

## 5. Anhang

### 5.1. Abkürzungen

AK	Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Calcium
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d	Tag
d.	destilliert
dd.	doppelt destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECVAM	‘European Centre for the Validation of Alternative Methods’
ETOH	Ethanol
FCS	Foetales Kälberserum
GD	Gestationstag
h	Stunde
HBSS	Hank’s Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
5H-NMP	5-Hydroxy-N-Methyl-2-pyrrolidon
2H-MSI	2-Hydroxy-N-Methylsuccinimid
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoxyd
IC <sub>Max</sub>	Niedrigste in der WEC getestete Konzentration, bei der 100% der Embryonen abnorm sind
IC <sub>NOAEL</sub>	Höchste in der WEC getestete Konzentration, bei der keine negativen Effekte auf die erhobenen Parameter beobachtet werden
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
KB	Kiemenbogen
kPa	Kilopascal
l	Liter
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen der Erythrozyten
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MSI	N-Methylsuccinimid
MW	Mittelwert
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
NCC	Neural Crest Cell = Neuralleistenzelle
NF	Neurofilament
nl/min	Normliter pro Minute
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
ppm	parts per million
RT	Raumtemperatur (22°C ± 3°C)

Stdabw	Standardabweichung
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
WEC	'Whole Embryo Culture'
SPF	Spezifisch pathogen-frei

## 5.2. Geräte und Materialien

### 5.2.1. Geräte

Gerät	Firma	Modell	Serien- bzw. Fabrikat-Nr.	Besonderheiten
<b>Autoklav</b>	Tuttnauer, New York, USA	3870 ELV PV	9801125	Gefäße und Instrumente: 135°C, 30 Min autoklavieren, 20 Min trocknen, 100 kPa Flüssigkeiten: 121°C, 30 Min, 100 kPa
<b>Analysewaage</b>	Sartorius, Göttingen, Deutschland	BP210D	50304874	
<b>Bördelwerkzeug</b>	VWR, Darmstadt, Deutschland		549-0073 + 548-0074	
<b>Dekapitator (small)</b>	Harvard Apparatus, Holliston, USA		55-0012	
<b>Gasmischanlage</b>	Witt, Witten, Deutschland		KM60-3SE SO	
<b>Gasflaschen</b>	Linde AG, München, Deutschland			O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub>
<b>Homogenisator</b>	IKA Werk, Staufen, Deutschland	RW 18	29017	Kunststoff-Pistill passend für 1,5 ml Reaktionsgefäße
<b>Heizblock (Thermomixer comfort)</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland		535501409	
<b>Kamera</b>	Nikon, Tokyo, Japan	E995	4519584	
<b>Kaltlichtquelle</b>	Zeiss, Jena, Deutschland	KL1500 electronic	495054- 9801-000	
<b>Mikroinjektor (Cell Tram Air)</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland		5176000. 017	
<b>Mikroskop</b>	Zeiss, Jena, Deutschland		473012-9902	
<b>Okkulometer (Okular W 25x/10)</b>	Zeiss, Jena, Deutschland		464003	
<b>Oxymeter (Oxycom 100D)</b>	Dräger, Lübeck, Deutschland	6803255	2070	
<b>Plattenphotometer (für Proteinbestimmung) Microplate Reader</b>	BioRad, Hercules, USA	3550	10368	

<b>PC Software für Plattenphotometer</b>	BioRad, Hercules, USA		170-6617	Microplate Manager 4.0 PC Data Analysis Software
<b>Rollerschranke - Inkubatoren</b>	Memmert, Schwabach, Deutschland	Typ B15	812940 802527 861507	
<b>Rührer (Combimag RCO)</b>	IKA Werk, Staufen, Deutschland	RCO (0-110 Upm)	27261	
<b>Reinraumbank (Lamin Air)</b>	Heraeus	TL 2448		
<b>Stereolupe</b>	Zeiss, Jena, Deutschland	Stemi SC 8		Okulare auf 10-facher Vergrößerung, Brennweite 100
<b>Schüttler</b>	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland	KS 125 basic (0-1100 Upm)	780239	
<b>Vortexer</b>	IKA Werk, Staufen, Deutschland	VF2 (max. 2500 Upm)	340174	
<b>Zentrifuge</b>	Heraeus, Hanau, Deutschland	Minifuge Modell RF		

