

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere und Tierhaltung

Für die vorliegenden Untersuchungen werden Ratten des Auszuchtstammes HsdCpb:WU verwendet. Die Tiere werden von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, geliefert. Die Tötung der Ratten wurde beim LAGetSi (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheit und technische Sicherheit Berlin) angezeigt und genehmigt und alle zwei Jahre verlängert (T 0295/97 „Entwicklung eines definierten Kulturmediums zur Kulturganzer Rattenembryonen“).

Die Ratten werden in klimatisierten Räumen bei einer Temperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$ gehalten. Als Futter stehen Altromin^R 1324 und Leitungswasser ad libitum zur Verfügung. Durch eine automatische Beleuchtungsanlage wird ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden vorgegeben. Die Dunkelphase dauert von 21.00-9.00 Uhr Winterzeit (= 22.00-10.00 Uhr Sommerzeit). Zur Verpaarung werden jeweils von 6.00-8.00 Uhr Winterzeit (= 7.00-9.00 Uhr Sommerzeit) ein Rattenbock und zwei weibliche Ratten in einen Käfig gebracht. Werden anschließend Spermien im Vaginalabstrich festgestellt, so hat die Paarung stattgefunden und die folgenden 24 Stunden gelten als Tag 0 der Trächtigkeit. 7.00 Uhr (bzw. 8.00 Uhr) gilt dann als Stunde 0 der embryonalen Entwicklung.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten und beschriebenen Versuche wurden 78 Ratten getötet.

3.2 Inkubationssystem

3.2.1 Rotator-System

Für die Kultur der explantierten Embryonen wird ein spezielles „Rotator-System“ benutzt. Dieses gewährleistet eine kontinuierliche Begasung der Embryonen. Basis dieses Systems ist ein Präzisionsbrutschrank des Types „RKI 10-0310“ (Firma Ikemoto Scientific Technology CO.,Ltd; Tokyo 113, Japan), in dem ein Rotator eingebaut ist (Abb.8). Dieser wird mit einem im Brutschrank eingebauten Elektromotor über einen Gummiriemen angetrieben. Der Rotator selbst besteht aus einer hohlen Scheibe, in der sich beidseits je sechs Öffnungen für die

Aufnahme der Kulturgefäße befinden. Diese werden mittels durchgängiger Gummistopfen an der Trommel befestigt. Auf diese Weise entsteht ein abgeschlossenes System. Das Gasgemisch gelangt über ein Schlauchsystem, in dem es zuvor gefiltert, angefeuchtet und erwärmt wird, über eine Öffnung im inneren Schaftbereich in den Hohlraum der Trommel und von dort in die einzelnen Kulturgefäße. Das verbrauchte Gas wiederum verlässt die Trommel über ein weiteres, ebenfalls im Schaft befindliches Rohr. Die Trommel dreht sich mit einer Umdrehung von 30 U/Min. Die Gasflussmenge in den Versuchen wird auf 250 ml/ Min. festgelegt. Die Temperatur wird auf $38,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ eingestellt.

3.2.2 Roller-System

Basis dieses Systems (Abb.9), bei dem die Begasung der Embryonen nicht kontinuierlich erfolgt, ist ein Präzisionsbrutschrank Typ B15 (Firma Memmert, Schwabach), in dem eine horizontale Achse drehbar eingebaut ist. Diese wird von einem außen am Brutschrank angebrachten Motor mit 30 U/Min. angetrieben. Auf der Achse sind drei runde Plexiglasscheiben befestigt, die am Rand je acht runde Bohrungen als Halterung für die Kulturflaschen aufweisen. Die eingestellte Temperatur beträgt $38,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$.

3.3 Begasungsanlage

Wie bereits mehrfach erwähnt, steigt der Sauerstoffbedarf des Embryos während der Kultur. Deshalb muss die Gasphase in den Kulturflaschen, abhängig vom embryonalen Entwicklungsstand, durch ein $\text{CO}_2\text{-O}_2\text{-N}_2$ -Gasgemisch mit unterschiedlichem Sauerstoffgehalt ersetzt werden. Der CO_2 -Anteil in den Mischungen beträgt stets 5 Vol%. Stickstoff wird als inertes Gas zur Ergänzung auf 100% zugesetzt.

Die Gase werden in einem Gasmischer Typ KM 60-3 SE SO (Firma Witt-Gasetechnik, Postfach 2550, Witten) gemischt. Die einzelnen Gaskomponenten werden dem Gasmischer über drei separate Druckgasflaschen (O_2 , CO_2 , N_2) zugeführt. Das aus den Gasflaschen ausströmende Gasvolumen wird über ein Durchflussmessrohr eingestellt. Die Größenangabe ist NI/Min (Normliter = Volumen von einem Liter Gas bei einem Druck von 1,013 bar und einer Temperatur von 0 °C). In der Gasmischung addieren sich die aus den einzelnen Flaschen entnommenen Volumina und ergeben zusammen 100 %.

