

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 *In-vitro*-Testsysteme

2.1.1 Kriterien eines *In-vitro*-Systems im Vergleich zu denen eines *In-vivo*-Systems für den Einsatz in der Toxikologie

Für die Beurteilung eines *In-vitro*-Systems müssen wirtschaftliche, ethische und wissenschaftliche Aspekte berücksichtigt werden. Unter wirtschaftlichen Aspekten sind *In-vitro*-Systeme den klassischen Tierversuchen deutlich überlegen. Sie sind in der Regel weniger kosten- und arbeitsintensiv, weil mitunter teure Untersuchungsmaterialien reduziert werden können und die Versuchstierhaltung weniger aufwändig ist.

Dennoch darf nicht vergessen werden, dass *In-vitro*-Systeme hinsichtlich ihrer Aussagekraft gegenüber Tierversuchen vor allem an Nicht-Primaten auch Defizite aufweisen. So können Ergebnisse *in vitro* nicht immer mit den Resultaten von Versuchen am ganzen Tier verglichen werden, weil sowohl pharmakokinetische wie auch interferierende maternale Faktoren (Kombinationseffekt, Metabolismus) nicht berücksichtigt werden können. Die *In-vitro*-Methode bietet aber auch große Vorteile. Denn bei sorgfältig standardisierten Methoden kann der direkte Effekt einer Testsubstanz, weil maternale Faktoren entfallen, zu einem genau definierten Zeitpunkt, in definierter Konzentration und über einen definierten Zeitraum untersucht werden. Aufgrund der kurzen Kulturdauer können Reparaturmechanismen temporär auftretende Schädigungen wahrscheinlich nicht verdecken, so dass die Fähigkeit, das embryotoxische Potenzial einer Substanz zu testen, ungleich größer ist als in einer *In-vivo*-Methode. Dies ist aber ein bedeutender Nachteil im Vergleich zu *In-vivo*-Untersuchungen, weil die Gefahr einer falsch positiven Einschätzung des embryotoxischen Potenzials einer Substanz (z.B. weil Reparaturmechanismen nicht wirken können) größer ist. Außerdem muss man sich der Gefahr von falsch negativen Einschätzungen durch *In-vitro*-Methoden bewusst sein, da Langzeiteffekte aufgrund der kurzen Kulturdauer nicht untersucht werden können.

Da die „Whole-Embryo-Culture“ Serum zu einem großen Anteil im Kulturmedium nutzt, kann die individuelle Zusammensetzung des Serums zu Variationen in der *In-vitro*-Entwicklung der Embryonen führen. Daraus können Probleme bei der Interpretation der Ergebnisse resultieren.

Es bleibt festzuhalten, dass die Einsatzmöglichkeiten von *In-vitro*-Modellen abhängig von ihren erreichbaren Endpunkten sind. Ein *In-vitro*-Modell muss in der Lage sein, *In-vivo*- Situationen nachzuvollziehen. Dabei ist der Grad der Komplexität eines *In-vitro*-Systems der entscheidende Parameter (Neubert, 1985). Je komplexer ein *In-vitro*-Modell ist, desto besser geeignet erscheint es für toxikologische Routineuntersuchungen. Das komplexeste System ist ein intakter Organismus.

2.1.2 Die „Whole-Embryo-Culture“ (WEC): Ein *In-vitro*-System in der Reproduktionstoxikologie

Die WEC ist ein sehr anspruchsvolles Testsystem hinsichtlich Durchführung und Auswertung (Webster, 1997) und erlaubt die Beobachtung des Wachstums und der Differenzierung von ganzen Embryonen in den sie umgebenden Fruchthüllen. Mit dieser Methode können sowohl Embryonen unterschiedlicher Säugetierspezies (z.B. Ratte, Maus, Hamster) als auch unterschiedliche Entwicklungsstadien der Prä- und Postimplantation kultiviert werden.

Mit der Evolution der lebend gebärenden Säugetiere (Plazentalia) erreichten die Organismen eine Entwicklungsstufe, die ihnen für die embryonale Entwicklung ein stabiles Milieu garantierte. Abiotische und biotische Faktoren, wie Temperatur, pH-Wert, Osmolarität, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt sowie eine komplexe Ionen- und Nährstoffzusammensetzung (bestehend aus Salzen, Kohlenhydraten, Fettsäuren, Aminosäuren, Polypeptiden, Eiweißen, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Vitaminen, Spurenelementen) werden zur optimalen Versorgung des Embryos vom mütterlichen Organismus bereitgestellt. Weitgehende Veränderungen des embryonalen, vorwiegend assimilatorischen Stoffwechsels, erfolgen nach Nidation, Implantation und der Plazentabildung. Im Kultursystem ist der Embryo nur durch das Entoderm und den Dottersack vom umgebenden Medium getrennt. Vor der Drehung des Embryos wird dieser durch das Entoderm, aus dem später Magen-Darm-Trakt, Leber, Pankreas, Lunge usw. entstehen, geschützt. Das Entoderm ist eine dicht geschlossene Zellschicht, deren einzelne Zellen ebenso wie die des entodermalen Dottersacks durch „tight-junctions“ verbunden sind. (Gupta, 1982)

Die „Whole-Embryo-Culture“ 9,5 Tage alter Embryonen erlaubt hierbei die Beobachtung von Rattenembryonen während einer bedeutenden Phase in der Entwicklung, dem Großteil der Organogenese. Die biologisch programmierte Entwicklung eines Embryos kann durch Beeinträchtigung des extrem kompliziert zusammengesetzten Milieus erheblich gestört werden. So können Agenzien oder Noxen in bestimmten embryonalen Phasen zu Embryopathien füh-

ren. Das „embryonale System“, als das ein „WEC-System“ verstanden werden kann, kann demnach als hochempfindliches Detektionssystem für Agenzien mit embryotoxischen Effekten eingesetzt werden (Embryotoxizitätstestung) (Piersma, 1996).

2.2 Kulturmethoden

In der Literatur werden mehrere von der Kulturtechnik her grundlegend verschiedene Verfahren für die Kultivierung von Embryonen beschrieben. Mit Hilfe dieser Methoden gelingt es, explantierte Ratten- oder Mäuseembryonen verschiedener Entwicklungsstadien über mehrere Tage in ihren Hüllen wachsen zu lassen.

2.2.1 Statische Kultur

Die so genannte Uhrglastechnik, die zunächst für die Anzucht embryonaler Gewebe genutzt wurde (Fell, 1929), ist die älteste beschriebene Technik und stellt den Ursprung der „Whole-Embryo-Culture“ dar. Der vom Dottersack umgebene Embryo wird in ein mit Kulturmedium gefülltes Uhrglas (Abb. 1) gegeben. Um dabei einen definierten Abstand zur Gasphase zu erreichen, wird der Embryo mit der Reichertschen Membran mittels eines Gazestreifens auf den Boden des Uhrglases angeheftet (New & Coppola, 1973). Das Uhrglas wird in eine mit feuchter Baumwolle ausgelegte Petrischale gestellt. Die Petrischale wird für 10 Minuten mit einem definierten Gasgemisch aus Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff begast und anschließend in einem Wärmeschrank inkubiert.

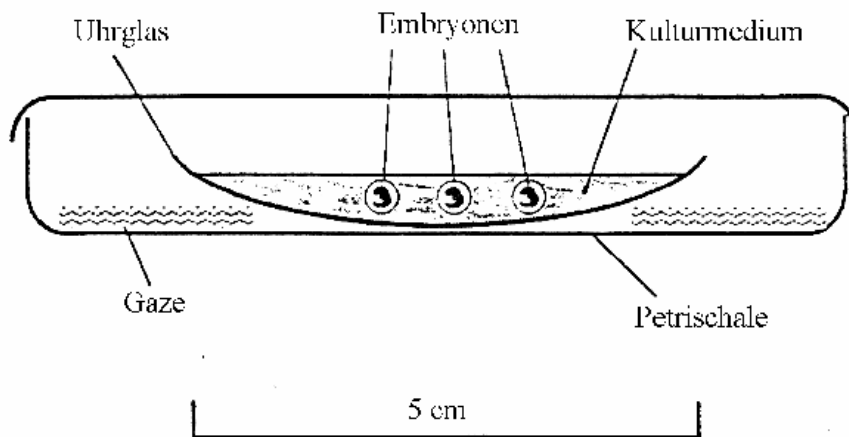


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Uhrglas-Apparatur (Cockroft, 1997)

In dieser statischen Kultur, in der Embryonen fixiert werden, häufen sich Stoffwechselprodukte (z.B. Laktat) in unmittelbarer Umgebung des Embryos an. Gleichzeitig kann es zu einer lokalen Verarmung des Mediums an Nährstoffen kommen. Dies führt zu einer erheblichen Beeinträchtigung des Wachstums und der Differenzierung des Embryos. Diese Erfahrungen führten zur Entwicklung eines Kultursystems mit „fließendem Kulturmedium“.

