

**6 METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR VERLÄNGERUNG DES KULTURZEIT-
RAUMS VON 48 STUNDEN AUF 72 (96) STUNDEN**

Eine Verlängerung der Kulturdauer (Kap.2.3) stellt für den Embryo eine hohe Belastung dar. Die von uns geschaffenen äußeren Bedingungen müssen deshalb den hohen Ansprüchen des Embryos gerecht werden. Wie schon in Kapitel 2.3 beschrieben, gehört dazu neben einer Erneuerung des Kulturmediums und einer Erhöhung der Sauerstoffkonzentration, auch die Eröffnung der Fruchthüllen der Embryonen (Kap.6.2). Im Rahmen der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollte der Frage nachgegangen werden, ob mit der von Cockroft (1973) beschriebenen Technik, die ausschließlich Rattenserum als Kulturmedium verwendete, eine Verlängerung der Kultur von Rattenembryonen in Rinderserum über 48 Stunden hinaus erzielt werden kann. Oder aber müssen andere Techniken und Methoden entwickelt werden, um die Kulturdauer auf 72 (96) Stunden ausdehnen zu können?

6.1 Allgemeine Rahmenbedingungen für den gesamten Kulturzeitraum von 0 - 72 (96) Stunden im Rotator (Tag 9,5-Tag 12,5/13,5)

Tab. 19: Allg. Rahmenbedingungen für den Kulturzeitraum Tag 9,5-Tag 12,5/13,5 im Rotator

Allg. Rahmenbed.	Rotator-Kultur	Roller-Kultur
Tag 9,5 – Tag 13,5	(kontinuierliche Begasung)	(nicht-kontinuierliche Begasung)
Kulturmedium	43 % Rinderserum; 43 % MyFCS; 14 % HBSS (Puffer); keine Antibiotika; Rinderserum: hitzeinaktiviert, filtriert,	
Inkubationstemp.	38,0 °C ± 0,5°C	
Gas-Durchflussrate:	250 ml Gasgemisch/Minute	Je 4 NI/Min. bei jeder Begasung
Anzahl Embryonen/ ml Serum	Tag 9,5 - Tag 11,2: 2 E./ 5 ml Tag 11,2 - Tag 13,5: 1 E./ 5 ml	Tag 9,5 - Tag 11,2: 4 E./ 7 ml Tag 11,2 - Tag 13,5: 2 E./ 7 ml
Mediumwechsel	Nach 42 Stunden	
Begasung	T = 0-24 h: 5 Vol% O ₂ T = 24 – 42 h: 30 Vol% O ₂ T = 42 – 72 h: 60 Vol% O ₂ T = 72 – 96 h: 85 Vol% O ₂	T = 0-32 h: 5 Vol% O ₂ T = 32 – 42 h: 50 Vol% O ₂ T = 42 – 72 h: 60 Vol% O ₂ T = 72 – 96 h: 85 Vol% O ₂

6.2 Präparation der Rattenembryonen (Tag 11,2) mit der Technik nach Cockroft

Cockroft (1973) kultivierte 12,5 Tage alte Embryonen in Rattenserum erfolgreich mit der in Abb. 5 dargestellten Technik. Um zu überprüfen, ob die Cockroftsche Technik auf unser Kultursystem zu übertragen ist, wurden die Eizylinder am Tag 11,2 aus dem Uterus gelöst. Die kugelförmigen Deziduen wurden aufgerissen, um den Embryo frei zu präparieren. Anschließend wurden Dottersack und Amnion im Bereich des Rhombenzephalons in unmittelbarer Nähe des Ekto-plazentakonus geöffnet, um die Embryonen in Rinderserum (s.Tab.19) für 30 Stunden einer 60 Vol%-igen Sauerstoffbegasung auszusetzen.



Abb. 12: Embryo am Tag 12,5. Kulturbeginn Tag 11,2. Embryo wurde nach der Cockroftschen Technik präpariert. Vergrößerung: 12,5-fach; —: 1mm

Die so kultivierten Embryonen zeigten nach Beendigung der Kultur keinerlei Abnormitäten. Die Medianwerte für Protein betragen 831,5 µg/Embryo und für den Parameter Scheitel-Steiß-Länge 5,40 mm. Im Bereich des Kopfes war die Laminar terminalis entwickelt und der Isthmus rhombencephali war angedeutet. Ebenso war ein gut ausgebildeter Blutkreislauf erkennbar. Die Augenanlage zeichnete sich durch eine deutlich ausgebildete Linsengrube und die Nasenanlage durch ein deutliches Nasengrübchen aus.

Die Auswertung morphologischer Parameter zeigte, dass die 12,5 Tage alten Embryonen *in vitro* nach 30 Stunden Kulturdauer in Rinderserum in etwa den *In-vivo*-Embryonen an Tag 12,0 entsprachen.

Tab. 20: Entwicklungsstand 12,5 Tage alter Rattenembryonen *in vitro* nach 30 Stunden Kulturdauer in Rinderserum im Vergleich zu *In-vivo*-Stadien an Tag 12,0

		CR [mm]	SOM	Protein [µg/E.]	Morphologischer Score	Abn. [%]
<i>In vitro</i>	Q3	5,52	35	870,9	48,5	
Tag 12,5	Median	5,40*	34*	831,5*	47,5*	0
N = 13	Q1	5,22	34	776,2	46	
<i>In vivo</i>	Q3	5,88	37	975,3	52	
Tag 12,0	Median	5,64	36	912,0	51	0
N = 22	Q1	5,49	36	901,6	51	

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

*: gibt an, dass sich die entsprechenden Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) statistisch signifikant im Vergleich zu *In-vivo*-Stadien unterscheiden.

6.2.1 Die Eröffnung von Dottersack und Amnion nach 48 Stunden Kultur

Nachdem mit der Präparationstechnik von Cockroft 11,2 Tage alte Rattenembryonen erfolgreich für 30 Stunden kultiviert werden konnten (s.o.), sollte mit der gleichen Technik eine Verlängerung der Kulturdauer von 48 auf 72 Stunden (gesamte Kulturperiode Tag 9,5-12,5) erreicht werden. Dazu wurden die Embryonen in Rinderserum nach vorangegangener 42-stündiger Kultur mit der in Kap. 2.3 beschriebenen Technik präpariert (Eröffnung von Dottersack und Amnion im Bereich des Rhombencephalons) und bis zum Tag 12,5 weiter kultiviert.

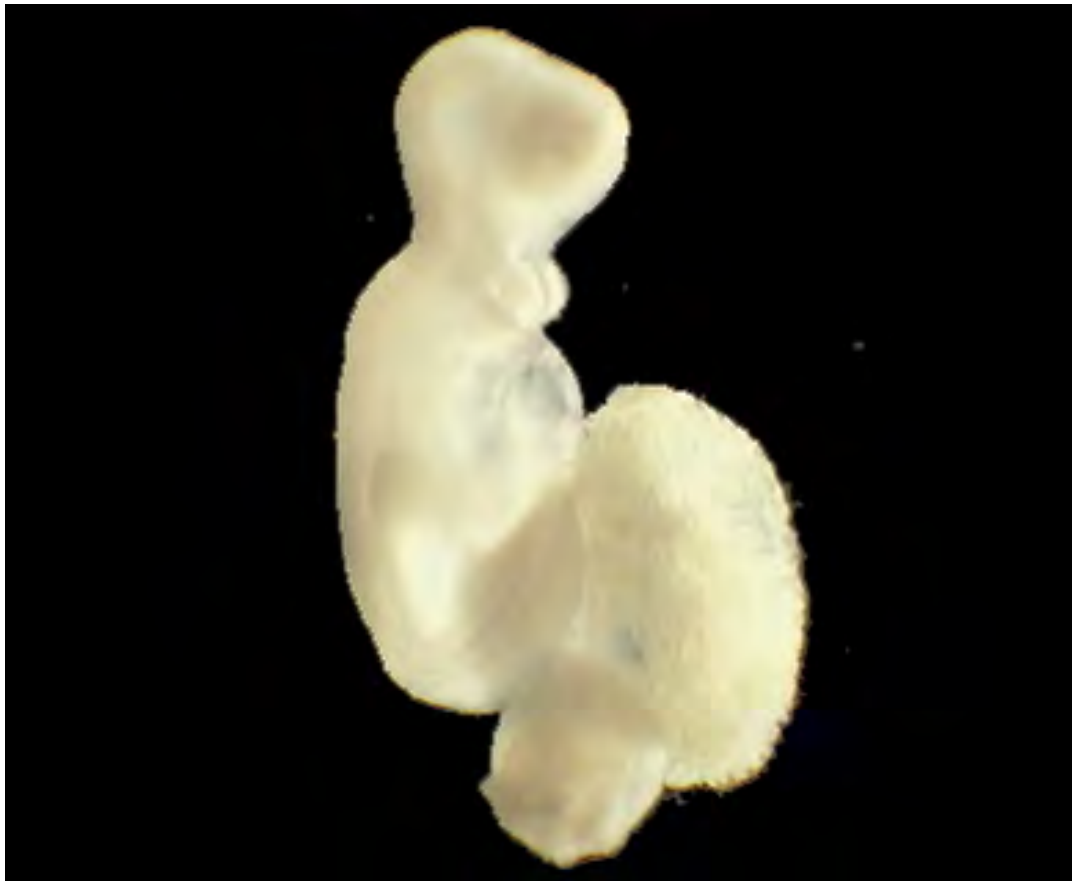


Abb. 13: 12,5 Tage alter Embryo nach 72 Stunden Kulturdauer (Tag 9,5 – Tag 12,5) im Rotator. Eröffnung von Amnion und Dottersack nach 42 Stunden mit der Cockroftschen Technik; Vergrößerung: 12,5-fach; —: 1mm