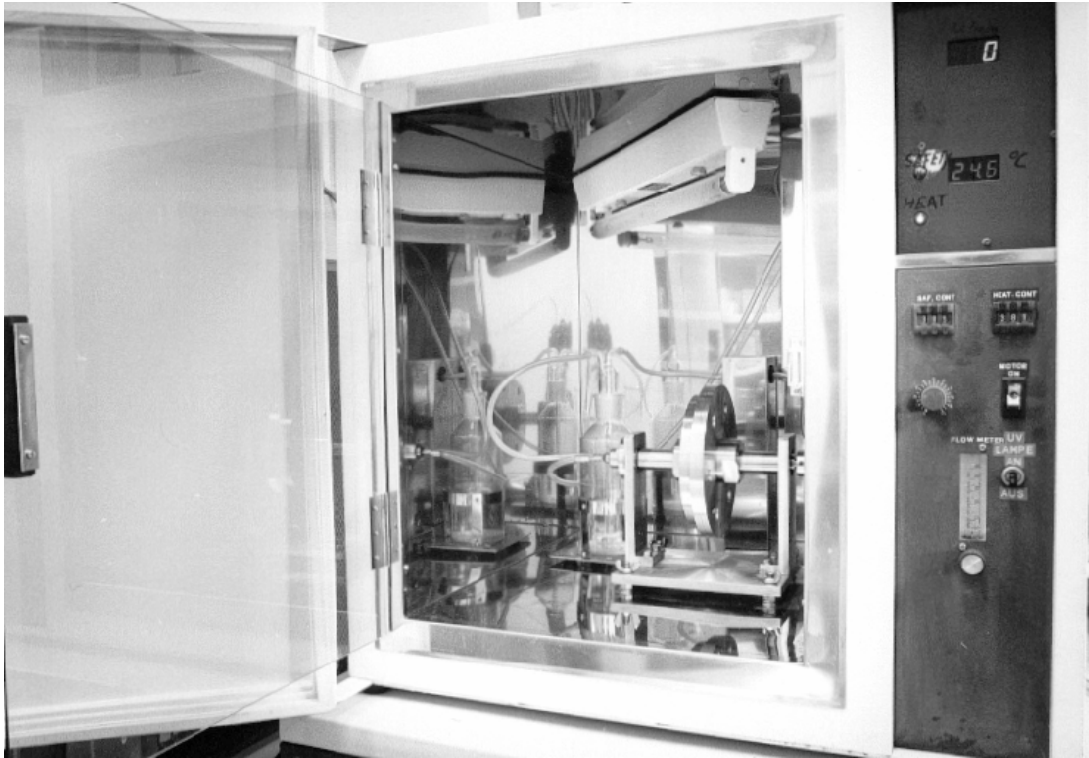


Abb. 8: Fotografie der in den Versuchen benutzten „Rotator-Apparatur“



Abb. 9: Fotografie der in den Versuchen benutzten „Roller-Apparatur“

Der Volumenanteil, den die einzelnen Gaskomponenten in der Mischung einnehmen, wird mittels Durchflussmessrohr am Gerät eingestellt. Zur Berechnung der einzelnen Skalenwerte auf dem Messrohr bedient man sich einer einfachen Formel, die vom Hersteller mitgegeben wurde:

$$\text{Skalenwert}_{\text{GAS}} = \frac{\text{Mischgasmenge} \times \% \text{Anteile}}{100}$$

Mischgasmenge : 18 l/Min (Angabe vom Hersteller)

Der Sauerstoffgehalt der entnommenen Gasmischung wird mit einem Prüfgerät Oxycom 25D (Drägerwerke AG, Lübeck) für die Bereiche 0-25 Vol% O₂ in der ersten Phase der Begasung oder mit einem Oxycom 100D für die Bereiche 0-100 Vol% O₂ in der zweiten und dritten Phase der Begasung kontrolliert.

Etwa eine Stunde vor Versuchsbeginn kommen die mit Serum gefüllten Kulturflaschen in den Rotator, um so eine ausreichende Äquilibrierungszeit zur Einstellung der Gasparameter Sauerstoff, Kohlendioxid und pH-Wert zu gewährleisten. 250 ml des Gasgemisches werden pro Minute in die Anlage geleitet.

3.4 Kulturmedium

Das Kulturmedium besteht in allen Versuchen aus 43 Vol% Rinderserum (eigene Herstellung), 43 Vol% käufliches Rinderserum (MyFCS = Myclone - Fetal calf serum, Gibco BRL, Life technologies, Kat. Nr. 10081-156) und 14 Vol% einer Pufferlösung (Bedingt durch die Untersuchungen wird nicht immer derselbe Puffer eingesetzt. In späteren Versuchen wurde mit HBSS gearbeitet). Die beiden Serumfraktionen werden getrennt aufbewahrt und vor Versuchsbeginn mit dem frisch angesetzten Puffer im entsprechenden Mischungsverhältnis gemischt.

3.4.1 Gewinnung des Rinderblutes

Das Blut wird von weiblichen Rindern gewonnen, die unter veterinärmedizinischer Aufsicht in der Klinik für Fortpflanzung an der FU Berlin stehen. Die Tiere dürfen keine Stoffwechselstörungen zeigen und nicht unter Arzneimitteltherapie stehen. Für die Gewinnung des Rin-

derserums wurde eine Organentnahme beim LAGetSi angezeigt und genehmigt und alle zwei Jahre verlängert (O 0419/97 „Gewinnung von Vollblut aus nicht behandelten Rindern“). Das Rinderblut wird mittels einer Aderlasskanüle, die mit einem Unterdruckgerät verbunden ist, aus der Vena jugularis gewonnen. Das Blut wird in einer zuvor autoklavierten 1-Liter-Infusionsflasche aufgefangen. Dabei läuft das Blut an der Glaswand ab. Diese Vorgehensweise vermindert das Risiko der Hämolyse. Das Blut wird dann vor Ort in 100 ml fassende, möglichst keimarme, Zentrifugenröhrchen (Firma Schott, Mainz) gefüllt und mit Alufolie verschlossen. Das Volumen einer solchen Charge beträgt pro Blutgewinnung ca. ein Liter.

3.4.2 Gewinnung des Serums

Der erste Zentrifugengang zur Serumgewinnung sollte innerhalb von 20 Minuten nach der Blutentnahme erfolgen. Bei 3000 U/Min. wird das Blut 10 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Minifuge CL, Firma Heraeus-Christ GmbH). Dabei bilden sich 3 Sedimentierungsphasen aus: eine stark rot gefärbte, erythrozytenhaltige, die sich bereits nach dem ersten Zentrifugengang am Boden absetzt, eine Serumphase und ein gelblicher gallertartiger Fibrinpfropf. Dieser schließt noch größere Serummengen ein. Er wird mit einer keimarmen Schere von der Wand gelöst und vorsichtig angeschnitten.