2.2.2 Zirkulierende Kultur

New (1967) arbeitete mit der Zirkulator-Methode. In dem geschlossenen System (Abb. 2) befinden sich die vom Dottersack umgebenen Embryonen auf einem Stück Seide haftend in einer Kammer. Diese wird kontinuierlich mit Kulturmedium durchströmt. Der Fluss des Mediums wird durch das Gasgemisch, bei dem der Druck und die Sauerstoffkonzentration regulierbar sind, aufrechterhalten. Den Embryonen wird ständig ein sauerstoffreiches, nährstoffhaltiges Medium zugeführt. Durch das ständig zirkulierende Medium werden so sämtliche Stoffwechselprodukte auf ein größeres Volumen verteilt, wodurch ein Vorteil gegenüber der statischen Kultur erzielt wurde.

Verglichen mit der Uhrglastechnik waren die Kulturerfolge, bezogen auf die Anzahl der Somiten, der Scheitel-Steiß-Länge und dem Proteingehalt, deutlich besser. Die Embryonen konnten über das 30-Somiten-Stadium hinaus kultiviert werden (New, 1967).

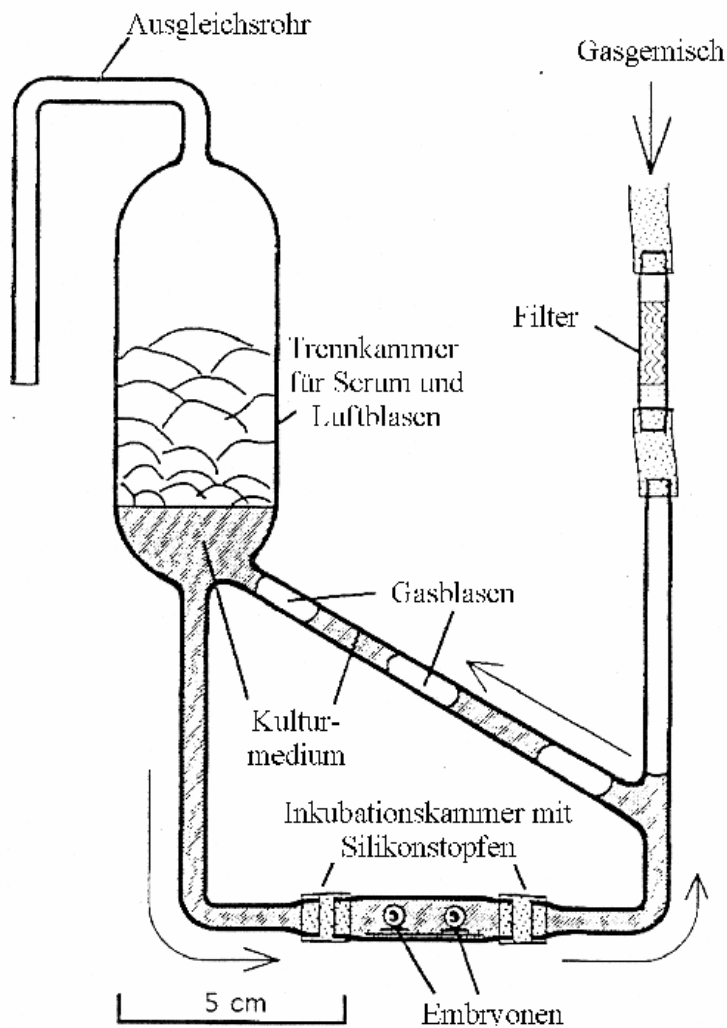


Abb. 2: Schematische Darstellung der Zirkulator-Technik (Cockroft, 1997)

Tamarin (1968) und Robkin (1974 a) entwickelten dieses System weiter. Sie führten das so genannte „Plasmom“ ein (keine Abbildung). Die aufwändige Technik des Plasmoms beseitigte die mechanische Beanspruchung, welcher der Embryo in der Zirkulator-Methode ausgesetzt war. Dort stellte das ungleichmäßig strömende und aufschäumende Medium einen Stressfaktor für den Embryo dar. Im „Plasmom“ strömt das Kulturmedium mittels einer Pumpe über Filter und weitere technische Einheiten am Embryo vorbei. Aus technischen und methodischen Gründen ist diese Technik für die Durchführung größerer Versuchsreihen ungeeignet. Es ist aber eine interessante Kulturmethode, die für spezielle Fragestellungen eingesetzt werden kann und hierbei viele Untersuchungsmöglichkeiten bietet. Diese Konstruktion lässt jederzeit, ohne den Embryo aus der Kultur nehmen zu müssen, gezielte Beobachtungen und Manipulationen zu. So konnte Robkin (1974 b) systematische Studien am Herzen von Rattenembryonen durchführen.

2.2.3 Rotierende Kultur

Mit dieser Kulturmethode wird heute weltweit gearbeitet. Das Prinzip besteht darin, dass entweder zylindrische Glasröhrchen oder Flaschen horizontal auf einer Roller-Apparatur (New, Coppola, 1973) oder in einer rotierenden Scheibe (Kochar, 1975; Deuchar, 1976) angebracht werden. Beide Systeme werden per Motor angetrieben und gewährleisten eine gleichmäßige Bewegung des Kulturmediums. Dadurch kommt es einerseits zum Austausch von Stoffwechselprodukten zwischen Embryo und Medium und andererseits von Gasbestandteilen zwischen Medium und Gasphase (Cockroft, 1997). Die rotierende Kulturmethode erlaubte erstmals die Kultivierung einer größeren Zahl von Embryonen in einem Experiment.

Bei der rotierenden Kultur unterscheidet man aufgrund unterschiedlicher Begasungsverfahren zwischen der so genannten Roller-Kultur (Deuchar, 1976; Kochar, 1975) und der Rotator-Kultur (New & Cockroft, 1978). Im Roller werden die Embryonen in verschlossenen Penicillinflaschen kultiviert. Die Begasung erfolgt in unterschiedlichen Zeitabständen. Im Rotator (Abb. 3) hingegen erfolgt die Begasung kontinuierlich.

New & Cockroft (1978) vergleichen die Entwicklung von 10,5 Tage alten Rattenembryonen über 24 Stunden in der Roller- und Rotatorkultur. „Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Entwicklung von Embryonen in der Roller- bzw. Rotatorkultur. Differenzen treten aber im Verlauf vom pO_2 , pCO_2 , pH-Wert und der Osmolarität im Kulturmedium in den verschiedenen Kulturtechniken auf“ (Tab. 1). Der Rotator ist in der Lage, den pH-Wert sowie die Sauerstoffkonzentration annähernd konstant zu halten, während die gleichen Parameter in der Roller-Kultur erwartungsgemäß größeren Schwankungen unterliegen.

Priscott (1984) kultivierte 11,5 und 12,5 Tage alte Embryonen über 24-48 Stunden in Rattenserum. Auch er verglich die Entwicklung der Embryonen in der Roller- und Rotatorkultur. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von New und Cockroft sind die Embryonen im Rotator besser entwickelt. Die Embryonen, die kontinuierlich begast werden, haben am Ende der Kultur deutlich bessere Proteinwerte und eine höhere Anzahl von Somiten.

Tarlatzis (1984) kultivierte Rattenembryonen (Tag 9,5) in Rattenserum über 96 Stunden (s. Tab. 2). Er bestätigte sowohl die Ergebnisse von New & Cockroft als auch von Priscott. Bei der Kultivierung von jüngeren Embryonen (Tag 9,5-11,5) erzielen sowohl Roller als auch Rotator hinsichtlich Wachstum und Differenzierung der Embryonen ähnlich gute Ergebnisse. Bei einer Verlängerung der Kulturdauer werden durch eine kontinuierliche Begasung bessere Ergebnisse erzielt.