### 5.2.2. Materialien

Material	Firma	Bezeichnung	Bestell- bzw. Artikel-Nr.	Besonderheiten
<b>Bördelkappen</b>	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	Bördelkappen N20 B/oA	702 37	
<b>Besteck 1: Schere</b>	VWR, Darmstadt, Deutschland	gerade, rostfrei,	233-1224	Länge 145 mm
<b>Besteck 1: Pinzette</b>	VWR, Darmstadt, Deutschland	rostfrei, mit Zähnen 1:2	232-2163	Länge 145 mm
<b>Besteck 2: Schere</b>	VWR, Darmstadt, Deutschland	fein, gebogen	233-1282	Länge 105 mm
<b>Besteck 2: Pinzette</b>	VWR, Darmstadt, Deutschland	rundgebogen	232-2141	Länge 115 mm
<b>Besteck 3: Pinzette</b>	VWR, Darmstadt, Deutschland	nach Dumont gebogen, Typ 7SA, sehr feine Spitze	232-1230	Länge 115 mm
<b>Besteck 4: Pinzette</b>	VWR, Darmstadt, Deutschland	nach Dumont gerade, Typ 5SA, sehr feine Spitze	232-1221	Länge 110 mm

<b>Faltenfilter</b>	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland	Faltenfilter Lot: Duo0251-1 Ref.Nr.:10312747	604 1/2	Durchmesser 185 mm
<b>Glasflaschen</b>	VWR, Darmstadt, Deutschland	verschließbare Glasflaschen	215-2011	40 mm hoch, 1,2 mm Durchmesser
<b>Kulturflaschen</b>	All tech, Lexington, USA	50 ml Serum Vials	66101	
<b>Kanülen</b>	Braun, Melsungen, Deutschland	Einmal- Injektionskanüle, 0,90 x 40 mm	301300	Begasung zu Beginn der Inkubation
<b>Kanülen</b>	Braun, Melsungen, Deutschland	Einmal- Injektionskanüle, 1,20 x 40 mm	4665120	Begasung nach 36 h
<b>Kanülen</b>	Braun, Melsungen, Deutschland	100 Sterican, 0,90 x 70 mm	4665791	Herstellung des Kulturmediums
<b>Mikroinjektions- kapillaren</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Femotip II	5242 957.000	
<b>Sterilfilter</b>	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland	FP 30/0,2 CA-S	10462200	Rotrand
<b>96-Well-Platten</b>	Greiner bio- one, Kremsmünster Österreich	PS Microplatte 96 well (F), unsteril	655101	für Proteinbestimmung

### 5.2.3. Chemikalien

Chemikalien	Firma	Bezeichnung	Art.Nr.	Besonderheiten	Lagerung
<b>Anti-Maus-Ig- Peroxidase</b>	Jackson Immuno Research, Wets Grove USA		115-035- 062	Ig-Gehalt: 0,8 mg/ml, 1:2 verdünnt in Glycerol	-20°C
<b>Anti-Ziegen-Ig- Peroxidase</b>	Sigma, St. Louis, USA	Lot 034K4858	A 5420	Ig-Gehalt: 7,3 mg/ml	-20°C
<b>Alkohol</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland	70%iger, vergällt, ≥99,8%	K928.2		RT
<b>Ammonium- chlorid</b>	Fluka - Sigma, St. Louis, USA	NH <sub>4</sub> Cl	09700		RT

<b>Antikörper 2H3</b>	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA	Strain BALB/c IgG1 Isotyp		Monoklonaler Antikörper, Ig-Gehalt: 200 µg/ml)	4°C
<b>Antikörper CRABP-I</b>	Santa-Cruz, Santa Cruz, USA	SC-10061	E 0903	Polyklonaler Antikörper, Ig-Gehalt: 200 µg/ml	4°C
<b>BioRad-Lösungen</b>	BioRad, Hercules, USA	BioRad Dc Protein Assay Reagenz B, S, A	B: 500-0114 S: 500-0115 A: 500-0113		RT
<b>BSA</b>	Paesel + Lorei, Duisburg, Deutschland	10 g Serum-Albumin vom Rind, reinst, lyophilisiert	04-100-812	Herstellung der Standardverdünnungen: 1,5; 1,15; 0,888; 0,683; 0,525; 0,404; 0,311 mg/ml, Lagerung bei –20°C	4°C
<b>4-Chloro-1-Naphthol</b>	Sigma, St. Louis, USA	christalline	C88905G		-20°C
<b>Ethanol</b>	J.T. Baker, Phillipsburg, USA	Ethanol absolute	8228		RT
<b>FCS</b>	HyClone, Logan, USA	ANJ19696	SH30071.03		-20°C
<b>Glukose</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland	D(+)-Glucose-Monohydrat	K252528 46831		-20°C
<b>Glycerol</b>	neolab Migge, Heidelberg, Deutschland	Glycerin wasserfrei	4450.0500		RT
<b>HBSS</b>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	Hank's Salzlösung ohne Phenolrot	L2035	mit 0,35 g/l NaHCO <sub>3</sub>	RT
<b>HCl</b>	Merck über VWR, Darmstadt, Deutschland	Salzsäure 32%	100319		RT
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Merck, Darmstadt, Deutschland	30%ig	822287		4°C, dunkel
<b>Isopropanol</b>	Baker, Phillipsburg, USA	2-Propanol	8119		RT
<b>Methanol</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland	reinst	1.0600 8.1000		RT
<b>Methionin</b>	Sigma, St. Louis, USA	L-Methionin	M-2893		-20°C

