

9 Zusammenfassung

Es wurde versucht, die Kulturbedingungen für ein „Whole-Embryo-Culture“-System durch Testung verschiedener Puffer zu verbessern. Als Kulturmedium wurde eine Mischung aus selber gewonnenem Rinderserum (43 Vol%), einem käuflichem Rinderserum – „Myklon Fetal Calf Serum – (43 Vol%) sowie 14Vol% der zu testenden Puffersubstanz verwendet. Folgende Puffer wurden eingesetzt: HEPES, Bufferall, HBSS sowie die bislang verwendete Tyrode-Lösung. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass HBSS und die Tyrode-Lösung signifikant bessere Kulturergebnisse erzielen als HEPES und Bufferall. Aufgrund der hohen Konzentration von Phosphationen in der Tyrode-Lösung, die in Versuchen zu Ausfällungen führte, wurde HBSS der Vorzug gegeben.

Durch Einführung einer Rotator-Kultur sollte die „Whole-Embryo-Culture“-Methode verbessert werden. Wir konnten nachweisen, dass eine kontinuierliche Begasung befriedigende Ergebnisse für die „Whole-Embryo-Culture“ erzielt. Die einzelnen Gasparameter im Kulturmedium Rinderserum können im Rotator besser eingestellt werden als im Roller. Dennoch sind die Resultate in der Rotator-Kulturmethode in den ersten 48 Stunden (Tag 9,5 bis 11,5) nicht signifikant besser als mit der Roller-Methode. In beiden Systemen erzielen die Embryonen einen Entwicklungsstand, der mit denen von *In-vivo*-Embryonen in etwa am Tag 11,2 vergleichbar ist. Will man größere Versuchsreihen, das heißt Versuche mit einer größeren Anzahl von Embryonen (30-40) durchführen, ist dem Roller aufgrund seiner Kapazität und seiner einfacheren Handhabung der Vorzug zu geben.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde versucht, Kulturbedingungen zu schaffen, die eine Verlängerung der Kultur von Rattenembryonen in Rinderserum über 48 Stunden hinaus ermöglichen.

Werden Embryonen nach 42 Stunden Kulturzeit, ohne dass ihr Dottersack geöffnet wird, in frischem Rinderserum für weitere 32 Stunden bis zum Tag 12,5 kultiviert, so erzielten sie bei einer kontinuierlichen Begasung mit 60Vol% Sauerstoff befriedigende Ergebnisse. Die Embryonen wiesen einen Entwicklungs- und Wachstumsstand auf, der deutlich über dem von *In-vivo*-Embryonen am Tag 11,5 lag. Die histologische Untersuchung ergab, dass alle bekannten lichtmikroskopischen Strukturen wie Herz, Kiemenbögen, Neuralrohr, Hirnbläschen, Augenanlage und Somiten zeitgerecht ausgebildet waren. Nekrosen traten nur vereinzelt auf. Eine Kulturverlängerung auf 96 Stunden war sowohl mit der Roller- wie auch mit der Rotator-Kulturmethode nicht möglich. Die Ergebnisse lagen weit unter unseren Erwartungen, zumal

die Nekrosehäufigkeit deutlich zunahm und die Embryonen nach 72 Stunden Kulturzeit keinen Fortschritt in ihrem Wachstum und ihrer Entwicklung zeigten.

Tab. 25: Folgende Kulturbedingungen erbrachten die besten Ergebnisse für eine Verlängerung der Kultur auf 72 (96) Stunden:

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; hitzeinaktiviert, filtriert,	
Inkubationstemp.	38,0 °C ± 0,5°C	
Gas- Durchflussrate:	250 ml Gasgemisch/Minute	Je 4 NI/Min. bei jeder Begasung
Anzahl Embryo- nen/ 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 = 0-36 h: 5 Vol% O ₂ T = 36 – 42 h 50 Vol% O ₂ T = 42 – 72 h 60 Vol% O ₂ T = 72 – 96 h 85 Vol% O ₂

Im letzten Teil der Arbeit wurde der Effekt von Ethanol auf die *In-vitro*-Entwicklung von 9,5 Tage alten Rattenembryonen untersucht. Es zeigte sich, dass eine Ethanolkonzentration von 1mg/ml Kulturmedium in den ersten 48 Stunden keinen Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen hat. Verlängert man die Kultur auf 72 Stunden, so zeigen die Embryonen auch bei dieser Konzentration (1 mg) eine signifikant schlechtere Entwicklung als Embryonen, die ohne Zusatz von Ethanol kultiviert wurden. Höhere Ethanolkonzentrationen (3 mg und mehr) führen in den von uns durchgeführten Versuchen immer zu signifikant schlechteren Entwicklungsergebnissen. In diesen Konzentrationen weist Ethanol eindeutig ein embryo-toxisches Potenzial auf.