

## 6 Diskussion

### 6.1 Kulturmedien für die Whole Embryo Culture (WEC)

Die Kulturmedien der WEC haben in der Regel einen sehr hohen Serumanteil. Für die WEC von Maus- und Rattenembryonen wird am häufigsten ein Kulturmedium bestehend aus 100 % Rattenserum verwendet [4]. Da für die Gewinnung von Rattenserum die Spendertiere getötet werden müssen, boten sich als Alternative heterologe Seren an [87]. Die drei alternativen Kulturmedien, die sich inzwischen etablieren konnten und auch bereits regelmäßig Anwendung in toxikologischen Studien mit der WEC finden, sind: Humanserum [103], Humanserum supplementiert mit 10 % Rattenserum [86] und Rinderserum hergestellt nach dem Protokoll von Klug et al. (1985) [76]. Da die Protokolle der WEC in verschiedenen Laboratorien in einzelnen Kulturparametern voneinander abweichen, ist das entwicklungsfördernde Potential dieser Kulturmedien anhand der publizierten WEC Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar. Eine Vergleichsstudie dieser vier Kulturmedien wurde durchgeführt.

Alle vier der genannten Kulturmedien ermöglichten eine Entwicklung der Embryonen *in vitro*. Diese lag innerhalb der Erwartung und wies eine Differenzierung auf, die mit der *In-vivo*-Situation vergleichbar ist. Das embryonale Wachstum erreichte im Proteingehalt ca. 50-60 % der entsprechenden *In-vivo*-Werte [85;160]. Keines dieser hier untersuchten Kulturmedien induzierte Entwicklungsanomalien.

Rattenserum ist seit der Etablierung des Protokolls durch New et al. [46] als Kulturmedium akzeptiert und wurde seitdem nicht weiter modifiziert [4]. Eine Eignungsprüfung verschiedener Chargen dieses Standardkulturmediums erfolgte bisher nicht und so sind keine Untersuchungsergebnisse bezüglich der Chargen-Konstanz publiziert. Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurden fünf Chargen Rattenserum nach dem Standardprotokoll von New [46] hergestellt und auf ihre Eignung für die WEC untersucht. Es wurde festgestellt, dass auch beim Rattenserum eine Chargenvariabilität vorlag, die sich in einer deutlichen Ergebnisstreuung bezüglich der Wachstumsparameter manifestierte (vgl. 5.1).

Die Kulturmedien basierend auf 100 % Humanserum und basierend auf Humanserum supplementiert mit 10 % Rattenserum wiesen in dieser Studie ein großes entwicklungsförderndes Potential für die Embryonen auf. Sie ermöglichten im Vergleich zu den anderen beiden Kulturmedien (Rattenserum bzw. Rinderserum) einen um 54 % höheren Proteinwert der Embryonen und einen um 8 % höheren Morphologischen Score-Wert der Embryonen (vgl. 5.1). Ein solches Ergebnis war nicht grundsätzlich zu erwarten, denn i.d.R. ermöglichen heterologe Seren nur ein vergleichbares oder geringes entwicklungsförderndes Potential im Vergleich zum Rattenserum [4]. Davon abweichende Ergebnisse besonders guter entwicklungsfördernder Potentiale, wie in dieser Studie festgestellt, wurden bereits auch von anderen Autoren beschrieben [85]. Es wurde schon einmal ein höheres Wachstum der Embryonen (44 %

höherer „Proteinwert der Embryonen“) für ein entsprechendes Kulturmedium (Humanserum mit 10 % Rattenserum) im Vergleich zu einem Kulturmedium basierend auf 100 % Rattenserum beschrieben [85].

In den Untersuchungen der vorliegenden Studie war die Eignung des Humanserums als Kulturmedium für die WEC unabhängig von der Supplementierung mit 10 % Rattenserum, so wie dies bereits von Chatot et al. beschrieben wurde [103]. Diese Beobachtung steht jedoch im Widerspruch zu anderen Studien [85-87]. Humanserum unterliegt nachweislich einer großen Chargenvariabilität. Denn es ist bekannt, dass die Eignung von Humanserum als Kulturmedium abhängig ist von den entsprechenden Blutspendern [103]. Möglichen Einflussgrößen wurde bereits wissenschaftlich nachgegangen. Das Geschlecht des Spenders hatte keinen Einfluss auf die Eignung [70]. Ebenso konnte kein Unterschied in der Entwicklung der Embryonen in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus der Spenderinnen nachgewiesen werden [160]. Eindeutig waren aber der Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum der Spender [161], mit Erkrankungen, wie Diabetes [162] und Urämie [163], oder mit einer Pharmakotherapie der Spender, wie Vitamin A Substitution [164], Chemotherapie [103] oder die Einnahme von Antiepileptika [71]. In einer WEC Studie konnten bekannte adverse Effekte von Antiepileptika durch eine Supplementierung des Kulturmediums mit Aminosäuren und Vitaminen signifikant reduziert werden [71;165]. Dies zeigte den großen Einfluss des Nährstoffangebots auf die Sensitivität und Sensibilität der Embryonen gegenüber von Toxinen, insbesondere auch den Einfluss von nicht speziesspezifischen Bestandteilen des Serums. Die Bedeutung der Aminosäuren und Vitamine für die Entwicklung kultivierter Embryonen wurde in unabhängigen Studien bestätigt [99;166]. Bezüglich des Aminosäure- und Vitamin-Anteils in Serum ist anzunehmen, dass individuell variierende Zusammensetzungen ernährungsbedingt sind und die Ernährungsgewohnheiten des Spenders die Eignung von humanem Serum für die WEC mitbestimmen.

Die mangelnde Eignung von Humanserum als Kulturmedium der WEC wurde primär mit der Retardierung der Embryonen beschrieben, seltener auch mit spezifischen Effekten, wie Anämie [86;167] und Dymorphogenesen in Form von Anomalien des Neuralrohrs [70;167]. Diese adversen Effekte begründeten sich in der defizitären Zusammensetzung des Humanserums gegenüber dem Rattenserum, da eine Supplementierung des Humanserums mit Glukose [103;160], Transferrin [168] und / oder mit 10 % Rattenserum [86;160;167] zu einer in dem Rattenserum vergleichbaren Entwicklung der Embryonen führte. Der positive Einfluss dieser Supplementierung wurde als Kompensation an speziesspezifischen Faktoren gedeutet. Der speziesspezifische Faktor könnte durch sein Fehlen einen absoluten Mangel oder durch die ungenügende Aufnahme in Folge von speziesspezifischen Proteinformen einen relativen Mangel bedingen. Letzteres wurde zum Beispiel bei dem Rezeptor vermittelten Transport des Transferrins am Dottersack nachgewiesen [168]. Das heterologe Transferrin des Menschen

wurde im Vergleich zum homologen Transferrin der Ratte in signifikant geringeren Mengen durch den Dottersack der Ratte aufgenommen.

Unter Berücksichtigungen der Literatur ist die in dieser Studie beobachtete Eignung der beiden auf Humanserum basierenden Kulturmedien als Einzelfall zu interpretieren. Die erhobenen Ergebnisse lagen im beschriebenen Schwankungsbereich des entwicklungsfördernden Potentials von Humanserum, sollten aber nicht verallgemeinert werden.

Die Entwicklung der Embryonen in dem auf Rinderserum basierendem Kulturmedium war vergleichbar mit derjenigen unter Verwendung von Rattenserum und bestätigte damit den Anspruch, ein gleichwertiges Kulturmedium zu sein [3].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass heterologe Seren (humanes Serum oder bovinnes Serum) grundsätzlich das Potential haben, eine Entwicklung von Rattenembryonen *in vitro* zu ermöglichen, die mit der in homologem Rattenserum vergleichbar ist. Für das Humanserum ist aber – wie oben bereits ausgeführt - eine besonders große, vom Spender abhängige Varianz zu erwarten, die es als Grundlage für ein standardisiertes Kulturmedium der WEC als ungeeignet erscheinen lässt. Rinderserum nach dem von Klug et al. etablierten Protokoll [72] stellt für die Weiterentwicklung eines Standardkulturmediums, welches in großen Chargen konstanter Qualität verfügbar sein sollte, die bessere Ausgangssituation dar.

Die von New et al. 1976 getroffene Aussage, dass die Entwicklung der Rattenembryonen (Gestationstag 9,5 kultiviert für 48 Stunden in Rattenserum) *in vitro* und *in vivo* vergleichbar ist, ist nicht für alle Auswertungsparameter gültig [45]. Sie bezieht sich primär auf die Differenzierung der Embryonen [85] und weniger auf das Wachstum derselben [160]. Es muss berücksichtigt werden, dass die Entwicklung der Embryonen *in vitro*, unabhängig vom verwendeten Kulturmedium (auch bei der Verwendung von Rattenserum), immer mit einer Wachstumsretardierung einhergeht.

## **6.2 Untersuchung von Rinderserum hergestellt nach dem Protokoll von Klug et al.**

Der Ausgangspunkt für die vorliegende Studie zur Etablierung eines neuen Kulturmediums war das supplementierte Rinderserum nach dem Protokoll von Klug (1985) [72]; dieses wurde daher als Referenz und Kontrollmedium für den ersten Teil der Studie verwendet. Insgesamt wurden 19 Chargen hergestellt und auf ihre Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC untersucht. Entsprechend der laborinternen Erfahrungen [72] unterlag auch das Rinderserum einer Chargenvariabilität, so dass nur 10 der 19 Seren als Kontrollkulturmedien genutzt werden konnten.

Nachdem in dieser Studie alle vier Seren oder Serummischungen unter den gleichen Laborbedingungen als Kulturmedium für die WEC eingesetzt wurden, kann - unter Berücksichtigung der dargestellten Angaben in der Literatur - zusammenfassend festgestellt werden, dass alle vier Kulturmedien basierend auf 1. Rattenserum, 2. Humanserum, 3. Humanserum

supplementiert mit 10 % Rattenserum und 4. Rinderserum nach dem Protokoll von Klug et al. [72] ein vergleichbares entwicklungsförderndes Potential in Abhängigkeit der Charge haben. Demnach erscheinen alle vier Standardkulturmedien im gleichen Maße geeignet, wie auch ungeeignet zu sein. Wenn man aber die Chargengrößen der verwendeten Seren, den Serumbedarf für einen WEC Versuch bzw. den für eine embryotoxikologische Untersuchung einer Substanz mitberücksichtigt, verändert sich die Gleichwertigkeit. Betrachtet man die tägliche Arbeitskapazität eines WEC Laboratoriums, so können Rattenserumchargen von 50 bis 80 ml durch das Poolen des Serums von ca. 20 Ratten hergestellt werden. Beim Humanserum sind Chargen von 100 bis 250 ml pro Person möglich. Pro Rind kann man Serumchargen von 500 bis 1 000 ml pro Tier herstellen. Der Serumbedarf für einen WEC Versuch (40 Embryonen) beträgt ca. 60 ml und somit werden für eine embryotoxikologische Untersuchung einer Testsubstanz mit vier WEC Ansätzen ca. 240 ml Serum benötigt. Diese Serummenge bedarf vier Rattenserumchargen, ein bis zwei Humanserumchargen oder ein Viertel bis der Hälfte einer Rinderserumcharge. Bei der festgestellten Chargenvariabilität aller vier Standardkulturmedien bedeutet dies, dass theoretisch die Verwendung von Rattenserum den größten und die Nutzung von Rinderserum - hier ist nur ein Charge nötig - den geringsten Fehler durch Chargenvariabilität nach sich zieht.

Betrachtet man die zusammenfassenden Darstellungen der Ergebnisse aller fünf Rattenserumchargen (vgl. 5.1) bzw. der 19 Rinderseren (vgl. 5.2), so muss gefolgert werden, dass sich die Chargenvariabilität viel deutlicher auf das Wachstum als auf die Differenzierung der Embryonen auswirkte. Die Streuung der Ergebnisse war bei den Wachstumsparametern, insbesondere dem Proteingehalt der Embryonen, viel größer als bei den Auswertungsparametern der Differenzierung. Dahingegen fällt bei der Betrachtung der Ergebnisse einzelner Chargen, wie bei den beiden auf Humanserum basierenden Standardkulturmedien, die Streuung der Ergebnisse nicht ins Gewicht (vgl. 5.1).