<b>NaCl</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland	reinst, endotoxin- arm	1.16224. 5000		RT
<b>NaOH</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland	Plätzchen, reinst	1.06482.	Herstellung einer 0,5M- Lösung: M=40 g/mol 2 g NaOH in 100 ml dd. H <sub>2</sub> O	RT
<b>PBS</b>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	L1815 L1825		RT
<b>Paraform- aldehyd</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland	reinst	1.04005		RT
<b>Skim milk</b>	BioRad, Hercules, USA	Blotting Grade Blocker Non- fat Dry milk	170-06404		RT
<b>Serum- mischung</b>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland		S9001		-20°C
<b>Triton X-100</b>	Fluka – Sigma, St. Louis, USA	Solution	93443		RT, dunkel
<b>Tween</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland	R20	9127.1		RT
<b>Tris</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland	Tris(hydroxy- methyl)- aminomethan	8382		RT

### 5.3. Literaturverzeichnis

- (1) Akesson, B., and Jonsson, B. A. (1997) Major metabolic pathway for N-methyl-2-pyrrolidone in humans. *Drug Metab Dispos* **25**(2), 267-269.
- (2) Akesson, B., and Jonsson, B. A. (2000) Biological monitoring of N-methyl-2-pyrrolidone using 5-hydroxy-N-methyl-2-pyrrolidone in plasma and urine as the biomarker. *Scand. J. Work Environ. Health* **26**(3), 213-218.
- (3) Akrill, P., Cocker, J., and Dixon, S. (2002) Dermal exposure to aqueous solutions of N-methyl pyrrolidone. *Toxicol Lett* **134**(1-3), 265-269.
- (4) Anundi, H., Langworth, S., Johanson, G., Lind, M. L., Akesson, B., Friis, L., Itkes, N., Soderman, E., Jonsson, B. A., and Edling, C. (2000) Air and biological monitoring of solvent exposure during graffiti removal. *Int Arch Occup Environ Health* **73**(8), 561-569.
- (5) Bartsch, W., Sponer, G., Dietmann, K., and Fuchs, G. (1976) Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. LD50 of ethanol, diethylacetamide, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, glycerine, N-methylpyrrolidone, polyethylene glycol 400, 1,2-propanediol and Tween 20. *Arzneimittelforschung* **26**(8), 1581-1583.

- (6) Basch, M. L., Garcia-Castro, M. I., and Bronner-Fraser, M. (2004) Molecular mechanisms of neural crest induction. *Birth Defects Res Part C Embryo Today* **72**(2), 109-123.
- (7) Becci, P. J., Knickerbocker, M. J., Reagan, E. L., Parent, R. A., and Burnette, L. W. (1982) Teratogenicity study of N-methylpyrrolidone after dermal application to Sprague-Dawley rats. *Fundam Appl Toxicol* **2**(2), 73-76.
- (8) Bronner-Fraser, M. (1993) Mechanisms of neural crest cell migration. *Bioessays* **15**(4), 221-230.
- (9) Brown-Woodman, P. D., Webster, W. S., Picker, K., and Huq, F. (1994) In vitro assessment of individual and interactive effects of aromatic hydrocarbons on embryonic development of the rat. *Reprod Toxicol* **8**(2), 121-135.
- (10) Brown, N. A., and Fabro, S. (1981) Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology* **24**, 65-78.
- (11) Chisaka, O., Musci, T. S., and Capecchi, M. R. (1992) Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene Hox-1.6. *Nature* **355**(6360), 516-520.
- (12) Choi, D. S., Ward, S. J., Messaddeq, N., Launay, J. M., and Maroteaux, L. (1997) 5-HT<sub>2B</sub> receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development* **124**(9), 1745-1755.
- (13) Clouthier, D. E., Hosoda, K., Richardson, J. A., Williams, S. C., Yanagisawa, H., Kuwaki, T., Kumada, M., Hammer, R. E., and Yanagisawa, M. (1998) Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* **125**(5), 813-824.
- (14) Dencker, L., Annerwall, E., Busch, C., and Eriksson, U. (1990) Localization of specific retinoid-binding sites and expression of cellular retinoic-acid-binding protein (CRABP) in the early mouse embryo. *Development* **110**(2), 343-352.
- (15) Dodd, J., Morton, S. B., Karagogeos, D., Yamamoto, M., and Jessell, T. M. (1988) Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron*. **1**(2), 105-116.
- (16) Dunty, W. C., Jr., Zucker, R. M., and Sulik, K. K. (2002) Hindbrain and cranial nerve dysmorphogenesis result from acute maternal ethanol administration. *Dev. Neurosci.* **24**(4), 328-342.
- (17) Edelfors, S., Hass, U., and Hougaard, K. S. (2002) Changes in markers of oxidative stress and membrane properties in synaptosomes from rats exposed prenatally to toluene. *Pharmacol Toxicol* **90**(1), 26-31.
- (18) Engelhardt, G., and Fleig, H. (1993) 1-Methyl-2-pyrrolidinone (NMP) does not induce structural and numerical chromosomal aberrations in vivo. *Mutat Res* **298**(3), 149-155.
- (19) Flick, B., and Klug, S. (2000) Improvement in standardization of the Whole - Embryo - Culture (WEC): Importance of a more precise staging. *Arch Pharm* **361**(Suppl 4), R 168.

