

Zusammenfassung

Untersuchung von N-Methyl-pyrrolidon und seinen Metaboliten auf Embryotoxizität in der `Whole Embryo Culture`

Einleitung: In dieser Arbeit wurden in der `Whole Embryo Culture` (WEC) N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) und seine Metaboliten auf Embryotoxizität untersucht. Die WEC eignet sich unter bestimmten Umständen für bestimmte Substanzgruppen gut für die Abklärung von Wirkmechanismen und für die Testung auf eine spezifische Embryotoxizität. Zusätzlich wurde das `Whole-immuno-staining` (WIS) der Neuralleistenzellen (NCC) und der Gehirnnerven durchgeführt, um beobachtete Defekte auf zellulärer Ebene nachvollziehen zu können.

Material und Methoden: Für die WEC wurden Rattenembryonen am Gestationstag 9,5 sowohl in Kulturmedium (als Lösungsmittelkontrolle), als auch in Testansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen von NMP und seinen drei Metaboliten inkubiert. Sie wurden unter einem definierten Gaspartialdruck und bei 38,5°C für 48 Stunden in einem rotierenden System kultiviert. Für das WIS wurden Embryonen aus der WEC mit primärem Antikörpern inkubiert: Der CRABP-I-Antikörper (zelluläres Retinsäure bindendes Protein 1) markierte die NCCs und der 2H3-Neurofilament-Antikörper die Gehirnnerven. Durch den Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper wurde der Farbstoff Naphthol in ein blaues Präzipitat umgewandelt.

Ergebnisse: Für alle Substanzen wurden in der WEC konzentrationsabhängige Effekte beobachtet. Bei NMP traten vor allem Abnormitäten am Kopf auf. Dieser war unproportional verkleinert, das Auge erschien dorsoventral abgeflacht, es bestand eine Adhäsion des zweiten Kiemenbogens mit dem ersten und seiner Umgebung. Neben diesen Abnormitäten wurde eine Veränderung in Form einer Umfangsvermehrung in Höhe des Trigeminalganglions beobachtet. Diese konnte mit Hilfe des morphologischen Scoring-Systems nicht bewertet werden und die Einschätzung als Abnormität war deshalb nicht möglich. Beim WIS der 2H3-Neurofilamente wurden Retardierungen und Anomalien der kranialen Nerven in dieser Kopfreion bei Embryonen exponiert mit NMP festgestellt. Bei dem WIS mit CRABP-I war es nicht möglich eine Störung der NCC-Wanderung durch NMP im Vergleich zur Kontrollsituation festzustellen.

Diskussion: In der WEC wurde für NMP und den Metabolit 5-Hydroxy-N-Methyl-2-pyrrolidon (5H-NMP) ein schwach embryotoxisches Potential festgestellt, welches sich in spezifischen morphologischen Abnormitäten bei den Embryonen manifestierte. Die Metaboliten N-Methylsuccinimid (MSI) und 2-Hydroxy-N-Methylsuccinimid (2H-MSI) wurden als nicht embryotoxisch klassifiziert. Sie verursachten nur einen generellen embryotoxischen Effekt bei sehr hohen unphysiologischen Konzentrationen. Da die im WIS detektierten Veränderungen an den Gehirnnerven der Embryonen inkubiert in NMP weder in der Kontrollsituation noch bei *Ex-vivo*-Embryonen auftraten, gab das WIS einen Hinweis auf eine spezifische Neurotoxizität von NMP.

Schlussfolgerung: NMP scheint die für die Embryotoxizität *in vivo* verantwortliche Substanz zu sein. Die Ergebnisse des WIS lieferten im Fall von NMP ergänzende Informationen zu den morphologischen Veränderungen und konnten zu diesen in einen sinnvollen Zusammenhang gestellt werden.

Schlagworte: CRABP-I, Embryotoxizität, Gehirnnerven, 2H3-Neurofilament, 5H-NMP, 2H-MSI, MSI, Neuralleistenzellen, NMP, `Whole Embryo Culture`, `Whole-immuno-staining`