

**Aus der Charité Universitätsmedizin Berlin,
Institut für Klinische Pharmakologie
und Toxikologie
eingereicht über das
Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Untersuchung von fünf Fremdstoffen und deren Hauptme-
taboliten allein und in Kombination in der *Whole Embryo*
Culture mit Rattenembryonen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Caroline Kilb, geb. Hofbeck
Tierärztin
aus Erlangen**

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3595

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ralf Stahlmann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

animal testing alternatives, animal experiments, rats, embryo
culture, in vitro, metabolism, cyclophosphamide, retinol,
albendazole, valproic acid, acetylaminofluorine

Tag der Promotion: 11.12.2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-255-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Ziel.....	1
2.	Literaturübersicht.....	3
2.1	„Whole Embryo Culture“	3
2.2	Übersicht über die verwendeten Referenzsubstanzen.....	4
2.2.1	Auswahlkriterien für die verwendeten Substanzen.....	4
2.2.2	Cyclophosphamid.....	5
2.2.3	Acrolein.....	10
2.2.4	Retinol.....	11
2.2.5	all-trans-Retinsäure.....	16
2.2.6	Valpromid.....	19
2.2.7	Valproinsäure.....	20
2.2.8	Albendazol.....	23
2.2.9	Albendazolsulfoxid.....	26
2.2.10	Acetylaminofluoren.....	28
2.2.11	N-Hydroxy-Acetylaminofluoren.....	30
3.	Material und Methoden.....	31
3.1	„Whole Embryo Culture“	31
3.2	Tiere.....	31
3.2.1	Ratten.....	31
3.2.2	Tierhaltung.....	31
3.2.3	Verpaarung.....	31
3.2.4	Präparation der Eizylinder.....	32
3.2.5	Kultivierung der Embryonen.....	32
3.3	Auswertung.....	33
3.3.1	Auswertung mittels Stereolupe anhand des Scoring-Systems.....	33
3.3.2	Fotodokumentation.....	35
3.3.3	Proteinbestimmung.....	35
3.4	Statistik.....	36
4.	Ergebnisse.....	37
4.1	Allgemeine Auswertungskriterien der Ergebnisse.....	37
4.2	Ergebnisse der Ausgangssubstanzen, ihrer Metaboliten und ihrer jeweiligen Mischungen.....	38
4.2.1	Ergebnisse der Untersuchung von Cyclophosphamid, Acrolein und deren Mischungen	38
4.2.1.1	Cyclophosphamid.....	38
4.2.1.2	Acrolein.....	41
4.2.1.3	Cyclophosphamid und Acrolein in der 80/20-Mischung.....	44
4.2.1.4	Cyclophosphamid und Acrolein in der 50/50-Mischung.....	47

Inhaltsverzeichnis

4.2.2 Ergebnisse der Untersuchung von Retinol, all-trans-Retinsäure und deren Mischungen	51
4.2.2.1 Retinol.....	51
4.2.2.2 all-trans-Retinsäure.....	54
4.2.2.3 Retinol und all-trans-Retinsäure in der 80/20-Mischung.....	57
4.2.2.4 Retinol und all-trans-Retinsäure in der 50/50-Mischung.....	60
4.2.3 Ergebnisse der Untersuchung von Valpromid, Valproinsäure und deren Mischungen	64
4.2.3.1 Valpromid.....	64
4.2.3.2 Valproinsäure	66
4.2.3.3 Valpromid und Valproinsäure in der 80/20-Mischung.....	69
4.2.3.4 Valpromid und Valproinsäure in der 50/50-Mischung.....	72
4.2.4 Ergebnisse der Untersuchung von Albendazol, Albendazolsulfoxid und deren Mischungen	76
4.2.4.1 Albendazol.....	76
4.2.4.2 Albendazolsulfoxid.....	79
4.2.4.3 Albendazol und Albendazolsulfoxid in der 80/20-Mischung.....	82
4.2.4.4 Albendazol und Albendazolsulfoxid in der 50/50-Mischung.....	85
4.2.5 Ergebnisse der Untersuchung von Acetylaminofluoren, N-Hydroxy-Acetylaminofluoren und deren Mischungen	88
4.2.5.1 Acetylaminofluoren.....	88
4.2.5.2 N-Hydroxy-Acetylaminofluoren.....	91
4.2.5.3 Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren in der 80/20-Mischung.....	94
4.2.5.4 Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren in der 50/50-Mischung.....	97
5. Diskussion	101
5.1 Zusammenfassung der morphologischen Veränderungen der Embryonen nach Exposition mit fünf unterschiedlichen Substanzen	101
5.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch die jeweiligen Substanzpaare	102
5.2.1 Cyclophosphamid und Acrolein	102
5.2.1.1 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Cyclophosphamid.....	102
5.2.1.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Cyclophosphamid und Acrolein.....	103
5.2.1.3 Diskussion der therapeutischen Konzentrationen und deren Wirkungen mit den in der <i>WEC</i> festgestellten Veränderungen durch Cyclophosphamid und Acrolein.....	104
5.2.2 Retinol und all-trans-Retinsäure	105
5.2.2.1 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Retinol.....	105

Inhaltsverzeichnis

5.2.2.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Retinol und all-trans-Retinsäure.....	106
5.2.2.3 Diskussion der therapeutischen Konzentrationen und deren Wirkungen mit den in der WEC festgestellten Veränderungen durch Retinol und all-trans-Retinsäure.....	107
5.2.3 Valpromid und Valproinsäure.....	108
5.2.3.1 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Valpromid.....	108
5.2.3.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Valpromid und Valproinsäure.....	108
5.2.3.3 Diskussion der therapeutischen Konzentrationen und deren Wirkungen mit den in der WEC festgestellten Veränderungen durch Valpromid und Valproinsäure.....	109
5.2.4 Albendazol und Albendazolsulfoxid.....	110
5.2.4.1 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Albendazol.....	110
5.2.4.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Albendazol und Albendazolsulfoxid.....	110
5.2.4.3 Diskussion der therapeutischen Konzentrationen und deren Wirkungen mit den in der WEC festgestellten Veränderungen durch Albendazol und Albendazolsulfoxid.....	111
5.2.5 Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren.....	112
5.2.5.1 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Acetylaminofluoren.....	112
5.2.5.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren.....	112
5.2.5.3 Diskussion der therapeutischen Konzentrationen und deren Wirkungen mit den in der WEC festgestellten Veränderungen durch Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren.....	113
5.3 Schlussfolgerungen aus den Einzel- und Mischungsversuchen in der WEC mit Rattenembryonen.....	113
6. Zusammenfassung.....	114
7. Summary.....	116
8. Anhang.....	118
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	118
8.2 Geräte und Chemikalien.....	120
8.2.1 Geräte.....	120
8.2.2 Chemikalien.....	121
8.2.3 Puffer, Lösungen und Gase.....	122
8.3 Tabellenverzeichnis.....	123

Inhaltsverzeichnis

8.4	Grafikverzeichnis.....	125
8.5	Abbildungsverzeichnis.....	125
8.6	Fotoverzeichnis.....	126
8.7	Literaturverzeichnis.....	128
9.	Publikationen und Poster.....	137
9.1	Poster.....	137
9.2	Publikationen.....	137
10.	Danksagung	138
11.	Selbständigkeitserklärung.....	139

1. Einleitung und Ziel

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) hat von 2008 bis 2011 ein Verbundprojekt mit dem Titel „**Entwicklung eines Biotransformationssystems für die metabolische Aktivierung von validierten *in-vitro*-Systemen zur Prüfung auf Embryotoxizität**“ gefördert (Nr. 0315208A). In dessen Rahmen wurde die hier vorliegende Promotionsarbeit mit dem Thema „**Untersuchung von fünf Fremdstoffen und deren Hauptmetaboliten allein und in Kombination in der *whole embryo culture* mit Rattenembryonen**“ erstellt.

Das Gesamtziel des Vorhabens entspricht der Entwicklung von Alternativmethoden zum Tierversuch, wobei die Methode „*whole embryo culture*“ (WEC) bereits in Studien der ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) und der ZEBET (Zentrum für Dokumentation und Evaluation von Alternativmethoden zum Tierversuch am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin) in den Jahren 1996 und 2000 zusammen mit dem Embryonalen Stammzelltest und dem Micromass Test validiert wurde (Brown, 2002; Genschow et al., 2002). Im Bereich der Embryotoxizität werden zur Untersuchung von Arzneimitteln und anderen chemischen Substanzen Tiermodelle herangezogen. Diese verursachen potentiell Leiden, Schmerzen und Schäden für die Tiere und gehen auch mit großem Kosten-, Zeit- und Arbeitsaufwand einher. Die WEC bietet, wie auch der Embryonale Stammzelltest, eine Möglichkeit, Tierversuche auf dem Gebiet der Reproduktionstoxikologie zu reduzieren.

Im Sinne der „drei Rs“ – Replacement, Reduction und Refinement – ursprünglich von Charles Hume, dem Gründer der Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), im Jahr 1954 vorgeschlagen (Russell et al., 1959) und weitergeführt von Russel und Burch im Jahre 1959, sollen hier Methoden verfeinert werden, die zu einer Verminderung bzw. einem Ersatz von Tierexperimenten führen (Russell et al., 1959; Balls et al., 1996). Aufgrund dieser Bestrebungen und einem wachsenden Interesse seitens der Öffentlichkeit fanden die „drei Rs“ auch Eingang in die Gesetzgebung. ECVAM wurde im Jahr 1991 von der Europäischen Kommission eingerichtet, um die wissenschaftliche und behördliche Akzeptanz von Alternativmethoden zu verstärken. In der momentanen europäischen und US-amerikanischen Gesetzgebung ist nun verankert, dass bei der Verwendung von Labortieren eine Überprüfung stattzufinden hat, ob der Einsatz von Tieren wissenschaftlich und ethisch gerechtfertigt ist (Brown, 2002; Zurlo et al., 1996).

Um den gesetzlichen und ethischen Anforderungen gerecht zu werden, besteht weiterhin ein großer Forschungsbedarf auf dem Gebiet der Alternativmethoden, um die Zahl an verwendeten Labortieren zu minimieren, diese Methoden zu verbessern oder ganz zu ersetzen. Ebenso wie in anderen Bereichen ist es auch in der Reproduktionstoxikologie wichtig, eine Möglichkeit zur Integration eines metabolisierenden Systems in die *in-vitro*-Tests zu finden.

Einleitung

Deshalb beschäftigt sich das Verbundprojekt mit der Möglichkeit der Integration der metabolischen Aktivierung von Testsubstanzen, um auch das embryotoxische Potenzial von „Proteratogenen“ nachweisen zu können, die erst nach metabolischer Aktivierung eine embryotoxische Wirkung aufweisen.

Im Rahmen des Verbundprojekts soll die mögliche Kombination des Embryonalen Stammzelltests (EST) und der *WEC* mit Biotransformationssystemen untersucht werden. Diese Biotransformationssysteme basieren auf primären Hepatozyten des Schweins bzw. NeoHep-Zellen, die aus Monozyten des Menschen gewonnen werden. Die primären Hepatozyten der Ratte dienen als Vergleich für die Optimierung und Standardisierung. In einem ersten Schritt sollen ausgewählte Substanzen und deren Metaboliten allein und in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen untersucht werden. In dieser Arbeit werden die Versuche mit der *WEC* und fünf Substanzen, Metaboliten und verschiedenen Kombinationen untersucht, um einen unvollständigen Umsatz von Ausgangssubstanz zu Metabolit zu simulieren und die Effekte für einen späteren realen Umsatz durch die Hepatozyten beurteilen zu können.

2. Literaturübersicht

2.1 „Whole Embryo Culture“

Eine immer größer werdende Zahl von chemischen Substanzen muss auf Toxizität getestet werden. Gesetzlich wurde dies von der Europäischen Union in der am 01. Juni 2007 in Kraft getretenen sogenannten **REACH**-Verordnung niedergelegt. REACH steht dabei für **R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation of **C**hemicals (Registrierung, Bewertung und Zulassung von Chemikalien). Diese EG-Verordnung (Nr. 1907/2006) zentralisiert und vereinfacht das Chemikalienrecht europaweit. Da dieses Ziel möglichst ohne eine drastische Ausweitung von Tierversuchen erreicht werden soll, war es in den letzten Jahrzehnten nötig, eine Reihe von Alternativmethoden unterschiedlicher Komplexität zu etablieren. Dazu zählen Zell-, Organ- und Embryokulturen, die eine Reduktion ansonsten notwendiger Tierversuche bewirken sollen. Dabei reicht das Spektrum von einfachen Zellkulturen bis hin zu hochkomplexen Systemen. Ungeklärt dabei ist, ob durch den Verzicht auf Tierexperimente das Niveau an Sicherheit bei der toxikologischen Prüfung unverändert bleibt (Flick und Klug, 2006).

Innerhalb einer ECVAM-Studie im Zeitraum zwischen 1997 und 2000 (Genschow et al., 2002; Piersma et al., 2002; Spielmann et al., 2002) wurden drei *in-vitro*-Alternativmethoden zum Tierversuch im Bereich Embryotoxizität validiert. Nach dem Validierungsschema der ECVAM, ICCVAM und der OECD wurden folgende Methoden empfohlen: Die *WEC* mit Rattenembryonen, der Micromass Test (MMT) mit primären Kulturen von dissoziierten Limb-Bud-Cells (Extremitätenknospen) und Mittelhirn von Rattenembryonen sowie der EST, der mit etablierten Mäuseembryonenzelllinien arbeitet. In der Studie wurden 20 Testsubstanzen evaluiert, die in drei Klassen unterteilt wurden: „nicht embryotoxisch“, „schwach embryotoxisch“ und „stark embryotoxisch“ (Spielmann und Liebsch, 2002). Je nach Anforderungsprofil der durchzuführenden Tests eignen sich die einzelnen Methoden unterschiedlich gut. Die Zellkulturen haben den Vorteil, dass keine Tiere verwendet werden müssen. Allerdings lässt sich nur eine geringe Breite an (zytotoxischen) Mechanismen und Effekten an ihnen darstellen. Ähnliches gilt für Versuche mit einzelnen Organen. Die *WEC* ist hingegen eine relativ aufwendige und teure Methode. Außerdem müssen tragende Tiere dafür getötet werden. Positiv ist hierbei zu bewerten, dass sich die Effekte der Substanzen auf die embryonale Entwicklung während der Organogenese gut darstellen lassen. Allen Methoden fehlt jedoch die metabolische Kapazität, die in einem Tierexperiment durch die Metabolisierung von Fremdstoffen im mütterlichen Organismus repräsentiert wird (Dinort, 2007).

Die *WEC* lässt die Beobachtung von Veränderungen während einer sehr sensiblen Phase der Organogenese zu, wobei eine weitgehende Übereinstimmung mit Tierexperimenten vorliegt. Innerhalb der Validierungsstudie wurde festgestellt, dass in der *WEC* mit einer 70-prozentigen nicht embryotoxische und mit einer 76-prozentigen Wahrscheinlichkeit schwach

embryotoxische Substanzen erkannt werden können; stark embryotoxische Substanzen wurden zu 100 % detektiert (Dinort 2007).

In der *WEC* können Embryonen von Fischen, Amphibien, Vögeln, wie auch Säugetierembryonen von Mäusen, Hamstern, Ratten oder Kaninchen verwendet werden. Die Ergebnisse zeigen aber speziesabhängige Unterschiede, so dass diese nicht gegenseitig übertragbar bzw. zu vergleichen sind (Flick et al., 2006). Da bei den meisten tierexperimentellen Studien zur Pränataltoxizität von Fremdstoffen Ratten verwendet werden, wird eine *WEC* bei toxikologischen Fragestellungen auch meist mit Rattenembryonen durchgeführt.

2.2 Übersicht über die verwendeten Referenzsubstanzen

2.2.1 Auswahlkriterien für die verwendeten Substanzen

Das Verbundprojekt beschäftigte sich mit der Weiterentwicklung von validierten *in-vitro*-Methoden, so dass es notwendig war, zunächst bereits als teratogen bzw. embryotoxisch bekannte Substanzen zu verwenden. Die ECVAM International Validation Study legte schon im Jahr 1994 Substanzen fest, die zur Testung von *in-vitro*-Systemen zur Embryotoxizität herangezogen werden konnten. Dabei wurden die Chemikalien klassifiziert in:

- nicht embryotoxisch (Klasse 1)
- schwach embryotoxisch (Klasse 2)
- stark embryotoxisch (Klasse 3)

Des Weiteren wurden auch die in dem hier durchgeführten Projekt verwendeten Substanzen all-trans-Retinsäure (Klasse 2) und Valproinsäure (Klasse 2) validiert (Brown, 2002). Zusätzlich wurden Cyclophosphamid, Albendazol und Acetylaminofluoren und deren Metaboliten untersucht.

Im Folgenden werden die zu untersuchenden Substanzpaare hinsichtlich ihres Metabolismus und ihrer Teratogenität beschrieben.

2.2.2 Cyclophosphamid

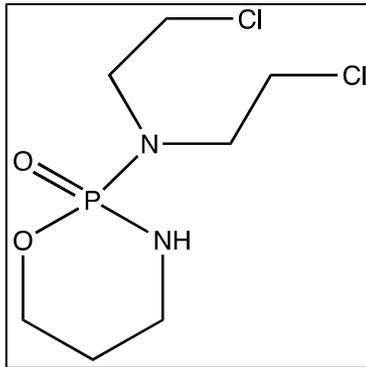


Abb. 1: Strukturformel von Cyclophosphamid

Cyclophosphamid gehört zu der Gruppe der alkylierenden N-Lost-Verbindungen. Es wird als Zytostatikum, meist in Kombination mit anderen Therapeutika, zur Behandlung von Neoplasien wie Brust- und Lungenkrebs, Leukämie und bei Autoimmunerkrankungen als Immunsuppressivum eingesetzt. Cyclophosphamid ist bekannt für seine teratogene Wirkung bei Tieren. Diese wurde bereits in mehreren Studien, unter anderem in der *WEC* (Luijten et al., 2008; Slott et al., 1988), in der Kultur von Limb-Buds von Mäusen (Huang et al., 2009), durch intraamniotische subgerminale Injektion in Hühnerembryonen zwischen Tag 2 bis 4 (Heringova et al., 2003), sowie durch Behandlung tragender Ratten mittels intraperitonealer Injektion (Park et al., 2009; Xiao et al., 2007), nachgewiesen.

Cyclophosphamid wird durch verschiedene Enzyme (Cytochrom P450 (CYP-)abhängige Monooxygenasen, die Glutathion-S-Transferase (GST) und die Aldehyd-Dehydrogenase) metabolisiert. Dabei entfaltet es erst durch enzymatische Aktivierung in der Leber (Hydroxylierung durch die CYP-Monooxygenasen) seine antineoplastische und auch teratogene Potenz und ist damit ein „Prodrug“ bzw. „Proteratogen“. Unter Prodrug (bzw. Proteratogen) versteht man eine Substanz, die erst durch die im Körper erfolgende Metabolisierung ihre pharmazeutische bzw. teratogene Wirksamkeit erhält. Für verschiedene CYP-Enzyme konnte nachgewiesen werden, dass sie in die 4-Hydroxylierung von Cyclophosphamid beim Menschen involviert sind, einschließlich CYP 2B6, 2C9, 2C19, 3A4 und 3A5, wobei 2B6 die höchste 4-Hydroxylierungsaktivität zeigte (Ekhart et al., 2008). Die hepatischen Enzyme CYP2B und CYP2C katalysieren die Ausgangssubstanz über einen Zwischenschritt (4-Hydroxy-Cyclophosphamid und seinem Aldehyd-Tautomer Aldophosphamid) zu den aktiven Metaboliten Acrolein und Phosphoramidmustard durch spontane β -Elimination (siehe Abb. 2 auf S. 6). Die CYP2B-Isoformen gelten als verantwortlich für die Bildung der embryotoxischen Metaboliten Acrolein und Phosphoramidmustard. 4-Hydroxy-Cyclophosphamid und Phosphoramidmustard werden von der GST inaktiviert (Ekhart et al., 2008; Park et al., 2009).

Literaturübersicht

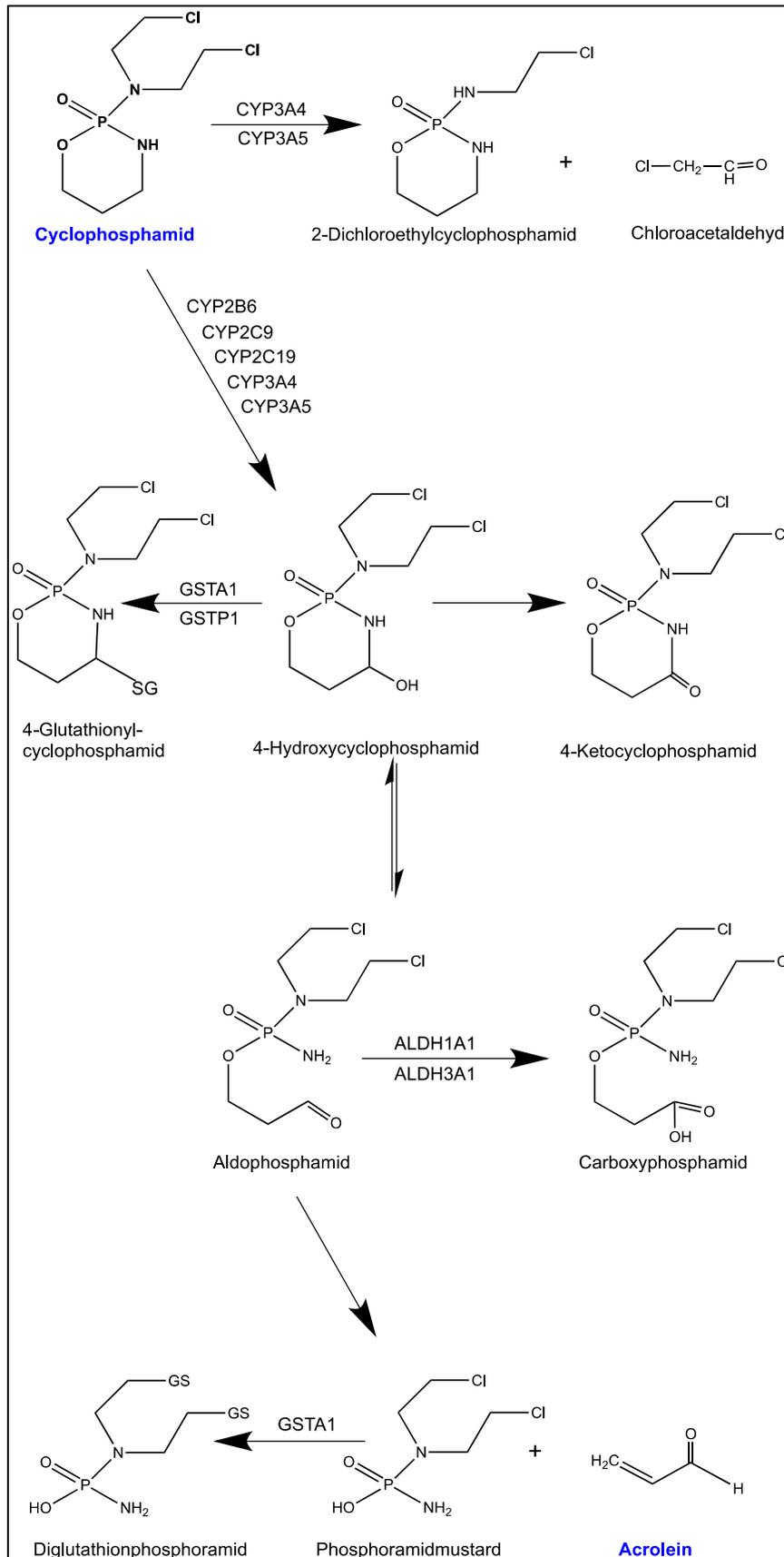


Abb. 2: Metabolisierung von Cyclophosphamid zu Phosphoramidmustard und Acrolein (modifiziert nach Ekhart et al., 2008).

Literaturübersicht

In einer WEC-Studie mit Rattenembryonen von Luijten und Mitarbeiter mit nicht-metabolisiertem bzw. nicht-enzymatisch bioaktiviertem Cyclophosphamid wurden bei einer Konzentration von 300 µg/ml (1074,8 µM) keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Erst nach einer Inkubation mit einer Mikrosomenpräparation zeigten sich morphologische und funktionelle Läsionen (Luijten et al., 2008).

In einer weiteren Studie wurden die Wirkungen von Cyclophosphamid auf Mäuseembryonen *in vitro* getestet (Ozolins et al., 1995). Dabei wurde eine Embryo-Hepatozyten-Co-Kultur von embryonalen und maternalen Mäusehepatozyten verwendet. Am Tag 9,5 wurden die Embryonen entnommen und für 24 Stunden in Kombination mit primären maternalen Mäusehepatozytenkulturen (> 85 % Überlebensrate) kultiviert. Die Mäuseembryonen wurden dann mit Cyclophosphamid in den Konzentrationen 0, 7,5, 15 und 25 µg/ml inkubiert. Dabei wiesen die mit nicht-aktiviertem Cyclophosphamid behandelten Embryonen im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderungen auf. Das aktivierte Cyclophosphamid hatte konzentrationsabhängig Einfluss auf die Scheitel-Steiß-Länge (Abnahme), Somitenzahl und Dottersackparameter (Ozolins et al., 1995).

In neueren *in-vitro*-Studien mit dem EST (Hettwer et al., 2010) und der Kultur mit Limb-Buds (Huang und Hales, 2009) konnte eine Beeinflussung der Entwicklung durch nicht-aktiviertes Cyclophosphamid festgestellt werden. Im EST sollten seine Auswirkungen auf die Differenzierung der embryonalen Stammzellen in Kardiomyozyten und auf die Proliferation von embryonalen Stammzellen sowie Balb/c-3T3-Zellen (adulte Mausfibroblasten) untersucht werden. Dabei wurden sechs Konzentrationen im Bereich von 31,3 bis 1000 µg/ml getestet. Innerhalb dieses Bereichs konnte kein (toxischer) Effekt auf die Lebensfähigkeit der Balb/c 3T3 nachgewiesen werden (IC₅₀-D3-Konzentration: 920 µg/ml). Durch Einsatz von mit Cyclophosphamid inkubierten primären murinen Hepatozyten und anschließender Verwendung im D3-Differenzierungsassay des EST ließ sich ein toxischer Effekt erzielen. Hier konnte dann im Vergleich zu nicht-aktiviertem Cyclophosphamid eine über 70-fach niedrigere IC₅₀-D3-Konzentration (von 5 µg/ml) berechnet werden. Die metabolische Aktivierung mittels eines CYP-450-Monooxygenasesystems wurde damit als Voraussetzung erkannt, um Effekte im EST bei relevanten Konzentrationen zu erzielen (Hettwer et al., 2010).

4-Hydroperoxycyclophosphamid wurde in der Limb-Buds-Kultur mit CD-1[®]-Mäusen getestet. Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Cyclophosphamid-Derivat, das spontan zu den gleichen Stoffen zerfällt wie Cyclophosphamid durch Metabolismus. Dabei wurden die Gliedmaßenknospen von Mäuseembryonen am Gestationstag 12,5 über sechs Tage hinweg mit Konzentrationen von 1 bzw. 3 µg/ml des aktivierten Analogons inkubiert. Es konnten bei beiden Konzentrationen deutliche Veränderungen auf die Chondrogenese festgestellt werden, vor allem in der Knochenlänge und der Zehenformation (Huang und Hales, 2009).

Literaturübersicht

Bereits in früheren Studien an Nagetieren, aber auch an Hühnern, Kaninchen und Affen, wurde gezeigt, dass die Substanz während der sensitiven Phase der Organogenese embryofetale Resorptionen, Wachstumsverzögerung oder multiple Anomalien wie Anenzephalie, sowie Gliedmaßen- und Skelettdefekte verursacht (Enns et al., 1999; Mirkes, 1985; Park et al., 2009). Die Tiere litten an Fehlbildungen in der Gesichtsregion wie Exophthalmus, Gaumen-/Lippenspalte, Mikrotie und Mittelgesichtshypoplasie (Gilani et al., 1983; Mirkes, 1985).

Xiao und Mitarbeiter (2007) verabreichten intraperitoneal tragenden Ratten am 13. Gestationstag Cyclophosphamid in den Dosierungen 7,5, 10,5, 12,5 und 15,0 mg/kg und töteten diese am 14. Tag. Die Effekte auf die embryonalen Gehirne wurden mit Hilfe von Zytotoxizitätstest (MTT), Single-Cell-Gel-Elektrophorese, Durchflusszytometrie und Elektronenmikroskopie untersucht. Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe zeigten sich deutliche Effekte vor allem bei der mit einer Konzentration von 12,5 mg/kg Körpergewicht behandelten Gruppe. Im Bereich des Neuralrohrs traten nach 24-stündiger Behandlung mit Cyclophosphamid apoptotische Zellen auf. In dieser Studie konnte somit festgestellt werden, dass teratogene Wirkungen von Cyclophosphamid auch noch nach Schluss des Neuralrohrs in Form einer neuralen Apoptose induziert werden können. Bei einer Konzentration von 8 µg/ml Cyclophosphamid (*in vitro*) sanken das Wachstum und die Lebensfähigkeit von Neuronen, DNA-Schäden entstanden und frühe apoptotische morphologische Schäden traten auf (Xiao et al., 2007).

Die Teratogenität von Cyclophosphamid wurde in mehreren Fallberichten aus der Humanmedizin beschrieben. Es traten kongenitale Veränderungen nach Exposition des Embryos mit der Substanz auf, die allerdings wenig spezifisch waren (Enns et al., 1999; Gupta et al., 2009). Cyclophosphamid wird häufig zusammen mit anderen Chemotherapeutika (5-Fluoruracil, Adriamycin oder Methotrexat) angewandt, so dass eine eindeutige Zuordnung der Veränderungen zu einer Substanz nicht möglich ist.

In einem Fallbericht aus dem Jahr 1999 (Enns et al., 1999) beschäftigten sich die Autoren mit der Frage der Ausprägung der morphologischen Veränderungen nach pränataler Cyclophosphamidexposition. Vor allem nach Verabreichung im ersten Trimenon wurden Fälle mit Fehlbildungen beschrieben; es besteht aber offenbar eine relative Sicherheit im zweiten und dritten Trimenon. Die Mutter wurde während ihrer bis zur 26. Woche nicht erkannten Schwangerschaft gegen Lupus Nephritis und Hypertonie mit vier intravenös verabreichten Dosen des cyclophosphamidhaltigen Präparates Cytoxan (20 mg/kg pro Dosis) behandelt. Davon wurden drei Dosen wahrscheinlich vor der Gravitätät und eine in der sechsten Woche post conceptionem am Tag 37 gegeben. Die Mutter nahm während ihrer Schwangerschaft außerdem noch Nifedipin, Atenolol, Clonidin, Prednison, Acetylsalicylsäure und Kaliumchlorid ein. Es gab keine Hinweise auf Erbkrankheiten in der Familie. Das Kind hatte bei der Geburt ein vermindertes Gewicht (< 5. Perzentile) und eine geringe Körpergröße (5. bis 10.

Literaturübersicht

Perzentile). Zudem zeigte das Mädchen von Geburt an noch verschiedene andere Anomalien: Mikrobrachyzephalie, Blepharophimosis, flache Orbitae, Hypertelorismus, breiter, flacher Nasenrücken, knollenförmige Nasenspitze, überfaltete kleine Ohren, präaurikulare Grube linksseitig, bogenförmig gekrümmter Daumen, Mikrognathie und hypoplastische Daumen. Darüber hinaus fand sich am fünften Finger eine Klinodaktylie und bilateral fehlten der vierte und fünfte Zeh.

Eine komplette Untersuchung des Skeletts ergab zusätzlich eine Brachyzephalie, Anterolisthesis des S1 Wirbelkörpers, Hypoplasie der Phalangen des fünften Fingers und Fehlen des vierten und fünften Metatarsus. Eine MRT des Kopfes zeigte im Alter von sechseinhalb Wochen unter anderem eine leichte Ventrikulomegalie, das teilweise Fehlen des Septum pellucidum und ein abnormales, einfaches gyrales Muster. Bei einer ophthalmologischen Untersuchung wurden leicht hypoplastische Nervi optici, eine Exotropie und möglicherweise eine kortikale visuelle Beeinträchtigung festgestellt. Die Chromosomenzahl der Blutzellen war normal (46, XX). Insgesamt war das Mädchen entwicklungsverzögert und hatte schwerwiegende motorische Defizite (Enns et al., 1999).

In einem weiteren Fallbericht aus dem Jahr 2005 (Paskulin et al., 2005) wurde ein Patient vorgestellt, dessen Mutter im ersten Trimenon ihrer Schwangerschaft an Brustkrebs erkrankt war und mit Chemotherapeutika (Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil und Adriamycin) behandelt worden war. Das Kind kam mit bilateraler Syndaktylie am ersten und zweiten Finger, gespaltenen Händen zwischen dem zweiten und dritten Finger, einem dystrophischen Nagel am vierten Finger der linken Hand, fehlenden distalen Fingerphalangen, hochgewölbtem Gaumen, Mikrozephalie und einem abgeflachten Nasenrücken auf die Welt.