- (20) Gale, E., Prince, V., Lumsden, A., Clarke, J., Holder, N., Maden, M., Giavini, E., Menegola, E., Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbaur, B., Chambon, P., Dolle, P., Lee, Y. M., Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Moon, C. K., Eriksson, U., and Eto, K. (1996) Late effects of retinoic acid on neural crest and aspects of rhombomere. *Development* **122**(3), 783-793.
- (21) Gavalas, A., Studer, M., Lumsden, A., Rijli, F. M., Krumlauf, R., and Chambon, P. (1998) Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* **125**(6), 1123-1136.
- (22) Gofflot, F., Maele-Fabry, G., and Picard, J. J. (1996) Cranial nerves and ganglia are altered after in vitro treatment of mouse embryos with valproic acid (VPA) and 4-en-VPA. *Brain Res Dev Brain Res.* **93**(1-2), 62-69.
- (23) Gregotti, C. F., Kirby, Z., Manzo, L., Costa, L. G., and Faustman, E. M. (1994) Effects of styrene oxide on differentiation and viability of rodent embryo cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **128**(1), 25-35.
- (24) Gustafson, A. L., Dencker, L., and Eriksson, U. (1993) Non-overlapping expression of CRBP I and CRABP I during pattern formation of limbs and craniofacial structures in the early mouse embryo. *Development* **117**(2), 451-460.
- (25) Hall Brian K., and Hörstadius Sven *The neural crest* (1988) Oxford University Press.
- (26) Hass, U., Jakobsen, B. M., and Lund, S. P. (1995) Developmental toxicity of inhaled N-methylpyrrolidone in the rat. *Pharmacol Toxicol* **76**(6), 406-409.
- (27) Hass, U., Lund, S. P., and Elsner, J. (1994) Effects of prenatal exposure to N-methylpyrrolidone on postnatal development and behavior in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **16**(3), 241-249.
- (28) Hass, U., Lund, S. P., Hougaard, K. S., and Simonsen, L. (1999) Developmental neurotoxicity after toluene inhalation exposure in rats. *Neurotoxicol. Teratol* **21**(4), 349-357.
- (29) Hass, U., Lund, S. P., Simonsen, L., and Fries, A. S. (1995) Effects of prenatal exposure to xylene on postnatal development and behavior in rats. *Neurotoxicol. Teratol* **17**(3), 341-349.
- (30) Jing, H., and Li, Y. (2004) Effects of ethanol on mouse embryonic brain development and heat shock protein 73 expression. *Toxicol In Vitro* **18**(5), 601-607.
- (31) Jonsson, B. A., and Akesson, B. (2003) Human experimental exposure to N-methyl-2-pyrrolidone (NMP): toxicokinetics of NMP, 5-hydroxy- N-methyl-2-pyrrolidone, N-methylsuccinimide and 2-hydroxy- N-methylsuccinimide (2-HMSI), and biological monitoring using 2-HMSI as a biomarker. *Int Arch Occup. Environ Health* **76**(4), 267-274.
- (32) Kitchin, K. T., and Ebron, M. T. (1984) Further development of rodent whole embryo culture: solvent toxicity and water insoluble compound delivery system. *Toxicology* **30**(1), 45-57.
- (33) Klug, S. (1991) Whole embryo culture: Interpretation of abnormal development in vitro. *Reprod. Toxicol.* **5**(3), 237-244.