Die Wahrscheinlichkeit ist hoch, dass bei der Verwendung von Standardkulturmedien bestehend aus verschiedenen kleinen Chargen (Rattenserum) weder die Wachstumsergebnisse von *Intra*-Laborstudien noch die von *Inter*-Laborstudien vergleichbar sind. Diese Aussage bezieht sich zwar nur auf die Kontrollsituationen in der Kultur, ist aber für eine Routinetestmethode nicht akzeptabel. Wenn man darüber hinaus annimmt, dass aufgrund einer Serumcharge mit geringerem entwicklungsfördernden Potential ein Mangel und damit ein Stressfaktor für den Embryo erzeugt wird, dann muss auch mit einer veränderten Sensibilität und Sensitivität der Embryonen gegenüber Noxen gerechnet werden. Dies bedeutet, dass eine Reproduzierbarkeit von Ergebnissen gefährdet ist, insbesondere bezüglich der Auswertungsparameter des embryonalen Wachstums. Dies stellt eine inakzeptable Situation für ein *In-vitro*-Modell dar, welches zu einem Standardroutineverfahren werden soll. Daher musste ein neues Kulturmedium für die WEC entwickelt und etabliert werden, welches in großen Chargen verfügbar ist und reproduzierbare Ergebnisse für alle Auswertungsparameter, sowohl die der

Differenzierung als auch die des Wachstums, erlaubt. Nur so sind größere *Intra-* und *Inter-*Laborstudien durchführbar.

Überprüft man die Auswertung der WEC in der ECVAM Validierungsstudie [5], so stellt man fest, dass zwar in der zugrunde liegenden Standardarbeitsanweisung (SOP als INVIT-TOX Protokoll Nr. 123) Wachstumsparameter enthalten sind, diese aber in dem Prädiktionsmodell (PM) für die Klassifizierung des embryotoxischen Potentials einer Testsubstanz nicht mehr berücksichtigt wurden [6]. Nach einer persönlichen Auskunft der betreuenden Statistikerin dieser Validierungsstudie, Frau Dr. Genschow (BfR, Berlin, 2004), war dies wegen mangelnder Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für diese Wachstumsparameter nicht möglich. In dieser dreijährigen WEC Validierungsstudie unter Beteiligung von vier WEC-Laboratorien wurden demnach durch die nicht zu vermeidende Chargenvariabilität bei der Verwendung von Rattenserum wichtige Wachstumsparameter der WEC [21] nicht ausgewertet.

Trotzdem hat die WEC im Rahmen dieser Validierungsstudie eine hohe und den anderen *In-vitro*-Embryotoxizitätstests (Embryonale Stammzelltest [EST] und Micromass Test [MM]) vergleichbare Prädiktivität erreicht [5]. Allen drei *In-vitro*-Embryotoxizitätstest war gemein, dass sie die stark embryotoxischen Substanzen sicher (100 %), aber die schwach und nicht embryotoxischen Substanzen mit einer geringeren Präzision (70-80 %) klassifizierten. Für die Toxikologie ist gerade die Identifizierung der schwach embryotoxischen Substanzen von großer Bedeutung, da diese den Großteil der embryotoxischen Substanzen ausmachen [122]; die Methodenoptimierung der WEC ist also dringend erforderlich. Diese kann durch die Etablierung eines neuen, standardisierbaren Kulturmediums erreicht werden, welches in großen Chargen verfügbar ist und somit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für die Wachstumsparameter gewährleistet. Dann könnten auch die Wachstumsparameter in das PM der WEC sinnvoll integriert werden und möglicherweise die Prädiktivität schwach und nicht embryotoxischer Substanzen gesteigert werden.

### **6.3 Untersuchung von käuflichen Seren auf ihre entwicklungsfördernde Potentiale für Rattenembryonen**

Da die Chargengrößen der Produktion von Rinderserum nach dem Protokoll von Klug et al. (1985) auf 500 bis 1 000 ml limitiert und die Verfügbarkeit der entsprechenden Spenderrinder in der Umgebung von Laboratorien, die eine sachgerechte Weiterverarbeitung zum Serum durchführen können, gering ist, sollten käufliche Rinderseren auf ihre Eignung für die WEC geprüft werden. Neben den beiden Studien von Klug et al. [72] und Coelho et al. [68] wurden nur wenige Untersuchungen über die Eignung von Rinderseren in der WEC publiziert. Im Jahr 1966 wurde ein kommerziell hergestelltes Rinderserum untersucht, welches eine abnorme Entwicklung der Embryonen bedingte [169]. Ein anderes Rinderserum, hergestellt 1983 nach dem Standardprotokoll für Rattenserum von New et al. [46], musste aufgrund starker

Retardierungen der Embryonen als ungeeignet eingestuft werden [87]. Im Jahr 1995 wurden dann für die Etablierung einer Co-Kultur der Embryonen mit Hepatozyten verschiedene Fötale Bovine Seren (FBS) auf ihre Eignung in einem Kulturmedium für die WEC bestehend aus 50 % Waymouth MB (definiertes Kulturmedium), 35 % Rattenserum und 15 % Rinderserum getestet [80]. Auslöser waren die dort zitierten unveröffentlichten Daten der Co-Autorin Oglesby, die berichtete, dass FBS chargenabhängig embryotoxisch sein konnte. Es wurden 12 verschiedene FBS zweier Serumproduzenten untersucht und nur drei FBS erlaubten eine normale Entwicklung der Embryonen.

Im letzten Jahrhundert zog die schnelle Entwicklung der Biotechnologie eine Zunahme der Serumproduktion nach sich, bei der schon 1995 weltweit mehr als 500 000 Liter pro Jahr industriell hergestellt wurden [170]. Höhere Qualitätsanforderungen der Abnehmer sowohl in Bezug auf das entwicklungsfördernde Potential für die Kulturen als auch in Bezug auf die Produktsicherheit führten zu einer stetigen Verbesserung der Serumproduktion [170;171].

Aufgrund der fehlenden systematischen Eignungsüberprüfung käuflicher Rinderseren wurden in dieser Studie die verschiedenen Arten des Rinderserums untersucht: fünf Chargen Adultes Bovines Serum (ABS) von drei Serumproduzenten, vier Chargen Donor Bovines Serum (DBS) von drei Serumproduzenten und zwölf Chargen Fötale Bovines Serum (FBS) von fünf Herstellern. Da kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Eignung eines Serums und seines Lieferanten (Biochrom, Greiner, HyClone, Sigma und PAA) feststellbar war, blieb die Zuordnung hierzu aus.

Alle drei Arten der käuflichen Rinderseren unterlagen einer großen Chargenvariabilität bezüglich ihres entwicklungsfördernden Potentials für Embryonen in Kultur (vgl. 5.3). Dabei ermöglichte keines der Testseren eine Entwicklung der Embryonen, die vergleichbar war mit der im Kontrollmedium basierend auf selbst hergestelltem Rinderserum nach dem Protokoll von Klug et al. [72].

Bezüglich des maximal möglichen embryonalen Wachstums ergaben sich Unterschiede bei den drei Serumtypen. Der Proteingehalt der Embryonen erreichte durch ABS maximal ein Viertel, durch DBS die Hälfte und durch FBS bis zu drei Viertel der Kontrollwerte (vgl. 5.3). Alle drei Serumtypen induzierten in allen untersuchten Chargen signifikant erhöhte Häufigkeiten von Dymorphogenesen bei den Embryonen. Die Art dieser variierte bei ABS und DBS. Im Gegensatz dazu wurde durch alle FBS primär eine Anomalie in Form eines offenen kranialen Neuroporus verursacht (vgl. 5.3.1.3). Eine Ursachenforschung dieses eindeutig chargenunabhängigen Befundes ist schwierig, da es sich bei Neuralrohrdefekten um multifaktorielle Ereignisse handelt [172]; deshalb wurde dies in dieser Studie nicht weiter verfolgt.

Nachdem kein geeignetes kommerzielles Rinderserum für die WEC identifiziert werden konnte, wurde kommerziell hergestelltes Rattenserum als Alternative zu dem selbst hergestellten Rattenserum getestet. Es wurden sechs Chargen von vier Herstellern geprüft (vgl. 5.3.2). Drei Chargen ermöglichten keine Entwicklung der Embryonen. Dagegen unterstützten

drei andere Rattenserumchargen die embryonale Entwicklung über den Status der Kontrolle hinaus. Die nicht geeigneten Chargen stammten von den Herstellern BioClot, PAA und Pan-Biotech. Nach Auskunft der Hersteller ist das Serum als Nebenprodukt bei Serientötungen aus anderen Gründen hergestellt worden. Das Blut der Ratten wurde nach der Dekapitation aufgefangen und erst nach unbestimmter Zeit zentrifugiert. Dieses Verfahren birgt die Gefahr der Kontamination mit Haaren, Gewebsresten und / oder –flüssigkeiten, oder Speiseröhreninhalt und stellt die Reinheit und Keimfreiheit des Serums stark in Frage. Es waren keine Angaben über die Herstellungsprotokolle erhältlich, aber es ist davon auszugehen, dass es nicht mit den besonderen Anforderungen des Herstellungsprotokolls für Rattenserum nach New et al. (1976) übereinstimmt [46]. Nicht jeder Punkt dieses Protokolls ist eine absolute Voraussetzung für die Eignung eines Rattenserums als Kulturmedium. Dies zeigten die anderen drei Chargen von Charles River (vgl. 5.3.2 - zusammengefasst dargestellt als kRaS-4), die die Entwicklung der Embryonen besser unterstützten als die Kontrollen. Laut dem Standardprotokoll des Herstellers wurde das Rattenblut durch Aortenpunktion in CO<sub>2</sub>-Narkose gewonnen und erst nach der Blutgerinnung zentrifugiert. Bisher galt die sofortige Zentrifugation als wichtiger Bestandteil des Standardherstellungsprotokolls von Rattenserum für die WEC [65]. Es sind keine Vergleichsdaten aus Untersuchungen von käuflichem Rattenserum als Kulturmedium der WEC publiziert worden. Nur ein Statement in einer Publikation von Oglesby (1995) besagt, dass kein kommerziell erhältliches Rattenserum für die WEC geeignet sei [80].

Zusammenfassend musste festgestellt werden, dass nach einer Untersuchung von 21 kommerziell erhältlichen Standard-Rinderseren (ABS, DBS und FBS), unabhängig von Hersteller oder Charge, keines gefunden wurde, welches einen Ersatz für das Standard-Kulturmedium (100 % Rattenserum) rechtfertigt. Es konnte aber gezeigt werden, dass es ein kommerziell erhältliches Rattenserum gibt, welches den Ansprüchen der WEC genügt. Es könnte aufgrund seiner professionellen Fertigung zu einer Standardisierung der Serumqualität beitragen. Zumindest im Vergleich zu den fünf selbst hergestellten Rattenserumchargen (Chargengröße 50-80 ml) (vgl. 5.1) war die Variabilität der drei Rattenserumchargen von Charles River (Chargengröße 300-350 ml) (vgl. 5.3.1.2) geringer. Sie manifestierte sich in der geringeren Streuung der Ergebnisse. Laut Herstellerangaben ist die tägliche Produktionskapazität auf ca. 350 ml begrenzt. Mit einem kommerziellen Rattenserum wäre nur eine geringe Verbesserung der Standardisierung erreichbar und im Wesentlichen durch die leichte Erhöhung der Chargenvolumina bedingt. Im Hinblick auf das Ziel der Reduktion der benötigten Versuchstiere für die WEC wäre kein Fortschritt erreicht worden.

