

3.3 Bestrahlung von Primärhepatocyten mit ultravioletem Licht

3.3.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die Fixierung der Zellen mit 4 % Formalin bewirkte im Vergleich zu den lebenden Leberzellen eine deutliche Verschlechterung der Qualität der lichtmikroskopischen Befunde. Die Interkalierung von Acridinorange in die DNA schien durch die Fixierung behindert zu werden, so dass eher verwaschene oder unscharf erscheinende Bilder entstanden. Eine Färbung von lysosomalen Elementen konnte nicht beobachtet werden. Acridinorange bewirkt nur in unfixierten Geweben und Zellen eine rote Fluoreszenz lysosomaler Elemente, so dass man in diesen Versuchen vergebens danach sucht.

Die Bestrahlung von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit UV-Licht von 314 nm führte zunächst zu einem Verlust der Reaggregationsfähigkeit. Eine Anfärbung der mit 4 % Formalin fixierten Zellen mit Acridinorange zeigte 2 Stunden nach der Bestrahlung eine leichte Zunahme intensiv gefärbter zellartiger Strukturen, die apoptotische Zellen oder apoptotische Körper darstellten, die noch nicht von anderen Hepatocyten aufgenommen worden waren. (Abb. 3.3.1-1).

Die Anzahl dieser Strukturen war 4 Stunden nach der Bestrahlung noch stärker ausgeprägt. Innerhalb dieser kleinen Partikel konnten nun klare unterschiedliche Bereiche ausgemacht werden, die sich durch verschieden intensive Färbung mit Acridinorange manifestierte (Abb. 3.3.1-2). Vereinzelt schienen diese kleineren Objekte direkt mit Hepatocyten verbunden, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich um Apoptosekörper handelt, die von den Hepatocyten durch Blebbing in das umgebende Medium abgegeben wurden (Abb. 3.3.1-3).

Auch 6 Stunden nach der Bestrahlung ändert sich an dem beobachteten Bild nichts. Weiterhin waren kleine Apoptosekörper in den Proben zu finden, doch die Anzahl erhöhte sich nicht weiter (Abb. 3.3.1-4).

Genauso verhielt es sich auch 24 Stunden nach der UV-Licht-Behandlung. Die Anzahl der beobachteten Apoptosekörper nahm jedoch zu (Abb. 3.3.1-5).

30 Stunden nach der Induktion war die Anzahl der Apoptosekörper weiter erhöht. Ganze Felder von Zellen schienen nun zur Produktion dieser Partikel beizutragen (Abb. 3.3.1-6).

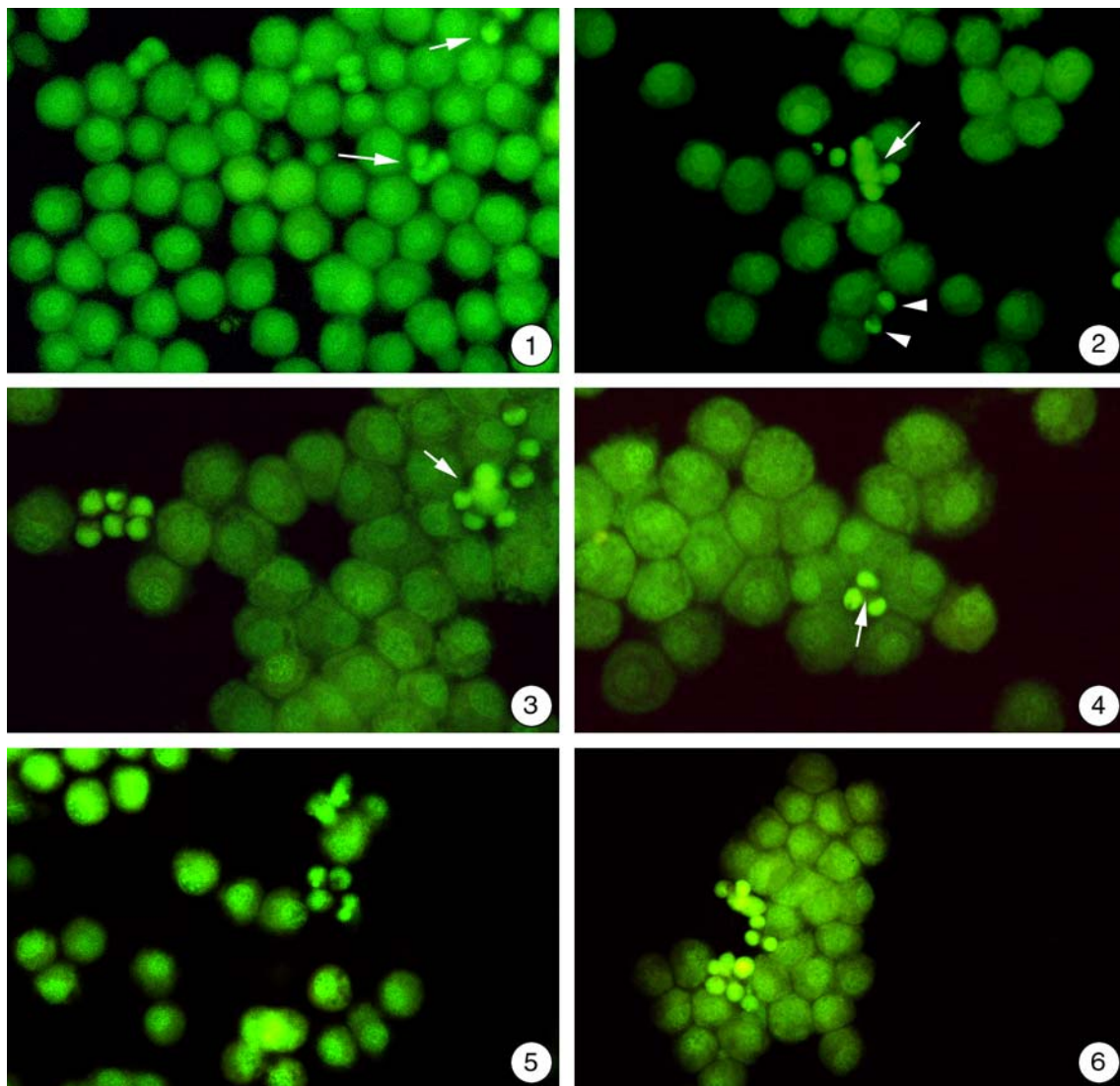


Abbildung 3.3.1-1 bis 6: Isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach Bestrahlung mit ultravioletttem Licht und Anfärbung mit Acridinorange.

1: Hepatocyten 2 Stunden nach der Bestrahlung mit ultravioletttem Licht. Die meisten Zellen sind rund, und die Kerne leuchten in intensivem Grün. Ab und zu fallen eingestreute sehr stark leuchtende runde Gebilde (Pfeile) zwischen den Zellen auf, die Blebs von Leberzellen darstellen könnten.

2: 4 Stunden nach der Bestrahlung können etliche kleinere runde Strukturen (Pfeile) in den untersuchten Proben gefunden werden. Ab und zu kann man erkennen, dass diese kleineren Strukturen nicht homogen grün gefärbt sind, sondern Bereiche mit intensiverer Färbung in diesen kleinen Formen auftreten (Pfeilspitzen). Dies legt nahe, dass es sich um Apoptosekörper mit Chromatinanteil handelt.

3: In Proben, die 4 Stunden nach der Bestrahlung untersucht werden, können Hepatocyten erkannt werden, die große Blebs von ihrem Zellkörper abschnüren (Pfeil).

Fortsetzung nächste Seite →

3.3.2 Ultrastrukturelle Untersuchungen

Hepatocyten, die 24 Stunden nach der Isolation und unmittelbar vor der UV-Bestrahlung für die Elektronenmikroskopie fixiert wurden, wiesen einen peripheren runden bis ovalen Kern auf, in dem einige Schollen aus Heterochromatin zu finden waren. Bei einigen Zellen erschien der Kern auch leicht gelappt. Der Nucleolus war deutlich ausgeprägt, eine Trennung in *Pars fibrosa* und *Pars granulosa* trat nicht auf (Abb. 3.3.2-2). Das raue endoplasmatische Retikulum (RER) war in Kernnähe und in der Zellperipherie in Stapeln organisiert (Abb. 3.3.2-1; 2). Das glatte endoplasmatische Retikulum war deutlich ausgebildet (Abb. 3.3.2-1). Die Mitochondrien waren als länglich ovale bis runde Strukturen hauptsächlich zwischen Kern und RER zu finden (Abb. 3.3.2-2). Eine weitere Häufung dieser Organellen konnte in der Peripherie der Zellen gefunden werden (Abb. 3.3.2-1). Die Anzahl der Peroxisomen – runde Organellen, die in ihrer Größe kleinen bis mittleren Mitochondrien entsprachen, war gering. Das lysosomale Kompartiment war dagegen deutlich erkennbar, zum Großteil als kleine primäre und seltener größere sekundäre Lysosomen (Abb. 3.3.2-1; 3). Residualkörper, die auf eine Vorbelastung der Hepatocyten hinweisen, konnten nicht beobachtet werden. Glykogenfelder oder Lipidtropfen als Speicherstoffe waren nur schwach ausgebildet. Die Zelloberfläche wies deutliche Mikrovilli auf (Abb. 3.3.2-1-3).

Unmittelbar nach der Bestrahlung waren viele Hepatocyten deutlich geschädigt. Der Kern verlor häufig seine runde Struktur und erschien stärker gelappt als die Kerne der Kontrollen. Die Menge und die Anordnung des Heterochromatins im Kern entsprach den unbestrahlten Zellen (Abb. 3.3.2-4 bis 6). Die innere Organisation der bestrahlten Zellen war jedoch völlig verändert. Zum Teil konnten doppelkernige Hepatocyten entdeckt werden (Abb. 3.3.2-4). Das raue endoplasmatische Retikulum (RER) war vollständig fragmentiert. Die Mitochondrien erschienen teilweise leicht geschwollen und elektronenlichter als in den Kontrollen (Abb. 3.3.2-5). Die Peroxisomen waren im Vergleich zu denen der Kontrollzellen unverändert. Einige Zellen produzierten Blebs, die vom Zellleib abgeschnürt wurden (Abb. 3.3.2-6). Ausgeprägte Speicherareale wie Glykogenfelder oder Lipidtropfen konnten in den Proben nicht gefunden werden.

← Fortsetzung Abbildung 3.3.1

4: Auch 6 Stunden nach der Bestrahlung treten die kleinen chromatinhaltigen Formen in den Proben auf, die von Hepatocyten ins umgebende Medium abgegeben werden. Eine Veränderung in der Anzahl dieser Partikel ist nicht erkennbar.

5: 24 Stunden nach Beendigung der UV-Bestrahlung gleicht das Bild den früheren Zeitpunkten.

6: Die Produktion kleinerer chromatinhaltiger Partikel findet hauptsächlich an der Grenzfläche einzelner Zellcluster statt. Dort werden die Blebs in größerer Anzahl produziert als mitten in den Clustern aus Hepatocyten. Die dargestellten Hepatocyten wurde 30 Stunden nach der Bestrahlung untersucht.

Zwei Stunden nach der Bestrahlung hatte sich der Heterochromatingehalt erhöht. Größere Schollen dieses Materials fanden sich über den Kern verteilt (Abb. 3.3.2-7). Das RER war komplett fragmentiert und in kleinere Vesikel im Cytoplasma aufgegangen (Abb. 3.3.2-9). Eine deutliche Veränderung gegenüber den Kontrollen und den Hepatocyten, die unmittelbar nach der Bestrahlung untersucht wurden, war das Auftreten vieler kleinerer Vakuolen, die möglicherweise primäre Lysosomen darstellten. Sie fanden sich gehäuft in einem eng umschriebenen Cytoplasmabereich zwischen Kern und Zelloberfläche konzentriert und waren nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt (Abb. 3.3.2-7; 9). Mitochondrien und Peroxisomen waren in ihrer Morphologie identisch mit den Proben, die direkt nach der UV-Bestrahlung genommen wurden (Abb. 3.3.2-8). Auch jetzt waren keinerlei Energiespeicher zu finden.

Vier Stunden nach der Bestrahlung waren die lysosomalen Elemente und Vakuolen ebenfalls deutlich ausgeprägt (Abb. 3.3.2-10). Der Anteil sekundärer Lysosomen erschien größer. Diese waren in der unmittelbaren Nachbarschaft zu den Vakuolen zu finden. (Abb. 3.3.2-10). Viele Zellen verloren ihre rundliche Form. Ein Teil der Zellkerne wies eine starke Kondensierung des Chromatins auf, und die Kernlamina löste sich teilweise vom Chromatin ab (Abb. 3.3.2-11; 12). Bei diesen Hepatocyten war auch der Rest der Zelle extrem verändert. Die Mitochondrien waren deutlich geschwollen und das Endomembransystem war in diesen Zellen entweder vollständig vesikuliert oder gar nicht mehr vorhanden (Abb. 3.3.2-11; 12). Einige Zellen waren zu diesem Zeitpunkt bereits abgestorben. Auch hier konnten, abgesehen von kleineren dunkel gefärbten Lipidtropfen, keinerlei Reservestoffe gefunden werden (Abb. 3.3.2-11).

Sechs Stunden nach der Bestrahlung entsprachen die meisten Zellen in ihrer Morphologie den bereits vorgestellten Zellen mit gelappten Kernen, vesikuliertem und fragmentiertem RER und einer deutlichen Vermehrung vakuolärer Strukturen und dem Vorhandensein großer sekundärer Lysosomen (Abb. 3.3.2-16; 17). Neue Strukturen traten in Form großer apoptotischer Körper (Abb. 3.3.2-13) und Zellen auf, die mit fragmentiertem Kern und einer extrem unregelmäßigen Form nicht mehr an Hepatocyten erinnerten (Abb. 3.3.2-14). Zum Teil waren die Mitochondrien sehr elektronenlicht und geschwollen (Abb. 3.3.2-15). Teilweise konnten Zellen dokumentiert werden, die sehr große elektronenlichte Vakuolen aufwiesen (Abb. 3.3.2-16). Im Unterschied zu den zuvor besprochenen bestrahlten Zellen konnten nun allerdings auch wie bei den Kontrollen Zellen gefunden werden, die kleinere Glykogenareale aufwiesen (Abb. 3.3.2-17).

Neun Stunden nach der Bestrahlung traten zum ersten Mal wieder Zellen auf, die eine Stapelbildung des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) aufwiesen (Abb. 3.3.2-18; 19). Allerdings war auch bei diesen Zellen der Kern zum großen Teil noch stark gelappt und der Heterochromatingehalt erhöht. Im Unterschied zu den bereits beschriebenen bestrahlten Hepatocyten waren nach 9 Stunden die vakuolären Strukturen schwächer ausgebildet. Neben diesen sich erholenden Zellen war der größere Teil der Hepatocyten noch immer stark verändert. Besonders auffällig waren auch bei diesen Leberzel-

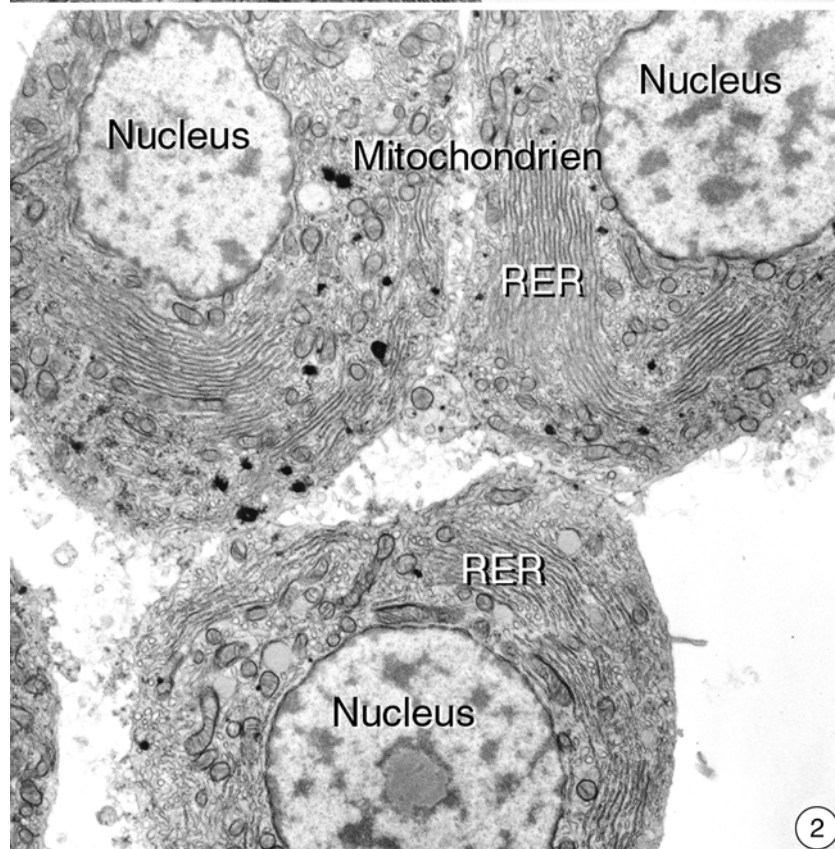
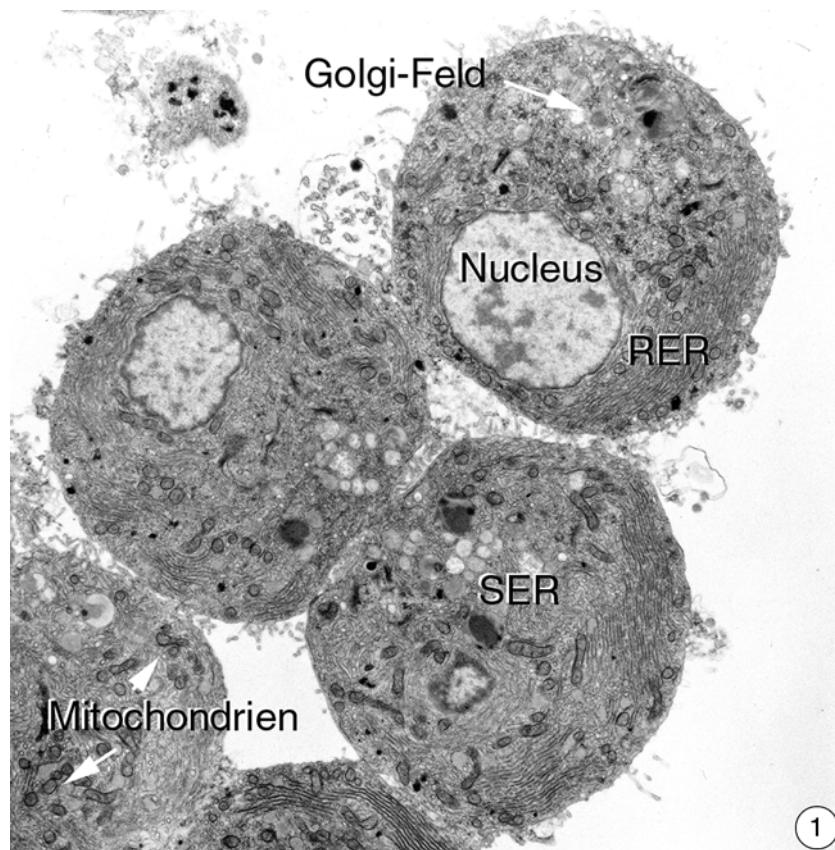
len die Vakuolen, das stark gestörte Endomembransystem und die stark geschwollenen Mitochondrien (Abb. 3.3.2-21). Zwischen den sich regenerierenden und den stark geschädigten Hepatocyten konnten auch Übergangsstadien gefunden werden, deren Endomembransystem zwar noch starke Störungen mit der Tendenz zur Stapelbildung des RER aufwies, in denen die Mitochondrien aber nicht geschwollen waren (Abb. 3.3.2-20). Teilweise waren tote Zellen mit stark kondensiertem Chromatin erkennbar (Abb. 3.3.2-21). Ferner traten Zellen auf, die einen deutlichen Ring von Heterochromatin in der Kernperipherie besaßen (Abb. 3.3.2-20).

