

3. Ergebnisse

3.1. WEC

Für die WEC wurden Rattenembryonen am Gestationstag 9,5 gewonnen und in die Kultur überführt. Sie wurden für 48 Stunden bis zum Gestationstag 11,5 inkubiert. Die Entwicklung der Embryonen aus den Testansätzen mit ansteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen wurde verglichen mit der Entwicklung der Embryonen aus der Lösungsmittelkontrolle.

Der Einfluss der Testsubstanzen auf die Entwicklung wird im Folgenden für jede Substanz einzeln beschrieben. Dabei wird zuerst auf die Veränderungen der Dottersackdurchblutung, der Somitenanzahl und des morphologischen Score-Wertes eingegangen. Dann werden die Abnormitäten und anschließend die Effekte der Substanzen auf die Wachstumsparameter Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt erläutert.

Zu jeder Substanz werden die Daten in zwei verschiedenen Tabellen präsentiert: In der ersten Tabelle werden die prozentualen Anteile der abnormen Embryonen aufgeführt.

Angegeben werden dabei:

- Die Variation 'Umfangsvermehrung kraniodorsal des ersten Kiemenbogens'
- Die klassische Abnormitätenrate, in die die routinemäßig erfassten Abnormitäten im Rahmen der Auswertung des morphologischen Score-Wertes einfließen
- Die nicht routinemäßig erfasste Abnormität 'Adhäsion des zweiten Kiemenbogens mit seiner Umgebung und mit dem ersten Kiemenbogen'
- Die gesamte Abnormitätenrate, die sich zusammensetzt aus der klassischen Abnormitätenrate und der Abnormität der Adhäsion des zweiten Kiemenbogens

Eine Abnormität ist entweder eine disproportionale Entwicklung einer Organanlage im Vergleich zur Kontrolle oder zu anderen Organanlagen des Embryos oder eine unphysiologische Entwicklung. Eine Retardierung hingegen bedeutet eine im Vergleich zum Entwicklungsstadium verzögerte Entwicklung des Embryos.

In der zweiten Tabelle werden die Effekte der Substanzen auf die Wachstums- und Differenzierungsparameter dargestellt.

Die Fotos der Embryonen exponiert gegenüber ansteigenden Konzentrationen der vier Testsubstanzen sind am Ende jedes einzelnen Kapitels zu finden. Der Einfluss der Substanzen auf die einzelnen Parameter ist durch Liniendiagramme im Kapitel 3.1.5. dargestellt.

Es wurden Konzentrationsfindungsversuche durchgeführt, um die zu testende Konzentrationsspanne auszuwählen. Diese begann in den Konzentrationseffektversuchen bei Konzentrationen ohne Effekt auf die Entwicklung der Embryonen und reichte bis zur niedrigsten getesteten Konzentration, bei der 100% der Embryonen abnorm waren (IC_{Max}).

3.1.1. Der Einfluss von NMP auf die Entwicklung von Embryonen in der WEC

Rattenembryonen wurden in Testansätzen mit ansteigenden Konzentrationen von NMP inkubiert. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 1000 bis 6000 $\mu\text{mol/l}$ NMP getestet. Es zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Effekte mit einem steilen Verlauf der Konzentrationseffektkurve (siehe Kapitel 3.1.5.). Auch in den höchsten getesteten Konzentrationen konnte bei allen Embryonen die Vitalität durch den Nachweis des Herzschlages und fließenden Blutes im Dottersack bestätigt werden.

Die Dottersackdurchblutung wurde durch NMP ab 4000 $\mu\text{mol/l}$ so beeinträchtigt, dass es zu einem Verlust der organisierten Gefäßarchitektur kam: Es bildeten sich über den gesamten Dottersack hinweg Verzweigungen und Anastomosen, der Blutfluss verlief ungerichtet.

Die Embryonen der Lösungsmittelkontrolle hatten im Mittel 25,7 Somitenpaare. Bei einer Konzentration von 3000 $\mu\text{mol/l}$ NMP lag die Anzahl mit 24,7 Somiten auf einem statistisch signifikant niedrigen Niveau.

Die Embryonen der Lösungsmittelkontrolle hatten einen morphologischen Score-Wert von 37,0. Ab einer Konzentration von 4000 $\mu\text{mol/l}$ NMP zeigten die Embryonen Veränderungen, die zu einem signifikant niedrigen morphologischen Score-Wert von 33,1 führten.

Ab einer Konzentration von 3000 $\mu\text{mol/l}$ NMP wurden abnorme Embryonen beobachtet. Am häufigsten traten dabei Abnormitäten des Neuralrohres (kranialer Neuroporus offen), des Kopfes (Hämorrhagien am Kopf, disproportionalen Wachstum, hervorstehende Nasenplakoden, asymmetrische und deformierte Kopfform und Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens) auf. In Konzentrationen ab 4000 $\mu\text{mol/l}$ NMP erschienen die Augenvesikel wellig und dorsoventral abgeflacht. Das Neuralrohr - vor allem im kaudalen Rumpfabschnitt - war bei allen Embryonen, die gegenüber 6000 $\mu\text{mol/l}$ NMP exponiert wurden, unregelmäßig. Seltener wurden bei Embryonen exponiert gegenüber 6000 $\mu\text{mol/l}$ NMP Abnormitäten in der Haltung beobachtet: Es kam zum Beispiel vor, dass der kaudale Rumpfabschnitt auf der linken Körperseite lag. Die Abnormitätenrate erreichte bei 6000 $\mu\text{mol/l}$ NMP 100%, was somit der IC_{Max} entsprach.

Ab 3000 $\mu\text{mol/l}$ NMP kam es zu Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens mit seiner Umgebung, vor allem mit dem Perikard und dem ersten Kiemenbogen. In der Routineauswertung des morphologischen Score-Wertes sind Veränderungen der Kiemenbögen nicht berücksichtigt. In der hier vorgestellten Arbeit wurden Abnormitäten der Kiemenbögen einzeln aufgeführt (unter der Bezeichnung Adh. = Adhäsion). Die gesamte Abnormitätenrate (Abn.) errechnet sich aus den Veränderungen der Kiemenbögen und der klassischen Abnormitätenrate (Klass. Abn.). Dargestellt wurden die Abnormitäten induziert durch NMP in der Tabelle 9.

Tab. 9: Abnormitätenrate bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in Testansätzen ansteigender Konzentrationen NMP

NMP [μmol/l]	Stichpro- bengröße	Umfangs- vermehr. N (%)	Klass. Abn. N (%)	Adh. N (%)	Abn. N (%)
Ko	21 (100%)	0 (0)	1 (5)	0 (0)	1 (5)
1 000	18 (100%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2 500	11 (100%)	2 (18)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3 000	23 (100%)	18 (78) **	3 (13)	2 (9)	5 (22)
4 000	23 (100%)	19 (83) **	12 (52) **	15 (65) **	19 (83) **
6 000	22 (100%)	22 (100) **	22 (100) **	22 (100) **	22 (100) **

Legende: Darstellung der absoluten und in Klammern prozentualen Anteile der Veränderungen: N = betroffene Embryonen, Umfangsvermehr. = Umfangsvermehrung kraniodorsal des ersten Kiemenbogens, Klass. Abn. = Abnormitätenrate ohne Hinzunahme der Adhäsionen, Adh. = Adhäsionen der Kiemenbögen miteinander und mit der Umgebung, Abn. = Abnormitätenrate mit Adhäsionen, Ko = Lösungsmittelkontrolle. * p < 0,05, ** p < 0,01, Fishers exakter Test.

Die Wachstumsparameter Proteingehalt und Scheitel-Steiß-Länge nahmen konzentrationsabhängig ab. Ihre Werte erreichten ab einer Konzentration von 3000 μmol/l NMP ein statistisch signifikant niedriges Niveau. Die Embryonen der Lösungsmittelkontrolle hatten einen durchschnittlichen Proteingehalt von 146,3 μg/Embryo und eine Scheitel-Steiß-Länge von 3,21 mm. Bei einer Konzentration von 6000 μmol/l NMP lag der Proteingehalt bei 98,8 μg/Embryo und die Scheitel-Steiß-Länge bei 2,65 mm.

2500 μmol/l NMP war die höchste getestete Konzentration, die bei den Embryonen keine signifikanten negativen Effekte auf die Parameter hatte und die somit der IC_{NOAEL} entsprach.

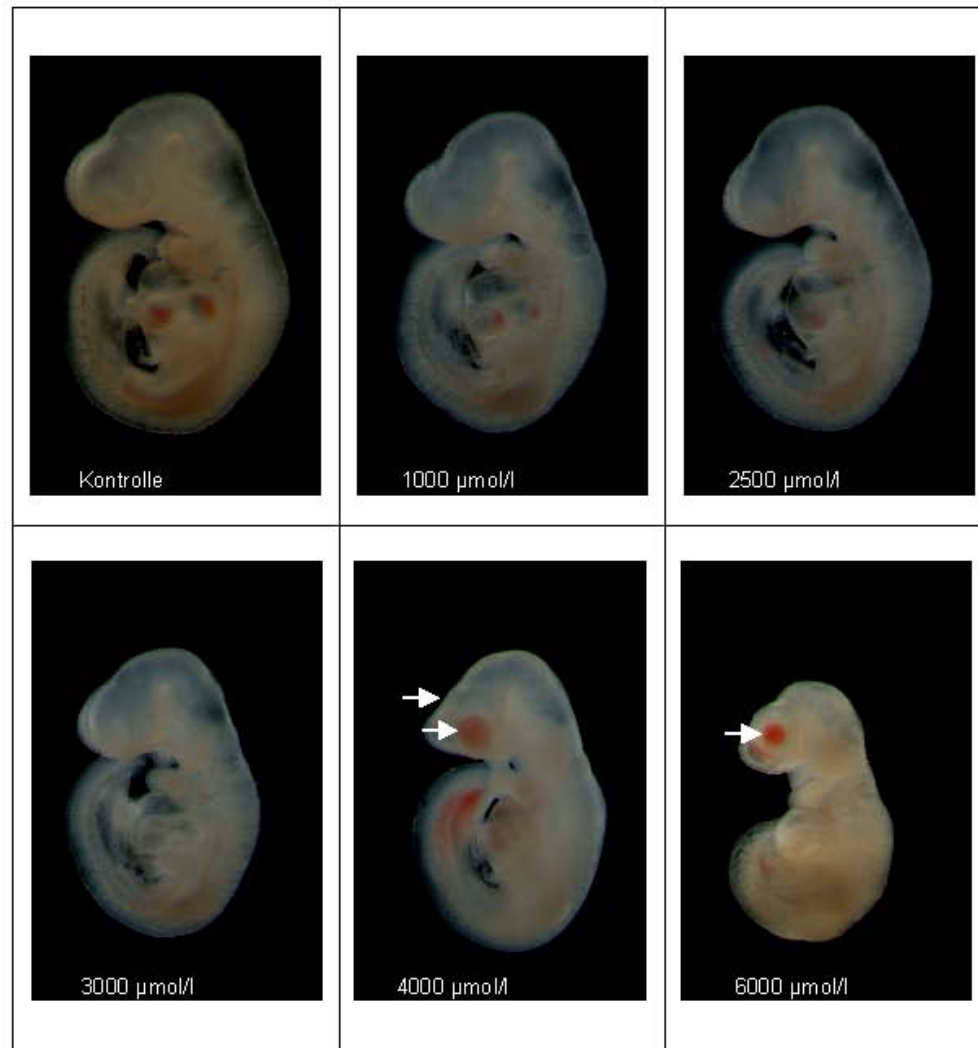
Die Veränderungen der Differenzierungs- und Wachstumsparameter im Verlauf ansteigender Konzentrationen von NMP sind in der Tabelle 10 dargestellt. Fotos der Embryonen sind auf den Seiten 36 bis 38 abgebildet.

Tab. 10: Veränderungen der Wachstums- und Differenzierungsparameter bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in verschiedenen Konzentrationen von NMP

NMP [µmol/l]	N	Scheitel-Steiß- Länge [mm]		Proteingehalt/ Embryo [µg]		Dottersack- durchblutung [Score]		Morphologischer Score		Somiten [Anzahl]	
		MW	± Stdabw.	MW	± Stdabw.	MW	± Stdabw.	MW	± Stdabw.	MW	± Stdabw.
Ko	21	3,21	± 0,16	146,3	± 19,2 n=20	3,0	± 0,0	37,0	± 1,2	25,7	± 1,3
1 000	18	3,15	± 0,16	134,7	± 20,1	2,9	± 0,2	36,9	± 1,7	25,0	± 1,2
2 500	11	3,20	± 0,16	146,0	± 17,5	2,9	± 0,3	36,9	± 1,0	25,5	± 0,7
3 000	23	3,05	± 0,19 **	130,2	± 19,5 * n=22	3,0	± 0,0	36,0	± 1,6	24,7	± 0,9 **
4 000	23	2,91	± 0,20 **	123,9	± 22,9 **	2,7	± 0,4 *	33,1	± 3,3 **	24,3	± 1,6 **
6 000	22	2,65	± 0,15 **	98,8	± 18,1 ** n=21	1,6	± 0,7 **	25,5	± 3,2 **	22,0	± 1,9 **

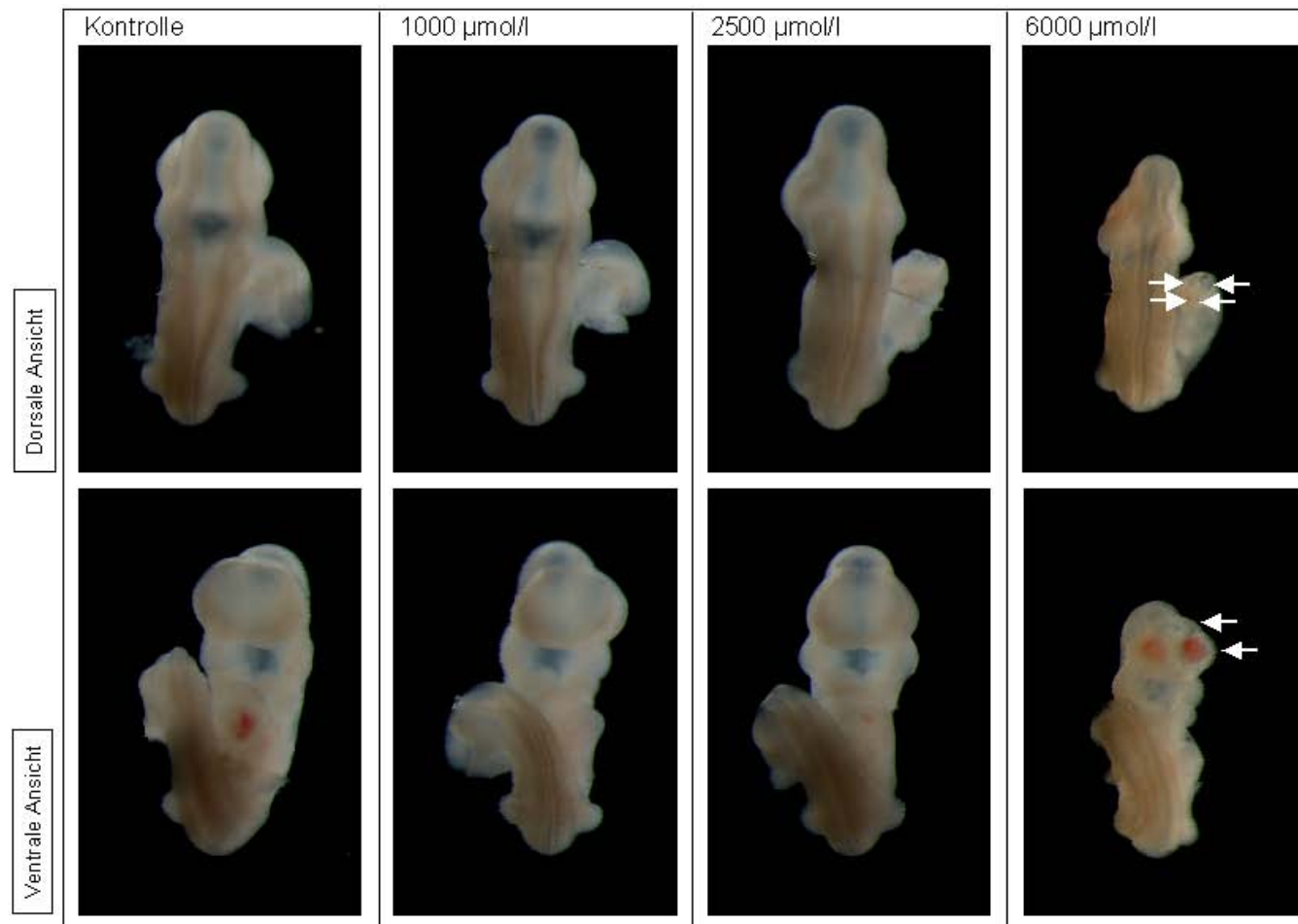
Legende: Darstellung des Einflusses von NMP auf die Wachstums- und Differenzierungsparameter. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe und der verschiedenen Testkonzentrationen sind als Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stdabw.) dargestellt, * p < 0,05, ** p < 0,01, N = Stichprobengröße, n = abweichende Stichprobengröße bei fehlenden Messwerten, Ko = Lösungsmittelkontrolle.

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen NMP



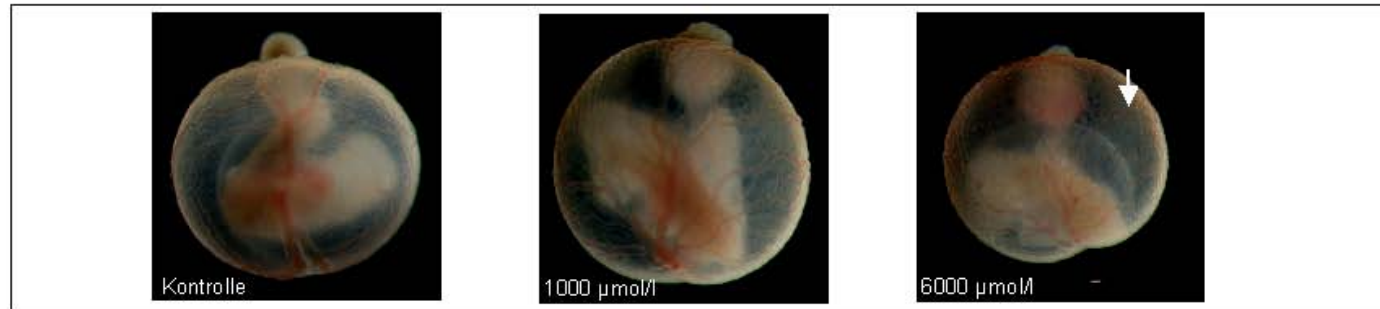
Legende: Abbildungen der linken Körperseite von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeile: 4000 µmol/l: Hämorrhagien, deformierter vorderer Kopfbereich. 6000 µmol/l: Hämorrhagien
Maßstab: 1 mm

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen NMP

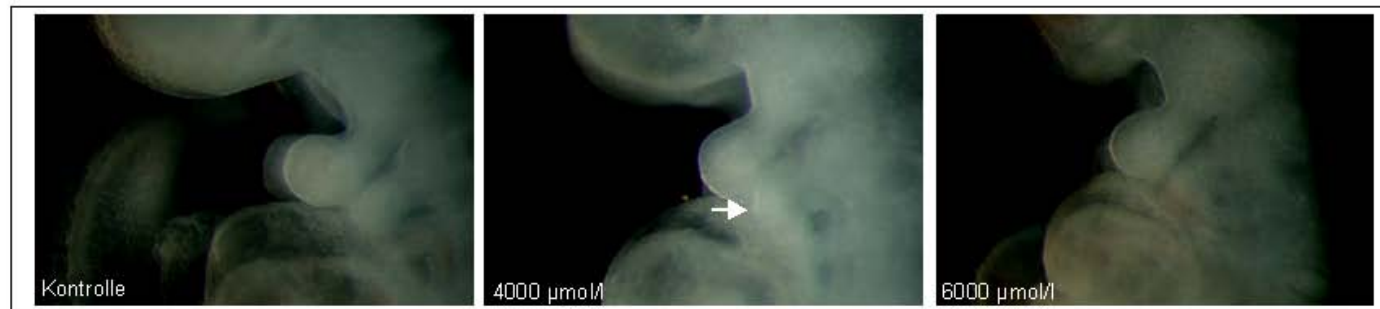


Legende: Abbildungen von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeile: dorsal: Ränder der Neuralleiste klaffen auseinander, offener kaudaler Neuroporus. ventral: offener kranialer Neuroporus, Hämorrhagie. Maßstab: 1 mm

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen NMP



Legende: Abbildungen der Dottersäcke nach 48 Stunden Kultur. Pfeil: unorganisiertes Blutgefäßsystem.
Maßstab: 1 mm



Legende: Abbildungen der Kiemenbögen von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeil: Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens.
Maßstab: 1 mm

Van Maele-Fabry et al. verwendeten für das 'Whole-immuno-staining' (WIS) der Nervenfasern Mäuseembryonen mit Somitenanzahlen zwischen 25 und 34 Somitenpaaren (79). Nach 48 Stunden Inkubation von Rattenembryonen in der WEC haben diese nur etwa 25 Somitenpaare. Um für das WIS vergleichbare Voraussetzungen für die Ratte zu erlangen, wurde versucht, die WEC mit Rattenembryonen auf 62 oder 72 Stunden zu verlängern. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 und auf Fotos der Seite 41 dargestellt.