#### 6.4 Untersuchung von Serummischungen auf ihre Eignung als Basis für das Kulturmedium der WEC

Um größere Kulturmediumchargen zu erreichen bzw. Tötungen von Spendertieren für die Herstellung des Standardkulturmediums der WEC (Rattenserum) zu reduzieren, wurde versucht das Rattenserum zu verdünnen. Hierzu wurden Salzlösungen, wie Hanks' balancierte Salzlösungen [173] und Tyrode [30] oder das Minimum Essential Medium (MEM) [174], verwendet. Dies war nur für relativ alte Embryonen, z.B. vom Gestationstag 12,5 [30], erfolgreich möglich, da sie weniger Ansprüche bezüglich des Nährstoffgehaltes an das Kulturmedium stellen [99]. So waren Verdünnungen bis 50 % möglich, die eine normale stabile Entwicklung der Embryonen gewährleisteten. Bei Verdünnungen des Rattenserums bis zu 75 % wurden die Ergebnisse variabel und schlecht reproduzierbar und bei solchen von über 75 % entstanden Retardierungen der Embryonen [174]. Für jüngere Embryonen (Gestationstag 9,5) war schon eine Verdünnung um 50 % mit COON's F12 definiertem Kulturmedium mit Retardierungen verbunden [175]. Die Ursache für diese Beobachtungen ist in dem abnehmenden Anspruch der Post-Implantations-Embryonen an das Kulturmedium in Bezug auf Nährstoffe und Wachstumsstimuli mit zunehmendem Alter zu sehen [99].

Für die Anwendung der WEC als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest ist die Abdeckung des relevanten Zeitfensters der Organogenese bei Start der Kultur, das heißt Gestationstag 9,5, relevant [176]. Um die Anwendung des Rinderserums aus eigener Herstellung zu ökonomisieren, wurden Verdünnungsversuche mit käuflichen Rinderseren durchgeführt. Aufgrund des höheren wachstumsfördernden Potentials im Vergleich zu ABS und DBS (vgl. 5.3.1) wurde FBS für die Mischung ausgewählt. Fünf verschiedene Mischungen mit einem Mischungsverhältnis 1:1 von selbst hergestelltes Rinderserum mit FBS wurden ausgetestet. Alle diese Serummischungen unterstützten die Entwicklung der Embryonen signifikant besser als die der Kontrolle, welche auf ungemischtem Rinderserum hergestellt nach dem Protokoll von Klug et al. (1985) basierte [72]. Das Entwicklungspotential aller fünf Mischungen war vergleichbar. Keine der Mischungen bedingte eine Häufung von Abnormitäten über das kulturbedingte Maß von ca. 3 % hinaus [177]. Da bekannt war, dass die Verdünnung eines Kulturmediums zu einem labilen Kultursystem führen kann [174], wurden mehrere Wiederholungsversuche durchgeführt, so dass Stichprobengrößen von bis zu 93 Embryonen für die Auswertung verfügbar waren (vgl. 5.4.1). Da Stichproben ab 20 Embryonen in der WEC als besonders aussagekräftig gelten [72], kann man bei den hier erreichten Stichprobengrößen von einer abgesicherten Reproduzierung der Aussagen sprechen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass eine Volumenverdopplung der Mediumchargen für die WEC durch die „Verdünnung“ mit FBS erreicht werden konnte. Hiermit werden Chargen von 1 000 bis 2 000 ml erreicht. Bemerkenswert ist hierbei, dass auch Rinderseren aus eigener Herstellung, die allein nur eine retardierte Entwicklung der Embryonen ermöglichten, in Kombination mit einem FBS bessere Ergebnisse aufwiesen als die Kontrollen.



Aus diesen Ergebnissen leitete sich die Frage ab, ob ein DBS, welches für sich auch nur eine retardierte embryonale Entwicklung unterstützte, in einer 1:1 Mischung mit FBS ein Kulturmedium darstellt, welches eine normale Entwicklung sichert. In der Untersuchung von 9 unterschiedlichen Mischungen aus käuflichem DBS plus FBS wurde aber festgestellt, dass diese Ansätze sehr variable Kulturergebnisse erbrachten, die alle eine zur Kontrolle signifikant geringere embryonale Entwicklung zur Folge hatten (vgl. 5.4.2).

Da bei 4 von 9 Ansätzen dieser 1:1 Mischung aus DBS und FBS eine signifikante Häufung von Abnormitäten der Embryonen auftraten, stellt diese Serum Mischung kein geeignetes Kulturmedium für die WEC dar.

### **6.5 Untersuchung der Effekte einer Supplementierung von nicht geeigneten, käuflichen Rinderseren und Serum Mischungen mit 10 % Rattenserum**

Bei verschiedenen Untersuchungen von heterologer Seren als Kulturmedium für Rattenembryonen wurde nachgewiesen, dass die Supplementierung der heterologen Seren mit Rattenserum eine normale Entwicklung der Embryonen ohne Abnormitäten ermöglichen kann [4]. Die Menge des benötigten Rattenserums im Kulturmedium der WEC scheint speziesabhängig zu sein. So wurde ein Bedarf von 10 % [86] bis 25 % [87] Rattenserum für Humanserum, 25 % für Hundeserum [87] und 25 % [88] bis 50 % [66] für die Verwendung von Kaninchenserum beschrieben. Ob es sich dabei aber um jeweils die optimalen Konzentrationen für die Supplementierung handelte, kann abschließend nur für das Humanserum und das Kaninchenserum vermutet werden; nur für diese Seren wurde die Konzentrationsabhängigkeit einer Supplementierung mit Rattenserum systematisch untersucht [66;160].

Um zu prüfen, ob die käuflichen Rinderseren DBS, FBS oder die Mischung aus DBS und FBS durch eine Supplementierung mit Rattenserum aufgewertet werden können, wurde dessen optimale Konzentration für Rinderserum bestimmt. Bei der Untersuchung des Konzentrationsbereichs von 0 % bis 100 % Rattenserum am Kulturmedium war ersichtlich, dass eine 5 %ige Supplementierung des Kulturmediums eine embryonale Entwicklung ohne Retardierung oder Abnormitäten ermöglichte. Eine weitere Erhöhung der Rattenserumkonzentration bis zu 20 % bewirkte keine weitere Steigerung der embryonalen Differenzierung und des Wachstums. Auch 100 % Rattenserum bewirkte im Vergleich zu den Ansätzen mit 5 bis 20 % keinen signifikanten Unterschied in der Differenzierung der Embryonen. Das Wachstum der Embryonen in 100 % Rattenserum war jedoch gesteigert.

Aus diesen Ergebnissen leitet sich die Frage ab, ob eine Wachstumsretardierung *in vitro* im Vergleich zur *In-vivo*-Situation für eine Anwendung der WEC als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest akzeptiert werden kann. Ein Wachstumsunterschied liegt bereits bei den in Rattenserum kultivierten Embryonen im Vergleich zur *In-vivo*-Situation vor, trotzdem konnten diverse Embryotoxizitätsstudien mit der WEC stets eine gute Vergleichbarkeit der *In-*

*vivo*- mit *In-vitro*-Befunden zeigen [107;121]. Hierbei wirkte sich somit offenbar das geringere Wachstum nicht negativ auf die Befundinterpretation aus. Im Kapitel 5.2 wurde aufgezeigt, dass Rinderserum, hergestellt nach dem Protokoll von Klug et al. [72], eine zufriedenstellende Entwicklung der Embryonen unterstützt. Diese Entwicklungsförderung war in Bezug auf die Differenzierung vergleichbar mit der des Rattenserums, jedoch war das Wachstum der Embryonen im Rinderserum geringer als dasjenige im Rattenserum. In dem Rinderserum gemäß Protokoll von Klug et al. [72] wurden ebenfalls bereits eine Reihe von embryotoxikologischen Untersuchungen durchgeführt. Bei diesen war eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse sowohl mit anderen WEC Studien unter der Verwendung von Rattenserum als Kulturmedium (z.B. für Aciclovir [74;75] oder Valproinsäure [73;178]) als auch im direkten *In-vivo*- / *In-vitro*-Vergleich (z.B. für Aciclovir [77]) gegeben. Auch wenn das im Rinderserum erzielte Wachstum im Vergleich zur *In-vivo*-Situation geringgradig schlechter ausfällt als das im Rattenserum erzielte Wachstum, schien dies die Aussagekraft der WEC als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest unter Verwendung eines Kulturmediums basierend auf Rinderserum nicht zu schwächen. Hieraus lässt sich ableiten, dass im Hinblick auf die Minimierung des Tierverbrauchs für die WEC ein Kompromiss bezüglich der Wachstumsraten der Embryonen für ein Kulturmedium basierend auf kommerziellen Standard-Rinderseren durchaus akzeptabel erscheint. Da man zwischen den drei Konzentrationen 5, 10 und 20 % der Supplementierung mit Rattenserum keinen Unterschied feststellen konnte, wurden 10 % als Optimum ausgewählt, um ein Kultursystem zu etablieren, welches möglichst robust gegenüber Chargenvariabilitäten des verwendeten Rattenserums und / oder Rinderserums ist.

Mit einer Supplementierung von 10 % Rattenserum wurde DBS (5 Mischungen), FBS (6 Mischungen) und 1:1 Mischungen aus FBS und DBS (8 Mischungen) ergänzt und auf ihr entwicklungsförderndes Potential für die Embryonen untersucht. Auf eine entsprechende Untersuchung des ABS wurde verzichtet, da das entwicklungsfördernde Potential der ABS allein so gering ausfiel, dass eine Aufwertung durch Supplementierung unwahrscheinlich erschien.

Die Effekte der Supplementierung mit 10 % Rattenserum bei den verschiedenen Ausgangseren fielen sehr unterschiedlich aus. Zwar induzierte sowohl supplementiertes DBS als auch FBS eine deutliche Steigerung der embryonalen Entwicklung, aber nur beim DBS wurde die bei der Untersuchung des nicht-supplementierten DBS beobachtete Häufung von Dysmorphogenesen aufgehoben (vgl. 5.3.1.2 und 5.4.3.1). Die durch FBS am häufigsten induzierte Anomalie, der offene kraniale Neuroporus, trat erneut unabhängig von der Charge auf (vgl. 5.3.1.3 und 5.4.3.2). Die 1:1 Mischung von DBS und FBS mit überdurchschnittlich entwicklungsförderndem Potential, die bereits ein deutlich gesteigertes entwicklungsförderndes Potential gegenüber den beiden Einzeleren besaß, wurde zusätzlich durch Supplementierung mit 10 % Rattenserum in ihrem wachstums- und differenzierungsförderndem Potential verbessert. In dieser Mischung kultivierte Embryonen wiesen keinen Unterschied mehr in der Entwicklung zu den Kontrollembryonen auf (vgl. 5.4.2 und 5.4.3.3). Eine Häufung von Dys-

morphogenesen, wie sie noch bei den Embryonen kultiviert in der 1:1 Mischung von DBS und FBS auftrat, wurde nun nicht mehr beobachtet.

Die für die WEC am besten geeigneten Seren oder deren Mischung wurden in der Regel empirisch ermittelt. Deshalb ist es schwer, eine kausale Argumentation für die Eignung als Kulturmedium der WEC zu formulieren. Entscheidend jedoch war, dass ein überdurchschnittliches, entwicklungsförderndes Potential von DBS und FBS in Kombination der Seren sich potenzierte und die Induktion von Anomalien der einzelnen Seren aufhob. FBS weist im Vergleich zum DBS viel höhere Konzentrationen an Wachstumsfaktoren auf [81]. So scheint es möglich, dass ein relativer Mangel an Wachstumsfaktoren im DBS durch die Mischung mit einem FBS ausgeglichen wird (vgl. 5.4.2). Ein Mangel an essentiellen Nährstoffen im FBS kann alleine nicht für die verfehlte Eignungsprüfung dieses Serumtyps verantwortlich sein, da eine Supplementierung mit 10 % Rattenserum zwar einen Entwicklungsschub induzierte, aber nicht alle Abnormitäten verhindern konnte (vgl. 5.3.1.3 und 5.4.3.2). Es ist daher nicht auszuschließen, dass FBS einen embryotoxischen Bestandteil enthält, der durch die Mischung mit 10 % Rattenserum nicht ausreichend verdünnt wird, wohl aber durch eine Verdünnung mit 50 % ABS. Hierbei sind auch im Vergleich zur Ratte untypisch hohe oder für die Spezies falsch proportionierte Konzentrationen an Wachstumsfaktoren als embryotoxische Bestandteile zu verstehen. Ein Überangebot an Wachstumsfaktoren kann die Homöostase der komplex über Wachstumsfaktoren regulierten physiologischen Entwicklung des Embryos stören.

