

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Untersuchung von drei Kulturmedien auf ihre entwicklungsfördernde Potentiale für die Rattenembryonen *in vitro*

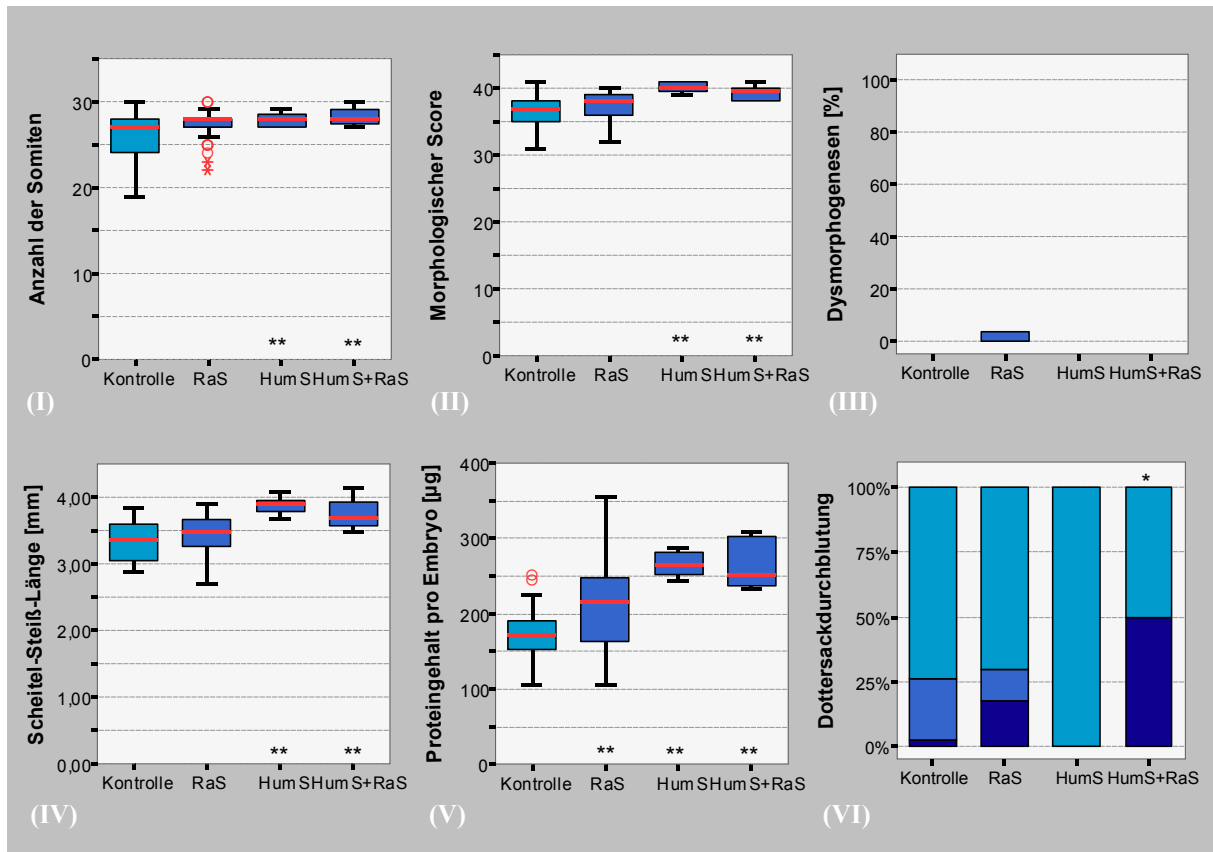
Die Kultur von Post-Implantations-Rattenembryonen gilt als ein robuster *In-vitro*-Embryotoxizitätstest, der viele Variationen der Kulturbedingungen zulässt, ohne dass die Aussagekraft über das embryotoxische Potential einer Testsubstanz beeinträchtigt wird [7]. Zur Beurteilung des embryotoxischen Potentials werden exponierte Embryonen mit denen einer Kontrollgruppe verglichen. Die Ergebnisse sind zwischen verschiedenen Labors gut reproduzierbar [36]. Die *Intra*-Laborvarianz der Entwicklung der Kontrollembryonen ist in der Regel sehr gering. Jedoch können aufgrund der zulässigen Variationen in der Kulturdurchführung die *Inter*-Laborvarianzen einzelner Auswertungsparameter von Kontrollembryonen erheblich sein [6]. Durch ein Literaturstudium lässt sich der Einfluss der verwendeten Serumtypen im Kulturmedium nicht eindeutig eruieren, da eine Vielzahl von weiteren entscheidenden Kulturparametern aus den verschiedenen Laboratorien nicht bekannt ist. Um diese Einflussfaktoren beschreiben zu können, wurden die drei, für das Kulturmedium der WEC am häufigsten verwendeten Seren bzw. deren Mischungen (Rattenserum, Humanserum und Mischung aus Ratten- und Humanserum) bei ansonsten konstanten Kulturbedingungen untersucht. Seit seiner Etablierung im Jahr 1985 besteht das Kulturmedium der WEC am Institut aus supplementiertem Rinderserum [72]. Zu Beginn der experimentellen Arbeit wurde es als Kontrolle bzw. Referenz für die Entwicklung und Etablierung neuer Kulturmedien für die WEC verwendet.

Im Labor wurden fünf Chargen eines Kulturmediums basierend auf fünf unabhängig von einander hergestellten Rattenseren nach dem Protokoll von New et al. [46], eine Charge eines Kulturmediums basierend auf Humanserum nach dem Protokoll von Chatot et al. [103] und eine Charge eines Kulturmediums basierend auf Humanserum, supplementiert mit 10 % Rattenserum, nach dem Protokoll von Reti et al. [86] hergestellt. Die Untersuchung der Standardkulturmedien erfolgte vergleichsweise mit dem Kontrollkulturmedium, welches auf Rinderserum hergestellt nach dem Protokoll von Klug et al. [72] basierte.

Das Standardkulturmedium, welches auf Rattenserum basierte, unterstützte die Differenzierung der Embryonen in vergleichbarer Weise wie das Kontrollkulturmedium (Abb. 6 / I und II). Die beiden Standardkulturmedien basierend auf Humanserum mit bzw. ohne Ergänzung von Rattenserum bedingten eine signifikant höhere Differenzierung der Embryonen (Abb. 6 / I und II). Das Wachstum der Embryonen in den drei Standardkulturmedien war größer als im Kontrollkulturmedium (Abb. 6 / IV und V bzw. Abb. 7).

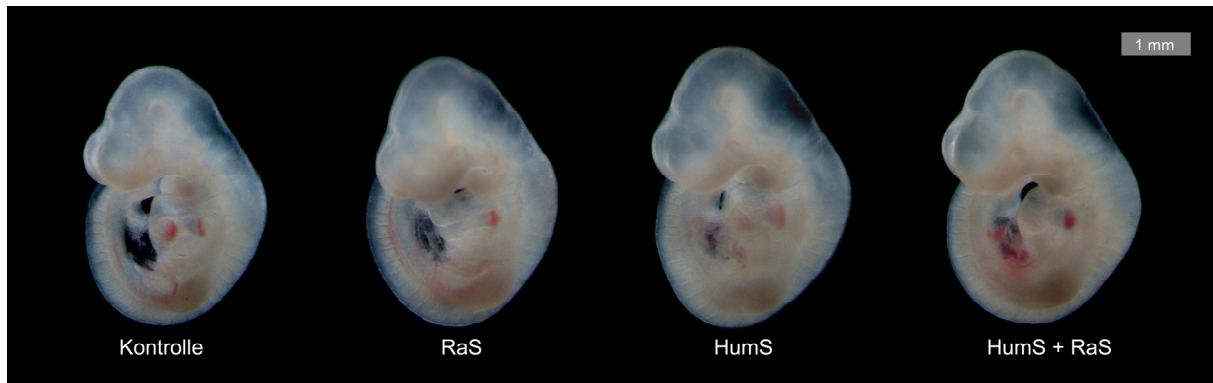
Für die fünf untersuchten Chargen des Rattenserums wurde bei der Auswertung der kultivierten Embryonen festgestellt, dass diese signifikante Unterschiede in der Entwicklung der

Embryonen bedingen, obwohl das standardisierte Herstellungsprotokoll verwendet wurde. Diese Unterschiede traten insbesondere beim Wachstumsparameter Proteingehalt der Embryonen auf und manifestierten sich in einer großen Streuung der Ergebnisse (Abb. 6 / V). Im statistischen Vergleich der Kulturergebnisse mit beiden Kulturmedien basierend auf Humanserum mit bzw. ohne Rattenserum konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Keines der untersuchten Standardkulturmedien verursachte eine abnorme Entwicklung der Embryonen (Abb. 6 / III). Der signifikant geringere Wert für die Dottersackdurchblutung der Embryonen, welche in dem Medium basierend auf Humanserum und supplementiert mit Rattenserum kultiviert wurden, ist Ausdruck der physiologischen Rückbildung des Dottersacks bei besonders weit entwickelten Embryonen am Gestationstag 11,5 und stellt keine Entwicklungsbeeinträchtigung dar.



**Abb. 6: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für die drei Kulturmedien der WEC**

RaS = Rattenserum, HumS = Humanserum und HumS+RaS = Mischung aus Humanserum und Rattenserum im Verhältnis 9:1. Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 42, RaS n = 51 (fünf Chargen zusammengefasst), HumS n = 8 und HumS+RaSn = 8. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.

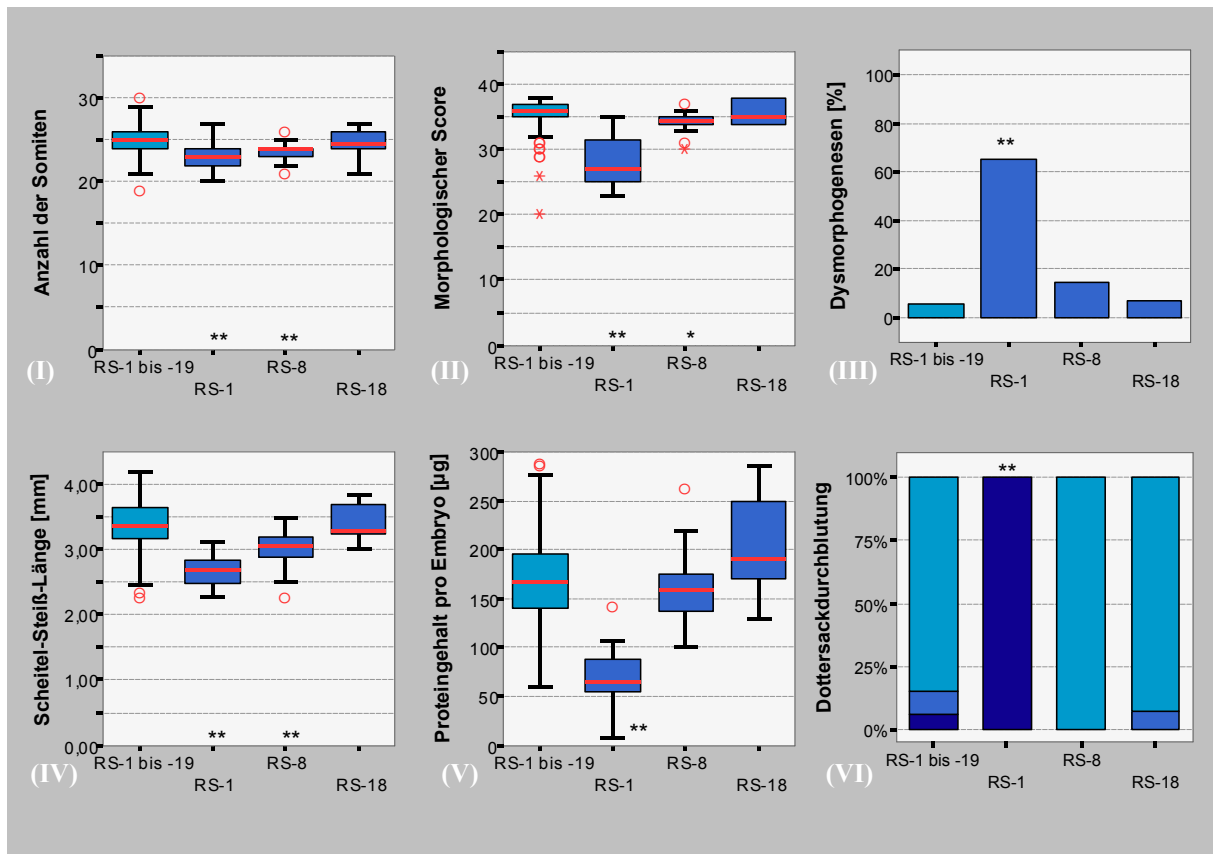


**Abb. 7: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in drei Kulturmedien der WEC** basierend auf Rattenserum (RaS), Humanserum (HumS), Humanserum supplementiert mit 10 % Rattenserum im Vergleich zur Kontrolle entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 6.

## 5.2 Untersuchung von Rinderserum hergestellt nach dem Protokoll von Klug et al. [3] in Bezug auf sein entwicklungsförderndes Potential für Rattenembryonen *in vitro*

Zu Beginn der experimentellen Arbeit wurde das Kulturmedium der WEC aus supplementiertem Rinderserum [72] als Referenz für die Entwicklung und Etablierung neuer Kulturmedien für die WEC verwendet. Aufgrund der herstellungsbedingt limitierten Chargengrößen musste das Serum in regelmäßigen Abständen (i.d.R. jeden Monat) gewonnen werden. Das Rinderserum aus eigener Herstellung unterlag trotz standardisiertem Herstellungsprotokoll einer Chargenvariabilität, die die Überprüfung jeder Charge auf Eignung für die WEC notwendig machte. In diesem Abschnitt ist eine Zusammenfassung der Kulturergebnisse der Embryonen von 19 dieser selbst hergestellten Rinderseren (RS-1 bis -19) wiedergegeben (Abb. 8). Um die Streubreite der einzelnen Endpunkte deutlich zu machen, wurden die Kulturergebnisse der jeweiligen Untersuchung dreier einzelner Rinderseren dargestellt (Abb. 8 und 9). Das Rinderserum RS-1 repräsentiert die Untergrenze und RS-18 die Obergrenze der erzielten Embryonenentwicklung. Die Ergebnisse für RS-8 stellen in Bezug auf alle untersuchten Rinderseren aus eigener Herstellung einen durchschnittlichen Entwicklungsstand von Rattenembryonen dar. Dieser repräsentiert gleichzeitig die untere Grenze des entwicklungsfördernden Potentials eines geeigneten Rinderserums. Alle Rinderseren, die eine vergleichsweise schlechtere Entwicklung der Embryonen ermöglichten (9 von 19 Rinderseren), wurden nicht für die WEC verwendet.

Zwischen den 19 untersuchten Serumchargen bestanden erhebliche Chargenschwankungen. Jedoch trat mit Ausnahme des RS-1 bei keinem der untersuchten Rinderseren eine signifikante Häufung von Dymorphogenesen auf. Die zehn hier als geeignet eingestuften Rinderseren aus eigener Herstellung wurden im Rahmen der Untersuchungen käuflicher Seren (vgl. 5.3 und 5.4) als Kontrollkulturmedien eingesetzt.



**Abb. 8: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse von 19 verschiedenen Kulturmedien basierend auf selbst hergestelltem Rinderserum**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: RS-1 bis -19 zusammengefasst (Kontrolle) n = 239, RS-1 n = 17, RS-8 n = 20 und RS-18 n = 15. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.



**Abb. 9: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in selbst hergestellten Rinderseren** entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 8.

### 5.3 Untersuchung von käuflichen Seren auf ihr entwicklungsförderndes Potential für Rattenembryonen *in vitro*

#### 5.3.1 Untersuchung von käuflichen Rinderseren

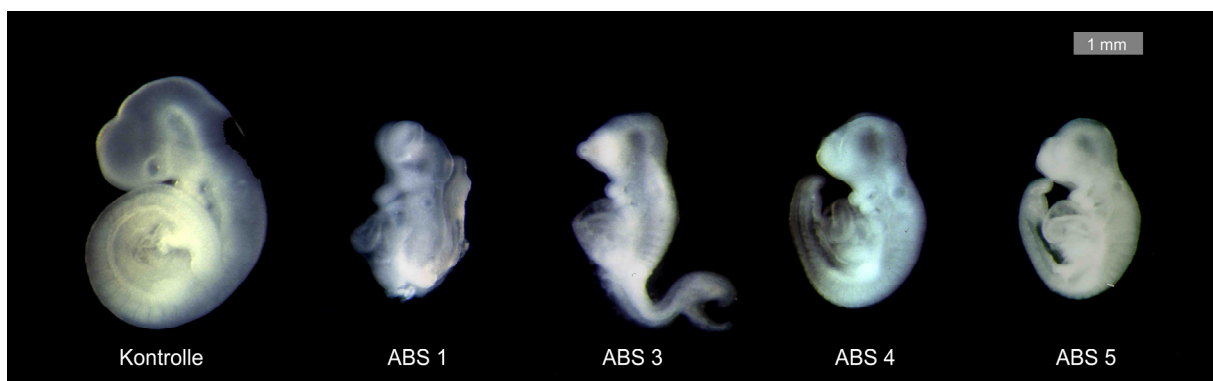
Am Anfang der Studie erfolgte eine Untersuchung verschiedener handelsüblicher Rinderseren auf ihre Eignung als Basis für Kulturmedien einer WEC. Hierbei wurden Adultes Bovines

Serum (ABS), Donor Bovines Serum (DBS) und Fötales Bovines Serum (FBS) untersucht. Um die Resultate der Serumtypen weitestgehend von möglichen Chargenabhängigkeiten bzw. grundsätzlichen Qualitätsunterschieden der Hersteller unabhängig zu machen, wurden von jedem Serumtyp mehrere Chargen von verschiedenen Serumproduzenten untersucht. Datenbasis für die abschließende Eignungsbeurteilung der Serumchargen für die WEC waren historische Kontrollen, die die Kulturergebnisse von insgesamt 253 Embryonen in Rinderserumchargen aus eigener Herstellung wiedergaben.

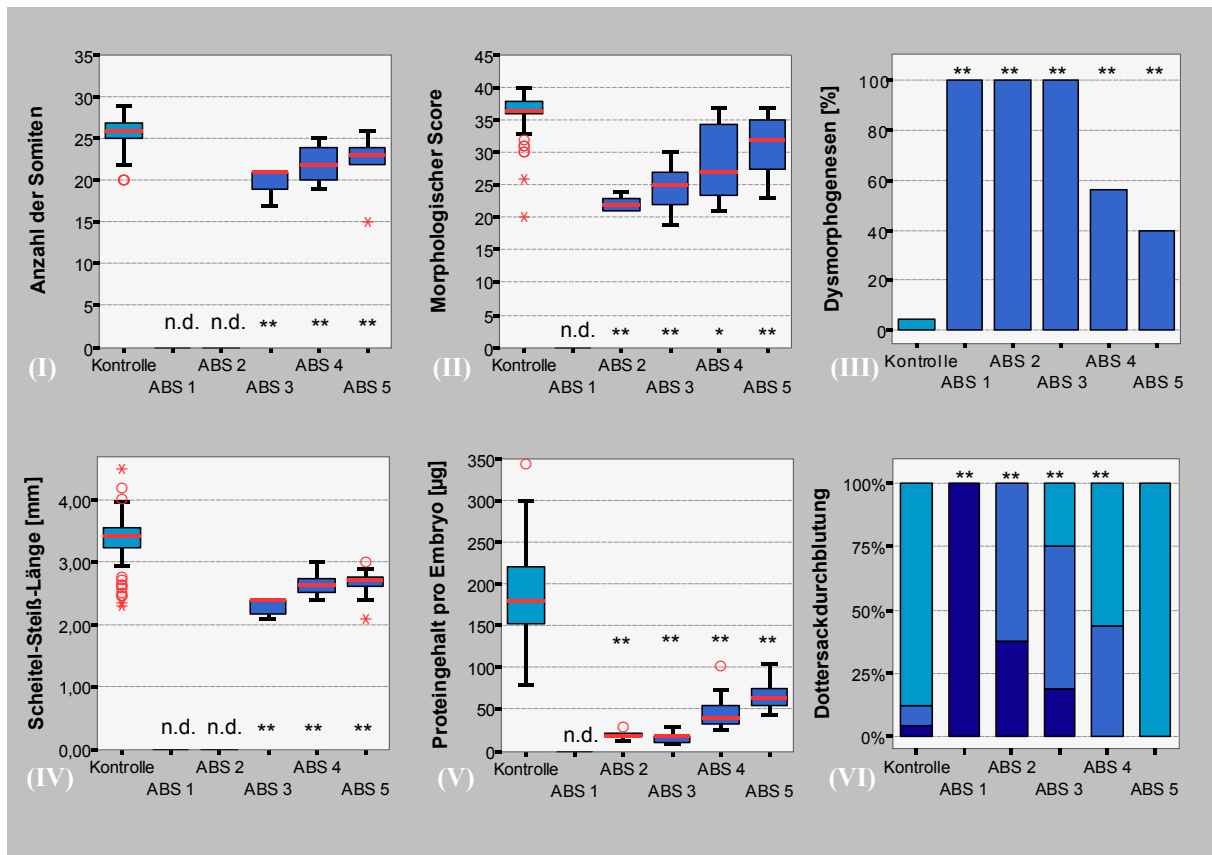
### **5.3.1.1 Untersuchung von Adultem Bovinem Serum (ABS) auf seine Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC**

Insgesamt wurden fünf Chargen ABS von drei Produzenten in der WEC untersucht. Alle fünf Seren bedingten eine signifikant geringere Entwicklung der Embryonen im Vergleich zu der Entwicklung der Embryonen, die in Rinderseren aus eigener Herstellung (Kontrollkulturmedium) kultiviert wurden. Dies manifestiert sich sowohl in den Auswertungsparametern des Wachstums (Abb. 11 / IV und V) als auch in der Differenzierung der Embryonen (Abb. 11 / I und II). Die Entwicklung des Dottersackgefäßsystems war bei den Testansätzen ABS-1 bis -4 geringer als in der Kontrolle. Bei dem ABS-5 war diese vergleichbar mit derjenigen der Kontrolle.

Das entwicklungsunterstützende Potential der untersuchten ABS in Kultur war sehr unterschiedlich, erreichte jedoch in keinem Fall den Stand der Kontrolle (Abb. 10). Die Seren ABS-1 und ABS-2 gestatteten eine so geringe Entwicklung der Embryonen, dass einige der Ausprägungen unterhalb des Messbereiches der Auswertungsparameter lagen. Auch das ABS-5, welches die Entwicklung der Embryonen in dieser Untersuchungsgruppe am besten unterstützte, ermöglichte im Vergleich zur Kontrolle nur ein sehr geringes Wachstum der Embryonen. Der Proteingehalt der Embryonen in dieser Untersuchungsgruppe erreichte nur ca. ein Drittel des Kontrollwertes. Alle ABS induzierten mit einer beobachteten Häufigkeit von 40 bis 100 % eine signifikante Erhöhung der Abnormitätenrate im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 11 / III). Keines der untersuchten Adulten Bovinen Seren war als alleinige Basis für das Kulturmedium der WEC geeignet.



**Abb. 10: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in kommerziellem ABS**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 11.



**Abb. 11: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für kommerzielles ABS**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 247, ABS-1 n = 7, ABS-2 n = 8, ABS-3 n = 16, ABS-4 n = 16 und ABS-5 n = 16. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. (n.d. = nicht bestimmbar). Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.

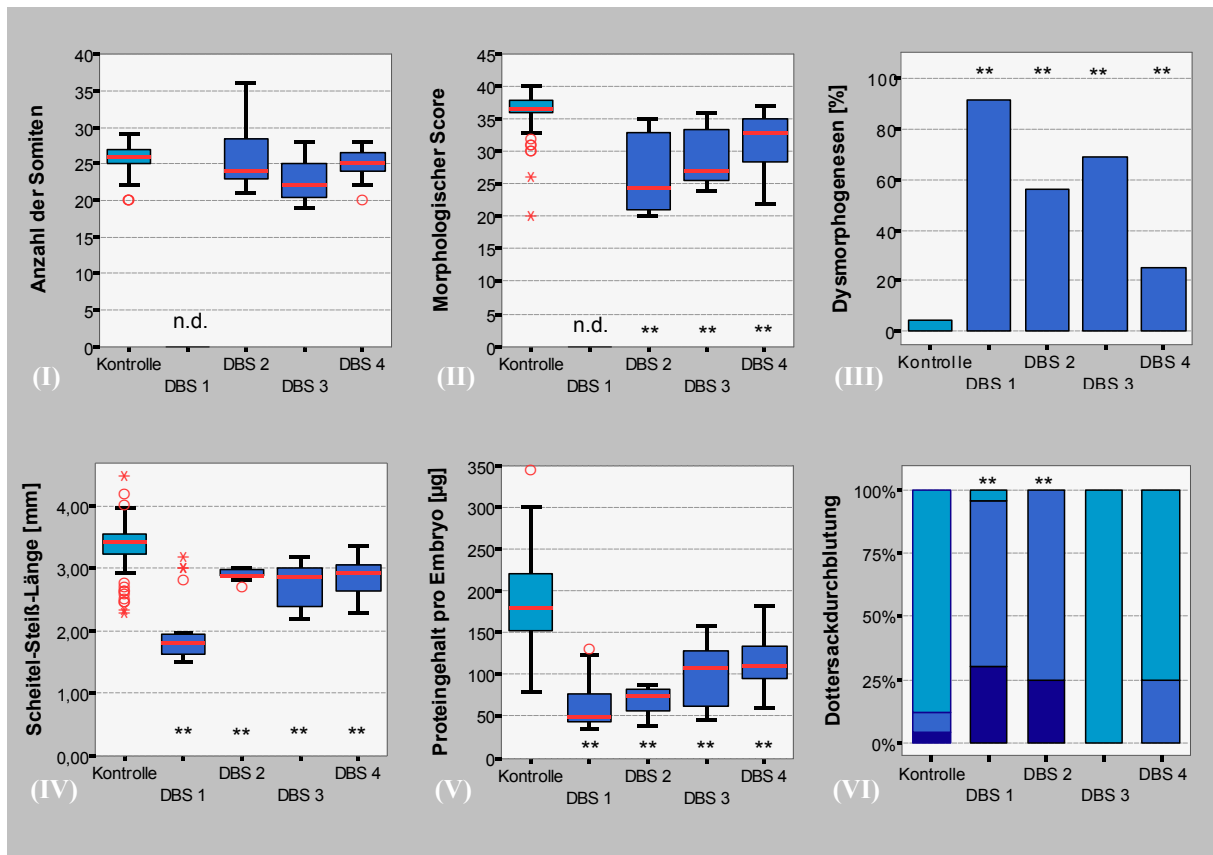
### 5.3.1.2 Untersuchung von Donor Bovinem Serum (DBS) auf seine Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC

Insgesamt vier Chargen DBS von drei Produzenten wurden in der WEC untersucht. DBS unterstützte die Entwicklung der Embryonen in einem geringeren Maße als es das Kontrollkulturmedium basierend auf Rinderserum aus eigener Herstellung tat (Abb. 12 und 13). Das DBS-1 gestattete eine so geringe Entwicklung der Embryonen, dass die Auswertungsparameter Anzahl der Somiten und Morphologischer Score nicht erfasst werden konnten. Die beobachtete Differenzierung dieser Embryonen lag unterhalb der Messbereiche der entsprechenden Auswertungsparameter.

Für die Wachstumsparameter Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt der Embryonen sowie den Differenzierungsparameter Morphologischer Score wurden bei den Embryonen der Testansätze signifikant niedrigere Werte als bei den Embryonen der Kontrolle festgestellt (Abb. 12 / II, IV und V). Das größte Wachstum der in DBS kultivierten Embryonen wurde bei dem DBS-4 beobachtet. Der entsprechende Proteingehalt der Embryonen erreichte aber auch hier nur zwei Drittel des Kontrollwertes.

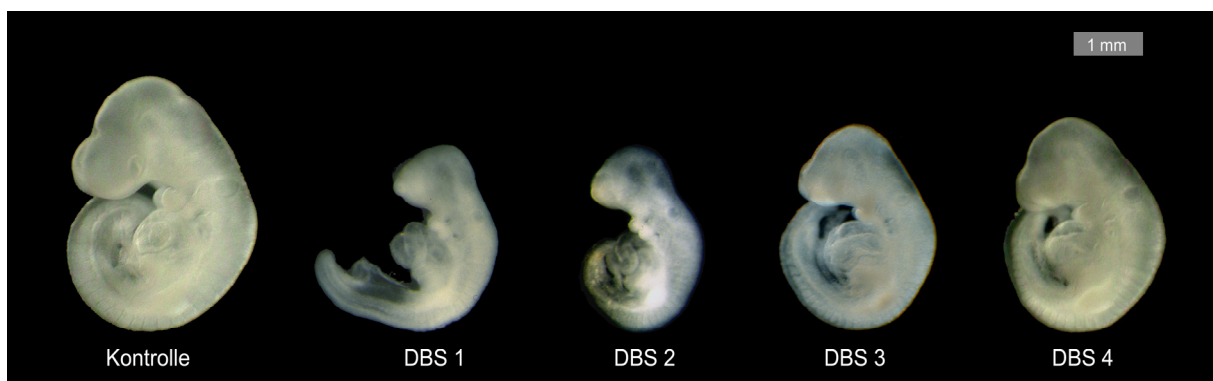
Alle DBS bedingten mit einer beobachteten Häufigkeit von 40 bis 100 % eine signifikant höhere Inzidenz von Dysmorphogenesen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 12 / III).

Keines der untersuchten, käuflichen DBS war als alleinige Serumgrundlage für das Kulturmedium der WEC geeignet.



**Abb. 12: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für kommerzielles DBS**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 247, DBS-1 n = 23, DBS-2 n = 16, DBS-3 n = 16 und DBS-4 n = 24. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. (n.d. = nicht bestimmbar). Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore 3 2 1.



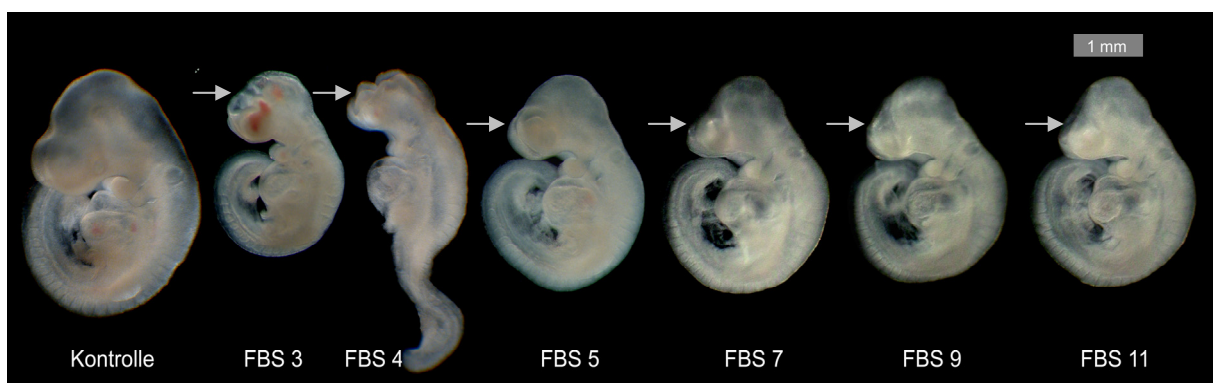
**Abb. 13: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in kommerziellem DBS**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 12.



