

## **7 Untersuchungen zu den Auswirkungen von Ethanol auf 9,5 Tage alte Embryonen über einen Kulturzeitraum von 48 bzw. 72 Stunden**

Mit Hilfe von Ethanol, dessen embryotoxische Wirkung in der WEC bekannt ist, wollten wir die Auswirkungen einer Modellsubstanz in unterschiedlicher Konzentration bei variierender Kulturzeit auf Rattenembryonen untersuchen.

Untersucht wurde der direkte Effekt von Ethanol in einer Konzentration von 1, 3 und 6 mg/ml auf 9,5 Tage alte Embryonen nach 48 bzw. 72 Stunden Kulturdauer. Als Referenzwerte dienten jeweils die Ergebnisse von Kontrollembryonen, die in ethanolfreiem Rinderserum bei gleichen Kulturbedingungen kultiviert wurden.

Die so kultivierten Embryonen wurden mit unserem morphologischen Score-System ausgewertet.

### **7.1 Einfluss von Ethanol auf 9,5 Tage alte Embryonen nach 48 Stunden Kultur**

Die Ergebnisse (Abb. 23; Grafik 9) zeigten eindeutig, dass Embryonen in den Kulturmedien, die 3 mg Ethanol/ml Kulturmedium(KM) und 6 mg Ethanol/ml KM enthalten, signifikant schlechtere Kulturergebnisse (Man-Whitney-Test:  $p < 0,05$ ) zeigten als Kontrollembryonen bzw. Embryonen mit 1 mg Ethanol/ml KM (s. Abb 23).

Die Embryonen, die gegenüber 3 mg Ethanol/ml KM exponiert wurden waren im Vergleich zu den Kontrollembryonen und gegenüber den 1 mg Ethanol/ml KM exponierten Embryonen kleiner (Scheitel-Steiß-Länge im Median 0,3 mm weniger), hatten geringere Proteinwerte (über 50 µg/Embryo weniger), weniger Somiten (mehr als ein Somitenpaar weniger im Median) und wiesen einen schlechteren morphologischen Score auf (der im Median mehr als zwei Punkte unter dem der Kontrollembryonen liegt).

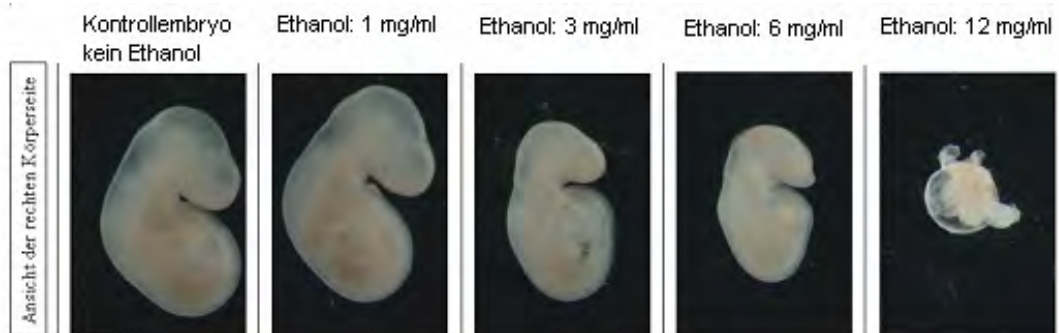
Eine Konzentration von 6 mg/ml Ethanol im Kulturmedium führte bei den Embryonen zu massiven Veränderungen in der Kopfanlage. Auch Augen-, Ohren- und Nasenanlage zeigten deutliche Retardierungsmerkmale. Darüber hinaus wurde bei steigender Ethanolkonzentration im Kulturmedium eine mangelhafte Drehung der Embryonen beobachtet.

Eine Konzentration von 1 mg Ethanol/ml KM hatte im Untersuchungszeitraum Tag 9,5-Tag 11,5 auf die Entwicklung der Embryonen keinen Einfluss. Die untersuchten Embryonen zeigten in allen Bewertungsparametern Ergebnisse, die mit denen der Kontrollembryonen vergleichbar waren.

