

4 METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR OPTIMIERUNG DES PUFFERSYSTEMS IM GESAMTKULTURMEDIUM

Manche Substanzen können zu pH-Wert-Veränderung im Kulturmedium führen (die Carbon-säure Valproinsäure beispielsweise führt zu einem Abfall des pH-Wertes im Medium). Vor diesem Hintergrund müssen wir ein Medium finden, in dem solche Substanzen gelöst und gleichzeitig eventuelle pH-Wert-Verschiebungen abgepuffert werden können, bevor sie dem Kulturmedium zugesetzt werden. Dort könnten Säuren oder Basen zu Ausfällungen (z.B. Proteinausfällungen) führen. Solche Substanzen müssen deshalb in einer pH-neutralen- Lösung dem Gesamtkulturmedium zugesetzt werden können. Dies bedarf einer Neutralisation mit Basen bzw. Säuren, was wiederum nicht in serumhaltigem Kulturmedien durchgeführt werden kann. Bei Substanzen mit nur schwach basischem bzw. saurem Charakter sollte eine Neutralisation direkt durch einen Puffer erreicht werden. Bislang setzten wir dies mit dem Zusatz einer Tyrode-Lösung um. Sie nahm im Gesamtkulturmedium einen Anteil von 14 Vol% ein. Die Tyrodelösung, wie wir sie bislang verwendeten, ist eine Salzlösung mit einem hohen Anteil an Phosphationen. Aufgrund chemischer Interaktionen kommt es aber bei der Kombination einer Phosphatlösung (Tyrode) mit Calcium zur Ausfällung von Calciumphosphationen (Calciumcarbonat). Obwohl der Nachweis einer schädigenden Wirkung dieser Ausfällungen bislang nicht erbracht wurde, suchten wir nach einem Ersatz für die Tyrode-lösung. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Ausfällungen Kristallisationspunkte für andere Komponenten des Kulturmediums oder aber auch für die Testsubstanzen darstellen können. Dies gilt es bei der Standardisierung der Methode zu vermeiden. Um dieses Problem zu lösen, testeten wir vier verschiedene Pufferlösungen (Tyrode-Lösung, HBSS, HEPES und Bufferall), die am Gesamtkulturmedium einen Volumenanteil von 14 Vol% einnehmen sollten, auf:

- a) ihre Fähigkeit, den pH-Wert im Kulturmedium zu stabilisieren
- b) ihr embryotoxisches Potential

4.1 Untersuchungen zur Pufferkapazität einzelner Pufferlösungen (Titrationsver-such); Veränderung der Osmolarität durch Zugabe einer Pufferlösung

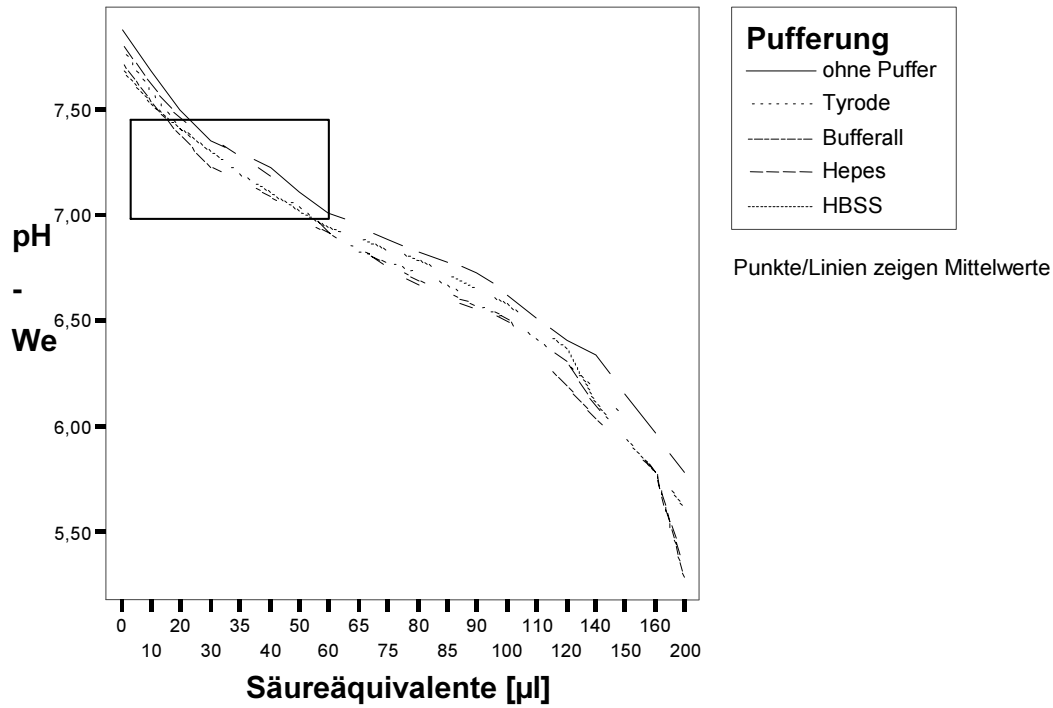
Wir lösten die beiden zu testenden organischen Puffersubstanzen (HEPES und Bufferall) in der vom Hersteller empfohlenen Arbeitskonzentration (HEPES: 15 mM; Bufferall: 10 ml/L) in