22 Stunden nach UV-Bestrahlung waren neben apoptotischen bzw. abgestorbenen Zellen mit kondensiertem Chromatin, geschwollenen Mitochondrien und dunklen Lipidtropfen (Abb. 3.3.2-22) auch Hepatocyten zu finden, die deutliche Regenerationsmerkmale zeigten. Bei diesen Zellen bildeten sich wieder RER-Stapel aus, die Schwellung der Mitochondrien war nicht mehr stark ausgeprägt. Trotzdem besaßen viele dieser Zellen noch zahlreiche vakuoläre Strukturen und sekundäre Lysosomen (Abb. 3.3.2-23; 24).

24 Stunden nach der Bestrahlung waren einige apoptotische Zellen oder Zellfragmente zu finden, nicht apoptotische Zellen wiesen große Vakuolen auf. Ihr Endomembransystem war stark vesikuliert und die Kernhülle dilatiert (Abb. 3.3.2-25). Apoptotische Zellen wiesen eine sehr unregelmäßige Form auf, und der Zellkern hatte jeweils einen einzelnen großen Heterochromatinbereich (Abb. 3.3.2-26; 27). Diese Kernüberreste wiesen eine Doppelmembranhülle mit Kernporenkomplexen auf (Abb. 3.3.2-27 Einsatz), so dass man ausschließen kann, dass es sich bei den beobachteten Formen nur um inkorporierte Apoptosekörper handelte.

26 Stunden nach der Bestrahlung ging die Regeneration vieler Hepatocyten weiter. Es konnten wieder Glykogenfelder gefunden werden und auch das Endomembransystem erfuhr eine Neuorganisation (Abb. 3.3.2-30). Generell schien die Anzahl apoptotischer Zellen leicht abzunehmen, auch wenn die überlebenden Hepatocyten in ihrer Morphologie weit von den Kontrollen entfernt waren. Noch immer traten größere vakuoläre Strukturen auf (Abb. 3.3.2-28; 29). Die Mitochondrien waren nicht mehr so stark geschwollen wie zu früheren Zeitpunkten.

Im weiteren Verlauf der Regenerationsphase waren noch immer viele Zellen mit großen bis sehr großen Vakuolen zu finden (30 h nach Bestrahlung; Abb. 3.3.2-33; 34). Auffällig waren nun auch Zellen die deutlich kleiner waren als normale Hepatocyten. Sie waren sehr organellenarm und der Kern besaß sehr unregelmäßige Formen (54 h nach Bestrahlung; Abb. 3.3.2-39). Es fanden sich auch noch immer Zellen mit stark geschwollenen Mitochondrien und völlig vesikuliertem Endomembransystem (54 h nach Bestrahlung; Abb. 3.3.2-36; 37). Ebenso waren die auffälligen Vakuolen in vielen Hepatocyten noch immer zu beobachten (54 h nach Bestrahlung; Abb. 3.3.2-37). Auffällige Veränderungen konnten auch 100 Stunden nach der Bestrahlung dokumentiert werden. Es traten nun auch vermehrt Zellen auf, die deutlich kleiner waren als Kontrollhepatocyten und stark deformierte Zellkerne aufwiesen (Abb. 3.3.2-41).



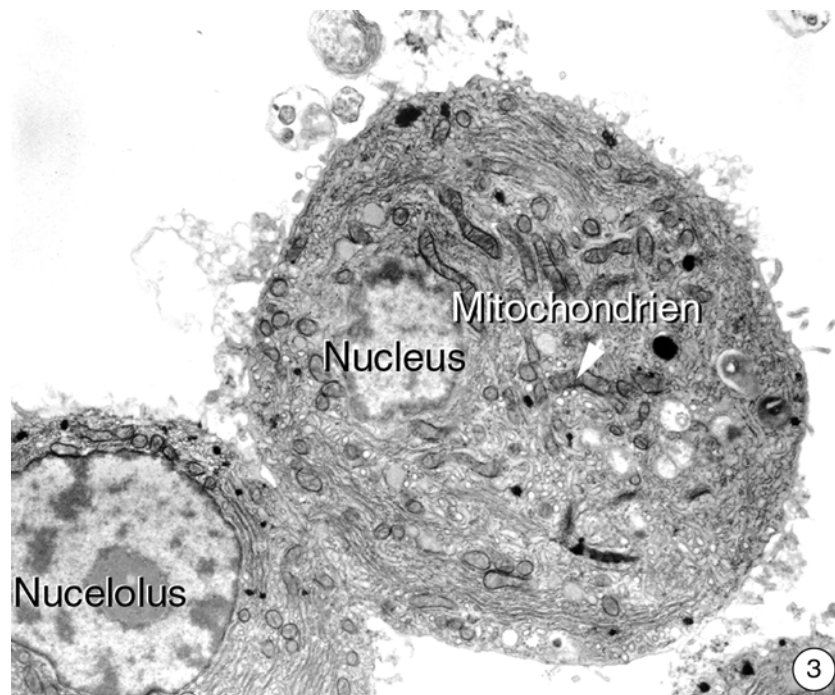
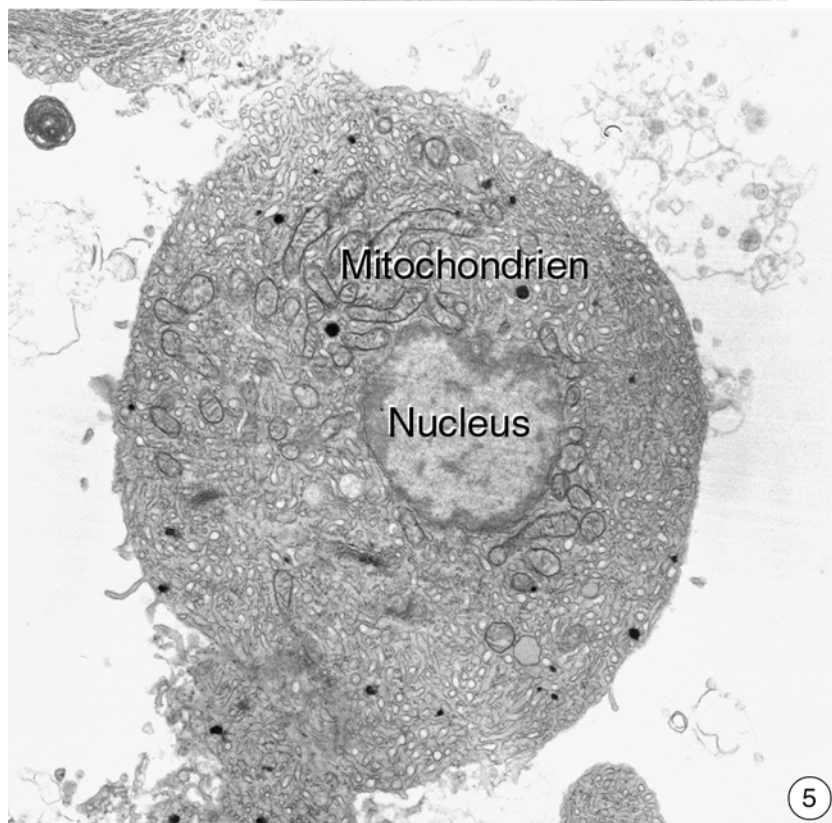
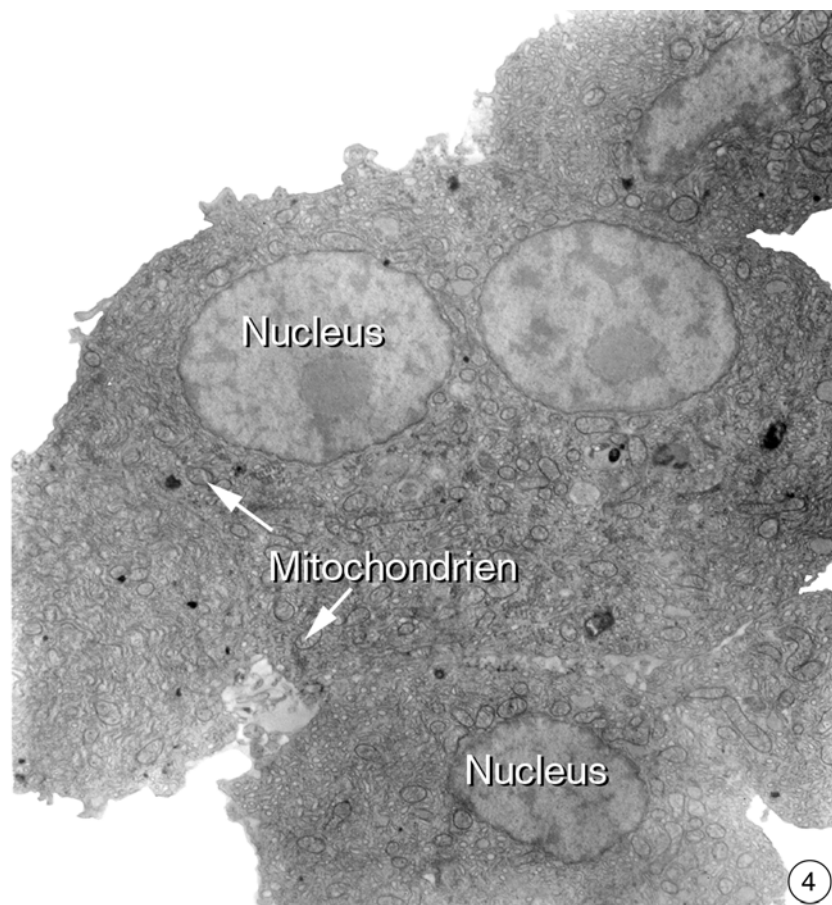


Abbildung 3.3.2-1 bis 3: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 24 Stunden nach der Isolation (1 bis 3) und direkt nach einer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht für 10 Minuten.

1: Der Kern ist rund bis leicht gelappt und liegt dezentral. Der Heterochromatinanteil ist relativ gering. Das raue endoplasmatische Retikulum (RER) liegt in Membranstapeln organisiert in der Peripherie der Zellen und weist eine leicht erhöhte Tendenz zur Fragmentierung auf. Das glatte endoplasmatische Retikulum (SER) ist ebenfalls gut entwickelt. Der Golgi-Apparat ist mächtig entwickelt, und die hohe Anzahl produzierter Vesikeln deutet auf eine hohe Stoffwechselaktivität in den Zellen hin (4.100x).

2: Viele Hepatocyten weisen stark ausgebildetes raues endoplasmatisches Retikulum (RER) auf, das als Manschette um den Kern herum zu finden ist (6.600x).

3: Die Mitochondrien in frisch isolierten Hepatocyten sind von länglich-ovaler Gestalt und sind über die gesamte Zelle verteilt (6.600x).



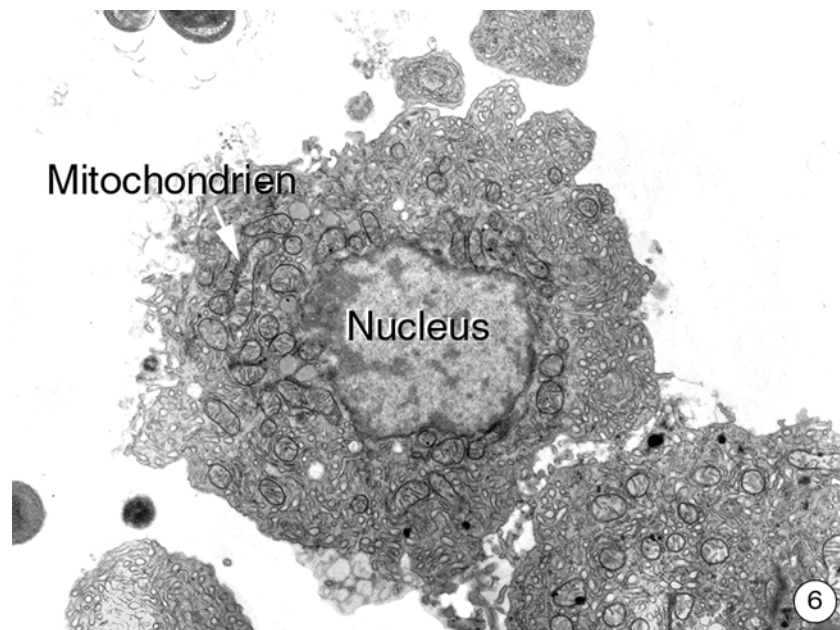
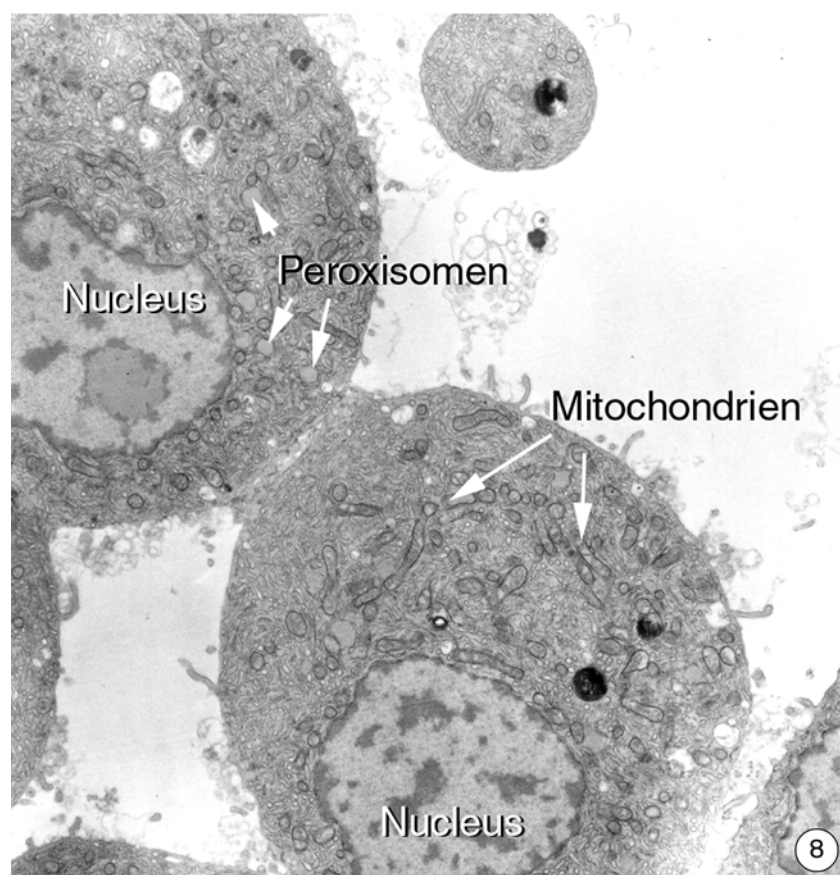


Abbildung 3.3.2-4 bis 6: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle direkt nach einer Bestrahlung mit ultravioletttem Licht für 10 Minuten.

4: Unmittelbar nach der Bestrahlung mit UV-Licht können mehrkernige Hepatocyten beobachtet werden, deren Endomembransystem vollständig fragmentiert ist. Die Mitochondrien erscheinen leicht geschwollen (5.800x).

5: Das Endomembransystem geht unmittelbar nach der Bestrahlung vollständig in viele kleinere Vesikel auf. Die Mitochondrien sind geschwollen (6.600x).

6: Nach Bestrahlung zeigen einige Hepatocyten die Abschnürung von Zellbestandteilen, wodurch die Zellform sehr unregelmäßig wird (6.600x).



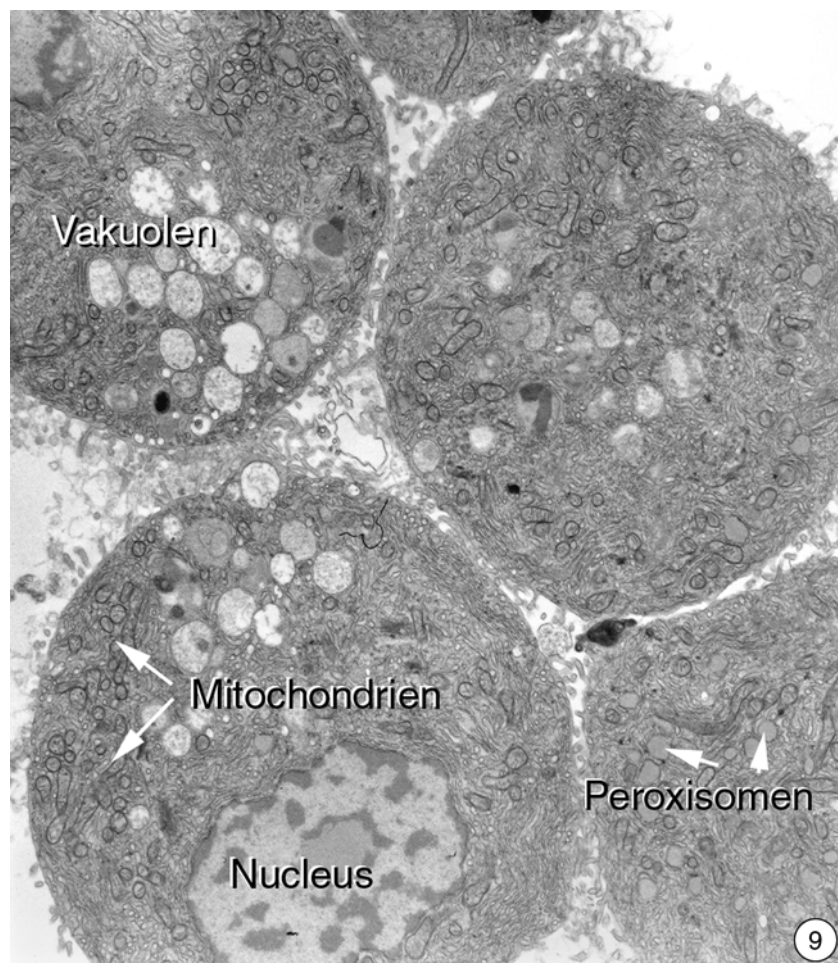


Abbildung 3.3.2-7-9: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 2 Stunden nach einer 10 minütigen Bestrahlung mit ultravioletttem Licht.

7: Zwei Stunden nach der Bestrahlung bestimmen viele vakuoläre Strukturen das Bild der Hepatocyten (6.600x).

8: Zwei Stunden nach der UV-Bestrahlung ist das Endomembransystem vollständig in Vesikel aufgelöst und die Mitochondrien erscheinen leicht geschwollen (6.600x).

