

## **5 METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ETABLIERUNG EINES KONTINUIERLICHEN BEGASUNGSVERFAHRENS (ROTATOR-SYSTEM)**

Ziel war es, mit einer kontinuierlichen Begasung gegenüber dem herkömmlichen Roller-System (Begasung initial mit 10 Vol% Sauerstoff und nach 36 Stunden mit 50 Vol% Sauerstoff) eine optimale Einstellung des Gasgemisches im Kulturmedium zu finden, um dadurch die Entwicklung der Embryonen zu verbessern.

### **5.1 Einfluss einer kontinuierlichen Begasung auf die Entwicklung der Embryonen im Kulturzeitraum von Tag 9,5 - Tag 11,5**

#### **5.1.1 Allgemeine Versuchsbedingungen im Rotator**

Die für die Rotator-“Whole-Embryo-Culture“ wichtigen Versuchsbedingungen (Anzahl der Embryonen pro Kulturgefäß, Inkubationstemperatur, Sauerstoffkonzentration im ersten Kulturzeitraum, Umdrehungen des Rotators) wurden aus diversen Literaturstellen übernommen (New, Cockroft, 1978, Sanyal, 1980; Tarlatzis, 1984; Miki, 1988; Pitt, 1999).

Bei der Benutzung des Blutgasanalysegeräts zur Messung einzelner Gase musste darauf geachtet werden, eine Beeinträchtigung der Messergebnisse durch sekundäre Einflußgrößen auszuschließen:

- a) Die Zeitspanne von der Entnahme der Probe aus der Kulturflasche bis zu ihrer Messung wurde auf maximal eine Minute festgelegt. Nicht dargestellte Versuche von uns haben gezeigt, dass eine Verringerung der so genannten „Messzeitspanne“ (= Zeitspanne von der Entnahme der Probe bis zur eigentlichen Messung) unter einer Minute zu keiner Veränderung der Ergebnisse führte.
- b) Das Totvolumen, bestehend aus dem Gasvolumen im Spritzenkonus und in der Kanüle, hatte, so haben eigene Untersuchungen ergeben, keinen Einfluss auf das Messergebnis (nicht dargestellte Versuchsreihe).
- c) Um die Gefahr einer Kontamination des Kulturmediums mit Keimen aus der Umgebung, die bei einer mehrfachen Probenentnahme zur Messung von Blutgasen besteht, zu verringern, wurde die Genauigkeit einer Einzelmessung mit der von Mehrfachmessungen verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass im vorliegenden Fall die Werte einer Einzelmessung im Bereich der Mehrfach-

messungen lag. Für jede Messung genügte es demnach eine einzige Probe dem Serum zu entnehmen.

### 5.1.2 Veränderung im zeitlichen Verlauf einzelner Gasparameter im Kultursystem bei Zusatz von Embryonen in den Rotator

Die Bedeutung der einzelnen Gasparameter für die Kultivierung von Rattenembryonen wurde schon in Kapitel 2.4. ausführlich erläutert.

Um die physiologischen Blutwerte einer Ratte zu ermitteln, wurden zwei Ratten narkotisiert, die Bauchhöhle eröffnet und jeweils eine Blutprobe aus der Aorta abdominalis genommen.

**Tab.16 :** Gasparameter einer Ratte *in vivo*; Trächtigkeitstag 9,5; Blutentnahme am Übergang Aorta abdominalis/A. ovarica

Messungen	pH	pO <sub>2</sub> [mmHg]	pCO <sub>2</sub> [mmHg]	HCO <sub>3</sub> [mmol/l]
Tier 1	7,32	80,4	52,6	24,7
Tier 2	7,33	80,7	49,8	25,5

Das Tier wurde mit einem Kombinationsnarkotikum (100 mg/kgKG Ketamin; 2,5 mg/kg KG Xylazin) narkotisiert. Diese Narkosekombination verhindert eine Atemdepression, die bei der Messung zu Verfälschungen führen könnte.

Bei der Etablierung des neuen Begasungssystems für die „Whole-Embryo-Culture“ wurde angestrebt, im Kultursystem in etwa die Gaswerte zu erreichen, die im Blut der Ratte am Trächtigkeitstag 9,5 herrschen. Diese „physiologischen Werte“, vor allem der pH-Wert, dienten uns als Richtwert für unser kontinuierliches Begasungssystem.

**Tab.17:** Gegenüberstellung zweier Versuchsansätze zur Austestung der Veränderung des Verlaufes einzelner Gasparameter durch den Zusatz von Embryonen im Rotator

<b>Allg.Rahmenbed. Tag 9,5 – Tag 11,5</b>	<b>Rotator-Kultur; Ansatz A (kontinuierliche Begasung)</b>	<b>Rotator-Kultur; Ansatz B (kontinuierliche Begasung)</b>
<b>Kulturmedium</b>	43 % Rinderserum; 43 % MyFCS; 14 % HBSS (Puffer); keine Antibiotika; Rinderserum: hitzeinaktiviert, filtriert,	
<b>Inkubationstemp.</b>	38,0 °C ± 0,5°C	
<b>Gas-Durchflussrate:</b>	250 ml Gasgemisch/Minute	
<b>Anzahl kultivierter Embryonen:</b>	<b>KEINE</b>	<b>2 Embryonen / 5 ml Kulturmedium</b>
<b>Begasung</b>	T = 0 – 24 h: 5 Vol% O <sub>2</sub> 5 Vol% CO <sub>2</sub> 90 Vol% N <sub>2</sub>	T = 24 – 48 h: 30 Vol% O <sub>2</sub> 5 Vol% CO <sub>2</sub> 65 Vol% N <sub>2</sub>

Die Zeitpunkte für die einzelnen Messungen wurden dabei wie folgt festgelegt (Angaben in Stunden):