Damit stellt diese supplementierte 1:1 Mischung ein Kulturmedium dar, welches eine Entwicklung der Rattenembryonen während der Organogenese vom Gestationstag 9,5 bis 11,5 in dem gleichen Maße ermöglicht, wie es das Rinderserum kann (gemäß Protokoll von Klug et al. [72]). Da in dieser Dissertationsarbeit auch gezeigt wurde, dass kommerziell erhältliches Rattenserum einsetzbar ist, welches eine normale Entwicklung der Embryonen in Kultur unterstützt, kann die Mischung aus DBS : FBS : Rattenserum (4,5 : 4,5 : 1) ausschließlich aus kommerziell verfügbaren Bestandteilen nach dieser Rezeptur zusammengestellt werden. Dieses Kulturmedium könnte somit aufgrund seines hohen Anteils von 90 % Rinderserum (45 % DBS und 45 % FBS) auch in großen Chargen hergestellt werden. Aufgrund des reduzierten Anteils an Rattenserum – anstelle von 100 % nur noch 10 % - wäre zwar kein vollständiger Verzicht auf Spendertiere erreicht, dennoch wäre damit eine deutliche Reduktion um 90 % der benötigten Versuchstiere für die Herstellung des Kulturmediums der WEC verbunden.

Damit stellt dieses Kulturmedium (Tab. 6) eine sinnvolle Alternative für das Standardkulturmedium der WEC dar, wie es in den Anforderungen an ein alternatives Kulturmedium zu Beginn dieser Studie formuliert wurde.

**Tabelle 6: Rezeptur des ersten Kulturmediums für die WEC bestehend aus kommerziell verfügbaren Bestandteilen**

<b>Bestandteile des Kulturmediums</b>	<b>Konzentration</b>
Fötales Bovines Serum	38,25 % (45 % des Serumanteils)
Donor Bovines Serum	38,25 % (45 % des Serumanteils)
Rattenserum	8,5 % (10 % des Serumanteils)
D-Glukose	1,57 mg/ml
L-Methionin	75 µg/ml
Hank´s balancierte Salzlösung	15 %

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

In dem neu etablierten Kulturmedium für die WEC sind 10 % Rattenserum enthalten. Um die Tötung von Spendertieren zukünftig zu vermeiden, wurde nach einem geeigneten Ersatz für das Rattenserum gesucht. Ersatz könnten Wachstumsfaktoren sein, die als Proteine an spezifisch aufgebauten Rezeptoren der Membran bestimmter Zelltypen gebunden werden, und die Replikation der DNA einleiten. Eine Vielzahl dieser stehen als rekombinante Produkte zur Verfügung.

Endogene und exogene Wachstumsfaktoren regulieren die embryonale Entwicklung. Werden die Wachstumsfaktoren vom Embryo selbst produziert, spricht man von endogenen Faktoren, stammen diese aber von dem Muttertier, so nennt man sie exogene Wachstumsfaktoren [179]. Für eine physiologische Entwicklung der Embryonen in der WEC muss das Kulturmedium die exogenen Wachstumsfaktoren bereitstellen. Werden heterologe Seren im Kulturmedium verwendet, könnte ein absoluter oder relativer Mangel eines Inhaltsstoffes für die Rattenembryonen auftreten und somit zu retardierter oder abnormer Entwicklung der Embryonen führen [4]. Wie in Abschnitt 4.4.1 gezeigt werden konnte, kann eine Supplementierung mit 10 % Rattenserum einen solchen Mangel des Rinderserums für die Entwicklung der Rattenembryonen ausgleichen. Zwar wurden schon verschiedene Fraktionen des Rattenserums identifiziert, in denen sich speziesspezifische embryotrophe Faktoren befinden, aber das gesamte Faktorenspektrum ist noch nicht vollständig charakterisiert [90;93;180]. Somit kann ein absoluter Mangel solcher Inhaltsstoffe in einem heterologen Serum heute noch nicht ausgeglichen werden, da die entsprechenden embryotropen Faktoren nicht bekannt sind. Ein relativer Mangel wird verursacht durch eine zu geringe Konzentrationen einer Substanz, wie z.B. Methionin [79], durch eine zu geringe Aufnahme einer Substanz, wie z.B. die rezeptorvermittelte Aufnahme von Transferrin [168] oder durch die zu geringe intrinsische Faktorenaktivität

aufgrund begrenzter Homologie der entsprechenden Rezeptorstrukturen zwischen Ratte und der Donor-Spezies [181]. Im Rahmen dieser Studie wurde versucht, durch die Erhöhung der Konzentrationen einzelner Wachstumsfaktoren im Kulturmedium einen solchen relativen Mangel nachzuweisen. Hierfür wurde die WEC in ihrem Protokoll modifiziert (vgl. 4.13), um die Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren zu erhöhen. Die Modifikationen ermöglichen das Kultivieren von jüngeren Embryonen (Gestationstag 9,0 anstatt 9,5) für einen längeren Zeitraum (72 Stunden anstatt 48).

Anhand von Mangelmedien, in Form von dialysiertem oder mehrfach genutztem Rattenserum, konnte nachgewiesen werden, dass die normale Entwicklung der Rattenembryonen auch von einer exogenen Zufuhr von IGF-1 und EGF abhängig ist [101;182]. Die Bedeutung des VEGF wurde bisher noch nicht direkt für den Embryo aufgeklärt, aber es gibt Hinweise, dass VEGF für den Aufbau der embryonalen Plazenta wichtig ist [175]. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde überprüft, ob durch die Zugabe von IGF-1, EGF oder VEGF in ein Kulturmedium basierend auf Rinderserum die entwicklungsfördernde Wirkung simuliert werden kann, die durch den Zusatz von 10 % Rattenserum erreicht wird. Die Wachstumsfaktorkonzentrationen im Blut der Muttertiere bleiben während der Trächtigkeit konstant. Dies bedeutet, dass die Aktivität dieser Faktoren während der verschiedenen Phasen der Embryogenese durch die embryonale Rezeptorexpression reguliert wird [183]. Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen der *In-vivo*- und *In-vitro*-Situation (Verwendung des Kulturmediums basierend auf Rinderserum) wurden in dieser Arbeit durch eine RT-PCR-Analyse der Embryonen und der Dottersäcke während der Organogenese untersucht.

IGF-1 gehört zu der Familie der Insulin-verwandten Peptide mit verschiedenen wachstums- und differenzierungsfördernden als auch den Stoffwechsel beeinflussenden Eigenschaften [184]. IGF-1 ist als Ligand und Rezeptor in den Embryonen der Ratten ab dem Gestationstag 5 detektierbar [185]. IGF-Rezeptoren sind in allen embryonalen Geweben nachweisbar, woraus ein breites Wirkspektrum resultiert.

Im Konzentrationsbereich von 10 bis 30 ng/ml förderte IGF-1 konzentrationsabhängig die embryonale Entwicklung, jedoch konnten die hohen Dysmorphogeneraten, die durch das Mangelmedium induziert werden, nicht gesenkt werden (vgl. 5.5.2.1). Diese effektiven Konzentrationen im Kulturmedium erscheinen im Vergleich zur physiologischen Serumkonzentration der Ratte (von  $327,6 \pm 92,8$  ng/ml) [186] niedrig. Das eingesetzte rekombinante IGF-1 war für eine höhere Wirksamkeit modifiziert. Es wies im Vergleich zur physiologischen Form eine 10-fach höhere wachstumsfördernde Aktivität auf (Angaben des Herstellers, Sigma, Kat. Nr. I-1227). Die eigenen Ergebnisse bestätigen die Notwendigkeit einer exogenen Zufuhr dieses Wachstumsfaktors während der Organogenese der Ratte [101]. Es konnte zuvor schon einmal gezeigt werden, dass in heterologen Seren eine suboptimale IGF-1 Konzentration vorgelegen hat. In einem Kulturmedium basierend auf Serum vom Meerschweinchen als Man-

gelmedium konnte durch konzentrationsabhängige Supplementierung die entwicklungsfördernde Wirkung von IGF-1 auf Rattenembryonen gezeigt werden [187].

Bei der RT-PCR Analyse von *In-vivo*- und *In-vitro*-Embryonen während der Organogenese wurde festgestellt, dass im Gegensatz zu den konstanten relativen mRNA-Mengen des IGF-I-Rezeptors der *In-vivo*-Embryonen eine Erhöhung der mRNA-Mengen bei den *In-vitro*-Embryonen am Gestationstag 12 auftrat (vgl. 5.5.3.1). Dies weist auf eine Störung des IGF-1-Rezeptor-Liganden-Systems *in vitro* hin. Eine mögliche Interpretation ist, dass der bestehende relative Mangel im heterologen Serum eine kompensatorische Steigerung der Rezeptorexpression des Embryos auslöst, die zu einer Sensitivitätssteigerung führt [188].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Supplementierung des Rinderserums mit IGF-1 nur zum Teil die entwicklungsfördernde Wirkung der 10 %igen Rattenserum-supplementierung simulieren kann, insbesondere bewirkte IGF-1-Zusatz keine Reduktion der Dysmorphogenesen.

EGF gehört wie IGF-1 zu den Wachstumsfaktoren, die den Zellzyklus beeinflussen [189]. Der EGF-Rezeptor ist ab dem Blastozysten-Stadium der Nagerembryonen nachweisbar [190]. EGF selbst wird von den Embryonen erst ab dem 19. Tag der Gestation synthetisiert [191;192].

In dem physiologischen Konzentrationsbereich zwischen 2 und 50 ng/ml konnte kein Effekt von EGF auf die Embryonalentwicklung *in vitro* festgestellt werden (vgl. 5.5.2.2). In einer anderen WEC-Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass die normale Entwicklung von Postimplantations-Embryonen von der exogenen Zufuhr des EGF abhängig ist. Ein Mangelmedium (Ultrazentrifugation des Rattenserums - Trennpunkt = 30 kDa) musste mit 10 ng/ml EGF supplementiert werden, um optimale Kulturergebnisse zu erzielen (zitiert in [183]). Diese Abhängigkeit des Embryos von EGF wurde in zwei weiteren WEC-Studien mit einem Mangelmedium bestätigt. Dieses Mangelmedium wurde durch wiederholte Verwendung eines Kulturmediums basierend auf Rattenserum hergestellt. Aus diesen Ergebnissen resultierte eine optimale Konzentration von 4 oder 8 ng/ml EGF [102;183]. Bei der eigenen RT-PCR-Analyse der Embryonen und deren Dottersäcke wurden vergleichbare relative mRNA-Mengen des EGF-Rezeptors während der Organogenese *in vivo und in vitro* festgestellt (vgl. 5.5.3.1).

Es ist davon auszugehen, dass kein Mangel an EGF vorlag. Diese Aussage ist dadurch gestützt, dass die Rezeptoren für EGF während der Organogenese in den Rattenembryonen exprimiert sind, die Sensitivität der Embryonen auf exogenes EGF zuvor nachgewiesen wurde [102;183], es aber keinen entwicklungsfördernden Effekt bei der Supplementierung des heterologen Rinderserums mit physiologischen EGF-Konzentrationen gab.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein Kulturmedium basierend nur auf Rinderserum keinen Mangel in Bezug auf EGF für die Entwicklung der Rattenembryonen dar-

stellt. Der Zusatz von EGF zum Rinderserum kann die Wirkung nicht simulieren, die eine Supplementierung mit 10 % Rattenserum hervorruft.