16 Embryonen wurden auf diese Art kultiviert. Nach einer 72-stündigen Kulturdauer (Embryonen Tag 12,5) zeigten alle Embryonen eine abnorme Entwicklung (Dysmorphogenese). In der Kopfanlage waren keine erkennbaren Gehirnbläschen ausgebildet. Augen- und Ohranlagen waren ebenfalls nicht erkennbar, die Extremitätenknospen nur im Ansatz vorhanden. Lediglich die Pulsation der Herzanlage war zu erkennen.

6.2.2 Ist die Eröffnung der embryonalen Fruchthüllen eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Verlängerung der Kultur über 48 Stunden hinaus?

Der beschriebene Versuch (s. Kap. 6.2.1) machte deutlich, dass die Präparationstechnik, wie sie von Cockroft für die Kultivierung von 12,5 Tage alten Rattenembryonen angewandt wur-

de, für die Kulturverlängerung von 9,5 Tage alten Embryonen in Rinderserum über 48 Stunden hinaus nicht geeignet war.

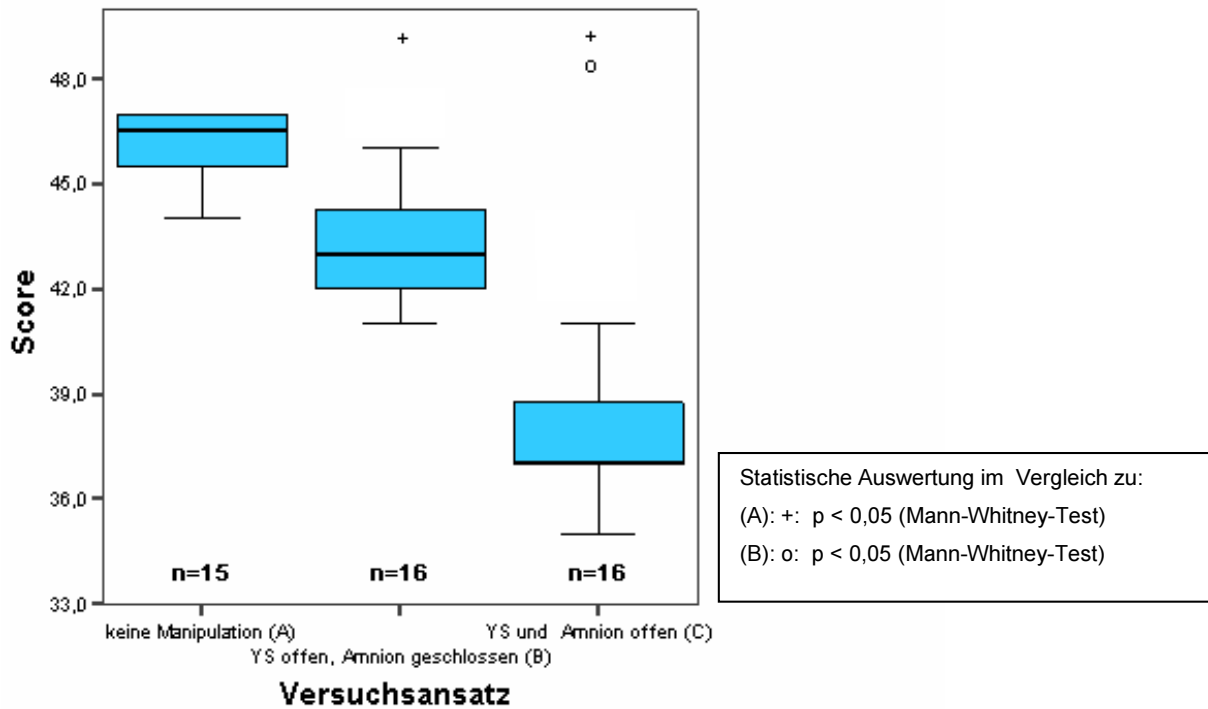
Mit Hilfe der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollte versucht werden, geeignete Voraussetzungen für eine Kulturverlängerung zu schaffen. Dazu wurden neben einem Wechsel des Kulturmediums und einer Erhöhung der Sauerstoffkonzentration nach 42 Stunden von 30 Vol% auf 60 Vol% auch unterschiedliche Techniken der Eröffnung der Fruchthüllen getestet.

Tab. 21: Versuchsbedingungen zur Verlängerung der Kulturdauer auf 72 Stunden (Tag 9,5-Tag 12,5)

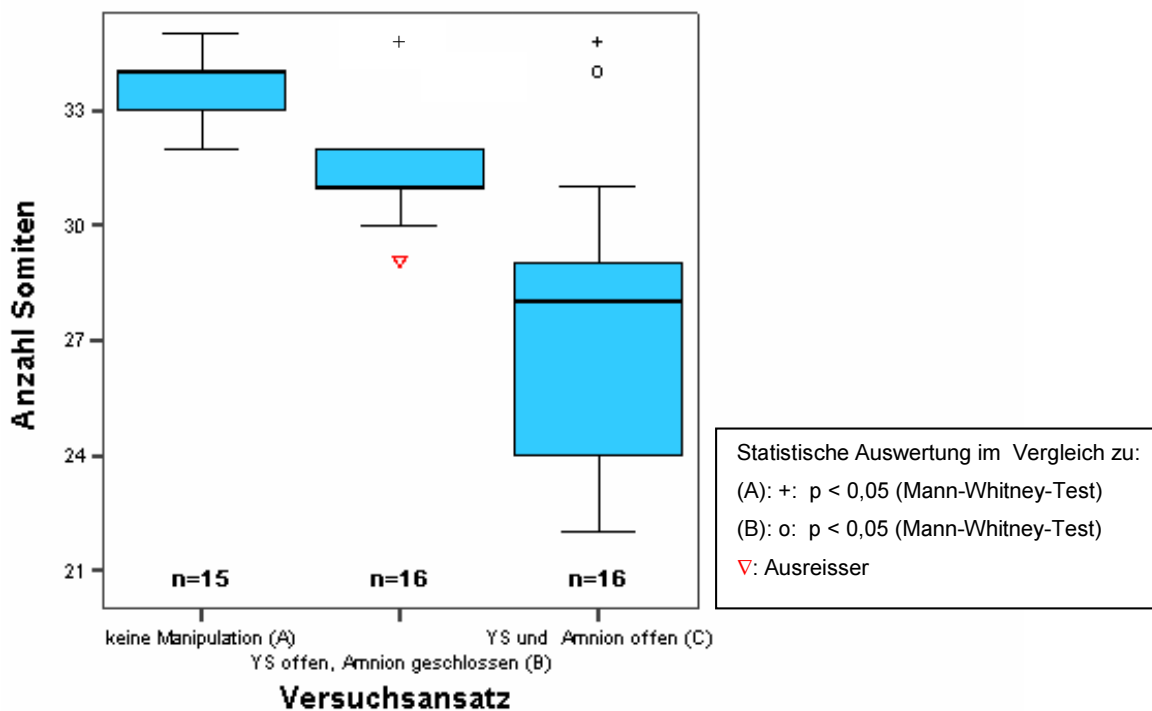
Rahmenbedingung für t = 42 – 72 Std.	Versuchsansatz
Rinderserum Mediumwechsel nach 42 Stunden Kultur	Gruppe A: Fruchthüllen (Dottersack und Amnion) bleiben intakt.
1 Embryo/ 5 ml Serum, 60 Vol% O ₂	Gruppe B: Eröffnung des Dottersacks im Bereich des Rhombencephalons; Amnion bleibt intakt.
DFR:250 ml Gas/Min. (DFR:Durchflussrate des Gases)	Gruppe C: Eröffnung des Dottersacks und des Amnion im Bereich des Rhombencephalons; der Embryo wird bis auf Höhe der Kie- menbögen vorsichtig aus den Fruchthüllen „herausgeschält“.