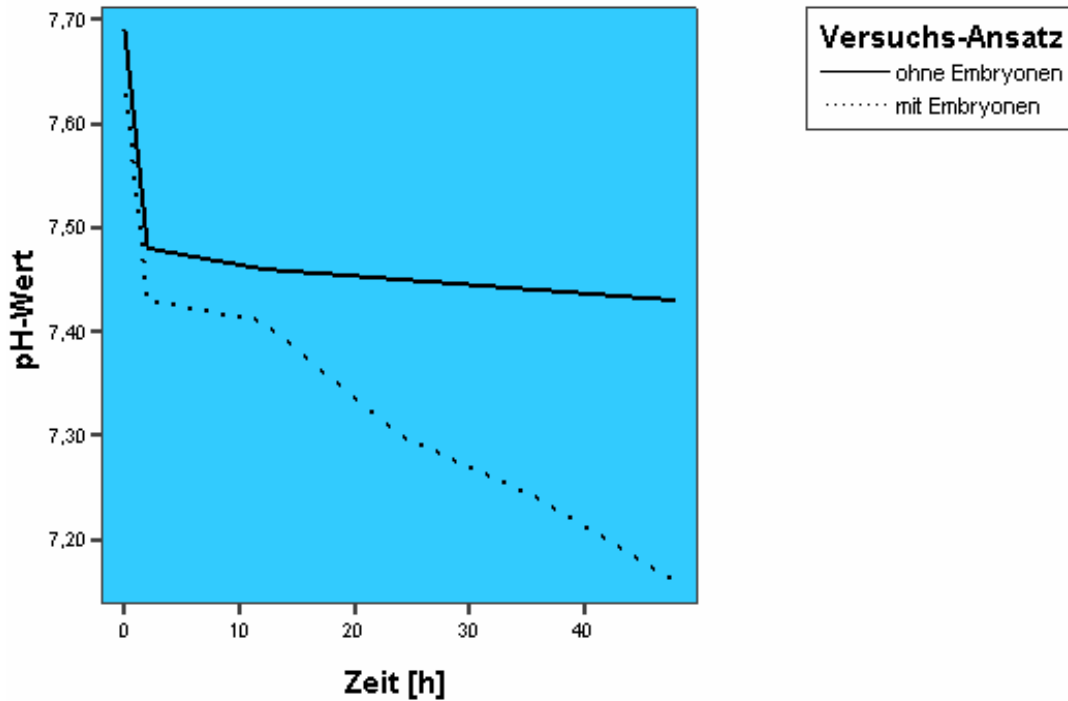
0 – 1 – 12 – 24 – 25 – 36 – 37 – 48

Den gewählten Zeitpunkten lagen folgende Überlegungen zugrunde. Direkt nach Füllung der Kulturgefäße mit dem „fertigen Medium“ wurde die erste Messung vorgenommen („0“). Der Messpunkt „1 Stunde“ wurde nach einer Stunde Kulturdauer gemessen. Die Messpunkte „24/25“ und „36/37“ wurden deshalb so gewählt, weil nach 24 Stunden (Rotator-Kultur) bzw. 36 Stunden (Rollerkultur) die zweite Begasungsperiode beginnt. Gleichzeitig wurde jeweils eine Stunde später nochmals gemessen, um die Veränderungen deutlich zu machen.

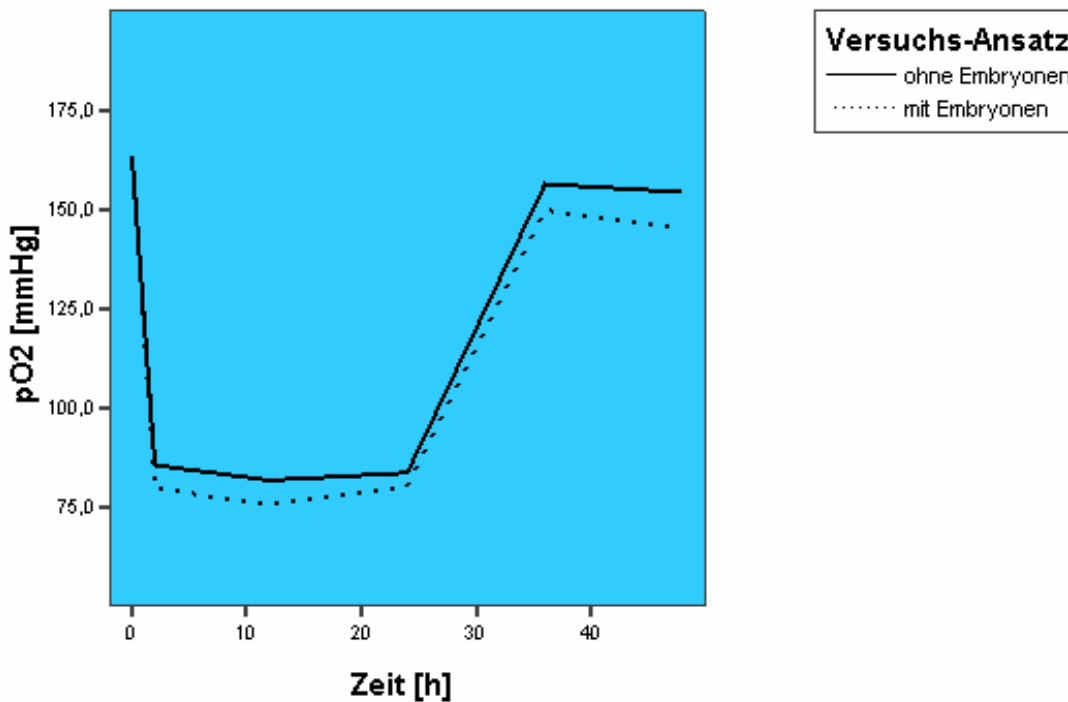
Es wurden nicht mehr Messpunkte ausgewählt, weil mit jeder Messung die Gefahr einer Kontamination des Mediums steigt.

**Grafik 3 :** Verlauf verschiedener Gasparameter über eine Dauer von 48 Stunden in dem WEC-Rotator; Gegenüberstellung eines Versuches ohne Embryonen und eines Versuches mit Embryonen (Begasung: 0-24h = 5 % O<sub>2</sub>, 24-48h = 20 % O<sub>2</sub>).