Die Differenzierungsparameter Somitenanzahl und morphologischer Score nahmen - im Vergleich zu den Embryonen nach 48 Stunden Kultur - nach 62 Stunden um 18,7% bzw. um 15,7% und nach 72 Stunden Inkubation um 27,6 bzw. um 21,6% zu. Die Wachstumsparameter Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt hingegen hatten nach 62 Stunden um 41,7 bzw. 145,4% und nach 72 Stunden Inkubation um 72,9 bzw. 254,1% höhere Werte im Vergleich zu den Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Der Wert für die Dottersackdurchblutung nahm bei längeren Inkubationszeiten bis zu 60% ab. Die Fotos der Embryonen (Seite 41) zeigen außerdem eine zunehmend blasig hervorgewölbte Nackenregion und einen im Verhältnis zum Kopf unproportional zu kleinen Rumpf.

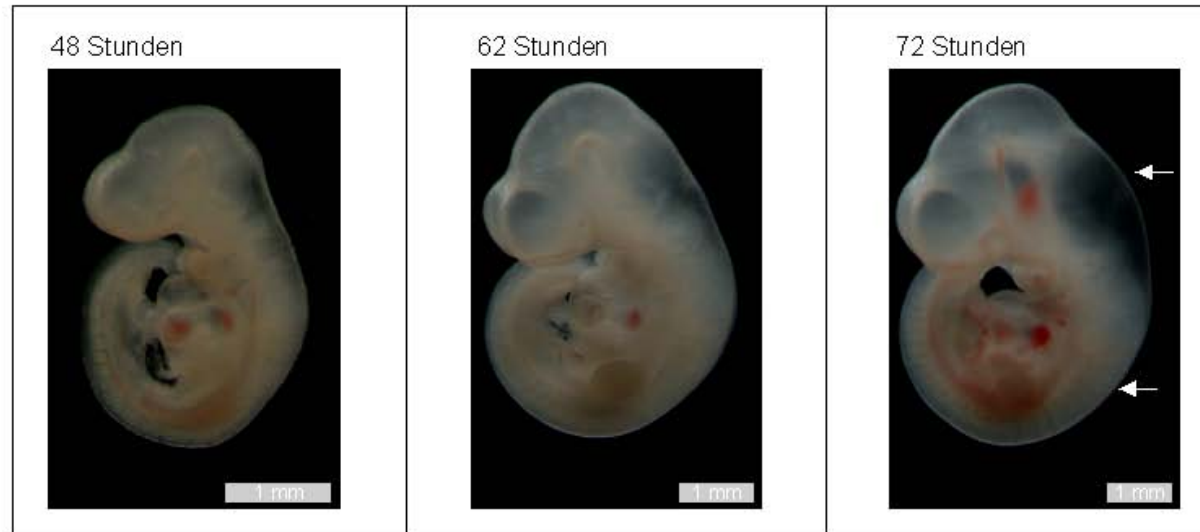
Bei Embryonen, die für 62 Stunden gegenüber NMP exponiert wurden, fiel auf, dass diese schon bei 2500 $\mu\text{mol/l}$ NMP hervorstehende Nasenplakoden und deutliche Retardierungen zeigten. Die Scheitel-Steiß-Länge war ab 2500 $\mu\text{mol/l}$ NMP verkürzt.

Tab. 11: Embryonen nach 48, 62 und 72 Stunden Kultivierung in der WEC

Dauer	N	Scheitel-Steiß- Länge [mm] MW ± Stdabw	Proteingehalt/ Embryo [µg] MW ± Stdabw	Dottersack- durchblutung [Score] MW ± Stdabw	Morphologischer Score MW ± Stdabw	Somiten [Anzahl] MW ± Stdabw
48 h	21	3,21 ± 0,16	146,3 ± 19,2	3,0 ± 0,0	37,0 ± 1,2	25,7 ± 1,3
62 h	11	4,55 ± 0,23 **	359,0 ± 47,8 **	2,4 ± 0,7 *	42,8 ± 0,9 **	30,5 ± 0,5 **
72 h	26	5,54 ± 0,46 **	518,1 ± 83,0 **	1,2 ± 0,4 **	45,0 ± 1,1 **	32,7 ± 1,3 **

Legende: Darstellung des Einflusses der Inkubationsdauer auf die Wachstums- und Differenzierungsparameter. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stdabw.) dargestellt, h = Stunden, N = Stichprobengröße. Die statistische Analyse erfolgte im Vergleich zu 48 Stunden Kultivierung. * p < 0,05, ** p < 0,01, t-Test.

Darstellung von Embryonen der WEC nach 48, 62 und 72 Stunden



Legende: Dargestellt werden Embryonen nach 48, 62 und 72 Stunden in der WEC. Pfeile: blasig hervorgewölbte Nackenregion, disproportional zu kleiner kaudaler Rumpfabschnitt.

3.1.2. Der Einfluss von 5H-NMP auf die Entwicklung von Embryonen in der WEC

9,5 Tage alte Rattenembryonen wurden in Testansätzen mit ansteigenden Konzentrationen von 5H-NMP für 48 Stunden inkubiert. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 1000 bis 12000 $\mu\text{mol/l}$ 5H-NMP getestet. Hierbei zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Effekte. Auch in den höchsten getesteten Konzentrationen konnte bei allen Embryonen die Vitalität durch den Nachweis des Herzschlages und fließenden Blutes im Dottersack bestätigt werden.

Veränderungen der Dottersackdurchblutung wurden über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich nicht beobachtet.

In Tabelle 13 sind die Veränderungen der Wachstums- und Differenzierungsparameter der Embryonen bei Exposition gegenüber ansteigenden Konzentrationen von 5H-NMP dargestellt.

Liniendiagramme, die die Effekte von 5H-NMP auf die einzelnen Parameter zeigen, werden in Kapitel 3.1.5. gezeigt.

Die Embryonen der Lösungsmittelkontrolle hatten eine durchschnittliche Somitenanzahl von 25,3 und einen durchschnittlichen morphologischen Score-Wert von 37,0. Bei 10000 $\mu\text{mol/l}$ 5H-NMP traten signifikante Veränderungen der Differenzierungsparameter auf. Die Somitenanzahl lag bei 23,9, der morphologische Score bei 34,5.

Bei einer Konzentration von 12000 $\mu\text{mol/l}$ 5H-NMP lag die Abnormitätenrate bei 100%, entsprach somit der IC_{Max} . Klassische Abnormitäten waren selten – sie traten ab 8000 $\mu\text{mol/l}$ 5H-NMP auf und lagen bei 12000 $\mu\text{mol/l}$ 5H-NMP lediglich bei 20%.

Hingegen zeigten alle Embryonen inkubiert in einer Konzentration von 12000 $\mu\text{mol/l}$ Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens.

Häufig war der kaudale Neuroporus nicht geschlossen und abnormal divergierend. Vereinzelt traten Hämorrhagien im Rumpfbereich, Abnormitäten des Kopfes (offener kranialer Neuroporus), der kaudalen Gliedmaße (bullöse Dilatation) und der Rotation des Körpers (Überdrehung) auf.

Die Abnormitätenrate ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tab. 12: Abnormitätenrate bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in Testansätzen verschiedener Konzentrationen 5H-NMP

5H-NMP [µmol/l]	Stichpro- bengröße	Umfangs- vermehr. N (%)	Klass. Abn. N (%)	Adh. N (%)	Abn. N (%)
Ko	14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1 000	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4 000	13	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6 000	15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
8 000	16	4 (25)	1 (6)	0 (0)	1 (6)
10 000	15	7 (47) **	2 (13)	1 (7)	3 (20)
12 000	15	15 (100) **	3 (20)	15 (100) **	15 (100) **

Legende: Darstellung der absoluten und in Klammern der prozentualen Anteile der Veränderungen: N = betroffene Embryonen, Umfangsvermehr. = Umfangsvermehrung kraniodorsal des ersten Kiemenbogens, Klass. Abn. = Abnormitätenrate ohne Hinzunahme der Adhäsionen, Adh. = Adhäsionen der Kiemenbögen miteinander und mit der Umgebung, Abn. = Abnormitätenrate mit Adhäsionen, Ko = Lösungsmittelkontrolle, * p < 0,05, ** p < 0,01, Fishers exakter Test.

Bei den Wachstumsparametern Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt wurden kaum Effekte durch ansteigende Konzentrationen von 5H-NMP beobachtet. Lediglich die Scheitel-Steiß-Länge war bei Embryonen inkubiert in einer Konzentration von 12000 µmol/l 5H-NMP signifikant niedriger.

Die IC_{NOAEL} lag bei 8000 µmol/l 5H-NMP.

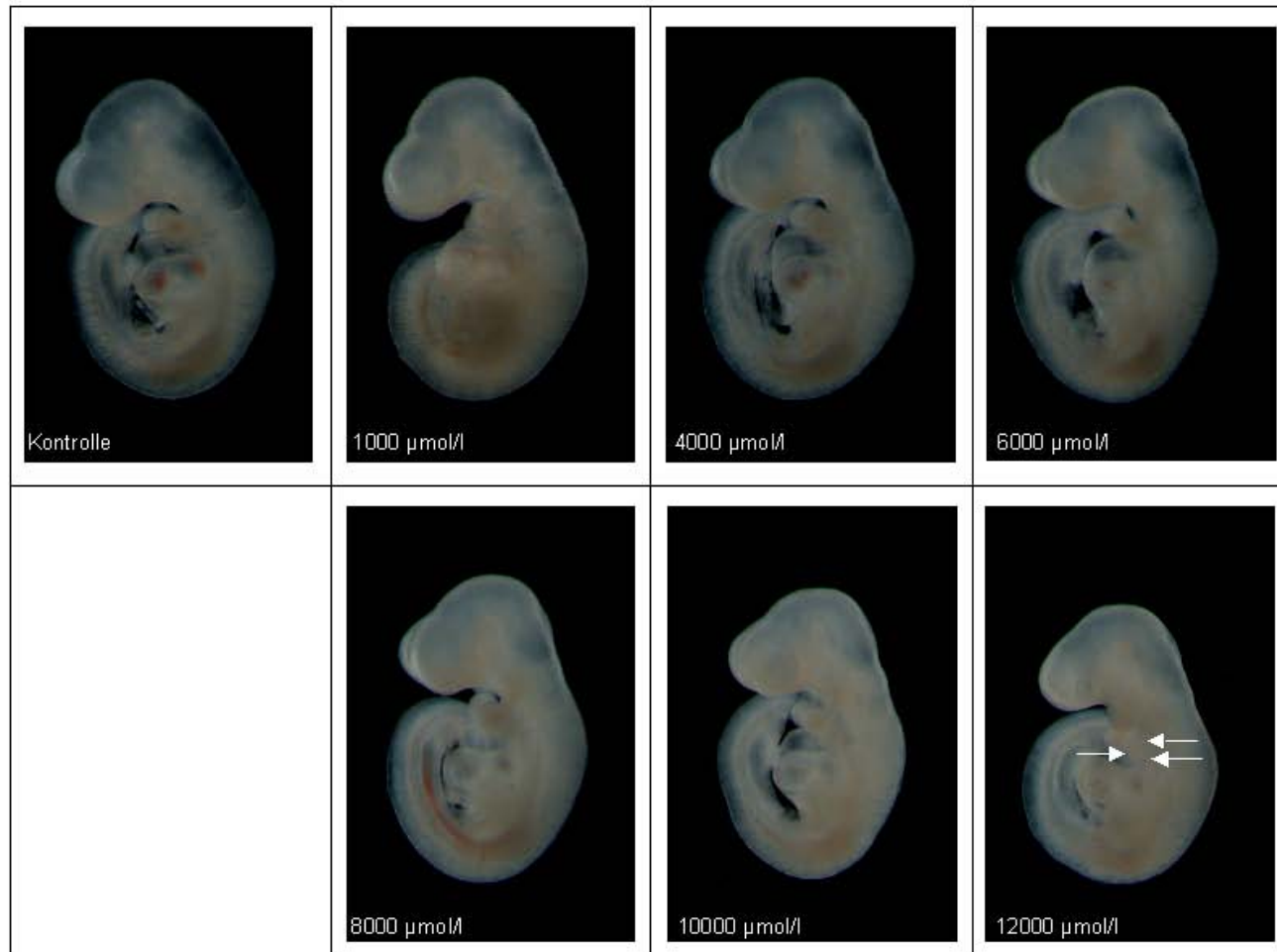
Fotos der gegenüber 5H-NMP exponierten Embryonen sind auf den Seiten 45 bis 47 dargestellt.

Tab. 13: Veränderungen der Wachstums- und Differenzierungsparameter bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in verschiedenen Konzentrationen von 5H-NMP

5H-NMP [μmol/l]	N	Scheitel-Steiß- Länge [mm]	Proteingehalt/ Embryo [μg]	Dottersack- Durchblutung [Score]	Morphologischer Score	Somiten [Anzahl]
		MW ± Stdabw.	MW ± Stdabw.	MW ± Stdabw.	MW ± Stdabw.	MW ± Stdabw.
Ko	14	3,09 ± 0,13	134,7 ± 20,7	3,0 ± 0,0 n=13	37,0 ± 1,0	25,3 ± 1,0
1 000	8	3,23 ± 0,11	155,5 ± 19,4	3,0 ± 0,0	38,5 ± 0,9	24,6 ± 0,7
4 000	13	3,17 ± 0,16	145,7 ± 21,0	3,0 ± 0,0	37,2 ± 1,4	25,4 ± 1,3
6 000	15	3,17 ± 0,13	145,5 ± 21,6	3,0 ± 0,0	36,9 ± 0,5	25,9 ± 0,7
8 000	16	3,14 ± 0,10	143,6 ± 18,6	2,8 ± 0,5	36,3 ± 2,3	24,9 ± 0,8
10 000	15	3,02 ± 0,19	131,8 ± 18,2	3,0 ± 0,0	34,5 ± 3,4 *	23,9 ± 1,2 **
12 000	15	2,97 ± 0,16 *	124,0 ± 16,8	2,7 ± 0,6	34,1 ± 2,5 **	24,5 ± 1,1 *

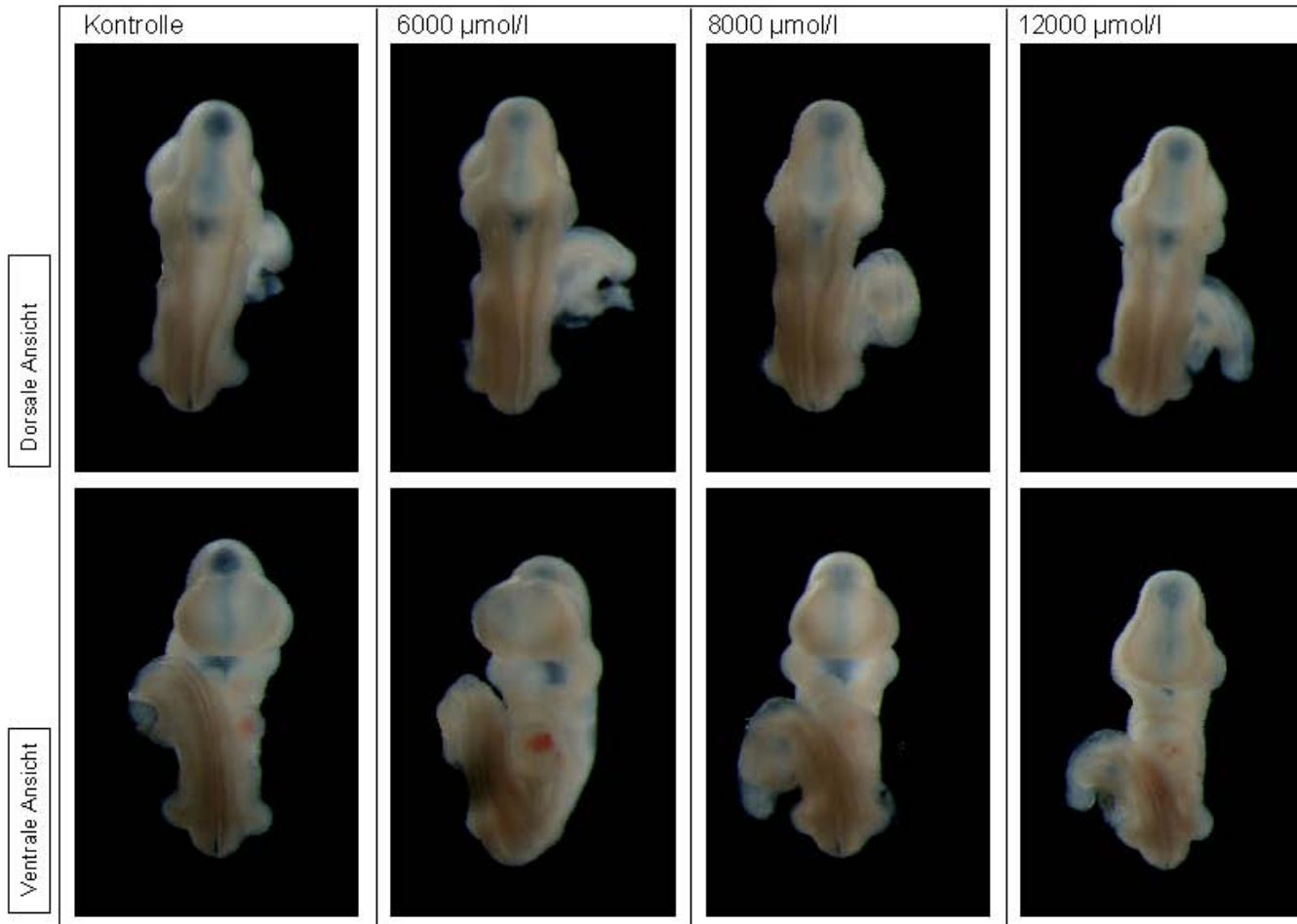
Legende: Darstellung des Einflusses von 5H-NMP auf Wachstums- und Differenzierungsparameter. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe und der verschiedenen Testkonzentrationen sind als Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stdabw.) dargestellt, N= Stichprobengröße, n = abweichende Stichprobengröße bei der Dottersackdurchblutung. Dieser liegt begründet in einem bei Herausnahme des Embryos aus der Kulturflasche geplatzten Dottersack. * p < 0,05, ** p < 0,01, Ko = Lösungsmittelkontrolle.

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 5H-NMP



Legende: Abbildungen der linken Körperseite von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeile: Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens. Maßstab: 1 mm

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 5H-NMP

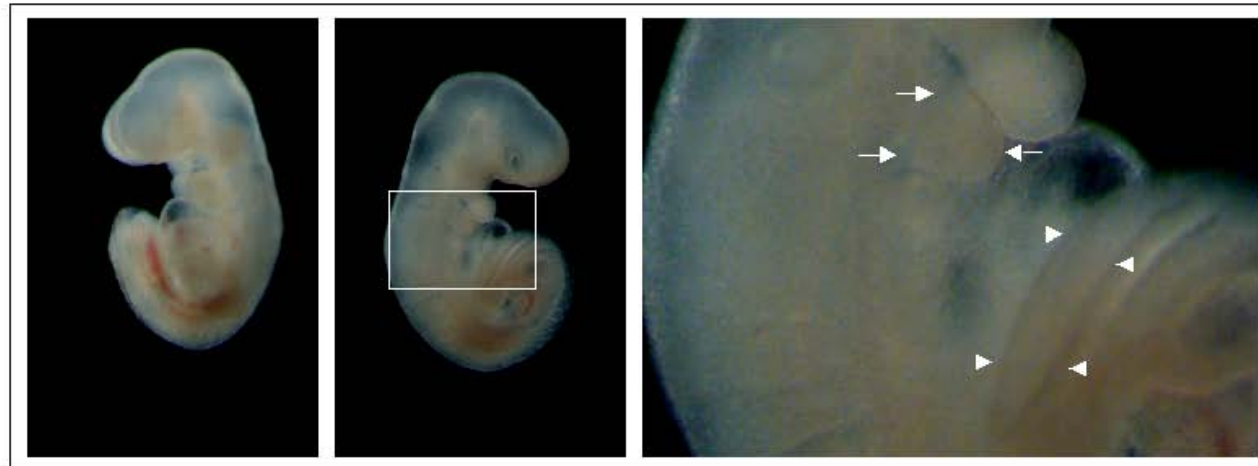


Legende: Abbildungen von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Maßstab: 1 mm

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 5H-NMP und ein Embryo nach Exposition gegenüber 12000 $\mu\text{mol/l}$ 5H-NMP



Legende: Abbildungen eines Ausschnittes der Kiemenbögen von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeile: Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens. Maßstab: 1 mm



Legende: Abbildungen eines Embryos nach 48 Stunden Kultur in 12000 μmol 5H-NMP. Darstellung der linken und rechten Körperseite und einer 4-fachen Vergrößerung des Ausschnitts im zweiten Bild. Pfeile: Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens. Pfeilspitzen: offener kaudaler Neuroporus. Maßstab: 1 mm

3.1.3. Der Einfluss von MSI auf die Entwicklung von Embryonen in der WEC

9,5 Tage alte Rattenembryonen wurden für 48 Stunden in Testansätzen mit ansteigenden Konzentrationen von MSI inkubiert. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 16000 bis 48000 $\mu\text{mol/l}$ MSI getestet. Es zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Effekte. Auch in den höchsten getesteten Konzentrationen konnte bei allen Embryonen die Vitalität durch den Nachweis des Herzschlages und fließenden Blutes im Dottersack bestätigt werden.

In den Konzentrationsfindungsversuchen wurde ein Konzentrationsbereich von 25 $\mu\text{mol/l}$ bis 32000 $\mu\text{mol/l}$ MSI getestet. In diesem Bereich wurden bei den Embryonen keine signifikanten Veränderungen in ihrer Entwicklung beobachtet. Da in den Versuchen dieser Arbeit eine für die Einschätzung der Embryotoxizität repräsentative Konzentrationsspanne angestrebt wurde, die die Endpunkte IC_{NOAEL} und IC_{Max} umfassen sollte, wurden für die Konzentrationseffektversuche Testkonzentrationen von 24000 bis 48000 $\mu\text{mol/l}$ MSI gewählt.