9: Die auftauchenden Vakuolen sind nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt. Vielmehr finden sie sich in einem eng umschriebenen Cytoplasmabereich zwischen Zellkern und Zellmembran konzentriert (6.600x).

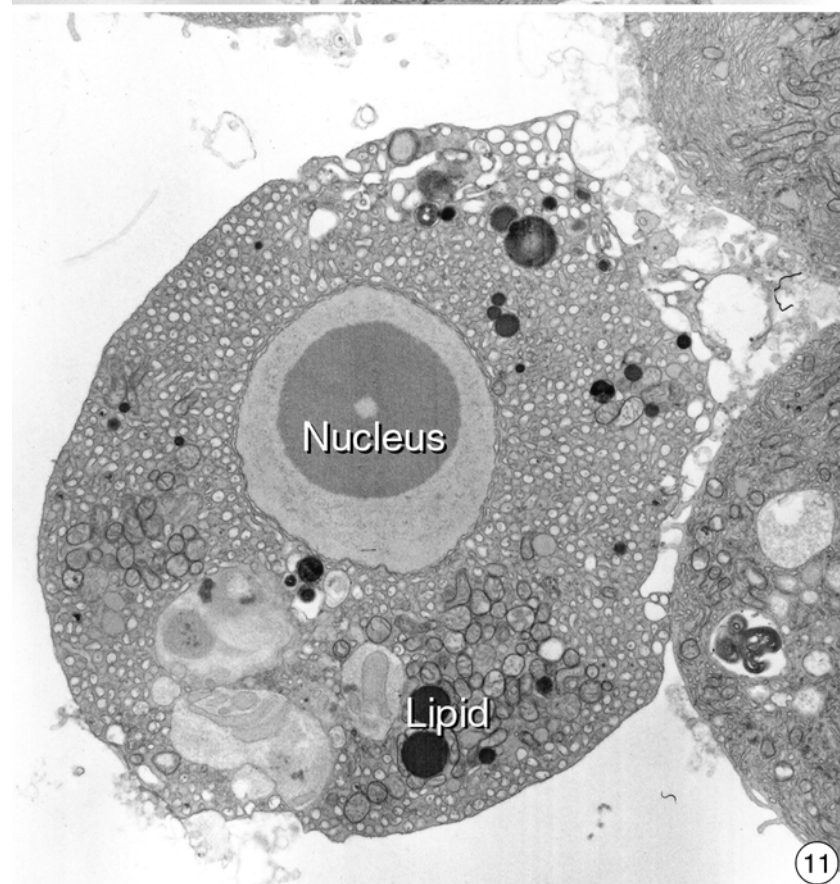
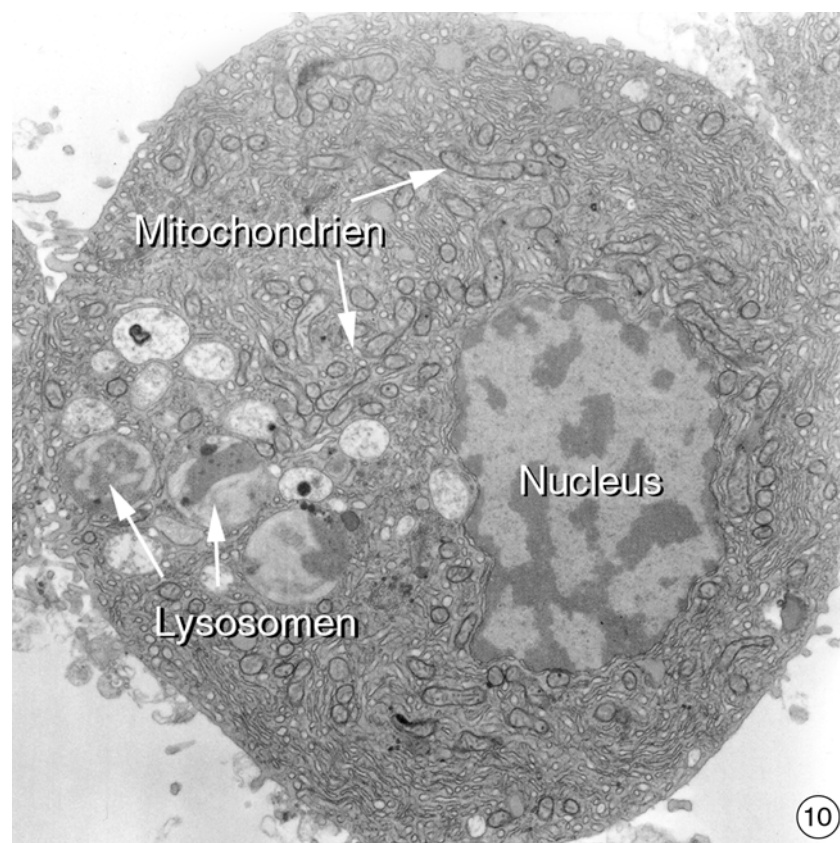


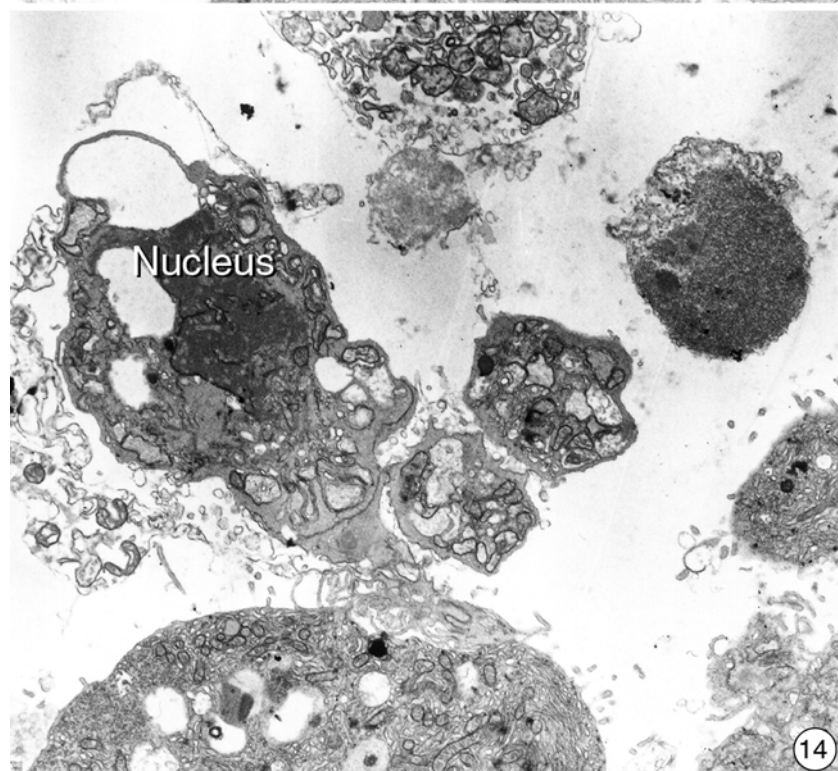
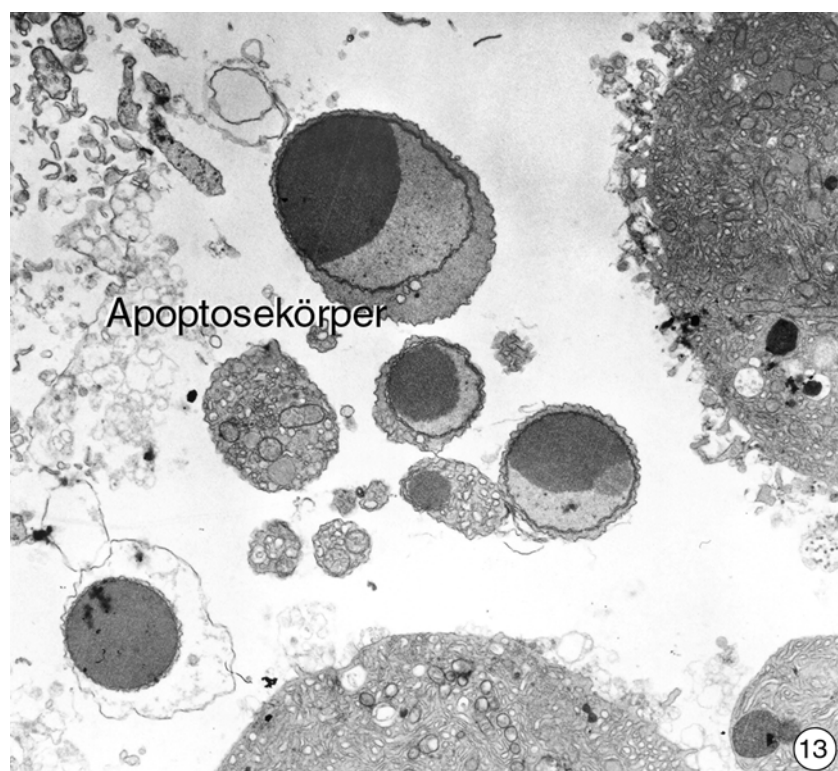


Abbildung 3.3.2-10-12: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 4 Stunden nach einer 10 minütigen Bestrahlung mit ultravioletttem Licht.

10: Vier Stunden nach der Behandlung können vermehrt sekundäre Lysosomen gefunden werden. Der Zellkern ist stärker gelappt, und der Heterochromatinanteil ist leicht erhöht (10.500x).

11: Das Endomembransystem ist 4 Stunden nach der Bestrahlung nur durch viele kleinere Vesikel repräsentiert. Der Zellkern weist eine zentrale Struktur aus kondensiertem Chromatin auf. Es treten mehrere kleinere dunkel gefärbte Lipidtropfen auf (7.500x).

12: Tote Zellen treten ebenfalls 4 Stunden nach der Bestrahlung auf. Bei diesen Zellüberresten ist das Chromatin in den Kernen stark reduziert. Organellen treten nur vereinzelt als stark geschwollene Mitochondrien auf (8.200x).



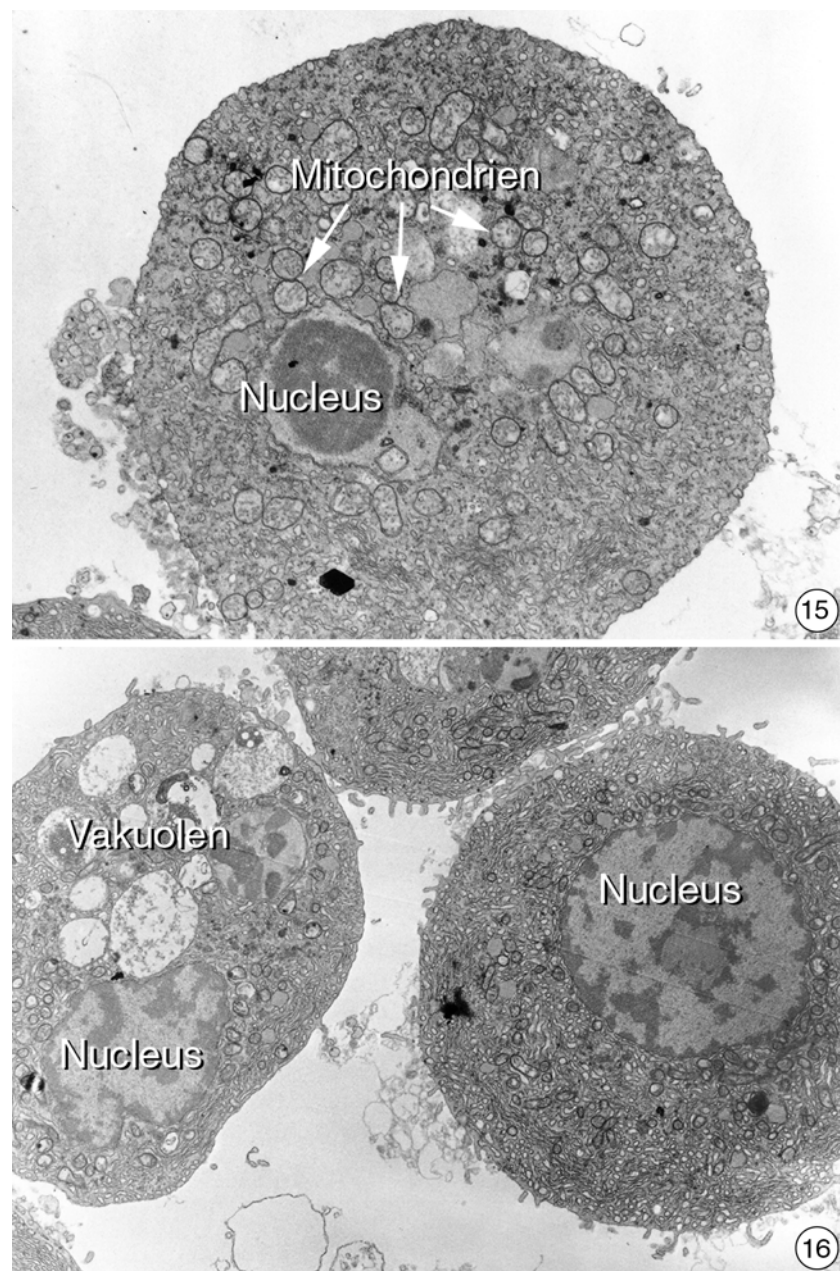


Abbildung 3.3.2-13 bis 16: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 6 Stunden nach einer 10 minütigen Bestrahlung mit ultravioletem Licht.

13: 6 Stunden nach der UV-Bestrahlung treten vermehrt Apoptosekörper im Medium auf. Es handelt sich dabei um membranbegrenzte kleinere Partikel, die Chromatin enthalten (6.600x).

14: Tote Zellen mit extrem veränderter äußerer Form sind erkennbar. Große vakuoläre Strukturen treten auf (6.600x).

15: Zellen mit stark kondensiertem Heterochromatin als zentrale Fläche im Zellkern, enthalten Mitochondrien, die sehr stark geschwollen erscheinen (7.000x).

16: Das lysosomale Kompartiment ist in vielen Zellen sechs Stunden nach der Behandlung extrem stark ausgeprägt. Die vakuolären Strukturen nehmen einen großen Bereich innerhalb der Hepatocyten ein. Hepatocyten, deren Chromatin keine extreme Kondensierung zeigt, besitzen ein stark vesikuliertes Endomembransystem (5.800x).