### 5.3.1.3 Untersuchung von Fötalem Bovinem Serum (FBS) auf seine Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC

In der WEC wurden insgesamt zwölf Chargen von FBS von vier Produzenten getestet. Die verschiedenen FBS unterstützten die Entwicklung der Embryonen sehr unterschiedlich. Einerseits, wie im Fall von FBS-1, war die Embryonenentwicklung so gering, dass die Auswertungsparameter für das Wachstum und die Differenzierung der Embryonen nicht erfasst werden konnten; diese lagen außerhalb der Messbereiche. Andererseits, wie im Fall von FBS-10, war die Entwicklung der Embryonen so weit fortgeschritten, dass diese zumindest in einem der beiden Auswertungsparameter für die Differenzierung (Anzahl der Somiten) und für einen der beiden Wachstumsparameter (Scheitel-Steiß-Länge) mit denen der Kontrolle vergleichbar waren (Abb. 15 / I und IV). Allen FBS war gemein, dass sie nur ein Wachstum der Embryonen ermöglichten, welches gemessen am Proteingehalt der Embryonen signifikant kleiner war als das der Kontrolle (Abb. 15 / V). Trotzdem konnten für käufliche FBS zum Teil relative hohe Wachstumsraten beobachtet werden. Im Fall vom FBS-10 erreichte der Wachstumsparameter Proteingehalt der Embryonen drei Viertel des Proteingehalts der Kontrolle. Ohne Ausnahme verursachten alle untersuchten FBS eine signifikante Erhöhung der Abnormalitätenrate im Vergleich zur Kontrolle. Die Inzidenz variierte von 27 %, wie im Fall von FBS-11, bis 100 %, wie im Fall von FBS-2. Die häufigsten Dysmorphogenesen waren ein offener kranialer Neuroporus und eine damit einhergehende Fehlbildung der Kopfanlage (Abb. 14).

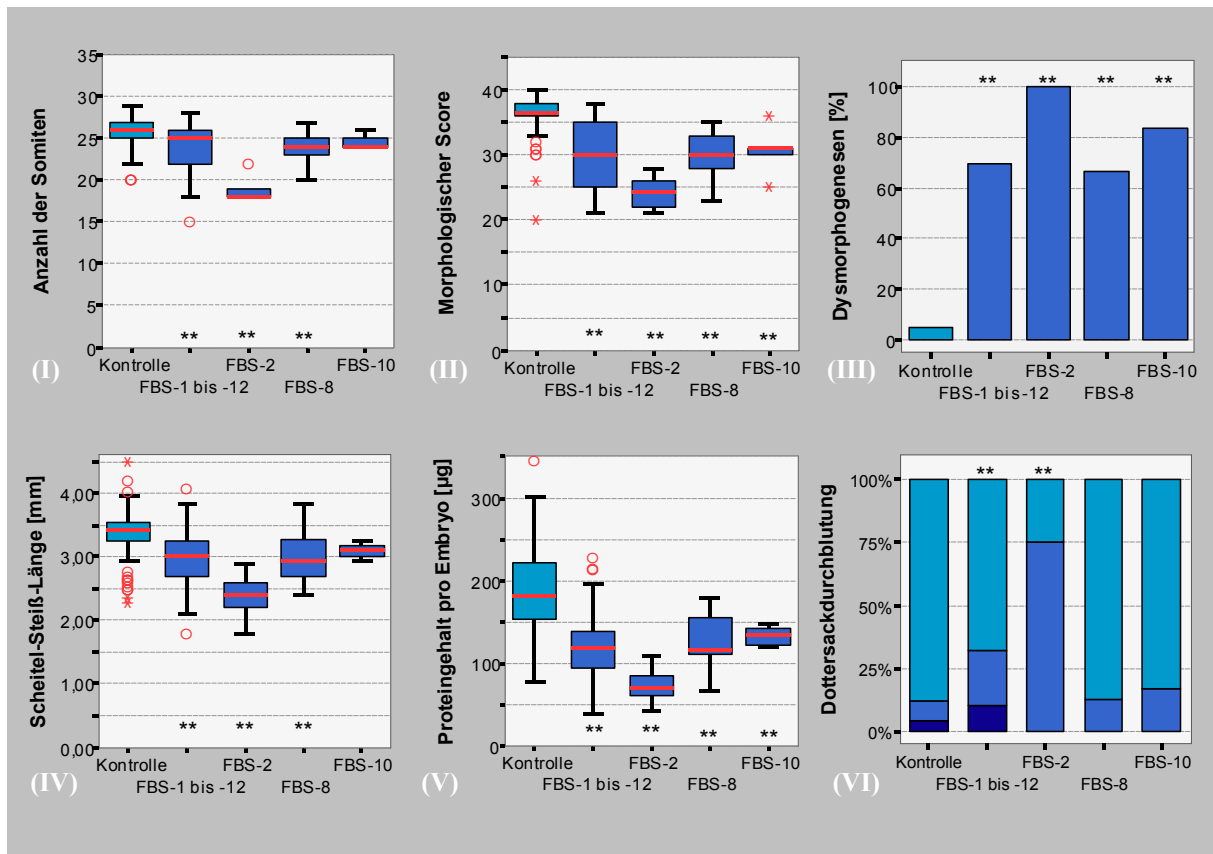
Keines der untersuchten Fötalen Bovinen Seren war als alleinige Grundlage für das Kulturmedium der WEC geeignet.



**Abb. 14: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in kommerziellem FBS**

(FBS 3 – 5, -7, -9 und -11) entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 15. Pfeile markieren die Dysmorphogenese „offenen kranialen Neuroporus“.





**Abb. 15: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für kommerzielles FBS**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 247, FBS-1 bis -12 (zusammengefasst) n = 229, FBS-2 n = 8, FBS-8 n = 24 und FBS-10 n = 6. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.

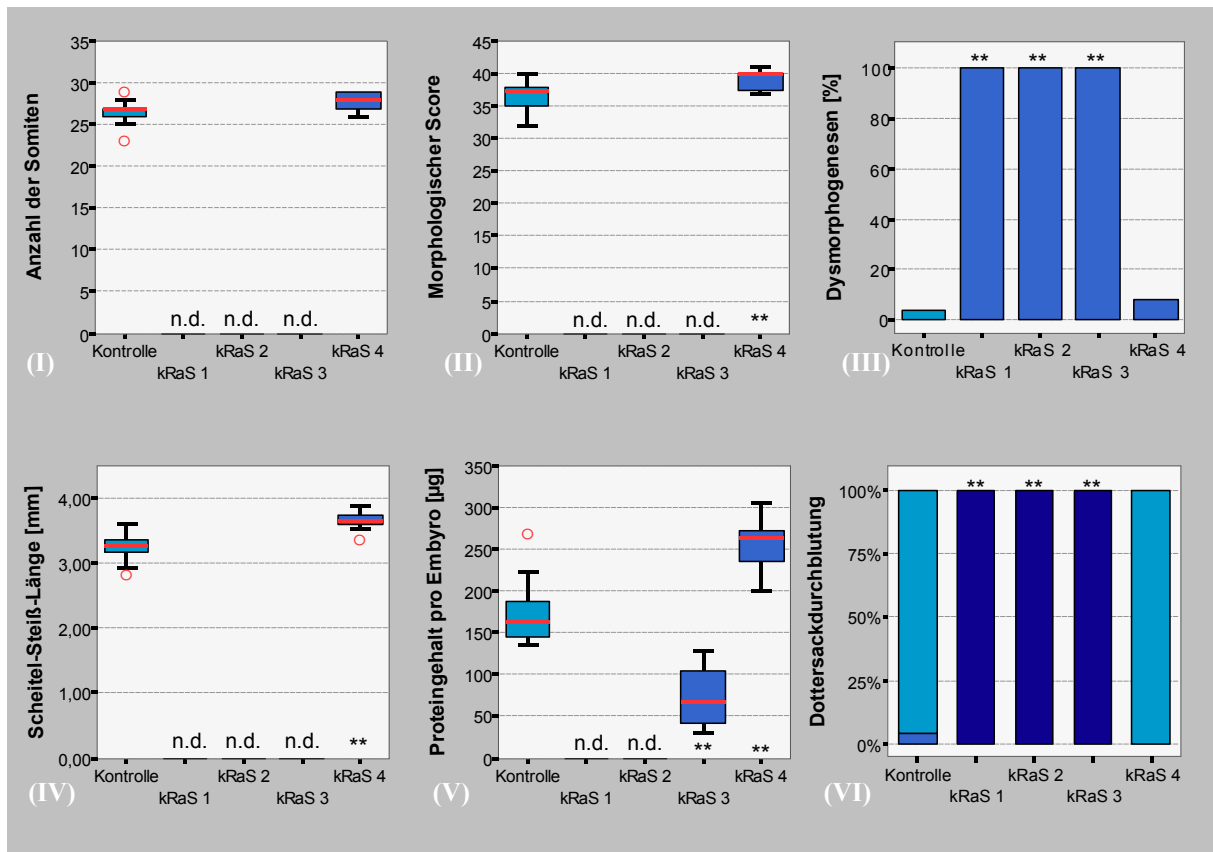
### 5.3.2 Untersuchung von käuflichem Rattenserum (kRaS) auf seine Eignung als Kulturmedium für die WEC

Es wurden insgesamt sechs Chargen von käuflichem Rattenserum (kRaS) von vier Produzenten in der WEC untersucht. Die untersuchten kRaS ermöglichten eine Entwicklung der Embryonen auf sehr unterschiedlichem Niveau. Dieses reichte vom Absterben der Embryonen zu Beginn der Kultur bis zu einem Entwicklungsstand der Embryonen, der über den Stand der Kontrollembryonen (kultiviert in Rinderserum aus eigener Herstellung) hinaus ging (Abb. 16 und 17).

Bei drei der sechs kRaS war die Entwicklung der Embryonen so beeinträchtigt, dass diese nicht mit den Auswertungsparametern für die Differenzierung und fast mit keinem für das Wachstum erfasst werden konnten. Ganz anders stellte sich die Situation bei der Untersuchung der anderen drei Chargen eines Serumproduzenten dar. Die Ergebnisse dieser drei kRaS wurden als kRaS-4 zusammengefasst grafisch dargestellt. Alle drei Chargen bedingten eine vergleichbare Embryonenentwicklung. Diese drei kRaS-Chargen ermöglichten eine Entwicklung, die über die der Kontrollembryonen hinausging. In Hinblick auf die Differenzierung der Embryonen bedeutete dieses signifikant größere Morphologische Score Werte (Abb. 16 / II). Auch für das Wachstum der Embryonen ergaben sich signifikant größere Werte der

Scheitel-Steiß-Länge und des Proteingehaltes der Embryonen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 16 / IV und V). Die Entwicklung der Embryonen in den kRaS-1 bis kRaS-3 ist als abnorm einzustufen (Abb. 16 / III und Abb. 17). Im Gegensatz dazu wurde bei der Untersuchung der drei Chargen (zusammengefasst in kRaS-4) keine statistisch signifikante Erhöhung der Inzidenz von Abnormitäten festgestellt.

Es konnte somit festgestellt werden, dass nur die kRaS eines Herstellers als Basis für ein Kulturmedium der WEC geeignet war.



**Abb. 16: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für kommerzielles Rattenserum**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 26, kRaS-1 n = 8, kRaS-2 n = 8, kRaS-3 n = 8 und kRaS-4 n = 24. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \*\* p < 0,01. (n.d. = nicht bestimmbar). Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.



**Abb. 17: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in kommerziellem Rattenserum**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 16.

## 5.4 Untersuchungen von Serummischungen auf ihre Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC

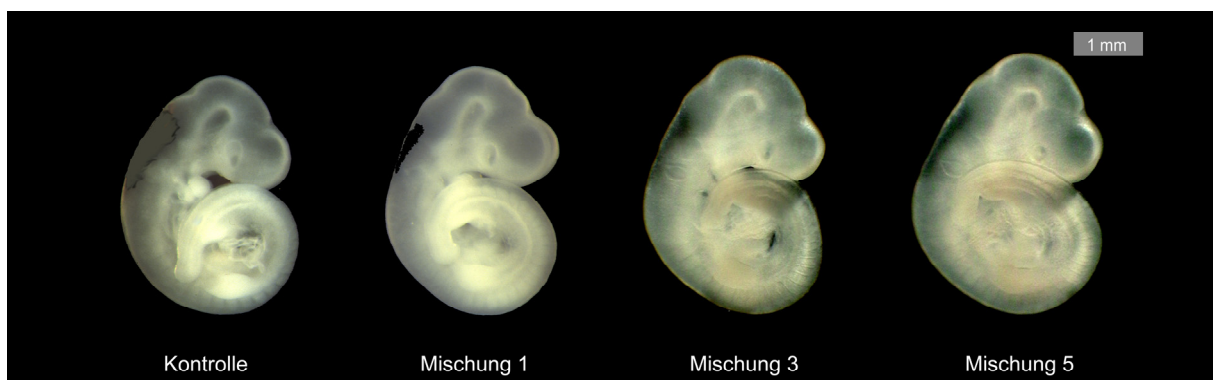
### 5.4.1 Untersuchung der Serummischung aus Fötalem Bovinem Serum (FBS) und Rinderserum aus eigener Herstellung (RS)

Bei der Untersuchung der käuflichen Rinderseren konnte weder ein Serumtyp noch eine einzelne Charge eines Serumtyps identifiziert werden, der die Entwicklung der Embryonen in einem mit dem der Kontrolle vergleichbaren Maß unterstützt (vgl. 5.3.1). Somit konnte mit diesen Seren kein vollständiger Ersatz des selbst hergestellten Rinderserums als Kulturmedium gefunden werden. Deshalb wurde die Möglichkeit untersucht, das industriell gefertigte Rinderserum mit Rinderserum aus eigener Herstellung (RS) zu mischen, um die Chargen damit zu vergrößern. Aufgrund der Beobachtung, dass das FBS die höchsten wachstumsfördernden Eigenschaften für Embryonen in Kultur aufwies, wurden primär Mischungsversuche mit diesem Serumtyp durchgeführt. Es sollte geprüft werden, ob generell die Möglichkeit besteht, ein FBS mit RS zu vermengen, ohne dessen Eignung für die WEC einzuschränken.

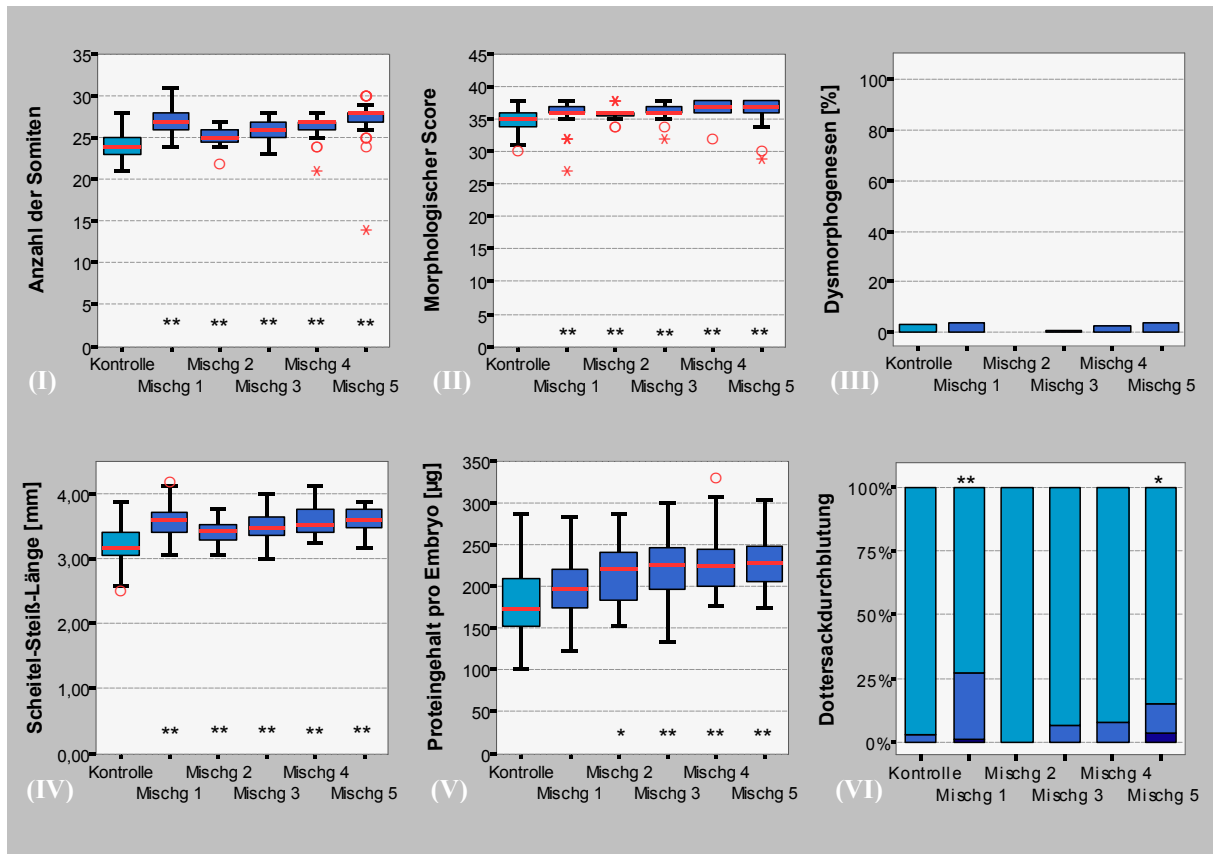
Zu diesem Zweck wurden fünf verschiedene Mischungen von FBS und RS im Verhältnis 1:1 im Vergleich zu Kontrollansätzen von reinem RS-Kulturmedium untersucht.

In diesen Testansätzen erreichten die Embryonen ein signifikant größeres Wachstum (Abb. 19 / IV und V) und eine signifikant höhere Differenzierung (Abb. 19 / I und II) im Vergleich zur Kontrolle. Dies galt sowohl für Mischungen basierend auf Chargen des RS, die als geeignet für die WEC eingestuft wurden als auch für eine Mischung mit einer Charge des RS, die als nicht geeignet eingestuft wurde. Die FBS in der Mischung bedingten keine signifikante Häufung von Abnormalitäten bei den kultivierten Embryonen (Abb. 19 / III), obwohl der Einsatz von FBS allein immer zu einer erhöhten Inzidenz von Anomalien führte (vgl. 5.3.1.3).

Die Mischung von Rinderserum aus eigener Herstellung mit FBS erwies sich als eine geeignete Basis für das Kulturmedium der WEC.



**Abb. 18: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in einer Mischung aus FBS und Rinderserum aus eigener Herstellung**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 19



**Abb. 19: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für eine Mischungen von FBS und Rinderserum aus eigener Herstellung**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 65, Mischg-1 n = 93, Mischg-2 n = 28, Mischg-3 n = 92, Mischg-4 n = 38 und Mischg-5 n = 54. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore 3 2 1.

#### 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

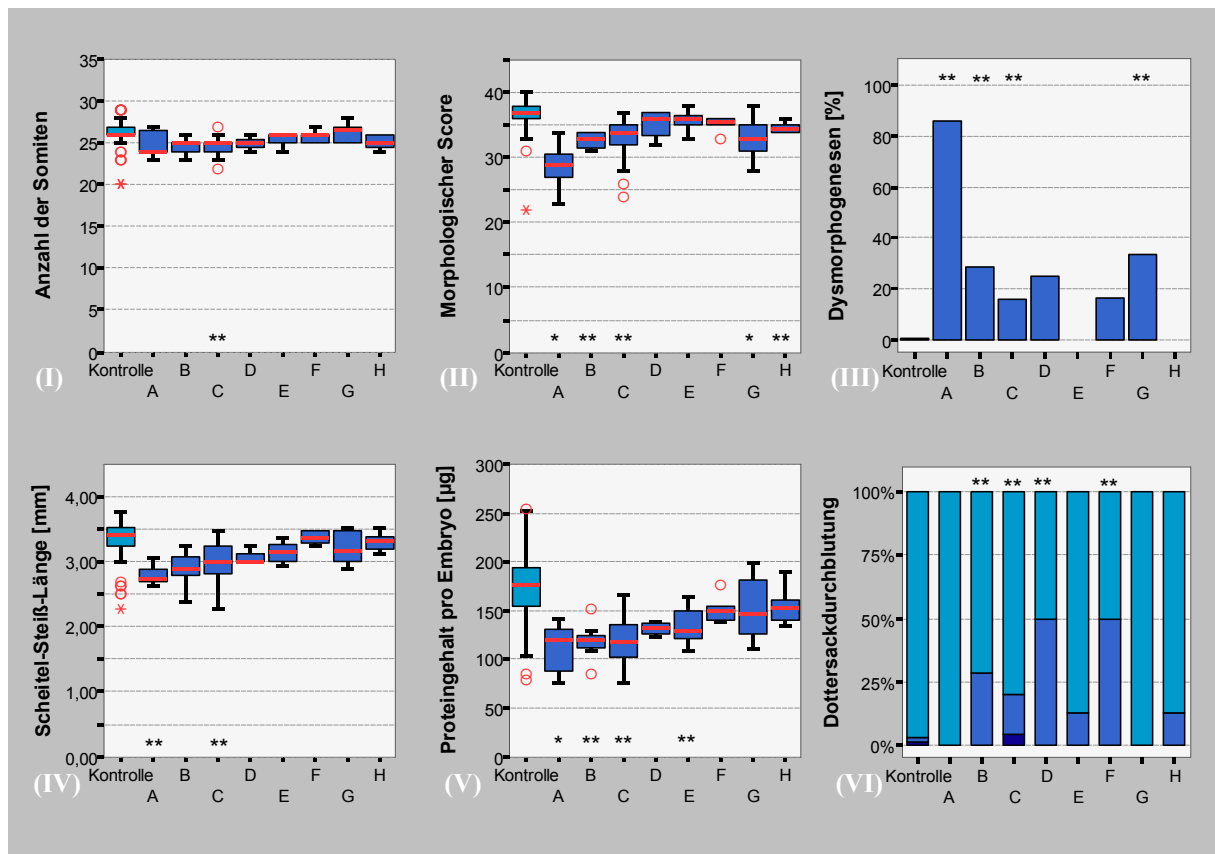
Bei der Untersuchung der Mischung von FBS mit RS wurde festgestellt, dass diese Mischung ein geeignetes Kulturmedium für die WEC darstellt, selbst dann, wenn das verwendete RS allein als Kulturmedium für die WEC nicht geeignet war (vgl. 5.4.1). Daher sollte weiter untersucht werden, ob die Mischung von FBS mit einem käuflichem DBS, welches allein nicht geeignet als Kulturmedium für die WEC war (vgl. 5.3.1.2), als Basis für das Kulturmedium der WEC ebenso geeignet ist.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen von 9 unterschiedlichen Mischungen aus FBS und DBS im Verhältnis 1:1 von acht Chargen FBS und fünf Chargen DBS von zwei Herstellern dargestellt (Abb. 20 und 21). Aufgrund des guten entwicklungsfördernden Potentials der 1:1 Mischung von RS und FBS wird diese im Folgenden als Kontrollkulturmedium anstatt des zuvor verwendeten reinen RS eingesetzt.

Alle Mischungen aus FBS und DBS unterstützten die Entwicklung der Embryonen in einem geringeren Maße als das Kontrollkulturmedium. Auch wenn einige Mischungen in einzelnen

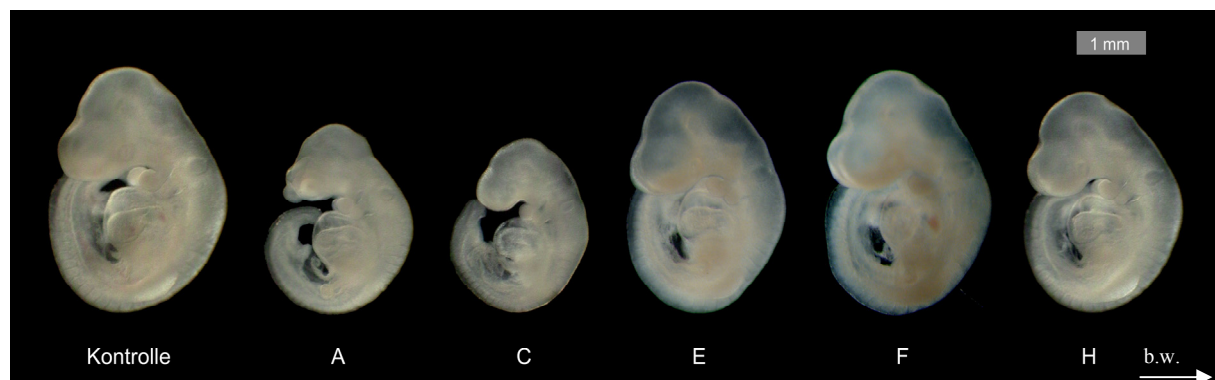
Parametern des Wachstums (Abb. 20 / IV und V) oder der Differenzierung (Abb. 20 / I und II) der Embryonen nicht mehr von der Kontrolle unterscheidbare Werte ermöglichten, musste für alle untersuchten Mischungen für mindestens einen der Auswertungsparameter ein statistisch signifikant kleinerer Wert im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Bei der Hälfte aller Mischungen traten signifikante Häufungen von Dymorphogenesen auf, die bis zu 86 % aller Embryonen einer Untersuchungsgruppe betrafen (Abb. 20 / III).

Somit wurde deutlich, dass die Mischung von käuflichen DBS und FBS keine geeignete Basis für das Kulturmedium der WEC darstellte.



**Abb. 20: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse acht verschiedener Kulturmedien basierend auf einer 1:1 Mischung von DBS und FBS**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 109, (A) n = 7, (B) n = 7, (C) n = 25, (D) n = 8, (E) n = 8, (F) n = 6, (G) n = 12 und (H) n = 8. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore 3 (hellblau) 2 (dunkelblau) 1 (schwarz).



**Abb. 21: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in einer Mischung von FBS und DBS**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 20. (Abb. 21 auf Seite 53).

### **5.4.3 Untersuchung der Effekte einer Supplementierung von nicht geeigneten käuflichen Rinderseren oder Rinderserummischungen mit 10 % Rattenserum**

Aus der Literatur ist bekannt, dass heterologe Seren, welche als Basis für das Kulturmedium der WEC ungeeignet waren, durch die Supplementierung mit 10 % homologen Rattenserum zu einem für die WEC geeigneten Kulturmedium aufgewertet werden können [4]. Im Folgenden sollte geprüft werden, ob diese Supplementierung des im Rahmen dieser Studie bereits als ungeeignet bewerteten DBS, FBS oder deren 1:1 Mischung zu einer Aufwertung führt, welche einen Einsatz der resultierenden Serummischung als Kulturmedium doch zulässt.

#### **5.4.3.1 Untersuchung von Donor Bovinem Serum (DBS) supplementiert mit 10 % Rattenserum auf seine Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC**

Es wurden zwei DBS von verschiedenen Herstellern (DBS 3 und 4), die die höchsten entwicklungsfördernden Eigenschaften aufwiesen (vgl. 5.3.1.2), mit 10 % Rattenserum supplementiert (Mischung 1 bis 5). Die Untersuchung erfolgte vergleichend zu einer Kontrolle basierend auf einer 1:1 Mischung von RS und FBS.

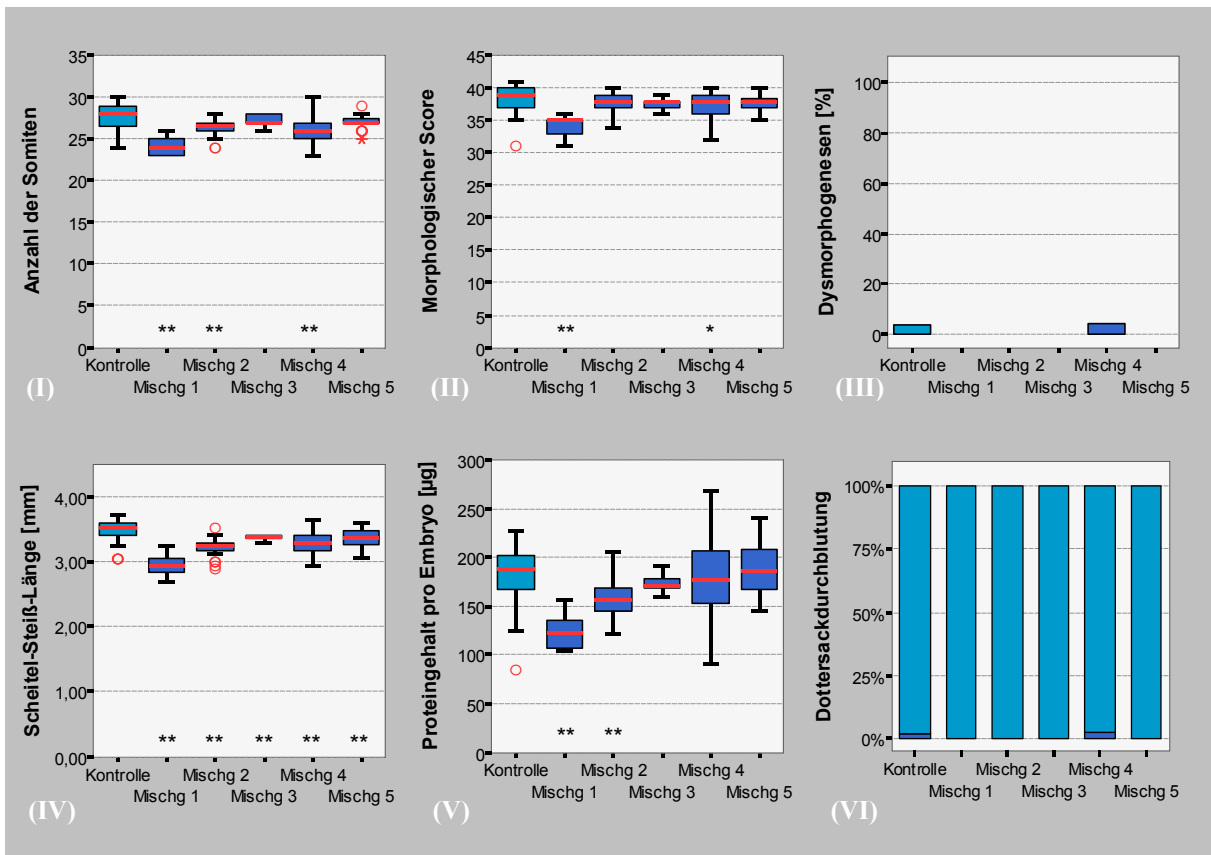
Diese Supplementierung konnte die signifikant geringere entwicklungsfördernde Eigenschaft der DBS nur teilweise verbessern (Abb. 22 und 23). So wurde zwar kein signifikantes Auftreten von Dymorphogenesen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt, wie dies noch ohne eine Supplementierung mit Rattenserum der Fall war (vgl. 5.3.1.2), aber die Entwicklung der Embryonen in diesen Mischungen war geringer als in dem Kontrollkulturmedium. Dies manifestierte sich in mindestens einem Auswertungsparameter der Differenzierung (Abb. 22 / I und II) oder des Wachstums (Abb. 22 / IV und V), die einen signifikant kleineren Wert im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen.

Das entwicklungsfördernde Potential der Mischungen 4 und 5 liegt aber sehr nahe bei demjenigen der Kontrolle, so dass diese supplementierten Kulturmedien durchaus als geeignet eingestuft werden könnten.

Bei den Mischungen 1 und 2 handelt es sich um verschiedene Chargen DBS, die mit der gleichen Rattenserum-Charge supplementiert wurden. Das unterschiedliche entwicklungsfördernde Potential dieser Serummischungen muss daher in dem unterschiedlichen DBS Anteil begründet sein. Bei den Mischungen 2 bis 5 handelt es sich um jeweils das gleiche DBS, welches mit unterschiedlichen Rattenserum-Chargen supplementiert wurde. Daher können nur die verschiedenen Rattenserum-Chargen für das variierende entwicklungsfördernde Potential dieser Serummischungen verantwortlich sein.