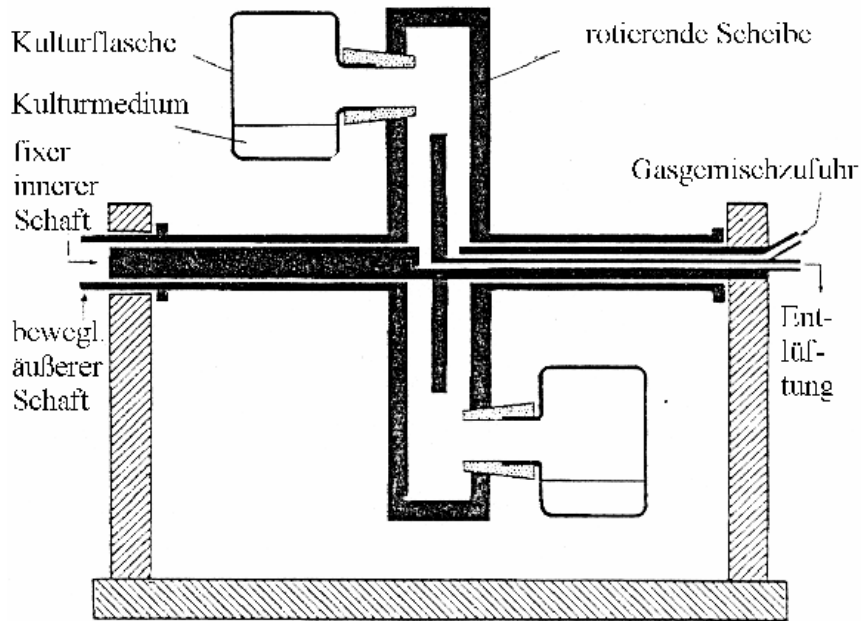


Abb.3: Schematischer Aufbau eines Rotators (New, Cockroft, 1978)

Tab. 1: Sauerstoff- und Kohlendioxidwerte, pH-Wert und Osmolarität im Rattenserum nach 24 Stunden Kultur in der Roller- und Rotatorkultur.

Versuchs- Ansatz	Kultur- system	pO ₂ [mmHg]	pCO ₂ [mmHg]	pH	Osmolarität [mosmol]
1	Rotator	134	37	7,19	294
2	Rotator	133	36	7,22	295
3	Roller	114	73	6,92	300
4	Roller	125	68	6,96	302

Alle Kulturflaschen haben die gleiche Größe und sind mit 5ml Serum gefüllt. Die Ausgangswerte ($t = 0h$) sind nicht angegeben (New, Cockroft, 1978). Es ist davon auszugehen, dass zum Zeitpunkt $t = 0$ in allen Versuchsansätzen die gleiche Ausgangssituation vorlag.

Es hat sich gezeigt, dass zur Beantwortung bestimmter Fragestellungen bei älteren Embryonen, wie zum Beispiel zur Beobachtung der Kammerentwicklung am Herzen zwischen Tag 9,5-12,5 (Nakagawa, 1997) oder bestimmter Aspekte der kraniofazialen Entwicklung von Tag 11,5-12,5 (Eto, 1985 b), die kontinuierliche Begasung durch den Rotator eine bessere Entwicklung der Embryonen ermöglicht.

2.3 Kulturverlängerung

Kulturverlängerung nach unserem Verständnis bedeutet den Erhalt des Wachstums 9,5 Tage alter Embryonen über 48 Stunden hinaus. Der Zeitraum Tag 9,5-11,5 beinhaltet einen großen Teil der Organogenese. Die Verlängerung des Kulturzeitraumes ist von Bedeutung, weil sie die Möglichkeiten der beeinfluss- und beobachtbaren Organentwicklungen vergrößert (Effekte auf morphologischer Ebene können besser erkannt werden). Ihre Manifestation könnte mit Hilfe späterer Endpunkte (s. morphologisches Score-System Kap.3.11.1) beobachtet werden.

Tab. 2 : Entwicklung von Rattenembryonen im Vergleich zwischen Roller und Rotator (Tarlatis, 1984)

Versuchsansatz	Kulturperiode [Stunden]	Scheitel-Steiß-Länge [mm]	Anzahl Somiten	Abnorme Embryonen [%]	Embryonen mit Herzschlag [%]
Roller	Initial	1,0	1,3	---	---
	nach 48 h	4,4	30,3	11,1	100
	nach 96 h	7,9	42,0	50,0	17 von abn.E.
Rotator	Initial	1,0	1,3	---	---
	nach 48 h	4,5	28,7	5	100
	nach 96 h	7,6	50,1	0	100

So könnte das Einsatzfeld dieser Alternativmethode durch eine Verlängerung der Kulturzeit erweitert werden.

Heutzutage sind zuverlässige Methoden zur Kultivierung von Rattenembryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien bekannt, wobei fast alle Arbeitsgruppen weltweit Rattenserum als Kulturmedium verwenden. Am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie in Berlin hingegen arbeitet man mit Rinderserum (s. Kap.3.4). Unabhängig davon werden die besten Entwicklungsergebnisse mit Embryonen erreicht, die im „Kopf-Falten-Stadium“ oder „Frühen-Somiten-Stadium“ kultiviert werden. „Mehr als 95% dieser Embryonen weisen nach einer 48-stündigen Kulturdauer eine Blutzirkulation auf. Ihre Differenzierung und ihr Wachstum sind ähnlich denen eines *In-vivo*-Embryos im gleichen Alter“ (New, 1976). Nach der Entwicklung der Extremitätenknospen (Tag 11,0-11,5) verlangsamt sich allerdings die Entwicklung des gesamten Embryos *in vitro*, wobei das Wachstum stärker beeinträchtigt ist als die

Differenzierung der Embryonen. New (1971) behauptet, dass es nicht möglich ist, das 50-55-Somitenstadium mit Hilfe der „Whole-Embryo-Culture“ zu überschreiten, selbst wenn Embryonen älterer Stadien (28 Somiten) in die Kultur eingesetzt werden (Abb. 4).

Aus Tabelle 3 wird ersichtlich, dass nur wenige Arbeiten über die Verlängerung des Kulturzeitraumes existieren. Die meisten Arbeiten über die Kultivierung von Rattenembryonen beschreiben kurze Zeiträume unterschiedlicher Entwicklungsstufen, wobei die Dauer der Kultur selten 48 Stunden überschreitet.

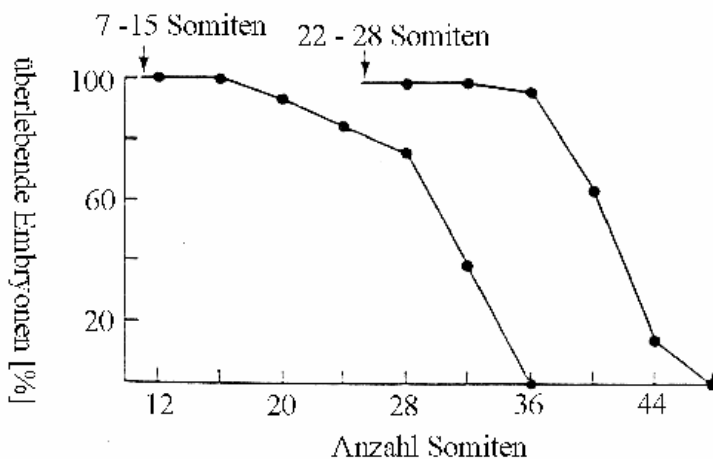


Abb.4: Überlebensfähigkeit von Embryonen in der Kultur in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (New, 1971)

2.3.1 Methodische Ansätze zur Kulturverlängerung

Embryonen im 1-4-Somitenstadium finden in niedrigem Sauerstoffmilieu optimale Wachstumsbedingungen vor (Chen, 1999). Die Energiebereitstellung findet unter anaeroben Bedingungen statt (anaerobe Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg). Mit zunehmendem embryonalem Wachstum steigt der Sauerstoffbedarf, die aerobe Glykolyse nimmt zu und die Energie wird über ein Elektronentransportsystem im Rahmen des Krebszyklus bereitgestellt (Shepard, 1969, 1970). Es muss demnach in einem optimierten Kultursystem versucht werden, diesen sich veränderten Ansprüchen des Embryos durch veränderte Kulturbedingungen gerecht zu werden, um das Wachstum und die Differenzierung der Embryonen zu verbessern (Def.: Entwicklung eines Embryos kann unterteilt werden in dessen Wachstum (Auswertungsparameter: Proteingehalt, Scheitel-Steiß-Länge) und Differenzierung (Auswertungsparameter: Anzahl der Somiten, Morphologischer Score)). *In vivo* werden die Embryo-

nen ab Gestationstag 10,5 durch den Dottersackkreislauf versorgt, am Tag 11,5 ist der Plazentakreislauf ausgebildet. Auf diesen Wegen wird der Großteil des Sauerstoff- und Nährstoffbedarfs der Embryonen gedeckt. In der „Whole-Embryo-Culture“ häufen sich mit zunehmender Kulturdauer embryotoxische Stoffwechselprodukte (Harnsäure, Kreatinin, Harnstoff (Sanyal, 1980)) im Medium an und es kommt zu einer Erschöpfung des Serums an Nährstoffen. Durch Erneuerung des Kulturmediums (Sanyal, 1980) wird versucht, diese Problematik zu lösen.

