie dafür prädisponiert, sich in der Nahrungskette anzureichern, z. B. in Fleisch, Eiern und Fisch (Dickson, 1993). Aufgrund ihrer Lipophilie reichern sie sich im menschlichen Fettgewebe und damit auch in der Muttermilch in hohem Maße an. Dabei entspricht das Ausmaß der Kontamination des Fettgewebes eines Organismus in etwa dem der Muttermilch. Während der Stillperiode werden die im Fettgewebe der Mutter gespeicherten "Dioxine" mobilisiert und über die Muttermilch an den Säugling abgegeben (Krüger et al., 1991). Seit etwa zwei Jahrzehnten nimmt allerdings die "Dioxin"-Belastung der Umwelt und damit die des Menschen, einschließlich der Muttermilch, deutlich erkennbar ab.

1.1.3. Toxizität der "Dioxine"

Unter den "Dioxinen" besitzt das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) die größte toxische Potenz. Die akute Toxizität dieser Verbindung für verschiedene Arten ist invers und nahezu linear mit dem prozentualen, auf das Gesamtkörpergewicht bezogenen Fettgehalt verlaufend. Insofern besitzt das Körperfettgewebe eine entgiftende Funktion. Eine akute letale Dosis für den Menschen ist nicht bekannt. Die akute letale Dosis für andere verschiedene Spezies ist sehr unterschiedlich und unterscheidet sich teilweise fast um einen Faktor von 10 000 (Tabelle 1). Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Dosierungen liegen weit unter der LD50 für die entsprechende Spezies. Zu den Symptomen einer akuten "Dioxinvergiftung" gehören neben der häufig auftretenden Chlorakne auch konjunktivale Reizerscheinungen, Lipidstoffwechselstörungen, Hepatomegalie mit Leberparenchymschäden. Symptome wie Abmagerung und Kachexie im Rahmen eines so genannten "Wasting-Syndroms", Ödembildung und stark ausgeprägte Lebertoxizität konnten bei Versuchstieren, nicht jedoch beim Menschen beobachtet werden (Rozman, 1990).

Spezies	LD50 von TCDD ($\mu g/kg$ Körpergewicht)			
Meerschweinchen	0,6-2,0			
Ratte	25-60,0			
Maus	114-284			
Affe	70			
Beaglehund	200-300			
Hamster	1157-5051			

Tabelle 1: LD50 von TCDD nach oraler Gabe bei verschiedenen Säugetierspezies. Der Tod der Tiere trat bei bei zunehmendem Gewichtsverlust nach 1-2 Wochen ein (Poiger und Schlatter, 1983).

1.1.4. Grundgerüst der Dibenzo-p-dioxine

Die Abbildung 1 zeigt die Strukturformel des Dibenzo-*p*-dioxins. Es besteht aus zwei Benzolringen, die über zwei Ätherbrücken miteinander verbunden sind. Die Zahlen 1-4 und 6-9 markieren 8 C-Atome, die freie Valenzen zur Bindung von Chloratomen aufweisen. Bei der Verbindung 2,3,7,8–Tetrachlordibenzo-p-dioxin sind vier freie Valenzen mit Chloratomen verbunden.



Abbildung 1: Strukturformel Dibenzo-*p*-dioxin

1.2. Allgemeines zur Substanz 2, 3, 7, 8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD)

Spätestens seit eines Fabrikunfalls am 10. Juni 1976 in Seveso bei Mailand infolge der Überhitzung einer Produktionsanlage ist die Substanz 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin weltweit bekannt. Es handelte sich bei der in Seveso frei gewordenen Substanz um die Verbindung aus der Substanzgruppe der "Dioxine" mit der höchsten toxischen Potenz. Die Anzahl der exponierten Personen wurde auf etwa 750 stark exponierte und 4500 gering exponierte geschätzt; dabei handelte es sich um eine durchschnittlich aufgenommene Menge 100-1000 von 2,3,7,8-TCDD von etwa ng/kg Körpergewicht. Als akute Vergiftungssymptome traten vor allem Haut- und Augenirritationen, Appetitverlust, Übelkeit und Erbrechen, Verdauungsstörungen sowie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Händezittern und Menstruationsstörungen auf. Als Hauptsymptom, das durch die toxische Einwirkung von halogenierten Hydrocarbonverbindungen akut entsteht, gilt die sog. Chlorakne. Im Zusammenhang mit dem Unfall in Seveso wurden 32000 Kinder untersucht, bei denen in unterschiedlichem Ausmaß in 607 Fällen Chlorakne auftrat. Erstmals wurde der Begriff Chlorakne 1899 von Herxheimer bei gegenüber halogenierten Verbindungen exponierten Arbeitern benutzt (Jirasek et al., 1976; Bertazzi et al., 1998). Bei Tieren verursacht 2,3,7,8-TCDD ähnliche Symptome wie beim Menschen, unter anderem hepatozelluläre Schädigungen und Störungen der hepatischen Porphyrinsynthese sowie Atrophie des lymphatischen Systems, vor allem des Thymus. Es resultiert eine Beeinträchtigung sowohl der humoralen als auch der zellulären Immunantwort. Sowohl tierexperimentelle Daten als auch

epidemiologische Beobachtungen beim Menschen sprechen für die kanzerogene Wirkung von 2,3,7,8-TCDD. Die "International Agency for Research on Cancer" (IARC) hat 2,3,7,8-TCDD im Frühjahr 1997 in die Kategorie 1 der "carcinogenic to humans" eingestuft (Mandal, 2005). Eine Nachuntersuchung der beim "Sevesounfall" hoch exponierten Personen ergab Hinweise für eine erhöhte Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen und chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen in dieser Gruppe. Weitere mit einer hohen "Dioxinbelastung" in Verbindung gebrachte Gesundheitsstörungen sind unspezifische Befindlichkeitsstörungen, Störungen des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels, neurologische Symptome (Polyneuropathien, Störungen sensorischer Funktionen, Schwäche der unteren Extremität) und psychische Symptome wie z.B. Depressionen. (Pesatori et al., 1998).

1.2.1. Möglicher Wirkungsmechanismus von 2,3,7,8-TCDD

Durch Diffusion gelangt 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin durch Zellmembranen ins Zytosol (Abbildung 2). Als initialer Vorgang der Wirkungskaskade nach Eindringen in die Zielzelle gilt die Bindung von 2,3,7,8-TCDD an einen zytosolischen Rezeptor, den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor). Dieser ist an ein "heat-shock" Protein gekoppelt (Hsp90). Der Komplex liegt in allen kernhaltigen Zellen vor. Das "heat-shock" Protein scheint die Aufnahme des freien Rezeptors in den Nukleus zu verhindern (Ikuta et al., 1998). Durch Abspaltung des hsp90 entsteht der Ah-Rezeptor-TCDD-Komplex, der nun durch aktiven Transport in den Zellkern gelangen kann. Er bindet hier an ein weiteres Transportprotein (Arnt, "aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator"). Dieser Komplex reagiert mit sog. "xenobiotic responsive elements" der Promoter-/Enhancer-Region von verschiedenen Genen, die empfindlich für den Ah-Rezeptor sind. Es kommt zur Induktion der Transkription dieser Gene, vor allem von Wachstum regulierenden Genen (Okey et al., 1994; Wilson et Safe, 1998). Im Falle der Wirkung auf Fibroblasten wird eine vermehrte Produktion des "transforming-growth-factors ß" (TGFB) diskutiert, der bei der Zielzelle eine Vermehrung der extrazellulären Matrix und eine Abnahme der Aktivität der Matrix-Proteinasen hervorrufen soll (Riecke et al., 2002).

1.2.2. Hypothetische Darstellung des Wirkungsmechanismus von 2,3,7,8-TCDD auf Fibroblasten

In der Abbildung 2 wird eine hypothetische Wirkungskaskade von 2,3,7,8–TCDD auf die Zielzelle dargestellt. Es folgt die Bindung an den zytosolischen Rezeptor unter Abspaltung des Hsp90. Der "TCDD-Ah-Rezeptorkomplex" gelangt in den Zellkern und wird an "Arnt" gekoppelt in die DNA der Zelle aufgenommen. Die Transduktion und Translation "Dioxinempfindlicher" Gene bewirkt eventuell eine Vermehrung des "transforming-growth-factors-ß" (TGF-ß), der bei Fibroblasten eine Vermehrung der extrazellulären Matrix und eine Abnahme der Aktivität von Matrixproteinasen verursacht.



Abbildung 2: Darstellung der möglichen Wirkungskaskade von TCDD in der Zelle eines Organs, an dem sich mögliche toxische Wirkungen manifestieren können, wie zum Beispiel einer Endothel- oder Epithelzelle (Erläuterungen s. Text).

1.2.3. Der Ah-Rezeptor

Der zytosolische Rezeptor, an den gekoppelt 2,3,7,8–TCDD in den Zellkern der Zelle gelangt, wird als Ah-Rezeptor (Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor) bezeichnet. Er gehört zur bHLH/PAS (basic Helix-Loop-Helix/Per-Arnt-Sim) Rezeptorfamlie der Entwicklungsregulatoren und ist an der Regulation von Stoffwechselvorgängen, Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt (Bock et al., 2006). Poland und Glover untersuchten anhand der Thymusatrophie (als empfindlichem Parameter) bei C57Bl Mäusen und DBA Mäusen einen Zusammenhang zwischen der Affinität des Ah-Rezeptors für 2,3,7,8-TCDD und der verabreichten Dosis. Sie beobachteten bei den Mäusen des Stammes C57Bl eine ausgeprägte Atrophie des Thymus, die mit der hohen Affinität des Rezeptors im Thymus korrelierte. Die Thymi der Mäuse des DBA-Stammes, die für 2,3,7,8-TCDD weniger empfindlich sind, atrophierten erst nach Verabreichung wesentlich höherer Dosen (Poland et Glover, 1980). Ah-Rezeptor "knockout" Mäuse waren resistent gegenüber einer 2,3,7,8-TCDD vermittelten Thymusatrophie im Vergleich zu Ah-Rezeptor Wildtypen (Camacho et al., 2004). Die Korrelation zwischen Rezeptoraffinität und biologischer und toxischer Wirkung der Substanz 2,3,7,8-TCDD machen es wahrscheinlich, dass zumindest einige der zahlreichen Wirkungen von 2,3,7,8-TCDD an die Anwesenheit des Rezeptors gekoppelt sind. Thymozytenentwicklung und T-Zell abhängige Immunreaktionen sind in jedem Fall sehr sensitive Ziele der Ah-Rezeptorabhängigen 2,3,7,8-TCDD Toxizität (Nohara et al., 2005).

1.2.4. TGF-ß

TGF-β (transforming-growth-factor β) ist ein multifunktionelles Signalprotein, von dem verschiedene Isoformen bekannt sind. Er wird vor allem von Thrombozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Chondrozyten produziert. Seine Isoformen (TGF-β 1 bis 3) wirken als Wachstumsinhibitoren für viele Zellen, können Wachstum aber auch stimulieren, vor allem bei mesenchymalen Zellen. Sie sind wichtige Induktoren der extrazellulären Matrix sowie der Integrinexpression. TGF-β kann direkt an die Proteine der extrazelluären Matrix binden und durch Bindung an Fibronektin seine Bioaktivität steigern. Im entzündlichen Gewebe wirkt er chemotaktisch und immunmodulatorisch und ist somit ein wichtiger Faktor für die Regulation von Entzündungsprozessen. TGF-β-defiziente Mäuse sterben unmittelbar postnatal an exzessiver Infiltration von inflammatorischen Lymphozyten und Makrophagen in unterschiedlichste Organsysteme (Shull et al., 1992; Piek et al., 1999). Seine Wirkung entfaltet TGF-β über einen eigenen membranständigen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor.

1.3. Toxische Wirkungen von 2,3,7,8–Tetrachlordibenzo-p-dioxin

Unterschieden wird in akute und chronische Toxizität von 2,3,7,8-TCDD mit unterschiedlichen Symptomen. Als sicheres Symptom einer akuten Vergiftung mit "Dioxinen" steht die Chlorakne an erster Stelle. Der Unfall in Seveso resultierte in einem der größten Ausbrüche an "Chloraknefällen", über die jemals berichtet wurde (Baccarelli et al., 2005).

Fünfzehn Jahre nach dem Unfall war bei den exponierten Personen eine erhöhte Sterblichkeit aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen, chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen und Diabetes mellitus nachzuweisen. In tierexperimentellen Studien sind u.a. Immuntoxizität, Reproduktionstoxizität, Teratogenität und Karzinogenität nachgewiesen. Es konnten Effekte auf die Haut, Leber und Schilddrüse, den Fett- und Glucosestoffwechsel sowie das Gefäßsystem nachgewiesen werden (Pesatori et al., 1998).

1.3.1. Wirkungen auf die Leber

Als toxische Auswirkungen auf die Leber wurden in zahlreichen Studien eine Verfettung der Leberzellen, Entzündungszeichen und nekrotische Prozesse beschrieben. So zeigten sich nach der einmaligen Behandlung von Rhesusaffen mit 5 µg TCDD/kg KG Körpergewicht lichtmikroskopisch fettige Infiltration und leichtgradige Nekrosen. Bei Ratten entstanden nach Behandlung mit 10 µg TCDD/kg KG Hepatozytenschwellungen und Nekrosen (Gupta et al., 1973). Shen und Mitarbeiter beobachteten bei Mäusen der Stämme C57Bl und DBA eine mäßige Leberverfettung ohne Entzündungszeichen oder Nekrosen nach Behandlung mit 3 µg TCDD/kg KG. Bei Erhöhung der Dosis auf 150 µg TCDD/kg KG traten zusätzlich Entzündungszeichen und Nekrosen auf. Bei Mäusen des DBA-Stammes beobachteten sie hepatozelluläre Entzündungen und Nekrosen, aber keine Verfettung der Leber. In der Sensitivität für die Wirkung des 2,3,7,8-TCDD spielte offensichtlich auch hier die Empfindlichkeit des Ah-Rezeptors in Bezug auf die Bindung von 2,3,7,8-TCDD eine Rolle (Shen et al., 1991). Mit dem Ziel, Gene zu identifizieren, die an einer TCDD-vermittelten Hepatotoxizität beteiligt sein könnten, untersuchten Yoon und Mitarbeiter Ah-Rezeptor "knockout" Mäuse (AhR-/-) und Wildtypen (AhR+/+) nach einmaliger Injektion von 100 µg TCDD/kg KG i.p. (intraperitoneal). Sie beobachteten bei den Wildtypen eine signifikante Zunahme der Lebergewichte. Zusätzlich fanden sie heraus, dass die Expression von 51 Genen verändert war. Die meisten der untersuchten Gene waren mit chemotaktischen Prozessen, Entzündungsreaktionen, Karzinogenese, Akut-Phase-Reaktionen, Zellmetabolismus und proliferation sowie Signal-transduktion assoziiert (Yoon et al., 2006).

1.3.2. Wirkungen auf das endokrine System

Von den vielfältigen Auswirkungen, die 2,3,7,8-TCDD auf das Hormonsystem, unter anderem auf Sexualsteroide, Corticosteroide und Schilddrüsenhormone haben kann, seien nur einige erwähnt. Bei Ratten wiesen Potter und Mitarbeiter eine Reduktion der T4-Konzentration im Serum nach, zusätzlich einen Abfall der Insulin- und Glucosekonzentration im Blut. Die Tiere bekamen 45 µg TCDD/kg KG verabreicht (Potter et al., 1983). Nishimura und Mitarbeiter untersuchten das Serum von "Ah-Rezeptor positiven" und "Ah-Rezeptor negativen" Mäusen bezüglich einer Vermehrung der Hormonkonzentration von T4 (Thyroxin) und beobachteten eine Reduktion des freien T4 bei "Ah-Rezeptor positiven" Mäusen, jedoch keine Effekte bei "Ah-Rezeptor negativen" Mäusen und vermuteten eine Zusammenhang zwischen 2,3,7,8-TCDD-Toxizität und sensiblem Ah-Rezeptor (Nishimura et al., 2005). Es wurden Störungen im Rückkopplungsmechanismus zwischen den Hormonkonzentrationen im Plasma und der Hypophyse beschrieben, die z.B. das Zusammenspiel von GnRH-LH und Testosteron betrafen (Bookstaff et al., 1990). Mit 50-100 µg TCDD/kg KG behandelte Ratten hatten signifikant erhöhte Gastrinwerte im Serum (Mably et al., 1990; Theobald et al., 1991). Wurde Ratten einmalig 50 µg TCDD/kg KG verabreicht, erhöhten sich die Adrenocorticotropinspiegel im Plasma signifikant (Bestervelt et al., 1993).

1.3.3. Wirkungen auf Sexualhormone und Reproduktionstoxizität

Mocarelli und Mitarbeiter stellten fest, dass Eltern, die 1976 in Seveso hohen Dosen an 2,3,7,8-TCDD ausgesetzt waren, mehr weibliche als männliche Nachkommen zeugten (Mocarelli et al., 1996). 1992 untersuchten De Vito und Mitarbeiter Östrogenrezeptoren bei weiblichen Ratten und beschrieben eine verminderte Anzahl in verschiedenen Organen nach 2,3,7,8-TCDD Exposition (De Vito et al., 1992). Dagegen wird nach 2,3,7,8-TCDD-Exposition bei männlichen Ratten eine verminderte Testosteronkonzentration im Blut beschrieben (Bookstaff et al., 1990). Beim ausgewachsenen Tier ist die Spermatogenese vermindert und eine Feminisierung erkennbar (Mably et al., 1992 a und b). Auch Choi und Mitarbeiter wiesen bei Ratten nach einmaliger inraperitonealer Injektion von 50 µg TCDD/kg KG verminderte Testosteronspiegel im Serum und erhöhte Östradiol-, FSH-(follikelstimulierndes Hormon) - und LH (luteinisierendes Hormon) -Spiegel nach sowie histologische Veränderungen im Hoden (Choi et al., 2008).

1.3.4. Neurotoxizität

Halogenierte aromatische Hydrocarbone wie Dibenzo-p-dioxine haben Auswirkungen auf neurologische Funktionen. Welche zellulären Grundlagen dafür verantwortlich sind, ist nicht vollständig geklärt. Es wurden Untersuchungen bezüglich der interzellulären Kommunikation von Neuronen und Astroglia über "gap junctions" gemacht und Störungen durch 2,3,7,8-TCDD-Exposition in diesen Prozessen beobachtet (Legare et al., 2000). 2,3,7,8-TCDD kann bei Astrogliazellen Veränderungen der Ca²⁺-Konzentration bewirken und eine Abnahme der Gluthationsynthetase und von Glutathion sowie Störungen der pH-Regulation (Legare et al., 1997). Die Effekte, die 2,3,7,8-TCDD auf die geistige Entwicklung ausüben kann, könnten auch durch eine Beeinflussung des Schilddrüsenhormonstoffwechsels oder dopaminerger Systeme erklärt werden. Es wurden einige dieser Effekte zum Beispiel bei Nagetieren von Brouwer und Mitarbeitern beschrieben (Brouwer et al., 1995).

1.3.5. Wirkungen auf die Niere

Eine Hydronephrose ist eine häufige Abnormalität der Nieren nach 2,3,7,8-TCDD-Exposition. Abbott und Mitarbeiter untersuchten fetale Mäusenieren hinsichtlich möglicher Ursachen für die Entstehung der Hydronephrose nach Verabreichung von 2,3,7,8-TCDD. Sie fanden in immunhistochemischen Untersuchungen heraus, dass es zu einer verminderten Anreicherung von Fibronektin, Laminin und Kollagen Typ IV in den Basallaminae der Bowman'schen Kapseln gekommen war und stellten die Vermutung auf, dass diese ultrastrukturellen Veränderungen eine Proteinurie verursachten. Proteinurie ist unter anderem ein Zeichen für eine unreife Filtrationsbarriere in der sich entwickelnden fetalen Niere. Fetale C57Bl Mäuse, deren Mütter mit Dosen bis zu 12 µg TCDD/kg KG behandelt worden waren, entwickelten schmalere und verdrehte Ureteren im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe. Lichtmikroskopisch zeigte sich eine Hyperplasie des ureteralen Epithels mit der Folge einer Hydronephrose und Hydroureteren (Abbott et al., 1987). Aragon und Mitarbeiter untersuchten C57Bl Mäuse nach Verabreichung von bis zu 6 µg TCDD/kg KG bezüglich einer Veränderung der kardialen Morphologie und Genexpression mittels PCR (polymerase-chainreaction). Sie machten neben ihren Ergebnissen in Bezug auf Herzmorphologie und Genexpression die Beobachtung, dass bei behandelten Tieren eine leichtgradige Hydronephrose auftrat und die Nieren in ihrer Morphologie verändert waren. Die kardiovaskuläre Dysfunktion könnte ein Zusammenspiel mit morphologischen Veränderungen der Niere sein (Aragon et al., 2008).

1.4. Die extrazelluläre Matrix

1.4.1. Allgemeine Aspekte

Die extrazelluläre Matrix, auch als Interzellularsubstanz bezeichnet, besteht aus kollagenen Fasern, aus retikulären und elastischen Fasern, außerdem amorpher Grundsubstanz, die sich aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und interstitieller Flüssigkeit zusammensetzt. Proteoglykane machen den Hauptbestandteil des interstitiellen Bindegewebes aus. Es handelt sich um sehr große Moleküle mit einem Proteinanteil, der sich als langer, fadenförmiger, zentraler Kern ("core protein") darstellt und der mit unterschiedlich gebauten Glykosaminseitenketten besetzt ist. Zur Gruppe der Proteoglykane zählen unter anderem Aggrecan (Knorpel), Perlecan (Basalmembran), Vesican (Gefäßwand) und Decorin (ubiquitär im kollagenen Bindegewebe vorkommend). Ihre Funktion, vor allem die der Glykosaminoglykane, besteht hauptsächlich darin, an der Induktion von Kalzifizierung und Wundheilung mitzuwirken und zur Regulation des Wasserbestandes des Bindegewebes beizutragen. Außerdem binden in der extrazellulären Matrix an den Proteoglykanen Wachstumsfaktoren, zum Beispiel "basic fibroblast growth factor". Glykoproteine, die im Gewebe vorliegen, werden als Strukturproteine bezeichnet. Als wichtige Strukturglykoproteine gelten neben Vitronektin, Tenaskin, Osteonektin und Thrombospondin, Laminin und Fibronektin. In allen Fällen dienen diese Glykoproteine der Zellhaftung als adhäsive Glykoproteine, da sie mit Adhäsionsrezeptoren (Integrinen) in der Plasmazellmembran verbunden sind. Durch diese Integrine, die Signale in die Zelle hinein vermitteln können, kann die extrazelluläre Matrix Einfluss auf grundlegende Zellphänomene wie Proliferation, Differenzierung und Migration nehmen (Utsumi et al., 1991; Junqueira et Caneiro, 1996; Lagrota-Candido et al., 1996; Savino et al., 2003; Savino et al., 2004).