unserer Salzlösung (HBSS). In dieser Salzlösung sollten die Puffer eine optimale Konzentration (s. Material u. Methode) mit guter Pufferkapazität besitzen, bevor wir sie dem Rinderserum zugaben. Diese Lösung nimmt im Gesamtkulturmedium einen Volumenanteil von 14Vol% ein, wodurch die Endkonzentration des Puffers im Gesamtkulturmedium geringer wird. Neben den Ansätzen mit den Pufferlösungen wurden vergleichend a) zwei Versuchsansätze mit Salzlösungen (Tyrode und HBSS) sowie b) ein Versuch mit reinem Rinderserum durchgeführt.

Für den Titrationsversuch wurde das Komplettkulturmedium, bestehend aus 4,3 ml Rinderserum und 0,7 ml Pufferlösung, in den Kulturflaschen im Rotator mit 5 Vol% Sauerstoff begast, damit gleiche Bedingungen wie im geplanten Versuch vorlagen. Anschließend wurden die Kulturflaschen luftdicht verschlossen und in ein 38,5 °C temperiertes Wasserbad gestellt. Die Kulturmedien mit ihren unterschiedlichen Pufferlösungen wurden dann mehrfach mit 0,2 ml einer 0,016%igen HCL-Lösung titriert. Der pH-Wert des Mediums wurde nach jedem Pipetiervorgang gemessen. Die Messungen erfolgten mit einem Blutgasanalysegerät (Radiometer, Firma Copenhagen).

In dem Titrationsversuch zeigte sich, dass alle Pufferlösungen in der oben genannten Anwendung keinen Einfluss auf die Pufferkapazität des Komplettkulturmediums hatten. Auch in Bereichen ihrer pK-Werte (umrandetes Feld in Grafik 1: „Die Pufferkapazität eines Puffers ist am größten in dem Bereich, in dem der pK-Wert des Puffers gleich dem pH-Wert ist.“) waren die Pufferlösungen nicht in der Lage, den pH-Wert des Mediums stabil zu halten. In allen Kulturmedien fiel der pH-Wert kontinuierlich ab. Durch die Verdünnung von reinem Rinderserum mit 14 Vol% Salzlösung bzw. organischer Puffersubstanz war keine signifikante Abnahme der Gesamtpufferkapazität festzustellen. Reines Rinderserum besitzt demnach eine ebenso gute Pufferkapazität wie die mit einer Pufferlösung zu 14 Vol% versetzten Kulturmedien.

**Titrationsskurve:
Pufferkapazität verschiedener Pufferlösungen im Rinderserum
nach Zugabe aufsteigender Säureäquivalente**



Grafik 1: Titrationsskurve: Pufferkapazität verschiedener Pufferlösungen im Serum, Umrandetes Rechteck: pK-Wert-Bereiche der getesteten Puffer

Da Serum eine so gute Pufferkapazität besitzt, dass eine 14%ige Verdünnung auch bei der Zugabe von unterschiedlichen Säureäquivalenten keine signifikanten Veränderungen der Pufferkapazität im Vergleich zu 100% Serum erzielt, ist keine Kompensation durch weitere Pufferzugabe notwendig. Wir benötigen unsere Salzlösung (Tyrode, HBSS) demnach nur, um etwaige Substanzen in Lösung zu bringen bzw. in einem proteinfreien Anteil des Kulturmediums eine Neutralisation von sauren oder basischen Testsubstanzen vornehmen zu können.