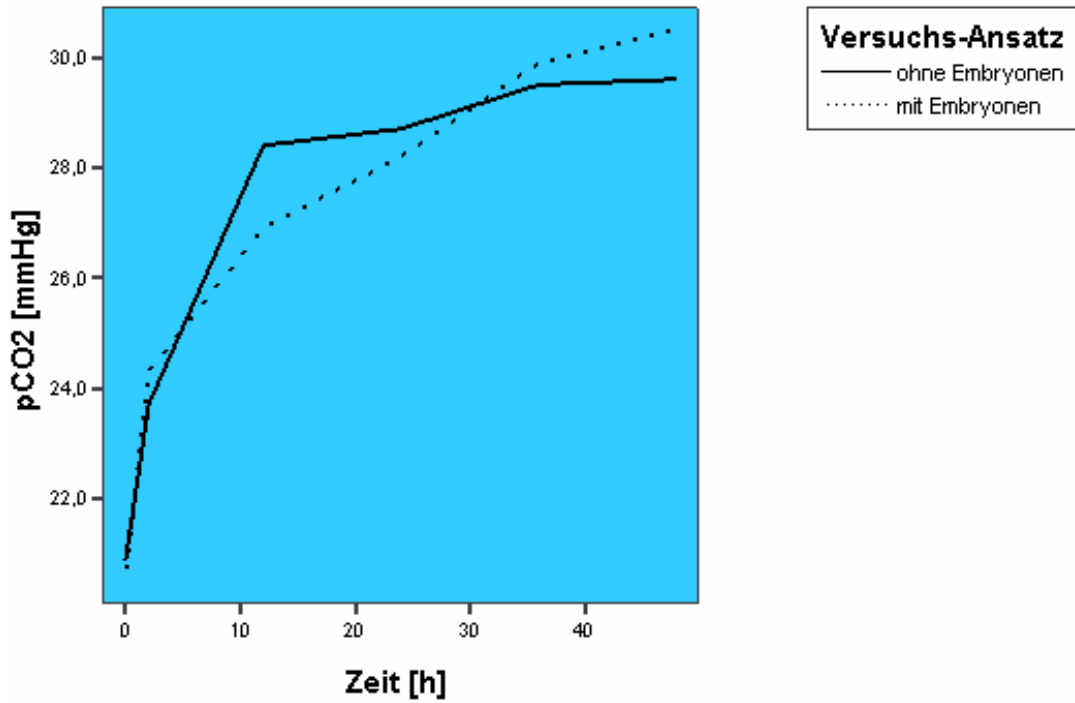
### Verlauf des pH-Wertes im Kulturmedium mit Embryonen bzw. ohne Embryonen



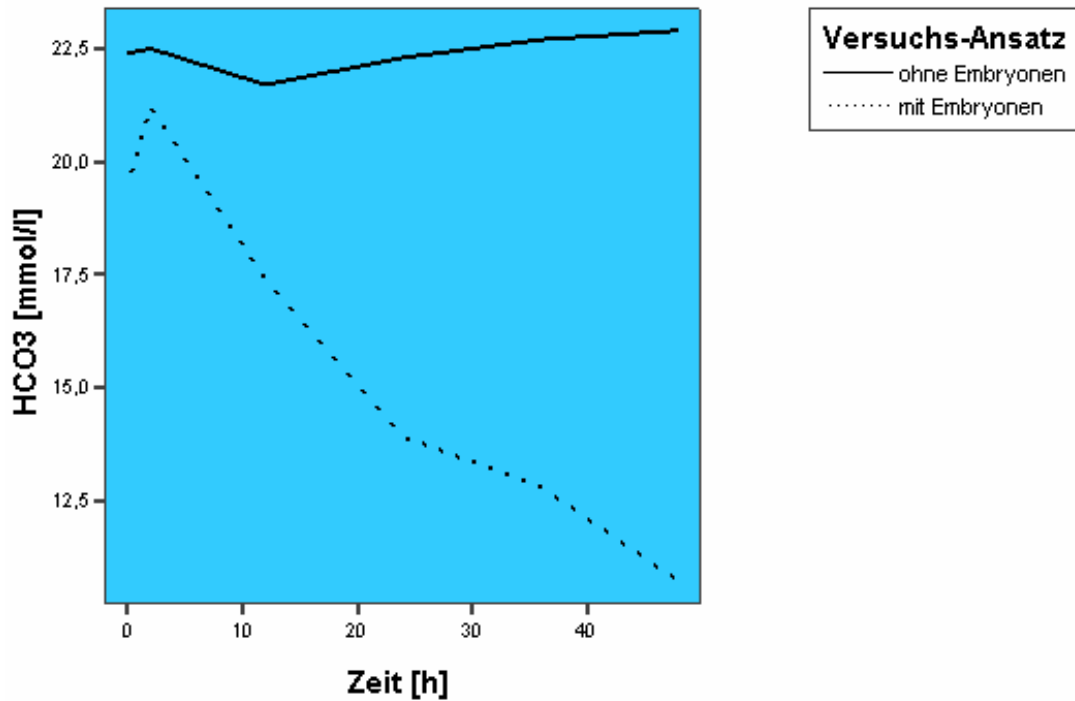
### Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium mit Embryonen bzw. ohne Embryonen



**Verlauf der Kohlendioxidkonzentration im Kulturmedium mit Embryonen bzw. ohne Embryonen**



**Verlauf der Bikarbonatkonzentration im Kulturmedium mit Embryonen bzw. ohne Embryonen**



Die geringe Konzentration von Kohlendioxid zu Beginn der Kulturperiode (ca. 50 mmHg CO<sub>2</sub> in frischem Rattenserum, circa 21 mmHg CO<sub>2</sub> in aufgetautem Rinderserum) ist durch den Auftauvorgang (Temperaturzufuhr, Erhitzung) des Serums vor jedem Versuch, bei dem das Kohlendioxid aus der Lösung ausgetrieben wird, zu erklären. Die Kohlendioxidkonzentration erhöhte sich innerhalb der ersten 10 Stunden von 20 auf 28,5 mmHg, weil sich in dieser Zeit ein Gleichgewicht zwischen der im Serum vorhandenen und der mit dem Gasgemisch zugeführten Konzentration einstellte. Der gesamte Vorgang nahm wegen der geringen Durchflussrate (DFR) von 250 ml/Min. viel Zeit in Anspruch. Im weiteren Versuchszeitraum blieb sie konstant bei 28 bis 29 mmHg.

Die Veränderung der Sauerstoffkonzentration von circa 80 mmHg in den ersten 24 Stunden der Kultur auf über 150 mmHg im zweiten Versuchszeitraum bedingte sich durch die Erhöhung der von außen zugeführten Menge.

Da keinerlei Säureäquivalente gebildet wurden (Ansatz A, Versuch ohne Embryonen) blieben die Messwerte für den pH-Wert (ca. 7,45) und der Bikarbonatkonzentration (21-22 mmol/L) über den gesamten Untersuchungszeitraum auf einem konstanten Niveau.