In den Konzentrationseffektversuchen traten schon ab 24000 $\mu\text{mol/l}$ MSI 19% klassische Abnormitäten und eine signifikante Abnahme des morphologischen Score-Wertes auf.

Um dennoch die IC_{NOAEL} mit einbeziehen zu können, wurden die acht Embryonen, die in den Konzentrationsfindungsversuchen gegenüber einer Konzentration von 16000 $\mu\text{mol/l}$ MSI exponiert worden sind, in die Konzentrationseffektversuche übernommen.

In Tabelle 15 sind die Veränderungen der Wachstums- und Differenzierungsparameter im Verlauf ansteigender Konzentrationen MSI dargestellt.

Liniendiagramme, die die Wirkung von MSI auf die einzelnen Parameter zeigen, werden in Kapitel 3.1.5. gezeigt.

Der Dottersack zeigte ab 32000 $\mu\text{mol/l}$ MSI eine deutliche Verschlechterung der Gefäßorganisation.

Generelle Retardierungen der Embryonen traten schon ab 24000 $\mu\text{mol/l}$ MSI auf, woraus folgt, dass diese nicht durch eine Minderversorgung (verursacht durch strukturelle Veränderungen der Dottersackdurchblutung) entstanden.

Bei 40000 $\mu\text{mol/l}$ MSI lag die Somitenanzahl auf einem signifikant niedrigen Niveau. Bei 44000 und 48000 $\mu\text{mol/l}$ MSI waren die Somiten oft wegen blasigen Veränderungen und verschwommenen Strukturen nicht mehr zählbar.

Der morphologische Score-Wert der Embryonen, die in einer Konzentration von 24000 $\mu\text{mol/l}$ MSI kultiviert wurden, war im Vergleich zu den Embryonen der Lösungsmittelkontrolle signifikant erniedrigt.

Die Abnormitätenrate betrug bei 24000 $\mu\text{mol/l}$ MSI 31 %. Die IC_{Max} lag bei 44000 $\mu\text{mol/l}$ MSI. Die am häufigsten auftretende Abnormität war die Adhäsion der Kiemenbögen. Weniger oft wurden Hämorrhagien, vor allem am Kopf, eine disproportionale und abnorme Form des Kopfes, die bullöse Dilatation der kaudalen Gliedmaße, die wellige Zeichnung des Neuralrohres und die abnorme Rotation des Körpers beobachtet.

Die Rate der Embryonen mit Umfangsvermehrungen kraniodorsal des ersten Kiemenbogens lag bei Embryonen exponiert gegenüber 24000 $\mu\text{mol/l}$ MSI bei 63 % und stieg bis 40000 $\mu\text{mol/l}$ MSI auf 100%. Durch die zunehmenden Veränderungen der Embryonen vor allem im Kopfbereich wurde ein Abschätzen der Ausmaße der Umfangsvermehrung und der Adhäsion der Kiemenbögen immer schwieriger und konnten ab einer Konzentration von 44000 $\mu\text{mol/l}$ MSI nicht mehr vorgenommen werden.

Selten auftretende Abnormitäten wurden vor allem in Konzentrationen beobachtet, in denen bereits eine generelle Retardierung der Embryonen vorlag. Dies legt den Schluss nahe, dass sie eher sekundär als Folge einer allgemeinen Toxizität entstanden sind und weniger auf eine spezifische Embryotoxizität zurückzuführen sind. Die Abnormitätenraten werden in Tabelle 14 aufgeführt.

Tab. 14: Abnormitätenrate bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in Testansätzen verschiedener Konzentrationen MSI

MSI [µmol/l]	Stichpro- bengröße	Umfangs- vermehr. N (%)	Klass. Abn. N (%)	Adh. N (%)	Abn. N (%)
Ko	14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
16 000	8	n.d.	0 (0)	n.d.	n.d.
24 000	16	10 (63) **	3 (19)	2 (13)	5 (31) *
32 000	16	12 (75) **	1 (6)	8 (50) **	8 (50) **
40 000	15	15 (100) **	9 (60) **	10 (67) **	12 (80) **
44 000	13	n.d.	12 (92) **	n.d.	13 (100) **
48 000	13	n.d.	13 (100) **	n.d.	13 (100) **

Legende: Darstellung der absoluten und in Klammern der prozentualen Anteile der Veränderungen: N = betroffene Embryonen, Umfangsvermehr. = Umfangsvermehrung kraniodorsal des ersten Kiemenbogens, Klass. Abn. = Abnormitätenrate ohne Hinzunahme der Adhäsionen, Adh. = Adhäsionen der Kiemenbögen miteinander und mit der Umgebung, Abn. = Abnormitätenrate mit Adhäsionen, die grau unterlegte Zeile ist aus den Konzentrationsfindungsversuchen entnommen, n.d. = 'not determined' - keiner der Embryonen dieser Konzentration wurde ausgewertet (Bei Konzentrationsfindungsversuchen wird mit niedrigen Probenumfängen versucht, ein geeignetes Konzentrationsfenster zu finden. Einzelheiten stehen dabei noch nicht im Vordergrund. Da es sich vor allem bei der beschriebenen Umfangsvermehrung um einen subjektiven Parameter handelt, der erst bei größeren Probenumfängen und in einer Konzentrationsabhängigkeit auffallend wird, wurden dieser und die Adhäsion der Kiemenbögen in den Konzentrationsfindungsversuchen noch nicht berücksichtigt.), Ko = Lösungsmittelkontrolle. * p < 0,05, ** p < 0,01, Fishers exakter Test.

Die Wachstumsparameter Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt lagen ab Konzentrationen von 32000 µmol/l MSI im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle auf einem statistisch signifikant niedrigen Niveau. Die Embryonen der Lösungsmittelkontrolle hatten einen durchschnittlichen Proteingehalt von 134,3 µg/Embryo und eine Scheitel-Steiß-Länge von 3,12 mm. Bei einer Konzentration von 48000 µmol/l MSI lag der Proteingehalt bei 58,8 µg/Embryo und die Scheitel-Steiß-Länge bei 2,52 mm.

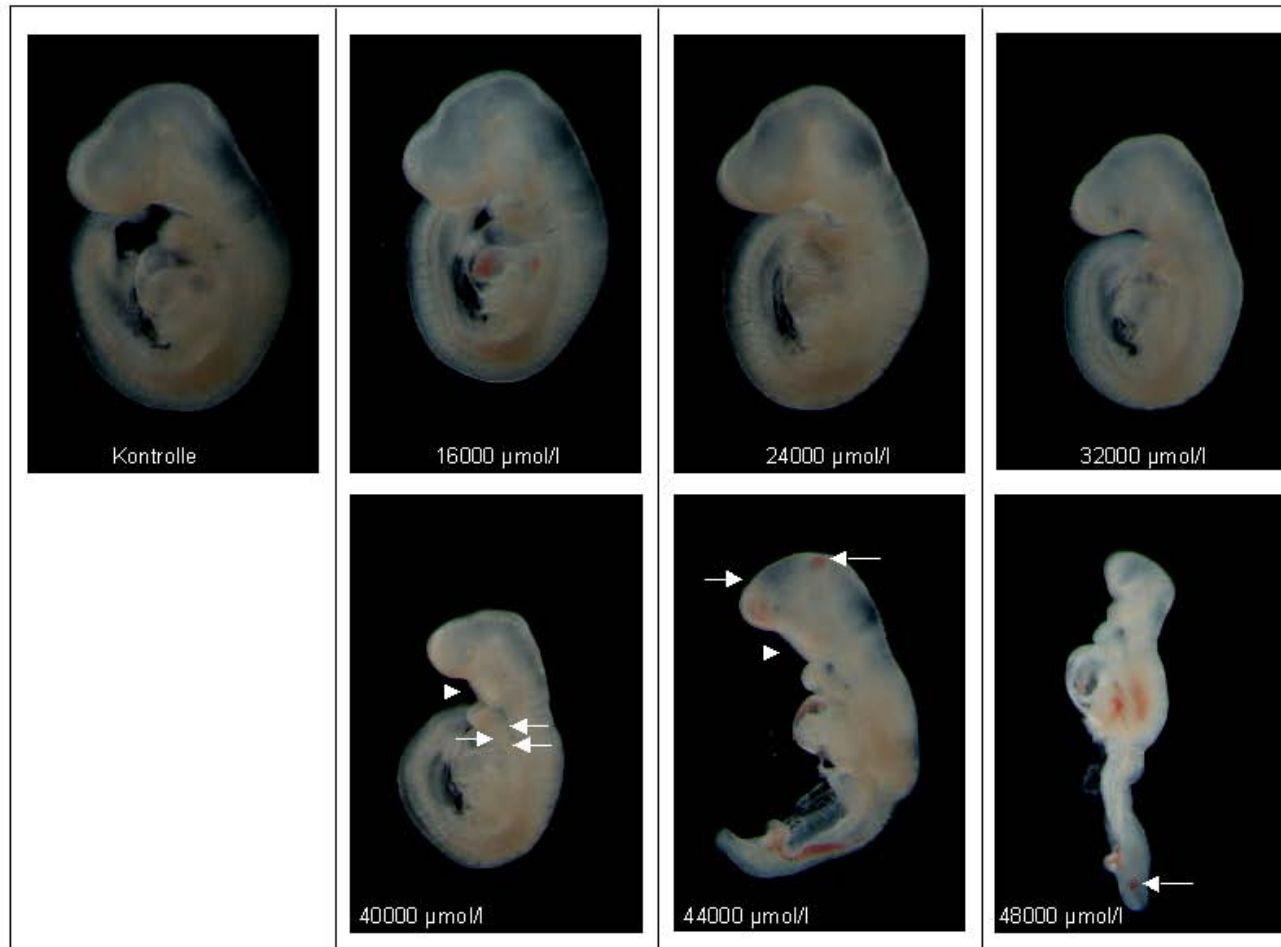
Fotos der Testansätze mit ansteigenden Konzentrationen von MSI inkubierten Embryonen sind auf den Seiten 51 bis 53 zu finden.

Tab. 15: Veränderungen der Wachstums- und Differenzierungsparameter bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in verschiedenen Konzentrationen von MSI

MSI [μmol/l]	N	Scheitel-Steiß- Länge [mm]		Proteingehalt/ Embryo [μg]		Dottersack- durchblutung [Score]		Morphologischer Score		Somiten [Anzahl]	
		MW ±	Stdabw.	MW ±	Stdabw.	MW ±	Stdabw.	MW ±	Stdabw.	MW ±	Stdabw.
Ko	14	3,12 ±	0,18	134,3 ±	22,4	2,9 ±	0,3	36,6 ±	1,3	25,4 ±	1,3
16 000	8	3,18 ±	0,12	138,8 ±	12,3	3,0 ±	0,0	37,4 ±	1,4	25,0 ±	0,9
24 000	16	3,05 ±	0,21	125,6 ±	20,4	2,8 ±	0,5	35,3 ±	2,2	24,5 ±	1,2
32 000	16	2,94 ±	0,15	110,8 ±	14,3	2,6 ±	0,6	33,8 ±	1,7	24,4 ±	1,9
		**		**		*		**			
40 000	15	2,75 ±	0,19	85,2 ±	21,1	1,6 ±	0,5	31,0 ±	2,5	21,5 ±	3,2
		**	n=12	**		**		**		**	
44 000	13	2,59 ±	0,10	75,8 ±	14,3	1,2 ±	0,4	28,4 ±	3,5	19,3 ±	3,0
		**	n=8	**		**		**		**	n=10
48 000	13	2,52 ±	0,08	58,8 ±	11,1	1,3 ±	0,5	23,8 ±	4,3	23,0 ±	0,0
		**	n=2	**		**	n=10	**	n=10	**	n=2

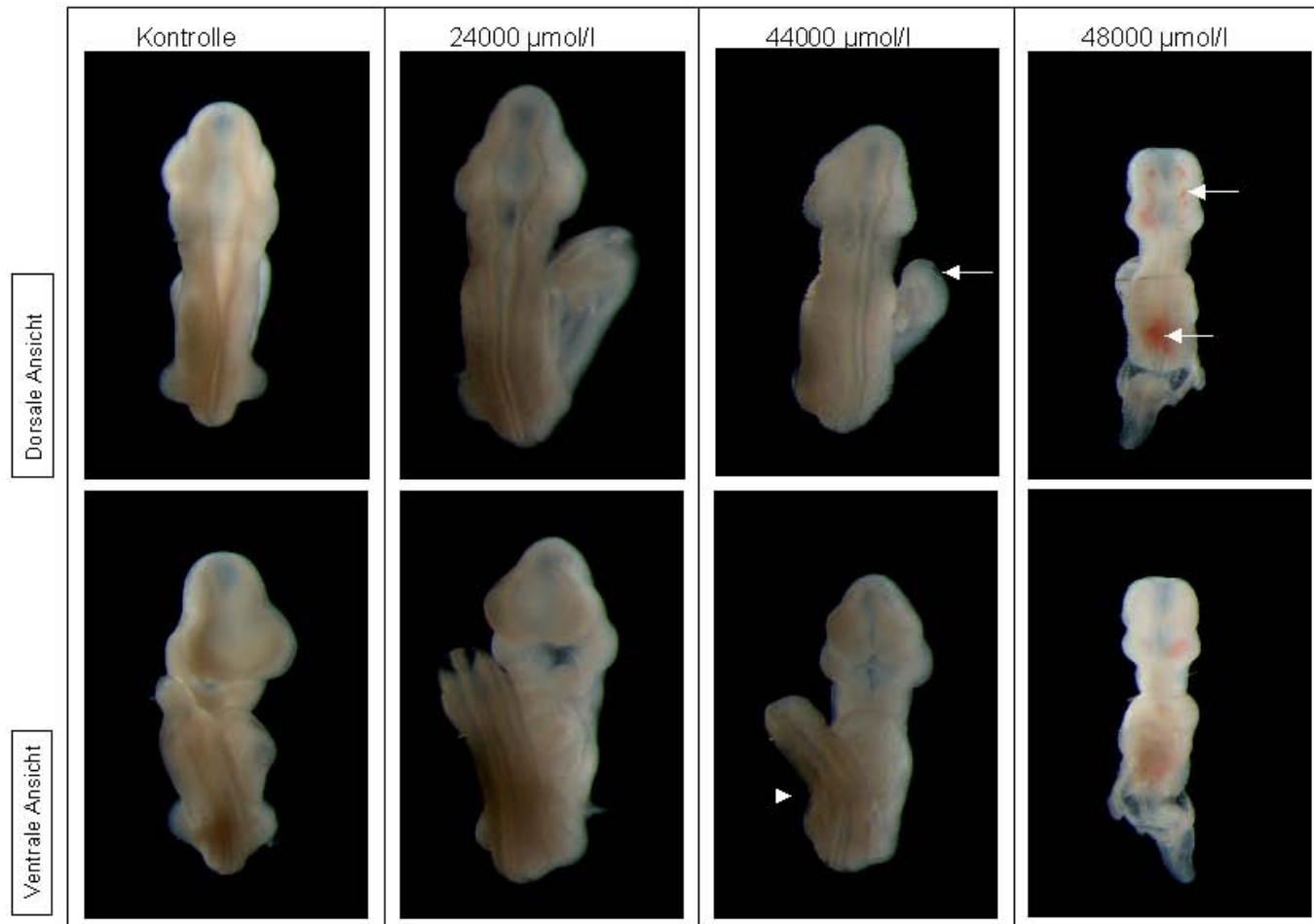
Legende: Darstellung des Einflusses von MSI auf die Wachstums- und Differenzierungsparameter. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe und der verschiedenen Testkonzentrationen sind als Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stdabw.) dargestellt, N= Stichprobengröße, n = abweichende Stichprobengrößen bei der Scheitel-Steiß-Länge, der Dottersackdurchblutung, dem morphologischen Score und der Somitenanzahl kamen dadurch zustande, dass die Embryonen für eine Auswertung zu stark verändert waren, * p < 0,05, ** p < 0,01, die grau unterlegte Zeile ist die aus den Konzentrationsfindungsversuchen beigefügte Konzentration, Ko = Lösungsmittelkontrolle.

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen MSI



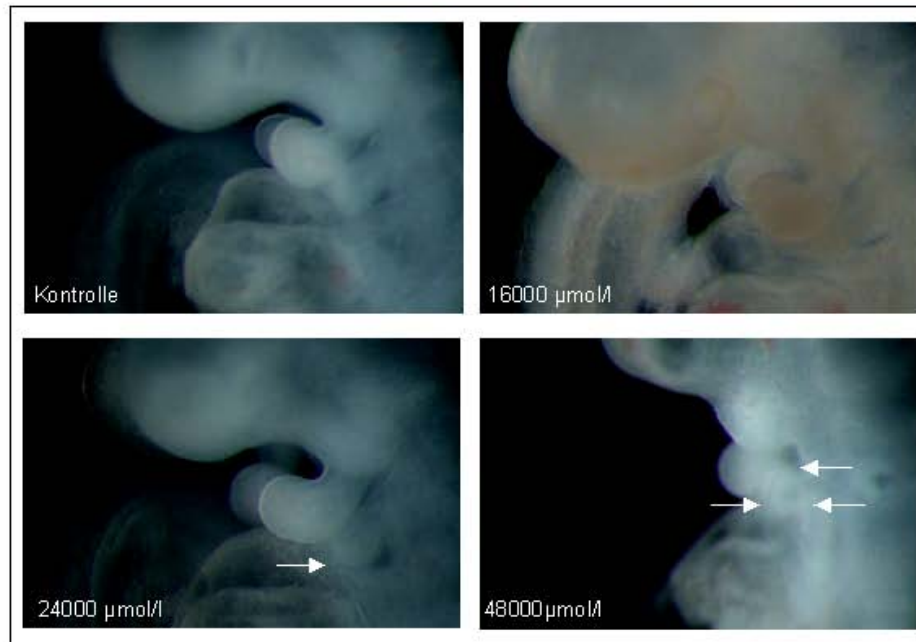
Legende: Abbildungen der linken Körperseite von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeilspitzen: Disproportionale Kopfsegmente.
 Pfeile: 40000 µmol/l: Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens. 44000 µmol/l: Hämorrhagien, deformierter Kopf. 48000 µmol/l: Hämorrhagien.
 Maßstab: 1 mm

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen MSI

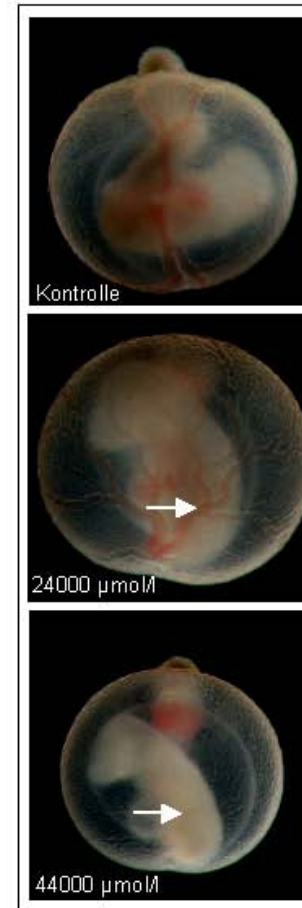


Legende: Abbildungen von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeilspitze: Knick im kaudalen Rumpfabschnitt. Pfeile: 44000 $\mu\text{mol/l}$: offener kaudaler Neuroporus. 48000 $\mu\text{mol/l}$: Hämorrhagien. Maßstab: 1 mm.

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen MSI



Legende: Abbildungen der Kiemenbögen von Embryonen nach 48 Stunden Kultur.
Pfeile: Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens. Maßstab: 1 mm.



Legende: Abbildungen der Dottersäcke nach 48 Stunden Kultur.
Pfeile: organisiertes und unorganisiertes Blutgefäßsystem. Maßstab: 1 mm.

3.1.4. Der Einfluss von 2H-MSI auf die Entwicklung von Embryonen in der WEC

Rattenembryonen wurden in Testansätzen mit ansteigenden Konzentrationen von 2H-MSI inkubiert. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 2000 bis 48000 $\mu\text{mol/l}$ 2H-MSI getestet. Es zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Effekte. Auch in den höchsten getesteten Konzentrationen konnte bei allen Embryonen die Vitalität durch den Nachweis des Herzschlages und fließenden Blutes im Dottersack bestätigt werden.

Der Einfluss von 2H-MSI auf die Wachstums- und Differenzierungsparameter wird in den Tabellen 17 und 18 dargestellt. Fotos der in Testansätzen mit ansteigenden Konzentrationen von 2H-MSI inkubierten Embryonen sind auf den Seiten 58 bis 60 zu finden.

Liniendiagramme, die die Wirkung von 2H-MSI auf die einzelnen Parameter verdeutlichen, werden in Kapitel 3.1.5. gezeigt.

Die Dottersackdurchblutung wurde durch 2H-MSI ab einer Konzentration von 24000 $\mu\text{mol/l}$ so beeinträchtigt, dass es zu einem Verlust der organisierten Gefäßverteilung kam: Es bildeten sich über den gesamten Dottersack hinweg Verzweigungen und Anastomosen, der Blutfluss verlief ungerichtet. Generelle Retardierungen der Embryonen traten aber schon bei niedrigeren Konzentrationen auf, woraus folgt, dass diese nicht durch eine Minderversorgung der Embryonen entstanden.

Bei Embryonen der Lösungsmittelkontrolle wurden im Mittel 25,5 Somitenpaare gezählt. Bei einer Konzentration von 16000 $\mu\text{mol/l}$ NMP lag die Anzahl der Somiten mit 23,1 auf einem statistisch signifikant niedrigen Niveau.

