

1. Einleitung

Thema der hier vorgelegten Arbeit ist die Untersuchung von N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) und seinen Metaboliten auf Embryotoxizität in der 'Whole Embryo Culture' (WEC). Mit Embryonen der WEC wurde außerdem das 'Whole-immuno-staining' (WIS) durchgeführt. Dabei wurden die Gehirnnerven mit Hilfe des 2H3-Neurofilament-Antikörpers und die Neuralleistenzellen mit Hilfe des CRABP-I-Antikörpers (CRABP-I – Cellular retinoic acid binding protein) dargestellt. CRABP-I wird von den Neuralleistenzellen und Hinterhirnzellen exprimiert (24), (14).

Im ersten Abschnitt der Einleitung wird erläutert, was N-Methyl-2-pyrrolidon ist und wozu es verwendet wird. Es werden Studienergebnisse anderer Autoren zur akuten und chronischen Toxizität und zur Embryotoxizität von NMP besprochen.

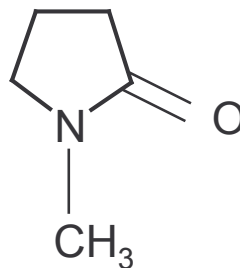
Im zweiten Abschnitt wird die WEC besprochen.

Im dritten Abschnitt der Einleitung werden Grundlagen zu den Neuralleistenzellen und zur Entwicklung der Gehirnnervenstrukturen während der Embryonalentwicklung gegeben.

1.1. NMP und seine Metaboliten

1.1.1. Eigenschaften von NMP

N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) ist eine farblose Flüssigkeit mit aminartigem Geruch, die als Zyklisierungsprodukt aus der 4-Methyl-aminobuttersäure entsteht. Die Strukturformel lautet C_5H_9NO .



1.1.2. Verwendung von NMP

NMP wird in verschiedenen Bereichen eingesetzt:

- Hauptsächlich verwendet wird NMP als Entfetter in der Reinigung, d.h. vor allem in der elektronischen Industrie, Automobilindustrie und in der industriellen Reinigung.
- Häufig findet NMP zum Entfernen von Farben und Graffiti Einsatz (4).
- NMP wird als Lösungsmittel, z.B. in der Landwirtschaft für Pestizide, verwendet.
- NMP ist geeignet als Lösungsmittel für Wachse und andere Hüllsubstanzen.
- NMP wird als Extraktionsmittel u.a. für Hydrocarbone, aromatische Stoffe und sulfurhaltige Stoffe genutzt.
- Wegen seiner hohen Hautpenetration wird NMP in der pharmazeutischen Industrie als Trägerstoff angewandt (z.B. für Mannitol, Griseofulvin).

1.1.3. Pharmakokinetik und Metabolismus von NMP

1.1.3.1. Aufnahme von NMP in den Körper

Es handelt sich bei NMP um eine flüchtige Substanz, die schnell in Wasser gebunden wird oder Reaktionen mit Hydroxylradikalen eingeht.

Prinzipiell ist es möglich, über die Abwässer aus der Industrie und aus Haushalten mit NMP in Kontakt zu kommen.

Die Aufnahme von NMP in den Körper kann über drei verschiedene Wege geschehen: dermal, per inhalationem und oral.

Dermal:

Bei Ratten wurden 2/3 der auf die Haut aufgetragenen Gesamtmenge mit einer Geschwindigkeit von 25,3 g/m²/h bei männlichen Tieren und 28,5 g/m²/h bei weiblichen aufgenommen. Dabei blieb die Absorption für fünf Stunden konstant (48). Beim Menschen wurden eine Stunde nach Expositionsende Maximalwerte erreicht (3). Es wurde eine Absorptionsrate von 17,1 g/m²/h gemessen. Im Vergleich hierzu beträgt die Absorption des in der Medizin häufig als Penetrationsförderer verwendeten Dimethylsulfoxid (DMSO) 17,6 g/m²/h (76).

Nach Ligocka et al. (41) liegt die Absorptionsrate für NMP beim Menschen bei 67,9% und somit im gleichen Bereich wie bei der Ratte.

Per inhalationem:

Bei einer Inhalationsstudie bei Menschen wurde am Tag nach der Exposition mit NMP über die Einatemluft die Konzentration des NMP-Metaboliten 2H-MSI (2-Hydroxy-Methylsuccinimid) im Plasma bestimmt. Die Korrelation zwischen der NMP-Konzentrationen in der Luft und den 2H-MSI-Konzentrationen im Plasma war gut ($r=0,98$). Das bedeutet, dass die 2H-MSI-Messung im Plasma einen guten Indikator für die tatsächliche NMP-Exposition darstellt. Die Plasmakonzentration von 2H-MSI nach einer Exposition mit 10 mg/m³ NMP lag nach 24 Stunden bei 4,5 µmol/l (31). Die in Schweden erlaubte Höchstgrenze der NMP-Konzentration in der Arbeitsluft ist bei 200 mg/m³ festgesetzt, während die deutsche MAK-Kommission – die Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK = Maximale Arbeitsplatzkonzentration) 82 mg/m³ (20 ml/m³ = 20 ppm) erlaubt. Bei Messungen der Luftkonzentration von NMP in der Arbeitsumgebung von Graffitiern, wurden Konzentrationen von 1,01 ± 0,89 mg/m³ gemessen. Dies entspricht einer Konzentration, die sich unter 3% des erlaubten Limits bewegt. Der gemessene NMP-Plasmaspiegel dieser Arbeiter lag bei 2 µmol/l. Die Messung der Metaboliten von NMP ergab dabei folgendes: 1,82 µmol/l 5-Hydroxy-N-Methyl-2-pyrrolidon (5H-NMP), 0,4 µmol/l Methylsuccinimid (MSI) und 0,36 µmol/l 2H-MSI (4).

Oral:

Bei oraler Gabe von NMP wurde bei Ratten nach 2 Stunden der NMP-Plasmapeak festgestellt. Die Halbwertszeit von NMP betrug 28 Stunden (48).

1.1.3.2. Verteilung von NMP im Körper

Nach der Aufnahme kommt es zu einer Umverteilung von NMP im Körper. Das so genannte Verteilungsvolumen kann bestimmt werden. Es handelt sich dabei um den Anteil des Körpervolumens, in dem sich eine von außen zugeführte Substanz verteilt. Das Verteilungsvolumen liegt für NMP bei 69%, was ungefähr dem Wasservolumen des Körpers (60% des Körpergewichts) entspricht (58). Auch Jonsson et al. (31) stellte bei NMP und seinen drei Metaboliten ein verhältnismäßig niedriges Verteilungsvolumen fest. Dies bedeutet, dass eine Akkumulation der Substanzen in bestimmten Organen oder im Fettgewebe nicht anzunehmen ist. Eine Ausnahme stellt

MSI dar. Das höhere Verteilungsvolumen von MSI spricht für eine Verteilung auch außerhalb des Körperwassers; eine Akkumulation ist somit denkbar. Es besteht auch bei 2H-MSI – aufgrund einer relativ langen Halbwertszeit von 16,1 bis 20,1 Stunden (31) - ein Hinweis auf Akkumulation nach wiederholter Exposition.