Durch den Zusatz von Embryonen (Ansatz B) änderten sich die Kurvenverläufe der Bikarbonatkonzentration und des pH-Wertes. Durch den Stoffwechsel der Embryonen, bei dem H<sup>+</sup>-Ionen entstehen, wurden die Wasserstoffionen vom Bikarbonat abgefangen (Bikarbonatkonzentration nahm von 21,5 mmol/L zu Versuchsbeginn auf 11 mmol/L nach 48 Stunden ab). Dadurch wurde vermehrt Kohlendioxid gebildet (dessen Konzentration nimmt von 24,0 mmHg auf 31,0 mmHg zu) und der pH-Wert sank (von 7,45 auf 7,18). Einzig der Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Medium wies einen ähnlichen Verlauf wie in Ansatz A auf, weil die ständige Zufuhr von Sauerstoff von außen den Sauerstoffverbrauch durch die Embryonen stets kompensierte.

### 5.1.3 Verlauf einzelner Gasparameter im Kultursystem bei unterschiedlichen Begasungsverfahren

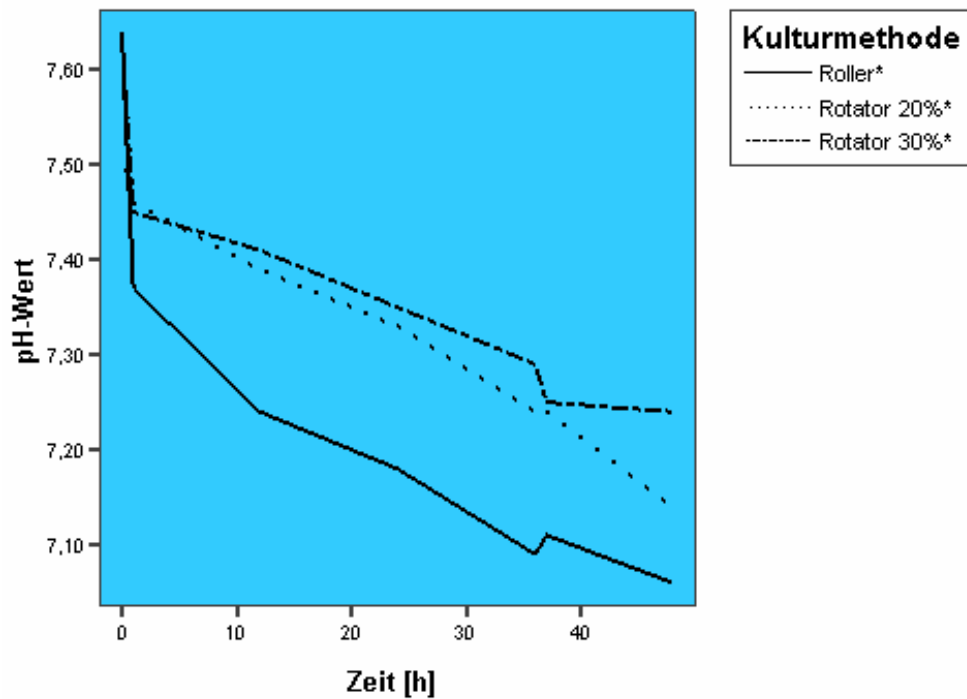
Um Unterschiede zwischen einer kontinuierlichen und einer nicht-kontinuierlichen Begasung hinsichtlich des Verlaufes einzelner Gasparameter (pH-Wert, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub>) darstellen zu können, wurden Versuche durchgeführt, in denen die Ergebnisse beider Kulturmethode (Roller- und Rotator-Methode) vergleichend gegenübergestellt wurden.

Dabei wurde die nicht-kontinuierliche Begasung mit der Roller-Methode eingesetzt, mit der am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der seit Jahren gearbeitet wird (s.

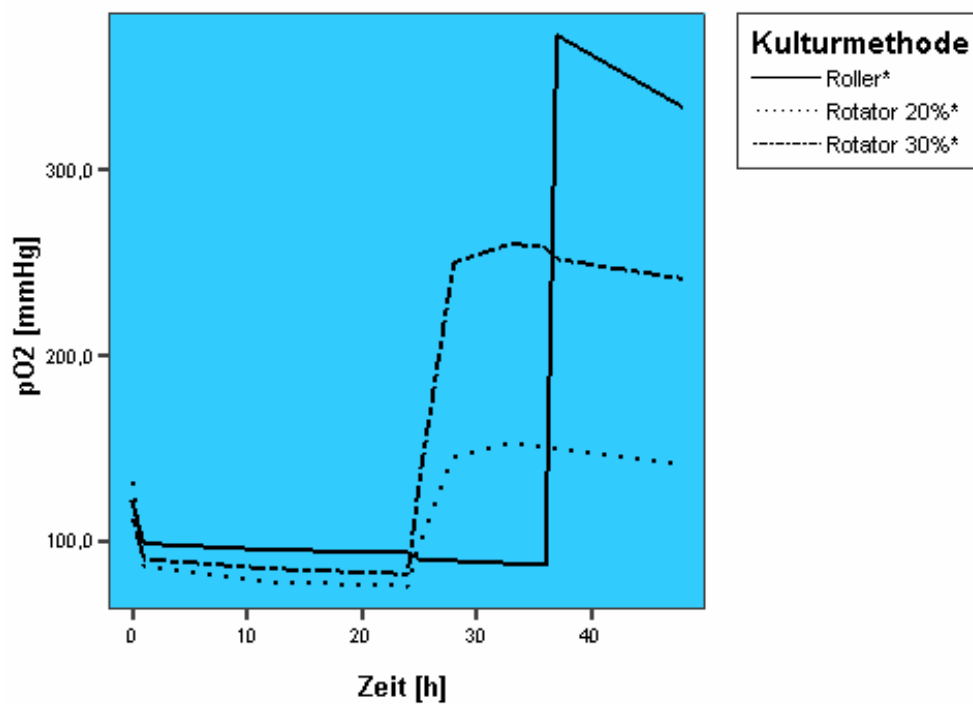
Material und Methode). Die Kulturflaschen wurden zu Beginn der Kulturperiode für 3 Minuten mit 10 Vol% Sauerstoff, 5 Vol% Kohlendioxid und 85 Vol% Stickstoff (DFR: circa 4 NI/min) begast. Nach 36 Stunden erfolgte die zweite Begasung für drei Minuten mit 50Vol% Sauerstoff, 5 Vol% Kohlendioxid und 45 Vol% Stickstoff (DFR: circa 4 NI/min) (Klug, 1985). Gleichzeitig wurden zu den Versuchen mit der Roller-Methode vergleichend zwei Versuchsansätze mit der Rotator-Methode durchgeführt. Der Unterschied beider Rotator-Ansätze lag in der zugeführten Sauerstoffkonzentration im zweiten Kulturabschnitt (24 h-48 h (Rot 20 Vol%; Rot 30 Vol%)). „Rot 20%“ bedeutet, dass den Embryonen in diesem Zeitraum kontinuierlich ein Gasgemisch mit 20 Vol% Sauerstoff zugeführt wurde, während „Rot 30 %“ 30 Vol% Sauerstoff in den zweiten 24 Stunden bedeutet. In den ersten 24 Stunden wurden in beiden Ansätzen die Embryonen mit 5 Vol% Sauerstoff kultiviert. Es wurde immer eine Durchflussrate von 250 ml/Minute für die ganze Apparatur eingestellt. Man erwartet dadurch eine Durchflussrate in den einzelnen Kulturflaschen von ca. 21 ml/Min. (10,5 ml/Min./ Embryo).