Nach der zweiten Zentrifugation (10 Minuten; 3000 U/Min.) wird dieser Arbeitsgang wiederholt. Im Anschluss an die dritte Zentrifugation (10 Minuten; 4000 U/Min) wird das überstehende Serum vorsichtig mittels 25 ml Pipetten entnommen und in frische Zentrifugengläser pipetiert. Sodann erfolgt der letzte Zentrifugengang für 20 Minuten bei 4000 U/Min. Das klare, bernsteinfarbene Serum wird zu je 50ml in Schraubgläser gefüllt und zur Inaktivierung des Komplementsystems (Steele und New, 1974) für 30 Minuten in ein 56°C heißes Wasserbad gestellt. Im Anschluss an die Hitzeinaktivierung wird das Serum sofort unter ständigem Schwenken in ein Eisbad gestellt und bis auf eine Temperatur von ca. 24°C abgekühlt. Danach wird das Serum vorfiltriert. Hierzu verwenden wir ein Filtersystem (Stericup Filtereinheiten, Firma Milipore), welches mit Unterdruck arbeitet. Die Porengröße beträgt 0,45 µm (Best.-Nr. SCGP U01 RE) und 0,22 µm (Best.-Nr. SCHV U01 RE). Nach der Vorfiltration werden 4,3ml Serum durch einen Celtronfilter mit der Porengröße 0,22 µm (Firma Schleicher & Schuell, Celtron 30/0,2 CA-GF92, Best.-Nr. 10462252) in zuvor verschlossene autoklavierte 50 ml Serumflaschen gefiltert. Die so portionierten Serummengen werden bei -20°C eingefroren.

3.4.3 Pufferlösung

Vor Versuchsbeginn werden 14 Vol% der jeweiligen Pufferlösung dem aufgetauten Serum zugesetzt. Der Puffer wird dabei durch einen Milliporfilter sterilfiltriert. Bei 5 ml Gesamtmenge an Kulturmedium pro Kulturgefäß entspricht dies 0,7 ml Puffer und 4,3 ml Serum.

So soll die Pufferkapazität des Mediums erhöht werden, und außerdem können Testsubstanzen im Puffer gelöst werden, bevor sie dem Serum zugesetzt werden. Ferner kann so die Glukose- wie auch die Methioninkonzentration im Kulturmedium erhöht werden (s. Kap. 3.6).

3.5 Präpariermedium

Die gebräuchlichsten Präpariermedien für die „Whole-Embryo-Culture“ sind Tyrode-Lösung oder HBSS (Hank's balancierte Salzlösung, Firma Biochrom, L 2035).

Wir verwenden in unseren Versuchen HBSS als Präpariermedium. HBSS wird bei einer Temperatur von ca. 4°C aufbewahrt und eine Stunde lang vor Versuchsbeginn bei Raumtemperatur stehen gelassen. Je 14 ml werden mittels steriler Einwegpipetten in sterile Petrischalen (Ø 9 cm) gefüllt.

Tab. 6: Zusammensetzung von HBSS (Firma Biochrom, L 2035) als Präpariermedium

Zusammensetzung von HBSS als Präpariermedium

NaCl	8000 mg	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	90 mg
KCl	400 mg	KH ₂ PO ₄	60 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	140 mg	NaHCO ₃	350 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100 mg	Glukose	1000 mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O	100 mg	Aqua tridest.ad	1000 ml

Sowohl die Entnahme der Eizylinder aus dem Uterus als auch das Freipräparieren der Embryonen aus ihren Deciduaanteilen geschieht in steriler HBSS.

3.6 Zusammensetzung der Puffersubstanzen

Vier verschiedene Puffer werden in dieser Arbeit auf ihre Eignung für den Einsatz in der „Whole-Embryo-Culture“ getestet. Die Lösungen aller Puffer werden bei +4°C im Kühlschrank gekühlt und vor Versuchsbeginn auf Raumtemperatur erwärmt. Die Pufferlösungen nehmen in unseren Versuchen im Kulturmedium stets einen Volumenanteil von 14% ein. Bei 5 ml Kulturmedium entspricht dies einer Menge von 0,7 ml Pufferlösung.

3.6.1 HBSS (Hank's balancierte Salzlösung)

Tab. 7: Zusammensetzung HBSS (Firma Biochrom, L2035)

Zusammensetzung HBSS als Puffersubstanz			
NaCl	8000 mg	KH ₂ PO ₄	60 mg
KCl	400 mg	NaHCO ₃	350 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	140 mg	Glucose	1220 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100 mg	Methionin	10,5 mg
MgCl ₂ · 6H ₂ O	100 mg	Aqua tridest.ad	1000 ml
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	90 mg		

Klug (1990) hat festgestellt, dass durch den Zusatz von 75 µg L-Methionin/ml Kulturmedium und 1,57 mg D-Glucose/ml Kulturmedium die Entwicklung der Embryonen *in vitro* verbessert wird. Um diese Endkonzentrationen zu erreichen, wurden zusätzlich 10,5 mg Methionin und 220 mg D-Glucose in 20 ml der entsprechenden Pufferlösungen gelöst und in eine sterile Penicillinflasche durch einen Celronfilter (Firma Schleicher & Schuell, Celtron FP 030/0,2 CA-S, Best.-Nr. 10462200) filtriert und anschließend zu 14 Vol% dem Kulturmedium zugeführt.

3.6.2 Tyrode-Lösung (Phosphat Pufferlösung)

Die Tyrode-Lösung besteht aus zwei Stammlösungen, die getrennt aufbewahrt werden, um Ausfällungen von unlöslichen Calciumphosphaten während der Lagerung zu vermeiden.

Tab. 8: Zusammensetzung der Tyrode-Phosphat-Pufferlösung

Lösung I		Lösung II	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	265 mg	Na H ₂ PO ₄ · H ₂ O	500 mg
KCL	200 mg	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1660 mg
MgCL ₂ · 6 H ₂ O	100 mg	Aqua tridest ad.	500 ml
NaCl	7000 mg		
D - Glukose	12000 mg		
Aqua. Dem.	Ad 500 ml		

Vor Versuchsbeginn werden je 10 ml von beiden Lösungen gemischt und 10,5 mg Methionin sodann in diese 20 ml Lösung (I + II) gelöst.

3.6.3 Bufferall

1966 entwickelten Good und seine Mitarbeiter Zwitterionenpuffer, die chemisch stabil sind, eine hohe Löslichkeit haben und nicht in die Zellen eindringen. Bufferall (Firma Sigma, B8405) ist eine Kombination aus verschiedenen Puffern (EPPS, MOPS, HEPES) mit pK_a - Werten von 7,2, 7,55 und 8,0.

Die angegebene Arbeitskonzentration in unserer 14 Vol%-igen Pufferlösung beträgt 10 ml/L, womit eine Arbeitskonzentration im Gesamtkulturmedium von 1,6 ml/L erreicht wird.

