

8 Diskussion

Die Kultur von 9,5 Tage alten Rattenembryonen über 48 Stunden mit der Roller-Kultur (nicht-kontinuierliches Begasungsverfahren) in Rinderserum ist in unserem Labor seit Jahren ein standardisiert durchgeführtes Kulturverfahren. Mit der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, durch Einführung einer Rotator-Kulturmethode (kontinuierliches Begasungsverfahren) sowie durch Austestung verschiedener Pufferlösungen die Kulturbedingungen für die ersten 48 Stunden zu verbessern.

So sollte eine Optimierung der ersten Kulturphase (Tag 9,5-Tag 11,5) erzielt werden, um geeignete Voraussetzungen für eine Kulturverlängerung, die ebenso Gegenstand dieser Arbeit war, über 48 Stunden hinaus zu schaffen. Weiter sollte gezeigt werden, dass die Verlängerung der Kulturdauer zur Darstellung unterschiedlicher Abnormitätsmuster an Embryonen geeignet ist. Ethanol diente hierbei als Testsubstanz.

Im ersten Teil der Arbeit wurde nach einer standardisierten Möglichkeit in Form einer Pufferlösung gesucht, in der Testsubstanzen, bevor sie dem Kulturmedium zugesetzt werden, gelöst werden können. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob die Pufferlösungen selbst embryotoxische Wirkung auf die kultivierten Embryonen haben.

Diese Lösung muss als eine pH-neutrale Lösung dem Gesamtkulturmedium zugesetzt werden können. Dazu verwendeten wir bislang eine Tyrodelösung, die in unserem Kulturmedium Rinderserum einen 14 Vol%-igen Anteil hatte. In dieser Tyrodelösung kam es jedoch, so konnten Versuche (Kastner M., 1999, hausinterne Untersuchungen) zeigen, nach 48 Stunden zu Ausfällungen von Kalziumphosphationen. Die Ursache hierfür lag in der hohen Konzentration an Phosphaten (13,0 mg/L) in der Tyrode-Lösung. Im Vergleich hierzu war die Konzentration von Phosphaten in HBSS 0,8 mg/L. Obwohl der Nachweis einer schädigenden Wirkung dieser Ausfällungen bislang nicht erbracht wurde, suchten wir nach einem Ersatz für die Tyrodelösung, da man zumindest theoretisch von einer mechanischen Belastung der Embryonen durch die Kristalle ausgehen musste.

Neben der Tyrodelösung wurden drei weitere Pufferlösungen (Bufferall, HEPES, HBSS) auf ihre pH-Wert-stabilisierende Fähigkeit und auf ihr embryotoxisches Potenzial getestet.

Im Titrationsversuch konnte gezeigt werden, dass 100% Serum eine gute Pufferkapazität besitzt. Hierbei haben „speziell die nicht-essentiellen Aminosäuren die größte Pufferkapazität“ (Edwards, 1998). Der Versuch zeigte aber auch, dass eine Verdünnung von Serum mit einem 14 Vol%-igen Pufferlösungsanteil zu keiner signifikanten Veränderung der

Pufferkapazität führte. Auch wurde deutlich, dass der erhöhte Anteil von Phosphationen in den zugesetzten Pufferlösungen (Tyrode-Lösung) für die Konstanthaltung des pH-Wertes im Gesamtkulturmedium nicht relevant war. Die Titrationskurven zeigten bei allen getesteten Pufferlösungen nach Zugabe von gleichen Säureäquivalenten einen fast identischen Verlauf.

Wie aber wirkt sich die Zugabe unterschiedlicher Pufferlösungen zum Kulturs Serum auf die Entwicklung der Embryonen aus?

Die meisten Arbeitsgruppen arbeiteten mit unverdünntem Rattenserum (Kao, 1981; Tarlatzis, 1984; Eto, 1985 b; Miki, 1988; Mensah-Brown, 1989) oder mit Tyrode-Lösung verdünntem Rattenserum (Cockroft, 1973; Eto, 1985 a; Nakagawa, 1997). Nakagawa (1997) kultivierte 9,5 Tage alte Rattenembryonen für 48 Stunden in 100% Rattenserum sowie in einer Verdünnung des Serums mit einem Tyrode-Anteil von 20%. Er konnte keinen Unterschied in der Entwicklung der Embryonen in beiden Medien feststellen. Cockroft (1973) und Priscott (1984) hingegen fanden heraus, dass eine Mischung von 25% Rattenserum und 75% Tyrode bzw. 75% DMEM-Lösung für die Kultivierung von 11,5 Tage alten Embryonen für 24 Stunden die besten Ergebnisse erzielt. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Eto (1985 a), der ebenfalls 11,5 Tage alte Embryonen für 24 Stunden kultivierte. Dessen Resultate zeigten, dass „eine Mischung von 50% Rattenserum und 50% Tyrode schlechtere Entwicklungsergebnisse der Embryonen erzielte als 100% Rattenserum.“ Eto schloss daraus, dass eine Verdünnung des Serums mit einer Pufferlösung zu einer Reduzierung essentieller Faktoren führt.

HBSS wurde bislang nur von Fujinaga (1991) als Salzlösung in der WEC verwendet. Auch er arbeitete mit Rattenserum (80%) und HBSS (20%) und erzielte „befriedigende Resultate der Embryonen“. Hingegen wurden die Puffer HEPES und Bufferall in einer Kultur mit Rattenembryonen noch nicht eingesetzt, obwohl gerade auf dem Gebiet der Forschung mit Zellkulturen HEPES sehr häufig als Puffer genutzt wird (Hanitzsch, 2002; Hare, 1998; Levrant, 2001). „Organische Puffer wie HEPES haben in den letzten Jahren großes Interesse geweckt, da sie praktische und stabile Alternativen zu den herkömmlichen Bikarbonat/Kohlendioxid-Puffern sind“ (Hare, 1998).