Die Embryonen der Lösungsmittelkontrolle hatten einen morphologischen Score-Wert von 36,3. Ab einer Konzentration von 20000 $\mu\text{mol/l}$ zeigten die Embryonen signifikante Veränderungen, die zu einem morphologischen Score-Wert von 34,9 führten.

Zum Absinken des morphologischen Score-Wertes mit steigenden Konzentrationen 2H-MSI kam es vor allem durch eine zunehmend unvollständige Rotation und somit einer Streckung des Embryos.

Die gesamte Abnormitätenrate lag bei 24000 $\mu\text{mol/l}$ bei 100 %, was der IC_{Max} entsprach. Häufig auftretende Abnormitäten waren Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens und Hämorrhagien vor allem im Kopfbereich. Seltener war die Abnormität eines disproportional kleineren Kopfes und kranial und kaudal offener Neuropori.

Abnormitäten wurden vor allem in Konzentrationen beobachtet, in denen bereits eine generelle Retardierung der Embryonen vorlag. Dies legt den Schluss nahe, dass sie eher sekundär als Folge einer allgemeinen Toxizität entstanden sind.

Die Raten der Veränderungen 'Adhäsion des zweiten Kiemenbogens' und 'Umfangsvermehrung' lagen bei 24000 und 32000 $\mu\text{mol/l}$ 2H-MSI bereits bei 100% und bei 40000 $\mu\text{mol/l}$ nur bei 80%. Durch die zunehmenden Veränderungen der Embryonen vor allem im Kopfbereich wurde ein Abschätzen der Ausmaße der Umfangsvermehrung immer schwieriger und konnte dann auch nicht mehr abgegrenzt werden von einer allgemeinen Abnormität des Kopfes.

Die Abnormitätenrate ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tab. 16: Abnormitätenrate bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in Testansätzen verschiedener Konzentrationen von 2H-MSI

2H-MSI [µmol/l]	Stichpro- bengröße	Umfangs- vermehr. N (%)	Klass. Abn. N (%)	Adh. N (%)	Abn. N (%)
Ko	21	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2 000	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4 000	15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
12 000	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
16 000	15	4 (27) *	0 (0)	8 (53) **	8 (53) **
20 000	15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
24 000	16	16 (100) **	3 (19)	16 (100) **	16 (100) **
32 000	16	16 (100) **	14 (88) **	16 (100) **	16 (100) **
40 000	14	11 (80) **	14 (100) **	11 (80) **	14 (100) **
48 000	6	n.d.	14 (100) **	n.d.	6 (100) **

Legende: Darstellung der absoluten und in Klammern der prozentualen Anteile der Veränderungen: N = betroffene Embryonen, Umfangsvermehr. = Umfangsvermehrung kraniodorsal des ersten Kiemenbogens, Klass. Abn. = Abnormitätenrate ohne Hinzunahme der Adhäsionen, Adh. = Adhäsionen der Kiemenbögen miteinander und mit der Umgebung, Abn. = Abnormitätenrate mit Adhäsionen, n.d. = 'not determined' - keiner der Embryonen dieser Konzentration war auswertbar, Ko = Lösungsmittelkontrolle. * p < 0,05, ** p < 0,01, Fishers exakter Test.

Die Wachstumsparameter Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt erreichten ab einer Konzentration von 16000 µmol/l 2H-MSI ein statistisch signifikant niedriges Niveau im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die Embryonen der Lösungsmittelkontrolle hatten einen durchschnittlichen Proteingehalt von 134,5 µg/Embryo und eine Scheitel-Steiß-Länge von 3,08 mm. Bei einer Konzentration von 16000 µmol/l MSI lagen der Proteingehalt bei 108,9 µg/Embryo und die Scheitel-Steiß-Länge bei 2,81 mm.

Die IC_{NOAEL} lag bei 12000 µmol/l 2H-MSI.

Tab. 17: Veränderungen der Wachstum- und Differenzierungsparameter bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in verschiedenen Konzentrationen von 2H-MSI

2H-MSI [μmol/l]	N	Scheitel-Steiß- Länge [mm]	Proteingehalt/ Embryo [μg]	Dottersack- durchblutung [Score]	Morphologischer Score	Somiten [Anzahl]
		MW ± Stdabw.	MW ± Stdabw.	MW ± Stdabw.	MW ± Stdabw.	MW ± Stdabw.
Ko	21	3,08 ± 0,21	134,5 ± 24,4	3,0 ± 0,0	36,3 ± 1,6	25,5 ± 1,6
2 000	7	3,28 ± 0,13	159,7 ± 15,1	2,9 ± 0,4	38,1 ± 0,4	24,7 ± 1,0
4 000	15	3,02 ± 0,25	129,3 ± 28,0	3,0 ± 0,0	35,6 ± 1,7	25,9 ± 1,4
12 000	7	3,10 ± 0,15	130,5 ± 20,3	2,9 ± 0,4	36,4 ± 0,8	25,0 ± 1,3
16 000	15	2,81 ± 0,31 **	108,9 ± 24,9 **	2,5 ± 0,7 *	35,1 ± 2,1	23,1 ± 2,3 **

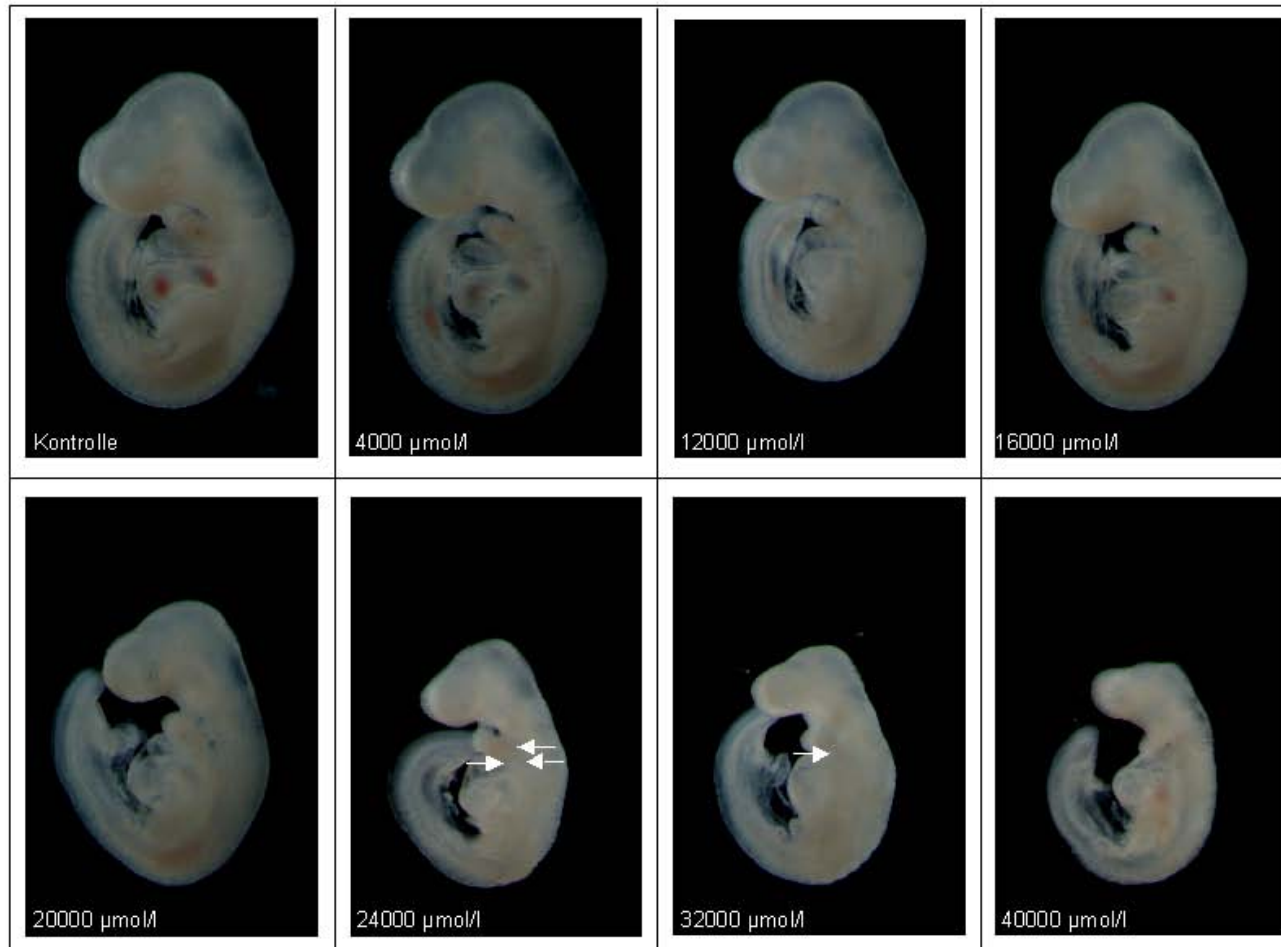
Legende: Darstellung des Einflusses von 2H-MSI auf die Wachstums- und Differenzierungsparameter. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe und der verschiedenen Testkonzentrationen sind als Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stdabw.) dargestellt. N= Stichprobengröße, * p < 0,05, ** p < 0,01, Ko = Lösungsmittelkontrolle.

Tab. 18: Veränderungen der Wachstum- und Differenzierungsparameter bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in verschiedenen Konzentrationen von 2H-MSI

2H-MSI [μmol/l]	N	Scheitel-Steiß- Länge [mm]		Proteingehalt/ Embryo [μg]		Dottersack- durchblutung [Score]		Morphologischer Score		Somiten [Anzahl]	
		MW ±	Stdabw.	MW ±	Stdabw.	MW ±	Stdabw.	MW ±	Stdabw.	MW ±	Stdabw.
Ko	21	3,08 ±	0,21	134,5 ±	24,4	3,0 ±	0,0	36,0 ±	1,6	25,5 ±	1,6
20 000	15	2,90 ±	0,12	117,5 ±	12,5	3,0 ±	0,0	34,9 ±	1,1	25,2 ±	0,8
		**		*				**			
24 000	16	2,45 ±	0,12	75,7 ±	7,4	2,0 ±	0,6	29,8 ±	1,5	20,3 ±	1,3
		**		**		**		**		**	
32 000	16	2,24 ±	0,17	59,6 ±	10,7	1,2 ±	0,4	27,6 ±	1,7	18,2 ±	1,2
		**	n=10	**		**		**		**	n=15
40 000	14	2,22 ±	0,05	44,7 ±	9,8	1,1 ±	0,3	25,6 ±	2,9	16,3 ±	1,8
		**	n=4	**		**		**	n=12	**	n=12
48 000	6	n.d.		29,0 ±	4,7	1,0 ±	0,0	n.d.		n.d.	
				**		**	n=4				

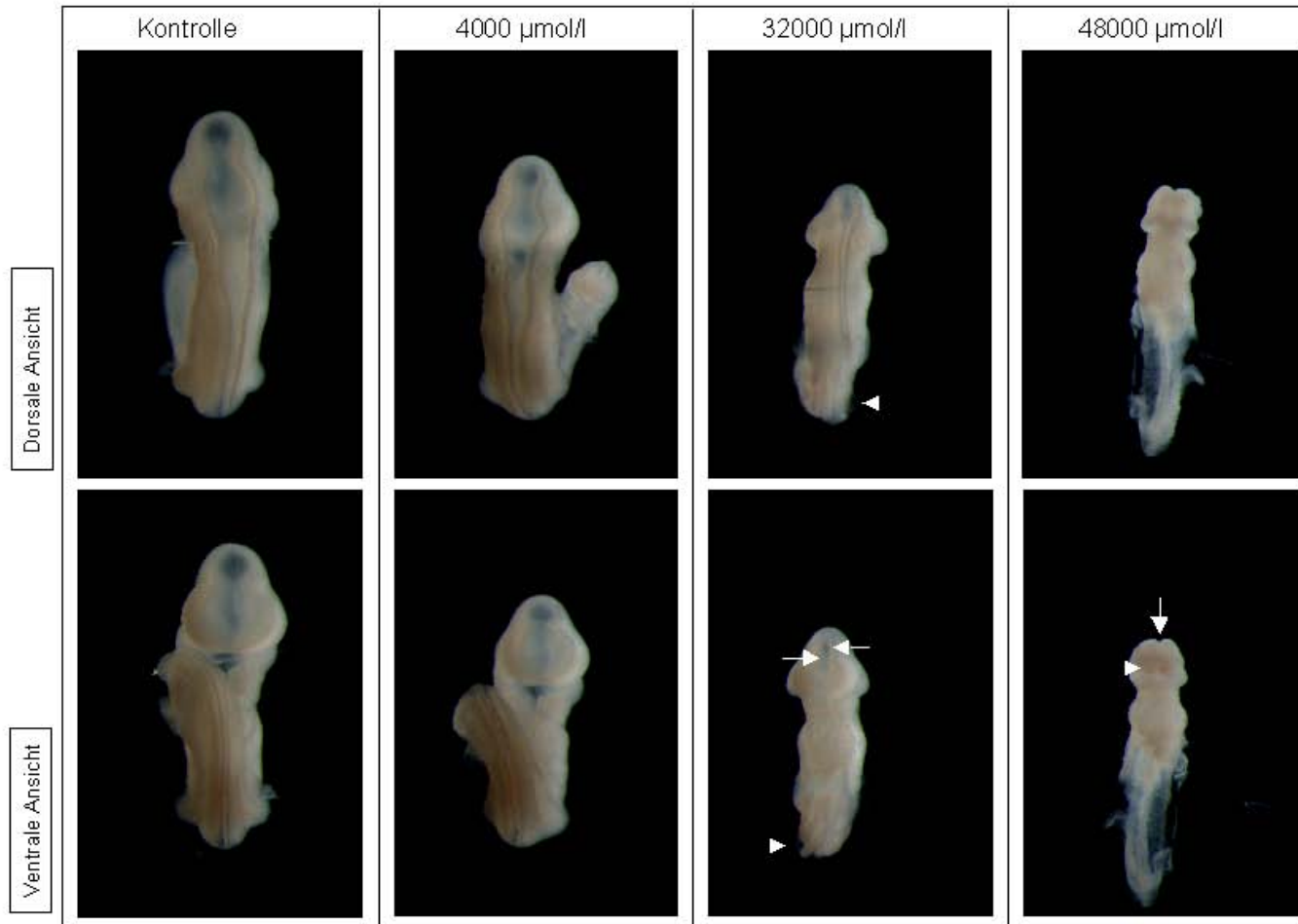
Legende: Darstellung des Einflusses von 2H-MSI auf die Wachstums- und Differenzierungsparameter. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe und der verschiedenen Testkonzentrationen sind als Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (Stdabw.) dargestellt, N = Stichprobengröße, * p < 0,05, ** p < 0,01, n = verminderte Stichprobengröße dadurch, dass die Embryonen wegen zu starken Veränderungen nicht mehr ausgewertet werden konnten, n.d. = 'not determined' - keiner der Embryonen dieser Konzentration war auswertbar, Ko = Lösungsmittelkontrolle.

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 2H-MSI



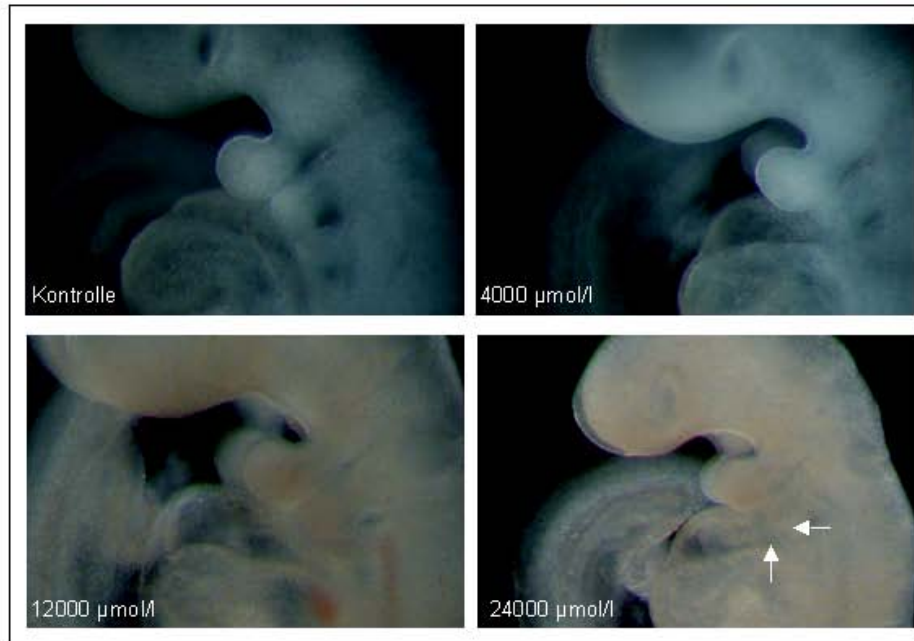
Legende: Abbildungen der linken Körperseite von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeile: Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens. Maßstab: 1 mm

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 2H-MSI



Legende: Abbildungen von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeilspitzen: 32000 $\mu\text{mol/l}$: Blasige Erweiterung des kaudalen Neuroporus. 48000 $\mu\text{mol/l}$: Hämorrhagien. Pfeile: offener kranialer Neuroporus. Maßstab: 1 mm

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 2H-MSI



Legende: Abbildungen der Kiemenbögen von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeile: Adhäsionen des zweiten Kiemenbogens. Maßstab: 1 mm

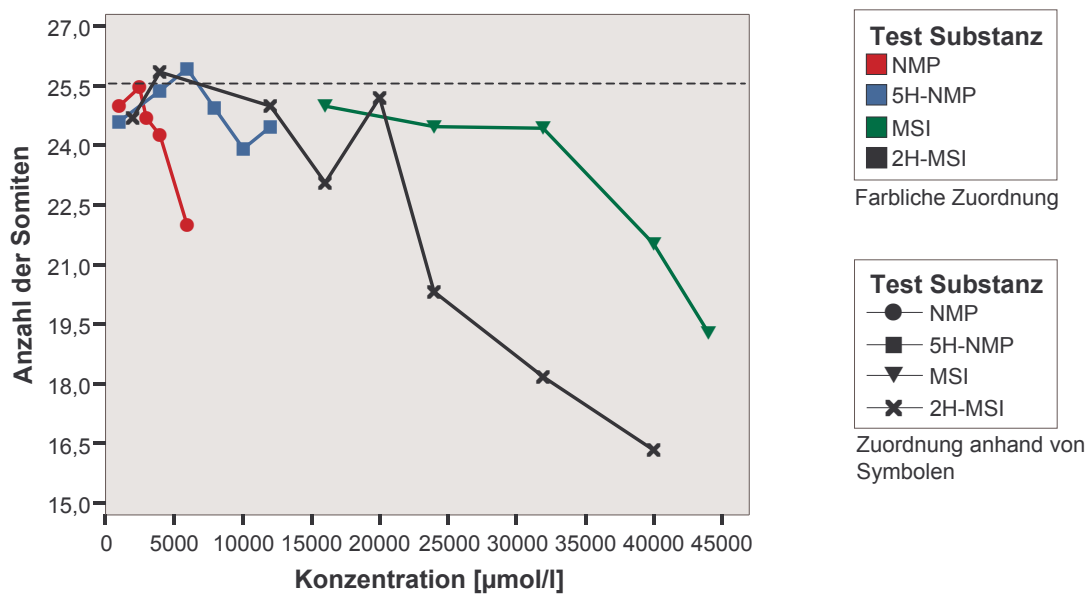


Legende: : Abbildungen von Embryonen nach 48 Stunden Kultur. Pfeile: organisiertes und unorganisiertes Blutgefäßsystem. Maßstab: 1 mm

3.1.5. Liniendiagramme der erhobenen Parameter unter dem Einfluss der vier Testsubstanzen in der WEC

In den folgenden Liniendiagrammen (Abbildungen 4 bis 9) wird dargestellt, wie ansteigende Konzentrationen der Testsubstanzen die einzelnen Parameter aus der WEC beeinflussen. Diese Darstellungsform erlaubt den direkten Vergleich der Konzentrations-Effekt-Beziehungen der verschiedenen Testsubstanzen untereinander getrennt nach den einzelnen Auswertungsparametern. Die zugrunde liegende Daten für die hier dargestellten Diagrammen sind in den Abschnitten 3.1.1. bis 3.1.4. bereits ausführlicher für die einzelnen Testsubstanzen angegeben.

Abb. 4: Darstellung des Differenzierungsparameters Somitenanzahl bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen



Legende: Die Veränderungen des erhobenen Parameters Somitenanzahl im Verlauf ansteigender Konzentrationen von NMP und den drei Metaboliten wird dargestellt. Die Punkte zeigen Mittelwerte, die Linien sind grafische Hilfsmittel. Es sind sowohl verschiedene Farben als auch verschiedene Symbole für die entsprechenden Substanzen aufgeführt. Auf der X-Achse ist die Konzentration in µmol/l aufgetragen. Die gestrichelte Referenzlinie stellt den Mittelwert aller Kontrollen dar.

