

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Einsatz von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch in der chemisch-pharmazeutischen Industrie.....	3
2.2	<i>In-vitro</i> -Systeme in der Reproduktionstoxikologie.....	4
2.3	Standardisierung der Whole Embryo Culture (WEC)	5
2.3.1	Allgemeine Erläuterungen.....	5
2.3.2	Historische Entwicklung der Kultur ganzer Embryonen	6
2.3.3	Einflussgrößen auf die Standardisierung der Kultur ganzer Embryonen (WEC) ..	7
2.4	Kulturmedien für die WEC	11
2.5	Identifizierung der embryotropen Inhaltsstoffe des Rattenserums	14
2.5.1	Charakterisierung der wichtigsten Serumfraktionen.....	14
2.5.2	Identifikation von sich verbrauchenden Serumbestandteilen.....	15
2.5.3	Identifikation von niedermolekularen Serumbestandteilen durch gezielte Supplementierung von dialysiertem Serum	15
2.5.4	Gezielte Supplementierung von heterologen Seren	16
2.6	Validierung der WEC.....	16
2.7	Referenzsubstanzen in der Embryotoxikologie	18
2.8	Bedarf für einen <i>In-vitro</i> -Embryotoxizitätstest.....	19
2.8.1	Grundsätzlicher Bedarf für einen <i>In-vitro</i> -Embryotoxizitätstest	19
2.8.2	Aktueller Bedarf für einen <i>In-vitro</i> -Embryotoxizitätstest.....	19
3	Gesamtziel der Dissertationsarbeit.....	22
4	Material und Methoden	23
4.1	Materialien	23
4.1.1	Puffer, Lösungen und Chemikalien.....	23
4.1.2	Sterilität	23
4.1.3	Labormaterialien	24
4.2	Geräte	25
4.3	Tiere	26
4.3.1	Ratten	26
4.3.2	Tierhaltung	26

4.3.3	Verpaarung	26
4.3.4	Organentnahme	26
4.4	Begasung der Kulturgefäße bzw. Vorbegasung der Kulturmedien	27
4.5	Inkubationsgerät – Roller	27
4.6	Präparationsmedium.....	27
4.7	Kulturmedien	28
4.7.1	Serumaufbereitung	28
4.7.2	Zusammensetzung des Kulturmediums	28
4.7.3	Vorbereitung der Kulturflaschen.....	28
4.8	Präparation des Eizylinders.....	28
4.8.1	Präparationstechnik	28
4.8.2	Auswahl der in die WEC eingesetzten Embryonen	29
4.8.3	Einbringen der Embryonen in die Kultur	29
4.9	Auswertung der Embryonen	29
4.9.1	Auswertungsparameter für das Wachstum.....	30
4.9.2	Auswertungsparameter für die Differenzierung.....	31
4.9.3	Fotografie der Embryonen	32
4.9.4	Methoden der statistischen Auswertung	32
4.10	Serumgewinnung	33
4.10.1	Gewinnung des Rinderblutes	33
4.10.2	Gewinnung des Menschenblutes.....	34
4.10.3	Gewinnung des Rattenblutes.....	34
4.10.4	Protokoll der Serumgewinnung.....	34
4.10.5	Spezielle Serumgewinnungen	35
4.11	Grundsätzliches Studiendesign	35
4.12	Versuchsaufbau zur Untersuchung der Seren auf ihr entwicklungsförderndes Potential für die Embryonen <i>in vitro</i>	35
4.13	Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses einzelner Wachstumsfaktoren auf die Entwicklung der Embryonen <i>in vitro</i>	35
4.14	Molekularbiologische Untersuchungen	36
4.14.1	Gewinnung des Probenmaterials.....	36
4.14.2	Isolierung der Gesamt-RNA.....	37
4.14.3	Synthese der cDNA durch Reverse Transkriptase	37
4.14.4	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	38
4.14.5	Primerdesign und –synthese.....	39
4.15	Untersuchungen von Referenzsubstanzen in der WEC	40