Da keinerlei vergleichende Arbeiten über die Auswirkungen von Pufferlösungen auf die Entwicklung von Rattenembryonen in der WEC vorliegen, wurden die Untersuchungen dieser Arbeit durchgeführt.

Unsere Versuche mit 9,5 Tage alten Rattenembryonen in Rinderserum im Rotator zeigten, dass speziell in den Bewertungsparametern Scheitel-Steiß-Länge, Morphologischer Score und Protein die Embryonen, die in den mit Salzlösungen (Tyrode-Lösung, HBSS) gepufferten Medien kultiviert wurden, signifikant bessere Resultate erzielten als die Embryonen, die mit organischen Puffern (Bufferall, HEPES) kultiviert wurden. Die Ursache für diese statistisch nachweisbaren Unterschiede ist schwer zu erklären. Eine mögliche Erhöhung der Osmolarität des Kulturmediums durch Zugabe von Pufferlösungen in unphysiologische Bereiche konnte in unseren Versuchen nicht zur Erklärung herangezogen werden. Die Messungen der Osmolarität (s. Tab. 11) nach Zugabe einzelner Puffer zeigten keine nennenswerten Unterschiede.

Mahadevan (1986) untersuchte die Entwicklung von Präimplantations-Mäuseembryonen (Blastozysten) in einem Bikarbonat gepufferten Medium mit alternativ Kohlendioxid, HEPES bzw. einer Tyrode-Phosphat-Lösung. Er erzielte die besten Kulturergebnisse von Mäuseembryonen in einem Medium, welches mit einer Tyrode-Lösung und zusätzlicher Kohlendioxidatmosphäre versetzt wurde. „Eine Pufferung des Mediums mit HEPES und exogenem Kohlendioxid scheint keine Alternativpufferung zu sein. Die Bikarbonatkonzentration müsste dafür doppelt so hoch sein. HEPES zusammen mit Bikarbonat, jedoch ohne exogenem Kohlendioxid, ist hingegen ein guter Puffer.“ Organische Puffer wie HEPES führen in einem bikarbonat-gepufferten Medium in Anwesenheit von Kohlendioxid zu einem Abfall des pH-Wertes (Gunawardana, 2002). Levraut (2001) untersuchte den Effekt von Natriumbikarbonat (NaHCO_3^-) auf den intrazellulären pH-Wert in Leberzellkulturen in Abhängigkeit von der HEPES-Konzentration. Auch er stellte fest, dass es in Medien, die sowohl Bikarbonat wie auch HEPES enthalten, zu einem Abfall des pH-Wertes kommt. Dabei ist der Abfall des pH-Wertes abhängig von der HEPES-Konzentration im Kulturmedium. Der pH-Wert im Medium sinkt bei einer HEPES-Konzentration von 5 mM jedoch deutlich weniger ab als bei 20 mM. Geringe Konzentrationen von HEPES haben keinen negativen Effekt auf Leberzellkulturen. Unsere Arbeitskonzentration von HEPES im Gesamtkulturmedium beträgt 2,5 mM.

Salzlösungen (Tyrode, HBSS) hingegen haben eine eher geringe Pufferwirkung und werden in erster Linie zur Verdünnung gehaltvoller Medien eingesetzt (Freshney, 2. Auflage). Doch aufgrund ihrer physiologischen Zusammensetzung üben sie keinerlei embryotoxische Wirkungen auf die Embryonen aus. Vergleicht man die Entwicklung von Rattenembryonen in Rinderserum, die in Tyrode- (Kontrollgruppe) und HBSS-gepufferten Medien kultiviert wurden, miteinander, so erzielen die Embryonen in beiden Kulturmedien Ergebnisse, die im Erwartungsbereich liegen und sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Zur weiteren Optimierung des Kultursystems wurde ein Verfahren mit einer kontinuierlichen Begasung getestet. Das sogenannte Rotator-System wurde u.a. schon von New & Cockroft (1978) und Ellington (1987) für den Einsatz in der WEC benutzt. Im Gegensatz zum Roller wird hierbei die Gasphase über dem Kulturmedium ständig erneuert. Durch die Konstanzhaltung der Partialdrücke von Sauerstoff und vor allem von Kohlendioxid kommt es zu einem „besseren Austausch von Gasbestandteilen zwischen Embryo und Medium“ (Cockroft, 1997) als in der Rollerkultur. Dort kommt es in Folge des Stoffwechsels der Embryonen zu einer Anreicherung von Kohlendioxid im Kulturmedium (s.u.).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch die Veränderung des Begasungstyp (Roller- bzw. Rotator-Kulturmethode) auch bessere Kulturergebnisse der Embryonen erzielt werden konnten.

