

## **4. Diskussion**

### **4.1. NMP - als verantwortliche Substanz für die Embryotoxizität**

In der WEC wurde die Embryotoxizität von NMP und seinen Metaboliten untersucht. Embryonen exponiert gegenüber NMP und 5H-NMP zeigten dabei Abnormitäten ab 3000 µmol/l bzw. 10000 µmol/l. Diese Konzentrationen sind unter Versuchsbedingungen und unter Berücksichtigung der Pharmakokinetik von NMP in der Ratte möglich. Bei Exposition gegenüber MSI und 2H-MSI kam es nur bei retardierten Embryonen zu Abnormitäten in Konzentrationen, die *in vivo* nicht erreicht werden können, ohne dass die Ausgangssubstanz NMP und der Metabolit 5H-NMP gleichzeitig in toxischen Konzentrationen vorliegen würden. Diese Tatsache, dass durch NMP und 5H-NMP im Gegensatz zu MSI und 2H-MSI einzelne Organanlagen dysproportional stark im Vergleich zu der Gesamtentwicklung des Embryos geschädigt werden, spricht für ein spezifisches embryotoxisches Potential von NMP und 5H-NMP und für ein generell embryotoxisches Potential von MSI und 2H-MSI.

Konzentrationen, die erste negative Effekte auf die Wachstums- und Differenzierungsparameter hatten, waren bei NMP niedriger als bei 5H-NMP. Den Substanzen wurden entsprechend ihrer Embryotoxizität in der WEC Ränge zugeteilt (siehe Kapitel 3.2.). Hierbei lag NMP auf Rang 1 und 5H-NMP auf Rang 2.

Diese Ergebnisse der *In-vitro*-Versuche sprechen für NMP als die Substanz, die für die *in vivo* beobachtete Embryotoxizität ausschlaggebend ist. Untermuert wird dies durch folgende pharmakokinetische Daten, die in Kapitel 1.1.3 näher erläutert wurden. NMP wird schnell dermal und per inhalationem in den Körper aufgenommen und nur in geringem Maße an Serumprotein gebunden.

Die 5H-NMP-Konzentration, die erste negative Effekte auf die Wachstums- und Differenzierungsparameter der in der WEC exponierten Embryonen hatte, lag zwei- bis dreifach höher als die entsprechende NMP-Konzentration. Da 5H-NMP nicht im Körper akkumuliert, würde diese Konzentration erst bei einer sehr hohen NMP-Ausgangskonzentration erreicht werden.

### **4.2. NMP - verglichen mit anderen Lösungsmitteln**

NMP bewirkte in der WEC vornehmlich Abnormitäten im Bereich des Kopfes: dieser war im Vergleich zum Körper unproportional verkleinert, seine Form war asymmetrisch, die Augen erschienen dorsoventral abgeflacht, die Nasenplakoden traten hervor und es wurden Hämorrhagien gesehen. Außerdem fehlte häufig der Schluss des kranialen Neuroporus.

Ethanol als ein weit verbreitetes Lösungsmittel induziert ähnliche Effekte in der WEC an Mäuseembryonen: offener kranialer Neuroporus, Abnormitäten des optischen Systems und des Vorderhirns (79), Hypoplasie des Vorderhirns und abnorme Gehirnentwicklung (30).

Der Metabolit Styrenoxid des Lösungsmittels Styren, welches v.a. in der Gummi- und Plastikherstellung verwendet wird, bewirkt in der WEC an Rattenembryonen eine Hypoplasie des Vorderhirns und einen offenen kranialen Neuroporus (23).

Die Lösungsmittel Toluol und Xylol waren in der WEC für Rattenembryonen embryotoxisch. Die Embryonen zeigten ein verkleinertes Telencephalon (9).

Wurden Ratten in der Trächtigkeit (Gestationstag 7 bis 20) 1800 ppm Toluol in der Atemluft ausgesetzt, so waren die Gehirngewichte der Nachkommen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant erniedrigt (17).

Ein einheitlicher Wirkmechanismus der Lösungsmittel wird vermutet. In der WEC wirken Toluol, Xylol und Benzol additiv, was für diese Theorie spricht (9). V.a. die Interaktion von

Lösungsmitteln mit der Zellmembran wird diskutiert. Die spezifische Neurotoxizität kann über Veränderungen der Membranfluidität, der ATPase-Aktivität und des intrazellulären Kalziums induziert werden (zusammengefasst in (17)). Untersuchungen mit Toluol zeigten eine Erhöhung der Membrandurchlässigkeit, der Membranfluidität und des reaktiven Sauerstoffs (17).