3.6.4 HEPES

HEPES (Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure, 1 Molar, Firma Sigma, H6147) ist ein zellkulturgetesteter Puffer. Die vorgegebene Arbeitskonzentration in unserer 14 Vol%-igen Pufferlösung beträgt 15 mM, womit eine Arbeitskonzentration im Gesamtkulturmedium von 2,5 mM erreicht wird.

Tab. 9: Herstellung einer Stammlösung von Bufferall und HEPES

	Lösung I	Lösung II
Bufferall	1,0 ml	---
Hepes	---	1,5 ml
D – Glucose	1200 mg	1200 mg
Methionin	10,5 mg (auf 20 ml Lösung)	10,5 mg (auf 20 ml Lösung)
Aqua tridest	100 ml	100 ml

Jede dieser Pufferlösungen wird in eine autoklavierte Penicillinflasche durch einen Millipore-Filter (0,2 µm) sterilfiltriert und in der entsprechenden Menge (14 Vol%) dem Gesamtkulturmedium zugesetzt.

Tab. 10: K-Wert, pK-Werte sowie Pufferbereiche der als biochemische Puffer verwendeten Säuren von HEPES und Bufferall

PUFFER	SÄURE	K – Wert	pK–Wert (25°C)*	pK–Wert (37°C)*	Puffer bereich **
Bufferall	MOPS (3-Propansulfonsäure)	$6,76 \times 10^{-8}$	7,17	7,01	7,0 - 8,14
	HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin -N-2-ethansulfonsäure)	$3,31 \times 10^{-8}$	7,48	7,31	6,6 – 8,0
	EPPS (N-2-Hydroxyethylpiperazin -N-2-propansulfonsäure)	$1,1, \times 10^{-8}$	7,96	7,85	7,1 – 8,5
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2- ethansulfonsäure	$1,1, \times 10^{-8}$	7,48	7,31	6,6 – 8,0

Voet & Voet (Lehrbuch der Biochemie, 1.Auflage; S.36); **: Sigma-Katalog '98; S 162

K- und pK-Werte: Werte, die Angaben über die Stärke von Säuren und Basen machen. Je schwächer eine Säure, desto kleiner ihr K-Wert bzw. desto größer ihr pK-Wert [$-\lg K_s = pK_s$].

3.7 Ethanol

Für unsere Testreihe verwendeten wir folgenden Testsubstanz:

Ethanol, absolut: Hersteller: J.T.Baker; Kat.-Nr.: 8228; LOT.-Nr.: 03093300002; CAS-Nr.: 64-17-5; Dichte: 0,79 kg/l.

Ethanol wurde für die Versuche nach folgender Tabelle im Kulturmedium gelöst:

Tab 11: Veränderung der Osmolarität im Kulturmedium durch Ethanol (ETOH) und deren Ausgleich durch destilliertes Wasser

Testansatz	Vol. an ETOH pro 7 ml Kultur-medium [µl]	Osmol. <u>vor</u> Ausgleich [osmol/kg]	Zugabe an destil. Wasser zum Kultur-medium zum Osmolaritätsausgl. / Kulturfl.	Osmol. <u>nach</u> Ausgleich [osmol/kg]
Kontrolle	0	0,305	-	
1 mg/ml ETOH	8,86	0,319	-	
3 mg/ml ETOH	26,58	0,364	1 ml	0,302
6 mg/ml ETOH	53,16	0,436	2 ml	0,309

Es ist bekannt (Clode, 1987), dass durch Ethanol die Osmolarität im Kulturmedium ansteigt. Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurden deshalb Messungen der Osmolarität in unserem Kulturmedium bei unterschiedlichen Serum-Ethanolkonzentrationen durchgeführt. Um eine Osmolarität von zwischen 0,290 osmol/kg und 0,320 osmol/kg (physiologischer Bereich) zu erzielen, wurde dem Medium destilliertes Wasser beigemischt.

3.8 Versuchsdurchführung

3.8.1 Versuchsvorbereitung

Da in den Kulturen auf den Zusatz von Antibiotika und Antimykotika verzichtet wird, sind sterile Arbeitsbedingungen Voraussetzung. Dementsprechend werden fast alle zum Versuch gehörenden Arbeitsschritte – bis auf das Töten der Ratte und das Herauslösen des Uterus aus der Bauchhöhle – in einem keimarm gehaltenen Raum unter einer Laminar-Air-Flow-Kabine (Ehret GmbH, Emmendingen) durchgeführt. Während der Versuchsvorbereitung und -durchführung wird eine chirurgische Gesichtsmaske getragen. Alle im Versuch benötigten Geräte wie Präparierbestecke, Kulturflaschen oder Glaspipetten werden vor Versuchsbeginn autoklaviert.

Circa zwei Stunden vor Versuchsbeginn wird das Kulturmedium hergestellt. Dazu taut man die benötigten Mengen Serum auf. Da der Rotator eine maximale Kapazität von 12 Kulturflaschen à 5 ml (= 60 ml) hat, benötigt man für einen Versuchsansatz 30 ml des Serums aus

eigener Herstellung, 30 ml des käuflichen Serums (MyFCS) und ca. 10 ml des entsprechenden Puffers. Diese Mengen erklären sich durch die schon genannten Mischungsverhältnisse: 43 Vol% Rinderserum (eigene Herstellung), 43 Vol% käufliches Rinderserum und 14 Vol% Puffersubstanz. Die großzügige Kalkulation ist erforderlich, weil bei der Filtration und Abfüllung in die Kulturflaschen stets mit Verlust zu rechnen ist. Das käufliche Serum wird vor der Verwendung nochmals sterilfiltriert (Celtronfilter; 0,2 µm). Je 5 ml des Kulturmediums werden nun in die mit Aluminiumfolie verschlossenen Kulturflaschen gefüllt. Anschließend werden die Flaschen mit speziellen Stopfen verschlossen und möglichst zügig in den Rotator gebracht, in dem sie begast werden.