In unseren Versuchen zeigte sich, dass die „Rotator-Kulturmethode 30-Vol%“ (die Sauerstoffkonzentration im Kulturzeitraum Tag 10,5-Tag 11,5 beträgt 30 Vol%) in den ersten 48 Stunden der Kultur (Tag 9,5-11,5) gegenüber der „Rotator-Kulturmethode 20-Vol%“ (die Sauerstoffkonzentration im Kulturzeitraum Tag 10,5-Tag 11,5 beträgt 20 Vol%) in den Bewertungsparametern Morphologischer Score und Scheitel-Steiß-Länge signifikant bessere Kulturergebnisse erzielt. Miki (1988) untersuchten den Effekt unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf Embryonen in einer Rotator-Kultur. Das Ergebnis seiner licht- und elektronenmikroskopischen Studie war, dass Sauerstoffkonzentrationen höher und niedriger als 20 Vol% degenerierte und nekrotische Zellen vor allem im Bereich des Neuralrohres und der Somiten zur Folge haben.

Auch Sanyal (1980) untersuchte den Einfluss von Sauerstoff auf das Wachstum und die Differenzierung von 10,5 Tage alten Embryonen im Rotator (Kulturdauer: Tag 10,5-11,5). Seine Ergebnisse zeigten, dass sich die „Differenzen in der Entwicklung der Embryonen zwischen einer 20 Vol%-igen und 40 Vol%-igen Sauerstoffbegasung aus einer „besseren Differenzierung“ und einer geringeren Abnormitätsrate zugunsten der 20 Vol%-igen Sauerstoffbegasung“ ergeben. Einen statistisch signifikanten Unterschied ergaben seine Untersuchungen jedoch nicht. Sanyal führte den beobachteten Unterschied in der Entwicklung der Embryonen auf eine größere CO₂-Akkumulation im Medium bei höheren Sauerstoffkonzentrationen zurück. Unsere Untersuchungen zeigten aber, dass die Rotator-Kulturmethode (Rot 30-Vol%) keine höhere CO₂-Akkumulation bedingt. Im Gegenteil: beide Rotator-Kulturmethoden (Rot 20-Vol% und Rot 30-Vol%) wiesen einen nahezu identischen Verlauf der Kohlendioxidkonzentration auf.

Wir vermuten, dass eine 20 Vol%-ige kontinuierliche Sauerstoffbegasung für diesen Kulturzeitraum den Sauerstoffbedarf der Embryonen nicht vollständig deckt und dass durch unsere 30 Vol%-ige Sauerstoffbegasung das „Defizit des plazentären Austausches *in vitro* gegenüber *in vivo* nach dem 17-Somiten-Stadium“ (New, Cockroft, 1978) besser kompensiert wird. In dem Kultursystem erreicht Sauerstoff den Embryo über direkte Diffusion durch den viszeralen Dottersack (New, Coppola, 1970) und über die Amnionflüssigkeit (Miki, 1988). Die Menge an Sauerstoff, die den Embryo tatsächlich erreicht, hängt von der Konzentration im Gasgemisch ab (New, Coppola, 1970).

In der Roller-Methode wird der Nachteil der nicht-kontinuierlichen Begasung durch eine höhere Durchflussrate des Gasgemisches kompensiert. Die höhere Durchflussrate bei der Begasung der geschlossenen Flaschen dient zur schnelleren Äquilibrierung des Kulturmediums durch rascheren Austausch der Gasphase in den Kulturflaschen. Dadurch wird ein maximal mögliches Konzentrationsgefälle zwischen der Zielkonzentration der Gase in dem eingeleiteten Gasgemisch und den sich dynamisch angleichenden Konzentrationen in dem Kulturmedium erzielt. Unsere Kulturergebnisse zeigten, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den im Roller und Rotator (30 Vol%O₂) kultivierten Embryonen hinsichtlich der Bewertungsparameter Morphologischer Score, Protein und Scheitel-Steiß-Länge existierte. Subjektiv erzielten die im Rotator kultivierten Embryonen in den benannten Parametern tendenziell bessere Ergebnisse.

Deutlicher wird der Unterschied zwischen beiden Begasungssystemen bei der Analyse der Verlaufskurve einzelner Blutparameter (pH-Wert, Kohlendioxid, Sauerstoff und Bikarbonat). Die durch den Embryo selbst produzierten Säureäquivalente in Form von H⁺-Ionen werden über einen Na⁺/H⁺-Antiport aus der Zelle ausgeschleust (Lane, 1998), gelangen so in das Medium und werden dort vom Bikarbonat abgefangen, so dass dessen Konzentration abnimmt.



Das dabei entstehende Kohlendioxid wird, und das ist der entscheidende Unterschied zum geschlossenen System des Rollers, im offenen System des Rotators an die sich ständig erneuernde Gasphase abgegeben. Durch die deutlich höhere Konzentration von Kohlendioxid im Kulturmedium der Roller-Kultur ist auch der geringe pH-Wert von 7,09 zu erklären, wäh-

rend dieser im Rotator nur auf 7,25 abfällt. Dass der pH-Wert auch in der Rotator-Kultur abfällt liegt an dem Verbrauch von Bikarbonat. Dadurch ändert sich das Verhältnis von $[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$ und die Pufferbasenkonzentration im Serum sinkt.