VEGF hat im Vergleich zu IGF-1 und EGF, die ein breites Wirkspektrum an vielen Zielzellen und –geweben aufweisen, nur eine sehr spezifische Wirkung auf Endothelzellen [193]. VEGF hat eine mitogene Wirkung auf das vaskuläre Endothel und gilt als ein Überlebensfaktor für diese Zellart [194]. Darüber hinaus ist VEGF ein vaskulärer Permeabilitätsfaktor [195]. Ab dem Gestationstag 8 ist VEGF als Ligand in den Embryonen der Ratte nachweisbar, hingegen sind die VEGF-Rezeptoren schon ab der Implantation im Trophoblasten expremiert [196]. Dabei ist die Expression des VEGF und seiner Rezeptoren nicht gleichmäßig in den Embryonen verteilt, sondern weist distinkte Regionen auf, wie z.B. die Blutinseln auf dem Dottersack oder das Herz im Embryo.

In dem physiologischen Konzentrationsbereich von 1 bis 4 ng/ml VEGF konnte in der WEC eine konzentrationsabhängige positive Wirkung auf die Embryonalentwicklung festgestellt werden. Hierbei wurden auch die hohen Dymorphogeneraten, induziert durch das Mangelmedium, reduziert (vgl. 5.5.2.3). Bei 4 ng/ml VEGF waren die Embryonen nicht mehr von den Embryonen zu unterscheiden, welche in Rinderserum supplementiert mit 10 % Rattenserum kultiviert waren. Diese festgestellte, entwicklungsfördernde Wirkung von VEGF weist auf die Notwendigkeit seiner exogenen Zufuhr während der Organogenese der Ratte hin. Unterstützt wird diese Interpretation von einer WEC-Studie, die als Mangelmedium eine Verdünnung von Rattenserum auf 50 % mit COON's F12 definiertem Kulturmedium verwendete. Hierbei erwies sich die Supplementierung von 10 ng/ml VEGF als entwicklungsfördernd auf die embryonale Plazenta [175]. Die Auswertung der Embryonen selbst ist nicht berichtet. Es wurde aber auf die Bedeutung der Plazenta als Nährstoffaustausch- und Stoffwechselorgan für die Embryonen hingewiesen und darauf, dass eine Besserung der placentaren Struktur eine Besserung der embryonalen Entwicklung bedingen könnte.

Die RT-PCR Analyse von *In-vivo*- und *In-vitro*-Embryonen während der Organogenese fokussierte sich auf den VEGF-Rezeptor Flk-1, da er als der wichtigste Rezeptor für die Signalvermittlung von VEGF gilt [197]. Die Analyse ergab, dass die relativen mRNA-Mengen des VEGF-Rezeptors in den *In-vivo*-Embryonen und den entsprechenden Dottersäcken konstant waren. Im Gegensatz dazu stiegen die mRNA-Mengen des VEGF-Rezeptors bei den *In-vitro*-Embryonen (aber nicht den entsprechenden Dottersack) bis zum Gestationstag 12 stetig an (vgl. 5.5.3.1). Dies weist auf eine Störung des VEGF-Rezeptor-Liganden-Systems *in vitro* im Vergleich zur *In-vivo*-Situation hin. Da die Expression im Dottersack mit der Implantation beginnt, hat sie sich am Gestationstag 10 schon auf hohem Niveau eingependelt [196]. Mögliche Retardierungen in Form einer verzögerten Expression könnten dann in der semi-quantitativen RT-PCR-Analyse nicht erkannt werden. Die physiologische Expression des VEGF-Rezeptors im Embryo selbst tritt aber erst am Gestationstag 8 auf und nimmt über die

folgenden Tage zu [196]. Der Anstieg der relativen mRNA-Mengen des VEGF-Rezeptors zwischen Gestationstag 11 und 12 könnte Ausdruck einer verzögerten Entwicklung des Embryos in einem Kulturmedium basierend auf Rinderserum sein.

Im Vergleich zu den anderen beiden Wachstumsfaktoren IGF-1 und EGF, wies VEGF den größten entwicklungsfördernden Effekt auf. Dies deutet auf eine starke Abhängigkeit des Embryos von der exogenen Zufuhr dieses Wachstumsfaktors. Um zu prüfen, ob in den Embryonen, kultiviert in dem Medium basierend auf Rinderserum, eine Retardierung der VEGF Expression vorliegt, wurde für diesen Wachstumsfaktor noch eine zusätzliche RT-PCR-Analyse für VEGF als Ligand (VEGF<sub>164</sub>) durchgeführt. Sowohl im Embryo als auch im Dottersack *in vivo* wurden von Gestationstag 10 bis 12 relativ hohe Mengen an mRNA des VEGF nachgewiesen. Während die mRNA-Mengen mit zunehmender Gestationsdauer im Embryo konstant blieben, nahmen diese im Dottersack stetig ab. Bei den Embryonen und Dottersäcken *in vitro* wurde am Gestationstag 11 eine relativ geringe mRNA-Menge im Embryo nachgewiesen, die sich am Gestationstag 12 vervielfacht hatte (vgl. 5.5.3.2). Da auch die physiologische Expression des VEGF-Liganden im Embryo selbst erst am Gestationstag 8 auftritt und an den folgenden Tagen stetig zunimmt [196], könnte der *in vitro* beobachtete Anstieg der relativen mRNA-Mengen des VEGF zwischen Gestationstag 11 und 12, Ausdruck einer verzögerten Entwicklung des Embryos in einem Kulturmedium basierend auf Rinderserum sein. Damit würde sich für Embryonen, die in einem Kulturmedium basierend auf Rinderserum kultiviert werden, ein relativ großer, endogener und exogener Mangel an VEGF ergeben, der die deutliche Entwicklungsinduktion durch VEGF Supplementierung *in vitro* erklären könnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein Kulturmedium basierend nur auf Rinderserum in Bezug auf die VEGF-Zufuhr für die Entwicklung der Rattenembryonen suboptimal ist. Der Zusatz von VEGF zum Rinderserum kann die Wirkung fast vollständig simulieren, die eine Supplementierung mit 10 % Rattenserum hervorruft. Dies trifft insbesondere zu, da eine Reduktion der Dymorphogenesen durch VEGF Supplementierung erzielt werden konnte.

Um die Sensitivität der Embryonen gegenüber Wachstumsfaktoren zu erhöhen, wurde in dieser Studie das Protokoll der WEC modifiziert. Es wurden Embryonen des Gestationstages 9,0 verwendet und eine Kulturzeit von 72 Stunden eingeplant. Mit diesem Protokoll konnte die Abhängigkeit der normalen Embryonalentwicklung von einer exogenen Zufuhr von IGF-1 und VEGF, jedoch nicht von EGF, nachgewiesen werden. Dabei konnte IGF-1 die positive Wirkung einer Supplementierung eines Mangelmediums (heterologes Rinderserum) mit 10 % Rattenserum teilweise simulieren. VEGF war in der Lage, die Wirkung vollständig zu simulieren. Das Standard-Protokoll der WEC als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest schreibt eine Kultur von Embryonen des Gestationstages 9,5 für 48 Stunden vor (INVITTOX Nr. 123). Es wurde



daher geprüft, ob die entwicklungsfördernde Wirkung von IGF-1 und VEGF auch in dem Standardprotokoll der WEC entsprechend in einem Kulturmedium basierend auf Rinderserum nachgewiesen werden könnte. Die Effekte beider Wachstumsfaktoren waren nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte für das Standardprotokoll kein Ersatz für den Rattenserumanteil (10 % Rattenserum) in dem neu entwickelten Kulturmedium (vgl. 6.5) gefunden werden.

### **6.7 Untersuchung der Variationsmöglichkeiten des laborinternen Herstellungsprotokolls von Rinderserum für die WEC**

Aufgrund des grundsätzlichen Zieles dieser Studie, die Anzahl der benötigten Versuchstiere zu reduzieren, wurde neben der Suche nach einer Alternative zu den 10 % Rattenserum im Kulturmedium in Form von Wachstumsfaktoren eine weitere Strategie verfolgt. Es wurde versucht, die Produktion der industriellen Rinderseren dahingehend zu optimieren, dass diese Seren, wie das Rinderserum hergestellt nach dem Protokoll von Klug et al. [72], auch als Kulturmedium der WEC keine Supplementierung mit Rattenserum benötigen. Im Hinblick auf eine spätere industrielle Fertigung des Rinderserums im Großmaßstab sollte von einzelnen Herstellungsschritten des Protokolls von Klug et al. [72] abgewichen und dann die potentiellen negativen Auswirkungen auf das entwicklungsfördernde Potential des Serums untersucht werden. Es wurden folgenden Punkte des Protokolls variiert: 1. Zeitraum zwischen Blutabnahme bis zum Beginn der Serumgewinnung, 2. Hämolyse und 3. Kontaminationen mit Endotoxin.

Fast jedes Herstellungsprotokoll von Serum für die WEC legt großen Wert auf den sofortigen Beginn der Serumgewinnung, d.h. unmittelbar nach der Blutabnahme [4]. Für Rattenserum wurde gezeigt, dass eine zeitverzögerte Zentrifugation des Blutes von 0,5 bis 18 Stunden nach Blutgewinnung zu einer Häufung von Herzmissbildungen führte [65]. Diese Fehlbildungen waren zwar in einer weiteren vergleichenden Untersuchung (Serumgewinnung 0 bzw. 18 Stunden nach Blutabnahme) nicht reproduzierbar, doch wurde eine bessere Embryonalentwicklung in einem Serum, dessen Herstellung unmittelbar nach der Blutabnahme begann, erzielt [46]. Bis heute wird bei der Gewinnung von Rattenserum für die WEC an der sofortigen Zentrifugation des Blutes festgehalten, nicht zuletzt ist dieses Vorgehen auch im INVIT-TOX Protokoll Nr. 123 für die WEC vorgeschrieben.

Bei der Untersuchung von drei Rinderseren, deren Gewinnung 30, 90 oder 270 Minuten nach der Blutabnahme begann, konnten weder eine Entwicklungsretardierung noch Anomalien, wie z.B. Fehlbildungen des embryonalen Herzens, beobachtet werden (vgl. 5.6.1). Ob dies ein speziesabhängiger Effekt ist, kann man nicht abschließend beurteilen. Mit Hinweis auf das Protokoll der Rattenserumgewinnung [46;65] wurde das sofortige Zentrifugieren des Blutes für die Herstellung von heterologen Seren immer angewendet, z.B. für Humanserum

[29], für Kaninchenserum [88] oder auch für Rinderserum [3;68]. Die Notwendigkeit des sofortigen Zentrifugierens des Blutes für die Herstellung eines dieser heterologen Seren war bisher nicht Gegenstand einer Untersuchung.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei der Herstellung von Rattenserum wurde in dieser Studie festgestellt, dass - im Vergleich zur Kontrolle - die Embryonen signifikant höher differenziert waren, wenn sie in Seren kultiviert wurden, deren Gewinnung erst nach 90 bzw. 270 Stunden begonnen hatte (vgl. 5.6.1). Diese Beurteilung basierte primär auf einer intensiveren Blutfärbung, welche aufgrund der leichten Hämolyse nach verzögerter Serumgewinnung (Hämoglobinkonzentrationen: 30 min 28 mg/dl, 90 min 92 mg/dl und 270 min 200 mg/dl) aufgetreten ist. Daraus folgten höhere Morphologische Score-Werte bei dem Auswertungsparameter Blutbildung. Bei der Verwendung von ausschließlich heterologen Seren im Kulturmedium der WEC wurden die Embryonen im Vergleich zu denen, die in Rattenserum kultiviert waren, als anämisch beurteilt [3;86]. Bei der Anämie handelte es sich weniger um eine verminderte Anzahl der Erythrozyten als um einen verringerten Hämoglobingehalt, denn man kann die farblos wirkenden Erythrozyten in dem Blutgefäßsystem erkennen. Dies wurde bei Embryonen, kultiviert in 100 % Humanserum [167] oder in 100 % Rinderserum (persönliche Beobachtung), festgestellt. Der Hämoglobingehalt eines ganzen Embryos (ohne Dottersack), der in Humanserum kultiviert wurde, ist geringer als bei Embryonen, die in Rattenserum kultiviert wurden [167]. Durch eine Supplementierung des Humanserums mit 10 % Rattenserum konnte der Hb-Gehalt fast auf die Werte der Vergleichsembryonen gesteigert werden. Diese Werte entsprechen aber nur drei Viertel des Hb-Gehalts von *In-vivo*-Embryonen [167].