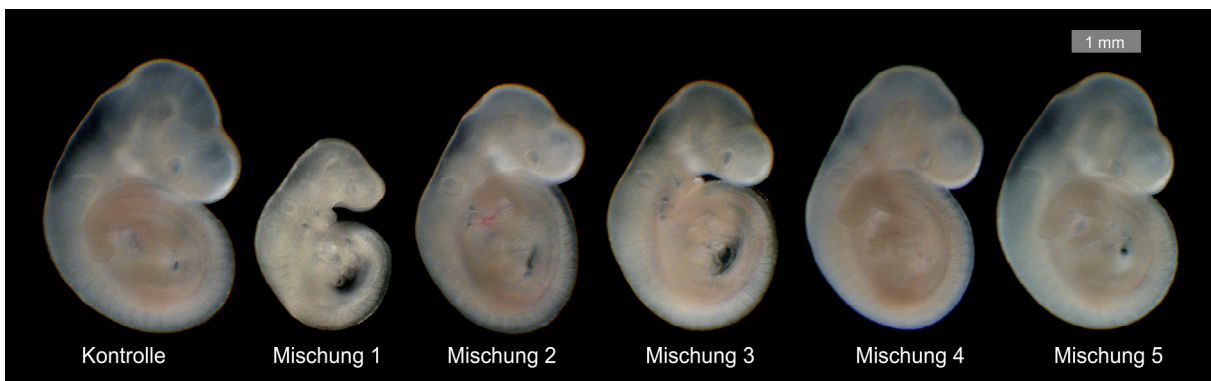
Die Supplementierung von käuflichem DBS mit 10 % Rattenserum führte nicht immer zu einer Serummischung, die eine geeignete Basis für das Kulturmedium der WEC darstellte.

Die Eignung war sowohl von der Qualität der verwendeten DBS Charge als auch der verwendeten Rattenserum Chargen abhängig.



**Abb. 22: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für DBS supplementiert mit 10 % Rattenserum**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 52, Mischg-1 n = 12, Mischg-2 n = 28, Mischg-3 n = 12, Mischg-4 n = 43 und Mischg-5 n = 39. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.



**Abb. 23: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in DBS supplementiert mit 10 % Rattenserum**

entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 22.

#### 5.4.3.2 Untersuchung von Fötalem Bovinem Serum (FBS) supplementiert mit 10 % Rattenserum (RaS) auf seine Eignung als Kulturmedium für die WEC

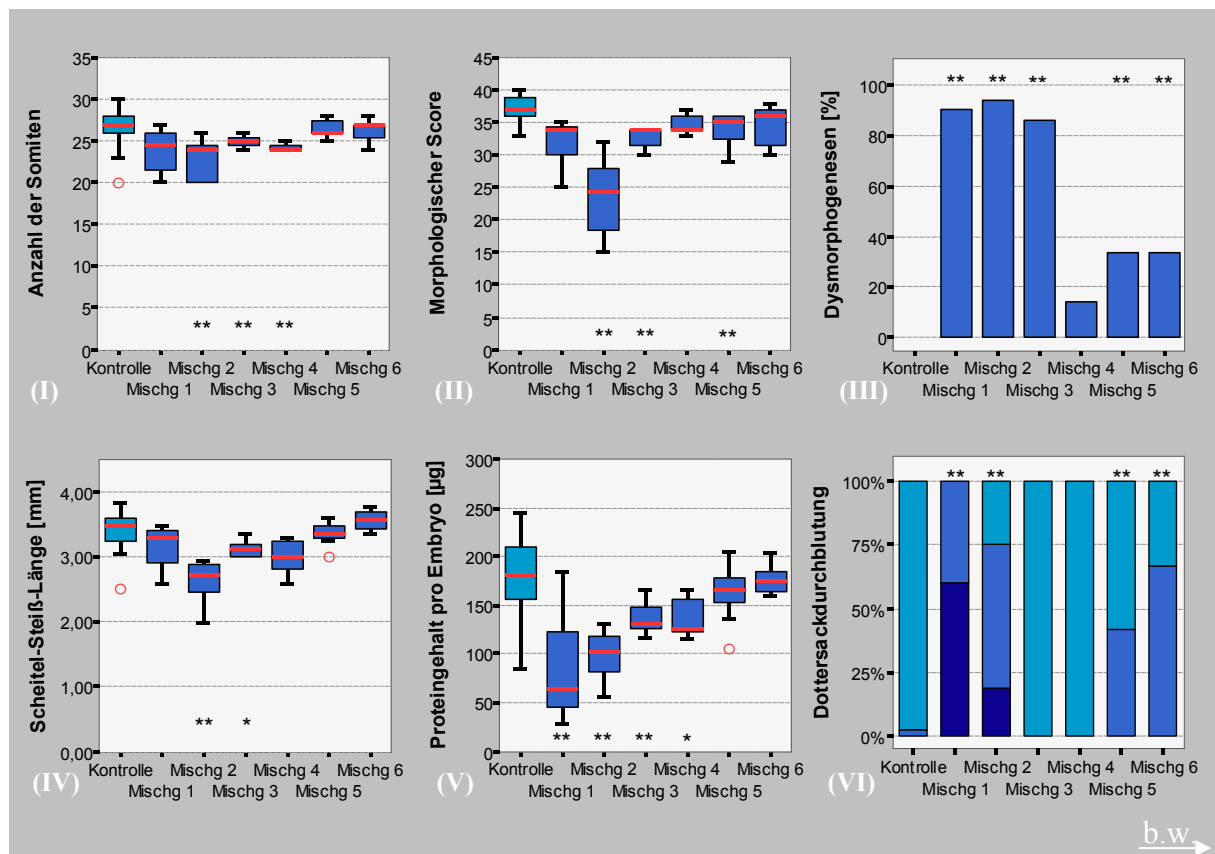
Im Folgenden soll die Supplementierung mit 10 % Rattenserum (RaS) als Aufwertung von käuflichen FBS, welches als alleinige Basis für das Kulturmedium WEC nicht geeignet war, untersucht werden.



Es wurden sechs verschiedene FBS von zwei Herstellern, die bereits sehr variable entwicklungsfördernde Eigenschaften gezeigt hatten (vgl. 5.3.1.3), mit RaS supplementiert und vergleichend zu einer Kontrolle (1:1 Mischung aus RS und FBS) untersucht.

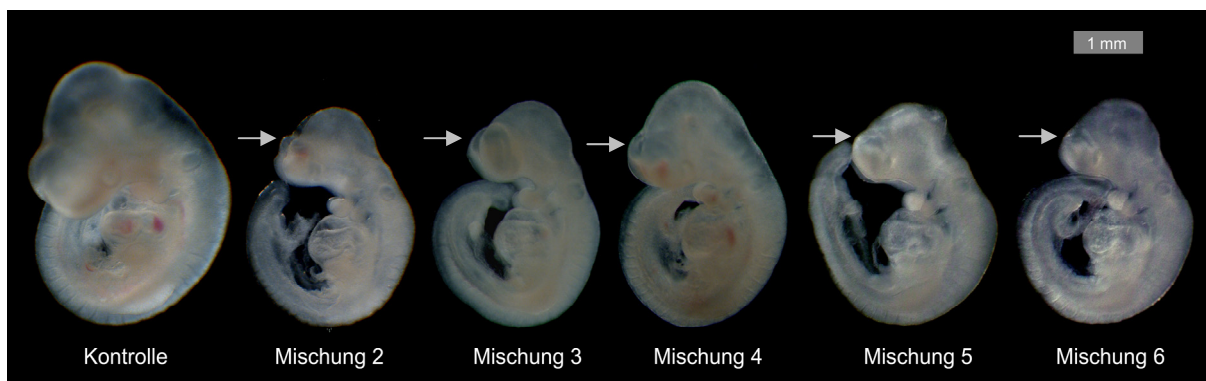
Die Supplementierung mit RaS konnte die signifikant geringere entwicklungsfördernde Eigenschaft des FBS nur teilweise kompensieren (Abb. 24 und 25). Im Vergleich zur Kontrolle waren nur in einer von sechs untersuchten Mischungen (Mischung 6) sowohl Differenzierung (Abb. 24 / I und II) als auch Wachstum (Abb. 24 / IV und V) gleich gut gefördert. Embryonen, die in diesen Mischungen kultiviert wurden, zeigten aber eine signifikante Häufung von Dysmorphogenesen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 24 / III). Eine Ausnahme bildete die Mischung 4. Aufgrund der geringen Stichprobengröße bleibt jedoch unbeantwortet, ob es sich bei der fehlenden statistischen Signifikanz bezüglich Häufigkeit der Anomalien um eine sachlich begründete oder um eine mathematisch bedingte handelte. Die Supplementierung des FBS mit RaS konnte offensichtlich die bei der Untersuchung des ungemischten FBS festgestellte typische Dysmorphogenese (vgl. 5.3.1.3), den offenen kranialen Neuporus mit der Anomalie der Kopfanlage, nicht kompensieren. Denn diese war auch bei dem supplementierten FBS die häufigste Anomalie (Abb. 25).

Die Supplementierung von käuflichem FBS mit RaS führte somit nicht zu einer Serumreinigung, die eine geeignete Basis für das Kulturmedium der WEC darstellte.



**Abb. 24: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für FBS supplementiert mit 10 % Rattenserum**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 49, Mischg-1 n = 20, Mischg-2 n = 16, Mischg-3 n = 7, Mischg-4 n = 7, Mischg-5 n = 12 und Mischg-6 n = 12. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1. (Abb. 24 auf Seite 56).

**Abb. 25: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in FBS supplementiert mit 10 % Rattenserum**

entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 24. Pfeile markieren die Dymorphogenese „offener kranialer Neuroporus“.

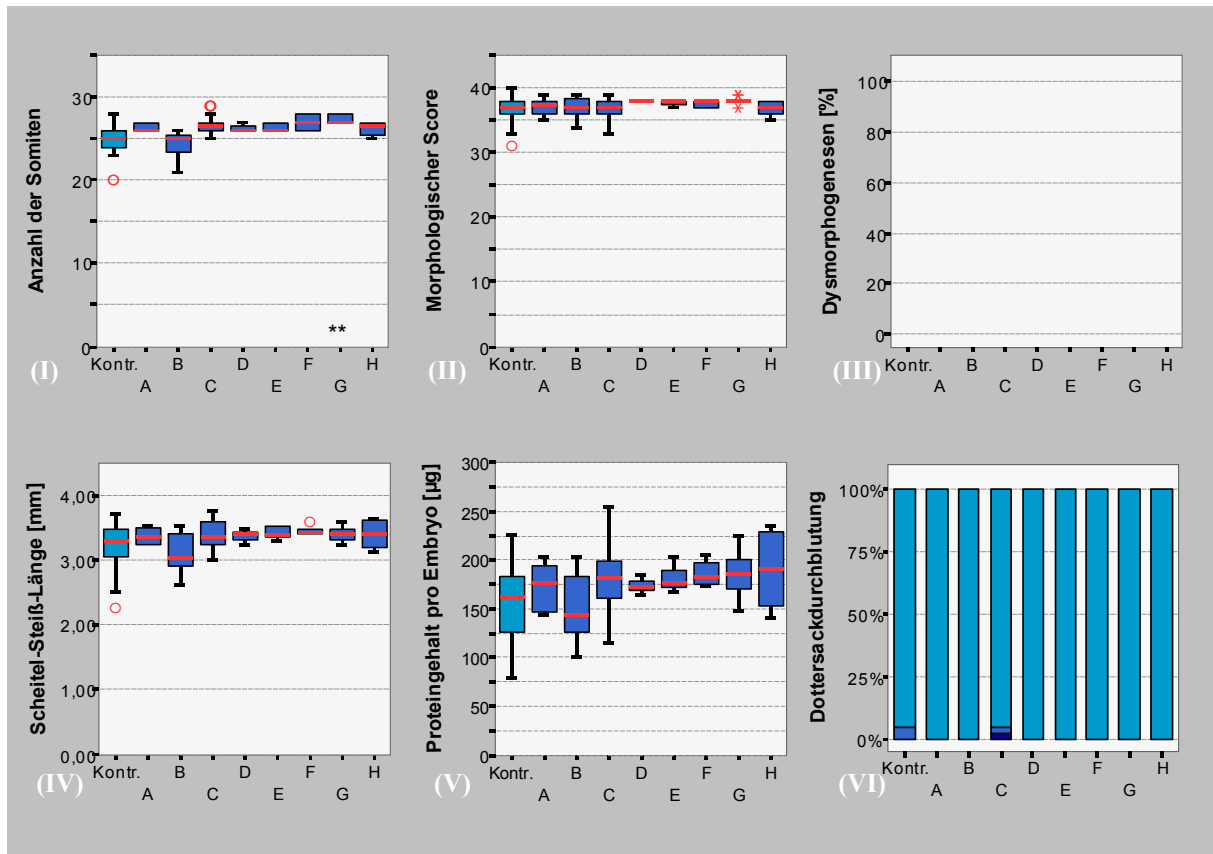
### 5.4.3.3 Untersuchung der Serummischung aus Fötalem Bovinem Serum (FBS) und Donor Bovinem Serum (DBS) supplementiert mit 10 % Rattenserum (RaS) auf seine Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC

Im Folgenden soll das Potential der Supplementierung von Serummischungen aus DBS und FBS (1:1), welche als alleinige Basis für das Kulturmedium der WEC nicht geeignet waren (vgl. 5.4.2), mit 10 % RaS untersucht werden.

Acht verschiedene Mischungen aus jeweils einem von acht FBS und einem von fünf DBS im Verhältnis 4,5 Teilen FBS und 4,5 Teilen DBS sowie 1 Teil RaS wurden dazu auf ihre entwicklungsfördernden Eigenschaften untersucht. Als Kontrolle diente ein Kulturmedium basierend auf einer 1:1 Mischung aus RS und FBS.

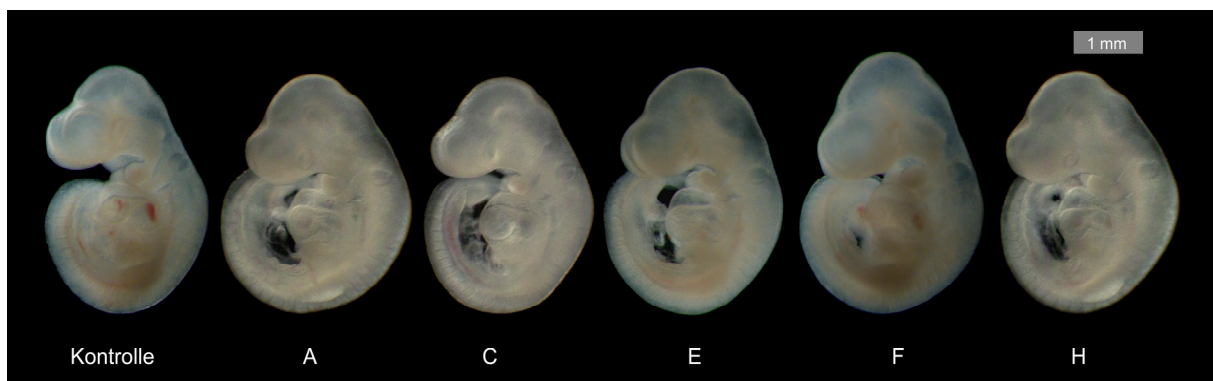
Es wurde festgestellt, dass bei allen Mischungen die Kulturergebnisse in allen Auswertungsparametern vergleichbar mit denen der Kontrolle waren (Abb. 26 und 27). Der einzige von den Kontrollwerten abweichende Wert war der signifikant größere Wert des Differenzierungsparameters Anzahl der Somiten bei der Mischung G (Abb. 26 / I). In keiner der untersuchten Mischungen traten Dymorphogenesen bei den kultivierten Embryonen auf (Abb. 26 / III).

Die Mischung von FBS, DBS und RaS im Verhältnis 4,5 : 4,5 : 1 stellte eine geeignete Basis für das Kulturmedium der WEC dar. Die Eignung der Mischung war unabhängig von den verwendeten Serumchargen des FBS, DBS und RaS.



**Abb. 26: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für 1:1 Mischungen von DBS und FBS supplementiert mit 10 % Rattenserum**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 21, (C) n = 46, (G) n = 12 und bei den übrigen Testansätzen n = 8. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.



**Abb. 27: Fotografien repräsentativer Embryonen für 1:1 Mischungen von FBS und DBS supplementiert mit 10 % Rattenserum**

entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 26.

## 5.5 Untersuchung des Einflusses von Rattenserum im Kulturmedium der WEC auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*

### 5.5.1 Einfluss des prozentualen Anteils des Rattenserums

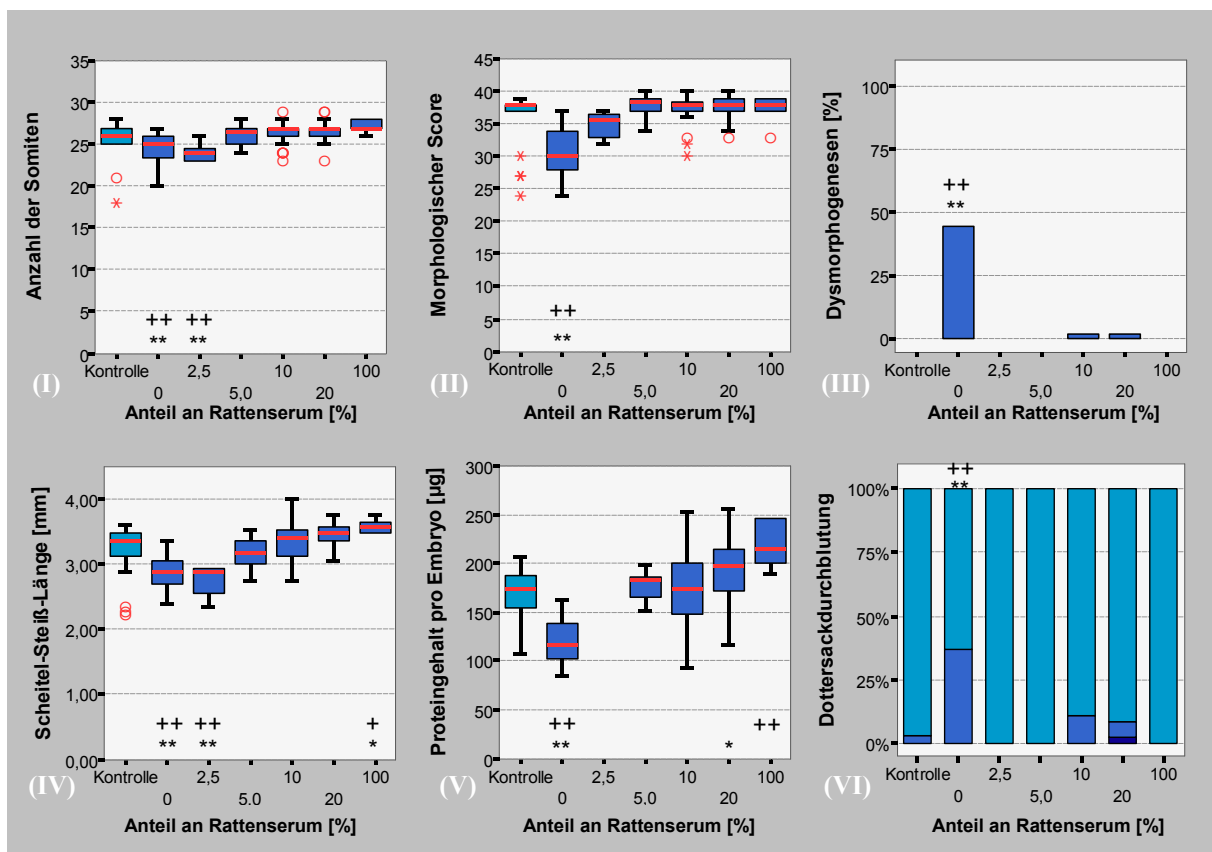
Ungeeignete heterologe Seren konnten mit einer Ergänzung von 10 bis 50 % Rattenserum am Gesamtserumanteil zu geeigneten Serummischungen aufgewertet werden [4;66;86-88;148]. Im Folgenden sollte geprüft werden, ob ein steigender prozentualer Anteil von Rattenserum als Supplement die Aufwertung von käuflichen Rinderseren ermöglicht. Hierbei wurden sowohl die Optimierungsmöglichkeiten von DBS als auch der 1:1 Mischungen von DBS mit FBS eruiert. Insgesamt wurden acht Versuche zur Supplementierung der Rinderseren mit Rattenserum durchgeführt.

Für den hierbei beobachteten konzentrationsabhängigen Effekt des RaS konnte kein Unterschied in Bezug auf die vier verschiedenen supplementierten Rinderseren bzw. Rinderserummischungen festgestellt werden. Diese wiesen un-supplementiert ein vergleichbares entwicklungsförderndes Potential auf. Die Ergebnisse dieser Versuche werden im Folgenden zusammengefasst dargestellt. Es wurden Serummischungen mit einem Rattenserumanteil von 2,5 bis 20 %, die entsprechenden ungemischten Rinder- bzw. Rattenserum untersucht. Das Kontrollkulturmedium basierte auf einer 1:1 Mischung aus FBS und DBS supplementiert mit 10 % Rattenserum.

Erwartungsgemäß (vgl. 5.3.1 und 5.4.2) bedingten die Rinderseren ohne eine Supplementierung mit Rattenserum eine schlechtere Entwicklung der Embryonen als das Kontrollkulturmedium. Dies manifestierte sich sowohl in signifikant geringeren Werten aller Auswertungsparameter des Wachstums (Abb. 28/ IV bzw. V) und der Differenzierung der Embryonen (Abb. 28 / I bzw. II) als auch in der Entwicklung des Dottersacks (Abb. 28 / VI). Die nicht supplementierten Rinderseren führten darüber hinaus zu einer signifikanten Häufung von Dysmorphogenesen der Embryonen (Abb. 28 / III). Durch die Supplementierung der Rinderseren mit Rattenserum konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Entwicklung der Embryonen beobachtet werden (Abb. 28 und 29). Die erste signifikante Steigerung der Differenzierung (Abb. 28 / I und II) und des Wachstums der Embryonen (Abb. 28 / IV und V) im Vergleich zur Kontrolle wurde ab einem Rattenserumanteil von 5 % festgestellt. Die Supplementierung der Rinderseren mit 2,5 % reichte aber bereits aus, um eine Häufung von Dysmorphogenesen zu verhindern (Abb. 28 / III) und eine Entwicklung des Dottersacks vergleichbar mit der der Kontrollen zu ermöglichen (Abb. 28 / VI). Die Supplementierung der Rinderseren mit 20 % Rattenserum bedingte ein Wachstum der Embryonen, welches signifikant größer war als das der Kontrollembryonen. Dieses Resultat zeigte sich aber nur in einem der beiden Wachstumsparameter, dem Proteingehalt der Embryonen (Abb. 28 / V). Das Wachstum, aber nicht die Differenzierung, der in 100 % Rattenserum kultivierten Embryonen

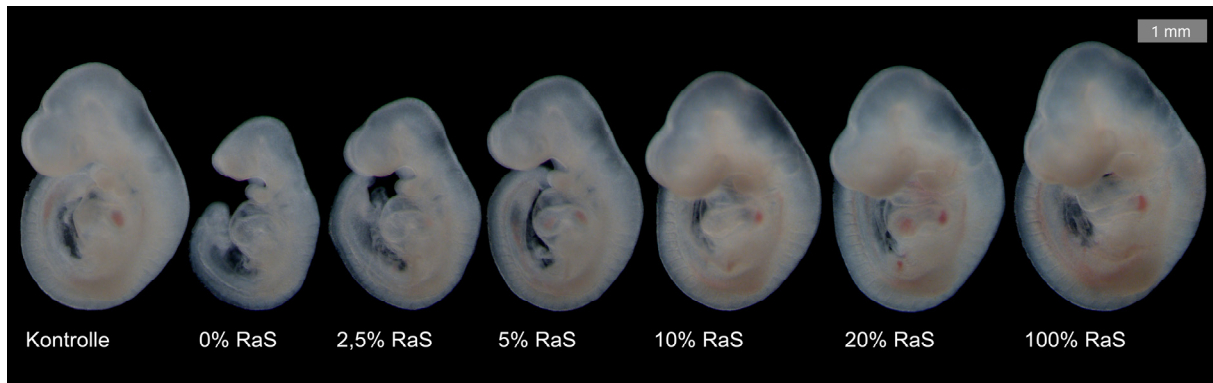
war erwartungsgemäß (vgl. 5.1) signifikant größer als bei der Kontrolle (Abb. 28 / IV und V bzw. Abb. 28 / I und II).

Ob eine Supplementierung der Rinderseren mit Rattenserum in einem geringeren bzw. größeren Anteil als 10 % zu einer signifikanten Verschlechterung bzw. Besserung der Entwicklung der Embryonen führt, wurde in einem zweiten statistischen Vergleich der verschiedenen Testansätze geprüft und zwar nun in Bezug auf den Testansatz mit 10 % Rattenserum. Der Kontrollansatz entspricht zwar auch einem Kulturmedium basierend auf einer Rinderserummischung supplementiert mit 10 % Rattenserum, wurde aber immer getrennt von den Testansätzen der Supplementierung mit 10 % Rattenserum erhoben, und wird daher auch getrennt ausgewertet. Hierbei wurde festgestellt, dass die Entwicklung der Embryonen in einem Kulturmedium mit 0 und 2,5 % Rattenserum mindestens in einem Auswertungsparameter signifikant kleiner war. Bei einem Kulturmedium bestehend aus 100 % Rattenserum wurde nur ein signifikant größeres Wachstum (Abb. 28 / IV und V), aber keine höhere Differenzierung (Abb. 28 / I und II) der Embryonen festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde für die Testansätze 5 % und 20 % in keinem Auswertungsparameter ein signifikanter Unterschied zum Testansatz mit 10 % Rattenserum beobachtet (Abb. 28).



**Abb. 28: Grafische Darstellung der konzentrationsabhängigen Effekte von Rattenserum (0 – 100 %) im Kulturmedium auf die Entwicklung der Embryonen**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 33, 0 % n = 27, 2,5 % n = 8, 5 % n = 14, 10 % n = 47, 20 % n = 47 und 100 % n = 6. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle gekennzeichnet mit (\*) oder im Vergleich zum Testansatz 10 % gekennzeichnet mit (+). Statistisches Signifikanzniveau: \* , + p < 0,05 und \*\*, ++ p < 0,01. (n.d. = nicht bestimmbar). Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.



**Abb. 29: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in Kulturmedien mit unterschiedlichem Rattenserumanteil**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 28.

### 5.5.2 Untersuchung einzelner Wachstumsfaktoren zur Aufwertung der käuflichen Rinderseren als Kulturmedium der WEC

Im Folgenden wurde untersucht, ob der positive Effekt der Supplementierung der käuflichen Rinderseren mit 10 % Rattenserum durch die Supplementierung mit Wachstumsfaktoren ersetzt werden kann. Hierfür wurden der insulinartige Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) und der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), die eine generelle Förderung des Wachstums und der Differenzierung von diversen Zellen und Geweben bedingen, sowie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), der spezifisch die Entwicklung des Blutgefäßsystems stimuliert, eingesetzt.

#### 5.5.2.1 Einfluss von IGF-1 auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*

Ziel der Untersuchung war es, einen möglichen konzentrationsabhängigen entwicklungsfördernden Effekt der Supplementierung eines Mangelkulturmediums (basierend auf Rinderseren) mit IGF-1 auf die Embryonen zu überprüfen. Hierfür wurde ein rekombinantes IGF-1 „Long R<sup>3</sup> IGF-1“ der Firma Sigma (Kat. Nr. I-1227) verwendet. Dieses zeichnet sich durch eine abgewandelte Aminosäuresequenz aus, die eine 10mal höhere wachstumsfördernde Aktivität als die physiologische Variante aufweist (Angaben des Herstellers).

In einem Konzentrations-Findungs-Versuch wurde der Konzentrationsbereich von 5 bis 100 ng/ml im Vergleich zu einer Negativkontrolle basierend auf einer 1:1 Mischung von DBS und FBS untersucht (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle diente ein Kulturmedium basierend auf der Serummischung der Negativkontrolle supplementiert mit 10 % Rattenserum. Unter Berücksichtigung der beobachteten Steigerung des Embryonenwachstums in diesem Versuch wurden die drei Konzentrationen 10, 20 und 30 ng/ml wiederholt geprüft.

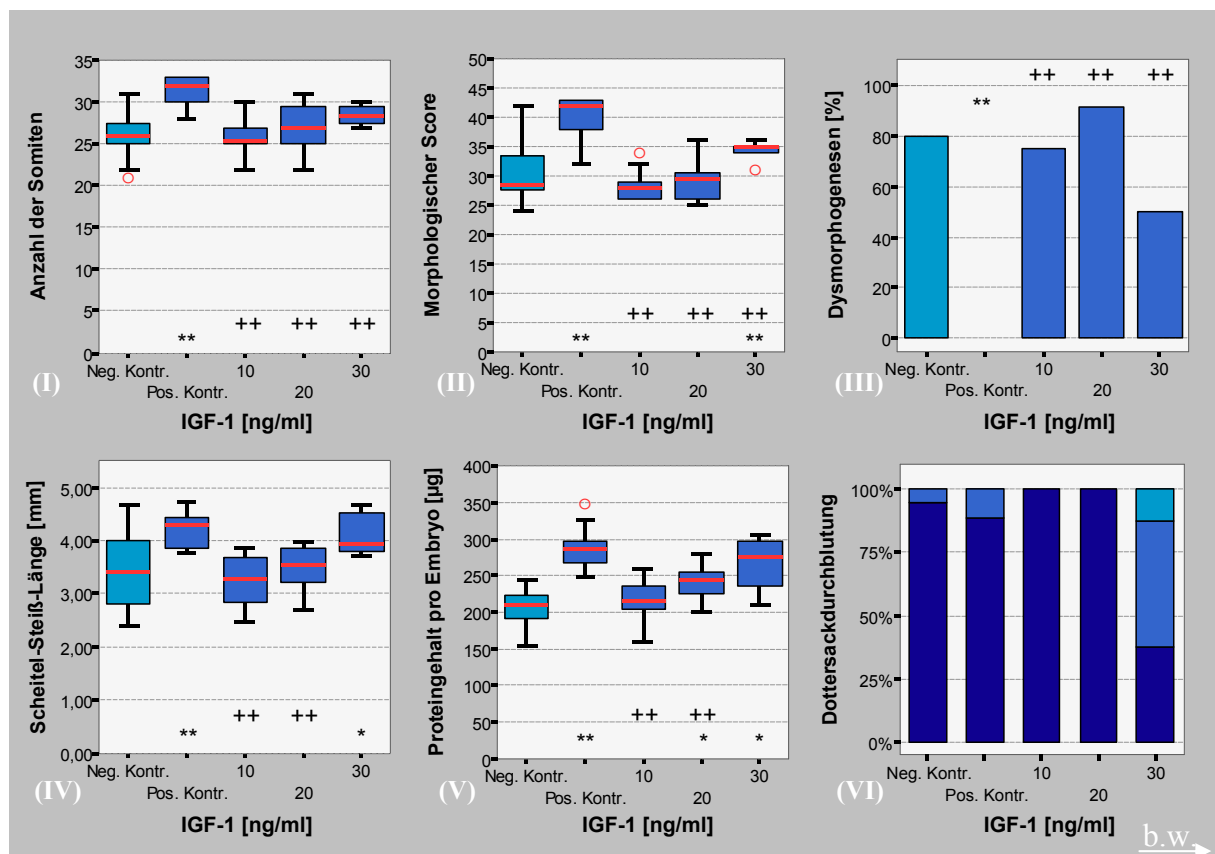
Es wurde ein konzentrationsabhängiger Effekt von IGF-1 festgestellt (Abb. 31). Eine Konzentration von 10 ng/ml hatte keinen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen. Zwanzig ng/ml steigerte das Wachstum signifikant, manifestiert im Proteingehalt der Embryonen (Abb. 30 / V), und 30 ng/ml induzierte zusätzlich eine Steigerung der Differenzierung, welche

sich in einem signifikanten Anstieg des Morphologischen Scores (Abb. 30 / II) im Vergleich zur Negativkontrolle manifestierte.