Der von uns gemessene pH-Wert im Blut einer Ratte lag mit 7,33 (s. Tab. 16) sehr nahe an dem im fetalen Blut gemessenen pH-Wert (im Mittel 7,3; Physiologiebuch, Silbernagel, 1985). Niedrige Werte erleichtern die Sauerstoffentkopplung bei erhöhter Hämoglobinkonzentration im fetalen Blut. In der Rotator-Kultur (30-Vol% O_2) lag der pH-Wert nach 24 Stunden bei 7,36 und nach 48 Stunden bei 7,25 (Ausgangswert Tag 9,5: 7,57). Beide Werte weichen nur geringfügig von den im fetalen Blut gemessenen Werten ab. In der Rollerkultur dagegen fiel der pH-Wert schon nach 24 Stunden auf 7,19 und nach 48 Stunden auf 7,09 ab (Ausgangswert Tag 9,5: 7,63). Ähnliche Werte beobachteten New, Cockroft (1978). In ihren Versuchen mit 9,5 Tage alten Embryonen fällt der pH-Wert nach 24 Stunden von Median 7,50 auf 7,20 (Rotator) bzw. 6,94 (Roller) ab. Auch sie beschrieben „die eindeutigen Vorteile einer kontinuierlichen Begasung hinsichtlich des pH-Wertes“, konnten aber „keine signifikanten Unterschiede im Wachstum und der Differenzierung von Embryonen aus der Rotator- bzw. Roller-Kultur“ erkennen.

So stellt sich die Frage, warum „die scheinbaren Vorteile eines besser eingestellten pH-Wertes keine signifikanten Auswirkungen auf die Differenzierung und das Wachstum der Rattenembryonen haben?“ (Tarlitzis, 1984). Rattenembryonen scheinen eine hohe Toleranzgrenze gegenüber dem im Serum vorhandenen pH-Wert zu haben. Demzufolge tolerieren Rattenembryonen dieses Entwicklungsstadiums einen niedrigeren pH-Wert über einen kurzen Zeitraum. Die Kulturphase, in der der pH-Wert in der Rollerkultur nach 36 Stunden in den kritischen Bereich von unter 7,10 absinkt, ist relativ kurz. Daraus könnte man schließen, dass in diesem relativ kurzen Kulturzeitraum die Entwicklung der Embryonen primär nicht von einem optimal eingestellten pH-Wert abhängt. Vielmehr ist die optimale Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium für die Embryonen und deren Versorgung mit Nährstoffen von größerer Bedeutung.

Erklärungen für diese Sachlage müssen in der Funktion der embryonalen Hüllen, im Stoffwechsel der Embryonen sowie in deren Sauerstoffbedürfnissen gesucht werden. *In vivo* bildet sich um den Tag 10,5 der Gestation der Dottersackkreislauf aus, der eine wichtige Funktion für den Gasaustausch darstellt. Die Plazenta mit dem damit verbundenen Plazentakreislauf ist erst um den Entwicklungstag 11,0 voll funktionstüchtig. Beide haben dann neben der nutritiven Funktion auch eine Bedeutung im Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid (Eto, 1985 b; Miki, 1988; Andrews, 1992).

Junge Embryonen (bis ca. Tag 10,5/11,0) finden unter geringer Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium optimale Wachstumsbedingungen vor, weil ihr Stoffwechsel bis zur Ausbildung der Chorion-Allantois-Membran anaerob ist (Ellington, 1987). Sie beziehen ihre Energie aus der Glykolyse, bei der aus einem mol Glucose zwei mol Pyruvat gespalten werden, wobei zwei mol ATP und $\text{NADH} + \text{H}^+$ entstehen (Biochemie, Voet & Voet, 1993). Unter anaeroben Bedingungen, wie wir sie im Stoffwechsel der Embryonen in dieser Phase vorfinden, wird das verbrauchte NAD durch Bildung von Lactat wieder regeneriert. Die Glykolyse ist unter anaeroben Bedingungen die einzige Möglichkeit zur Gewinnung von ATP aus ADP und Phosphat (Voet & Voet, 1993). Eine weitere wichtige Rolle für die Gewinnung von Energie spielt der Pentose-Phosphat-Weg (Sanyal, 1980).

Ab einem Entwicklungsstadium, in dem die Embryonen maternal über die voll funktionsfähigen Dottersack- und Plazentakreisläufe versorgt werden (ab ca. Tag 10,5 – 11,0), werden die Unterschiede zwischen der *In vivo*- und *In-vitro*-Entwicklung deutlicher, da der Stoffwechsel der Embryonen in diesem Zeitfenster aerob wird und ihr Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen steigt. *In vitro* hingegen müssen die Embryonen dann die Nährstoffe sowie den Sauerstoff aus dem Kulturmedium über den großflächigen Dottersackkreislauf aufnehmen (Jojovic, 1998; Freemann, 1981 b). Dieser elementare Unterschied in der Stoffwechselsituation der *In-vivo*- bzw. *In-vitro*-Embryonen zeigt aber bei einer Kulturdauer von 48 Stunden noch keine drastischen Auswirkungen auf die Differenzierung und das Wachstum der Embryonen (s. Tab. 23).

Das Defizit in der Sauerstoffverwertung der *In-vitro*-Embryonen muss durch eine höhere Sauerstoffkonzentration von außen kompensiert werden (Cockroft, 1997). Die Embryonen decken ihren Bedarf an Sauerstoff über Diffusion aus dem umgebenden Medium. Bei einer kontinuierlichen Gaszufuhr reicht den Embryonen ein Gasgemisch, welches 30 Vol% Sauerstoff (Tag 10,5-Tag 11,5) enthält, während in der Rollermethode nach 36 Stunden (Tag 11,0) eine dreiminütige 50 Vol%-ige Sauerstoffbegasung nötig ist. Diese höhere Sauerstoffkonzentration im Roller im Vergleich zum Rotator stellt einen Kompromiss zwischen dem Bereitstellen des Sauerstoffs für den aktuellen Bedarf zu einem frühen Zeitpunkt und dem Vorhalten des Sauerstoffs für den Bedarf zu einem späteren Zeitpunkt dar. Das heißt: Bei einer kontinuierlichen Begasung ist eine geringere Sauerstoffkonzentration zur Bedarfsdeckung der Embryonen nötig als bei einer nicht-kontinuierlichen Gaszufuhr, weil der ständige Gasaustausch mit 30 Vol% Sauerstoff über dem Kulturmedium eine bedarfsdeckende Sauerstoffkonzentration für die Embryonen im Kulturmedium garantiert. Dass dabei dem Sauerstoff eine so wichtige Bedeutung zukommt, erkennt man daran, dass ein Unterschied von 10