Eine letzte hier zitierte Falluntersuchung aus dem Jahr 2009 (Gupta et al., 2009) beschrieb eine erfolgreiche Zwillingschwangerschaft unter Cyclophosphamidtherapie bei einer Patientin, die ebenfalls an Lupus Nephritis litt. Ihr wurde das Medikament (15 mg/kg Körpergewicht, d.h. hier 600 mg einmal pro Monat nach dem NIH Regime) intravenös verabreicht, zusätzlich erhielt sie eine Dauertherapie mit 100 mg Azathioprin pro Tag. Als die Schwangerschaft diagnostiziert wurde, erhielt die Frau bereits die Cyclophosphamidtherapie. Die Therapie wurde auf Wunsch der Patientin weitergeführt. Zudem bekam sie Hydroxychloroquin und Prednisolon in niedriger Dosierung; das Azathioprin wurde abgesetzt. Die Zwillinge kamen in der 32. Woche zur Welt und zeigten keine kongenitalen Fehlbildungen. Jedoch wurde darauf hingewiesen, dass nicht allzu viele Schwangerschaften unter Cyclophosphamidtherapie ohne Nebenwirkungen für den Embryo verlaufen. Es besteht die Gefahr, dass es durch Cyclophosphamid-Gabe während der Schwangerschaft im späteren Leben der *in utero* exponierten Kinder zu sekundären malignen Veränderungen kommen kann (Gupta et al., 2009).

2.2.3 Acrolein

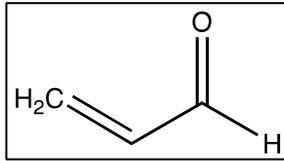


Abb. 3: Strukturformel von Acrolein

In den hier beschriebenen Experimenten wurde Acrolein als (neben Phosphoramidmustard) bekannter Metabolit des Cyclophosphamid verwendet. Es handelt sich dabei um einen ungesättigten Aldehyd, der unter anderem auch in Autoabgasen, Zigarettenrauch sowie in Wein vorkommt (Chhibber et al., 1986; Slott et al., 1986).

Die embryotoxische Wirkung des Cyclophosphamid-Metaboliten wurde bereits in verschiedenen *in-vitro*-Studien an Kaninchenembryonen, in Hühnereiern (Chhibber und Gilani, 1986), durch Injektion in Dottersack und Amnion (Claussen et al., 1980) und in der *WEC* mit Rattenembryonen (Mirkes et al., 1984; Slott und Hales, 1986) untersucht. Seine ausgeprägte Embryotoxizität und -letalität wurde *in vitro* und *in vivo* bestätigt. Veränderungen zeigten sich in Form von asymmetrischen Wirbelkörpern, Spina bifida, deformierten Rippen, Fehlen oder Fusion von Sternumsegmenten und Mikrophthalmus beim Kaninchenembryo (Chhibber und Gilani, 1986). In der Rattenembryokultur konnte man eine Größenabnahme und eine abnormale Flexion des Embryos mit steigender Konzentration beobachten (Mirkes et al., 1984). In der *WEC* zeigten sich signifikante Fehlbildungen des Gehirns, des Herzens, der Somiten, der Gesichtsregion und der Vordergliedmaßenanlage ebenso wie eine Größenabnahme (Scheitel-Steiß-Länge) und eine Veränderung von Kopflänge und Dottersackdurchmesser ab einer Konzentration von 80 µM Acrolein. Ab einer Konzentration von 120 µM Acrolein konnte eine Zunahme toter Embryonen festgestellt werden (Slott und Hales, 1986).

Bereits im Jahr 1985 wurde der Metabolit Acrolein auch in der Limb-Bud-Culture mit Mäuseembryonen (Gestationstag 11 oder 12) getestet. In einem Konzentrationsbereich von 3 und 10 µg/ml wurde ein deutlicher Einfluss auf die Differenzierung der Gliedmaßenknospen nach sechstägiger Kultur festgestellt. Der Effekt machte sich vor allem bei der Skapula und den knöchernen Strukturen der Pfoten bemerkbar, Radius und Ulna waren weniger betroffen (Stahlmann et al., 1985).

2.2.4 Retinol

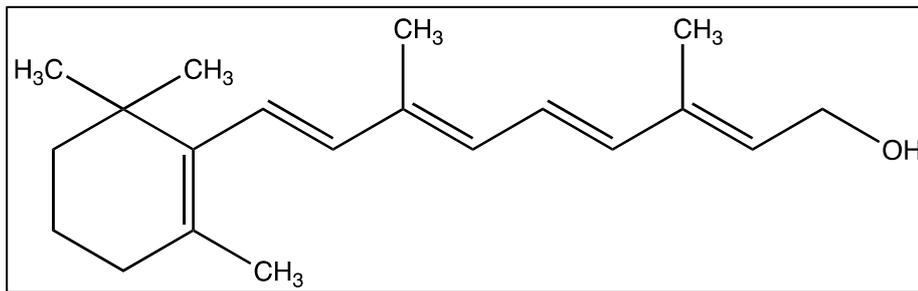


Abb. 4: Strukturformel Retinol (Vitamin A)

Retinol gehört zur Gruppe der essentiellen fettlöslichen Vitamine und wird in der Leber gespeichert. Bereits 1937 konnte demonstriert werden, dass die Exposition von Säugetieren mit Vitamin A zu angeborenen Defekten führen kann. 1940 wurde gezeigt, dass ein Vitamin-A-Mangel bei tragenden Ratten ebenfalls zu multiplen angeborenen Veränderungen führt. In einer ganzen Reihe von Untersuchungen bzw. Studien konnten ebenfalls zahlreiche kongenitale Fehlbildungen durch die Verabreichung von hoch dosiertem Retinol (100 bis 200 mg/kg bei tragenden Labortieren wie Ratten, Mäusen oder auch Schweinen) während einer frühen Phase der Gravidität bei Säugetieren ausgelöst werden (Kraft et al., 1992; Lee et al., 1991). Epidemiologische Studien zeigen, dass ein entsprechendes Risiko offenbar auch für den Menschen besteht (Rothman et al., 1995).

In der Studie aus dem Jahr 1992 von Kraft und Juchau (1992) wurden Rattenembryonen am Tag 10 mittels intraamniotischer Injektion mit jeweils einem Retinoid (all-trans-Retinsäure, 13-cis-Retinsäure und Retinol) behandelt und bis Tag 11,5 in Kultur gebracht. Dabei wurde festgestellt, dass alle drei Retinoide qualitativ ähnliche Dymorphogeneseeffekte hervorriefen wie durch eine niedrige Konzentration von all-trans-Retinsäure (250 ng/ml) verursacht wurden; im Vergleich dazu mussten die Konzentrationen von 13-cis-Retinsäure um das sechsfache und bei Retinol sogar etwa um das 16-fache höher angesetzt werden. Bei der Inkubation mit all-trans-Retinsäure wurde bei 55 bis 60 % der überlebenden Embryonen eine oder mehrere Abnormitäten wie unterentwickelte zweite Kiemenbögen, fehlende Augenblasen und Unregelmäßigkeiten in der kaudalen Körperregion (abnorme Achsenrotation, unregelmäßige Somiten) festgestellt. Retinol wurde mit 4 µg/ml getestet. Hier zeigten nach 24 Stunden 86 % der inkubierten Embryonen mindestens einen Defekt, der den unter all-trans-Retinsäure aufgetretenen Fehlbildungen entsprach. Kraft und Mitarbeiter vermuteten eine fetale Metabolisierungskapazität, die eine Umwandlung von Retinol zu all-trans-Retinsäure bewirke und dass damit die entstandene all-trans-Retinsäure verantwortlich für die teratogenen Effekte sei (Kraft und Juchau, 1992).

Die Möglichkeit der embryonalen Metabolisierung wurde in einer weiteren Studie von Chen und Mitarbeitern beschrieben (Chen et al., 1995). Hierin wurde die Biotransformation von all-

Literaturübersicht

trans-Retinol und all-trans-Retinal in all-trans-Retinsäure in Rattenembryonenhomogenat untersucht. Hierfür wurden Rattenembryonen vom Gestationstag 10,5, 11,5 und 12,5 verwendet. Im ersten Schritt erfolgte die Homogenisierung. Das jeweilige Homogenat der verschiedenen Gestationsstadien wurde im Anschluss inkubiert. Bei allen konnte mittels HPLC festgestellt werden, dass ein nachweisbarer Teil von all-trans-Retinol und all-trans-Retinal in all-trans-Retinsäure umgewandelt wurde. Es wurden all-trans-Retinol und all-trans-Retinal in Konzentrationen von 18, 36, 54 und 72 μM verwendet. Die Reaktion war Coenzym-abhängig (NAD). Die Reaktionsraten steigerten sich im gleichen Umfang, wie das embryonale Protein sich erhöhte. Beide Reaktionen wurden durch Erhitzen des Homogenats (5 Minuten bei 100°C) beendet (Chen und Juchau, 1998).

In der *WEC* mit Rattenembryonen wurden Retinol und all-trans-Retinsäure auf ihre fruchtschädigende Wirkung getestet, wobei die inkubierten Embryonen keine Veränderungen gegenüber den Kontrollembryonen bei einer Konzentration von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Retinol zeigten (Luijten et al., 2008).

Eine weitere *in-vitro*-Studie wurde mit einer Maus-Limb-Bud-Kultur und Maus-Mesenchymzellkulturen (High Density Culture) durchgeführt (Zimmermann et al., 1985). Dafür wurden die oberen Gliedmaßenanlagen von NMRI-Mäuseembryonen (Gestationstag 11) verwendet und auf Membranfiltern in Organkulturen (Methode von Trowell) inkubiert. Die Mesenchymzellen wurden aus Gliedmaßenanlagen von Mäuseembryonen des Gestationstages 12 gewonnen. Beide Kulturen wurden bei 37°C in humider Atmosphäre (2,5 % CO_2 Luftgehalt) über sechs Tage inkubiert. Verwendete Retinoide waren all-trans-Retinsäure, 13-cis-Retinsäure und weitere Isoformen in Konzentrationen von 0,1, 1,0, 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Alle Substanzen wurden in DMSO gelöst. Die Kontrollen wurden nur mit DMSO behandelt. Limb Buds und Zellen waren von Tag 1 bis 3 exponiert. Ein Teil der Limb Buds und der Zellen wurde dann elektronenmikroskopisch untersucht, während der andere Teil für weitere drei Tage inkubiert wurde. Jedes der getesteten Retinoide bewirkte eine konzentrationsabhängige Inhibition der Differenzierung der Limb Buds vom Blastemstadium zu den Knorpelanlagen des Skeletts. Allerdings konnten quantitative Unterschiede zwischen den Substanzen festgestellt werden. all-trans-Retinsäure war wirksamer als 13-cis-Retinsäure und diese wiederum war stärker auf die Ausbildung der Gliedmaßen wirksam als die zwei weiteren getesteten Isoformen. Alle untersuchten Retinoide zeigten ähnliche Effekte auf das Limb-Bud-Mesenchym. Bei höheren Konzentrationen entwickelte sich kein Knorpelgewebe. Die quantitative Wirkung in der Mesenchymzellkultur glich der in der Limb Bud Kultur (all-trans-Retinsäure > 13-cis-Retinsäure > Isoformen) (Zimmermann et al., 1985).

Die Teratogenität der Retinoide ist in mehreren Tierversuchen gezeigt worden. Bereits im Jahr 1953 führte Cohlan Versuche mit tragenden Ratten durch, bei denen er Vitamin A an diese mittels einer Verdünnungslösung verfütterte (Cohlan, 1953). Dabei wurden 50.000 In-

Literaturübersicht

ternationale Einheiten (I.E.) Vitamin A (entsprechend etwa 15 mg all-trans-Retinsäure) mit Sorethytan-Monooleate-und-Wasser-Verdünnung vermischt. Es wurde festgestellt, dass die Fähigkeit, den Wurf bis zum Geburtstermin auszutragen, zurückging, wenn 35.000 I.E. Vitamin A pro tragender Ratte täglich vom zweiten, dritten oder vierten bis zum 16. Tag der Trächtigkeit gegeben wurden. Nur bei 10 % der behandelten Tiere verlief die Trächtigkeit normal. Die nur mit dem Vehikel gefütterte Gruppe erreichte eine Rate von 88 %. Auffällig waren vor allem die kongenitalen Veränderungen im Wurf der mit Vitamin A behandelten Gruppe. Beobachtet wurden dabei Enzephalozelen, Gaumenspalten, Makroglossie, eine Verkürzung von Mandibula und Maxilla und schwerwiegende Augendefekte allein, sowie assoziiert mit Schädeldeformationen. In mehreren nachfolgenden Untersuchungen wurde eine Menge von 25.000 I.E. Vitamin A bei täglicher Fütterung an tragende Ratten von Tag 7 bis 10 der Trächtigkeit als Dosis für eine konstant hohe Inzidenz für schwerwiegende Fehlbildungen ermittelt (Cohlan, 1953).

Der Einfluss auf die Neurulation fand ebenfalls viel Beachtung in Tierexperimenten. Diese Studien wurden auch mehrfach zur Erforschung der Organogenese des Nervensystems herangezogen (Nobakht et al., 2006). Hier wurden die Effekte von Retinsäure auf die Neurulation bei Mäuseembryonen untersucht. Die adulten Albinomäuse wurden dabei in vier Gruppen aufgeteilt, die entweder nicht (Kontrollgruppe), mit einer Einzeldosis DMSO oder mit einer Einzeldosis von 40 mg/kg bzw. 60 mg/kg Retinsäure (gelöst in DMSO) mittels intraperitonealer Injektion am Gestationstag 8 behandelt wurden. Am Tag 10 der Trächtigkeit wurden dann die Embryonen untersucht. Zur Auswertung wurden makroskopische, mikroskopische und morphometrische Charakteristika verwendet. Hierzu wurde auch eine histologische Untersuchung der neuronalen Zellen durchgeführt. Die Zahl der Embryonen sank mit steigender Dosis der Retinsäure. Die Scheitel-Steiß-Länge war bei Embryonen, die einer Dosis von 40 mg/kg Retinsäure ausgesetzt waren, im Vergleich zu den Kontrollembryonen statistisch signifikant reduziert ($p < 0,01$). Das Gleiche galt für das Gewicht der Embryonen. Bei 60 mg/kg war das Gewicht der Embryonen sehr variabel, was wahrscheinlich mit der Resorption einiger Embryonen zusammenhing. Bei 40 mg/kg wurden Fehlbildungen wie Kopf- und Gesichtsspalten, abgeflachter Kopf und Mikrozephalie beobachtet. Bei einer Dosis von 60 mg/kg war die Differenzierung von Kraniofazial- und Thoraxspalte stärker beeinträchtigt. Es traten Veränderungen wie Verlängerung des Schädels, der Kopf- und Gesichtsspalte, des Gesichts und eine Nichtverschmelzung der Thoraxregion auf. Die Kontrollembryonen zeigten alle eine geschlossene und regelrechte Neurulation, während bei 40 mg/kg nur noch jeder zweite Embryo ein geschlossenes Neuralrohr aufwies. Bei einer Gabe (intraperitoneal) von 60 mg/kg lag bei allen exponierten Embryonen eine offene Neurulation vor (Nobakht et al., 2006).

Eine nicht abgeschlossene Neurulation sowie Veränderungen der Kopfgregion waren auch im Fütterungsversuch mit Retinol bzw. Retinsäure an Ratten darstellbar. In einer Reviewarbeit

Literaturübersicht

der Teratology Society wurden ähnliche Effekte auch bei Meerschweinchen, Hamstern und Kaninchen beschrieben (Laschinski und Spielmann, 1988).

Vitamin A und seine Metaboliten sind endogene physiologische Stoffe. In erhöhten Dosen bzw. Konzentrationen wirken Retinoide teratogen. In einer Studie aus dem Jahr 1998 (Wiegand et al., 1998) wurde die endogene Plasmakonzentration von Vitamin-A-Metaboliten bei Frauen in einer frühen Phase der Schwangerschaft gemessen. Hierbei wurden von über 160 Frauen aus neun Ländern, die sich im ersten Trimenon ihrer Schwangerschaft befanden, Blutproben von der fünften bis zur 32. Woche genommen. Zudem wurden die Essensgewohnheiten ausgewertet, um eine Auswirkung von Lebensmitteln auf die Isotretinoinkonzentrationen im Plasma zu untersuchen. Die Werte lagen bei Retinol zwischen 0,68 und 2,18 ng/ml (im Durchschnitt 1,33 ng/ml). Diese Konzentrationen verursachten keine kongenitalen Fehlbildungen, so dass angenommen wurde, dass es sich hier um einen nicht-teratogenen Konzentrationsbereich handelte.

Wiegand und Mitarbeiter (1998) beschäftigten sich auch mit der Pharmakokinetik von Isotretinoin. Im ersten Trimenon wurden für Isotretinoin Plasmakonzentrationen von im Mittelwert 1,41 ng/ml (Bereich: 0,72 bis 4,72 ng/ml) und mittlere Retinsäurekonzentrationen von 1,33 ng/ml (Bereich: 0,68 bis 2,18 ng/ml) gemessen (n = 80). Ein Versuch mit nicht-schwangeren Frauen zeigte, dass eine tägliche Aufnahme von 4.000, 10.000 und 30.000 I.E. über drei Wochen im Bereich der Plasmawerte oder leicht über den der Schwangeren lag. Bei Javaaffen (durchschnittliches Gewicht: 3 bis 4 kg) lag der NOAEL (no observed adverse effect level) bei 7500 I. E. pro kg Körpergewicht, der LOAEL (lowest observed adverse effect level) für die Entwicklungstoxizität bei 20.000 I.E. pro kg Körpergewicht. In Anbetracht der im Javaaffenversuch ermittelten Werte und den gemessenen physiologischen Werten bei nicht-schwangeren Frauen wurde bei Wiegand und Mitarbeitern eine Dosis von 30.000 I.E. pro Tag als (wahrscheinlich) nicht teratogen beim Menschen angenommen (Wiegand et al., 1998; Miller et al., 1998).

In einer Studie, durchgeführt mit über 22.000 schwangeren Frauen in den USA, wurde das Risiko von kongenitalen Fehlbildungen in Abhängigkeit von der Vitamin A-Aufnahme während der Schwangerschaft untersucht (Rothman et al., 1995). Dabei standen vor allem kongenitale Fehlbildungen der kranialen Neuralleiste im Vordergrund. Frauen, die mehr als 15.000 I.E. Vitamin A pro Tag zu sich nahmen (durch Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel), hatten eine Prävalenz für Fehlbildungen mit einem Faktor von 3,5 gegenüber Frauen, die 5.000 I.E. oder weniger Vitamin A in der Schwangerschaft konsumiert hatten. Bei einer Aufnahme von Vitamin A allein aus Nahrungsergänzungsmitteln war dieser Faktor bei 4,8, wenn die Menge der Aufnahme bei mindestens 10.000 I.E. pro Tag lag, was gleichzeitig als Schwellenwert für die tägliche Einnahme von Vitamin A identifiziert wurde. Vor allem Kinder von Müttern, die hohe Dosen Vitamin A (über 10.000 I.E. in Form von Nahrungsergän-

Literaturübersicht

zungsmitteln) vor der siebten Schwangerschaftswoche zu sich genommen hatten, wiesen eine erhöhte Rate von kongenitalen Fehlbildungen auf (Rothman et al. 1995).

Bei der Metabolisierung von Retinol zu Retinsäure handelt es sich um eine Zwei-Stufen-Oxidation: Zuerst erfolgt eine Katalysierung zu Retinaldehyd, worauf sich eine Umwandlung zu Retinsäure, der Retinolmetabolit mit der höchsten biologischen Aktivität, anschließt. Der erste, reversible Schritt wird von der Retinol-Dehydrogenase 16, der zweite, irreversible Schritt wahrscheinlich durch eine Retinal-Dehydrogenase 2 katalysiert (Pavez et al., 2009).

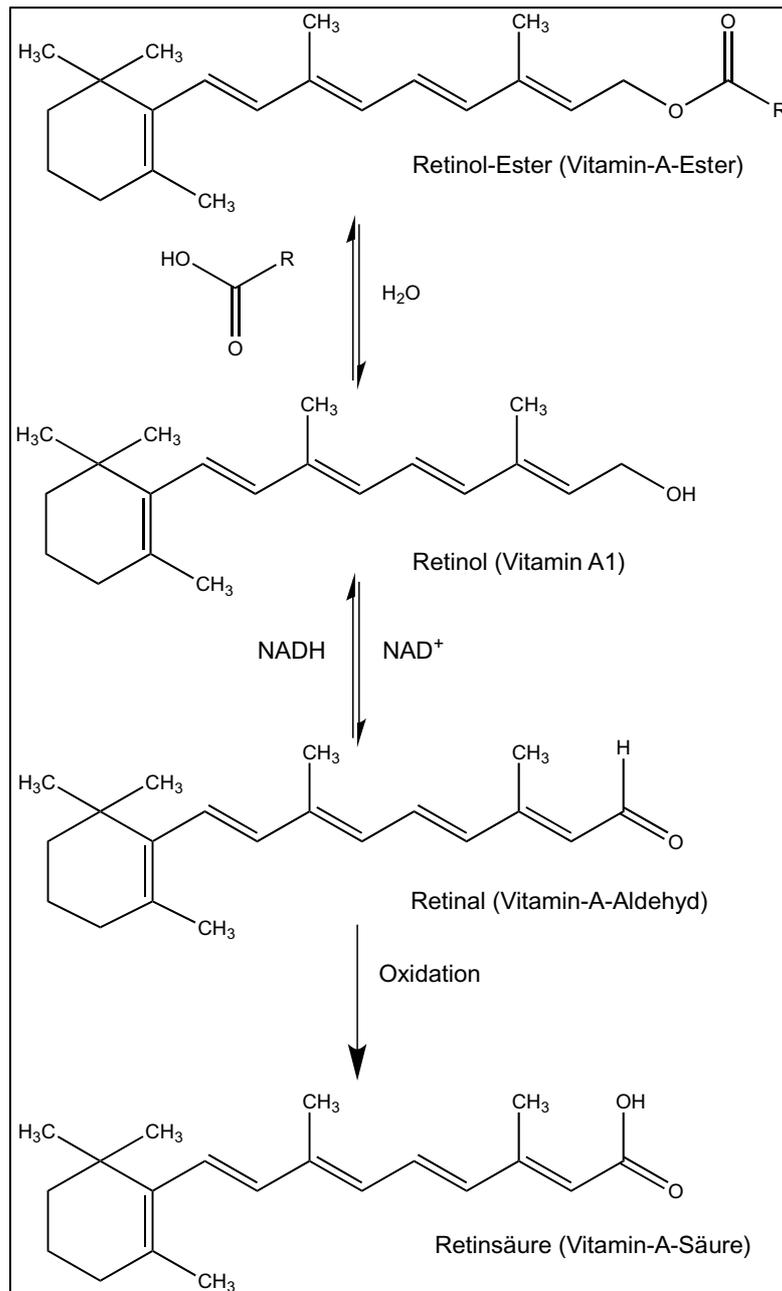


Abb. 5: Metabolisierung von Retinol zu Retinsäure (modifiziert nach Lee et al., 1991)

2.2.5 All-trans-Retinsäure

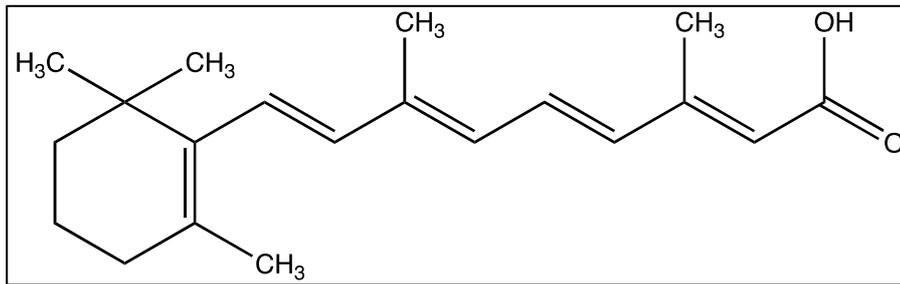


Abb. 6: Strukturformel von Retinsäure (Vitamin-A-Säure)

All-trans-Retinsäure ist ein als „deutlich“ teratogen bekannter Metabolit des Retinols. Man geht davon aus, dass die Teratogenität bei der Mehrfachapplikation von Retinol, ebenso wie bei der Verabreichung von 13-cis-Retinsäure, wahrscheinlich auf der metabolischen Konversion von Retinol in all-trans-Retinsäure bzw. auf der isomerischen Umwandlung von 13-cis-Retinsäure beruht. Auch bei dieser Substanz wurden schon Untersuchungen mit der WEC mit Mäuseembryonen (intraamniotischer Mikroinjektion) durchgeführt. Dabei wurde bei 55 bis 66 % der lebenden Embryonen ab einer Konzentration von 250 ng/ml mindestens eine Abnormität festgestellt, wie zum Beispiel ein verkürztes Prosenzephalon, fehlende Augenanlagen, unterentwickelte Kiemenbögen und Unregelmäßigkeiten in der kaudalen Körperregion in Form einer abnormalen Achsenrotation und irregulär ausgebildeten Somiten (Kraft und Juchau, 1992; Lee et al., 1991). Bei der intraamniotischen Mikroinjektion werden nicht nur die Auswirkungen der maternalen Biotransformation ausgeschaltet, sondern auch die (potenziellen) metabolischen Effekte des Dottersackgewebes, so dass die in der *in vivo* stattfindenden plazentaren Übertragung durch cis- und trans-Retinsäure beobachteten Veränderungen nicht auftraten (Lee et al., 1991).

Die Retinsäuremetaboliten, wie auch Retinol, wurden in den genannten Studien nur in abgedunkelten Räumen unter gelbem Licht untersucht, da diese Substanzen sehr empfindlich auf Sauerstoff und Tageslicht reagieren. Retinol und all-trans-Retinsäure wurden zu jeweils 100 mg in 100 ml Ethanol gelöst (Kraft und Juchau, 1992; Lee et al., 1991) bzw. all-trans-Retinsäure in DMSO (Han et al., 2007; Lee et al., 1991) und in einer weiteren Studie in Aceton (Chen et al., 1998).

Retinoide sind bereits seit einigen Jahrzehnten als Humanteratogene bekannt. Bei Vitamin A handelt es sich um ein essentielles Vitamin, das für die normale Zellfunktion, inklusive Reproduktion und Entwicklung, von wesentlicher Bedeutung ist (Azais-Braesco et al., 2000; Laschinski und Spielmann, 1988). Zudem werden all-trans-Retinsäure (auch Tretinoin genannt) und 13-cis-Retinsäure (bekannt als Isoretinoin) zur Therapie bei Akne, Psoriasis und akuter promyeloischer Leukämie eingesetzt (Tillner und Dingermann, 1998). Zahlreiche Fälle von kindlichen Fehlbildungen sind beschrieben worden, die sich mit der Verabreichung von

Literaturübersicht

Vitamin A bzw. dessen Metaboliten beschäftigen. Vorwiegend handelt es sich um die Anwendung der cis-Isoform, die als Medikament „Accutane“ (siehe Punkt 2.2.4 Retinol) zur Aknebehandlung verwendet wird.

Es wurden mehrere Fälle beschrieben, bei denen möglicherweise teratogene Effekte durch Anwendung von „Accutane“ (Retin-Isoform Isoretinoin = 13-cis-Retinsäure) in der Schwangerschaft aufgetreten waren (Robertson et al., 1985; Ishijima und Sando, 1999). Nach dreimonatiger Anwendung des Medikaments zeigte sich an einem 19 Wochen alten Abortus (Schwangerschaftsabbruch nach Ultraschalluntersuchung) eine generalisierte Autolyse. Es konnte ein Hydrozephalus mit schwach ausgeformten, tief angesetzten Ohren und Mikrognathie festgestellt werden. Die seitlichen Ventrikel waren ausgesprochen dilatiert ohne Anzeichen einer Obstruktion. Die Kleinhirnhemisphären und der Vermis cerebelli waren nur schwach ausgeformt und ein Ventrikelseptumdefekt war vorhanden. Die Fehlbildungen des 19 Wochen alten Embryos wurden mit einem Genese- oder Migrationsfehler der Neuralleistenzellen während der frühen Embryogenese erklärt (Robertson et al., 1985).

Eine weitere Fallstudie beschrieb einen Jungen, der mit einer komplexen Fehlbildung des zentralen Nervensystems zur Welt gekommen war. Er hatte kongenital einen Hydrozephalus und litt an ausgeprägter mentaler Retardierung und Krampfanfällen. Die rechte Ohrmuschel fehlte. Der rechte äußere Gehörgang war nur eine 1 cm lange Öffnung mit einem kleinen umgebenden Knorpel. Dieser war 3,5 cm unterhalb des externen Kanthus des Auges, gleich oberhalb des Mandibelwinkels angelegt. Das linke Ohr war auf seiner physiologischen Position. Weder Audiometrie- noch Gleichgewichtssinnuntersuchungen wurden aufgrund der ausgeprägten mentalen Retardierung des Patienten durchgeführt. Post mortem wurden Fehlbildungen des Zentralnervensystems kombiniert mit Dandy-Walker- und Chiari-Fehlbildungen, mesenteriale Appositionen am Dünndarm rechts von der Mittellinie, nicht abgestiegene Hoden im Leistenkanal, einer Splenomegalie und eine Mukosahämorrhagie des rektosigmoiden Übergangs festgestellt (Ishijima und Sando, 1999).

Ein weiterer Bericht aus dem Jahr 1992 befasste sich mit dem Fall eines Mädchens, das mit einem hypoplastischen Ohr und Atresie des äußeren Gehörgangs auf der rechten Seite zur Welt kam. Seine Mutter hatte im Monat vor ihrer letzten Menstruation und während der ersten elf Wochen der Schwangerschaft „Retin-A“ (Tretinoin) Creme 0,05 % verwendet. Das Kind wurde nach 41 Wochen Schwangerschaft geboren und wies eine deutliche Verminderung von Körpergewicht, Kopfumfang und Größe auf. Es konnten keine Rückschlüsse auf einen genetischen Defekt gezogen werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Verwendung der Tretinoin-Creme und den Fehlbildungen war nicht beweisbar, jedoch naheliegend, da die Mutter während der kritischen Phase ihrer Schwangerschaft die retinsäurehaltige Creme verwendete (Camera et al., 1992).

Literaturübersicht

In einer letzten hier angeführten Studie wurde ein zwei Jahre altes Mädchen mit Gesichtsdysmorphismus und kongenitaler Kardiopathie vorgestellt. Die Mutter litt an der Darrier'schen Krankheit und wurde mit einer Dosis von 10 mg Acitretin pro Tag bereits vor Beginn der Schwangerschaft behandelt. Diese Medikation wurde noch zehn Wochen während der Schwangerschaft fortgesetzt. Acitretin ist ein aromatisches Retinoidanalogon von Vitamin A. Es wird systemisch zur Behandlung von Psoriasis und Keratinisierungsstörungen angewendet. Das Kind kam in der 32. Woche zur Welt. Auch hier war eine Verminderung von Körpergewicht, Größe und Kopfumfang, sowie weitere Veränderungen, feststellbar: Epikanthus, flacher Nasenrücken, hoher Gaumen, becherförmige Ohren, nach vorne geneigte Nasenlöcher und prominente Fersen. Ein Septumdefekt im Atrium bei der Fossa ovalis wurde mittels Echokardiographie entdeckt. Zudem wurde eine beidseitige Taubheit diagnostiziert. Das Mädchen hatte einen 46 XX-Karyotyp. Mit 18 Monaten hatte das Kind einen Mikrozephalus, war hypoton und zeigte eine neuronale Entwicklungsverzögerung. Es konnte nicht selbst stehen, obwohl es seinen Kopf mit sechs Monaten selbst halten, mit zwölf sitzen und mit 16 Monaten krabbeln konnte (Barbero et al., 2004).

2.2.6 Valpromid

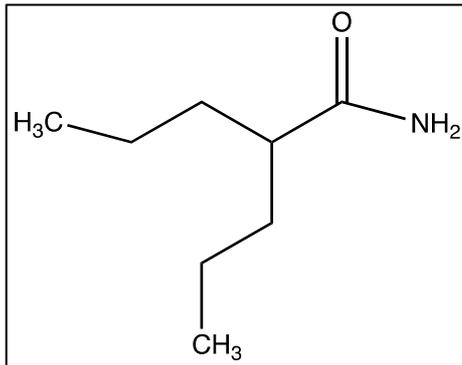


Abb. 7: Strukturformel von Valpromid

Valpromid ist ein Carboxamid-Derivat der Valproinsäure, das in der Epilepsietherapie und bei anderen affektiven Störungen als Therapeutikum genutzt wird. Es wird in einigen europäischen Ländern in Tablettenform als „Depamide[®]“ vertrieben. Nach oraler Applikation beim Menschen wird es, noch bevor es den systemischen Kreislauf erreicht, durch Hydrolyse in der Leber zu 80 % zu Valproinsäure metabolisiert (Bialer et al., 1984; Billig et al., 1990). Dabei ist Valpromid drei- bis fünfmal potenter als Valproinsäure und zeigt keine teratogene Aktivität im Tiermodell. Allerdings besitzt es in der Humanmedizin die bessere antiepileptische Wirkung. Die „fehlende Teratogenität“ hat keine klinische Bedeutung, da Valpromid das Prodrug von Valproinsäure ist (Wasserman et al., 2001; Winkler et al., 2005). Die Metabolisierungsrate von Valpromid zu Valproinsäure betrug bei Ratten 63 %, bei Hunden 55 %; bei Mäusen konnte man nach subkutaner Injektion von Valpromid nur kleine Mengen am Tag 9 der Gestation nachweisen (Radatz et al., 1998).