Oxidativer Stress gilt als Initiator der Apoptose im Nervengewebe. Diese ist bei Nachkommen von Ratten, die mit 1500 ppm Toluol an den Gestationstagen 7 bis 20 über die Atemluft behandelt wurden, verstärkt (36).

Wurden Ratten an den Gestationstagen 7 bis 18 mit 1200 ppm Toluol behandelt, so zeigten die Nachkommen herabgesetzte kognitive Funktionen (28). Gleiches galt für Nachkommen von Ratten, die an den Gestationstagen 7 bis 20 mit 499 ppm des Lösungsmittels Xylol behandelt wurden. Bei ihnen wurden außerdem herabgesetzte vestibuläre Funktionen festgestellt. Die Gehirne dieser Nachkommen waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verkleinert (29).

Ähnliche Effekte (Einschränkungen bei der Bewältigung schwieriger Lernsituationen) wurden von Hass et al. auch für NMP beschrieben (siehe Kapitel 1.1.7) (27).

### **4.3. Begründung für die Wahl des WIS der Gehirnnerven und der Neuralleistenzellen (NCCs)**

Wie bereits erläutert, ist NMP nach diesen *In-vitro*-Ergebnissen die Substanz, die in erster Linie für die *in vivo* beobachtete Embryotoxizität verantwortlich zu sein scheint. Aus diesem Grund wurde nur NMP auf seine Effekte an den Gehirnnerven und den NCCs hin untersucht. Bei NMP – als Lösungsmittel – war eine spezifische neurotoxische Wirkung zu erwarten (siehe Kapitel 4.2.). Abnormitäten, die in der WEC speziell im Bereich des Kopfes beobachtet wurden, sprachen ebenfalls dafür. Abgeklärt werden sollte dieser Verdacht durch das WIS der Gehirnnerven.

In der WEC fiel ab einer Konzentration von 2500 µmol/l NMP eine Umfangsvermehrung kraniodorsal des ersten Kiemenbogens im Bereich des Trigeminalganglions auf. Es handelte sich hierbei aber um eine schlecht zu quantifizierende, subjektive Beobachtung, die oft nur schwer von einer allgemeinen Abnormalität des Kopfes abgegrenzt werden konnte. Zellgruppen, die in diesem Bereich von besonderer Bedeutung sind, sind die NCCs und die Nervenzellen. Deshalb war ein weiteres Ziel des WIS, eine Betroffenheit dieser Zellgruppen eventuell mit der Umfangsvermehrung in Verbindung bringen zu können.

Ab 3000 µmol/l NMP wurde in der WEC die Adhäsion des zweiten Kiemenbogens mit dem ersten und seiner Umgebung beobachtet. Mit Hilfe des WIS sollte die Auswirkung dieser Adhäsion auf die NCCs, beziehungsweise eine ursächliche Beteiligung der NCCs an ihr untersucht werden.

Wie in der Einleitung dieser Arbeit erläutert (siehe Kapitel 1.3) entstehen die Gehirnnerven zu einem Teil aus den NCCs. Aufgrund dieses Zusammenhangs eignet sich die Untersuchung dieser beiden Zellgruppen gut, um eventuell Veränderungen der Gehirnnerven an Hand der Wanderung der NCCs erklären zu können.

### **4.4. Veränderungen der Gehirnnerven induziert durch Ethanol**

Van Maele-Fabry et al. etablierten das hier in modifizierter Form verwendete Nerven-Score System (77;79) in ihrer Veröffentlichung über die Wirkung von Ethanol auf die Nervenstrukturen von Mäuseembryonen. In der WEC exponierten sie Mäuseembryonen gegenüber Ethanol und führten das WIS mit dem 2H3-Neurofilament-Antikörper durch. Van Maele-Fabry et al. beobachteten bei 10,5 Tage alten Mäuseembryonen, die in der WEC gegenüber 4 mg/ml Ethanol exponiert wurden, vor allem Defekte am neunten (fehlende dorsale Wurzel, sternförmiger Nerv) und am zehnten (desorganisierte

Wurzelfasern und schmalere Faserbündel) Gehirnnerven. Es waren vor allem die proximalen Anteile betroffen.