Grafik 6 : Kulturergebnis 12,5 Tage alter Embryonen, die 72 Stunden kultiviert wurden. Gegenüberstellung unterschiedlicher Präparationstechniken an den embryonalen Fruchthüllen.

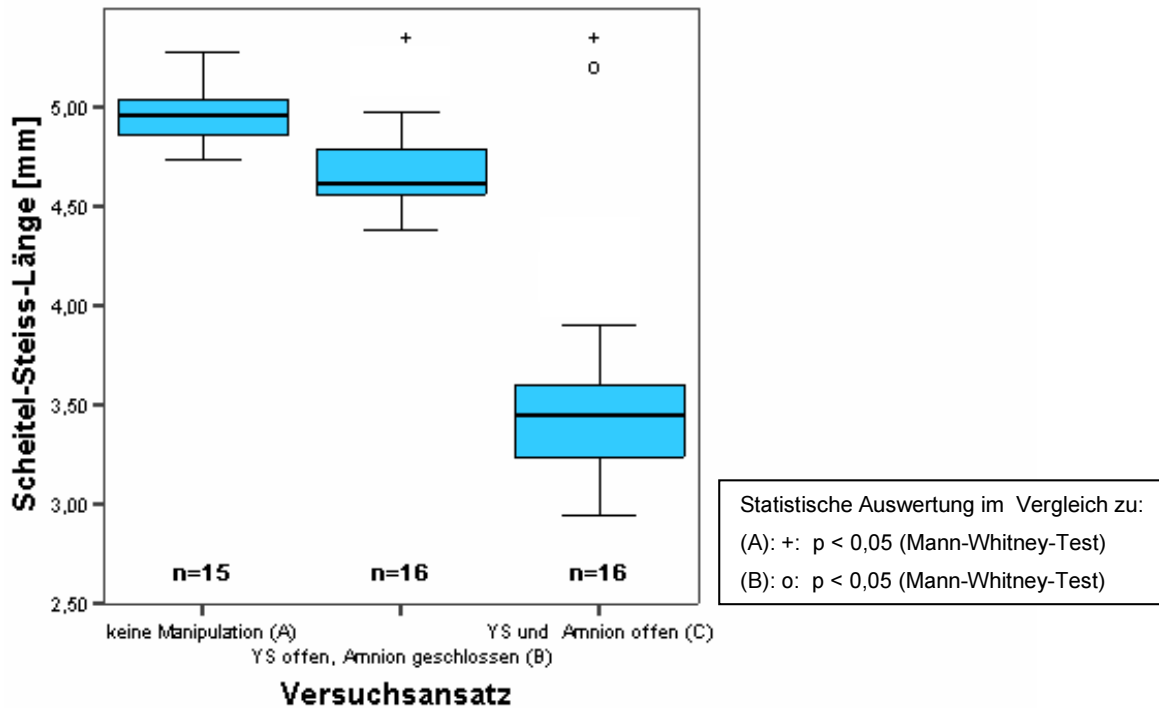
**Verlängerung des Kulturzeitraumes auf 72 Stunden;
Auswirkung verschiedener Präparationstechniken an den Fruchthüllen auf den Score-Wert der Embryonen**



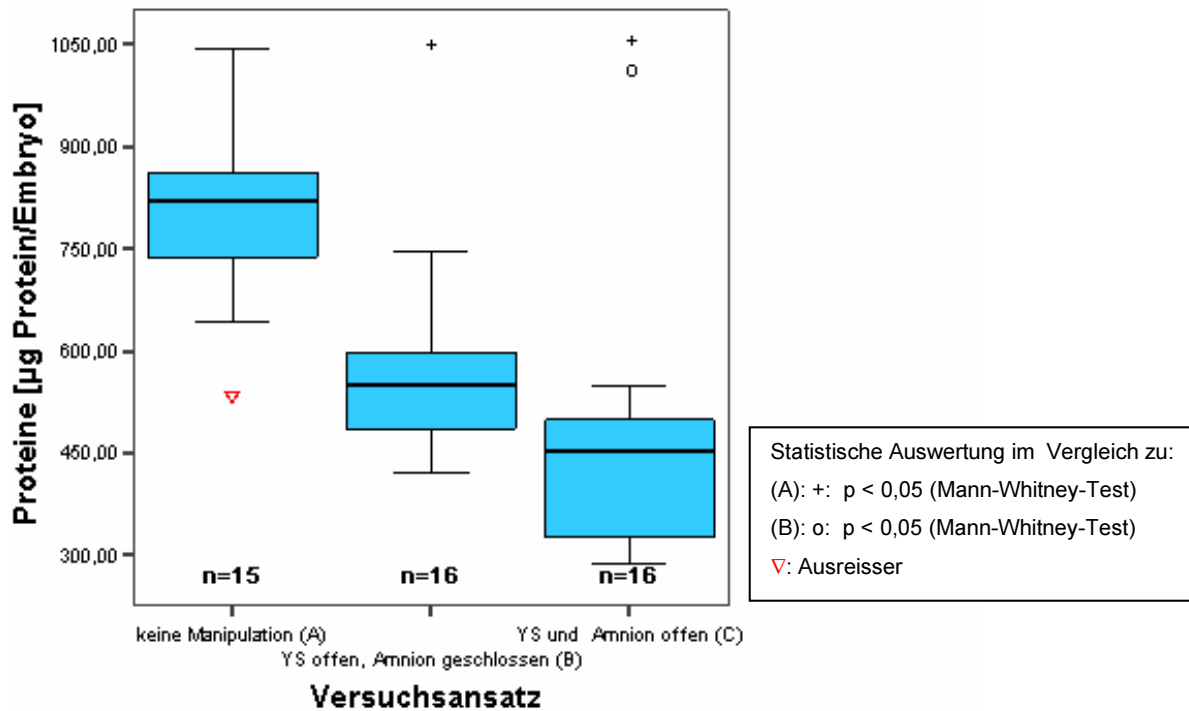
**Verlängerung des Kulturzeitraumes auf 72 Stunden;
Auswirkung verschiedener Präparationstechniken an den Fruchthüllen auf die Anzahl der Somiten der Embryonen**



**Verlängerung des Kulturzeitraumes auf 72 Stunden;
Auswirkung verschiedener Präparationstechniken an den
Fruchthüllen auf die Scheitel-Steiss-Länge der Embryonen**



**Verlängerung des Kulturzeitraumes auf 72 Stunden;
Auswirkung verschiedener Präparationstechniken an den
Fruchthüllen auf den Proteinwert der Embryonen**



Embryonen, die mit intakten Fruchthüllen von Tag 9,5-Tag 12,5 (Abb.14) kultiviert wurden (Gruppe A), erzielten in Bezug auf Wachstum und Differenzierung signifikant bessere Resultate als Embryonen der Gruppe B ($p < 0,01$) und Embryonen der Gruppe C ($p < 0,001$). Embryonen der Gruppe A erzielten die höchsten Werte für die Parameter Morphologischer Score, Scheitel-Steiß-Länge, Somitenzahl und Proteine. Im Median erreichten sie Proteinwerte von 819 $\mu\text{gProtein/Embryo}$, wohingegen Gruppe-B-Embryonen Proteinwerte im Median von 548 $\mu\text{Protein/Embryo}$ erreichten. Die Messung der Scheitel-Steiß-Länge ergab ähnlich große Unterschiede (4,96 mm/4,62 mm).

Embryonen der Gruppe B erzielten in der Bewertung einzelner Organanlagen wie Herzanlage, sowie Nase-, Ohren- und Augenanlage zwar ähnlich gute Ergebnisse wie Embryonen der Gruppe A, wiesen jedoch eine Entwicklungsstörung am Übergang vom Rumpf zum Schwanzansatz auf. Hier kam es zu einer Abknickung am Schwanzansatz. Diese Störung ist auf die Manipulation des Dottersacks zurückzuführen. Der aufgerissene Bereich im Dottersack stellt dabei eine mechanische Barriere für den Embryo dar, wodurch die Drehung des Embryos gestört wurde. Embryonen, bei denen sowohl der Dottersack als auch das Amnion eröffnet wurden (Gruppe C), waren stark retardiert und nur schwer mit dem morphologischen Score-System auszuwerten.