Wir haben in den Versuchsreihen genau protokolliert, welche Entwicklungsstadien der Embryonen eingesetzt wurden. Hier konnten wir eindeutig eine Stadienabhängigkeit der Embryonen gegenüber Ethanol nachweisen. Es zeigte sich, dass jüngere Embryonen (Vor-Somiten-Stadium, 14a) deutlich sensibler gegenüber steigenden Ethanolkonzentrationen reagieren als ältere Embryonen (Spätes-Kopffalten-Stadium, 14d). So zeigten Embryonen (Stadium 14d), die in einem Kulturmedium mit einer Ethanolkonzentration von 3 mg/ml kultiviert wurden ähnliche Ergebnisse in ihrem Wachstum und ihrer Differenzierung wie Kontrollembryonen im Vor-Somiten-Stadium (14a). Setzte man aber junge Embryonen (14a) in ein Kulturmedium mit 3 mg Ethanol/ml KM, so lagen sie in ihrer Entwicklung deutlich hinter den Kontrollembryonen (14a).

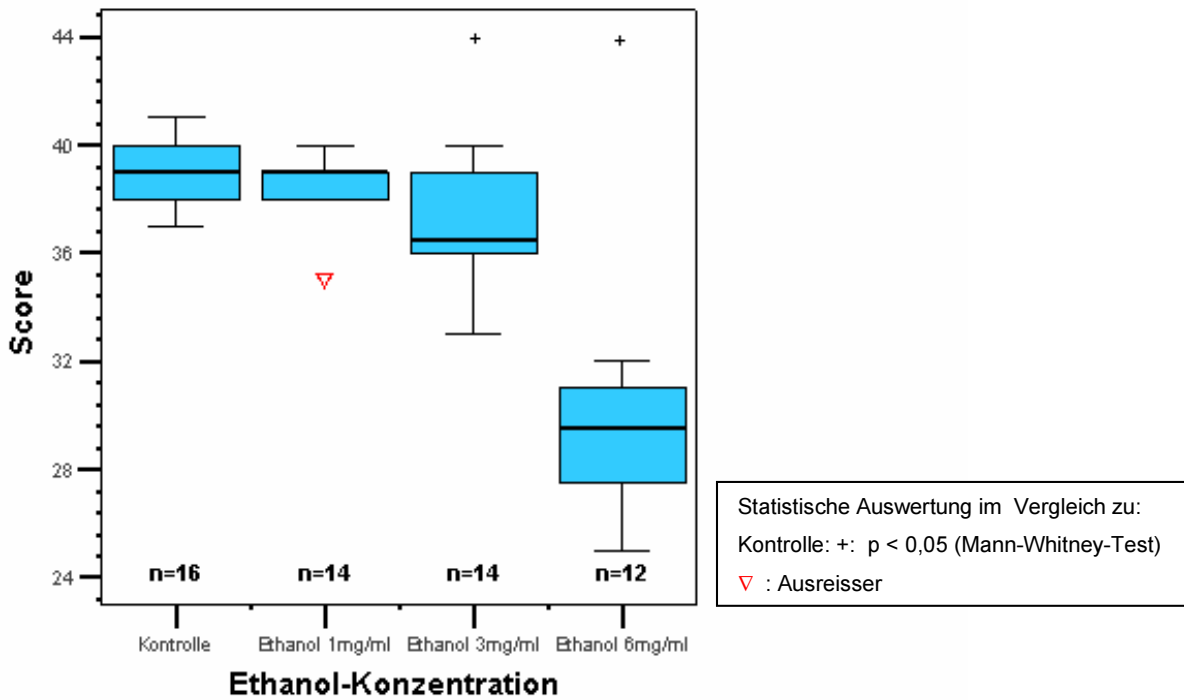
Eine abnorme Entwicklung bei Embryonen trat in diesem Kulturzeitraum bei Ethanolkonzentrationen von 12 mg/ml KM und mehr auf. Auf die Darstellung dieser Ergebnisse wurde verzichtet, da schon eine Konzentration von 6 mg Ethanol/ml KM zu deutlichen Retardierungsmerkmalen bei den Embryonen führte.