1.4.2. Funktionen der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix nimmt Einfluss auf die Entwicklung, Regulation und Funktion fast aller Zellen im Organismus. Die Matrixkomponenten nehmen einerseits durch intrazelluläre Signalvermittlung durch Integrine Anteil an der Regulation von Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung der Zellen; andererseits auch durch Interaktionen mit Wachstumfaktoren, die Einfluss auf Zellproliferation, Differenzierung und Zellmigration nehmen (Schwartz et al., 1995). Der Glykosaminoglykananteil an der extrazellulären Matrix ist wichtig für die Kontrolle des Transportes von Molekülen durch die Basallamina und Erstellung einer Struktur des Gewebes für die Zellbewegung. Schließlich tragen die Komponenten der extrazellulären Matrix zur Beständigkeit und Stabilität von Geweben bei (Uitto et al., 1996).

1.4.3. Basalmembran und Basallamina

Basalmembranen und Basallaminae gehören zur extrazellulären Matrix. Sie bilden Zellscheiden und befestigen Zellen als Haftstrukturen an ihrer Umgebung. Sie verhindern so eine Zellwanderung. Andererseits tragen sie zur Ausbildung und Stabilisierung von Organstrukturen bei und beeinflussen Wachstum, Differenzierung und Regeneration von mit ihnen verbundenen Zellen. Die einzelnen Schichten der Basalmembran sind durch Verknüpfung ihrer einzelnen Bestandteile (Glykoproteine und Proteoglykane) miteinander verbunden. Die Bestandteile können in die Gruppen der kollagenen Bestandteile und nichtkollagenen Bestandteile eingeteilt werden. Als kollagene Bestandteile kommen in der Lamina densa typischerweise Kollagen Typ IV, in der Lamina fibroreticularis Kollagen Typ III, in der Lamina propria Kollagen Typ I vor. Glykoproteine sind als nicht-kollagene Bestandteile für die Haftung der die Basalmembran umgebenden Zellen zuständig und für die Verknüpfung der Basalmembran mit der Interzellularsubstanz. Das wichtigste Glykoprotein der Basalmembran ist Laminin. Es ist basalmembranspezifisch. Laminin ist einerseits mit Lamininrezeptoren (Integrinen) der Plasmamembran verbunden, andererseits mit Kollagen Typ IV in der Lamina densa. Neben Laminin kommen Tenascin, Thrombospontin und Fibronektin als Haftproteine in der Basalmembran vor. Laminin ist auch auf Zelloberflächen von Zellen ohne Basalmembranen oder Basallaminae vertreten und ermöglicht hier eine zeitweilige Zellhaftung. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Zellwanderung. Basallaminae bilden die Laminae densae der Basalmembran. Sie treten jedoch auch an der Oberfläche vieler Zellen als eigenständige Einheit auf, z.B. von Herzmuskelzellen, Nervenzellen und Glia. Basallaminae können durch Ankerfibrillen an Kollagenfasern einer umgebenden Lamina propria befestigt sein (Junqueira et Caneiro, 1996).

1.4.4. Einzelne Proteine der extrazellulären Matrix

1.4.4.1. Ein Überblick über die Kollagene

Kollagene Fasern machen den größten Anteil der Faserarten des Bindegewebes aus. Nach ihren unterschiedlichen Strukturen werden sie in vier Gruppen eingeteilt (Kollagen Typ I bis IV). Sie unterscheiden sich in ihrem Vorkommen im Organismus, in ihrem Syntheseort und ihrer Funktion.

1.4.4.1.1. Kollagen Typ I

Kollagen Typ I ist das im Organismus am häufigsten vorkommende Kollagen. Lichtmikroskopisch ist es als typische Kollagenfaser darstellbar (dick und dicht gepackt als Faserbündel) und unter anderem in der Dermis, in Faszien und in Organkapseln zu finden. Als Syntheseort gelten Fibroblasten, Chondroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten. Es zeichnet sich durch sehr starke Zugfestigkeit aus und versieht den Organismus mit einem Gerüst mit Stütz- und Haltefunktion und so mit einem geeigneten Umfeld für Zellen zur Zellmigration, Differenzierung und Anhaftung.

1.4.4.1.2. Kollagen Typ IV

Es ist unter den Kollagenen der Basalmembran das häufigste und wird deswegen auch als Basalmembrankollagen bezeichnet. In der Basalmembran kommt es vor allem in der Lamina densa (Basallamina) vor. Als Syntheseort dienen endotheliale und epitheliale Zellen. Kollagen Typ IV formt in der Basalmembran eine Netzwerkstruktur, die indirekt über die Proteine Nidogen und Entacin mit Laminin interagiert und zusätzlich direkt an Laminin bindet. Es stellt eine Permeabilitätsbarriere dar und ist für die Zellhaftung bestimmter Zellen zuständig. Kollagen Typ IV liegt nicht in Form von Fibrillen oder Fasern vor, sondern geknäult.

1.4.4.2. Fibronektin

Fibronektin ist ein hochmolekulares Glykoprotein (Molekulargewicht etwa 450 Dalton), das von verschiedenen Zellen wie Hepatozyten, Fibroblasten, Myoblasten, Epithel- und Gliazellen und Chondrozyten gebildet wird. Es ist in nicht-gelöster Form Bestandteil der extrazellulären Matrix und in gelöster Form Bestandteil vom Blutplasma. Seine vielfältigen Funktionen setzen sich aus Zelladhäsion und Organisation des Zytoskelettes zusammen. Außerdem wirkt es sich auf die Zellmorphologie, Migration und Differenzierung von Zellen aus (Kreiß et al., 1999). Fibronektin setzt sich aus zwei nahezu identischen, 80 nm langen Peptidketten zusammen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die beiden Ketten sind zu 90 % aus drei verschiedenen, sich wiederholenden homologen Peptidsequenzen aufgebaut. Jede Untereinheit ist auf einen Zelloberflächenintegrinrezeptor spezialisiert oder Bestandteile der extrazellulären Matrix. Fibronektin fördert die Adhäsion und Ausdehnung vieler Zelltypen durch die Bindung an seine unterschiedlichen Integrin-Rezeptoren, die zusätzlich Einfluss auf die Zelladhäsion nehmen (Hynes, 1990 und 1992; Schwartz et al., 1995; Mosher, 1998).

1.4.4.3. Laminin

Laminine repräsentieren eine Proteinfamilie, die vor allem in Basalmembranen und mesenchymalen Geweben zu finden ist. Während der Organogenese können sie in epithelialen Geweben nachgewiesen werden. Laminine sind mit Nidogen und Kollagen Typ IV Bestandteil der Netzwerkstruktur von verschiedenen Zellen, wie z.B. Epithelzellen und Leukozyten. Die Verbindung zwischen Laminin und Kollagen erfolgt über Nidogen. Seine Funktion als Zelladhäsionskomponente und seine Rolle in der Migration und Differenzierung von Epithelzellen werden durch Bindung an "Integrin- und nicht-Integrin-Rezeptoren" reguliert (Koshikawa et al., 2000). Kim und Mitarbeiter beschrieben ein Einwirken von Laminin auf die Entwicklung der Thymozyten (Kim et al., 2000).

1.5. Der Thymus

1.5.1. Allgemeines zur Entwicklung des Thymus

Der Thymus entwickelt sich aus embryonalen Schlundtaschen und Kiemenfurchen. Er ist ontogenetisch ein branchiogenes Gewebe mit entodermaler (dritte und vierte Schlundtasche) und ektodermaler (Zervikalvesikel) Herkunft (Hammar, 1911). Die Fusion von entodermalen, später innen gelegenen Anteilen, und ektodermalem Anteil des Thymus findet bei Mäuseembryonen am 11. Gestationstag statt. Dabei umschließen ektodermale Zellen den entodermalen Zellanteil vollständig. Am 11. Gestationstag besteht der Thymus des Mäuseembryos ausschließlich aus Thymusepithelzellen ektodermaler und entodermaler Herkunft. Nach der Geburt dringen Prothymozyten aus dem Knochenmark in den Thymus ein. Aus diesen Zellen entwickeln sich unter starker Proliferation Lymphozyten, die die Maschen zwischen den Thymusepithelzellen füllen und erweitern. Manche Epithelzellen in der Rinde scheinen Thymozyten vollständig zu umschließen, sie werden als "thymic nurse cells" bezeichnet (Junqueira et Caneiro, 1996).

1.5.2. Topographie und Anatomie des Thymus

Der Thymus befindet sich im vorderen oberen Mediastinum oberhalb des Herzbeutels. Er liegt vor der Vena brachiocephalica und der Vena cava superior. Seine lateralen Begrenzungen werden von den mediastinalen Blättern beider Lungenpleurae gebildet. Ventral grenzt er direkt an das Sternum. Vollausgebildet reicht das Organ vom Unterrand der Schilddrüse bis in den Bereich des vierten Intercostalraumes. Der Thymus gehört zu den primären Lymphorganen. Er enthält keine Lymphfollikel und keine afferenten Lymphbahnen. Nach Abschluss der Wachstumsphase des Organismus beginnt sich das Thymusgewebe umzuwandeln und das Organ wird mehr und mehr von Fettzellen durchsetzt (Thymusinvolution). Mit Abschluss der Thymusinvolution ist nur noch der Thymus-Restkörper vorhanden.

1.5.3. Histologie des Thymus

Der Thymus setzt sich aus intraparenchymalem Kompartiment, Kortex und Medulla, und dem extraparenchymalem Kompartiment, dem Bindegewebe der Septen und der darin enthaltenen Gefäße zusammen. Die mesenchymalen Septen ziehen von der Rinde in das Mark und erstellen damit eine organtypische Pseudolobulierung. Sie bestehen unter anderem aus kollagenen Fasern und enthalten arterielle und venöse Gefäße sowie Lymphkapillaren.

1.5.3.1. Zelltypen des Thymus

Die Unterscheidung der verschiedenen Thymusepithelzellen erfolgt anhand ihrer embryonalen Herkunft, ihrer unterschiedlichen Zellmorphologie und ihrem Vorkommen innerhalb des Thymusparenchyms.

1. Rinde:

Sie enthält vorwiegend kleine Lymphozyten, die eine zusammenhängende Schicht bilden. Hier werden Lymphozyten neu gebildet. Viele Zellen gehen zugrunde, bevor sie freigesetzt werden. Sie werden durch Makrophagen abgebaut. Retikulumzellen hüllen die Lymphozyten ein und bilden um Blut- und Lymphgefäße durch ihre Desmosomen ein dichtes Netzwerk. Entlang der Blutgefäße verläuft eine epitheliale Grenzschicht. Damit ist das Rindenparenchym von den Gefäßen getrennt.

2. Mark:

Hier herrschen Lymphoblasten, Lymphozyten und epitheliale Retikulumzellen vor. Zwischen interdigitierenden Retikulumzellen befinden sich T-Lymphozyten. Für das Mark typisch sind die Hassall'schen Körperchen. Sie bestehen aus konzentrisch angeordneten epithelialen Retikulumzellen. Das Zentrum der Hassall'schen Körperchen besteht meist aus Zellresten. Ein vermehrtes Vorkommen hängt meist mit einer gesteigerten Abwehrtätigkeit des Organismus zusammen. Medulläre Epithelzellen bilden mit einer Vielzahl von langen Zytoplasmaausläufern mit Desmosomen ein Netzwerk, durch welches ein enger Kontakt zwischen den einzelnen Epithelzellen hergestellt wird.

Gemeinsam bilden alle diese Zellen durch ihre zytoplasmatischen Ausläufer ein dreidimensionales Netzwerk, in dem sich neben Makrophagen auch lymphoide Rundzellen befinden. So kommt die Infrastruktur des Thymus zustande, die für Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten von entscheidender Bedeutung ist (Toepfer, 1993).

1.5.3.2 "Thymus nurse cells" (TNC)

Ein spezieller im Thymus befindlicher Zelltyp sind "thymus nurse cells". Sie gehören zu den Epithelzellen des Thymus und finden sich sowohl in den äußeren Schichten der Rinde als auch im Thymusmark. Die sich entwickelnden Thymozyten wandern während ihrer Differenzierung vom Kortex in die Medulla und haben dabei immer engen Kontakt zu den Epithelzellen. In "TNC-Komplexen" befinden sich bis zu 200 Thymozyten, sie bilden so eine multizelluläre lymphoepitheliale Struktur (Villa-Verde et al., 1995). Samms und Mitarbeiter wiesen als dritte Zellart in diesen Strukturen Makrophagen nach, die mit den Thymozyten innerhalb der Strukturen interagieren (Samms et al., 2001). TNC-Komplexe sollen eine wichtige Rolle in Selektion und Differenzierung und Proliferation der Thymozyten spielen (Villa-Verde et al., 1995; Ezaki et Uehara, 1997). Gab man z. B. TNC-spezifische Antikörper zu fetalen Thymuskulturen, bewirkte das eine bis zu 80%ige Abnahme der doppelt positiven Thymozyten. "TNC-Komplexe" scheinen für die Selektion der Thymozyten eine entscheidende Rolle zu spielen (Guyden et al., 2003).

1.5.4. Das extraparenchymale Kompartiment

Zum extraparenchymalen Kompartiment gehören zum einen die Blut- und Lymphgefäße des Thymus, zum anderen das mesenchymale Bindegewebe, in das sie eingebettet sind. Eine innere und äußere Basalmembran begrenzen es, dazwischen befindet sich ein Netzwerk aus retikulären und kollagenen Fasern, zusätzlich fibrozytenähnliche Zellen. Im septalen und medullären Bereich sind die perivaskulären Spalträume weit und mit Lymphozyten ausgefüllt. Im Kortex sind sie eher schmal und die Dichte an lymphatischen Zellen geringer. Die perivaskulären Spalträume sind wichtige Bestandteile der Blut-Thymus-Barriere. Die Blut-Thymus-Schranke schützt das Thymusgewebe vor dem Einfluss von Makromolekülen, die als Antigene hier nicht zur Wirkung kommen dürfen (Toepfer, 1993).

1.6. Funktion des Thymus

Der Thymus gehört zu den primären lymphatischen Organen. Thymektomierte neugeborene Mäuse entwickeln ein "Kachexie-ähnliches" Krankheitsbild mit Diarrhöen, Reduktion der Zellzahl von lymphatischen Zellen und Verlust der Fähigkeit, homologe Hauttransplantate abzustoßen, das "postthymectomy wasting syndrom" (Miller, 1961). Bei ausgewachsenen Mäusen, denen der Thymus operativ entfernt wurde, waren erhöhte Neigung zu Autoimmunerkrankungen und eine relative Lebensverkürzung zu beobachten. Eine wichtige Funktion des Thymus ist auf zellulärer Ebene zu finden: Im Thymus findet die Antigen unabhängige Differenzierung von lymphatischen Vorläuferzellen zu immunkompetenten T-Lymphozyten statt (Toepfer, 1993).

1.6.1. Reifung der T-Lymphozyten innerhalb des Thymus

Aus dem Knochenmark, dem Dottersack und der Leber gelangen Vorläuferzellen über den Blutweg in den Thymus. Dort findet sowohl die Proliferation als auch die Antigen-unabhängige Differenzierung zu reifen T-Lymphozyten statt. Bei der Maus besiedeln die lymphatischen Vorläuferzellen das Thymusgewebe zwischen dem 10. und 11. Gestationstag. Die Vorläuferzellen, die in dieser Zeitspanne den Thymus erreichen proliferieren und differenzieren innerhalb von zwei bis drei Tagen und verlassen das Organ, gefolgt von einem zweiten Schub Vorläuferzellen, die sich bis zur ersten Woche nach der Geburt im Thymus aufhalten. In der zweiten Woche postpartal erfolgt eine sehr hohe Proliferationsrate in Thymusmark und Kortex. Auch die darauf folgende Differenzierung findet erheblich beschleunigt statt. Kurz darauf können die T-Lymphozyten in den sekundären lymphatischen Organen nachgewiesen werden. Von Thymusepithelzellen werden chemotaktisch wirksame Faktoren produziert und freigesetzt, die eine migrationsfördernde Wirkung auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen ausüben. Eine bedeutende Rolle bei der Reifung der T-Lymphozyten spielen Thymusepithelzellen und Interzellularsubstanz. Die präthymischen T-Vorläuferzellen erreichen im Thymus zuerst den Thymuskortex und vollziehen ihren Reifungsprozess während der Migration in das Thymusmark. Während ihrer Reifung im Thymus lernen die Zellen, körperfremde und körpereigene Substanzen zu unterscheiden. Zu diesem Prozess soll der direkte enge Zellkontakt beitragen. Es wurde beschrieben, dass Thymusepithelzellen die Fähigkeit besitzen, Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, die diesen Vorgang induzieren (Britz et al., 1984). Eine weitere Eigenschaft der Thymusepithelzellen ist ihre Fähigkeit, Hormone zu produzieren und zu sezernieren. Den Sekretionsprodukten soll eine Rolle bei Reifung und Differenzierung zukommen. Bei ihren Reifungsprozessen benötigen die sich entwickelnden Thymozyten interzelluläre Interaktionen mit Endothelzellen, Thymusepithelzellen, Fibroblasten, Marophagen und dendritischen Vorläuferzellen. Unreife Thymozyten sind dabei über Adhäsionsmoleküle mit Liganden an den Zellen des so genannten "microenviroments" verbunden.

1.7. Die Rolle der extrazellulären Matrix im Thymus

Die T-Zell–Differenzierung ist der Prozess im Thymus, bei dem sich, aus dem Knochenmark kommende Vorläuferzellen zu reifen funktionsfähigen T–Lymphozyten entwickeln. Während ihres Reifungsprozesses entwickelt sich das Gen für den T-Zell-Rezeptor (van Ewijk, 1991).

Während ihrer Differenzierung findet eine Migration der Thymozyten vom Kortex zur Medulla statt; von dort werden sie anschließend an eine Selektion in die Peripherie freigegeben. Die molekulare Basis für den Migrationsprozess beinhaltet eine Interaktion der Thymozyten mit den Membranrezeptoren der Zellen des Stützgewebes. Es gibt zwei Modelle für diesen Prozess:

- 1. direkt: durch Zell-zu Zell-Kontakt,
- 2. indirekt: über die Substanzen der extrazellulären Matrix, die eine Brückenfunktion übernimmt.

Die Bewegung der Thymozyten während ihrer Migration mit Hilfe der Moleküle der extrazellulären Matrix, die Verbindungen zwischen den Thymozyten und Membranrezeptoren der Zellen der unmittelbaren Umgebung bilden, bezeichnet man als indirekten Weg. Dieses Modell trat in den Mittelpunkt von Diskussionen, seit sich zeigte, welchen Einfluss die Matrix auf Migration und Aktivität von Thymozyten hat. extrazelluläre Durch immunhistochemische Untersuchungen ist die Lokalisation verschiedener Matrixmoleküle unter anderem bei der Maus ermittelt worden (Berrih et al., 1985). Im Folgenden wird speziell auf Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV, Fibro-nektin und Laminin eingegangen. Das Vorkommen von Kollagen Typ I bleibt im Thymus auf die Septen beschränkt. Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronektin finden sich in hohem Maße in der Basalmembran und formen innerhalb des Thymusmarks ein feines Netzwerk. Die Verteilung dieser Moleküle ist im sich entwickelnden Organ nicht identisch mit der im fetalen oder adulten Thymus. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass dem Netzwerk der extrazellulären Matrix eine besondere Bedeutung im Zusammenhang mit Migration und Differenzierung des reifenden Thymus zukommt (Savino et al., 1993). Im alternden Thymus besteht ein drittes Muster der Anordnung von Matrixmolekülen, die nun dicke Fasern in Kortex und Medulla ausbilden. Diese histologische Veränderung korreliert mit der abnehmenden Funktion eines atrophischen Thymus (Savino, 1990). Wenn Proteine der extrazellulären Matrix für die Zellaktivitäten des Thymus eine Rolle spielen, müssen Thymozyten Rezeptoren für diese Moleküle besitzen. Der erste gut untersuchte Rezeptor für Matrixmoleküle auf Thymozyten ist CD44 (CD = cluster of differentiation). Er bindet Hyaluronsäure und Kollagen Typ IV und befindet sich auf unreifen Thymozyten der Rindenregion sowie auf aktivierten peripheren T-Lymphozyten. Ein weiterer wichtiger Rezeptor ist der Fibronektinrezeptor, der auf allen Thymozyten als VLA4 präsentiert wird (Cardarelli et al., 1987). Unreife kortikale Strukturen weisen eine höhere Anzahl dieser Rezeptoren auf als reife medulläre Zellen (Pilarski et al., 1991). Ebenfalls auf unreifen Thymozyten befindet sich das Integrin $\alpha 6\beta 4$, das den Laminin-Rezeptor darstellt. Die Lamininexpression und die Expression des entsprechenden Rezeptors, sind am höchsten im fetalen Thymus. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression dieses Rezeptors auf Thymusepithelzellen parallel zur

Thymozytenreifung verläuft. Die Thymozytenproliferation lässt sich durch Antikörper gegen den Lamininrezeptor hemmen. Es gibt viele Anhaltspunkte dafür, dass Interaktionen zwischen extrazellulärer Matrix und dazugehörigen Rezeptoren auf Migration und Reifung der Thymozyten Einfluss nehmen. Der VLA4-Rezeptor für Fibronektin ist an der Migration der Prothymozyten beteiligt (Savagner et al., 1989). Des Weiteren ist die Erhaltung der Thymusepithelzellen von der Anwesenheit der extrazellulären Matrix abhängig (Eshel et al., 1990). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass viele Anhaltspunkte Anlass dazu geben, die Proteine der extrazellulären Matrix in Bezug auf Zellreifung und Differenzierung der Zellen des Thymus näher zu untersuchen.