Die Embryonen der Gruppe A waren vollständig gedreht, das Linsensäckchen war ausgebildet, die Lamina terminalis deutlich sichtbar, ein Nasengrübchen gut zu erkennen, und eine Ohrblase war immer vorhanden.

Um die Ergebnisse richtig einordnen zu können, haben wir sie mit den Ergebnissen verglichen, die Embryonen erreichen, die in Rinderserum von Tag 11,2-Tag 12,5 mit der Präparationstechnik nach Cockroft kultiviert wurden (s.Abschnitt 6.2.). In den Bewertungsparametern „morphologischer Score, Somitenzahl und Proteinwerte“ erzielten sie Ergebnisse, die sehr nahe an die Werte der „Cockroft-Embryonen“ herankommen (s. Tab. 22). Einzig im Parameter „Scheitel-Steiß-Länge“ erzielten die „Cockroft-Embryonen“ ein signifikant besseres Ergebnis als die Embryonen, die über 72 Stunden kultiviert wurden.

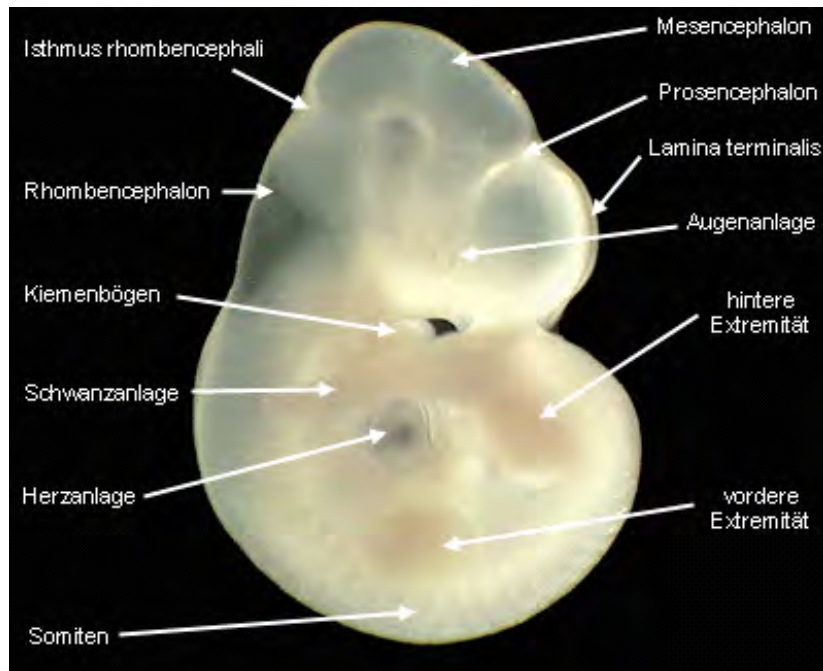


Abb 14: Ratteneembryo nach 72 Stunden Kultur; Rotator; keine Manipulation der Fruchthüllen (Fruchthüllen bleiben intakt); Vergrößerung: 20-fach; — 1mm



Abb 15: Ratteneembryo nach 72 Stunden Kultur; Rotator; Eröffnung des Dottersacks; Amnio intakt; Vergrößerung: 16-fach; — 1mm



Abb 16: Rattenembryo nach 72 Stunden Kultur; Rotator; Eröffnung von Dottersack; und des Amnion; Vergrößerung: 16-fach; — 1mm

Tab. 22: Entwicklungsstand 12,5 Tage alter Rattenembryonen *in vitro* nach 30 Stunden Kulturdauer im Vergleich zu *In-vitro*-Stadien nach 72 Stunden Kulturdauer, Kulturmedium: Rinderserum

		CR [mm]	SOM	Protein [µg/E.]	Morphologischer Score	Abn. [%]
In vitro (30)	Q3	5,52	35	870,9	48,5	
Tag 12,5	Median	5,40	34	831,5	47,5	0
N = 13	Q1	5,22	34	776,2	46,0	
In vitro (72)	Q3	5,04	34	864,5	47,0	
Tag 12,5	Median	4,96*	34	819,0	46,5	0
N = 15	Q1	4,86	33	713,0	45,0	

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

*: gibt an, dass sich die entsprechenden Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) statistisch signifikant im Vergleich zu *In-vitro*-Stadien (30) unterscheiden.

30: Kulturbeginn an Tag 11,2

72: Beginn der Kultur an Tag 9,5; Kultivierung mit intakten Fruchthüllen, frisches Kulturmedium nach 42 Stunden

6.2.3 Histologische Auswertung der Embryonen, die über 72 Stunden kultiviert wurden (Tag 9,5-Tag 12,5)

In allen drei Gruppen (Gruppe A, B, C; s. vorheriger Versuch) waren lichtmikroskopische Strukturen wie Herz, Kiemenbögen, Neuralrohr, Hirnbläschen, Augenanlage, Somiten dem physiologischen Entwicklungsstand in Form und Größe entsprechend ausgebildet.

Deutliche Unterschiede existierten allerdings hinsichtlich der Nekrose-Häufigkeit. Die Nekrosen waren vom apoptotischen Typ. Man erkannte dies daran, dass sowohl Zellen wie auch die Zellkerne optisch sehr dicht waren und in unterschiedlich große, ebenso dichte Fragmente zerfielen, den so genannten apoptotischen Körperchen. Diese Apoptosen zeigten keine fixen Prädelektionsstellen, sondern traten an wechselnden Stellen entweder diffus verteilt oder aber lokal konzentriert auf. Gut sichtbar waren sie in den Neuralepithelien (s. Abb. 17/18).

Embryonen der Gruppe A zeigten in nahezu allen Geweben wenige Nekrosen. In den Neuralepithelien, einem mitotisch besonders aktiven Gewebe, waren nur wenige nekrotische Zellen zu erkennen.

Die Embryonen der Gruppe C zeigten die meisten Nekrosen.

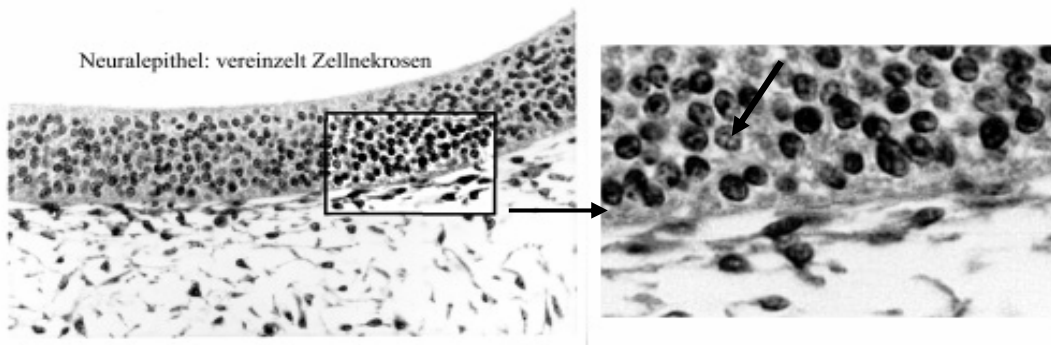


Abb.17: Neuralepithel nach 72 Stunden Kultur; Rotator; Dottersack und Amnion intakt (Gruppe A); Vergrößerung linkes Bild: 100-fach, schwarzer Pfeil in rechtem Ausschnitt zeigt Zellnekrosen.

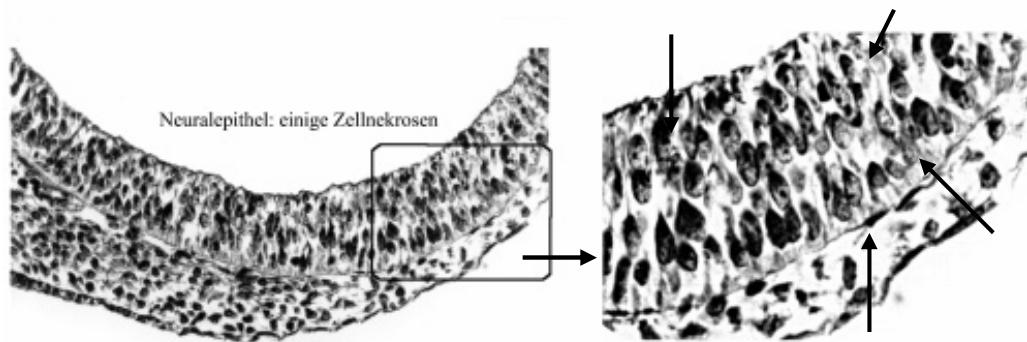


Abb.18: Neuralepithel nach 72 Stunden Kultur; Rotator; Eröffnung von Dottersack; Amnion intakt (**Gruppe B**); Vergrößerung linkes Bild: 100-fach, schwarze Pfeile in rechtem Ausschnitt zeigen Zellnekrosen.