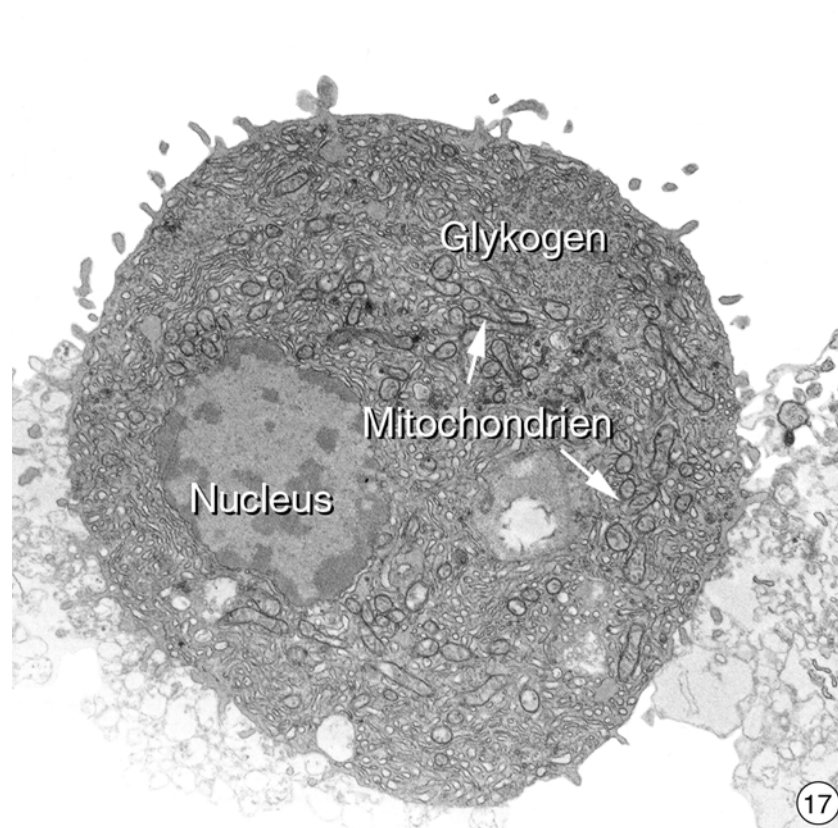
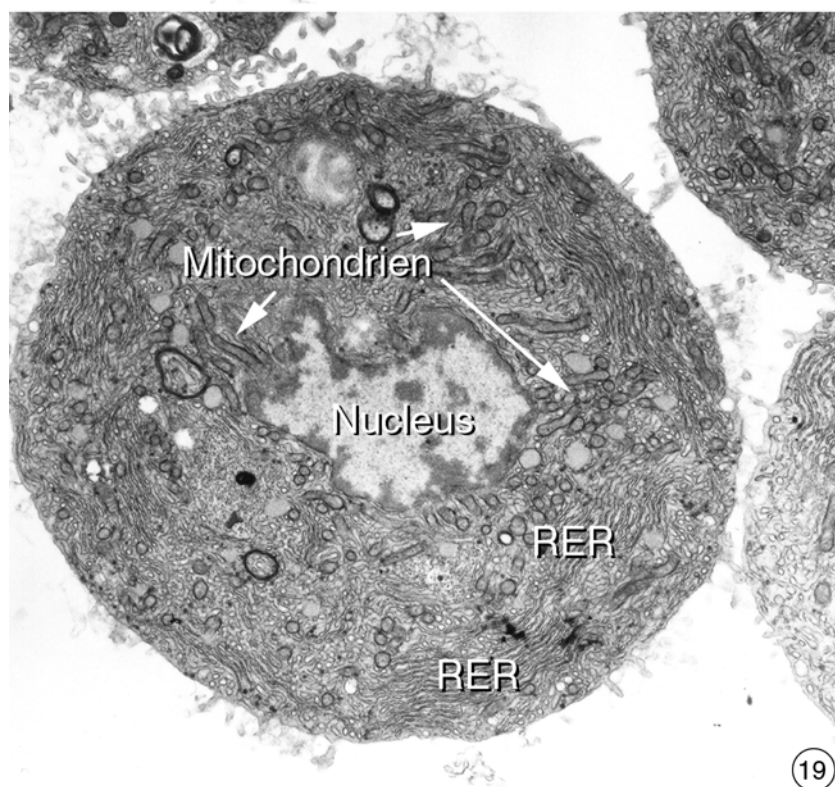
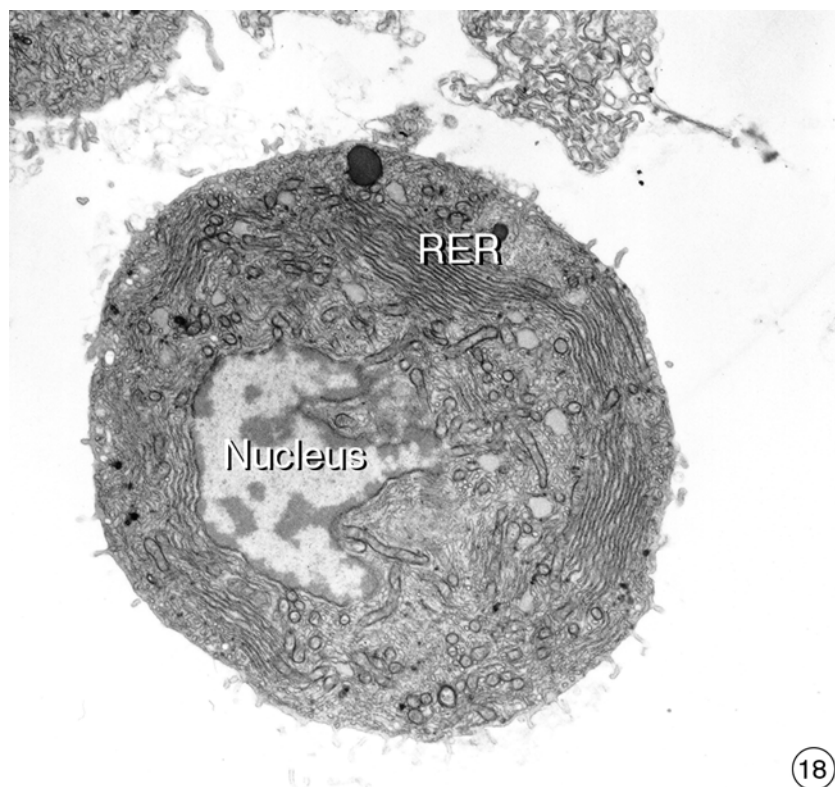
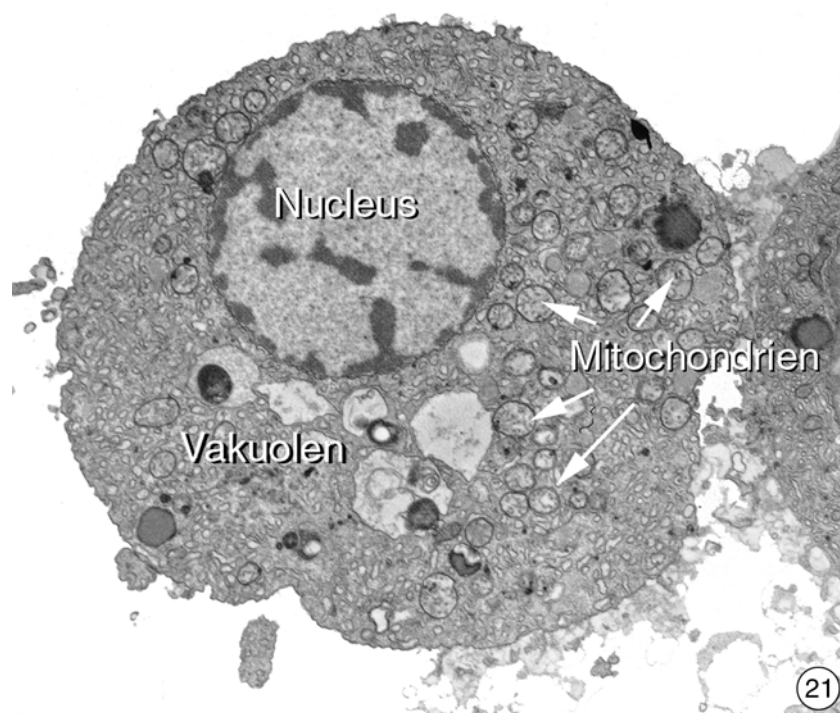
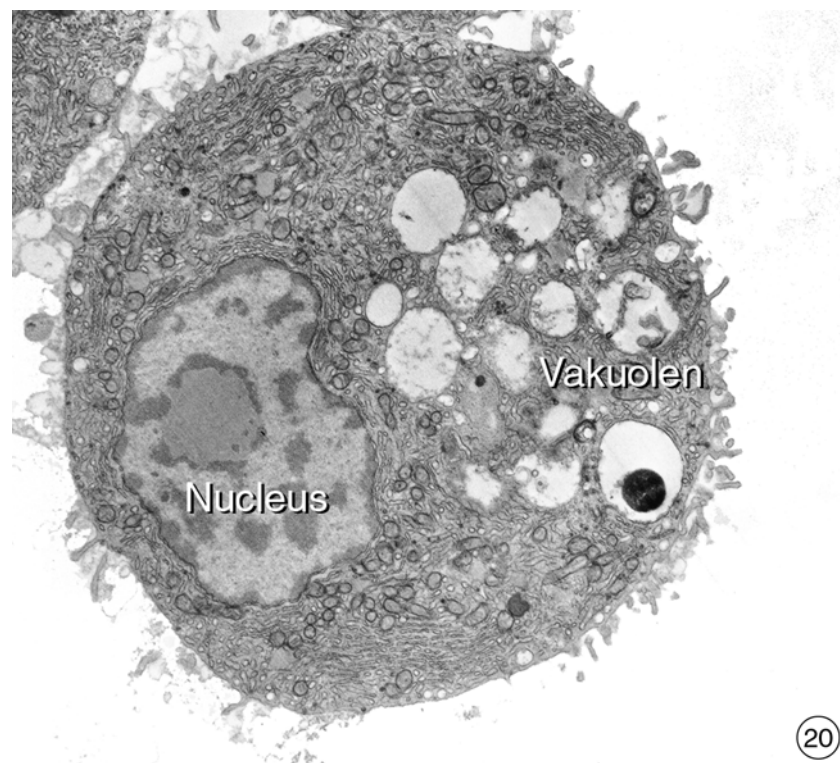


Abbildung 3.3.2-17: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 6 Stunden nach einer Bestrahlung mit ultravioletem Licht für 10 Minuten. Als Reservestoffe findet man in Hepatocyten mit stark vesikuliertem Endomembransystem 6 Stunden nach der Behandlung noch kleinere Glykogenfelder (9.400x).



Abbildungsbeschriftungen siehe Seite 95 →



Abbildungsbeschriftungen siehe Seite 95 →



Abbildung 3.3.2-18 bis 22: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 9 Stunden nach Bestrahlung mit ultravioletttem Licht für 10 Minuten.

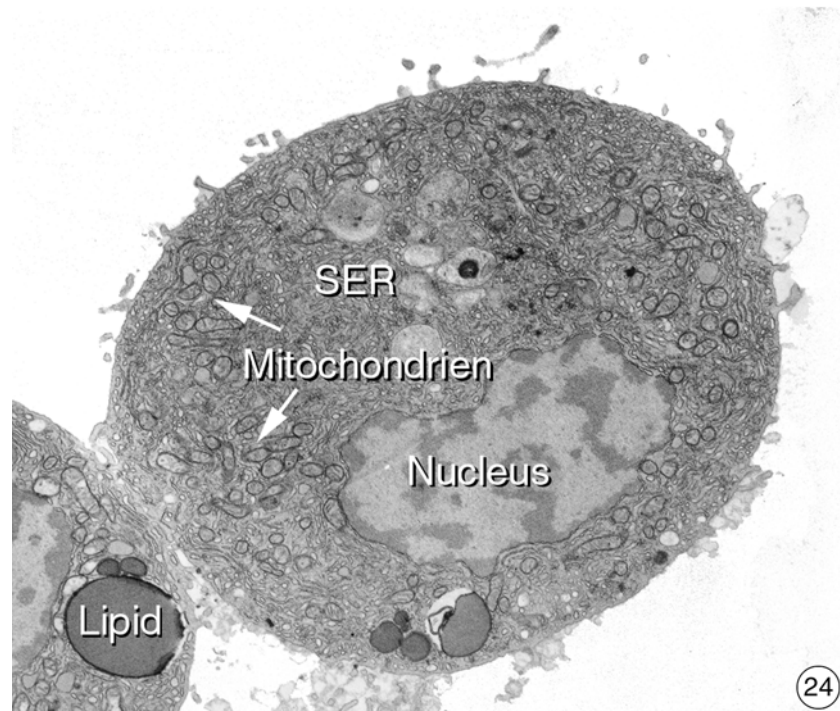
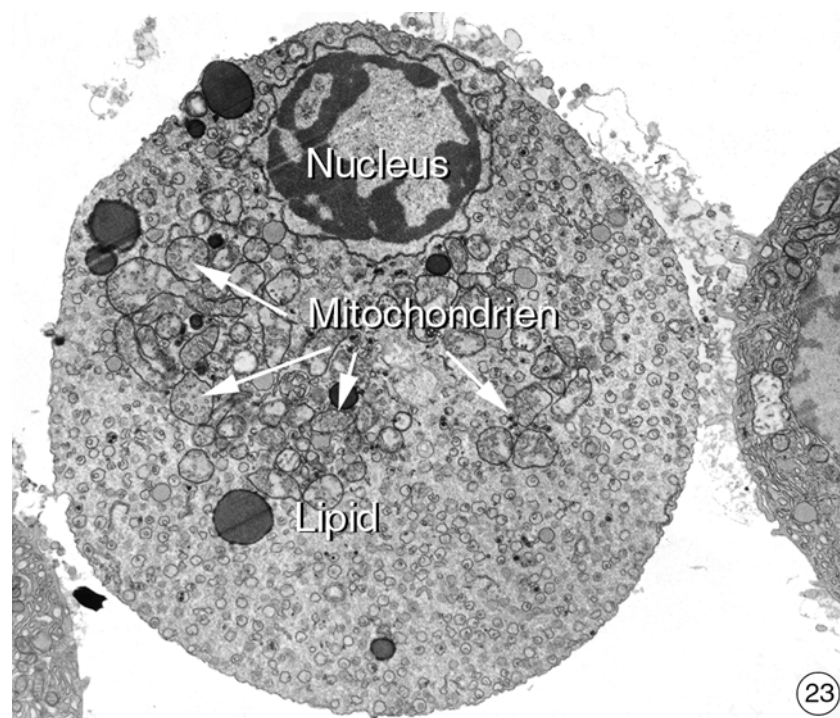
18: 9 Stunden nach der Behandlung fällt zunächst der stark gelappte Kern in den Hepatocyten auf. Weiterhin lässt sich aber auch feststellen, dass das Endomembransystem deutliche Regeneration zeigt. Das raue endoplasmatische Retikulum (RER) bildet Stapel aus Zisternen aus (7.200x).

19: Die Schwellung der Mitochondrien ist 9 Stunden nach der Belastung nicht mehr so deutlich, wie dies zu früheren Zeitpunkten der Fall war (6.600x).

20: Trotz Regeneration des Endomembransystems treten nach der Bestrahlung sehr große vakuoläre Strukturen innerhalb den Zellen auf (7.500x).

21: Unabhängig von den vielen Zellen, die Regeneration zeigen, sind 9 Stunden nach der Behandlung noch immer Zellen vorhanden, die die Tendenz zur Kondensierung des Chromatins in der Peripherie des Zellkerns zeigen. Ferner sind die Mitochondrien stark geschwollen (7.800x).

22: Auch tote Zellen können nach der Bestrahlung gefunden werden. Solche Zellen sind extrem arm an Organellen, der Zellkern ist klein und zeigt starke Kondensierung des Chromatins (6.600x).



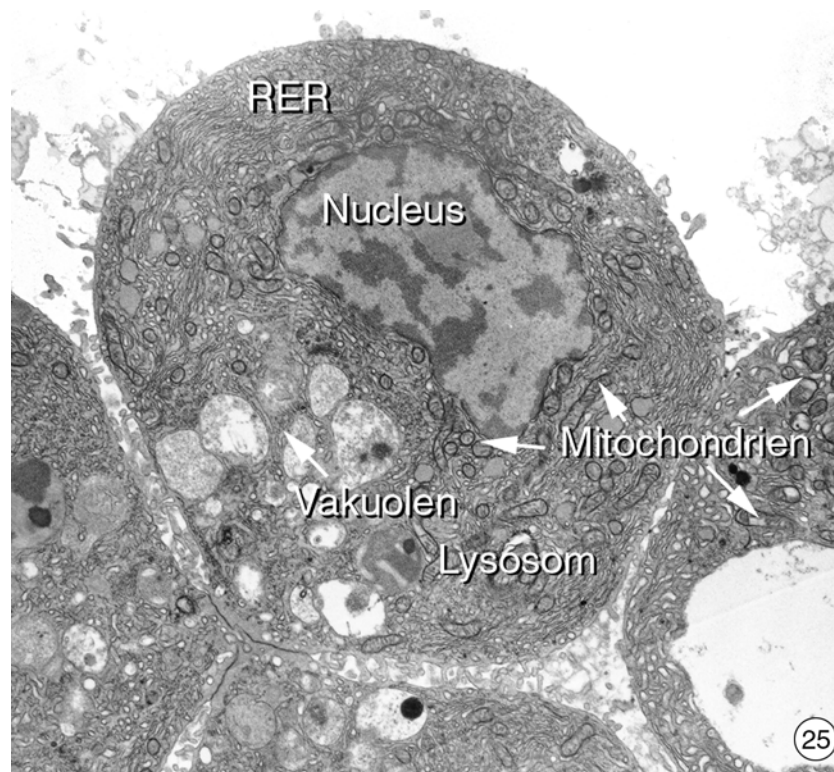
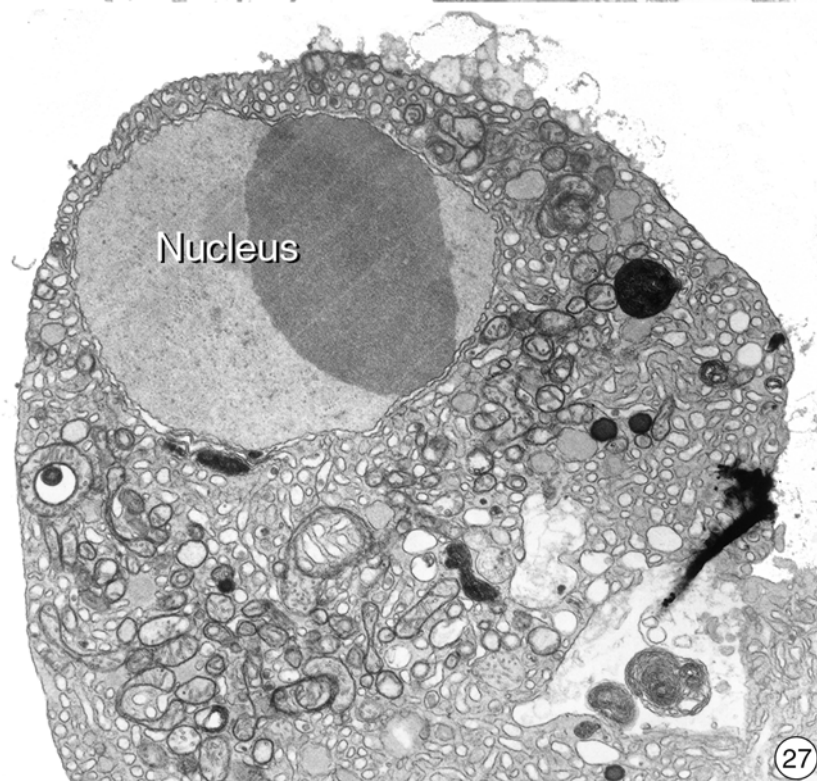


Abbildung 3.3.2-23 bis 25: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 22 Stunden nach Bestrahlung mit ultravioletem Licht für 10 Minuten.

23: Nach Bestrahlung mit UV können viele Zellen in den Proben gefunden werden, die extreme Schädigungen aufweisen. Das Chromatin ist kondensiert und die Kernmembran ist stark dilatiert. Die Mitochondrien weisen eine starke Schwellung auf (6.900x).

24: Im Gegensatz zu den stark geschädigten Zellen treten aber auch 22 Stunden nach der Behandlung Zellen auf, bei denen die Schwellung der Mitochondrien nur gering ausgeprägt ist, das Endomembransystem jedoch noch immer starke Tendenzen zur Vesikulierung zeigt (7.200x).

25: Regenerierende Hepatocyten besitzen neben kleineren Stapeln aus rauem endoplasmatischem Retikulum (RER) auch große Vakuolen im Cytoplasma (6.600x).



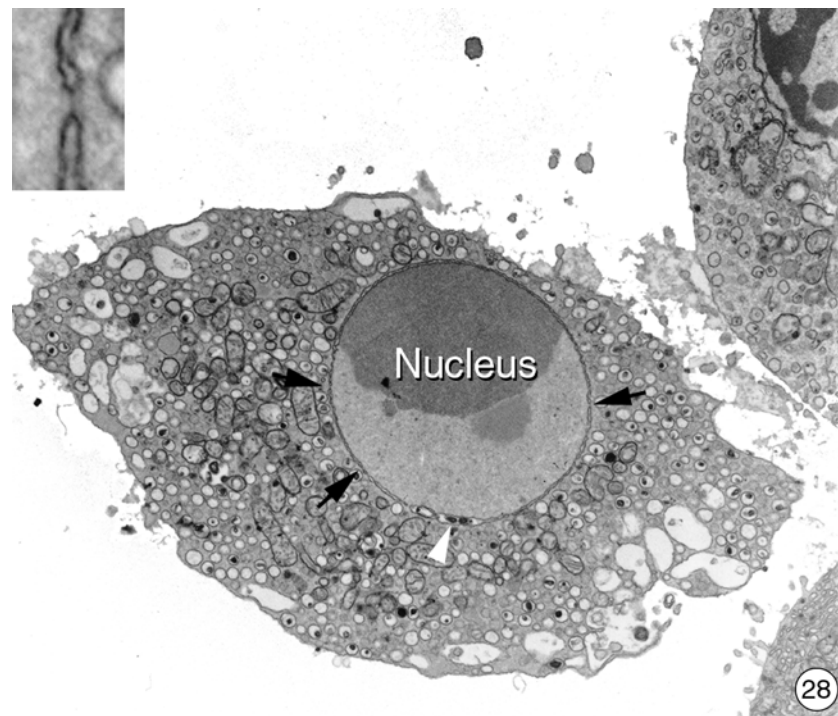
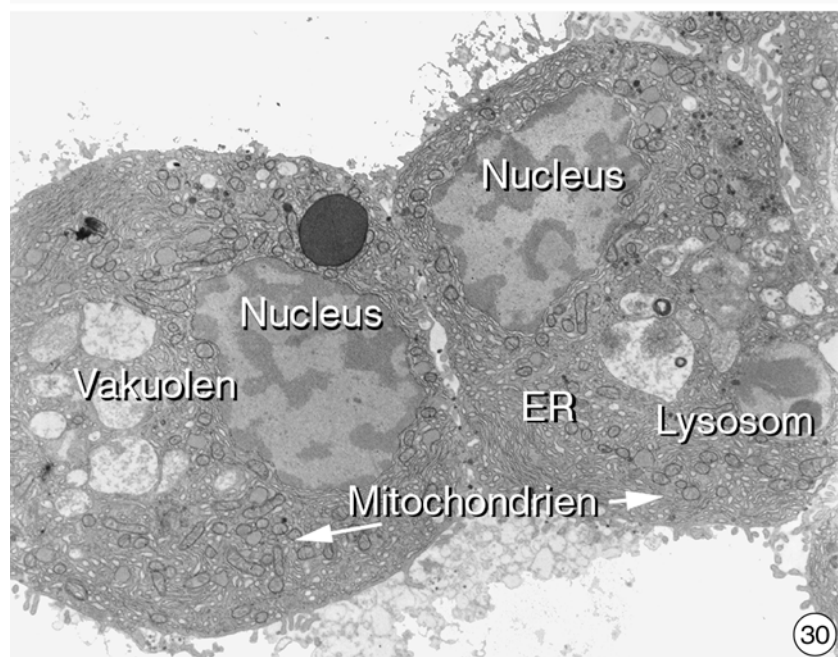
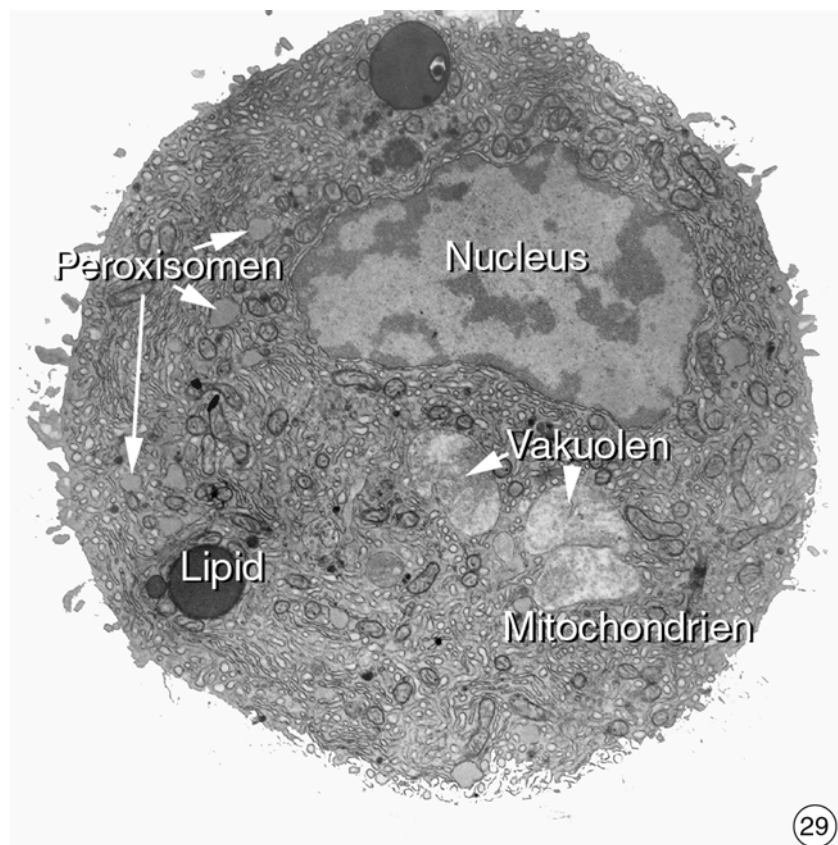


Abbildung 3.3.2-26 bis 28: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 24 Stunden nach einer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht für 10 Minuten.