**Abb. 23:** Darstellung der Auswirkung unterschiedlicher Ethanolkonzentrationen auf Rattenembryonen nach 48-stündiger Kulturdauer an Tag 11,5  
— : 1mm

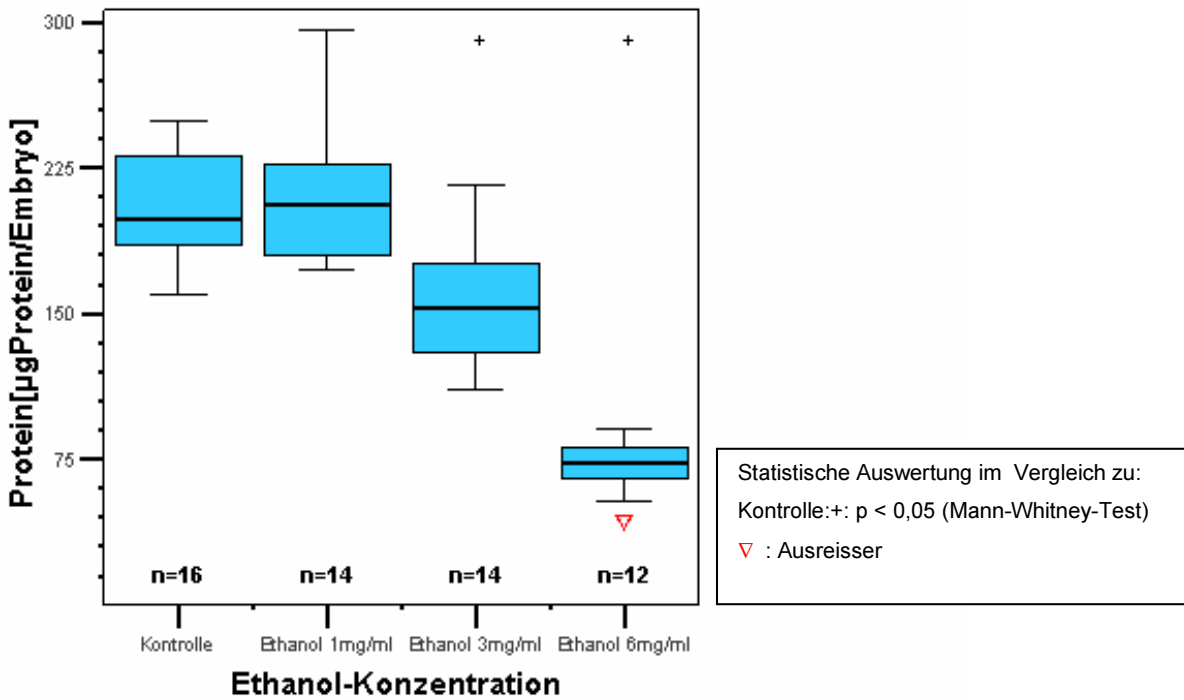


**Grafik 9 :** Kulturergebnisse 11.5 Tage alter Embryonen nach Exposition mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen.

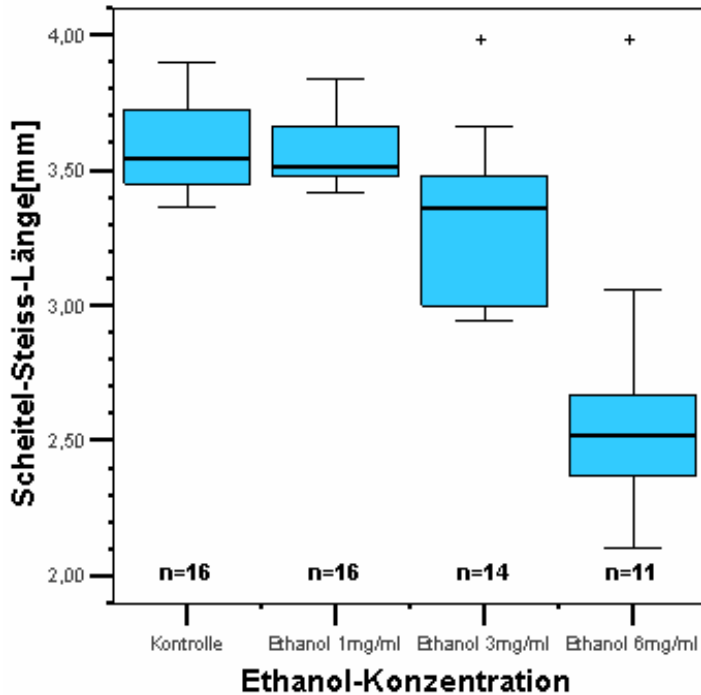
**Auswirkungen verschiedener Ethanolkonzentrationen auf den Score-Wert von Rattenembryonen nach 48-stündiger Kulturdauer in Rinderserum**