Im Folgenden werden beispielhaft einige Versuchsansätze beschrieben, die die Verlängerung der Kulturdauer beziehungsweise die Kultivierung älterer Embryonen in Rattenserum als Kulturmedium zum Ziel haben.

Tarlatzis (1984) kultivierte 9,5 Tage alte Rattenembryonen in Rattenserum über einen Zeitraum von 96 Stunden. Er verglich in seiner Arbeit die Auswirkung unterschiedlicher Begasungsverfahren auf die Entwicklung der Embryonen. Die Sauerstoffkonzentration wurde von anfänglich 5 Vol% auf 95 Vol% nach 96 Stunden erhöht. Nach der Hälfte der Kulturperiode wurden die Embryonen samt Fruchthüllen in frisches Medium transferiert.

Sanyal (1980) hingegen kultivierte 10,5 Tage alte Embryonen über 48 Stunden bis Tag 12,5 und stellte fest, dass durch einen Serumwechsel nach 24 Stunden Kulturdauer die Embryonen höhere Proteinwerte erreichen als Embryonen, die über 48 Stunden ohne Serumwechsel kultiviert werden. Ellington (1987) bestätigte die Ergebnisse von Sanyal. Sie untersuchte, abhängig vom Entwicklungsstadium, den Glukoseverbrauch bei 9,5 Tage alten Embryonen über einen Zeitraum von 48 Stunden in der Kultur. Dabei stellte sie fest, dass der Verbrauch an Glukose zwischen Tag 10,5 und 11,5 der Gestation am größten ist. „Die Glukosekonzentration im Kulturmedium nimmt progressiv während der Dauer der Kulturperiode (Tag 9,5-Tag 11,5) ab und stellt den limitierenden Wachstumsfaktor dar.“ Während der ersten 42 Stunden wird, so Ellington, der überwiegende Teil der Glukosemoleküle verbraucht, so dass ein Glukosedefizit entsteht. Messungen (Ellington, 1987) ergaben, dass die Glukosekonzentration nach ca. 42 Stunden von ca. 7 mmol/L Kulturmedium auf unter 2 mmol/L Kulturmedium abfällt. Gleichzeitig kommt es aufgrund des anaeroben Stoffwechsels zur Bildung von Laktatmolekülen. Für Ellington stellt die Abnahme der Serum-Glukosekonzentration über den Kulturzeitraum eine größere Beeinträchtigung für das Wachstum und die Entwicklung der Embryonen dar (geringere Scheitel-Steiß-Länge, schlechtere Proteinwerte) als die Anhäufung von Stoffwechselmetaboliten im Serum. Den Beweis für diese These tritt Ellington dadurch an, dass die beeinträchtigte Entwicklung der Embryonen sowohl durch einen Serumwechsel als auch durch eine Supplementierung des Serums mit der entsprechenden Glukosekon-

zentration nach 24 Stunden ausgeglichen werden kann. In unseren Untersuchungen zur Verlängerung der Kulturdauer über 48 Stunden hinaus wurde die erste Kulturphase nach 42 Stunden beendet (s.Kap.6).

Cockroft (1973) war der Erste, der Embryonen vom Tag 13 der Gestation mit Hilfe einer speziellen Methode erfolgreich kultivierte. Um die Verfügbarkeit des Sauerstoffs über Diffusion zu verbessern, öffnete er sowohl den Dottersack als auch das Amnion des explantierten Embryos (s. Abb. 5; Abb. 6). Bei dieser Technik ist es wichtig, keine großen Gefäße des Dottersacks zu verletzen, da der Embryo sonst ausbluten würde.

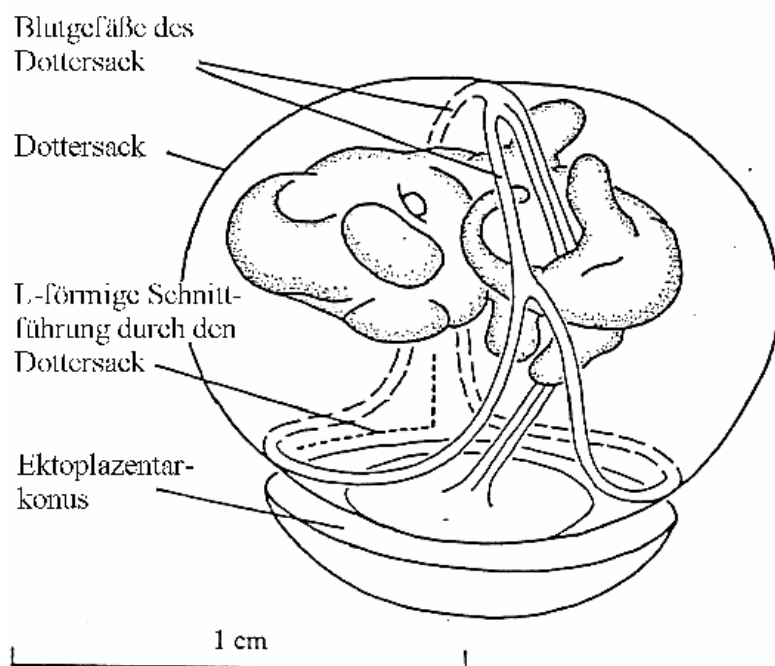


Abb.5: Schematische Darstellung eines Rattenembryos im Dottersack. Deutlich ist die L-förmige Schnittführung zur Eröffnung des Dottersacks zu erkennen. Das Amnion ist nicht dargestellt. (Cockroft, 1973)

Mit dieser Präparationstechnik wird ein direkter Kontakt des Embryos mit dem umgebenden Medium erreicht. Cockroft, der die Kulturflaschen mit 95% Sauerstoff begaste, stellte fest, dass Embryonen, bei denen der Dottersack nicht geöffnet wird, schlechtere Kulturergebnisse erzielen.

Autoren, die in den Jahren nach 1973 Embryonen dieser Entwicklungsstufe (Alter der Embryonen: mindestens Tag 11,5 der Gestation) kultivierten, bedienten sich dieser Technik. Im Vergleich dazu waren die Kulturerfolge von Embryonen, die ohne Eröffnung der Fruchthüllen kultiviert wurden, schlechter.

Eto (1985, b) untersuchte die Bedeutung des Dottersacks für die kraniofaziale Entwicklung der Ratte. Er kultivierte 11,5 Tage alte Rattenembryonen über 72 Stunden. In einer Untersuchungsgruppe wurden sowohl Dottersack als auch Amnion am Tag der Explantation (Tag 11,5) mit Hilfe der „Cockroftschen Technik“ eröffnet. Bei der anderen Gruppe wurden bei den Embryonen die Fruchthüllen erst nach 24 Stunden Kultur (Tag 12,5) geöffnet. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die Embryonen bei denen Dottersack und Amnion am Tag 11,5 eröffnet wurden, hinsichtlich der zu bewertenden Parameter (medialer und lateraler Nasenfortsatz) besser entwickelt waren als die Embryonen der Vergleichsgruppe.

Abb. 6A-C:

Darstellung der Präparation eines 11,5 Tage alten Embryos für die Kulturverlängerung (Cockroft, 1973)



Abb. 6.A: Embryo mit geschlossenen Fruchthüllen (Dottersack, Amnion)
Vergrößerung: 16-fach; — : 1mm

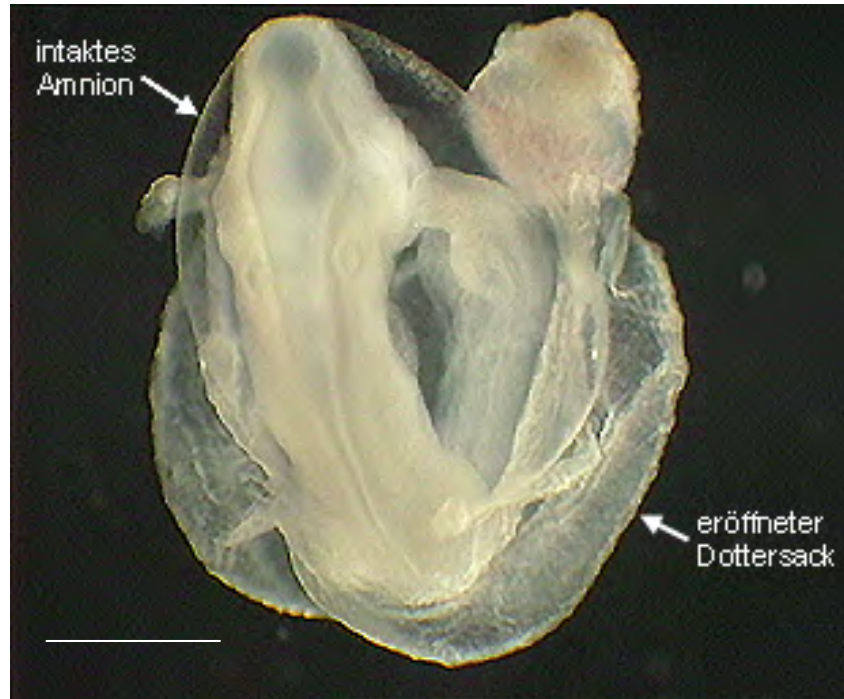


Abb 6.B: Embryo mit geöffnetem Dottersack; Amnion geschlossen
Vergrößerung: 16-fach; — : 1mm