Eine Tierversuchsstudie von Radatz und Mitarbeitern aus dem Jahr 1998 verglich die teratogene Potenz von Valpromid und Valproinsäure in NMRI-Mäusen und kam zu dem Ergebnis, dass der Metabolit deutlich teratogener war als die Ausgangssubstanz, die aber auch einen teratogenen Effekt zeigte. Für die Untersuchung wurde jeweils eine Gruppe von fünf trgenden Mäusen mit jeweils 3,0 mmol pro kg Körpergewicht Valpromid bzw. Valproinsäure am Tag 8 der Gestation mittels subkutaner Injektion behandelt. Nach 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden wurden Blutproben genommen. Valpromid wurde in Suspension mit einer Mischung aus 10 % DMSO, 20 % Tween 20 und 70 % destilliertem Wasser gebracht. 3,0 mmol/kg wurden den Mäusen intraperitoneal verabreicht und weitere 3 mmol/kg wurden subkutan am Tag 8 der Gestation injiziert. Am 18. Trächtigkeitstag wurden die Tiere dann mittels zervikaler Dislokation getötet. Es folgte die Untersuchung der Feten. Kriterien waren Embryoletalität, Fetalgewicht und das Auftreten von Enzephalozelen. Valproinsäure verursachte zu 52 %, Valpromid nur zu 6 % Enzephalozelen. Die Embryoletalität lag bei 52 % im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei Valpromid (wieder nur) bei 7 %. Beim Fetalgewicht zeigte sich eine signifikante Reduktion unter Valproinsäuregabe, jedoch nicht unter Valpromidein-

fluss. Im Endergebnis zeigte die Untersuchung, dass die teratogenen Effekte durch Valproinsäure und nicht durch seine Ausgangssubstanz ausgelöst wurden. Aufgrund von Messungen des maternalen Plasmaspiegels in Abständen von 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden post injectionem konnte die Pharmakokinetik der Substanzen bestimmt werden. Hier wurde bei Valpromid eine C_{MAX} von 233 $\mu\text{g/ml}$ nach vier Stunden gemessen. Nach 24 Stunden lag die Konzentration noch bei 5,5 $\mu\text{g/ml}$. Deutlich höhere Konzentrationen waren nach Verabreichung von Valproinsäure messbar. Die maximale Konzentration lag bereits nach 15 Minuten bei 727 $\mu\text{g/ml}$. Nach acht Stunden war sie auf 4,5 $\mu\text{g/ml}$ abgefallen (Radatz et al., 1998).

2.2.7 Valproinsäure

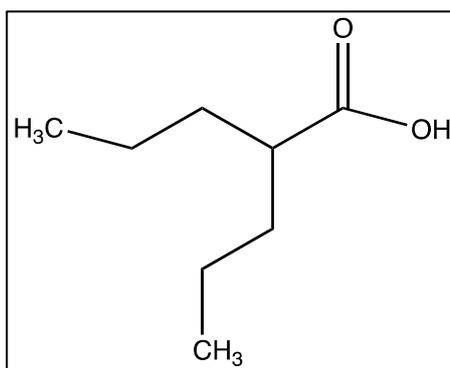


Abb. 8: Strukturformel von Valproinsäure

Valproinsäure gehört zu den meistverschriebenen Antiepileptika. Sie verfügt über ein hohes antiepileptisches Potenzial. Es sind aber auch teratogene Effekte beim Mensch und bei einigen Tierspezies bekannt. Dabei konnten in Studien an Mensch und Maus hauptsächlich Neuralrohrdefekte nach Verabreichung von Valproinsäure während der frühen Phase der Gravidität festgestellt werden. Die häufigste Fehlbildung war Spina bifida aperta. Bei der Maus zeigten sich vorwiegend Enzephalozelen nach einmaliger intraperitonealer Valproinsäureinjektion (3 mmol/kg) am Tag 8 der Gestation, während Spina bifida aperta und occulta nach dreimaliger Injektion am neunten Tag der Trächtigkeit auftraten (Radatz et al., 1998).

Für die Studie (siehe auch unter Punkt 2.2.6) an tragenden NMRI Mäusen wurde Valproinsäure mit einer äquimolaren Menge Natriumhydroxid-Lösung neutralisiert, um Natriumacetat-Valproat herzustellen. Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser verdünnt, um das Endvolumen der Injektionslösung (intraperitoneal) zu erreichen, die in einer Menge von 10 ml/kg verabreicht wurde (Radatz et al., 1998).

In einer weiteren Studie wurde Valproinsäure in der WEC an Mäuseembryonen untersucht. Bei Konzentrationen ab 150 $\mu\text{g/ml}$ zeigten sich bereits Veränderungen an den Somiten, der Rotation des Embryos und der Dottersackparameter. Zudem ließen sich adverse Effekte auf Größe und Entwicklung im Vergleich zu den Kontrollembryonen beobachten wie auch eine

konzentrationsabhängige Abnahme des Protein- und DNA-Gehalts. Bei einer Konzentration von 375 µg/ml betrug die Letalität 100 % (kein Herzschlag und keine Blutzirkulation feststellbar). Ab Konzentrationen von 185 µg/ml wurden eine unvollständige oder keine Drehung und ein offener kaudaler Neuroporus festgestellt. Der normale Schluss des Neuralrohrs am Gestationstag 10 fand nicht statt. Dabei zeigte sich eine Affinität der Substanzen zur kranialen Region, vorwiegend auf der Ebene des Mittel- und Hinterhirns. Extrem hohe Konzentrationen von 375 µg/ml führten zu Embryonen mit Enzephalozelen und offener Neuralspalte vom Prosenzephalon bis zum Rhombenzephalon. Diese Embryonen hatten einen unregelmäßigen Herzschlag und wurden als „nicht lebend“ klassifiziert (Bruckner et al., 1983).

In einer Übersichtsarbeit von Ornoy aus dem Jahr 2009 wurden die Auswirkungen von Valproinsäuremedikation in der Schwangerschaft dargestellt. In der Humanmedizin wird die Gabe von Valproinsäure während der Schwangerschaft mit einer ein- bis zweiprozentigen Inzidenz von Neuralrohrdefekten (alle Arten von Neuralrohrdefekten, inklusive Anenzephalie und Enzephalozelen) in Verbindung gebracht. Valproinsäure wird hauptsächlich mit Spina bifida aperta assoziiert. Diskutiert wurden auch zahlreiche Organabnormitäten, Entwicklungsverzögerungen und Autismus und das sog. „fetal valproate syndrome“. Unter diesem Syndrom wird eine spezifische Zusammenstellung von dysmorphen Gesichtsmerkmalen verstanden, die in Beziehung zu den Effekten von Valproinsäure auf den sich entwickelnden Embryo und Fetus gesetzt werden. Dies wurde zuerst von DiLiberti und Mitarbeitern im Jahre 1984 bei sieben Kindern beschrieben (DiLiberti et al., 1984). Von mehreren Autoren wurden mit der Zeit weitere Fallberichte und Daten aus epidemiologischen Studien hinzugefügt. Demnach gehörten zu einem „valproate syndrome“ hauptsächlich klinische Befunde, wie intrauterine Wachstumsverzögerung, eine lange und dünne Oberlippe, flaches Philtrum, ein Epikanthus und Mittelgesichtshypoplasie (flacher Nasenrücken, kleine Stupsnase und nach unten gezogene Mundwinkel). Zudem wiesen viele Kinder noch weitere kongenitale Anomalien, wie eine mentale Entwicklungsverzögerung und neurologische Beeinträchtigungen auf (Ornoy, 2009; Meador et al., 2009).

Zu Beginn der 80er Jahre hatten Studien zur Teratogenität von Valproinsäure beim Menschen nahegelegt, dass die ansteigende Rate von lumbosakraler Spina bifida mit Meningomyelozele oder Meningozele bei Kindern, deren Müttern Valproinsäure im ersten Trimenon der Schwangerschaft eingenommen hatten, mit der Einnahme des Antiepileptikums in Verbindung stehen. Dabei wurden in mehreren Studien über einen Zeitraum von fast 30 Jahren Kinder evaluiert, die *in utero* (vorwiegend) mit Valproinsäure exponiert waren und überwiegend offene Fehlbildungen im Bereich des Rückenmarks aufwiesen. Zudem konnte man bei einigen auch einen Einfluss auf die Gehirnentwicklung feststellen, sowie eine hohe Rate anderer „midline defects“. Bei einer prospektiven Kohortenstudie lag die Prävalenz aller Fehlbildungen der *in utero* Valproinsäure-exponierten Kinder bei 9 % über denen aller anderen Antiepileptikaexpositionen. Die Rate der Neuralrohrdefekte bei Kindern, deren Mütter das

Literaturübersicht

Medikament in Dosierungen von über 1000 mg pro Tag eingenommen hatten, lag in dieser Studie bei 5 %. 1000 mg pro Tag wurde damit auch als Schwellenwert für die teratogen wirksame Dosis von Valproinsäure in dieser Studie festgelegt. Andere kongenitale kardiovaskuläre oder genitale Anomalien, Gesichtsspalten und Gliedmaßenfehlbildungen wurden ebenfalls einer Valproinsäureexposition *in utero* zugeschrieben (Ornoy, 2009).

Eine Studie von Jentink und Mitarbeitern aus dem Jahr 2010 widmete sich der Aufarbeitung von Daten, die auf die Risiken von kongenitalen Fehlbildungen (neben Spina bifida) hinweisen, die nach Medikation mit Valproinsäure im ersten Trimenon auftraten. Dazu wurden die Daten von acht veröffentlichten Kohortenstudien mit 1.565 Schwangerschaften herangezogen, bei denen die Mütter mit Valproinsäure behandelt wurden und bei denen 118 Hauptfehlbildungen beobachtet werden konnten. Dabei wurden 14 Fehlbildungen erkannt, die bei Frauen mit Valproinsäureexposition im ersten Drittel der Schwangerschaft signifikant häufiger auftraten. Diese 14 Fehlbildungen wurden dann durch Einträge in der „European Surveillance of Congenital Anomalies“ (EUROCAT) bewertet, die Daten aus Studien mit Antiepileptika zusammenträgt. Der Datensatz beinhaltete 98.075 Lebendgeburten, Totgeburten nach mindestens 20 Schwangerschaftswochen oder Abbrüche nach pränataler Diagnostik mit mindestens einer der folgenden Fehlbildungen (innerhalb von 3,8 Mio. Geburten aus 14 europäischen Ländern von 1995 bis 2005): Spina bifida, Mikrozephalie, Ventrikelseptumdefekt, Atriumseptumdefekt, Fallot-Tetralogie, Pulmonalklappenatresie, Rechtsherzhypoplasie, Gaumenspalte (ohne assoziierte Lippenpalte), Zwerchfellhernie, Gastroschisis, Hypospadie, Klumpfuß, Polydaktylie und Kraniosinostose. Alle Fälle, bei denen ein chromosomales oder monogenetisches Syndrom diagnostiziert wurde, wurden ausgeschlossen (Jentink et al., 2010).

2.2.8 Albendazol

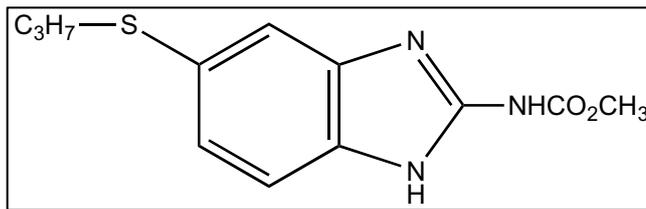


Abb. 9: Strukturformel von Albendazol

Albendazol ist ein weitverbreitetes Anthelmintikum aus der Gruppe der Benzimidazole. Es wird zur Prophylaxe und Therapie von Säugetieren gegen Rund-, Band- und Lungenwürmer sowie Leberegel eingesetzt. Seine geringe Toxizität und seine zuverlässige Wirksamkeit sind Voraussetzung für die Verwendung in der Veterinärmedizin und Humanmedizin bei gastrointestinalen Nematoden und larvalen Stadien von Cestoden, wie *Echinococcus granulosus* und *multilocularis*, sowie *Taenia solium* (Whittaker et al., 1991; Rawden et al., 2000; Velik et al., 2005).

Nach oraler Aufnahme wird Albendazol, hauptsächlich bedingt durch seine begrenzte Löslichkeit, über den Gastrointestinaltrakt schlecht absorbiert. In der Leber wird der Arzneistoff durch verschiedene Cytochrom P450 Enzyme und das Flavin-enthaltende Monooxygenase-system zum aktiven Metaboliten Albendazolsulfoxid biokonvertiert (siehe Abb. 10 auf S. 24). Dabei durchläuft Albendazol einen sehr raschen first-pass-Metabolismus, so dass es schon nach kürzester Zeit nicht mehr im Plasma nachgewiesen werden kann. Die Sulfoxidation ist ein schneller und reversibler Prozess, in welchem der Ausgleich zugunsten des Metaboliten Albendazolsulfoxid ausfällt. Albendazolsulfoxid hat ein chirales Zentrum. Die Entstehung von (-)-Albendazolsulfoxid ist von dem CYP3A4-Isoenzym abhängig, während (+)-Albendazolsulfoxid von Flavin-enthaltenden Monooxygenasen synthetisiert wird (Corti et al., 2009; Gokbulut et al., 2006; Capese et al., 2009). Des Weiteren wird Albendazolsulfoxid in einem zweiten, langsameren und irreversiblen oxidativen (cytochromabhängigen) Schritt zu dem weitgehend inaktiven Albendazolsulfon umgesetzt (Velik et al., 2005). Beide Enantiomere konnten im Plasma mehrerer Tierspezies (parasitisch lebende Wurmspezies, Ratten, Rinder, Mäuse und Schafe) und im Menschen nach Albendazolgabe nachgewiesen werden (Whittaker und Faustman, 1991; Gokbulut et al., 2006; Corti et al., 2009).

Literaturübersicht

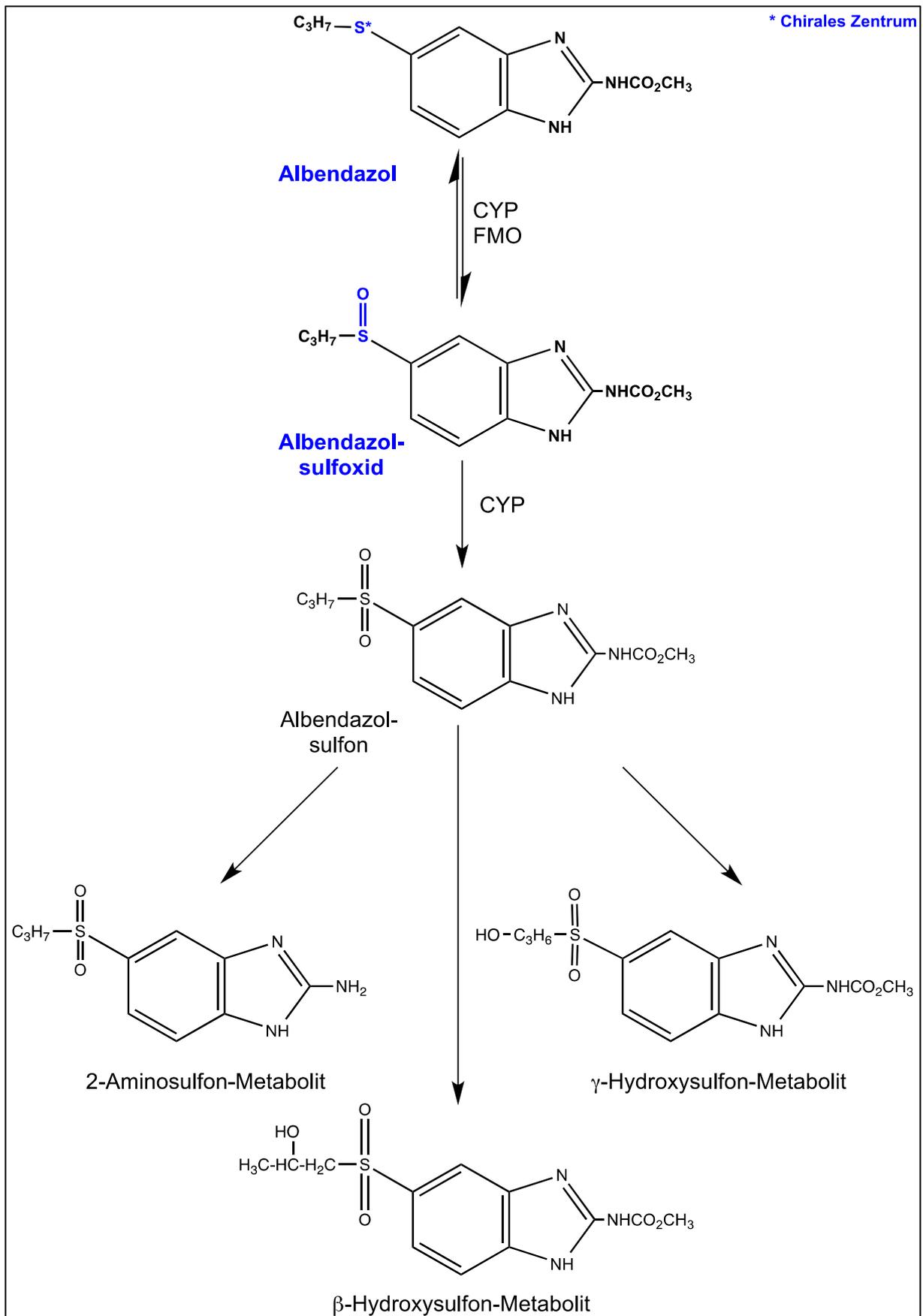


Abb. 10: Metabolisierung von Albendazol zu Albendazolsulfoxid (modifiziert nach Rawden et al., 2000)

Literaturübersicht

Benzimidazol-Carbamate gelten bei vielen Säugetierspezies als teratogen. Dies wird auch für Albendazol berichtet und konnte bereits in Versuchen mit Ratten gezeigt werden. Albendazol erwies sich in einem *in-vitro*-Test als ein potenteres Teratogen als sein Sulfoxidderivat (Whittaker und Faustman, 1991). In mehreren Studien wurde vermutet, dass die Embryo-toxizität damit zusammenhängt, dass Benzimidazole fähig sind, eine Bindung mit dem Tubulin in der Zelle einzugehen. Sie inhibieren erfolgreich die Tubulinpolymerisation. Bei Zuchtschafen, die im ersten Drittel der Trächtigkeit mit Netobimin (einem Benzimidazolprodrug, dessen wichtigster Metabolit Albendazol ist) behandelt wurden, zeigten die Feten kongenitale Missbildungen wie renale Agenesie, ektopische Nieren, Spina bifida, fusionierte Wirbel und Rippen, Hypoplasie der thorakalen Extremitäten und vaskuläre Anomalien. Bei Ratten konnten nach Behandlung mit Anthelmintika auf Benzimidazolbasis eine erhöhte Resorptionsrate, abnehmendes Fetalgewicht und externe wie auch skelettale Fehlbildungen festgestellt werden (Whittaker und Faustman, 1991; Cristofol et al., 1997).

In einer älteren Studie von Whittaker und Faustman (1991) wurden Albendazol und sein Metabolit an Nagerzellkulturen getestet. Hierbei wurden die Substanzen zum einen an Mittelhirnzellen (CNS) und zum anderen auf Limb-Bud-Zellen (LB) von Rattenembryonen getestet. Die Konzentrationen lagen bei 3,6, 7,1, 10,7, 14,2 und 21,3 μM . Es konnte eine Konzentration-Effekt-Beziehung festgestellt werden. Die beiden höchsten Konzentrationen zeigten auf das Wachstum der CNS-Kulturen einen signifikanten Einfluss, während sich in der LB-Kultur nur bei einer Konzentration von 21,3 μM ein statistisch relevanter Effekt zeigte. IC_{50} -Werte betragen bei CNS-Zellen 14,8 μM und bei LB-Zellen 18,0 μM . Die durchschnittliche IC_{50} lag bei den Hirnzellen bei 0,31 μM und bei der LB-Kultur bei 0,37 μM . Albendazol wurde für die Zellkulturversuche in DMSO gelöst (Whittaker und Faustman, 1991).

Albendazol bzw. Mebendazol werden auch in der Humanmedizin zur Behandlung von Wurmerkrankungen in endemischen Gebieten wie Südamerika oder Afrika angewandt. Beide Substanzen sind seit 1972 bzw. 1983 im Einsatz und gelten als sicher, günstig und effektiv in der Therapie einer Vielzahl von Parasitosen (Cowden et al., 2000). Mehrere Studien beschreiben Behandlungen von schwangeren Frauen mit diesen Benzimidazolderivaten, ohne ein erhöhtes Risiko für kongenitale Fehlbildungen bei den Nachkommen exponierter Mütter feststellen zu können (Gyorkos et al., 2006; Ndibazza et al., 2010; Gyapong et al., 2003; Cowden et al., 2000). Demnach scheint das teratogene Potenzial von Albendazol und seinen Metaboliten, das sich *in vitro* oder im Tierversuch mit mehreren Spezies darstellen lässt, in der Humanmedizin gering zu sein. Allerdings wird von der WHO (World Health Organisation) empfohlen, die Medikamente erst im zweiten bzw. dritten Trimenon der Schwangerschaft einzusetzen, auch wenn in geschilderten Fallberichten bei versehentlicher Anwendung von Albendazol im ersten Drittel der Schwangerschaft keine höheren Raten an kongenitalen Fehlbildungen aufgetreten waren (Cowden et al., 2000).

2.2.9 Albendazolsulfoxid

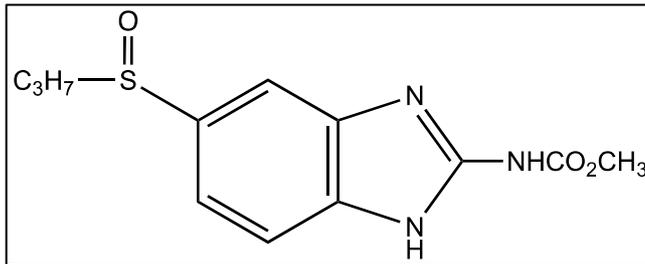


Abb. 11: Strukturformel von Albendazolsulfoxid

Albendazol wird *in vivo* rasch zu Albendazolsulfoxid metabolisiert. Der Metabolit kann auch als Anthelmintikum eingesetzt werden (Palomares et al., 2006).

Albendazolsulfoxid liegt als (-) und (+)-Enantiomer vor. Dabei ist aber die relative Wirkpotenz eines jeden Enantiomers bisher unbekannt, wobei nur ein kleiner Beitrag zur gesamten klinischen Effektivität dem (-)-Albendazolsulfoxidenantiomer zugeschrieben wird. Bei der Inkubation des zugrunde liegenden Prodrugs mit NADPH und Lebermikrosomen von einzelnen Tierspezies konnte man einen messbaren Umsatz von Albendazol zu Metaboliten nachweisen (Velik et al., 2005). Zwei sequenzielle Schritte, durchgeführt von den enzymatischen Systemen der Flavinmonooxygenase (FMO) und CYP 450, sind dabei bei der Produktion der Sulfoxide und des Sulfonylmetaboliten beteiligt. Albendazolsulfoxid ist auch in der anthelmintischen Therapie bei Schafen und Rindern verfügbar und wird dabei durch die Wiederkäuermikroflora nach oraler oder intraruminaler Applikation in das Prodrug umgewandelt (Capece et al., 2009).

Wie seine Ausgangssubstanz, weist auch Albendazolsulfoxid ein beträchtliches anthelmintisches und embryotoxisches Potenzial auf. Die Art der Fehlbildungen entsprechen denen des Prodrugs (Cristofol et al., 1997).

In der bereits unter Punkt 2.2.8 erwähnten Studie von Whittaker und Faustman (1991) wurde neben Albendazol auch Albendazolsulfoxid getestet. Der Metabolit wurde dazu in DMSO gelöst und zum vorgewärmten Kulturmedium gegeben. Dabei lag die DMSO-Konzentration bei 0,25 %. Im Ergebnis zeigten sich Ausgangssubstanz und Metabolit als potente Inhibitoren des Zellwachstums und der Differenzierung im Micromass Zellkultursystem mit IC₅₀-Werten von < 50 µg/ml (Whittaker und Faustman, 1991).

Capece und Mitarbeiter führten eine Untersuchung mit Albendazolsulfoxid bei tragenden Ratten durch (Capece et al., 2003). Dabei verabreichte man den Ratten Einzeldosen von 8,5, 10 und 14 mg/kg einer Racematmischung von Albendazolsulfoxid am Tag 10 der Gestation. Am Tag 20 wurden die Tiere euthanasiert. Untersucht wurden das Plasma der Mutter-

Literaturübersicht

tiere und Feten auf die Konzentration der Enantiomere und des Metaboliten Albendazolsulfon neun Stunden nach Gabe. Damit sollte herausgefunden werden, welches der beiden Enantiomere eine höhere teratogene Potenz in sich birgt und wie sich die Verteilung im Plasma in Abhängigkeit von der Dosishöhe auswirkt. Im Ergebnis zeigte sich bei allen Dosen im maternalen Plasma und im Feten eine höhere Konzentration des (-)-Enantiomers. Signifikante Unterschiede zwischen Muttertierplasma und Fetus wurden nur in der höchsten Dosierung von 14 mg/kg festgestellt. Als Fehlbildungen wurden meist eine Schwanzagenesie und kurze oder geringelte Schwänze und eine Analatresie beobachtet. Zudem wurden noch externe Anomalien wie eine Thorakoschisis mit Ektopia cordis, Hydrozephalie und fehlentwickelte Gliedmaßen festgestellt. Skelettale Fehlbildungen traten bei ca. 90 % der exponierten Feten mit 10 mg/kg Dosis im Vergleich mit der Kontrollgruppe ebenso gehäuft auf (Defekte in Sternum, Metakarpalia und Phalangen). Dazu kamen noch weniger häufige Fehlbildungen wie Variationen in der Zahl der Wirbel, Rippen- und Gliedmaßenanomalien. Die gemessenen Werte lagen bei einer Dosis von 8,5 mg/kg beim Muttertier bei $1,5 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$, bei 10 mg/kg bei $1,6 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ und bei 14 mg/kg bei $4,3 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$. Die beiden letzten Dosierungen zeigten signifikante Abweichungen bei der Messung von Albendazolsulfoxid im embryonalen Gewebe: bei 10 mg/kg $1,8 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$ und bei 14 mg/kg $2,2 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$ (Capece et al., 2003).

2.2.10 Acetylaminofluoren

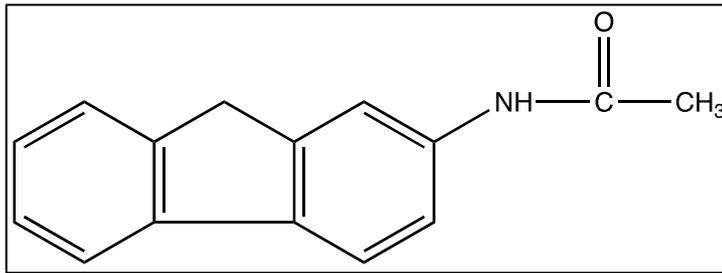


Abb. 12: Strukturformel von Acetylaminofluoren

Acetylaminofluoren wird ausschließlich in der Grundlagenforschung in den Bereichen Kanzerogenese, Mutagenese und DNA-Reparation verwendet und dient hier als Modellsubstanz aus dem Bereich der aromatischen Amine. Es hat eine geringe akute Toxizität für Nager, ist aber ein potentes Karzinogen (verursacht Tumoren, vor allem in der Leber, Blase und Niere) und wirkt mutagen auf Bakterien in Anwesenheit eines metabolisierenden Systems. Die Substanz gehört zur Klasse der aromatischen Amine, welche ein Kanzerogenitätspotential in einer großen Zahl von Spezies, wie Nagetieren, Kaninchen, Hunden und dem Menschen aufweisen (Timbrell, 2000; Faustman-Watts et al., 1983; Faustman-Watts et al., 1984).

Die Substanz wurde bereits in einem Embryo-Kultur-System mit Ratten nach New und Mitarbeitern aus dem Jahr 1973 untersucht. Dabei wurden die Embryonen am Tag 10 der Gestation entnommen und 24 Stunden in einer Serummischung inkubiert (New et al., 1973).

Im Jahr 1983 wurden die Wirkungen von 2-Acetylaminofluoren (AAF) sowie seine Metaboliten N-Hydroxy-Acetylaminofluoren (N-OH-AAF) und N-Acetoxy-2-Acetylaminofluoren (N-AAAF) jeweils allein und in Kombination mit einem mikrosomalen Monooxygenasesystem S9 (aus der Rattenleber präpariert), auf Rattenembryonen *in vitro* untersucht. Die Embryonen wurden in einer Mischung, die aus 7 ml Waymouth's Medium, 3,5 ml hitzeinaktiviertem Rattenserum und 3,5 ml hitzeinaktiviertem Humanserum bestand, inkubiert. Die Serummischung enthielt zusätzlich die Antibiotika Penicillin G (100 IU/ml) und Streptomycin (50 µg/ml). Als Lösungsmittel für 2-AAF wurde DMSO mit einer Konzentration von < 35 mM verwendet. Die Verwendung von DMSO kann Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen nehmen. Es wurde festgestellt, dass die SSL unverändert blieb, während sich der Proteingehalt der mit DMSO inkubierten Embryonen leicht verringerte. Ebenfalls wurden die Mischungen einem Begasungsregime (90 % N₂, 5 % O₂, 5 % CO₂ für 30 Minuten bei 37 °C) vor und nach der Bestückung (nach 20 Stunden mit 95 % O₂ und 5 % CO₂) unterzogen. Die mikrosomenreiche hepatische (S9) Fraktion wurde dem Kulturmedium hinzugegeben. Sie wurde aus Lebern von mit polychlorierten Biphenylen vorbehandelten Ratten gewonnen. Der Konzentrationsbereich lag zwischen 0 bis 75 µg/ml (0 bis 336 µM) AAF. Bei der Auswertung wurden nur Embryonen als lebend klassifiziert, die eine aktive Dottersackdurchblutung und einen Herz-

Literaturübersicht

schlag aufwiesen. Eine *in-vitro*-Teratogenität für 2-AAF war nur zu beobachten, wenn ein aktives Monooxygenasesystem dem Kulturmedium hinzugefügt wurde. Ohne Zusatz der S9-Fraktion oder von notwendigen Co-Faktoren für das Monooxygenasesystem kam es zu einem signifikanten Anstieg der Lebensfähigkeit der Embryonen in der höchsten Exposition von 75 µg/ml (336 µM) AAF. Ebenso wurden bei alleiniger Inkubation selbst bei einer Konzentration von 75 µg/ml (336 µM) von AAF keine Neuralrohrdefekte oder andere Fehlbildungen festgestellt (Faustman-Watts et al., 1983).

Die Metaboliten von AAF sind bei der Entstehung der Kanzerogenität beteiligt. Eine wichtige Metabolisierungsreaktion ist die N-Hydroxylierung, die durch die mikrosomalen Mischfunktionsoxidasen katalysiert werden. Die Reaktion ist *in vitro* und *in vivo* darstellbar (Timbrell, 2000; Astrom et al., 1982).

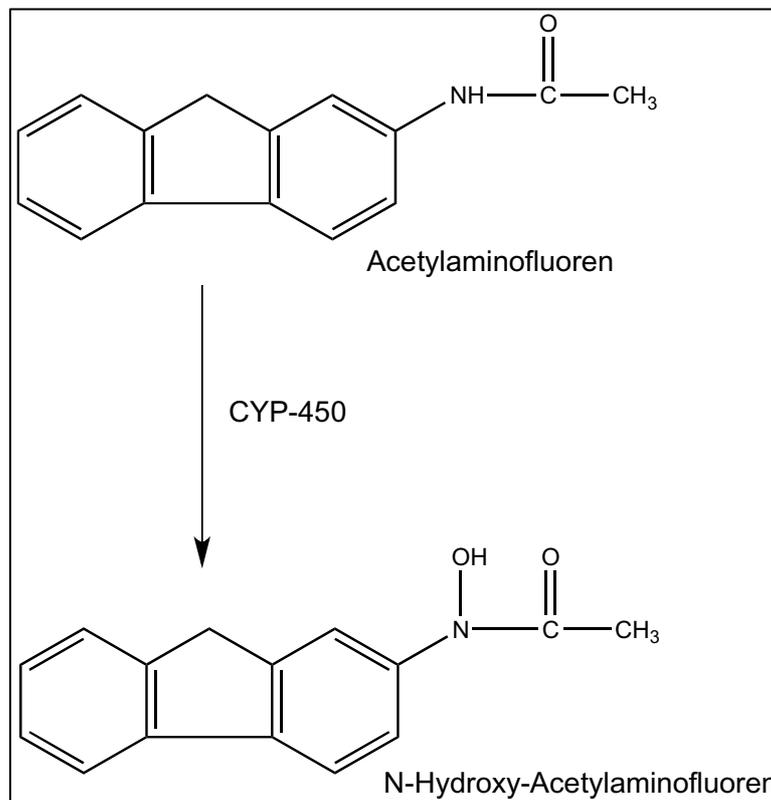


Abb. 13: Metabolisierung von Acetylaminofluoren zu N-Hydroxy-Acetylaminofluoren (modifiziert nach Inami und Masataka, 2008)

2.2.11 N-Hydroxy-Acetylaminofluoren

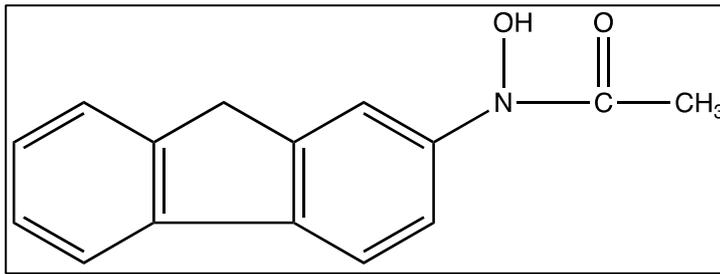


Abb. 14: Strukturformel von N-Hydroxy-Acetylaminofluoren

Hierbei handelt es sich um einen der aktiven Metaboliten von N-Acetylaminofluoren. Die aktiven Metaboliten gelten als teratogen und erzeugen hauptsächlich Abnormitäten in der axialen Rotation. Für N-OH-AAF und N-AAAF typische Fehlbildungen sind Hypoplasien des Prosenzephalon und Mikrozephalien. Es wird weiter davon ausgegangen, dass 7-Hydroxy-Acetylaminofluoren (7-OH-AAF) hauptsächlich für die charakteristischen Veränderungen am Neuralrohr verantwortlich ist (Faustman-Watts et al., 1983; Faustman-Watts et al., 1985).