**Auswirkungen verschiedener Ethanolkonzentrationen auf den Proteinwert von Rattenembryonen nach 48-stündiger Kulturdauer in Rinderserum**

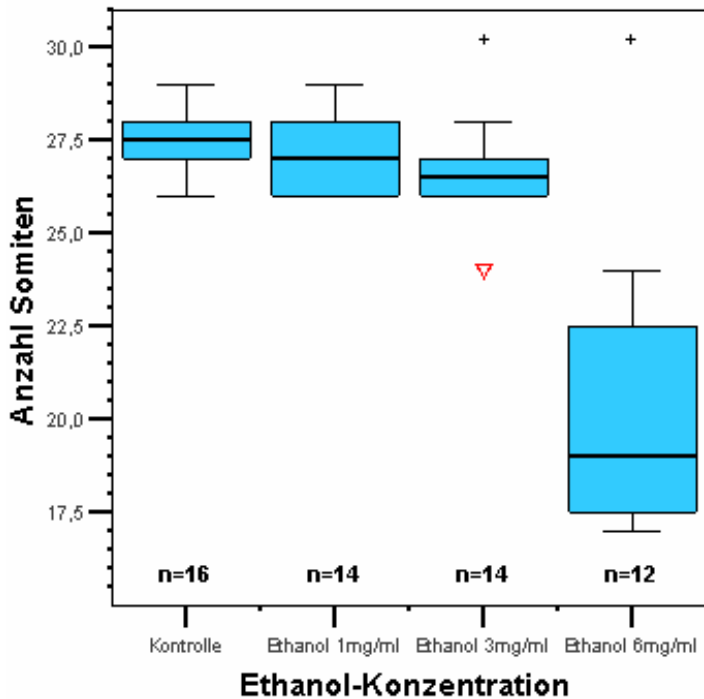


**Auswirkungen verschiedener Ethanolkonzentrationen auf die Scheitel-Steiss-Länge von Rattenembryonen nach 48-stündiger Kulturdauer in Rinderserum**



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

**Auswirkungen verschiedener Ethanolkonzentrationen auf die Anzahl der Somiten von Rattenembryonen nach 48-stündiger Kulturdauer in Rinderserum**



Statistische Auswertung im Vergleich zu:  
Kontrolle: +:  $p < 0,05$  (Mann-Whitney-Test)  
▽: Ausreisser

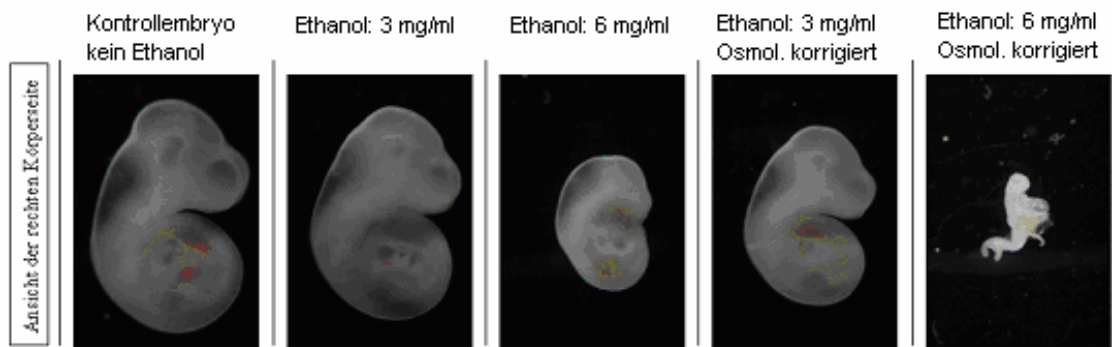
## 7.2 Auswirkungen von Ethanol auf 9,5 Tage alte Embryonen nach 72-stündiger Kulturdauer

Untersucht wurde der direkte Effekt von Ethanol in einer Konzentration von 1, 3 und 6 mg/ml KM auf 9,5 Tage alte Embryonen nach 72 Stunden Kulturdauer. Darüber hinaus wurde der mögliche Effekt eines Osmolaritätsanstiegs im Kulturmedium, der durch die Zugabe von Ethanol entsteht, untersucht.