NMP wird schnell und in alle wichtigen Organe in etwa gleichmäßig verteilt. Die höchsten Konzentrationen von NMP und den Metaboliten wurden in der Leber und im Gastrointestinaltrakt gemessen (82).

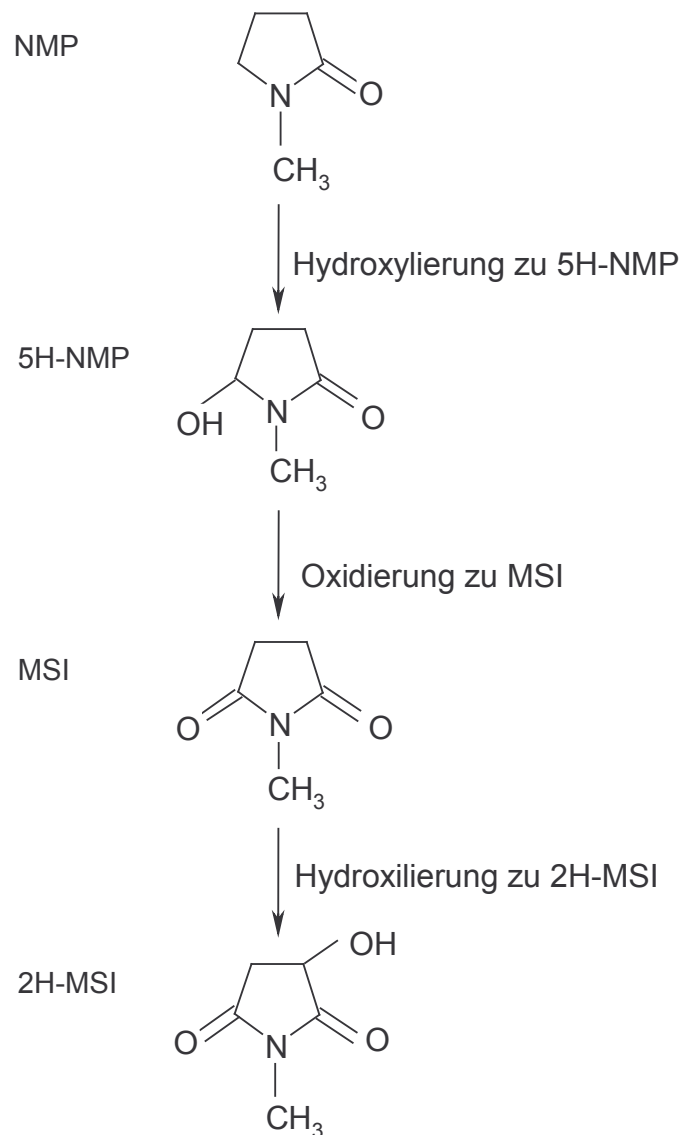
Vermutlich liegt bei NMP nur eine geringgradige Proteinbindung in Rattenserum vor (58). Radioaktiv markiertes NMP wurde durch eine Membran (30 000 Dalton) ultrafiltriert und im Plasma wurden anschließend 99,5% der Radioaktivität gemessen.

1.1.3.3. Der Metabolismus von NMP

NMP wird zu 5H-NMP hydroxiliert, dieses wird zu MSI oxidiert und MSI wird zu 2H-MSI hydroxiliert (siehe Abbildung 1).

Der Metabolismus von NMP ist Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1)-abhängig. Als Marker für einen hohen bzw. niedrigen Stoffwechsel wurde die Konzentration des Metaboliten 5H-NMP im Plasma und im Urin herangezogen. Bei einer Induktion des Cytochroms durch Fasten oder bei erhöhten P450 – Blutwerten war die Ausscheidung von NMP und seinen Metaboliten verstärkt. Bei einer Hemmung des Cytochroms entweder durch den CYP2E1-Hemmer Diethyldithiocarbamat beziehungsweise durch CYP2E1-Antikörper oder bei festgestellten niedrigen P450 - Blutwerten war die 5H-NMP-Menge im Urin vermindert und der Plasmapeak des Metaboliten wurde erst später erreicht. Dieser dabei beobachtete verzögerte Konzentrationsanstieg des Metaboliten 5H-NMP war bei der Ratte ausgeprägter als beim Menschen. Deshalb wird von weiteren involvierten Cytochrom-Isoformen beim Menschen ausgegangen. Vermutet werden auch individuelle Schwankungen in der Isoformenzusammensetzung und –aktivität des Cytochroms (41).

Abb. 1: Der Metabolismus von NMP



Der Hauptmetabolit von NMP ist 5H-NMP. Dies geht aus einer Arbeit von Anundi et al. (4) hervor (siehe Tabelle 1). Bei Arbeitern, die während einer 8-stündigen Schicht in Untergrundstationen mit Hilfe von NMP Graffiti entfernten, wurden die Plasmakonzentrationen von NMP und seinen Metaboliten gemessen und in $\mu\text{mol/l}$ angegeben. Die kumulativen prozentualen Anteile waren dabei folgende: NMP 44%, 5H-NMP 39%, MSI 9% und 2H-MSI 8%.

Tab. 1: Tabelle nach Anundi et al. (4)

Plasma	Graffiti-Entfernungs-Gruppe (n=35)		Kontroll-Gruppe (n=10)	
	AM	Bereich	AM	Bereich
P-NMP	2	ND – 22,6	0,05	ND
P-5-HNMP	1,82	0,05 – 6,89	0,066	ND – 0,2
P-MSI	0,4	0,01 – 1,36	0,015	0,01 – 0,025
P-2-HMSI	0,36	ND – 2,84	0,041	ND – 0,16
P-NMP (Gesamt)	4,58	0,12 – 27,4	0,17	0,09 – 0,31

Legende: Konzentrationen von N-Methyl-pyrrolidon (NMP) und seinen Metaboliten im Plasma ($\mu\text{mol/l}$). n = Stichprobengröße, MW = Mittelwert, ND = nicht nachweisbar, P = Plasma, modifiziert nach Anundi et al.(4).

1.1.3.4. Die Pharmakokinetik von NMP

Je nach Quelle unterscheiden sich diverse kinetische Parameter sehr. Sie sind in Tabelle 2 und im Text dargestellt.