2-AAF verursacht ohne Aktivierung durch ein mikrosomales Monooxygenasesystem keine Veränderungen der inkubierten Embryonen. Nach Zugabe des Metabolisierungssystems bzw. bei Einzeluntersuchungen der Metaboliten N-AAAF und N-OH-AAF konnte gezeigt werden, dass die teratogenen Effekte auf diese zurückzuführen sind. In der Studie von Faustman-Watts aus dem Jahr 1983 wurde N-OH-AAF in Konzentrationen von 0 bis 50 µg/ml (0 bis 209 µM) in einem Kultursystem mit Rattenembryonen über 24 Stunden getestet. Als Lösungsmittel wurde wie bei der Ausgangssubstanz DMSO (35 mM) verwendet. N-OH-AAF zeigte Embryoletalität auch ohne aktivierendes Metabolisierungssystem. Zudem wurden Fehlbildungen bei über 80 % der Embryonen bei der Höchstkonzentration von 50 µg/ml (210 µM) im Kulturmedium beobachtet. Gehäuft trat eine ventrolaterale Protusion und Prosenzephalonhypoplasie auf. Neuralrohrabnormitäten konnten (entgegen der Beobachtungen mit aktiviertem 2-AAF) nicht festgestellt werden. Die Exposition mit N-OH-AAF erzeugte eine statistisch signifikante Abnahme der SSL bereits in relativ geringer Konzentration. Ebenso kam es dabei zu einer Abnahme des Proteingehalts der Embryonen im Vergleich zu den Kontrollen (Faustman-Watts et al., 1983; Faustman-Watts et al., 1984).

Die bei biotransformierten AAF festgestellten Abnormitäten des Neuralrohrs sind demnach nicht auf N-OH-AAF zurückzuführen, sondern wurden in einer nachfolgenden Studie einem weiteren Metaboliten von 2-AAF zugeordnet, dem 7-OH-AAF. Hier traten bei einer Konzentration von 104 µM bei 13 % der Embryonen Fehlbildungen auf (Faustman-Watts et al., 1985).

3. Material und Methoden

3.1 „Whole Embryo Culture“

Die WEC gehört zu einer Reihe von *in-vitro*-Systemen, die zur Untersuchung von Substanzen auf Embryotoxizität herangezogen werden. Hierbei werden durch Präparation gewonnene Rattenembryonen verwendet. Diese werden in einer rotierenden Kultur während einer besonders sensitiven Phase ihrer Organogenese mit den Referenzsubstanzen zwischen Tag 9,5 und 11,5 inkubiert. Es handelt sich dabei um ein geschlossenes, rotierendes System, welches einer definierten Temperatur und einem definierten Gaspartialdruck unterliegt. Über ein Scoring-System erfolgt dann nach 48 Stunden die Auswertung der Embryonen jeweils nach morphologischen und anderen Kriterien (Klug et al., 1985; Flick und Klug, 2000; Flick und Klug, 2006).

3.2 Tiere

3.2.1 Ratten

Es wurden Ratten des Aufzuchtstammes Wistar-Unilever (HsdCPb: Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland) verwendet. Die weiblichen Tiere waren nullipar und wogen zwischen 180 und 220 g. Die Rattenböcke wurden im Tierstall des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie über ein Jahr gehalten und mit den Weibchen verpaart.

3.2.2 Tierhaltung

Die Haltung der Ratten erfolgte in vollklimatisierten Räumen unter spezifischen, pathogenfreien (SPF) Bedingungen bei einer Temperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \% \pm 5 \%$ in Makrolon[®]-Käfigen in Gruppen von fünf bis acht weiblichen Tieren. Die Rattenböcke wurden separat gehalten. Den Tieren stand Futter (2018X Teklad Global, Rodent Diet, Harlan Laboratories, Rossdorf, Deutschland) und Leitungswasser aus Nippeltränken ad libitum zur Verfügung. Es wurde ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus im 12-Stunden-Takt erzeugt, wobei die Lichtperioden ab 9.00 Uhr und die Dunkelperioden ab 21.00 Uhr geschaltet waren. Die Tierschutzrichtlinien des Landes Berlin wurden bei der Haltung der Ratten eingehalten.

3.2.3 Verpaarung

Die Verpaarung wurde von Tierpflegern zwischen 4.00 und 6.00 Uhr vorgenommen. Dabei wurde der Erfolg durch vorhandenen Vaginalplaque bzw. durch Vaginalabstrich auf das Vorhandensein von Spermien überprüft. Bei positivem Befund wurde dieser Tag ab 5.00 Uhr als

Mittelwert dann als Tag 0 der Gestation festgelegt. Diese Tätigkeiten übernahmen die Tierpfleger des Instituts.

3.2.4 Präparation der Eizylinder

Die tragenden Ratten wurden am Tag 9,5 durch Dekapitation mittels eines Dekapitators getötet und entblutet. Im Anschluss erfolgte die Präparation der graviden Uteri. Nach Überführung des isolierten Organs in zimmerwarme HBSS-Lösung (Hank's Buffered Salt Solution) wurden die folgenden Arbeitsschritte unter Reinraumbänken durchgeführt: Durch vorsichtiges Auseinanderziehen des Uterusgewebes wurde dieser an jeder Implantationsstelle mithilfe zweier Pinzetten eröffnet und die Dezidua herausgelöst. Unter der Stereolupe erfolgte dann die Eröffnung der Dezidua durch Einschneiden mit einer Pinzette und anschließendem Längsteilen durch entgegengesetztes Ziehen der beiden Hälften. Eine Hälfte beherbergte den Eizylinder, inklusive des Ektoplazentarkonus, viszeralem Dottersack und Embryo, umgeben von der noch zu lösenden Reichertschen Membran, der durch vorsichtiges Herausschälen mit der Pinzette von der Dezidua gelöst wurde. Die den Eizylinder überziehende Reichertsche Membran musste noch bis zum Ektoplazentarkonus heruntergezogen werden. Am Ende dieser Präparation lag nun der Embryo mit sich entwickelndem Amnion und viszeralem Dottersack vor.

3.2.5 Kultivierung der Embryonen

Zur Kultivierung der Embryonen wurde ein Kulturmedium der Firma Biochrom AG Berlin (Serummischung für die WEC, Katalognummer S9001) verwendet. Dieses bestand aus 10 % Rattenserum und 90 % Rinderserum. Das für die WEC verwendete Kultivierungsserum wurde dann aus 85 % der Serummischung (6 ml) und 15 % HBSS (1 ml) hergestellt. Das Volumen der Kulturflaschen betrug jeweils 7 ml. Die Embryonen wurden nach der Präparation in die vorbereiteten Kulturflaschen überführt und danach für 48 Stunden im Rollerschrank bei 38,5°C inkubiert (Klug et al., 1985; Klug et al., 1990; Klug, 1991).

Jeder Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt. Es wurden immer zwei Kontrollkulturflaschen und jeweils zwei Flaschen mit der zu untersuchenden Substanz in aufsteigenden Konzentrationen verwendet. Dabei wurden jeweils vier Embryonen pro Flasche eingesetzt, wobei darauf zu achten war, dass die Eizylinder unbeschädigt waren, um Entwicklungsstörungen aufgrund von Läsionen, die durch die Präparation entstanden sind, zu vermeiden. Ebenfalls wurden immer nur maximal zwei Embryonen eines Muttertieres verwendet um den sog. „litter effect“ zu minimieren. Die Auswahl der Embryonen erfolgte durch das Einteilungsschema nach Flick und Mitarbeitern, so dass nur Entwicklungsstadien 14 a bis c eingesetzt wurden. Stadium 14 a zeigte dabei bereits eine deutlich sichtbare Neuralfalte, bei 14 b sah man die Vorderdarmbucht und eine Kopffalte und bei 14 c war bereits eine Weiterentwick-

lung des Rhombenzephalons erfolgt, das eine Vertiefung von dorsal erkennen ließ (Flick et al., 2000).

Um ein rotierendes System zu erreichen, wurde ein für die *WEC* modifizierter Rollerschrank verwendet, der mit konstant 25 Upm und einer Temperatur von 38,5°C ($\pm 0,3^\circ\text{C}$) lief. Die Modifikation bestand aus einer nachträglich eingebauten, drehbaren horizontalen Achse, die über einen außenliegenden Elektromotor angetrieben wurde. Auf die Achse waren drei Plasticscheiben mit jeweils acht Löchern aufgesteckt, in welche die Kulturflaschen eingehängt wurden.

Fast alle Referenzsubstanzen wurden bereits in der *WEC* getestet. Ihr embryotoxisches Potenzial ist bekannt. Aufgrund dessen konnte bei der Versuchsdurchführung der Konzentrationsbereich bereits aus den schon vorliegenden Ergebnissen abgeschätzt werden. Für einige Substanzen bzw. Substanzpaare wie Albendazol, Acrolein und Valpromid wurden jedoch auch Konzentrationsfindungsversuche durchgeführt, um den optimalen Konzentrationsbereich zu bestimmen. Dabei war das Ziel, den Bereich zu definieren, in dem noch keine negativen Effekte auf die Organogenese zu beobachten (NOAEL) sind bis zur niedrigsten getesteten Konzentration, bei der 100 % der Embryonen abnorm sind (IC_{MAX}).

Die Kulturflaschen wurden dreimal begast, um ein für den Embryo physiologisches Sauerstoffmilieu zu erzeugen. Hierfür wurden Medizinischer Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff aus Gasflaschen verwendet, die über eine Gasmischanlage gemischt und über eine Kanüle in die Kulturflaschen eingeleitet wurden. Dabei wurde zwei Stunden vor dem Bestücken der Flaschen mit den Embryonen jeweils zwei Minuten, nach dem Bestücken nochmals drei Minuten mit 10 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid und 85 % Stickstoff bei 8 NI/min begast und nach 36 Stunden Inkubation erfolgte die letzte Begasung mit 50 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid und 45 % Stickstoff bei 5 NI/min.

3.3 Auswertung

3.3.1 Auswertung mittels Stereolupe anhand eines Scoring-Systems

Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die bestückten Kulturflaschen, mit der Kontrolle beginnend, aus dem Rollerschrank entnommen. Die Embryonen wurden in eine Petrischale mit zimmerwarmer HBSS-Pufferlösung verbracht und unter der Stereolupe ausgewertet. Dabei war darauf zu achten, dass die Reihenfolge der Auswertung der Flaschen mit der der Bestückung übereinstimmte, um eventuelle Entwicklungsunterschiede durch verschieden lange Inkubations- bzw. Kultivierungszeiten zu vermeiden.

Material und Methoden

Die Auswertung erfolgte anhand eines von Klug und Mitarbeitern entwickelten Scoring-Schemas. Darin wurden die Parameter Dottersackstruktur, Scheitel-Steiß-Länge, Anzahl der Somiten, Haltung, Neurulation, Kopf, Auge, Ohr, Herz, vordere bzw. hintere Gliedmaßenanlage, Schwanzanlage und Blut mit einem Punktesystem beurteilt und bewertet. Die Punkte wurden addiert und ergaben damit den morphologischen Score-Wert (Klug et al., 1985).

Begonnen wurde mit der Beurteilung der Dottersackstruktur (Bewertung nach Score von 1 bis 3). Diese beinhaltet vor allem die Gefäßentwicklung und -verteilung über den Dottersack. Dies gibt Aufschluss über den Fortschritt der Entwicklung des Embryos. Weit verzweigte und über den Dottersack verteilte Gefäße entsprechen dem physiologischen Entwicklungszustand am Tag 11,5 (= 3 Score-Punkte). Im Anschluss daran wurden die Embryonen aus Dottersack und Amnion herauspräpariert und direkt beurteilt. Weitere wichtige Parameter, die ebenfalls den Entwicklungsfortschritt zeigten, sind die Scheitel-Steiß-Länge (SSL) und die Anzahl der Somiten. Die SSL wurde mittels eines in das Okular der Stereolupe integrierten Okkulometers abgelesen und dann mithilfe einer Tabelle in Millimeter umgerechnet. Ein weiterer Punkt war die Anzahl der Somiten. Diese wurden von dem ersten deutlich abgrenzbaren Somiten kaudal bis zum Beginn der vorderen Gliedmaßenanlage gezählt. Dazu wurden noch die zwölf weiter kranial vorhandenen Somiten addiert.

Der morphologische Scorewert wurde anhand der bereits oben aufgeführten Punkte (Haltung des Embryos, Neurulation, Kopfentwicklung (inklusive Gehirnanlage), Augen-, Ohr-, Herzanlage, vordere und hintere Gliedmaßenanlagen, Schwanzanlage und Blutbildung) ermittelt. Jeder Parameter wurde auch hier nach einem vorgegebenen Scoring-System (Klug et al., 1985) bewertet. Dadurch konnte der Entwicklungszustand der einzelnen Embryonen bzw. die durch die zugegebene Referenzsubstanz hervorgerufenen Veränderungen oder Fehlbildungen beurteilt werden. Die einzelnen Werte wurden dann summiert und somit der Gesamtscore für jeden Embryo ermittelt. Je höher die Summe der Einzelscores war, desto fortgeschrittener wurde der Entwicklungszustand des Embryos klassifiziert. Die zu erreichende Höchstpunktzahl waren 40 Score-Punkte.

Durch das Scoring-System konnten die durch die Referenzsubstanzen verursachten Veränderungen, wie Fehlbildungen oder die Unterentwicklung des gesamten Embryos oder dessen einzelner Organanlagen, erfasst werden. Die Kontrollembryonen dienten dabei als Vergleich für die mit den Testsubstanzen in aufsteigender Konzentration inkubierten Embryonen. Von der Norm abweichende Ausprägungen wurden dabei erfasst. Von einer Abnormität wurde ausgegangen, wenn eine disproportionale Entwicklung einer Organanlage im Vergleich zur Kontrolle oder der normalen Ausprägung der Gewebemuster auftrat (Dinort, 2007). Abnormitäten oder für die Substanz spezifische Veränderungen bzw. Fehlbildungen oder Retardierungen wurden separat aufgezeichnet. Da der Scorewert nur definierte Parameter

enthielt, wurden darüber hinaus auftretende Veränderungen zusätzlich vermerkt, wie beispielsweise Fehlbildung der Kiemenbögen.

Als abnorm wurden alle Embryonen mit einer oder mehreren (schwerwiegenden) Abnormitäten (Scoring-Bewertung mit 1) beschrieben. Die als abnorm bewertete Dottersackstruktur allein galt in der statistischen Auswertung allerdings nicht als Abnormitätskriterium, hierfür musste noch mindestens ein zweiter Parameter als abnorm bewertet worden sein.

Die Embryonen aus den Lösungsmittelkontrollen wurden mit den Kontrollergebnissen vorangegangener Studien des hiesigen Labors verglichen, die eine Abnormitätsrate von 2-3 % aufwiesen. Methodenbedingt kann es zum Auftreten von Abnormitäten in der Kontrolle kommen. Durch die relativ kleinen Fallzahlen lag die Abnormitätenrate bei max. ca. 10 %, wie auch schon in vorangegangenen Arbeiten (Dinort, 2007; Klug et al., 1985).

3.3.2 Fotodokumentation

Im Anschluss an die Auswertung mittels Stereolupe wurden die von den Eihüllen befreiten Embryonen noch fotografisch dokumentiert. Dabei wurden mit einer der Stereolupe aufgesetzten Digitalkamera (Nikon Typ E995, Tokyo, Japan) die Embryonen erst als Übersichtsbild in der 16-fachen Vergrößerung mit jeweils allen Embryonen pro Flasche, angeordnet, danach folgten noch zwei Einzelbilder in 20-facher Vergrößerung, eines der linken und rechten Körperseite des Embryos, der repräsentativ für die Gruppe stand. Besonderheiten oder Auffälligkeiten wurden separat dokumentiert.

3.3.3 Proteinbestimmung

Als Wachstums- bzw. Entwicklungsparameter wurde ebenfalls der Gesamtproteingehalt der jeweiligen Embryonen ohne Eihüllen herangezogen. Dieser wurde mittels der Lowry Methode (Lowry et al., 1951) ermittelt. Mithilfe des DC-Protein-Assays (BioRad, Hercules, USA) wurde dann der Proteingehalt bestimmt. Die Standardkurve wurde mit bovinem Serumalbumin (Paesel + Lorey, Hanau) erstellt.

Die Gesamtproteinbestimmung wurde mit Embryonenhomogenat durchgeführt. Dazu wurden die ganzen Embryonen frei von Pufferlösung nach Auswertung unter der Stereolupe in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Um im linearen Bereich der Standardkurve zu bleiben wurde je nach Größe des Embryos das Volumen mit 0,5 M Natronlauge aufgefüllt. Durch die 14- bis 16-stündige Inkubation mit Natronlauge bei Zimmertemperatur kam es zur chemischen Zersetzung des embryonalen Gewebes. Danach wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit dem zersetzten Embryonalgewebe für 30 Minuten bei 30°C in den Thermoschüttler verbracht. Im Anschluss erfolgte eine nochmalige mechanische Zerkleinerung der Em-

bryonen durch ein Laborrührwerk mit Homogenisationskegel in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Danach wurde die Standardreihe dreifach pipettiert, gefolgt von dem ebenfalls dreifach zu bestimmenden Embryonenhomogenat. Dieses wurde mithilfe des Biorad DC-Protein-Assays bestimmt. Die Auswertung erfolgte danach computergestützt mit der Software von Mircoplate Manager 4.0, Biorad, Hercules, USA.

3.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS (Version 18.0). Dafür wurden die bereits in der optischen Auswertung angeführten Parameter herangezogen, die im Score aufsummiert wurden, zusammen mit den Werten der Proteinbestimmung. Ausgehend vom arithmetischen Mittelwert und der Standardabweichung für die Scheitel-Steiß-Länge und den Gesamtproteingehalt wurde der Dunnett T3-Test durchgeführt. Unter der gleichen Prämisse wurde für den Scorewert und die Anzahl der Somiten der Mann-Whitney-U-Test verwendet, für die Dottersackdurchblutung der „Kruskall-Wallis-H-Test“ und für die Dysmorphogenese der „Exakte Test nach Fisher“ angewandt.

Dabei wurden die Kontroll- und Testansätze statistischen Analysen unterzogen. Die als abnorm gewerteten Embryonen wurden in der Statistik als absolute Zahl und als Prozentzahl für jeden Ansatz dargestellt. Das statistische Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**) angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemeine Anmerkungen zur Auswertung der Versuche

Für die Beurteilung und Auswertung der Embryonen wurde das bereits in Kapitel 3.3.1 beschriebene Scoring-System nach Klug und Mitarbeitern herangezogen (Klug et al., 1985). Die Embryonen wurden in einer ersten Versuchsreihe mit den jeweiligen Testsubstanzen in aufsteigenden Konzentrationen für 48 Stunden inkubiert, danach wurden sie in Mischungen von 80/20 und 50/50 des Ausgangsstoffes und seines Metaboliten in einer zweiten Testreihe untersucht, um unterschiedliche Metabolisierungsraten zu simulieren. Dabei wurden die Embryonen in der jeweiligen Mischung auch steigenden Konzentrationen der Ausgangssubstanz und dem dazugehörigen Metaboliten ausgesetzt. Bei einigen Substanzen wurden zuvor Konzentrationsfindungsversuche durchgeführt, da genauere Angaben in der Literatur fehlten. Zu jedem Versuch wurde eine Lösungsmittelkontrolle erstellt. Es wurden für jede Referenzsubstanz – Ausgangssubstanz und dazugehöriger Metabolit – die aufgetretenen Veränderungen der Somitenzahl, der Dottersackdurchblutung und des morphologischen Score-Werts beschrieben. Zur weiteren Beurteilung wurden noch die Proteinbestimmung und die Scheitel-Steiß-Länge als Wachstumsparameter verwendet. Zu jeder Substanz sind im jeweiligen Kapitel Tabellen mit den Ergebnissen angefügt.

Die Veränderungen wurden hinsichtlich ihrer Bedeutung unterschiedlich gewichtet. So wurde die Abnormität als eine disproportionale Entwicklung einer Organanlage im Vergleich zur Kontrolle oder zu anderen Organanlagen des Embryos oder als eine „unphysiologische Entwicklung“ definiert (Dinort, 2007). Die Abnormität wurde damit als gravierendste Abweichung klassifiziert und erhielt im Scoring-System den Wert 1.

Die Verwendung des Begriffs „Ramskopf“ bzw. „ramsköpfig“ beschreibt die Abflachung der Furche (Sulkus) zwischen dem Di- und Telenzephalon durch die Einwirkung der jeweiligen Substanz. Diese Beobachtung wurde noch nicht als „abnorm“ (Wert 1) bewertet. Die Bezeichnung „Eichhörnchen(-haltung)“ steht jedoch für eine abnorme Veränderung: Der Embryo war nicht mehr gedreht, sein Körper lag – gleich dem Schweif eines Eichhörnchens – der Kopfanlage dorsal an.

4.2 Ergebnisse der Untersuchung der Ausgangssubstanzen, ihrer Metaboliten und ihrer jeweiligen Mischungen in der WEC

4.2.1 Ergebnisse der Untersuchung von Cyclophosphamid, Acrolein und deren Mischungen

4.2.1.1 Cyclophosphamid

Die Substanz wurde in aufsteigenden Konzentrationen im Bereich von 179,1 bis 1433,1 μM (50 bis 400 $\mu\text{g/ml}$) getestet. Im Vorfeld fand ein Konzentrationsfindungsversuch im Bereich von 358,2 bis 1433,1 μM (100 bis 400 $\mu\text{g/ml}$) statt.

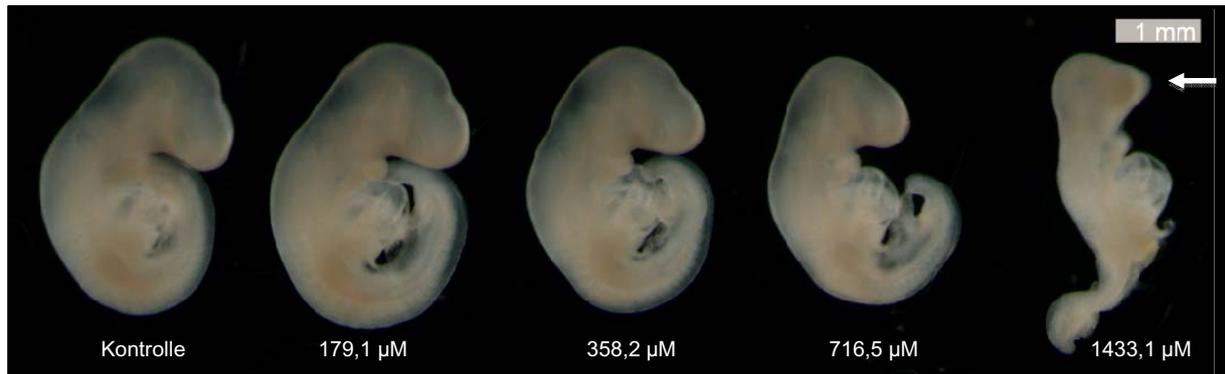
Mit steigenden Konzentrationen konnte eine kontinuierliche Abnahme der Scheitel-Steiß-Länge (SSL) festgestellt werden. Zwischen den Werten der Kontrolle und den von mit der höchsten Konzentration inkubierten Embryonen bestand ein auffälliger Unterschied ($p < 0,05$). Ebenfalls kam es zu einem stetigen Rückgang des Proteingehalts, ohne jedoch signifikante Abweichungen von der Lösungsmittelkontrolle zu zeigen.

Die Dottersackdurchblutung lag in der Kontrolle bei 3,0 Punkten und zeigte damit eine sehr gute Gefäßzeichnung. Ab dem zweiten Versuchsansatz nahmen die Mittelwerte kontinuierlich ab. Der Scorewert der Kontrollembryonen ergab $34,5 \pm 3,82$ (Mittelwert MW \pm Standardabweichung SD) Punkte. Auch hier war ab der niedrigsten Konzentration (179,1 μM) eine stetige Abnahme zu verzeichnen, die aber erst in der höchsten Konzentration bei 1433,1 μM eine statistische Signifikanz im Vergleich mit der Kontrolle ($p < 0,01$) aufwies. Die Zahl der Somiten verringerte sich ebenfalls konzentrationsabhängig statistisch signifikant ($p < 0,05$) in der höchsten Konzentration (1433,1 μM) mit einem Wert von $23,5 \pm 0,71$ (MW \pm SD). Ab 358,2 μM zeigten sich zunehmend Veränderungen der Kopfreion, wobei das Te-lenzephalon nicht richtig ausgebildet war und ein Fehlen der Augenanlage auffiel (Foto 1 auf Seite 39). Auch waren hier nicht mehr alle Embryonen gedreht (Rumpf liegt nicht ventral der Herz- und Kopfanlage an). Dabei betrug die Abnormitätsrate unter den inkubierten Embryonen erst ab der höchsten Konzentration von 1433,1 μM (400 $\mu\text{g/ml}$) 100 %.

Die jeweiligen Ergebnisse der einzelnen Parameter sind in Tabelle 1 (S. 40) aufgeführt. Das Liniendiagramm (Grafik 1 auf S. 50) zeigt eine steile Konzentrationswirkungskurve.

Ergebnisse

Foto 1: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Cyclophosphamid in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Stetige Abnahme der SSL. Bei einer Konzentration von 1433,1 µM war die Rotation des Rumpfes unvollständig, das Telenzephalon (Pfeil) nicht mehr physiologisch ausgeprägt.

Tab. 1: Effekte verschiedener Konzentrationen von Cyclophosphamid auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / μg/ml	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW ± SD	Score MW ± SD	Somitenzahl MW ± SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW ± SD	Proteingehalt (μg/Embryo) MW ± SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 ± 0,0	34,4 ± 3,82	26,5 ± 0,76	1 / 8	2,98 ± 0,22	123,5 ± 27,1
179,1 / 50	8	3,0 ± 0,0	36,3 ± 1,04	26,6 ± 0,92	0 / 8	3,05 ± 0,19	125,3 ± 25,4
358,2 / 100	8	2,75 ± 0,46	36,1 ± 1,55	26,0 ± 1,41	0 / 8	2,87 ± 0,11	124,9 ± 26,0 (N=6)
716,5 / 200	8	2,63 ± 0,52	35,5 ± 1,2	25,9 ± 1,25	0 / 8	2,92 ± 0,2	114,3 ± 20,9
1433,1 / 400	8	2,75 ± 0,46	26,8 ± 4,62**	23,5 ± 0,71* (N = 2)	8 / 8**	2,48 ± 0,28*	82,4 ± 25,0

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Cyclophosphamid. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung.

MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung

* = p < 0,05

** = p < 0,01

N = Stichprobengröße

4.2.1.2 Acrolein

Der Metabolit von Cyclophosphamid wurde in einem Konzentrationsbereich von 111,5 bis 891,8 μM (6,25 bis 50 $\mu\text{g/ml}$) getestet. Allerdings waren bereits bei einer Konzentration von 445,9 μM (25 $\mu\text{g/ml}$) alle eingesetzten Embryonen abnorm, sodass eine Auswertung der kaum noch als solche erkennbaren Embryonen der höchsten Konzentration von 891,8 μM (50 $\mu\text{g/ml}$) nicht mehr durchgeführt werden konnte.

Die Wachstumsparameter SSL und Proteingehalt zeigten bis zu 222,9 μM bzw. 12,5 $\mu\text{g/ml}$ keinen auffälligen Rückgang. Die SSL lag in der Kontrolle bei $3,0 \pm 0,33$ mm (MW \pm SD), der mittlere Proteingehalt bei $120,8 \pm 20,15$ μg (MW \pm SD). Beide Werte waren bei einer Konzentration von 445,9 μM (25 $\mu\text{g/ml}$) durch eine deutliche Abnahme gekennzeichnet (SSL: $1,60 \pm 0,28$ mm [MW \pm SD], Proteingehalt: $39,9 \pm 14,63$ μg [MW \pm SD]).

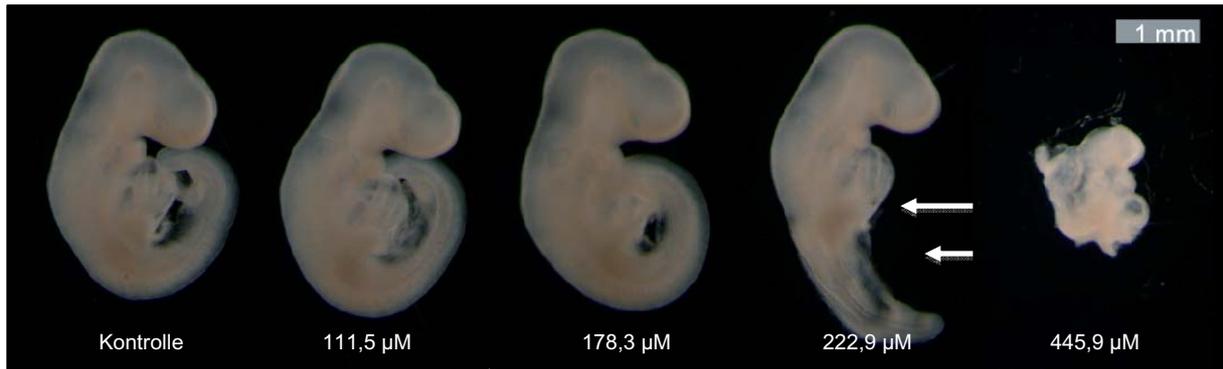
Die Dottersackdurchblutung (inklusive der Gefäßzeichnung des Dottersacks) war schon ab 222,9 μM (12,5 $\mu\text{g/ml}$) statistisch signifikant ($p < 0,01$) auf $1,5 \pm 0,58$ Punkte (MW \pm SD) im Vergleich zur Kontrolle ($3,0 \pm 0,0$ MW \pm SD) verändert. Dies bestätigte sich bei einer Konzentration von 445,9 μM (25 $\mu\text{g/ml}$) mit einem Wert von nur noch $1,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) Punkten. In der höchsten Konzentration (445,9 μM) stellten sich die Dottersäcke als klein und leer, mit geröteter, gewölbter bzw. höckeriger, teilweise auch ganz glatter Oberfläche dar. Der Score lag bei $35,8 \pm 0,5$ Punkten (MW \pm SD) in der Kontrolle und zeigte eine signifikante Abnahme ($p < 0,05$) ab einer Konzentration von 178,3 μM auf $34,3 \pm 1,5$ Punkte (MW \pm SD). Im letzten Versuchsansatz (445,9 μM bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$) betrug der Scorewert nur noch $16,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) Punkte. Die Somitenzahl zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (Signifikanz ($p < 0,05$) bei 178,3 μM bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$).

Die morphologischen Veränderungen setzen ab 222,9 μM (12,5 $\mu\text{g/ml}$) Acrolein ein. Bei 445,9 μM (25 $\mu\text{g/ml}$) zeigte sich eine 100-prozentige Abnormitätsquote (IC_{MAX} : 445,9 μM). Zwei von drei Embryonen waren nicht mehr gedreht und zeigten eine „Eichhörnchenhaltung“, da der Rumpf noch mit der Kopfanlage dorsal verwachsen war (Foto 2 auf S. 42). Eine Zählung der Somiten war dadurch nicht mehr möglich. Alle Embryonen wiesen einen offenen kranialen Neuporus auf, die Telenzephalonanlage erschien blasig und die Herzanlage war nicht deutlich abgrenzbar. Gliedmaßen- und Schwanzanlage waren nur noch mäßig gut ausgeprägt.

Alle Einzelergebnisse sind in Tabelle 2 (S. 43) aufgelistet.

Ergebnisse

Foto 2: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Acrolein in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Ab einer Konzentration von 222,9 µM war die Rotation des Rumpfes unvollständig (Pfeile), die SSL war deutlich verkürzt. Ab 445,9 µM war eine Auswertung anhand der Score-Parameter nicht mehr möglich (100-prozentige Dymorphogenese).