Abb. 5: Darstellung des Differenzierungsparameters morphologischer Score bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen

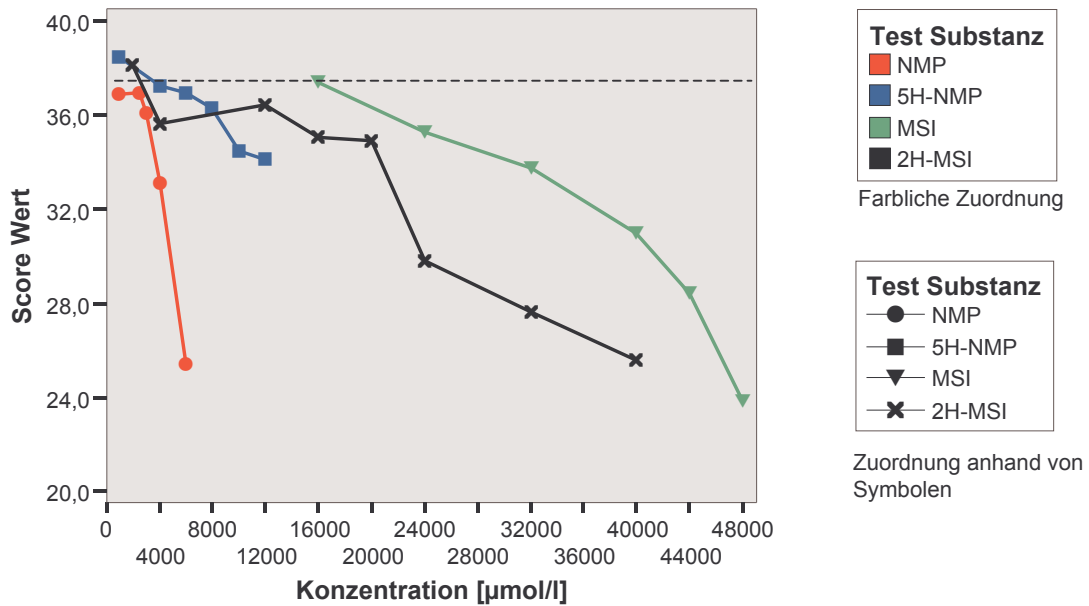
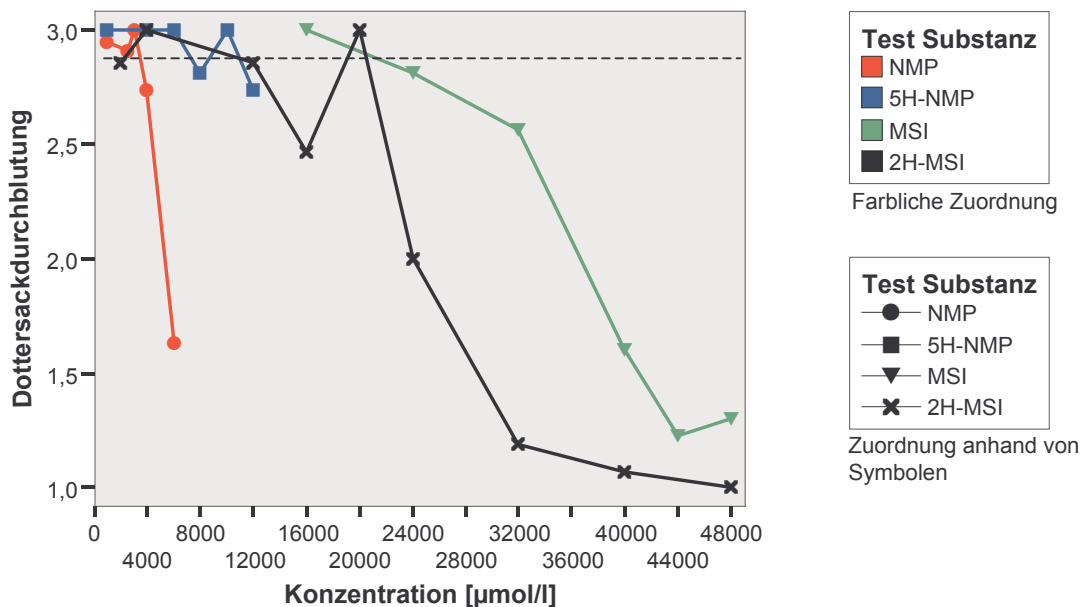


Abb. 6: Darstellung der Dottersackdurchblutung bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen



Legende: Die Veränderungen der erhobenen Parameter morphologischer Score und Dottersackdurchblutung im Verlauf ansteigender Konzentrationen von NMP und den drei Metaboliten wird dargestellt. Die Punkte zeigen Mittelwerte, die Linien sind grafische Hilfsmittel. Es sind sowohl verschiedene Farben als auch verschiedene Symbole für die entsprechenden Substanzen aufgeführt. Auf der X-Achse ist die Konzentration in µmol/l aufgetragen. Die gestrichelte Referenzlinie stellt den Mittelwert aller Kontrollen dar.

Abb. 7: Darstellung des Wachstumsparameters Proteingehalt bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen

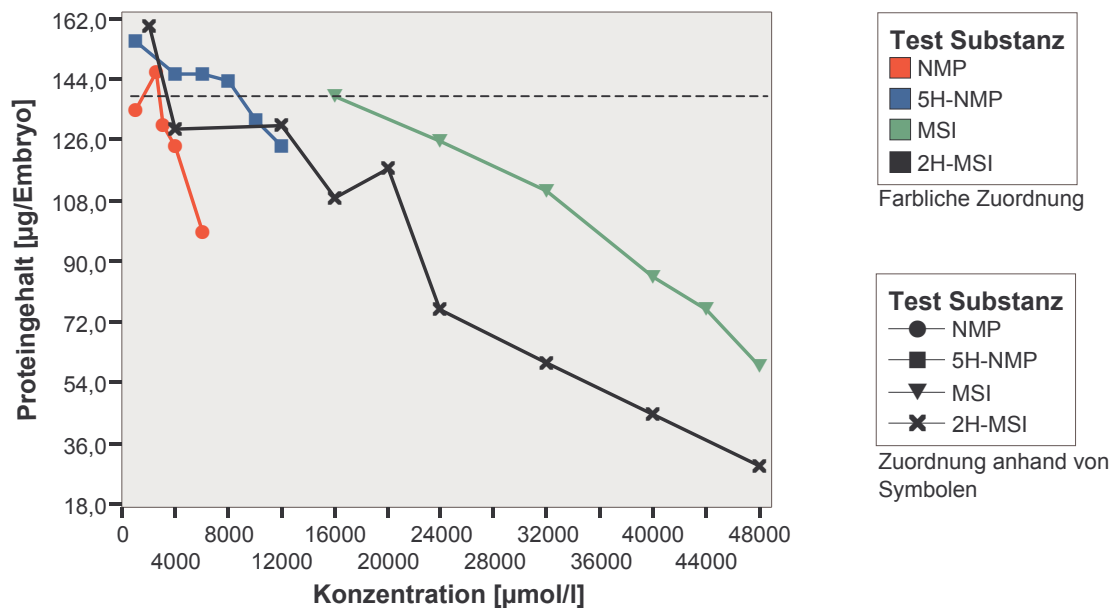
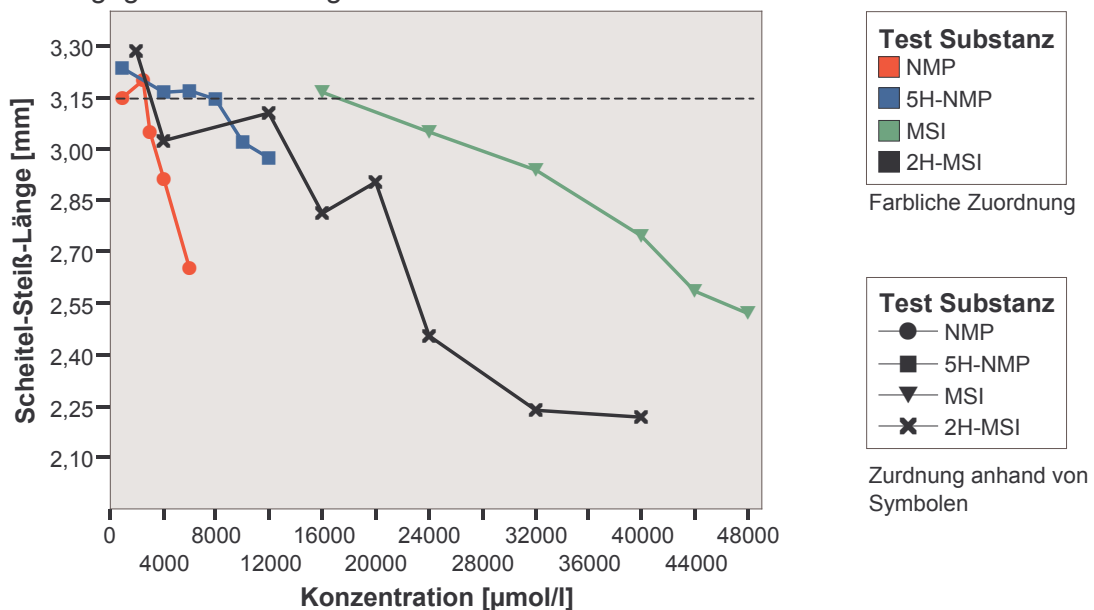
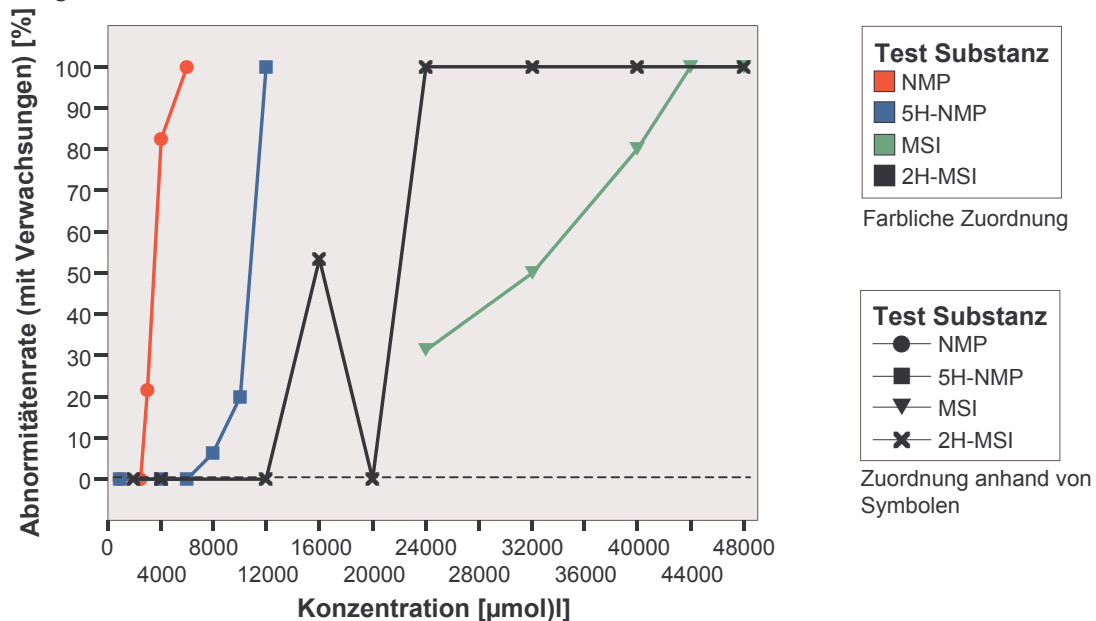


Abb. 8: Darstellung des Wachstumsparameters Scheitel-Steiß-Länge bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen



Legende: Die Veränderungen der erhobenen Parameter Proteingehalt und Scheitel-Steiß-Länge im Verlauf ansteigender Konzentrationen von NMP und den drei Metaboliten wird dargestellt. Die Punkte zeigen Mittelwerte, die Linien sind grafische Hilfsmittel. Es sind sowohl verschiedene Farben als auch verschiedene Symbole für die entsprechenden Substanzen aufgeführt. Auf der X-Achse ist die Konzentration in µmol/l aufgetragen. Die gestrichelte Referenzlinie stellt den Mittelwert aller Kontrollen dar.

Abb. 9: Darstellung der Abnormitätenrate bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen



Legende: Die Veränderungen des erhobenen Parameters Abnormitätenrate im Verlauf ansteigender Konzentrationen von NMP und den drei Metaboliten wird dargestellt. Die Punkte zeigen Mittelwerte, die Linien sind grafische Hilfsmittel. Es sind sowohl verschiedene Farben als auch verschiedene Symbole für die entsprechenden Substanzen aufgeführt. Auf der X-Achse ist die Konzentration in µmol/l aufgetragen. Die gestrichelte Referenzlinie stellt den Mittelwert aller Kontrollen dar.

Jede Substanz wurde prinzipiell bis zu ihrer IC_{Max} getestet, also bis zur niedrigsten getesteten Konzentration, in der alle Embryonen abnorm verändert waren. Dies war insbesondere bei NMP und 5H-NMP in Konzentrationen der Fall, in denen die Wachstums- und Differenzierungsparameter nur wenig reduziert waren.

3.1.6. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse am Beispiel von 6000 µmol/l NMP

Vor allem MSI und 2H-MSI mussten in sehr hohen Konzentrationen getestet werden, um Effekte zeigen zu können. Um die Empfindlichkeit des Systems zu überprüfen, wurde dabei NMP in der Konzentration von 6000 µmol/l als Positivkontrolle eingesetzt. Die Embryonen zeigten sich in allen Versuchen vergleichbar empfindlich. Die Daten aus neun Versuchen, in denen 6000 µmol/l NMP getestet wurde, sind an dieser Stelle zusammengefasst, um zu zeigen, dass die Ergebnisse der WEC reproduzierbar sind. Dargestellt wird dies in Tabelle 19.

Größere Schwankungen gab es vor allem beim Proteingehalt, bei dem die prozentuale Abweichung der Einzelversuche vom Mittelwert der gesammelten neun Versuche bei 12,8% lag. Die Abnormitätenrate blieb konstant bei 100 %. Bei den anderen Parametern lag die prozentuale Abweichung vom Mittelwert bei den Daten der Scheitel-Steiß-Länge bei 4,4 % in einem Bereich von 2,64 mm bis 2,88 mm, der Somitenanzahl bei 5,6 % in einem Bereich von 22,0 bis 23,3 und des morphologischen Score-Wertes bei 8,9 % in einem Bereich von 23,9 bis 28,6.

Tab. 19: Darstellung der Wachstums- und Differenzierungsparameter von Embryonen inkubiert in 6000 $\mu\text{mol/l}$ NMP

Versuchs- nummer	N	Scheitel-Steiß- Länge [mm]		Proteingehalt/ Embryo [μg]		Dottersack- durchblutung [Score]		Morphologischer Score		Somiten [Anzahl]		Abn. [%]
		MW \pm	Stdabw	MW \pm	Stdabw	MW \pm	Stdabw	MW \pm	Stdabw	MW \pm	Stdabw	
1	4	2,75 \pm	0,26	112,9 \pm	29,5	1,8 \pm	0,5	27,0 \pm	2,2	23,3 \pm	1,7	100
2	4	2,73 \pm	0,12	110,9 \pm	11,9	2,0 \pm	0,0	25,0 \pm	0,0	20,8 \pm	1,0	100
3	4	2,72 \pm	0,13	110,6 \pm	11,7	2,3 \pm	1,0	26,3 \pm	2,1	23,0 \pm	1,6	100
4	4	2,66 \pm	0,18	106,5 \pm	13,0	1,8 \pm	1,0	25,0 \pm	1,2	23,0 \pm	0,8	100
5	4	2,88 \pm	0,13	120,0 \pm	10,2	1,5 \pm	0,6	28,5 \pm	0,6	22,3 \pm	1,0	100
6	8	2,69 \pm	0,16	98,7 \pm	19,2	1,5 \pm	0,8	23,9 \pm	2,8	22,0 \pm	1,9	100
7	4	2,79 \pm	0,25	92,7 \pm	14,1	1,5 \pm	0,6	28,5 \pm	2,9	22,8 \pm	2,6	100
8	4	2,70 \pm	0,10	100,5 \pm	15,5	1,8 \pm	1,0	25,5 \pm	1,0	22,0 \pm	1,8	100
9	7	2,64 \pm	0,15	107,8 \pm	15,5	1,8 \pm	0,5	28,6 \pm	2,7	22,7 \pm	2,2	100

Legende: Darstellung der Auswertung von gegenüber 6000 $\mu\text{mol/l}$ NMP exponierten Embryonen aus neun voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Es wurden die Mittelwerte (MW) der Parameter und die Standardabweichung (Stdabw.) angegeben, N = Stichprobengröße, Abn. = Abnormitätenrate.

3.2. Ranking der Substanzen entsprechend ihrer Embryotoxizität

In der WEC wurden die Effekte von NMP und den drei Metaboliten auf die Wachstums- und Differenzierungsparameter untersucht. Um die vier Substanzen bezüglich ihrer Embryotoxizität zu ordnen, wurden die niedrigsten getesteten Konzentrationen jeder Testsubstanz, die erste signifikante Effekte auf jeden einzelnen Parameter hatten, notiert. Der Substanz, die in den niedrigsten Konzentrationen Effekte bewirkte, wurde der Rang 1 zugewiesen, den nachfolgenden Substanzen entsprechend höhere Ränge. Das 'Ranking' der Substanzen entsprechend ihrer Embryotoxizität ergibt sich aus der Summe der Ränge. In Tabelle 20 ist der relative Einfluss der Substanzen auf verschiedene Parameter entsprechend ihres 'Rankings' dargestellt.

Tab. 20: Ranking des toxischen Potentials der Substanzen in der WEC

	NMP	5H-NMP	MSI	2H-MSI
Scheitel-Steiß-Länge	1	2/3	4	2/3
Proteingehalt/Embryo	1	2/3	4	2/3
Morphologischer Score	1	2/3	4	2/3
Somitenanzahl	1	2/3	4	2/3
Abnormitätenrate	1	2	4	3
Dottersack-durchblutung	1	2/3	4	2/3
Embryotoxizität	1	2	4	3

Legende: Darstellung des Rankings des toxischen Potentials von NMP und den Metaboliten. Die 1 steht für ein hohes toxisches Potential, bzw. für die Substanz mit den stärksten Effekten auf die erhobenen Parameter. Entsprechend höhere Ränge stehen für ein geringeres toxisches Potential bzw. für geringere Effekte auf die erhobenen Parameter.

Im Hinblick auf die Embryotoxizität der untersuchten Substanzen ergab sich folgendes Ranking: MSI < 2H-MSI < 5H-NMP < NMP.

3.3. 'Whole-immuno-staining' (WIS) des 2H3-Neurofilaments

3.3.1. Ex-vivo-Embryonen

Rattenembryonen der Gestationstage 10,0, 11,0, 11,5 und 12,0 wurden aus den Muttertieren gewonnen. Mit dem primären 2H3-Neurofilament-Antikörper wurden die Nervenstrukturen markiert und sichtbar gemacht, um die Entwicklung der Gehirnnerven während der Embryogenese nachvollziehen zu können.

Zur Beurteilung der Entwicklung wurde an den *Ex-vivo*-Embryonen ein Nerven-Score erstellt (siehe Kapitel 2.2.3.). Dargestellt werden die Ergebnisse der Untersuchungen an den *Ex-vivo*-Embryonen auf den Fotos der Seite 71 und in der Tabelle 21.

Im Text wurde in Klammern die Anzahl der Embryonen, die das beschriebene Nervenmuster aufweisen, im Vergleich zur gesamten Stichprobengröße angegeben (Anzahl der Embryonen/Stichprobengröße).

Die am *Gestationstag 10,0* gewonnen Embryonen zeigten eine markierte Struktur, die balkenartig über der Herzanlage lag (siehe Foto Seite 71).

Die Nervenfasern von am *Gestationstag 11,0* gewonnenen Embryonen waren mit Hilfe des WIS nicht klar strukturiert darstellbar. Sie schienen aus kleinen, wenig geordneten Punkten zu bestehen. Diese lagerten sich vor allem im Nervus trigeminus schon zu Bündeln von Fasern zusammen. So weit dies möglich war, wurden nachvollziehbare und strukturierte Nerven durch das Nerven-Score System erfasst. Ansonsten wurde ein Nerven-Score von null vergeben. Es wurden zwölf Embryonen am Gestationstag 11,0 untersucht.

Das Ganglion und der Nervus ophthalmicus des Nervus trigeminus waren bei elf Embryonen des Gestationstages 11,0 nachvollziehbar (Nerven-Score 2). Bei einem Embryo waren zusätzliche Fasern vom Ganglion aus in die Peripherie zu sehen (Nerven-Score 3).

Das Ganglion des Nervus facialis und einige Fasern in Richtung Peripherie (6/12) (Nerven-Score 1) bzw. Fasern bis zur Wurzel des zweiten Kiemenbogens (5/12) (Nerven-Score 2) waren zu sehen. Bei einem Embryo waren die Strukturen noch keinem Nerven-Score zuzuordnen.

Den meisten Embryonen wurde, wegen der undeutlichen Strukturen des Nervus glossopharyngeus, ein Nerven-Score von null zugeteilt. Teilweise waren aber schon Fasern, die in Richtung der Peripherie zogen, auszumachen (3/12) (Nerven-Score 1).

Beim Nervus vagus wurde nur bei wenigen Embryonen das Ganglion gesehen (5/12) (Nerven-Score 1). Der Nervus vagus der restlichen Embryonen konnte nicht bewertet werden (7/12).

Bei Embryonen des Gestationstages 11,0 wurde also folgendes Bild der Gehirnnerven beobachtet: der Nervus trigeminus stellte sich als Ganglion mit dem ersten Abzweig dem Nervus ophthalmicus dar (Nerven-Score 2); beim Nervus facialis lag das Ganglion mit einigen Fasern, die nach ventral ziehen, vor (Nerven-Score 1); die Nervi glossopharyngeus und vagus waren nicht auswertbar.