Dunty et al. (16) bestätigten bei *In-vitro*-Versuchen diese Ergebnisse teilweise. Sie fanden bei gleich alten Mäuseembryonen vor allem die distalen Anteile der Nerven betroffen: verkürzte bzw. fehlende Abzweige des Nervus trigeminus, ektopische Fasern des Nervus facialis, Fusionen der Ganglien des fünften und siebten Gehirnnerven, fehlende dorsale Wurzel des Nervus glossopharyngeus, Verschmelzungen der Wurzeln des neunten und zehnten Gehirnnerven und desorganisierte dorsale Wurzeln des Nervus vagus.

Da die nervenschädigende Wirkung von Ethanol in beiden Publikationen hinreichend gezeigt und untersucht wurde, wurde in der hier vorgelegten Arbeit Ethanol als Positivkontrolle gewählt und es wurde lediglich in einer Konzentration (3 mg/ml Ethanol) eine aussagekräftige Stichprobengröße verwendet. Bei 3 mg/ml Ethanol lagen dabei leicht verminderte Nerven-Score Werte vor. Auffällig war vor allem der Nervus facialis, dessen Fasern bei fast der Hälfte der Embryonen nicht über die Ansatzlinie der Kiemenbögen hinausreichte. Bei 6 mg/ml Ethanol waren die Embryonen retardiert und die Entwicklung der Nerven verzögert. V.a. der Nervus vagus war nur noch schwer nachvollziehbar.

In der WEC mit Rattenembryonen wurde eine Hemmung der Nervenentwicklung durch Ethanol beobachtet. Abnormitäten wie sie in der Literatur beschrieben wurden, konnten aber in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Eventuell können Übereinstimmungen erst ab größeren Stichproben gefunden werden. In beiden Publikationen wurden für die Versuche Mäuseembryonen verwendet. Es besteht die Möglichkeit, dass sich bei Rattenembryonen die durch Ethanol bedingten Veränderungen nicht so deutlich oder in anderer Form niederschlagen. Dies zeigte sich bei Versuchen mit Valproinsäure: Traten bei Gofflot et al. (22) nach Behandlung von Mäuseembryonen mit Valproinsäure deutliche Effekte an den Gehirnnerven auf, so war dies laut Menegola et al. (47) bei Rattenembryonen nicht der Fall. Bisher wurde zwar ein unterschiedliches Muster der adversen Effekte embryotoxischer Substanzen an den sich entwickelnden Nervenstrukturen vermutet (77;78), aber eine mechanistische Erklärung hierfür liegt noch nicht vor.

#### **4.5. Veränderungen der NCCs induziert durch all-trans Retinsäure**

Mulder et al. (52) behandelten tragende Mäuse am Gestationstag 9,0 oral mit Retinsäure und gewannen am Tag 9,5 die Embryonen für das WIS der NCCs. Sie dokumentierten desorganisierte Ströme von Zellen, die aus dem vierten Rhombomer in den ersten Kiemenbogen zogen. Aus *In-vivo*-Versuchen mit Affen, die gegenüber Retinsäure exponiert wurden, gewann man die Embryonen am Gestationstag 100,0 (81). Es zeigte sich eine Aufteilung des NCC-Stranges aus dem vierten Rhombomer: ein Teil der Zellen mündete in den ersten NCC-Strang, ein Teil verschmolz kaudal mit dem dritten NCC-Strang (81). Diese Ergebnisse wurden bei Versuchen mit Hühnerembryonen bestätigt. Dabei wurde außerdem bei höheren Retinsäure-Konzentrationen eine gänzlich chaotische Wanderung der NCCs beschrieben (20). Lee et al. (40) berichteten nach Versuchen mit Rattenembryonen, die 48 Stunden in der WEC unter Retinsäureeinfluss inkubiert wurden, von einer Konvergenz des ersten und zweiten Neuralleistenzell-Stranges.

In der hier vorgestellten Arbeit migrierten bei etwa einem Drittel der gegenüber 30 ng/ml Retinsäure exponierten Rattenembryonen NCCs aus dem zweiten NCC-Strang nach kranial bzw. nach kaudal. Bei gegenüber 100 ng/ml Retinsäure exponierten Embryonen trat in 60% der Fälle eine Konvergenz der Neuralleistenzell-Stränge aus dem zweiten und vierten Rhombomer auf. Bei gegenüber 300 ng/ml Retinsäure exponierten Embryonen war in 90% der Fälle ein gänzlich chaotisches Bild zu beobachten.