Die Halbwertszeit ist die Zeit, in der die Hälfte einer Substanz abgebaut wird. Die Halbwertszeit für NMP bei der Ratte nach intravenöser Gabe lag zwischen 0,7 (58) und 9,9 Stunden (82). Es sind laut Payan et al. (58) zwei Thesen für die große Diskrepanz zwischen den aufgeführten Halbwertszeiten denkbar:

- Wells et al. (82) wählten eine höhere Ausgangskonzentration als Payan et al. (58). Es ist folglich möglich, dass bei höheren Ausgangskonzentrationen auch längere Halbwertszeiten vorliegen.
- Proben wurden bei Payan et al. (58) bis zu 72 Stunden lang gezogen, bei Wells et al. (82) nur bis zu sechs Stunden lang. Im gewählten Konzentrationsbereich wurde für NMP in den ersten drei Stunden ein linearer, anschließend ein exponentieller Konzentrationsabfall festgestellt. Wird die Probenentnahme schon im Verlauf des flacheren Bereichs eingestellt, so erhält man rechnerisch eine längere Halbwertszeit als bei einer zusätzlichen Probenentnahme auch im Bereich des steilen Abfalls.

Die Halbwertszeit von 5H-NMP lag zwischen 2,2 (58), 6,3 (2) und 10,6 Stunden (3). Der Vergleich dieser Werte ist schwierig, da die Versuche sich sowohl in der Spezies (zwei Versuche bei Menschen und ein Versuch bei Ratten), als auch in der Applikationsart unterschieden. Der Unterschied zwischen den beiden gemessenen Halbwertszeiten aus den Versuchen mit Freiwilligen - 6,3 bis 7,3 (2) und 10,6 Stunden (3) - ist vermutlich durch die Applikationsart zu erklären, da der Zeitraum der Probenentnahmen bei beiden Versuchsreihen in etwa gleich lang war (40 und 48 Stunden). Eine verlängerte Halbwertszeit lag bei der dermalen Applikation vor. Es wird für wahrscheinlich gehalten, dass NMP nur verlangsamt aus der Haut abgegeben wird und somit auch nur verlangsamt verstoffwechselt wird. Diese These wird in der Arbeit von Akrill et al. (3) favorisiert.

Nach intravenöser NMP-Applikation bei Ratten wurden die 5H-NMP- und MSI-Plasmapeaks nach etwa vier Stunden erreicht (58). Es wurde beobachtet, dass die Plasmapeaks bei hohen NMP-Ausgangskonzentrationen erst nach etwa 24 Stunden erreicht wurden. Dieser mit steigenden Ausgangskonzentrationen immer spätere Zeitpunkt des Plasmapeaks spricht für einen sättigbaren Prozess des NMP-Metabolismus.

Bei der Elimination von NMP aus dem Körper handelt es sich um eine Reaktion 0. Ordnung (61).

An der Ausscheidung der verabreichten Dosis über die Nieren waren NMP und die Metaboliten prozentual folgendermaßen beteiligt: NMP zu 0,8 (1) bis 10% (58) am ersten Tag, 5H-NMP zu 42 - 45% am ersten und zweiten Tag (58),(1), MSI zu 0,4% vom ersten bis zum dritten Tag (1) und 2H-MSI zu 20% vom ersten bis zum siebten Tag (1).

Tab. 2: Pharmakokinetische Parameter von NMP und seinen Metaboliten

	HWZ [h]	Plasmapeak [nach x h]	Anteil im Urin [%]	Dauer [Tag]	Quelle
NMP			0,8	1 Tag	Akesson et al. (human, oral) (1)
	0,77 ± 0,004		4 - 10		Payan et al. (Ratten, i.v.) (58)
	7 - 9,9				Wells et al. (Ratten, i.v.) (82)
5H-NMP			44	1.+2. Tag	Akesson et al. (human, oral) (1)
	2,2 ± 0,2	4	42 - 45		Payan et al. (Ratten, i.v.) (58)
	6,3 - 7,3				Akesson et al. (human, Inhalation, 8h) (2)
	10,6			1.+2. Tag	Akrill et al. (human, dermal, 15 Minuten) (3)
MSI			0,4	1.- 3. Tag	Akesson et al. (human, oral) (1)
		4			Payan et al. (Ratten, i.v.) (58)
2H-MSI			20	1.- 7. Tag	Akesson et al. (human, oral) (1)
	16,1 - 20,1	24			Jonsson et al. (human, Inhalation, 8h) (31)

Legende: Darstellung der Halbwertszeit (HWZ) in Stunden (h), des Zeitpunkts des Plasmapeaks in Stunden nach Expositionsende (nach x h), des prozentualen Anteils des jeweiligen Agens an der gesamten im Urin ausgeschiedenen Menge (Anteil im Urin), der Dauer der nachweisbaren Ausscheidung in Tagen im Urin (Dauer) von NMP und den Metaboliten. i.v. = intravenös, h = Stunden.

33% der absorbierten Menge werden nicht über den Urin ausgeschieden (1). Ein Teil davon ist in der Faezes enthalten: 1-2% (48), 3,4% (58); ein weiterer wird als CO₂ über die Expiration ausgeschieden: 6-7% (48), 1% (82), 2% (58). Die unterschiedlichen Aussagen über die Anteile der Systeme an der Ausscheidung, sind vor allem bei der Ausatmung über CO₂ und bei der Exkretion über die Nieren augenfällig. Die Ursache dafür liegt in der Konzentrationsabhängigkeit der Ausscheidung: Die pulmonale Ausscheidung steigt mit ansteigenden Ausgangskonzentrationen an. Die Ausscheidung über die Nieren nimmt mit ansteigenden Ausgangskonzentrationen ab (58).

Folgendes findet man in der Literatur zur Geschwindigkeit der Ausscheidung von NMP bei Ratten: Innerhalb von 12 Stunden wurden nach einmaliger i.v.-Gabe 70 %

ausgeschieden, innerhalb von 24 Stunden etwa 80% (vor allem in Form der Metaboliten) (82).

Ergänzt wird dies durch andere Quellen; diese sprechen von einer 85 - 88%igen Ausscheidung nach 5 Tagen bei oraler Aufnahme und einer 69%igen bei dermalen Applikation (48). Bei einmaliger intravenöser Gabe wurden nach 72 Stunden 86% der aufgenommenen NMP-Menge ausgeschieden (58).

Die Ausscheidung von NMP verlief bei trächtigen Ratten langsamer als bei nicht trächtigen Tieren (61).

1.1.4. Akute und chronische Toxizität von NMP *in vivo*

Zur Untersuchung der **akuten Toxizität** von NMP wurden Ratten und Mäuse über unterschiedliche Applikationswege mit NMP behandelt: per inhalationem, per injectionem und oral.

Per inhalationem:

Konzentrationsabhängig kam es zu unterschiedlich starken Irritationen und Schädigungen zuerst im nasalen Bereich und später im gesamten Respirationstrakt bis hin zu fokalen Pneumonien. Als allgemeine Symptome traten bei vierwöchigen Studien mit Ratten, ab einer Exposition mit 0,1 mg/l NMP Lethargie und unregelmäßige Atmung auf. Bei 1 mg/l NMP starben mehrere Tiere. In dieser Expositionshöhe wurden außerdem Knochenmarkssuppression und Atrophie des Lymphgewebes beobachtet. Bei einer Studie, die über zwei Jahre ging, traten bei einer Expositionshöhe von 0,4 mg/l bei männlichen Ratten Körpergewichtsverluste von etwa 6 % auf. Eine karzinogene Wirkung konnte ausgeschlossen werden (39).