Tab. 21: Nerven-Score bei *Ex-vivo*-Embryonen an den Gestationstagen 10,0 bis 12,0

Nerven-Score		GD 10,0 N = 6 (100%)	GD 11,0 N = 12 (100%)	GD 11,5 N = 12 (100%)	GD 12,0 N = 17 (100%)
Nervus trigeminus	0	6 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	2	0 (0)	11 (92)	3 (25)	0 (0)
	3	0 (0)	1 (8)	5 (42)	5 (29)
	4	0 (0)	0 (0)	3 (25)	1 (6)
	5	0 (0)	0 (0)	1 (8)	0 (0)
	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	11 (65)
Score gesamt		-	2,1	3,2	5,0
Nervus facialis	0	6 (100)	1 (8)	0 (0)	0 (0)
	1	0 (0)	6 (50)	0 (0)	0 (0)
	2	0 (0)	5 (42)	10 (83)	4 (24)
	3	0 (0)	0 (0)	2 (17)	6 (35)
	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (41)
Score gesamt		-	1,3	2,2	3,2
Nervus glosso-pharyngeus	0	6 (100)	9 (75)	0 (0)	0 (0)
	1	0 (0)	3 (100)	1 (8)	0 (0)
	2	0 (0)	0 (0)	1 (8)	0 (0)
	3	0 (0)	0 (0)	8 (67)	0 (0)
	4	0 (0)	0 (0)	2 (17)	17 (100)
	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Score gesamt		-	0,3	2,9	4,0
Nervus vagus	0	6 (100)	7 (58)	0 (0)	0 (0)
	1	0 (0)	5 (42)	0 (0)	0 (0)
	2	0 (0)	0 (0)	5 (42)	0 (0)
	3	0 (0)	0 (0)	7 (58)	17 (100)
Score gesamt		0,0	0,4	2,6	3,0

Legende: Dargestellt wird die Nervenentwicklung von *Ex-vivo*-Embryonen (Gestationstage 10,0, 11,0, 11,5 und 12,0). Die Entwicklung wird in Form des Nerven-Score Wertes angegeben. Für jeden Gestationstag wird der absolute und in Klammern der prozentuale Anteil der Embryonen aus der Gruppe angegeben, die den entsprechenden Nerven-Score aufweisen. GD = Gestationstag, N = Stichprobengröße, 0 = keine Embryonen mit diesem Nervenscore in dieser Untersuchungsgruppe.

Es wurden zwölf Embryonen am *Gestationstag 11,5* untersucht.

Der individuelle Stand der Nervenentwicklung schwankte vor allem beim V. und beim IX. Gehirnnerven in einer sehr großen Spanne. Für den Nervus trigeminus hieß dies ein Spektrum von Nerven-Score Werten zwischen zwei und fünf. Bei drei Embryonen wurde das Ganglion mit dem Ophtalmicus-Abzweig (Nerven-Score 2), bei fünf Embryonen zusätzliche Fasern in Richtung Peripherie (Nerven-Score 3), bei drei Embryonen der zusätzliche Mandibularis-Abzweig (Nerven-Score 4) und bei einem Embryo außerdem der dritte Abzweig – der Nervus maxillaris (Nerven-Score 5) - beobachtet.

Der siebte Gehirnnerv reichte vom Ganglion bis zur Ansatzlinie des zweiten Kiemenbogens (Nerven-Score 2) und bei zwei Embryonen bis zur Wurzel des Kiemenbogens (Nerven-Score 3).

Die Werte des Nerven-Scores des neunten Gehirnnervens schwankten in einem Bereich von eins bis vier. Ein Embryo wies keine sichtbare dorsale Wurzel und nur wenige Fasern nach ventral auf (Nerven-Score 1). Bei einem Embryo war eine dünne dorsale Wurzel ausgebildet (Nerven-Score 2). Bei acht Embryonen waren die ventralen Fasern zu einem Bündel zusammen gelagert, welches über die Ansatzlinie der Kiemenbögen reichte (Nerven-Score 3). Bei zwei Embryonen hatte sich zusätzlich zu diesem Bündel eine gut entwickelte dorsale Wurzel gebildet (Nerven-Score 4).

Der Nervus vagus hatte bei fünf Embryonen eine gut organisierte dorsale Wurzel und ein dünnes Faserbündel ventral des Ganglions (Nerven-Score 2) und bei sieben Embryonen ein dickes Faserbündel, welches mindestens die Dicke des Ganglions erreichte (Nerven-Score 3).

Bei Embryonen des Gestationstages 11,5 wurde also folgendes Bild der Gehirnnerven beobachtet: beim Nervus trigeminus waren zusätzlich zum Ganglion und dem abzweigenden Nervus ophthalmicus Fasern in Richtung der Peripherie ausgeprägt (Nerven-Score 3). Der Nervus facialis wies ein Faserbündel vom Ganglion bis zur Ansatzlinie der Kiemenbögen auf (Nerven-Score 2). Die ventralen Fasern des Nervus glossopharyngeus reichten bis zur Ansatzlinie der Kiemenbögen, und die dorsale Wurzel lag als dünne Wurzel vor (Nerven-Score 3).

Die ventralen Fasern des Nervus vagus waren zu einem dicken Bündel zusammengelagert (Nerven-Score 3).

Es wurden 17 Embryonen am *Gestationstag 12,0* untersucht.

Fünf der Embryonen hatten nur den Ophthalmicus-Abzweig des Nervus trigeminus und zusätzliche Fasern in die Peripherie (Nerven-Score 3). Einer der Embryonen zeigte einen zusätzlichen Mandibularis-Ast (Nerven-Score 4). Elf Embryonen hatten drei Abzweige des Nervus trigeminus: die Nervi ophthalmicus, mandibularis und maxillaris. Die beiden kaudalen Abzweige reichten bereits über die Ansatzlinie der Kiemenbögen hinaus, und der Nervus ophthalmicus reichte über die Ebene des Auges hinaus (Nerven-Score 6).

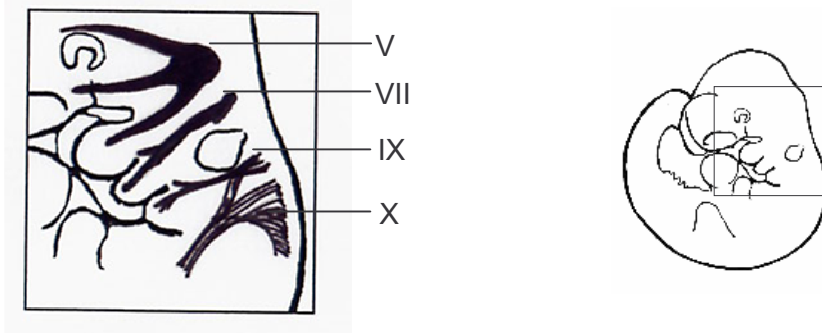
Beim Nervus facialis reichten bei vier der Embryonen die ventralen Fasern bis zur Ansatzlinie des zweiten Kiemenbogens (Nerven-Score 2), bei sechs reichten sie über die Ansatzlinie (Nerven-Score 3), und bei sieben Embryonen kam es zu einer zusätzlichen Ausbildung von Fasern, die in Richtung des ersten Kiemenbogens abzweigten (Nerven-Score 4) (siehe auch Skizze 6).

Bei *Ex-vivo*-Embryonen war die Faserung des Nervus glossopharyngeus sehr gerade von dorsal nach ventral in Richtung des noch nicht auszumachenden dritten Kiemenbogens gerichtet – der Nerv erschien wie gebürstet. Eine Auffächerung fand erst weiter ventral – nach Überschreiten der Ansatzlinie der Kiemenbögen – statt. Es war immer eine Verbindung zwischen dem neunten und zehnten Gehirnnerven nachweisbar. Sie lag etwas dorsal des Ganglions des Nervus glossopharyngeus in kaudodistaler Richtung zum Nervus vagus. Die dorsale Wurzel des Nervus glossopharyngeus wurde dann als gut entwickelt mit dem Nerven-Score Wert von vier eingestuft, wenn sie mindestens 2-3 klar erkennbare, geradlinige Fasern aufwies, die mehr oder weniger parallel zueinander zum Ganglion (ventral der Verbindung zum Nervus vagus) verliefen und von dort über die Ansatzlinie der Kiemenbögen reichten. Als dorsale Wurzel wurde der Teil der Fasern, der sich über die Breite des Ganglions dorsal von diesem erstreckte, definiert. Bei allen Embryonen des Gestationstages 12,0 war die dorsale Wurzel gut entwickelt (Nerven-Score 4).

Die Fasern, die den zehnten Gehirnnerven bilden, liefen fächerförmig in einem Bündel zusammen. Entweder beteiligten sie sich direkt an der dorsalen Wurzel oder aber indirekt über den von kaudal kommenden Strang. Bei allen Embryonen war eine dicke ventrale Wurzel ausgebildet (Nerven-Score 3).

Um die klar gerichtete Faserstruktur am Tag 12,0 *ex vivo* zu verdeutlichen, wurde eine grobe Skizze (Skizze 6) beigelegt:

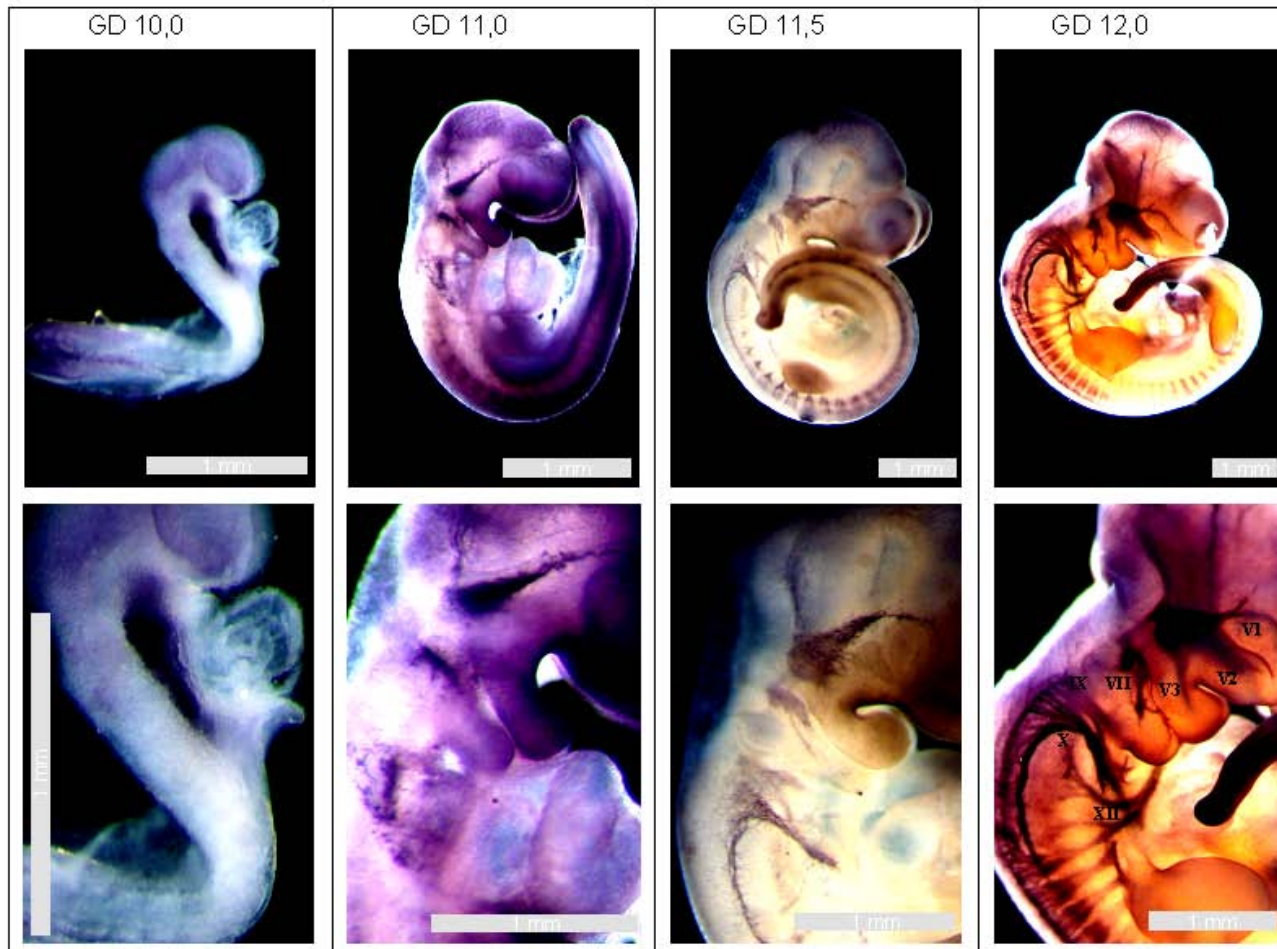
Skizze 6: Darstellung der Nerven bei *Ex-vivo*-Embryonen am Tag 12,0



Legende: Schematische Darstellung eines *Ex-vivo*-Embryos am Tag 12,0. Es ist ein Ausschnitt des rechten Embryos zu sehen. Die Nervi trigeminus (V), facialis (VII), glossopharyngeus (IX) und vagus (X) sind skizziert. Embryonen entnommen und modifiziert nach Van Maele-Fabry et al. (79).

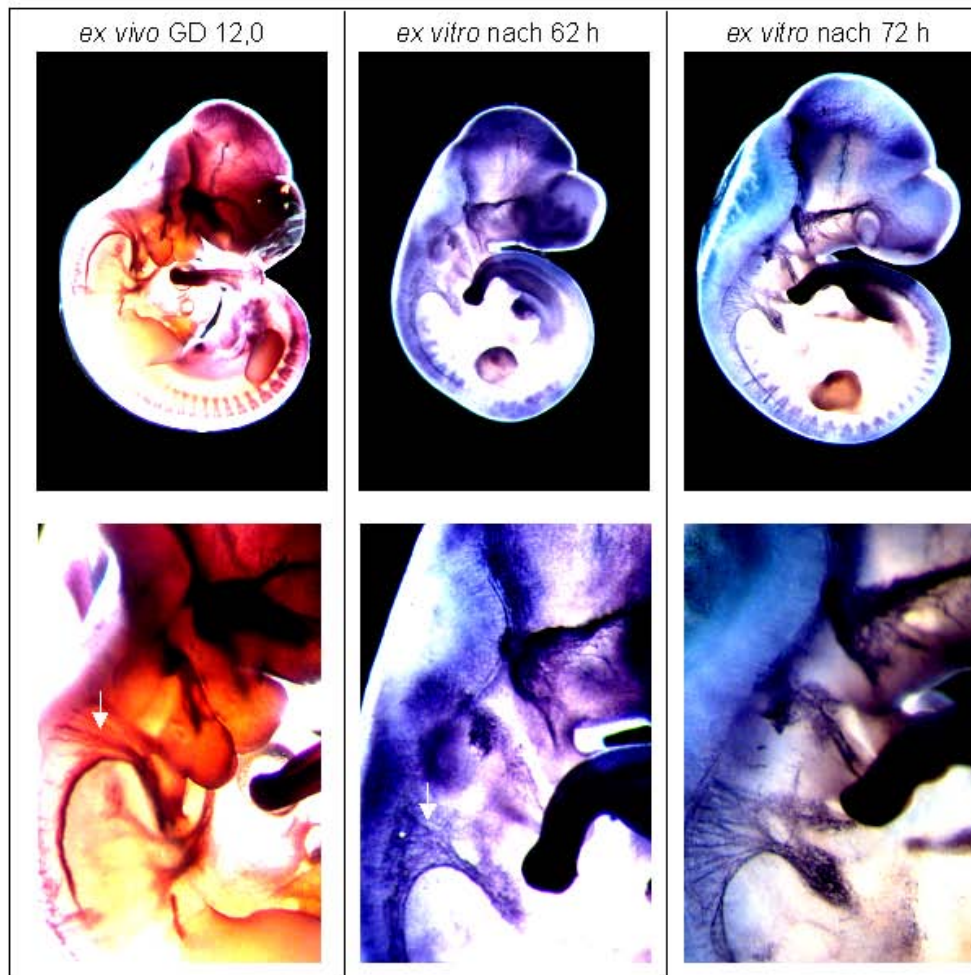
Zusammenfassend kann zu den Gehirnnerven der *Ex-vivo*-Embryonen des Gestationstages 12,0 gesagt werden, dass der Nervus trigeminus alle drei Abzweige aufwies (Nerven-Score 5), dass die ventralen Fasern des Nervus facialis über die Ansatzlinie der Kiemenbögen reichten (Nerven-Score 3) und dass der Nervus glossopharyngeus eine gut entwickelte dorsale Wurzel hatte (Nerven-Score 4). Die ventrale Wurzel des Nervus vagus bildete ein dickes Faserbündel (Nerven-Score 3).

Darstellung der Gehirnnerven bei Embryonen *ex vivo*



Legende: Dargestellt werden Embryonen nach dem 'Whole-immuno-staining' (WIS) mit dem 2H3-Neurofilament-Antikörper. Gehirnnerven von Embryonen *ex vivo* an den Gestationstagen (GD) 10,0, 11,0, 11,5 und 12,0 sind abgebildet. Oben: Aufnahmen der Embryonen von rechts; unten: Ausschnitte aus den oberen Bildern. Die Maßstäbe sind in den Bildern angegeben.

Darstellung der Gehirnnerven bei Embryonen *ex vivo* und *ex vitro*



Legende: Dargestellt werden Embryonen nach dem WIS mit dem 2H3-Neurofilament-Antikörper. Gehirnnerven von Embryonen *ex vivo* und *ex vitro* werden abgebildet. Oben: Aufnahmen der Embryonen von rechts, Maßstab: 1 mm. Unten: Ausschnitte aus den oberen Bildern, Maßstab: 1 mm. Pfeil GD 12,0: geordneter Verlauf der Fasern der Nervi glossopharyngeus und vagus. Pfeil 62 h: ungeordneter Verlauf der Fasern der Nervi glossopharyngeus und vagus. GD = Gestationstag.

3.3.2. *Ex-vitro*-Embryonen

Aufgrund der gut differenzierten und somit gut auswertbaren Nervenstrukturen bei *Ex-vivo*-Embryonen des Gestationstages 12,0 wurde dieser Zeitpunkt auch für die Auswertung der *Ex-vitro*-Embryonen ausgewählt.

Van Maele-Fabry et al. verwendeten das WIS für die Färbung von Nervenfasern Mäuseembryonen mit 25 bis 34 Somitenpaaren (79). Nach 62 Stunden wurden bei Rattenembryonen 30,5 Somitenpaare gezählt (siehe Tabelle 11). Um den Bedingungen von Van Maele-Fabry et al. möglichst nahe zu kommen, wurden die Embryonen auch 72 Stunden lang in der WEC inkubiert. Dabei wurden Somitenzahlen von etwa 32,0 gezählt. Allerdings wurde - wie bereits in Abschnitt 3.1.1. beschrieben - auch eine im Vergleich zum Wachstum herabgesetzte Differenzierung beobachtet. Außerdem wurden - neben einer erheblichen Verschlechterung der Gefäßstrukturen des Dottersacks - eine aufgeblähte Nackenregion und ein disproportionales Wachstum des kaudalen Rumpfabschnittes im Vergleich zum Kopf festgestellt.

Deshalb wurden zur Beurteilung der Gehirnnerven in der *In-vitro*-Situation Embryonen am Gestationstag 9,5 in die WEC eingesetzt und für 62 Stunden inkubiert. Darüber hinaus wurden Embryonen nach Inkubation in Testansätzen mit ansteigenden Konzentrationen der Positivkontrolle Ethanol (1, 3, 6 mg/ml Ethanol) und der Testsubstanz NMP (2500, 3000, 4000 µmol/l NMP) untersucht.

In einem Vorversuch wurde allerdings die Nervenentwicklung von fünf Embryonen nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden untersucht, um einen weiteren Parameter für die Differenzierung zu erhalten. Im Folgenden wird der Stand der Nervenentwicklung bei Embryonen der Lösungsmittelkontrolle nach 62 Stunden mit der nach 72 Stunden Inkubation verglichen:

Bei den Embryonen nach 62 Stunden Kulturdauer reichten die drei Abzweige des Nervus trigeminus nicht über die Ansatzlinie der Kiemenbögen und die Ebene des Auges hinaus. Dreizehn der Embryonen hatten drei Abzweige (Nerven-Score 5), bei fünf Embryonen war lediglich der Nervus ophthalmicus und einige Fasern in Richtung Peripherie zu beobachten (Nerven-Score 3).

Bei einem Embryo - inkubiert für 72 Stunden in der WEC - reichten die drei Abzweige des Nervus trigeminus über die Ansatzlinie der Kiemenbögen und die Ebene des Auges hinaus (Nerven-Score 6). Bei den anderen vier Embryonen war die Entwicklung des Nervus trigeminus noch nicht so weit fort geschritten.

Beim Nervus facialis war auffällig, dass häufiger als bei *Ex-vivo*-Embryonen eine Verbindung zwischen dem VII. und dem IX. Gehirnnerven zu sehen war. Bei zwei Embryonen der Lösungsmittelkontrolle trat sogar eine Verschmelzung zwischen dem V. und VII. Gehirnnerven auf. Mit Ausnahme je eines Embryos nach 62 bzw. 72 Stunden Kulturdauer waren bei allen Embryonen die Fasern des Nervus facialis über die Ansatzlinie des zweiten Kiemenbogens getreten (Nerven-Score 3). Bei der Hälfte der Embryonen - inkubiert für 62 Stunden in der WEC - kam es zu einem zusätzlichen Abzweig von Fasern zum ersten Kiemenbogen (12/24) (Nerven-Score 4). Dieser Anteil lag bei den Embryonen nach 72 Stunden Kulturdauer etwas höher (3/5).