- (34) Klug, S., Lewandowski, C., and Neubert, D. (1985) Modification and standardization of the culture of early postimplantation embryos for toxicological studies. *Arch Toxicol.* **58**, 84-88.
- (35) Klug, S., Lewandowski, C., Wildi, L., and Neubert, D. (1990) Bovine serum: An alternative to rat serum as a culture medium for the rat whole embryo culture. *Toxic. in Vitro* **4**(4-5), 598-601.
- (36) Ladefoged, O., Hougaard, K. S., Hass, U., Sorensen, I. K., Lund, S. P., Svendsen, G. W., and Lam, H. R. (2004) Effects of combined prenatal stress and toluene exposure on apoptotic neurodegeneration in cerebellum and hippocampus of rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **94**(4), 169-176.
- (37) Le Douarin, N. M., Smith, J., and Le Lievre, C. S. (1981) From the neural crest to the ganglia of the peripheral nervous system. *Annu. Rev Physiol* **43**, 653-671.
- (38) Le Douarin, N. M., Ziller, C., and Couly, G. F. (1993) Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo: in vivo and in vitro studies. *Dev Biol* **159**(1), 24-49.
- (39) Lee, K. P., Chromey, N. C., Culik, R., Barnes, J. R., and Schneider, P. W. (1987) Toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP): teratogenic, subchronic, and two-year inhalation studies. *Fundam Appl Toxicol* **9**(2), 222-235.
- (40) Lee, Y. M., Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Moon, C. K., Eriksson, U., and Eto, K. (1995) Retinoic acid stage-dependently alters the migration pattern and identity of hindbrain neural crest cells. *Development* **121**(3), 825-837.
- (41) Ligocka, D., Lison, D., and Haufroid, V. (2003) Contribution of CYP2E1 to N-methyl-2-pyrrolidone metabolism. *Arch Toxicol* **77**(5), 261-266.
- (42) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1), 265-275.
- (43) Malek, D. E., Malley, L. A., Slone, T. W., Elliott, G. S., Kennedy, G. L., Mellert, W., Deckardt, K., Gemhardt, C., Hildebrand, B., Murphy, S. R., Bower, D. B., and Wright, G. A. (1997) Repeated dose toxicity study (28 days) in rats and mice with N-methylpyrrolidone (NMP). *Drug Chem Toxicol* **20**(1-2), 63-77.
- (44) Malley, L. A., Kennedy, G. L., Elliott, G. S., Slone, T. W., Mellert, W., Deckardt, K., Gemhardt, C., Hildebrand, B., Parod, R. J., McCarthy, T. J., and Griffiths, J. C. (1999) 90-day subchronic toxicity study in rats and mice fed N-methylpyrrolidone (NMP) including neurotoxicity evaluation in rats. *Drug Chem Toxicol* **22**(3), 455-480.
- (45) Mark, M., Lufkin, T., Vonesch, J. L., Ruberte, E., Olivo, J. C., Dolle, P., Gorry, P., Lumsden, A., and Chambon, P. (1993) Two rhombomeres are altered in Hoxa-1 mutant mice. *Development* **119**(2), 319-338.
- (46) Menegola, E., Broccia, M. L., Di Renzo, F., Prati, M., and Giavini, E. (2000) In vitro teratogenic potential of two antifungal triazoles: triadimefon and triadimenol. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **36**(2), 88-95.

- (47) Menegola, E., Broccia, M. L., Prati, M., and Giavini, E. (1999) Morphological alterations induced by sodium valproate on somites and spinal nerves in rat embryos. *Teratology* **59**(2), 110-119.
- (48) Midgley, I., Hood, A. J., Chasseaud, L. F., Brindley, C. J., Baughman, S., and Allan, G. (1992) Percutaneous absorption of co-administered N-methyl-2-[<sup>14</sup>C]pyrrolidinone and 2-[<sup>14</sup>C]pyrrolidinone in the rat. *Food Chem Toxicol* **30**(1), 57-64.
- (49) Moiseiwitsch, J. R., and Lauder, J. M. (1995) Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16), 7182-7186.
- (50) Moore, R., and Larue, L. (2004) Cell surface molecules and truncal neural crest ontogeny: A perspective. *Birth Defects Res C Embryo Today* **72**(2), 140-150.
- (51) Morriss-Kay, G., and Tuckett, F. (1985) The role of microfilaments in cranial neurulation in rat embryos: effects of short-term exposure to cytochalsain D. *J. Embryol. exp. Morph.* **88**, 333-348.
- (52) Mulder, G. B., Manley, N., and Maggio-Price, L. (1998) Retinoic acid-induced thymic abnormalities in the mouse are associated with altered pharyngeal morphology, thymocyte maturation defects, and altered expression of Hoxa3 and Pax1. *Teratology* **58**(6), 263-275.
- (53) Nakagawa, S., and Takeichi, M. (1995) Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development* **121**, 1321-1332.
- (54) New, D. A. T. (1978) Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol Rev Camb Philos Soc* **53**(1), 81-122.
- (55) Nichols, D. H. (1981) Neural crest formation in the head of the mouse embryo as observed using a new histological technique. *J Embryol Exp Morphol* **64**, 105-120.
- (56) Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbauer, B., Chambon, P., and Dolle, P. (2000) Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* **127**( 1), 75-85.
- (57) Noden, D. M. (1983) The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev Biol* **96**(1), 144-165.
- (58) Payan, J. P., Beydon, D., Fabry, J. P., Boudry, I., Cossec, B., and Ferrari, E. (2002) Toxicokinetics and metabolism of N-[<sup>14</sup>C]methylpyrrolidone in male Sprague-Dawley rats. A saturable NMP elimination process. *Drug Metab Dispos.* **30** (12), 1418-1424.
- (59) Piersma, A. H. (2004) Validation of alternative methods for developmental toxicity testing. *Toxicol Lett* **149**(1-3), 147-153.
- (60) Piersma, A. H., Genschow, E., Verhoef, A., Spanjersberg, M. Q., Brown, N. A., Brady, M., Burns, A., Clemann, N., Seiler, A., and Spielmann, H. (2004) Validation of the postimplantation rat whole-embryo culture test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Altern. Lab Anim* **32**(3), 275-307.