3.8.2 Präparation der Embryonen

Das Muttertier wird am Tag 9,5 der Trächtigkeit durch Dekapitation (Dekapitator, Mod. 130, Harvard Apparatus, USA) und anschließendem Ausbluten getötet. Sodann wird das Fell des Tieres auf der Bauchseite mit 70%-igem Alkohol behandelt. Die Bauchdecke wird bis zum Rippenbogen mit sterilem Besteck (chirurgische Pinzette 13 cm, Schere für Physiologie 13 cm) eröffnet. Mit einer leicht gebogenen Mikropräparierschere (11 cm) und einer Mikropinzette (10 cm) wird der Uterus herauspräpariert und in eine mit Präpariermedium gefüllte Petrischale gelegt. Zunächst werden die Eizylinder aus dem Uterus gelöst. Hierzu muss die Uteruswand auf der antimesometrialen Seite mit Hilfe zweier gebogener Uhrmacherpinzetten (Mikro-Präparierpinzetten, 10,5 cm) geöffnet werden. Die birnenförmigen Deciduen werden vorsichtig herausgeschält und anschließend in eine zweite, mit frischem Präpariermedium gefüllte, Petrischale umgesetzt. Unter dem Stereomikroskop wird mit zwei geraden Mikro-Präparierpinzetten (10,5 cm) das Deziduagewebe entfernt und die Reichertsche Membran aufgerissen (s. Abb. 10). Beim Aufreißen der Membran wird gleichzeitig auch der innen eng anliegende parietale Dottersack aufgerissen. Weder der Embryo noch der viszerale Dottersack dürfen verletzt werden. Die Embryonen eines Muttertieres werden gesammelt und nach Entwicklungsstadien sortiert (s. Kap. 3.9; Abb.11). Es werden zwei intakte Eizylinder mit Embryonen des gleichen Entwicklungsstadiums in einer Kulturflasche inkubiert. Dazu werden sie mit einer umgekehrt benutzten Pasteurpipette angesaugt und in die Kulturflaschen umgesetzt. Die Kulturflaschen werden mit zuvor autoklavierter Aluminiumfolie abgedeckt und aus dem Rotator herausgeholt. Dieser Arbeitsschritt muss zügig und sorgfältig erfolgen, weil die Gefahr der Kontamination in dieser Phase groß ist.

3.9 Für die Kultur geeignete Embryonen

Die Auswahl der Embryonen erfolgte nach ihren Entwicklungsstadien (Abb.11). Flick (2000) führte Kulturansätze mit Embryonen genau definierter Stadien durch. Grund für diese Versuchsreihen war die Tatsache, dass eine ungenügende Standardisierung der eingesetzten Entwicklungsstadien der Embryonen eine große Varianz der Kulturergebnisse bedingte, wodurch die Interpretation der Ergebnisse erschwert wurde. Durch den Einsatz genau definierter Entwicklungsstadien der Embryonen wurde es möglich, die relative Standardabweichung für die einzelnen Auswertungsparameter deutlich zu reduzieren. Flick stellte fest, dass eine Selektion der Embryonen beim Versuchsbeginn nach bestimmten morphologischen Kriterien mit dem zu erwarteten Ergebnis am Ende der Kultur linear korreliert. Durch Anwendung der Formel nach Cohen (1988): diese gibt die Verhältnisse der Standardabweichung, des minimalen beobachtbaren Behandlungseffektes und des benötigten Stichprobenumfangs unter Berücksichtigung der Signifikanzgrenze und der statistischen Aussagekraft an, konnte der Versuchsumfang (Anzahl eingesetzter Embryonen pro Testgruppe) durch die Reduktion der Standardabweichung bei gleicher Aussagekraft um 1/3 reduziert werden. Die für die Versuche eingesetzten Embryonen umfassen die Entwicklungsstadien 14c, 14d sowie 14e (Flick, 2000). Bei all diesen Embryonen ist die Neuralrinne mit den Neuralfalten ausgebildet, die Vordarmtasche ist ausgebildet und die Kopffalte erkennbar. Dieser Entwicklungsstand entspricht dem histologisch erkennbaren 2-3-Somitenstadium der Rattenembryonen. Bei den Stadien 14d und 14e ist auch schon die Herzanlage zu erkennen.

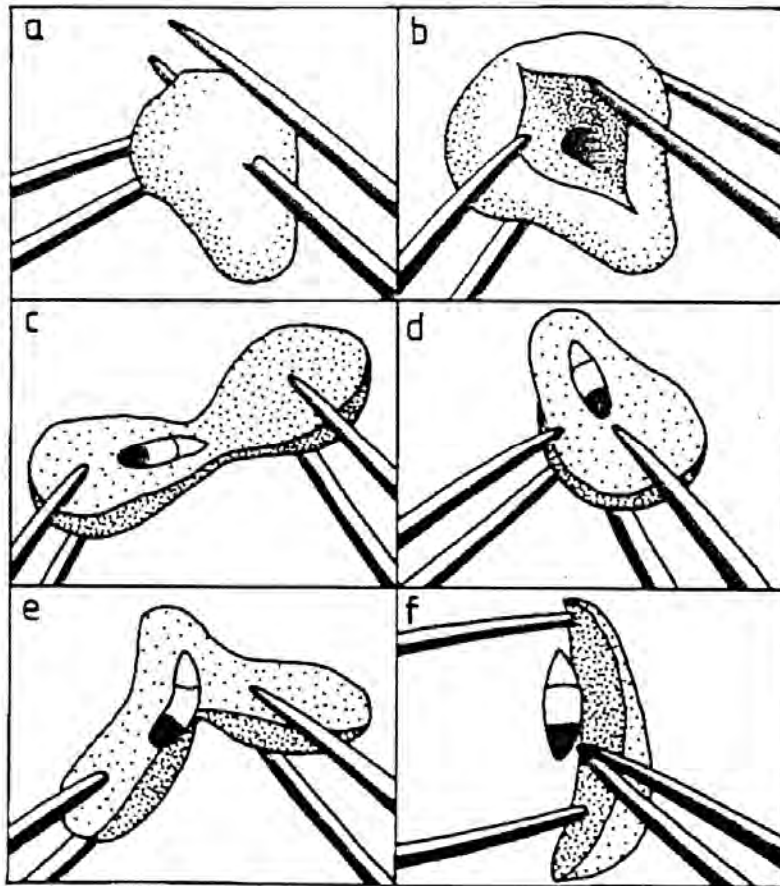


Abb. 10: Schematische Darstellung der Präparation eines Embryos aus dem Dezidua-gewebe. Das Aufreißen der Reichertschen Membran ist nicht dargestellt. (Cockroft, 1997)

3.10 Methodische Voraussetzungen für die Kulturverlängerung

Aufgrund bekannter (s. Kap. 2.3.1) Nährstoffreduktion (Glukose) im Kulturmedium während der ersten 48 Stunden der Kultur (Tag 9,5 – Tag 11,5) wird die erste Kulturphase nach 42 Stunden unterbrochen. Die Embryonen werden sodann nach entsprechender Präparation (s.u.) ohne Zeitverzögerung in frisches Kulturmedium gesetzt und für weitere 30 Stunden kultiviert.