26: Das Endomembransystem ist in vielen Hepatocyten noch immer stark vesikuliert, und große Vakuolen sind im Cytoplasma zu finden (4.800x).

27: Extreme Formen von veränderten Zellen sind auch 24 Stunden nach der Behandlung in den untersuchten Proben zu finden. Es kann nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei der dargestellten Form um eine komplette Zelle handelt oder nur ein Fragment abgebildet ist. Der Kern besitzt kompaktes Heterochromatin, die Kernhülle zeigt Dilatation. Eine Schwellung der Mitochondrien ist offensichtlich, und das Endomembransystem ist stark vesikuliert (10.300x).

28: Der Kern ist stark modifiziert, kann aber durch das Vorhandensein von Kernporenkomplexen (Pfeile) eindeutig identifiziert werden (siehe auch Einsatz). Elektronendichte Einschlüsse können im Zwischenraum der beiden Kernmembranen beobachtet werden (Pfeilspitze; 7.900x).



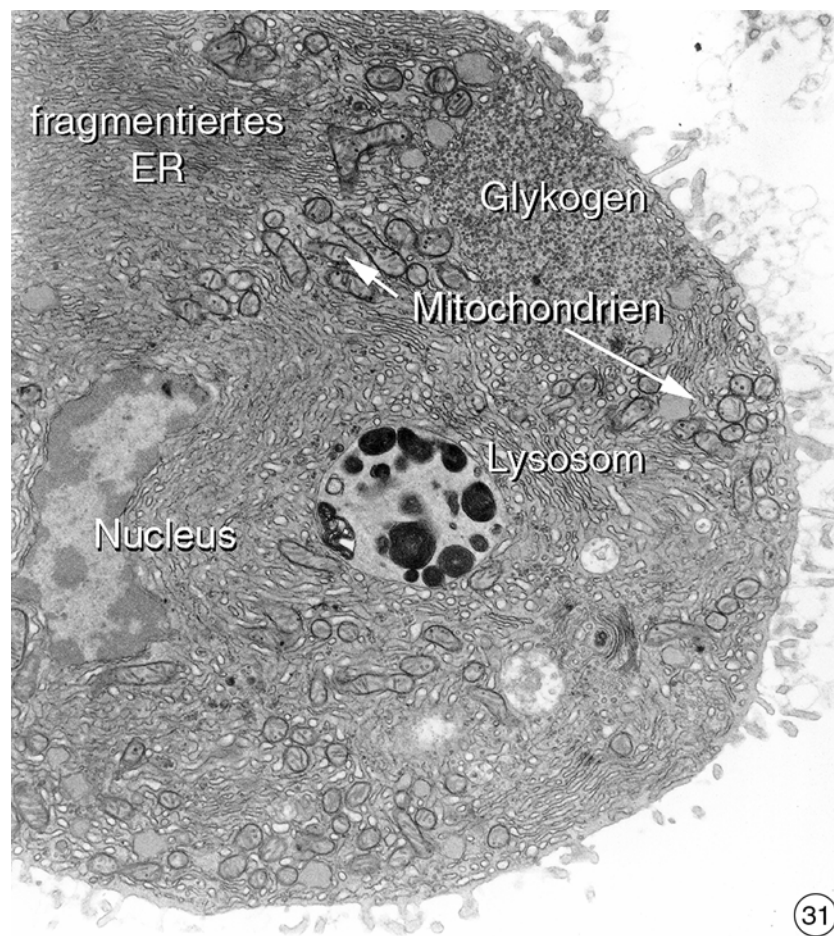
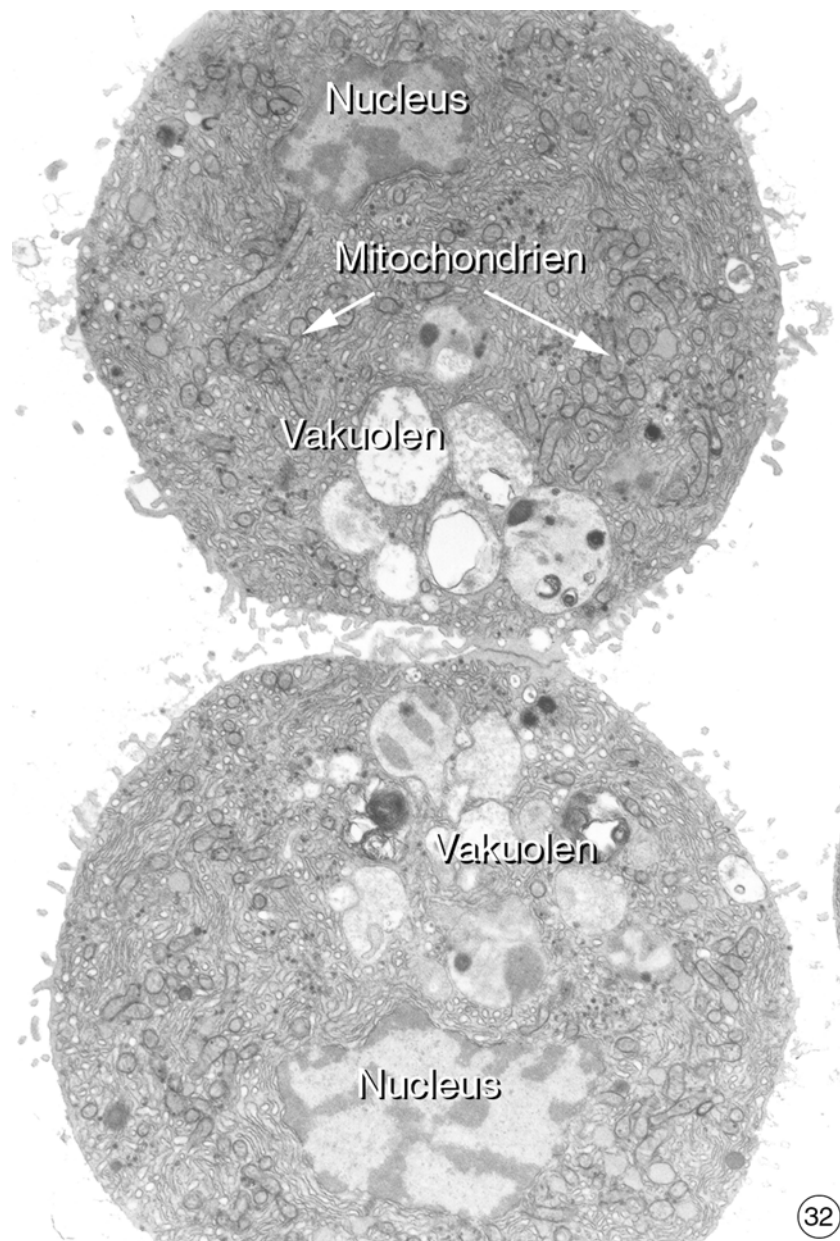


Abbildung 3.3.2-29 bis 31: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 26 Stunden nach einer 10 minütigen Bestrahlung mit ultravioletttem Licht.

29: Auch 26 Stunden nach der Behandlung von Hepatocyten mit UV-Licht sind die zu früheren Zeitpunkten beobachteten Veränderungen noch nicht verschwunden. Die Vesikulierung des Endomembransystems ist zwar schwächer ausgeprägt, doch eine Stapelbildung des rauen endoplasmatischen Retikulums ist in vielen Zellen nicht zu beobachten (9.300x).

30: Auch wenn etliche Zellen deutliche Regenerationserscheinungen zeigen, so fällt doch noch immer auf, dass das Endomembransystem (ER) zu einem Großteil vesikuliert ist. Der Heterochromatinanteil ist gegenüber den Kontrollen erhöht und im Cytoplasma befinden sich große Vakuolen. Allerdings ist die Schwellung der Mitochondrien gegenüber früheren Zeitpunkten deutlich verringert (6.600x).

31: 26 Stunden nach Bestrahlung schreitet die Regeneration voran. Das Endomembransystem baut neue ER Stapel auf und als Reservestoffe findet man kleinere Glykogenfelder (11.800x).



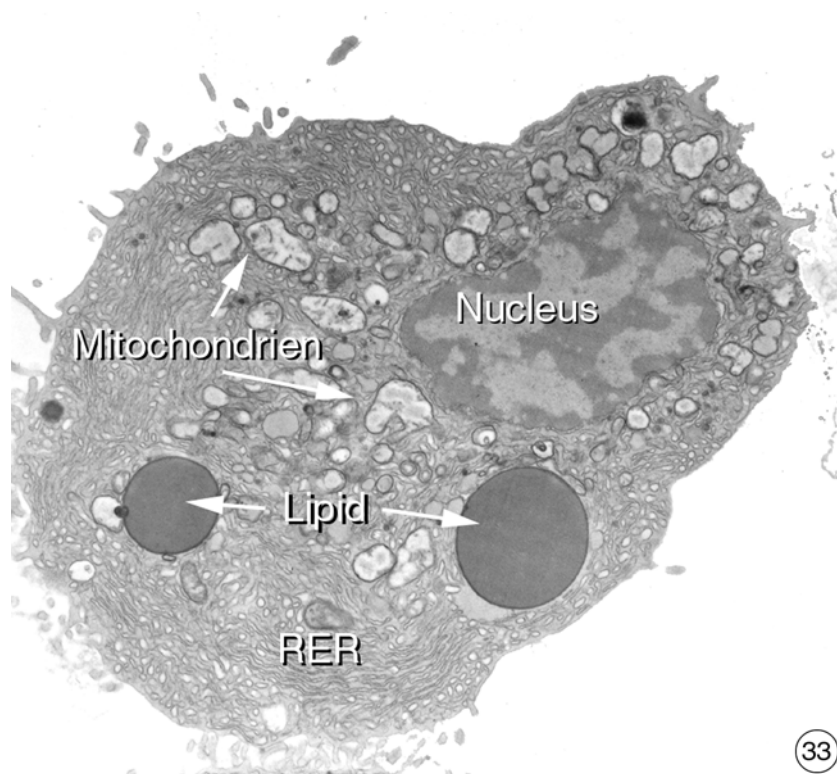
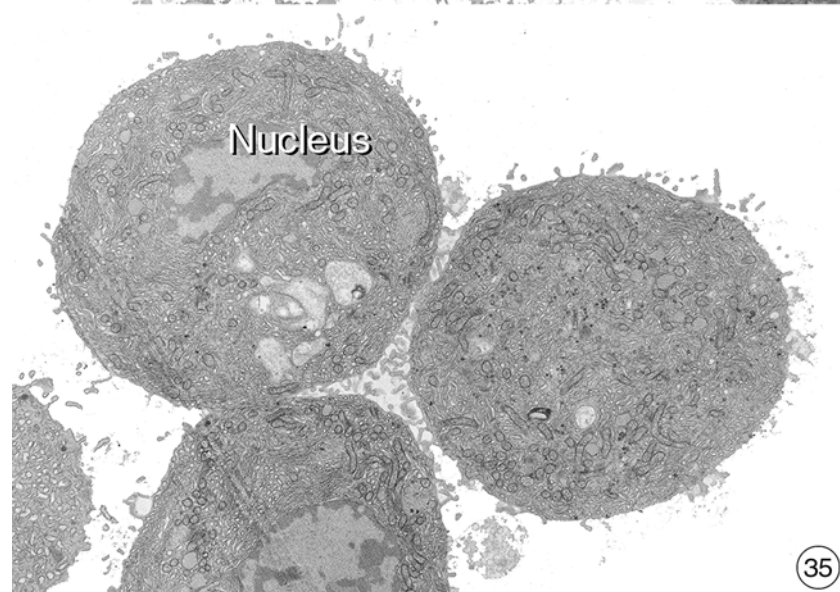
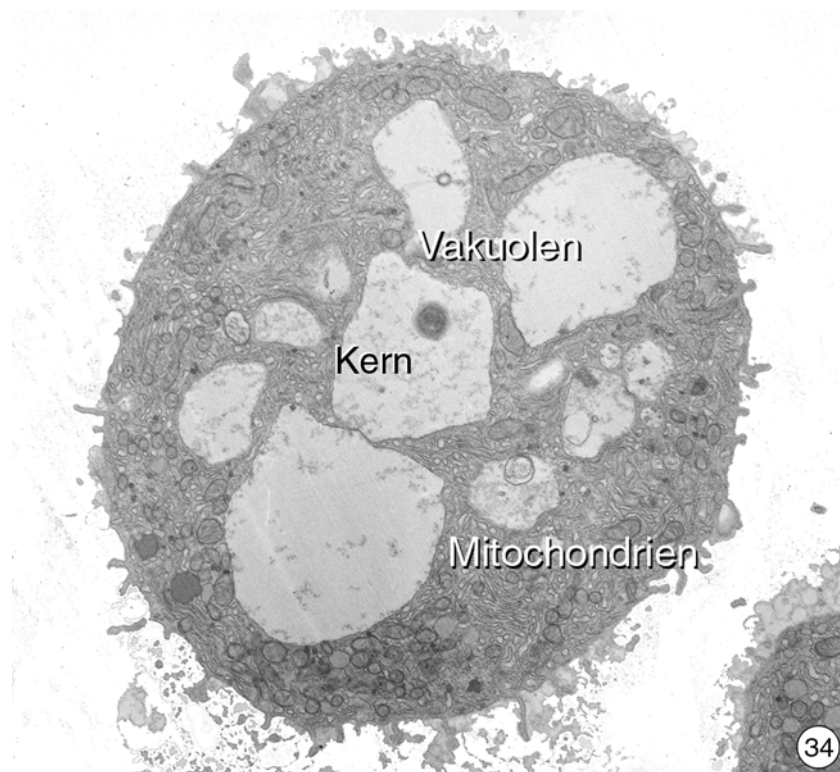


Abbildung 3.3.2-32 bis 33: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 28 Stunden nach einer Bestrahlung mit ultravioletttem Licht für 10 Minuten.

32: Auch 28 Stunden nach Bestrahlungsende findet man noch viele Zellen, die große lysosomale Vakuolen besitzen (7.600x).

33: Neben den regenerierenden Zellen erscheinen auch 28 Stunden nach der Behandlung viele Zellen dauerhaft geschädigt. Besonders auffällig sind die stark geschwollenen Mitochondrien. Große dunkel gefärbte Lipidtropfen können im Cytoplasma beobachtet werden (9.600x).



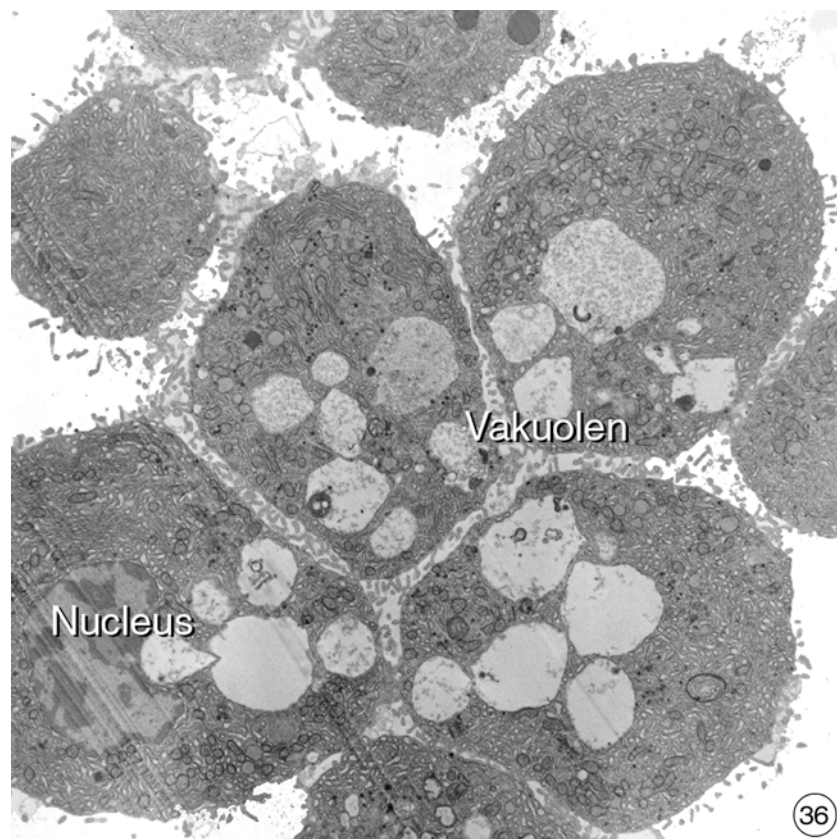


Abbildung 3.3.2-34 bis 36: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 30 Stunden nach einer 10 minütigen Bestrahlung mit ultravioletttem Licht.

34: Extrem große Vakuolen können in bestrahlten Hepatocyten gefunden werden (7.800x).