- (61) Ravn-Jensen, A., Edelfors, S., Hass, U., and Lund, S. P. (1992) The kinetic of N-methylpyrrolidinone in pregnant rats and their foetuses compared with non-pregnant rats. *Toxicology letters (supplement 136)*, Abstract P5/P8.
- (62) Ruberte, E., Friederich, V., Morriss-Kay, G., and Chambon, P. (1992) Differential distribution patterns of CRABP I and CRABP II transcripts during mouse embryogenesis. *Development* **115**(4), 973-987.
- (63) Saillenfait, A. M., Gallissot, F., Langonne, I., and Sabate, J. P. (2002) Developmental toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone administered orally to rats. *Food Chem Toxicol* **40**(11), 1705-1712.
- (64) Saillenfait, A. M., Gallissot, F., and Morel, G. (2003) Developmental toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone in rats following inhalation exposure. *Food Chem Toxicol* **41**(4), 583-588.
- (65) Scott F. Gilbert (2000) The central nervous system and the epidermis. In *Developmental Biology* (Sinauer Associates, I., eds.), Sunderland, Massachusetts: pp 379-389.
- (66) Scott F. Gilbert (2002) Neural crest cells and the axonal specificity. In *Developmental biology* (Sinauer Associates, I., eds.) Sunderland, Massachusetts: pp 411-440.
- (67) Selleck, M. A., and Bronner-Fraser, M. (1996) The genesis of avian neural crest cells: a classic embryonic induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18), 9352-9357.
- (68) Serbedzija, G. N., Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. E. (1992) Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development* **116**(2), 297-307.
- (69) Serbedzija, G. N., Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. E. (1994) Developmental potential of trunk neural crest cells in the mouse. *Development* **120**(7), 1709-1718.
- (70) Smith, A., Robinson, V., Patel, K., and Wilkinson, D. G. (1997) The EphA4 and EphB1 receptor tyrosine kinases and ephrin-B2 ligand regulate targeted migration of branchial neural crest cells. *Curr Biol.* **7**(8), 561-570.
- (71) Solomon, H. M., Burgess, B. A., Kennedy, G. L. J., and Staples, R. E. (1995) 1-Methyl-2-pyrrolidone (NMP): reproductive and developmental toxicity study by inhalation in the rat. *Drug Chem Toxicol* **18**(4), 271-293.
- (72) Starck Dietrich (1975) Nervensystem und Sinnesorgane. In *Embryologie – Ein Lehrbuch auf allgemein biologischer Grundlage*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart: pp 354-387.
- (73) Tan, S. S., and Morriss-Kay, G. M. (1985) The development and distribution of the cranial neural crest in the rat embryo. *Cell Tissue Res.* **240**(2), 403-416.
- (74) Trainor, P., and Krumlauf, R. (2000) Plasticity in mouse neural crest cells reveals a new patterning role for cranial mesoderm. *Re Cell Biology* **2**(2), 96-102.
- (75) Trainor, P. A., Sobieszczuk, D., Wilkinson, D., and Krumlauf, R. (2002) Signalling between the hindbrain and paraxial tissues dictates neural crest migration pathways. *Development* **129**(2), 433-442.