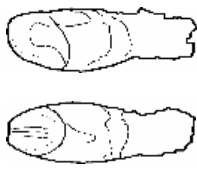
Für die Verlängerung der Kultur werden die gleichen Vorbereitungen getroffen wie zu Beginn der Kultur (s. Kap. 3.8). Nachdem die Kulturflaschen mit Serum gefüllt worden sind, werden sie zur Temperaturangleichung für 15 Minuten in den Rotator gestellt.

Die für den zweiten Kulturzeitraum notwendigen Manipulationen werden unter der Laminar-Air-Flow-Kabine vorgenommen. Die Embryonen werden mit einer Glaspipette in eine mit frischem Präpariermedium gefüllte Petrischale gebracht. Anschließend wird jeder Embryo unter dem Stereomikroskop so positioniert, dass der Betrachter ihm von kaudal auf den Kopf schaut. Nun wird der Dottersack mit zwei Mikro-Präparierpinzetten an einer Stelle eröffnet, an der sich wenige Gefäßstämme befinden (s.Abb.6 A-C). Wichtig ist dabei, dass der Dottersack soweit eröffnet wird, dass er für das Wachstum des Embryos keine mechanische Barriere darstellt. Bei der Öffnung des Amnions ist die Vorgehensweise ähnlich. Nachdem der Dottersack aufgerissen wurde, wird je nach Fragestellung das darunter liegende Amnion ebenfalls aufgerissen, ohne jedoch den Embryo zu verletzen.

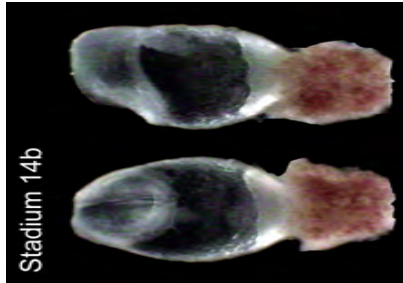
Abb.11 : Beurteilungsschema der Entwicklung von Rattenembryonen



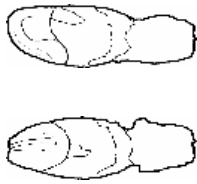
Stadium 14a



Neuralrinne mit schwach ausgebildeten Neuralfalten. Beginnende Verdichtung des Gewebes am Kopfende.



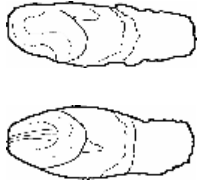
Stadium 14b



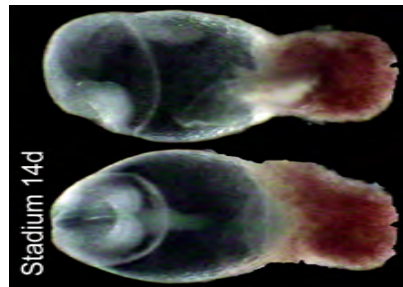
Vordarmtasche. Nur eine Tasche am Kopfende zu erkennen.



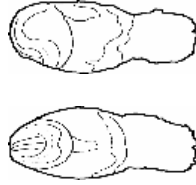
Stadium 14c



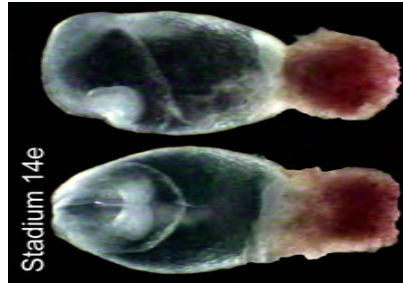
Aufwölbung des Mesencephalons mit deutlicher Rinnebildung zwischen den Hemisphären.



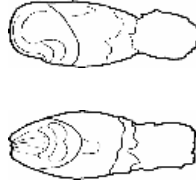
Stadium 14d



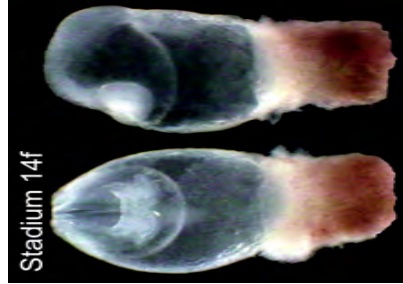
Zwischen rostraler Commissur der Vorderarmgrube und Mesencephalon Verdichtung des Gewebes (Herzanlage).



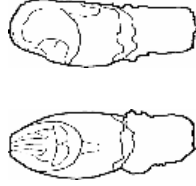
Stadium 14e



Abgrenzung der Herzanlage von der Gehirnanlage. Oberfläche des Gehirns noch glatt und konvex.



Stadium 14f



Zunehmende Ausprägung in eine konvexe Oberfläche (Sulcusopticus) – dreieckige Gestalt der Gehirnanlage.

3.11 Versuchsauswertung

3.11.1 Morphologisches Score-System

Im ersten Teil der Versuchsreihe wird die Entwicklung der Embryonen nach 48 Stunden Kultur beurteilt. Im zweiten Teil der Arbeit, bei dem die Verlängerung des Kultivierungszeitraumes im Mittelpunkt steht, werden die Embryonen nach 72 Stunden bzw. nach 96 Stunden beurteilt.