Die Effekte von Ethanol auf die Embryonen (die jeweiligen Versuchsgruppen setzten sich aus Embryonen der Entwicklungsstadien, 14a-14d, zusammen) waren nach einer 72-stündigen Kulturdauer größer als nach 48-stündiger Kulturdauer (Abb. 24; Grafik 10). Im Vergleich zu den Kontrollembryonen führte hier schon eine Ethanolkonzentration von 1 mg/ml KM zu einem signifikant schlechteren Kulturergebnis in den Bewertungsparametern Morphologischer Score, Protein und Scheitel-Steiß-Länge (Man-Whitney-Test:  $p < 0,05$ ). Für die Parameter Somiten waren die Ergebnisse der gegenüber 1 mg Ethanol/ml KM exponierten Embryonen auch schlechter. Gegenüber den Kontrollembryonen lag aber kein signifikanter Unterschied vor. Bei einer Ethanolkonzentration von 3 und 6 mg Ethanol/ml KM zeigten die Embryonen gegenüber den Kontrollembryonen in allen Bewertungsparametern signifikant schlechtere Ergebnisse (Man-Whitney-Test:  $p < 0,05$ ). Embryonen, die in 6 mg Ethanol/ml KM kultiviert wurden, wiesen Retardierungserscheinungen auf.

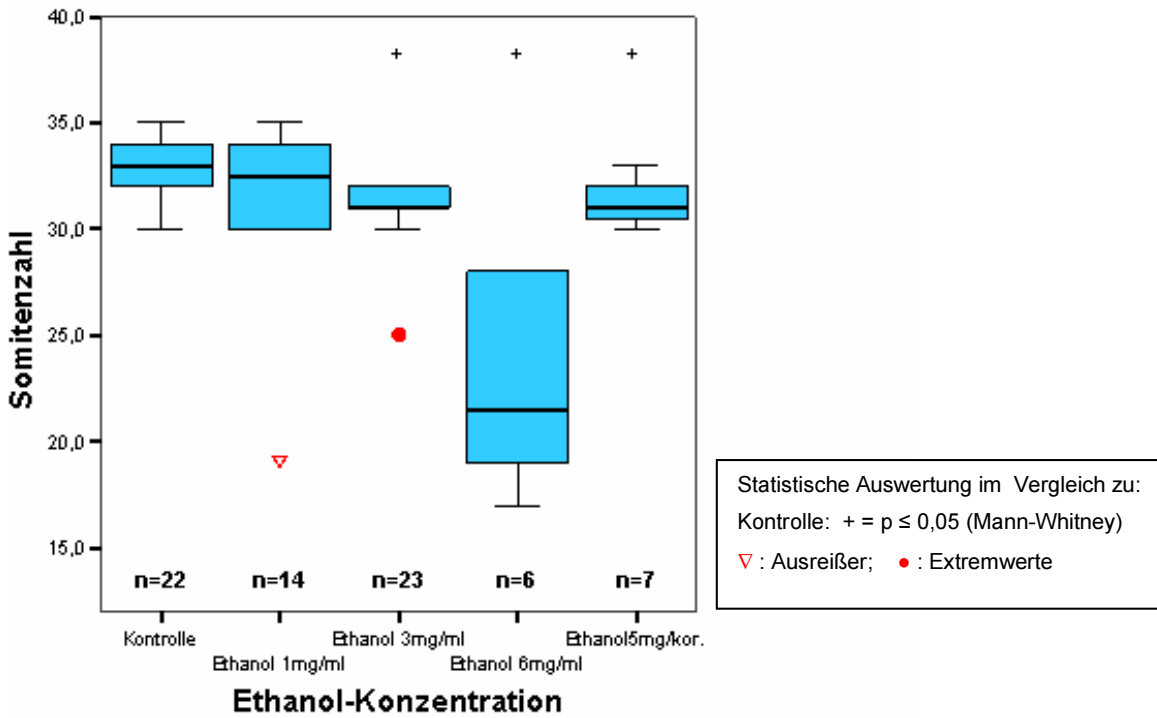
Auch bei einer 72-stündigen Kulturdauer zeigte sich, dass junge Embryonen (14a) deutlich schlechtere Ergebnisse erzielten als Ältere. Embryonen im „Späten-Kopffalten-Stadium“ waren weniger sensibel gegenüber einer Ethanolkonzentration von bis zu 3 mg/ml KM. Sie erzielten bessere Entwicklungsergebnisse als Kontrollembryonen im „Vor-Somiten-Stadium“ (s. Abb. 24). Durch die Zugabe von Ethanol stieg die Osmolarität im Kulturmedium (s. Tab. 11). In unseren Untersuchungen wurde durch Zugabe von destilliertem Wasser versucht, die Erhöhung der Osmolarität auszugleichen. Es zeigte sich aber, dass ein Osmolaritätsausgleich zu keinem besseren Entwicklungsergebnis der Embryonen führte (s. Abb. 24, Grafik 10). Bei einer Ethanolkonzentration von 6 mg/ml KM führte die Zugabe von 2,0 ml destilliertem Wasser/Kulturflasche zu massiven Missbildungen der Embryonen.