6.3 Verlängerung der Kulturdauer auf 96 Stunden; Roller- und Rotator-Methode im Vergleich (Kulturzeitraum: Tag 9,5-Tag 13,5)

Anhand der bisher durchgeführten Versuche wurde deutlich, dass eine Verlängerung der Kulturdauer auf bis zu 72 Stunden möglich ist. Der nachfolgend beschriebene Versuch sollte klären, wie lange Rattenembryonen (Tag 9,5 der Gestation) in Rinderserum kultiviert werden können, ohne dass dabei eine starke Retardierung des Wachstums und der Differenzierung auftritt. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die Rotator-Methode durch ihre kontinuierliche Gaszufuhr bessere Voraussetzungen für die Kulturverlängerung bietet als die Roller-Kulturmethode. Für diesen Versuch wurden die Embryonen mitsamt ihren intakten Fruchthüllen weiterkultiviert. Die beiden alternativen Präparationstechniken wurden hierbei nicht mehr berücksichtigt, weil sie schon für die Kulturdauer von 72 Stunden wenig befriedigende Ergebnisse erbrachten.

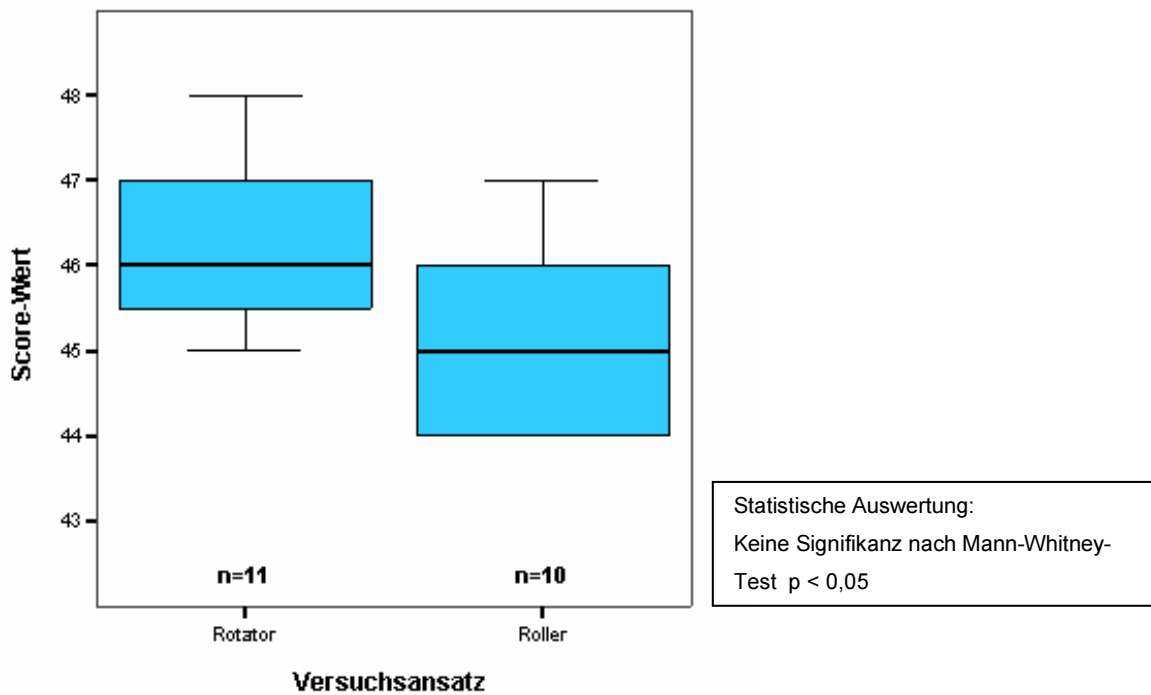
Tab. 23: Versuchsbedingungen in der Rotator- und Roller-Kultur für den Kulturzeitraum Tag 9,5-Tag 13,5

Allg. Rahmenbed.	Rotator-Kultur	Roller-Kultur
Tag 9,5-Tag 13,5	(kontinuierliche Begasung)	(nicht-kontinuierliche Begasung)
Kulturmedium	43 Vol% Rinderserum; 43 Vol% MyFCS; 14 Vol% HBSS (Puffer); keine Antibiotika; Rinderserum: hitzeinaktiviert, filtriert,	
Inkubationstemp.	38,0 °C ± 0,5°C	
Gas-Durchflussrate:	250 ml Gasgemisch/Minute	Je 4 NI/Min. bei jeder Begasung
Anzahl Embryonen/ ml Serum	Tag 9,5 - Tag 11,2: 2 E./ 5 ml Tag 11,2 - Tag 13,5: 1 E./ 5 ml	Tag 9,5 - Tag 11,2: 4 E./ 7 ml Tag 11,2 - Tag 13,5: 2 E./ 7 ml
Mediumwechsel	Nach 42 Stunden	
Begasung	T = 0 – 24 h: 5 Vol% O ₂ T = 24 – 42 h 30 Vol% O ₂ T = 42 – 72 h 60 Vol% O ₂ T = 72 – 96 h 85 Vol% O ₂	T = 0 – 32 h: 5 Vol% O ₂ T = 32 – 42 h 50 Vol% O ₂ T = 42 – 72 h 60 Vol% O ₂ T = 72 – 96 h 85 Vol% O ₂

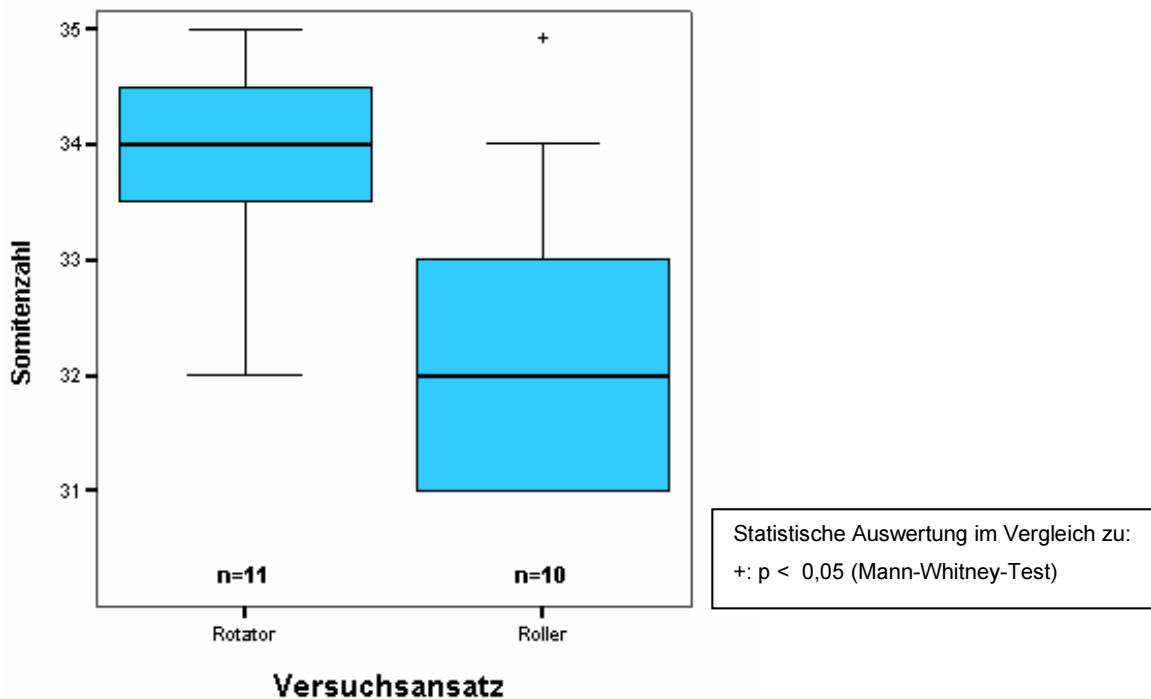
Die Auswertung dieses Versuches erfolgte mit Hilfe des morphologischen Score-Systems, einer Analyse des Verlaufes der Gasparameter (pO₂, pH-Wert, pCO₂, HCO₃) sowie einer Bewertung der histologischen Schnitte.

Grafik 7 : Kulturergebnis 13,5 Tage alter Embryonen, die 96 Stunden kultiviert wurden. Gegenüberstellung der Rotator- und Roller-Methode.