Abb 6.C: Embryo mit geöffnetem Dottersack und offenem Amnion
Vergrößerung: 16-fach; — : 1mm

2.4 Begasungsverfahren

2.4.1 Bedeutung des Sauerstoffs im Gasgemisch

Die Gasmischung in der „Whole-Embryo-Culture“ beinhaltet die Komponenten Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff. Der Anteil von Kohlendioxid ist konstant 5 Vol%. Eine Veränderung der Sauerstoffkonzentration bedeutet demnach eine entsprechende Veränderung der Stickstoffkonzentration, wobei Stickstoff nur die Funktion eines Füllgases hat. Da aber Sauerstoff für die Entwicklung der Embryonen eine bedeutende Rolle spielt, ist der Volumenanteil dieses Gases in der Mischung von entscheidender Bedeutung. Shapiro (1994) stellte fest, dass eine adäquate Versorgung des Embryos mit Sauerstoff essenziell für die Proteinsynthese und die Herzaktionen des Embryos ist. Viele Arbeiten beschäftigten sich mit den Auswirkungen unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die Entwicklung der Embryonen.

Versuche zur Messung des Sauerstoffverbrauchs bei 13-14 Tage alten Rattenembryonen mit Hilfe der Warburg-Technik ergaben Q_{O_2} -Werte ($Q_{O_2} = \mu\text{l O}_2 \text{ pro Stunde} \times \text{mg Trockengewicht}$) von 7-10 $\mu\text{l O}_2$ in reiner Sauerstoffatmosphäre und 4 $\mu\text{l O}_2$ in Luftatmosphäre (Spielmann, 1970; Spielmann, 1971). Für 9,5 Tage alte Embryonen, die für 24-72 Stunden kultiviert werden, liegen zurzeit keine Erkenntnisse über den Q_{O_2} -Wert vor. Sicher ist jedoch, dass der Sauerstoffbedarf des Embryos mit zunehmendem Entwicklungsstand steigt (Baltz, 1991). So zeigen Embryonen, die mit konstantem Sauerstoffdruck kultiviert werden, eine zu ihrem Alter und ihrer Größe korrelierende Verschlechterung der Kulturergebnisse. Ein ungestörtes Wachstum und eine weitgehend normale Entwicklung wird durch eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks während der Kultur erreicht.

Tabelle 3 gibt einen Überblick der Gasgemisch-Zusammensetzung in verschiedenen methodischen Ansätzen.

Werden 9,5 Tage alte Rattenembryonen über 48 Stunden im Rotator mit einer kontinuierlichen Begasung (20 Vol% O_2 ; 5 Vol% CO_2 ; 75 Vol% N_2) kultiviert, zeigen sie einen fehlerhaften Schluss des Neuralrohres (New, 1976). Dieses Ergebnis konnte von New (1976) bestätigt werden. Miki (1988) beschreibt unter gleichen Versuchsbedingungen in einer licht- und elektronenmikroskopischen Studie in den Embryonen eine Veränderung des Phago-

lysosoms bei zu hoher (20-40 Vol%) und eine Schwellung der Mitochondrien bei zu geringer (<5 Vol%) Sauerstoffkonzentration.

Klug (1985) erzielte die besten Kulturergebnisse von 9,5 Tage alten Embryonen mit der Roller-Methode, bei einer initialen Begasung von 10 Vol% Sauerstoff. Ältere Stadien der Embryonen benötigten höhere Partialdrücke an Sauerstoff. New, Cockroft (1978); Sanyal (1980) und Ellington (1987) begasten 10,5 Tage alte Embryonen über weitere 24 Stunden (bis Tag 11,5) kontinuierlich mit 20 Vol% Sauerstoff. Klug (1985) erzielte bei der Kultivierung im Roller mit einer zweiten Begasung nach 36 Stunden (Tag 11,0) von 50 Vol% Sauerstoff die besten Ergebnisse.

Für die Verlängerung der „Whole-Embryo-Culture“ über 48 Stunden hinaus werden verschiedene Varianten der Sauerstoffbegasung diskutiert. Zum einen besteht die Möglichkeit, mit einer Erhöhung der Sauerstoffkonzentration oder einem Gasmischüberdruck (New, Coppola, 1970) den Bedarf des Embryos zu decken. Andererseits gelingt den Embryonen eine bessere Ausnutzung des Sauerstoffs mittels Diffusion (Cockroft, 1973) durch die Öffnung des Dottersacks.

Priscott (1984) erzielt bei der Kultivierung von 11,5 Tage alten Embryonen über 24 Stunden die besten Ergebnisse mit einer Begasung von 60 Vol% Sauerstoff bei gleichzeitiger Eröffnung des Dottersacks. Eto (1985 a) kultiviert 11,5 Tage alte Embryonen über einen Zeitraum von 72 Stunden kontinuierlich mit 95 Vol% Sauerstoff und offenem Dottersack, wobei derart hohe Sauerstoffkonzentrationen durchaus toxische Auswirkungen auf Zellstrukturen haben können (Miki, 1988).

Aus der Literatur wird deutlich, dass für den späteren Kulturzeitraum (Embryonalstadium älter als 11,5 Tage) keine einheitliche Meinung bezüglich der zugeführten Sauerstoffmengen existiert. Zudem ist es schwer, die Ergebnisse zu vergleichen, weil sich die Versuchsansätze häufig unterscheiden. Unbestritten aber ist, dass mit fortgeschrittenem Entwicklungsstadium das O₂-Angebot erhöht werden muss, und dass sowohl ein Überangebot als auch ein Defizit an Sauerstoff für den jeweiligen Entwicklungsstand von großer Bedeutung sind.

2.4.2 Bereitstellung und Aufnahme des Sauerstoffs

Dem viszeralen Dottersackepithel der Ratte werden zwei wichtige Funktionen zugeschrieben:

- a) das Epithel ist der primäre Ort der Hämatopoese
- b) es übernimmt eine wichtige Funktion in der Ernährung des Embryos.

In vivo haben sich bis zum Tag 11,5 der Embryonalentwicklung zwei miteinander verbundene Kreislaufsysteme gebildet: vom Embryo zum Dottersack und zurück (Dottersackkreislauf), und vom Embryo zur Plazenta und zurück (Allantoiskreislauf/Plazentakreislauf).

Der Dottersack zeigt am Tag 10,5 der Gestation einen Blutkreislauf (Gefäßnetz, das in Verbindung zum Embryo steht) und stellt damit ein wichtiges Organ für den Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid dar. Die Plazenta hingegen nimmt *in vivo* zwischen Tag 11,0-11,5 ihre Funktion auf (Gupta, 1982).

In vitro sind andere Voraussetzungen gegeben. Die Gefäße zur Plazenta sind zwar ausgebildet und auch zu erkennen, jedoch entwickelt sich die Plazenta unter *In-vitro*-Bedingungen nicht vollständig aus, so dass sie demzufolge auch nicht ihre Funktion ausüben kann.