Tab. 2: Effekte verschiedener Konzentrationen von Acrolein auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration µM / µg/ml	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW ± SD	Score MW ± SD	Somitenzahl MW ± SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW ± SD	Proteingehalt (µg/Embryo) MW ± SD
0 (Kontrolle)	4	3,0 ± 0,0	35,8 ± 0,5	26,3 ± 1,5	0 / 4	3,0 ± 0,33	120,8 ± 20,15
111,5 / 6,25	4	3,0 ± 0,0	37,5 ± 0,58*	26,0 ± 0,82	0 / 4	3,27 ± 0,08	138,4 ± 16,65
178,3 / 10	4	3,0 ± 0,0	34,3 ± 1,5	23,8 ± 0,50*	0 / 4	3,02 ± 0,23	131,3 ± 33,11
222,9 / 12,5	4	1,5 ± 0,58**	34,3 ± 0,96	26,0 ± 0,82	0 / 4	2,99 ± 0,11	124,3 ± 16,98
445,9 / 25	3	1,0 ± 0,0**	16,0 ± 0,0	25,0 ± 2,0	3 / 3**	1,60 ± 0,28*	39,9 ± 14,63*

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Acrolein. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung.

MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung

* = p < 0,05

** = p < 0,01

N = Stichprobengröße

4.2.1.3 Cyclophosphamid und Acrolein in der 80/20-Mischung

Der Konzentrationsbereich orientierte sich an dem des Metaboliten. Er erstreckte sich von 222,5 bis 1783,5 μM in der Verteilung 80 % Cyclophosphamid und 20 % Acrolein. Dabei wurden in der ersten Konzentration insgesamt 222,5 μM der Mischung verwendet, was einem Anteil von 178 μM Cyclophosphamid und 44,5 μM Acrolein entspricht.

Die SSL nahm im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($3,18 \pm 0,14$ mm MW \pm SD) ab einer Konzentration von 445,5 μM auf $2,86 \pm 0,15$ mm (MW \pm SD) statistisch signifikant ($p < 0,01$) ab, was sich bei den Konzentrationen 1337,5 μM (SSL: $1,79 \pm 0,39$ mm MW \pm SD) und 1783,5 μM (SSL: $1,69 \pm 0,33$ mm MW \pm SD) fortsetzte. Der zweite Wachstumsparameter bestätigte den Rückgang ebenfalls: Der mittlere Proteingehalt verringerte sich ab einer Konzentration von 1337,5 μM mit $52,6 \pm 28,4$ μg (MW \pm SD) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit $145,8 \pm 19,7$ μg (MW \pm SD) drastisch.

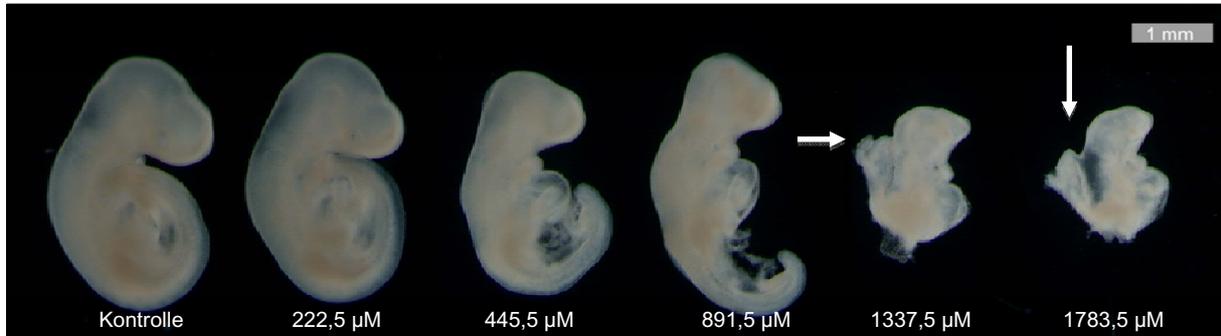
Ab 891,5 μM zeigte sich bei der Dottersackdurchblutung eine Abnahme mit einem Mittelwert von $2,13 \pm 0,35$ (MW \pm SD) verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle mit $3,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) Punkten.

Der Score zeigte ab einer Konzentration von 445,5 μM eine statistisch signifikante Abweichung ($p < 0,01$) von $32,0 \pm 2,78$ (MW \pm SD) verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle ($36,8 \pm 1,17$ MW \pm SD). Dabei war vor allem eine nicht vollständige bis nicht vorhandene Drehung des Embryos auffällig und ein offener kranialer Neuroporus bei zwei von acht Embryonen. Ab 891,5 μM konnten zudem noch prominent ausgebildete Nasenplakoden und ein nur geringgradig ausgebildetes Telenzephalon bei zwei von acht Embryonen festgestellt werden (Foto 3 auf S. 45). Vereinzelt traten Hämorrhagien im Kopfbereich auf. Bei einer Konzentration von 1337,5 μM waren 88 % der inkubierten Embryonen dysmorph. Die Embryonen waren nicht mehr gedreht, sondern überwiegend in „Eichhörnchenhaltung“ (Foto 3 auf S. 45). Die Neurulation war abnorm, bzw. es war der kraniale Neuroporus noch offen, die Augenanlage fehlte bei der Hälfte der Embryonen. Die Herzanlage wies keine Herzschleife auf, sondern war nur noch ein diffuser Schlauch. Auch waren Vorder- und Hintergliedmaßenanlagen ab dieser Konzentration nicht mehr gut sichtbar ausgebildet. Eine 100-prozentige Abnormitätsrate wies der fünfte Versuchsansatz mit 1783,5 μM auf (IC_{MAX} : 1783,5 μM). Hier zeigten sich bei drei von acht Embryonen ausgebildete Nasenplakoden (sind bei physiologisch entwickelten Embryonen am Tag 11,5 nicht ausgebildet) und eine „Eichhörnchenhaltung“ (Foto 3 auf S. 45). Offene kraniale Neuropori waren bei fast allen Embryonen zu erkennen. Die Somitenzahl war ab der zweiten Konzentration mit $22,9 \pm 1,22$ (MW \pm SD) zu $25,5$ (MW \pm SD 0,76; Kontrollwert) statistisch signifikant ($p < 0,05$) verringert. Ab 891,5 μM war aufgrund der fehlenden Drehung der Embryonen eine Zählung der Somiten nicht mehr möglich.

Ergebnisse

In der Tabelle 3 (S. 46) werden die einzelnen Ergebnisse aufgeführt. Die Grafiken 1 und 2 (S. 50) zeigen eine Rechtsverschiebung in Richtung der Ausgangssubstanz Cyclophosphamid.

Foto 3: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Cyclophosphamid und Acrolein im Verhältnis 80/20 in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Ab einer Konzentration von 445,5 µM war eine vollständige Rotation nicht mehr gegeben. Ab 891,5 µM war das Telenzephalon nicht mehr physiologisch ausgebildet. Ab 1337,5 µM war der Rumpf dorsal mit der Kopfanlage verwachsen, die Embryonen hatten eine „Eichhörnhaltung“ (siehe Pfeile).

Tab. 3: Effekte verschiedener Konzentrationen von Cyclophosphamid und Acrolein in der 80/20-Mischung auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / μg/ml	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW ± SD	Score MW ± SD	Somitenzahl MW ± SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW ± SD	Proteingehalt (μg/Embryo) MW ± SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 ± 0,0	36,8 ± 1,17	25,5 ± 0,76	0 / 8	3,18 ± 0,14	145,8 ± 19,68
222,5 / 5	8	3,0 ± 0,0	33,8 ± 3,5	24,4 ± 0,98	2 / 8	3,0 ± 0,17	125,7 ± 14,08
445,5 / 10	8	2,75 ± 0,46	32,0 ± 2,78**	22,9 ± 1,22**	1 / 8	2,86 ± 0,15**	115,0 ± 18,28
891,5 / 20	8	2,13 ± 0,35**	28,9 ± 4,52**	23,6 ± 0,55**	3 / 8	2,75 ± 0,38	110,9 ± 28,97
1337,5 / 30	8	1,0 ± 0,0**	19,3 ± 4,89**	n.d.	7 / 8**	1,79 ± 0,39**	52,6 ± 28,4**
1783,5 / 40	8	1,0 ± 0,0**	19,1 ± 3,94**	n.d.	8 / 8**	1,69 ± 0,33**	47,7 ± 19,37**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Cyclophosphamid und Acrolein in der 80/20-Mischung. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung

* = p < 0,05

** = p < 0,01

4.2.1.4 Cyclophosphamid und Acrolein in der 50/50-Mischung

Der Testbereich bei diesem Mischungsverhältnis erstreckte sich von 178,4 bis 713,4 μM , wobei beide Substanzen zu gleichen Teilen verwendet wurden. Im Fall der ersten Konzentration bedeutete dies eine Mischung aus 89,2 μM Cyclophosphamid und der gleichen Menge Acrolein.

Die Wachstumsparameter SSL und Proteingehalt verringerten sich bis zu einer Konzentration von 356,7 μM nur geringfügig bzw. erhöhten sich bei 535 μM leicht (Tab. 4 auf S. 50). Jedoch zeigte die SSL bei der höchsten Konzentration von 713,4 μM eine statistisch signifikante Verringerung auf $1,95 \pm 0,56$ mm (MW \pm SD) im Vergleich zu $3,08 \pm 0,40$ mm (MW \pm SD) in der Lösungsmittelkontrolle. Auch der mittlere Proteingehalt hatte mit $73,5 \pm 45,09$ μg (MW \pm SD) zum Kontrollwert $159,1 \pm 64,3$ μg (MW \pm SD) in der höchsten Konzentration stark abgenommen, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Abnahme der Dottersackdurchblutung war in der höchsten Konzentration (713,4 μM) auffällig. Hier sank der Wert von $3,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) in der Kontrolle auf $1,25 \pm 0,46$ (MW \pm SD). Beim Score wurde ein signifikanter Rückgang ($p < 0,05$) bereits ab 356,7 μM bemerkt. Dieser verringerte sich von $36,8 \pm 1,58$ (MW \pm SD) der Kontrollembryonen auf $34,0 \pm 2,76$ (MW \pm SD) bei 356,7 μM . Ein deutlicher Effekt war dabei in der höchsten Konzentration von 713,4 μM zu beobachten: Hier lag der Score-Wert nur noch bei $24,0 \pm 5,74$ (MW \pm SD). Die Anzahl der Somiten blieb hingegen unverändert, die höchste Konzentration war in diesem Punkt nicht auswertbar, da alle Embryonen in „Eichhörchenhaltung“ vorlagen und eine Somitenzählung somit nicht möglich war. Die Embryonen zeigten von der niedrigsten Konzentration an zunehmend eine Dysmorphogenese ihrer Rotation, d. h. keine vollständige oder gar keine Drehung (Foto 4 auf S. 48). In der vierten Konzentration (713,4 μM) lag bei zwei von acht Embryonen eine abnorme Neurulation vor. Der Kopfbereich wies bei drei Embryonen einen „Ramskopf“ auf bzw. einmal einen offenen kranialen Neuroporus. Eine Einzeldarstellung der Werte erfolgt in der Tabelle 4 (S. 49).

In der grafischen Darstellung (Grafiken 1 und 2 auf S. 50) verhielt sich die Mischung erwartungsgemäß: Die Konzentrationswirkungskurve lag zwischen denen der Ausgangssubstanz und ihres Metaboliten.

Ergebnisse

Foto 4: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Cyclophosphamid und Acrolein im Verhältnis 50/50 in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Deutliche Abnahme der SSL, sowie eine nicht mehr vollständige Rotation des Rumpfes waren ab einer Konzentration von 356,7 µM zu erkennen. Ab 713,4 µM war der Rumpf dorsal mit der Kopfanlage verwachsen.

Tab. 4: Effekte verschiedener Konzentrationen von Cyclophosphamid und Acrolein in der 50/50-Mischung auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / $\mu\text{g/ml}$	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW \pm SD	Score MW \pm SD	Somitenzahl MW \pm SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW \pm SD	Proteingehalt ($\mu\text{g}/\text{Embryo}$) MW \pm SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 \pm 0,0	36,75 \pm 1,58	25,5 \pm 1,31	0 / 8	3,08 \pm 0,4	159,1 \pm 64,3
178,4 / 10	8	3,0 \pm 0,0	33,5 \pm 5,68	25,6 \pm 0,55	1 / 8	2,96 \pm 0,33	134,5 \pm 29,8
356,7 / 20	6	2,83 \pm 0,41	34,0 \pm 1,9*	25,3 \pm 0,58	1 / 6	2,66 \pm 0,32	124,7 \pm 24,82
535,0 / 30	7	2,86 \pm 0,38	33,6 \pm 2,76*	26,0 \pm 0,0	1 / 7	2,87 \pm 0,47	148,9 \pm 57,22
713,4 / 40	8	1,25 \pm 0,46**	24,0 \pm 5,74**	n.d.	8 / 8**	1,95 \pm 0,56**	73,5 \pm 45,09

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Cyclophosphamid und Acrolein in der 50/50-Mischung. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW \pm SD = Mittelwert \pm Standardabweichung

* = $p < 0,05$

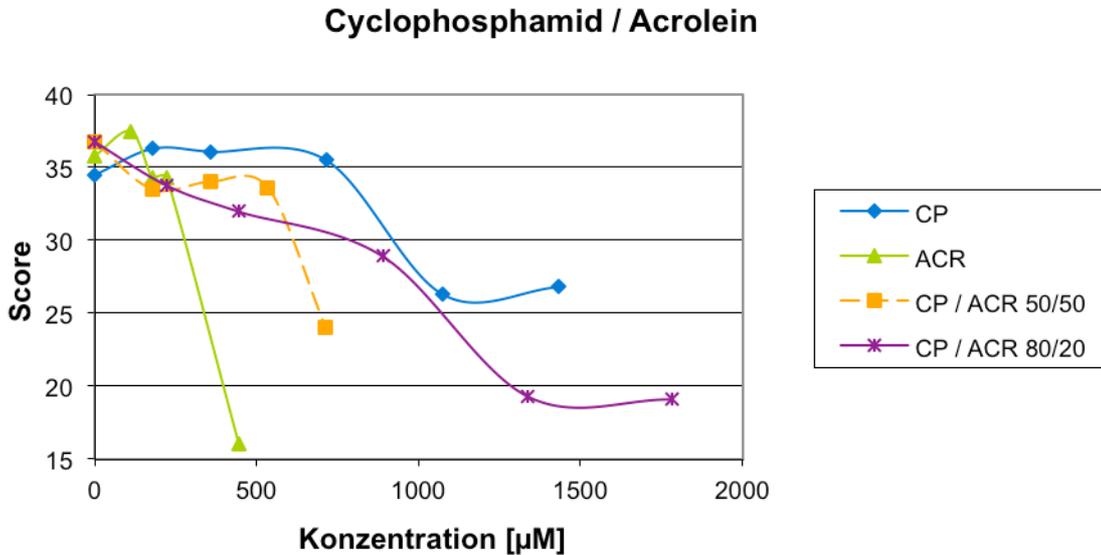
** = $p < 0,01$

N = Stichprobengröße

Ergebnisse

Grafik 1: Score in Beziehung zur Konzentration (μM)

Der Metabolit Acrolein verursachte eine deutliche Abnahme des Scorewertes. Die Kurven der Mischungsversuche lagen erwartungsgemäß zwischen denen der Ausgangssubstanz und der des Metaboliten.

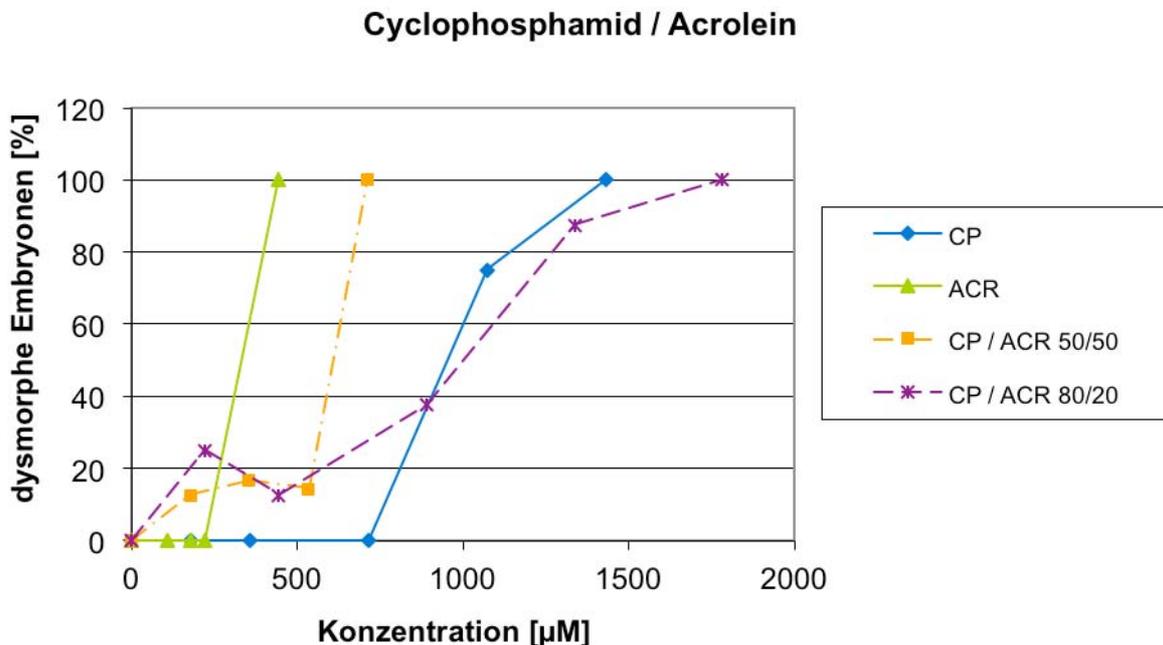


Legende:

Die Darstellung zeigt die Veränderung des Scores von Ausgangssubstanz, Metabolit und der 80/20- und 50/50-Mischung in Abhängigkeit von der Konzentration [μM]. Die verschiedenfarbigen Symbole stehen für die jeweiligen Mittelwerte, die Linien dazwischen sind grafische Hilfsmittel. Auf der X-Achse ist die Konzentration in [μM] aufgetragen, die Y-Achse stellt die Scorewerte dar.

Grafik 2: Dismorphe Embryonen in Beziehung zur Konzentration (μM)

Die Dismorphogenese zeigt in beiden Mischungsversuchen eine deutliche Rechtsverschiebung zugunsten der Ausgangssubstanz.



Legende:

Die Darstellung zeigt die Veränderung der Dismorphogenese der Embryonen nach 48-stündiger Inkubation mit der Ausgangssubstanz, dem Metabolit bzw. in der 80/20- und 50/50-Mischung in Abhängigkeit von der Konzentration [μM]. Die verschiedenfarbigen Symbole stehen für die jeweiligen Mittelwerte, die Linien dazwischen sind grafische Hilfsmittel. Auf der X-Achse ist die Konzentration in [μM] aufgetragen, die Y-Achse stellt die Scorewerte dar.

4.2.2 Ergebnisse der Untersuchung von Retinol, all-trans-Retinsäure und deren Mischungen

4.2.2.1 Retinol

Retinol wurde in einem Konzentrationsbereich von 3,49 bis 174,5 μM bzw. 1,0 $\mu\text{g/ml}$ bis 50 $\mu\text{g/ml}$ getestet (Tab. 5 auf S. 53). Die Auswertung aller Parameter konnte nur bis 8,73 μM bzw. 2,5 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt werden, da hier bereits eine Abnormitätsrate von 100 % festgestellt wurde. Es gingen mehrere Konzentrationsfindungsversuche voraus, bei denen die hohe Sauerstoff- und Lichtempfindlichkeit des Retinols berücksichtigt werden musste.

Bei den Wachstumsparametern SSL und Proteingehalt wurde Folgendes festgestellt: Die Lösungsmittelkontrolle zeigte einen Wert von $3,18 \pm 1,45$ mm (MW \pm SD) SSL. Die SSL nahm ab der niedrigsten Konzentration (3,49 μM bzw. 1,0 $\mu\text{g/ml}$) stetig ab. Eine erste statistisch signifikante ($p < 0,01$) Abweichung war bei der vierten Konzentration mit 34,9 μM bzw. 10,0 $\mu\text{g/ml}$ bei einem Wert von $1,89 \pm 0,48$ mm (MW \pm SD) zu erkennen. Der Proteingehalt sank im Vergleich zur Kontrolle ($144,8 \pm 26,28$ μg MW \pm SD) bis zu einem Wert von $77,2 \pm 26,6$ μg (MW \pm SD) bei einer Konzentration von 35,0 μM (10,0 $\mu\text{g/ml}$) kontinuierlich ab.

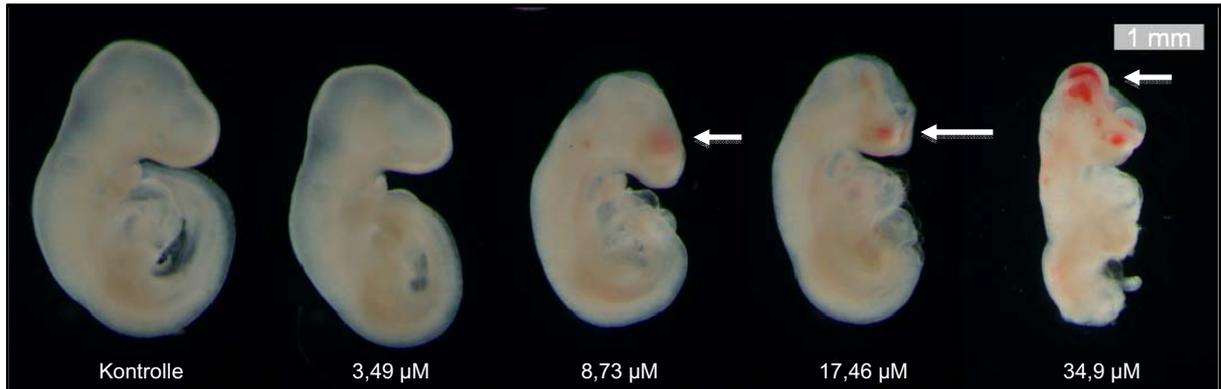
Retinol zeigte bereits ab der zweiten Konzentration (8,73 μM bzw. 2,5 $\mu\text{g/ml}$) eine deutliche Verringerung der Dottersackgefäßausbildung mit einem Wert von $1,5 \pm 0,58$ Punkten (MW \pm SD), verglichen mit $3,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) der Kontrolle, und ging auch in den folgenden Konzentrationen bis auf einen Wert von $1,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) bei 34,9 μM (10,0 $\mu\text{g/ml}$) und 87,25 μM (25,0 $\mu\text{g/ml}$) zurück. Schon in der niedrigsten Konzentration war eine deutliche Abnahme des Scores ($32,3 \pm 5,34$ MW \pm SD; Kontrolle: $37,0 \pm 0,82$ MW \pm SD) zu beobachten. Eine statistisch signifikante Veränderung ($p < 0,05$) war ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$ festzustellen; hier lag der Score bei $21,5 \pm 0,58$ (MW \pm SD) und verringerte sich weiter deutlich auf $21,0 \pm 4,0$ (MW \pm SD) und in der höchsten Konzentration (34,9 μM) auf $18,3 \pm 1,16$ (MW \pm SD).

Ab 8,73 μM (2,5 $\mu\text{g/ml}$) fielen Veränderungen der Neurulation auf. Bei zwei von sieben Embryonen waren offene kraniale Neuropori und damit eine abnorme Entwicklung der Kopfregion auffällig. Auch fiel ein verzögertes Wachstum der hinteren Gliedmaßenanlagen und der Schwanzanlage auf. Die Ausbildung der Herzschleife war nicht mehr vollständig, es waren lediglich Herzsclläuche zu sehen. Die Abnormitätsrate lag bei 100 % (IC_{MAX} : 8,73 μM). Ab 17,46 μM (5,0 $\mu\text{g/ml}$) zeigte sich bei allen Embryonen eine abnorme Kopfregion, da sich der kraniale Neuroporus noch nicht geschlossen hatte. Zudem fehlte bei allen Embryonen die Augenanlage. Ein Embryo zeigte zahlreiche Hämorrhagien im Kopfbereich (Foto 5 und 6 auf S. 52). Das Telenzephalon war verformt und wies eine höckerige Oberfläche auf. Der Rumpf war bei allen Embryonen physiologisch entwickelt, Augen- und Ohranlage jedoch waren weitgehend nicht ausgebildet. In den nachfolgenden Konzentrationen bestätigte sich

Ergebnisse

die 100-prozentige Abnormitätsrate. Auch die anderen Scoring-Parameter waren stark verringert, so dass die Neurulation, Kopfentwicklung und Herzanlage mit dem Wert 1 (abnorm) bewertet wurden. Auffällig war, dass der Rumpf vollständig mit dem Amnion verwachsen war. Augen- und Ohranlage waren nicht mehr angelegt. Ab $87,25 \mu\text{M}$ ($25 \mu\text{g/ml}$) konnte keine Auswertung vorgenommen werden, da alle Embryonen unter $1,2 \text{ mm}$ groß und zu 100% abnorm waren. Die statistische Auswertung der Einzelwerte liegt in Tabelle 5 (S. 53) vor.

Foto 5: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Ab einer Konzentration von $8,73 \mu\text{M}$ waren deutliche Hämorrhagien im Bereich des Telenzephalons zu erkennen (Pfeile).

Foto 6: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol in der WEC



Legende:

Abbildungen der linken Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Ab einer Konzentration von $8,73 \mu\text{M}$ waren deutliche Hämorrhagien im Bereich des Telenzephalons zu erkennen (Pfeile).

Tab. 5: Effekte verschiedener Konzentrationen von Retinol auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / $\mu\text{g/ml}$	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW \pm SD	Score MW \pm SD	Somitenzahl MW \pm SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW \pm SD	Proteingehalt ($\mu\text{g/Embryo}$) MW \pm SD
0 (Kontrolle)	4	3,0 \pm 0,0	37,0 \pm 0,82	25,5 \pm 1,0	0 / 4	3,18 \pm 1,45	144,8 \pm 26,28
3,49 / 1,0	7	3,0 \pm 0,0	32,3 \pm 5,34	23,3 \pm 2,16	3 / 7	2,86 \pm 0,25	125,8 \pm 31,45
8,73 / 2,5	4	1,5 \pm 0,58**	21,5 \pm 0,58*	n. d.	4 / 4**	2,79 \pm 0,19	104,3 \pm 15,06
17,46 / 5,0	7	1,43 \pm 0,54**	21,0 \pm 4,0**	19,0 \pm 1,41	7 / 7**	2,67 \pm 0,40	120,8 \pm 47,84
34,9 / 10,0	7	1,0 \pm 0,0**	18,3 \pm 2,87**	n. d.	7 / 7**	1,89 \pm 0,48**	77,2 \pm 26,6

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW \pm SD = Mittelwert \pm Standardabweichung

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

4.2.2.2 All-trans-Retinsäure

Aufgrund seiner hohen Embryotoxizität wurde der Metabolit des Retinols nur in einem niedrigen Konzentrationsbereich von 0,42 bis 3,33 μM (0,125 bis 1 $\mu\text{g/ml}$) untersucht.

Die SSL wies in der Lösungsmittelkontrolle einen Wert von $2,94 \pm 0,23$ mm (MW \pm SD) auf. Bereits mit der niedrigsten Konzentration begann die Tendenz zur Abnahme. Ab einer Konzentration von 1,66 μM war der Rückgang deutlich ($p < 0,05$) mit nur noch $2,09 \pm 0,57$ mm (MW \pm SD). Bei der höchsten Konzentration von 3,33 μM (1,0 $\mu\text{g/ml}$) lag die SSL mit $1,91 \pm 0,43$ mm (MW \pm SD) auffällig unterhalb der der Lösungsmittelkontrolle. Der Proteingehalt sank in der statistischen Auswertung hingegen geringer im Vergleich zur SSL. Bei einem Kontrollmittelwert von $112,4 \pm 30,8$ μg (MW \pm SD) zeigte sich eine kontinuierliche Verringerung bis zur Konzentration von 1,66 μM (0,5 $\mu\text{g/ml}$) auf $76,1 \pm 24,5$ μg (MW \pm SD).

An der Dottersackdurchblutung war schon ab der niedrigsten Konzentration ein Rückgang ($p < 0,05$) von $3,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) der Lösungsmittelkontrolle auf 2,29 (MW \pm SD 0,76) Punkte zu verzeichnen, d. h. die Gefäßzeichnung war vermindert. Ab 0,83 μM (0,25 $\mu\text{g/ml}$) war der Wert auf $1,75 \pm 0,89$ (MW \pm SD) Punkte gesunken und damit statistisch signifikant ($p < 0,01$) verändert. Die folgenden Konzentrationen (0,25, 0,5 und 1,0 $\mu\text{g/ml}$) zeigten nur noch abnorme Dottersackstrukturen: Es waren keine sichtbaren Gefäße mehr ausgebildet. Auch der Score verringerte sich mit ansteigenden Konzentrationen deutlich. Der Lösungsmittelkontrollwert betrug $32,25 \pm 4,2$ (MW \pm SD) Punkte. Statistische Signifikanzen ($p < 0,01$) waren allerdings erst ab 1,66 μM (0,5 $\mu\text{g/ml}$) zu beobachten. Dabei zeigten sich Veränderungen vor allem im Kopfbereich. Hier war bei drei von acht Embryonen der kraniale Neuroporus noch nicht geschlossen und damit die Kopfanlage als abnorm bewertet.

Ab der niedrigsten Konzentration (0,42 μM) war die Rotation der Embryonen nicht immer mit der Höchstzahl 5 zu bewerten. Eine Bewertung mit fünf Punkten setzte eine Berührung der Schwanzanlage mit den Gehirnbläschen voraus. Hier war eine Entwicklungsverzögerung durch Einwirkung der Substanz zu erkennen. Ab einer Konzentration von 0,83 μM (0,25 $\mu\text{g/ml}$) war eine geringere Ausbildung der vorderen und hinteren Gliedmaßen- und der Schwanzanlage zu beobachten. Bei 1,66 μM (0,5 $\mu\text{g/ml}$) lag eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) des Scores ($23,0 \pm 2,45$ MW \pm SD) bei einem Kontrollwert von $32,25 \pm 4,20$ (MW \pm SD) vor. Sechs von acht Embryonen wurden bei einer Konzentration von 1,66 μM als dysmorph eingestuft. Die Augenanlage war nicht vorhanden, ebenso waren die Gliedmaßenanlagen wenig ausgeprägt und wurden daher mit dem Wert 2 bewertet. Vereinzelt waren auch Hämorrhagien im Kopfbereich sichtbar (Foto 7 und 8 auf S. 55). Die Embryonen bei der höchsten Konzentration von 3,33 μM (1,0 $\mu\text{g/ml}$) waren alle abnorm, sie waren nicht gedreht, sondern in „Eichhörnchenhaltung“ und vom Kopf- bis zum Rumpfbereich deutlich entwicklungsverzögert. Augen- und teilweise Ohranlagen waren nicht ausgebildet, der Rumpf nach

Ergebnisse

dorsal geklappt und die Gliedmaßenanlagen kaum entwickelt. Eine Darstellung der Einzelergebnisse der Statistik findet sich in Tabelle 6 auf S. 56.

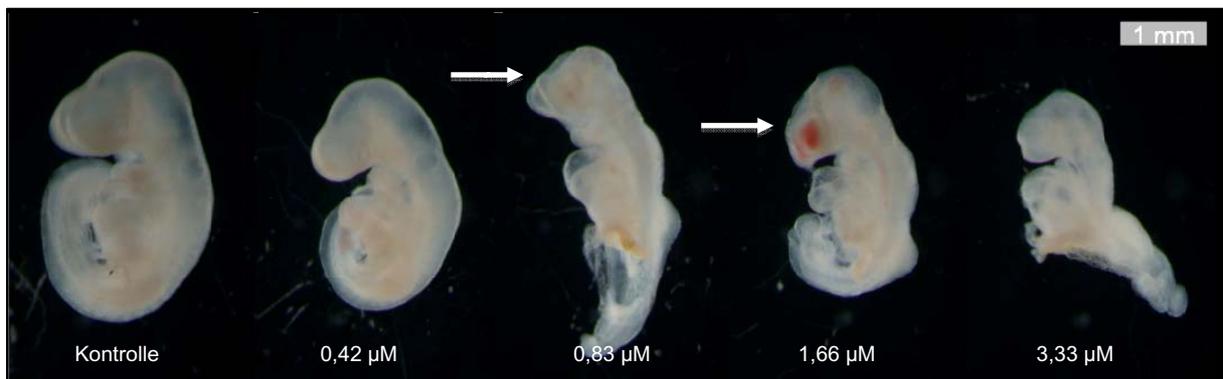
Foto 7: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von all-trans-Retinsäure in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Eine Abnahme der SSL war ab 0,42 µM feststellbar. Ab einer Konzentration von 0,83 µM waren die Embryonen unvollständig gedreht. Vereinzelt Hämorrhagien in der Telenzephalonregion zeigten sich bei 1,66 µM.

Foto 8: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von all-trans-Retinsäure in der WEC



Legende:

Abbildungen der linken Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Bei einer Konzentration von 0,83 µM war der kraniale Neuroporus nicht mehr geschlossen (Pfeile). Deutlich erkennbare Hämorrhagien im Bereich des Telenzephalons bei 1,66 µM (Pfeile).