Die in der hier vorgelegten Arbeit dargestellten Befunde stehen folglich in Übereinstimmung mit der Literatur. Es wurde außerdem gezeigt, dass mit Hilfe des WIS

Veränderungen der Wanderung der NCCs dargestellt werden könnten. Durch die Kreuzreaktionen der drei ausgetesteten CRABP-I Antikörper mit den embryonalen Strukturen der Rattenembryonen während der Organogenese, ist eine ungestörte Beurteilung der NCC's nicht möglich. Daher waren nur Veränderungen extremer Ausprägungen erkennbar.

#### **4.6. Veränderungen der Gehirnnerven induziert durch NMP**

An den Gestationstagen 10,0 bis 12,0 wurden *Ex-vivo*-Embryonen entnommen, und die Gehirnnerven wurden mittels des WIS dargestellt. Das mit Hilfe dieser Embryonen modifizierte Nerven-Score System nach Van Maele-Fabry et al. (77;79) spiegelt die chronologische Entwicklung der Gehirnnerven wieder (Kapitel 2.2.3).

Effekte, die beim WIS mit *Ex-vitro*-Embryonen beobachtet wurden, konnten so mit der physiologischen Entwicklung verglichen werden.

Ab dem Gestationstag 11,0 waren vor allem die kranialen Gehirnnerven deutlich zu differenzieren. Erst ab Tag 11,5 war dies auch für die kaudalen Nerven möglich.

Der Nervus trigeminus zeigte bei 42% der gegenüber 4000  $\mu\text{mol/l}$  NMP exponierten Embryonen eine Unterbrechung, die weder bei *Ex-vivo*-Embryonen noch bei Embryonen der Lösungsmittelkontrolle gesehen wurde.

Bei der physiologischen Entwicklung des Nervus facialis in der Embryogenese bilden sich zuerst Fasern, die in den zweiten Kiemenbogen ziehen. Erst wenn diese über die Ansatzlinie des Kiemenbogens reichen, bilden sich Fasern, die in Richtung des ersten Kiemenbogens ziehen. Nach Exposition der Embryonen gegenüber NMP in der WEC reichten die ventralen Fasern nicht über die Ansatzlinie des Kiemenbogens, es waren aber schon Fasern zu sehen, die zum ersten Kiemenbogen abzweigten. Eine mögliche Erklärung wird im folgenden Kapitel gegeben.

Bei der physiologischen Entwicklung des Nervus glossopharyngeus bilden sich - bei einer retardierten dorsalen Wurzel - zuerst Fasern in den zweiten Kiemenbogen. Anschließend entwickelt sich die dorsale Wurzel weiter. Bei Embryonen exponiert gegenüber 4000  $\mu\text{mol/l}$  NMP gelangten die ventralen Fasern nicht in den Bereich der Kiemenbögen, die dorsale Wurzel war aber gut entwickelt.

Die beobachteten Veränderungen dieser drei Nerven wurden bei *Ex-vitro*-Embryonen nicht beobachtet und könnten deshalb als Effekte induziert durch NMP beschrieben werden.

Es ist nicht auszuschließen, dass die beobachteten Defekte und Abnormitäten im Verlauf der weiteren Entwicklung *in vivo* repariert würden. Es muss bedacht werden, dass *In-vitro*-Methoden nicht die Möglichkeit zur Erfassung einer eventuellen Reversibilität oder Heilung von beobachteten Effekten geben.

#### **4.7. Ein Vergleich der Morphologie mit den im WIS gefundenen Effekten**

Embryonen, die in der WEC für 48 Stunden gegenüber NMP exponiert wurden, zeigten ab 3000  $\mu\text{mol/l}$  NMP erste signifikante Veränderungen bei den Werten der Differenzierungs- und Wachstumsparameter sowie vereinzelte Abnormitäten. Wurden die Embryonen für 62 Stunden in der WEC gegenüber NMP exponiert, so ergaben grobmorphologische Betrachtungen Abnormitäten v.a. im Bereich des Kopfes und eine Abnahme der Somitenanzahl und der Scheitel-Steiß-Länge bereits ab 2500  $\mu\text{mol/l}$  NMP. Ein Grund für diese erhöhte Empfindlichkeit bei längeren Inkubationszeiten kann sein, dass gleichzeitig eine längere Expositonszeit der Embryonen vorlag oder dass ab dem Gestationstag 11,5 eine besonders sensible Zeitspanne für die Effekte von NMP beginnt. Möglicherweise wird sie auch von der schlechter werdenden Durchblutung und Gefäßarchitektur des

Dottersacks und der zusätzlich durch die Größe des Embryos bedingten unzureichenden Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen verursacht. Dadurch reagieren diese bereits geschwächten Embryonen noch empfindlicher auf toxische Agentien.