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei der Herstellung von Rattenserum [46;65] ist bei der Herstellung von Rinderserum kein Nachteil in einem verzögerten Zentrifugationszeitpunkt von bis zu 4,5 Stunden festzustellen. D.h. ein produktionsbedingter verzögerter Zentrifugationszeitpunkt bei der industriellen Herstellung von Rinderserum ist nicht der Grund für das festgestellte geringe entwicklungsfördernde Potential der käuflichen Rinderseren. Im Hinblick auf eine professionelle Herstellung eines Rinderserums für die WEC gab dies einen ausreichenden Freiraum für die Variation des Herstellungsprotokolls von Klug et al. [72].

Welche Bedeutung eine Hämolyse während des Herstellungsprozesses hat, wurde durch einen Vergleich der zuvor festgestellten Serumeignung mit der Hämoglobinkonzentration käuflicher Rinderseren überprüft (vgl. 5.3.1). Der Hämoglobingehalt variierte stark zwischen den Serumproben. In einer Auswertung von 25 Analysenzertifikaten von käuflichen Rinderseren war die kleinste Hämoglobinkonzentration 4,6 mg/dl und die höchste 105,5 mg/dl ( $\bar{x}$  20,6 mg/dl). Es konnte zwar kein klarer Zusammenhang zwischen Hb-Konzentration und Eignung der Seren abgeleitet werden, doch waren mehr hohe Hb-Konzentrationen bei den nicht-geeigneten Rinderseren zu finden. In einer Überprüfung von 12 FBS für die Co-Kultur (Hepatozyten mit Embryonen) wurde dem Kulturmedium 17 % FBS zugesetzt. Trotzdem konnte man deren Kompatibilität mit der ungestörten embryonalen Entwicklung in Bezug

setzen [80]. Wenn auch keine abschließende Beurteilung möglich war, fiel doch ebenfalls eine Häufung von niedrigen Hb-Konzentrationen bei den geeigneten FBS auf.

Davon ausgehend, dass die Hb-Konzentrationen der Seren hämolytisch bedingt sind, wurde Rinderserum hergestellt und in der WEC untersucht, bei dem eine mechanische Hämolyse (Schneiden des Blutes nach beginnender Gerinnung mit einer Schere) provoziert wurde. Die Hb-Konzentrationen dieser hämolytischen Seren lagen zwischen 393 und 534 mg/dl, die der entsprechenden Kontrollseren, hergestellt aus den gleichen Blutproben ohne mechanische Belastung, zwischen 28 und 107 mg/dl. Die Eignungsprüfung in der WEC ergab, dass die mechanische Hämolyse zu einer Aufwertung des Serums führte, die sich sowohl in einer besseren Differenzierung als auch in einem vermehrten Wachstum der Embryonen manifestierte (vgl. 5.5.4.3). Die physiologische Hämoglobinkonzentration im Rattenserum beträgt 43 mg/dl [198]. Ein Rattenserum, welches nach dem Protokoll gemäß New et al. [46] hergestellt wurde, wies aber einen relativ hohen Hb-Wert von 304 mg/dl auf. Dieses Resultat legt eine Hämolyse durch den Serumherstellungsprozess nahe. Durch die sofortige Zentrifugation des Blutes kommt es zu einer Fibrinvernetzung im Serum und nicht im zellulären Blutanteil. Um das so verfestigte (gelartige) Serum von den Blutzellen abtrennen zu können, sind mechanische Manipulationen an den Erythrozyten nicht vermeidbar und könnten das Austreten des Hämoglobins im Blut erklären.

Die Hämolyse des Rinderblutes schien keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung der Rattenembryonen zu haben, zumindest nicht, wenn es sich um eine mechanisch induzierte Hämolyse handelte. Eine Hämolyse tritt auch bei der Herstellung des Rattenserums auf, welches in der Vergangenheit das meist genutzte Kulturmedium für die WEC war [4]. Auch wenn kein negativer Effekt im Zusammenhang mit der Hämolyse beobachtet wurde, muss berücksichtigt werden, dass eine andere, nicht-mechanische Ursache - vermittelt über das Serum - durchaus eine negative Auswirkung auf die WEC haben könnte. Daher wird die Hb-Konzentration auch als Indikator für einen *lege artis* Umgang mit dem Blut bis zur Herstellung des Serums herangezogen ([www.hyclone.com/products/sera/aboutsera.htm](http://www.hyclone.com/products/sera/aboutsera.htm)).

Die Endotoxinkonzentration käuflicher Rinderseren wird im Allgemeinen ebenfalls als Indikator für hohe Serumqualität angesehen. In einer Überprüfung von 12 FBS für die Co-Kultur (Hepatozyten mit Embryonen) wurde beobachtet, dass zwei der drei geeigneten Chargen geringe Endotoxinkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,03 ng/ml hatten [80]. Endotoxinfreiheit bedeutete aber nicht immer unbeeinträchtigte embryonale Entwicklung. Die retrospektive Auswertung von 22 Analysezertifikaten käuflicher Rinderseren, die in der WEC untersucht wurden, ergab eine hohe Varianz des Endotoxingehaltes. Die Schwankungsbreite war unterhalb der Nachweisgrenze von 0,01 ng/ml bis maximal 31,4 ng/ml ( $\emptyset$  2,5 ng/ml, aber 10 von 22 Seren  $< 0,1$  ng/ml). Die Eignung der käuflichen Rinderseren als Kulturmedium war nicht eindeutig korreliert mit dem Endotoxingehalt der Charge. Es lag

aber eine Häufung der hohen Endotoxinkonzentrationen bei den nicht geeigneten Rinderseren vor. Um einen möglichen Zusammenhang zu eruieren, wurden die Effekte von Endotoxin in der WEC in dieser Arbeit untersucht.

Endotoxin ist eine Gruppe von hitzestabilen Lipopolysacchariden (LPS), die aus der Zellwand von gram-negativen Bakterien stammen und ein toxisches Potential besitzen. LPS wirkt primär indirekt toxisch über die Freisetzung von Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und Akut-Phasen-Proteinen [199]. Für LPS wurde auch eine embryotoxische Wirkung *in vivo* nachgewiesen [200].

Zwei Versuchsaufbauten dienten zur Untersuchung eines möglichen Serum-vermittelten Effektes des Endotoxins: ein Nachweis prüfte die direkte Wirkung, der andere die indirekte Wirkung. In der ersten Versuchsreihe wurde das LPS direkt im Kulturmedium gelöst, um eine mögliche direkte Wirkung von *Escherichia Coli*-Endotoxin auf den Embryo nachzustellen. Hierbei konnte weder im Konzentrationsbereich, der bei kommerziell erhältlichen Rinderseren vorkommt (1 bis 51 ng/ml), noch bei höheren Konzentrationen bis 10  $\mu$ g/ml ein signifikanter Effekt von LPS nachgewiesen werden (vgl. 5.5.4.2.1). Dieses Ergebnis wird gestützt durch eine *In-vitro*-Studie mit Prä-Implantations-Embryonen der Maus, bei der eine direkte embryotoxische Wirkung erst ab 50  $\mu$ g/ml nachgewiesen wurde [201]. Mit einer WEC-Untersuchung unter Verwendung von Post-Implantationsembryonen der Maus konnte in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 0,05 bis 0,5  $\mu$ g/ml LPS (*Salmonella typhimurium*) ebenfalls kein adverser Effekt nachgewiesen werden [202]. Im Gegensatz dazu wurde in einer entsprechenden *In-vivo*-Studie für LPS (*Salmonella typhimurium*) ein embryotoxischer Effekt in Form eines konzentrationsabhängigen Absterbens der Embryonen gezeigt [203]. In dieser Studie wurde die indirekte embryotoxische Wirkung von LPS durch die Korrelation zwischen dem maternalen TNF- $\alpha$  und dem Absterben der Embryonen aufgezeigt. Da die Embryonen die entsprechenden funktionsfähigen Effektorzellen für LPS (u.a. Makrophagen und Dendriten) noch nicht haben [204], kann in der WEC kein direkter embryotoxischer Effekt von LPS auftreten. In der zweiten Versuchsreihe sollte deshalb aufgezeigt werden, welche embryotoxische Wirkung LPS-kontaminiertes Blut als Ausgangsmaterial für das Serum haben könnte. Reaktive Effektorzellen, wie Makrophagen, würden im LPS-kontaminierten Vollblut noch Cytokine ausschütten können, die die Ursache für die *in vivo* beobachtete embryotoxische Wirkung von LPS sind. Diese Cytokine wären auch noch im Serum nach Zentrifugation vorhanden und könnten so eine adverse Wirkung auf die Embryonen in Kultur haben. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde das Vollblut vom Rind nach der Abnahme mit LPS (1 bis 500 ng/ml) oder dessen Lösungsmittel (Kontrolle) versetzt. Das Standardprotokoll zur Serumgewinnung gab eine Inkubationszeit des Vollblutes mit LPS über 30 min (Raumtemperatur) vor, bis anschließend der zelluläre Anteil des Blutes durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Bei diesem Teilversuch wurden konzentrationsabhängige (gemeint ist die Konzentra-

tion im Vollblut) Effekte nachgewiesen; die höchste getestete Konzentration, bei der kein adverser Effekt auftrat (NOAEC), war 50 ng/ml (vgl. 5.5.4.2.2).

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass eine Endotoxinkontamination des Vollblutes, aber nicht des Serums, die Verwendung einer Serumcharge in der WEC einschränkt. Der indirekte embryotoxische Effekt wird möglicherweise über die Freisetzung von embryotoxischen Cytokinen vermittelt.

## **6.8 Optimierung der industriellen Herstellung eines Rinderserums als Basis für ein Kulturmedium**

Das Herstellungsprotokoll für Rinderserum nach Klug et al. [72] erwies sich insoweit als flexibel (vgl. 6.7), dass der Weg zu einer schrittweisen Umsetzung des industriellen Herstellungsmaßstabs durchaus für möglich erschien. Jedoch mussten noch wichtige Einflussfaktoren auf dieses neue Produktionsverfahren systematisch untersucht werden, um die spätere Eignung der Rinderseren zu gewährleisten. Zu diesem Zweck war es erforderlich, Standardarbeitsanweisungen zu formulieren.

Im ersten Schritt wurde das Herstellungsprotokoll von Klug et al. [72] (vgl. 4) in zwei Punkten modifiziert:

1. Die Spendertiere mussten im letzten Drittel der Trächtigkeit sein.
2. Eine Unterbrechung im Herstellungsprotokoll musste produktionsbedingt eingeplant werden; nach allen Zentrifugationsschritten sollte das Rohserum bis zur Weiterverarbeitung bei der Biochrom AG, Berlin, bei -20 °C tiefgefroren werden.

Nach dieser SOP wurden vier Serumchargen (bis 500 ml) produziert. Alle vier Chargen stammten jeweils von einem Spendertier und hatten jeweils ein gutes entwicklungsförderndes Potential in der WEC gezeigt (vgl. 5.6.1). Das Herstellungsprotokoll erwies sich als robust gegenüber den oben erwähnten beiden Modifikationen und damit war die unabhängige Reproduzierbarkeit der Herstellung dokumentiert.