- (76) Ursin, C., Hansen, C. M., Van Dyk, J. W., Jensen, P. O., Christensen, I. J., and Ebbehøj, J. (1995) Permeability of commercial solvents through living human skin. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **56**(7), 651-660.
- (77) van Maele-Fabry, G., Gofflot, F., and Picard, J. J. (1996) Defects in the development of branchial nerves and ganglia induced by in vitro exposure of mouse embryos to mercuric chloride. *Teratology* **53**(1), 10-20.
- (78) van Maele-Fabry, G., Clotman, F., Gofflot, F., Bosschaert, J., and Picard, J. J. (1997) Postimplantation mouse embryos cultured in vitro. Assessment with whole-mount immunostaining and in situ hybridization. *Int J Dev Biol* **41**(2), 365-374.
- (79) van Maele-Fabry, G., Gofflot, F., Clotman, F., and Picard, J. J. (1995) Alterations of mouse embryonic branchial nerves and ganglia induced by ethanol. *Neurotoxicol Teratol* **17**(4), 497-506.
- (80) Verwoerd, C. D., and van Oostrom, C. G. (1979) Cephalic neural crest and placodes. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **58**, 1-75.
- (81) Wei, X., Makori, N., Peterson, P. E., Hummler, H., and Hendrickx, A. G. (1999) Pathogenesis of retinoic acid-induced ear malformations in primate model. *Teratology* **60**(2), 83-92.
- (82) Wells, D. A., and Digenis, G. A. (1988) Disposition and metabolism of double-labeled [3H and 14C] N-methyl-2-pyrrolidinone in the rat. *Drug Metab Dispos.* **16**(2), 243-249.
- (83) Wells, D. A., Thomas, H. F., and Digenis, G. A. (1988) Mutagenicity and cytotoxicity of N-methyl-2-pyrrolidinone and 4-(methylamino)butanoic acid in the Salmonella/microsome assay. *J Appl Toxicol* **8**(2), 135-139.
- (84) White, J. C., Highland, M., Kaiser, M., and Clagett-Dame, M. (2000) Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. *Dev. Biol.* **220**(2), 263-284.
- (85) Yasuda, Y., Itoh, K., Mizuno, N., Konishi, H., and Tanimura, T. (1989) Alterations in migrating cranial neural crest cells in embryos of mice fed retinoic acid. *Anal. Cell. Pathol.* **2**(1), 23-40.
- (86) Ziller, C., Dupin, E., Brazeau, P., Paulin, D., and Le Douarin, N. M. (1983) Early segregation of a neuronal precursor cell line in the neural crest as revealed by culture in a chemically defined medium. *Cell* **32**(2), 627-638.

## 5.4. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Tabelle nach Anundi et al. (4) .....	5
Tab. 2: Pharmakokinetische Parameter von NMP und seinen Metaboliten .....	6
Tab. 3: Akute Toxizität - Orale Kurzzeitexposition mit NMP über das Futter bei Ratten .....	8
Tab. 4: Akute Toxizität - Orale Kurzzeitexposition mit NMP über das Futter bei Mäusen .....	8
Tab. 5: Chronische Toxizität - Effekte nach 90 Tagen oraler NMP-Gaben über das Futter bei Ratten .....	9
Tab. 6: Teratogenität nach Ganzkörperbegasung mit NMP bei Ratten .....	10
Tab. 7: Teratogenität nach dermalen Applikation von NMP bei Ratten .....	11
Tab. 8: Teratogenität nach oraler Applikation von NMP über das Futter bei Ratten .....	12
Tab. 9: Abnormitätenrate bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in Testansätzen ansteigender Konzentrationen NMP .....	34
Tab. 10: Veränderungen der Wachstums- und Differenzierungsparameter bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in verschiedenen Konzentrationen von NMP .....	35
Tab. 11: Embryonen nach 48, 62 und 72 Stunden Kultivierung in der WEC .....	40
Tab. 12: Abnormitätenrate bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in Testansätzen verschiedener Konzentrationen 5H-NMP .....	43
Tab. 13: Veränderungen der Wachstums- und Differenzierungsparameter bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in verschiedenen Konzentrationen von 5H-NMP .....	44
Tab. 14: Abnormitätenrate bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in Testansätzen verschiedener Konzentrationen MSI .....	49
Tab. 15: Veränderungen der Wachstums- und Differenzierungsparameter bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in verschiedenen Konzentrationen von MSI .....	50
Tab. 16: Abnormitätenrate bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in Testansätzen verschiedener Konzentrationen von 2H-MSI .....	55
Tab. 17: Veränderungen der Wachstum- und Differenzierungsparameter bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in verschiedenen Konzentrationen von 2H-MSI .....	56
Tab. 18: Veränderungen der Wachstum- und Differenzierungsparameter bei Embryonen nach 48 Stunden Kultivierung in verschiedenen Konzentrationen von 2H-MSI .....	57
Tab. 19: Darstellung der Wachstums- und Differenzierungsparameter von Embryonen inkubiert in 6000 µmol/l NMP .....	65
Tab. 20: Ranking des toxischen Potentials der Substanzen in der WEC .....	66
Tab. 21: Nerven-Score bei <i>Ex-vivo</i> -Embryonen an den Gestationstagen 10,0 bis 12,0 ...	68
Tab. 22: Nerven-Score bei Embryonen nach 62 Stunden Inkubation in Testansätzen ansteigender Konzentrationen Ethanol .....	75
Tab. 23: Nerven-Score bei Embryonen nach 62 Stunden Inkubation in Testansätzen ansteigender Konzentrationen NMP .....	78
Tab. 24: Darstellung der Abnormitäten der Gehirnnerven von Embryonen nach 62 Stunden Exposition gegenüber ansteigender Konzentrationen von NMP .....	79