35: Auch wenn die Anzahl geschwollener Mitochondrien 30 Stunden nach der Behandlung abnimmt, so leidet doch noch immer das Endomembransystem unter extremer Vesikulierung. Die Kerne sind reich an Heterochromatin, aber eine Kondensierung in der Peripherie des Kerns kann nicht beobachtet werden (5.100x).

36: Vesikulierte Endomembransystem und große Vakuolen bestimmen die Morphologie vieler Hepatocyten 30 Stunden nach Ende der Bestrahlung (5.200x).

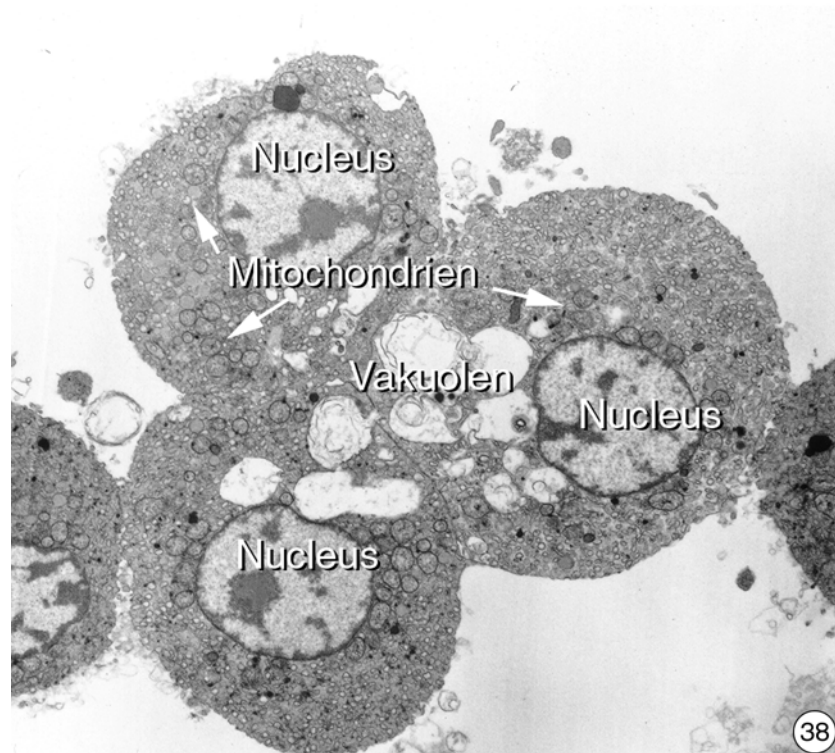
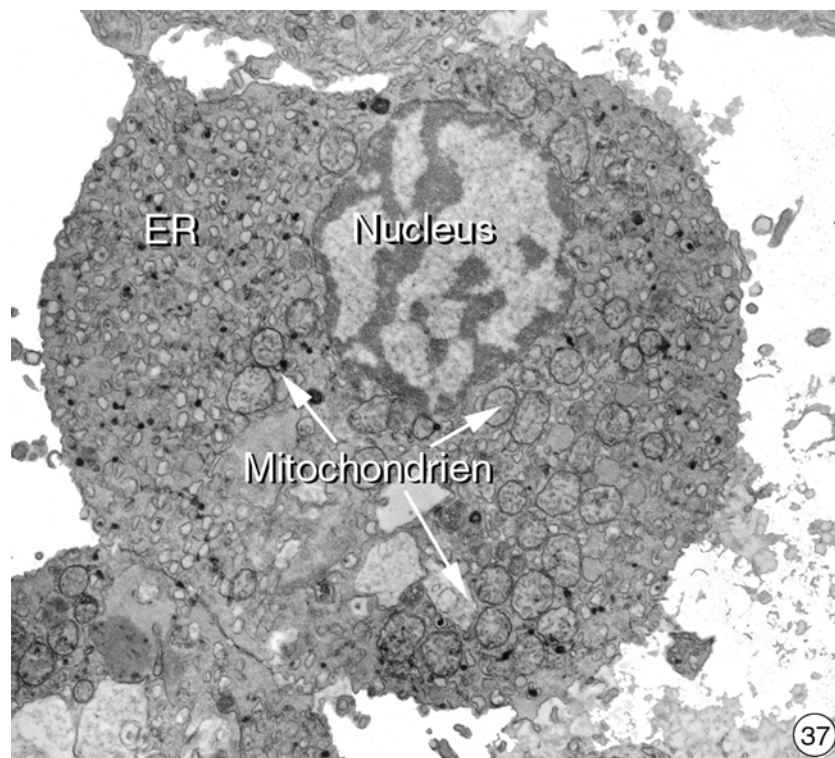


Abbildung 3.3.2-37,38: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 54 Stunden nach einer 10 minütigen Bestrahlung mit ultravioletttem Licht.

37: Das Endomembransystem ist komplett vesikuliert. Der Zellkern ist gelappt, und die Mitochondrien erscheinen stark geschwollen. Die Form der Zelle ist unregelmäßig (7.900x)

38: In den Zellen sind viele große elektronenlichte Vakuolen zu finden (3.700x)

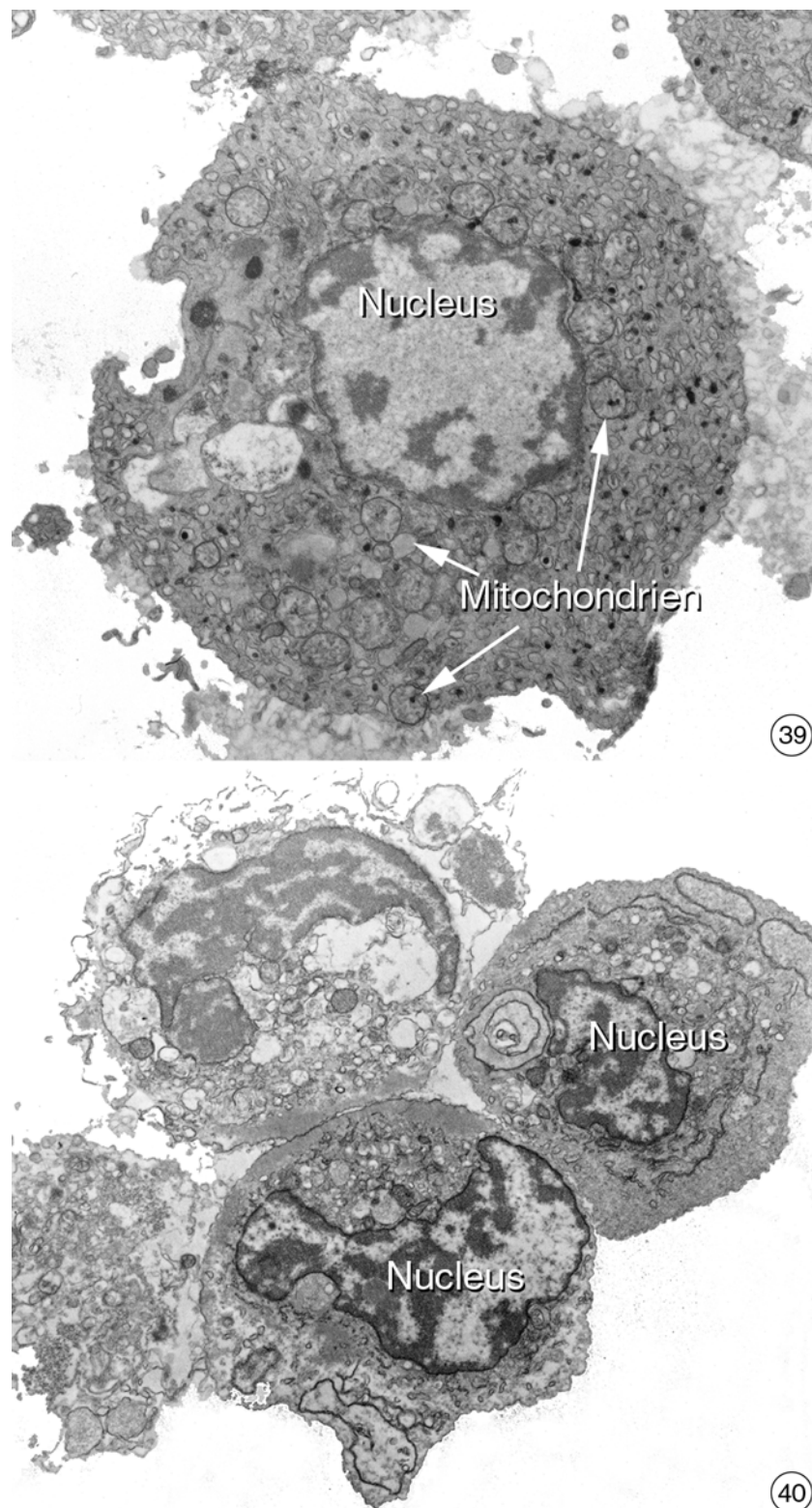
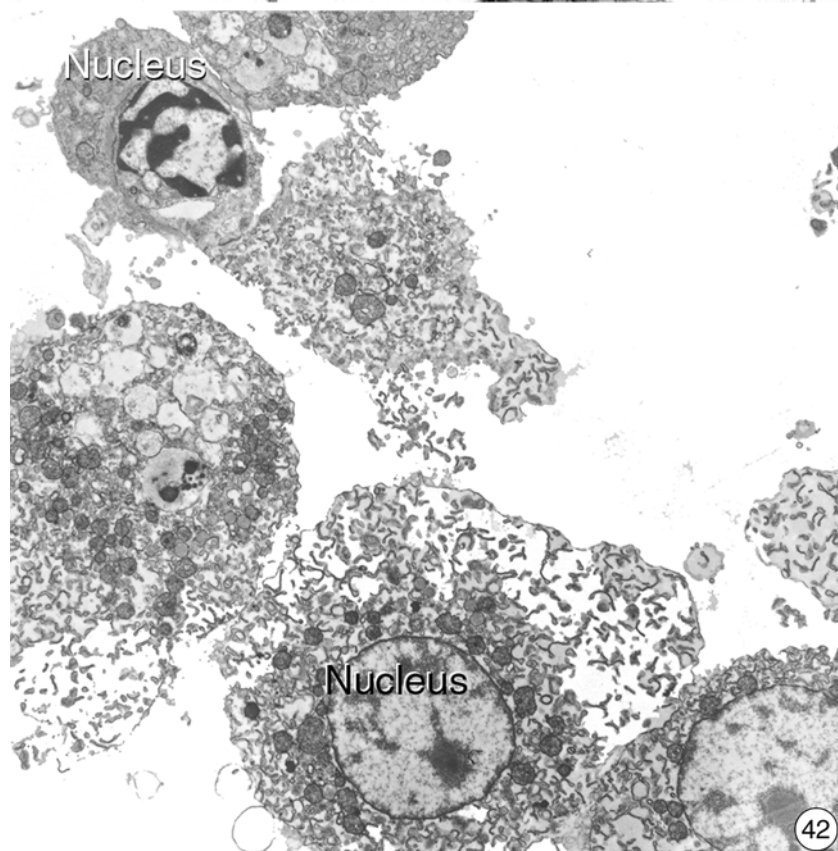
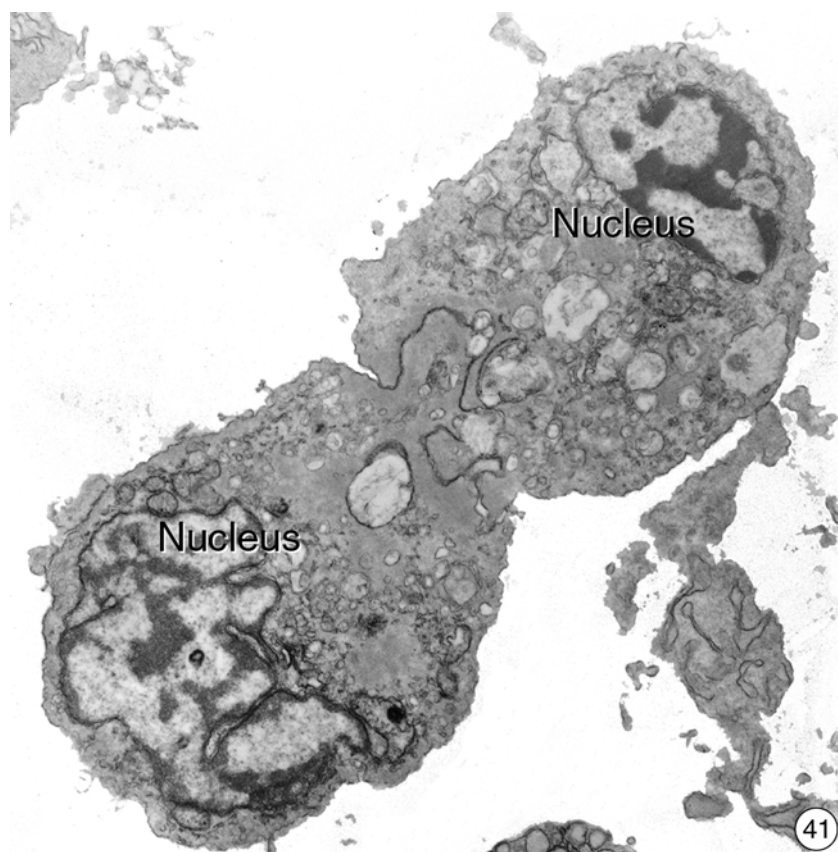


Abbildung 3.3.2-39,40: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 54 Stunden nach einer Bestrahlung mit ultravioletterem Licht für 10 Minuten.

39: Stark unregelmäßige Zellformen können öfter beobachtet werden (7.500x).

40: Eine Besonderheit, die zum ersten Mal 54 Stunden nach Versuchsbeginn auftaucht, ist das Vorhandensein von Zellen, deren Zellkörper deutlich verkleinert ist. Der Zellkern besitzt viel Heterochromatin und zeigt eine unregelmäßige Form (7.500x)



3.3.2 Westernblots

3.3.2.1 Caspase 3 nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht

Westernblots mit dem polyklonalen Antikörper gegen humane Caspase 3 führte in Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht zur Anfärbung einer einzelnen Bande auf den Blotmembranen. Dieses Signal wies auf ein Protein hin, dessen Molekulargewicht ungefähr bei 55 kDa lag. Die Intensität dieses Signals nahm mit fortschreitender Zeit nach der Bestrahlung zu und erreichte 30 Stunden nach der Belastung ein Maximum. Danach sank die Signalstärke wieder ab. Aber selbst 100 Stunden nach der Exposition war der Gehalt dieses Proteins höher als bei den Kontrollen (Abb. 3.3.3-1).

3.3.2.2 p53 nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht

Wie bereits beschrieben wurde in Westernblots mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes p53 eine Bande im Molekulargewichtsbereich von 53 kD detektiert. Unmittelbar nach der Bestrahlung war das Signal am stärksten ausgebildet. Es nahm mit fortschreitender Zeit wieder ab. Der Rückgang des p53-Gehalts in den Zellen könnte auf einen Rückgang der Apoptoserate deuten, der sich bereits in den ultrastrukturellen Untersuchungen zeigte (Abb. 3.3.3-2).

3.3.2.3 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht

Westernblots mit einem polyklonalen Antiserum gegen die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) führten in den Hepatocyten aus diesen Versuchen zur Detektierung von zwei verschiedenen Banden. Beide Markierungen wiesen auf Proteine hin, die kleiner sind als die Säugervariante von PARP. Im Gegensatz zu den Versuchen an Hepatocyten, die mit Clofibrat belastet wurden und nur eine einzelne Bande im Blot aufwiesen, kam es hier tatsächlich zu einer Spaltung des detektierten Proteins, was zur Markierung von zwei verschiedenen Banden auf den Blots führte. Auch unmittelbar nach der Bestrahlung konnte eine zweite Bande detektiert werden, die das Spaltprodukt von PARP repräsentieren könnte. Diese war allerdings nur schwach ausgebildet und deutete aufgrund des geringeren Zeitraums zwischen Isolation und Blotdurchführung eher darauf hin, dass isolationsbedingt apoptotische Zellen nachgewiesen wurden. Die Intensität der Färbung des Proteins mit dem höheren Molekulargewicht war 6 Stunden

Abbildung 3.3.2-41, 42: Ultrastruktur von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle 100 Stunden nach einer 10 minütigen Bestrahlung mit ultraviolettem Licht.

41: 100 Stunden nach der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht können Zellen entdeckt werden, die tief eingebuchtete Zellkerne aufweisen (10.500x)

42: 100 Stunden nach der Bestrahlung sind häufig abgestorbene Zellen zu finden (3.400x)

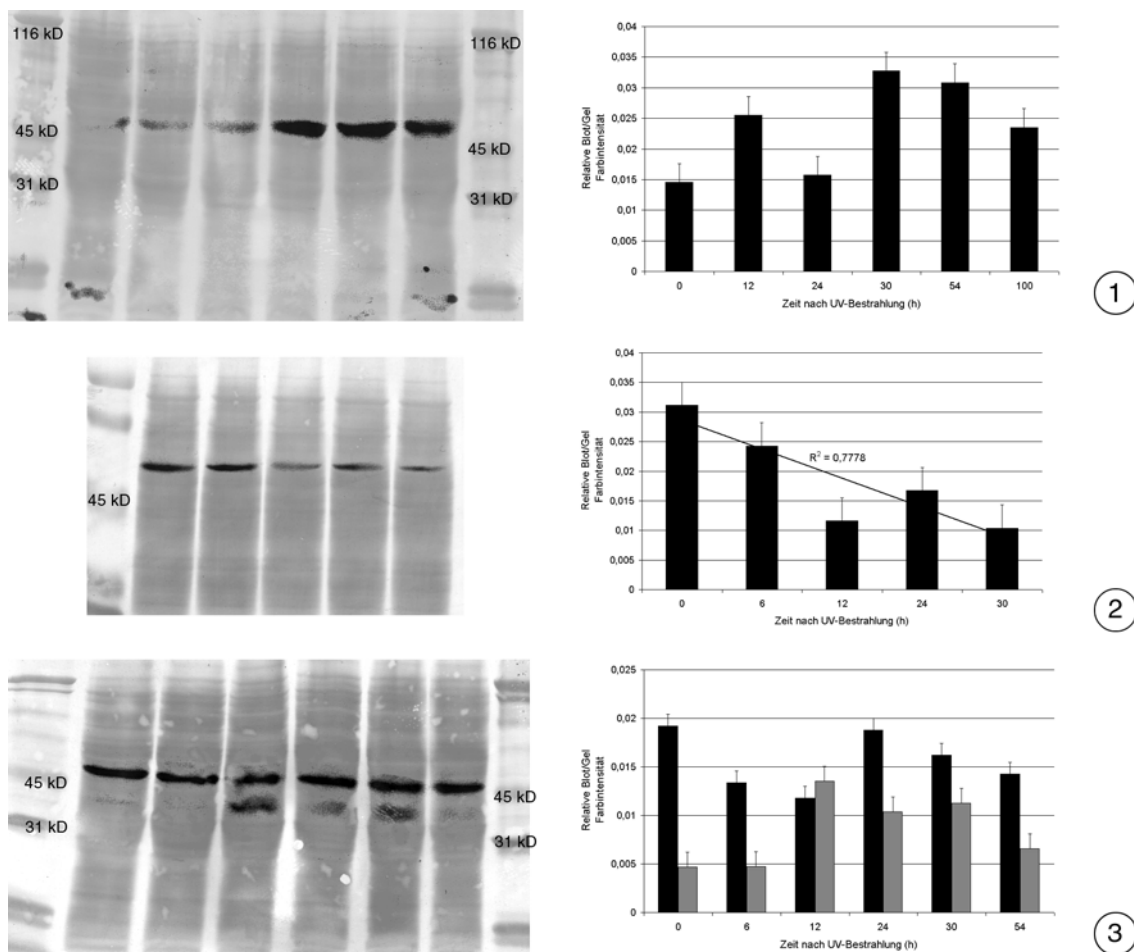


Abbildung 3.3.3-1 bis 3: Relativer Proteingehalt im Westernblots in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach 10 minütiger Bestrahlung mit UV-B-Licht.