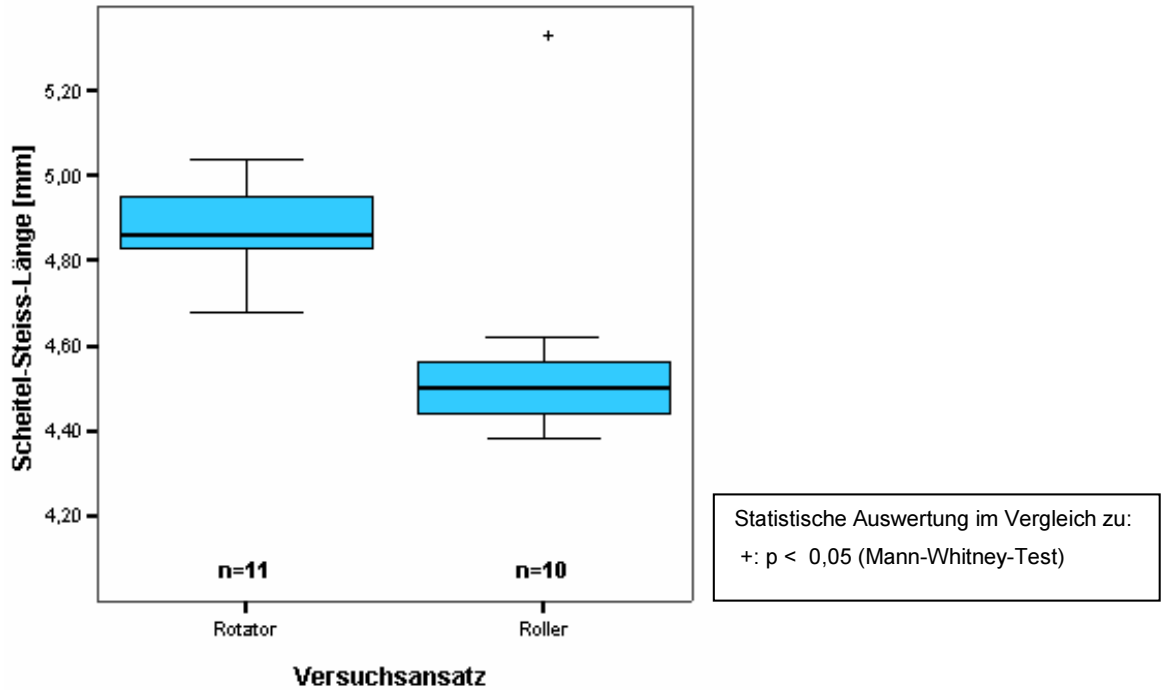
**Kulturzeitraum: Tag 9,5 - Tag 13,5:
Score-Wert der Embryonen
Vergleich zwischen Roller und -Rotatormethode**



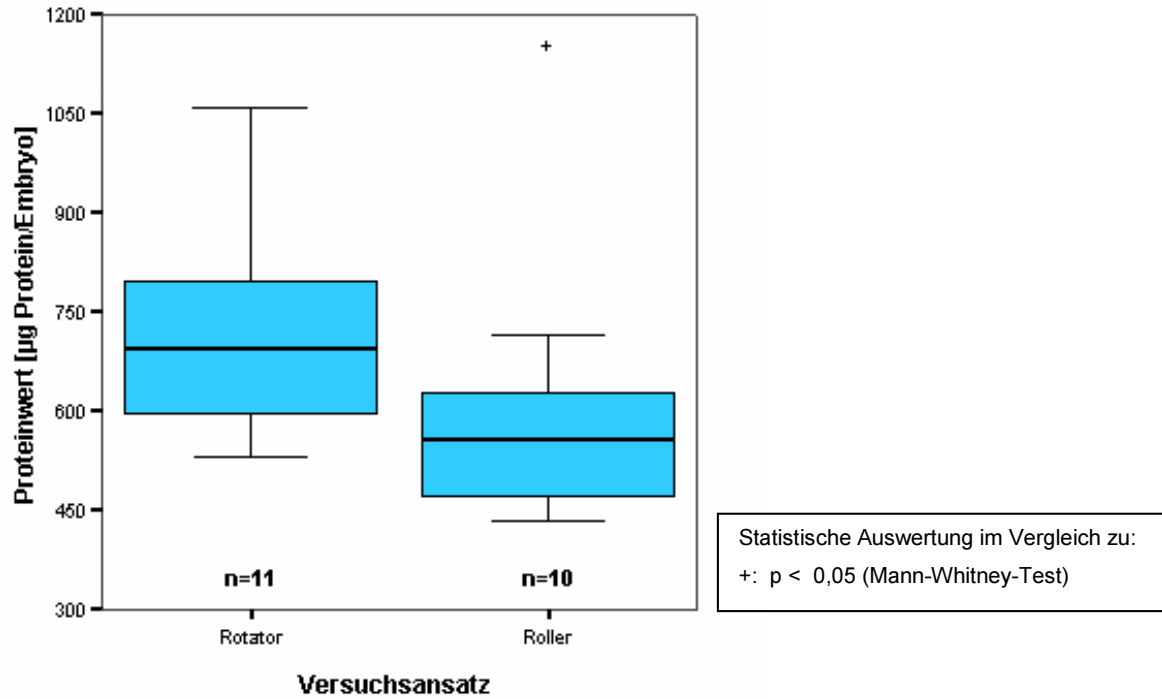
**Kulturzeitraum: Tag 9,5 - Tag 13,5
Anzahl an Somiten der Embryonen
Vergleich zwischen Roller und -Rotatormethode**



Kulturzeitraum: Tag 9,5 - Tag 13,5
Scheitel-Steiss-Länge der Embryonen
Vergleich zwischen Roller und -Rotatormethode



Kulturzeitraum: Tag 9,5 - Tag 13,5
Proteinwerte der Embryonen
Vergleich zwischen Roller und -Rotatormethode



Embryonen, die im Rotator über 96 Stunden kultiviert wurden, erzielten in den Wachstums- und Differenzierungsparametern eindeutig bessere Ergebnisse als Embryonen, die im Roller über 96 Stunden kultiviert wurden (Grafik 7). Für die Auswertungsparameter Scheitel-Steiß-Länge, Somiten und Proteinwert konnten statistisch signifikant bessere Resultate ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test) ermittelt werden. Embryonen im Rotator erzielten im Median eine Scheitel-Steiß-Länge von 4,86 mm, einen Proteinwert von 818,1 $\mu\text{g}/\text{Embryo}$ und 34 Somiten. Sie waren vollständig gedreht, wiesen aber im Vergleich zur normalen embryonalen Entwicklung am Schwanzansatz eine ungewöhnlich starke Beugung auf. Da dies als eine Entwicklungsstörung bewertet werden musste, wurden alle Embryonen als abnorm eingestuft (Abnormitätsrate: 100 %). Embryonen, die im Roller kultiviert wurden, erreichten hingegen im Median eine Scheitel-Steiß-Länge von 4,50 mm, einen Proteinwert von 510,0 $\mu\text{g}/\text{Embryo}$ und 32 Somiten. Sie waren vollständig gedreht, zeigten aber alle eine geringgradige Deformation im Bereich der Lamina terminalis und zusätzlich eine ausgeprägte Beugung im Bereich des Schwanzansatzes.

Am Ende der Kulturperiode fiel in beiden Methoden ein dem Amnion dicht aufliegender, spannungsarmer Dottersack auf, dessen Gefäß-Struktur nur noch schwer zu erkennen war. Die Pulsation der Herzanlagen (Herzschlag) war bei allen Embryonen erkennbar.

Tab.24 : Entwicklungsstand 13,5 Tage alter Rattenembryonen *in vitro* im Vergleich zwischen Rotator- und Roller-Kultur; (Kulturdauer: Tag 9,5-Tag 13,5)

		CR [mm]	SOM	Protein [$\mu\text{g}/\text{E.}$]	Morphologischer Score	Abn. [%]
Rotator	Q3	4,92	34,5	842,3	47	
Tag 13,5	Median	4,86*	34*	818,1*	46	100
N = 11	Q1	4,82	33,5	780,8	45,5	
Roller	Q3	4,58	33	625,9	46	
Tag 13,5	Median	4,50	32	510,0	45	100
N = 10	Q1	4,43	31	485,6	44	

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

*: gibt an, dass sich die entsprechenden Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test) statistisch signifikant im Vergleich zu „Rollerembryonen“ unterscheiden.

6.3.1 Verlauf der Gasparameter im Kultursystem über einen Zeitraum von 96 Stunden; Rotator- und Roller-Methode im Vergleich

Die gewählten Mess-Zeitpunkte waren 0 – 24 – 25 – 32 – 33 – 42 – 43 – 72 – 73 - 96 [Stunden].