Der erste statistische Vergleich der Testansätze zur Negativkontrolle diente zur Aufdeckung von jeglicher entwicklungsfördernder Wirkung des Wachstumsfaktors. Ein zweiter statistischer Vergleich der Testansätze zur Positivkontrolle diente zu Abschätzung, ob ein möglicher entwicklungsfördernder Effekt des Wachstumsfaktors im Ausmaß vergleichbar war mit dem Effekt der Supplementierung mit 10 % Rattenserum, welches der Kontrollsituation entsprach. In der zweiten statistischen Analyse wurde festgestellt, dass die Differenzierung der Embryonen in dem Testansatz 30 ng/ml IGF-1 noch signifikant kleiner war als die der Embryonen in der Positivkontrolle (Abb. 30 / I und II). Im Gegensatz dazu war das Wachstum der Embryonen in dem Ansatz mit der hohen Konzentration so deutlich gesteigert, dass dieses statistisch nicht mehr von dem der Embryonen in der Positivkontrolle unterscheidbar war (Abb. 30 / IV und V).

Durch die Supplementierung mit IGF-1 wurde keine signifikante Reduzierung der Häufigkeit der Dysmorphogenesen bewirkt (Abb. 30 / III).

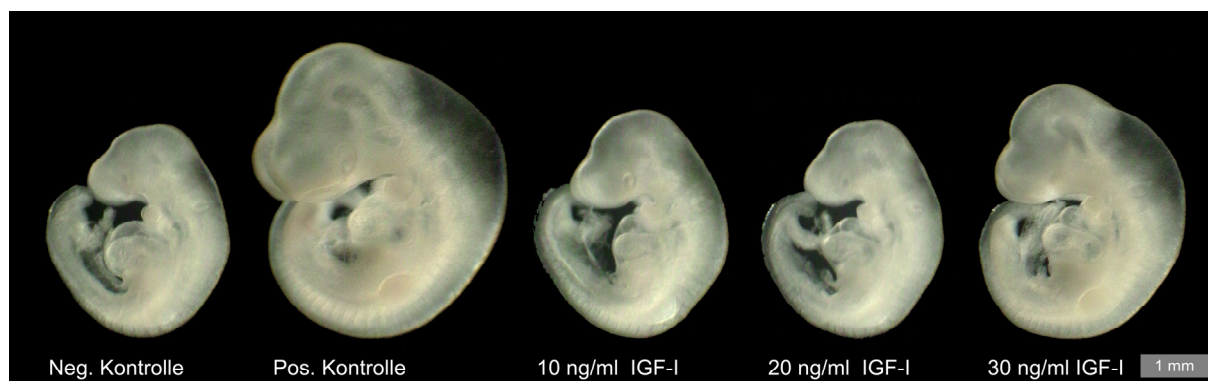
Durch die Supplementierung mit IGF-1 konnte die entwicklungsfördernde Wirkung des Rattenserumsupplements auf die Embryonen nur im Hinblick auf die Wachstumsinduktion simuliert werden. Aufgrund der Ergebnisse des Konzentrations-Findungs-Versuchs war eine weitere Erhöhung der IGF-1 Konzentration nicht sinnvoll, da hierbei eine Erhöhung der Abnormitätenrate beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).





**Abb. 30: Grafische Darstellung des Einflusses von IGF-1 auf die Entwicklung von Embryonen**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Negativkontrolle (Neg. Kontr.) n = 20, Positivkontrolle (Pos. Kontr.) n = 18, 10 ng/ml n = 12, 20 ng/ml n = 12 und 30 ng/ml n = 8. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Negativkontrolle (\*) bzw. zur Positivkontrolle (+). Statistisches Signifikanzniveau: \*, + p < 0,05 und \*\*, ++ p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1. (Abb. 30 auf Seite 62).

**Abb. 31: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in einem Mangelmedium supplementiert mit IGF-1**

Als Vergleich dienten die Embryonen kultiviert in dieser Serum Mischung als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde diese Serum Mischung mit 10 % Rattenserum supplementiert. Die dargestellten Embryonen entsprechen den Ergebnissen dargestellt in Abb. 30.

**5.5.2.2 Einfluss von EGF auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro***

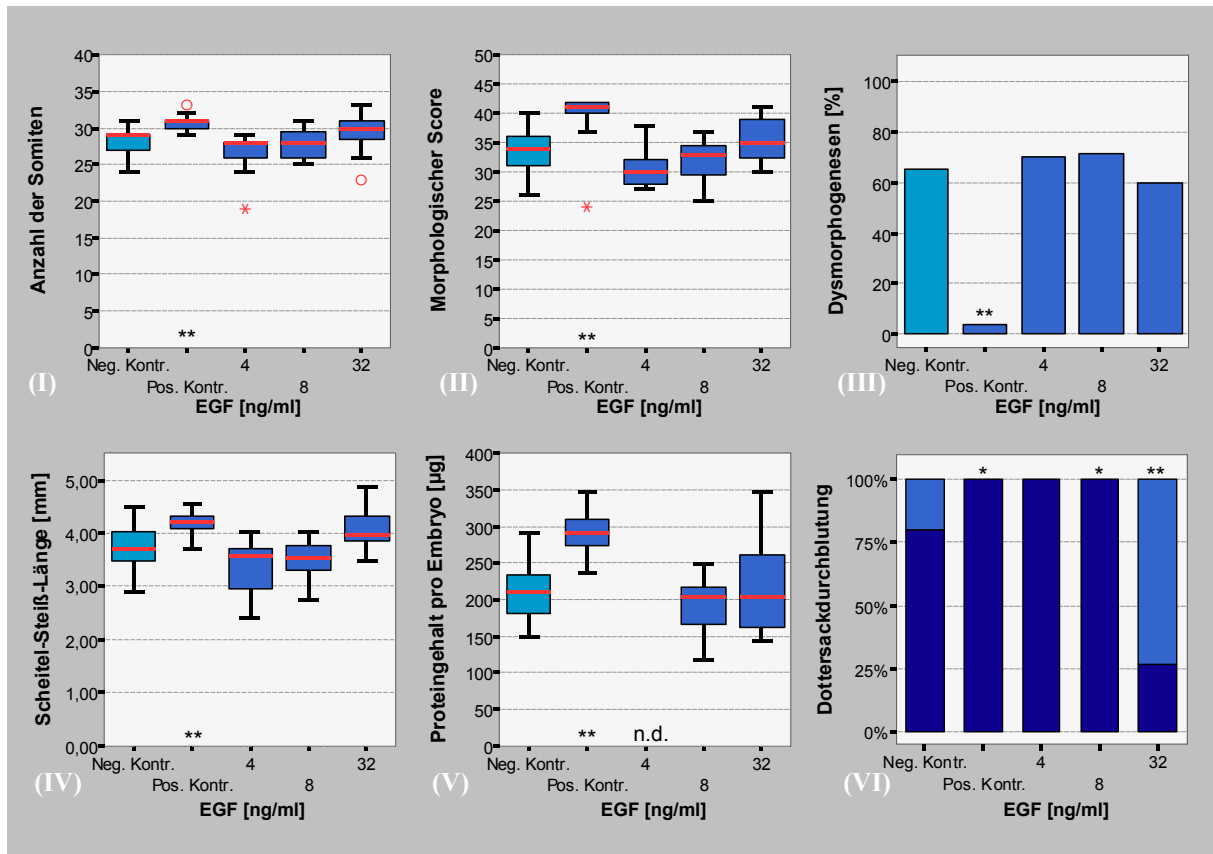
Es wurde untersucht, ob eine konzentrationsabhängige Supplementierung eines Mangelmediums (basierend auf Rinderserum) mit dem Wachstumsfaktor EGF einen entwicklungsfördernden Effekt auf die Embryonen *in vitro* hat. Hierfür wurde ein aus der Unterkieferdrüse (*Glandula submaxillaris*) der Maus isoliertes EGF der Firma Sigma (Kat. Nr. E-4127) verwendet.

In einem Konzentrations-Findungs-Versuch wurde der Konzentrationsbereich von 2 bis 200 ng/ml im Vergleich zu einer Negativkontrolle (1:1 Mischung von DBS und FBS) untersucht. Als Positivkontrolle diente ein Kulturmedium basierend auf der Serum Mischung der Negativkontrolle supplementiert mit 10 % Rattenserum. Hierbei konnte kein eindeutiger konzentrationsabhängiger Effekt von EGF beschrieben werden. Nur im Konzentrationsbereich von 2 bis 50 ng/ml schien sich, ein positiver konzentrationsabhängiger Effekt auf das Wachstum abzuzeichnen. Daher wurden die drei Konzentrationen 4, 8 und 32 ng/ml nochmals untersucht, um durch eine Erweiterung der Stichprobengröße auch kleinere Effekte beschreiben zu können.

Es konnte kein signifikanter Effekt des EGF in einem der Wachstum- oder Differenzierungsparameter für die Embryonen festgestellt werden (Abb. 32 / I bis V und Abb. 33). Nur die Differenzierung der Dottersackdurchblutung wurde durch 8 und 32 ng/ml signifikant gesteigert (Abb. 32 / VI).

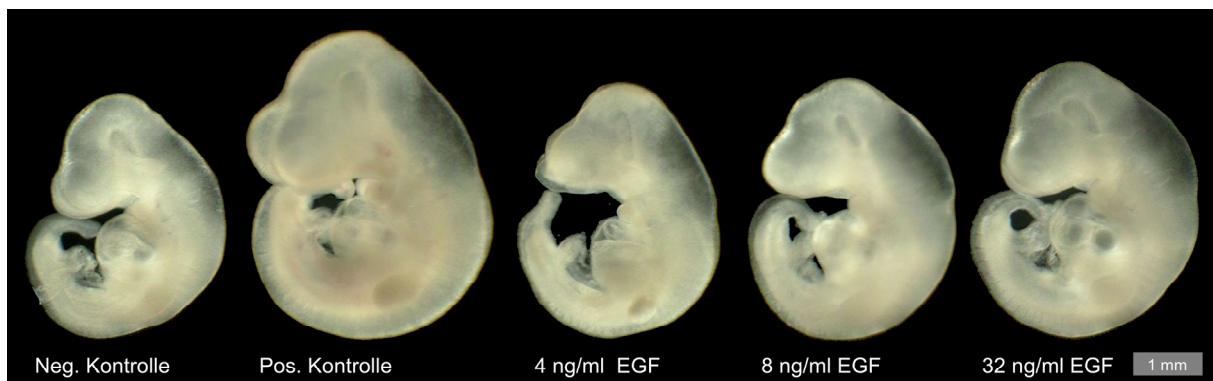
EGF bewirkte keine Reduzierung der Häufigkeit der Dymorphogenesen im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 32 / III).

Durch die Supplementierung mit EGF konnte die positive Wirkung des Rattenserumsupplements auf die Embryonen nicht simuliert werden.



**Abb. 32: Grafische Darstellung des Einflusses von EGF auf die Entwicklung von Embryonen**

Getesteter Konzentrationsbereich von 4 bis 32 ng/ml. Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Negativkontrolle (Neg. Kontr.) n = 40, Positivkontrolle (Pos. Kontr.) n = 26, 4 ng/ml n = 10, 8 ng/ml n = 28 und 32 ng/ml n = 15. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Negativkontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. (n.d. = nicht bestimmt). Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.



**Abb. 33: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in einem Mangelmedium supplementiert mit EGF**

Als Vergleich dienten die Embryonen kultiviert in diesem unsupplementierten Mangelmedium als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde das Mangelmedium mit 10 % Rattenserum supplementiert. Die dargestellten Embryonen entsprechen den Ergebnissen aus Abb. 32.

### 5.5.2.3 Einfluss von VEGF auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*

Es wurde untersucht, ob eine konzentrationsabhängige Supplementierung eines Mangelmediums (basierend auf Rinderserum) mit dem Wachstumsfaktor VEGF einen entwicklungsfördernden Effekt auf die Embryonen hat. Hierfür wurde ein rekombinantes VEGF der Firma Sigma (Kat. Nr. V7259) verwendet.

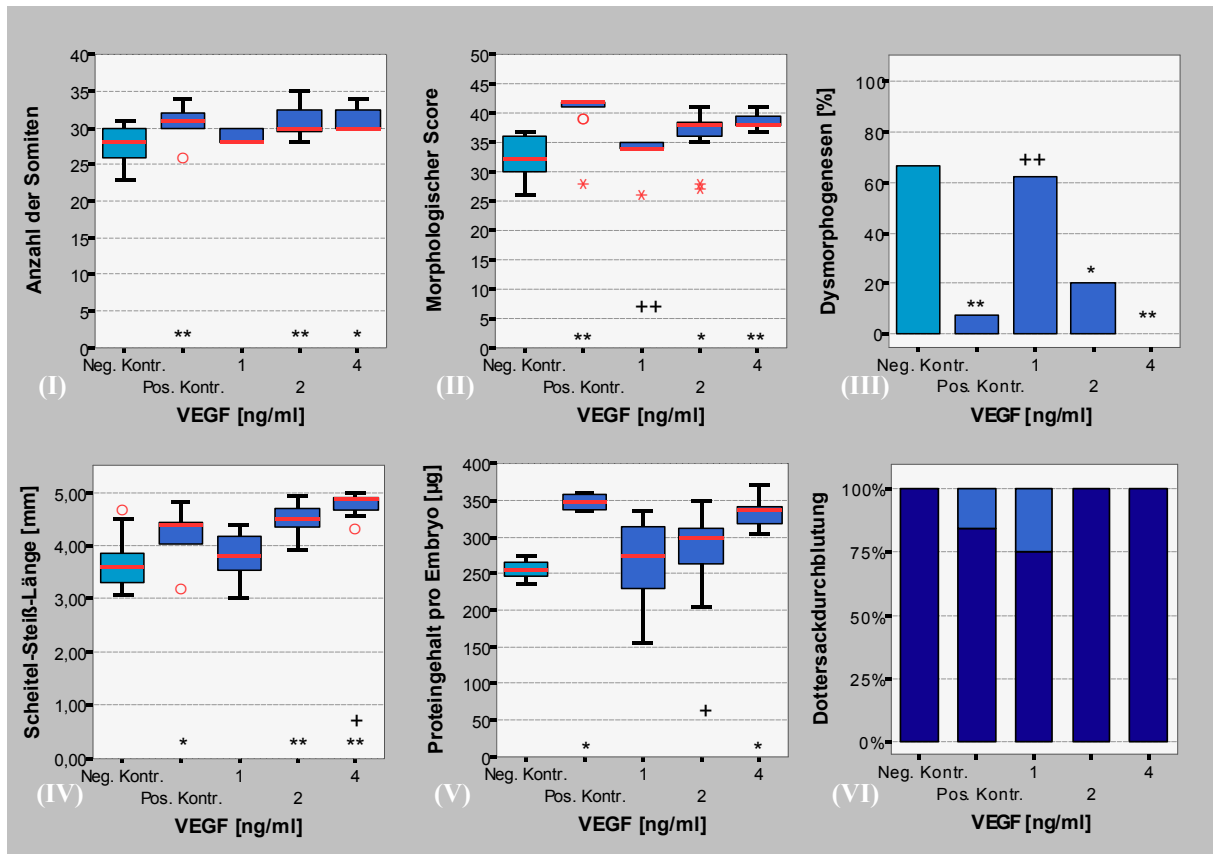
In einem Konzentrations-Findungs-Versuch wurde der Konzentrationsbereich von 0,5 bis 16 ng/ml im Vergleich zu einer Negativkontrolle (1:1 Mischung von DBS und FBS) untersucht. Als Positivkontrolle diente ein Kulturmedium basierend auf der Serummischung der Negativkontrolle supplementiert mit 10 % Rattenserum. Unter Berücksichtigung der beobachteten entwicklungsfördernden Effekte im Konzentrations-Findungs-Versuch wurden die drei Konzentrationen 1, 2 und 4 ng/ml wiederholt untersucht.

Es wurde ein konzentrationsabhängiger Effekt von VEGF festgestellt (Abb. 34 und 35). VEGF hatte in einer Konzentration von 1 ng/ml keinen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen. Bei 2 ng/ml steigerte der Wachstumsfaktor signifikant die Differenzierung mit Zunahme der Anzahl der Somiten und auch des Morphologischen Scores (Abb. 34 / I und II) und zudem war eine signifikante Wachstumsförderung in Hinblick auf die Scheitel-Steiß-Länge festzustellen (Abb. 34 / IV). Die konzentrationsabhängige Zunahme im Proteingehalt der Embryonen erreichte erst bei einer Konzentration von 4 ng/ml VEGF im Vergleich zur Negativkontrolle eine statistische Signifikanz (Abb. 34 / V).

Entsprechend zu der Vorgehensweise des vorhergehenden Versuchsansatzes mit EGF und IGF-1 wurden die Testansätze einerseits zur Negativkontrolle als auch zur Positivkontrolle statistisch verglichen. Im Vergleich mit der Positivkontrolle ergab sich eine Differenzierung der Embryonen in dem Testansatz 2 und 4 ng/ml VEGF, die sich nicht mehr von der Differenzierung der Embryonen der Positivkontrolle unterscheiden ließ (Abb. 34 / I und II). Die Supplementierung mit 1 ng/ml VEGF führte zu einer Differenzierung der Embryonen, die sich signifikant von der der Positivkontrolle unterschied (Abb. 34 / I und II). Im statistischen Vergleich der Wachstumsparameter ergab sich ein heterogenes Bild. Anhand der Scheitel-Steiß-Länge war das Wachstum der Embryonen kultiviert in den Testansätzen mit 1 und 2 ng/ml vergleichbar mit dem der Positivkontrolle, nach Supplementierung mit 4 ng/ml sogar signifikant größer als diese (Abb. 34 / IV). Im Gegensatz dazu wurde beim Proteingehalt der Embryonen festgestellt, dass dieser in den beiden niedrigen Konzentrationen kleiner waren als in der Positivkontrolle, auch wenn bei 1 ng/ml keine statistische Signifikanz erreicht wurde ( $p = 0,056$ ). Der Proteingehalt der Embryonen im Testansatz 4 ng/ml VEGF war vergleichbar mit dem der Positivkontrolle (Abb. 34 / V).

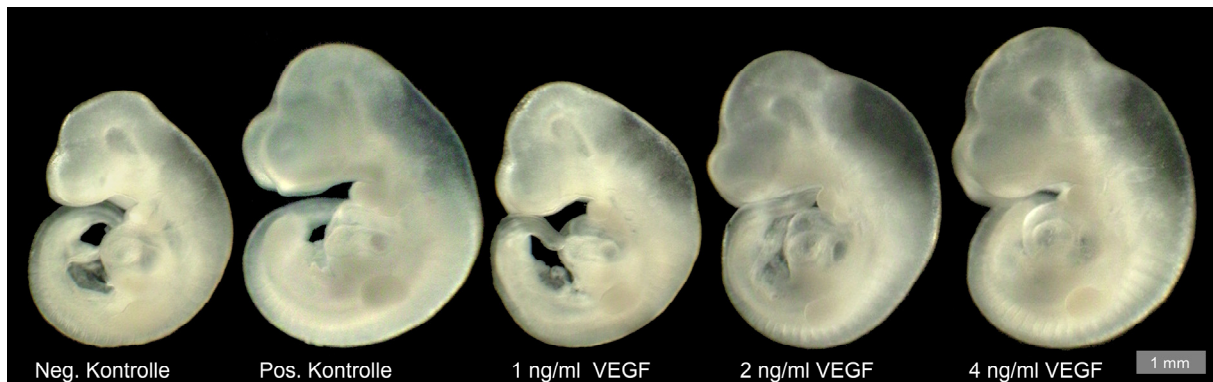
Durch die Supplementierung mit VEGF in der Konzentration 2 und 4 ng/ml wurde eine signifikante Reduzierung der Häufigkeit der Dysmorphogenesen bewirkt (Abb. 34 / III).

Durch die Supplementierung mit VEGF konnte somit die positive Wirkung des Rattenserumsupplements auf die Embryonen simuliert werden.



**Abb. 34: Grafische Darstellung des Einflusses von VEGF auf die Entwicklung von Embryonen**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Negativkontrolle (Neg. Kontr.) n = 15, Positivkontrolle (Pos. Kontr.) n = 13, 1 ng/ml n = 8, 2 ng/ml n = 15 und 4 ng/ml n = 7. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Negativkontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore 3 2 1.



**Abb. 35: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in einem Mangelmedium supplementiert mit VEGF**

Als Vergleich dient die Embryonen kultiviert in dieser Serummischung als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde diese Serummischung mit 10 % Rattenserum supplementiert. Die dargestellten Embryonen entsprechen den Ergebnissen aus Abb. 34.

### 5.5.3 RT-PCR Analysen an Embryonen- und Dottersackmaterial in Bezug auf Rezeptoren verschiedener Wachstumsfaktoren und den Wachstumsfaktor VEGF

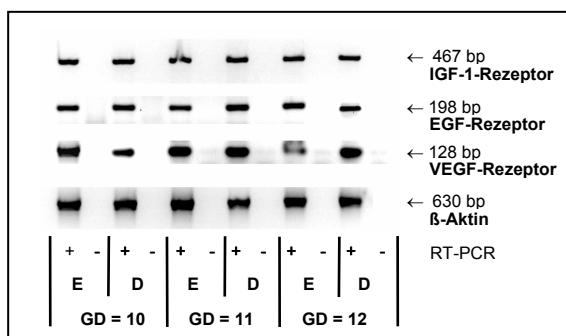
Die Steuerung der Entwicklungsprozesse der Embryonen erfolgt weniger über variierende Konzentrationen von exogenen Wachstumsfaktoren als über die Variation der Rezeptorexpression der Embryonen [101]. Um die Vergleichbarkeit der *In-vivo*- und *In-vitro*-Embryonen

diesbezüglich bestimmen zu können, wurden sowohl in den Embryonen als auch im Dottersack die Rezeptorexpression für verschiedene Wachstumsfaktoren während der Kulturzeit der WEC untersucht. Da nur wenig Probenmaterial von Rattenembryonen der Gestationstage 10, 11 und 12 gewonnen werden kann, wurde die Analyse der Rezeptorexpression von IGF-1, EGF und VEGF nicht auf der Proteinebene sondern auf der mRNA-Ebene durchgeführt. Das Ziel war die semiquantitative Untersuchung der relativen mRNA-Mengen für die oben genannten Rezeptoren im Vergleich zur mRNA-Menge des „House-keeping Gene“  $\beta$ -Aktin im Embryo und im Dottersack. Weiterhin wurde die relative Menge an mRNA für VEGF, der den größten Effekt in der Aufwertung von käuflichen bovinem Serum hatte, untersucht, um einen Hinweis auf dessen Expression im Embryo bzw. Dottersack zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden Proben verschiedener Gestationstage sowie entsprechende *In-vivo*- und *In-vitro*-Materialien vergleichend untersucht.

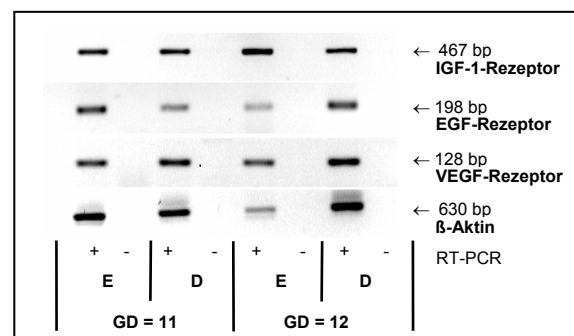
### 5.5.3.1 RT-PCR Analysen von Rezeptoren verschiedener Wachstumsfaktoren in *In-vivo*- und *In-vitro*-Embryonen

Alle RT-PCR-Analysen ergaben jeweils eine spezifische Bande. Diese lagen im Vergleich zu den Banden des mitgelaufenen 100-bp-Markers auf der Höhe, die der durch die Primerauswahl vorgegebenen Länge der spezifischen Amplifikate entsprach. Dies waren für den IGF-1-Rezeptor 467 bp, für den EGF-Rezeptor 198 bp, für den VEGF-Rezeptor (Flk-1) 128 bp und für  $\beta$ -Aktin 630 bp.

Die RT-PCR-Analysen der *In-vivo*-Proben ergaben, dass die relativen mRNA-Mengen der ausgewählten Rezeptoren für IGF-1, EGF und VEGF konstant waren (Abb. 36). Dies traf sowohl für den Vergleich zwischen den verschiedenen Gestationstagen 10, 11 und 12 als auch für den Vergleich zwischen Dottersack und Embryo zu. Die densitometrische Untersuchung der Banden mit der AIDA-Software bestätigte den subjektiven Eindruck der Konstanz der mRNA Mengen.



**Abb. 36:** Repräsentative RT-PCR Analysen der *In-vivo*-Embryonen (E) und deren Dottersäcke (D) auf die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren IGF-1, EGF, VEGF und des „House-keeping Gene“  $\beta$ -Aktin  
+ oder - RT-PCR = positive - oder negative RT-PCR Ansatz, bp = Basenpaare, GD = Gestationstag.



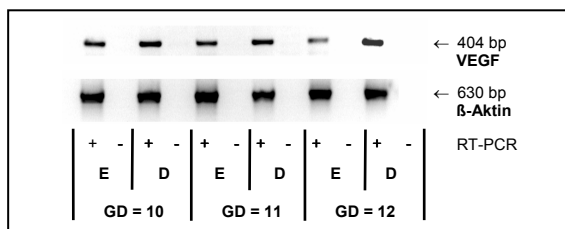
**Abb. 37:** Repräsentative RT-PCR Analysen der *In-vitro*-Embryonen (E) und deren Dottersäcke (D) auf die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren IGF-1, EGF, VEGF und des „House-keeping Gene“  $\beta$ -Aktin  
+ oder - RT-PCR = positive - oder negative RT-PCR Ansatz, bp = Basenpaare, GD = Gestationstag.

Mit einer 24-Stunden Kultur beginnend, wurde *In-vitro*-Probenmaterial an den Gestationstagen 11 und 12 gewonnen. Die RT-PCR-Analysen für Embryonen und ihre Dottersäcke ergaben, dass die relative mRNA-Menge des EGF-Rezeptors an den Gestationstagen relativ konstant war (Abb. 37). Im Gegensatz hierzu nahm die relative mRNA-Menge für den IGF-1-Rezeptor im Embryo und für den VEGF-Rezeptor sowohl im Embryo als auch im Dottersack zu. Die densitometrische Untersuchung dieser Banden wies eine Verdreifachung der relativen mRNA Mengen zwischen Gestationstag 11 und 12 nach.

### 5.5.3.2 RT-PCR Analysen des Wachstumsfaktors VEGF in *In-vivo*- und *In-vitro*-Embryonen

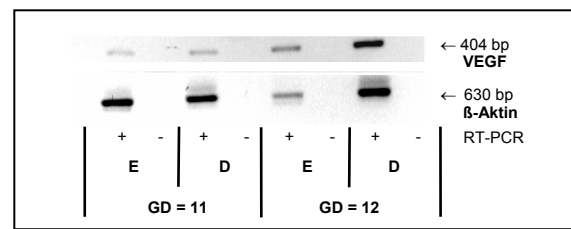
Alle RT-PCR-Analysen ergaben jeweils eine spezifische Bande. Diese lagen im Vergleich zu den Banden des mitgelaufenen 100-bp-Markers auf der Höhe, die der durch die Primerauswahl vorgegebenen Länge der spezifischen Amplifikate entsprach. Dies waren für den Wachstumsfaktor VEGF 404 bp und für  $\beta$ -Aktin 630 bp.

Die RT-PCR-Analysen der *In-vivo*-Embryonen und ihrer Dottersäcke an den Gestationstagen 10, 11 und 12 ergaben, dass die relativen mRNA-Mengen des Wachstumsfaktors VEGF an allen Gestationstagen im Embryo relativ konstant war, im Dottersack aber von Gestationstag 10 zu 12 abnahm (Abb. 38). Die größeren Mengen an mRNA wurden im Dottersack nachgewiesen. Die densitometrische Untersuchung der Banden bestätigte dieses Ergebnis und zeigte auf, dass die relative mRNA Menge im Dottersack auf die Hälfte zurückging (Abb. 40 / I).



**Abb. 38:** Repräsentative RT-PCR Analysen von *In-vivo*-Embryonen (E) und deren Dottersäcke (D) auf den Wachstumsfaktor VEGF und das „House keeping Gene“  $\beta$ -Aktin

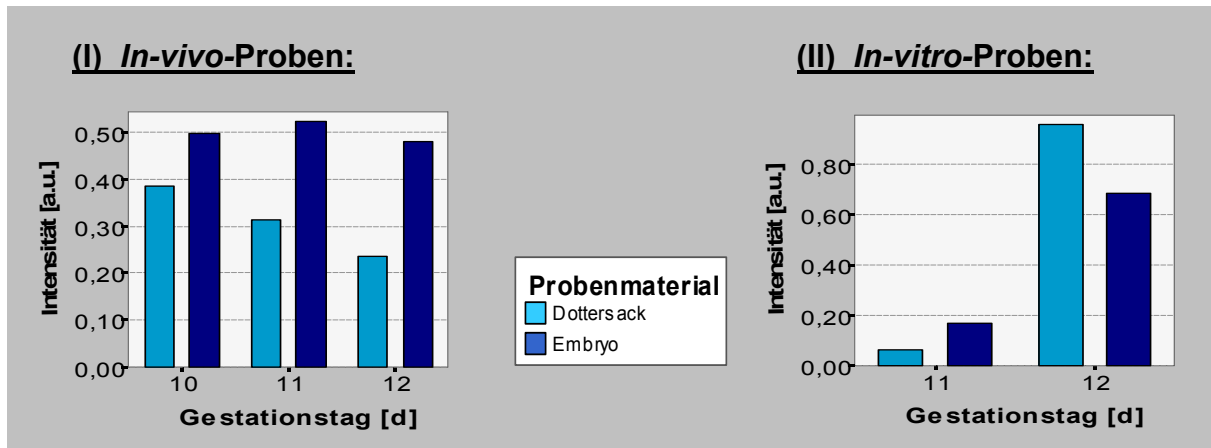
+ oder - RT-PCR = positive oder negative RT-PCR Ansatz, bp = Basenpaare, GD = Gestationstag.



**Abb. 39:** Repräsentative RT-PCR Analyse der *In-vitro*-Embryonen (E) und deren Dottersäcke (D) auf den Wachstumsfaktor VEGF und das „House keeping Gene“  $\beta$ -Aktin

+ oder - RT-PCR = positive oder negative RT-PCR Ansatz, bp = Basenpaare, GD = Gestationstag.

Die RT-PCR-Analysen der *In-vitro*-Embryonen und ihrer Dottersäcke am Gestationstag 11 und 12 ergaben, dass die mRNA Mengen des Wachstumsfaktors VEGF in Bezug auf die nachgewiesene Menge an mRNA des  $\beta$ -Aktins sowohl im Embryo als auch im Dottersack von Gestationstag 11 auf den nächsten Gestationstag deutlich anstieg (Abb. 39). Die densitometrische Untersuchung der Banden mit der AIDA-Software bestätigte diesen Anstieg. Es lag eine Steigerung der mRNA-Mengen auf das Zehnfache im Dottersack und auf das Dreifache im Embryo vor (Abb. 40 / II).



**Abb. 40:** Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der RT-PCR Analysen für den Wachstumsfaktor VEGF in *In-vivo*- und *In-vitro*-Embryonen und deren Dottersäcke relativiert zum  $\beta$ -Aktin basierend auf den Ergebnissen in Abb. 38 und 39. a.u. = willkürliche Einheit.