1.8. Das Immunsystem als Zielorgan für 2,3,7, 8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin

Als Folge einer chronischen oder akuten Exposition des Organismus mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin sind Auswirkungen auf das Immunsystem insbesondere auf den Thymus zahlreich beschrieben worden. Es werden dabei erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Tierspezies sowie auch innerhalb einer Spezies beobachtet. Der Thymus von Primaten ("Marmosets") reagiert wesentlich sensitiver auf die Einwirkung von TCDD als der von bestimmten Nagetieren; Mäuse des Stammes DBA reagieren weniger sensitiv auf eine Exposition als C57Bl Mäuse (De Heer et al., 1994). Es ist in zahlreichen Studien nachgewiesen worden, dass eine Exposition gegenüber unterschiedlichen Mengen 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-pdioxin eine Thymusatrophie zur Folge hat (Silverstone et al., 1994; De Heer et al., 1994). Zweifel bestehen darüber, welche Vorgänge im Thymus diese Reduktion der Thymusentwicklung bewirken. Als Angriffspunkte im Thymus wurden sowohl Prothymozyten und unreife Thymozyten als auch das Thymusepithel und seine verschiedenen Zelltypen diskutiert (Fine et al., 1990; De Waal et al., 1993; Kurl et al., 1993; Kremer et al., 1994). Viele Befunde sprechen für Thymusepithelzellen als primäre Angriffspunkte für 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin. In immunhistologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Thymus zeigten Epithelzellen einen untypischen Phänotyp und das kortikale Epithel war nach Behandlung mit 2,3,7,8-TCDD weiter differenziert (De Waal et al., 1992 und 1993). Greenlee und Mitarbeiter beschrieben eine verbesserte lymphoproliferative Kapazität der Thymozyten nach Kultivierung mit Epithelzellen. Diese verbesserte Thymozytenproliferation nahm ab, wenn die Thymusepithelzellen zuvor mit 2,3,7,8-TCDD inkubiert wurden, nicht jedoch, wenn die Thymozyten behandelt wurden (Greenlee et al., 1985). Weitere Beobachtungen, die ebenfalls für Thymusepithelzellen als Angriffspunkte sprechen, machte man bei fetalen Thymuskulturen. Es wurde ein Abbau der Thymusläppchengröße gezeigt, der nicht mit einer Abnahme der Thymozytenzahl einherging (Kremer et al., 1994). Für

den Einfluss von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin vornehmlich auf Epithelzellen spricht das Wirken durch Bindung an den Ah-Rezeptor. Da dieser auf Epithelzellen in dreifach höherer Konzentration vorhanden ist, treten sie als Angriffspunkte in den Vordergrund (Greenlee et al., 1985). Die Thymusatrophie von BALB/c-Mäusen als Folge einer einmaligen Behandlung mit 30 µg TCDD/kg KG könnte auch durch die Abnahme von Thymozyten aller Reifestufen verursacht sein (Silverstone, 1994). De Heer beschrieb eine Thymusatrophie, die mit Reduzierung der Zahl aller Thymuszellen einherging. Er teilte die Reaktion des Thymus nach der Anzahl der Tage nach Behandlung in drei Phasen ein. In der ersten Phase (bis Tag 2) wurde eine Abnahme der Proliferationsaktivität der Thymozyten im Cortex beobachtet, nicht aber eine Abnahme der Zellzahl. Phase 2 zeigte eine Abnahme der Zellzahl der reifen Thymozyten (bis Tag 8). Ab Tag 13 stieg die Zellzahl insgesamt wieder an (De Heer et al., 1994). Betrachtet man die B-Zell-Reihe gibt es einige Anhaltspunkte dafür, dass eine TCDD-Exposition bei Mäusen sowohl die B-Lymphozyten als auch deren Antikörperproduktion beeinflusst. Die Veränderungen bestehen aus einer Abnahme der Antikörperproduktion bzw. der B-Zellen selbst. Nach einmaliger subkutaner Injektion von 1 µg TCDD/kg KG bei Marmosets wurde eine Abnahme der Gesamtzahl der Leukozyten, der B-Lymphozyten und der Gedächtniszellen beobachtet (Neubert et al., 1990, 1991, 1993).

1.9. Histologie des Herzens

Die Herzwände bestehen aus drei Schichten: der inneren Schicht, dem Endokard, der mittleren Schicht oder Myokard und der äußeren Schicht, Epikard. Zur Struktur des Herzens gehören außerdem die Herzklappen, das Erregungsbildungs und -leitungssystem sowie das aus straffem Bindegewebe bestehende Herzskelett. Aus Mesodermzellen werden Myoblasten, aus denen wiederum Herzmuskelzellen entstehen. Die Herzmuskelzellen bilden ein dreidimensionales Netz, das auf Verzweigungen der Muskelzellen zurückgeht. Das Herzmuskelgewebe ist eine besondere Form des quergetreiften Muskelgewebes. Die Muskelzellen des Herzens sind durch herztypische Haftstrukturen miteinander verbunden, den Disci intercalares. In den Disci intercalares sind die benachbarten Muskelzellen durch drei Arten von Zell zu Zell Kontakten verknüpft:

Maculae adhaerentes (Desmosomen), Fasciae adhaerentes, in denen Aktinfilamente verankert sind und "gap junctions", über die das Zytosol der benachbarten Zellen miteinander kommuniziert. Die gesamte innere Oberfläche des Herzens wird von Endokard überdeckt, darunter liegt feinfaseriges Bindegewebe. Bei einer Beschädigung der Herzmuskelzellen ist eine Regeneration der Zellen nach der frühen Kindheit nicht mehr möglich. Das untergegangene Gewebe wird durch Bindegewebe ersetzt.

1.9.1. Das Herz als Zielorgan von 2,3,7,8–Tetrachlordibenzo-p-dioxin

In Untersuchungen von Riecke und Mitarbeitern sind eindeutige Veränderungen der extrazellulären Matrix des Myokards von "Marmosets" (Callithrix jacchus) nach Behandlung mit 2,3,7,8-TCDD bereits nach niedrigen Dosierungen nachgewiesen worden. Wurden "Marmosets" einmalig mit 1, 10 und 100 ng TCDD/kg KG behandelt, fanden sich histologische Veränderungen im Myokard im Sinne einer Myokardfibrose, die durch die Vermehrung von Kollagen, Laminin und Fibronektin zustande kamen und quantitativ durch Western-Blot Untersuchungen gesichert wurden. Als zusätzliche Befunde wurden ein Anstieg der Menge von TGF-B und seines Rezeptors in den Organen der mit 2,3,7,8-TCDD behandelten Tiere beschrieben (Riecke et al., 2002). Vor allem diese Veränderungen, aber auch frühere Beobachtungen über eine toxische Wirkung von 2,3,7,8-TCDD auf das kardiovaskuläre System waren Grundlagen der vorliegenden Arbeit, das Myokard von mit 2,3,7,8-TCDD behandelten C57Bl Mäusen zu untersuchen und dabei vor allem einige Proteine der extrazellulären Matrix zu beschreiben. Pesatori und Mitarbeiter bestätigten bei der Bevölkerung, die in Seveso großen Mengen von 2,3,7,8-TCDD ausgesetzt war, den Anstieg von schwerwiegenden kardiovaskulären Erkrankungen (Pesatori et al., 1998). In Seveso wurde 1976 eine Population, die eine stark kontaminierte Region bewohnte mit der einer nicht kontaminierten Region verglichen. In diesem Vergleich wurde in der Zeit zwischen 1976 und 1986 eine erhöhte Sterblichkeit bei Exponierten durch kardiovaskuläre Erkrankungen festgestellt. Es wurden ischämische Herzerkrankungen und Hypertonie als beschrieben. Weitere Symptome einer 2,3,7,8-TCDD–Exposition Ursachen sind präarteriosklerotische Läsionen der Aorta (Brewster et al. 1988), myokardiale Degeneration und ventrikuläre Dilatation.

1.10. Fragestellungen

1.10.1. Lassen sich die beim "Marmoset" beobachteten Veränderungen des Herzens auch bei anderen Säugetierspezies nachweisen?

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden C57Bl Mäuse eingesetzt, die als "Dioxin-empfindliche" Spezies gelten. Es wurden die Komponenten der extrazellulären Matrix Kollagen Typ I und IV, Fibronektin und Laminin mittels Immunfluoreszenztechnik untersucht, um die Erkenntnisse über eine Wirkung von 2,3,7,8-TCDD auf das Myokard zu ergänzen. Eine Bestätigung der bei den nicht-menschlichen Primaten beschriebenen Veränderungen würde zahlreiche neue Experimente zu dieser Fragestellung ermöglichen, die bei "Marmosets" aus diversen Gründen nicht möglich sind.

1.10.2. Lassen sich auch in anderen Organen Veränderungen der extrazellulären Matrix nachweisen?

Aufgrund der toxischen Wirkungen, die 2,3,7,8-TCDD auf viele Organe ausüben kann, war die zweite Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, mögliche Effekte in Bezug auf die extrazelluläre Matrix des Thymus zu untersuchen. Die Immunmodulation, die nach unterschiedlichen Dosen einer 2,3,7,8-TCDD-Exposition stattfinden kann, ist lange bekannt. Auf welche morphologischen Veränderungen im Thymus sie zurückzuführen ist, ist noch nicht geklärt worden. Da an den meisten Prozessen der Ausreifung des Immunsystems im Thymus Proteine der extrazellulären Matrix beteiligt sind, kommen sie als möglicher Angriffspunkt für 2,3,7,8-TCDD in Frage und wurden in der vorliegenden Arbeit immunhistologisch untersucht. Die untersuchten Komponenten sind Kollagen Typ I und IV, Fibronektin und Laminin.

2 Material und Methoden

2.1. Tiere und Tierhaltung

20 weibliche Mäuse des Aufzuchtstammes C57Bl/6JOLaHsd von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) wurden unter spezifisch-pathogenfreien (spf) Bedingungen im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin, in klimatisierten Räumen (21 Grad Celsius, relative Luftfeuchtigkeit: 50 %) und bei künstlichem Tag-/ Nachtrhythmus (Lichtperiode: 9 - 21 Uhr) gehalten. Es wurden pro Käfig Gruppen von fünf Mäusen gehalten. Leitungswasser und Futter standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Die Genehmigung der Tierversuche erteilte die Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales, Berlin.

2.2. Behandlung

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin wurde von der ÖkometricGmbH, Bayreuth, bezogen (Reinheit 99,4%, Lot Nr.93/TCCD/010) und in einer Mischung von DMSO und Toluol (2:1, vol/vol) gelöst. Die Behandlung der Mäuse erfolgte einen Tag nach deren Eintreffen im Institut. Es wurden fünf Mäuse jeweils einer Behandlungsgruppe zugeordnet. Alle Mäuse der vier Behandlungsgruppen bekamen das gleiche Volumen des Lösungsmittels aus DMSO und Toluol in einer Dosierung von 3 ml/kg Körpergewicht (KG) als subkutane Injektion verabreicht.

Die Dosierung von 2,3,7,8-TCDD betrug:

0 µg/kg KG für die Mäuse 1-5 (Kontrollen),

1 μg/kg KG für die Mäuse 6-10,

3 µg/kg KG für die Mäuse 11-15 und

10 µg/kg KG für die Mäuse 16-20.

Anschließend wurden die Tiere weitere 14 Tage unter gleich bleibenden Bedingungen gehalten und schließlich mittels zervikaler Dislokation getötet.

2.3. Präparation und Fixierung des Gewebes

Die Präparation erfolgte unmittelbar nach der Tötung der Mäuse. Es wurden die Organe Herz und Thymus präpariert und direkt nach der Entfernung gewogen. Das entnommene Gewebe wurde in drei verschiedenen Verfahren fixiert. Ein Teil jedes Organs wurde für immunhistochemische Untersuchungen in "Tissue-TEK" eingebettet, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Für einen guten Strukturerhalt ist ein schonendes und schnelles Einfrieren von großer Bedeutung.

2.4. Immunhistochemische Untersuchungen

2.4.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Für die immunhistochemische Markierung wurden Gefrierschnitte angefertigt. Die in "Tissue-TEK" eingebetteten Organe wurden dafür in einem Kryostaten (Frigocut Fe Jung Leica Instruments Deutschland), ohne zuvor aufzutauen, bei -23°C in einer Schnittdicke von 6-10 µm geschnitten (Messer: Spezialmesser vom Typ C mit superflachem Anschliff). Etwa jeder zehnte Schnitt wurde auf einen Objektträger aufgezogen. Auf einem Objektträger konnten immer drei Schnitte platziert werden. Die Gefrierschnitte wurden anschließend bei -20°C tief gefroren und erst kurz vor der immunhistochemischen Markierung wieder aufgetaut. Mehrfaches Auftauen und Einfrieren schadet dem Gewebe und führt zu Strukturveränderungen; es sollte deswegen vermieden werden.

2.4.2. Verfahren der indirekten Immunfluoreszenztechnik

Das Verfahren der immunhistochemischen Untersuchung von Gefrierschnitten eignet sich zum semiquantitativen Nachweis und zur Lokalisation spezieller Gewebebestandteile durch spezifische Immunreaktionen mit mono- oder polyklonalen Antikörpern. In den beschriebenen Versuchen wurde die indirekte Immunfluoreszenztechnik angewendet (Abbildung 3). Die Gewebeschnitte wurden zunächst mit monoklonalen oder polyklonalen primären Antikörpern, die sich gegen antigene Strukturen verschiedener Matrixbestandteile richten, inkubiert. Diese Strukturen wurden dadurch immunmarkiert. Im zweiten Schritt wurden mit sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die an die Fc-Fragmente der primären Antikörper, jetzt als Antigen wirkend, binden, immunmarkierte Matrixbestandteile sichtbar gemacht. Auf diese Weise konnten spezielle Gewebebestandteile nachgewiesen werden.



Abbildung 3: Schematische Darstellung der Methode der indirekten Immunfluoreszenz. Ein Antigen wird mit einem primären Antikörper inkubiert und anschließend mit dem sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Unter fluoreszenzgebendem Licht wird der fluoreszierende sekundäre Antikörper sichtbar.

2.4.3. Antikörper

1) Als primäre Antikörper gegen Matrixbestandteile wurden gegen Kollagen Typ I und Fibronektin gerichtete polyklonale Antikörper (Chemicon International, Hofheim, Deutschland) verwendet. Gegen Kollagen Typ IV und Laminin wurden monoklonale Antikörper (Chemicon International, Hofheim, Deutschland) eingesetzt (Tabelle 2).

2) Als sekundäre Antikörper dienten bei polyklonalen primären Antikörpern ein "goat antirabbit" Fluorescein-Isothiocyanat markierter Antikörper (Gar-FITC, Chemicon, International, Hofheim, Deutschland), bei monoklonalen primären Antikörpern kamen "goat anti-rat" oder "goat anti-mouse" Fluorescein-Isothiocyanat Antikörper zur Anwendung (Gar-FITC, Gam-FITC, Chemicon, International, Hofheim, Deutschland). Bei Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) kam es bei Blau-Anregung durch die Lichtquelle des Mikroskopes zur gelbgrünen Fluoreszenz. 1) Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen, aus B-Lymphozyten entstandenen, Plasmazellklonen gebildet, die immunchemisch unterschiedliche Eigenschaften aufweisen und mit verschiedenen Epitopen des Antigens reagieren, mit dem immunisiert wurde.

Der Nachteil bei der Verwendung eines polyklonalen Antikörpers ist seine mögliche Kreuzreaktion (Bindung eines Antikörpers an verschiedene Antigene, die das gleiche Epitop oder ähnlich strukturierte Epitope haben).

2) Für die Produktion monoklonaler Antikörper werden Plasmazellen, die spezifische Antikörper produzieren, mit unbegrenzt teilungsfähigen Tumorzellen eines Myeloms fusioniert. Die daraus hervorgehenden Zell-Linien produzieren dauerhaft den spezifischen Antikörper. Die Produktion der Antikörper erfolgt entweder in der Zellkultur oder in Tieren. Ein Vorteil der monoklonalen Antikörper ist ihre hohe Spezifität.

Matrixantigen	Herkunft des Antigens	Herkunft des primären Antikörpers	Verdünnung in PBS	Kreuzreaktivität (Angabe des Herstellers)	Sekundärer Antikörper	Verdünnung in PBS
Fibronektin	Maus	Kaninchen	1 : 20	mit Laminin und Kollagen weniger als 0,1%	Goat anti rabbit	1 : 20
Kollagen Typ I	Rind	Kaninchen	1 : 20	mit Fibronektin weniger als 0,5 %	Goat anti rabbit	1 : 20
Laminin	Maus	Ratte	1 : 20		Goat anti rat	1 : 20
Kollagen TypIV	Maus	Maus	1 : 20		Goat anti mouse	1 : 20

Tabelle 2 : Überblick über die verwendeten Antikörper, ihre Herkunft, ihre Kreuzreaktivität und in welcher Verdünnung mit ihnen gearbeitet wurde. (Hersteller der Antikörper: Chemicon International, Hofheim, Deutschland)

2.4.4. Vorbereitung der Immunmarkierung

Als Vorbereitung der Gefrierschnitte für die Immunmarkierung mussten zunächst unspezifische Bindungsstellen im Gewebe blockiert und somit für den primären Antikörper unzugänglich gemacht werden. Dies wurde durch die Inkubation der Schnitte in 0,5 % iger Albuminlösung erreicht. Für die Lösung wurde BSA (Bovines Serum Albumin, PAA Laboratories, Linz, Österreich) in phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit einem Magnetrührer eingerührt. Die bei -80° C tief gefrorenen Gefrierschnitte wurden zehn Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend zwanzig Minuten unter vorsichtigem Rühren in BSA inkubiert. Danach wurden die Objektträger zur Entfernung des BSA einmal kurz in PBS eingetaucht und abschließend zweimal mit PBS für jeweils zehn Minuten gespült.

2.4.5. Aufbringen der Antikörper

Die vorbereiteten Gewebeschnitte wurden kurz an der Luft getrocknet, danach wurde eventuell noch auf den Objektträgern befindliches PBS mit Filterpapier vorsichtig entfernt, um ein Ineinanderlaufen der Antikörper zu verhindern. Im nächsten Schritt wurden mit einer 100 µl Pipette jeweils 10 µl des primären Antikörpers auf die einzelnen Schnitte gegeben und mit der Pipettenspitze sorgfältig verteilt. Die so bearbeiteten Präparate ließ man nun für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubieren. Anschließend wurde der Antikörper durch kurzes Eintauchen der einzelnen Objektträger in PBS und zweimaliges zehnminütiges Spülen entfernt. Zur Weiterbehandlung der Präparate mussten diese wieder vollständig getrocknet sein. Danach wurden die Schnitte mit dem entsprechenden sekundären Antikörper versehen und wieder bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Nach einer Stunde wurden zur Entfernung des sekundären Antikörpers die oben beschriebenen Spülvorgänge wiederholt. Bei allen Spülvorgängen war darauf zu achten, dass beim Rühren nur langsame Bewegungen erzeugt und die Schnitte beim Trocknen nicht berührt wurden. Auch die Pipettenspitze sollte beim Auftragen der Antikörper nicht mit dem Gewebe in Verbindung geraten sein und war ansonsten zu entsorgen. Im letzten Schritt der Markierung wurde auf die Schnitte jeweils ein Tropfen einer 0,1%ige p-Phenylendiamin-Lösung (Sigma, St.Louis, MO, USA) gelöst in Glycerin (Merck, Darmstadt)/PBS (9+1) aufgetragen und jeder Objektträger mit einem Deckgläschen versehen. Bis zum Zeitpunkt der mikroskopischen Untersuchung und fotografischen Dokumentation wurden die Präparate kühl und dunkel aufbewahrt. Der Zusatz des Phenylendiamins stabilisiert den Fluoreszenzfarbstoff und verzögert ein rasches Verblassen der Fluoreszenz im Strahlengang des Mikroskopes. Phenylendiamin muss zur Aufbewahrung dunkel und kühl gelagert werden. Von den drei auf jedem Objektträger befindlichen Gewebeschnitten wurden jeweils nur zwei Schnitte mit dem

primären Antikörper bedeckt, mit dem sekundären Antikörper wurde auch der dritte Schnitt versehen. Durch dieses Verfahren erhielt man eine Kontrolle für jede markierte Schnittreihe. Sie diente zum späteren Vergleich von nicht markiertem mit markiertem Gewebe und der Erfassung von unspezifischen Reaktionen des sekundären Antikörpers mit diversen Gewebebestandteilen.

2.4.6. Fluoreszenzmikroskopie und fotografische Dokumentation

Um die optimale Leuchtkraft der Fluoreszenz zu nutzen und um eine optimale Bildqualität zu erreichen, wurden die gefärbten Gewebe direkt nach Fertigstellung der Immunmarkierung mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiophot Typ III (Zeiss, Oberkochen) betrachtet und fotografisch dokumentiert. Zur Betrachtung wurden die Präparate unter Auflicht-Anregung mit blauem Licht (Anregungsfilter 450-490 nm, Zeiss, Oberkochen) sichtbar gemacht. Von jedem Organ wurden, unter Verwendung eines 10fach und eines 20fach Objektivs, fünf repräsentative Stellen mit der im Mikroskop integrierten Kamera fotografisch festgehalten (Film: Ektachrome 64T, Kodak, Stuttgart). Während der fotografischen Dokumentation, die im abgedunkelten Raum stattfand, wurden die Präparate, die gerade nicht betrachtet wurden, kühl und dunkel gelagert. Für die densitometrische Auswertung wurden von jedem Objekt etwa fünfzig repräsentative Bilder mit der integrierten digitalen Kamera angefertigt und gespeichert und mit Hilfe des Computerprogramms ScionImage Beta 4.0.2 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) morphometrisch ausgewertet.