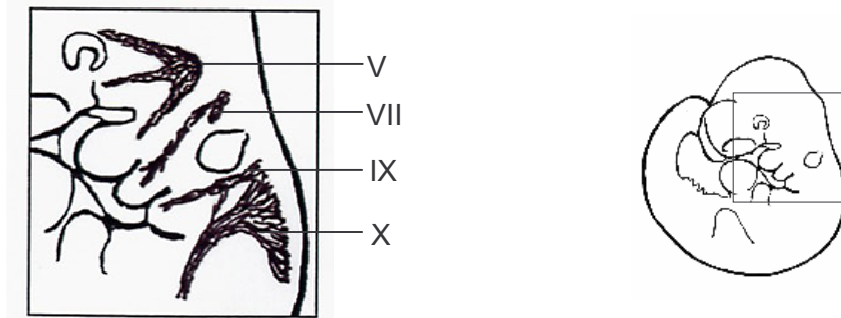
Die Fasern des Nervus glossopharyngeus reichten bei den *Ex-vitro*-Embryonen über die Ansatzlinie der Kiemenbögen hinaus und die dorsale Wurzel war gut entwickelt (Nerven-Score 4).

Der Nervus vagus hatte bei allen *Ex-vitro*-Embryonen eine dicke ventrale Wurzel (Nerven-Score 3).

Aus den Untersuchungen ging hervor, dass die Differenzierung der Nerven *in vitro* nach 62 Stunden nicht mehr deutlich voranschreitet. Dies steht im Einklang mit den morphologischen Untersuchungen der Embryonen.

Was bei den Nerven von *Ex-vitro*-Embryonen deutlich auffiel war, dass die typische Strukturiertheit und der geordnete Verlauf der Nervenfasern der *Ex-vivo*-Embryonen des Gestationstages 12,0 nicht beobachtet werden konnte - weder nach 62 noch nach 72 Stunden Kulturdauer. Zur Verdeutlichung dieses Sachverhalts wurde eine Skizze (Skizze 7) beigefügt:

Skizze 7: Darstellung der Nerven bei *Ex-vitro*-Embryonen nach 62 Stunden Kulturdauer



Legende: Schematische Darstellung eines Embryos nach 62 Stunden in Kultur. Es ist ein Ausschnitt des rechten Embryos zu sehen. Die Nervi trigeminus (V), facialis (VII), glossopharyngeus (IX) und vagus (X) sind skizziert. Embryonen entnommen und modifiziert nach Van Maele-Fabry et al. (79)

Auf den Fotos der Seite 72 wurde ein *Ex-vivo*-Embryo des Gestationstages 12,0 und je ein *Ex-vitro*-Embryo der Lösungsmittelkontrolle nach 62 bzw. 72 Stunden Kultur dargestellt.

3.3.3. *Ex-vitro*-Embryonen - nach Exposition gegenüber Ethanol

Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt, die bei dem WIS der Gehirnnerven von *Ex-vitro*-Embryonen nach 62 Stunden Kultur generiert wurden. Ethanol (ETOH) wurde als Positivkontrolle ausgewählt, die laut Van Maele-Fabry et al. (79) bei Mäuseembryonen spezifische Abnormitäten der Gehirnnerven induziert. Das WIS von Embryonen, inkubiert in der WEC in Testansätzen unterschiedlicher Konzentrationen Ethanol, sollte das Potential der Methode, spezifische Veränderungen der Nerven durch das Agens sichtbar zu machen, zeigen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 22 und in Form von Fotos auf der Seite 76 dargestellt.

Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle kam es bei Embryonen exponiert gegenüber 1 bzw. 3 mg/ml Ethanol zu leichten Verringerungen des Nerven-Scores Wertes.

Auffällig war, dass die ventralen Fasern des Nervus facialis bei 3 mg/ml Ethanol bei der Hälfte der Embryonen nicht über die Ansatzlinie des zweiten Kiemenbogens reichte (Nerven-Score 2).

6 mg/ml Ethanol bewirkte bei allen Nerven starke Retardierungen. Vor allem beim zehnten Gehirnnerven. Bei diesem konnten nur einzelne Punkte anstatt eines klaren Verlaufes der Wurzel ausgemacht werden.

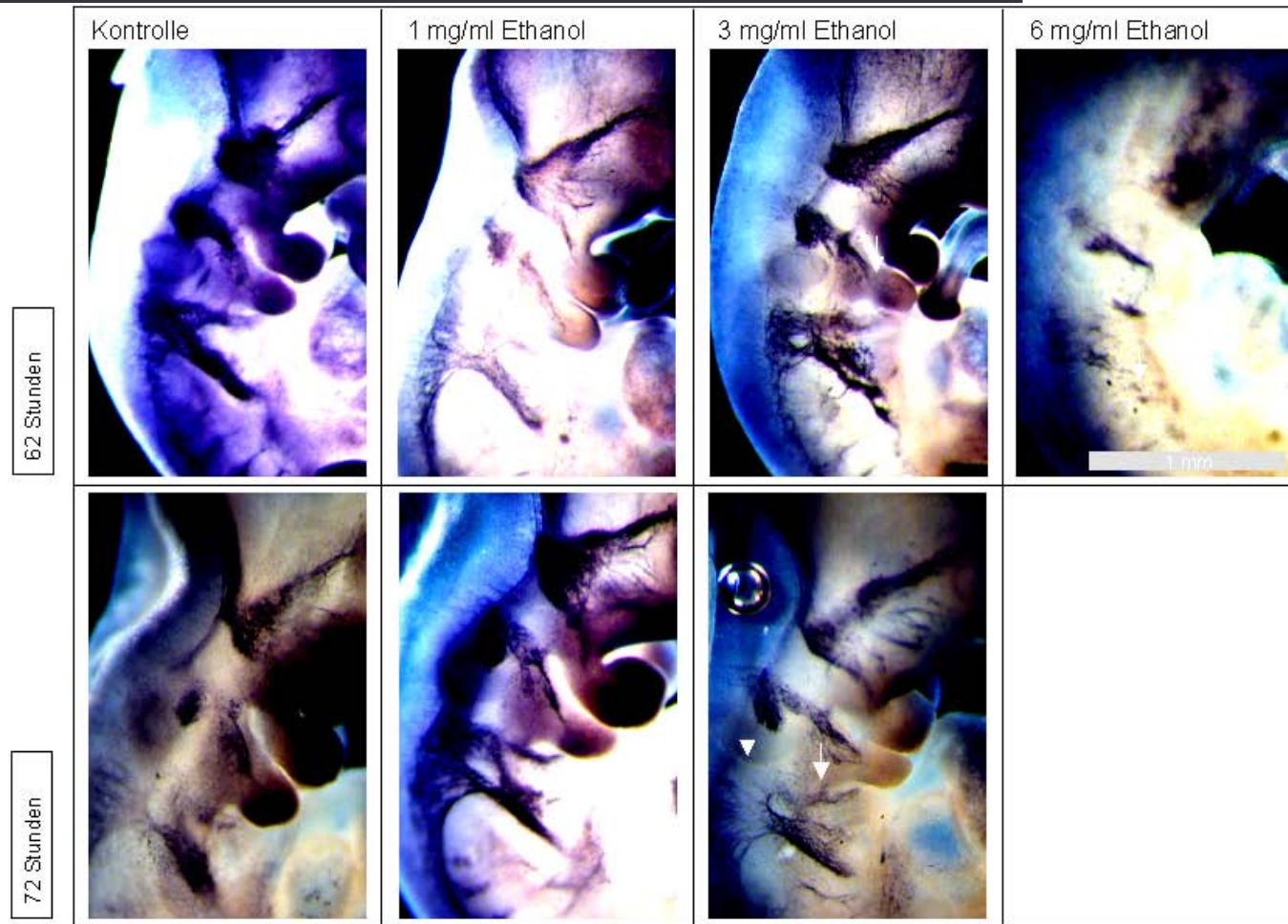
Die teilweise geringe Anzahl an untersuchten Embryonen erklärt sich aus der Tatsache heraus, dass durch Van Maele-Fabry et al. (79) Ethanol als Positivkontrolle ausreichend untersucht wurde.


Tab. 22: Nerven-Score bei Embryonen nach 62 Stunden Inkubation in Testansätzen ansteigender Konzentrationen Ethanol

Nerven-Score		Ko N = 12 (100%)	1,0 mg/ml ETOH N = 4 (100%)	3,0 mg/ml ETOH N = 9 (100%)	6,0 mg/ml ETOH N = 3 (100%)
Nervus trigeminus	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33)
	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (67)
	3	2 (17)	0 (0)	3 (33)	0 (0)
	4	3 (25)	3 (75)	2 (22)	0 (0)
	5	7 (58)	1 (25)	4 (44)	0 (0)
	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Score gesamt		4,4	4,3	4,1	1,7 **
Nervus facialis	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	2	0 (0)	0 (0)	4 (44)	3 (100)
	3	7 (58)	3 (75)	1 (12)	0 (0)
	4	5 (42)	1 (25)	4 (44)	0 (0)
Score gesamt		3,4	3,3	3,0	3,0 **
Nervus glosso- pharyngeus	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33)
	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33)
	3	5 (42)	0 (0)	3 (33)	1 (33)
	4	7 (58)	3 (75)	6 (67)	0 (0)
	5	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)
Score gesamt		3,6	4,3	3,7	2,0 *
Nervus vagus	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (67)
	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	2	0 (0)	1 (25)	1 (12)	1 (33)
	3	12 (100)	3 (75)	8 (88)	0 (0)
Score gesamt		3,0	2,8	2,8	0,3 **

Legende: Dargestellt wird die Nervenentwicklung von *Ex-vitro*-Embryonen nach 62 Stunden Inkubation in der WEC. Die Entwicklung der Nerven wird dargestellt in Form des Nerven-Score Wertes. Für die Lösungsmittelkontrolle und die Testansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen Ethanol wird der absolute und in Klammern der prozentuale Anteil der Embryonen des jeweiligen Ansatzes angegeben, die den entsprechenden Nerven-Score aufweisen. GD = Gestationstag, N = Stichprobengröße, Ko = Lösungsmittelkontrolle, 0 = keine Embryonen mit diesem Nervenscore in dieser Untersuchungsgruppe. * p < 0,05, ** p < 0,01, Mann-Whitney-Test.

Darstellung der Gehirnnerven bei Embryonen *ex vitro* nach Exposition gegenüber Ethanol



Legende: Dargestellt werden Embryonen nach dem WIS mit dem 2H3-Neurofilament-Antikörper. Gehirnnerven von Embryonen nach Kultur in unterschiedlichen Konzentrationen Ethanol sind abgebildet. Es werden Ausschnitte ganzer Embryonen gezeigt. Oben: nach 62 Stunden, unten: nach 72 Stunden. Maßstab:  1 mm. Pfeilspitze: schwach entwickelte dorsale Glossopharyngeus-Wurzel. Pfeile: 62 h, 3 mg/ml: Fasern des Nervus facialis ziehen nicht über die Ansatzlinie des zweiten Kiemenbogens, 72 h, 3 mg/ml: Fasern, die vom Nervus glossopharyngeus in den zweiten Kiemenbogen ziehen, 62 h, 6 mg/ml: lediglich vereinzelte Punkte im Verlauf der Wurzel des Nervus vagus.

3.3.4. *Ex-vitro*-Embryonen - nach Exposition gegenüber NMP

Die Ergebnisse des WIS der Neurofilamente der Embryonen, die in der WEC 62 Stunden gegenüber NMP exponiert wurden, werden in der Tabelle 23 dargestellt.

Die Embryonen wurden in Testansätzen mit Konzentrationen von 2500, 3000 und 4000 $\mu\text{mol/l}$ NMP inkubiert. Dargestellt sind die Ergebnisse auf den Fotos der Seite 80.

Beim Nervus trigeminus zeigten zwei der Embryonen exponiert gegenüber 3000 $\mu\text{mol/l}$ NMP lediglich das Ganglion (Nerven-Score 1) bzw. die Anfänge eines Ophthalmicus-Abzweiges (1/15) (Nerven-Score 2). Bei Embryonen inkubiert in 4000 $\mu\text{mol/l}$ NMP kam es zu einer Unterbrechung des Nervus ophthalmicus. Mit steigender Konzentration von NMP fiel außerdem ein deutlicheres Erscheinungsbild des Trigeminalganglions auf – es wurde kreisförmig und hob sich kugelig von der Umgebung ab. Dies war in den Fällen der Ophthalmicus-Unterbrechung besonders stark ausgeprägt.

Der Nervus facialis von Embryonen exponiert gegenüber NMP-Konzentrationen bis einschließlich 3000 $\mu\text{mol/l}$ NMP blieb unverändert im Vergleich zu den Embryonen der Lösungsmittelkontrolle. Bei keinem der Embryonen inkubiert in 4000 $\mu\text{mol/l}$ NMP reichten die ventralen Fasern über die Ansatzlinie der Kiemenbögen (Nerven-Score 2). Trotzdem zweigte bei einigen Embryonen ein Faserbündel zum ersten Kiemenbogen ab (9/12). In der physiologischen Entwicklung der Nerven würde dieser Abzweig erst nach Erreichen des zweiten Kiemenbogens entstehen.

Der Nervus glossopharyngeus war schon bei Embryonen inkubiert in einer Konzentration von 2500 $\mu\text{mol/l}$ NMP in seiner Entwicklung eingeschränkt (nicht signifikant), was vor allem durch die zurückgebliebene Entwicklung der dorsalen Wurzel gekennzeichnet war. Bei 4000 $\mu\text{mol/l}$ NMP wurde bei einigen Embryonen am Nervus glossopharyngeus festgestellt, dass bei gut entwickelter dorsaler Wurzel das ventrale Faserbündel fehlte (Nerven-Score 2) (4/12). In der physiologischen Entwicklung der Nerven würde sich erst nach Erreichen der Ansatzlinie der Kiemenbögen eine gut entwickelte dorsale Wurzel ausbilden.

Keine Veränderungen des Nerven-Scores im Vergleich zu Embryonen der Lösungsmittelkontrolle gab es beim Nervus vagus. Es wurde immer eine dicke ventrale Wurzel beobachtet (Nerven-Score 3).

Bei 4000 $\mu\text{mol/l}$ NMP lagen die Werte des Nerven-Scores der Nervi facialis und glossopharyngeus auf einem statistisch signifikant niedrigen Niveau (VII: $p < 0,01$, IX: $p < 0,05$, Mann-Whitney-Test). Der in der WEC erhobene morphologische Score der Embryonen erreichte ebenfalls bei 4000 $\mu\text{mol/l}$ NMP ein statistisch signifikant niedriges Niveau. Bei der morphologischen Betrachtung der Embryonen traten Umfangsvermehrungen im Bereich kraniodorsal der Kiemenbögen 3000 $\mu\text{mol/l}$ NMP auf. Eindeutig als Abnormitäten zu klassifizierende Veränderung wurden erst bei Konzentrationen ≥ 4000 $\mu\text{mol/l}$ NMP festgestellt (vgl. Tab. 9).

Tab. 23: Nerven-Score bei Embryonen nach 62 Stunden Inkubation in Testansätzen ansteigender Konzentrationen NMP

Nerven-Score		Ko N = 12 (100%)	2 500 µmol/l NMP N = 12 (100%)	3 000 µmol/l NMP N = 15 (100%)	4 000 µmol/l NMP N = 12 (100%)
Nervus trigeminus	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1	0 (0)	0 (0)	2 (13)	0 (0)
	2	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)
	3	2 (17)	3 (25)	3 (20)	5 (42)
	4	4 (33)	5 (42)	5 (33)	3 (25)
	5	6 (50)	4 (33)	4 (26)	4 (33)
	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Score gesamt		4,3	4,1	3,5	3,9
Nervus facialis	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)
	2	1 (8)	4 (33)	4 (26)	12 (100)
	3	6 (50)	2 (17)	0 (0)	0 (0)
	4	5 (42)	6 (50)	10 (67)	0 (0)
Score gesamt		3,3	3,2	3,3	2,0 **
Nervus glosso-pharyngeus	0	0 (0)	0 (0)	1 (7)	1 (8)
	1	0 (0)	0 (0)	1 (7)	0 (0)
	2	0 (0)	4 (33)	1 (7)	4 (33)
	3	3 (25)	1 (9)	5 (33)	2 (17)
	4	7 (58)	7 (58)	7 (46)	5 (42)
	5	2 (17)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Score gesamt		3,9	3,3	3,1	2,8
Nervus vagus	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (9)
	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	3	12 (100)	12 (100)	15 (100)	11 (91)
Score gesamt		3,0	3,0	3,0	2,8

Legende: Dargestellt wird die Nervenentwicklung von *Ex-vitro*-Embryonen nach 62 Stunden Inkubation in der WEC. Die Entwicklung der Nerven wird dargestellt in Form des Nerven-Score Wertes. Für die Lösungsmittelkontrolle und die Testansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen NMP wird der absolute und in Klammern der prozentuale Anteil der Embryonen des jeweiligen Ansatzes angegeben, die den entsprechenden Nerven-Score aufweisen. GD = Gestationstag, N = Stichprobengröße, Ko = Lösungsmittelkontrolle. 0 = keine Embryonen mit diesem Nervenscore in dieser Untersuchungsgruppe. * p < 0,05, ** p < 0,01, Mann-Whitney-Test.

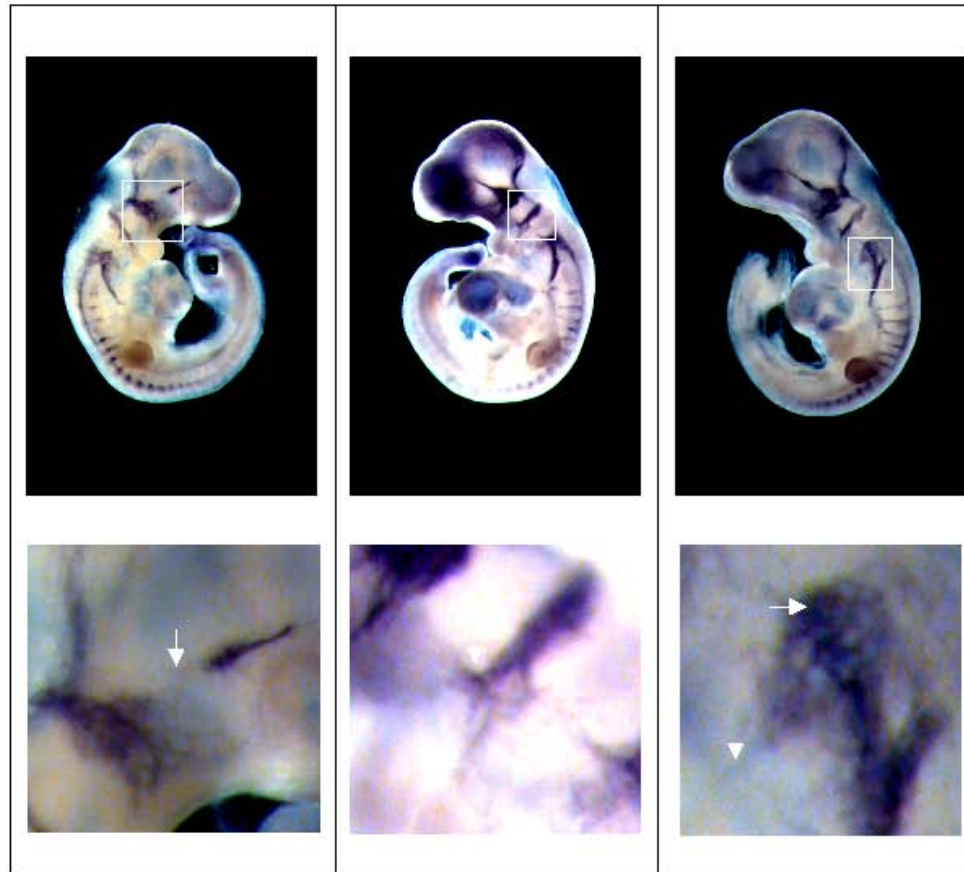
Das Vorkommen von Abnormitäten ist in Tabelle 24 dargestellt.
Die Abnormitäten der Nervenstrukturen werden durch Fotos auf der Seite 80 dargestellt. Im Vergleich dazu werden die gleichen Nervenstrukturen der Embryonen der Lösungsmittelkontrolle auf der Seite 81 gezeigt.