#### 5.5.4 Untersuchung der Variationsmöglichkeiten des laborinternen Herstellungsprotokolls von Rinderserum für die WEC im Hinblick auf die angestrebte industrielle Umsetzung

##### 5.5.4.1 Einfluss des Zeitraumes zwischen Blutabnahme und Beginn der Serumgewinnung auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*

Es ist aus der Literatur bekannt, dass der Zeitpunkt, an dem mit der Serumgewinnung aus Vollblut begonnen wird, für Rattenserum sehr wichtig ist [65]. Das von Klug et al. etablierte Protokoll zur Gewinnung von Rinderseren schreibt eine Serumgewinnung innerhalb von 20 bis 30 Minuten nach Blutabnahme vor [72]. Es ist zu erwarten, dass sich dieser Zeitplan bei einer industriellen Herstellung von größeren Serumchargen aus Rindervollblut nicht realisieren lässt. Das Ziel der folgenden Untersuchungen war es deshalb, diese Zeitabhängigkeit für Rinderserum zu untersuchen, insbesondere in Hinblick auf seine Eignung als Kulturmedium der WEC.

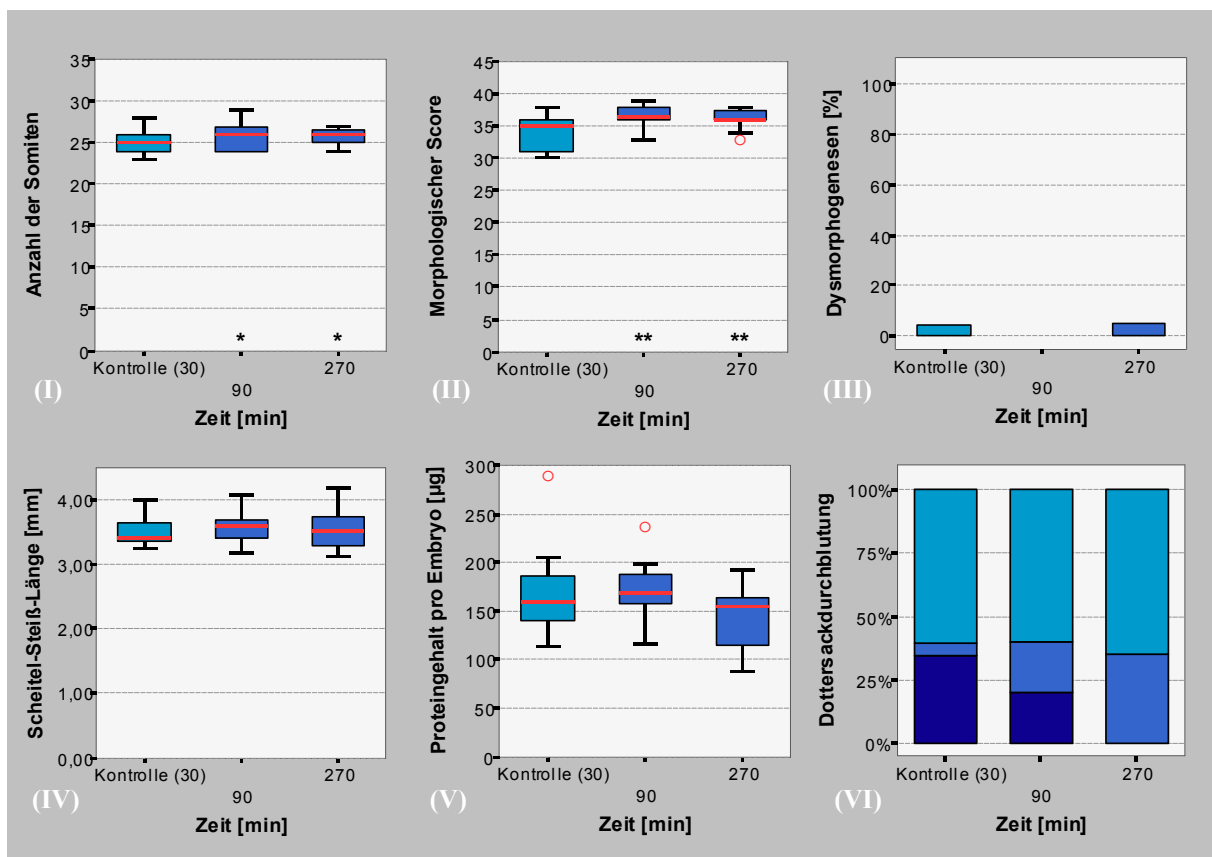
Hierfür wurden drei Rinderseren aus einer einzigen Blutprobe hergestellt. Diese Seren unterschieden sich nur hinsichtlich des zeitlichen Beginns der Zentrifugation nach Entnahme des Vollblutes. Es wurde der laborinterne Standardzeitpunkt von 30 Minuten nach der Blutab-



nahme für das Kontrollserum realisiert, aber zudem auch Serum erst nach 90 bzw. 270 Minuten nach der Blutabnahme gewonnen. Diese drei Serumvarianten dienten als Basis für Kulturmedien in zwei unabhängigen WEC Experimenten (Abb. 41).

Der verzögerte Beginn der Serumgewinnung mit 90 bzw. 270 Minuten bedingte im Vergleich zur Kontrolle (Zeitraum von 30 Minuten bis zur Serumgewinnung) eine signifikant bessere Differenzierung der kultivierten Embryonen. Dies manifestierte sich sowohl in einer größeren Zahl von Somiten (Abb. 41 / I) als auch in einem höheren Morphologischen Score-Wert (Abb. 41 / II) dieser Embryonen. Es wurde jedoch kein Einfluss des Zeitpunktes der Serumgewinnung auf das Wachstum der Embryonen (Abb. 41 / IV und V) oder auf die Entwicklung des Dottersacks (Abb. 41 / VI) beobachtet. Zudem wurde auch keine Häufung von Dysmorphogenesen bei diesen Embryonen festgestellt (Abb. 41 / III).

Die Untersuchung zeigte, dass es nicht von Nachteil war, Rinderserum verzögert zu gewinnen.



**Abb. 41: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse in Hinblick auf den Einfluss des Zeitraumes zwischen Blutabnahme und Beginn der Serumgewinnung**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle (30 min) n = 23, 90 min und 270 min je n = 20. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01.

Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore 3 2 1.

#### 5.5.4.2 Untersuchung des Einflusses einer möglichen Kontamination des Rinderserums mit Endotoxin auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*

Bei der industriellen Herstellung von Rinderserum stellt die Belastung mit Endotoxinen ein Problem dar, da ein hoher Keimdruck an Bakterien während der industriellen Gewinnung von Vollblut am Tier unvermeidbar ist. In der folgenden Untersuchung sollte getestet werden, ob der direkte Effekt eines Endotoxins als mögliche Ursache der beobachteten eingeschränkten Eignung (vgl. 5.3) verschiedener käuflicher Seren als Kulturmedium in Frage kommt.

##### 5.5.4.2.1 Untersuchung eines möglichen direkten Effektes von Endotoxin auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*

Hierfür wurde das Endotoxin von *Escherichia coli*-Bakterien in das Kulturmedium supplementiert und dessen mögliche konzentrationsabhängigen Effekte in einem WEC Experiment untersucht. Der gewählte Konzentrationsbereich reichte von 1 bis 51 ng/ml und entsprach damit den Konzentrationen, die in Analysenzertifikaten von Rinderseren angegeben waren.

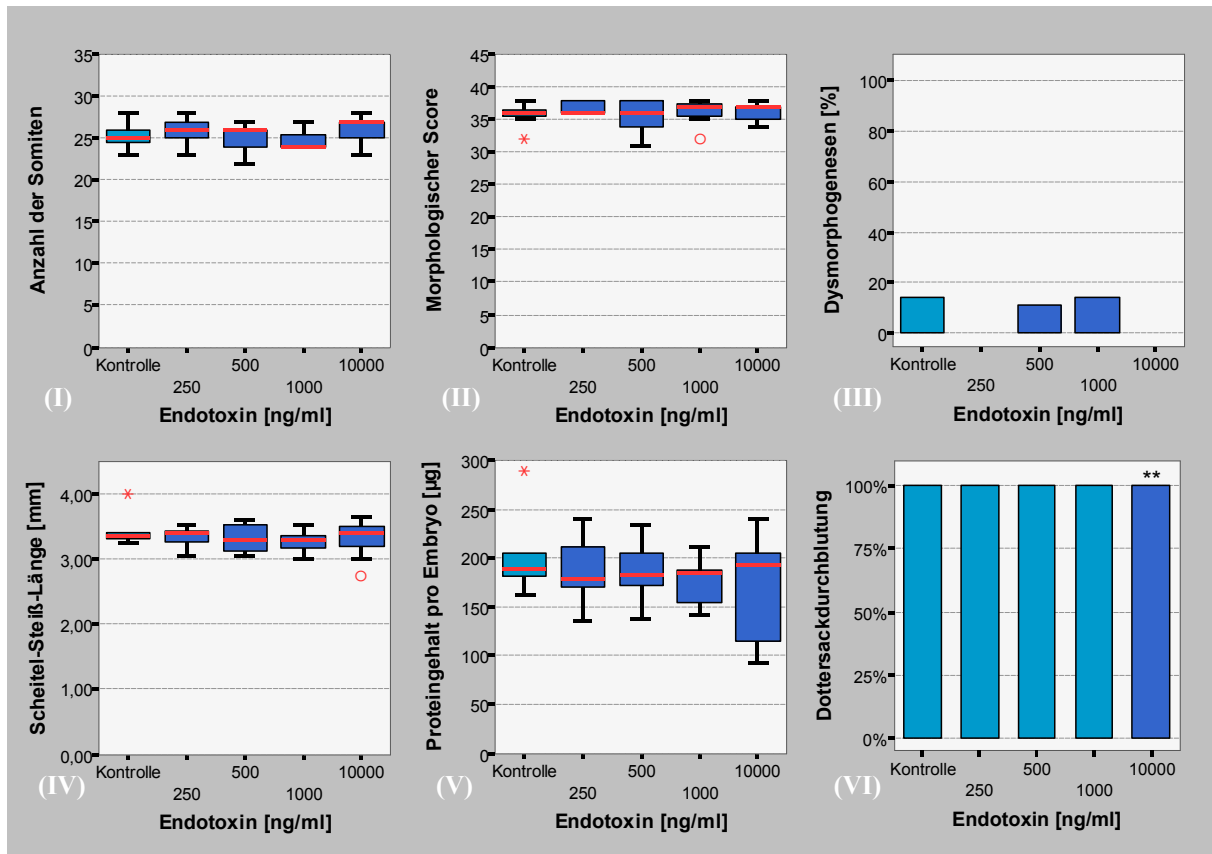
Die direkte Exposition der Embryonen mit Endotoxin-Konzentrationen von 1, 8, 26 und 51 ng/ml hatte keinen signifikanten Effekt auf die Embryonenentwicklung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ergebnisse nicht dargestellt).

Auch in einem zweiten Experiment mit Endotoxin-Konzentrationen bis zu 10 µg/ml (250, 500, 1 000 und 10 000 ng/ml) konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kein signifikanter Effekt auf die Differenzierung (Abb. 43 / I und II) oder das Wachstum (Abb. 43 / IV und V) der Embryonen festgestellt werden (Abb. 42). Zudem war eine Häufung von Dysmorphogenesen bei den Embryonen nicht zu beobachten (Abb. 43 / III). Nur die Entwicklung des embryonalen Dottersackes wurde durch die höchste getestete Konzentration signifikant gehemmt (Abb. 43 / VI).

Da bis zur höchsten getesteten Konzentration von *Escherichia coli*-Endotoxin kein adverser Effekt auf die Entwicklung von kultivierten Embryonen beobachtet werden konnte, ist ein direkter Effekt von Endotoxinen als Ursache der eingeschränkten Eignung käuflicher Rinderseren als Kulturmedium nicht wahrscheinlich.



**Abb. 42: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in endotoxinhaltigem Medium - direkter Endotoxineffekt**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 43.



**Abb. 43: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für unterschiedliche Endotoxin Konzentrationen im Kulturmedium - direkter Endotoxineffekt**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug:  $n = 7$  mit Ausnahme des Ansatzes 500 ng/ml  $n = 9$ . Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \*\*  $p < 0,01$ .

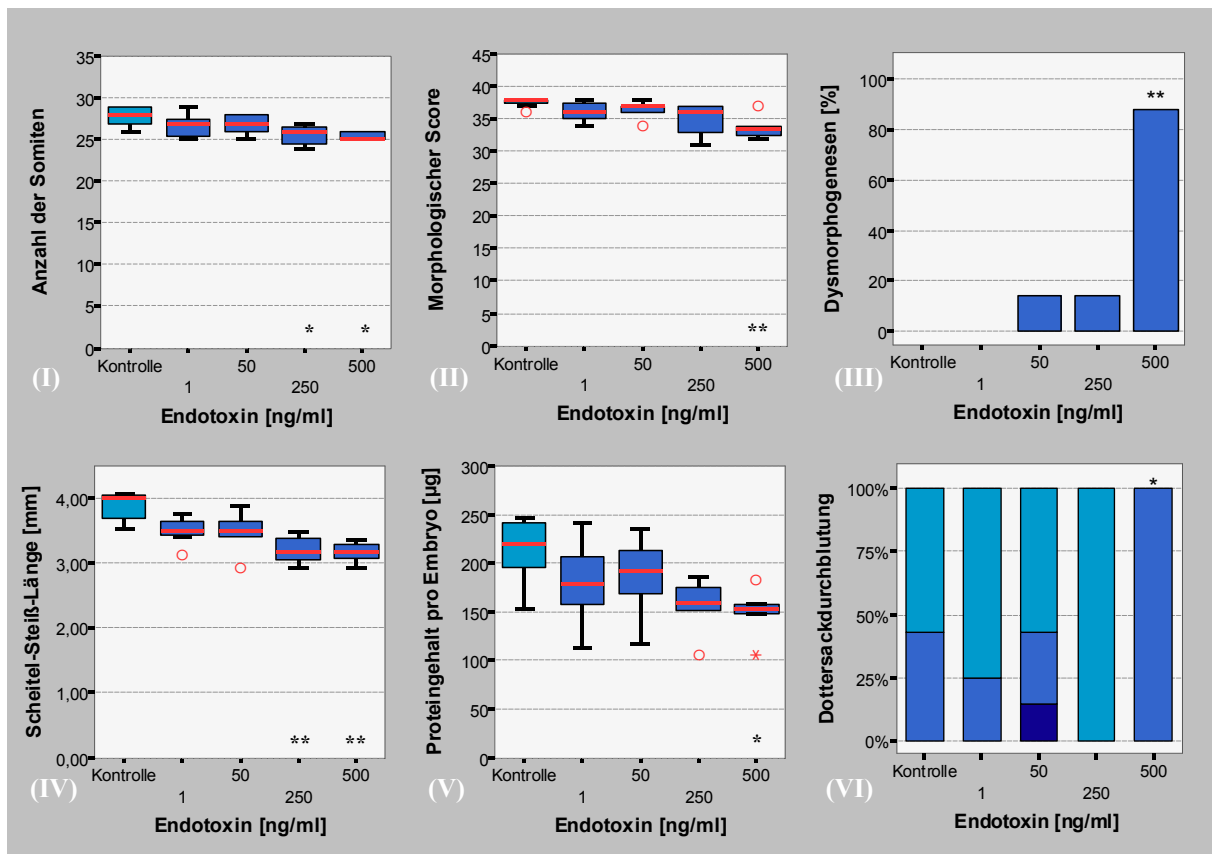
Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.

#### 5.5.4.2.2 Untersuchung eines möglichen indirekten Effektes von Endotoxin auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*

Endotoxine vermitteln ihre toxische Wirkung *in vivo* primär indirekt durch das Immunsystem. Sie setzen aus verschiedenen Blutzellen Transmitter frei, die die Homöostase eines Organismus stören können. Diese freigesetzten Transmitter könnten im Rinderserum vorhanden sein und somit indirekt einen adversen Effekt der Endotoxine auf die embryonale Entwicklung *in vitro* vermitteln. Um diese These zu prüfen, wurde eine Kontamination des Blutes mit verschiedenen Konzentrationen *Escherichia coli*-Endotoxin simuliert. Hierfür wurde das Blut eines Spendertieres (Rind) mit 1, 50, 250 und 500 ng/ml Endotoxins unmittelbar nach der Abnahme versetzt. Das Serum wurde anschließend nach dem Standardprotokoll für Rinderserumgewinnung hergestellt, d.h. zelluläre und fibrinhaltige Fraktionen wurden 30 min nach der Blutabnahme durch Zentrifugation abgetrennt. Als Vergleichskontrolle wurde Serum aus der gleichen Blutprobe, die nur mit dem Lösungsmittel des Endotoxin (Hank's balancierte Salzlösung) versetzt war, gewonnen.

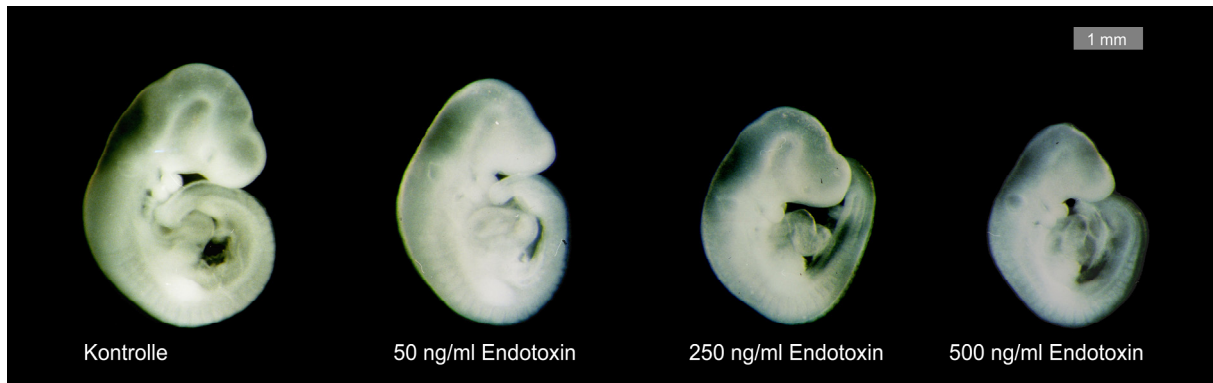
Es konnte ein konzentrationsabhängiger adverser Effekt dieser Seren auf die embryonale Entwicklung beobachtet werden (Abb. 44 und 45). Die Differenzierungsparameter Anzahl der Somiten (ab 250 ng/ml) und Morphologischer Score (bei 500 ng/ml) wiesen signifikant geringere Werte auf als die Kontrolle (Abb. 44 / I und II). Es wurde eine signifikante Häufung von Dysmorphogenesen bei einer Supplementierung des Blutes mit 500 ng/ml Endotoxin (Abb. 44 / III) gesehen. Die Scheitel-Steiß-Länge der Embryonen war konzentrationsabhängig ab 250 ng/ml und der Proteingehalt der Embryonen bei 500 ng/ml vermindert (Abb. 44 / IV und V). Die Entwicklung des Dottersacks wurde ebenfalls durch die Kontamination des Blutes mit 500 ng/ml Endotoxin signifikant gehemmt.

Ein konzentrationsabhängiger *indirekter* adverser Effekt von Endotoxin auf die Embryonalentwicklung konnte durch die Kontamination des Vollblutes nachgewiesen werden.



**Abb. 44: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für unterschiedliche Endotoxin Konzentrationen im Vollblut - indirekter Endotoxineffekt**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 7, 1 ng/ml n = 8, 50 ng/ml n = 7, 250 ng/ml n = 7 und 500 ng/ml n = 8. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.



**Abb. 45: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in endotoxinhaltigem Medium - indirekter Endotoxineffekt**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 44.

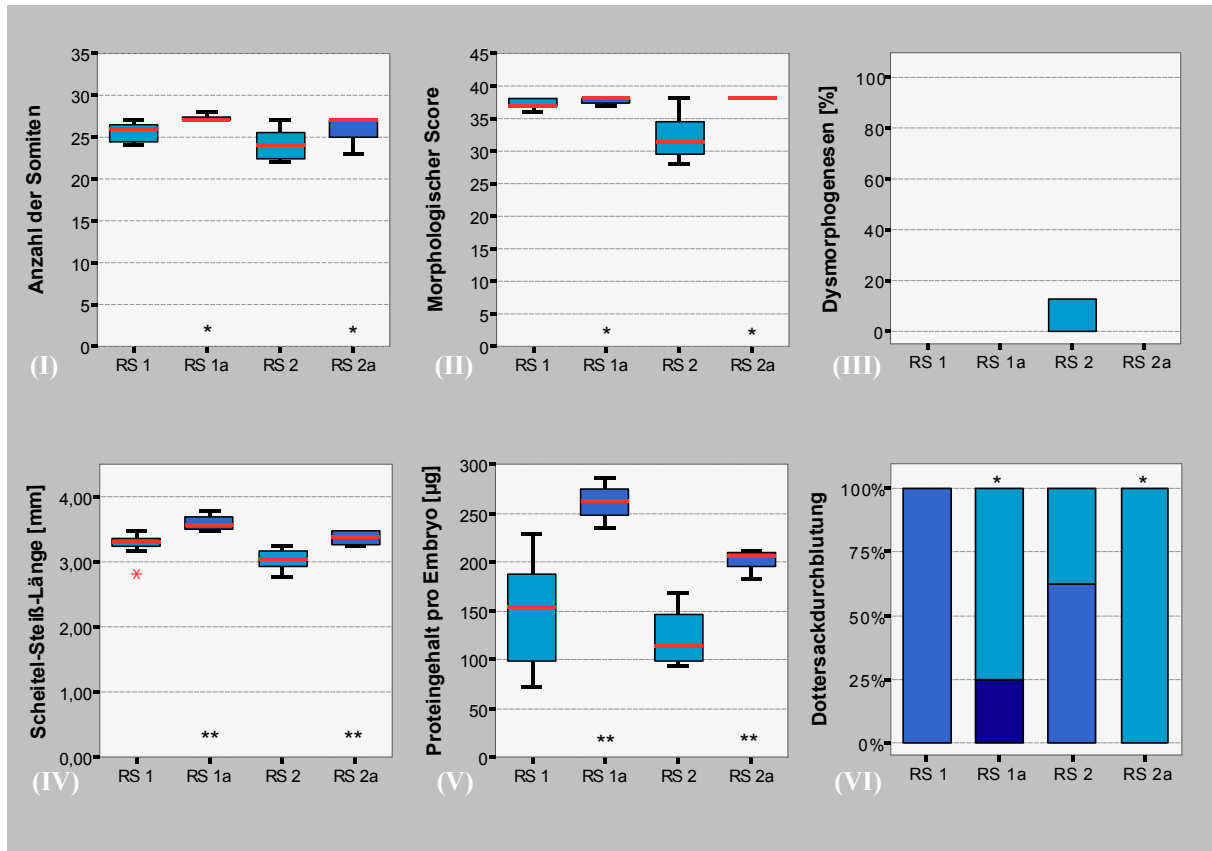
#### 5.5.4.3 *Untersuchung des Einflusses einer mechanisch verursachten Hämolyse während der Herstellung von Rinderserum auf dessen Eignung als Kulturmedium für Embryonen*

In den Analysenzertifikaten der verschiedenen käuflichen Rinderseren war die Konzentration des Hämoglobins (Hb) ein stark variierender Parameter. Die Gegenüberstellung der Eignung der Seren und deren Hb-Werte legt einen Zusammenhang dieser Eigenschaften nahe. Hohe Hb-Konzentrationen schienen mit einer schlechten Eignung der Seren als Kulturmedium verbunden zu sein. Es stellte sich die Frage, ob Hb selbst für die mangelnde Eignung eines Serums verantwortlich war oder nur einen Indikator für andere schädigende Blutzellbestandteile darstellte. Zur Beantwortung dieser Frage wurden aus je zwei unabhängigen Rinderblutchargen einerseits nicht-hämolytisches Serum (nach dem Standardprotokoll) und andererseits hämolytisches Serum (nach einem modifizierten Verfahren) hergestellt und auf ihre Eignung als WEC-Kulturmedium untersucht. Nach der Zentrifugation des Blutes wurde die Hämolyse mechanisch durch Zerschneiden der zellulären Phase mit einer Schere induziert; eine deutliche Rotfärbung des Serums galt als Indikator für die erfolgreiche Hämolyse.

Beide Seren wurden parallel in einem Versuch auf ihre Eignung untersucht. Die nicht hämolytischen Seren (RS1 und RS2) stellten dabei die jeweilige Kontrollansätze für die entsprechenden hämolytischen Rinderserumchargen (RS1a und RS2a) dar.

Die mechanische Hämolyse verursachte eine signifikante Steigerung der Embryonalentwicklung *in vitro*. Die hämolytischen Seren wiesen in beiden Auswertungsparametern für die Differenzierung höhere Werte auf als die nicht-hämolytischen Seren (Abb. 46 / I und II). Entsprechendes galt auch für die beiden Wachstumsparameter (Abb. 46 / IV und V) und die Entwicklung des Dottersacks (Abb. 46 / VI). Durch die beiden hämolytischen Rinderseren wurde keine Häufung von Dysmorphogenesen bei den kultivierten Embryonen beobachtet (Abb. 46 / III).

Weder das freigesetzte Hämoglobin noch die anderen durch eine mechanische verursachte Hämolyse freigesetzten zellulären Bestandteile der Blutzellen hatten einen adversen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*.



**Abb. 46: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse nach mechanisch verursachter Hämolyse (RS-1a und RS-2a) bei der Herstellung von Rinder serum**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug bei allen Untersuchungsgruppen  $n = 8$ . Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zu den entsprechenden nicht hämolytischen Seren (RS-1 und RS-2) als Kontrollen. Statistisches Signifikanzniveau: \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$ . Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.

## 5.6 Optimierung der industriellen Herstellung eines Rinderserums als Basis für ein Kulturmedium der WEC

Im Abschnitt 5.3 wurde dargestellt, dass ungemischte käufliche Rinderseren kein geeignetes Kulturmedium für die WEC darstellten. Eine auf käuflichen Rinderseren basierende Kombination aus FBS, DBS und RaS in dem Verhältnis 4,5:4,5:1 jedoch war ein geeignetes Kulturmedium, wie in Abschnitt 5.4.3.3 berichtet. Um dabei optimale Kulturergebnisse erzielen zu können, ist eine zeitaufwendige Chargentestung jedes einzelnen zu verwendenden Serums (FBS, DBS und RaS) in der WEC notwendig. Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft des Ausgangsmaterials unterliegt insbesondere FBS einer großen Varianz. Wie in Abschnitt 5.3.1.2 und 5.4.3.1 gezeigt wurde, sind Standardherstellungen des DBS weder allein noch supplementiert mit RaS in der Lage, die Entwicklung der Embryonen *in vitro* zu ermöglichen. Ausgehend von dem laborinternen Herstellungsprozess von geeignetem Rinderserum als Kulturmedium der WEC [3], sollte nun eine Übertragbarkeit auf den industriellen Herstellungsmaßstab geprüft werden. Im Rahmen eines von der Förderung der industriellen Technologieentwicklung (FiTE) geförderten Verbundprojekts (Partner: Biochrom AG und Institut für

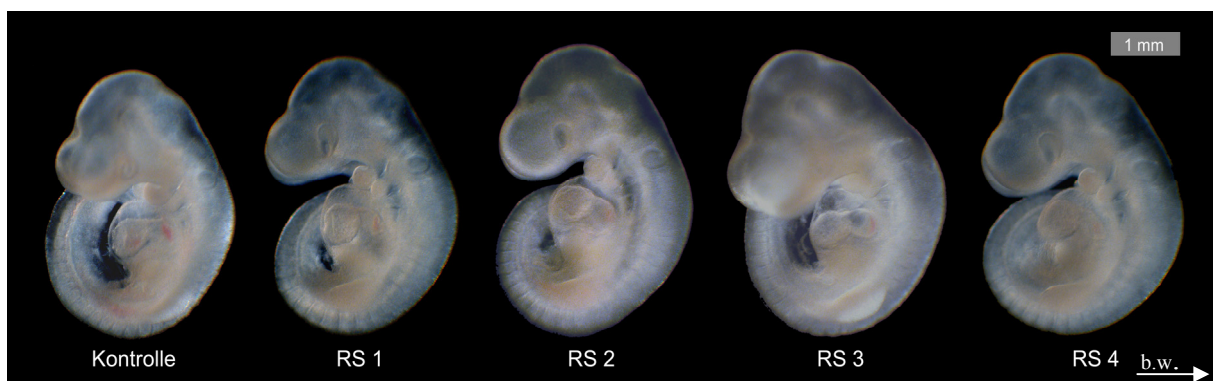


Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abt. Toxikologie, der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin) wurde diese Aufgabe als Teilprojekt bearbeitet. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse dargestellt.

### 5.6.1 Reproduzierbarkeit des laborinternen Herstellungsprotokolls in kleinen Chargen

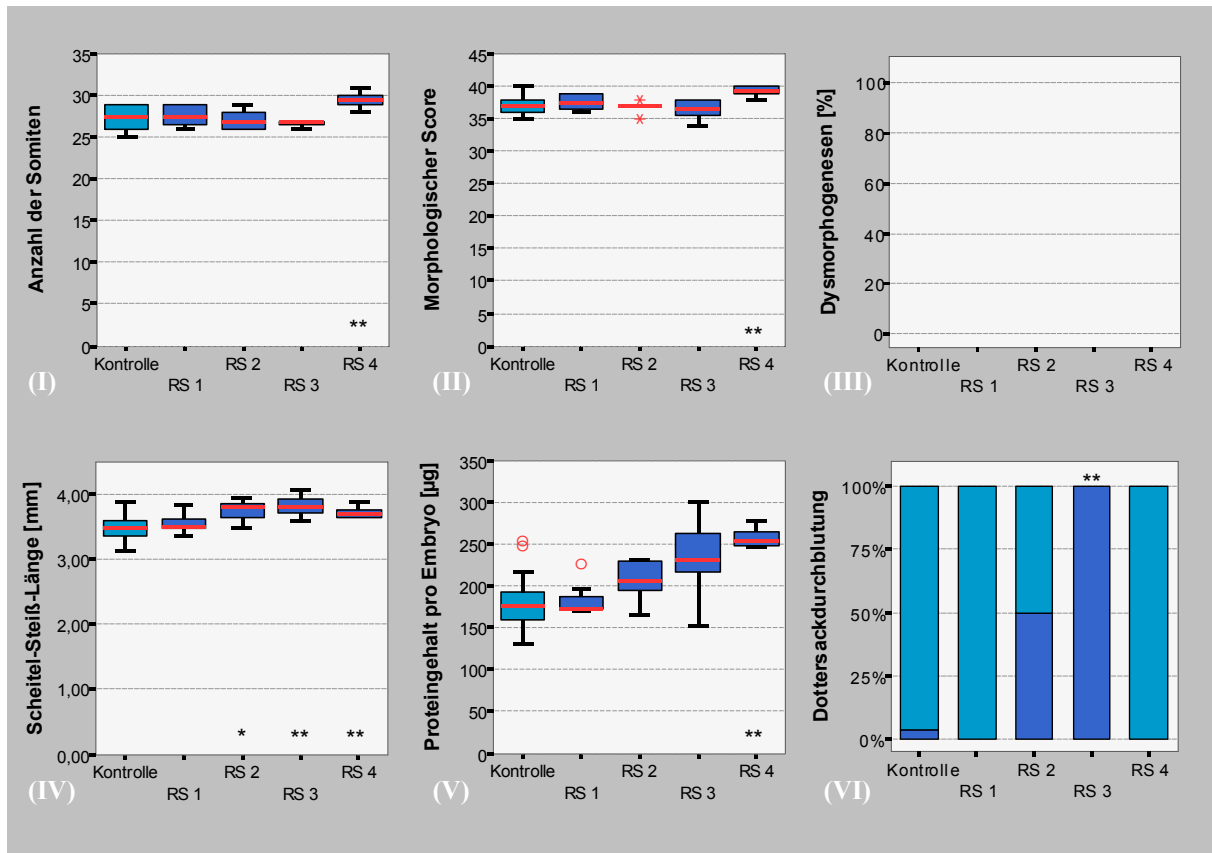
Im ersten Schritt zur Optimierung einer industriellen Herstellung sollte die unabhängige Herstellung von Rinderserum für die WEC im Labormaßstab von 0,5 l pro Charge untersucht werden. In einer Tierzuchtanlage in Behningen wurden vier unabhängige Chargen unter tierärztlicher Aufsicht produziert. Als Spendertiere wurden hierfür trächtige Rinder im letzten Drittel der Gestation herangezogen. Diese vier Serumchargen Donor Bovines Serum von trächtigen Rindern (RS) wurden vergleichend zu einer Kontrolle basierend auf einer 1:1 Mischung aus DBS und FBS supplementiert mit 10 % Rattenserum auf ihre Eignung als Basis eines Kulturmediums für die WEC untersucht.