Tab. 6: Effekte verschiedener Konzentrationen von all-trans-Retinsäure auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / μg/ml	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW ± SD	Score MW ± SD	Somitenzahl MW ± SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW ± SD	Proteingehalt (μg/Embryo) MW ± SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 ± 0,0	32,25 ± 4,2	23,13 ± 1,36	1 / 8	2,94 ± 0,23	112,4 ± 30,8
0,42 / 0,125	7	2,29 ± 0,76*	30,57 ± 5,5	23,43 ± 3,21	2 / 7	2,76 ± 0,44	115,2 ± 40,2
0,83 / 0,250	8	1,75 ± 0,89**	28,13 ± 4,09	23,6 ± 2,51	4 / 8	2,47 ± 0,58	92,8 ± 33,1
1,66 / 0,50	8	1,0 ± 0,0**	23,0 ± 2,45**	n.d.	6 / 8*	2,09 ± 0,57*	76,1 ± 24,5
3,33 / 1,00	6	1,0 ± 0,0**	21,17 ± 20,4**	n.d.	6 / 6**	1,91 ± 0,43**	77,1 ± 36,1

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von all-trans-Retinsäure. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung

* = p < 0,05

** = p < 0,01

N = Stichprobengröße

4.2.2.3 Retinol und all-trans-Retinsäure in der 80/20-Mischung

Der Mischungsversuch im Verhältnis 80/20 wurde in den Konzentrationen 0,41, 0,83, 4,1 und 8,3 μM durchgeführt. Die zu testenden Konzentrationen orientierten sich an dem weitaus toxischeren Metaboliten. Dabei wurde in der ersten Konzentration eine Mischung aus 0,3 μM Retinol und 0,11 μM all-trans-Retinsäure verwendet.

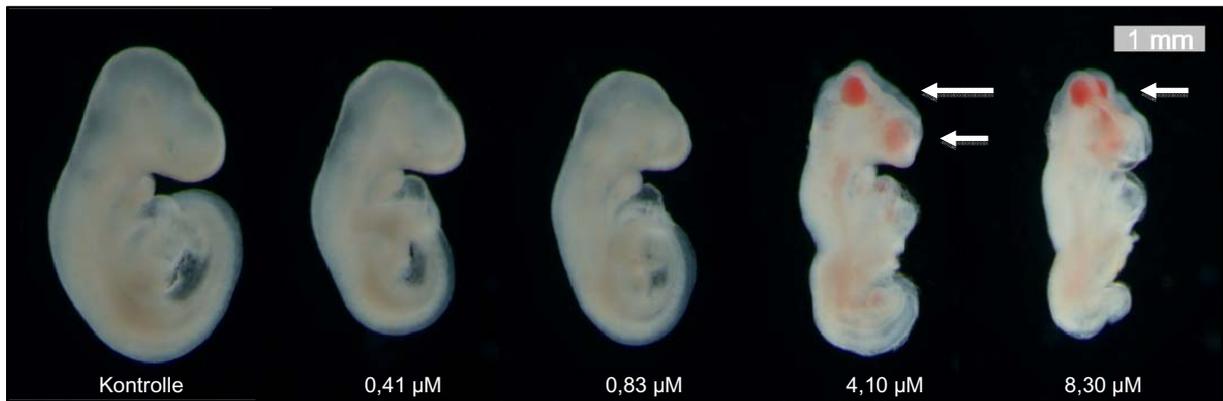
Die SSL betrug in der Kontrolle $3,11 \pm 0,26$ mm (MW \pm SD). Ab der dritten Konzentration (4,1 μM) zeigte sich mit $1,95 \pm 0,72$ mm (MW \pm SD) ein statistisch signifikanter Rückgang ($p < 0,05$), ebenso der vierte Ansatz ($p < 0,01$) mit einer SSL von nur noch $1,90 \pm 0,56$ mm (MW \pm SD). Der zweite Wachstumsparameter Proteingehalt der Embryonen wies ebenfalls eine stetige Abnahme seines Wertes auf: von $170 \pm 48,37$ μg (MW \pm SD) in der Kontrolle auf einen Wert von $77,3 \pm 21,74$ μg (MW \pm SD) in der höchsten Konzentration (8,3 μM).

Auch die weiteren Punkte der Auswertung wie die Dottersackdurchblutung zeigten einen kontinuierlichen Rückgang mit steigenden Konzentrationen. Hier ließ sich bereits ab der niedrigsten Konzentration eine Abnahme der Gefäßausbildung ($2,60 \pm 0,89$ MW \pm SD) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle ($3,0$ MW \pm SD) feststellen. Dies wurde mit Werten von $1,14 \pm 0,38$ (MW \pm SD) und $1,13 \pm 0,35$ (MW \pm SD) in der dritten (4,1 μM) und vierten Konzentration (8,30 μM) als statistisch signifikant ($p < 0,01$) erkannt. Der Score zeigte ab der zweiten Konzentration (0,83 μM) signifikante Auffälligkeiten. Er betrug bei der Lösungsmittelkontrolle $37,4 \pm 1,30$ (MW \pm SD) Punkte und schwächte sich über $34,0 \pm 3,32$ (MW \pm SD) in der niedrigsten Konzentration über $30,9 \pm 6,01$ (MW \pm SD; $p < 0,05$), $19,0 \pm 1,73$ (MW \pm SD; $p < 0,01$) letztendlich auf $18,6 \pm 1,19$ Punkte (MW \pm SD; $p < 0,01$) ab. Die Abnormitätsrate lag in der zweiten Konzentration (0,83 μM) bei 25 %, ab 4,1 μM bei 100 % (IC_{MAX} : 4,1 μM). Als Fehlbildungen in der zweiten Konzentration waren vor allem offene kraniale Neuropori und eine unvollständige Drehung zu beobachten. Der dritte Ansatz zeigte durchgehend „Eichhörnchenhaltung“ und offene Neuropori (Foto 9 auf S. 58). Zudem war das Herz oft abnorm verändert, ebenso die Schwanzanlage. Die mit der vierten Konzentration (8,3 μM) behandelten Embryonen zeigten die vorab beschriebenen Fehlbildungen in gleichem bis noch stärkerem Maße. In Tabelle 7 (S. 59) sind die Ergebnisse im Überblick dargestellt.

Das Mischungsverhältnis zeigte im Vergleich zu den Einzelsubstanzen eine Linksverschiebung in der Konzentrationswirkungskurve in Richtung des Metaboliten all-trans-Retinsäure (Grafik Nr. 3 und 4 auf S. 63).

Ergebnisse

Foto 9: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol und all-trans-Retinsäure im Verhältnis 80/20 in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Eine Abnahme der SSL war ab 0,83 µM feststellbar. Hämorrhagien und nicht geschlossene kraniale Neuropori in der Telencephalonregion zeigten sich ab 4,10 µM (Pfeile).

Tab. 7: Effekte verschiedener Konzentrationen von Retinol und all-trans-Retinsäure in der 80/20-Mischung auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / $\mu\text{g/ml}$	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW \pm SD	Score MW \pm SD	Somitenzahl MW \pm SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW \pm SD	Proteingehalt ($\mu\text{g/Embryo}$) MW \pm SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 \pm 0,0	37,4 \pm 1,30	25,3 \pm 1,16	0 / 8	3,11 \pm 0,26	170,0 \pm 48,37
0,41 / 0,025	5	2,6 \pm 0,89	34,0 \pm 3,32	25,4 \pm 2,70	0 / 5	3,13 \pm 0,24	157,9 \pm 61,28
0,83 / 0,05	8	2,5 \pm 0,54	30,9 \pm 6,01*	24,4 \pm 2,70 (N = 5)	2 / 8	2,89 \pm 0,39	141,0 \pm 51,5
4,1 / 0,25	7	1,14 \pm 0,38**	19,0 \pm 1,73**	n.d.	7 / 7**	1,95 \pm 0,72*	91,1 \pm 54,82
8,3 / 0,5	8	1,13 \pm 0,35**	18,6 \pm 1,19**	n.d.	8 / 8**	1,9 \pm 0,56**	77,3 \pm 21,74**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol und all-trans-Retinsäure in der 80/20-Mischung. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW \pm SD = Mittelwert \pm Standardabweichung

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

N = Stichprobengröße

4.2.2.4 Retinol und all-trans-Retinsäure in der 50/50-Mischung

Die Versuchsreihe der 50/50-Mischung umfasste den Konzentrationsbereich von 0,33, 1,66 und 3,33 μM all-trans-Retinsäure. Dabei wurden für die erste Konzentration eine Mischung von 0,17 μM beider Substanzen verwendet.

Die SSL wurde in der Lösungsmittelkontrolle mit $2,96 \pm 0,25$ mm (MW \pm SD) angegeben. Eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) der SSL war erst bei der höchsten Konzentration mit 3,3 μM bei $1,74 \pm 0,43$ mm (MW \pm SD) zu erkennen, jedoch war auch hier eine Abnahme des Wertes in den Versuchsansätzen zuvor zu sehen. Der Proteingehalt wies ebenfalls erst ab der höchsten Konzentration einen signifikant ($p < 0,01$) veränderten Wert mit $66,9 \pm 24,99$ μg (MW \pm SD) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit $126,4 \pm 23,41$ μg (MW \pm SD) auf. In den Versuchsansätzen mit geringerer Konzentration war eine kontinuierliche Abnahme des Proteingehalts zu verzeichnen.

Die Dottersackdurchblutung nahm ab der niedrigsten Konzentration statistisch signifikant ab ($2,38 \pm 0,52$ MW \pm SD zur Kontrolle mit $3,0 \pm 0,0$ MW \pm SD) und stagnierte in der höchsten Konzentration (3,33 μM) bei $1,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD). Ab dem ersten Ansatz mit der Substanzmischung waren 50 % der eingesetzten Embryonen abnorm, ab dem zweiten Ansatz (1,66 μM) betrug die Abnormitätsrate dann 100 % (IC_{MAX} : 1,66 μM). Der Score zeigte in der Kontrolle einen Wert von $36,2 \pm 1,17$ (MW \pm SD). Bereits im Ansatz mit der niedrigsten Konzentration von 0,33 μM war der Scorewert mit $29,3 \pm 5,18$ (MW \pm SD) Punkten statistisch signifikant ($p < 0,05$) zurückgegangen. In den folgenden Ansätzen sank der Score noch weiter. Die beiden höchsten Konzentrationen verursachten deutliche Veränderungen. Im ersten Ansatz (0,33 μM) wurde vor allem eine unvollständige Drehung bzw. noch offene Neuropori festgestellt. Einige Embryonen zeigten hier bereits eine „Eichhörnchenhaltung“. Dies setzte sich auch in der zweiten Konzentration (1,66 μM) fort. Zusätzlich zeigten alle Embryonen einen offenen kranialen Neuroporus, teilweise mit Hämorrhagien im Bereich des Telenzephalons. Die hinteren Gliedmaßenanlagen waren kaum noch ausgebildet, ebenso die Schwanzanlage. Gleiches war in den nachfolgenden Versuchsansätzen zu erkennen, wo jedoch noch die Abnormalität der Herzentwicklung dazu kam. Die Tabelle 8 (S. 62) zeigt die Ergebnisse im Einzelnen.

In der 50/50-Mischung zeigte sich eine starke Linksverschiebung im Vergleich zur Konzentrationswirkungskurve der Einzelsubstanzergebnisse (siehe Grafik Nr. 3 und 4 auf S. 63).

Ergebnisse

Foto 10: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol und all-trans-Retinsäure im Verhältnis 50/50 in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Hämorrhagien in der Telenzephalonregion zeigten sich ab 1,66 µM: Die Ausprägung des Telenzephalons war nicht mehr physiologisch (Pfeile). Die SSL verringerte sich ab 0,33 µM stetig.

Tab. 8: Effekte verschiedener Konzentrationen von Retinol und all-trans-Retinsäure in der 50/50-Mischung auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / μg/ml	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW ± SD	Score MW ± SD	Somitenzahl MW ± SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW ± SD	Proteingehalt (μg/Embryo) MW ± SD
0 (Kontrolle)	6	3,0 ± 0,0	36,2 ± 1,17	24,4 ± 0,92	0 / 6	2,96 ± 0,25	126,4 ± 23,41
0,33 / 0,1	8	2,38 ± 0,52*	29,3 ± 5,18*	23,8 ± 0,96	4 / 8	2,81 ± 0,29	113,7 ± 32,49
1,66 / 0,5	8	1,38 ± 0,52**	20,3 ± 3,45**	n. d.	8 / 8**	2,39 ± 0,48	103,0 ± 38,29
3,33 / 1,0	8	1,0 ± 0,0**	17,4 ± 2,07**	n. d.	8 / 8**	1,74 ± 0,43**	66,9 ± 24,99**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol und all-trans-Retinsäure in der 50/50-Mischung. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung

* = p < 0,05

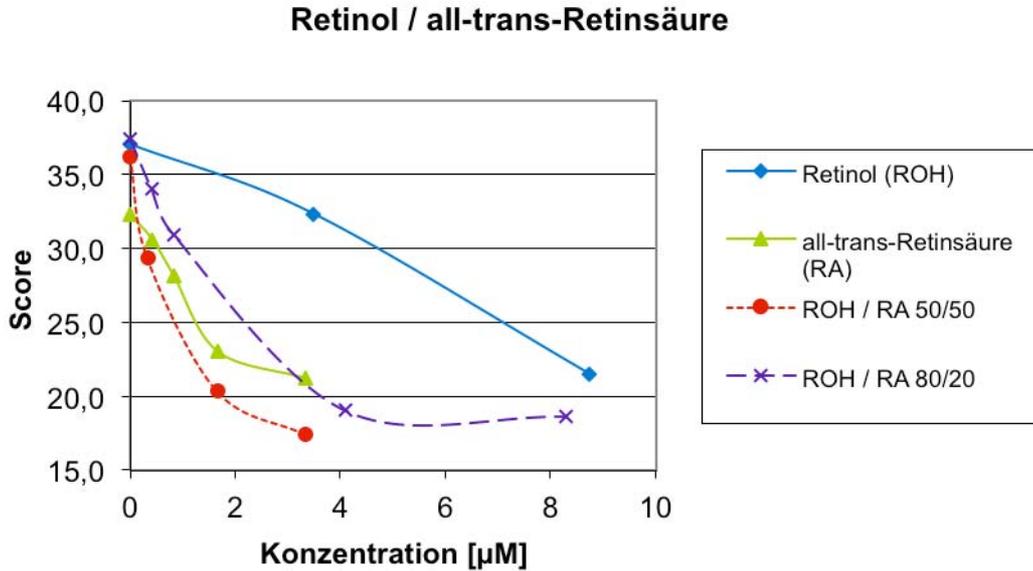
** = p < 0,01

N = Stichprobengröße

Ergebnisse

Grafik 3: Score in Beziehung zur Konzentration (μM)

All-trans-Retinsäure verursachte ab der ersten Konzentration eine steile Abnahme des Scorewertes. Die 50/50-Mischung erwies sich im Versuch als potenteste Mischung, doch schon die 80/20-Mischung zeigte eine Linksverschiebung im Vergleich zum Metabolit.

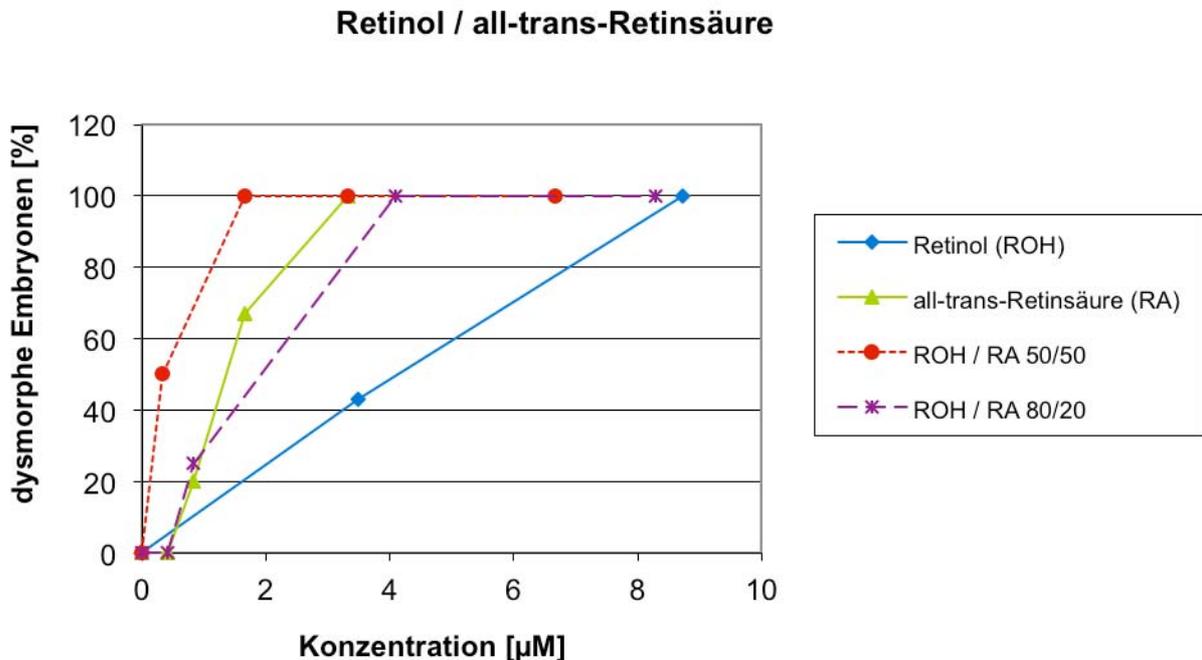


Legende:

Die Darstellung zeigt die Veränderung des Scores von Ausgangssubstanz, Metabolit und der 80/20- und 50/50-Mischung in Abhängigkeit von der Konzentration [μM]. Die verschiedenfarbigen Symbole stehen für die jeweiligen Mittelwerte, die Linien dazwischen sind grafische Hilfsmittel. Auf der X-Achse ist die Konzentration in [μM] aufgetragen, die Y-Achse stellt die Scorewerte dar.

Grafik 4: Dysmorphie Embryonen in Beziehung zur Konzentration (μM)

Auch in der Dysmorphogenese war die 50/50-Mischung das stärkste Teratogen, gefolgt vom Metabolit all-trans-Retinsäure. Die 80/20-Mischung lag in der Dysmorphogenese zwischen Ausgangssubstanz und Metabolit.



Legende:

Die Darstellung zeigt die Veränderung der Dysmorphogenese der Embryonen nach 48-stündiger Inkubation mit der Ausgangssubstanz, dem Metabolit bzw. in der 80/20- und 50/50-Mischung in Abhängigkeit von der Konzentration [μM]. Die verschiedenfarbigen Symbole stehen für die jeweiligen Mittelwerte, die Linien dazwischen sind grafische Hilfsmittel. Auf der X-Achse ist die Konzentration in [μM] aufgetragen, die Y-Achse stellt die Scorewerte dar.

4.2.3 Ergebnisse der Untersuchung von Valpromid und Valproinsäure und deren Mischungen

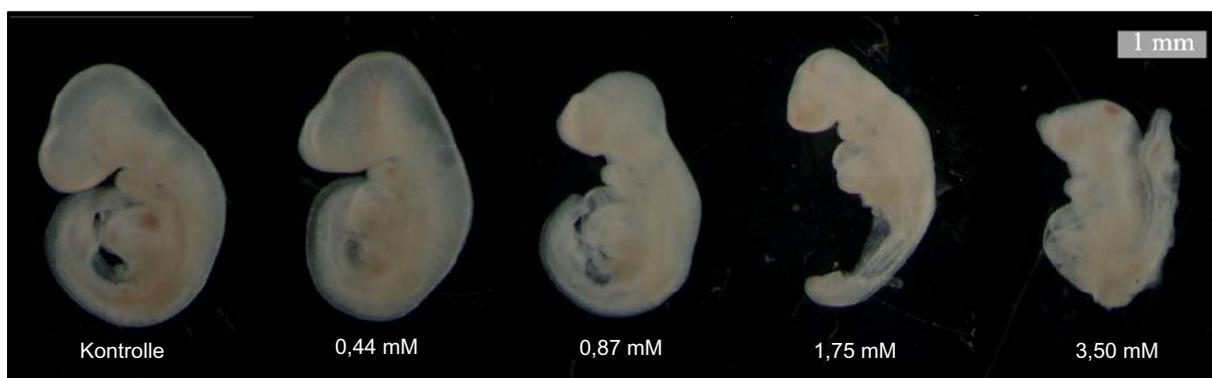
4.2.3.1 Valpromid

Valpromid wurde in Konzentrationen zwischen 0,44 mM (62,5 µg/ml) und 3,5 mM (500 µg/ml) getestet. Höhere Konzentrationen konnten wegen schlechter Löslichkeit der Substanz nicht untersucht werden, da das Lösungsmittel DMSO in der WEC nur bis 0,1 % eingesetzt werden kann.

Die Kontrollembryonen zeigten eine Größe von $2,97 \pm 0,39$ mm (MW \pm SD) SSL, die sich mit der niedrigsten Konzentration leicht auf $2,81 \pm 0,32$ mm (MW \pm SD) verringerte. Eine statistisch signifikante ($p < 0,01$) Abnahme war ab 1,75 mM (250 µg/ml) auf $2,33 \pm 0,36$ mm (MW \pm SD) zu erkennen. Der zweite Wachstumsparameter, der Proteingehalt, betrug in der Lösungsmittelkontrolle $140,3 \pm 37,62$ µg (MW \pm SD) und sank kontinuierlich mit Zunahme der Wirkstoffkonzentration. Eine erste statistische Signifikanz ($p < 0,01$) trat bei 0,87 mM (125 µg/ml) mit einem Wert von $90,0 \pm 22,35$ µg (MW \pm SD) auf. Bei 3,5 mM (500 µg/ml) lag der Proteingehalt nur noch bei $77,1 \pm 6,2$ µg (MW \pm SD; $p < 0,01$).

Die Dottersackdurchblutung verringerte sich schon ab 62,5 µg/ml auf $2,62 \pm 0,52$ (MW \pm SD) Punkte im Vergleich zum Kontrollwert ($3,0 \pm 0,0$ MW \pm SD) geringgradig. Eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) stellte sich ab 1,75 mM (250 µg/ml) ein. Hier zeigte sich eine Abnahme auf $1,86 \pm 0,69$ (MW \pm SD) und in der höchsten Konzentration auf $1,4 \pm 0,55$ (MW \pm SD) Punkte. Der Score lag in der Kontrolle im Mittel bei $36,3 \pm 2,14$ (MW \pm SD) Punkten und nahm mit steigender Konzentration bis auf $25,0 \pm 3,46$ (MW \pm SD) Punkte in der höchsten Konzentration ($p < 0,01$) ab. Bei einer Konzentration von 0,44 mM (62,5 µg/ml) waren drei der acht kultivierten Embryonen dysmorph, bei 1,75 mM waren es drei von sieben Embryonen und bei der höchsten eingesetzten Konzentration vier von fünf Embryonen.

Foto 11: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Valpromid in der WEC



Legende:

Abbildungen der linken Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Hämorrhagien im Kopfbereich waren ab 1,75 mM zu erkennen, eine unvollständige Rotation ab 0,87 mM Valpromid.

Tab. 9: Effekte verschiedener Konzentrationen von Valpromid auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration mM / µg/ml	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW ± SD	Score MW ± SD	Somitenzahl MW ± SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW ± SD	Proteingehalt (µg/Embryo) MW ± SD
0 (Kontrolle)	7	3,0 ± 0,0	36,3 ± 2,14	25,4 ± 2,07	0 / 7	2,97 ± 0,39	140,3 ± 37,62
0,44 / 62,5	8	2,62 ± 0,52	32,1 ± 4,91	24,7 ± 1,60	3 / 8	2,81 ± 0,32	112,6 ± 33,35
0,87 / 125	8	2,75 ± 0,46	32,5 ± 3,96*	24,9 ± 1,22	0 / 8	2,84 ± 0,31	90,0 ± 22,35**
1,75 / 250	7	1,86 ± 0,69**	27,1 ± 5,52**	25,0 ± 1,41	3 / 7	2,33 ± 0,36**	101,9 ± 26,05*
3,5 / 500	5	1,40 ± 0,55**	25,0 ± 3,46**	23,0 ± 0,0 (N=1)	4 / 5*	2,44 ± 0,18*	77,1 ± 6,20**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Valpromid. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung.

MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung

* = p < 0,05

** = p < 0,01

N = Stichprobengröße

4.2.3.2 Valproinsäure

Valproinsäure wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,3 bis 1,2 mM (50 bis 200 µg/ml) untersucht.

Die SSL lag in der Lösungsmittelkontrolle bei $3,04 \pm 0,17$ mm (MW \pm SD). Sie verringerte sich mit ansteigender Konzentration zunehmend. Eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) ließ sich aber erst ab 0,9 mM (150 µg/ml) mit $2,53 \pm 0,26$ mm (MW \pm SD) im Vergleich zum Kontrollwert feststellen. Ab 1,2 mM lag die SSL bei statistisch signifikanten ($p < 0,05$) $2,32 \pm 0,39$ mm (MW \pm SD). Der Proteingehalt zeigte eine erste signifikante ($p < 0,05$) Abweichung zum Wert der Lösungsmittelkontrolle ($138,4 \pm 17,6$ µg MW \pm SD) ab der dritten Konzentration (0,9 mM): $161,9 \pm 13,1$ µg MW \pm SD Proteingehalt. Danach sank er statistisch signifikant ($p < 0,05$) auf $102,6 \pm 19,4$ µg (MW \pm SD) bei 0,9 mM (150 µg/ml) und $89,0 \pm 18,7$ µg (MW \pm SD; $p < 0,01$) bei 1,2 mM (200 µg/ml) ab.

In den ersten zwei Konzentrationen, 0,3 und 0,6 mM (50 und 100 µg/ml), entsprach die Dottersackdurchblutung der Kontrolle ($3,0 \pm 0,0$ MW \pm SD). Erst ab 0,9 mM (150 µg/ml) zeigte sich eine statistisch signifikante ($p < 0,01$) Abnahme auf $1,14 \pm 0,38$ (MW \pm SD) Punkte. In der höchsten Konzentration (1,2 mM) lag der Wert der Dottersackdurchblutung bei nur noch $1,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD). Ähnliches war auch bei der Entwicklung des Scores zu beobachten. Dieser lag in der Lösungsmittelkontrolle noch bei $37,5 \pm 0,93$ (MW \pm SD) Punkten und nahm dann erst geringfügig ($36,6 \pm 1,30$ MW \pm SD und $35,2 \pm 2,71$ MW \pm SD) und ab der dritten Konzentration stark ab ($29,3 \pm 5,28$ MW \pm SD und $21,5 \pm 2,43$ MW \pm SD; $p < 0,01$). Hier waren drei von sieben Embryonen abnorm.

Die Tabelle 10 (S. 68) stellt die Einzelergebnisse dar. Vor allem die Haltung und der Kopfbereich waren fehlgebildet. Die Embryonen waren nicht mehr gedreht, die Somiten waren teilweise verformt, im Kopfbereich war das Telenzephalon noch nicht richtig ausgebildet. In der höchsten Konzentration waren alle Embryonen abnorm. Ab einer Konzentration von 0,9 mM (150 µg/ml) zeigten die Embryonen Hämorrhagien im Telenzephalon und „Blutbildung“ in der Herzanlage¹ (Foto 12 auf S. 67). Die IC_{MAX} lag bei 1,2 mM (200 µg/ml). Die Anzahl der Somiten war nicht mehr bestimmbar, die Embryonen waren nicht gedreht, sondern zeigten „Eichhörnchenhaltung“. Das Neuralrohr erschien teilweise als „geschlängelte“ Linie, die Neuropori waren kranial und kaudal nicht geschlossen und somit abnorm.

¹ Unter Blutbildung wurde die mikroskopisch erkennbare Ansammlung von roten Vorläuferblutzellen in der Herzanlage bezeichnet.

Ergebnisse

Foto 12: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Valproinsäure in der WEC



Legende:

Abbildungen der linken Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: „Blutbildung“ in der Herzschleife und Hämorrhagien im Kopfbereich fanden sich ab 0,90 mM (Pfeile).

Tab. 10: Effekte verschiedener Konzentrationen von Valproinsäure auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration mM / µg/ml	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW ± SD	Score MW ± SD	Somitenzahl MW ± SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW ± SD	Proteingehalt (µg/Embryo) MW ± SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 ± 0,0	37,5 ± 0,93	25,1 ± 1,07 (N=7)	0 / 8	3,04 ± 0,17	138,4 ± 17,6
0,3 / 50	8	3,0 ± 0,0	36,6 ± 1,30	25,5 ± 0,54	0 / 8	3,07 ± 0,3	147,4 ± 30,1
0,6 / 100	6	3,0 ± 0,0	35,2 ± 2,71*	24,6 ± 0,55 (N=5)	0 / 6	3,09 ± 0,06	161,9 ± 13,1
0,9 / 150	7	1,14 ± 0,38**	29,3 ± 5,28**	21,3 ± 1,53** (N=3)	3 / 7	2,53 ± 0,26*	102,6 ± 19,4*
1,2 / 200	7	1,0 ± 0,0**	21,5 ± 2,43** (N=6)	n.d.	6 / 7**	2,32 ± 0,39*	89,0 ± 18,7**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Valproinsäure. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung

* = p < 0,05

** = p < 0,01

N = Stichprobengröße

4.2.3.3 Valpromid und Valproinsäure in der 80/20-Mischung

Für den Mischungsversuch wurden fünf Konzentrationen von 0,375 bis 6,0 mM angesetzt. Dabei betrug in der ersten Konzentration (0,375 mM) der Anteil an Valpromid 0,3 mM und an Valproinsäure 0,075 mM.

Die SSL wies in der Lösungsmittelkontrolle $3,11 \pm 0,30$ mm (MW \pm SD) auf und zeigte eine stetige Abnahme mit Anstieg der Konzentrationen. Ab der vierten Konzentration (3,0 mM) zeigte sich erstmals eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) mit $2,16 \pm 0,48$ mm (MW \pm SD). In der höchsten Konzentration (6,0 mM bzw. 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) lag der Wert bei $1,23 \pm 0,06$ mm (MW \pm SD; $p < 0,01$). Der andere Wachstumsparameter, der Proteingehalt, lag in der Lösungsmittelkontrolle bei $160,7 \pm 27,03$ μg (MW \pm SD). Statistische Signifikanzen ($p < 0,01$) waren in der Auswertung ab der vierten Konzentration (3 mM bzw. 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zu sehen. Hier betrug der Proteingehalt $84,6 \pm 24,71$ μg (MW \pm SD), in der höchsten Konzentration nur noch $26,5 \pm 11,07$ μg (MW \pm SD).

Veränderungen an der Dottersackdurchblutung ließen sich ab einer Konzentration von 0,75 mM (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) feststellen. Hier war der Kontrollwert von $3,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) auf $2,75 \pm 0,71$ (MW \pm SD) Punkte verringert. Bei 3 und 6 mM wies die Dottersackdurchblutung nur noch Werte von $1,57 \pm 0,54$ (MW \pm SD) und $1,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) Punkte auf. Der Score lag in der Kontrolle bei $35,6 \pm 2,2$ (MW \pm SD) Punkten und nahm mit steigenden Konzentrationen stetig ab. Auch hier war ab der dritten Konzentration (1,5 mM) eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) erkennbar.

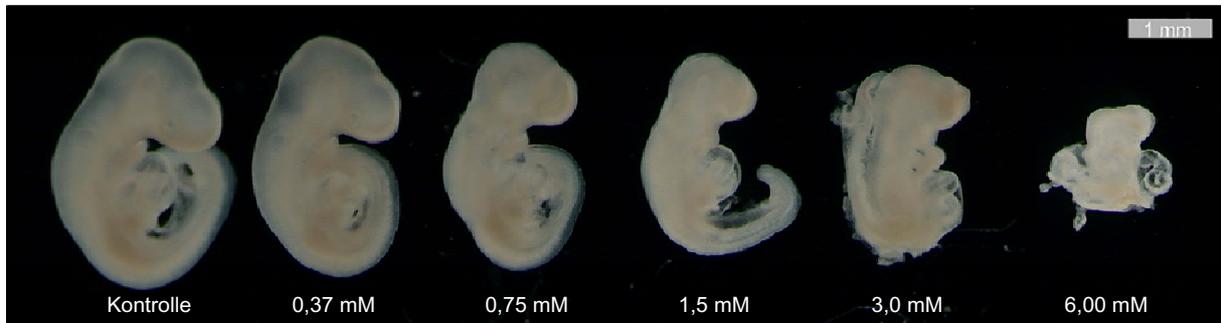
Die genauen Ergebnisse sind in der Tabelle 11 auf S. 71 dargestellt. Bei einer Konzentration von 0,75 mM waren drei von acht Embryonen dysmorph. Bei 1,5 mM waren sechs von acht Embryonen abnorm, bei 6 mM lag die Abnormitätsrate bei 100 % (IC_{MAX} : 3 mM). Veränderungen traten ab der zweiten Konzentration (0,75 mM) im Kopfbereich auf – hier zeigten sich offene kraniale Neuropori und nicht ausgebildete Ohr- und Augenanlagen. Die Embryonen waren nicht mehr vollständig gedreht. Ab der dritten Konzentration war vor allem die „Eichhörnhaltung“ bei der Mehrzahl der Embryonen zu sehen. Deutlich reduzierte Entwicklung zeigten die Embryonen ab 3,0 mM. Hier waren „Eichhörnhaltung“, offene kraniale Neuropori und ein entwicklungsverzögerter Rumpf festzustellen (Foto 13 auf S. 70). Die höchste Konzentration (6,0 mM) bestätigte die vorher beschriebenen Ergebnisse; die Embryonen waren wesentlich kleiner und ebenfalls in allen Organ- und Gliedmaßenanlagen deutlich unterentwickelt.