**Grafik 4 :** Grafischer Verlauf einzelner Gasparameter; Vergleich zwischen Roller- und Rotator-Kulturmethode. (\*: Begasungsschemata, s. Tab.17)

**Verlauf des pH-Wertes im Vergleich zwischen Roller -und Rotatormethode**

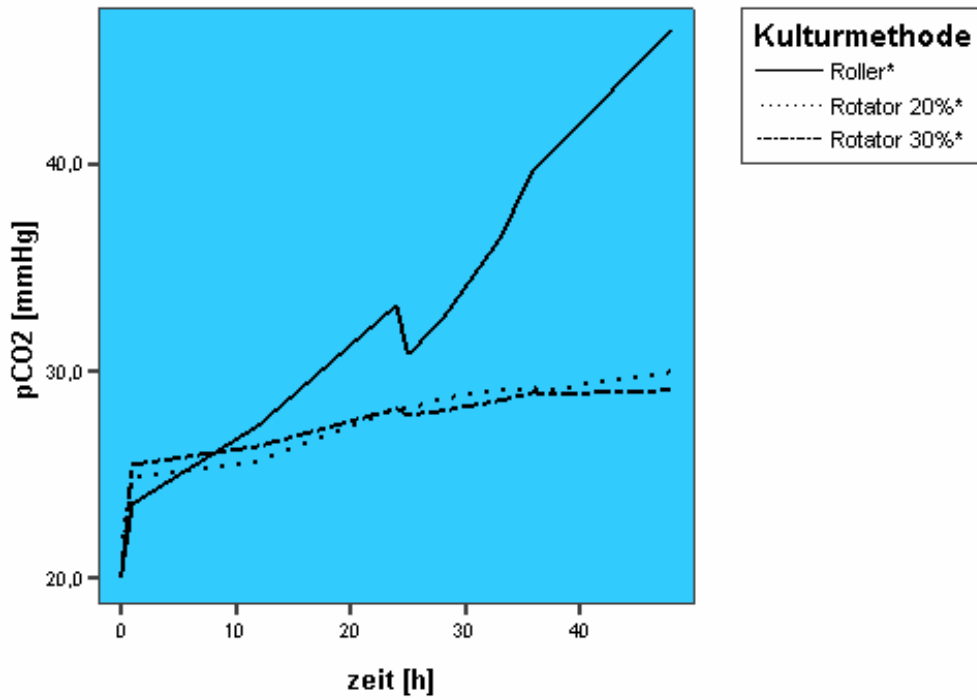


**Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Vergleich zwischen Roller -und Rotatormethode**

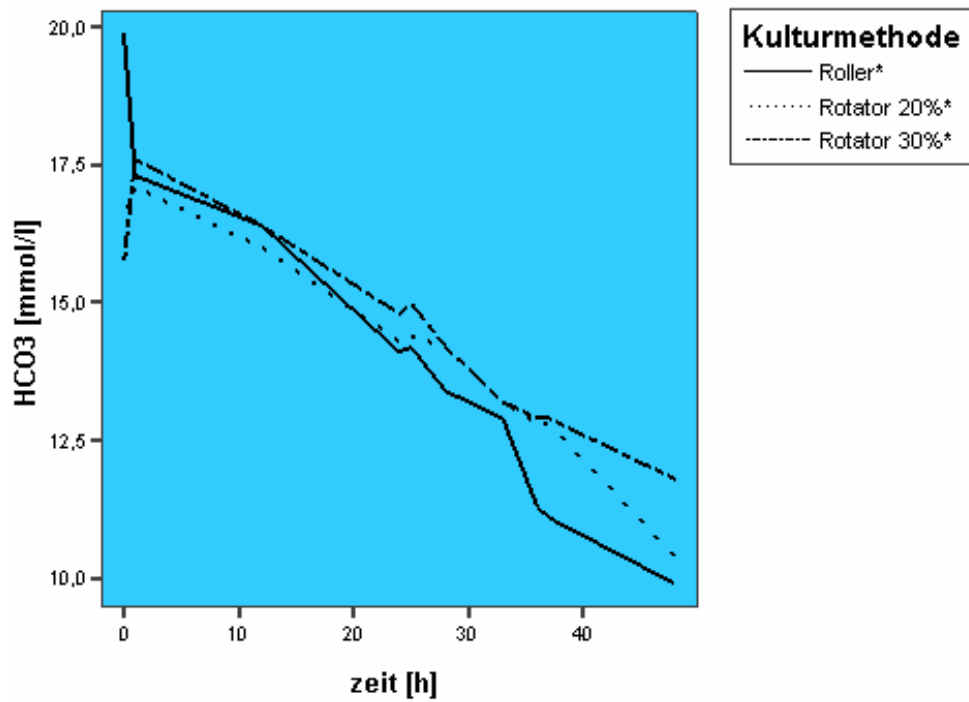




**Verlauf der Kohlendioxidkonzentration im Vergleich zwischen Roller -und Rotatormethode**



**Verlauf der Bikarbonatkonzentration im Vergleich zwischen Roller -und Rotatormethode**



Bei der Auswertung der Ergebnisse (Grafik 4) wurde deutlich, dass vor allem in der zweiten Hälfte des Kulturzeitraumes (24-48 Stunden) große Unterschiede zwischen einer kontinuierlichen- bzw. nicht-kontinuierlichen Begasung bezüglich des Verlaufes einzelner Gasparameter zu erkennen sind.