Per injectionem:

Bei der Prüfung der akuten Toxizität bei der Ratte lag die LD₅₀ (LD₅₀ = Die Konzentration, bei der 50% der Tiere sterben) bei intraperitonealen Injektionen bei 2,4 ml/kg Körpergewicht (bei Ethanol lag die LD₅₀ bei 6,3 ml/kg). Die Tiere starben dabei immer im Laufe des ersten Tages (5).

Oral:

Versuche zur oralen akuten Toxizität ergaben bei Ratten eine LD₅₀ von 3,8 ml/kg Körpergewicht (Ethanol: 13,0 ml/kg KG) (5).

Malek et al. (43) fanden bei Ratten die in Tabelle 3 dargestellten Effekte. Er exponierte die Tiere gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von NMP für eine Zeit von 4 Wochen über das Futter.

Tab. 3: Akute Toxizität - Orale Kurzzeitexposition mit NMP über das Futter bei Ratten

Beobachteter Effekt	Männliche Ratten	Weibliche Ratten
Futтераufnahme sinkt	1 234 mg/kg KG (19%)	2 268 mg/kg KG (23%)
Futtereffizienz sinkt	1 234 mg/kg KG (26%)	2 268 mg/kg KG (36%)
Körpergewicht sinkt	1 234 mg/kg KG (17%)	2 268 mg/kg KG (14%)
Cholesterol steigt	2 019 mg/kg KG	2 268 mg/kg KG
Protein sinkt	2 019 mg/kg KG	2 268 mg/kg KG
Alkalische Phosphatase sinkt	2 019 mg/kg KG	
Glucose sinkt	1 234 mg/kg KG	
Zentrilobuläre hepatozelluläre Hypertrophie	1 234 mg/kg KG	2 268 mg/kg KG
Hypozelluläres Knochenmark, Thymusatrophie	2 019 mg/kg KG	2 268 mg/kg KG
Hodendegeneration	2 019 mg/kg KG	
IC _{NOAEL}	429 mg/kg KG	1 548 mg/kg KG

Legende: Darstellung des Auftretens von Symptomen nach oraler Gabe von NMP abhängig von der Konzentration und dem Geschlecht und Angabe der IC_{NOAEL}. Die Prozentangaben in Klammern stellen den prozentualen Abfall des jeweiligen Parameters im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dar. Die aufgeführten Konzentrationen sind die niedrigsten getesteten Konzentrationen, bei denen die Symptome das erste Mal auftraten. Cholesterol, Protein, Alkalische Phosphatase und Glukose wurden im Serum bestimmt. KG = Körpergewicht, IC_{NOAEL} = höchste getestete Konzentration, bei der keine negativen Effekte auf die erhobenen Parameter festgestellt wurden. Tabelle nach Malek et al. (43).

Die IC_{NOAEL} (höchste getestete Konzentration, bei der keine adversen Effekte beobachtet werden) lag in dieser Studie bei männlichen Tieren bei 429 mg/kg Körpergewicht und bei weiblichen bei 1548 mg/kg Körpergewicht. Ab einer Konzentration von 1234 mg/kg traten Veränderungen des Blutbildes auf: Cholesterol stieg im Serum, während Glukose, Protein und die alkalische Phosphatase sanken. Außerdem zeigten sich Veränderungen des Knochenmarks, des Thymus und der Hoden. Diese Effekte sind vermutlich weniger von toxischer Relevanz, als vielmehr das Resultat von verminderter Futтераufnahme und geringerem Körpergewicht. Auffällig war, dass männliche Tiere empfindlicher auf NMP reagierten als weibliche Tiere, was vom Autor auf metabolische Unterschiede zwischen den Geschlechtern zurückgeführt wurde. Die Effekte auf Mäuse bei Kurzzeitstudien mit oralen Gaben von NMP über das Futter (43) werden in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Akute Toxizität - Orale Kurzzeitexposition mit NMP über das Futter bei Mäusen

	Männliche Mäuse	Weibliche Mäuse
Geschwollenes Epithel der distalen Nierentubuli	2 130 mg/kg KG	4 060 mg/kg KG
IC _{NOAEL}	720 mg/kg KG	2 970 mg/kg KG

Legende: Darstellung des Auftretens eines Symptoms durch NMP abhängig von der Konzentration und dem Geschlecht und Angabe der IC_{NOAEL}. Die aufgeführte Konzentration ist die niedrigste getestete Konzentration, bei der das Symptom das erste Mal auftrat. KG = Körpergewicht, IC_{NOAEL} = höchste getestete Konzentration, bei der keine negativen Effekte auf die erhobenen Parameter festgestellt wurden. Tabelle nach Malek et al. (43).

Die IC_{NOAEL} lag bei männlichen Tieren bei 720 mg/kg Körpergewicht und bei weiblichen bei 2970 mg/kg Körpergewicht. Im Vergleich dazu schienen die Ratten derselben Studie sehr viel empfindlicher als Mäuse zu reagieren. Die Ratten reagierten eher mit allgemeinen Effekten. Organspezifische Schädigungen konnten bei der Ratte nicht gezeigt werden, während Mäuse auf NMP mit Nierenschäden reagierten.

Bei Studien zur **chronischen Toxizität** von NMP wurden die Effekte bei Ratten nach 90 Tagen oraler NMP-Gaben über das Futter von Malley et al. (44) untersucht – die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Chronische Toxizität - Effekte nach 90 Tagen oraler NMP-Gaben über das Futter bei Ratten

	Männliche Ratten	Weibliche Ratten
Futterkonsum und -effizienz sinkt	433 mg/kg KG	567 mg/kg KG
Körpergewichtszunahme sinkt, v.a. in erster Hälfte, dann reversibel	433 mg/kg KG (28%)	567 mg/kg KG (26%)
Verstreuen von Futter gehäuft (nicht reversibel)	433 mg/kg KG	
Sedativer Effekt (langsameres Aufstehen, vermehrter Augenschluss)	1 057 mg/kg KG	1 344 mg/kg KG
Relatives Lebergewicht steigt		1 344 mg/kg KG
Relatives Nierengewicht steigt	1 057 mg/kg KG	1 344 mg/kg KG
Relatives Lungengewicht steigt	1 057 mg/kg KG	1 344 mg/kg KG
Relatives Hodengewicht steigt	1 057 mg/kg KG	
Relatives Gehirngewicht sinkt	1 057 mg/kg KG	1 344 mg/kg KG
IC_{NOAEL}	169 mg/kg KG	217 mg/kg KG

Legende: Darstellung des Auftretens von Symptomen durch NMP abhängig von der Konzentration und dem Geschlecht und Angabe der IC_{NOAEL} . Die Prozentangaben in Klammern stellen den prozentualen Abfall des jeweiligen Parameters im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dar. Die aufgeführten Konzentrationen sind die niedrigsten getesteten Konzentrationen, bei denen die Symptome das erste Mal auftraten, KG = Körpergewicht, IC_{NOAEL} = höchste getestete Konzentration, bei der keine negativen Effekte auf die erhobenen Parameter festgestellt wurden. Tabelle nach Malley et al. (44).