2.4.7. Morphometrische Bildanalyse

Zur morphometrischen Auswertung (ScionImage Beta 4.0.2, Scion Corporation, Frederick, MD, USA) wurden die Farbbilder in binäre Bilder umgewandelt. Es wurde für die Bildanalyse jeweils eine Fläche von 301146,95 µm² digitalisiert. Die angefärbten Anteile wurden über eine Schwellenwerteinstellung ("threshold") detektiert. Diese Anteile stellten sich in schwarz dar, der Hintergrund war weiß. Der schwarze Anteil konnte in einem zweiten Schritt als prozentualer Anteil vom Gesamtbild gemessen werden oder die angefärbte Fläche in Relation zur Gesamtfläche gesetzt werden. Pro Objekt wurden für fünf der gespeicherten Bilder die Werte ermittelt und zu einem Mittelwert pro Organ zusammengefasst. Die grafische Darstellung erfolgte in GraphPadPrism 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Die fotografische Dokumentation erfolgte ohne Kenntnis des Untersuchers, um welches Objekt aus welcher Behandlungsgruppe es sich handelte. Zur graphischen Darstellung wurden die Objektnummern aufgedeckt und die Organe wieder nach Behandlungsgruppen sortiert. Es wurde so eine objektive und unbeeinflusste Auswertung ermöglicht.
2.4.8. Statistische Berechnung der Daten

Die statistische Berechnung der Bildverarbeitungsdaten aus den immunhistochemischen Untersuchungen und die Berechnung der Gewichtsdaten (Körpergewichte, Organgewichte) erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse mit einem post-hoc zweiseitigen Dunnett t-test für Mehrfachvergleiche. Ein signifikanter Unterschied wurde bei p < 0,05 angenommen. Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm SPSS 12.0 (SPSS Ind., Chicago, USA) benutzt.

3 Ergebnisse

3.1. Untersuchung der Versuchstiere

Nach einer einmaligen Behandlung mit 2,3,7,8-TCDD subkutan in einer der drei Dosierungen (1 oder 3 oder 10 µg TCDD/kg KG) oder dem Vehikel wurden jeweils 5 C57Bl Mäuse in vier Gruppen zwei Wochen unter gleich bleibenden Bedingungen gehalten (s.o.). Direkt nach der Tötung der Mäuse wurden sie gewogen. Nach der Präparation wurde das Gewicht der einzelnen Organe ermittelt. Es zeigten sich keine sichtbaren, grobpathologischen Veränderungen. Das mittlere Körpergewicht (\pm SD) der Kontrollmäuse lag bei 19,1 \pm 1,6 g, die mittleren Körpergewichte der mit 2,3,7,8-TCDD behandelten Mäuse wurden wie folgt berechnet: 1,0 µg TCDD/kg: 18,6 \pm 1,1 g; 3,0 µg TCDD/kg: 18,7 \pm 0,5 g; 10,0 µg TCDD/kg: 19,0 \pm 0,8 g; die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den drei Gruppen von TCDD-behandelten Mäusen waren nicht statistisch signifikant.

3.2. Gewichte von Thymus und Herz

Die Einzelgewichte der präparierten Thymi und Herzen werden in den Abbildungen 4 und 5 wiedergegeben. Das Thymusgewicht der Kontrolltiere war höher als die Thymusgewichte der TCDD-behandelten Mäuse (Kontrolle: 47 ± 14 mg; $1,0 \ \mu g$ TCDD/kg: 34 ± 23 mg; $3,0 \ \mu g$ TCDD/kg: 36 ± 12 mg; $10,0 \ \mu g$ TCDD/kg: 33 ± 14 mg; jeweils Mittelwerte \pm SD). Alle Mittelwerte lagen damit etwa 20% unter dem Mittelwert der Thymusgewichte der Kontrolltiere. Es zeigte sich jedoch keine Dosisabhängigkeit dieser Gewichtsabnahme in den TCDD-behandelten Mäusen. Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den TCDD-behandelten Mäusen waren statistisch nicht signifikant.

Die Mittelwerte der Herzgewichte waren bei den Mäusen aus allen drei Gruppen mit TCDD-Behandlung im Vergleich zu denen der Kontrolltiere etwa 12% niedriger (Abbildung 5). Im Einzelnen wurden die folgenden Werte errechnet: Kontrolle: 138 ± 18 mg; 1,0 µg TCDD/kg: 121 ± 12 mg; 3,0 µg TCDD/kg: 121 ± 15 mg; 10,0 µg TCDD/kg: 120 ± 11 mg; (jeweils Mittelwerte \pm SD). Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den drei Gruppen von TCDD-behandelten Mäusen waren statistisch nicht signifikant.



Abbildung 4: Gewichte der Herzen von Mäusen nach Behandlung mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) in drei verschiedenen Dosierungen (1, 3, 10 μ g/kg KG) oder dem Vehikel (jeweils fünf Mäuse pro Gruppe)



Abbildung 5: Gewichte der Thymi von Mäusen nach Behandlung mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) in drei verschiedenen Dosierungen (1, 3, 10 μ g/kg KG) oder dem Vehikel (jeweils fünf Mäuse pro Gruppe)

3.3. Immunhistochemische Untersuchungen der extrazellulären Matrix in Thymus und Herz

3.3.1. Mögliche Artefakte

3.3.1.1. Anfertigung der Kryostatschnitte

Als gleichmäßige parenchymale Gewebe waren sowohl Thymus als auch Herz gut zum Anfertigen von Gefrierschnitten geeignet. Beim Schneidevorgang war es wichtig, die Organe bei einer gleich bleibenden Temperatur von –23°C sowohl zu verarbeiten als auch aufzubewahren. Wenn die Temperaturen im Kryostaten Schwankungen unterlagen, entstanden Risse und Falten im Objekt, in denen sich Antikörper beim Färbevorgang vermehrt anreichern konnten und das Ergebnis der Auswertung verfälschen konnte. Zusätzlich lässt sich die Organmorphologie bei einer nicht intakten Oberfläche kaum noch beurteilen. Die feinen Objektscheiben wurden auf Objektträger, jeweils drei Schnitte pro Stück, aufgezogen. Dabei sollten die verwendeten Objektträger Raumtemperatur haben, um ein optimales Anhaften der Gefrierschnitte zu gewährleisten und ein Einreißen der Schnitte beim Auftragen zu verhindern.

3.3.1.2. Durchführung der Färbung

Zum Färben wurden nur solche Schnitte verwendet, die keine Artefakte durch Schneiden oder Auftragen auf den Objektträger erhalten hatten. Bei jedem Färbevorgang wurde eine identische Inkubationszeit eingehalten, da die Ausprägung der Fluoreszenz von der Inkubationszeit und der Konzentration des aufgetragenen Antikörpers abhängig war und die Ergebnisse durch Änderung der Bedingungen beeinflusst wurden. Das Anfertigen der Fotos erfolgte direkt nach abgeschlossenem Färbevorgang. Nach spätestens einem Tag begann die Fluoreszenz zu verblassen und eignete sich dann nicht mehr zur Auswertung. Die fertig gestellten, immmunhistologisch gefärbten Gefrierschnitte mussten auch während des Fotografierens dunkel und kühl gelagert sein, um ein Verblassen der Fluoreszenz weitgehend zu verhindern. Das Auftreten unspezifischer Färbungen wurde durch das regelmäßige Anfertigen einer Kontrolle ohne primären Antikörper überprüft.

3.4. Ergebnisse der Färbungen mit Antikörpern gegen vier Bestandteile der extrazellulären Matrix im Thymus

3.4.1. Fibronektin

Fibronektin im Thymus ist in den Abbildungen 6 a-d fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Es bildet mit anderen Komponenten der Bindegewebsmatrix ein kompaktes Netzwerk im Mark der Thymusläppchen und durchzieht den Kortex mit einer feinen Netzstruktur. Es hat des Weiteren einen großen Anteil an der Substanzgebung der Basalmembran, in der es zum Teil Bindungen mit Laminin und Kollagen Typ IV eingeht. Zudem vermittelt es die Adhäsion an Zellen von Nachbarorganen. Im Bindegewebe der lymphatischen Organe entsteht durch die den Retikulinfasern aufgelagerten Fibronektine mikroskopisch eine gitterartige Struktur. Eine fluoreszenzmikroskopisch sichtbar vermehrte Ansammlung des Fibronektins fand im Bereich von Gefäßstrukturen statt; von der densitometrischen Auswertung wurden solche Anhäufungen weitgehend ausgeschlossen oder im Vergleich mit anderen Objekten berücksichtigt.

3.4.1.1. Die Auswertung der Färbung von Fibronektin

Zur Auswertung standen vier Thymi aus der Gruppe der Kontrolltiere und aus der Dosisgruppe 1 μ g TCCD/kg KG zur Verfügung und jeweils fünf Thymi aus den beiden anderen Gruppen. Beim Vergleich der Organe aller Behandlungsgruppen untereinander, wurden Unterschiede im Vorkommen von Fibronektin beobachtet, die innerhalb einer Behandlungsgruppe breiten Streuungen unterlagen. Eine dosisabhängige Veränderung der Menge an Fibronektin wurde nicht beobachtet (Abbildung 7). Von der Gesamtmenge an Pixeln (Bezugsgröße = 75286,74 μ m²) entsprachen die fluoreszierenden Anteile dem angefärbten Fibronektin. Bei der Kontrollgruppe waren es 3082 ± 717 μ m² (Mittelwert ± SD). In aufsteigender Behandlungsdosis waren es 3484 ± 1167, 3729 ± 1581 und 2762 ± 1420 μ m² von der Gesamtfläche. In Prozent entspricht dies im Schnitt 4 % der Gesamtmenge bei den Kontrolltieren; 4,6 %, 4,9 % und 3,6 % in aufsteigender Behandlungsdosis.

3.4.2. Laminin

Laminine bilden im Thymus als Komponenten der extrazellulären Matrix ein feines, Strukturgebendes Netzwerk in parenchymatösen Organen, das unter anderem der Zellhaftung dient und vornehmlich von den Basalmembranen ausgeht (Abbildung 8a-d). Die Haftung zwischen den Zellen und Lamininen als Adhäsionsmoleküle der Basallamina (Lamina rara externa) wird durch Integrine vermittelt. Eine Anreicherung von Laminin fand sich vor allem im Bereich der kortikalen und medullären Epithelzellen einschließlich der Hassall`schen Körperchen (Abbildung 8 b und c), den subepithelialen Basalmembranen der Kapsel und um Gefäßstrukturen. Bei der Auswertung der immunhistologisch markierten Laminine wurde darauf geachtet, Bereiche mit physiologisch verstärkter Anreicherung von einer Quantifizierung weitgehend auszuschließen.



Abbildung 6 a -d: Immunhistochemische Darstellung von Fibronektin im Thymus



b



c



Abbildung 6 a-d: Immunhistochemische Darstellung von Fibronektin im Thymus

Abb. 6 a: Thymusausschnitt eines Kontrolltieres Gleichmäßige Verteilung von Fibronektin über das gesamte Parenchym. Zwanzigfache Vergrößerung.

Abb. 6 b: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 1µg TCDD/kg KG Keine Zunahme der fluoreszierenden Anteile. Zwanzigfache Vergrößerung.

Abb. 6 c: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 3µgTCDD/kg KG Keine Zunahme der fluoreszierenden Anteile. Zwanzigfache Vergrößerung.

Abb. 6 d: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 3µg TCDD/kg KG Keine Zunahme der fluoreszierenden Anteile. Zwanzigfache Vergrößerung.



Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Fibronektin in Thymi von C57Bl Mäusen.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung jeder Maus aus den vier Behandlungsgruppen (o), zusätzlich wird der errechnete Mittelwert aller untersuchten Mäuse pro Gruppe dargestellt (•). Der Bereich, in dem die Werte der Kontrolltiere liegen, befindet sich zwischen den beiden Linien.

3.4.2.1. Auswertung der Färbung von Laminin

Bei den Thymi der Kontrollgruppe fiel eine mäßige Streuung der Werte auf. Zwei Thymi der Mäuse, die mit der höchsten Dosis 2,3,7,8-TCDD behandelt worden waren, zeigten einen sehr niedrigen Gehalt an Laminin, zwei andere dagegen einen etwa vierfach höheren Gehalt. Betrachtete man die Mittelwerte der densitometrisch gemessenen Lamininmengen der einzelnen Behandlungs-gruppen, wurde keine Zunahme der Menge an Laminin im Thymus mit steigender Dosis des verabreichten 2,3,7,8-TCDDs beobachtet (Abbildung 9). Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen in Bezug auf das Verteilungsmuster von Laminin konnten nicht festgestellt werden. An der Gesamtmenge an Pixeln (Bezugsgröße) wurden bei den Kontrolltieren 2491 \pm 699 μ m² und in aufsteigender Behandlungsdosis 3530 \pm 2134, 3349 \pm 1169 und 3878 \pm 1980 μ m² an der Gesamtmenge gemessen. Das entspricht 3,3 % bei den Kontrolltieren und in aufsteigender Behandlungsdosis 4,6 %, 4,4 % und 5,1 % an der Gesamtfläche.

3.4.3. Kollagen Typ I

In den Abbildungen 10 a-d ist die Färbung mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ I dargestellt. Es findet sich als typische Kollagenfaser vor allem in den Kapseln von Organen und im gefäßführenden Bindegewebe.

3.4.3.1. Die Auswertung der Färbungen von Kollagen Typ I

Es wurde eine leichte Zunahme in der Behandlungsgruppe 1 µg TCDD/kg KG (Abbildung 10b) gemessen, im nächst höheren Dosisbereich nahm die Menge an Kollagen Typ I ein wenig ab und sank im Durchschnitt wieder unter den Mittelwert der Kontrolltiere. Die Thymi der Mäuse, die mit 10 µg TCDD/kg KG behandelt worden waren (Abbildung 10d), zeigten eine deutlich erhöhte Menge von Kollagen Typ I. Im Vergleich mit dem Mittelwert der gemessenen Menge an Kollagen Typ I in den Thymi der Kontrolltiere, konnte eine Erhöhung auf mehr als das Dreifache beobachtet werden (Abbildung 11). Dabei lag der im einzelnen Thymus gewertete Kollagen Typ I Anteil in keinem Mäusethymus der Behandlungsgruppe 10 µg TCDD/kg KG unter dem in den Thymi der Kontrolltiere gemessenen Anteilen (Abbildung 11). Die Thymi aller Mäuse der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppen 1 und 3 µg TCDD/kg KG wiesen Mengen an Kollagen Typ I auf, die die Mengen in den Thymi der höchsten Dosisgruppe bei weitem nicht erreichten (Abbildung 11).



а





b

Abbildung 8 a-d: Immunhistochemische Darstellung von Laminin im Thymus



Abbildung 8 a-d: Immunhistochemische Darstellung von Laminin im Thymus

Abb. 8a: Thymusausschnitt eines Kontrolltieres Gleichmäßige Verteilung des Laminins über das gesamte Parenchym verteilt. Zwanzigfachen Vergrößerung

Abb. 8b: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 1µg TCDD/kg KG Keine Veränderung der fluoreszierenden Anteile an der Gesamtfläche des Bildes. Zwanzigfache Vergrößerung

Abb. 8c: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 3µg TCDD/kg KG Keine Veränderung der fluoreszierenden Anteile an der Gesamtfläche des Bildes. Zwanzigfache Vergrößerung.

Abb. 8d: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 3µg TCDD/kg KG Keine Veränderung der fluoreszierenden Anteile an der Gesamtfläche des Bildes. Zwanzigfache Vergrößerung.



Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Laminin in Thymi von 57Bl Mäusen. Aufgetragen sind die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung jeder Maus aus den vier Behandlungsgruppen (o), zusätzlich wird der errechnete Mittelwert aller untersuchten Mäuse pro Gruppe dargestellt (•). Der Bereich, in dem die Werte der Kontrolltiere liegen, befindet sich zwischen den beiden Linien.



Abbildung 10 a-d: Immunhistochemische Darstellung von Kollagen Typ I im Thymus

Abbildung 10 a-d: Immunhistochemische Darstellung von Kollagen Typ I im Thymus

Abb. 10a: Thymusausschnitt eines Kontrolltieres Gleichmäßige Verteilung des Kollagens über das gesamte Parenchym verteilt. Zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb. 10b: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 1µg TCDD/kg KG Keine Veränderung der fluoreszierenden Anteile an der Gesamtfläche des Bildes. Zwanzigfache Vergrößerung.

Abb. 10c: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 3µg TCDD/kg KG Keine Veränderung der fluoreszierenden Anteile an der Gesamtfläche des Bildes. Zwanzigfache Vergrößerung.

Abb. 10d: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 10µg TCDD/kg KG Zunahme der fluoreszierenden Anteile an der Gesamtfläche des Bildes. Zwanzigfache Vergrößerung.



Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung der immunhistochemischen Markierung von Kollagen I in Thymi von C57Bl Mäusen. Aufgetragen sind die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung jeder Maus aus den vier Behandlungsgruppen (o), zusätzlich wird der errechnete Mittelwert aller untersuchten Mäuse pro Gruppe dargestellt (•). Der Bereich, in dem die Werte der Kontrolltiere liegen, befindet sich zwischen den beiden Linien.

*statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe

Im Verteilungsmuster des Kollagen Typ I konnten keine Unterschiede im Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen beobachtet werden. Gemessen an der Gesamtfläche der Pixel (Bezugsgröße) waren bei den Kontrolltieren im Mittel 2991 \pm 700 μ m² gefärbt und in ansteigender Dosis 3758 \pm 1147, 2784 \pm 565 und 9537 \pm 1308 μ m². Das entsprach 3,9 % bei den Kontrolltieren; in aufsteigender Dosis 4,9 %, 3,6 % und 12,6 %.

3.4.4. Kollagen Typ IV

Kollagen Typ IV wird im Thymus von Thymusepithelzellen gebildet und kommt nicht nur als Haftprotein in der Basalmembran des Organs vor. Es bildet zusammen mit den Matrixkomponenten Laminin und Fibronektin ein dichtes Netzwerk im Mark der Thymusläppchen und durchzieht in feinen Fasern die Rinde des Thymus wie in dem Präparat eines Kontrolltieres deutlich wird (Abb. 12a). Als Bestandteil der Basalmembran findet sich Kollagen Typ IV verstärkt im gefäßführenden Bindegewebe.

3.4.4.1. Die Auswertung der Färbung von Kollagen Typ IV

Es zeigte sich eine erhebliche Streuung der Werte. Zwei Messungen der Kollagen Typ IV Anteile der Thymi im höchsten Dosisbereich lagen über allen anderen gemessenen Werten (Abb. 12a-d; Abb. 13). Die drei anderen Werte lagen im Bereich aller übrigen Werte. Kollagen Typ IV kam bei den Mäusen nach Behandlung mit 1 oder 3 µg TCDD/kg KG ohne große Unterschiede innerhalb einer Gruppe in einem Anteil vor, der unter dem in den beiden Thymi der höchsten Dosis lag. Dabei lagen die Werte dieser beiden Gruppen jeweils dicht zusammen, das heißt, es kamen in allen Thymi der Tiere, die mit 1 oder 3 µg TCDD/kg KG behandelt wurden (Abb. 12b und c), ähnliche Mengen an Kollagen Typ IV vor. Bei der Betrachtung der immunhistochemisch gefärbten Objekte war eine deutliche Zunahme des Kollagen Typ IV bei zwei Tieren der 10 µg TCDD/kg KG Gruppe im Vergleich zu einigen Thymi der Kontrolltiere eindeutig nachzuweisen. In der Abbildung 12d wird das Präparat des Tieres gezeigt, das eine deutlich höh. Gemessen an der Gesamtfläche der Pixel (Bezugsgröße) waren bei den Kontrolltieren im Mittel 3289 \pm 1423 µm² angefärbt und in aufsteigender Behandlungsdosis 4034 \pm 508, 2908 \pm 497 und 5543 \pm 2049 µm². Das entsprach 4,3 % bei den Kontrolltieren; in aufsteigender Behandlungsdosis 5,3 %, 3,8 % und 7,4 %.



Abbildung 12 a-d: Immunhistochemische Darstellung von Kollagen Typ IV im Thymus





с



Abbildung 12 a-d: Immunhistochemische Darstellung von Kollagen Typ IV im Thymus

Abb. 12a: Thymusausschnitt eines Kontrolltieres In diesem Präparat konnte nur eine geringe Menge an Kollagen I nachgewiesen werden. (Zwanzigfache Vergrößerung)

Abb. 12b: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 1µg TCDD/kg KG Im Vergleich zur Kontrolle sind die fluoreszierenden Anteile an der Gesamtfläche des Bildes zwar vermehrt, trotzdem konnte bei einer Betrachtung der gesamten Gruppe keine signifikante Vermehrung festgestellt werden. (Zwanzigfache Vergrößerung)

Abb. 12c: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 3µg TCDD/kg KG Im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung der fluoreszierenden Anteile an der Gesamtfläche des Bildes. (Zwanzigfache Vergrößerung)

Abb. 12d: Thymusausschnitt einer Maus aus der Behandlungsgruppe 10µg TCDD/kg KG In diesem Präparat wurde eine deutliche Anreicherung von Kollagen Typ IV festgestellt, die so bei den anderen Tieren dieser Gruppe nicht nachgewiesen werden konnte. (Zwanzigfache Vergrößerung)



Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung der immunhistologischen Darstellung von Kollagen Typ IV in Thymi von C57Bl Mäusen. Aufgetragen sind die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung jeder Maus aus den vier Behandlungsgruppen (o), zusätzlich wird der errechnete Mittelwert aller untersuchten Mäuse pro Gruppe dargestellt (•). Der Bereich, in dem die Werte der Kontrolltiere liegen, befindet sich zwischen den beiden Linien.