In der Roller-Kultur stieg der Sauerstoffgehalt im Serum nach 36 Stunden erwartungsgemäß sprunghaft innerhalb einer Stunde von ca. 70 mmHg auf über 400 mmHg an (Ergebnis der dreiminütigen Begasung nach 36 Stunden mit 50 Vol% O<sub>2</sub>; DFR: 4 NI/Min), während mit der kontinuierlichen Begasung im Rotator nach 24 Stunden erwartungsgemäß ein kontinuierlicher Anstieg von Sauerstoff innerhalb von zwei bis drei Stunden im Serum zu beobachten war (von circa 80 mmHg auf 150 mmHg (Rot 20%) bzw. 260 mmHg (Rot 30%); DFR: 250 ml/Min.). Die Kohlendioxidkonzentration nahm im Roller-System deutlich und kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum zu (von 20,4 mmHg auf über 50,2 mmHg). In den beiden Rotator-Kulturen stieg die CO<sub>2</sub>-Konzentration in den ersten 24 Stunden von ca. 21,5 mmHg auf ca. 28 mmHg an und konnte danach auf diesem Niveau (circa 28-29 mmHg) konstant gehalten werden. Die Konzentration von Bikarbonat nahm im Laufe der Kulturdauer in beiden Systemen ab, was an der Bildung von H<sup>+</sup>-Ionen durch den Stoffwechsel der Embryonen liegt. Doch trotz der hohen Kohlendioxidkonzentration nach 48 Stunden fiel die Bikarbonatkonzentration im Kulturmedium des Rollers nicht unter 10mmol/l ab. Der Abfall der Bikarbonatkonzentration im Roller nach 36 Stunden wurde durch die zu diesem Zeitpunkt durchgeführte Begasung deutlich reduziert. Auch in beiden Rotator-Kulturen kam es zu einem bemerkenswerten Abfall der Bikarbonatkonzentration auf 11-12 mmol/l, obwohl der Anstieg der Kohlendioxidkonzentration im Kulturmedium auf weniger als 30mmol/l anstieg. Der pH-Wert im Kulturmedium fiel sowohl in der Roller wie auch in den beiden Rotator-Kulturen im Versuchszeitraum (Tag 9,5-Tag 11,5) ab, wobei die Abnahme in der Roller-Kultur wesentlich stärker ausgeprägt war (von ca. 7,45 auf 7,09) als in den Rotator-Kulturen (von ca. 7,45 auf 7,17 (Rot 20%) bzw. -7,25 (Rot 30%)).

#### 5.1.4 Einfluss unterschiedlicher Begasungsschemata auf die Entwicklung der Embryonen

Neben der Zusammensetzung des Kulturmediums ist vor allem der Sauerstoffgehalt im zugeführten Gasgemisch von großer Bedeutung (s.Kap.2.4).

Um für den Kulturzeitraum (Tag 9,5-11,5) die geeignete Sauerstoffkonzentration im Gasgemisch zu ermitteln, wurden Versuchsansätze mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt.

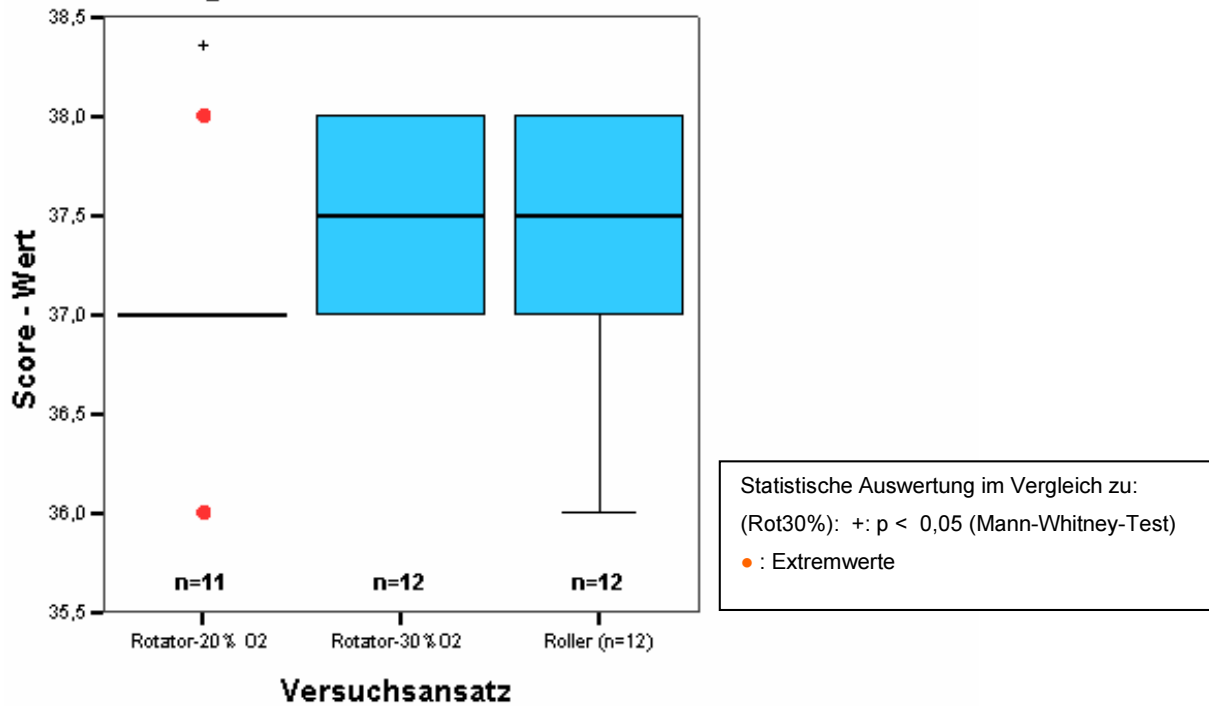
Die Embryonen, die mit nicht-kontinuierlicher Begasung kultiviert wurden (Roller-Ansatz) dienten als Kontrollgruppe, da dies in unserem Labor seit Jahren die Standardmethode für die Kultivierung von Rattenembryonen ist.