Die Messung der Osmolarität wurde vorgenommen, weil eine Veränderung der Medienzusammensetzung, wie die Zugabe einer Pufferlösung, zu Veränderungen der Osmolarität führen kann. Der Zusatz von HEPES oder von Substanzen, die in starken Säuren und Basen gelöst sind und die anschließende Neutralisation können die Osmolarität erheblich beeinflussen (Freshney, 2. Auflage).

Tab.13: Veränderung der Osmolarität [mosmol] im Kulturmedium durch Zugabe verschiedener Pufferlösungen (Prozentangaben sind Volumenprozent)

	Serum 100%	Serum 86% Tyrode 14%	Serum 86% HBSS 14%	Serum 86% Hepes 14%	Serum 86% Bufferall 14%
MW	293	303	308	300	312
STABW	11	6	6	4	5

Angegeben ist der Mittelwert (MW) aus einzelnen Stichproben (n = 3) sowie die Standardabweichung (STABW) als Maß für die Streuung von Werten bezüglich ihres Mittelwertes.

Die Messung der Osmolarität im Kulturmedium Rinderserum ergab (s.Tab.13), dass eine Verdünnung des Mediums durch die Zugabe verschiedener Pufferlösungen zu keiner nennenswerten Veränderung der Osmolarität führte. Diese lag in allen getesteten Kulturmedien zwischen 297 mosmol Minimum und 316 mosmol Maximum.

4.2 Auswirkungen unterschiedlicher Pufferlösungen auf die Entwicklung der kultivierten Embryonen

In den folgenden Versuchen sollte nachgeprüft werden, ob Pufferlösungen neben ihren erwünschten Effekten wie der Pufferung des Kulturmediums auch mögliche schädigende Effekte auf die Entwicklung der Embryonen haben.

Bei der Durchführung des Versuches wurden die vier verschiedenen Pufferlösungen (Tyrode-Lösung, HBSS, HEPES, Bufferall) parallel in einem Versuch getestet. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurden die Versuche wiederholt. Der Vergleich erfolgte zum Kontrollpuffer Tyrodelösung. Der Stichprobenumfang der Testgruppen betrug $n \geq 12$ kultivierter Embryonen.

Tab.14: Allgemeine Rahmenbedingungen für die WEC für die Austestung verschiedener Puffersysteme in der Rotatorkultur

Kulturmedium	43 Vol% Rinderserum; 43 Vol% FCS; 14 Vol% HBSS (Puffer); Rinderserum: hitzeinaktiviert, filtriert, keine Antibiotika		
Kulturzeitraum	Tag 9,5 - Tag 11,5		
Inkubationstemperatur	38,0 °C ± 0,5°C		
Gas-Durchflussrate:	250 ml Gasgemisch/Minute		
Anzahl Embryonen / ml Kulturmedium	2 Embryonen / 5 ml		
Getestete Puffer	Bufferall; Hepes, Tyrode und HBSS		
Begasung, kontinuierlich	T = 0 – 24 h:	5 Vol% O ₂ 5 Vol% CO ₂ 90 Vol% N ₂	T = 24 – 48 h: 30 Vol% O ₂ 5 Vol% CO ₂ 65 Vol% N ₂

Nicht alle getesteten Pufferlösungen eigneten sich für die Kultur von Rattenembryonen in Rinderserum. Die erzielten Werte (s. Grafik 2) waren dicht am Erwartungsbereich der Ergebnisse von Kontrollembryonen in der „Whole-Embryo-Culture“. Es traten in keiner Gruppe Abnormitäten auf, die nicht mit der erwarteten Spontanrate (spontan auftretende Fehlentwicklungen, die bis zu einem Prozentsatz von 5-10% im Toleranzbereich liegen) zu erklären sind (Bufferall, Hepes, Tyrode jeweils ein abnormer Embryo). Dennoch waren eindeutige Unterschiede in den Entwicklungsergebnissen der Embryonen zu erkennen. Im Vergleich zu den Embryonen in dem Kulturmedium mit dem laborinternen Standardpuffer Tyrode erreichten die Embryonen, die in HBSS gepufferten Medien kultiviert wurden, in keinem Bewertungsparameter statistisch bessere Entwicklungsergebnisse. Die Embryonen in HEPES- und Bufferall gepufferten Medien erzielten hingegen in den Parametern Scheitel-Steiß-Länge und Proteine statistisch signifikant schlechtere Resultate ($p < 0,05$). Die Analyse der Verteilung des morphologischen Scores ergab, dass Embryonen in der Bufferall-Mischung signifikant schlechtere Ergebnisse erzielten als in Tyrode ($p < 0,05$) (Graf. 2). Diese Embryonen zeigten neben einer schlechter entwickelten Dottersackstruktur und einem verkürzten kaudalen Rumpf auch eine weniger gute Entwicklung der Ohranlagen. Bei der Anzahl der Somiten unterschieden sich die Embryonen, kultiviert in Kulturmedien mit verschiedenen Puffern, nicht signifikant voneinander. Für die Durchführung weiterer Versuchsreihen wurde HBSS an Stelle des Tyrodepuffers eingesetzt, weil die Embryonen in den HBSS gepufferten Medien in