Ein weiterer Unterschied ist, dass *In-vivo*-Embryonen und in Rattenserum kultivierte Embryonen am Tag 11,5 intensiv rot gefärbtes Blut besitzen, während die in Rinderserum kultivierten Embryonen diesen Farbstoff (Häm) nicht entwickeln. Bei Verwendung von Rinderserum für die Kultivierung von Embryonen ist in deren Gefäßsystem zwar eine Zirkulation von Blutkörperchenvorstufen zu erkennen, diese sind wegen mangelnder Hämoglobinbildung aber nahezu farblos. Da im Blutserum eine wesentlich geringere Konzentration an Hämoglobin (ca. 10 mg/100ml) vorliegt als im Vollblut (ca. 15 g/100ml) oder sogar im fetalen Blut (ca. 18 g/100ml), liegt der dort gemessene Anteil an Sauerstoff zum überwiegenden Teil in der gelösten Form vor. In der „Whole-Embryo-Culture“ wird das Defizit der mangelnden Hämoglobinbildung (und der damit verbundenen defizitären Sauerstoffbindung) im Rinderserum im Vergleich zu Rattenserum durch eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Gasgemisch ausgeglichen, um so den Partialdruck von Sauerstoff zu erhöhen. Diese Verhältnisse lassen darauf schließen, dass die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff fast ausschließlich über Diffusion (New, 1997) und nur zu einem geringen Anteil über die Dottersackgefäßstruktur (New, Coppola, Cockroft 1976) erfolgt.

Tab.3: Tabellarische Darstellung verschiedener in der „WEC“ benutzter Begasungsschemata (Literaturübersicht)

Autor	Jahr	Methode	Kulturzeitraum [Tage]:Sauerstoff					Präpar. der E.	Entwicklungsergebn. der E.
			9,5-10,5	10,5-11,5	11,5-12,5	12,5-13,5	13,5-14,5		
Cockroft	1973	fließ. Medi-				40%	40%	Eröffnung von Amnion u. YS	beste Ergebnisse: offener YS; 95% Sauerstoff
New, Cockroft	1978	Rotator,		20%				mit Fruchthüllen	kein Unterschied zwischen Rotator im Wachstum; Blutgase im Rotator besser
Sanyal	1979	Rotator*			5%			mit Fruchthüllen; nach 48 Stunden	20- und 40%ige Sauerstoffbegasung sind günstig für die Entwicklung der Embryonen
					10%			frisches Medium	
					20%				
					40%				
Sanyal	1980	Roller*		20%	40%			mit Fruchthüllen, nach 24 Stunden fr. Medium	bessere Entwicklung durch Transfer nach 24 Stunden
Herken	1981	Roller*		30%	95%			mit Fruchthüllen	nach 36 Stunden beginnende Retardierg.
Priscott	1984	Rotator,			60%	60%		Eröffnung von Amnion und YS	beste Ergebnisse: offener YS, 60% Sauerstoff, Rollermethode
Tarlatzis, Sanyal	1984	Rotator,	5%	20%	40%	95%		mit Fruchthüllen; nach 48 Stunden fr. Medium	Rotator ist dem Roller in der zweiten Kulturhälfte überlegen
Klug	1985	Roller**	10%	50%				mit Fruchthüllen	zufriedenstellendes Wachstum
Eto	1985a	Rotator,			95%	95%	95%	Eröffnung von Amnion u. YS nach 24 Std.	bessere Entwicklung durch Eröffnung von YS und Amnion, Rotator besser
Ellington	1987	Rotator*	5%	20%				mit Fruchthüllen	gute Entwickl. mit diesen Gasgemischen
				20%	40%				
Miki, Fujimoto	1988	Rotator*	5%	20%				mit Fruchthüllen	bestes Begasungsschema: 5% und 20%
			20%	20%					
			95%	95%					
Nakagawa	1997	Roller*	5%	20%				mit Fruchthüllen	gute Entwicklung der Embryonen

*: Medium: Rattenser., hitzeinaktiv., Zusatz v. AB
 **: Medium: Rindenser., hitzeinaktiv., kein Zusatz v. AB

2.5 Im Kultursystem eingesetzte Pufferlösungen

Der Einsatz von Pufferlösungen (s. Tab. 4) in der „Whole-Embryo-Culture“ kann sinnvoll sein. So besteht die Möglichkeit, Testsubstanzen (z.B. auch nicht-pH-neutrale-Substanzen) oder andere für die Kultur benötigte Bestandteile, wie zum Beispiel Glukose und Methionin, im Puffer zu lösen. Dies ist für die Verwendung von Rinderserum als Kulturmedium wichtig, weil dort die Konzentration dieser beiden Substanzen derjenigen im Rattenserum angeglichen werden muss. Zwangsläufig kommt es dadurch auch zu einer Verdünnung des Serums als Kulturmedium. Cockroft (1973) stellte fest, dass er mit einer Verdünnung des Rattense- rums auf 50% mit Tyrode-Lösung die besten Bedingungen für die Entwicklung von 12,5 Tage alten Embryonen im Vergleich zu 100% Serum erzielte. Priscott (1984) bestätigte tenden- ziell dieses Ergebnis. Er verwendete DMEM-Lösung als Pufferlösung und erzielte bei 12,5 Tage alten Embryonen mit einer Verdünnung des Serums auf 75% die besten Ergebnisse. Eto (1985 a, b) hingegen erzielte mit unverdünntem Serum bessere Ergebnisse. Er kultivierte 11,5 Tage alte Embryonen über 72 Stunden. Dabei verwies er auf die Ergebnisse von Cock- roft und Priscott. „Durch Zusatz einer Puffersubstanz erreicht man mitunter eine Verdünnung essenzieller Faktoren, die für die Entwicklung der Embryonen von Bedeutung sind.“

Zellen reagieren unterschiedlich auf Puffer. Der Einsatz von Puffern sowohl in der Roller- wie Rotatorkultur-Methode kann, trotz des Prädikates „zellkulturgetestet“ (Angaben der Herstel- ler, Sigma), zu toxischen Reaktionen der kultivierten Embryonen führen. Bisher liegen keine Arbeiten über die Auswirkungen verschiedener Puffer auf die Entwicklung von Rattenembryo- nen vor. So arbeiten viele Wissenschaftler mit unverdünntem Serum, da die Pufferkapazität des Serums alleine ausreichend ist (Pitt, 1999; Fujinaga, 1991; Miki, 1988).

Werden dennoch Puffersubstanzen dem Kulturmedium Serum zugesetzt, handelt es sich meist um Bikarbonatpuffer. Diese haben zwar im physiologischen pH-Bereich eine geringere Pufferkapazität als organische Puffer, sie sind jedoch preiswert, zellkulturgetestet und leicht in Lösung zu bringen.

Mögliche Nachteile bei der Verwendung dieser Puffer können sein:

- a) große pH-Abweichungen (Angaben der Hersteller, Sigma)
- b) Phosphate (Salze), die am Stoffwechsel beteiligt sind, fällen Kationen aus (Protolysegleichgewicht)
- c) die Karbonatpufferung ist vom Kohlendioxid abhängig (bei Abwesenheit von CO_2 verschiebt sich die Hendersson-Hasselbalchsche-Gleichung (Abb.7) nach links,

wodurch alles gelöste CO_2 und letztlich auch HCO_3^- aus dem Medium eliminiert wird; Pufferungswirkung lässt nach).

Bufferall, der bislang in der WEC nur von Mensah-Brown (1989) eingesetzt wurde, ist ein Zwitterionenpuffer. Dieser ist chemisch stabil, hat eine hohe Löslichkeit und stört nicht den Zellstoffwechsel, weil er nicht in die Zellen eindringen kann. Bufferall ist eine Kombination aus drei biologischen Puffern (EPPS, MOPS, HEPES) mit pK_a -Werten von 7,2, 7,5 und 8,0.

HEPES hingegen wurde bislang als Puffer in der „Whole-Embryo-Culture“ für Rattenembryonen weder getestet noch benutzt. HEPES ist im pH-Bereich von 7,2-7,6 ein potenter Puffer. Da keine vergleichenden Arbeiten mit Postimplantationsembryonen in Zusammenhang mit HEPES vorliegen, wird an dieser Stelle auf eine Arbeit von Mahadevan (1986) verwiesen, der allerdings mit Präimplantationsembryonen von Mäusen gearbeitet hat. Mahadevan vergleicht die Entwicklung von Blastozysten, die in unterschiedlich gepufferten Kulturmedien (Bikarbonat/Kohlendioxid-System, „Whittingham´s modified Tyrode(T6)“, HEPES) kultiviert wurden. „Ein HEPES-Medium, das mit Bikarbonat aber ohne Kohlendioxid arbeitet, erzielt ähnlich gute Entwicklungsergebnisse der Blastozysten wie die Kontrollen in dem Tyrode-Medium (T6 + Kohlendioxid)“.

In der Versuchsreihe zur Optimierung der Pufferkapazität wählten wir folgende Puffer aus: Tyrode-Lösung, HBSS (Hank´s balanced salt solution), HEPES und Bufferall. Dies sind in *In-vitro*-Versuchen die am häufigsten eingesetzten Puffer.