Bei den Versuchen zur chronischen Toxizität von NMP zeigte sich eine erhöhte Sensibilität bei männlichen Tieren (siehe Tabelle 5). Es zeigten sich auch Effekte, die eventuell auf Störungen des Nervensystems zurückzuführen waren, wie vermehrtes Verstreuen von Futter, verlangsamtes Aufstehen und gehäuftes Schließen der Augenlider. Auch in dieser Versuchsanordnung wurden eine verminderte Futteraufnahme und verminderte Körpergewichtszunahmen geschildert.

1.1.5. Genotoxizität von NMP

In vitro:

Unter speziellen Bedingungen, wie z.B. vorhergehende Kälteschocks, wurde eine Aneuploidie (zusätzliches oder fehlendes Chromosom) bei *Saccharomyces* nach NMP-Exposition festgestellt. Allerdings trat dies nur bei bestimmten Stämmen und nicht konzentrationsabhängig auf. Bei Zytotoxizitätstests mit Salmonellen fand man ab Konzentrationen von 1000 μmol NMP/ml Zeichen einer Zytotoxizität (83).

In vivo:

Bei oralen Einzeldosen bis zu 3800 mg NMP/kg Körpergewicht gab es keine Anzeichen einer Genotoxizität beim chinesischen Hamster (18).

1.1.6. Reproduktionstoxizität von NMP

Bei einer Studie von Solomon et al. (71), sollten die Effekte von NMP auf die Fertilität von Ratten untersucht werden. Hierbei konnten bei Studien über zwei Generationen keine Auffälligkeiten festgestellt werden.

1.1.7. Teratogenität von NMP

Es wurden mehrere *In-vivo*-Studien durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Teratogenität von NMP ziehen zu können. Dabei wurden verschiedene Applikationswege gewählt: per inhalationem, dermal und oral.

Per inhalationem:

In Tabelle 6 werden die Ergebnisse aus verschiedenen Studien mit Ratten bei Ganzkörperbegasung über einen bestimmten Trächtigkeitsabschnitt vorgestellt.

Tab. 6: Teratogenität nach Ganzkörperbegasung mit NMP bei Ratten

	Konzentration	Maternale Toxizität	Fötale Toxizität	Quelle
GD 0- 20	116 ppm = 478 mg/m ³		Fötale Gewicht sinkt (7%)	Solomon et al. (71)
GD 4- 20	680 mg/m ³		Fötale Gewicht sinkt, präimplantative Verluste, verspätet Ossifikationen	Hass et al. (26)
GD 7- 20	150 ppm = 622 mg/m ³		Fötale Gewicht sinkt, Verhalten und physische Entwicklung gestört, keine motorischen Funktions-Störungen	Hass et al. (27)
GD 6- 15	360 mg/m ³	Lethargie, unregelmäßige Atmung		Lee et al. (39)
GD 6- 20	60 ppm	KG sinkt		Saillenfait et al. (64)
	120 ppm	Futterkonsum sinkt	Fötale Gewicht sinkt	

Legende: Darstellung verschiedener Studien zur Begasung von Ratten mit NMP in unterschiedlichen Gestationsabschnitten, mit den jeweiligen effektiven Konzentrationen von NMP. GD = Gestationstag, KG = Körpergewicht, ppm = parts per million. Die Prozentangabe in Klammern stellt den prozentualen Abfall des jeweiligen Parameters im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, d.h. zu Tieren, die nicht mit NMP begast, aber unter gleichen Bedingungen gehalten wurden, dar.

Mit den verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Ziele verfolgt. Folglich variieren die NMP-Konzentrationen stark und ein Vergleich der effektiven Konzentrationen untereinander ist deshalb nicht möglich. Es fällt aber auf, dass in drei der aufgeführten Versuche eine teratogene Wirkung in Konzentrationen auftrat, die beim Muttertier im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle noch keine Effekte hervorriefen. Zwei der Versuche zeigten Effekte am adulten Tier in Konzentrationen, in denen keine Veränderungen der Embryonen vorlagen. In den letzten beiden Fällen, bei denen das Muttertier vor den Embryonen Effekte zeigte, ist eine spezifische teratogene Wirkung von NMP nicht von einer allgemeinen toxischen Wirkung zu unterscheiden. Der Grund dafür liegt darin, dass die Veränderungen der Feten – vornehmlich Reduktion des fötalen Gewichts, präimplantative Verluste und Ossifikationsstörungen – auch durch gestörte Stoffwechsel- und Kreislauffunktionen der Mutter bedingt sein können.

Untersuchungen von Hass et al. (26) zeigten bei den Neugeborenen der behandelten Gruppe eine eingeschränkte Fähigkeit zur Bewältigung schwieriger Lernsituationen (z.B. Skinner Box) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Damit ergibt sich ein Hinweis auf eine mögliche nervenspezifische Toxizität von NMP.

Dermal:

Becci et al. führten (7) *In-vivo*-Studien zur Teratogenität von NMP nach dermalen Applikation bei Ratten durch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Teratogenität nach dermalen Applikation von NMP bei Ratten

	Konzentration	Maternale Toxizität	Fötale Toxizität
GD 6- 15	2 500 mg/kg KG	Alle verendet	
	1 100 mg/kg KG	KG sinkt	65 von 66 Embryonen resorbiert
	750 mg/kg KG	Körpergewichtszunahme sinkt	Resorptionen (23%), fötales Gewicht sinkt, Skelettanomalien (19%)

Legende: Fötale und maternale Effekte bei verschiedenen Konzentrationen von NMP nach dermalen Applikation werden dargestellt. GD = Gestationstag, KG = Körpergewicht. Tabelle nach Becci et al. (7).

Bei der dermalen Applikation von 750 mg NMP/kg Körpergewicht zeigte sich sowohl bei den Muttertieren in Form niedrigerer Körpergewichtszunahmen, als auch bei den Feten in Form von Skelettanomalien und niedrigeren Körpergewichten eine toxische Wirkung von NMP (siehe Tabelle 7). Diese Skelettanomalien umfassten inkomplette Schädelchlüsse, fehlende Brustbeinknochen, zusammengewachsene und zusätzlich auftretende Rippen, inkomplette Ossifikationen der Wirbel, Zusammenwachsen von

Atlas und Okziput und reduzierte und inkomplette Zungenbeinmuskeln. Die Resorptionsrate stieg abhängig von der NMP-Konzentration. Eine spezifische teratogene Wirkung von NMP ist unklar, da die Muttertiere Anzeichen maternaler Toxizität zeigten. Die IC_{NOAEL} lag bei 237 mg/kg Körpergewicht der Muttertiere.