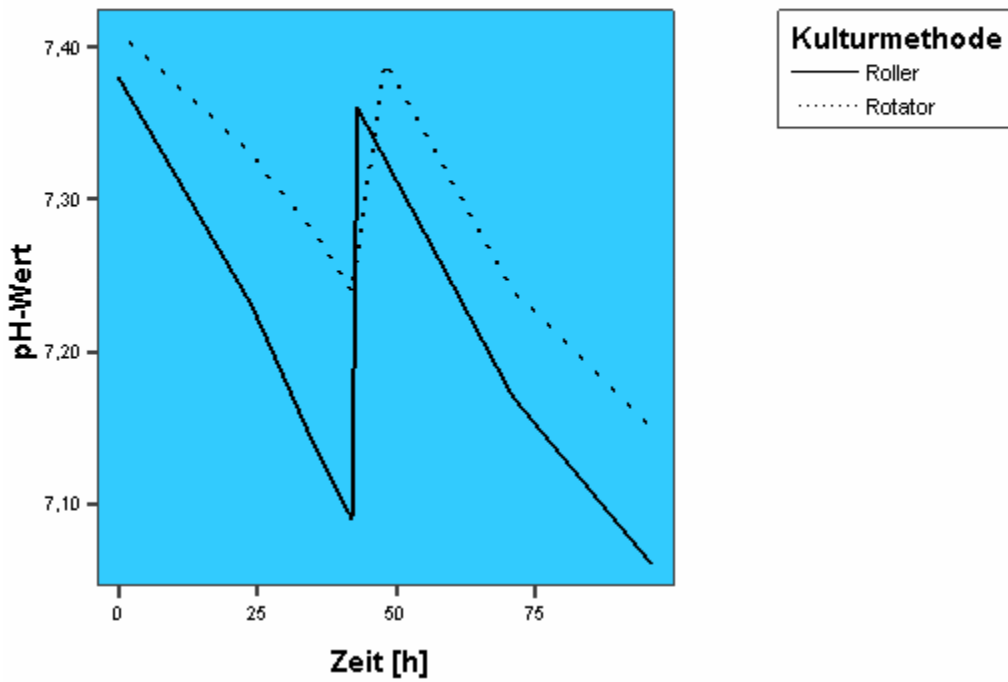
Untersuchte man den Konzentrationsverlauf einzelner Blutgase über den Kulturzeitraum von 96 Stunden (Grafik 7), so stellte man fest, dass durch die Erneuerung des Kulturmediums und eine Veränderung des Gasgemisches nach 42 Stunden Kulturdauer die Konzentrationen von Bikarbonat und Kohlendioxid annähernd wieder ihre Ausgangswerte zu Beginn der Kultur (Tag 9,5) erreichten. Auch der pH-Wert stieg durch die Erneuerung des Mediums wieder auf 7,36 an. Einzig die Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium erhöhte sich, bedingt durch die von außen zugeführte Menge an Sauerstoff im Gasgemisch, im Verlauf des Kulturzeitraumes stetig. Der pH-Wert sank im zweiten Versuchszeitraum (Tag 11,2 (42h)-Tag 13,5 (96h)) in beiden Kulturmethoden stärker ab als im vergleichbaren ersten Versuchszeitraum (Tag 9,5-Tag 11,2). Nach der ersten Kulturphase (Zeitpunkt des Mediumwechsels) sank der pH-Wert auf 7,24 (Rotator) bzw. 7,11 (Roller) ab, während er am Ende der gesamten Kulturphase im Rotator auf 7,11 und im Roller auf 7,06 abfiel. Der Verlauf der Bikarbonatkonzentration war in beiden Versuchszeiträumen tendenziell ähnlich, wobei im zweiten Versuchszeitraum der Abfall im Rotator geringer war (von 14,7 auf 10,9 mmol/L) als im Roller (von 14,7 auf 9,8 mmol/L).

Am deutlichsten unterschieden sich Roller und Rotator im Verlauf der Kohlendioxidkonzentration. Im Rotator wurde am Ende der jeweiligen Kulturabschnitte ein deutlich geringerer Konzentrationsanstieg von Kohlendioxid gemessen (von 22,3 auf 38,4 mmHg), als im Roller (von 22,4 auf 50,2 mmHg).

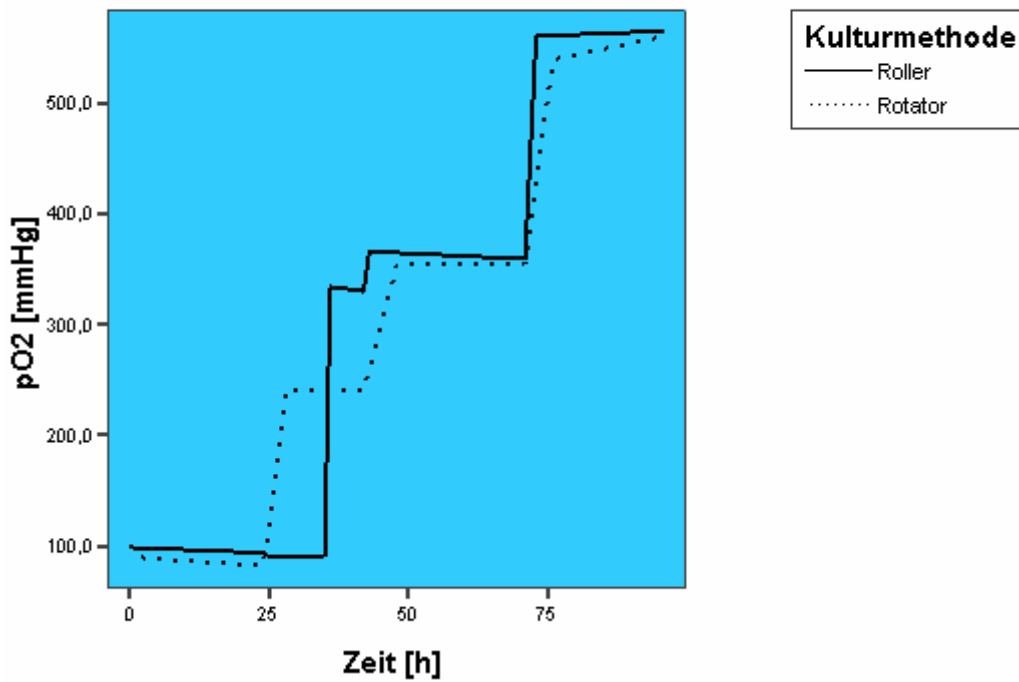
Die einzige messbare Größe, die in beiden Ansätzen ähnliche Werte erzielte, war die im Medium gemessene Sauerstoffkonzentration. Diese stieg in beiden Methoden von ca. 98 mmHg (Tag 9,5 (0h)) über ca. 355 mmHg (Tag 11,5 (48h)-12,5 (72h)) auf fast ca. 600 mmHg in der letzten Kulturphase. Erwartungsgemäß kam es durch die nicht-kontinuierliche Begasung innerhalb kürzester Zeit zu einer Erhöhung der Serum-O₂-Konzentration (max. eine Stunde). Eine kontinuierliche Begasung im Rotator erzielte final ähnliche Werte, jedoch fielen die Stufen hier deutlich sanfter aus.