Alle vier Rinderseren (RS-1 bis -4) unterstützten die Entwicklung der Embryonen vergleichbar oder besser als das Kontrollmedium (Abb. 47 und 48). Die Differenzierung der Embryonen war sowohl bei der Anzahl der Somiten (Abb. 48 / I) als auch beim Morphologischen Score (Abb. 48 / II) für die RS-1 bis -3 vergleichbar und für das RS-4 besser als bei den Embryonen der Kontrolle. Bei der Scheitel-Steiß-Länge wurden signifikant höhere Werte für das Embryonenwachstum in RS-2, RS-3 und RS-4 beobachtet (Abb. 48 / IV). Auch der zweite Wachstumsparameter Proteingehalt der Embryonen hatte für das RS-2, RS-3 und RS-4 höhere Median-Werte als die Kontrolle. Aufgrund der hohen Varianz der Ergebnisse für RS-2 und RS-3 konnte nur für RS-4 eine statistische Signifikanz dokumentiert werden (Abb. 48 / V). Keines der untersuchten Rinderseren verursachte Dymorphogenesen bei den Embryonen (Abb. 48 / III). Für den Dottersack waren RS-1, RS-2 und RS-4 ohne Einfluß auf die Auswertungsparameter; RS-3 dagegen zeigte signifikant geringere Werte. Dies war durch zwei besonders große und weit entwickelte Embryonen bedingt, bei denen bereits die physiologische Rückentwicklung des Blutgefäßsystems im Dottersack begann. Diese beiden Embryonen sind u.a. auch für die in dieser Untersuchungsgruppe beobachtete große Schwankung des Proteingehalts der Embryonen mitverantwortlich (Abb. 48 / V).





**Abb. 47: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in Kulturmedien basierend auf Rinderserum, welches unabhängig vom etablierenden Labor aber nach dessen Protokoll hergestellt wurde** entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 48. (Abb. 47 auf Seite 76).



**Abb. 48: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für Kulturmedien basierend auf Rinderserum, welches unabhängig vom etablierenden Labor aber nach dessen Protokoll hergestellt wurde**  
 Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 30 und RS-1 bis RS-4 n = 8. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01.  
 Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.

### 5.6.2 Untersuchung zur Reproduzierbarkeit des laborinternen Herstellungsprotokolls unter industriellen Rahmenbedingungen

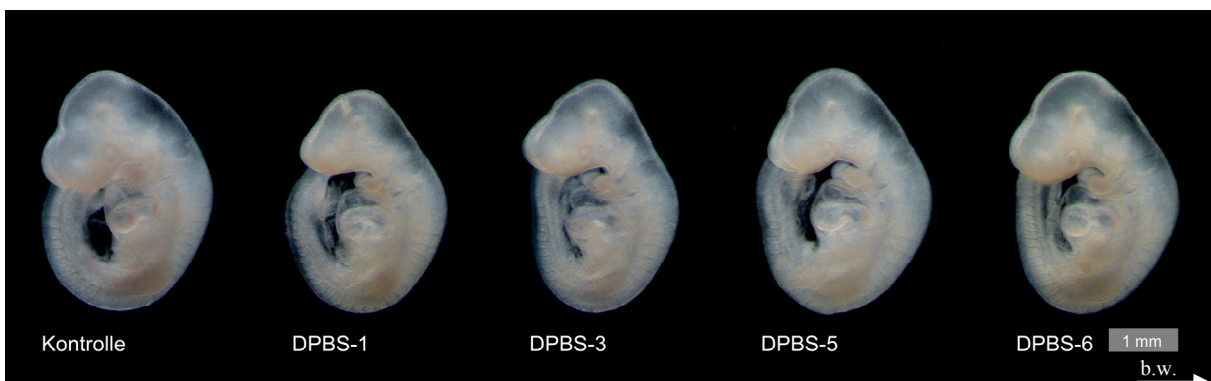
Im zweiten Schritt zur Optimierung der industriellen Rinderserumproduktion für die WEC sollten Kleinchargen von 1,0 bis 1,5 l durch einen professionellen Rohserumfabrikanten hergestellt werden. Diese Kleinchargen stammten von jeweils einem Spendertier. Unter Berücksichtigung der BSE-Problematik, die Exportbeschränkungen für europäisches Serum in bestimmte Ländern, wie z.B. den USA, nach sich zieht, wurde ein Rohserumlieferant für das DBS in Neuseeland (Vertragspartner der Biochrom AG, Berlin) ausgewählt. Unter Berücksichtigung der industriellen Möglichkeiten wurde ein Protokoll erarbeitet, dass dem Herstellungsprotokoll des Labors sehr nahe kam.

### 5.6.2.1 Untersuchungen der Donor Bovinen Seren von trächtigen Rindern aus Neuseeland (DPBS) auf ihr entwicklungsförderndes Potential für Embryonen *in vitro*

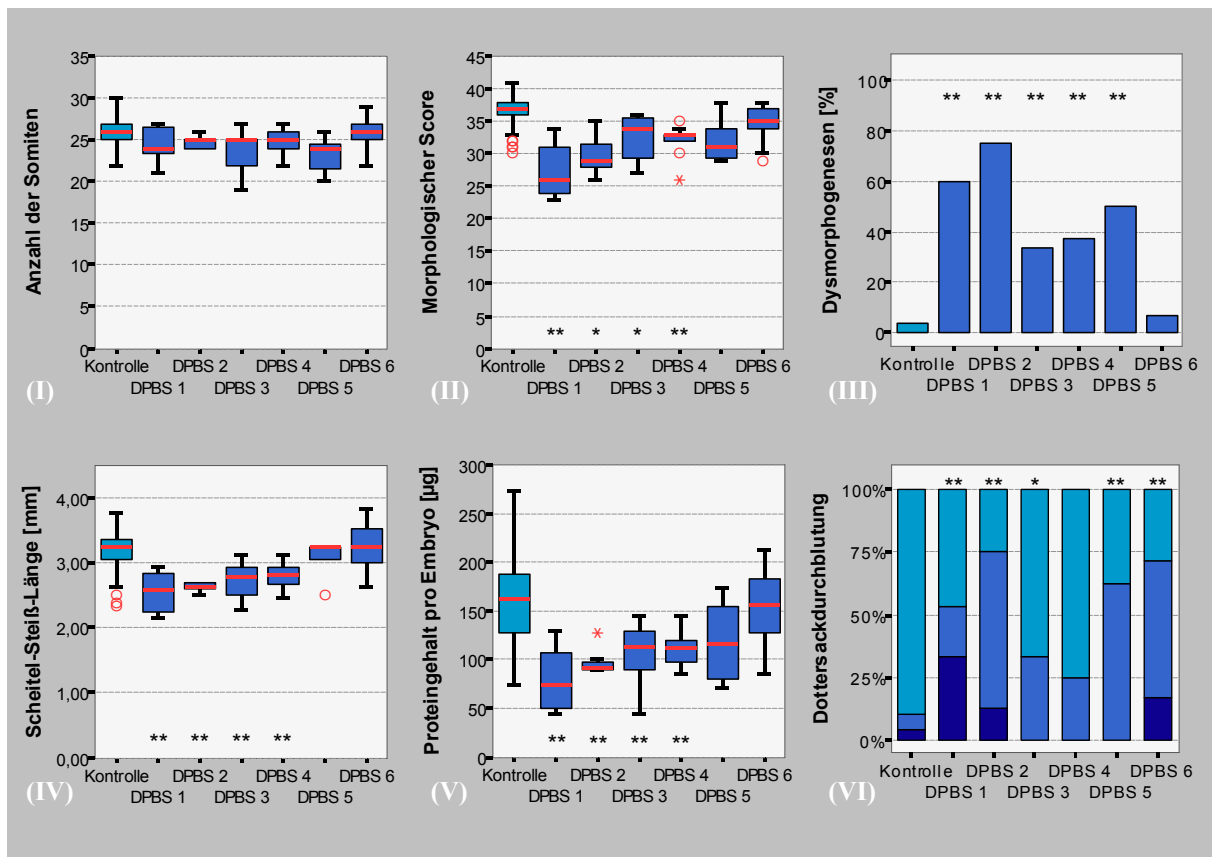
Es wurden sechs unabhängig von einander hergestellte Rohseren von Spenderrindern gewonnen, welche im letzten Drittel der Trächtigkeit waren. Es erfolgte eine Weiterverarbeitung dieser Rohseren in Form von Hitzeinaktivierung (45 min bei 56 °C) und Filtration durch Poren von 0,2 µm bei der Biochrom AG.

Die Untersuchung des entwicklungsfördernden Potentials dieser Rinderseren (DPBS-1 bis -6) erfolgte im Vergleich zu einem Kontrollkulturmedium basierend auf einer 1:1 Mischung aus FBS und DBS supplementiert mit 10 % Rattenserum. Die Auswertung der Versuche zeigte, dass die Differenzierung der Embryonen kultiviert in allen sechs DPBS in Bezug auf den Auswertungsparameter Anzahl der Somiten mit der Kontrolle vergleichbar war (Abb. 49 und 50 / I). Sowohl in dem zweiten Differenzierungsparameter, dem Morphologischen Score, als auch in den beiden Auswertungsparametern des Wachstums, Scheitel-Steiß-Länge und Proteingehalt der Embryonen, wiesen die Embryonen der DPBS-1 bis -4 signifikant geringere Werte auf als die Embryonen der Kontrolle (Abb. 50 / II, IV und V). Im Gegensatz dazu ermöglichten DPBS-5 und -6 eine Entwicklung der Embryonen, welche mit der der Kontrolle in Bezug auf den Differenzierungsparameter Morphologischer Score sowie die beiden Wachstumsparameter vergleichbar war (Abb. 50 / II, IV und V). Alle DPBS mit Ausnahme des DPBS-4, bei dem die abweichende Ausprägung des Dottersacks zur Kontrolle keine statistische Signifikanz aufwies, bedingten einen niedrigeren Entwicklungsstand des Dottersacks (Abb. 50 / VI). Bis auf DPBS-6, welches in allen Auswertungsparametern dieser Untersuchungsgruppe den höchsten Entwicklungsstand der Embryonen ermöglichte, führten alle DPBS zu einer signifikanten Häufung von Dymorphogenesen in der Embryonenentwicklung (Abb. 50 / III).

Die hier untersuchten DBS von trächtigen Spendertieren aus Neuseeland zeigten in mindestens einem Auswertungsparameter signifikant geringere Ausprägungen als die Embryonen der Kontrolle. Mit Ausnahme der Charge DPBS-6 stellte dieses speziell hergestellte Rinderserum allein noch kein geeignetes Serum für die WEC dar. Dennoch war der Entwicklungsstand der Embryonen bei allen sechs DPBS-Proben im Vergleich zu den zuvor getesteten DBS gleichmäßig auf einem relativ hohen Niveau (vgl. 5.3.1.2).



**Abb. 49: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in DPBS**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 50. (Abb. 49 auf Seite 78)



**Abb. 50: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für DPBS**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 49, DPBS-1 n = 15, DPBS-2 n = 8, DPBS-3 n = 15, DPBS-4 n = 16, DPBS-5 n = 8 und DPBS-6 n = 42. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.

### 5.6.2.2 Untersuchung der Donor Bovinen Seren von trächtigen Rindern aus Neuseeland (DPBS) supplementiert mit 10 % Rattenserum auf ihr entwicklungsförderndes Potential für Embryonen in vitro

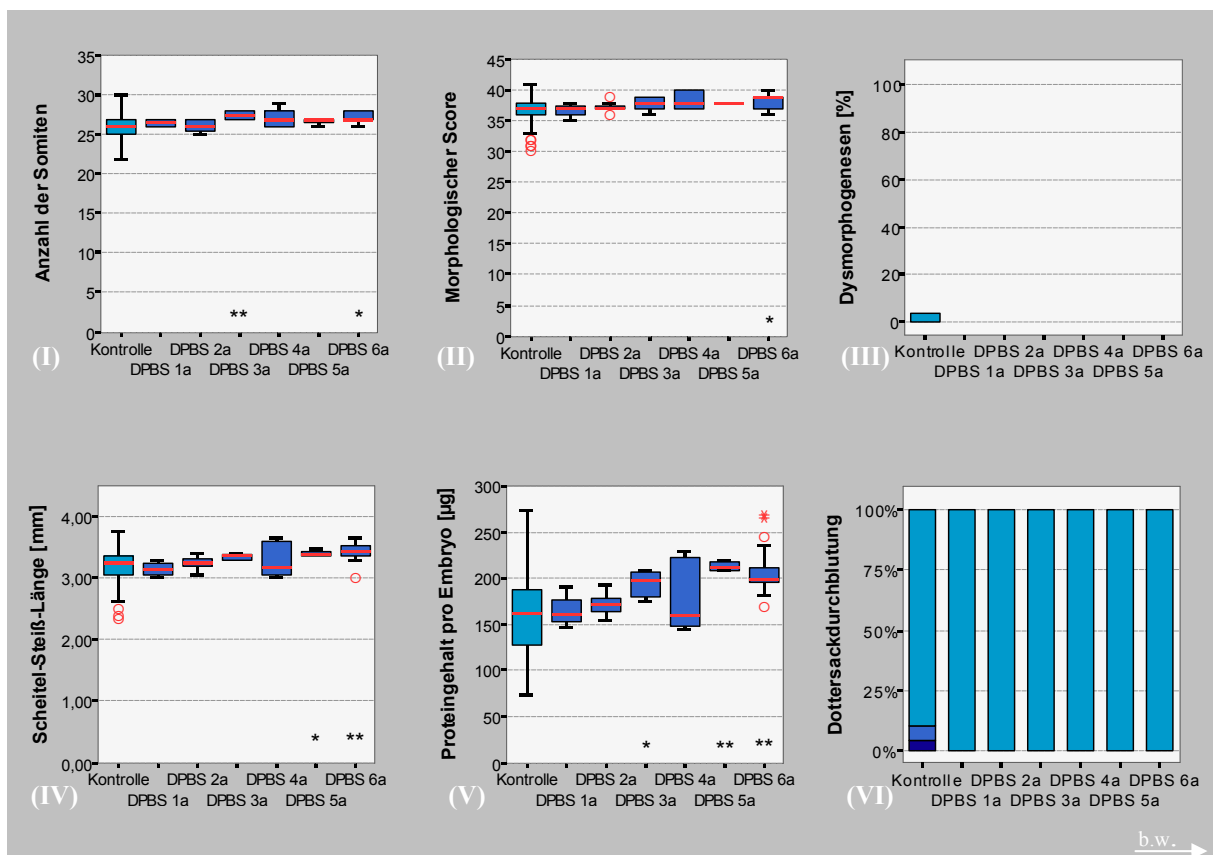
Im Abschnitt 5.6.2.1 wurde dargestellt, dass das speziell hergestellte bovine Serum von trächtigen Spendertieren (DPBS) zwar noch kein zufriedenstellendes Ergebnis erbrachte, aber dennoch ein besser geeignetes Serum für die WEC darstellte, als die zuvor getesteten käuflichen DBS (vgl. 5.3.1.2). Ob DPBS durch eine Supplementierung mit 10 % Rattenserum zu einer geeigneten Serummischung für das Kulturmedium der WEC aufgewertet werden könnte, wurde anschließend in WEC Kulturen getestet.

Die sechs Seren von trächtigen Spenderrindern aus Neuseeland (DPBS-1 bis -6 aus 5.6.2.1) wurden daher mit 10 % Rattenserum supplementiert (DPBS-1a bis -6a) und auf ihr entwicklungsförderndes Potential im Vergleich zu einem Kontrollkulturmedium (1:1 Mischung aus FBS und DBS supplementiert mit 10 % Rattenserum) untersucht.

Die Auswertung der Versuche zeigte, dass die Entwicklung der Embryonen in allen Untersuchungsgruppen mit den Resultaten der Kontrollembryonen vergleichbar war (Abb. 51 und

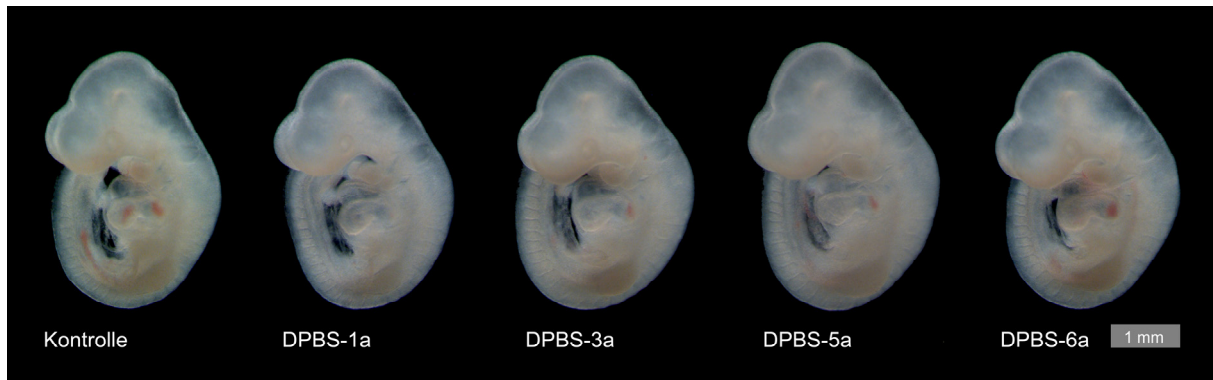
52). Das DPBS-3a bewirkte darüber hinaus eine signifikant höhere Differenzierung in Bezug auf die Anzahl der Somiten im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 51 / I). Das DPBS-6a, welches schon ohne Supplementierung mit Rattenserum (DPBS-6) eine mit der Kontrolle vergleichbare Entwicklung der Embryonen ermöglichte (vgl. 5.2.1), führte zu einer signifikant höheren Differenzierung der Embryonen in Bezug auf die Anzahl der Somiten und den Morphologischen Score im Vergleich zu den Kontrollembryonen (Abb. 51 / I und II). Das Wachstum der Embryonen kultiviert in DPBS-3a, -5a und -6a war mindestens in einem der beiden Wachstumsparameter, der Scheitel-Steiß-Länge und/oder dem Proteingehalt der Embryonen, signifikant größer als in der Kontrolle (Abb. 51 / IV und V). Die mit 10 % Rattenserum supplementierten DPBS, die ohne Rattenserum zu einer abweichenden Ausprägung des Dottersacks im Vergleich zur Kontrolle führten (vgl. 5.6.2.1), ermöglichten nun eine Entwicklung des Dottersacks vergleichbar mit dem der Kontrolle (Abb. 51 / VI). Die Supplementierung der DPBS mit 10 % Rattenserum (Abb. 51 / III) verhinderte die zuvor beobachteten Dysmorphogenesen bei den in nicht-supplementierten DPBS kultivierten Embryonen (vgl. 5.6.2.1).

Die untersuchten bovinen Seren von trächtigen Spendertieren aus Neuseeland erwiesen sich supplementiert mit 10 % Rattenserum als eine geeignete Basis für ein Kulturmedium der WEC, welches in drei von sechs Chargen sogar eine bessere Entwicklung der Embryonen ermöglichte als in der entsprechenden Kontrolle.



**Abb. 51: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für DPBS supplementiert mit 10 % Rattenserum**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 48, DPBS-1a n = 8, DPBS-2a n = 8, DPBS-3a n = 8, DPBS-4a n = 16, DPBS-5a n = 8 und DPBS-6a n = 22. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.  
(Abb. 51 auf Seite 80)



**Abb. 52: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in DPBS supplementiert mit 10 % Rattenserum**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 51.

### 5.6.2.3 Untersuchung der Mischungen von verschiedenen Donor Bovinen Seren von trächtigen Rindern aus Neuseeland (DPBS) auf ihr entwicklungsförderndes Potential für Embryonen *in vitro*

Die in dem Abschnitt 5.6.2.1 untersuchten Rinderserumchargen von trächtigen Spendertieren aus Neuseeland (DPBS-1 bis -6) stellten Kleinchargen von 1,0 bis 1,5 l dar. Diese wurden aus dem Blut von jeweils einem Spendertier gewonnen. Da die Blutabnahme pro Tier und Zeitpunkt bei Spendertieren begrenzt ist, müssen für größere Chargen die verschiedenen Seren einzelner Rinder miteinander gepoolt werden. Welchen Einfluss dies auf die Eignung des Serums für seine Verwendung im Kulturmedium der WEC hat, sollte mit den nun dargestellten Versuchen untersucht werden.

Ausgehend von den sechs Serumchargen (DPBS-1 bis -6) wurde eine Mischung hergestellt, wobei jede Charge in gleicher relativer Menge verwendet wurde. Diese Serum Mischung wurde allein (Pool-1) und supplementiert mit 10 % Rattenserum (Pool-1a) im Vergleich zu einem Kontrollkulturmedium (1:1 Mischung aus DBS und FBS supplementiert mit 10 % Rattenserum) untersucht.

Eine geringere Differenzierung der Embryonen, die in Pool-1 kultiviert wurden, war in Hinblick auf den Morphologischen Score nachweisbar (Abb. 53 / II). Der Pool-1 bedingte weiterhin ein signifikant geringeres embryonales Wachstum verglichen mit der Kontrolle (Abb. 54). Dies war ersichtlich in der kürzeren Scheitel-Steiß-Länge als auch im geringeren Proteingehalt der Embryonen (Abb. 53 / IV und V). Zudem blieb die Entwicklung des Dottersackblutkreislaufs der in der Serum Mischung Pool-1 kultivierten Embryonen hinter der der Kontrolle zurück (Abb. 53 / VI). Die Supplementierung von Pool-1 mit 10 % Rattenserum (Pool-1a) verbesserte das entwicklungsfördernde Potential des Kulturmediums für die Emb-

ryonen. Hierbei wurde eine höhergradige Differenzierung über das Niveau der Kontrolle hinaus festgestellt. Diese war im Auswertungsparameter Morphologischer Score als statistisch signifikant auffällig (Abb. 53 / II). Das Wachstum dieser Embryonen war in Bezug auf beide Auswertungsparameter signifikant größer als dasjenige der Kontrolle (Abb. 53 / IV und V). Im Gegensatz zu den einzeln untersuchten DPBS (vgl. 5.6.2.1) beeinflusste das Poolen von Seren mit oder ohne Supplementierung mit 10 % Rattenserum nicht die Häufigkeit von Dysmorphogenesen (Abb. 53 / III).

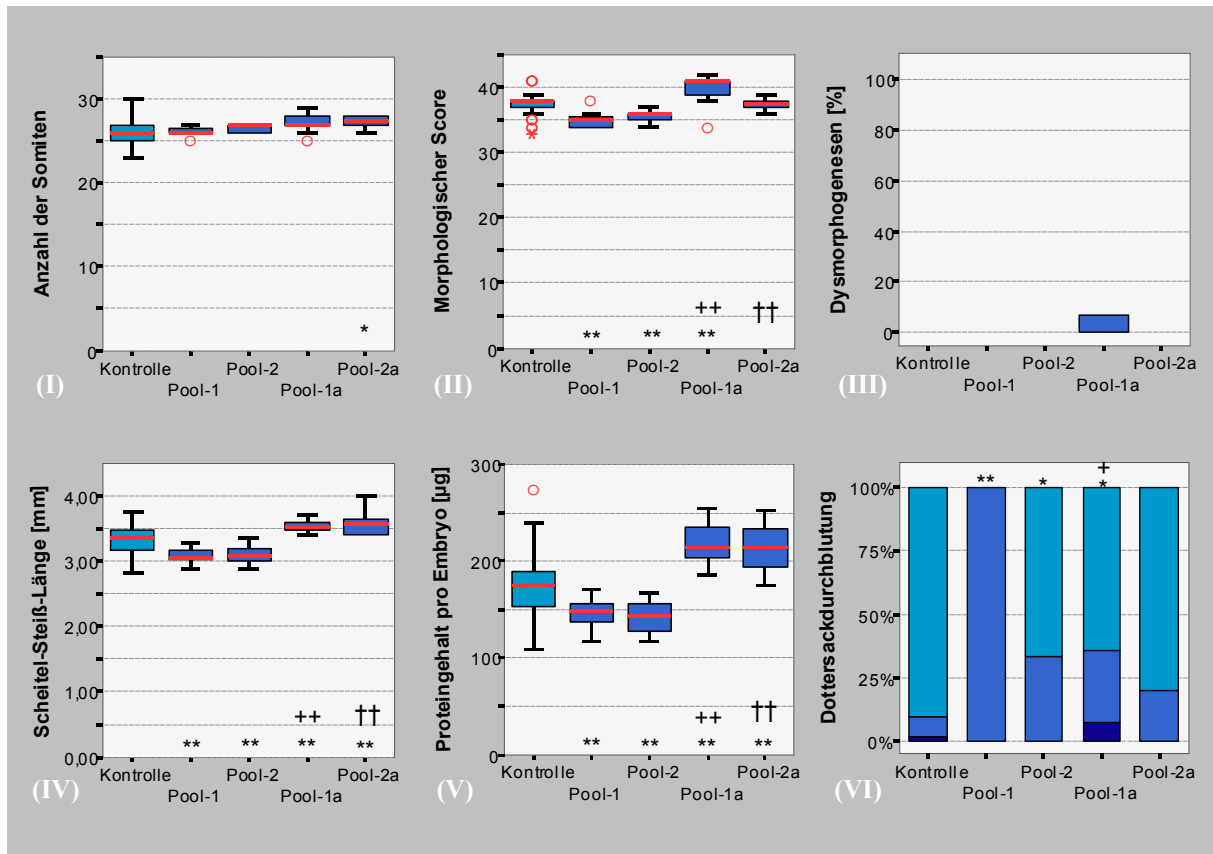
Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Mischung von Seren keine Nachteile, sondern sogar Vorteile für die embryonale Entwicklung hatte. Die Aufwertung von DPBS durch die Supplementierung mit 10 % Rattenserum (vgl. 5.6.2.2) war ebenso sichtbar bei den gepoolten Seren aus DPBS.

Auch wenn die industriell gewonnenen DPBS die Entwicklung der Embryonen nicht mit einem der Kontrolle vergleichbaren Potential unterstützten, ermöglichten diese Seren eine Entwicklung der Embryonen auf dem höchsten Niveau aller bisher untersuchten industriell gefertigten Seren (vgl. 5.3). Daher wurde eine zweite Herstellung von diesen DPBS nach dem etablierten Protokoll in Neuseeland durchgeführt. Um sich der angestrebten Größe von Serumchargen (20-50 l) zu nähern, wurden bei dieser Herstellung bereits die Rohseren der einzelnen Spendertiere in Neuseeland gepoolt.

Die Serummischung von trächtigen Spenderrindern der zweiten Herstellung aus Neuseeland wurden allein (Pool-2) und supplementiert mit 10 % Rattenserum (Pool-2a) auf ihr entwicklungsförderndes Potential im Vergleich zu einem Kontrollkulturmedium basierend auf einer 1:1 Mischung aus FBS und DBS supplementiert mit 10 % Rattenserum untersucht.

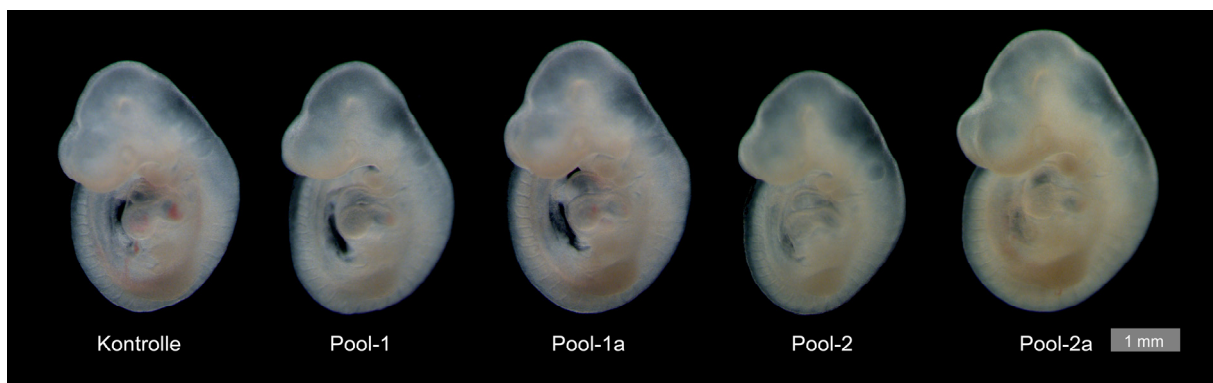
Durch die Ergebnisse mit dem Pool-2 und Pool-2a konnten die Ergebnisse von Pool-1 und Pool-1a in der WEC bestätigt werden.

Auch mit der zweiten Produktion des DPBS in Neuseeland zeigte sich, dass dieses Serum allein nicht als Kulturmedium für die WEC geeignet ist. Trotzdem erwies sich, dass das bei der ersten Herstellungsserie festgestellte, hohe Niveau des entwicklungsfördernden Potentials der DPBS im Vergleich zu anderen industriell gefertigten Rinderseren reproduzierbar war. Auch konnte erneut gezeigt werden, dass durch die Mischung verschiedenener Serumchargen des DPBS im Gegensatz zu einem Großteil der einzeln untersuchten DPBS auch ohne Supplementierung mit Rattenserum keine Dysmorphogenesen bei den Embryonen induziert wurden. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass auch die Mischung von bovinen Rohseren von trächtigen Spendertieren aus Neuseeland supplementiert mit 10 % Rattenserum sich als geeignete Basis für ein Kulturmedium für die WEC erwies. Sie ermöglichte sogar ein besseres Wachstum der Embryonen als in der entsprechenden Kontrolle.



**Abb. 53: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für DPBS Mischungen (Pool), zum Teil supplementiert mit 10 % Rattenserum**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 55, Pool-1 n = 11, Pool-2 n = 12, Pool-1a n = 14 und Pool-2a n = 12. Die statistische Auswertung im Vergleich zur Kontrolle wurde markiert mit \*, der Vergleich zwischen Pool-1 und -1a mit + und der Vergleich zwischen Pool-2 und -2a mit †. Statistisches Signifikanzniveau: \*, + p < 0,05; \*\*, ++ und †† p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.



**Abb. 54: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in DPBS Mischungen (Pool), zum Teil supplementiert mit 10 % Rattenserum**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 53.

#### 5.6.2.4 Untersuchung von industriell hergestellten Kulturmedien auf ihr entwicklungs-förderndes Potential für Rattenembryonen in vitro

Es bestand demnach die Möglichkeit, sowohl eine Mischung aus kommerziell gefertigten FBS, DBS und RaS im Mischverhältnis 4,5:4,5:1 (vgl. Abschnitt 5.4.3.3) als auch eine Mischung des neu etablierten DPBS supplementiert mit 10 % Rattenserum (vgl. Abschnitt



5.6.2.2 bis 5.6.2.3) als Alternative zu den etablierten Standardkulturmedien der WEC zu verwenden. Diese Kulturmedien könnten durchaus durch verschiedene Laboratorien angewendet werden, solange eine individuelle Vorauswahl geeigneter Chargen der käuflichen Seren erfolgt. Um den zeitaufwendigen Prozess der Chargentestung umgehen zu können bzw. Qualitätsunterschiede bei der Herstellung im Labormaßstab auszuschließen, sollten größere Chargen eines fertigen Kulturmediums für die WEC industriell hergestellt werden.