Bei dem WIS der Gehirnnerven nach 62 Stunden Kultur konnten beim Nervus facialis und beim Nervus glossopharyngeus erst ab 4000  $\mu\text{mol/l}$  NMP zu signifikanten Veränderungen des Nerven-Scores beschrieben werden. In derselben Konzentration traten auch die ersten Abnormitäten der Gehirnnerven auf.

Bei 42% der Embryonen, die für 62 Stunden gegenüber 4000  $\mu\text{mol/l}$  NMP exponiert wurden, wurde mit Hilfe des WIS beobachtet, dass bei Unterbrechung des Nervus ophthalmicus eine bullöse Hervorwölbung im Bereich des Trigeminalganglions vorlag.

Bei der grobmorphologischen Betrachtung der Umfangsvermehrung in der WEC war nicht auszuschließen, dass es sich dabei um einen sekundären Veränderung infolge des abnormen Kopfes handelte. Die Ergebnisse des WIS geben einen Hinweis darauf, dass es sich bei der Umfangsvermehrung um ein unabhängiges Geschehen im Zusammenhang mit der gestörten Entwicklung der darunterliegenden Nervenstrukturen stehen könnte. Dies gilt jedoch nicht als gesichert, weshalb die Umfangsvermehrung nur als Variation und nicht als Abnormität gewertet wurde.

Ab 3000  $\mu\text{mol/l}$  NMP lag bei Embryonen der WEC eine Adhäsion des zweiten Kiemenbogens mit dem ersten und mit seiner Umgebung vor.

Die physiologische Entwicklung des Kiemenbogens ist ein, für die weitere Entwicklung der kraniofazialen Strukturen, wichtiger Prozess. Veränderungen der Kiemenbögen haben oft schwerwiegende Folgen, und sie führen in den meisten Fällen zu bleibenden Schäden (72). In diesem Fall kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei der beobachteten Adhäsion der Kiemenbögen um eine vorübergehende Veränderung handelt. Sie könnte sich im Laufe der weiteren Embryogenese zurückbilden und hätte dann keine weitere Relevanz. Außerdem bleibt unklar, ob es sich um eine Adhäsion im wörtlichen Sinne handelt. Es kann sich tatsächlich eine Gewebsbrücke gebildet haben. Möglicherweise fand aber auch keine ausreichende Trennung des Kiemenbogens von seiner Umgebung durch Zellflucht oder Zelltot statt.

Mit Hilfe des WIS wurde gezeigt, dass bei 75% der gegenüber 4000  $\mu\text{mol/l}$  NMP exponierten Embryonen das ventrale Faserbündel des Nervus facialis und bei 33% der Embryonen das des Nervus glossopharyngeus nicht über die Ansatzlinie der Kiemenbögen reichten. Eventuell besteht hier ein Zusammenhang mit der Adhäsion der Kiemenbögen.

Nach 24 Stunden Exposition gegenüber NMP konnten weder grobmorphologisch noch durch das WIS der Neuralleistenzellen Veränderungen an den Embryonen festgestellt werden. Eine Beteiligung der NCCs an den beobachteten Veränderungen der Gehirnnerven kann trotzdem nicht ausgeschlossen werden, da nicht vermeidbare Kreuzreaktionen der derzeitiger kommerziell verfügbaren Antikörper für CRABP-I eine hohe Sensitivität der Auswertung mit der WIS verhinderten. Die fehlenden Effekte könnten aber auch mit der kurzen Kontaktzeit in Zusammenhang stehen, beziehungsweise mit dem Fehlen einer für NMP sensiblen Zeitspanne der Embryonen an den Tagen 9,5 bis 10,5.

Da das WIS der Neuralleistenzellen aber mit Hilfe des hier beschriebenen Protokolls nicht bei älteren Embryonen eingesetzt werden konnte, war eine verlängerte Kulturdauer nicht möglich.

Zwar verliert das WIS der Neuralleistenzellen durch die variierende Kontrollsituation und die oft starke Hintergrundfärbung der Embryonen an Sensitivität, sie detektierte aber trotzdem Veränderungen durch Retinsäure. Für eventuelle feinere Veränderungen an den NCCs durch NMP müsste die Methode noch optimiert werden.