Im zweiten Schritt wurde die SOP an die Möglichkeiten eines Rohserumherstellers in Neuseeland adaptiert:

1. Die Abnahme des Vollblutes erfolgte direkt in Blutbeutel (à 1 Liter).
2. Die Zeitspanne bis zur Zentrifugation betrug bis zu 1 Stunde.
3. Die Zentrifugation erfolgte im Blutbeutel, d.h. die Zentrifugalkräfte konnten in der jeweiligen Flüssigkeitssäule erheblich variieren (in Abhängigkeit des Füllstandes, des Rotors und der Umdrehungszahl bis über 100 %).

Auf diese Weise wurden sechs Chargen von maximal 1500 ml eines Donor Pregnant Bovine Serum (DPBS) in Neuseeland hergestellt. Alle sechs Chargen, die jeweils von einem Spender tier stammten, wiesen ein hohes entwicklungsförderndes Potential in der WEC auf, das aber

geringer war als das der Kontrollen (vgl. 5.6.2.1). Fünf der sechs DPBS bedingten eine signifikante Häufung von Dysmorphogenesen.

Das entwicklungsfördernde Potential dieser 6 DPBS war das höchste aller bisher untersuchten DBS (vgl. 5.3.1.2) und damit vergleichbar mit einer Mischung aus DBS und FBS (vgl. 5.4.2). Der Zusatz von 10 % Rattenserum zu der zuletzt genannten Serum Mischung wertete das Kulturmedium soweit auf, dass es vergleichbar mit den Standardkulturmedien der WEC war (vgl. 5.4.3.3). Daher wurden auch die Effekte nach Supplementierung der DPBS mit 10 % Rattenserum untersucht. Im Gegensatz zur 10 %igen Supplementierung der Standardherstellungen von DBS mit Rattenserum konnte nun bei den DPBS eine Aufwertung zu einem geeigneten Kulturmedium erreicht werden, bei dem in 3 von 6 Chargen sogar höhere Differenzierungs- oder Wachstumsraten der Embryonen beobachtet wurden als in den Vergleichskontrollen (vgl. 5.4.3.2 und 5.6.2.2). Hiermit wurde deutlich, dass die oben beschriebenen DPBS-Chargen nicht mit den Standard-DBS vergleichbar waren. Sie bieten zwar nicht die Möglichkeit, den Rattenserumanteil einzusparen, aber durchaus die Chance, auf FBS zu verzichten. Aufgrund der herstellungsbedingten, hohen Chargenvariabilität der FBS ist dies ein Vorteil, insbesondere im Hinblick auf die Zielsetzung einer WEC Standardisierung.

Da kommerzielle Rinderseren Mischprodukte der Seren vieler Einzeltiere sind, die in den durchgeführten Testungen ausnahmslos für die WEC ungeeignet waren (vgl. Ergebnisse 3), sollte ausgeschlossen werden, dass das Mischen der individuellen DPBS zu Serumeigenschaften führt, die adverse Effekte bei den kultivierten Embryonen bedingen. Hierzu wurden die 6 DPBS zuerst gepoolt und dann mit oder ohne Supplementierung von 10 % Rattenserum in der WEC getestet. Es konnte kein Nachteil durch das Mischen festgestellt werden; vielmehr erwies sich ein solches Mischprodukt der DPBS als überlegenes Kulturmedium. Im Gegensatz zu den DPBS-Einzelproben wurde durch die Mischung derselben keine Dysmorphogenesen bei den kultivierten Embryonen induziert (vgl. 5.6.2.3). Auch das Mischprodukt der DPBS erreichte aber erst nach der Supplementierung mit 10 % Rattenserum ein entwicklungsförderndes Potential, welches größer war als das der Kontrolle. In einer unabhängigen Wiederholung dieses Experiments, ausgehend von der Produktion der DPBS in Neuseeland, konnten diese Beobachtungen reproduziert werden (vgl. 5.6.2.3).

Hiermit wurde ein zweites neues Protokoll für die Herstellung eines Kulturmediums etabliert. Dieses Kulturmedium für die WEC kann mit einem hohen Anteil von 90 % DPBS auch in großen Chargen hergestellt werden. Es hat, wie das erste, etablierte Protokoll leider noch den Nachteil, dass es 10 % Rattenserum enthält. Es bietet aber den Vorzug, dass FBS mit seiner hohen Chargenvariabilität nicht mehr eingesetzt werden muss.

Damit stellt dieses zweite Kulturmedium (Tab. 7) eine weitere und bessere Alternative dar. Es erfüllt alle Anforderungen an ein Kulturmedium der WEC vergleichend zu dem Kulturmedium basierend auf Rattenserum.

**Tabelle 7: Rezeptur des zweiten Kulturmediums für die WEC bestehend aus kommerziell verfügbaren Bestandteilen**

<b>Bestandteile des Kulturmediums</b>	<b>Konzentration</b>
Donor Pregnant Bovine Serum	76,5 % (90 % des Serumanteils)
Rattenserum	8,5 % (10 % des Serumanteils)
D-Glukose	1,57 mg/ml
L-Methionin	75 µg/ml
Hank's balancierte Salzlösung	15 %

Es war demnach gelungen, ein Kulturmedium basierend auf Rinderserum zu etablieren. Der Serum- und Kulturmedienhersteller Biochrom AG, Berlin, der an der Etablierung beteiligt war, erhielt die Protokolle zur Herstellung dieser neu etablierten Kulturmedien, um sie in sein Produktportfolio aufnehmen zu können. Damit ist eine weitreichende Verfügbarkeit und damit auch die zukünftige Nutzung dieser Alternativen zum Rattenserum sichergestellt. Es wurden vier Chargen dieser Kulturmedien für die WEC produziert, einmal nach der Rezeptur 1 (Tab. 6) und dreimal nach der Rezeptur 2 (Tab. 7). Der Rezeptur 2 wird der Vorzug gegeben, weil sie unabhängig von FBS ist und - im Gegensatz zur Rezeptur 1 - ein größeres Wachstum der Embryonen ermöglicht (vgl. 5.6.2.4).

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

Sobald ein Kulturmedium modifiziert oder ausgetauscht wird, könnte sich in einem *In-vitro*-Toxizitätstest die Empfindlichkeit der Zielstruktur gegenüber Expositionen verändern. Referenzsubstanzen könnten dazu dienen, Sensitivitätsänderungen im Kultursystem sichtbar zu machen. Die Ergebnisse der Referenzsubstanzen im neuen Kulturmedium werden mit historischen Laborkontrollen bzw. Literaturangaben verglichen. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit die Konzentrations-Effekt-Beziehungen für Penicillin G, 5-Fluorouracil und Valproinsäure in dem ersten, neu etablierten Kulturmedium basierend auf den drei Seren FBS, DBS und Rattenserum (Rezeptur 1) und für Valproinsäure, Ethanol und *all-trans* Retinsäure in dem zweiten, neu etablierten Kulturmedium, basierend auf DPBS und Rattenserum (Rezeptur 2) bestimmt.

### **6.9.1 Kulturmedium basierend auf FBS, DBS supplementiert mit 10 % Rattenserum**

Penicillin G wurde in dem ersten, neu etablierten Kulturmedium (FBS, DBS und Rattenserum) untersucht (vgl. 5.7.1). Dieses Antibiotikum ist als nicht embryotoxisch klassifiziert

[205]. Jede Substanz kann aber in einer genügend hohen Konzentration einen adversen Effekt auf den sich entwickelnden Embryo verursachen. Zur Abschätzung eines embryotoxischen Potentials einer Substanz ist es, entsprechend den Empfehlungen des INVITTOX Protokolls Nr. 123 der WEC bzw. der Validierungsstudie der WEC [6], ausreichend, Konzentrationen bis 1 000 µg/ml zu untersuchen. Für Penicillin G wurde daher nur diese Konzentration von 1 000 µg/ml untersucht. Dabei konnte kein adverser Effekt auf die exponierten Embryonen beobachtet werden, wie dies auch in zwei *Inter*-Laborstudien [5;36] und in einer Einzelstudie [124] der Fall war, welche Rattenserum als Kulturmedium verwendeten.

Des Weiteren wurde 5-Fluorouracil (5-FU) in der WEC geprüft. 5-FU ist eine stark embryotoxische Substanz. Dieses Zytostatikum ist in verschiedenen Spezies teratogen, wie zum Beispiel in Ratte [206], Maus [207], Hamster [208] und Affe [209]. In der eigenen Untersuchung konnte ein konzentrationsabhängiger adverser Effekt von 5-FU nachgewiesen werden. Die höchste getestete Konzentration, die keine Nebenwirkung auf die Embryonen hatte (NOAEC), war 0,11 µg/ml, und die Konzentration, die bei allen Embryonen einen Dysmorphogenese verursachte (IC<sub>Max</sub>), war 0,20 µg/ml (vgl. 5.7.1). Diese effektiven Konzentrationen liegen im Bereich der substanz-charakteristischen Konzentrationen in anderen WEC Studien unter Verwendung von Rattenserum als Kulturmedium. Im Rahmen der Validierungsstudien der WEC [7] wurden von vier beteiligten WEC Laboratorien folgende Konzentrationsbereiche für diese Endpunkte angegeben: NOAEC von 0,03 bis 0,12 µg/ml und IC<sub>Max</sub> von 0,05 bis 1 µg/ml. Eine weitere WEC Studie unter Verwendung von Rattenserum als Kulturmedium ergab eine NOAEC von 0,15 µg/ml und eine IC<sub>Max</sub> von 0,3 µg/ml [134]. Unter Berücksichtigung der biologischen Variabilität solcher Assays wurden diese Ergebnisse durch die effektiven Konzentrationen bestätigt. Im Gegensatz zur Validierungsstudie sind in dieser Studie auch die beobachteten morphologischen Effekte beschrieben. Die Effekte waren vergleichbar. So handelt es sich um signifikante generelle Wachstumsretardierungen und eine spezifische Manifestation an der Kopfanlage, des Neuralrohrs und der Haltung der Embryonen [134]. Darüber hinaus wurden in dieser Studie auch Veränderungen an den Augenanlagen in Form von einer Hypoplasie beschrieben, die auch im Rahmen dieser Dissertationsarbeit beobachtet wurden. Kuwagata et al. beurteilte diese Veränderung als Anomalie [134]. Aufgrund der fehlenden Dysproportionalität [177] der veränderten Augenanlage im Vergleich zum insgesamt retardierten Embryo wurde sie hier nicht als Anomalie klassifiziert. In entsprechenden *In-vivo*-Untersuchungen von 5-FU wurden vergleichbare Befunde zu denen in der WEC festgestellt. Allgemeine Wachstumsretardierungen und Anomalien am Kopf, in Form von kranio-fazialen Defekten, wie z.B. Hydrocephalie, sind beschrieben. Im Rahmen dieser WEC Studie wurden Anomalien an den Gliedmaßenanlagen beobachtet, die nicht unter Verwendung von Rattenserum im Kulturmedium festgestellt wurden. Dabei scheint es sich aber nicht um falsch positive Befunde, möglicherweise bedingt durch das neue Kulturmedi-



um, zu handeln. Denn Anomalien der Gliedmaßen werden auch durch 5-FU *in vivo* induziert. Es handelte sich dabei um Manifestationen in Form von Wachstumsretardierungen der Hintergliedmaßen bis hin zur Agenesie der lateralen Zehen [210].