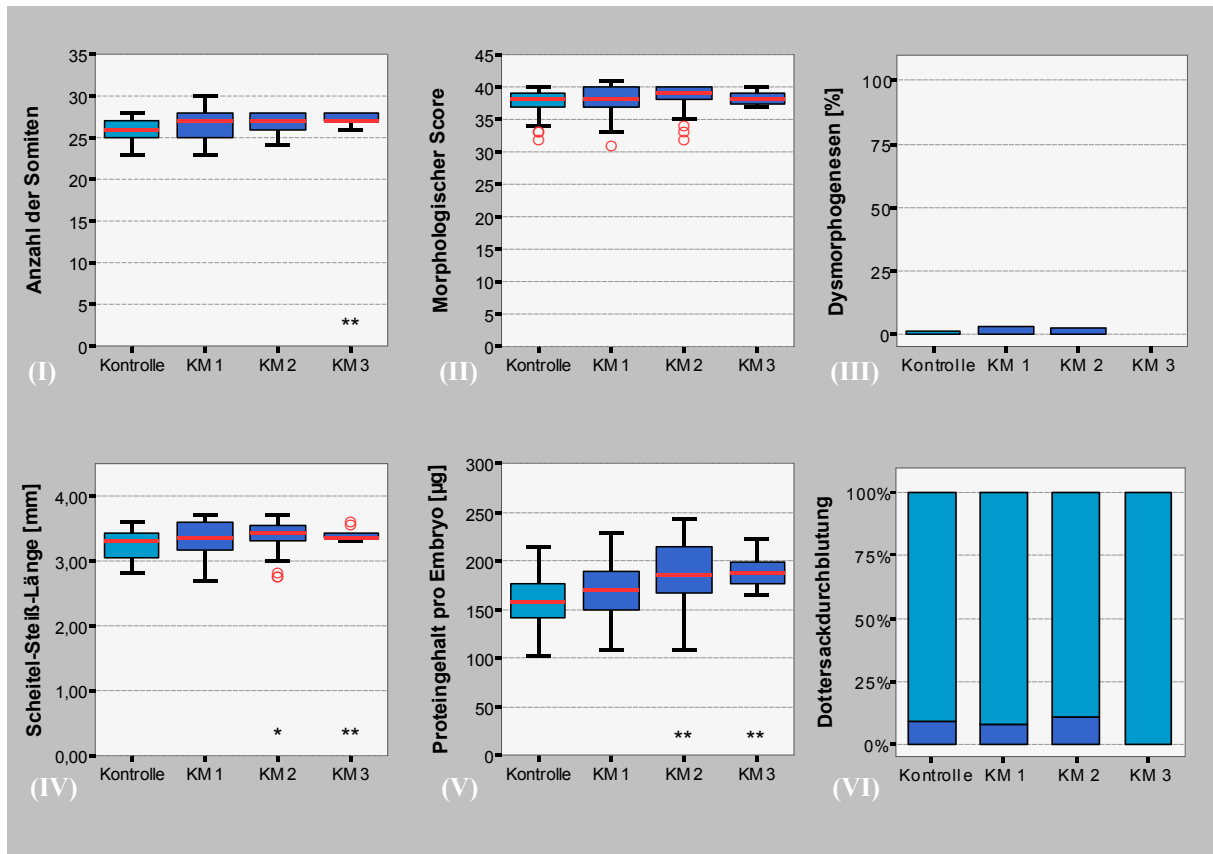
Daher wurde nach der Etablierung der ersten Rezeptur, basierend auf einer Serummischung aus FBS, Adulten Bovinem Serum und Rattenserum im Mischverhältnis 4,5:4,5:1, eine Pilotcharge für die WEC durch einem professionellen Seren- und Kulturmedienhersteller (Biochrom AG, Berlin) produziert (KM1). Das gleiche galt für die neu etablierten industriell hergestellten DPBS supplementiert mit 10 % Rattenserum (KM2). Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Eignung dieses Produktes wurde die letzte Produktion (KM2) noch einmal mit neuen Chargen an Rinderserum und Rattenserum wiederholt (KM3).

Die Ergebnisse der Untersuchung dieser drei industriell hergestellten Kulturmedien für die WEC werden im Folgenden zusammenfassend dargestellt. Die Untersuchungen wurden vergleichend zu Kontrollansätzen basierend auf einer selbst hergestellten 1:1 Mischung aus FBS und DBS supplementiert mit 10 % Rattenserum durchgeführt.

Alle drei industriell hergestellten Kulturmedien (KM1, KM2 und KM3) unterstützten die Entwicklung der Embryonen in einem mit dem der Kontrollembryonen vergleichbaren oder besseren Maße. Dabei wurden mit dem Kulturmedium KM1 in allen Auswertungsparametern des Wachstums und der Differenzierung zur Kontrolle vergleichbare Ergebnisse erhalten (Abb. 55 und 56). Im Gegensatz dazu wiesen die Kulturmedien unter Verwendung des neu etablierten DPBS (KM2 und KM3) ein signifikant größeres Wachstum der Embryonen, gemessen sowohl im Wachstumsparameter Scheitel-Steiß-Länge (Abb. 55 / IV) als auch beim Proteingehalt der Embryonen (Abb. 55 / V) auf. Ein höherer Differenzierungsgrad der Embryonen, manifestiert im Differenzierungsparameter Anzahl der Somiten, wurde im Vergleich zur Kontrolle nur für das Kulturmedium KM3 nachgewiesen (Abb. 55 / I).

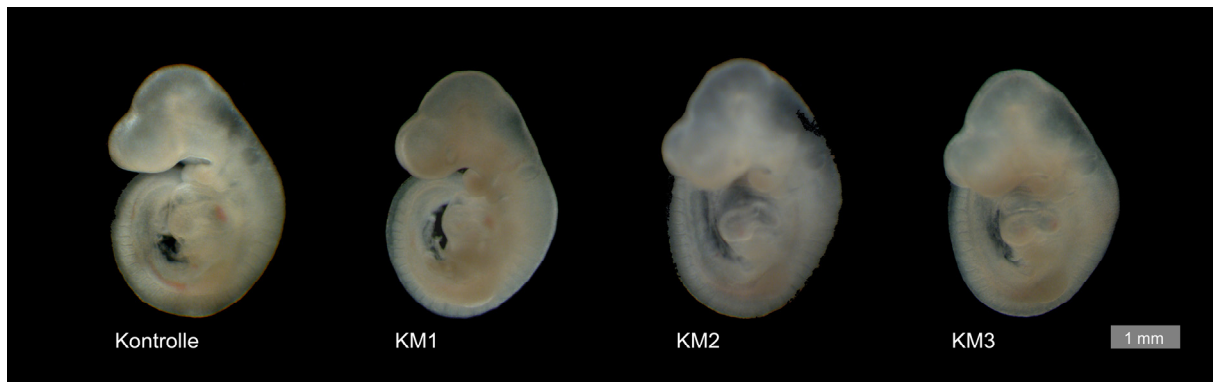
Keines der drei untersuchten industriell hergestellten Kulturmedien verursachte eine signifikante Häufung von Dymorphogenesen bei den Embryonen (Abb. 55 / III). Ebenso konnte kein Unterschied in der Entwicklung des Dottersacks bei den in diesen Medien kultivierten Embryonen beobachtet werden (Abb. 55 / VI).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine industrielle Umsetzung der laboreigenen Herstellungsprotokolle für geeignete WEC-Kulturmedien möglich war.



**Abb. 55: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse für kommerziell hergestellte Kulturmedien**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 69, KM-1 n = 66, KM-2 n = 37 und KM-3 n = 12. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.



**Abb. 56: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in kommerziell hergestellten Kulturmedien** entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 55.

## 5.7 Untersuchung von Referenzsubstanzen in der WEC unter Verwendung der neu etablierten Kulturmedien

In den folgenden Untersuchungen sollte überprüft werden, ob die beiden neu etablierten Kulturmedien

1. Serum Mischung aus FBS, DBS und RaS im Mischverhältnis 4,5:4,5:1 und
2. Serum Mischung des neu etablierten DPBS supplementiert mit 10 % Rattenserum

eine Sensitivitäts- oder Sensibilitätsänderung der Embryonen gegenüber Substanzen mit unterschiedlichem embryotoxischen Potential bedingen. Hierfür wurden die Effekte von Referenzsubstanzen unter Verwendung der neuen Kulturmedien bestimmt und mit den Ergebnissen von bereits publizierten WEC-Studien zu diesen Referenzsubstanzen verglichen.

### **5.7.1 Effekte von 5-Fluorouracil und Penicillin G auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro***

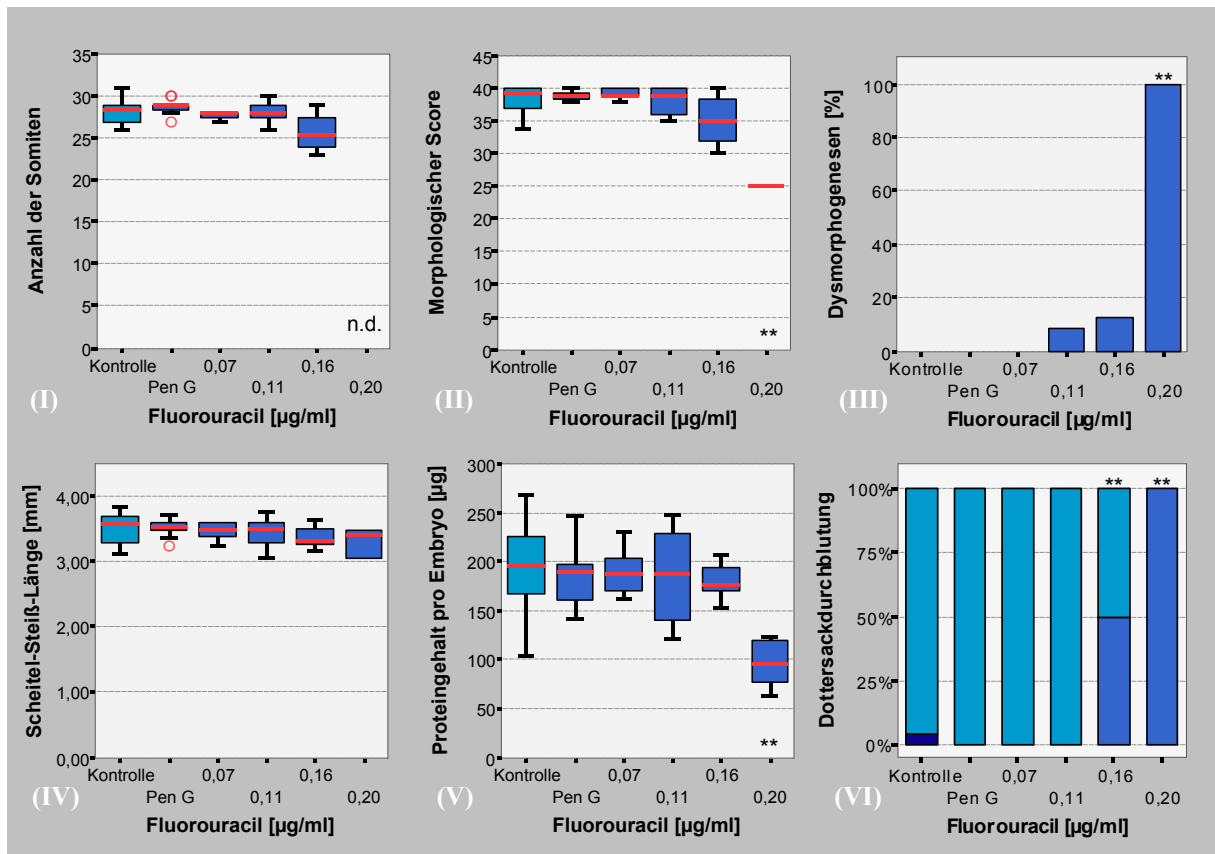
5-Fluorouracil (5-FU) und Penicillin G (PenG) wurden in der von der ECVAM geförderten Validierungsstudie dreier *In-vitro*-Embryotoxizitätstests als Positiv- bzw. Negativkontrolle verwendet [5]. In dieser Studie wurde Rattenserum als Kulturmedium verwendet. Es liegen reproduzierte Konzentrations-Effekt-Beziehung für 5-FU und PenG vor. Zum Vergleich wurde eine Untersuchung zu 5-FU und PenG mit dem neu etablierten Kulturmedium basierend auf FBS, DBS und RaS im Mischungsverhältnis 4,5:4,5:1 durchgeführt.

In einem Konzentrations-Findungs-Versuch für 5-FU wurden 0,05 bis 15 µg/ml untersucht. Auf Basis der gefundenen konzentrationsabhängigen adversen Effekte wurde der Konzentrationsbereich von 0,07 bis 0,20 µg/ml 5-FU für die Konzentrations-Effekt-Beziehungsversuche ausgewählt. Im Vergleich zur Kontrolle verursachte die hohe Konzentration von 0,20 µg/ml 5-FU eine statistisch signifikant verzögerte Entwicklung der Embryonen mit Ausnahme der Scheitel-Steiß-Länge (Abb. 57 / I; II, IV und V). Die Entwicklung des Dottersacks der Embryonen wurde durch 0,16 µg/ml 5-FU im Vergleich zur Kontrolle signifikant gehemmt (Abb. 57 / VI).

Die ermittelte Konzentrations-Effekt-Beziehung von 5-FU wird durch folgende Konzentrationen charakterisiert: Die höchste Testkonzentration, die keinen signifikanten adversen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen hatte (NOAEC), war 0,11 µg/ml (Abb. 57 und 58). Die niedrigste getestete Konzentration, die noch einen adversen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen hatte (LOAEC), war 0,16 µg/ml. Die niedrigste Konzentration, die bei allen Embryonen eine Dymorphogenese induzierte ( $IC_{Max}$ ) war 0,20 µg/ml.

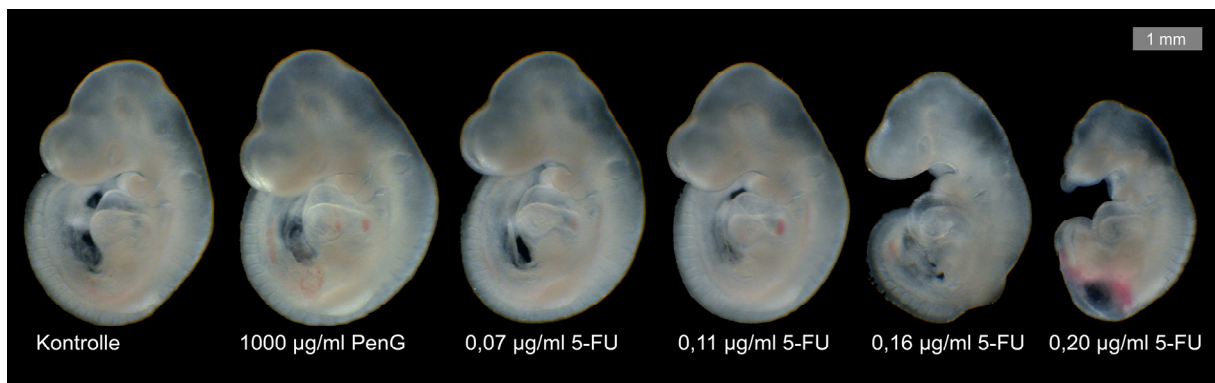
Die von 5-FU am häufigsten verursachten Dymorphogenesen wurden an der Vorderhirnanlage und an der vorderen Gliedmaßenanlage beobachtet. Die Vorderhirnanlage war im Verhältnis zum Mittel- und Hinterhirn kleiner als bei den Kontrollembryonen (Abb. 59). Im kaudalen Rumpfabschnitt der exponierten Embryonen trat eine blasige Umfangsvermehrung auf (Abb. 60). Als weitere Anomalie waren im kaudalen Rumpfabschnitt nicht von der Umgebung abgrenzbare Somiten zu sehen, die aber bei den Kontrollembryonen als rechteckige Strukturen erkennbar waren (Abb. 60). Das konzentrationsabhängige Auftreten der Anomalien an den einzelnen Organanlagen war substanzspezifisch und wurde in Tab. 2 zusammengefasst.

PenG wurde nur in der Konzentration von 1 000 µg/ml untersucht. Hierbei wurden keine adversen Effekte von PenG auf die Embryonalentwicklung beobachtet (Abb. 57).



**Abb. 57: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse nach Exposition mit 5-Fluorouracil u. Penicillin G**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 36, PenG 1000 µg/ml n = 33; Fluorouracil 0,07 µg/ml n = 10, 0,11 µg/ml n = 13, 0,16 µg/ml n = 16 und 0,20 µg/ml n = 22. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \*\* p < 0,01. (n.d. = nicht bestimmbar).  
Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.

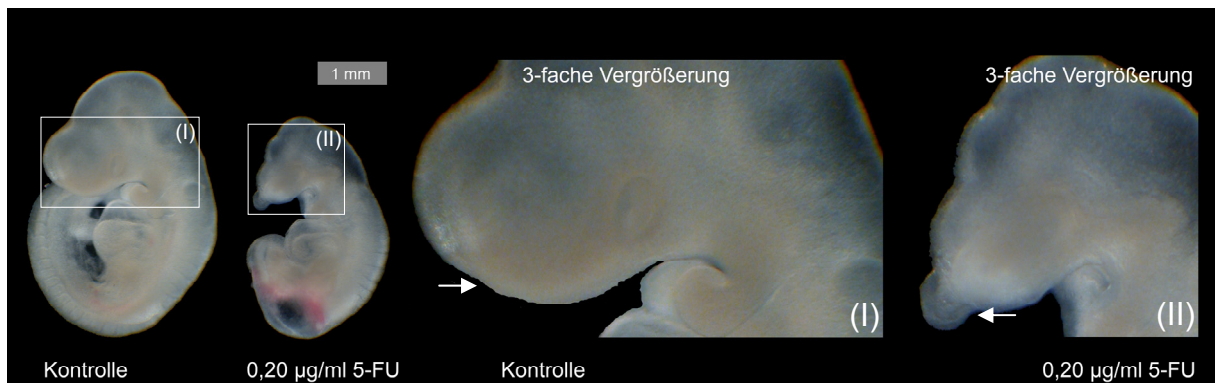


**Abb. 58: Fotografien repräsentativer Embryonen nach Exposition mit Penicillin G und 5-Fluorouracil**  
entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 57.

**Tabelle 2: Verteilung der Anomalien auf die morphologischen Strukturen von Embryonen nach Exposition mit 5-Fluorouracil**

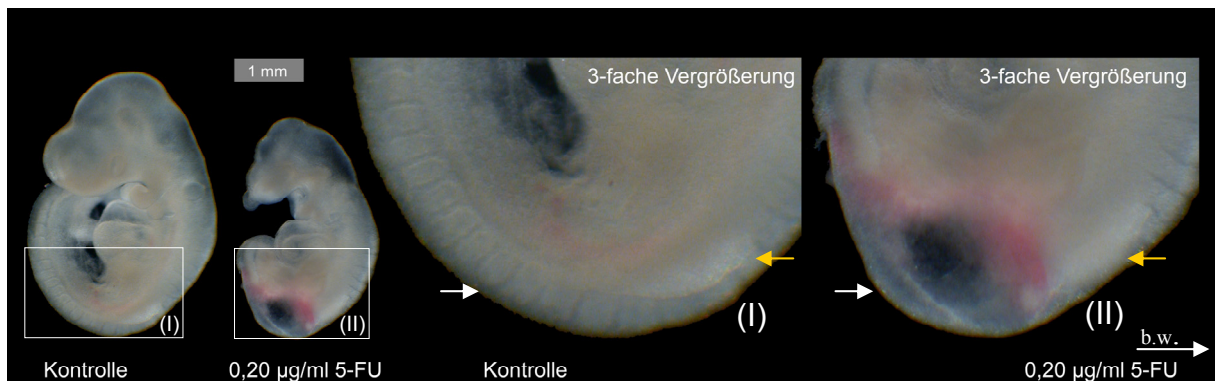
5-Fluorouracil [µg/ml]	0	0,07	0,11	0,16	0,20
Anzahl der Embryonen	36	10	13	16	22
<b>Dysmorphogenesen insgesamt</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>100</b>
<b>Haltung</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>Neuralrohr</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>Kopfanlage</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
Augenanlage	0	0	0	0	0
Ohranlage	0	0	0	0	0
Kiemenbögen	0	0	0	0	0
Herzanlage	0	0	0	0	0
<b>Somiten</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>Vordere Gliedmaßenanlage</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>100</b>
<b>Hintere Gliedmaßenanlage</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>100</b>
Kaudaler Rumpfabschnitt	0	0	0	0	0

**Legende zu Tab. 2:** Tabellarische Darstellung des prozentualen Anteils der betreffenden Embryonen - insgesamt und getrennt nach den betroffenen Organanlagen. Angaben in Prozent, diese beziehen sich auf die in Abb. 57 wiedergegebenen Versuche. Die Auswertungsparameter bei denen Anomalien festgestellt wurden, die ein spezifisches Muster der Dysmorphogenesen für 5-Fluorouracil ergeben, sind „fett gedruckt“ markiert.



**Abb. 59: Darstellung der Dysmorphogenesen an der Kopfanlage von repräsentativen Embryonen nach Exposition mit 0,20 µg/ml 5-Fluorouracil**

im Vergleich zu den entsprechenden Regionen der unbehandelten Kontrolle. Links in der Abbildung sind in der Seitenansicht die Bereiche weiß eingerahmt, die rechts in der Abbildung in der 3-fachen Vergrößerung wiedergegeben sind. Die Vorderhirnanlage war im Verhältnis zu den Mittel- und Hinterhirnanlagen kleiner als in der Kontrollsituation. Infolge des dysproportionalen Wachstums der Vorderhirnanlage gegenüber den Nasenplakoden traten diese bei den exponierten Embryonen deutlich über die Kontur des Vorderhirns hervor. Bei den Kontrollembryonen waren diese nicht abgrenzbar, sondern nur als Gewebsverdichtung an der Vorderhirnanlage zu erkennen (Pfeile).



**Abb. 60: Darstellung der Dymorphogenesen am Rumpf von repräsentativen Embryonen nach Exposition mit 0,20 µg/ml 5-Fluorouracil**

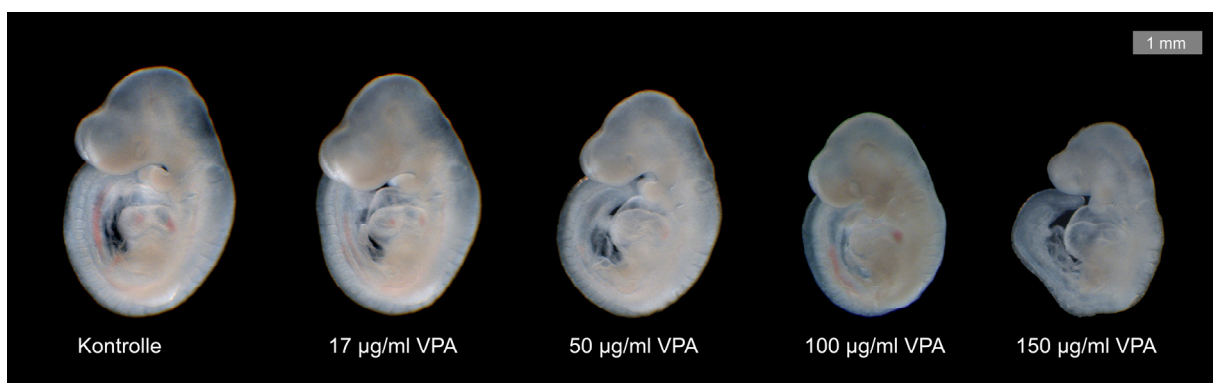
im Vergleich zu den entsprechenden Regionen der unbehandelten Kontrolle. Links in der Abbildung sind in der Seitenansicht die Bereiche weiß eingerahmt, die rechts in der Abbildung in der 3-fachen Vergrößerung wiedergegeben sind. Im Rumpfabschnitt der exponierten Embryonen trat eine blasige Umfangsvermehrung auf, die von Hämorrhagien im umliegenden Gewebe begleitet war. Die Somiten, bei dem Kontrollembryo als rechteckige Strukturen erkennbar, waren im Rumpfabschnitt der exponierten Embryonen nicht mehr abgrenzbar (weiße Pfeile). Die vordere Gliedmaßenanlage ist bei dem Kontrollembryo als glatte runde Erhebung zu erkennen, nicht jedoch bei dem exponierten Embryo, wo diese unregelmäßig und mit undeutlichen Grenzen geformt war (gelbe Pfeile). (Abb. 60 auf Seite 88).

**5.7.2 Effekte von Valproinsäure auf die Entwicklung der Embryonen in vitro**

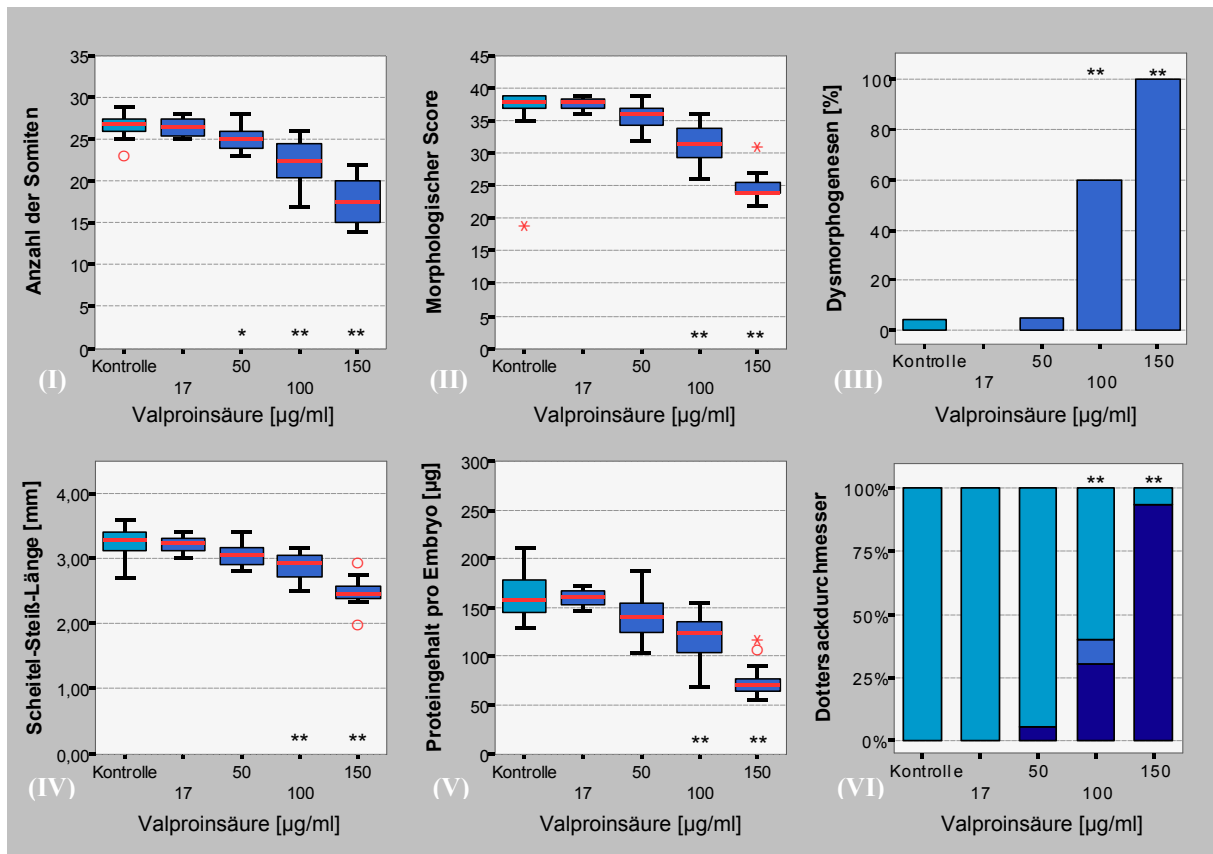
Die embryotoxische Wirkung von Valproinsäure (VPA) wurde in verschiedenen Studien unter Verwendung der WEC belegt [73;76;126;149-151]. Diese Studien verwendeten Ratten- oder Rinderserum als Kulturmedium.

VPA wurde in dem neu etablierten Kulturmedium basierend auf der Serummischung von FBS, DBS und RaS im Verhältnis 4,5:4,5:1 untersucht und zwar in zwei Versuchen zur Charakterisierung des konzentrationsabhängigen adversen Effekts auf die Embryonalentwicklung. Es wurden Konzentrationen zwischen 17 und 150 µg/ml VPA eingesetzt. In diesem Konzentrationsbereich waren alle entwicklungsrelevanten Parameter für den Embryo als auch den Dottersack konzentrationsabhängig verändert (Abb. 61 und 62). Die NOAEC für VPA war 17 µg/ml (Abb. 62), die LOAEC 50 µg/ml und die entsprechende  $IC_{Max}$  war 150 µg/ml.

Die am häufigsten beobachteten Dymorphogenesen betrafen: 1. die Kopfanlage der Embryonen begleitet von einem offenen kranialen Neuroporus und Anomalien der Augenanlage (Abb. 63), 2. ein unregelmäßig gewelltes Neuralrohr im mittleren bis kaudalen Rumpfabschnitt (Abb. 64) und 3. eine Anomalie der Herzanlage. Als weitere Anomalie wurden im kaudalen Rumpfabschnitt der exponierten Embryonen nicht mehr abgrenzbare Somiten beobachtet, die bei dem Kontrollembryo als rechteckige Strukturen erkennbar waren. Das konzentrationsabhängige Auftreten der Anomalien an den einzelnen Organanlagen war substanzspezifisch und wurde in Tab. 3 zusammengefasst.



**Abb. 61: Fotografien repräsentativer Embryonen nach Exposition mit Valproinsäure**  
im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 62.



**Abb. 62: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse nach Exposition mit Valproinsäure**

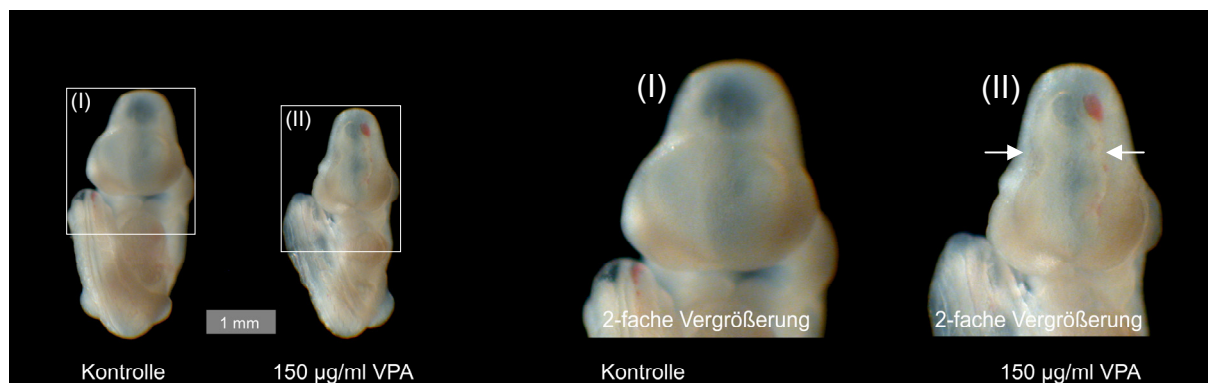
Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 23; 17 µg/ml n = 14; 50 µg/ml n = 15; 100 µg/ml n = 16 und 150 µg/ml n = 16. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,25 % DMSO. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.