1: Westernblots mit einem polyklonalen Antiserum gegen humane Caspase 3 führt in Hepatocyten nach Bestrahlung mit UV Licht zu Anfärbung einer einzelnen Bande. Die Intensität der Färbung dieser Bande nimmt zunächst zu und erreicht 30 Stunden nach der Bestrahlung ein Maximum und nimmt danach wieder ab. Sie bleibt aber deutlich über dem Niveau der Färbung, die direkt nach Ende der Bestrahlung entdeckt werden kann. Markierungen, die von der Spaltung der Procaspase 3 stammen, können in den Blots nicht entdeckt werden

2: Westernblots mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes p53 führt nach einer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht zur Anfärbung einer einzelnen Bande im Molekulargewichtsbereich von 53 kD. Die Intensität des Signals nimmt im Verlauf des Versuchs stetig ab.

3: Westernblots mit einem monoklonalen Antikörper gegen PARP aus der Maus führt zur Anfärbung mehrerer Banden auf den Blotmembranen. Die Bande, die ein höheres Molekulargewicht anzeigt, ist in allen untersuchten Proben vorhanden. Die Bande mit dem niedrigeren Molekulargewicht ist nicht bei allen Proben ausgeprägt. Sie ist besonders kräftig nach 12 und 30 Stunden und könnte auf das Vorhandensein eines Spaltprodukts von PARP hinweisen.

nach der Behandlung deutlich geringer als zu Beginn des Versuchs. Allerdings nahm die Farbintensität der Bande, die das Spaltprodukt zu repräsentieren schien, nicht nennenswert zu. 12 Stunden nach der Bestrahlung war die Intensität der ersten Bande weiter verringert, während die Schwärzung im Bereich der zweiten Bande deutlich zugenommen hatte und intensiver gefärbt war als die erste Bande. Zu späteren Zeitpunkten war die Intensität der ersten Bande wieder größer als nach 12 Stunden, nahm aber bis zum Versuchsende weiter ab. Der Gehalt des Spaltprodukts wurde ebenfalls wieder geringer (Abb. 3.3.3-3).

3.4 Belastung von Hepatocyten mit Staurosporin

Die Belastung von Primärhepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 100 nM Staurosporin über einen Zeitraum von 3 Tagen führte zu einer verminderten Reaggregationsfähigkeit der Zellen.

3.4.1 Ultrastruktur

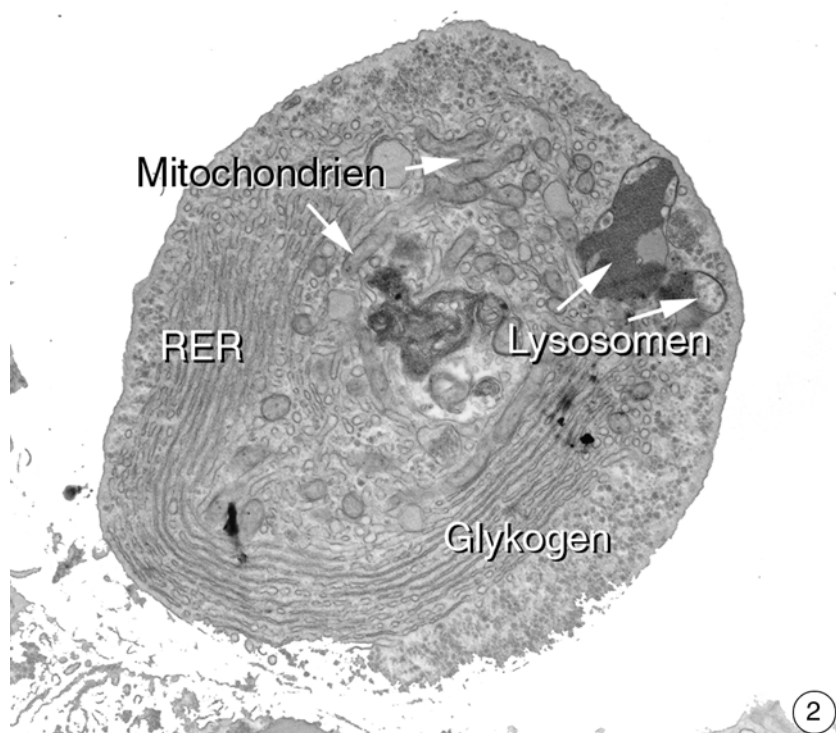
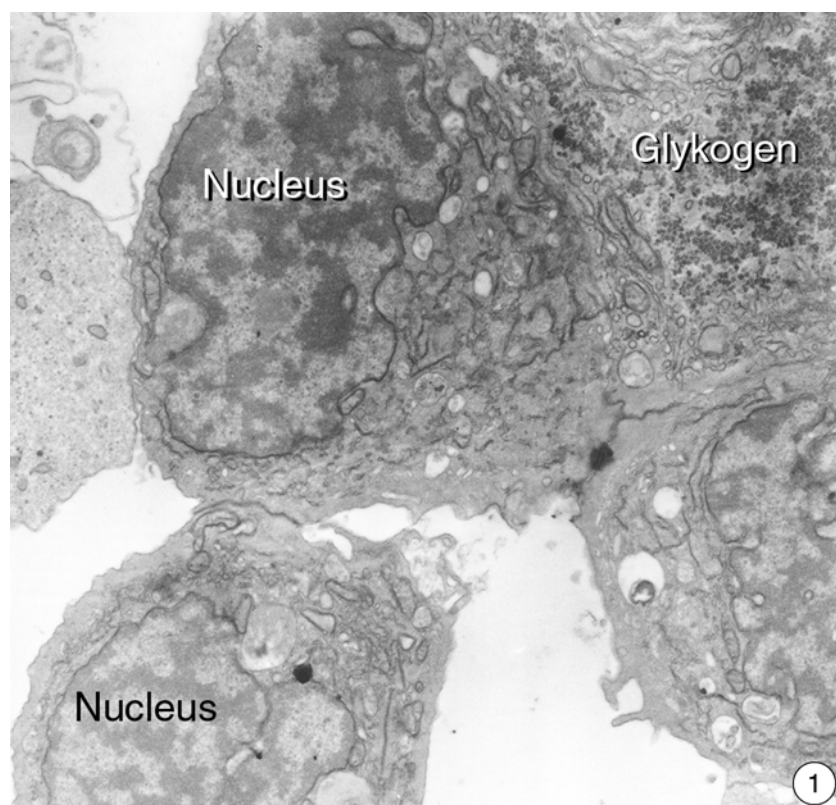
Die deutlichsten Veränderungen waren wieder in der Ultrastruktur zu finden. Eine Belastung von Primärhepatocyten mit 100 nM Staurosporin über einen Zeitraum von 3 Tagen veränderte die Morphologie der Zellen.

Zwei Tage nach Beginn der Belastung fanden sich Hepatocyten, deren Kerne teilweise stark gelappt oder eingebuchtet waren (Abb. 3.4.1-1). Der Anteil von Heterochromatin war gegenüber den Kontrollen in diesen Zellen leicht erhöht. Das raue endoplasmatische Retikulum lag meist als Manschette um den Kern und wurde von größeren Feldern an glattem endoplasmatischem Retikulum (SER) unterbrochen (Abb. 3.4.1-4). Im Vergleich zu den Kontrollen war die Menge des SER erhöht. Die Mitochondrien waren als runde bis länglich ovale Organellen in der Zelle verteilt. Die Peroxisomen waren ebenfalls rund und entsprachen in ihrer Größe kleineren Mitochondrien (~0,9 µm Durchmesser). Lysosomen konnten als sekundäre Formen beobachtet werden (Abb. 3.4.1-3). Als Speicherstoffe fielen größere Glykogenfelder in der Peripherie der Zellen auf (Abb. 3.4.1-1; 2; 4; 5). Lipidtropfen fanden sich in unterschiedlicher Größe in den Zellen (Abb. 3.4.1-4). Der Golgi-Apparat war deutlich ausgeprägt (Abb. 3.4.1-3; 4).

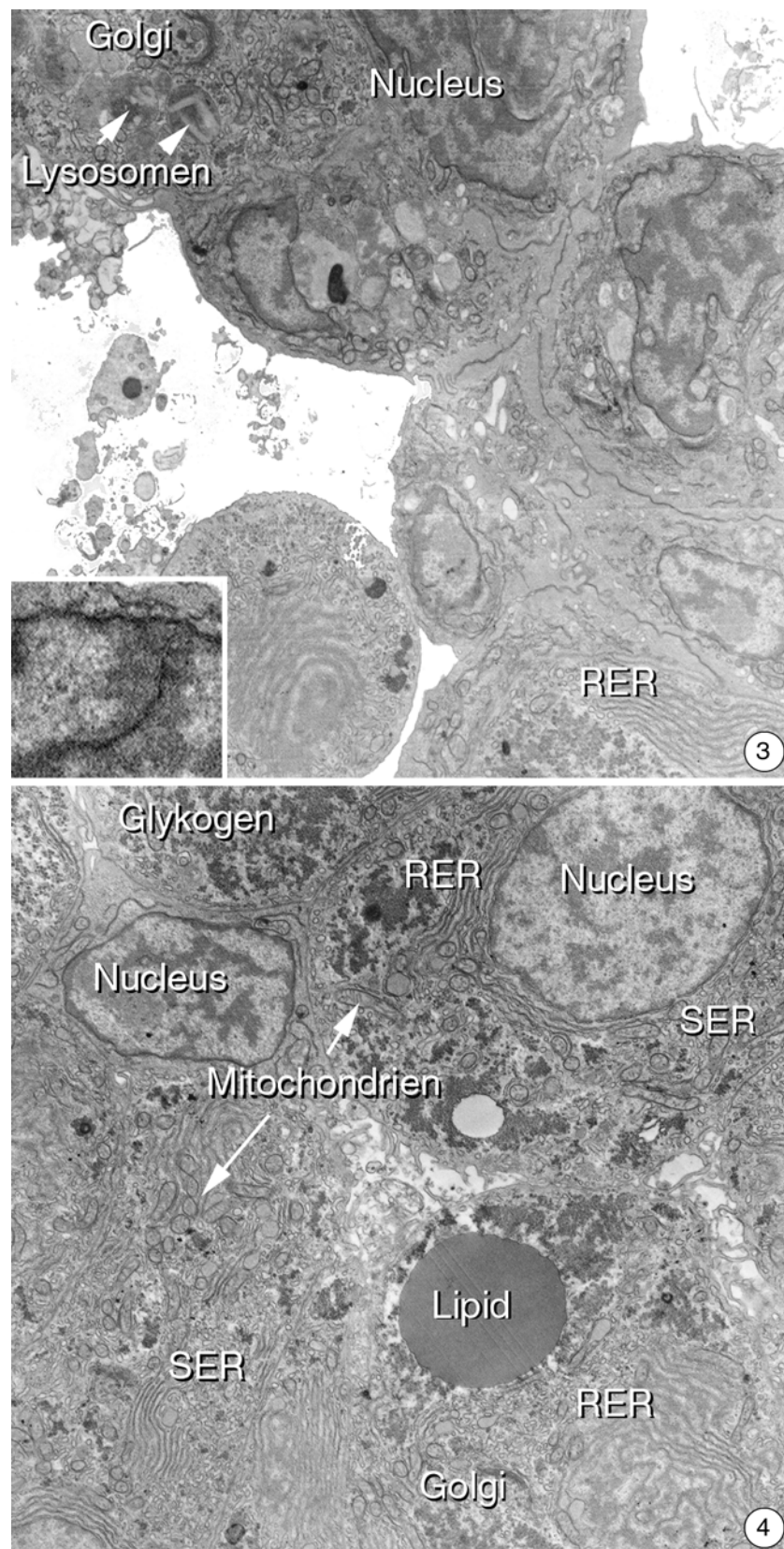
Einige Zellen wiesen eine völlig veränderte Ultrastruktur im Vergleich zu den Kontrollen auf. In Relation zum gesamten Zellleib waren bei diesen Zellen die Kerne extrem vergrößert und der Anteil von Heterochromatin war ebenfalls stark erhöht (Abb. 3.4.1-1; 5). Die Kernform war unregelmäßig. Die Menge an Organellen war stark vermindert. Das Endomembransystem konnte in seiner typischen Ausprägung nicht beobachtet werden (Abb. 3.4.1-1; 3). Selten fanden sich zellartige Strukturen, die in ihrem Inneren Kernfragmente aufwiesen. Dabei bleibt offen, ob es sich um inkorporierte Apoptosekörper oder Überreste des eigenen Zellkerns handelte. Eine deutliche Begrenzung dieser

Strukturen durch eine Doppelmembran konnte nicht ausgemacht werden. Es schien sich vielmehr um eine einzelne Membran zu handeln (Abb. 3.4.1-2).

Drei Tage nach Expositionsbeginn waren sowohl Hepatocyten, die den Kontrollen entsprachen (Abb. 3.4.1-6; 8), als auch deutlich veränderte Zellen erkennbar (Abb. 3.4.1-10). Das glatte endoplasmatische Retikulum (SER) zeigte Tendenzen zur Proliferation (Abb. 3.4.1-6; 8). Das lysosomale Kompartiment erschien stärker ausgeprägt als in den Kontrollen. Reservestoffe konnten in Form von Glykogen als kompakte Ansammlungen in der Peripherie der Zellen und Lipidtropfen gefunden werden (Abb. 3.4.1-8). Die Mitochondrienmorphologie war oftmals verändert. Es konnten hantelförmige und ringförmige Organellen nachgewiesen werden (Abb. 3.4.1-8 Einsätze). Vereinzelt fand man nun auch apoptotische Zellen (Abb. 3.4.1-10). Öfter konnten in Hepatocyten Einschlüsse gefunden werden, die als apoptotische Körper interpretiert werden können. Diese Einschlüsse besaßen einen elektronendichten, grob granulären Inhalt, und häufiger konnten noch Reste einer Doppelmembran erkannt werden (Abb. 3.4.1-7; 9). Einzelne Lipidtropfen waren sehr eng mit Zisternen des endoplasmatischen Retikulums verbunden. Diese Lipidtropfen wiesen dann einen deutlichen dunkel gefärbten Saum auf, was auf das Vorhandensein eines hohen Anteils von Phospholipiden hinweist (Abb.: 3.4.1-11).



Abbildungsbeschriftungen siehe Seite 115 →



Abbildungsbeschriftungen siehe Seite 115 →

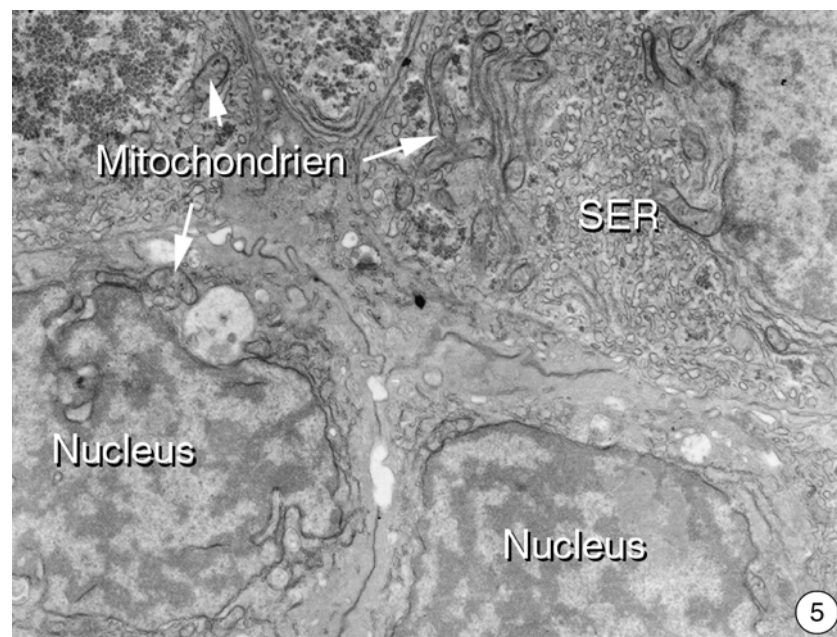


Abbildung 3.4.1-1 bis 5: Belastung von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 100 nM Staurosporin über einen Zeitraum von 2 Tagen

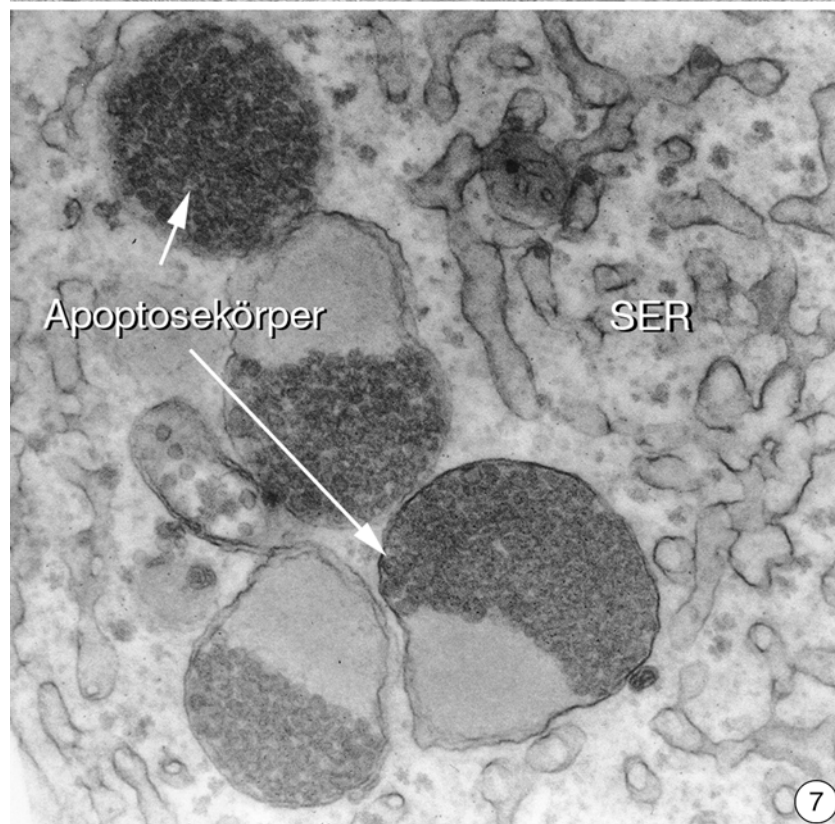
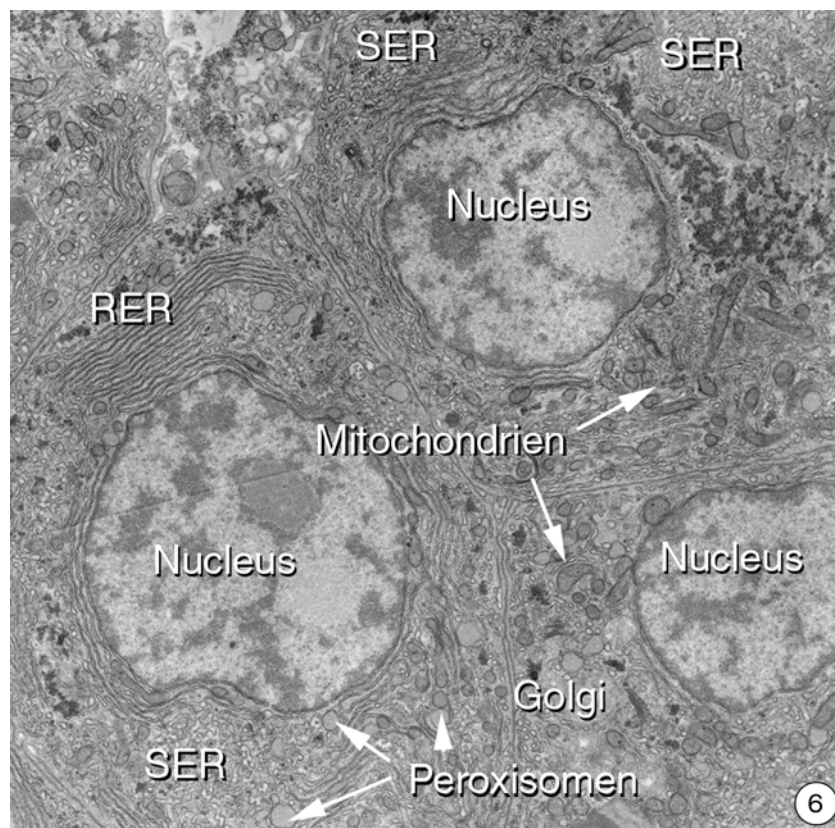
1: Die Belastung von Hepatocyten mit Staurosporin führt zu geschrumpften Zellen mit stark gelappten Kernen. Ein geordnetes Endomembransystem lässt sich in solchen Zellen nicht nachweisen. Als Energiespeicher treten größere Glykogenfelder auf (10.500x).

