

## 8 Zusammenfassung

### **Optimierung und Standardisierung der Kultur ganzer Rattenembryonen (WEC) als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest durch die Etablierung eines neuen Kulturmediums**

Internationale Richtlinien der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) empfehlen die Durchführung reproduktionstoxikologischer Untersuchungen anhand von Tierversuchen zur Feststellung von embryotoxischen Wirkungen von Chemikalien. Im Rahmen des REACH Programms (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) der Europäischen Union sollen in den nächsten Jahren 30 000 Altsubstanzen auf ihr toxikologisches Potential untersucht werden. Hierfür sollen primär Alternativmethoden eingesetzt werden, die für ihren Einsatz in diesem Zusammenhang nach den internationalen Richtlinien validiert und von den Zulassungsbehörden akzeptiert sind. Dem 3R-Konzept von Russel und Burch [1] folgend wurden seit Jahrzehnten Alternativmethoden etabliert, im Bereich der Reproduktionstoxikologie u.a. die Whole Embryo Culture (WEC).

Heute ist das Protokoll der WEC zur Klassifizierung des embryotoxischen Potentials von Chemikalien validiert. Die WEC muss aber zum Erreichen einer höheren Standardisierung noch weiterentwickelt werden, um behördlich akzeptiert zu werden. In der vorgeschriebenen Verwendung von 100 % Rattenserum (RaS) als Kulturmedium begründen sich zwei Nachteile für die Anwendung der WEC als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest. Zum einen müssen für die Gewinnung des RaS Spendertiere getötet werden und zum anderen gefährdet die Chargenvariabilität die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Aufgrund dessen konnten im Rahmen der Validierungsstudie der WEC nur wenige der vielen möglichen Auswertungsparameter der WEC genutzt werden. So wurden z.B. die empfindlichen und wichtigen Auswertungsparameter des Wachstums der Embryonen in der Auswertung nicht berücksichtigt. Es gab keine Alternative zum RaS, die einen höheren Grad der Standardisierung ermöglicht hätte. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Kulturmedium zu etablieren, das in diesen Kriterien dem RaS überlegen ist.

In einem direkten Vergleich der am meisten angewendeten Kulturmedien der WEC (Humanserum, Humanserum supplementiert mit 10 % RaS, RaS) und einem Rinderserum nach Klug et al. [72], erwiesen sich diese heterologen Seren in ihrem entwicklungsfördernden Potential als gleichwertig. Handelsübliche Rinderseren ermöglichten dieses Ergebnis nicht. Um diese Problematik systematisch und fundiert bearbeiten zu können, wurde ein Drittmittelprojekt im Verbund mit einem Hersteller von Zellkulturmedien und tierischen Seren beantragt. Im Rahmen dieses Projektes wurde das entwicklungsfördernde Potential von handelsüblichen Rinderseren (Fötales Bovines Serum [FBS], Donor Bovines Serum [DBS] und Adultem Bovinem Serum [ABS]) untersucht. Als ersten Teilerfolg konnte durch die Kombination von verschiedenen Rinderseren supplementiert mit 10 % Rattenserum ein entwicklungsförderndes

Potential vergleichbar mit dem des Rattenserums erzielt werden. Diese Kombination stellt das erste kommerziell verfügbare Kulturmedium für die WEC dar.

Durch die detaillierte Untersuchung möglicher Einflussgrößen der Serumherstellung konnte eine Umsetzung des Protokolls für ein Rinderserum nach Klug et al. [72] in den industriellen Fertigungsprozess erreicht werden. Es konnte ein neuer Subtyp des DBS in der industriellen Herstellung etabliert werden, das Donor Pregnant Bovine Serum (DPBS). Es zeichnet sich durch das höchste, in der vorliegenden Arbeit festgestellte entwicklungsfördernde Potential aller industriell gefertigter Rinderseren aus. Als zweiten Teilerfolg konnte festgestellt werden, dass durch eine Supplementierung des DPBS mit 10 % Rattenserum eine vergleichbare Entwicklung von Embryonen wie in dem Rattenserum erreicht werden konnte. Diese Kombination stellt das zweite kommerziell verfügbare Kulturmedium für die WEC dar.

Weiterhin wurde die Bedeutung der Wachstumsfaktoren (Insulin-like Growth Factor-1 [IGF-1], Epidermal Growth Faktor [EGF] und Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF]) als Alternativen für die Supplementierung von heterologen Rinderseren mit RaS untersucht. Mit RT-PCR Analysen der entsprechenden Rezeptoren konnten Unterschiede bei den Rezeptoren für IGF-1 und VEGF, aber nicht für EGF im Vergleich zwischen *In-vivo*- und *In-vitro*-Embryonen nachgewiesen werden. Eine gesteigerte Entwicklung der Embryonen in Rinderserum konnte durch Supplementierung mit IGF-1 und mehr noch durch die mit VEGF ermöglicht werden. Dies weist auf die Bedeutung dieser beiden Wachstumsfaktoren für den Effekt der Supplementierung von heterologem Serum mit 10 % Rattenserum hin.

Um eine Änderung in Sensitivität oder Sensibilität der Embryonen gegenüber Testsubstanzen durch den Einsatz der neuen Kulturmedien auszuschließen, wurden mit den neu etablierten Kulturmedien: 1. Serummischung aus ABS : FBS : RaS im Verhältnis 4,5 : 4,5 : 1 und 2. DPBS supplementiert mit 10 % RaS fünf Referenzsubstanzen untersucht und mit den Ergebnissen von anderen WEC Studien oder *In-vivo*-Studien verglichen. Sowohl die Konzentrations-Effekt-Beziehungen als auch die spezifisch auftretenden Anomalien induziert durch Penicillin G, Ethanol, Valproinsäure, *all-trans* Retinsäure und 5-Fluorouracil waren vergleichbar.

Die neu etablierten Kulturmedien der WEC ermöglichen eine Senkung des Tierverbrauchs für die Herstellung des Kulturmediums der WEC um 90 % und die Erhöhung der Chargen des Kulturmediums von 50 – 80 ml auf 20 000 – 50 000 ml. Um die Verfügbarkeit für jedes Labor zu gewährleisten, wurden diese Kulturmedien in das Produktportfolio der kooperierenden Firma (Biochrom AG, Berlin) aufgenommen. Das entwicklungsfördernde Potential der Kulturmedien konnte bereits durch ein deutsches pharmazeutisches Unternehmen und durch den Leiter der Validierungsstudie der WEC, Dr. Piersma, reproduziert werden.

Es wurde ein Kulturmedium für die WEC etabliert, welches die benötigte Standardisierung der WEC mit der entsprechenden Reproduzierbarkeit aller Auswertungsparameter ermöglicht, weltweit in großen Chargen verfügbar ist und gleichzeitig den Tierbedarf für die WEC deutlich reduziert.