Die Auswertung erfolgt mit einem von Klug (1985) entwickelten Score-System, welches bezogen auf die Beurteilung morphologisch weiterentwickelter Parameter für die Kulturverlängerung modifiziert wurde (s. Tab. 9). Mit diesem Score-System werden für den Entwicklungsgrad einzelner Organanlagen Punkte vergeben, wobei die Punktezahl umso höher ist, je weiter eine Organanlage entwickelt ist. Die höchste Punktezahl entspricht dem höchsten- bzw. ungestörtesten Entwicklungsstand. Zusätzlich werden messbare Parameter wie der Dottersackdurchmesser, die Scheitel-Steiß-Länge, der Proteingehalt und die Anzahl der Somiten hinzugezogen, um weitere standardisierte Angaben über das *In-vitro*-Wachstum der Embryonen machen zu können. Am Ende eines jeden Versuchs werden die Embryonen in mit HBSS gefüllte Petrischalen umgesetzt und unter einem Stereomikroskop beurteilt.

Tab. 12: Auswertungsschema nach Klug (1985), grau unterlegte Punkte wurden speziell für die Verlängerung der Kultur modifiziert (*).

Morpholog. punkte	End- Bewertung
Dottersackstruktur	3 = gut differenzierter Blutgefäßbaum mit drei oder mehr erkennbaren Aufzweigungen. 2 = Blutgefäße mit ein oder zwei Aufzweigungen erkennbar. 1 = Blutgefäßstruktur mit irregulären Verbindungen, kein gerichteter Blutstrom möglich
Dottersack (∅):	abgelesene Teilstriche im Strichkreuzokular für den maximalen Durchmesser des Dottersacks werden an hand einer Tabelle in mm umgerechnet und eingetragen
Scheitel-Steiß-Länge:	abgelesene Teilstriche im Strichkreuzokular für die Distanz von Scheitel und Steiß werden an hand einer Tabelle in mm umgerechnet und eingetragen
Somiten:	am kaudalen Ende der vorderen Gliedmaßenanlage befindet sich der 12. Somit, - von hier aus wird zum Schwanzende durchgezählt
Lage:	5 = vollständig gedreht, spiralg gekrümmt, Telencephalon dem Herzen stark genähert 4 = vollständig gedreht, C-förmige Krümmung 3 = nicht vollständig gedreht, gestreckte Position 2 = nicht gedreht, über den Rücken gekrümmte Position 1 = Abnormität
Neuroporus:	5 = vollständig geschlossen 4 = nur caudal offen 3 = cranial und caudal offen 2 = nur cranial offen 1 = Abnormität

Kopf-Anlage:	5 = Isthmus rhombencephali (Rhombencephalon vom Mesencephalon getrennt, Cerebellum angedeutet) 4 = Lamina terminalis deutlich ausgebildet 3 = Fissura telodiencephali (Telencephalon durch Querfurche vom Diencephalon getrennt) 2 = Telencephalon nicht vom Diencephalon abgesetzt (Ramskopf) 1 = Abnormität
Augen-Anlage:	7 = Linsenbläschen 6 = Linsensäcken fast verschlossen 5 = Linsengrube vorhanden 4 = Augenblase vorhanden 3 = Augenfurche vorhanden 2 = keine Augenanlage 1 = Abnormität
Nasen-Anlage:	5 = mediane Einsenkung (medialer und lateraler Nasenfortsatz) 4 = deutliches Nasengrübchen 3 = flaches Nasengrübchen (hohes Riechfeldepithel) 2 = keine Nasenanlage 1 = Abnormität
Ohr-Anlage:	6 = Ohrblase ganz verschlossen, birnenförmig 5 = dorsaler Recessus (Ohrblase noch nicht vollständig verschlossen, Ohrblase berührt an einer kleinen Stelle das Ektoderm) 4 = Ohrgrube, Ohrblase vorhanden 3 = Ohrplatte vorhanden 2 = keine Ohranlage 1 = Abnormität
Herz-Anlage:	4 = Herz scheint viergekammert zu sein 3 = Herzscheife, Kammerung zwischen Atrium und Ventrikel 2 = Herzschauch 1 = Abnormität
vordere Extremität:	5 = Extremitätenknospe, Höhe mindestens doppelt so groß wie Basis (Paddle) 4 = Extremitätenknospe, Höhe gleich oder größer als Basis, Ansatz Paddle 3 = Extremitätenknospe, Höhe kleiner als Basis 2 = Extremitätenknospe nicht vorhanden 1 = Abnormität
hintere Extremität:	4 = Extremitätenknospe, Höhe gleich oder größer als Basis 3 = Extremitätenknospe, Höhe kleiner als Basis 2 = Extremitätenknospe nicht vorhanden 1 = Abnormität
Schwanz:	5 = Schwanz gestreckt, sehr lang 4 = Schwanz gestreckt, Länge größer als Basis 3 = Schwanzknospe ausgebildet 2 = Schwanzknospe nicht ausgebildet 1 = Abnormität
Blut:	5 = Blut überall 4 = Blut im Kreislauf 3 = Blutbildung nur lokal 2 = keine Blutbildung

(*): Die morphologischen Endpunkte für die Verlängerung wurden in *In-vivo*-Versuchen ermittelt. Die Embryonen wurden zum Zeitpunkt Tag 11,5, 12,0 und 12,5 auf der Grundlage des Morphologischen-Score-Systems (Klug, 1985) mikroskopisch untersucht. Veränderungen und Weiterentwicklung der Embryonen in diesem zeitlichen Rahmen wurden dokumentiert und sinnvoll in das bisherige System integriert.

3.11.2 Fotografie

Fotos der Embryonen werden direkt im Anschluss an die Auswertung unter der Stereolupe gemacht. Hierzu wird der Embryo in eine mit HBSS gefüllte Petrischale verbracht.

Die Fotoanlage besteht aus einer Videokamera (Sony-Handycam 2006i), die auf einem Stereomikroskop (Firma Zeiss, Stemi 2000-C) montiert ist. Eine Schott Kaltlichtquelle (KL 1500) beleuchtet die Embryonen mit Hilfe einer so genannten „Durchlicht-Dunkelfeldbeleuchtung“ (Firma Zeiss, 475269-9901). Die Fotos werden mit Hilfe des Computerprogramms „VidCap“ (Microsoft) gemacht und mit dem Programm „Photoshop 5.0 LE“ bearbeitet.