**Tab.18:** Unterschiedlicher Begasungsschemata für verschiedene Kultursysteme

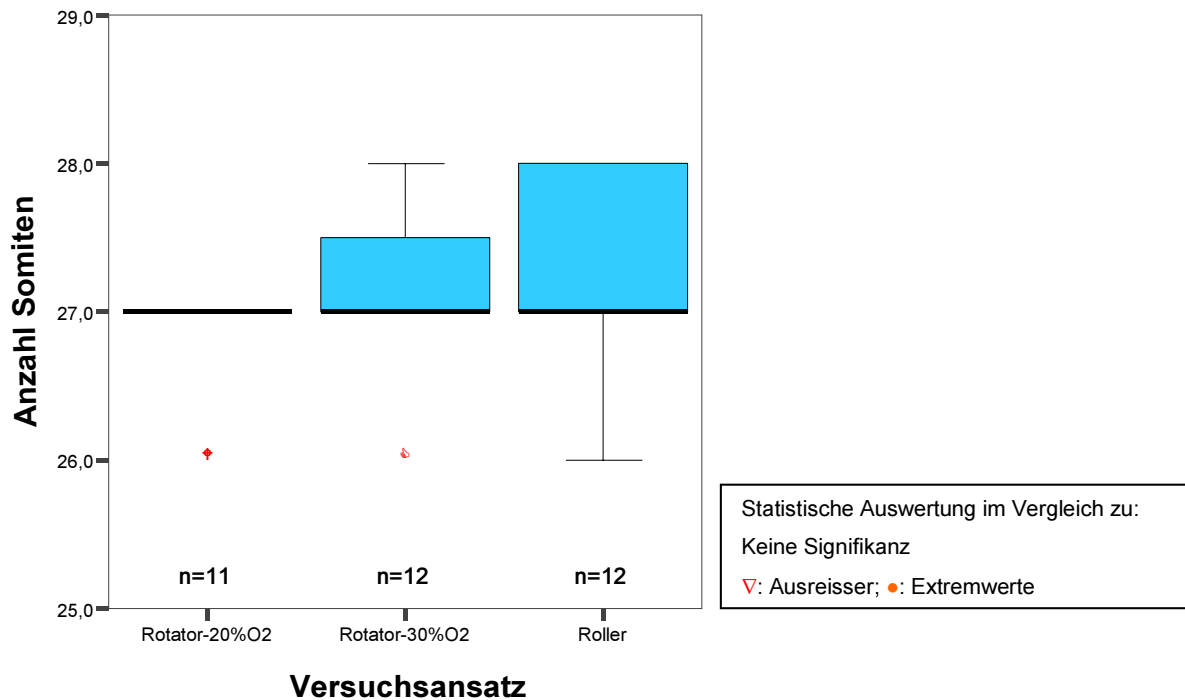
<b>Allg.Rahmenbed.</b>	<b>Rotator-Kultur</b>	<b>Rotator-Kultur</b>	<b>Roller-Kultur</b>
<b>Tag 9,5 – Tag 11,5</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>	
<b>Kulturmedium</b>	43 Vol% Rinderserum; 43 Vol% MyFCS; 14 Vol% HBSS (Puffer); keine Antibiotika; Rinderserum: hitzeinaktiviert, filtriert,		
<b>Inkubationstemp.</b>	38,0 °C ± 0,5°C		
<b>Gas-Durchflussrate:</b>	250 ml Gasgemisch/Minute		Je 4 NI/Min. bei jeder Begasung
<b>Anzahl Embryonen/ml Serum</b>	2 E. / 5 ml Serum	2 E. / 5 ml Serum	4 E. / 7 ml Serum
<b>Begasung (Angaben in Vol% Sauerstoff)</b>	T = 0-24 h: 5 T = 24 – 48 h: 20	T = 0-24 h: 5 T = 24 – 48 h: 30	T = 0-32 h: 5 T = 32 – 48 h: 50

**Grafik 5 :** Entwicklungsstand 11,5 Tage alter Rattenembryonen nach Kultivierung in der Roller- und Rotator-Kultur bei unterschiedlicher Sauerstoffkonzentration.

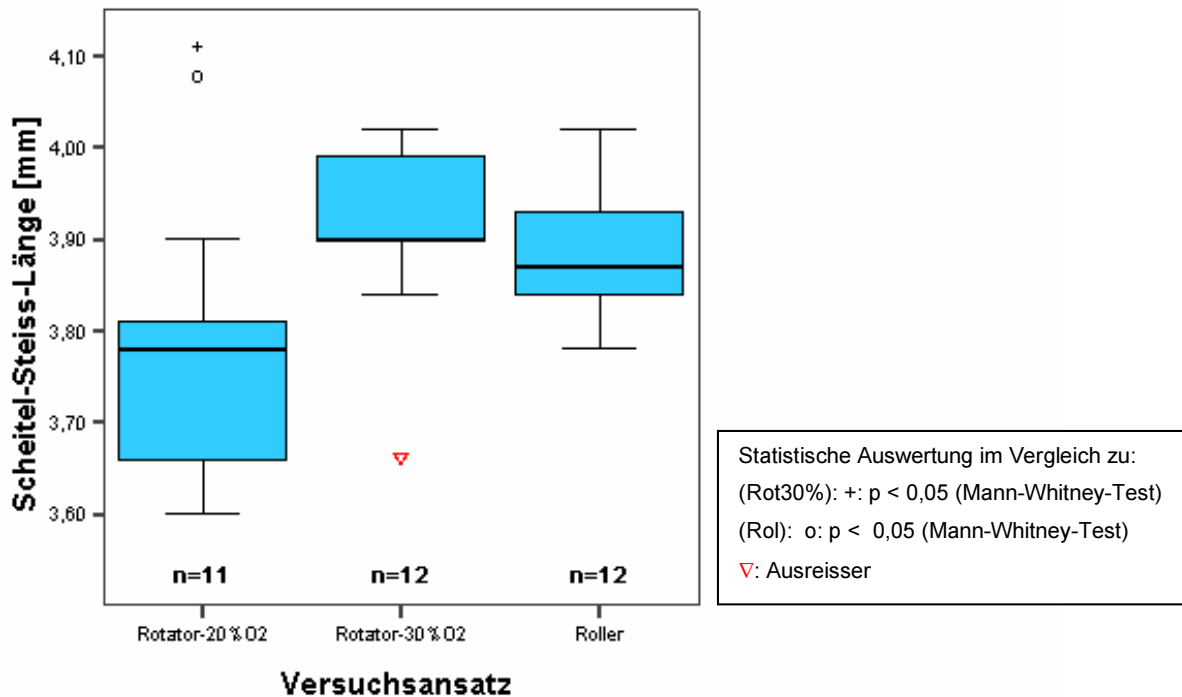
### Einfluß verschiedener Sauerstoffkonzentrationen in der Rotatorkultur auf den Score-Wert der Embryonen im Vergleich zur herkömmlichen Rollerkultur