2.5.1 Regulation des pH-Wertes im Kultursystem

Der Abfall des pH-Wertes im Rinderserum aufgrund einer Überproduktion von Kohlendioxid und Säureäquivalenten (Beispiel: Milchsäurebildung, Oxidation schwefelhaltiger Aminosäuren wie Methionin) durch die wachsenden Embryonen macht die Bedeutung des pH-Wertes deutlich. „Seine Konstanzhaltung ist für die Struktur von Proteinen oder Zellbestandteilen lebensnotwendig“ (Baltz, 1993). Der pH-Wert ist ein Maß für die effektive H^+ -Ionenkonzentration. Er beträgt im fetalen Blut im Mittel ca. 7,3. Diese Tatsache kommt uns bei der Einstellung des pH-Wertes im Kulturmedium entgegen, weil wir in unserer *In-vitro*-Kultur mit Embryonen arbeiten, die einen geringeren pH-Wert tolerieren (s.o.).

Im fetalen Blut liegt eine erhöhte Hämoglobinkonzentration vor (180 g/Liter). Dies hat den Vorteil, dass Sauerstoff (trotz eines geringeren Sauerstoff-Partialdruckes) gut gebunden werden kann. Gleichzeitig bedeutet dies aber auch, dass Sauerstoff schlecht entkoppelt werden

kann. Dies wird in der Natur durch einen niedrigeren pH-Wert im fetalen Blut ausgeglichen, wodurch der Sauerstoff wieder leichter entkoppelt werden kann.

Tab.4: In der WEC verwendete Kulturmedien und Pufferungssysteme (Beispiele)

Autor	Kulturmedium	Mediumzusatz (Puffer)	Kultursystem*
Cockroft, 1973	Rattenserum in versch. Verdünnungsstufen	Tyrode-Phosphat- Puffer (25%, 75%)	geschlossen
Herken, 1981	Humanserum	Tyrode-Phosphat- Puffer (25%)	geschlossen
Klein, 1982	100% Humanserum, 100% Affenserum		geschlossen
Kao, 1981	100% Rattenserum		geschlossen
Sadler, 1982	Rattenserum	Tyrode-Phosphat- Puffer	geschlossen, offen
Priscott, 1984	Rattenserum in versch. Verdünnungsstufen	DMEM (25%, 50%, 75%)	geschlossen, offen
Klug, 1985	Rinderserum	Tyrode-Phosphat- Puffer (15%)	geschlossen
Eto, 1985 a	Rattenserum	Tyrode-Phosphat- Puffer	offen
Ellington, 1987	100% Rattenserum		geschlossen
Mensah-Brown, 1989	Rattenserum	Bufferall	geschlossen
Pitt, 1999	100% Kaninchense- rum		offen

*: Kultursystem bezieht sich auf das Begasungsverfahren; offen bedeutet in dem Fall ein kontinuierliches Begasungsverfahren, bei dem die Gasphase oberhalb des Kulturmediums ständig erneuert wird. Im geschlossenen System wird die Gasphase nur zu festgelegten Zeitpunkten erneuert, z.B. nach 36 Stunden (Klug, 1985).

Ungeachtet der von außen zugeführten Puffersubstanzen besitzt das Serum auch eigene Puffersysteme. Dazu gehören, neben dem Bikarbonat-Kohlendioxid-System, insbesondere die im Serum enthaltenen Proteine und Aminosäuren. Diese tragen hauptsächlich durch Bin-

dung von Protonen an ihre Aminogruppen zur Einstellung des pH-Wertes bei. Hämoglobin, welches physiologisch betrachtet wohl das wichtigste Protein zur Regulierung des pH-Wertes darstellt, spielt in der WEC eine eher unbedeutende Rolle, weil es in zu geringen Konzentrationen im Rinderserum vorhanden ist.

Bei den von uns getesteten Puffersubstanzen handelt es sich im Falle von HEPES und Bufferall um Säuren (s. Material und Methode). Puffer sind Lösungen einer entsprechend schwachen Säure und eines ihrer Salze in nahezu gleichem Molverhältnis.

Protonen werden von der konjugierten Base der entsprechenden Säure aufgenommen. Puffer besitzen eine optimale Wirkung, wenn der pH-Wert der Lösung mit ihrem pK-Wert identisch ist.

Bei dem Tyrode- bzw. HBSS-Puffern handelt es sich hingegen um Salzlösungen. Sie werden häufig als Puffersubstanzen verwendet. Das Prinzip der Pufferung ist mit dem oben beschriebenen identisch. Auch hier werden die freiwerdenden Wasserstoffionen von der konjugierten Base aufgenommen.

2.5.2 Regulation des pH-Wertes durch ein kontinuierliches Begasungsverfahren

Im „Whole-Embryo-Culture“-System wird der pH-Wert von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Ein wichtiges System ist der „Bikarbonat-Kohlensäure-Puffer“ (Abb.7). Er besteht aus der Kohlensäure, einer schwachen Säure ($pK_a=6,1$), und ihrem einfach geladenen Anion, dem Hydrogencarbonat. Die Kohlensäure liegt im Medium weitgehend in Form ihres Anhydrids, dem Kohlendioxid, vor.

$$\text{Hendersson-Hasselbalchsche Gleichung: } \text{pH} = \text{pK} (6,1) + \log [\text{HCO}_3^-] / [\text{CO}_2]$$

Durch den anaeroben Stoffwechsel der Embryonen (bis Tag 10,5), bei dem Lactat entsteht, sowie dem aeroben Stoffwechsel ab Tag 10,5 gelangen H^+ -Ionen in das Kulturmedium. Diese werden an die Pufferbase (hier HCO_3^- -Ionen) gebunden, aus der dadurch die Puffersäure (hier CO_2) entsteht (s. Gleichung Abb.7). Der pH-Wert des Mediums sinkt. Das heißt, die Pufferkapazität dieses Puffers in einem geschlossenen System müsste geringer sein, weil Kohlendioxid nur solange entweichen kann, bis sich ein Gleichgewicht mit der über dem Medium befindlichen Gasphase eingestellt hat. Im offenen System des Rotators hingegen wird das entstehende Kohlendioxid aus dem Kulturmedium entfernt. Das bedeutet, dass sich

durch die entstehenden H^+ -Ionen nur die Bikarbonatkonzentration ändert. Das Verhältnis von $[HCO_3^-]/[CO_2]$ und damit auch der pH-Wert müssten sich demnach weit weniger ändern als bei der Pufferung im geschlossenen System.

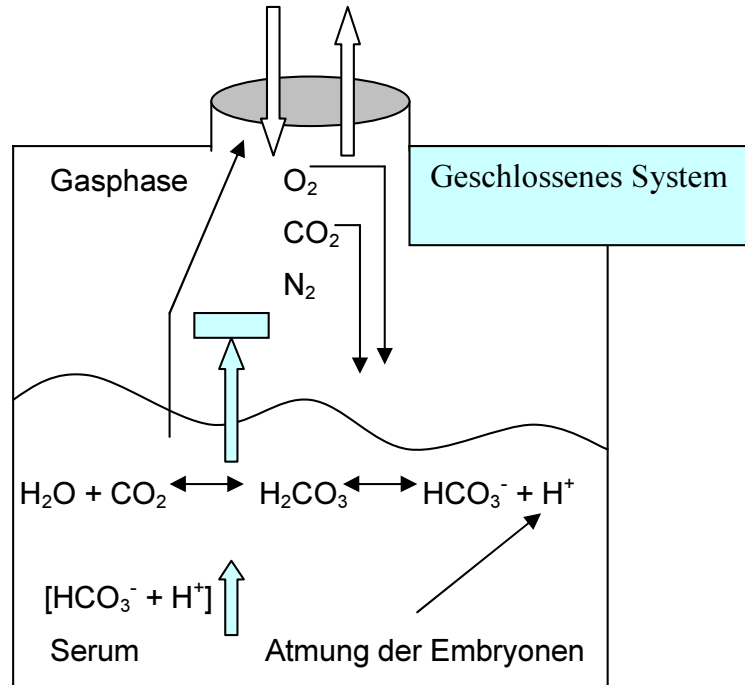


Abb.7.: Austausch von Gasbestandteilen zwischen Serum und Gasphase während der Kulturperiode im Rotator (offenes System); Dicke Pfeile: Roller als Beispiel für ein geschlossenes System

2.5.3 Beurteilung der Entwicklung von Rattenembryonen *In vitro* im Vergleich zur *In-vivo*-Entwicklung

Für die Eignung der „Whole-Embryo-Culture“ als ein *In-vitro*-Modell für die Reproduktionstoxikologie ist die Entwicklung der Embryonen im Vergleich zu den entsprechenden *In-vivo*-Stadien maßgebend. Dabei sind die Bestimmung des Proteingehaltes, die Auswertung der histologischen Befunde sowie eine morphologische Bewertung (Morphologisches Score-System; s. Kap. 3.11.1) genutzte Parameter, um die Entwicklung der jeweiligen Embryonen zu beschreiben.