**Abb. 24:** Darstellung der Auswirkung unterschiedlicher Ethanolkonzentrationen auf Embryonen nach 72-stündiger Kulturdauer an Tag 12,5  
— : 1mm

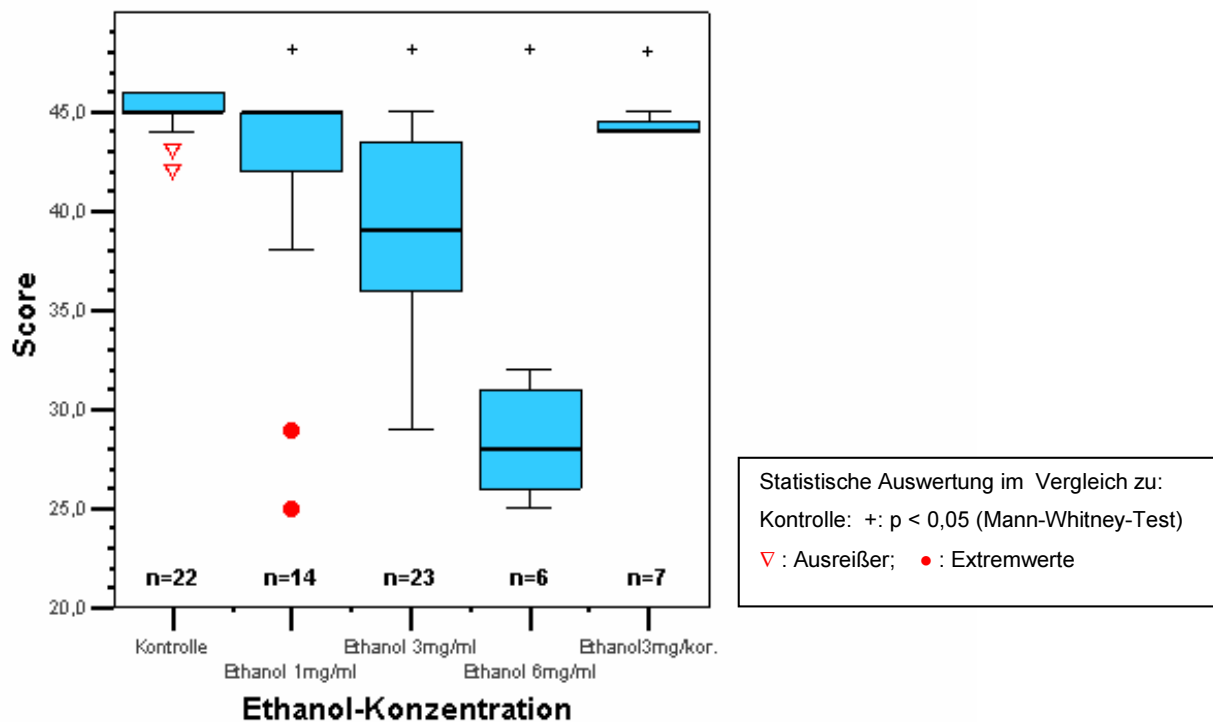


**Grafik 10 :** Kulturergebnisse 12.5 Tage alter Embryonen nach Exposition mit unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen

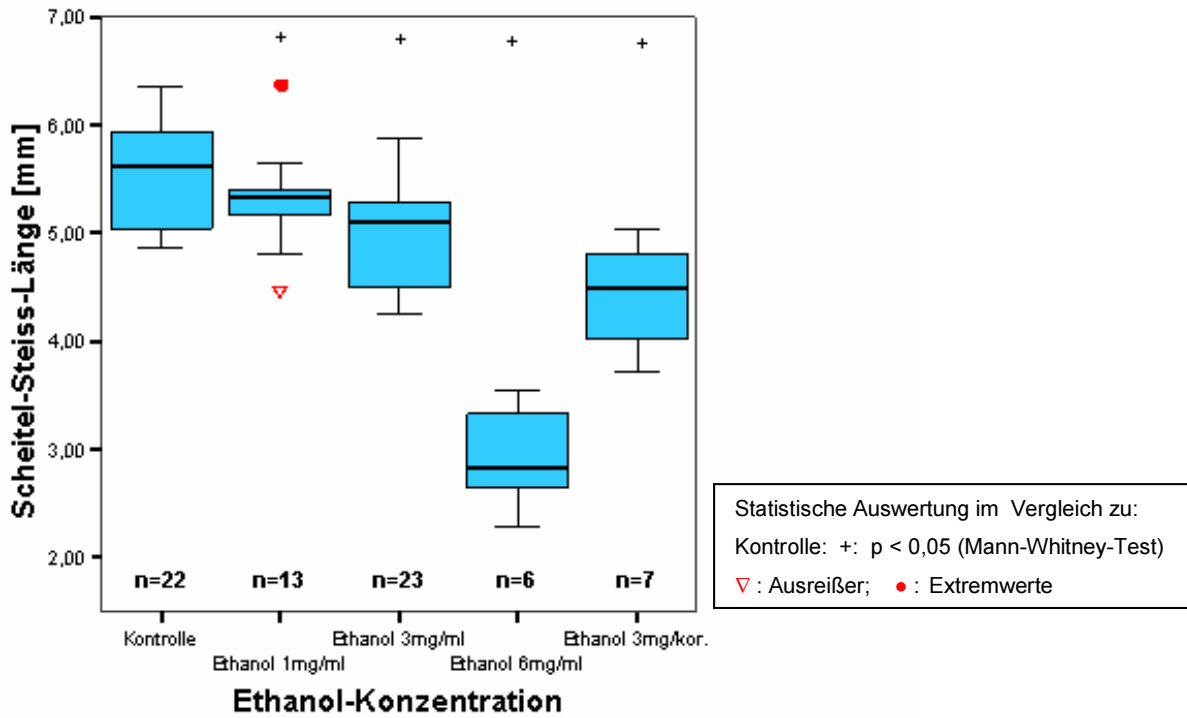
**Auswirkung verschiedener Ethanolkonzentrationen auf die Anzahl der Somiten von Rattenembryonen nach 72-stündiger Kulturdauer in Rinderserum**



**Auswirkungen verschiedener Ethanolkonzentrationen auf den Score-Wert von Rattenembryonen nach 48-stündiger Kulturdauer in Rinderserum**



**Auswirkung verschiedener Ethanolkonzentrationen auf die Scheitel-Steiss-Länge von Rattenembryonen nach 72-stündiger Kulturdauer in Rinderserum**



**Auswirkung verschiedener Ethanolkonzentrationen auf den Proteinwert von Rattenembryonen nach 72-stündiger Kulturdauer in Rinderserum**