Das Mischungsverhältnis 80/20 zeigt in der Grafik 5 (S. 75) eine Linksverschiebung der Konzentrationswirkungskurve gegenüber der Ausgangssubstanz Valpromid. Bei der grafischen

Ergebnisse

Darstellung des Scores (Grafik 6 auf S. 75) liegt die Kurve der Mischung mittig zwischen Ausgangssubstanz und Metabolit.

Foto 13: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Valpromid und Valproinsäure 80/20 in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Die bei 1,5 mM kultivierten Embryonen waren nur noch unvollständig gedreht. Bei Konzentrationen von 3,0 und 6,00 mM waren alle untersuchten Embryonen abnorm.

Tab. 11: Effekte verschiedener Konzentrationen von Valpromid und Valproinsäure in der 80/20-Mischung auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration mM / µg/ml	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW ± SD	Score MW ± SD	Somitenzahl MW ± SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW ± SD	Proteingehalt (µg/Embryo) MW ± SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 ± 0,0	35,6 ± 2,2	25,3 ± 0,76	0 / 8	3,11 ± 0,30	160,7 ± 27,03
0,37 / 50	7	3,0 ± 0,0	35,4 ± 1,62	25,0 ± 0,63	0 / 7	3,03 ± 0,16	139,8 ± 16,99
0,75 / 100	8	2,75 ± 0,71	30,9 ± 7,47	24,5 ± 0,84	3 / 8	2,80 ± 0,46	113,2 ± 38,98
1,5 / 200	8	2,0 ± 0,0**	25,3 ± 4,53**	23,7 ± 0,58	6 / 8**	2,62 ± 0,36	113,1 ± 31,92
3,0 / 400	7	1,57 ± 0,54**	20,7 ± 0,95**	n.d.	7 / 7**	2,16 ± 0,48*	84,6 ± 24,71**
6,0 / 800	8	1,0 ± 0,0**	18,0 ± 0,0**	n.d.	8 / 8**	1,23 ± 0,06**	26,5 ± 11,07**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Valpromid und Valproinsäure in der 80/20-Mischung. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung

* = p < 0,05

** = p < 0,01

N = Stichprobengröße

4.2.3.4 Valpromid und Valproinsäure in der 50/50-Mischung

Hier wurde im Konzentrationsbereich von 0,3 bis 2,4 mM getestet. Beide Substanzen wurden zu gleichen Teilen in der Mischung verwendet.

Die SSL der Lösungsmittelkontrolle lag bei $3,20 \pm 0,18$ mm (MW \pm SD). Im Vergleich dazu zeigte sich ab der zweiten Konzentration (0,6 mM) eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) mit $2,43 \pm 0,22$ mm (MW \pm SD). In der höchsten Konzentration (2,4 mM) lag diese Signifikanz ($p < 0,01$) bei einem Wert von $2,24 \pm 0,40$ mm (MW \pm SD) ebenfalls vor. Der Proteingehalt betrug in der Kontrolle $166,4 \pm 26,18$ μ g (MW \pm SD). Auch hier war ab einer Konzentration von 0,6 mM (100 μ g/ml) eine statistisch signifikante ($p < 0,01$) Abnahme zur Kontrolle mit $102,9 \pm 18,99$ μ g (MW \pm SD) zu erkennen. Bei 2,4 mM (400 μ g/ml) lag der Proteingehalt bei $84,4 \pm 16,43$ μ g (MW \pm SD; $p < 0,01$).

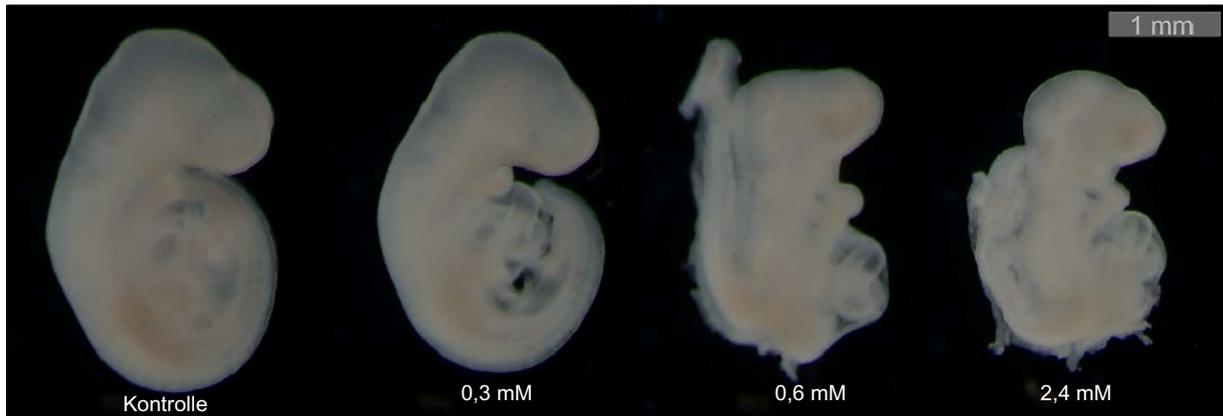
Eine erste statistische Signifikanz in der Reduzierung der Entwicklung der Dottersackdurchblutung zeigte sich bei einer Konzentration von 0,6 mM. Hier lag der Wert nur noch bei $2,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) im Vergleich zur Kontrolle $3,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD). Ab 2,4 mM war dieser Parameter bei allen Embryonen verändert. Der Scorewert lag bei $37,0 \pm 1,31$ (MW \pm SD) in der Lösungsmittelkontrolle. Ab der zweiten Konzentration war eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) mit $22,8 \pm 1,89$ Punkten (MW \pm SD) zu beobachten. Die höchste Konzentration (2,4 mM) ergab nur noch $19,5 \pm 1,51$ Punkte (MW \pm SD).

Ab dem zweiten Versuchsansatz (0,6 mM) waren alle vier untersuchten Embryonen abnorm (IC_{MAX} : 2,4 mM). Dabei waren die Haltung und der Kopfbereich durchgehend mit dem Wert 1 zu bewerten (Foto 14 auf S. 73). Alle Embryonen zeigten eine „Eichhörnchenhaltung“ und einen offenen kranialen Neuroporus, die Augenanlage war nicht mehr angelegt. In der höchsten Konzentration war bei zwei Embryonen ein „geschlängelt“ wirkendes Neuralrohr zu erkennen. Die Oberfläche der Embryonen wirkte uneben. Gliedmaßen- und Schwanzanlagen waren geringgradig ausgebildet.

Alle Einzelergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 12 (S. 74) abgebildet. In der Konzentration-Effekt-Beziehung zeigte die Mischung eine deutliche Linksverschiebung im Vergleich zu den Grafen der Ausgangssubstanz, Metabolit und 80/20-Mischung (Grafik Nr. 5 und 6 auf S. 75).

Ergebnisse

Foto 14: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Valpromid und Valproinsäure im Verhältnis 50/50 in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Ab einer Konzentration von 0,6 mM waren alle Embryonen dysmorph, während eine Konzentration von 0,3 mM kaum Veränderungen hervorrief.

Tab. 12: Effekte verschiedener Konzentrationen von Valpromid und Valproinsäure in der 50/50-Mischung auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration mM / µg/ml	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW ± SD	Score MW ± SD	Somitenzahl MW ± SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW ± SD	Proteingehalt (µg/Embryo) MW ± SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 ± 0,0	37,0 ± 1,31	25,6 ± 0,74	0 / 8	3,20 ± 0,18	166,4 ± 26,18
0,3 / 50	4	3,0 ± 0,0	36,8 ± 0,96	24,8 ± 0,5	0 / 4	3,03 ± 0,20	149,9 ± 35,84
0,6 / 100	4	2,0 ± 0,0**	22,8 ± 1,89**	n.d.	4 / 4**	2,43 ± 0,22**	102,9 ± 18,99**
2,4 / 400	8	1,0 ± 0,0**	19,5 ± 1,51**	n.d.	8 / 8**	2,24 ± 0,40**	84,4 ± 16,43**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Valpromid und Valproinsäure in der 50/50-Mischung. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung

* = p < 0,05

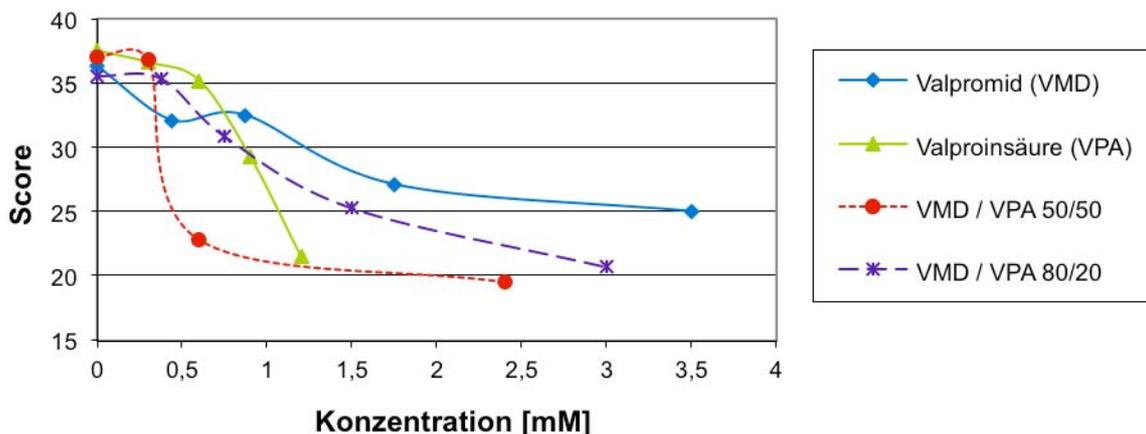
** = p < 0,01

Ergebnisse

Grafik 5: Score in Beziehung zur Konzentration (mM)

Während bei Valpromid nur eine geringgradige Abnahme des Scores zu verzeichnen war, ist bei seinem Metabolit Valproinsäure ein deutlicher Rückgang ab der niedrigsten Konzentration zu erkennen. Die 80/50-Mischung wies erwartungsgemäß eine Linksverschiebung zur Ausgangssubstanz auf, während die 50/50-Mischung sich noch deutlich stärker auf die Abnahme des Scores auswirkte.

Valpromid / Valproinsäure



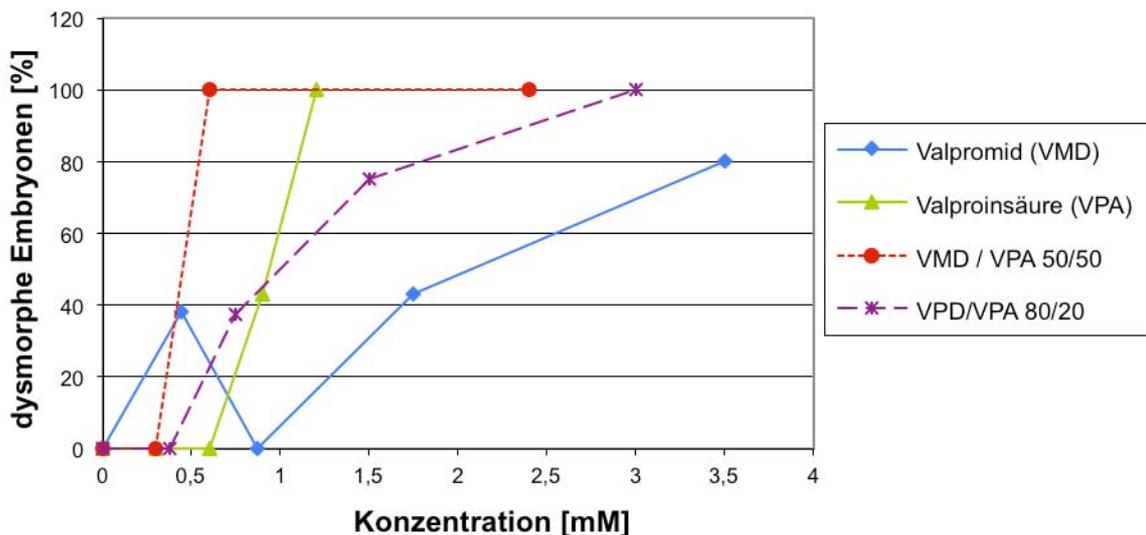
Legende:

Die Darstellung zeigt die Veränderung des Scores von Ausgangssubstanz, Metabolit und der 80/20- und 50/50-Mischung in Abhängigkeit von der Konzentration [mM]. Die verschiedenfarbigen Symbole stehen für die jeweiligen Mittelwerte, die Linien dazwischen sind grafische Hilfsmittel. Auf der X-Achse ist die Konzentration in [mM] aufgetragen, die Y-Achse stellt die Scorewerte dar.

Grafik 6: Dysmorphie Embryonen in Beziehung zur Konzentration (mM)

Bei Valpromid konnte keine 100-prozentige Dysmorphogenese der Embryonen erreicht werden. Eine Linksverschiebung war bei Valproinsäure allein und, noch deutlicher, bei den 80/20- und 50/50-Mischungen zu erkennen.

Valpromid / Valproinsäure



Legende:

Die Darstellung zeigt die Veränderung der Dysmorphogenese der Embryonen nach 48-stündiger Inkubation mit der Ausgangssubstanz, dem Metabolit bzw. in der 80/20- und 50/50-Mischung in Abhängigkeit von der Konzentration [µM]. Die verschiedenfarbigen Symbole stehen für die jeweiligen Mittelwerte, die Linien dazwischen sind grafische Hilfsmittel. Auf der X-Achse ist die Konzentration in [mM] aufgetragen, die Y-Achse stellt die Scorewerte dar.

4.2.4 Ergebnisse der Untersuchung von Albendazol und Albendazolsulfoxid und deren Mischungen

4.2.4.1 Albendazol

Albendazol wurde in fünf Konzentrationen von 0,04 bis 3,7 μM (0,01 bis 1,0 $\mu\text{g/ml}$) getestet. Es gingen mehrere Konzentrationsfindungsversuche voran. Albendazol scheint eine Interaktion mit Gefäßen aus Kunststoff einzugehen, was die anfänglichen Versuche nicht auswertbar machte. Dies wurde in den Versuchsprotokollen vermerkt. In den folgenden Versuchen mit Albendazol und seinem Metabolit wurden ausschließlich Glasgefäße zur Herstellung der Verdünnungen verwendet.

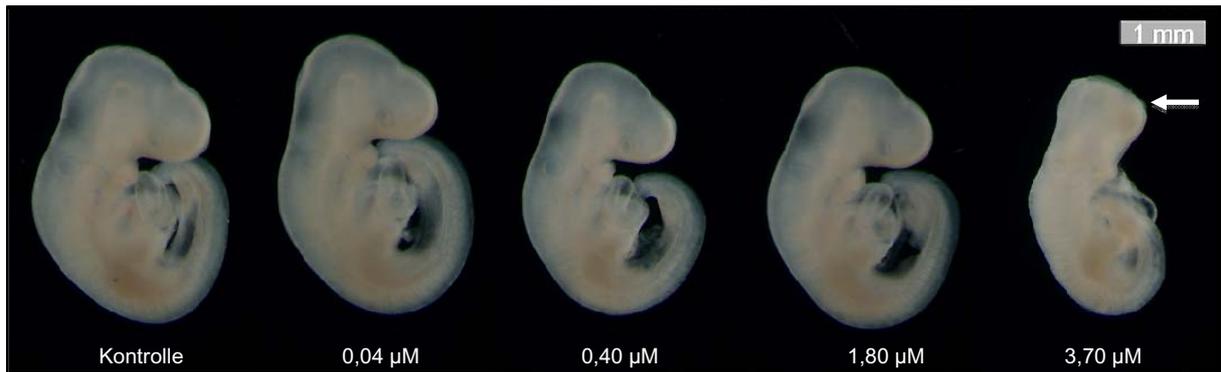
Die SSL betrug $3,09 \pm 0,11$ mm (MW \pm SD) bei den Kontrollembryonen. Mit steigender Konzentration der Ausgangssubstanz kam es zu einer stetigen Abnahme der SSL. Beim Proteingehalt bot sich ein ähnliches Bild. Hier lag die Kontrolle bei $138,6 \pm 14,76$ μg (MW \pm SD) und sank bis auf $102,4 \pm 48,02$ μg (MW \pm SD) ab.

Die Dottersackdurchblutung ging erst ab einer Konzentration von 1,8 μM (0,5 $\mu\text{g/ml}$) zurück und lag bei einem Wert von $2,83 \pm 0,41$ (MW \pm SD) Punkten. Eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) stellte sich bei dem Versuchsansatz mit der höchsten Konzentration von 3,7 μM (1,0 $\mu\text{g/ml}$) ein. Die Auswertung über das Scoresystem ergab einen Wert von $36,3 \pm 0,5$ (MW \pm SD) Punkten für die Kontrollembryonen. Auch hier ließ sich eine kontinuierliche Abnahme feststellen, die jedoch bis zum Versuchsansatz mit 1,8 μM (0,5 $\mu\text{g/ml}$) Albendazol keine statistisch signifikanten Abweichungen aufzeigte. Erst bei einer Konzentration von 3,7 μM (1,0 $\mu\text{g/ml}$) war der Scorewert auf $24,4 \pm 2,30$ (MW \pm SD) Punkte verringert und wies eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) auf. Die IC_{MAX} lag bei 3,7 μM (1,0 $\mu\text{g/ml}$).

Die statistische Auswertung ist im Einzelnen in Tabelle 13 (S. 78) dargestellt. Morphologische Veränderungen betrafen vereinzelt die Herzanlage. Diese wies ein stark vergrößertes, blasenartiges Perikard auf. In der höchsten Konzentration fiel zudem noch eine Rückbildung des Telenzephalon auf (Foto 15 auf S. 77), während das Neuralrohr – auch kranial – geschlossen war.

Ergebnisse

Foto 15: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazol in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Vor allem das Telenzephalon war bei 3,70 µM verändert (Pfeil).

Tab. 13: Effekte verschiedener Konzentrationen von Albendazol auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / $\mu\text{g/ml}$	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW \pm SD	Score MW \pm SD	Somitenzahl MW \pm SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW \pm SD	Proteingehalt ($\mu\text{g/Embryo}$) MW \pm SD
0 (Kontrolle)	4	3,0 \pm 0,0	36,3 \pm 0,5	25,8 \pm 1,5	0 / 4	3,09 \pm 0,11	138,6 \pm 14,76
0,04 / 0,01	6	3,0 \pm 0,0	36,0 \pm 2,53	25,0 \pm 1,41	0 / 6	3,01 \pm 0,19	119,1 \pm 23,22
0,40 / 0,1	6	3,0 \pm 0,0	34,8 \pm 2,4	24,0 \pm 1,58	0 / 6	3,0 \pm 0,11	124,8 \pm 22,0
1,8 / 0,5	6	2,83 \pm 0,41	35,0 \pm 4,98	25,4 \pm 1,52	1 / 6	3,09 \pm 0,29	165,1 \pm 38,42
3,7 / 1,0	5	1,0 \pm 0,0**	24,4 \pm 2,3*	23,3 \pm 1,53	5 / 5	2,74 \pm 0,39	102,4 \pm 48,02

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazol. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW \pm SD = Mittelwert \pm Standardabweichung

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

4.2.4.2 Albendazolsulfoxid

Der Metabolit von Albendazol wurde ebenfalls in fünf Konzentrationsschritten getestet. Diese reichten von 0,3 bis 17,7 μM (0,1 bis 5,0 $\mu\text{g/ml}$).

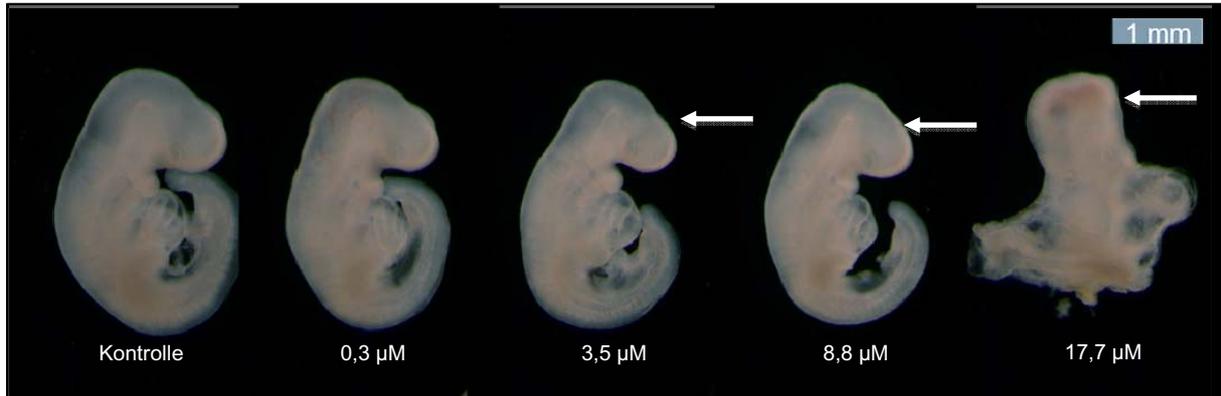
Die Wachstumsparameter SSL und Proteingehalt zeigten bis zur höchsten Konzentration eine kontinuierliche Abnahme. Jedoch erst in der höchsten Konzentration von 17,7 μM (5,0 $\mu\text{g/ml}$) waren die Unterschiede zur Kontrolle statistisch signifikant ($p < 0,01$). Die SSL lag in der Kontrolle bei $2,89 \pm 0,20$ mm (MW \pm SD) und in der höchsten Konzentration bei $2,04 \pm 0,0$ mm (MW \pm SD). Der Proteingehalt erreichte in der Kontrolle $107,5 \pm 28,85$ μg (MW \pm SD) und lag in der höchsten Konzentration bei $50,9 \pm 1,7$ μg (MW \pm SD) ($p < 0,01$). Einen Überblick über alle Einzelergebnisse dieser Versuche zeigt die Tabelle 14 auf S. 81.

Die Dottersackdurchblutung wurde in der Kontrolle mit einem Wert von $2,88 \pm 0,0$ (MW \pm SD) ermittelt. Dieser fiel kontinuierlich ab, da die Gefäßzeichnung abnahm. In der höchsten Konzentration (17,7 μM) wies die Dottersackdurchblutung mit $1,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) auf. Nur bei 1,7 μM (0,5 $\mu\text{g/ml}$) wurde der Wert von $3,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) erreicht. Der Score entsprach in der Kontrolle $34,5 \pm 3,83$ (MW \pm SD) Punkten. Er nahm mit ansteigenden Konzentrationen nur leicht ab. Ab dem dritten Versuchsansatz (3,5 μM) waren die Embryonen nicht mehr vollständig gedreht, auch waren Ohr- und Augenanlage nicht mehr entwicklungsphysiologisch korrekt ausgebildet, d. h. es war nur noch eine Augenfurche statt einer Augenblase bei zwei von acht Embryonen. Bei der Ohranlage war bei sechs von acht Embryonen kein dorsaler Rezessus vorhanden. Nach Kultur der Embryonen in der höchsten Konzentration konnten keine Somiten mehr gezählt werden, die Embryonen waren nicht gedreht und Neurulation und Kopfbereich waren abnorm. Augen- und Ohranlagen waren nicht vorhanden. Das Herz wurde ebenfalls als abnorm bewertet. Die IC_{MAX} lag bei 5,0 $\mu\text{g/ml}$.

Die Konzentrationswirkungskurve war im Vergleich zur Ausgangssubstanz Albendazol deutlich nach rechts verschoben (siehe Grafik Nr. 7 und 8 auf S. 87).

Ergebnisse

Foto 16: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazol-sulfoxid in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Die Veränderungen befanden sich vor allem im Bereich des Telenzephalon ab einer Konzentration von 3,5 µM (Pfeile).

Tab. 14: Effekte verschiedener Konzentrationen von Albendazolsulfoxid auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / $\mu\text{g/ml}$	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW \pm SD	Score MW \pm SD	Somitenzahl MW \pm SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW \pm SD	Proteingehalt ($\mu\text{g/Embryo}$) MW \pm SD
0 (Kontrolle)	6	2,88 \pm 0,0	34,5 \pm 3,83	24,4 \pm 1,52	1 / 6	2,89 \pm 0,20	107,5 \pm 28,85
0,3 / 0,1	4	2,5 \pm 1,0	32,3 \pm 7,68	24,0 \pm 1,0	1 / 4	2,75 \pm 0,51	100,9 \pm 53,95
1,7 / 0,5	7	3,0 \pm 0,0	34,4 \pm 3,05	23,8 \pm 0,41	1 / 7	2,67 \pm 0,32	88,8 \pm 16,95
3,5 / 1,0	8	2,88 \pm 0,35	34,8 \pm 3,72	24,3 \pm 1,89	0 / 8	2,95 \pm 0,18	121,0 \pm 20,06
8,8 / 2,5	6	2,5 \pm 0,58	32,7 \pm 3,72	24,3 \pm 0,58	1 / 6	2,79 \pm 0,41	117,4 \pm 42,11
17,7 / 5,0	2	1,0 \pm 0,0**	13,5 \pm 0,71**	n. d.	2 / 2	2,04 \pm 0,0**	50,9 \pm 1,7**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazolsulfoxid. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW \pm SD = Mittelwert \pm Standardabweichung

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

N = Stichprobengröße

4.2.4.3 Albendazol und Albendazolsulfoxid in der 80/20-Mischung

Die Kombination im Verhältnis 80/20 von Ausgangssubstanz Albendazol und Metabolit Albendazolsulfoxid wurde in Konzentrationen von 0,24 bis 4,71 μM getestet. Dabei wurden in der ersten Konzentration (0,24 μM) 0,19 μM Albendazol und 0,05 μM Albendazolsulfoxid verwendet.

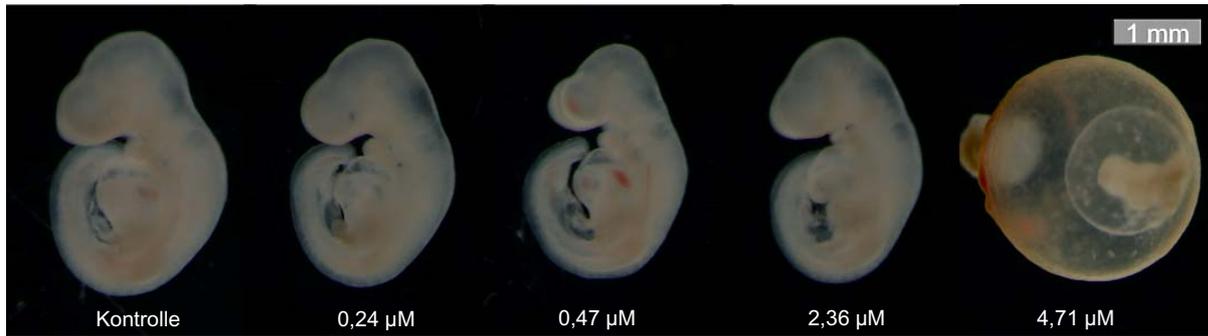
Die SSL veränderte sich erst in der höchsten Konzentration (4,71 μM) statistisch signifikant ($p < 0,01$). Diese lag bei unter $1,20 \pm 0,0$ mm (MW \pm SD) im Vergleich zur Kontrolle ($3,21 \pm 0,28$ mm MW \pm SD). Der Proteingehalt lag in der Kontrolle bei $172,8 \pm 34,58$ μg (MW \pm SD). Auch hier zeigte sich eine statistische Signifikanz erst in der höchsten Konzentration. Die Einzelwerte sind detailliert in Tabelle 15 auf S. 84 wiedergegeben.

Die Dottersackdurchblutung für die Kontrollembryonen lag bei $3,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD). Statistische Unterschiede stellten sich ab der zweiten Konzentration (0,47 μM) ein ($p < 0,05$ bei 0,47 μM und $p < 0,01$ bei 2,36 μM und 4,71 μM). Ab hier sanken die Werte auf $2,33 \pm 0,82$ (MW \pm SD), $1,88 \pm 0,35$ (MW \pm SD) und in der höchsten Konzentration (4,71 μM) auf $1,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD). Die weitere Auswertung des Scores ergab einen Wert von $36,6 \pm 2,44$ (MW \pm SD) Punkten für die Kontrollembryonen. Dieser sank bis zur Konzentration von 0,47 μM (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf $34,0 \pm 3,74$ (MW \pm SD) ab und stieg dann auf $34,8 \pm 2,32$ (MW \pm SD) Punkte. In der höchsten Konzentration (4,71 μM) wurden $15,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) Punkte erreicht ($p < 0,01$). Die Dymorphogenese lag bei 0,47 μM bei 17 %. Die IC_{MAX} entsprach 4,71 μM . Erste Veränderungen zeigten sich in der Haltung der Embryonen. Diese waren ab der zweiten Konzentration in drei von sieben Fällen nicht mehr gedreht, auch zeigten sich schon Fehlbildungen im Kopfbereich, wie ein „Ramskopf“ oder ein „angeschoppt“ (d. h. aufgeworfen) wirkendes Telenzephalon. Die Deformationen im Kopfbereich zeigten sich auch in der dritten Konzentration. Im vierten Versuchsansatz wurden alle Embryonen als dymorph gewertet: Die Dottersäcke enthielten sehr kleine, mit einer SSL unter 1,2 mm, komplett abnorme Embryonen (Foto 17 auf S. 83).

In der Konzentrationswirkungskurve ließ sich eine deutliche Linksverschiebung bei der Dymorphogenese, wie auch dem Score in Richtung der Ausgangssubstanz erkennen (Grafik Nr. 7 und 8 auf S. 87).

Ergebnisse

Foto 17: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazol und Albendazolsulfoxid im Verhältnis 80/20 in der WEC



Legende:

Abbildungen der linken Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: In der höchsten Konzentration (4,71 µM) war der Embryo nicht mehr durch das Scoring-Schema zu evaluieren. Der dysmorphe Embryo im Amnion war zwar zu erkennen, aber von diesem nicht mehr zu befreien. Der Dottersack war glatt ohne organisierte Gefäßstruktur.

Tab. 15: Effekte verschiedener Konzentrationen von Albendazol und Albendazolsulfoxid in der 80/20-Mischung auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / $\mu\text{g/ml}$	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW \pm SD	Score MW \pm SD	Somitenzahl MW \pm SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW \pm SD	Proteingehalt ($\mu\text{g}/\text{Embryo}$) MW \pm SD
0 (Kontrolle)	7	3,0 \pm 0,0	36,6 \pm 2,44	25,0 \pm 0,89	0 / 7	3,21 \pm 0,28	172,8 \pm 34,58
0,24 / 0,05	8	3,0 \pm 0,0	35,9 \pm 1,96	23,8 \pm 1,16	0 / 8	3,13 \pm 0,16	153,4 \pm 31,68
0,47 / 0,10	6	2,33 \pm 0,82*	34,0 \pm 3,74	23,8 \pm 1,26	1 / 6	2,95 \pm 0,17	142,1 \pm 34,86
2,36 / 0,5	8	1,88 \pm 0,35**	34,8 \pm 2,32	24,3 \pm 0,82	0 / 8	3,17 \pm 0,24	164,3 \pm 30,57
4,71 / 1,0	8	1,0 \pm 0,0**	15,0 \pm 0,0**	n.d.	8 / 8**	1,2 \pm 0,0**	81,6 \pm 24,41**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazol und Albendazolsulfoxid in der 80/20-Mischung. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW \pm SD = Mittelwert \pm Standardabweichung

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

N = Stichprobengröße

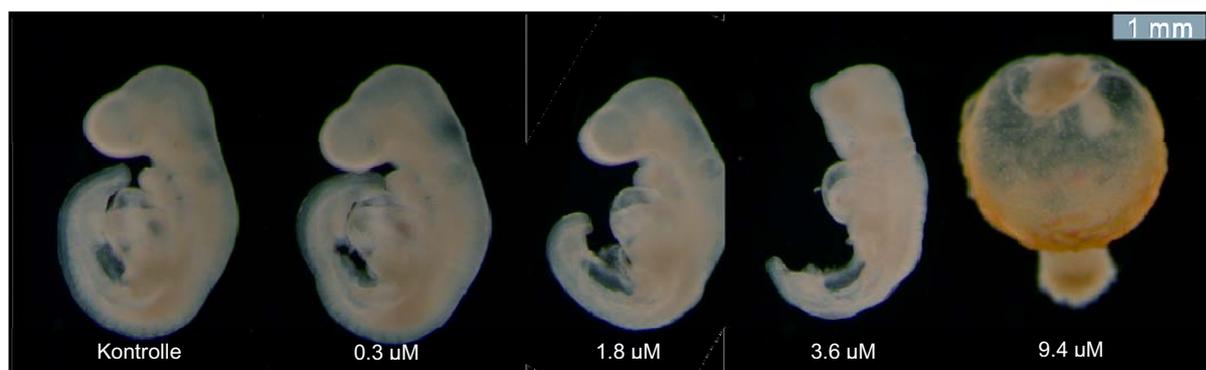
4.2.4.4 Albendazol und Albendazolsulfoxid in der 50/50-Mischung

In den Mischungsversuchen 50/50 wurden Konzentrationen von 0,3 bis 9,4 μM verwendet. Beide Substanzen waren zu je 50 % in der Mischung vertreten.