Die Auswertung histologischer Schnitte wurde in den letzten Jahrzehnten als Beurteilungskriterium der Embryonen immer häufiger verwendet (Herken, 1981; Tarlatzis, 1984; Miki, 1988). Bei speziellen Fragestellungen, wie der Auswirkung unterschiedlicher Glukosekonzentrationen auf die Entwicklung der Embryonen (Gupta, 1982) oder der Analyse der Herzentwick-

lung (Nakagawa,1997), können auch elektronenmikroskopische Bilder zur Auswertung herangezogen werden.

Der Grad der Entwicklung von 9,5 Tage alten Rattenembryonen *in vitro* ist nach einer 48-stündigen Kulturdauer und bei genauer Analyse nicht der gleiche wie in den entsprechenden *In-vivo*-Entwicklungsstadien, obwohl man häufig in Veröffentlichungen Zitate, wie „The best results are obtained from embryos, growth and differentiation of these embryos *in vitro* is almost identical to that *in vivo*“ (New, 1991) findet. 9,5 Tage alte Embryonen erreichen nach 48 Stunden einen Entwicklungsstand, der zu 80-85% dem von *In-vivo*-Embryonen an Tag 11,5 entspricht (s.Tab.5).

Dennoch hat die „Whole-Embryo-Culture“ einen Standard erreicht, der es erlaubt, embryotoxische Wirkungen von Pharmaka an den Embryonen zu untersuchen. Dies ist jedoch nur möglich, wenn man pharmakologisch induzierte Veränderungen von methodisch bedingten unterscheiden kann. Neben den Bestrebungen, ständig Verbesserungen durch Standardisierung sowohl technischer als auch methodischer Art zu erzielen, ist es wichtig, die erzielten Ergebnisse richtig deuten zu können. Dafür sind Kenntnisse über die Entwicklung der Embryonen *in vivo* und *in vitro* unverzichtbar.

Tab.5: Entwicklungsstand 11,5 Tage alter Rattenembryonen *in vivo* und *in vitro* (nach 48 Stunden Kulturdauer in Rinderserum)

		CR [mm]	SOM	Protein [µg/E.]	Morphologischer Score	Abn. [%]
<i>In vivo</i>	Q3	4,80	30	451,7	43	
N = 21	Median	4,74	29	423,1	43	0
	Q1	4,48	29	402,0	43	
<i>In vitro</i>	Q3	4,02	28	294,5	38	
N = 18	Median	3,90	27	276,5	38	0
	Q1	3,84	27	247,8	37	

(Quelle: eigene Untersuchungen)

2.6 Einsatz von Ethanol in der „Whole-Embryo-Culture“

Klinische Studien und experimentelle Untersuchungen haben die Auswirkungen (Zusammenhänge) zwischen Alkoholkonsum während der Schwangerschaft und dem Vorkommen von Alkohol-Embryopathien (AE) bei Kindern von Alkoholikern untersucht.

Die Schäden dieser Alkohol-Embryopathie (fötales Alkohol-Syndrom) sind schwerwiegend (Julien, 1997):

- a) ZNS-Dysfunktion mit verminderter Intelligenz, Mikrocephalie, geistige Entwicklungsstörungen sowie Verhaltensstörungen in Form von Hyperaktivität und erschwerter sozialer Integration
- b) verlangsamtes Körperwachstum
- c) Gesichtsveränderungen wie kurze Lidspalte, kurze Nase und weit auseinanderstehende Augen.

Die WEC mit Rattenembryonen bietet die Möglichkeit, über einen längeren Zeitpunkt (Zeitraum innerhalb der Organogenese = Zeitraum Tag 9,5-11,5) die direkten Auswirkungen von Ethanol auf die Embryonen zu untersuchen. Der hiermit vergleichbare Zeitraum bei Menschen wäre die Zeit bis zum zweiten Monat der Schwangerschaft (Clode, 1987 a, b).

Versuche mit trächtigen Ratten, denen Ethanol verabreicht wurde, haben zu unterschiedlichen Effekten geführt:

- a) erhöhte Resorption (Henderson, 1979/1980; Fernandez, 1983)
- b) erhöhte Mortalität (Henderson, 1977; Abel, 1979; Henderson, 1979)
- c) vermindertes Geburtsgewicht (Lee, 1980; Fernandez, 1983)
- d) Mikrocephalus (Samson, 1984)
- e) Verhaltensstörungen (Lee, 1980).

Die bislang durchgeführten Untersuchungen in der WEC beobachten den Zeitraum von Tag 9,5-Tag 11,5 bei Rattenembryonen. Die Ergebnisse zeigen übereinstimmend, dass einerseits ältere Stadien kultivierter Embryonen deutlich unempfindlicher gegenüber Ethanol sind als jüngere Stadien (Clode, 1987 b). Andererseits zeigen sich bei einer Ethanolkonzentration von mehr als 3 mg Ethanol/ml Kulturmedium meist folgende Effekte:

- a) schlechtere Dottersackzirkulation (Sandor, 1980)
- b) unzureichende Drehung der Embryonen (Sandor, 1980)
- c) die Anzahl der Somiten sinkt (Giavini, 1992)
- d) häufig schließt das Neuralrohr mangelhaft (Giavini, 1992)
- e) die Nekrosehäufigkeit vor allem im ZNS steigt signifikant (Giavini, 1992).

Da Ethanol zu Effekten bei Rattenembryonen in der WEC führt, eignet es sich gut als Modellschubstanz für embryotoxikologische Untersuchungen (s.o.). In dieser Arbeit soll vor allem gezeigt werden, dass eine Variation der Kulturdauer zur Induktion unterschiedlicher Effekte führen kann. Gemeint sind Effekte an den Embryonen, die sich erst durch längere Exposition zeigen.

2.6.1 Allgemeines

Das Ethanolmolekül ist sehr klein und mit dem lebenswichtigen Wasser sehr verwandt. Das dürfte auch der Grund sein, weshalb das eigentliche toxische Prinzip des Alkohols erstaunlicherweise noch immer unbekannt ist (Reichen, 2002).

Ethanol wirkt narkotisch, toxisch und ist wegen seiner guten Wasser- und Fettlöslichkeit eine große Gefahr für den gesamten Organismus. Es ist ein Nerven- und Zellgift mit neuro-, hepato- und pankreatico- und cardiotoxischer Wirkung. Ethanol als kleines hydrophiles und etwas lipophiles Molekül wird vom Verdauungstrakt sehr leicht aufgenommen. Die Resorptionsgeschwindigkeit ist von der Konzentration abhängig. Je höher die Konzentration, desto rascher die Aufnahme (Reaktion erster Ordnung). Das aufgenommene Ethanol verteilt sich rasch und ziemlich gleichmäßig im gesamten wässrigen Körpergewebe.

Mehr als 12 g Ethanol pro Tag kann laut US-Gesundheitsdepartment bei einem Embryo einer schwangeren Frau je nach Entwicklungsstand zu Entwicklungsschäden führen. Weltweite Studien haben ergeben, dass auf 1000 Geburten ein Kind mit Alkoholschädigungen zur Welt kommt. Das ist häufiger als das Auftreten des Down-Syndroms.

2.6.2 Abbau von Ethanol

Der Abbau ist praktisch unabhängig von der Ethanolkonzentration bis zu ca. 0,2 Promille pro Stunde. Es liegt eine konstante Abbaugeschwindigkeit vor (Reaktion 0. Ordnung).

Ethanol wird im Körper nahezu ausschließlich (ca. 95%) über die Leber abgebaut. Dabei findet mit Hilfe verschiedener Enzyme eine Umwandlung zu Kohlendioxid und Fettsäuren statt. Bei der Oxidation des Ethanols durch die Alkoholdehydrogenase entsteht mit dem Acetaldehyd (CH_3CHO) ein toxisches Zwischenprodukt (Giavini, 1992). Dieses wird mit Hilfe der Acetaldehyddehydrogenase (ALDH) zum Acetat weiter oxidiert. Dieses Acetat wird dann in den Intermediärstoffwechsel eingeschleust und durch das P-450-abhängige Monooxigenasesystem (oxidierendes Enzymsystem der Leber) zu Essigsäure oxidiert. Diese wird über den Zitratzyklus in Form von Kohlendioxid und Wasser ausgeschieden.