Grafik 8 : Verlauf verschiedener Gasparameter über ein Dauer von 96 Stunden;
im Vergleich Rotator-Kultur und Roller-Kultur

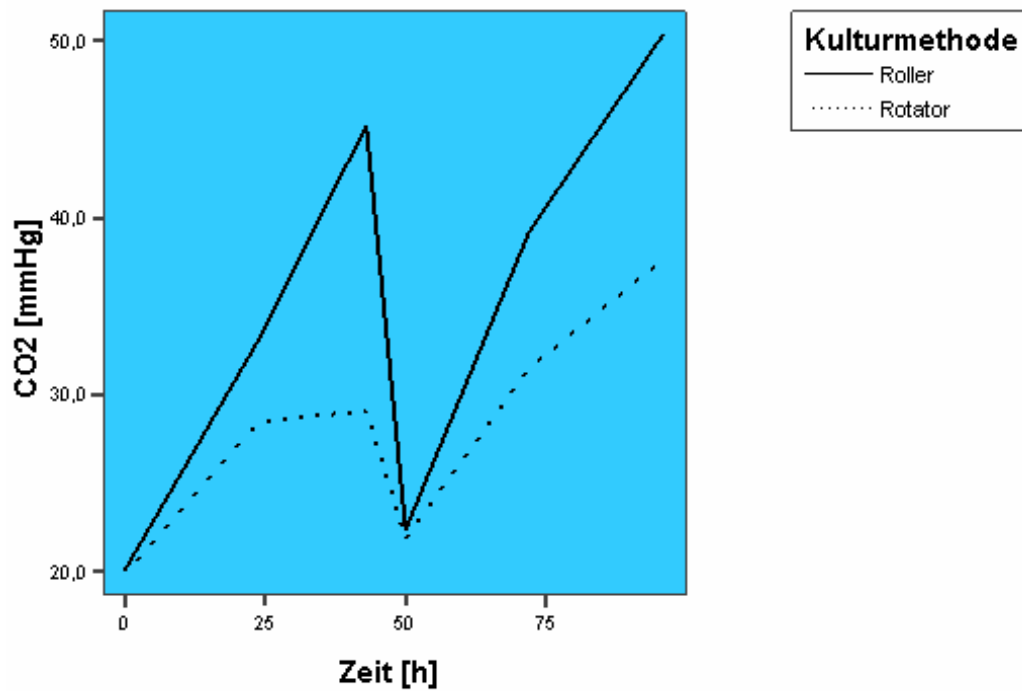
Verlauf des pH-Wertes über einen Kulturzeitraum von 96 Stunden; Vergleich zwischen Roller -und Rotatormethode



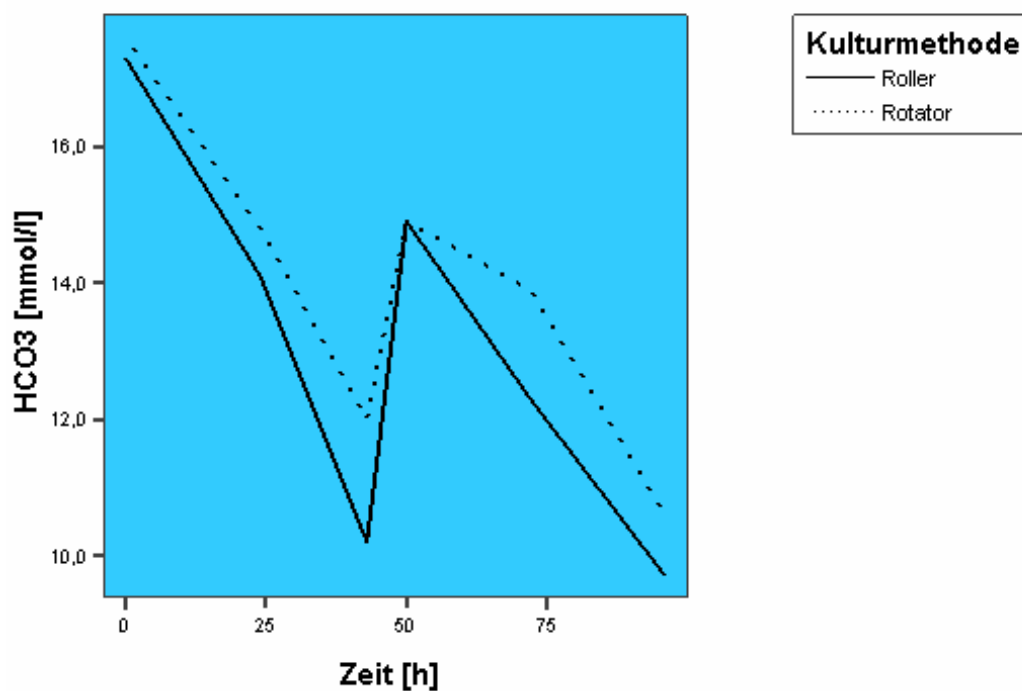
Verlauf der Sauerstoffkonzentration über einen Kulturzeitraum von 96 Stunden; Vergleich zwischen Roller -und Rotatormethode



Verlauf der Kohlendioxidkonzentration über einen Kulturzeitraum von 96 Stunden; Vergleich zwischen Roller -und Rotatormethode



Verlauf der Bikarbonatkonzentration über einen Kulturzeitraum von 96 Stunden; Vergleich zwischen Roller -und Rotatormethode



6.3.2 Histologische Auswertung der Embryonen, die über 96 Stunden kultiviert wurden (Tag 9,5-Tag 13,5).

Bei der Bewertung der histologischen Schnitte der über 96 Stunden kultivierten Embryonen in der Rotator- wie Roller-Methode (Abb. 19/20) fielen zahlreiche Nekrosen (Apoptosen) auf. Diese kamen in allen Geweben diffus verteilt oder aber auch manchmal lokal gehäuft vor. Manche Organe waren durch das Ausmaß der Nekrosen im Vergleich zu ihrer normalen Größe verkleinert (z.B.: Herz, Dicke des Neuralepithels, Somiten). In den durch Zelluntergänge aufgelockerten Mesenchymarealen waren große, weitlumige und dünnwandige Gefäße, die nur durch eine einzige Endothelschicht begrenzt waren, entstanden.

Insgesamt fiel die histologische Bewertung der Embryonen in der Rotator-Kultur besser aus als die der in der Roller-Kultur kultivierten Embryonen. Dennoch konnte festgehalten werden, dass die Embryonen sowohl im Rotator als auch im Roller nicht dem erwarteten Entwicklungsstand entsprachen (s. Abb. 21/22). Die Embryonen beider Gruppen wiesen eine deutliche Retardierung auf und zeigten gegenüber Embryonen, die 72 Stunden kultiviert wurden, eine Stagnation in Wachstum und Differenzierung.

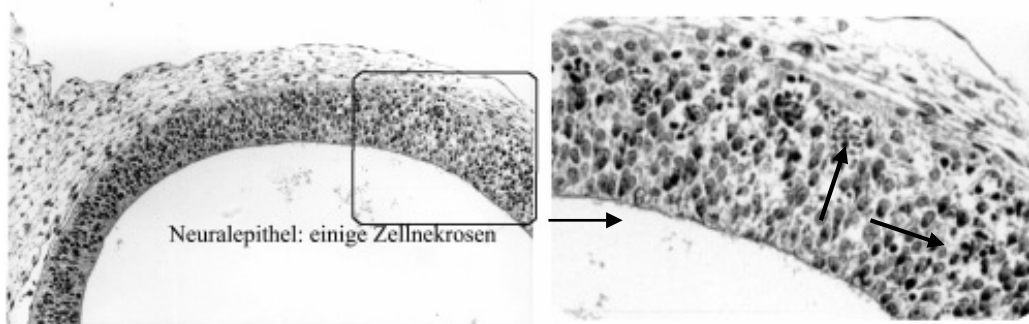


Abb.19: Neuralepithel; Rattenembryo nach 96 Stunden Kultur im **Rotator**
Vergrößerung linkes Bild: 100-fach, schwarze Pfeile in rechtem Ausschnitt zeigen Zellnekrosen.

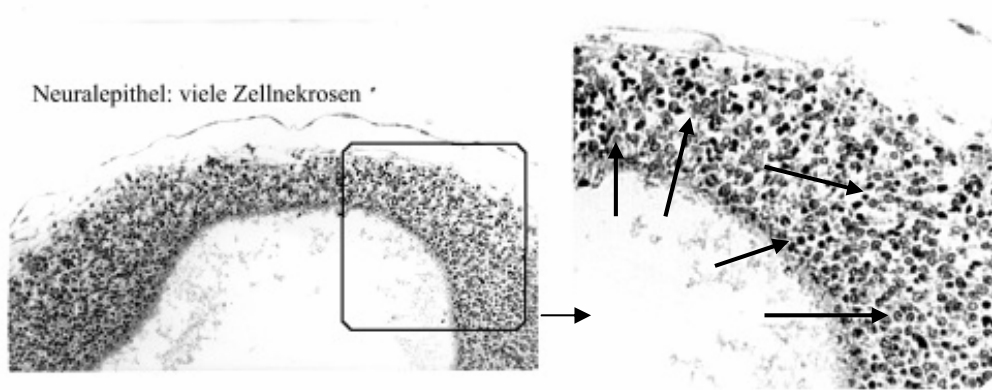


Abb.20: Neuralepithel; Rattenembryo nach 96 Stunden Kultur im **Roller**
Vergrößerung: 100-fach, schwarze Pfeile in rechtem Ausschnitt zeigen Zellnekrosen.



Abb. 21: Rattenembryo nach 96 Stunden Kultur im Rotator, Vergrößerung:16-fach;
——: 1mm



Abb.22: Rattenembryo nach 96 Stunden Kultur im Roller, Vergrößerung:16-fach;
——: 1mm