2: Teilweise treten in mit Staurosporin belasteten Zellen lysosomale Strukturen mit extrem dunkel gefärbtem Inhalt auf, der an Heterochromatin erinnert (12.400x).

3: Hepatocyten mit stark gelappten Kernen besitzen deutliche Golgi-Felder, die als einziges Merkmal eines intakten Endomembransystems gewertet werden können (6.600x). Innerhalb der gelappten Kerne lassen sich Membranstrukturen erkennen, die auf eine Zergliederung und einen anschließenden Zerfall des Kerns hindeuten könnten (Einsatz).

4: Ein großer Teil der Hepatocyten erscheint wie die Kontrollzellen mit einem rundlichen Kern, der von einer Manschette aus rauem endoplasmatischem Retikulum (RER) umgeben ist. Das glatte endoplasmatische Retikulum (SER) ist ebenfalls gut entwickelt. Als Energie-reserven treten Glykogenfelder und Lipidtropfen auf (5.700x).

5: Nach Staurosporinbelastung treten leichte Schwellungen an den Mitochondrien auf (9.700x).



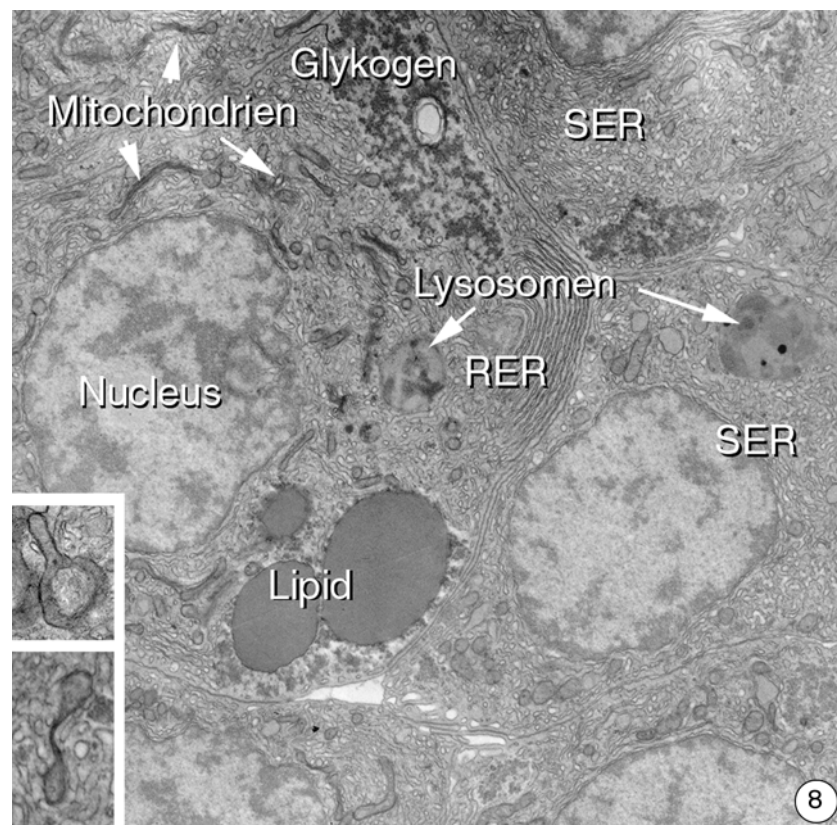
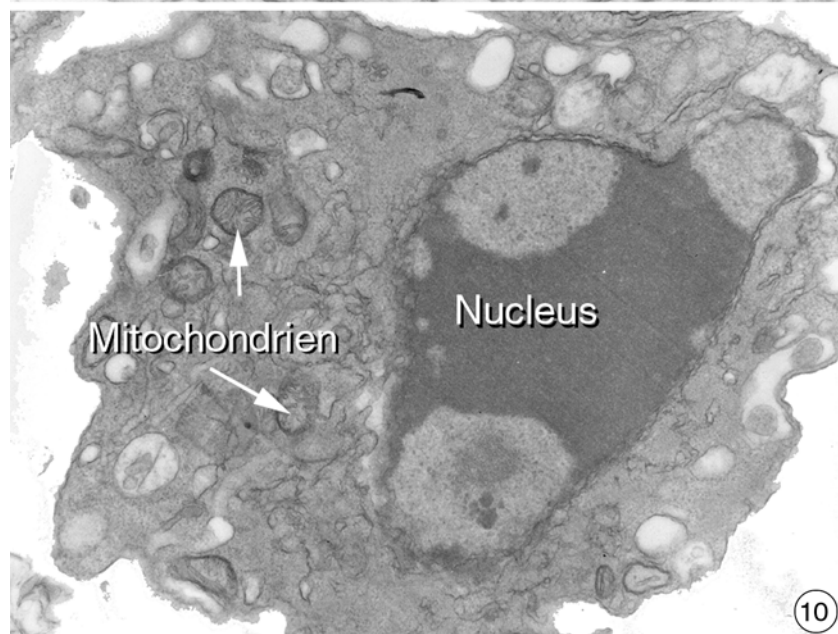


Abbildung 3.4.1-6 bis 8: Belastung von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 100 nM Staurosporin über einen Zeitraum von 3 Tagen.

6: Einige Hepatocyten erscheinen in ihrer Morphologie wie die Kontrollen. Das Endomembransystem lässt alle Merkmale wie raues (RER) und glattes (SER) endoplasmatisches Retikulum sowie aktive Golgifelder (6.600x) in einer für Kontrollen typischen Konfiguration erkennen

7: Oft lassen sich kleinere lysosomale Strukturen mit elektronendichtem granulärem Material, das stark an Heterochromatin erinnert, erkennen (47.500x).

8: Die Anzahl der Lysosomen nimmt gegenüber unbelasteten Zellen leicht zu. Eine starke Proliferation erfährt das glatte endoplasmatische Retikulum (SER; 6.600x). Auffällig sind viele Mitochondrien mit hantel- oder ringförmiger Morphologie (Einsätze).



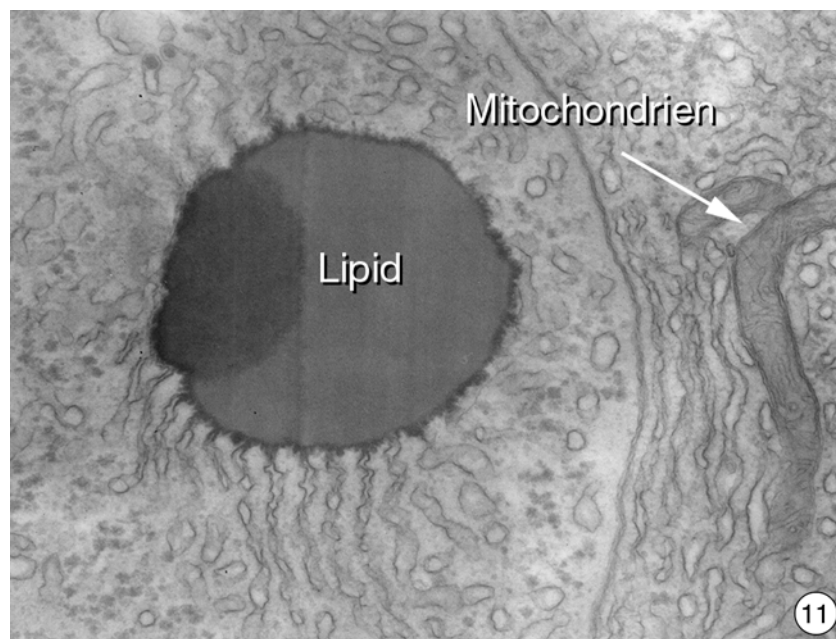


Abbildung 3.4.1-9 bis 11: Belastung von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 100 nM Staurosporin über einen Zeitraum von 3 Tagen.

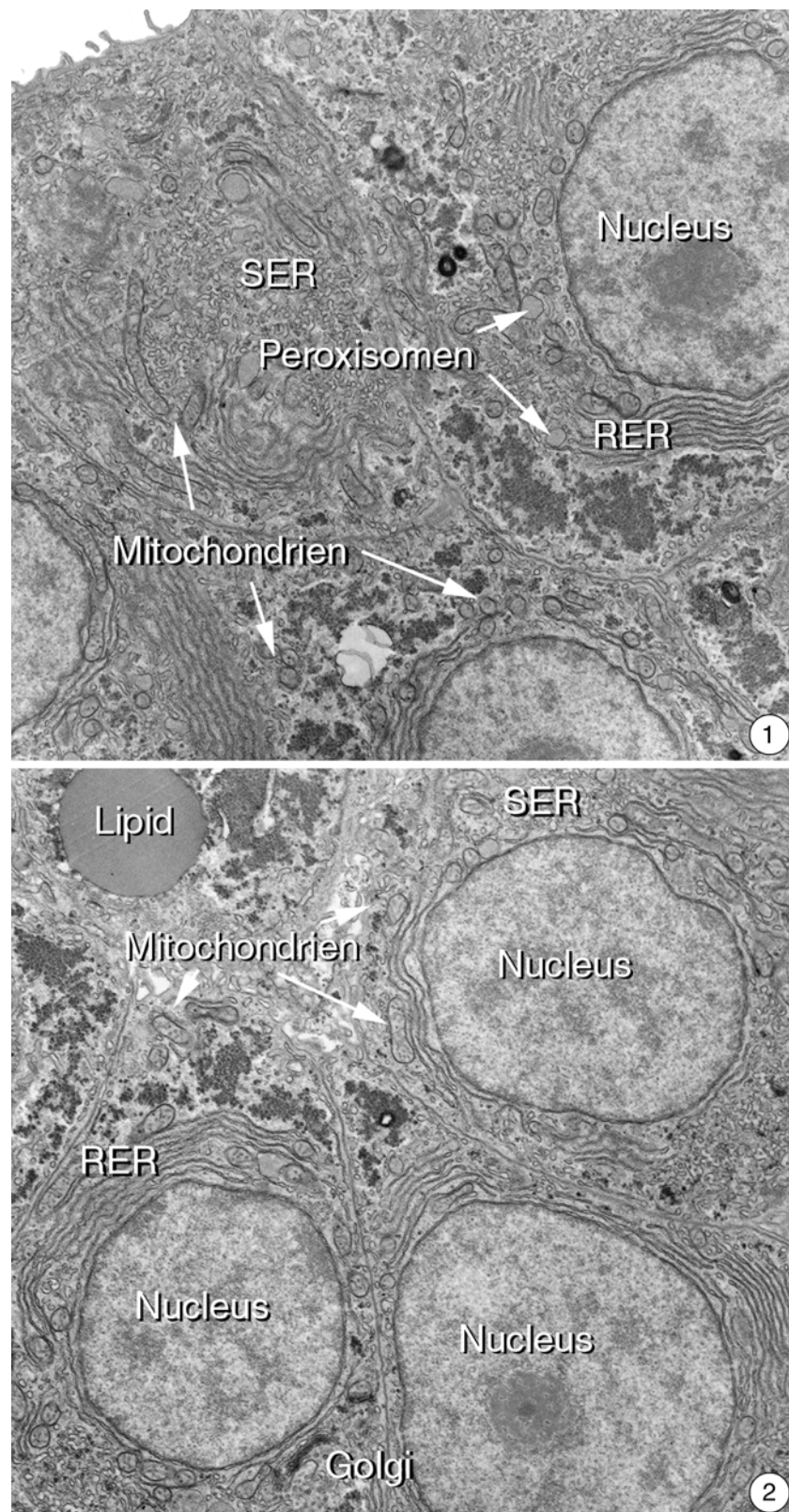
9: Lysosomale Elemente in Hepatocyten besitzen einen stark granulären Inhalt, der höchstwahrscheinlich Chromatin darstellt und deshalb als inkorporierter Apoptosekörper gewertet werden kann (27.500x).

10: In höherem Maße als in den Kontrollen, bei denen apoptotische Zellen nur extrem selten auftreten, können nach Staurosporinbehandlung absterbende Zellen entdeckt werden. In diesen Fällen ist das Chromatin stark kondensiert, das Endomembransystem ist verschwunden und die wenigen Mitochondrien erscheinen geschwollen (10.300x).

11: Ab und zu findet man in den mit Staurosporin belasteten Hepatocyten Lipidtropfen, die eng mit Zisternen des Endomembransystems in Verbindung stehen. Sie sind von einem dunkel gefärbten Saum umgeben (16.500x).

3.4.2 Ultrastrukturelle Veränderungen in Hepatocyten bei simultaner Inkubation mit 100 nM Staurosporin und 10 μ M eines membranpermeablen Caspase 3-Inhibitors

Die gemeinsame Belastung von Hepatocyten mit 100 nM Staurosporin und 10 μ M eines zellmembranpermeablen Caspase-3-Inhibitors über einen Zeitpunkt von 3 Tagen verhinderte das Auftreten von Apoptosekörpern. Die Zellkerne waren durchweg rund und besaßen nur wenig Heterochromatin (Abb. 3.4.2-1 bis 3). Umgeben wurden die Kerne von einer Manschette aus Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums (Abb. 3.4.2-1 bis 3). Das glatte endoplasmatische Retikulum war deutlich ausgebildet, blieb aber in seinem Umfang hinter dem beobachteten Ausmaß in Hepatocyten, die 3 Tage mit 100 nM Staurosporin belastet wurden, zurück. Die Mitochondrien waren rund-ovale Strukturen, die sich zwischen den RER Zisternen und der Zellperipherie befanden. Sie erschienen teilweise leicht geschwollen, doch konnten keine hantel- oder ringförmige Formen gefunden werden (Abb. 3.4.2-2). Peroxisomen waren nur schwach ausgebildet. Lysosomale Elemente in Form sekundärer Lysosomen waren ebenfalls selten. Als Speicherstoffe traten größere Lipidtropfen sowie kompakte Glykogenfelder in der Peripherie der Hepatocyten auf (Abb. 3.4.2-2).



Abbildungsbeschriftungen siehe nächste Seite →

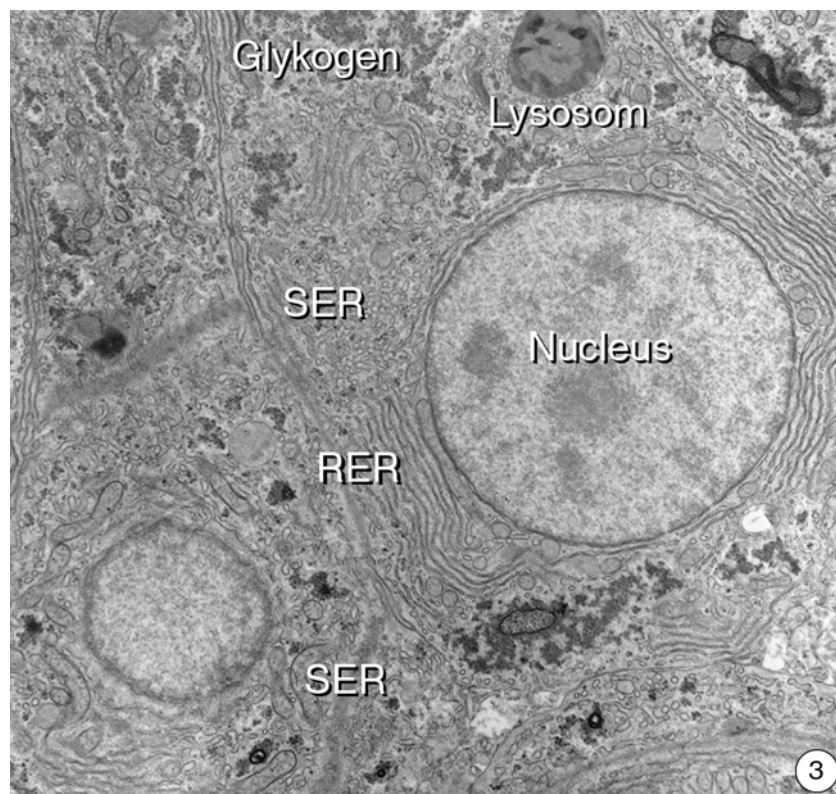


Abbildung 3.4.2-1 bis 3: Simultane Belastung von Hepatocyten mit 100 nM Staurosporin und 10 μ M eines membranpermeablen Caspase 3-Inhibitors für 3 Tage.

1: Zellen mit runden Kernen und wenig Heterochromatin bestimmen das Bild. Das glatte endoplasmatische Retikulum (SER) ist gut entwickelt. Mitochondrien treten als längliche oder runde Formen auf. Peroxisomen sind ebenfalls rund. Ausgedehnte Glykogenfelder treten als Energiespeicher auf (6.600x).

2: Das raue endoplasmatische Retikulum (RER) ist in den Hepatocyten, die mit Staurosporin und Inhibitor belastet wurden, als Manschette um den Kern ausgebildet. Vereinzelt dienen auch Lipidtropfen als Energiespeicher (6.700x).

3: Das lysosomale Kompartiment ist in Hepatocyten, die mit Staurosporin und Inhibitor belastet wurden, nur schwach entwickelt (6.600x).