Abbildung 14 a -d: Immunhistologische Darstellung von Fibronektin im Myokard





d

Abbildung 14 a-d: Immunhistologische Darstellung von Fibronektin im Myokard

Abb.14a: Linker Ventrikel eines Kontrolltieres

Fibronektin ist gleichmäßig über das Myokard verteilt, der Pfeil markiert eine Fibronektinanreicherung in einer Gefässwand. Präparate mit Anschnitten von grösseren Gefässen wurden bei der densitometrischen Auswertung nicht berücksichtigt. Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb.14b: Linker Ventrikel einer Maus aus der Behandlungsgruppe 1 µg TCDD/kg KG Zunahme der fluoreszierenden Anteile am Myokard. Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb.14c: Linker Ventrikel einer Maus aus der Behandlungsgruppe 3 µg TCDD/kg KG Zunahme der fluoreszierenden Anteile am Myokard. Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung

Abb.14d: Linker Ventrikel einer Maus aus der Behandlungsgruppe 10 µg TCDD/kg KG Zunahme der fluoreszierenden Anteile am Myokard. Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung



Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung der immunhistochemischen Markierung von Fibronektin im Myokard von C57BL Mäusen. Aufgetragen sind die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung jeder Maus aus den vier Behandlungsgruppen (o), zusätzlich wird der errechnete Mittelwert aller untersuchten Mäuse pro Gruppe dargestellt (•). Der Bereich, in dem die Werte der Kontrolltiere liegen, befindet sich zwischen den beiden Linien.

3.5. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen im Myokard

3.5.1. Allgemeines zur Auswertung

Auch im Myokard der C57Bl Mäuse wurden als Komponenten der extrazellulären Matrix die Anteile von Kollagen Typ I, Typ IV, Laminin und Fibronektin untersucht und densitometrisch ausgewertet. Um einheitliche Voraussetzungen für die Auswertung zu schaffen, wurde nur der linke Ventrikel untersucht. Es standen zwanzig Organe zur Verfügung, jeweils fünf aus jeder Behandlungsgruppe.

3.5.2. Auswertung der Färbungen der einzelnen Bestandteile der extrazellulären Matrix

3.5.2.1. Fibronektin

Beim Vergleich der Werte aller Behandlungsgruppen konnte beobachtet werden, dass die Anzahl der gemessenen Pixel bei den Kontrolltieren im Mittel bei $1285 \pm 380 \ \mu\text{m}^2$ lagen (\pm Standardabweichung). Mit aufsteigender Behandlungsdosis waren es 1786 ± 896 , 2336 ± 487 und $3675 \pm 1402 \ \mu\text{m}^2$. In Prozent entsprach dies 1,7 % an der Gesamtfläche bei den Kontrolltieren, 2,3 % bei den Tieren, die mit 1 μ g/kg KG behandelt wurden, 3,1 % bei den Tieren, die mit 3 μ g/kg KG behandelt wurden und 4,8 % bei den Tieren der höchsten Dosisgruppe. In allen Herzen der Mäuse aus der Dosisgruppe 10 μ g/kg wurde mehr Fibronektin nachgewiesen, als in denen der Kontrollgruppe. Die einzelnen Werte der anderen beiden Gruppen überschnitten sich teilweise mit denen der Kontrollgruppe und der höchsten Behandlungsgruppe. Eine Tendenz zur Vermehrung von Fibronektin wurde auch im Myokard der Mäuse dieser Gruppen beobachtet. Insgesamt wurde ein signifikanter Dosis-abhängiger Anstieg der Fibronektinmenge im linken Ventrikel von C57bl Mäusen nach 2,3,7,8-TCDD Exposition beobachtet. (Abb. 14a-d, Abb. 15)

3.5.2.2. Laminin

Im Vergleich der Werte der einzelnen Dosisgruppen mit denen der Kontrolltiere zeigte sich eine eindeutige Zunahme der Menge an Laminin mit steigender Dosis. Die gemessene Fläche war bei den Kontrolltieren im Mittel 4687 \pm 205 μ m² und mit steigender Behandlungsdosis 5269 \pm 1875, 5899 \pm 693 und 7086 \pm 1906 μ m². Das entsprach 6,2 % an der Gesamtfläche bei den Kontrolltieren, 6,9 % bei Tieren, die mit 1 μ g TCDD/kg KG behandelt wurden und 7,8 % (3 μ g/kg) sowie 9,4 % (10 μ g/kg). Die Werte der Kontrolltiere lagen dicht beieinander und alle unter dem niedrigsten Wert der höchsten Dosisgruppe. Es konnte eine eindeutige Zunahme von

Laminin im linken Ventrikel von C57bl Mäusen nach Behandlung mit 2,3,7,8 TCDD nachgewiesen werden. (Abb. 16a-b; Abb. 17)

















Abbildung 16 a-d: Imunnhistologische Darstellung von Laminin im Myokard

Abb.16a: Laminin im Myokard eines Kontrolltieres. Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb. 16b: Laminin im Myokard einer Maus aus der Behandlungsgruppe 1 µg TCDD/kg KG Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb. 16c: Laminin im Myokard einer Maus aus der Behandlungsgruppe 3 µg TCDD/kg KG Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb. 16d: Laminin im Myokard einer Maus aus der Behandlungsgruppe 10 µg TCDD/kg KG Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.



Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Laminin im Myokard des linken Ventrikels von C57Bl Mäusen.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung jeder Maus aus den vier Behandlungsgruppen (o), zusätzlich wird der errechnete Mittelwert aller untersuchten Mäuse pro Gruppe dargestellt (•). Der Bereich, in dem die Werte der Kontrolltiere liegen, befindet sich zwischen den beiden Linien.



Abbildung 18 a -d : Immunhistologische Darstellung von Kollagen Typ I im Myokard



d

- 66 -

Abbildung 18 a-d : Immunhistologische Darstellung von Kollagen Typ I im Myokard

Abb. 18a: Myokard eines Kontrolltieres Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb. 18b: Myokard einer Maus aus der Behandlungsgruppe 1 µg TCDD/kg KG Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb. 18c: Myokard einer Maus aus der Behandlungsgruppe 3 µg TCDD/kg KG Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb. 18d: Myokard einer Maus aus der Behandlungsgruppe 1 µg TCDD/kg KG Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.



Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung der immunhistologischen Färbung von Kollagen Typ I im Myokard von C57BL Mäusen. Aufgetragen sind die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung jeder Maus aus den vier Behandlungsgruppen (o), zusätzlich wird der errechnete Mittelwert aller untersuchten Mäuse pro Gruppe dargestellt (•). Der Bereich, in dem die Werte der Kontrolltiere liegen, befindet sich zwischen den beiden Linien.

3.5.2.3. Kollagen Typ I

Bei der Betrachtung von Kollagen Typ I (Abbildung 18 a-d) im Myokard zeigte sich eine geringe Variabilität der fluoreszierenden Anteile bei den Tieren der Kontrollgruppe im Vergleich zu denen der Dosisgruppen 1 und 3 µg TCDD/kg KG. Die Werte der Gruppe 3 µg TCDD/kg KG wiesen die höchste Streuung auf. Ein Wert der Gruppe 1 µg TCDD/kg KG war fast doppelt so hoch wie die anderen gemessenen Werte dieser Gruppe (Abbildung 19). Eine Tendenz zur Zunahme von Kollagen Typ I bei der Betrachtung aller Messungen insgesamt war dennoch zu beobachten. Die fluoreszierenden Anteile am Myokard aller Kontrolltiere, die dem Anteil an Kollagen Typ I entsprachen, lagen mit einer Ausnahme unter denen der höchsten Behandlungsgruppe. Die Gesamtmenge der fluoreszierenden Pixel betrug bei den Kontrolltieren im Mittel 2991 \pm 857 μ m². Mit steigender Dosis wurden die folgenden Werte berechnet: 3758 ± 1282 , 2784 ± 632 und $9537 \pm 1462 \ \mu m^2$. Das entspricht beginnend mit der Kontrollgruppe 3,9 % and der Gesamtfläche. Mit steigender Dosis 4,9 %, 3,6 % und 6,1 %. Betrachtete man die Mittelwerte der einzelnen Gruppen im Vergleich untereinander, konnte eine Zunahme der Kollagen Typ I Anteile im linken Ventrikel von C57Bl Mäusen unter 2,3,7,8-TCDD-Exposition mit steigender Dosis beobachtet werden. Eindeutige Ergebnisse ergaben sich aus dem Vergleich der Werte der Kontrolltiere mit denen der Tiere der Behandlungsgruppe 10 µg TCDD/kg KG. Bei den Einzelwerten der anderen Gruppen bestand ein großer Streuungsbereich.

3.5.2.4. Kollagen Typ IV

Nach Färbung mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ IV, zeigte sich eine homogene Verteilung der Fluoreszenz in allen untersuchten Organen. Beim Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Gruppen miteinander war der Wert der höchsten Dosisgruppe mit 4,6 % am größten (Abb. 21). Nächst höherer Wert war der Mittelwert der Kontrolltiere mit 3,4 %, die fluoreszierenden Anteile der beiden anderen Gruppen betrugen 3,0 % (1 μ g TCDD/kg KG) und 2,6 % (3 μ g TCDD/kg KG). Der im Durchschnitt hohe Anteil an Fluoreszenz im Myokard der Mäuse der höchsten Behandlungsgruppe kam durch ein Organ dieser Gruppe zustande, welches besonders stark angereichert hat und damit den Mittelwert dieser Gruppe deutlich beeinflusste. Bei der Betrachtung der Einzelwerte der einzelnen Gruppen zeigte sich eine geringe Variabilität. Die fluoreszierenden Anteile der Herzen änderten sich nicht signifikant im Sinne von einer Vermehrung oder Verminderung von Kollagen Typ IV in den TCDD-Gruppen im Mittel 2613 ± 465 μ m² bei den Kontrolltieren und mit steigender Dosis 2317 ± 599, 2021 ± 912 und 3518 ± 1795 μ m².











d

Abbildung 20 a-d: Immunhistologische Darstellung von Kollagen Typ IV im Myokard

Abb. 20a: Myokard eines Kontrolltieres Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb. 20b: Myokard einer Maus aus der Behandlungsgruppe 1 µg TCDD/kg KG Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb. 20c: Myokard einer Maus aus der Behandlungsgruppe 3 µg TCDD/kg KG Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.

Abb. 20d: Myokard einer Maus aus der Behandlungsgruppe 10 µg TCDD/kg KG Die mikroskopische Darstellung erfolgt mit einer zwanzigfachen Vergrößerung.


Abbildung 21

Grafische Darstellung der densitometrischen Auswertung der Darstellung von Kollagen Typ IV im Myokard von C57BL Mäusen. Aufgetragen sind die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung jeder Maus aus den vier Behandlungsgruppen (o), zusätzlich wird der errechnete Mittelwert aller untersuchten Mäuse pro Gruppe dargestellt (•). Der Bereich, in dem die Werte der Kontrolltiere liegen, befindet sich zwischen den beiden Linien.

4 Diskussion

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war eine Studie mit nicht-menschlichen Primaten zu Veränderungen von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Riecke et al. 2002). Die eindeutigen morphologischen Veränderungen, die eine 2,3,7,8-TCDD Exposition am Myokard von "Marmosets" bewirkte, führten zu der Frage, ob diese morphologischen Veränderungen im Myokard auch bei anderen Säugetierspezies, im Falle der vorliegenden Arbeit bei Mäusen, nachweisbar sein könnten. Damit würden sich neue experimentelle Möglichkeiten für weitere systematische Untersuchungen zur Toxizität von 2,3,7,8-TCDD ergeben.

4.1. 2,3,7,8-TCDD verursachte kardiovaskuläre Veränderungen

4.1.1. Epidemiologische Daten

Der Zusammenhang zwischen einer 2,3,7,8-TCDD Exposition und der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen ist in mehreren epidemiologischen Studien beschrieben worden. Bartazzi und Mitarbeiter beschrieben 1989, dass ein erhöhtes Risiko für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen bei der Bevölkerung, die 1976 hohen Dosen an 2,3,7,8-TCDD als Folge des Unfalls in Seveso ausgesetzt war, bestand und bestätigten ihre Beobachtungen zehn Jahre später (Bertazzi et al., 1989; Bertazzi et al., 1998). Eine Arbeitsgruppe von Flesch-Janys untersuchte eine Gruppe von 10 000 Arbeitern retrospektiv, die mit einer hohen Dosis von 2,3,7,8-TCDD in Kontakt gekommen waren. Die Autoren beschrieben bei diesen Arbeitern eine erhöhte Sterblichkeit durch kardiovaskuläre Erkrankungen (Flesch-Janys et al., 1995). Watanabe und Mitarbeiter veröffentlichten eine Zusammenfassung über die toxischen Effekte von 2,3,7,8-TCDD. Auch hier wurde unter anderem auf einen statistisch signifikanten Anstieg von Todesfällen durch kardiovaskuläre Erkrankungen hingewiesen. Das relative Risiko der Bevölkerung, ischämische, chronische Herzerkrankungen und andere kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln stieg an (Watanabe et al., 1999). Pesatori und Mitarbeiter veröffentlichten 1998 eine Sammlung von Studien, über die nicht-malignen Effekte von 2,3,7,8-TCDD auf die menschliche Gesundheit. Als Effekte, das kardiovaskuläre System betreffend, beschrieben sie neben funktionellen Herzbeschwerden auch präarteriosklerotische Läsionen in der Aorta, myokardiale Degeneration und ventrikuläre Dilatation sowie als Folge davon das Auftreten von myokardialer Hypertrophie. Die Autoren vermuteten, dass die Ursache für diese gesundheitlichen Veränderungen aufgrund einer gestörten Herzfunktion in einer durch 2,3,7,8-TCDD verursachten Veränderung der Herzmorphologie zu suchen wäre (Pesatori et

al., 1998). Die epidemiologisch aufgezeigten Zusammenhänge werden hinsichtlich ihrer Aussagekraft durch experimentelle Untersuchungen von Auswirkungen einer 2,3,7,8-TCDD Exposition auf das kardiovaskuläre System unterstützt.

4.1.2. Experimentelle Daten

4.1.2.1. Untersuchungen bei unterschiedlichen Spezies

Ivnitski und Mitarbeiter berichteten über eine 2,3,7,8-TCDD-induzierte Hemmung der Herzentwicklung auf dem Boden einer Abnahme der Myozytenreifung und vermehrten Zelltod der Myozyten bei Fischen, Vögeln und Säugetieren (Ivnitski et al., 2001). In Hühnerembryonen zeigten sich Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System, nachdem sie in einer frühen Entwicklungsphase mit 2,3,7,8-TCDD behandelt worden waren. Es wurde ein Anstieg der Apoptoserate der Zellen im Myokard und ein Abfall der Myozytenproliferation beobachtet, sodass es zu einer Ausdünnung der Ventrikelwände kam sowie zu einer Entwicklungsstörung der Koronararterien. Diese Entwicklungsstörung zeigte sich anhand eines verminderten Durchmessers und einer verminderten Anzahl an Koronararterien. Es wurde in diesem Zusammenhang eine Abhängigkeit vom Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor beschrieben (Dong et al., 2002; Heid et al., 2001). Der Anstieg der Gewichte der Herzen von mit 2,3,7,8-TCDD behandelten Hühnerembryonen kann über Interaktionen von 2,3,7,8-TCDD mit dem Aryl-Hydrocarbon Rezeptor zustande gekommen sein (Kanzawa et al., 2004). Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor wird während Der der gesamten embryonalen Entwicklungsphase im Myokard des Hühnerembryos exprimiert. Durch welche genauen zellulären Veränderungen die groben morphologischen Veränderungen des Myokards und der Koronararterien nach 2,3,7,8-TCDD Einfluss zustande kommen, ist nicht geklärt.

4.1.2.2. Untersuchungen bei Nagetieren

Dalton und Mitarbeiter publizierten ähnliche Ergebnisse von Untersuchungen bei Säugetieren einer späteren Entwicklungsphase. Sie beobachteten bei adulten C57Bl Mäusen nach der Behandlung mit 5 µg TCDD/kg KG einen Anstieg der Häufigkeit von ischämischen Herzerkrankungen. Sie führten ihre Resultate auf einen Anstieg der "arteriosklerosefördernden" Lipide, Triglyzeride und LDL (low-density Lipoprotein), zurück. Zusätzlich fanden sie bei vaskulären Muskelzellen der behandelten Mäuse eine Fehlregulation von Genen, die für Zellproliferationen und Apoptose verantwortlich sind (Dalton et al., 2001). Über den Einfluss von 2,3,7,8-TCDD auf das kardiovaskuläre System bei Nagetieren berichteten auch Jokinen und Mitarbeiter. Sie untersuchten Sprague-Dawley Ratten, die mit bis zu 100 µg TCDD/kg KG behandelt worden waren. Es zeigten sich in diesen Untersuchungen toxische Einflüsse auf das kardiovaskuläre System im Sinne der Entwicklung von Kardiomyopathien und chronischer Artheriitis - vor allem im Pankreas und Mesenterium, aber auch in der Leber, im Ovar, im Rectum, im Uterus und Herz (Jokinen et al., 2003). Für einige dieser Effekte auf das kardiovaskuläre System scheinen Veränderungen der extrazellulären Matrix eine Rolle zu Spielen. Bei Untersuchungen zur Wirkung von 2,3,7,8-TCDD auf die Expression von bestimmten Genen, die für eine physiologische Entwicklung des kardiovaskulären Systems von Bedeutung sind, beobachteten Thackaberry und Mitarbeiter weit reichende Veränderungen. Sie stellten fest, dass bei C57Bl Mäusen, die während der Embryonalphase mit bis zu 3µg TCDD/kg KG behandelt worden waren, Gene betroffen waren, die an wichtigen Regulationsprozessen für die extrazelluäre Matrix beteiligt sind (Thackaberry et al., 2005). Die gestörte Ausbildung der kardialen extrazellulären Matrix während der Entwicklungsphase beeinträchtigt die Morphologie im Erwachsenenalter und führt zu kardialer Dysfunktion. Als spezieller Angriffspunkt für 2,3,7,8-TCDD wurden Gene beschrieben, die für Auf- und Umbauprozesse der extrazellulären Matrix verantwortlich sind, sowie von bestimmten Matrixmetallo-Proteinasen. Diese Beobachtungen wurden mit dem Vorhandensein des Arylhydrocarbon-Rezeptors assoziiert (Aragon et al., 2008).

4.1.2.3. Untersuchungen bei nicht-menschlichen Primaten

Ausgangspunkt für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war eine experimentelle Studie mit nicht-menschlichen Primaten ("Marmosets"). Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass histologische Veränderungen im Myokard bereits nach Applikation von relativ niedrigen Dosen von 2,3,7,8-TCDD (1-100 ng TCDD/kg KG) auftraten. Für die Untersuchungen wurden Marmosets einmalig mit 1, 10 und 100 ng TCDD/kg KG behandelt und anschließend 2 bzw. 4 Wochen unter gleich bleibenden Bedingungen gehalten. Dann wurde das Myokard des linken Ventrikels in Hinsicht auf eine Veränderung der Bestandteile der extrazellulären Matrix Kollagen, Laminin und Fibronektin untersucht. Es fanden sich histologische Veränderungen im Myokard im Sinne einer Myokardfibrose, die durch die Vermehrung von Kollagen, Laminin und Fibronektin zustande kamen und quantitativ durch Western-Blot-Untersuchungen gesichert wurden. Als zusätzlicher Befund wurde ein Anstieg der Menge von TGF-ß und seines Rezeptors in den Organen der mit 2,3,7,8-TCDD behandelten Tiere beschrieben (Riecke et al., 2002).

Zur weiteren Vervollständigung der Erkenntnisse über die Wirkung von 2,3,7,8-TCDD auf die Morphologie, speziell bezüglich der Bestandteile der extrazellulären Matrix, auch bei anderen Säugetierspezies, wurden im Rahmen dieser Arbeit C57Bl Mäuse mit 1, 3 und 10 µg TCDD/kg KG einmalig subkutan behandelt und die Komponenten der extrazellulären Matrix

Kollagen Typ I und IV, Laminin und Fibronektin im Myokard des linken Ventrikels untersucht. Es wurde dafür ein Dosisbereich gewählt, der nicht mit einer akuten Allgemeintoxizität für diese Spezies einherging und nicht zum Tod der Tiere führen konnte. Eine akut toxische oder letale Dosis würde sich innerhalb kurzer Zeit mit starker Gewichtsabnahme im Rahmen eines Wasting-Syndroms zu erkennen gegeben haben.

4.2. Spezielle histologische Aspekte

Bei den hier beschriebenen Experimenten wurde beobachtet, dass ein signifikanter dosisabhängiger Anstieg von Fibronektin, eine eindeutige Vermehrung von Kollagen Typ I und eine deutliche Zunahme von Laminin im Myokard des linken Ventrikels unter 2,3,7,8-TCDD Einwirkung stattgefunden hatte, nicht jedoch der anderen untersuchten Komponente der extrazellulären Matrix, Kollagen Typ IV. Insgesamt zeigen die in dieser Arbeit beschriebenen Resultate und die zuvor zitierten Ergebnisse aus den Studien mit Marmosets sowie etliche weitere tierexperimentelle Arbeiten, dass 2,3,7,8-TCDD morphologische Veränderungen im Organismus verursacht, die direkt oder indirekt für potenziell toxische Wirkungen am kardiovaskulären System verantwortlich sein können. Spezielle histologische Veränderungen betreffen anscheinend bestimmte Komponenten der extrazellulären Matrix. Untersuchungen zu Veränderungen der Bestandteile der extrazellulären Matrix als Angriffspunkte für 2,3,7,8-TCDD rücken damit in den Vordergrund.