den Parametern Morphologischer Score, Somitenzahl und Protein die besten Resultate erzielten.

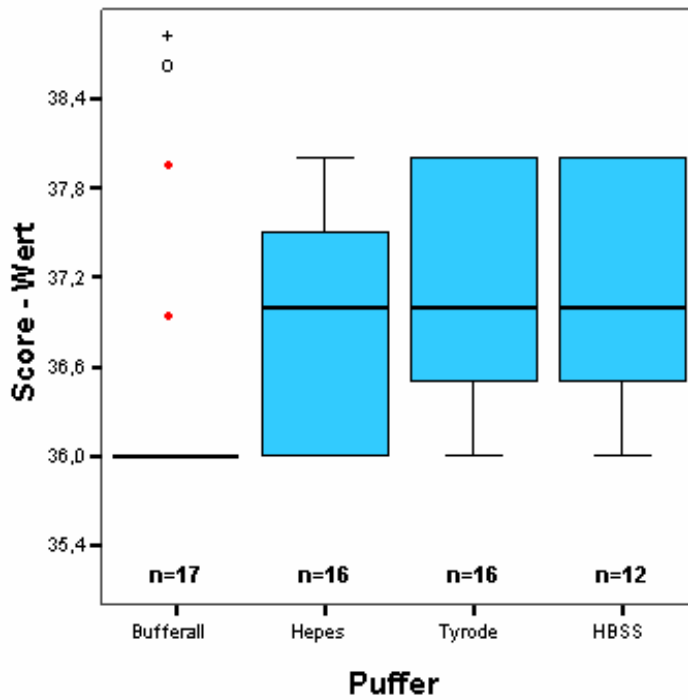
Tab.15: Entwicklungsstand 11,5 Tage alter Rattenembryonen (nach 48 Stunden Kulturdauer in 85% Rinderserum und 15% Tyrode-Lösung);

		CR	SOM	Protein	Morphologischer	Abn.
		[mm]		[µg/E.]	Score	[%]
In vitro	Q3	4,02	28	294,5	38	
N = 18	Median	3,90	27	276,5	38	0
	Q1	3,84	27	247,8	37	

Die in der Tabelle angegebenen Werte sind Medianwerte; erstes und drittes Quartil werden durch die kleineren Ziffern unter- bzw. oberhalb der Medianwerte angegeben. CR: Scheitel-Steiß-Länge; SOM: Anzahl der Somiten
N: Anzahl der eingesetzten Embryonen

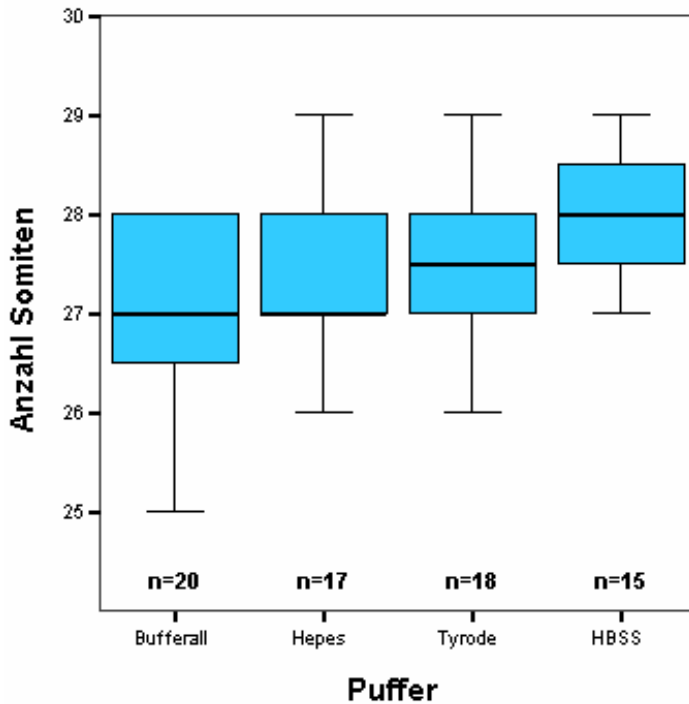
Grafik 2 : Vergleichende Darstellung des Gesamtproteingehaltes, der Anzahl der Somiten, des morphologischen Scores sowie der Scheitel-Steiß-Länge der für 48 Stunden kultivierten Embryonen in Kulturmedien mit verschiedenen Pufferlösungen verdünnt.

