

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b><i>In-vitro</i>-Testsysteme .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Kriterien eines <i>In-vitro</i> -Systems im Vergleich zu denen eines <i>In-vivo</i> -Systems für den Einsatz in der Toxikologie.....	3
2.1.2	Die „Whole-Embryo-Culture“ (WEC): Ein <i>In-vitro</i> -System in der Reproduktionstoxikologie.....	4
<b>2.2</b>	<b>Kulturmethode.....</b>	<b>5</b>
2.2.1	Statische Kultur .....	5
2.2.2	Zirkulierende Kultur.....	6
2.2.3	Rotierende Kultur.....	8
<b>2.3</b>	<b>Kulturverlängerung.....</b>	<b>10</b>
2.3.1	Methodische Ansätze zur Kulturverlängerung.....	11
<b>2.4</b>	<b>Begasungsverfahren.....</b>	<b>16</b>
2.4.1	Bedeutung des Sauerstoffs im Gasgemisch .....	16
2.4.2	Bereitstellung und Aufnahme des Sauerstoffs.....	17
<b>2.5</b>	<b>Im Kultursystem eingesetzte Pufferlösungen.....</b>	<b>20</b>
2.5.1	Regulation des pH-Wertes im Kultursystem.....	21
2.5.2	Regulation des pH-Wertes durch ein kontinuierliches Begasungsverfahren.....	23
2.5.3	Beurteilung der Entwicklung von Rattenembryonen <i>In vitro</i> im Vergleich zur <i>In-vivo</i> -Entwicklung.....	24
<b>2.6</b>	<b>Einsatz von Ethanol in der „Whole-Embryo-Culture“ .....</b>	<b>26</b>
2.6.1	Allgemeines .....	27
2.6.2	Abbau von Ethanol.....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>29</b>

---

<b>3.1</b>	<b>Tiere und Tierhaltung .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Inkubationssystem .....</b>	<b>29</b>
3.2.1	Rotator-System .....	29
3.2.2	Roller-System .....	30
<b>3.3</b>	<b>Begasungsanlage .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4</b>	<b>Kulturmedium .....</b>	<b>32</b>
3.4.1	Gewinnung des Rinderblutes .....	32
3.4.2	Gewinnung des Serums.....	33
3.4.3	Pufferlösung .....	34
<b>3.5</b>	<b>Präpariermedium.....</b>	<b>34</b>
<b>3.6</b>	<b>Zusammensetzung der Puffersubstanzen .....</b>	<b>35</b>
3.6.1	HBSS (Hank´s balancierte Salzlösung) .....	35
3.6.2	Tyrode-Lösung (Phosphat Pufferlösung) .....	35
3.6.3	Bufferall.....	36
3.6.4	HEPES .....	36
<b>3.7</b>	<b>Ethanol .....</b>	<b>37</b>
<b>3.8</b>	<b>Versuchsdurchführung .....</b>	<b>38</b>
3.8.1	Versuchsvorbereitung.....	38
3.8.2	Präparation der Embryonen .....	39
<b>3.9</b>	<b>Für die Kultur geeignete Embryonen .....</b>	<b>40</b>
<b>3.10</b>	<b>Methodische Voraussetzungen für die Kulturverlängerung .....</b>	<b>41</b>
<b>3.11</b>	<b>Versuchsauswertung .....</b>	<b>44</b>
3.11.1	Morphologisches Score-System .....	44
3.11.2	Fotografie.....	45
3.11.3	Proteinbestimmung .....	46
3.11.4	Histologie .....	47
3.11.5	Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse.....	47

<b>4</b>	<b>METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR OPTIMIERUNG DES PUFFERSYSTEMS IM GESAMTKULTURMEDIUM.....</b>	<b>49</b>
4.1	Untersuchungen zur Pufferkapazität einzelner Pufferlösungen (Titrationsversuch); Veränderung der Osmolarität durch Zugabe einer Pufferlösung .....	49
4.2	Auswirkungen unterschiedlicher Pufferlösungen auf die Entwicklung der kultivierten Embryonen.....	52
<b>5</b>	<b>METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ETABLIERUNG EINES KONTINUIERLICHEN BEGASUNGSVERFAHRENS (ROTATOR-SYSTEM) .....</b>	<b>57</b>
5.1	Einfluss einer kontinuierlichen Begasung auf die Entwicklung der Embryonen im Kulturzeitraum von Tag 9,5 - Tag 11,5 .....	57
5.1.1	Allgemeine Versuchsbedingungen im Rotator.....	57
5.1.2	Veränderung im zeitlichen Verlauf einzelner Gasparameter im Kultursystem bei Zusatz von Embryonen in den Rotator .....	58
5.1.3	Verlauf einzelner Gasparameter im Kultursystem bei unterschiedlichen Begasungsverfahren .....	62
5.1.4	Einfluss unterschiedlicher Begasungsschemata auf die Entwicklung der Embryonen.....	66
<b>6</b>	<b>METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR VERLÄNGERUNG DES KULTURZEITRAUMS VON 48 STUNDEN AUF 72 (96) STUNDEN.....</b>	<b>71</b>
6.1	Allgemeine Rahmenbedingungen für den gesamten Kulturzeitraum von 0 - 72 (96) Stunden im Rotator (Tag 9,5-Tag 12,5/13,5) .....	71
6.2	Präparation der Rattenembryonen (Tag 11,2) mit der Technik nach Cockroft.....	72
6.2.1	Die Eröffnung von Dottersack und Amnion nach 48 Stunden Kultur .....	73
6.2.2	Ist die Eröffnung der embryonalen Fruchthüllen eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Verlängerung der Kultur über 48 Stunden hinaus?.....	74
6.2.3	Histologische Auswertung der Embryonen, die über 72 Stunden kultiviert wurden (Tag 9,5-Tag 12,5).....	81

<b>6.3</b>	<b>Verlängerung der Kulturdauer auf 96 Stunden; Roller- und Rotator-Methode im Vergleich (Kulturzeitraum: Tag 9,5-Tag 13,5) .....</b>	<b>82</b>
6.3.1	Verlauf der Gasparameter im Kultursystem über einen Zeitraum von 96 Stunden; Rotator- und Roller-Methode im Vergleich .....	87
6.3.2	Histologische Auswertung der Embryonen, die über 96 Stunden kultiviert wurden (Tag 9,5-Tag 13,5). .....	90
<b>7</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN ZU DEN AUSWIRKUNGEN VON ETHANOL AUF 9,5 TAGE ALTE EMBRYONEN ÜBER EINEN KULTURZEITRAUM VON 48 BZW. 72 STUNDEN ....</b>	<b>93</b>
7.1	Einfluss von Ethanol auf 9,5 Tage alte Embryonen nach 48 Stunden Kultur .....	93
7.2	Auswirkungen von Ethanol auf 9,5 Tage alte Embryonen nach 72-stündiger Kulturdauer .....	97
<b>8</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>115</b>
<b>10</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>117</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>120</b>

Abschliessend:

- Danksagung
- Lebenslauf
- Selbstständigkeitserklärung