Tab. 24: Darstellung der Abnormitäten der Gehirnnerven von Embryonen nach 62 Stunden Exposition gegenüber ansteigender Konzentrationen von NMP

	Ko N = 12 (100%)	2 500 µmol/l NMP N = 12 (100%)	3 000 µmol/l NMP N = 15 (100%)	4 000 µmol/l NMP N = 12 (100%)
Unterbrechung des Nervus trigeminus	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (42) *
Abzweig eines Faserbündels aus dem Nervus facialis in den 1. Kiemenbogen vor Erreichen des 2.	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (75) **
Gut entwickelte dorsale Wurzel des Nervus glossopharyngeus bei fehlendem ventralem Faserbündel	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (33)

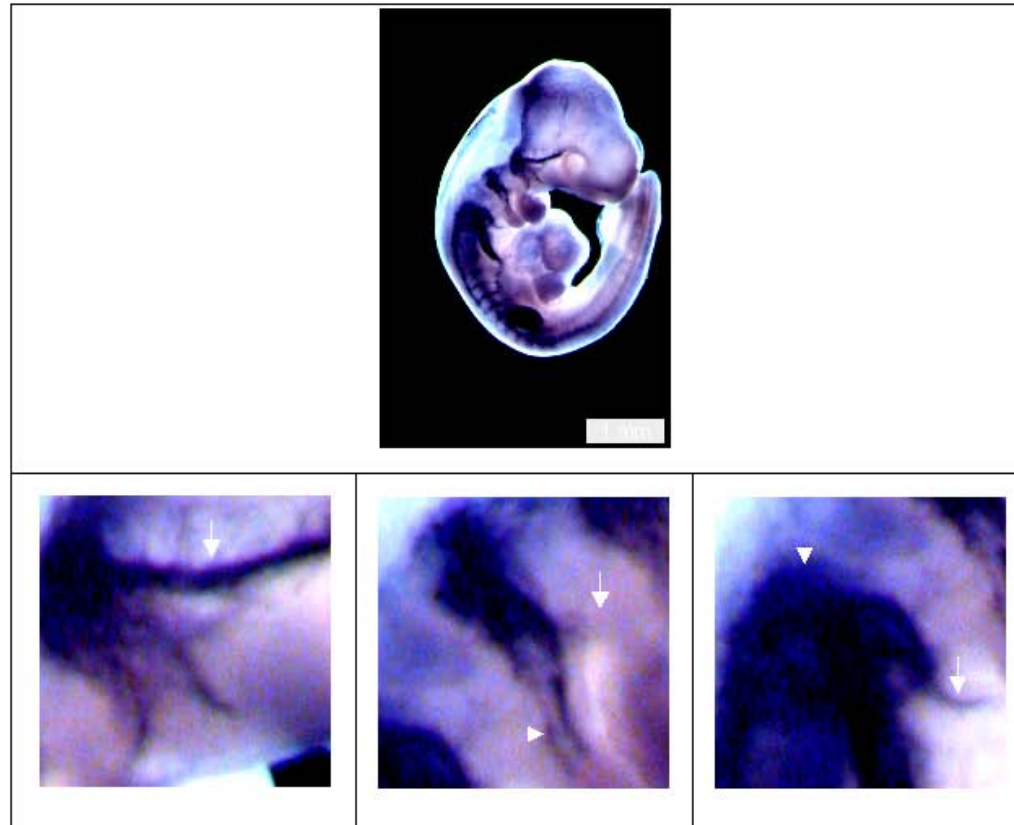
Legende: Dargestellt werden die Abnormitäten der Nerven von *Ex-vitro*-Embryonen nach 62 Stunden Inkubation in der WEC. Für die Lösungsmittelkontrolle und die Testansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen NMP wird der absolute und in Klammern der prozentuale Anteil der Embryonen des jeweiligen Ansatzes angegeben, die die entsprechende Abnormität zeigen. Da ein einzelner Embryo auch mehrere Abnormitäten aufweisen kann, überschreiten die addierten Absolutzahlen die Stichprobengröße. N = Stichprobengröße, Ko = Lösungsmittelkontrolle. * p < 0,05, ** p < 0,01, Fishers exakter Test.

Darstellung der Gehirnnerven bei Embryonen *ex vitro* nach Exposition gegenüber NMP



Legende: Dargestellt werden Embryonen nach dem WIS mit dem 2H3-Neurofilament-Antikörper. Gehirnnerven von Embryonen nach 62h Kultur in 4000 $\mu\text{mol/l}$ NMP werden abgebildet. Oben: Darstellung ganzer Embryonen, Maßstab: **1 mm**. Unten: Ausschnitte des jeweiligen oberen Bildes mit einer 4- bis 6,9-fachen Vergrößerung. Pfeile: Bild 1: Unterbrechung des Ramus optalmicus. Bild 2: Pfeilspitze: Abzweig vom Nervus facialis in den ersten Kiemenbogen. Pfeil: Faserbündel des Nervus facialis zieht nicht in den zweiten Kiemenbogen. Bild 3: Pfeil: gut ausgebildete dorsale Wurzel des Nervus glossopharyngeus. Pfeilspitze: fehlendes Faserbündel nach ventral.

Darstellung der Gehirnnerven eines Embryos der Lösungsmittelkontrolle



Legende: Dargestellt wird ein Embryo der Lösungsmittelkontrolle nach 62 Stunden Kultur nach dem WIS mit dem 2H3-Neurofilament-Antikörper. Oben: Darstellung eines Embryos, Maßstab: 1 mm. Unten: Ausschnitte aus dem oberen Bild mit einer 5,4- bis 6-fachen Vergrößerung. Pfeile: Bild 1: keine Unterbrechung des Nervus optalmicus. Bild 2: Pfeil: kein Abzweig in den ersten Kiemenbogen. Pfeilspitze: Faserbündel zieht bis in den zweiten Kiemenbogen. Bild 3: Pfeil: Faserbündel des IX. Gehirnnerven zieht über die Ansatzlinie der Kiemenbögen, Pfeilspitze: gut entwickelte dorsale Wurzel.

3.4. 'Whole-immuno-staining' (WIS) der Neuralleistenzellen

3.4.1. Ex-vivo-Embryonen

Embryonen des Gestationstages 10,5 wurden aus den Muttertieren gewonnen. Das CRABP-I-Antigen (CRABP-I - cellular retinoic acid binding protein 1) auf den Neuralleistenzellen wurde mit einem primären Antikörper markiert, um die Wanderung der Neuralleistenzellen (NCCs) während der Embryonalentwicklung nachvollziehen zu können.

In Vorversuchen wurden die methodischen Parameter variiert, um die starke Färbung des Hintergrunds zu verringern und somit eine eindeutige Aussage zu erhalten.

Variiert wurde vor allem bei der Inkubation der Antikörper: die Inkubationszeit und die Konzentration des Antikörpers wurden mehrfach und in verschiedenen Kombinationen verändert, sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper wurden einmal gewechselt, die Inkubation wurde mit und ohne Triton vorgenommen, sie fand außerdem in unterschiedlichen Flüssigkeitsmengen und Gefäßen statt und das Gefäß wurde entweder in Ruhe belassen oder permanent mit unterschiedlichen Geräten und Intensitäten bewegt. Die Konzentration von Triton X-100 wurde variiert und versuchsweise Saponin eingesetzt. Als Färbelösungen wurde 4-Chloro-1-Naphthol und versuchsweise Diaminobenzidin verwendet. Variationen gab es auch bei der für die Auswaschung des Antikörpers gewählten Zeitspanne.

Die besten Ergebnisse wurden bei der oben beschriebenen Methodik (Kapitel 2.3.) erzielt. Trotzdem blieb eine Hintergrundfärbung bestehen, die die eindeutige Auswertung der Embryonen erschwerte. Die Überprüfung von Antikörpern dreier verschiedenen Hersteller erbrachte keine Minderung der unspezifischen Färbung der CRABP-I AK. Daher sind die im Folgenden dargestellten Ergebnisse der NCC-Färbung, nur als hinweisende Daten auf das Potential der Methodik zu verstehen. Valide Daten, die eine Beurteilung der Effekte der Testsubstanzen ermöglichen, waren im Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht möglich. Die Ergebnisse liefern die Grundlage für weiterführende Arbeiten anderer am Institut.

Hauptaugenmerk wurde auf den Wanderungsweg der Neuralleistenzellen gelegt. Diese ziehen in Strängen aus den Rhombomeren zwei, vier und sechs entsprechend in den ersten, den zweiten und die folgenden (zu diesem Entwicklungszeitpunkt noch nicht sichtbaren) Kiemenbögen. Skizze 8 soll die Verhältnisse verdeutlichen.

Skizze 8: Neuralleistenzellen bei Ex-vivo-Embryonen am Gestationstag 10,5



Legende: Schematisch dargestellt werden die Neuralleistenzellen im Kopfbereich eines Ex-vivo-Embryos am Gestationstag 10,5. Es ist ein Ausschnitt des rechten Embryos zu sehen. Die Neuralleistenzell-Stränge sind grau gefärbt. Zwischen den Strängen der Rhombomere zwei (r2) und vier (r4) und unterhalb der Ohranlage zum Strang des Rhombomers sechs (r6) sind neuralleistenzellfreie Räume. Außerdem soll die keulenförmige Ausprägung der Stränge deutlich werden. r = Rhombomer. Embryonen entnommen und modifiziert nach Serbedzija et al. (68).

Der erste Neuralleistenzell-Strang zieht vom zweiten Rhombomer in den ersten Kiemenbogen. In etwa 50 Prozent der Fälle wurde ein nach kranial gewölbter Verlauf beobachtet. Nach etwa einem Drittel der Strecke kommt es zu einer Verjüngung des Stranges, was diesem ein keulenförmiges Aussehen verleiht. Der zweite Strang reicht - mit einer Einschnürung etwa auf der Hälfte der Strecke - vom vierten Rhombomer in den zweiten Kiemenbogen. Der dritte Strang zieht aus den sechsten und folgenden Rhombomeren nach ventral. Zwischen den drei Strängen wurden keine NCCs beobachtet. Die ersten beiden Kiemenbögen waren bei *Ex-vivo*-Embryonen zu diesem Zeitpunkt deutlich auszumachen. Ein Foto eines *Ex-vivo*-Embryos ist auf der Seite 86 dargestellt. In drei Versuchen wurden insgesamt 16 Embryonen untersucht.

3.4.2. *Ex-vitro*-Embryonen

Zur Beurteilung der NCCs in der *In-vitro*-Situation wurden Embryonen am Tag 9,5 in die WEC eingesetzt und für 24 Stunden inkubiert. Darüber hinaus wurden Embryonen nach Inkubation in Testansätzen mit ansteigenden Konzentrationen der Positivkontrolle Retinsäure (30, 100, 300 ng/ml Retinsäure) und der Testsubstanz NMP (2500, 3000, 4000 µmol/l NMP) untersucht.

Die *Ex-vitro*-Embryonen der Lösungsmittelkontrolle waren kleiner als die *Ex-vivo*-Embryonen desselben Alters und der kaudale Rumpfabschnitt lag noch über den Rücken gekrümmt. Es war nur der erste Kiemenbogen ausgeprägt. Ein Foto eines *Ex-vitro*-Embryos der Lösungsmittelkontrolle ist auf Seite 86 gezeigt.

Die Kontrollsituation des CRABP-I-WIS mit einer gesamten Stichprobengröße von 26 *Ex-vitro*-Embryonen stellte sich folgendermaßen dar:

Die Wanderung der NCCs entsprach bei 16 der Embryonen der oben beschriebenen *Ex-vivo*-Situation (siehe Kapitel 3.4.1.) Bei den anderen Embryonen kam es vereinzelt zu Variationen, die wie folgt aussahen:

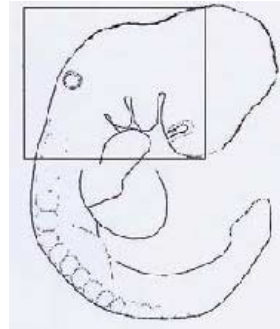
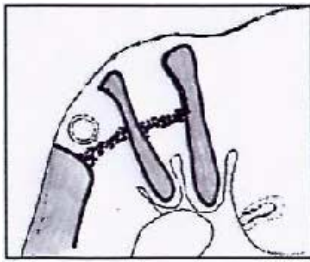
- Der erste Neuralleistenzell-Strang beschreibt einen Bogen sehr weit nach kranial
- Der zweite Strang ist unterbrochen
- Der zweite Strang ist an der entsprechenden Stelle nicht verjüngt und ventral schmal zulaufend
- Der zweite Strang ist ventral nach kaudal erweitert

3.4.3. *Ex-vitro*-Embryonen - nach Exposition gegenüber *all-trans* Retinsäure

Die Fotos der Embryonen sind auf der Seite 86 dargestellt.

Bei 30 ng/ml Retinsäure lösten sich aus dem zweiten Neuralleistenzell-Strang einzelne Zellen aus dem Verband und mündeten nach kranial oder nach kaudal in den jeweilig benachbarten Wanderungsweg der NCCs ein. Zur Verdeutlichung wurde diese Variation skizziert (Skizze 9). Dies wurde bei sechs von zehn Embryonen beobachtet. Im ersten Versuch gab es einen Embryo, bei dem diese beiden Variationen gleichzeitig auftraten. Im Wiederholungsversuch wurden nur nach kaudal abzweigende Zellen beobachtet.

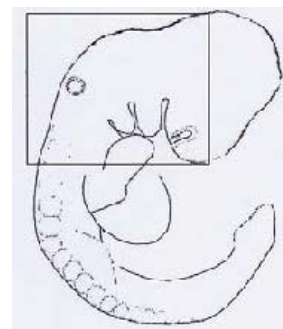
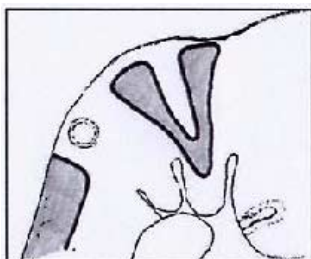
Skizze 9: Neuralleistenzellen nach Exposition von Embryonen gegenüber 30 ng/ml *all-trans* Retinsäure über 24 Stunden in der WEC



Legende: Schematisch dargestellt werden die Neuralleistenzellen im Kopfbereich eines Embryos nach 24 Stunden in Kultur exponiert gegenüber 30 ng/ml Retinsäure. Es ist ein Ausschnitt des rechten Embryos zu sehen. Die Neuralleistenzell-Stränge sind grau gefärbt. Zwischen den Strängen der Rhombomere zwei (r2) und vier (r4) und unterhalb der Ohranlage zum Strang des Rhombomers sechs (r6) sind einzelne Neuralleistenzellen zu sehen. Embryonen entnommen und modifiziert nach Serbedzija (68).

Unter Einfluss von 100 ng/ml Retinsäure wurde bei 60% der Embryonen eine Konvergenz des ersten und zweiten Stranges beobachtet. Die Wege der Zellen vereinigten sich dabei am Ansatz des ersten Kiemenbogens (siehe Skizze 10). Außerdem zweigten bei einem von acht Embryonen NCCs nach kranial und nach kaudal und bei einem weiteren lediglich nach kranial ab.

Skizze 10: Neuralleistenzellen nach Exposition von Embryonen gegenüber 100 ng/ml *all-trans* Retinsäure über 24 Stunden in der WEC



Legende: Schematisch dargestellt werden die Neuralleistenzellen im Kopfbereich eines Embryos nach 24 Stunden in Kultur exponiert gegenüber 100 ng/ml Retinsäure. Es ist ein Ausschnitt des rechten Embryos zu sehen. Die Neuralleistenzell-Stränge sind grau gefärbt. Die Stränge der Rhombomere zwei (r2) und vier (r4) nähern sich zum ersten Kiemenbogen hin an und die Wege der Zellen vereinigen sich an der Ansatzlinie des Kiemenbogens. Embryonen entnommen und modifiziert nach Serbedzija et al. (68).

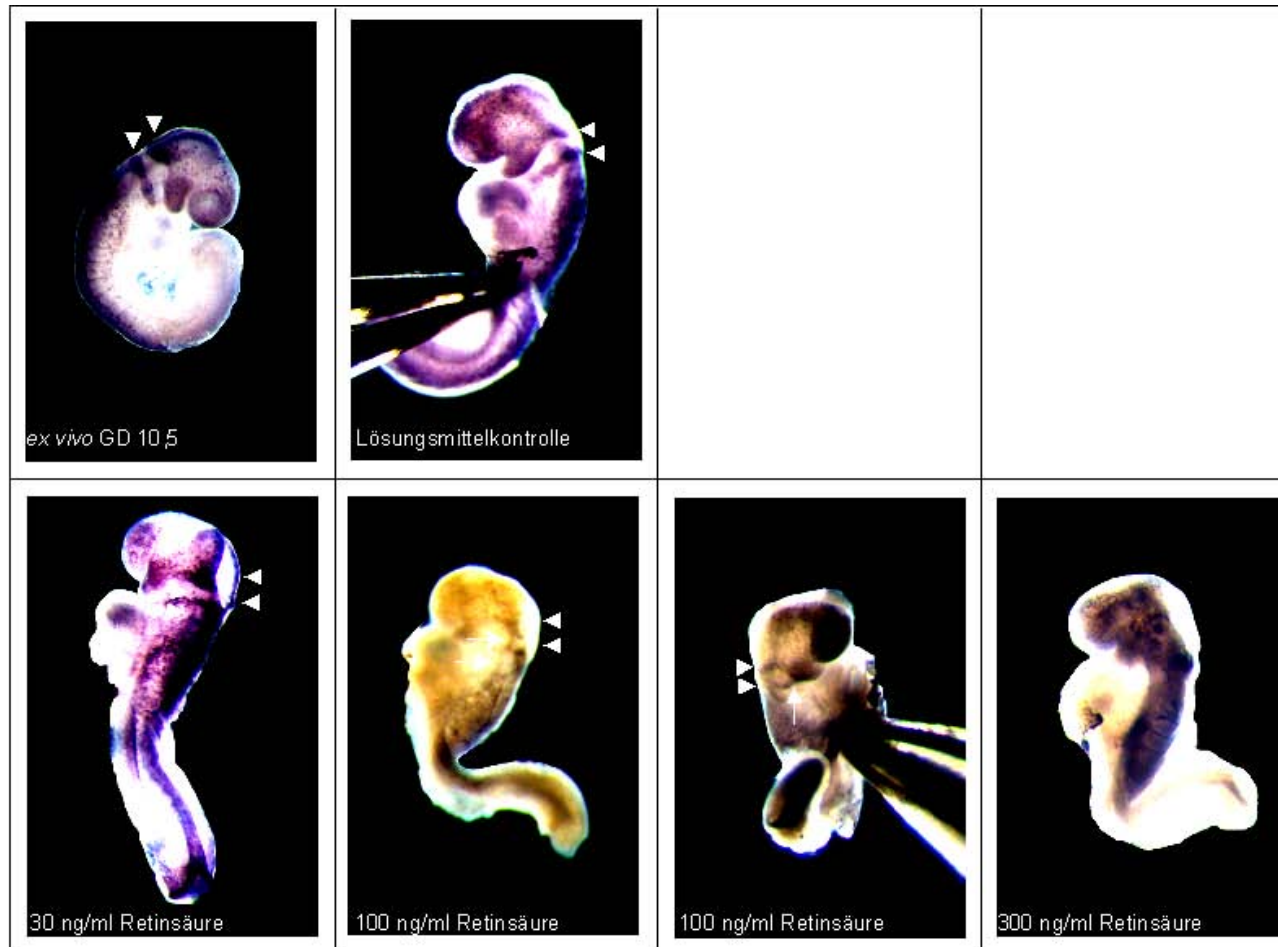
Nach Färbungen der Embryonen exponiert gegenüber 300 ng/ml Retinsäure zeigte sich ein ungeordnetes und „chaotisches“ Erscheinungsbild der Neuralleistenzellen, so dass eine klare Zuordnung zu den entsprechenden Rhombomeren und Strängen nicht mehr möglich war.

Allgemein fiel auf, dass mit steigenden Konzentrationen der Retinsäure die Färbung der Neuralleistenzellen immer schlechter wurde, in dem Sinne, dass diese sich immer undeutlicher vom Hintergrund abhoben.

3.4.4. *Ex-vitro*-Embryonen - nach Exposition gegenüber NMP

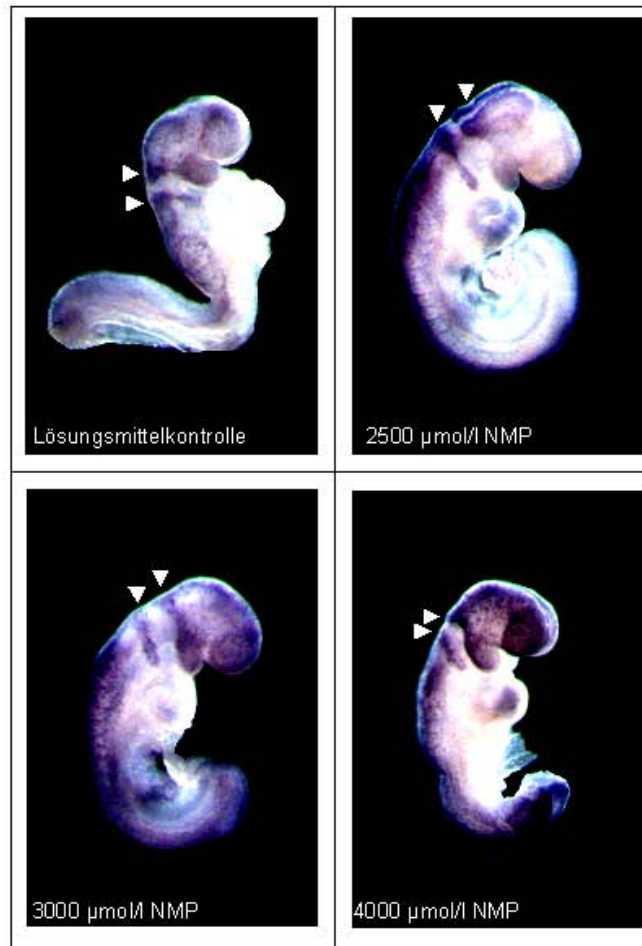
Die Wanderungen der Neuralleistenzellen entsprachen denen der Lösungsmittelkontrolle, es wurden keine Effekte beobachtet. Die Fotos dieser Embryonen sind auf Seite 87 dargestellt.

Darstellung der Neuralleistenzellen bei Embryonen *ex vivo*, *ex vitro* und nach *In-vitro*-Exposition gegenüber Retinsäure



Legende: Abbildungen von Embryonen nach dem WIS mit dem CRABP-I-Antikörper. Maßstab des Embryos *ex vivo*: 1 mm. Maßstab der Embryonen *ex vitro*: 1 mm. Pfeilspitzen: erster und zweiter Neuralleistenzell-Strang. Waagerechte Pfeile: Neuralleistenzellen (NCCs) zwischen dem ersten und dem zweiten und zwischen dem zweiten und dem dritten Neuralleistenzell-Strang. Senkrechter Pfeil: Konvergenz des ersten und des zweiten Neuralleistenzell-Stranges, GD=Gestationstag.

Darstellung der Neuralleistenzellen bei Embryonen *ex vitro* nach Exposition gegenüber NMP



Legende: Abbildungen von Embryonen nach dem WIS mit dem CRABP-I-Antikörper. Alle Embryonen wurden 24 Stunden in verschiedenen Konzentrationen NMP inkubiert. Maßstab der Embryonen: 1 mm. Pfeilspitzen: Erster und zweiter Neuralleistenzell-Strang.