Einfluß einzelner Pufferlösungen auf den Score-Wert der Embryonen in der WEC



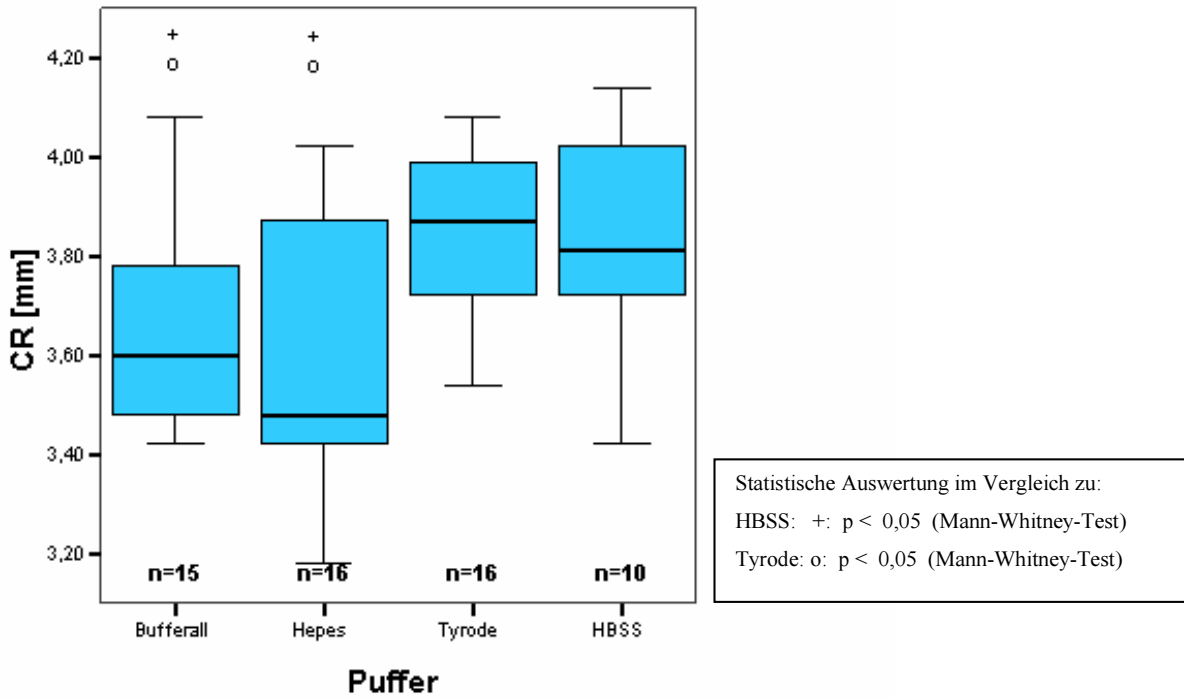
Statistische Auswertung im Vergleich zu:
 HBSS: + : $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test)
 Tyrode: o : $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test)
 • : Extremwerte

Einfluß einzelner Pufferlösungen auf die Somitenzahl der Embryonen in der WEC



Statistische Auswertung im Vergleich zu:
 HBSS: + : $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test)
 Tyrode: o : $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test)

Einfluß einzelner Pufferlösungen auf die Scheitel-Steiß-Länge der Embryonen in der WEC



Bewertung einzelner Puffer in der WEC: Proteinwerte der Embryonen im Vergleich