4.3. Lassen sich auch bei anderen Organen Veränderungen der extrazellulären Matrix nachweisen?

Zu Untersuchungen bezüglich dieser Fragestellung, wurde in der vorliegenden Arbeit die extrazelluläre Matrix des Thymus untersucht. Atrophie und Funktionseinschränkungen des sich entwickelnden Thymus könnten durch Veränderungen der Proteine der extrazellulären Matrix erklärbar und eine der möglichen Erklärungen für die immuntoxischen Wirkungen von 2,3,7,8-TCDD sein.

4.3.1. Allgemeine Aspekte einer 2,3,7,8-TCDD Exposition und Veränderungen der Funktion des Thymus

Die allgemeinen toxischen Wirkungen von 2,3,7,8-TCDD und anderen "Dioxinen" sind im Hinblick auf den Thymus ausführlich und bei vielen Spezies untersucht und beschrieben worden. Eine Exposition ist unter anderem mit der frühzeitigen Involution des lymphatischen Systems (v.a. des Thymus) assoziiert, sowie mit Panzytopenie und Immunsuppression. Die Auswirkungen, die eine 2,3,7,8-TCDD-Exposition auf das Immunsystem hinsichtlich Funktion und Morphologie haben kann, werden seit Jahren untersucht. Es ist bekannt, dass 2,3,7,8-TCDD die zellvermittelte und humorale Immunität bei vielen Spezies beeinflussen kann (House et al., 1990; Holsapple et al., 1991; Morris et al., 1992; Luebke et al., 1994; Smialowicz et al., 1994; Fan et al., 1996). Schon 1970 beschrieb Vos eine 2,3,7,8-TCDD abhängige ausgeprägte Thymusatrophie und den Verlust der physiologischen Thymusarchitektur mit nachfolgender Unterdrückung der zellvermittelten Immunantwort. Er ging in diesen Untersuchungen noch nicht darauf ein, in welchem Maße und in welcher Art die Morphologie des Thymus verändert war. Vos und Mitarbeiter untersuchten Schweinethymi hinsichtlich einer morphologischen Veränderung des Thymusgewebes nach Verabreichung von 1 µg TCDD/kg KG. Sie beobachteten eine Größenzunahme und Vermehrung der Hassall'schen Körperchen (Vos, 1970). Im Zusammenhang mit der 2,3,7,8-TCDD-induzierten Thymusatrophie bei Ratten, Mäusen und Schweinen wurde auch die Atrophie anderer lymphatischer Organe wie Milz und Lymphknoten erwähnt (Friend et al., 1970). Dass Thymozyten von der physiologischen Funktionsfähigkeit des Thymusepithels und des so genannten "microenviroments" des Thymus abhängig sind, um sich normal entwickeln zu können, ist bekannt. Andererseits benötigen auch Epithelzellen die Anwesenheit von funktionsfähigen Thymozyten, um ihre Funktion aufrechterhalten zu können (De Waal et al., 1997). Das bedeutet, dass ein Ungleichgewicht zwischen diesen Komponenten einen negativen Einfluss auf Reifungsprozesse im Thymus haben kann.

4.3.2. Histologische Aspekte der Thymusatrophie

4.3.2.1. Nagetiere

Den Verlust des normalen korticalen Thymusgewebes und einer physiologischen Thymusarchitektur bei Ratten, die mit 2,3,7,8-TCDD behandelt wurden, wurde von Gupta und Mitarbeitern schon 1973 nachgewiesen (Gupta et al., 1973). Untersuchungen von Faith und Moore aus dem Jahr 1977 zeigten eine Unterdrückung der zellulären Immunantwort, während die humorale Immunantwort unbeeinflusst blieb. Т-Sie gaben zu Lymphozytenkulturen von mit 2,3,7,8-TCDD behandelten F344 Ratten das T-Zell Mitogen PHA (Phytohemagglutinin) und Con A (concavalin A) und beobachteten die Reaktion der T-Lymphozyten auf diese "Mitose-Stimulatoren". Die Zellen der mit 2,3,7,8-TCDD behandelten Tiere zeigten einen signifikanten Abfall der physiologischen Reaktion auf diese Stimulatoren. Eine Veränderung der Serumantikörpertiter blieb aus, was darauf hindeutete, dass keine Beeinflussung der humoralen Immunantwort stattfand (Faith et Moore, 1977). Bei Ratten, die mit 1 µg TCDD/kg KG behandelt worden waren, beobachteten De Waal und Mitarbeiter eine Anreicherung von weit differenzierten Stadien von Thymusepithelzellen im Kortex (De Waal et al., 1993). Eine Abnahme der Zellzahl im Thymuskortex von Wistar-Ratten zeigten De

Heer und Mitarbeiter. Sie behandelten die Ratten mit 150 µg TCDD/kg KG und bewerteten dann die Proliferationsrate sowie die Zellzahl der Thymozyten im Kortex. Sie kamen zu dem Schluss, dass eine verminderte Zellzahl zur Thymusatrophie führte. Auch die Proliferationsrate der Thymozyten war vermindert (De Heer et al., 1994).

Dabei gibt es Anhaltspunkte dafür, dass diese die Zellzahl betreffenden Veränderungen nicht auf 2,3,7,8-TCDD-induzierte Veränderungen der Lymphozytenstammzellen im Knochenmark zurückzuführen ist (Frazier et al., 1994). Inzwischen ist die Thymusatrophie ein gut untersuchter Effekt einer 2,3,7,8-TCDD Exposition, es ist jedoch immer noch unklar, welche morphologischen Veränderungen dieser Thymusatrophie zugrunde liegen. Mittlerweile ist bekannt, dass 2,3,7,8-TCDD die Proliferationsprozesse sowie Differenzierungen von unreifen Thymozyten beeinflussen kann. Nohara und Mitarbeiter untersuchten Thymi von Ratten, um Effekte von 2,3,7,8-TCDD auch nach Applikation relativ niedriger Dosen (1 und 2 µg TCDD/kg KG) besser beschreiben zu können. Bereits sieben Tage nach Exposition war die Expression von CYP1A1 mRNA, eine der sensitivsten Antworten auf die Bindung von 2,3,7,8-TCDD an den Ah-Rezeptor, in Thymi der behandelten Ratten nachweisbar. Sie beobachteten, dass auch nach niedrigen Dosen als Folge einer 2,3,7,8-TCDD-Exposition eine Thymusatrophie und eine Abnahme der Zellzahl reifer Thymozyten die Folge waren. In peripheren Lymphknoten war die Anzahl reifer Lymphozyten vermindert. Offensichtlich war die Differenzierung der Thymozyten deutlich eingeschränkt (Nohara et al., 2000). Immer in engem Zusammenhang zu Veränderungen im Thymus werden Interaktionen des Ah-Rezeptors erwähnt. Diese sind für die Entwicklung einer 2,3,7,8-TCDD-induzierten Thymusatrophie von großer Bedeutung. Inwiefern Proteine der extrazellulären Matrix an Differenzierungs- und Proliferationsveränderungen der Thymozyten nach 2,3,7,8-TCDD-Exposition beteiligt sind wurde bisher nicht beschrieben.

4.3.2.2. Bei nicht-menschlichen Primaten und menschlichen Zellen

Neubert und Mitarbeiter zeigten, dass eine 2,3,7,8-TCDD-Exposition beim nichtmenschlichen Primaten ("Marmosets") zur Abnahme der peripheren T-Heferzellen führte und stellten die Hypothese auf, dass indirekte Effekte zu Veränderungen im Thymus führten (Neubert et al., 1990). Sie machten diese Beobachtungen auch bei menschlichen Blutlymphozyten und Thymusepithelzellen (Neubert et al., 1991). De Heer und Mitarbeiter beschrieben Untersuchungen bei Marmosets, die zuvor mit bis zu 3 μ g TCDD/kg KG behandelt worden waren. Sie konnten weder einen signifikanten Abfall der Gewichte der Thymi der behandelten Tiere noch histologische Veränderungen in den Thymi nachweisen (De Heer et al., 1994). Es ist noch unklar, ob 2,3,7,8-TCDD und andere "Dioxine" ihre Effekte auf den Thymus durch direkte Zellschädigung oder Störungen im so genannten "microenvironment", das heißt z.B. bei Bestandteilen der extrazellulären Matrix oder Komponenten, die mit ihr interagieren (Integrine und Adhäsionsmoleküle), hervorrufen. Von Riecke und Mitarbeitern wurden hinsichtlich dieser Fragestellung Integrine und Adhäsionsmoleküle menschlicher Thymusepithelzellen untersucht, die mit bis zu 10 ng TCDD/kg KG behandelt worden waren. Es wurden Veränderungen der Expression von CD49b, e und f, CD51 und CD54 sowie CD106 nachgewiesen. Hinsichtlich der Interaktionen dieser Rezeptoren und Bestandteilen der extrazellulären Matrix sowie ihrer Schlüsselfunktion für die physiologische Thymozytenreifung kommen ihre Veränderungen nach 2,3,7,8-TCDD-Exposition als Ursache für eine Immuntoxizität in Frage (Riecke et al., 2003).

Komponenten der extrazellulären Matrix wurden von Nottebrock und Mitarbeitern untersucht. Sie verabreichten Marmosets bis zu 10 ng TCDD/kg KG und beobachteten unter anderem signifikante Veränderungen von Komponenten der extrazellulären Matrix und bestimmten Integrinen nach 2,3,7,8-TCDD Exposition (Nottebrock et al., 2006). Die extrazelluläre Matrix und ihre Beeinflussung der Thymozytenreifung sowie das Zusammenspiel zwischen Thymusepithelzellen und Thymozyten rücken bei der Interpretation von Effekten von 2,3,7,8-TCDD weiter in den Vordergrund.

4.3.3. Aspekte zum Zeitpunkt der Exposition

Vos und Moore beobachteten bei Ratten und C57Bl Mäusen sowohl nach perinataler als auch nach postnataler Exposition mit 2,3,7,8-TCDD eine Abnahme von Lymphozyten im Thymuskortex und eine signifikante Thymusatrophie (Vos et al., 1974). Im Falle einer 2,3,7,8-TCDD-abhängigen Beeinflussung der Aktivität und des Differenzierungsprozesses der Thymusepithelzellen, kann es zur Abnahme der epithelzellabhängigen Mitogenität von Thymozyten kommen und infolge davon zu unvollständiger Reifung der Thymozyten innerhalb des Thymus. Cook und Mitarbeiter beschrieben, dass 2,3,7,8-TCDD die Differenzierung der Thymusepithelzellen in einem Stadium stimulieren mußte, in dem durch die Exposition ihre Fähigkeit verloren ging, die Thymozytenreifung zu unterstützen (Cook et al., 1987). Anscheinend waren von der Beeinflussung der Differenzierungsprozesse reife Thymozyten am stärksten betroffen. Zu einem Abfall der Anzahl der reifen Thymozyten kam es vor allem nach perinataler Exposition (Holladay et al., 1991; Blaylock et al., 1992). Holsapple und Mitarbeiter beschäftigten sich ebenfalls vor allem mit der Frage nach dem Zeitpunkt der Exposition mit 2,3,7,8-TCDD, bei dem die deutlichsten Effekte ausgelöst werden konnten. Sehr ausgeprägt und lang anhaltend waren die Auswirkungen von 2,3,7,8-TCDD bei jungen Tieren. Sie nahmen dann mit zunehmendem Alter ab. Die Autoren

schlossen ihre Untersuchungen zusätzlich mit dem Fazit, dass 2,3,7,8-TCDD die zelluläre Immunantwort indirekt und die humorale Immunantwort direkt beeinflusste und Reifung und Differenzierungskapazität sowie Aktivitäten von immunkompetenten Zellen zu reduzieren vermochte. Lymphozyten schienen gegenüber der toxischen Substanz während der Zeiträume, in denen die oben genannten Prozesse stattfanden besonders sensibel zu sein. Sie gingen in ihren Untersuchungen jedoch nicht auf mögliche morphologische Änderungen des Thymus als Grundlage für die Effekte im Immunsystem ein (Holsapple et al., 1991). Kim und Mitarbeiter beschäftigten sich mit Laminin 5 und seinem Anteil an der Thymusreifung. Sie machten die Beobachtung, dass Laminin 5 für das Überleben unreifer Thymozyten von großer Bedeutung war. Sie gaben fetalen Thymuszellkulturen anti-Laminin 5 Antikörper und lösten damit eine Unterdrückung der T-Zell-Entwicklung aus. Am stärksten betroffen waren die unreifen T-Lymphozyten (Kim et al., 2000).

4.3.4. Auswirkungen von 2,3,7,8-TCDD auf die Morphologie des Thymus

Über die genauen Veränderungen des Thymus unter 2,3,7,8-TCDD Exposition bestehen bis heute wenige Erkenntnisse. Welche Auswirkung hat eine Verabreichung der Substanz zum Beispiel auf das Grundgerüst des Thymus, das so genannte "microenvironment", also z.B. auf Komponenten der extrazellulären Matrix oder auf ihre interagierenden Komponenten wie Integrine und andere Adhäsionsmoleküle. Die extrazelluläre Matrix des Thymus besitzt, wie oben erwähnt, nicht nur eine Funktion als Stütz- und Bindegewebe zur Stabilisierung des Organs, sie hat einen bedeutenden Anteil an Differenzierungs- und Reifungsprozessen der sich entwickelnden Thymozyten und dient zusätzlich als Migrationsgrundlage für diese Zellen, was wiederum eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung der Thymozyten darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Komponenten der extrazellulären Matrix Kollagen Typ I und IV sowie Laminin und Fibronektin untersucht. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass einzelne Bestandteile der Matrix in den Organen der behandelten Tiere signifikant vermehrt waren. Kollagen Typ I und Laminin zeigten eine deutliche Vermehrung im Thymus mit ansteigender Dosis. Bei Betrachtung von Fibronektin wurde weder im Verteilungsmuster noch in der Menge dieser Komponente der extrazellulären Matrix eine Veränderung festgestellt. Diese Ergebnisse morphologischer Untersuchungen bei C57Bl Mäusen stimmen mit Untersuchungen bei Marmosets an Myokard und Thymus überein und bieten neue Ansatzpunkte für weitere experimentelle Untersuchungen, um die Zusammenhänge zwischen 2,3,7,8-TCDD-Exposition und verminderter Immunkompetenz weiter ausführen zu können.

4.4. Aspekte zu Auswirkungen der morphologischen Veränderungen im Thymus

4.4.1. Funktion der extrazellulären Matrix im Thymus

Der Reifungsprozess der jungen Thymozyten nimmt seinen Ursprung in Vorläuferzellen in der subkapsulären Region des Thymus. Die nächste Reifungsstufe der Thymozyten sind CD3-CD4+ oder CD3-CD8+ Zellen ("einfach positive") und schließlich "doppelt positive" Zellen im Thymusmark (Boyd et Hugo, 1991). Es besteht kein Zweifel daran, dass ein enger Zusammenhang zwischen Thymozyten und Thymusepithelzellen in Bezug auf die Reifungsprozesse der Thymozyten besteht. An ihrer eigenen Reifung sind die T-Zellen auch direkt durch Produktion von Cytokinen beteiligt, die mit den Thymusepithelzellen interagieren.

Ein Fibroblasten- und Kollagen Typ I - reiches trabekelförmiges Netzwerk durchzieht Kortex und Medulla des Thymus. Eine Basalmembran durchzieht den subkapsulären Raum und umgibt die Trabekel des Netzwerkes, sie unterstützt damit ein spezielles dünnes Epithel, dass eine Barriere zwischen externem und internem Thymusgewebe bildet (Takeuchi et al., 1991). Das thymusspezifische Netzwerk besteht aus Epithelzellen mit charakteristischen Tonofilamenten, Verbindungen zwischen den Zellen untereinander durch Desmosomen und Stromazellen aus dem Knochenmark. Eine wichtige Komponente der Mikrostruktur des Thymus ist die extrazelluläre Matrix. Sie besteht aus multiplen Kollagentypen, Retikulinfasern, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen wie Fibronektin und Laminin. Diese Strukturen sind direkt anliegend oder in unmittelbarer Umgebung der Epithelzellen lokalisiert. Kollagen Typ I ist vor allem in der Kapsel und den Fasern der Septen zu finden, während die Basalmembran um das Epithelgerüst reich an Kollagen Typ IV, Fibronektin und Laminin sind (Lannes-Viera et al., 1991). Die präzise Verteilung von Laminin und Fibronektin innerhalb des Thymus wurde noch nicht vollständig geklärt (Savino et al., 2004). Funktionell sind die Komponenten der Matrix an vielen Entwicklungen beteiligt. Sie unterstützen das Wachstum und die Funktion von Thymozyten und Epithelzellen (Fine et al., 1990). Vivinus- Nebot und Mitarbeiter untersuchten Laminin 5 im Thymus und seine Rolle in Reifungsprozessen der Thymozyten und schrieben dem Protein eine große Bedeutung in der Signalübertragung zwischen Thymozyten und anderen Zellen des Thymusparenchyms zu (Vivinus-Nebot et al., 1999). Avres-Martins und Mitarbeiter konnten in einer immunhistochemischen Untersuchung zeigen, dass auch phagozytotische Zellen des Thymus mit Proteinen der extrazellulären Matrix (Laminin und Fibronektin) und entsprechenden Rezeptoren interagieren und die Adhäsion von Thymozyten beeinflussen. Durch Antikörper gegen Laminin und Fibronektin wurde die Adhäsion an diese Zellen verhindert (AyresMartins et al., 2004). Chemokine und Proteine der extrazellulären Matrix sind eine wichtige Grundlage für die physiologische Abfolge dieser Prozesse und damit grundlegend an der normalen Reifung und Differenzierung der Thymozyten beteiligt. Eine physiologische Verteilung der extrazellulären Matrix und ihrer Rezeptoren ist für die normale Zellbewegung der Thymozyten und damit für ihre Reifung und Differenzierung von großer Bedeutung. Es besteht offensichtlich ein geregeltes Zusammenspiel zwischen den Proteinen der extrazellulären Matrix, den entsprechenden Rezeptoren, bestimmten Chemokinen und den Zellen des Thymus, das für die sich entwickelnden Thymozyten essentiell ist. Bestehen Störungen in Verteilung oder Anreicherung an Proteinen der extrazellulären Matrix, ist eine Störung in der Entwicklung der Thymozyten anzunehmen und damit die unzureichende Funktionsfähigkeit des Thymus und seiner Zellen eine mögliche Folge. In der vorliegenden Arbeit wurden alle vier untersuchten Komponenten der Matrix immunhistologisch im gesamten Thymusparenchym nachgewiesen. Obwohl die Verteilung von Laminin und Fibronektin im Thymus bekannt ist, ist nicht ganz geklärt, welche Isoformen jeweils in welchen Regionen des Thymus vertreten sind.

4.4.2. Rezeptoren der extrazellulären Matrix im Thymus

Wenn die extrazelluläre Matrix eine Rolle in zellulären Interaktionen im Thymus spielt, müssen Thymuszellen Rezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix exprimieren. Der erste gut untersuchte Rezeptor war CD44, der neben Hyaluronsäure auch Kollagen Typ IV bindet. CD44 wird von unreifen cortikalen Thymozyten und aktivierten peripheren T-Zellen exprimiert. Thymusepithelzellen, die wesentlich an der Entwicklung der Thymozyten beteiligt sind, präsentieren eine Vielzahl an Rezeptoren der extrazellulären Matrix. Der Laminin Rezeptor VLA6 wird auf medullären und subkapsulären Epithelzellen präsentiert und der VLAB1 Rezeptor auf "thymus nurse cells" (Savino et al., 1993). Unreife Thymozyten besitzen einen für Laminin bekannten Rezeptor, 84a6. Die 84a6-Expression ist beim Fetus am höchsten. Auch medulläre und subkapsuläre Thymusepithelzellen exprimieren VLA6 und den VLA5 Fibronektinrezeptor (Giunta et al., 1991; Lannes-Vieira et al., 1993). Der Fibronektin Rezeptor wurde von Cardarelli und Pierschbacher beschrieben und ließ sich auf allen Thymozyten als VLA4-Rezeptor (β1α4) nachweisen (Cardarelli et Pierschbacher, 1987). Unreife kortikale Zellen exprimierten ihn in höherem Maße als reife medulläre Zellen (Pilarski et al, 1991). Eine Beeinflussung der Thymozytenreifung durch 2,3,7,8-TCDD könnte wie oben erwähnt durch indirekte Effekte auf Thymozyten verursacht sein, zum Beispiel durch Beeinflussung der "Zell/Zell-Interaktionen" oder der "Zell/Matrix-Interaktionen". Dafür kommen unter anderem Rezeptoren als Angriffspunkte in Frage. Um die Erkenntnisse

über eine 2,3,7,8-TCDD vermittelte Immuntoxizität weiter zu vervollständigen, wären sicherlich Untersuchungen bestimmter Rezeptoren der Proteine der extrazellulären Matrix nach Exposition mit 2,3,7,8-TCDD von Bedeutung.