**Tabelle 3: Verteilung der Anomalien auf die morphologischen Strukturen der Embryonen nach Exposition mit Valproinsäure**

<b>Valproinsäure [µg/ml]</b>	<b>0</b>	<b>17</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>150</b>
Anzahl der Embryonen	23	14	15	15	16
<b>Dysmorphogenesen insgesamt</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>60</b>	<b>100</b>
Haltung	4	0	0	0	0
<b>Neuralrohr</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>81</b>
<b>Kopfanlage</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>33</b>	<b>94</b>
<b>Augenanlage</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>94</b>
Ohranlage	0	0	0	0	0
Kiemenbögen	0	0	0	0	0
<b>Herzanlage</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>20</b>	<b>50</b>
<b>Somiten</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>50</b>
Vordere Gliedmaßenanlage	0	0	0	0	0
Hintere Gliedmaßenanlage	0	0	0	10	0
Kaudaler Rumpfabschnitt	4	0	0	0	13

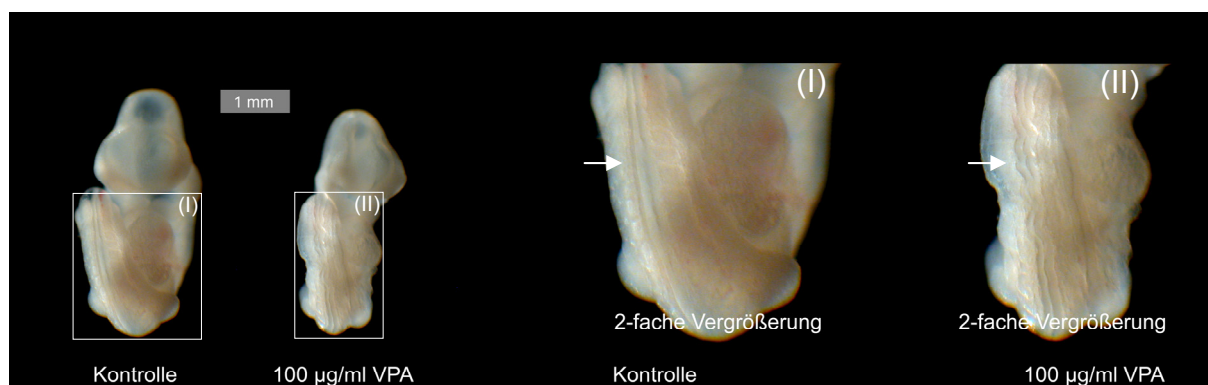
**Legende zu Tab. 3:** Tabellarische Darstellung des prozentualen Anteils der betroffenen Embryonen - insgesamt und getrennt nach den betroffenen Organanlagen. Angaben in Prozent, diese beziehen sich auf die in Abb. 62 wiedergegebenen Versuche. Die Auswertungsparameter, bei denen Anomalien festgestellt wurden, die ein spezifisches Muster der Dysmorphogenesen für Valproinsäure ergeben, sind „fett gedruckt“ markiert.





**Abb. 63: Darstellung der Dysmorphogenesen im Kopfbereich von einem repräsentativen Embryo nach Exposition mit 150 µg/ml Valproinsäure**

im Vergleich zu den entsprechenden Regionen der unbehandelten Kontrolle. Im linken Teil der Abbildung sind in der Frontansicht die Bereiche weiß eingerahmt, die im rechten Teil der Abbildung in der 2-fachen Vergrößerung wiedergegeben sind. Im Gegensatz zur Kontrolle war der Kopfbereich der exponierten Embryonen deformiert. Am vorderen Kopf waren nicht eine glatte und in der Tiefe konturlose Oberfläche, sondern unregelmäßige Strukturen im Gewebe (Kanten und Ränder des Neuralrohres – offener kranialer Neuroporus) festgestellt worden (weiße Pfeile).



**Abb. 64: Darstellung der Dysmorphogenesen im kaudalen Rumpfabschnitt von einem repräsentativen Embryo nach Exposition mit 100 µg/ml Valproinsäure**

im Vergleich zu den entsprechenden Regionen der unbehandelten Kontrolle. Im linken Teil der Abbildung sind in der Frontansicht die Bereiche weiß eingerahmt, die im rechten Teil der Abbildung in der 2-fachen Vergrößerung wiedergegeben sind. Bei den exponierten Embryonen verlaufen die Konturen des Neuralrohres nicht, wie in der Kontrolle, in sagittal verlaufenden Geraden, sondern unregelmäßig gewellt (weiße Pfeile).

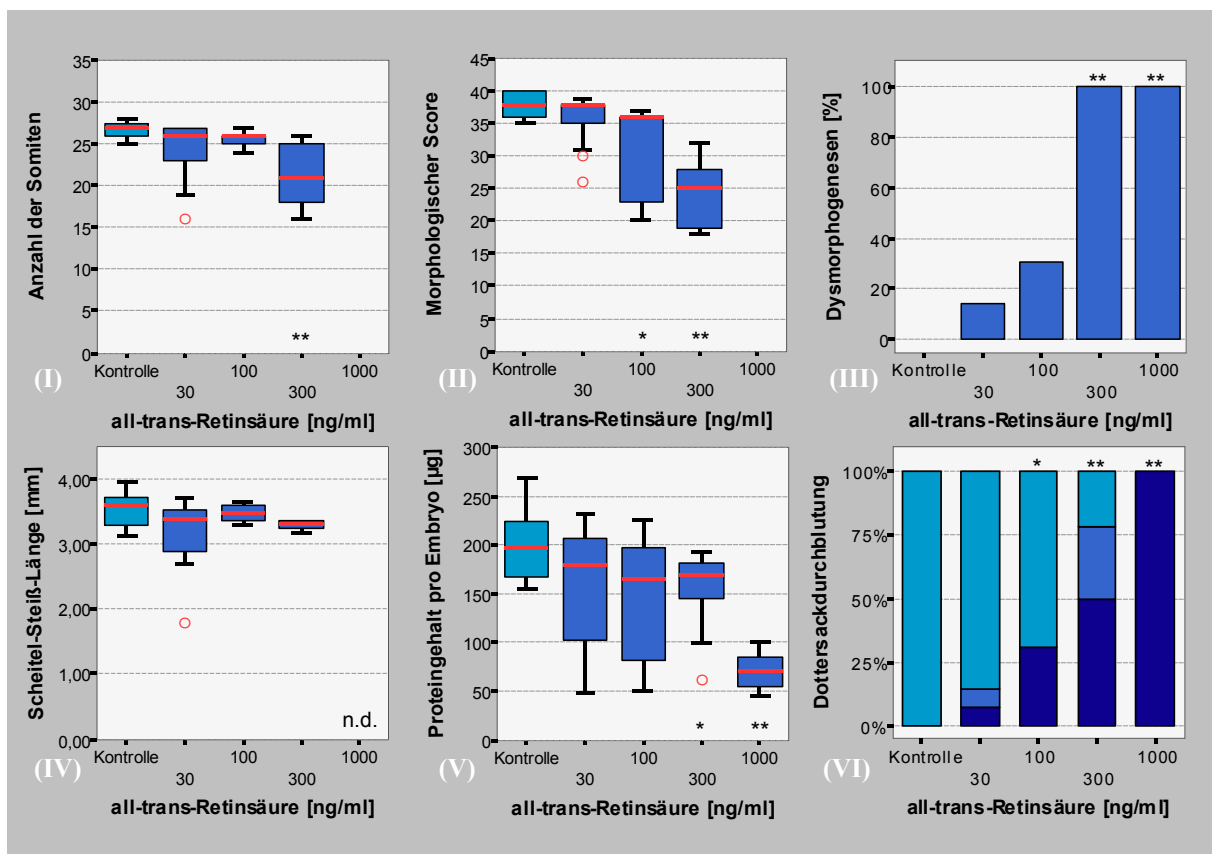
### 5.7.3 Effekte von *all-trans* Retinsäure auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*

*All-trans* Retinsäure (RA) wurden in verschiedenen Studien unter Verwendung der WEC auf ihr embryotoxisches Potential untersucht [132;152-155]. Diese Studien wurden unter Verwendung von Rattenserum sowie von Rinderserum als Kulturmedium durchgeführt.

Die Testsubstanz RA wurde in dem aus der Literatur übernommen Konzentrationsbereich von 30 bis 1 000 ng/ml unter Verwendung des neu etablierten Kulturmediums basierend auf DPBS supplementiert mit 10 % Rattenserum untersucht.

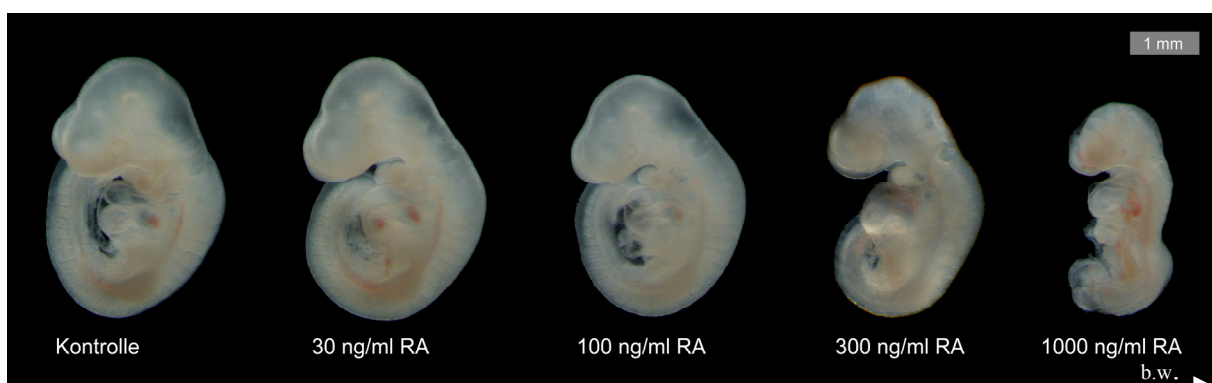
In diesem Konzentrationsbereich manifestierten sich in allen Auswertungsparametern konzentrationsabhängige adverse Effekte auf die Entwicklung der Embryonen und des Dottersacks (Abb. 65 und 66). In dieser Studie wurde die NOAEC bei 30 ng/ml erreicht. Die LOAEC für RA war 100 ng/ml. Als empfindlichste Parameter reagierten der Morphologische Score-Wert (Abb. 65 / II) sowie die Differenzierung des Blutgefäßsystems des Dottersacks

(Abb. 65 / VI). Der  $IC_{Max}$ -Wert war 300 ng/ml RA. Die am häufigsten beobachteten Dysmorphogenesen waren: 1. eine Hypoplasie des zweiten Kiemenbogens (Abb. 67), 2. ein unregelmäßig gewelltes Neuralrohr im mittleren bis kaudalen Rumpfabschnitt (Abb. 68), 3. eine Anomalie des kaudalen Rumpfabschnitts in Form einer unregelmäßig geformten Struktur mit einer Abknickung des Achsenverlaufs in Höhe der kaudalen Gliedmaßenanlage (Abb. 69) und 4. einer Haltungsanomalie in Form einer Skoliose mit einer seitlichen Abknickung des Achsenverlaufs in Höhe der kaudalen Grenze der Herzanlage (Abb. 69). Das konzentrationsabhängige Auftreten der Anomalien an den einzelnen Organanlagen war substanzspezifisch und wurde in Tab. 4 zusammengefasst.



**Abb. 65: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse nach Exposition mit *all-trans* Retinsäure**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 11, 30 ng/ml n = 14, 100 ng/ml n = 13, 300 ng/ml n = 14 und 1000 ng/ml n = 11. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,1% DMSO. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. (n.d. = nicht bestimmbar).  
Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore ■ 3 ■ 2 ■ 1.

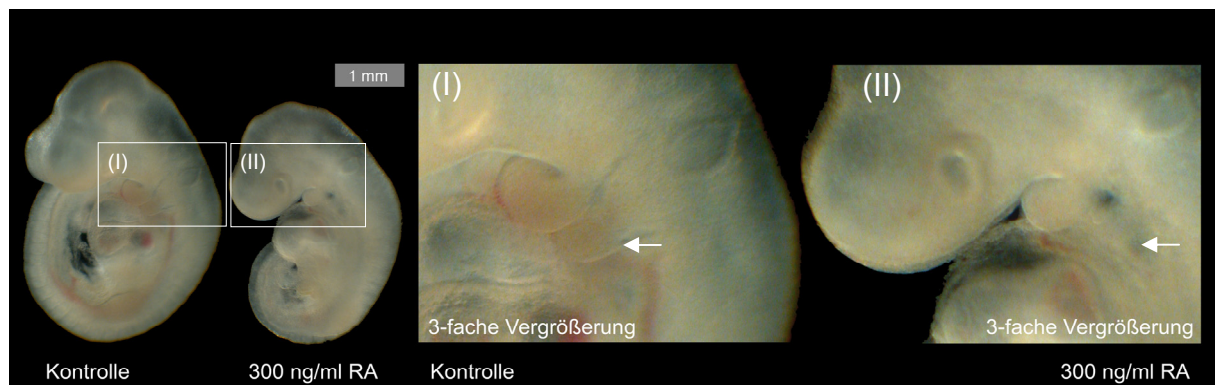


**Abb. 66: Fotografien repräsentativer Embryonen nach Exposition mit *all-trans* Retinsäure**  
entsprechend den Kulturergebnissen aus Abb. 65. (Abb. 66 siehe Seite 92).

**Tabelle 4: Verteilung der Anomalien auf die morphologischen Strukturen der Embryonen nach Exposition mit *all-trans* Retinsäure**

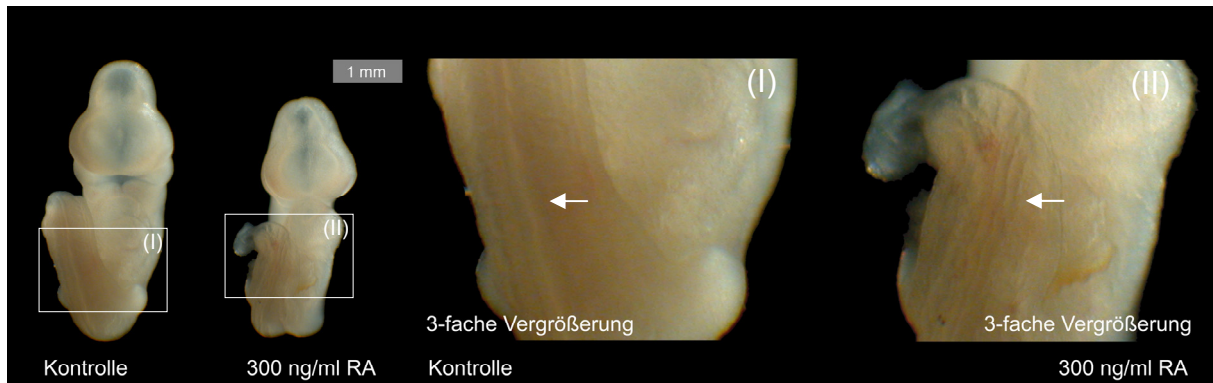
<i>All-trans</i> Retinsäure [ng/ml]	0	30	100	300	1000
Anzahl der Embryonen	13	14	13	14	13
<b>Dysmorphogenesen insgesamt</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>31</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Haltung</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>71</b>	<b>n.d.</b>
<b>Neuralrohr</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>31</b>	<b>79</b>	<b>n.d.</b>
<b>Kopfanlage</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>31</b>	<b>64</b>	<b>n.d.</b>
Augenanlage	0	7	31	29	n.d.
Ohranlage	0	0	0	14	n.d.
<b>Kiemenbögen</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>93</b>	<b>n.d.</b>
Herzanlage	0	0	0	0	n.d.
Somiten	0	0	0	0	n.d.
Vordere Gliedmaßenanlage	0	0	0	0	n.d.
Hintere Gliedmaßenanlage	0	0	0	43	n.d.
<b>Kaudaler Rumpfabschnitt</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>n.d.</b>

**Legende zu Tab. 4:** Tabellarische Darstellung des prozentualen Anteils der betreffenden Embryonen - insgesamt und getrennt nach den betroffenen Organanlagen. Angaben in Prozent, diese beziehen sich auf die in Abb. 65 wiedergegebenen Versuche. Die Auswertungsparameter bei denen Anomalien festgestellt wurden, die ein spezifisches Muster der Dysmorphogenesen für *all-trans* Retinsäure ergeben, sind „fett gedruckt“ markiert. In der Untersuchung der Exposition 1000 ng/ml *all-trans* Retinsäure war eine eindeutige Identifizierung von Dysmorphogenesen an einzelnen Organanlagen nicht möglich. Die Embryonen waren insgesamt so stark verändert, dass eine Anomalie einer Organanlage auch durch eine passive Verformung durch umliegende selbst veränderte Strukturen möglich wäre. n.d. = nicht bestimmbar.

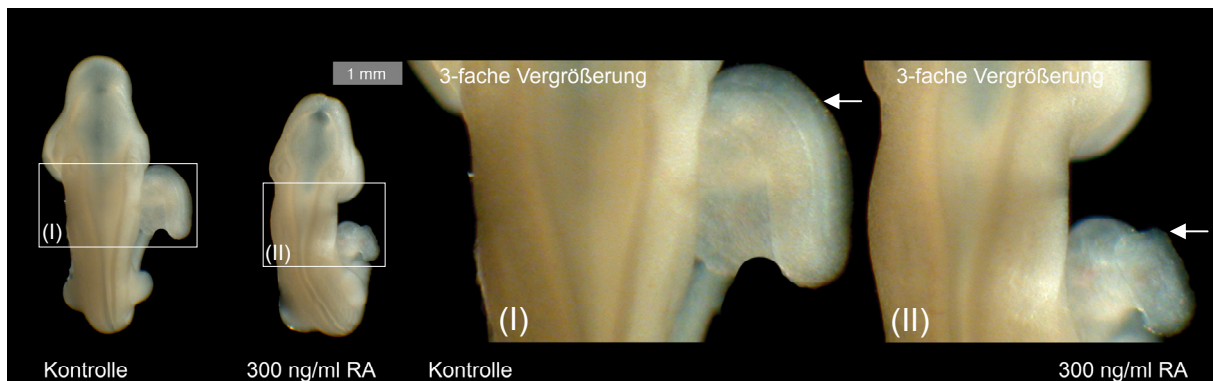


**Abb. 67: Darstellung der dysproportionalen Hypoplasie des zweiten Kiemenbogens bei einem repräsentativen Embryo nach Exposition mit 300 ng/ml *all-trans* Retinsäure**

im Vergleich zu den entsprechenden Regionen der unbehandelten Kontrolle. Im linken Teil der Abbildung sind in der Seitenansicht die Bereiche weiß eingerahmt, die im rechten Teil der Abbildung in der 3-fachen Vergrößerung wiedergegeben sind. Im Gegensatz zur Kontrolle war der zweite Kiemenbogen der exponierten Embryonen anomal geformt. Dieser war nicht von der Umgebung abgrenzbar. Es entstanden diffuse Gewebsübergänge zwischen dem Rumpf und der Herzanlage mit dem Herzbeutel (weiße Pfeile).



**Abb. 68: Darstellung des unregelmäßig gewellten Neuralrohrs im kaudalen Rumpfabschnitt bei einem repräsentativen Embryo nach Exposition mit 300 ng/ml *all-trans* Retinsäure** im Vergleich zu den entsprechenden Regionen der unbehandelten Kontrolle. Im linken Teil der Abbildung sind in der Frontansicht die Bereiche weiß eingerahmt, die im rechten Teil der Abbildung in der 3-fachen Vergrößerung wiedergegeben sind. Im Gegensatz zur Kontrolle, in der die Konturen des Neuralrohrs als parallele Geraden erscheinen, sind die Konturen des Neuralrohrs von Embryonen exponiert mit 300 ng/ml RA unregelmäßig gewellt (weiße Pfeile).



**Abb. 69: Darstellung der Anomalie des kaudalen Rumpfabschnitts bei einem repräsentativen Embryo nach Exposition mit 300 ng/ml *all-trans* Retinsäure** im Vergleich zu den entsprechenden Regionen der unbehandelten Kontrolle. Im linken Teil der Abbildung sind in der Rückansicht die Bereiche weiß eingerahmt, die im rechten Teil der Abbildung in der 3-fachen Vergrößerung wiedergegeben sind. Im Gegensatz zur Kontrolle, wo die Dorsalseite des kaudalen Rumpfabschnittes als konvexe glatte Struktur erscheint, ist sie bei den exponierten Embryonen unregelmäßig geformt und weist eine Abknickung des Achsenverlaufs in Höhe der kaudalen Gliedmaßenanlage auf (weiße Pfeile). Weiterhin ist in den Übersichtsaufnahmen der Embryonen die Haltungsanomalie in Form einer Skoliose mit einem seitlichen Achsenbruch in Höhe der kaudalen Grenze der Herzanlage zu beobachten.

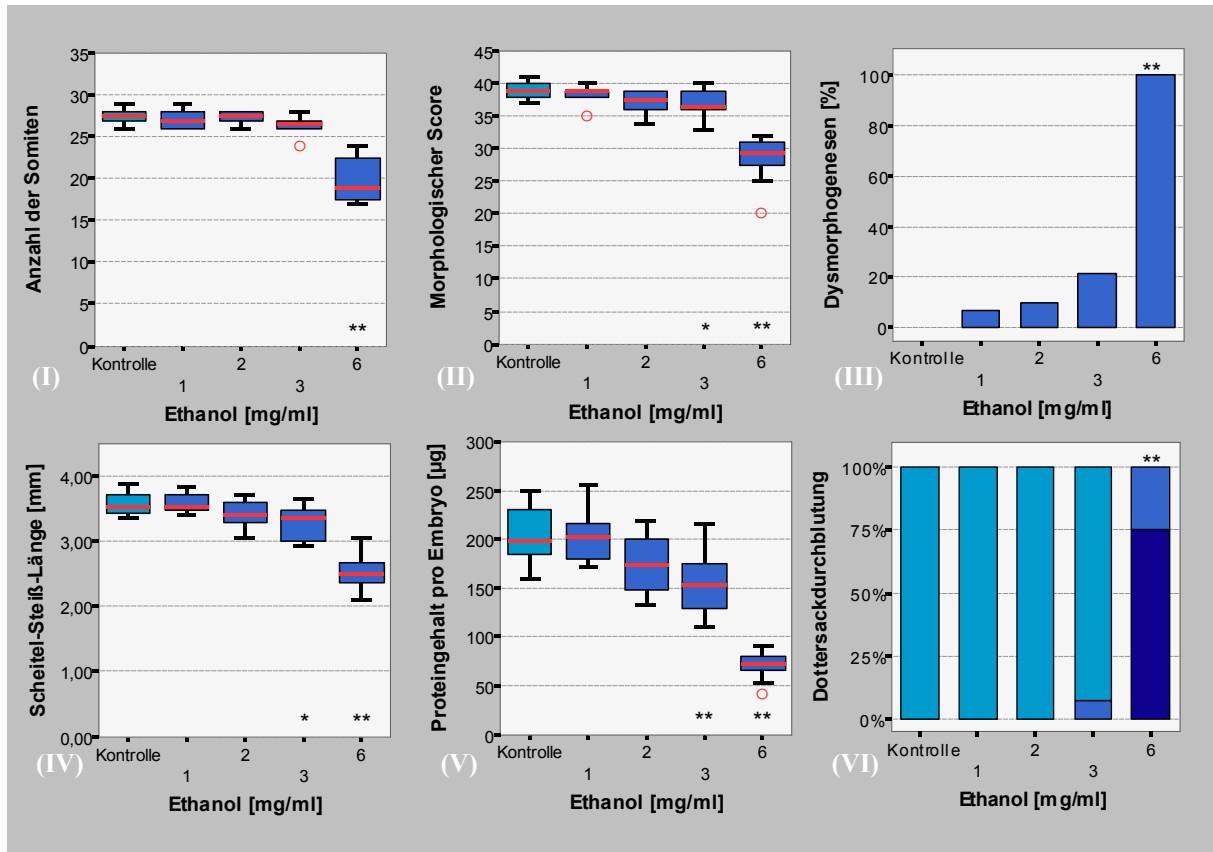
#### 5.7.4 Untersuchung der Effekte von Ethanol auf die Entwicklung der Embryonen *in vitro*

Auch Ethanol wurde in verschiedenen Studien unter Verwendung der WEC auf sein embryotoxisches Potential untersucht [128;129;156-159]. Diese Studien wurden unter Verwendung von Rattenserum als Kulturmedium durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Ethanol in dem aus der Literatur entnommenen Konzentrationsbereich von 1 bis 6 mg/ml in dem neu etablierten Kulturmedium DPBS supplementiert mit 10 % Rattenserum in der WEC-Kultur untersucht.

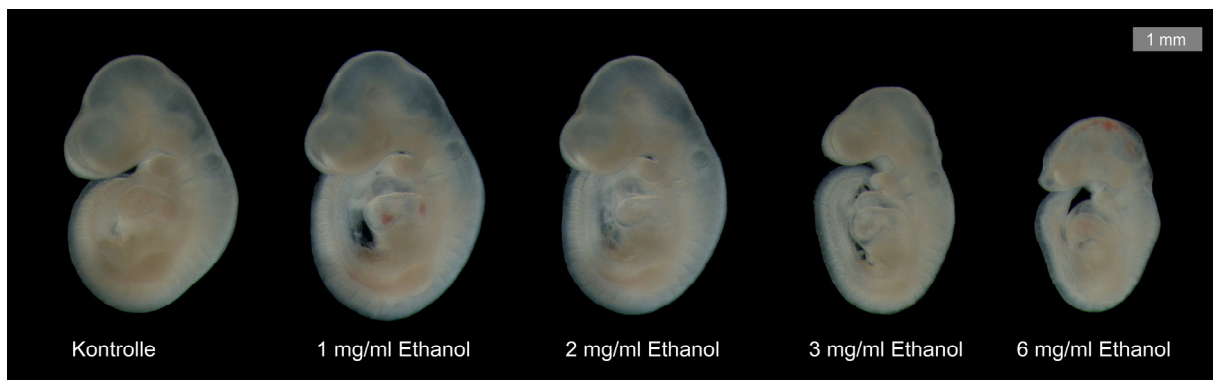
In diesem Konzentrationsbereich waren alle Entwicklungsparameter für den Embryo als auch den Dottersack (Abb. 70 und 71) beeinträchtigt. Folgende charakteristische Konzentrationen konnten für Ethanol definiert werden: NOAEC = 2 mg/ml und LOAEC = 3 mg/ml. Als erste Parameter reagierten der Morphologische Score-Wert (Abb. 70 / II), die Scheitel-Steiß-

Länge und der Proteingehalt der Embryonen (Abb. 70 / IV und V). Die niedrigste getestete Konzentration ( $IC_{Max}$ ), die zu Dysmorphogenesen in allen exponierten Embryonen führte, war 6 mg/ml Ethanol. Die am häufigsten beobachtete Dysmorphogenese war die Hypoplasie der Kopfanlage (Abb. 72). Das konzentrationsabhängige Auftreten der Anomalien an den einzelnen Organanlagen war substanzspezifisch und wurde in Tab. 5 zusammengefasst.



**Abb. 70: Grafische Darstellung der Kulturergebnisse nach Exposition mit Ethanol**

Der Stichprobenumfang der Untersuchungen betrug: Kontrolle n = 16, 1 mg/ml n = 14; 2 mg/ml n = 10; 3 mg/ml n = 14 und 6 mg/ml n = 12. Die statistische Auswertung erfolgte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Statistisches Signifikanzniveau: \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. Dottersackdurchblutung: Bewertungsscore 3 (hellblau) 2 (dunkelblau) 1 (schwarz).



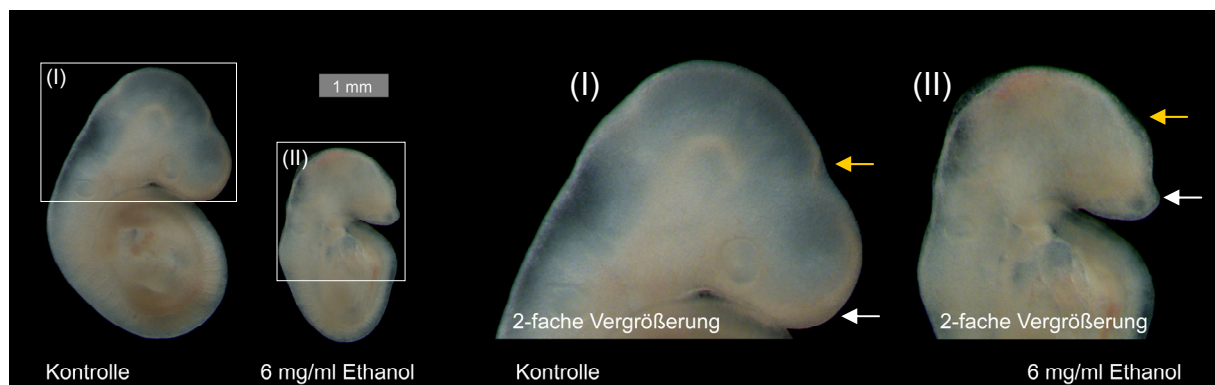
**Abb. 71: Fotografien repräsentativer Embryonen kultiviert in DBS supplementiert mit 10 % Fötuse- rum nach einer Exposition mit Ethanol** entsprechend den Ergebnissen aus Abb. 70.



**Tabelle 5: Verteilung der Anomalien auf die morphologischen Strukturen der Embryonen nach Exposition mit Ethanol**

Ethanol [mg/ml]	0	1	2	3	6
Anzahl der Embryonen	16	14	10	14	12
<b>Dysmorphogenesen insgesamt</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>21</b>	<b>100</b>
Haltung	0	7	10	0	8
Neuralrohr	0	0	0	0	8
<b>Kopfanlage</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>100</b>
Augenanlage	0	0	0	0	0
Ohranlage	0	0	0	0	25
Kiemenbögen	0	0	0	0	0
Herzanlage	0	0	0	0	25
Somiten	0	0	0	0	17
Vordere Gliedmaßenanlage	0	0	0	0	0
Hintere Gliedmaßenanlage	0	0	0	0	0
Kaudaler Rumpfabschnitt	0	0	0	0	25

**Legende zu Tab. 5:** Tabellarische Darstellung des prozentualen Anteils der betroffenen Embryonen - insgesamt und getrennt nach den betroffenen Organanlagen. Angaben in Prozent, diese beziehen sich auf die in Abb. 70 wiedergegebenen Versuche. Die Auswertungsparameter bei denen Anomalien festgestellt wurden, die ein spezifisches Muster der Dysmorphogenesen für Ethanol ergeben, sind „fett gedruckt“ markiert.



**Abb. 72: Darstellung der Dysmorphogenesen im Kopfbereich von einem repräsentativen Embryo nach Exposition mit 6 mg/ml Ethanol**

im Vergleich zu der entsprechenden Region der unbehandelten Kontrolle. Im linken Teil der Abbildung sind in der Seitenansicht die Bereiche weiß eingerahmt, die im rechten Teil der Abbildung in der 2-fachen Vergrößerung wiedergegeben sind. Im Gegensatz zur Kontrolle war der Kopfbereich der exponierten Embryonen deformiert. Bei diesen war am Kopf keine deutliche Dreiteilung der Gehirnanlage in Vorder-, Mittel- und Hinterhirn erkennbar. Bei dem Kontrollembryo sind diese Abschnitte durch deutliche Einziehungen in der sonst konkaven Form der Kopfanlage abgrenzbar (gelbe Pfeile). Bei den exponierten Embryonen war das Verhältnis der Größe der Gehirnanlage zur Größe des gesamten Embryos kleiner als bei den Kontrollembryonen. Infolge des dysproportionalen Wachstums der Gehirnanlage traten die Nasenplakoden bei den exponierten Embryonen deutlich hervor. Bei den Kontrollembryonen waren diese nicht abgrenzbar, sondern nur als Gewebsverdichtung an der Vorderhirnanlage zu erkennen (weiße Pfeile).