3.11.3 Proteinbestimmung

Der Gesamtproteingehalt [μg Protein/Embryo] der einzelnen Embryonen ohne ihre Fruchthüllen wird colorimetrisch mit dem Bio-Rad DC Protein Assay (Firma Biorad) mit Hilfe eines Elisagerätes (Firma Biorad, Modell 3550) bestimmt (Prinzip nach Lowry). Nach der Auswertung der Embryonen (Scoring-System, Fotografie) werden diese ohne ihre Hüllen und in möglichst wenig Präpariermedium mit Hilfe einer Pinzette in zuvor gewogene Eppendorfgefäße gebracht. Im Anschluss daran werden die Eppendorfgefäße nochmals gewogen, um das Gewicht der Embryonen zu ermitteln, bevor sie bei -20°C eingefroren werden. Nach dem Auftauen wird den Embryonen Natronlauge zugesetzt. Die Menge an Natronlauge ergibt sich rechnerisch für jeden Embryo wie folgt: Die Differenz des Gewichtes Eppendorfgefäß leer und Eppendorfgefäß mit Embryo wird von $200\ \mu\text{l}$ (finales Homogenisationsvolumen) subtrahiert. Das Ergebnis entspricht der „korrigierten“ Menge Natronlauge ($0,5\ \text{M NaOH}$), die dem entsprechenden Eppendorfgefäß zugesetzt wird. Dadurch wird ein identisches finales Verdünnungsverhältnis der Embryonen garantiert. Die Eppendorfgefäße bleiben dann über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Am folgenden Tag werden die mit Natronlauge versetzten Proben homogenisiert (Firma Becker, Berlin; Rührwerk IKA-RW 15). Anschließend wird eine Protein-Standardverdünnungsreihe von $0,2\ \text{mg/ml}$ bis $1,5\ \text{mg/ml}$ aus BSA Fraktion V zubereitet. Zur Beschickung der Mikrotiterplatte werden in jedes Well $5\ \mu\text{l}$ Probe, $25\ \mu\text{l}$ Reagenz A sowie $200\ \mu\text{l}$ Reagenz B pipetiert (Reagenzien des Biorad Protein Assay DC), wobei man darauf achten muss, dass sich keine Luftblasen bilden. Die Extinktion der einzelnen Proben wird nach 15 Minuten photometrisch bei $595\ \text{nm}$ im Plattenphotometer gemessen. Um den Proteingehalt des Embryos [μg Protein/Embryo] bestimmen zu können, wird der Ausgabewert des Proteinassays (mg/ml) mit 200 multipliziert, da der Embryo in $200\ \mu\text{l}$ Natronlauge homogenisiert wurde.

3.11.4 Histologie

In der erste Hälfte der Arbeit (Embryonen Tag 9,5-11,5) werden die Embryonen mit Hilfe der üblichen Parameter (Scheitel-Steiß-Länge, Anzahl der Somiten, Morphologischer Score und Proteinwert) beurteilt. Im zweiten Teil der Arbeit (Verlängerung des Kulturzeitraums auf 96 Stunden) werden die Embryonen auch histologisch untersucht, um zusätzlich zur morphologischen Beurteilung der Embryonen auch Informationen über eventuell vorliegende zelluläre Schädigungen zu erhalten. Dabei werden für die entsprechenden Versuchsgruppen repräsentative Embryonen histologisch beurteilt.

Im Anschluss an die Kulturperiode und nach beendeter morphologischer Beurteilung wird der Embryo von Medienrückständen durch Spülung in 0,9 %-iger Kochsalzlösung befreit und in alkoholischer Bouinscher Lösung (1 g Pikrinsäure in 150 ml Ethanol (80 %) + 60 ml Formol (= 37 % Formaldehyd) + 15 ml Eisessig) für 36 Stunden fixiert. Anschließend werden die Embryonen in 80 %-igem Ethanol bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wird der Embryo entwässert und vollautomatisch in Paraplast eingebettet. Als Intermedium wird Histosol verwendet. Anschließend werden mit dem Universalmikrotom® 1140 5 µm dicke Serienschnitte angefertigt. Die Schnitte werden in einer Stainette mit Hämäläun-Eosin gefärbt.

3.11.5 Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse

Die Auswertungsparameter der Embryonen (Anzahl der Somiten, Scheitel-Steiß-Länge, Proteinwerte) werden mit Hilfe von Boxplots grafisch dargestellt. Boxplots (Kastendiagramme) zeigen den Median, die Quartile sowie Ausreißer (▽) und Extremwerte (●) an. Die dicke Linie innerhalb des Kastens markiert den Median. Liegt er in der Mitte, so ist die Verteilung symmetrisch, liegt er zu einer Seite verschoben, ist sie schief. Die Ausdehnung des Kastens entspricht dem Bereich zwischen dem ersten und dritten Quartil, umfasst also 50% der Fälle (Interquartilsrange, IQR). Zusätzlich geben die Querstriche am Ende der jeweiligen Längsachse die höchsten bzw. niedrigsten beobachteten Werte an, die keine Ausreißer sind. Ausreißer (Werte, die mehr als 1,5 mal Boxenlänge vom oberen bzw. unteren Quartil abweichen) sind als Kreis und Extremwerte (Abweichung von mehr als 3 mal Boxenlänge) als Dreieck gekennzeichnet. Unterschiede zwischen diesen unabhängigen Datengruppen bezüglich der auszuwertenden Merkmale werden mit dem nicht-parametrischen „U-Test nach Mann und Whitney“ ermittelt. Dieser Test wurde gewählt, weil sich die in der Studie erhobenen Daten

(Messgrößen) nicht in allen Auswertungsparametern normalverteilt verhalten. Bei dem „U-Test nach Mann und Whitney“ werden die Werte der Gruppen zunächst gemeinsam in aufsteigender Reihenfolge geordnet. Jedem Wert wird seiner Position in der Ordnung entsprechend ein Rang zugeordnet. Aus den Rängen in der gemeinsamen Gruppe wird eine Rangsumme für jede Stichprobe und daraus eine entsprechende Prüfgröße berechnet. Je mehr sich die aus der gemeinsamen Reihe ermittelten Rangsummen für die beiden Gruppen unterscheiden, desto deutlicher unterscheiden sich die zugehörigen Gruppen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm „SPSS 10.0 für Windows“. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf „ $p < 0,05$ “ festgelegt.