4.4.3. EZM/ EZM- Rezeptoren vermittelte Interaktionen im Thymus

Der VLA5 Fibronektin Rezeptor ist maßgeblich am Eintritt von pro-T-Zellen in den Thymus beteiligt (Savagner et al., 1989). Savino und Mitarbeiter beobachteten, dass die Injektion von anti-Fibronektin Antikörpern eine "Down"-Regulation des CD3-Komplexes hervorrufen kann. Damit unterstützten sie die Annahme, dass Fibronektin an der Differenzierung der Thymozyten beteiligt ist (Savino et al., 1993). Laminin und Fibronektin sind zudem fähig, die Adhäsion und Proliferation von Thymusepithelzellen zu erhöhen; zusätzlich wurde beobachtet, dass eine Erhöhung des Anteils an extrazellulärer Matrix im Thymus die Thymusepithelzelladhäsion und Proliferation erhöhen kann (Lannes-Vieira et al., 1991). Der extrazellulären Matrix wird eine essentielle Rolle in der Zellbewegung innerhalb des Thymus zugewiesen. Savino und Mitarbeiter benutzten zur Erklärung dieser Beobachtungen ein Model mit "thymus nurse cells" (TNC)-Komplexen. In solch einem Komplex befinden sich Thymusepithelzellen sowie unreife und reife Thymozyten. In Kulturen lassen die TNC-Komplexe die Thymozyten auf dem Weg eines aktiven, zytoskelettabhängigen Migrationsmechanismus frei. TNC-Komplexe setzen Proteine der extrazellulären Matrix frei, und die Anzahl der frei gesetzten Thymozyten kann durch Kultivierung mit Liganden und Rezeptoren der extrazellulären Matrix moduliert werden. Laminin und Fibronektin beschleunigen die spontane Thymozytenfreisetzung aus den TNC-Komplexen, während anti-Matrix)-Antikörper und EZM(extrazelluläre anti-EZM-Rezeptoren-Antikörper einen hemmenden Effekt auf diesen Prozess ausüben und die Konstitution des TNC-Komplexes aufheben. Zusammengefasst lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Bewegungen der Lymphozyten im TNC-Komplex durch Änderungen in "EZM/EZM Rezeptoren-Interaktionen" beeinflussbar sind und damit diese Bestandteile der Thymusmorphologie eine wichtige Komponente der T-Zellbewegung und von Differenzierungsprozessen im Thymus sind. Savino und Mitarbeiter machten weitere Untersuchungen zur Zellbewegung im Thymus. Grundlage für ihre Untersuchungen war die Annahme, dass die Bewegung der Thymozyten innerhalb des Thymus für eine physiologische Zellreifung essentiell ist (Savino et al., 2003). Vor allem spielen Komponenten der extrazellulären Matrix und Chemokine in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Die Zellen der Feinstruktur innerhalb des Thymus produzieren diese Gruppen von Proteinen, während die reifenden Thymozyten die entsprechenden Rezeptoren exprimieren. Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungen,

dass die physiologische Bewegung der Thymozyten ein Resultat aus mehreren Stimuli ist, zu denen Chemokine, Proteine der extrazellulären Matrix und Matrix-Metalloproteinasen beitragen. Dass bedeutet, dass eine pathologische Veränderung einer der Komponenten, eine Veränderung der normalen Migration der Thymozyten hervorruft und damit eine Störung der Differenzierung dieser Zellen bewirkt.

4.5. Der Acrylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor) als möglicher Angriffspunkt für 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin

Bei der Betrachtung der Wirkungskaskade von 2,3,7,8-TCDD stellt sich die Frage an welcher Stelle dieses Ablaufes eine Beeinträchtigung stattfinden kann. Es ist bekannt, dass "Dioxine" ihre Wirkung über einen zytosolischen Rezeptor entfalten. Nach der Bindung von 2,3,7,8-TCDD an diesen Rezeptor (Arylhydrocarbon-Rezeptor, Ah-Rezeptor) wird vom 2,3,7,8-TCDD-Rezeptorkomplex ein "heat shock Protein" (Hsp90) abgespalten. Der Komplex gelangt anschließend in den Zellkern und bewirkt die Synthese zahlreicher Proteine. Diese Prozesse bewirken in einigen Zelltypen die Vermehrung des "transforming growth faktors-ß", der bei Fibroblasten eine Vermehrung der extrazellulären Matrix und eine Abnahme der Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen bewirkt (Nohara et al., 2000).

Der Ah-Rezeptor ist ein Genprodukt des Ah-Genlocus und hat an der Wirkungskaskade von 2,3,7,8-TCDD einen wichtigen Anteil und gut beschriebenen Einfluss auf die 2,3,7,8-TCDD vermittelte Toxizität in Myokard und Thymus (Okey et al., 1994). In transgenen Mäusen mit konstitutiv aktiviertem Ah-Rezeptor wurden Organveränderungen beobachtet, die ähnlich waren, wie nach einer TCDD-Exposition (Brunnberg et al. 2006). Bislang sind keine physiologischen Liganden für den Rezeptor gefunden worden. Nebert und Mitarbeiter beschrieben schon 1972 die Zusammenhänge zwischen einer 2,3,7,8-TCCD-induzierten Toxizität und deren Abhängigkeit vom Ah-Rezeptor und bestimmten Enzymen. Sie beobachteten, dass die meisten durch 2,3,7,8-TCDD ausgelösten Effekte mit der Affinität des Ah-Rezeptors zu 2,3,7,8-TCDD korrelierten (Nebert et al., 1972). Über die Immuntoxizität, die durch 2,3,7,8-TCDD hervorgerufen wird, besonders seine Toxizität auf das humorale Abwehrsystem, liegen unterschiedliche Beobachtungen vor (Holsapple et al., 1991; Lundberg et al., 1991; Morris et al., 1992; Luebke et al., 1994; Smialowicz et al., 1994; Fan et al., 1996). Es wird vermutet, dass die Ah-Rezeptor-abhängige Toxizität nach akuter Exposition im Vordergrund steht, während die vom Rezeptor unabhängige Toxizität vor allem nach chronischer, niedrig dosierter Exposition auftritt (Morris et al., 1992). Mit der Thymusatrophie als sensibles Zeichen für Immuntoxizität wurde eine Abhängigkeit schon bei vielen Spezies, unter anderem bei Nagetieren, nachgewiesen. Verschiedene Stämme von Mäusen unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit für eine durch 2,3,7,8-TCDD induzierte Immuntoxizität. Die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber 2,3,7,8-TCDD von "Ah-Rezeptor-empfindlichen" Mäusestämmen (z. B. C57Bl Mäuse) und "Ah-Rezeptorunempfindlichen" Mäusestämmen (z. B. DBA Mäuse) wurde den Allel-Variationen des Genlocus des Rezeptors zugeschrieben, was in unterschiedlichen Fähigkeiten resultiert, 2,3,7,8-TCDD zu binden (Holsapple et al.,1991; Landers et Bunce, 1991).

Der Thymus, bekannt als besonders empfindliches Organ für 2,3,7,8-TCDD, weist eine hohe Konzentration an Ah- Rezeptoren auf. Poland und Glover beschrieben einen direkten Zusammenhang zwischen einer durch 2,3,7,8-TCDD induzierten Thymusatrophie und dem Vorhandensein des Ah-Rezeptors (Poland et Glover, 1980). Es ist auch von Bedeutung, in welchen Konzentrationen der Rezeptor in den Zellen vorhanden ist (Blank et al., 1987; Vos et al., 1989).

Der Nachweis von Ah-Rezeptoren in Thymusepithelzellen von Ratten, Mäusen und Menschen erklärt die Empfindlichkeit dieser Zellen für 2,3,7,8-TCDD (Greenlee et al., 1985). Da Thymusepithelzellen zum großen Teil an der Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix beteiligt sind und eine Rolle in der physiologischen Funktionsfähigkeit des Thymus sowie Reifung und Differenzierung der Thymozyten spielen, scheinen sie, als Ah-Rezeptoren-reiche Zellen, eine wichtige Angriffsstelle von 2,3,7,8-TCDD darzustellen. Holsapple und Mitarbeiter zeigten mit einem Dioxincongener 2,7- Dichlor-dibenzo-para-dioxin, das eine sehr schwache Affinität zum Ah-Rezeptor besitzt, dass bei den behandelten Tieren eine Abschwächung der humoralen Immunantwort auslösbar war; eine Thymusatrophie wurde nicht beobachtet. Dagegen erreichten sie bei Behandlung mit 2,3,7,8-TCDD (hohe Affinität zum Ah-Rezeptor) eine starke Unterdrückung der Immunantwort und eine ausgeprägte Thymusatrophie (Holsapple et al., 1986).

Die meisten Studien zeigten, dass eine Thymusatrophie, die Unterdrückung der thymusabhängigen Immunität und die Unterdrückung der Antikörpersynthese nach 2,3,7,8-TCDD-Exposition, durch den Ah-Rezeptor vermittelt wird. Gerade die thymusabhängige zelluläre Immunantwort soll stark abhängig vom Ah-Genotyp der entsprechenden Epithelien der Zellen des Thymus sein (Greenlee et al., 1985). Lin und Mitarbeiter untersuchten die Rolle des Ah-Rezeptors in Entwicklungsstörungen unterschiedlicher Organe nach 2,3,7,8-TCDD Exposition. Sie beschrieben unter anderem die Ah-Rezeptor abhängige Abnahme der relativen und absoluten Gewichte von Thymi von Mäusen, die als Ah-Rezeptor Wildtypen galten, im Gegensatz zu so genannten Ah-Rezeptor "knock-out" Mäusen, bei denen dieser Effekt nicht zu beobachten war (Lin et al., 2001).

Eine "Überaktivierung" des Ah-Rezeptors führte zu Thymusatrophie und Immunsuppression sowie zu einer vermehrten Auswanderung von "doppelt-negativen", also unreifen Thymozyten in die Peripherie und Akkumulation in der Milz (Temchura et al., 2005). Camacho und Mitarbeiter untersuchten Ah-Rezeptor "knock-out" Mäuse und Wildtypen nach Behandlung mit 2,3,7,8-TCDD bezüglich Thymusatrophie und Apoptoseraten bestimmter Zellen. Sie machten die Beobachtung, dass Ah-Rezeptor "knock-out" Mäuse hinsichtlich der untersuchten Effekte resistent gegenüber 2,3,7,8- TCDD waren. Zusätzlich stellten sie fest, dass die Expression bestimmter Apoptosegene beeinflusst worden war. Diese Gene wurden in Thymusepithelzellen, nicht jedoch in Thymozyten nachgewiesen. Der Anstieg der Apoptoserate war in Zellen aufgetreten, in denen Fas/FasL-Interaktionen stattgefunden hatten (Camacho et al., 2005). In einer Studie, in der die Involvierung des oben beschriebenen Apoptosegens Fas näher untersucht werden sollte, beobachteten Nagai und Mitarbeiter ebenfalls die Ah-Rezeptor abhängige Thymusinvolution, jedoch keine Beteiligung von Fas/FasL Interaktionen (Nagai et al., 2006).

Im Zusammenhang mit Herz und Gefäßsystem ist in mehreren Untersuchungen die kardiovaskuläre Toxizität des Ah-Rezeptor Liganden 2,3,7,8-TCDD nachgewiesen worden (Vogel et al., 2004). Es stellt sich die Frage, ob auch hier Zusammenhänge zwischen der Wirkung von "Dioxinen" und der Anwesenheit des Ah-Rezeptors zu beobachten sind.

Eine Ah-Rezeptorüberaktivierung durch 2,3,7,8-TCDD während der Entwicklung des Zebrafischembryos resultierte in veränderter Herzmorphologie und veränderter Funktion, die zum Exitus der Embryonen führte. 2,3,7,8-TCDD induzierte die Expression von 42 Genen, die an Proliferation, Entwicklung des Herzens und der Herzkontraktilität beteiligt waren. Zeichen der kardiovaskulären Veränderungen waren ein vermindertes Schlagvolumen, verminderter peripherer Blutfluss und gestörtes Wachstum des Herzens (Carney et al., 2006). Clark und Mitarbeiter wiesen in ihren Versuchen mit C57Bl Mäusen ebenfalls einen direkten Zusammenhang zu 2,3,7,8-TCDD vermittelten Effekten und der Anwesenheit des Ah-Rezeptor nach (Clark et al., 1991). Bei der Untersuchung von Genen, die an Veränderungen von Funktion und Morphologie von Myokard und Nieren nach 2,3,7,8-TCDD Verabreichung beteiligt waren, beobachteten Aragon und Mitarbeiter eine Induktion von mRNA für Gene, die mit "Remodeling" der extrazellulären Matrix assoziiert waren, mit kardialer Hypertrophie und Aktivierung des Ah-Rezeptors. Die Beeinflussung der Genexpression war bei Ah-Rezeptor "knock-out" Mäusen nicht nachweisbar (Aragon et al., 2008).

Ein weiterer diskutierbarer Zusammenhang besteht zwischen der Wirkung von TGF-ß auf unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix und der Wirkung von 2,3,7,8-TCDD auf unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix. Die Wirkung von TGF- ß auf die extrazelluläre Matrix ist in einem umfassenden Überblick von Branton und Kopp zusammengefasst worden (Branton und Kopp, 1999). Sie beschreiben die Rolle von TGF-ß im Rahmen der Fibrosierung von Geweben. TGF-ß lässt sich physiologisch in allen Geweben nachweisen, aber besonders hoch sind seine Konzentrationen in Bereichen der Wundheilung und in Arealen mit erhöhtem Reparationsbedarf. Erhöhte Konzentrationen finden sich auch in Knochen, in der Lunge, in den Nieren und in der Plazenta. TGF-ß wird in fast allen parenchymalen Zellen produziert, aber auch von Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten. Er stimuliert die Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix und hemmt den Abbau dieser Proteine. Damit ist TGF-ß ein entscheidender Faktor bei der Fibrosierung von Geweben. Zu den durch TGF-ß regulierbaren Proteinen der extrazellulären Matrix gehören auch Laminin, Fibronektin, Kollagen Typ I und Typ IV. Unter physiologischen Bedingungen ist der Anteil an Proteinen der extrazellulären Matrix im Gewebe durch eine Balance zwischen Synthese und Abbau reguliert, letzterer durch die Aktivität der so genannten Matrix-Metalloproteinasen. Würde hier ein Ungleichgewicht entstehen, könnte es im entsprechenden Maße zur Fibrose von parenchymalen Organen kommen. Chen und Mitarbeiter untersuchten einen Wachstumsfaktor, "connective tissue growth factor" (CTGF), der funktionell in einem engen Zusammenhang zum "transforming growth factor" steht. Es ist bekannt, dass CTGF viele zelluläre Prozesse beeinflussen kann, die einer Fibrose zu Grunde liegen können, wie Adhäsion, Proliferation und Migration von Zellen, auch die Synthese der Proteine der extrazellulären Matrix. Die Autoren betonen die Rolle von CTGF als einen wichtigen Mediator bei Signalübertragungen durch TGF-ß im Herz. Eine nicht physiologische Expression dieses Genes könnte ein diagnostischer Marker für kardiale Fibrose sein. Zur vermehrten Expression dieses Fibrose-verursachenden Faktors ist die Induktion durch TGF-ß Voraussetzung (Chen et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Fibrose von Thymus und Myokard bei Mäusen nach Behandlung mit TCDD nachgewiesen werden. Die Ursache liegt in der Vermehrung der TGFß-abhängigen Proteine der extrazellulären Matrix.

In der Studie von Riecke und Mitarbeitern wurde nicht nur eine Vermehrung von Proteinen der extrazellulären Matrix sondern auch eine erhöhte Konzentrationen von TGF-ß bei 2,3,7,8-TCDD induzierter Myokardfibrose nachgewiesen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die morphologischen Veränderungen im Thymus und Myokard von C57Bl Mäusen nach 2,3,7,8-TCDD Exposition untersucht.

Vier Gruppen von je fünf weiblichen C57Bl Mäusen wurden einmalig subkutan mit 2,3,7,8-TCDD (Dosierungen: 1, 3, 10 µg TCDD/kg KG) oder dem Vehikel behandelt, 2 Wochen unter gleich bleibenden Bedingungen gehalten und nach zervikaler Dislokation seziert. Körpergewichte und Organgewichte wurden bestimmt und Gewebeproben des Thymus und des Myokards wurden immunhistochemisch untersucht. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Antikörper gegen die folgenden Komponenten der extrazellulären Matrix eingesetzt: Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV, Fibronektin, Laminin.

Ein sekundärer FITC-markierter Antikörper wurde zum Nachweis der Markierung benutzt. Die Quantifizierung der Daten erfolgte durch semiquantitative Bildanalyse. Die Behandlung mit 10 µg 2,3,7,8-TCDD/kg Körpergewicht führte im Vergleich zu den Kontrollen zu einem signifikant erhöhten Anteil an Kollagen Typ I im Thymus. Auch der Anteil an Laminin war bei drei von fünf Mäusen nach Behandlung mit der höchsten Dosis höher als der höchste ermittelte Kontrollwert. Die Resultate bei den Antikörpern gegen Kollagen Typ IV und Fibronektin zeigen eine vergleichsweise hohe Variabilität. Eine eindeutige signifikante Veränderung bei diesen Komponenten der extrazellulären Matrix war nicht zu erkennen.

Die immunhistologische Darstellung der extrazellulären Matrix im Myokard des linken Ventrikels ergab bei den TCDD-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen eine Vermehrung der Komponenten Fibronektin, Kollagen Typ I und Laminin, die für Fibronektin am deutlichsten und statistisch signifikant ausgeprägt war. Es lassen sich also eindeutige morphologische Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in Thymus und Myokard nach 2,3,7,8-TCDD Exposition nachweisen. Die Veränderungen stehen mit den früher gemachten Beobachtungen beim Marmoset in Übereinstimmung, bei denen ein erhöhter Gehalt an Kollagen Typ I im Myokard nachgewiesen wurde. Es bleibt zunächst unklar, ob die beobachteten Veränderungen primäre Ereignisse darstellen oder sekundär etwa durch eine Vermehrung von TGF-ß oder ähnliche Faktoren zustande kommen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Veränderungen bei niedrigen, mehrfach verabreichten Dosierungen zu untersuchen, oder mögliche Angriffspunkte von 2,3,7,8-TCDD, wie zum Beispiel den Ah-Rezeptor, zu identifizieren und zusätzliche Informationen zum möglichen Wirkmechanismus von 2,3,7,8-TCDD zu erhalten. Mäuse des Stammes C57Bl kommen als Versuchstiere in Frage, um weitere experimentelle Untersuchungen auch mit anderen Organen, wie Leber, Nieren, Milz und Lungen durchzuführen.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott BD, Morgan KS, Birnbaum LS, Pratt RM. TCDD alters the extracellular matrix and basal lamina of the fetal mouse kidney. Teratology 1987; 35:335-344.
- Abbott BD, Birnbaum LS, Pratt RM. TCDD-induced hyperplasia of the ureteral epithelium produces hydronephrosis in murine fetuses. Teratology 1987; 35:329-334.
- Aragon AC, Kopf PG, Campen MJ, Huwe JK, Walker MK. In utero and lactational 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure: effects on fetal and adult cardiac gene expression and adult cardiac and renal morphology. Toxicol Sci 2008; 101:321-330.
- Ayres-Martins S, Lannes-Vieira J, Farias-De-Oliveira DA, Brito JM, Verde DM, Savino W. Phagocytic cells of the thymic reticulum interact with thymocyte extracellular matrix ligands and receptors. Cell Immunol 2004; 229:21-30.
- Baccarelli A, Pfeiffer R, Consonni D, Pesatori AC, Bonzini M, Patterson DG Jr, Bertazzi PA, Landi MT. Handling of dioxin measurement data in the presence of non-detectable values: overview of available methods and their application in the Seveso chloracne study. Chemosphere 2005; 60:898-906.
- Berrih S, Savino W, Cohen S. Extracellular matrix of the human thymus: immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells. J Histochem Cytochem 1985; 33:655-664.
- Bertazzi PA, Zocchetti C, Pesatori AC, Guercilena S, Sanarico M, Radice L. Ten-year mortality study of the population involved in the Seveso incident in 1976. Am J Epidemiol 1989; 129:1187-1200.
- Bertazzi PA, Bernucci I, Brambilla G, Consonni D, Pesatori AC. The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. Environ Health Perspect 1998; 106 Suppl 2:625-633.
- Bestervelt LL, Pitt JA, Nolan CJ, Piper WN. TCDD alters pituitary-adrenal function. II: Evidence for decreased bioactivity of ACTH. Neurotoxicol Teratol 1993; 15:371-376.
- Blank JA, Tucker AN, Sweatlock J, Gasiewicz TA, Luster MI. Alpha-Naphthoflavone antagonism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced murine lymphocyte ethoxyresorufin-O-deethylase activity and immunosuppression. Mol Pharmacol 1987; 32:169-172.
- Blaylock BL, Holladay SD, Comment SE, Heindel JJ, Luster MI. Exposure to tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters fetal thymocyte maturation. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 112:207.
- Bock KW, Köhle C. Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. Biochem Pharmacol 2006; 72:393-404.
- Bookstaff RC, Kamel F, Moore RW, Bjerke DL, Peterson RE. Altered regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor number and pituitary responsiveness

to GnRH in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated male rats. Toxicol Appl Pharmacol 1990; 105:78-92.

- Boyd RL, Hugo P. Towards an integrated view of thymopoiesis. Immunol Today 1991; 12:71-79.
- Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. Microbes Infect 1999; 1:1349-1365.
- Brewster DW, Bombick DW, Matsumura F. Rabbit serum hypertriglyceridemia after administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). J Toxicol Environ Health 1988; 25:495-507.
- Britz JS, Jason JM, Ptak W, Janeway CA jr, Gershon RK. Distinctive immunological properties of cultured murine thymic epithelial cells. Clin Immunol Immunopathol 1984; 30:227-232.
- Brouwer A, Ahlborg UG, Van den Berg M, Birnbaum LS, Boersma ER, Bosveld B, Denison MS, Gray LE, Hagmar L, Holene E et al. Functional aspects of developmental toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants. Eur J Pharmacol 1995; 293:1-40.
- Brunnberg S, Andersson P, Lindstam M, Paulson I, Poellinger L, Hanberg A. The constitutively active Ah receptor (CA-Ahr) mouse as a potential model for dioxin exposure effects in vital organs. Toxicology 2006; 224:191-201.
- Camacho IA, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on maternal immune response during pregnancy. Arch Toxicol 2004; 78:290-300.
- Cardarelli PM, Pierschbacher MD. Identification of fibronectin receptors on T lymphocytes. J Cell Biol 1987; 105:499-506.
- Clark GC, Taylor MJ, Tritscher AM, Lucier GM. Tumor necrosis factor involvement in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated endotoxin hypersensitivity in C57BL/6J mice congenic at the Ah locus. Toxicol Appl Pharmacol 1991; 111:422-431.
- Chen MM, Lam AL, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. J Mol Cell Cardiol 2000; 32:1805-1819.
- Choi JS, Kim IW, Hwang SY, Shin BJ, Kim SK. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin on testicular spermatogenesis-related panels and serum sex hormone levels in rats. BJU Int 2008; 101:250-255.
- Cook JC, Gaido KW & Greenlee WF. Ah receptor: relevance of mechanistic studies to human risk assessment. Environ Health Perspect 1987; 76:71-77.
- Dalton TP, Kerzee JK, Wang B, Miller M, Dieter MZ, Lorenz JN, Shertzer HG, Nerbert DW, Puga A. Dioxin exposure is an environmental risk factor for ischemic heart disease. Cardiovasc Toxicol 2001; 1:285-298.