Vol% Sauerstoff (Rot 20% zu Rot 30%) in der zweiten Kulturphase zu statistisch signifikant besseren Ergebnissen der Embryonen zugunsten der 30 Vol%-igen Begasung führt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob die Eröffnung der embryonalen Fruchthüllen dazu dienen kann, die Kulturperiode von Rattenembryonen in Rinderserum über 48 Stunden hinaus zu verlängern. Gleichwohl sollten die Untersuchungen zeigen, über welchen Kulturzeitraum, beginnend am Tag 9,5, die „Whole-Embryo-Culture“ befriedigende Kulturergebnisse zeigt.

Ellington, S. (1987) zeigte, dass der Glukoseverbrauch bei 9,5 Tage alten Embryonen im Versuchszeitraum (Tag 9,5-Tag 11,5) kontinuierlich ansteigt. „Die Glukosekonzentration nimmt progressiv während der Dauer der Kulturperiode ab und stellt einen limitierenden Faktor dar“ (Sanyal, 1980). Während der ersten 42 Stunden einer Kultur von 9,5 Tage alten Embryonen werden alle Glukosemoleküle, so Ellington, verbraucht, und es entstehen Laktatmoleküle. So kommt es zu einem Glukosedefizit (Abfall der Glukosekonzentration im Serum von anfänglich 1,5 mM auf unter 0,4 mM), da der Bedarf des Embryos an Glukose die tatsächlich im Serum vorhandene Glukosekonzentration übersteigt. Der Glukoseverbrauch ist signifikant höher bei Embryonen, die nach 42-stündiger Kulturdauer frisches Serum erhalten haben, als bei Embryonen, die über 48 Stunden im selben Kulturmedium kultiviert wurden, weil eine positive Korrelation zwischen dem Glukoseverbrauch und der im Serum angebotenen Glukosekonzentration besteht. Der Glukoseverbrauch korreliert mit dem Proteinwert und der Scheitel-Steiß-Länge der Embryonen am Ende der Kultur (Ellington, 1987).

Da im Kulturmedium nach 42 Stunden für die Embryonen ein Glukosedefizit entsteht, beendeten wir den ersten Kulturabschnitt zu diesem Zeitpunkt. Für die zweite Kulturphase sollten die Fruchthüllen der Embryonen nach der „Cockroftschen Technik“ (s. Abb. 6A-C) präpariert werden. Cockroft (1973) war der Erste, dem es gelang, ältere Rattenembryonen in homologem Serum über 24 Stunden (Tag 12,5-13,5) zu kultivieren. Er eröffnete sowohl die Amnion- als auch die Dottersackhöhle. Der so erzielte direkte Kontakt vom Embryo zum umgebenden Medium sollte die Sauerstoffversorgung des Embryos entscheidend verbessern. Embryonen, bei denen die Fruchthüllen eröffnet wurden, erzielten signifikant bessere Resultate als Embryonen mit geschlossenen Fruchthüllen. Priscott (1984) konnte diese Ergebnisse bestätigen.

Wir präparierten 11,2 Tage alte Embryonen, die zuvor einer 42-stündigen Kultur ausgesetzt waren, nach der von Cockroft beschriebenen Technik (s. Abb. 5). Nach weiteren 30 Stunden (Tag 12,5) waren die Embryonen abnorm entwickelt (s. Abb.13). Das Gewebe war massiv nekrotisch. Erklärungen hierfür sind schwer zu finden. In all den oben genannten Versuchen, in denen Embryonen ohne ihre Fruchthüllen kultiviert wurden, wurden sie erst zu Versuchs-

beginn (Tag 11,5) aus dem Uterus explantiert und in Rattenserum kultiviert. Die erfolgreiche Nachahmung des Cockroftschen Versuches (s. Abb. 12) in unserem Labor (Alter der Embryonen zu Beginn der Kultur: Tag 11,2), in dem die Embryonen ein zufriedenstellendes Wachstum aufweisen, zeigt, dass eine fehlerhafte Präparation, die direkte Exposition der Embryonen mit dem heterologen Rinderserum sowie eine Veränderung der Fruchtwasserzusammensetzung durch Eröffnung der Fruchthüllen (Franke, 1979) nicht zur Erklärung der schlechten Kulturergebnisse herangezogen werden können. Wir vermuten, dass dieser doch bedeutsame Eingriff des Aufreißens beider embryonaler Fruchthüllen nach einer schon bereits 42 Stunden dauernden Kultur eine zu hohe Belastung für die Embryonen darstellt.