Unter Verwendung des Kulturmediums basierend auf FBS, DBS und Rattenserum wurde als dritte Substanz Valproinsäure (VPA) untersucht. VPA ist ein Antiepileptikum. Dieses Medikament besitzt ein schwach embryotoxisches Potential für Mensch und Tier [211]. Die spezifischen Manifestationen seiner teratogenen Wirkung sind: 1. Neuralrohrdefekte (insbesondere Spina bifida) sowie Fehlbildungen 2. des Skeletts, 3. des Herzkreislaufsystems und 4. des Urogenitaltraktes [212]. In der eigenen Arbeit konnte ein konzentrationsabhängiger adverser Effekt von VPA nachgewiesen werden. Die Konzentrations-Effekt-Beziehung wurde durch folgende Schwellenkonzentrationen charakterisiert: NOAEC von 17 µg/ml, LOAEC von 50 µg/ml und IC<sub>Max</sub> von 150 µg/ml (vgl. 5.7.2). Diese Resultate lagen im Bereich der zu erwartenden, charakteristischen Konzentrationen, die aus publizierten WEC Studiendaten unter der Verwendung von Rattenserum als Kulturmedium hervorgehen. Im Rahmen der Validierungsstudie der WEC [7] wurden folgende Konzentrationsbereiche für die Endpunkte der Konzentrations-Effekt-Beziehungen angegeben: NOAEC von 20 bis 40 µg/ml und IC<sub>Max</sub> von 150 bis 200 µg/ml. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die WEC unter der Verwendung von Rinderserum als Kulturmedium dokumentiert: NOAEC von < 43 µg/ml und IC<sub>Max</sub> von 173 µg/ml [76]. In einer WEC Studie, die ein Kulturmedium basierend auf 25 % Humanserum, 25 % Rattenserum und 50 % Waymouth's Medium verwendete, lag die beschriebene Konzentrations-Wirkungs-Kurve wieder im vergleichbaren Konzentrationsbereich, wies aber einen steileren Verlauf mit den Konzentrationseckpunkten: NOAEC 58 µg/ml und IC<sub>Max</sub> 144 µg/ml auf [78]. Die gute Übereinstimmung der charakteristischen Konzentrationen muss jedoch relativiert werden, da hier ältere Embryonen verwendet wurden. Zwar wurden diese auch am Gestationstag 10 gewonnen, die Embryonen hatten aber bereits 6-10 Somiten anstatt 0-5 Somiten wie bei den bisher vorgestellten Studien. Dadurch ergibt sich eine geringere Empfindlichkeit der Embryonen gegenüber Toxinen [36]. Durch die Verwendung eines Kulturmediums mit nur 50 % Serumanteil im Vergleich mit einem Kulturmedium bestehend aus 100 % Serum werden die Embryonen empfindlicher gegenüber VPA [150]. Zwei Effekte die sich in diesem Fall gegeneinander auszugleichen scheinen und zu den ähnlichen Ergebnissen führen.

Unabhängig davon konnte festgestellt werden, dass - trotz so extremer Unterschiede im Kulturmedium - die spezifischen Effekte von VPA immer vergleichbar blieben, auch wenn nur 50 % Serum im Kulturmedium vorhanden waren [150]. Die in den verschiedenen WEC Studien festgestellten Abnormitäten entstanden durch die Störung der Neurulation, die sich meist in einem offenen, kranialen Neuroporus oder den gewellten Konturen des Neuralrohrs manifestierte. Zudem war eine Mikroenzephalie zu beobachten und weiterhin Anomalien an

der Herzanlage. In einem direkten Vergleich der Embryonen am Gestationstag 11,5 (kultiviert in Rinderserum) mit den *Ex-vivo*-Embryonen exponiert gegenüber VPA konnte gezeigt werden, dass das Abnormitätenmuster an den Embryonen *in vivo* und *in vitro* vergleichbar war [76].

### **6.9.2 Kulturmedium basierend auf DPBS supplementiert mit 10 % Rattenserum**

Unter Verwendung des zweiten, neu etablierten Kulturmediums basierend auf DPBS und Rattenserum wurde erneut VPA untersucht. Hierbei wurden die gleichen Konzentrationen eingesetzt wie zuvor (siehe 6.9.1). Es wurden die gleichen charakteristischen NOAEC und IC<sub>Max</sub>-Werte sowie Manifestationen der adversen Effekte beobachtet. Es gilt entsprechendes wie dargestellt unter 6.9.1.

Als zweites wurde *all-trans*-Retinsäure in der WEC unter Verwendung des zweiten etablierten Kulturmediums getestet. Derivate von Vitamin A sind essentiell für das Wachstum und die Differenzierung der Zellen während der Organogenese [213]. Verschiedene Retinoide finden Anwendung in der Therapie von dermatologischen Erkrankungen und Hyperplasien [214], jedoch besitzen die Retinoide neben ihrer pharmakodynamisch erwünschten Wirkung auch ein teratogenes Potential. Die spezifischen Manifestationen ihrer teratogenen Wirkung (stark embryotoxisch) sind: 1. kranio-faziale Malformationen (Holoprosenzephalie), 2. Malformationen des Skeletts, 3. Anomalien des zentralen Nervensystems und 4. Fehlbildungen am Ohr [215].

In dieser Arbeit konnte der konzentrationsabhängige, embryotoxische Effekt von *all-trans* Retinsäure in der WEC nachgewiesen werden. Die Konzentrations-Effekt-Beziehung wurde charakterisiert durch eine NOAEC von 20 ng/ml, eine LOAEC von 100 ng/ml und eine IC<sub>Max</sub> von 300 ng/ml (vgl. 5.7.3). Diese Resultate liegen im Bereich der entsprechenden charakteristischen Schwellenkonzentrationen, die in anderen WEC Studien unter der Verwendung von Rattenserum als Kulturmedium beobachtet wurden. Im Rahmen der Validierungsstudie der WEC [7] wurden folgende Konzentrationsbereiche ermittelt: NOAEC von 20 bis 100 ng/ml und IC<sub>Max</sub> von 250 bis 1250 ng/ml. Diese Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie aber nur teilweise bestätigt, obwohl ebenfalls Rattenserum verwendet wurde. Hierbei waren die NOAEC (5 ng/ml) und die IC<sub>Max</sub> (100 ng/ml) etwas niedriger als die ermittelten Konzentrationen aus der Validierungsstudie [152]. Methodische Abweichungen sind aus dieser Publikation nicht zu entnehmen. Aufgrund der relativ niedrigen Wachstums- und Differenzierungsraten der Kontrollembryonen könnte auf die Verwendung einer Rattenserumcharge mit geringem entwicklungsförderndem Potential geschlossen werden, welche für die dort beobachtete hohe Empfindlichkeit der Embryonen verantwortlich sein könnte. Verwendet man Rinderserum als Kulturmedium, dann ist die Empfindlichkeit vergleichbar, wie aus der Validierungsstudie

ersichtlich. Die darin determinierten Schwellenkonzentrationen waren NOAEC < 30 ng/ml und IC<sub>Max</sub> 1000 ng/ml [110].

Die teratogene Wirkung war in den verschiedenen WEC Studien stets vergleichbar. Die festgestellten Anomalien waren: 1. an den Kiemenbögen lokalisiert (dysproportional klein und von der Umgebung schlecht abgrenzbar), 2. im kaudalen Rumpfabschnitt zu finden (dysproportional klein und unregelmäßige Fehlbildung, Abknickungen der Körperachse) und 3. reflektierten eine Störung der Neurulation (dysproportional kleine Vorderhirnanlage oder gewellte Rückenlinie). Die betroffenen Organanlagen der Embryonen *in vitro* korrelierten mit den Manifestationen der Abnormitäten *in vivo*. *In vivo* ist zudem eine vierte typische teratogene Wirkung von *all-trans* Retinsäure an den Ohren zu beobachten. Diese Manifestation der Wirkung an der entsprechenden Organanlage konnte nicht immer *in vitro* am Gestationstag 11,5 gezeigt werden [110;152]. Denn einen entscheidenden Einfluss, ob eine Veränderung als Abnormität erkannt werden kann oder als generelle Retardierung interpretiert wird, ist im Studiendesign begründet, d.h. in welchen Teilschritten ein Konzentrationsfenster untersucht wird. Nur eine detaillierte Exposition im Konzentrationsbereich direkt oberhalb der NOAEC stellt sicher, dass alle spezifischen Anomalien erzeugt werden. Dies konnte in einer Vergleichstudie von *all-trans* Retinsäure und VPA mit der WEC belegt werden [78]. Damit war es möglich, die für beide Substanzen beobachtete Anomalie des offenen, kranialen Neuroporus zu differenzieren. *All-trans* Retinsäure induziert einen symmetrischen während VPA-Exposition einen deutlich asymmetrischen, offenen, kranialen Neuroporus hervorruft.

Als dritte Substanz wurde Ethanol unter Verwendung des zweiten, neu etablierten Kulturmediums basierend auf DPBS und Rattenserum in der WEC getestet. Es ist bekannt, dass Alkoholmissbrauch einer schwangeren Frau schwach embryotoxisch wirkt. Je nach Entwicklungsstadium des Embryos bzw. Fötus wirkt sich das embryotoxische Potential von Alkohol unterschiedlich aus. Das fetale Alkoholsyndrom umfasst folgende Manifestationen: 1. Wachstumsretardierung 2. Mikrozephalie bzw. Mikroenzephalie und 3. kranio-faziale Hypoplasie [211]. Da zur Manifestation dieser postnatalen Symptome eine hohe pränatale Alkoholexposition während der Schwangerschaft notwendig ist und kaum neurotoxische Effekte beachtet werden, spricht man heute auch von „Fetal Alcohol Spectrum Disorder“. Hierbei sind eine Vielzahl von Alkohol-induzierten, neurologischen Verhaltensstörungen ebenfalls berücksichtigt [216]. Tierversuche zeigten vergleichbare Effekte bei Ratten und Mäusen, jedoch ergaben sich darüber hinaus noch weitere Anomalien [217].

In der WEC konnte für Ethanol ebenfalls ein konzentrationsabhängiger, embryotoxischer Effekt gezeigt werden. Die Konzentrations-Effekt-Beziehung wurde charakterisiert durch eine NOAEC von 2 mg/ml, eine LOAEC von 3 mg/ml und eine IC<sub>Max</sub> von 6 mg/ml (vgl. 5.7.4). Diese Konzentrationen stimmen mit den Beobachtungen von WEC Studien unter der Verwendung von Rattenserum überein. In dem untersuchten Konzentrationsbereich von 0,3 bis

8 mg/ml Ethanol wurden embryotoxische Effekte in Form von Wachstumsretardierungen ab 3 mg/ml beschrieben [129;159;218]. In diesen Studien traten die Fehlbildungen erst ab den Konzentrationen auf, die bereits hochgradige Wachstumsretardierungen erzeugten. Diese Tatsache erschwert die Interpretation der Befunde. Es resultierte kein spezifisches Anomalien-spektrum, das Neuralrohr war jedoch am häufigsten betroffen. Andere Untersuchungen der embryotoxischen Wirkung von Ethanol mittels der WEC weisen zu viele methodische Variationen in Bezug auf die verwendete Tierspezies, Ausgangsstadien der Embryonen, Kulturzeit bzw. Art und Dauer der Exposition auf, so dass ein Vergleich schwierig ist [158;161;219-221].

Für die neurotoxische Wirkung von Ethanol wurde eine spezifische Untersuchung der Nervenstrukturen im Embryo etabliert [222]. Hierbei werden Nervenstrukturen mit einem immunhistochemischen Verfahren unter der Anwendung eines Neurofilament-spezifischen Antikörpers gefärbt. Alkohol zeigt spezifische Effekte auf die Nervenentwicklung [128], die sich von den Effekten anderer Toxine unterscheiden [222-224]. In diesen Studien wurde stets Rattenserum als Kulturmedium verwendet. Unter der Verwendung des neu etablierten Kulturmediums basierend auf DPBS und Rattenserum wurden kürzlich mit der oben beschriebenen Färbung die entwicklungshemmenden Effekte von Ethanol auf embryonale Nerven untersucht. Es konnten tatsächlich die spezifischen Alterationen der Nervenstrukturen in den kultivierten Embryonen reproduziert werden [225;226].

Abschließend kann festgestellt werden, dass bei Verwendung der beiden, neu etablierten Kulturmedien für die WEC die Embryonen sensitiv auf die Referenzsubstanzen reagierten. Sowohl die Konzentrations-Effekt-Beziehungen als auch die induzierten, substanzcharakteristischen Anomalien waren vergleichbar zu denen, die unter der Verwendung von Rinderserum oder Rattenserum in WEC Studien publiziert wurden.