- De Heer C, De Waal EJ, Schuurman HJ, Van Loveren H, Vos JG. The intrathymic target cell for the thymotoxic action of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Exp Clin Immunogenet 1994; 11:86.
- De Heer C, Verlaan B, Pennikins A, Vos S, Schuurman HJ, Van Loveren H. Time course of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced thymic atrophy in the wistar rat. Toxicol Appl Pharmacol 1994; 128:97-104.
- De Heer C, Schuurman HJ, Vos JG, & Van Loveren H. Lymphodepletion of the thymus cortex in rats after single oral intubation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Chemosphere 1994; 29:2295.
- De Waal EJ, Rademaker LHPM, Schuurman HJ, Van Loveren H, Vos JG. Ultrastructure of the cortical epithelium of the rat thymus after in vivo exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Arch Toxicol 1993; 67:558.
- De Waal EJ, Schuurman HJ, Van Loveren H, Vos JG. Differential Effects of 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin, bis(Tri-N-Butylin)Oxide and Cyclosporine on Thymus Histophysiology. Crit Rev Toxicol 1997; 27:381-430.
- De Waal EJ, Schuurman HJ, Loeber JG, Van Loveren H, Vos JG. Alterations in the cortical thymic epithelium of rats after in vivo exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): an (immuno)histological study. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 115:80-88.
- De Waal EJ, Rademakers LHPM, Schuurman HJ, Van Loveren H, Vos JG. Ultrastructure of the cortical epithelium of the rat thymus after in vivo exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Arch Toxicol 1993; 67:558.
- De Vito MJ, Thomas T, Umbreit TH, Gallo MA. Antiestrogenic action of 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin: tissue-specific regulation of estrogen receptor in CD1 mice. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 113:284-292.
- Dickson LA. Health risk of dioxins: a review of environmental on tox. considerations. Vet Hum Toxicol 1993; 35:68-77.
- Dong W, Teraoka H, Yamazaki K, Tsukiyama S, Imani S, Imagawa T. 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis. Toxicol Sci 2002; 69:191-201.
- Eshel I, Savion N, Shoham J. Analysis of thymic stromal cell subpopulations grown in vitro on extracellular matrix in defined medium. I. Growth conditions and morphology of murine thymic epithelial and mesenchymal cells. J Immunol 1990; 144:1554-1562.
- Ezaki T, Uehara Y. Thymic nurse cells forming a dynamic microenvironment in spontaneous thymoma BUF/Mna rats. Arch Histol Cytol 1997; 60:39-51.
- Friend M, Trainer DO. Polychlorinated biphenyl: interaction with duck hepatitis virus. Science 1970; 170:1314-1316.
- Fan F, Wierda D, Rozman KK. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on humoral and cell-mediated immunity in Sprague-Dawley rats. Toxicology 1996; 106:221-228.

- Fine JS, Silverstone AE & Gasiewicz TA. Impairment of prothymocyte activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. J Immunol 1990; 144:1169-1176.
- Flesch- Janys D, Berger J, Gurn P, Manz A, Nagel S, Waltsgott H, Dwyer JH. Exposure to polychlorinated dioxins and furans (PCDD/F) and mortality in a cohort of workers from a herbicide-producing plant in Hamburg, Federal Republic of Germany. Am J Epidemiol. 1995; 142:1165-75. Erratum in: Am J Epidemiol 1996; 144:716.
- Frazier DE Jr, Silverstone AE, Soults JA, Gasiewicz TA. The thymus does not mediate 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-elicited alterations in bone marrow lymphocyte stem cells. Toxicol Appl Pharmacol 1994; 124:242-247.
- Giunta M, Favre A, Ramarli D. A novel integrin involved in thymocyte-thymic epithelial cell interactions. J Exp Med 1991; 173:1537-1548.
- Greenlee WF, Dold KM, Irons RD, Osborne R. Evidence for direct action of 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on thymic epithelium. Toxicol Appl Pharmacol 1985; 79:112-120.
- Gupta BN, Vos JG, Moore JA, Zinkl JG, Bullock BC. Pathologic effects of 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals. Environ Health Perspect 1973; 5:125-140.
- Guyden JC, Pezzano M. Thymic nurse cells: a microenvironment for thymocyte development and selection. Int Rev Cytol 2003; 223:1-37.
- Hammar JA. Zur gröberen Morphologie und Morphogenie des Menschenthymus. Anat Hefte 1911; 43:201-242
- Heid SE, Walker MK and Swanson HI. Correlation of cardiotoxicity mediated by halogenated aromatic hydrocarbons to aryl hydrocarbon receptor activation. Toxicol Sci 2001; 61:187-196.
- Holladay SD, Lindstrom P, Blaylock BL, Comment CE, Germolec DR, Heindell JJ, Luster MI. Perinatal thymocyte antigen expression and postnatal immune development altered by gestational exposure to tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Teratology 1991; 44:385-393.
- Holsapple MP, Morris DL, Wood SC, Snyder NK. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxininduced changes in immunocompetence: possible mechanisms. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1991; 31:73-100.
- Holsapple MP, Snyder NK, Wood SC, Morris DL. A review of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin-induced changes in immunocompetence: 1991 update. Toxicology 1991; 69:219-255.
- Holsapple MP, McCay JA, Barnes DW. Immunosuppression without liver induction by subchronic exposure to 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin in adult female B6C3F1 mice. Toxicol Appl Pharmacol 1986; 83:445-455.

- Holsapple MP, Mc Nerney PJ, Barnes DW, White KL jr. Suppression of humoral antibody production by exposure to 1,2,3,6,7,8-hexachlorodibenzo-p-dioxin. J Pharmacol Exp Ther 1984; 231: 518-526.
- House RV, Lauer LD, Murray MJ, Thomas PT, Ehrlich JP, Burleson GR, Dean JH. Examination of immune parameters and host resistance mechanisms in B6C3F1 mice following adult exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. J Toxicol Environ Health 1990; 31:203-215.
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 1992; 69:11-25.
- Hynes RO. Fibronectins. 1990 Springer, New York.
- Ivnitski I, Elmaoued R, Walker MK. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibition of coronary development is preceded by a decrease in myocyte proliferation and an increase in cardiac apoptosis. Teratology 2001; 64:201-212.
- Jirasek L, Kalensky J, Kubec K. Chlorakne, Porphyria cutanea tarda an other intoxikation by herbicides. Hautarzt 1976; 27:328-333.
- Ikuta T, Eguchi H, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K. Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. J Biol Chem 1998; 273:2895-2904.
- Jokinen MP, Walker NJ, Brix AE, Sells DM, Haseman JK, Nyska A. Increase in cardiovascular pathology in female Sprague-Dawley rats following chronic treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. Cardiovasc Toxicol 2003; 3:299-310.
- Junqueira LC, Carneiro J. Histologie-Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 4. aktualisierte und korrigierte Auflage, 1996; 105-107. Originaltitel: Histologia Basica 1971 Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, Brasilien.
- Kanzawa N, Kondo M, Okushima T, Yamaguchi M, Temmei Y, Honda M, Tsuchiya T. Biochemical and molecular biological analysis of different responses to 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin in chick embryo heart and liver. Arch Biochem Biophys 2004; 427:58-67.
- Kim MG, Lee G, Lee SK, Lolkema M, Yim J, Hong SH, Schwartz RH. Epithelial cellspecific laminin 5 is required for survival of early thymocytes. J Immunol 2000; 165:192-201.
- Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. J Cell Biol 2000; 148:615-624. Erratum in: J Cell Biol 2000; 151:47.
- Kreiß T, Vale, R. Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhhesion Proteins. A sambrook & tooze publikation at oxford university press, 1999.
- Kremer J, Gleichmann E & Esser. Thymic stroma exposed to arylhydrocarbon receptorbinding xenobiotics fails to support proliferation of early thymocytes but induces differentiation.J Immunol 1994; 153:2778-86.

- Krüger N, Helge H, Neubert D. Bedeutung von PCDDs/PCDFs ("Dioxinen") in der Pädiatrie. Monatsschr Kinderheilkd 1991; 139: 434-441.
- Kurl RN, Abraham M & Olnes MJ. Early effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on rat thymocytes in vitro. Toxicology 1993; 77:103-114.
- Lagrota-Candido JM, Villa-Verde DM, Vanderlei FH Jr, Savino W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. V. Interferon-gamma modulates thymic epithelial cell/thymocyte interactions via extracellular matrix ligands and receptors. Cell Immunol 1996; 170:235-244.
- Landers JP, Bunce NJ. The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. Biochem J 1991; 276:273-287.
- Lannes-Vieira J, Dardenne M, Savino W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. J Histochem Cytochem 1991; 39:1539-1546.
- Lannes- Vieira J, Chammas R, Villa-Verde DM. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. III. Thymic epithelial cells express the VLA6 complex that is involved in laminin-mediated interactions with thymocytes. Int Immunol 1993; 5:1421-1430.
- Lannes-Vieira J, van der Meide PH, Savino W. Extracellular matrix components of the mouse thymic microenvironment. II. In vitro modulation of basement membrane proteins by interferon-gamma: relationship with thymic epithelial cell proliferation. Cell Immunol 1991; 137:329-340.
- Legare ME, Hanneman WH, Barhoumi R, Burghardt RC, Tiffany-Castiglioni E. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters hippocampal astroglia-neuronal gap junctional communication. Neurotoxicology 2000; 21:1109-1116.
- Legare ME, Hanneman WH, Barhoumi R, Tiffany-Castiglioni E. The effects of 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure in primary rat astroglia: identification of biochemical and cellular targets. Neurotoxicology 1997; 18:515-524.
- Lin TM, Ko K, Moore RW, Buchanan DL, Cooke PS, Peterson RE. Role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of control and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed male mice. J Toxicol Environ Health A 2001; 64:327-342.
- Luebke RW, Copeland CB, Diliberto JJ, Akubue PI, Andrews DL, Riddle MM, Williams WC, Birnbaum LS. Assessment of host resistance to Trichinella spiralis in mice following preinfection exposure to 2,3,7,8-TCDD. Toxicol Appl Pharmacol 1994; 125:7-16.
- Lundberg K. Dexamethasone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin can induce thymic atrophy by different mechanisms in mice. Biochem Biophys Res Commun 1991; 178:16-23.
- Lundberg K, Grönvik KO, Dencker L. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induced suppression of the local immune response. Int J Immunopharmacol 1991; 13:357-368.

- Mably TA, Moore RW, Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 1. Effects on androgenic status. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 114:97-107.
- Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A, Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 114:118-126.
- Mably TA, Theobald HM, Ingall GB, Peterson RE. Hypergastrinemia is associated with decreased gastric acid secretion in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats. Toxicol Appl Pharmacol 1990; 106:518-528.
- Mandal PK.Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. J Comp Physiol [B] 2005; 175:221-230.
- Miller JF. Immunological function of the thymus. Lancet 1961; 2:748-749.
- Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG Jr, Needham LL. Change in sex ratio with exposure to dioxin. Lancet 1996; 348:409.
- Carney SA, Chen J, Burns CG, Xiong KM, Peterson RE, Heideman W. Aryl hydrocarbon receptor activation produces heart-specific transcriptional and toxic responses in developing zebrafish. Mol Pharmacol 2006; 70:549-561.
- Morris DL, Snyder NK, Gokani V, Blair RE, Holsapple MP. Enhanced suppression of humoral immunity in DBA/2 mice following subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Toxicol Appl Pharmacol 1992; 112:128-132.
- Mosher DF. Fibronectin. Academic Press, New York, 1998.
- Murante FG, Gasiewicz TA. Hemopoietic progenitor cells are sensitive targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J mice. Toxicol Sci 2000; 54:374-83.
- Nagai H, Kubo M, Abe R, Yamamoto M, Nohara K. Constitutive activation of the aryl hydrocarbon receptor in T-lineage cells induces thymus involution independently of the Fas/Fas ligand signaling pathway. Int Immunopharmacol 2006; 6:279-286.
- Nebert DW, Goujon FM, Gielen JE. Aryl hydrocarbon hydroxylase induction by polycyclic hydrocarbons: simple autosomal dominant trait in the mouse. Nat New Biol 1972; 236:107-110.
- Neubert R, Stahlmann R, Korte M, van Loveren H, Vos JG, Golor G, Webb JR, Helge H, Neubert D. Effects of small doses of dioxins on the immune system of marmosets and rats. Ann NY Acad Sci 1993; 685:662-686.
- Neubert R, Jacob-Müller U, Stahlmann R, Helge H, Neubert D. Polyhalogenated dibenzo-pdioxins and dibenzofurans and the immune system. 1. Effects on peripheral lymphocyte subpopulations of a non-human primate (Callithrix jacchus) after treatment with 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Arch Toxicol 1990; 64:345-359.

- Neubert R, Jacob-Müller U, Stahlmann R, Helge H, Neubert D. Polyhalogenated dibenzo-pdioxins and dibenzofurans and the immune system. 2. In vitro effects of 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on lymphocytes of venous blood from man and a non-human primate (Callithrix jacchus). Arch Toxicol 1991; 65:213-219.
- Nishimura N, Yonemoto J, Miyabara Y, Fujii-Kuriyama Y, Tohyama C. Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. Arch Toxicol 2005; 79:260-267.
- Nohara K, Pan X, Tsukumo S, Hida A, Ito T, Nagai H, Inouye K, Motohashi H, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y, Tohyama C. Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes. J Immunol 2005; 174:2770-2777.
- Nohara K, Fujimaki H, Tsukumo S, Ushio H, Miyabara Y, Kijima M, Tohyama C, Yonemoto J. The effects of perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune organs in rats. Toxicology 2000; 154:123-133.
- Nottebrock C, Riecke K, Kruse M, Shakibaei M, Stahlmann R. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the extracellular matrix of the thymus in juvenile marmosets (Callithrix jacchus). Toxicology 2006; 226:197-207.
- Okey AB, Riddick DS, Harper PA. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. Toxicol Lett 1994; 70:1-22.
- Pesatori AC, Zocchetti C, Guercilena S, Consonni D, Turrini D, Bertazzi PA. Dioxin exposure and non-malignant health effects: a mortality study. Occup Environ Med 1998; 55:126-131.
- Pilarski LM, Yacyshyn BR, Jensen GS, Pruski E, Pabst HF. Beta 1 integrin (CD29) expression on human postnatal T cell subsets defined by selective CD45 isoform expression. J Immunol 1991; 147:830-837.
- Poland A, Glover E. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: segregation of toxocity with the Ah locus. Mol Pharmacol 1980; 17:86-94.
- Potter CL, Sipes IG, Russell DH. Hypothyroxinemia and hypothermia in rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin administration. Toxicol Appl Pharmacol 1983; 69:89-95.
- Riecke K, Grimm D, Shakibaei M, Kossmehl P, Schulze-Tanzil G, Paul M, Stahlmann R. Low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin increase transforming growth factor beta and cause myocardial fibrosis in marmosets (Callithrix jacchus). Arch Toxicol 2002; 76:360-366.
- Riecke K, Schmidt A, Stahlmann R. Effects of 2,3,7,8-TCDD and PCB 126 on human thymic epithelial cells in vitro. Arch Toxicol 2003; 77:358-364.
- Rozman K. The Toxicology Forum. Health Effects and Safety Assessment of Dioxins and Furans. (Kongreßband: Karlsruhe) 1990; 259.

- Samms M, Martinez M, Fousse S, Pezzano M, Guyden JC. Circulating macrophages as well as developing thymocytes are enclosed within thymic nurse cells. Cell Immunol 2001; 212:16-23.
- Savagner P, Bauvois B, Deugnier MA. Aspects of haemopoietic cell dynamics: ontogeny and targeted migration. Ann Inst Pasteur/ Immunol 1989; 139:409-425.
- Savino W, Villa-Verde DM, Lannes-Vieira J. Extracellular matrix proteins in intrathymic Tcell migration and differentiation? Immunol Today 1993; 14:158-161.
- Savino W. The thymic microenvironment in infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990; 85:255-260.
- Savino W, Martins SA, Neves-dos-Santos S, Smaniotto S, Ocampo JSP, Mendes-da-Cruz DA, Terra-Granado E, Kusmenok O, Villa-Verde DMS. Thymocte migration: an affair of multiple cellular interactions? Braz J Med Biol Res 2003; 36
- Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. J Leukoc Biol 2004; 75:951-961.
- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. Annu Rev Cell Dev Biol 1995; 11:549-599.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature 1992; 359:693-699.
- Silverstone AE, Frazier DE Jr, Fiore NC, Soults JA, Gasiewicz TA. Dexamethasone, betaestradiol, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin elicit thymic atrophy through different cellular targets. Toxicol Appl Pharmacol 1994; 126:248-259.
- Shen ES, Gutman SI, Olson JR. Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated hepatotoxicity in C57BL/6J and DBA/2J mice. J Toxicol Environ Health 1991; 32:367-381.
- Smialowicz RJ, Riddle MM, Williams WC, Diliberto JJ. Effects of 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on humoral immunity and lymphocyte subpopulations: differences between mice and rats. Toxicol Appl Pharmacol 1994; 124:248-256.
- Thackaberry EA, Jiang Z, Johnson CD, Ramos KS, Walker MK. Toxicogenomic profile of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the murine fetal heart: modulation of cell cycle and extracellular matrix genes. Toxicol Sci 2005; 88:231-241.
- Takeuchi T, Kubonishi I, Ohtsuki Y, Miyoshi I. A new monoclonal antibody to human subcapsular thymic epithelial cells.Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1991; 419:147-151.
- Temchura VV, Frericks M, Nacken W, Esser C. Role of the aryl hydrocarbon receptor in thymocyte emigration in vivo. Eur J Immunol 2005; 35:2738-2747.

Theobald HM, Ingall GB, Mably TA, Peterson RE. Response of the antral mucosa of the rat stomach to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Toxicol Appl Pharmacol 1991; 108:167-179.

Toepfer K. Cytologie und Histologie. 1993, pp. 138-140.

- Uitto J, Burgeson RE, Christiano AM, Moshell AN. Symposium on Epidermolysis Bullosa: Molecular Genetics of the Cutaneous Basement Membrane Zone, Jefferson Medical College, Philadelphia, Pennsylvania, April 29 and 30, 1996. J Invest Dermatol 1996; 107:787-788.
- Villa-Verde DM, Mello-Coelho V, Lagrota-Candido JM, Chammas R, Savino W. The thymic nurse cell complex: an in vitro model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. Braz J Med Biol Res 1995; 28:907-912.
- Vivinus-Nebot M, Ticchioni M, Mary F, Hofman P, Quaranta V, Rousselle P, Bernard A. Laminin 5 in the human thymus: control of T cell proliferation via alpha6beta4 integrins. J Cell Biol 1999; 144:563-574.
- Vogel CF, Sciullo E, Matsumura F. Activation of inflammatory mediators and potential role of ah-receptor ligands in foam cell formation. Cardiovasc Toxicol 2004; 4:363-373.
- Vos JG. Immune suppression as related to toxicology. Crit Rev Toxicol 1970; 5:67-101.
- Vos JG, Moore JA, Zinkl JG. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in C57B1/6 mice. Toxicol Appl Pharmacol 1974; 29:229-241.
- Vos, J.G. and Luster, M.I., 1989. Immune alterations. In: Kimbrough, R.D. and Jensen, A.A., Editors, 1989. Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products, Elsevier, Amsterdam, pp. 295–322.
- Watanabe S, Kitamura K, Nagahashi M. Effects of dioxins on human health: a review. J Epidemiol 1999; 9:1-13.
- Wilson CL, Safe S. Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. Toxicol Pathol 1998; 26:657-671.
- Yoon CY, Park M, Kim BH, Park JY, Park MS, Jeong YK, Kwon H, Jung HK, Kang H, Lee YS, Lee BJ. Gene expression profile by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the liver of wild-type (AhR+/+) and aryl hydrocarbon receptor-deficient (AhR-/-) mice. J Vet Med Sci 2006; 68:663-668.

7 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stahlmann, für eine großartige und intensive Betreuung in der gesamten Zeit während der Erstellung der Arbeit, für seine nahezu grenzenlose Geduld und Freundlichkeit und für sein Vertrauen.

Besonderer Dank gilt auch Frau Irmela Baumann-Wilschke, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und ein offenes Ohr für Alles hatte. Ganz besonderer Dank an Frau Heidi Pretorius für Ihre Freundlichkeit und Herrn Dr. Matthias Kruse für seine Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich auch anderen Mitarbeitern aus dem Institut, die in vielen Fällen zur Problemlösung bereit standen und ohne die vieles unmöglich gewesen wäre:

Herrn Dr. Peter Koßmehl, Frau Christine Gericke und Herrn Harald Weinrich, Frau Annegret Felies und Frau Nina Götze (für gute Unterhaltung jederzeit), Frau Helga Stürje und Herrn Dr. Kai Riecke und allen anderen, mit denen ich jederzeit ein Wort wechseln konnte.

Danke meinen Eltern und meiner Schwester, die über viele Jahre geduldig an meiner Seite standen, nie die Hoffnung aufgaben und mir Mut und Rückhalt gaben in allen Zeiten.

Erklärung

"Ich, Anke Ludwig, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Wirkung von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin auf die extrazelluläre Matrix von Myokard und Thymus bei C57Bl Mäusen" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Datum 18.09.2009

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.