Nachdem sich diese Technik als ungeeignet für die Kulturverlängerung erwiesen hatte, suchten wir nach anderen Möglichkeiten, Bedingungen zu schaffen, die eine Verlängerung der Kultur über 48 Stunden hinaus ermöglichen. Dazu wurde der erste Kulturabschnitt nach 42 Stunden unterbrochen. Die Embryonen wurden aus dem Kulturmedium genommen, und ihre Fruchthüllen wurden auf drei verschiedene Arten präpariert. Bei Embryonen der Gruppe A wurden sämtlichen Fruchthüllen intakt gelassen, während in den anderen beiden Gruppen der Dottersack eröffnet wurde (Gruppe B) bzw. Dottersack und Amnion aufgerissen wurden (Gruppe C), (s. Tab. 19). Anschließend wurden die Embryonen in frischem Kulturmedium mit 60 Vol% Sauerstoff (Priscott, 1984) für die folgenden 30 Stunden bis Tag 12,5 weiterkultiviert. Die Versuche zeigten, dass Embryonen, die mit intakten Fruchthüllen (Gruppe A) weiter kultiviert werden, in unseren Bewertungsparametern sowie in der Beurteilung der histologischen Schnitte signifikant bessere Ergebnisse erzielten, als Embryonen der beiden Vergleichsgruppen (Gruppe B/C). Embryonen, bei denen sowohl Amnion als auch der Dottersack aufgerissen wurden (Gruppe C), wiesen eine deutliche Retardierung des Entwicklungsstandes auf.

Gründe für diese doch großen Unterschiede der einzelnen Versuchsgruppen müssen in der Beeinträchtigung der Struktur und Funktion der embryonalen Hüllen durch die Manipulationen in dieser Entwicklungsphase liegen, weil alle anderen Rahmenbedingungen identisch waren. Der Embryo bezieht *in vitro* seine Nährstoffe ausschließlich über den Dottersack- und Plazentakreislauf. Das viszerale Dottersackepithel ist dabei für die Stoffaufnahme und den Abbau von Makromolekülen verantwortlich. Dessen Zellen besitzen ausgeprägte apikale endozytotische Einstülpungen und Vesikel sowie eine hohe enzymatische Aktivität (Andrews, 1992). Makromoleküle werden vom Dottersackepithel aufgenommen, wobei man zwei Arten der Aufnahme unterscheiden muss. Zum einen die Endozytose membrangebundener Moleküle (z.B.: Transferrin) sowie zum anderen die pinozytotische Aufnahme der flüssigen Phase

(z.B.: Dextran). Sämtliche so aufgenommenen Substanzen werden dann an die Lysosomen weitergeleitet, die diese zu kleinen Molekülen abbauen (Enzymkaskade; Kugler, 1985). Diese diffundieren direkt oder indirekt zum Embryo und werden von diesem zur Synthese eigener Baustoffe benötigt. Die Enzymaktivität des viszeralen Dottersackepithels nimmt in vivo bis zum Tag 12,5 ständig zu (Miki, 1984). Freemann (1981a) und Miki (1984) haben einige der Enzymaktivitäten (u.a.: saure Phosphatase, α -Glucosidase, Dipeptidylpeptidase) am Tag 11,5 nach einer In-vitro-Kultur mit entsprechenden In-vivo-Aktivitäten verglichen. Sie stellten fest, dass sich die Enzymaktivitäten bei einer Kultur bis zum Tag 11,5 nicht von den entsprechenden Enzymaktivitäten in vivo unterscheiden. Bei einer Kultur bis zum Tag 12,5 sind sie aber geringer als in vivo. Das bedeutet, dass die Versorgung des Embryos über das Dottersackepithel in vitro ab Tag 11,5 beeinträchtigt ist. Ein vollständiger Funktionsverlust des Dottersackepithels zu diesem Zeitpunkt liegt aber nicht vor (Tarlantzis, 1984), so dass die Versorgung des Embryos mit Nährstoffen aus dem umgebenden Medium bei intaktem Epithel aufrechterhalten wird.

Wenn das Dottersackepithel durch unsere Manipulation zerstört wird, dann, so vermuten wir, ist die Epithelschicht zwar noch aktiv, jedoch gelangt ein Großteil der synthetisierten Moleküle über das verletzte Gefäßsystem (bedingt durch das Aufreißen) wieder ins Kulturmedium und steht dem Embryo nur bedingt zur Verfügung. Ebenso konnten wir beobachten, dass sich das Dottersackepithel, wenn es aufgerissen wird, zum Ende der Kulturphase hin sehr stark zusammenzieht. Dadurch verkleinert sich seine Oberfläche in nicht unerheblichem Maße und die Aufnahmekapazität wird beeinträchtigt.

Insgesamt erzielten die Embryonen nach 72 Stunden Kultur im Rotator bei 60 Vol%-iger Sauerstoffbegasung, wenn sie mit intakten Fruchthüllen weiter kultiviert werden, ein befriedigendes Ergebnis (s. Abb.14). Sie erreichten ein Entwicklungsniveau, das zwischen denen von In-vivo-Embryonen am Tag 11,5 und denen von In-vivo-Embryonen am Tag 12,0 anzusiedeln ist (s. Tab. 20).