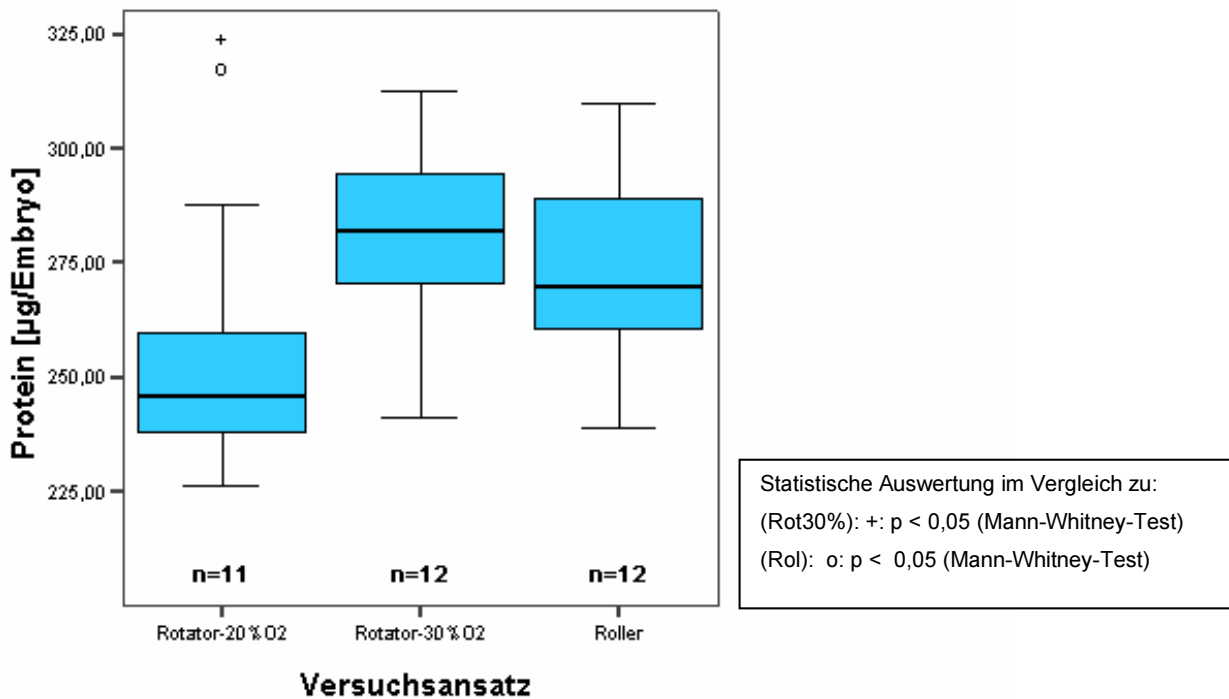
### Einfluß verschiedener Sauerstoffkonzentrationen in der Rotatorkultur auf die Anzahl der Somiten der Embryonen im Vergleich zur herkömmlichen Rollerkultur



**Einfluß verschiedener Sauerstoffkonzentrationen in der Rotatorkultur auf die Anzahl die Scheitel-Steiss-Länge der Embryonen im Vergleich zur herkömmlichen Rollerkultur**



**Einfluß verschiedener Sauerstoffkonzentrationen in der Rotatorkultur auf den Proteinwert der Embryonen im Vergleich zur herkömmlichen Rollerkultur**



In allen drei Versuchsansätzen zeigten die Embryonen eine zufrieden stellende Entwicklung. Strukturelle Abnormitäten traten in keiner Versuchsgruppe auf. Dennoch wurden Unterschiede in den Kulturergebnissen der kultivierten Embryonen in den drei Versuchsgruppen deutlich. Embryonen, die im Kulturzeitraum Tag 10,5-11,5 kontinuierlich im Rotator mit 30 Vol% Sauerstoff (Rot30%) begast wurden, erzielten die besten Ergebnisse in Bezug auf Wachstum und Differenzierung. Sie erreichten in den Parametern Scheitel-Steiß-Länge, Morphologischer Score und Protein die besten Resultate gegenüber den beiden Vergleichsgruppen. Beim statistischen Vergleich zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Embryonen der Rotator-30%-Methode (Rot 30%) und der Rotator-20%-Methode (Rot 20%) für die Parameter Morphologischer Score, Protein und Scheitel-Steiß-Länge. Hinsichtlich des Parameters Somitenzahl der einzelnen Embryonen erzielten die Embryonen im Versuchsansatz „Rot 30%“ auch bessere Ergebnisse als die Embryonen in „Rot 20%“. Dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant. Embryonen, die im Roller mit einer nicht kontinuierlichen Begasung kultiviert wurden, erzielten für den Parameter Somitenzahl das beste Ergebnis gegenüber den beiden Rotator-Ansätzen, wobei auch hier der Unterschied statistisch nicht signifikant war. Obwohl zwischen der Roller- und der Rotator-30%-Methode in keinem Bewertungsparameter ein statistisch signifikanter Unterschied berechnet wurde, entstand der Eindruck, dass die Embryonen in dem Rotator-30%-Ansatz eine bessere Entwicklung zeigten. Demzufolge wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen als Standardmethode für die Kultivierung im Kulturzeitraum Tag 9,5-Tag 11,5 eine kontinuierliche Begasung mit 30 Vol% Sauerstoff verwendet.