Oral:

Saillenfait et al. (63) exponierten Ratten an den Gestationstagen 6 bis 20 mit unterschiedlichen Konzentrationen von NMP über das Futter und beobachteten die toxischen Effekte auf maternaler und fötaler Seite. Die Ergebnisse werden in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Teratogenität nach oraler Applikation von NMP über das Futter bei Ratten

Konzentration	Maternale Toxizität	Fötale Toxizität
750 mg/kg KG	Futterkonsum und Körpergewicht sinken	Fötales Gewicht um 47% niedriger, Resorptionen (67%), Anasarca, Atresia ani, Herz- und Gefäßanomalien, Skelettanomalien
500 mg/kg KG	Futterkonsum und Körpergewicht sinken	Fötales Gewicht um 30% niedriger, Resorptionen, Anasarca, Atresia ani, Herz- und Gefäßanomalien, Skelettanomalien
250 mg/kg KG		Fötales Gewicht um 10% niedriger, Anasarca, Atresia ani
IC_{NOAEL}	250 mg/kg KG	125 mg/kg KG

Legende: Fötale und maternale Effekte bei verschiedenen Konzentrationen von NMP werden dargestellt. IC_{NOAEL} = höchste getestete Konzentration, bei der keine negativen Effekte auf die erhobenen Parameter festgestellt wurden. Tabelle nach Saillenfait et al. (63).

Bei dieser Versuchsanordnung mit oralen Gaben von NMP (siehe Tabelle 8) beobachtete man ab 250 mg NMP/kg Körpergewicht des Muttertieres ein niedrigeres fötales Gewicht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, ohne dass dabei Effekte auf maternaler Seite festgestellt werden konnten. Mit steigenden Konzentrationen kam es zu vermehrten Resorptionen und bei den Feten zu Veränderungen wie Anasarca (Ödeme des Unterhautgewebes), Atresia ani, Herz-, Gefäß- und Skelettanomalien.

1.2. Die `Whole Embryo Culture` (WEC)

Die WEC wurde in ihren Anfängen (54) verwendet, um während der Embryonalentwicklung die Organogenese zu untersuchen. Die Embryonen konnten außerhalb des Uterus, im viszeralen Dottersack beobachtet werden.

Bald wurde dieses System auch verwendet, um die embryotoxischen Effekte von verschiedenen Substanzen zu untersuchen. Laut dem ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) ist die WEC ein wissenschaftlich validierter Test, der geeignet ist, das embryotoxische Potential einer Substanz in Routineuntersuchungen zu bestimmen (59). Rattenembryonen wurden dafür am Tag 9,5 entnommen und in Kultur verbracht. Sie entwickeln dann innerhalb von zwei Tagen ein schlagendes Herz, die wichtigsten Organanlagen und das Neuralrohr schließt sich. Die Entwicklung der verschiedenen Organanlagen wird in einem Score zusammengefasst und zu einem gesamten morphologischen Score addiert. Weitere Parameter wie die Blutversorgung des Dottersacks, die Scheitel-Steiß-Länge, der Proteingehalt je Embryo und die Somitenanzahl werden erfasst.

Die Embryokultur ist eine der drei validierten Alternativmethoden zu *In-vivo*-Versuchen auf dem Gebiet der Embryotoxizitäts-Tests. *In-vitro*-Methoden im Allgemeinen, wie z.B. Zell-, Organ- und Embryokultur, haben den Vorteil des geringeren Verbrauchs von Labortieren.

Die Zellkultur mit primären Zellen bzw. Zelllinien stellt dabei das einfachste Modell dar: sie benötigt wenig bzw. gar kein Tiermaterial. Es können aber nur einfache zelluläre Mechanismen und ihre Reaktion auf toxische Substanzen untersucht werden. Ähnlich verhält es sich mit der Organkultur.

Die Embryokultur hat einen höheren Bedarf an lebenden Tieren: tragende Tiere müssen getötet werden, um die Embryonen zu gewinnen. Außerdem ist der Zeit- und Kostenaufwand im Vergleich zu den anderen Alternativmethoden größer. Der Vorteil der WEC liegt darin, dass man die Entwicklung der repräsentativen Embryonen in ihrer ganzen Komplexität von Zellproliferation, -differenzierung und regulativen Prozessen beobachten kann.

Die wichtigste Basis der WEC ist die Tatsache, dass beobachtete Effekte die direkte Wirkung der Substanz auf den Embryo darstellen. Maternale Effekte haben dabei keinen Einfluss auf den Embryo. Dies ist der bedeutendste Unterschied zu *In-vivo*-Versuchen.

Die WEC ist ein geeignetes System, um Chemikalien vor allem in der Anfangsphase ihrer Entwicklung auf eine mögliche Embryotoxizität zu überprüfen. Sie zeigt dabei im Vergleich zu den anderen *In-vitro*-Methoden die beste Übereinstimmung zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Ergebnissen. Ein wichtiges Kriterium für die routinemäßige Verwendung eines Systems zur Testung auf Embryotoxizität, ist ein möglichst geringer Anteil an falsch-negativen Befunden. Die WEC detektiert mit einer 70 %igen Wahrscheinlichkeit nicht-embryotoxische und mit einer 76 %igen Wahrscheinlichkeit schwach-embryotoxische Substanzen. Sie erkennt in 100 % der Fälle stark-embryotoxische Substanzen.

Trotzdem kann auch in Zukunft selbst bei einer idealen Kombination von verschiedenen *In-vitro*-Systemen nicht auf die Verwendung von *In-vivo*-Testungen verzichtet werden. Nur *in vivo* kann das gesamte Spektrum der Embryogenese, die Interaktionen zwischen der Mutter und dem Fetus und die Metabolisierung abgedeckt werden (59;60).

1.3. Neuralleistenzellen (NCCs) und Nerven in der Embryonalentwicklung

Zusätzlich zur WEC-Methode sind in der Versuchsplanung der hier vorgelegten Arbeit das auf Antikörper basierende 'Whole-immuno-staining' (WIS) der Neurofilamente mit dem 2H3-Antikörper und der Neuralleistenzellen (NCCs) mit dem CRABP-I-Antikörper (cellular retinoic acid binding protein 1 = zelluläres Retinsäure bindende Protein 1) durchgeführt worden.

Die in der WEC gegenüber NMP exponierten Embryonen werden auf Veränderungen der durch diese Zellen gebildeten und beeinflussten Strukturen hin untersucht.

Zuerst wird hier ein Überblick über die Grundlagen der Neuralleistenzellen, über ihre Wanderung und Differenzierung gegeben. Informationen wurden - falls nicht anders vermerkt - den Büchern von Gilbert (65;66) und Starck (72) entnommen.