In einer weiteren Versuchsreihe kultivierten wir Rattenembryonen über 96 Stunden in Rinderserum sowohl in einer Roller- wie auch in einer Rotator-Kultur. Unsere Bewertung der Embryonen am Ende der Kultur zeigte, dass die Differenzierung (Anzahl der Somiten, Morphologischer Score) und das Wachstum (Scheitel-Steiß-Länge, Proteingehalt) der Embryonen im Rotator signifikant besser war als im Roller. In der Bewertung der histologischen Schnitte fielen jedoch bei den Embryonen in beiden Methoden zahlreiche Nekrosen auf, die in sämtlichen Geweben vorkamen. Organe wie Herz, Somiten oder auch das Neuralepithel

waren im Vergleich zu *In-vivo*-Strukturen deutlich verkleinert. In keinem Auswertungsparameter konnte gegenüber den für 72 Stunden kultivierten Embryonen eine Verbesserung erzielt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von *Tarlatzis* (1984) überein. Am Ende der Kultur zeigten alle Embryonen eine geringgradige Deformation im Bereich der Lamina terminalis und zusätzlich eine Abknickung im Bereich des Schwanzansatzes. Wir vermuten, dass der dicht aufliegende Dottersack die Bewegungsfreiheit des Embryos einschränkt und diese Veränderungen herbeiführt. Trotzdem können das Dottersackepithel, welches nach 96 Stunden nur noch weniger als 50 % seiner ursprünglichen Funktion besitzt, wie auch eine unphysiologisch hohe Sauerstoffkonzentration von circa 90 Vol% die Versorgung der Embryonen decken. Der „Vorteil“ des Rotators ist auf seine kontinuierliche Begasung zurückzuführen. Durch den wachsenden Stoffwechsel der Embryonen (Produktion von H^+ -Ionen) wird vermehrt Kohlendioxid gebildet, welches im geschlossenen System (Roller) nicht entweichen kann. Dadurch sinkt der pH-Wert nach 96 Stunden auf unter 7,00, während er im Rotator-System nur auf knapp unter 7,20 abfällt.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Kultivierung 9,5 Tage alter Embryonen über einen Zeitraum von 72 Stunden durchaus möglich ist. Dennoch nimmt das embryonale Wachstum und die Differenzierung der Embryonen „nach dem 17-Somiten-Stadium, wenn die Embryonen über die Plazenta mit Nährstoffen versorgt werden ab“, und es ist mit einem reduzierten Wachstum zu rechnen (New, 1997).

Will man Embryonen älterer Stadien zur Durchführung toxikologischer Untersuchungen kultivieren, dann erscheint es sinnvoll, Embryonen eines höheren Entwicklungsstadiums direkt einzusetzen, weil es möglich ist, 11,5 (Nakagawa, 1997)-, 12,5 (Eto, 1985 a) -oder auch 13,5 Tage alte Embryonen (Priscott, 1984) über 24 Stunden zu kultivieren.

Die „Ethanol-Versuche“ zeigten bei einer 48-stündigen Kulturdauer eindeutig, dass eine Ethanol-Serumkonzentration von 3 mg/ml und mehr in der WEC mit Rinderserum eine entwicklungshemmende Wirkung auf Rattenembryonen hatte. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von Brown (1979) überein. Auch er erkannte „teratogene Effekte“ bei Rattenembryonen, die höheren Konzentrationen von Ethanol ausgesetzt waren. Hierbei muss aber berücksichtigt werden, dass die Wirkung von Ethanol stark davon abhängig ist, in welchem Entwicklungsstadium Rattenembryonen an Tag 9,5 eingesetzt werden (sog. Stadienabhängigkeit). So „erzielen Embryonen im „Späten-Kopffalten-Stadium“ (bei einer Ethanolkonzentration von 3 mg/ml) ähnlich gute Kulturergebnisse wie Kontrollembryonen im „Vor-Somiten-Stadium““ (Clode, 1987 a). Diese Resultate konnten wir in unseren Versuchen bestätigen.

Vergleichbare Ergebnisse erhält man demnach nur bei einer Kultur gleicher embryonaler Entwicklungsstadien.

Ethanolkonzentrationen von 6 mg/ml Kulturmedium und mehr hatten im Kulturzeitraum (Tag 9,5 – Tag 11,5) auf die Embryonen aller Stadien eindeutig toxische und dismorphogenetische Effekte, die sich am deutlichsten im Bereich der Kopfanlage zeigten (Augen-, Nasen-, Ohrenanlage, nicht geschlossenes Neuralrohr). Darüber hinaus wurde eine unvollständige Drehung der Embryonen beobachtet.

Bei einer längeren Kulturdauer von 72 Stunden (Tag 9,5 – Tag 12,5) manifestierten sich die Effekte, die durch Ethanol verursacht wurden, deutlicher. Hier kam es schon gegenüber den Kontrollembryonen bei einer Konzentration von 1 mg Ethanol/ml Kulturmedium zu statistisch signifikant schlechteren Ergebnissen hinsichtlich der Bewertungsparameter Protein, Scheitel-Steiß-Länge und morphologischer Score. Der Grund hierfür war die längere Kulturzeit mit einer damit verbundenen verlängerten Manifestationsmöglichkeit für bestimmte Effekte. Als Beispiel hierfür soll die Analyse der Auswertungsparameter Protein und morphologischer Score dienen. Während die gemessene Proteinmenge bzw. der errechnete morphologische Score der Embryonen (1 mg Ethanol/ml Kulturmedium) nach 48 Stunden ähnliche Werte erzielten wie die der Kontrollembryonen, so fielen beide Parameter nach 72 Stunden deutlich unter den der Kontrollembryonen ab (signifikanter Unterschied). Die morphologischen Veränderungen der Embryonen manifestierten sich auch hier in erster Linie in den Augen-, Nasen- und Ohranlagen sowie in einer insuffizienten Dottersackzirkulation. Embryonen, die in einem Medium mit 6 mg Ethanol/ml Kulturmedium für 72 Stunden kultiviert wurden, zeigten deutliche Retardierungserscheinungen.