## 5.5. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Metabolismus von NMP .....	4
Abb. 2: Darstellung der getesteten Konzentrationen in den Konzentrationsfindungsversuchen in der WEC .....	20
Abb. 3: Darstellung der getesteten Konzentrationen in den Konzentrationseffektversuchen in der WEC .....	20
Abb. 4: Darstellung des Differenzierungsparameters Somitenanzahl bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen .....	61
Abb. 5: Darstellung des Differenzierungsparameters morphologischer Score bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen .....	62

Abb. 6: Darstellung der Dottersackdurchblutung bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen.....	62
Abb. 7: Darstellung des Wachstumsparameters Proteingehalt bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen.....	63
Abb. 8: Darstellung des Wachstumsparameters Scheitel-Steiß-Länge bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen.....	63
Abb. 9: Darstellung der Abnormitätenrate bei Embryonen exponiert gegenüber aufsteigenden Konzentrationen der Testsubstanzen.....	64

## 5.6. Skizzenverzeichnis

Skizze 1: Embryo <i>ex vitro</i> am Tag 12,0.....	26
Skizze 2: Darstellung des Nerven-Scores des Nervus trigeminus .....	26
Skizze 3: Darstellung des Nerven-Scores des Nervus facialis.....	27
Skizze 4: Darstellung des Nerven-Scores des Nervus glossopharyngeus .....	27
Skizze 5: Darstellung des Nerven-Scores des Nervus vagus .....	28
Skizze 6: Darstellung der Nerven bei <i>Ex-vivo</i> -Embryonen am Tag 12,0 .....	70
Skizze 7: Darstellung der Nerven bei <i>Ex-vitro</i> -Embryonen nach 62 Stunden Kulturdauer .....	74
Skizze 8: Neuralleistenzellen bei <i>Ex-vivo</i> -Embryonen am Gestationstag 10,5.....	82
Skizze 9: Neuralleistenzellen nach Exposition von Embryonen gegenüber 30 ng/ml <i>all-trans</i> Retinsäure über 24 Stunden in der WEC.....	84
Skizze 10: Neuralleistenzellen nach Exposition von Embryonen gegenüber 100 ng/ml <i>all-trans</i> Retinsäure über 24 Stunden in der WEC.....	84

## 5.7. Fotoverzeichnis

Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen NMP .....	36
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen NMP .....	37
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen NMP .....	38
Darstellung von Embryonen der WEC nach 48, 62 und 72 Stunden .....	41
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 5H-NMP .....	45
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 5H-NMP .....	46
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 5H-NMP und ein Embryo nach Exposition gegenüber 12000 µmol/l 5H-NMP.....	47
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen MSI .....	51
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen MSI .....	52
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen MSI .....	53
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 2H-MSI.....	58
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 2H-MSI.....	59
Embryonen nach 48 Stunden Exposition gegenüber aufsteigenden Konzentrationen 2H-MSI.....	60
Darstellung der Gehirnnerven bei Embryonen <i>ex vivo</i> .....	71

Darstellung der Gehirnnerven bei Embryonen <i>ex vivo</i> und <i>ex vitro</i> .....	72
Darstellung der Gehirnnerven bei Embryonen <i>ex vitro</i> nach Exposition gegenüber Ethanol .....	76
Darstellung der Gehirnnerven bei Embryonen <i>ex vitro</i> nach Exposition gegenüber NMP .....	80
Darstellung der Gehirnnerven eines Embryos der Lösungsmittelkontrolle .....	81
Darstellung der Neuralleistenzellen bei Embryonen <i>ex vivo</i> , <i>ex vitro</i> und nach <i>In-vitro</i> -Exposition gegenüber Retinsäure .....	86
Darstellung der Neuralleistenzellen bei Embryonen <i>ex vitro</i> nach Exposition gegenüber NMP .....	87