Die NCCs werden nach ihrer Lokalisation folgendermaßen eingeteilt:

- Kraniale NCCs
- NCCs des Stammes, die zu Melanozyten, sympathischen Ganglien, adrenalem Mark, die Aorta umgebende Nervenbündel und Dorsalwurzelganglien werden
- Vagale und sakrale NCCs, die zu parasymphatischen Ganglien werden
- Kardiale NCCs

1.3.1. Der Ursprung der Neuralleistenzellen (NCCs)

In der hier vorgelegten Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die kranialen Neuralleistenzellen gelegt.

Vieles im Bereich der Neuralleistenzellen wurde in der Literatur ausführlich untersucht, aber es sind immer noch viele Fragen offen.

Selbst wichtige Fragen zur Herkunft der NCCs waren und sind strittig. Klar ist der Ursprung aus dem Ektoderm. Die Neuralleistenzellen liegen vor ihrer Wanderung in der äußerst dorsalen Gegend des Neuralrohrs oder - im Stadium der Neuralfalte - an deren lateralen Grenze, zwischen dem Neuralgewebe und dem Oberflächenepithel.

Das Ursprungsepithel der Neuralleistenzellen ist laut Tan et al. (73) das Neuralepithel, laut Verwoerd et al. (80) das Oberflächenepithel und laut Nichols (55) beide Epithelien je nach Entwicklungsstadium des Embryos.

Neueren Studien zufolge sind die NCCs Zellen des Neuralgewebes. Diese können bis zum Schluss des Neuralrohrs zu Zellen des zentralen Nervensystems, zu Zellen der Epidermis und zu NCCs werden. Eine Induktion zu NCCs kommt über Wechselwirkungen von Neuralgewebe und Epidermis zustande (67).

1.3.2. Die Migration der NCCs

Im Gegensatz zu Hühnern und Amphibien beginnt die Migration der Zellen bei Säugern schon vor dem Schluss des Neuralrohrs.

Uneinigkeit besteht über die Ursache der zielgerichteten Wanderung: Adhäsionen zwischen den Zellen sind dafür zuständig (51), (53), es wird so jedoch nicht klar, wie die ersten Zellen zum Zielort geleitet werden. Wichtig ist eine Interaktion des umliegenden Gewebes mit den NCCs (75): Serotonin wirkt über 5-HT-Rezeptoren auf die Neuralleistenzellen (12;49). Beteiligt sind auch Zelladhäsionsmoleküle, u.a. Laminin und Fibronectin (8), Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter (38). Die NCCs wandern bevorzugt auf Fibronectin-bedeckten Substraten. Sie bilden mindestens drei

verschiedene Integrinrezeptoren für die Interaktion mit diversen Molekülen der Extrazellulärmatrix aus (8). Die extrazelluläre Matrix hat dabei auch die weitere Aufgabe, zellfreie Räume zu schaffen, durch die die NCCs bevorzugt migrieren. Die NCCs sezernieren u.a. Proteasen und plasminogene Aktivatoren, die die Chondroitinsulfate, Glykosaminoglykane, etc. der Matrix auflösen (25). Beim Frosch fand Smith et al. (70), dass Ephrine für das Separieren der NCC-Stränge zuständig sind, da sie zellabstoßend wirken und somit ein Vermischen der Zellstränge, die ihren Ursprung in verschiedenen Rhombomeren haben, verhindern. Diese Trennung der NCC-Stränge ist deshalb wichtig, weil die spätere Funktion einzelner Populationen von NCCs bereits vor der Wanderung festgelegt ist. Es handelt sich dabei um die so genannte Determinierung.

1.3.3. Die Differenzierung der NCCs

Es gibt unterschiedliche Theorien zur Differenzierung der NCCs, von denen zwei sehr polarisierende hier vorgestellt werden.

Noden (57) führte Transplantationsexperimente mit NCCs der Kiemenbögen durch. Aus diesen entwickelten sich die Skelett- und Bindegewebsstrukturen, die vom ursprünglichen Startpunkt der Neuralleistenzellen aus auch gebildet worden wären. Deshalb geht er von einer vor der Wanderung der NCCs in die Kiemenbögen festgelegten Differenzierungsrichtung hinsichtlich des zu bildenden Gewebes dieser aus.

Trainor et al. (74) hielten die Plastizitätstheorie für wahrscheinlicher. Ihr zufolge nimmt das Zielgewebe auf die NCCs Einfluss und zwingt diese so in eine bestimmte Differenzierungsrichtung. Le Douarin et al. (37) hatten bereits 1981 Versuchsergebnisse beschrieben, die in diese Richtung wiesen.

Es scheint aber bestimmte NCC-Populationen zu geben, deren Bestimmung schon vor Beginn der Migration festgelegt ist und andere, bei denen dies erst später geschieht: Serbedzija et al. (69) hielten viele NCC-Vorläuferzellen für multipotent, schlossen aber nicht aus, dass es Subpopulationen gibt, aus denen nur bestimmte Derivate hervorgehen oder die stadiumsabhängig festgelegte Potenzen haben. Sogar bereits determinierte Zellen reagieren noch auf äußere Einflüsse (86).

Forschungen auf dem Gebiet der Gene machen immer deutlicher, dass die Expression und Verteilung verschiedener Gen-Familien und vor allem der so genannten Hox-Gene die Differenzierung entscheidend beeinflussen (u.a. (11;21)). Diese für die Differenzierung der NCCs wichtigen Gene werden u.a. durch Retinsäure beeinflusst. Mitbeteiligt an der Induktion der Differenzierung sind unterschiedliche Wachstumsfaktoren und andere Signalproteine – genaueres kann in verschiedenen Reviews (6;50) nachgelesen werden.

1.3.4. Die Funktionen der kranialen NCCs

Die kranialen Neuralleistenzellen üben an ihrem Zielgewebe verschiedene Funktionen aus.

Zellen des Vorder- und Mittelhirns wandern aus dem Rhombomer zwei in den ersten Kiemenbogen und zum frontonasalen Fortsatz. Dort gehen aus ihnen die Kieferknochen, Hammer und Amboss des Mittelohres, bzw. die Gesichtsknochen und der harte Gaumen hervor.

Zellen aus dem Rhombomer vier (im vorderen Teil des Hinterhirns) ziehen zum zweiten Kiemenbogen, der zum Ursprung von Steigbügel und einem Großteil des Gesichtsknorpels wird.

Die Zellen der Rhombomere sechs und der folgenden des kaudalen Hinterhirns (bis zu den ersten Somiten) versorgen die weiter kaudal gelegenen Kiemenbögen und sind wichtig für die Entstehung der Knochen und Muskeln in der Nackenregion, des Thymus, der Schilddrüse und der Nebenschilddrüse.