Warum es durch Ethanol bei den Embryonen zu Entwicklungsstörungen kommt, ist nicht geklärt, weil der eigentliche Wirkmechanismus von Ethanol weiterhin unklar ist. Eine Osmolaritätserhöhung wird in der Literatur (Clode, 1987 b) häufig als Ursache für die schlechteren Kulturergebnisse herangezogen, denn die Zugabe anderer osmolaritäts-steigernder Substanzen wie Glycerol oder Natriumchlorid führt gleichfalls zu embryotoxischen Veränderungen. Unsere Versuche zeigten aber, dass durch die Zugabe von destilliertem Wasser, wodurch die Osmolaritätserhöhung ausgeglichen wurde, keine besseren Kulturergebnisse erzielt wurden. Demzufolge kann vermutet werden, dass Ethanol selber, die Abbauprodukte des Ethanols (s.u.) oder aber auch die Verdünnung des Kulturmediums in unseren Versuchen (durch Zugabe von destilliertem Wasser) für die Schädigungen der Embryonen verantwortlich waren.

Giavini (1992) führte Versuche mit Acetaldehyd (Zwischenprodukt beim Abbau von Ethanol durch die Alkoholdehydrogenase) durch und stellte fest, dass allein diese Substanz eine stark entwicklungshemmende Wirkung auf die Embryonen hat. Er vermutete, dass mit Beginn der oxidativen Prozesse (ca. Tag 11,0) „es im Embryo zur Bildung von Acetaldehyd kommt“.

Die Resorptionsgeschwindigkeit (Reaktion 1. Ordnung) von Ethanol ist im Gegensatz zur Abbaugeschwindigkeit (Reaktion 0. Ordnung) konzentrationsabhängig. Das heißt: Je höher die Serum-Ethanolkonzentration ist, desto schneller nimmt der Embryo den Alkohol durch einfache Diffusion auf und umso schneller steigt auch die Ethanolkonzentration im Embryo an.

Aus den Ergebnissen der Arbeit kann zusammenfassend festgehalten werden, dass

1. 9,5 Tage alte Rattenembryonen, die in mit Salzlösungen (Tyrode-Lösung, HBSS) gepufferten Kulturmedien (Rinderserum) kultiviert werden, eine signifikant bessere Entwicklung (Scheitel-Steiß-Länge, morphologischer Score, Gesamtproteingehalt der Embryonen) zeigen als Embryonen, die im Kulturmedium mit den Puffersubstanzen Bufferall oder HEPES kultiviert werden.
2. die Rotator-Kulturmethode in unserem Labor erfolgreich etabliert werden konnte. Die besten Kulturergebnisse erzielt man mit der Rotator-Kulturmethode, wenn mit folgendem Begasungsschema gearbeitet wird: Tag 9,5 - Tag 10,5: 5 Vol% Sauerstoff; Tag 10,5 - Tag 11,5: 30 Vol% Sauerstoff. Die Wachstums- und Differenzierungsergebnisse der Embryonen zeigen nach 48 Stunden Kulturdauer keine signifikanten Unterschiede zu den Embryonen, die mit der Roller-Kulturmethode (Kontrollgruppe) kultiviert wurden. Mit Hilfe der kontinuierlichen Begasung des Rotators können einzelnen Parameter (pH-Wert, CO_2 , O_2 , HCO_3^-) im Kulturmedium über den Kulturzeitraum konstanter eingestellt werden.
3. für eine Verlängerung der Kulturdauer über 48 Stunden hinaus die Kulturzeit in zwei Phasen unterteilt werden muss. Die Embryonen werden nach 42 Stunden mit intakten Fruchthüllen in frisches Medium gesetzt und mit 60 Vol% Sauerstoff für weitere 30 Stunden kultiviert. Am Ende der Kulturphase nach 72 Stunden ist gegenüber den Embryonen nach 48 Stunden der Gesamtproteingehalt der Embryonen deutlich hö-

her, sie sind größer und weisen mehr Somiten auf. Das Linsensäckchen ist ausgebildet, die Lamina terminalis deutlich sichtbar und das Nasengrübchen gut erkennbar.

4. eine Verlängerung der Kulturzeit auf 72 Stunden sinnvoll sein kann. Die verlängerte Kulturzeit ermöglicht zum einen eine längere Expositionszeit und zum anderen zusätzliche morphologisch auswertbare Strukturen der weiterentwickelten Embryonen. Hierdurch können, wie am Beispiel von Ethanol gezeigt wurde, Manifestationen embryotoxischer Effekte im Vergleich zur WEC nach 48 Stunden beobachtet werden.

Die Gesamtstudie macht deutlich, dass die in unserem Labor über Jahrzehnte verwendete Rollermethode mit einer Kulturzeit von 48 Stunden für Standarduntersuchungen gut geeignet ist. Die Kulturergebnisse von Embryonen sowohl in der Roller- als auch in der Rotator-Kultur sind nach 48 Stunden mit denen von *In-vivo*-Embryonen an Tag 11,5 weitestgehend vergleichbar (New, Cockroft, 1978). Der methodisch geringere Aufwand lässt die Roller-Kulturmethode für den Routineeinsatz als geeigneter erscheinen.

Die Vorteile des Rotators-Kultursystems hingegen liegen in der Verlängerung der Kulturperiode, denn hier sind die Entwicklungsergebnisse der Embryonen bei einer kontinuierlichen Begasung besser. Dem Rotator sollte demnach der Vorzug gegeben werden, wenn nach Effekten von Substanzen gesucht wird, die sich nach einer Kulturzeit von 48 Stunden noch nicht an Strukturen der Organanlagen am Trächtigkeitstag 11,5 manifestiert haben.