5	Ergebnisse	41
5.1	Untersuchung von drei Kulturmedien auf ihre entwicklungsfördernde Potentiale für die Rattenembryonen <i>in vitro</i>	41
5.2	Untersuchung von Rinderserum hergestellt nach dem Protokoll von Klug et al. [3] in Bezug auf sein entwicklungsförderndes Potential für Rattenembryonen <i>in vitro</i>	43
5.3	Untersuchung von käuflichen Seren auf ihr entwicklungsförderndes Potential für Rattenembryonen <i>in vitro</i>	44
5.3.1	Untersuchung von käuflichen Rinderseren	44
5.3.2	Untersuchung von käuflichem Rattenserum (kRaS) auf seine Eignung als Kulturmedium für die WEC	49
5.4	Untersuchungen von Serummischungen auf ihre Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC	51
5.4.1	Untersuchung der Serummischung aus Fötalem Bovinem Serum (FBS) und Rinderserum aus eigener Herstellung (RS).....	51
5.4.2	Untersuchung der Serummischung aus Fötalem Bovinem Serum (FBS) und Donor Bovinem Serum (DBS) auf seine Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC	52
5.4.3	Untersuchung der Effekte einer Supplementierung von nicht geeigneten käuflichen Rinderseren oder Rinderserummischungen mit 10 % Rattenserum... 54	54
5.5	Untersuchung des Einflusses von Rattenserum im Kulturmedium der WEC auf die Entwicklung der Embryonen <i>in vitro</i>	59
5.5.1	Einfluss des prozentualen Anteils des Rattenserums	59
5.5.2	Untersuchung einzelner Wachstumsfaktoren zur Aufwertung der käuflichen Rinderseren als Kulturmedium der WEC.....	61
5.5.3	RT-PCR Analysen an Embryonen- und Dottersackmaterial in Bezug auf Rezeptoren verschiedener Wachstumsfaktoren und den Wachstumsfaktor VEGF	66
5.5.4	Untersuchung der Variationsmöglichkeiten des laborinternen Herstellungsprotokolls von Rinderserum für die WEC im Hinblick auf die angestrebte industrielle Umsetzung	69
5.6	Optimierung der industriellen Herstellung eines Rinderserums als Basis für ein Kulturmedium der WEC	75
5.6.1	Reproduzierbarkeit des laborinternen Herstellungsprotokolls in kleinen Chargen	76
5.6.2	Untersuchung zur Reproduzierbarkeit des laborinternen Herstellungsprotokolls unter industriellen Rahmenbedingungen	77
5.7	Untersuchung von Referenzsubstanzen in der WEC unter Verwendung der neu etablierten Kulturmedien.....	85

5.7.1	Effekte von 5-Fluorouracil und Penicillin G auf die Entwicklung der Embryonen <i>in vitro</i>	86
5.7.2	Effekte von Valproinsäure auf die Entwicklung der Embryonen <i>in vitro</i>	89
5.7.3	Effekte von <i>all-trans</i> Retinsäure auf die Entwicklung der Embryonen <i>in vitro</i> ..	91
5.7.4	Untersuchung der Effekte von Ethanol auf die Entwicklung der Embryonen <i>in vitro</i>	94
6	Diskussion	97
6.1	Kulturmedien für die Whole Embryo Culture (WEC).....	97
6.2	Untersuchung von Rinderserum hergestellt nach dem Protokoll von Klug <i>et al.</i>	99
6.3	Untersuchung von käuflichen Seren auf ihre entwicklungsfördernde Potentiale für Rattenembryonen	101
6.4	Untersuchung von Serummischungen auf ihre Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC	104
6.5	Untersuchung der Effekte einer Supplementierung von nicht geeigneten, käuflichen Rinderseren und Serummischungen mit 10 % Rattenserum.....	105
6.6	Untersuchung einzelner Wachstumsfaktoren zur Aufwertung der käuflichen Rinderseren als Kulturmedium der WEC	108
6.7	Untersuchung der Variationsmöglichkeiten des laborinternen Herstellungsprotokolls von Rinderserum für die WEC.....	113
6.8	Optimierung der industriellen Herstellung eines Rinderserums als Basis für ein Kulturmedium	117
6.9	Untersuchung von Referenzsubstanzen in der WEC unter Verwendung der neu etablierten Kulturmedien.....	119
6.9.1	Kulturmedium basierend auf FBS, DBS supplementiert mit 10 % Rattenserum	119
6.9.2	Kulturmedium basierend auf DPBS supplementiert mit 10 % Rattenserum	122
7	Ausblick	125
8	Zusammenfassung.....	126
9	Summary	128
10	Literaturverzeichnis.....	130
11	Danksagung.....	145
12	Tabellarischer Lebenslauf	146
13	Publikationen.....	147
14	Selbständigkeitserklärung	149