Diese beschriebenen Funktionen betreffen die Gruppe der kranialen NCCs, die nach ventral wandern. Auf die dorsal gelegenen NCCs wird im nächsten Kapitel eingegangen.

1.3.5. NCCs, Gehirnnerven und ektodermale Plakoden

In diesem Kapitel werden die Zusammenhänge zwischen den Neuralleistenzellen und dem Nervengewebe dargestellt und ein allgemeiner Überblick über die Entwicklung dieser Strukturen gegeben.

Die kranialen NCCs, die weiter dorsal liegen, sind beteiligt an den sensiblen und autonomen Anteilen der Nerven. Autonome Nerven entstehen alleine aus NCCs, sensible Nerven aus NCCs und Plakodenzellen. Plakoden sind Epidermisverdickungen, die Zellen aus ihrem Epithelverband in die Tiefe aussondern und so u.a. an der Bildung von nervösen Strukturen beteiligt sind.

Die motorischen Anteile des Nervus trigeminus stammen aus den Rhombomeren zwei und drei, die des Nervus acustofacialis aus den Rhombomeren vier und fünf und die des Nervus glossopharyngeus aus den Rhombomeren sechs und sieben.

Schon früh lässt sich eine Aufteilung in die Nerven V, VII, und dem Plexus aus IX und X erkennen.

Die NCCs werden bipolar: der zentrale Fortsatz nimmt Kontakt zum zentralen Nervensystem auf, der periphere wächst in die Körperperipherie aus. Diese Zellen werden dann pseudounipolar.

Es ist noch nicht vollständig geklärt, wodurch die Zellmigration der Neuralleistenzellen an den entsprechenden Stellen der zukünftigen Ganglien gestoppt wird. Dabei spielen neben der genetischen Regulation, physikalische Barrieren eine große Rolle: Daran beteiligt sind u.a. die Somiten, Blutgefäße, Basalmembranen und Anhäufungen von großen Mengen an Kollagen II. Wichtig sind auch epithelial-mesenchymale Interaktionen, welche maßgeblich an der späteren Differenzierung der NCCs beteiligt sind (25).

In ihrer weiteren Entwicklung zeigen die Gehirnnerven viele morphologische Modifikationen, die von Van Maele-Fabry et al. (79) bei Mäusen mit 25 bis 36 Somitenpaaren festgehalten wurden. Die Entwicklung scheint starken individuellen Schwankungen unterlegen zu sein.

Bei Embryonen mit 25 bis 26 Somiten sind die Primordien der Nerven V, VII und X deutlich, die des Nerven IX nur schwach angelegt. Der Nervus facialis innerviert bereits den zweiten Kiemenbogen.

Ab 27 Somiten steigt die Anzahl der Neurofilament-positiven Fasern deutlich an. Der Nervus ophthalmicus des Nervus trigeminus ist sichtbar. Der Nervus glossopharyngeus hat eine dorsale Wurzel und die Wurzeln des Nervus vagus laufen in einem Ganglion zusammen.

Ab 29 Somiten sind auch die Nervi mandibularis und maxillaris sichtbar. Vom Nervus facialis zweigen zusätzliche Fasern in Richtung des ersten Kiemenbogens ab

(eventuell späterer Nervus petrosus major und stapedius) und der Nervus vagus bildet ein ventrales Bündel.

Ab 31 Somiten sind alle Fasern deutlicher markiert und besser sichtbar. Beim Nervus trigeminus sind alle Abzweige deutlich zu sehen, die Fasern des Nervus glossopharyngeus erreichen den dritten Kiemenbogen und es bilden sich Fasern in den zweiten Kiemenbogen. Außerdem besteht eine Verbindung zwischen den Ganglien des Nervus vagus und des Nervus glossopharyngeus.

Diese beschriebenen deutlichen Modifikationen eignen sich gut, um den Entwicklungsstand der Nerven durch einen Nerven-Score zu charakterisieren. Daraus folgend ist es möglich, den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Entwicklung der Gehirnnerven zu untersuchen und quantitativ auszudrücken. Dies hat besondere Relevanz bei Chemikalien, wie z.B. Ethanol, für die bekannt ist, dass sie kraniofaziale Abnormitäten auslösen oder eine neurotoxische Wirkung haben.

1.3.6. Beispiele für das 'Whole-immuno-staining' (WIS) der 2H3-Neurofilamente

Das 'Whole-immuno-staining' (WIS) kann verwendet werden, um mit speziellen Antikörpern bestimmte Strukturen an ganzen Embryonen zu markieren und darzustellen. Im Folgenden werden Beispiele für die Anfärbung von Neurofilamenten mit Hilfe des 2H3-Neurofilament-Antikörpers aufgeführt.

Bei mit Valproinsäure (VPA) (750 μ M) behandelten Mäuseembryonen beobachteten Gofflot et al. (22) vor allem Effekte an den proximalen Anteilen der Gehirnnerven: Es wurden dabei ein reduzierter dorsaler Teil des Nervus trigeminus, die fehlende dorsale Wurzel des Nervus glossopharyngeus, desorganisierte dorsale Wurzeln des Nervus vagus und diffuse ventrale Fasern des Nervus facialis beschrieben. Als mögliche Ursache wurden Veränderungen in der extrazellulären Matrix genannt. Menegola et al. (47) hingegen fanden bei Rattenembryonen keine Hinweise auf Veränderungen der Gehirnnerven durch VPA. Es wurden lediglich Spinalnervendefekte beobachten.

Menegola et al. (46) testeten außerdem zwei fungizide Triazole auf Neurotoxizität bei Rattenembryonen. Sie dokumentierten vor allem Effekte an den kranial gelegenen Nerven: Fusionen und Verlagerungen des VII. Gehirnnerven und das Fehlen des Nervus mandibularis.

Lee et al. (40) exponierten ab dem Gestationstag 9,5 Rattenembryonen in der WEC gegenüber Retinsäure. Sie beobachteten fusionierte Trigeminal- und Akustikofazial-Ganglien. Sie brachten diese mit der morphologisch sichtbaren Kompression der präotischen Hinterhirnregion in Verbindung.

Bei 12,5 Tage alte Rattenembryonen von Muttertieren, die mit Vitamin-A defizienten Rationen gefüttert wurden, kam es zu einem vollständigen Verlust der Nerven IX, X, XI und XII (84). Retinsäure schien in erster Linie essentiell für die postotischen Nerven. Auch K. Niederrheiter et al. (56) beschrieben die Reduktion des kaudalen Hinterhirns bei einem Vitamin-A-Mangel durch die Unterbrechung des Gens der Retinaldehyd Dehydrogenase.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das WIS der 2H3-Neurofilamente durch verschiedene Agentien hervorgerufene Veränderungen spezifisch darstellen kann. Außerdem wurde gezeigt, dass diese Effekte bei Ratten und Mäusen nicht immer übereinstimmen, was bedeutet, dass diese Spezies unterschiedlich sensibel in ihrer Nervenentwicklung zu sein scheinen.