Die Kontrollembryonen hatten eine Größe von $2,89 \pm 0,29$ mm (MW \pm SD). Diese nahm kontinuierlich ab und wurde ab der höchsten Konzentration (9,4 μM) bei einem Wert von $1,91 \pm 0,13$ mm (MW \pm SD) als statistisch signifikant ($p < 0,01$) eingestuft. Der Proteingehalt lag in der Kontrolle bei $117,7 \pm 8,95$ μg (MW \pm SD). Eine statistisch signifikante Abnahme wurde nicht erkannt. In der höchsten Konzentration (9,4 μM) konnte aufgrund der geringen Materialmenge eine Proteinbestimmung nicht durchgeführt werden.

In der Beurteilung der Dottersackdurchblutung zeigten sich erst ab 3,6 μM bzw. 1,0 $\mu\text{g/ml}$ statistisch signifikante ($p < 0,01$) Veränderungen. Im letzten Versuchsansatz lag der Wert nur noch bei $1,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD). Hier war kein Embryo mehr aus dem Dottersack zu präparieren; der Dottersack wies eine unorganisierte Gefäßstruktur auf (Foto 18). Der Score veränderte sich bis zu 3,6 μM (1,0 $\mu\text{g/ml}$) des Substanzgemischs nur gering, eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) lag in dieser Konzentration bei $30,8 \pm 3,54$ (MW \pm SD) Score-Punkten. Die Dysmorphogenese wurde im ersten Versuch (0,3 μM) mit 12,5 %, im dritten (3,6 μM) mit 62 % und im vierten (9,4 μM) mit 100 % ermittelt (IC_{MAX} : 9,4 μM bzw. 2,5 $\mu\text{g/ml}$). Die einzelnen Werte finden sich in der Tabelle 16 auf S. 86.

Foto 18: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazol und Albendazolsulfoxid im Verhältnis 50/50 in der WEC



Legende:

Abbildungen der linken Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Die Embryonen zeigten schon in der zweiten Konzentration eine geringere SSL, sowie eine unvollständige Drehung des Rumpfes. Bei 9,4 μM war eine Auswertung des Embryos nicht mehr möglich. Die Oberfläche des Dottersacks erschien höckerig; eine Organisation der Blutgefäße war nicht mehr erkennbar.

Tab. 16: Effekte verschiedener Konzentrationen von Albendazol und Albendazolsulfoxid in der 50/50-Mischung auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / $\mu\text{g/ml}$	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW \pm SD	Score MW \pm SD	Somitenzahl MW \pm SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW \pm SD	Proteingehalt ($\mu\text{g/Embryo}$) MW \pm SD
0 (Kontrolle)	7	3,0 \pm 0,0	36,6 \pm 0,79	26,0 \pm 1,16	0 / 7	2,89 \pm 0,29	117,7 \pm 8,95
0,3 / 0,1	8	3,0 \pm 0,0	34,6 \pm 2,93	24,7 \pm 0,52*	1 / 8	2,90 \pm 0,32	127,3 \pm 28,99
1,8 / 0,5	8	2,75 \pm 0,46	34,8 \pm 3,0	24,2 \pm 1,17*	0 / 8	2,78 \pm 0,28	118,0 \pm 17,7
3,6 / 1,0	8	1,75 \pm 0,46**	30,8 \pm 3,54**	26,0 \pm 1,87	5 / 8	2,76 \pm 0,44	120,5 \pm 43,82
9,4 / 2,5	8	1,0 \pm 0,0**	n.d.	n.d.	8 / 8**	1,91 \pm 0,13**	n.d.

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazol und Albendazolsulfoxid in der 50/50-Mischung. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW \pm SD = Mittelwert \pm Standardabweichung

* = $p < 0,05$

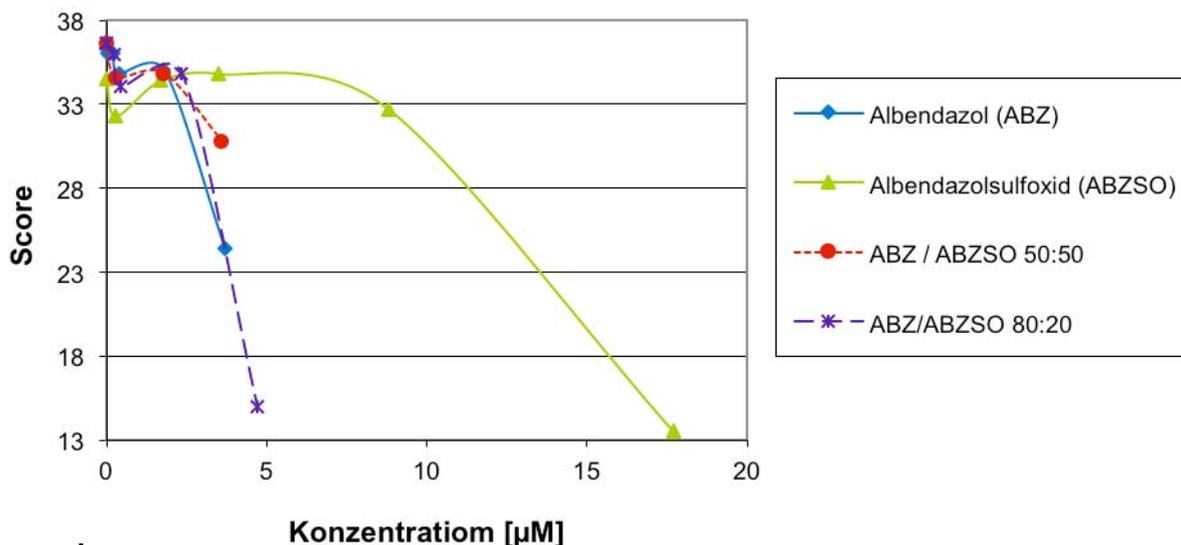
** = $p < 0,01$

Ergebnisse

Grafik 7: Score in Beziehung zur Konzentration [μM]

Die Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve von Albendazolsulfoxid ist anhand der grafischen Darstellung des Scores gut erkennbar. Die Grafen der beiden Mischungen weisen eine Linksverschiebung (Richtung Albendazol) auf.

Albendazol / Albendazolsulfoxid



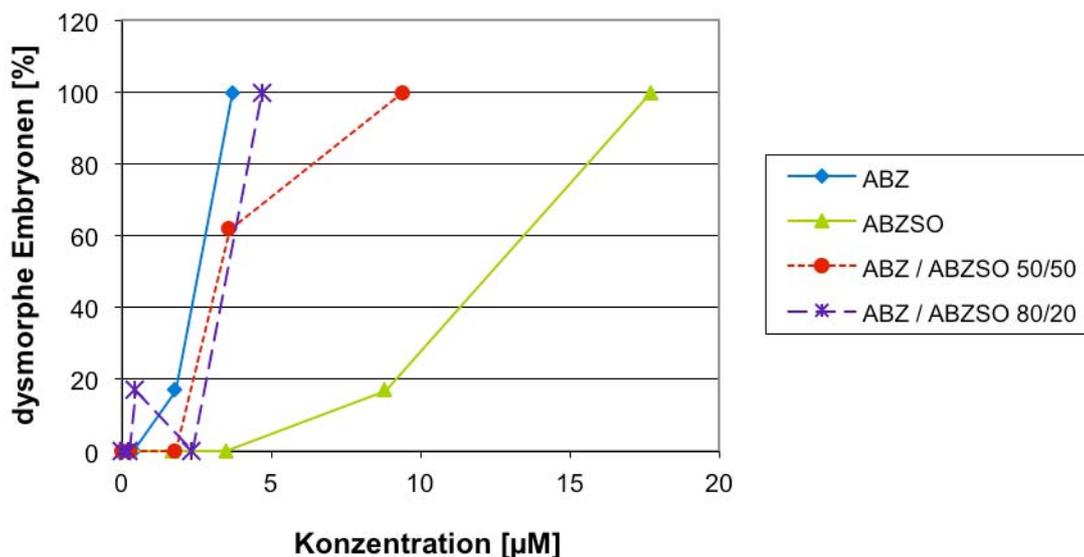
Legende:

Die Darstellung zeigt die Veränderung des Scores von Ausgangssubstanz, Metabolit und der 80/20- und 50/50-Mischung in Abhängigkeit von der Konzentration [μM]. Die verschiedenfarbigen Symbole stehen für die jeweiligen Mittelwerte, die Linien dazwischen sind grafische Hilfsmittel. Auf der X-Achse ist die Konzentration in [μM] aufgetragen, die Y-Achse stellt die Scorewerte dar.

Grafik 8: Dysmorphe Embryonen in Beziehung zur Konzentration (μM)

Albendazol wies bereits ab der ersten Konzentration ein fast 20 prozentige Dysmorphogeneserate auf. In der zweiten Konzentration wurden zu 100 % dysmorphe Embryonen festgestellt. Sein Metabolit zeigte erst bei einer wesentlich höheren Konzentration einen Anstieg der dysmorphen Embryonen. Analog dazu verhielten sich die Mischungen.

Albendazol / Albendazolsulfoxid



Legende:

Die Darstellung zeigt die Veränderung der Dysmorphogenese der Embryonen nach 48-stündiger Inkubation mit der Ausgangssubstanz, dem Metabolit bzw. in der 80/20- und 50/50-Mischung in Abhängigkeit von der Konzentration [μM]. Die verschiedenfarbigen Symbole stehen für die jeweiligen Mittelwerte, die Linien dazwischen sind grafische Hilfsmittel. Auf der X-Achse ist die Konzentration in [μM] aufgetragen, die Y-Achse stellt die Anzahl der dysmorphen Embryonen dar.

4.2.5 Ergebnisse der Untersuchung von N-Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren und deren Mischungen

4.2.5.1 Acetylaminofluoren

Die Substanz wurde in einem Bereich von 44,7 bis 895,7 μM (10 bis 200 $\mu\text{g/ml}$) untersucht.

In der Auswertung konnte bei den Embryonen in der Lösungsmittelkontrolle eine SSL von $3,06 \pm 0,23$ mm (MW \pm SD) festgestellt werden. Es folgte mit ansteigender Konzentration von Acetylaminofluoren eine Abnahme der SSL bis zu dem statistisch signifikanten ($p < 0,05$) Wert von $2,30 \pm 0,45$ (MW \pm SD) in der höchsten Konzentration. Der Proteingehalt lag bei den Kontrollembryonen bei $156,7 \pm 28,04$ μg (MW \pm SD). Er zeigte erst in der höchsten Konzentration mit $90,5 \pm 25,39$ μg (MW \pm SD) einen statistischen Unterschied ($p < 0,01$). Die Ergebnisse dieser Experimente finden sich in Tabelle 17 (S. 90).

Die Dottersackdurchblutung zeigte eine statistisch signifikante ($p < 0,01$) Verringerung bei einer Konzentration von 447,8 μM (100 $\mu\text{g/ml}$) auf $2,29 \pm 0,49$ (MW \pm SD) Punkte. Der Wert sank weiter auf $1,12 \pm 0,35$ (MW \pm SD) bei 671,8 μM (150 $\mu\text{g/ml}$) und $1,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) bei 895,7 μM (200 $\mu\text{g/ml}$).

Die Punktzahl des Scores lag bei den Kontrollembryonen bei $36,1 \pm 1,22$ (MW \pm SD). Ein Unterschied war bei 223,9 μM (50 $\mu\text{g/ml}$) zu erkennen. Hierbei lag die Punktzahl nur noch bei $32,3 \pm 4,8$ (MW \pm SD) im Vergleich zur Kontrolle. Weitere statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zeigten sich bei 671,8 μM bzw. 150 $\mu\text{g/ml}$ mit $28,6 \pm 5,01$ (MW \pm SD) und bei 200 $\mu\text{g/ml}$ mit $20,9 \pm 2,23$ Punkten (MW \pm SD). Die Dymorphogenese begann bei 223,9 μM bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$ mit 38 %, die IC_{MAX} lag bei 895,7 μM (200 $\mu\text{g/ml}$). Bereits im zweiten Versuchsansatz (223,9 μM) war eine abnorme Haltung bei drei von acht Embryonen zu beobachten (Wert 1 in der Bewertung). Es waren zum Teil Nasenplakoden entwickelt (die zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung normalerweise nicht mikroskopisch erkennbar sind). In einem Fall war der kraniale Neuroporus noch offen. Diese Fehlbildungen bestätigten sich bei 447,8 μM . Auffällig waren die stark ausgebildeten Nasenplakoden in den höheren Konzentrationen. Im fünften Konzentrationsansatz (895,7 μM) waren alle Embryonen „Eichhörnchen“. Die Neurulation war kranial noch nicht geschlossen und das Telenzephalon war noch nicht angelegt. Stattdessen ragten Nasenplakoden hervor. Oftmals traten in der Kopfregion auch Hämorrhagien auf (Foto 19 auf S. 89).

Ergebnisse

Foto 19: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Acetylaminofluoren in der WEC



Legende:

Abbildungen der linken Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Bei einer Konzentration von 447,8 µM waren bereits Hämorrhagien im Kopfbereich zu erkennen. In den folgenden Konzentrationen war eine vollständige Rotation des Rumpfes nicht mehr gegeben, die Embryonen wiesen zudem vermehrt Hämorrhagien auf (Pfeil) und es kam zur Ausbildung von Nasenplakoden.

Tab. 17: Effekte verschiedener Konzentrationen von Acetylaminofluoren auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / $\mu\text{g/ml}$	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW \pm SD	Score MW \pm SD	Somitenzahl MW \pm SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW \pm SD	Proteingehalt ($\mu\text{g}/\text{Embryo}$) MW \pm SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 \pm 0,0	36,1 \pm 1,22	26,0 \pm 1,73	0 / 8	3,06 \pm 0,23	156,7 \pm 28,04
44,7 / 10,0	7	3,0 \pm 0,0	36,0 \pm 1,41	25,6 \pm 1,27	0 / 7	3,13 \pm 0,23	148,2 \pm 28,7
223,9 / 50,0	8	3,0 \pm 0,0	32,3 \pm 4,80*	25,0 \pm 1,58	3 / 8	2,84 \pm 0,35	134,1 \pm 36,41
447,8 / 100	7	2,29 \pm 0,49**	31,4 \pm 5,26	25,4 \pm 1,52	3 / 7	2,91 \pm 0,17	137,2 \pm 19,86
671,8 / 150	8	1,12 \pm 0,35**	28,6 \pm 5,01**	24,5 \pm 1,64	5 / 8	2,84 \pm 0,42	124,9 \pm 35,19
895,7 / 200	8	1,0 \pm 0,0**	20,9 \pm 2,23**	n. d.	8 / 8**	2,30 \pm 0,45*	90,5 \pm 25,39**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Acetylaminofluoren. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW \pm SD = Mittelwert \pm Standardabweichung

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

4.2.5.2 N-Hydroxy-Acetylaminofluoren

Der Metabolit von Acetylaminofluoren wurde ebenfalls in fünf Versuchsansätzen getestet. Diese umfassten einen Bereich von 4,1 bis 104,4 μM (1,0 bis 25,0 $\mu\text{g/ml}$).

Die SSL der Embryonen lag in den Kontrolllösungen bei $2,88 \pm 0,12$ mm (MW \pm SD). Es traten bei diesem Parameter keine statistisch signifikanten Veränderungen der Embryonen mit steigender Konzentration der Substanz auf. Der Proteingehalt konnte in der Kontrolle mit $92,2 \pm 15,25$ μg (MW \pm SD) bestimmt werden. Es wurde keine drastische Abnahme des Wertes beobachtet. Die Werte waren nicht statistisch signifikant abweichend zur Kontrolle.

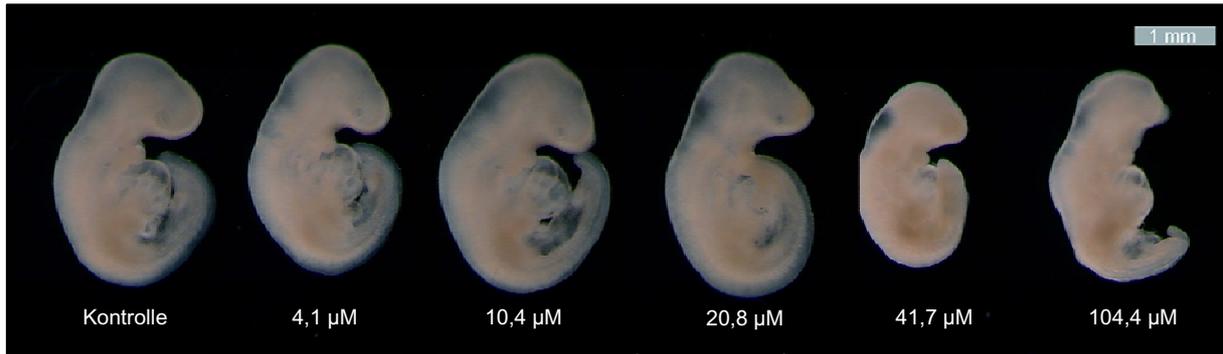
In der Dottersackdurchblutung war bei einer Konzentration von 10,4 μM (2,5 $\mu\text{g/ml}$) nur noch eine statistisch signifikante Abnahme ($p < 0,05$) auf einen Wert von $2,20 \pm 1,10$ (MW \pm SD) ermittelbar. Dieser sank mit zunehmender Konzentration noch weiter ab (20,8 μM : $1,43 \pm 0,54$ MW \pm SD; 41,7 μM : $1,80 \pm 0,45$ MW \pm SD; 104,4 μM : $1,33 \pm 0,52$ MW \pm SD).

Beim Scorewert ließen sich statistisch signifikante ($p < 0,05$) Abweichungen erst beim vierten Konzentrationsansatz (41,7 μM) feststellen. Hier war die Bewertung auf $28,8 \pm 4,09$ (MW \pm SD) Punkte verringert (Kontrolle $35,1 \pm 2,30$ MW \pm SD). In der höchsten Konzentration (104,4 μM) lag der Wert bei $25,8 \pm 1,47$ (MW \pm SD) Punkten. Eine augenscheinliche Dysmorphogenese zeigte sich erst in den beiden höchsten Konzentrationen (41,7 und 104,4 μM). Im Versuchsansatz mit 41,7 μM waren vier von fünf und im letzten (104,4 μM) alle Embryonen dysmorph (IC_{MAX} von 104,4 μM). Auffällige, jedoch nicht als abnorm einzustufende Veränderungen traten schon in der niedrigsten Konzentration (4,1 μM) auf. Diese setzten sich fort und waren bei der zweiten Konzentration (10,4 μM) ausgesetzten Embryonengruppe im Kopfbereich zu erkennen. Hier war eine „ramsköpfige“ Form auffällig, teilweise auch ein nicht ausgebildete Telenzephalonanlage (Foto 20 auf S. 92). Eine beginnende Ausbildung von Nasenplakoden war zu beobachten². Zusätzlich waren die Embryonen ab dem vierten Ansatz zumeist nicht mehr vollständig gedreht, die Gliedmaßenanlagen wenig ausgebildet. Ein Einfluss auf den Schluss des Neuralrohrs konnte nicht festgestellt werden.

² Hier wurde noch keine Abnormität festgestellt, d. h. der Wert 1 wurde nicht vergeben.

Ergebnisse

Foto 20: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von N-Hydroxy-Acetylamino-fluoren in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Ab einer Konzentration von 20,8 µM war eine vollständige Rotation des Rumpfes nicht mehr gegeben, die Embryonen wiesen zudem vermehrt Hämorrhagien auf und es kam zur Ausbildung von Nasenplakoden. Auffällig waren die Veränderungen im Kopfbereich bereits ab einer Konzentration von 4,1 µM.

Tab. 18: Effekte verschiedener Konzentrationen von N-Hydroxy-Acetylaminofluoren auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / μg/ml	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW ± SD	Score MW ± SD	Somitenzahl MW ± SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW ± SD	Proteingehalt (μg/Embryo) MW ± SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 ± 0,0	35,1 ± 2,30	26,1 ± 1,68	0 / 8	2,88 ± 0,12	92,2 ± 15,25
4,1 / 1,0	8	3,0 ± 1,0	34,5 ± 2,83	24,7 ± 0,82	0 / 8	2,78 ± 0,23	94,3 ± 13,34
10,4 / 2,5	5	2,2 ± 1,1*	32,6 ± 3,4	24,5 ± 0,58	0 / 5	2,78 ± 0,27	95,9 ± 20,1
20,8 / 5,0	7	1,43 ± 0,54**	34,3 ± 0,76	24,6 ± 0,79	0 / 7	3,0 ± 0,27	108,8 ± 15,08
41,7 / 10	5	1,8 ± 0,45**	28,8 ± 4,09*	23,7 ± 2,52	4 / 5	2,39 ± 0,46	83,8 ± 28,7
104,4 / 25	6	1,33 ± 0,52**	25,8 ± 1,47**	21,0 ± 0,0*	6 / 6**	2,65 ± 0,13	87,1 ± 15,72

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von N-Hydroxy-Acetylaminofluoren. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW ± SD = Mittelwert ± Standardabweichung

* = p < 0,05

** = p < 0,01

4.2.5.3 Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren in der 80/20-Mischung

Die Kombination wurde in vier Versuchsansätzen plus Kontrolle untersucht, die einen Konzentrationsbereich von 32,5 bis 261 μM umfassten. Dabei wurden bei einer Gesamtmenge von 32,5 μM für die Mischung 26 μM Acetylaminofluoren und 6,5 μM N-Hydroxy-Acetylaminofluoren verwendet.

Hier konnte bei Messung der SSL bei den Kontrollembryonen eine Größe von $3,38 \pm 0,14$ mm (MW \pm SD) festgestellt werden. Ein kontinuierlicher Rückgang des Wertes ließ sich mit ansteigender Konzentration verzeichnen. Ein statistischer Unterschied ($p < 0,05$) wurde ab 130,5 μM im dritten Ansatz mit $3,01 \pm 0,21$ mm (MW \pm SD) erkannt. Statistisch signifikant ($p < 0,01$) wurden die Auswirkungen auf die SSL in der höchsten Konzentration von 261 μM (12,5 $\mu\text{g/ml}$) beurteilt. Hier war die SSL auf $2,88 \pm 0,17$ (MW \pm SD) abgesunken. Der Proteingehalt veränderte sich im Vergleich zur Kontrolle ($169,3 \pm 26,18$ μg MW \pm SD) zunächst nur unwesentlich; es war nur ein kontinuierliches, leichtes Absinken des Wertes zu beobachten. Eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) zeigte der Proteingehalt erst ab der höchsten Konzentration (261 μM bzw. 12,5 $\mu\text{g/ml}$) mit $99,2 \pm 28,03$ μg (MW \pm SD).

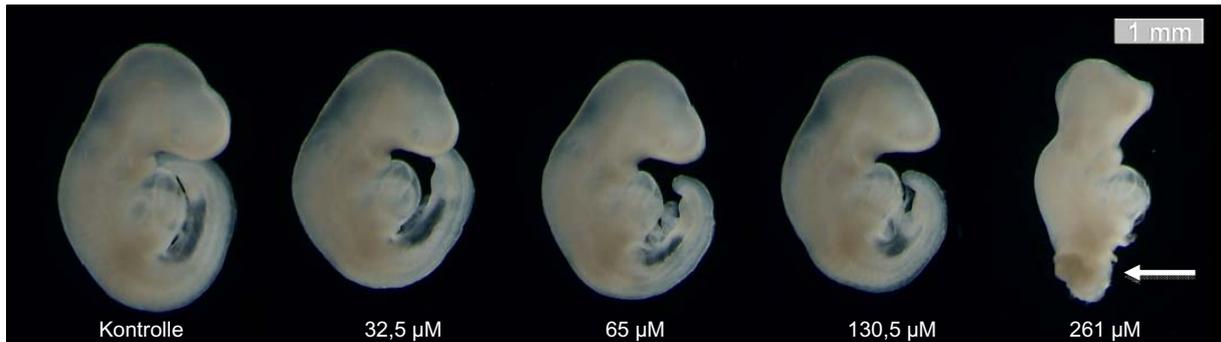
Schon ab dem ersten Versuchsansatz (32,5 μM) war bei der Dottersackdurchblutung ein Rückgang der Gefäßstruktur und damit des Wertes verglichen mit der Kontrolle ($3,0 \pm 0,0$ MW \pm SD) zu erkennen. Mit der niedrigsten Konzentration (32,5 μM) lag der Wert bei $2,75 \pm 0,46$ (MW \pm SD) und ging bis auf $2,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) Punkte in den nachfolgenden Konzentrationen zurück, was eine statistisch signifikante ($p < 0,01$) Veränderung darstellte. Der Kontrollwert des Scores belief sich auf $37,5 \pm 1,31$ (MW \pm SD) Punkte. Dieser zeigte ebenfalls einen stetigen Rückgang mit aufsteigender Konzentration. Statistisch signifikant ($p < 0,01$) wurde dieser ab 130,5 μM ($33,5 \pm 4,11$ MW \pm SD Punkte). Bei 261 μM waren nur noch $26,8 \pm 3,28$ (MW \pm SD) Punkte zu zählen. In der zweiten Konzentration (65,0 μM) fanden sich Veränderungen im Bereich des Kopfes („Ramskopf“). Einer von acht Embryonen wies auch einen offenen kranialen Neuroporus auf und wurde daher als abnorm gewertet. Bei zwei von acht Embryonen waren auch Nasenplakoden ausgebildet, der Rumpf war teilweise durch eine Krümmung bzw. Einziehung abgesetzt (Bewertung mit „4“ bzw. „3“ Punkten nach Scoring-System). Bei 130,5 μM war das Telenzephalon bei einem Embryo gar nicht mehr ausgebildet (dysmorph), eine vollständige Drehung hatte nicht bei allen stattgefunden. Im letzten Versuchsansatz (261 μM) war bei allen Embryonen der Kopfbereich abnorm, d. h. das Telenzephalon war nicht ausgebildet, es zeigten sich Nasenplakoden. Die Embryonen waren überwiegend nicht mehr gedreht. Die Somiten waren bis zur höchsten Konzentration erkennbar, bei dieser wiesen sie aber einen statistisch signifikanten ($p < 0,01$) Wert von $23,8 \pm 0,5$ (MW \pm SD) im Vergleich zur Kontrolle ($25,6 \pm 0,92$ MW \pm SD) auf. Die Dysmorphogenese lag in der zweiten und dritten Konzentration (65,0 und 130,5 μM) jeweils bei einem von

Ergebnisse

acht Embryonen. Im letzten Versuchsansatz (261 μM) waren alle Embryonen dysmorph (IC_{MAX}: 261 μM). Die Einzelergebnisse der Experimente sind in Tabelle 19 (S. 96) dargestellt.

In der Konzentrationswirkungskurve ließ sich eine Linksverschiebung gegenüber der Ausgangssubstanz erkennen (siehe Grafik Nr. 9 und 10 auf S. 100).

Foto 21: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren 80/20 in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Eine 100-prozentige Abnormitätsrate wurde ab einer Konzentration von 261 μM beobachtet. Der Rumpf war nicht gedreht sowie nicht mehr physiologisch entwickelt (Pfeil).

Tab. 19: Effekte verschiedener Konzentrationen von Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren in der 80/20-Mischung auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / $\mu\text{g/ml}$	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW \pm SD	Score MW \pm SD	Somitenzahl MW \pm SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW \pm SD	Proteingehalt ($\mu\text{g/Embryo}$) MW \pm SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 \pm 0,0	37,5 \pm 1,31	25,6 \pm 0,92	0 / 8	3,38 \pm 0,14	169,3 \pm 26,18
32,5 / 1,56	8	2,75 \pm 0,46	33,8 \pm 5,47	25,0 \pm 0,58	0 / 8	3,15 \pm 0,28	148,1 \pm 33,58
65 / 3,13	8	2,0 \pm 0,0**	33,6 \pm 8,82	25,1 \pm 0,69	1 / 8	3,13 \pm 0,58	147,7 \pm 48,47
130,5 / 6,25	8	2,0 \pm 0,0**	33,5 \pm 4,11**	24,5 \pm 0,58	1 / 8	3,01 \pm 0,21*	144,6 \pm 32,5
261 / 12,5	8	2,0 \pm 0,0**	26,8 \pm 3,28**	23,8 \pm 0,5**	8 / 8**	2,88 \pm 0,17**	99,2 \pm 28,03**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren in der 80/20-Mischung. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW \pm SD = Mittelwert \pm Standardabweichung

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

4.2.5.4 Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren in der 50/50-Mischung

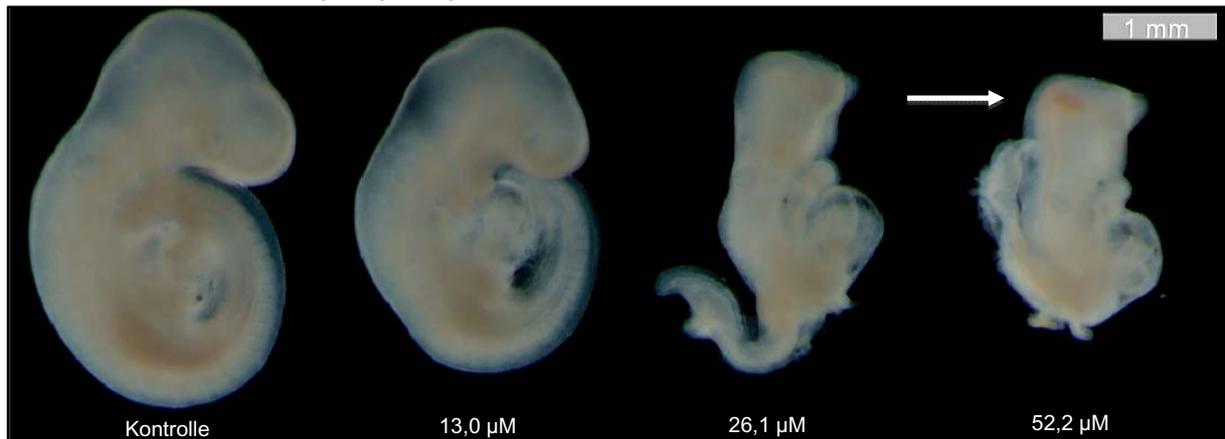
Das Mischungsverhältnis 50/50 des Substanzpaares wurde in vier Konzentrationen im Bereich von 13,0 bis 52,2 μM getestet. Die Mischung enthielt von beiden Substanzen den gleichen Mengenanteil.

Die SSL betrug $3,05 \pm 0,19$ mm (MW \pm SD) bei den Kontrollembryonen. Sie verringerte sich kontinuierlich bis auf $1,96 \pm 0,39$ mm (MW \pm SD) bei 26,1 μM und $2,45 \pm 0,18$ mm (MW \pm SD) bei 52,2 μM . Beide Werte erwiesen sich als statistisch signifikant ($p < 0,01$) unterschiedlich zur Kontrolle. Die Veränderung des Proteingehalts verlief in ähnlicher Weise. Die Kontrollembryonen enthielten $135,9 \pm 27,99$ μg (MW \pm SD) Protein. Der Proteingehalt der beiden höchsten Konzentrationen (26,1 und 52,2 μM) war statistisch signifikant ($p < 0,01$) verringert. Die Einzelwerte dieser Experimente sind in Tabelle 20 (S. 99) aufgeführt.

Bei der Dottersackdurchblutung fiel ein Rückgang der Gefäßbildung ab einer Konzentration von 26,1 μM auf. Diese wurde nur noch mit $1,25 \pm 0,46$ Punkten (MW \pm SD) bewertet im Vergleich zur Kontrolle mit $3,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD) und wies damit eine statistische Signifikanz ($p < 0,01$) auf. In der höchsten Konzentration (52,2 μM) lag der Wert nur noch bei $1,0 \pm 0,0$ (MW \pm SD). In der Beurteilung des Scorewertes war ab dem ersten Versuchsansatz (13 μM) bereits eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Verringerung der Punktezahl zu sehen. Die beiden nachfolgenden Konzentrationen (26,1 und 52,2 μM) riefen ebenfalls eine statistisch signifikante ($p < 0,01$) Verringerung hervor (Kontrolle: $36,8 \pm 0,71$ MW \pm SD, $18,5 \pm 2,73$ MW \pm SD bei 26,1 μM und $19,0 \pm 0,0$ MW \pm SD bei 52,2 μM). Ab einer Konzentration von 26,1 μM waren keine Somiten mehr zählbar. Schon ab der niedrigsten Konzentration (13 μM) war ein „Ramskopf“ als Veränderung erkennbar. Die nachfolgenden Konzentrationen brachten dann nur noch Embryonen hervor, die nicht gedreht waren, einen offenen kranialen Neuroporus und ein nicht ausgebildetes Telenzephalon zeigten. Die Haltung prägte sich in den folgenden Versuchsansätzen noch als „Eichhörnchen“ aus. Die Embryonen waren bereits in der zweiten Konzentration zu 100 % dysmorph (IC_{MAX} : 26,1 μM).

Ergebnisse

Foto 22: Rattenembryonen nach 48-stündiger Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Acetylamino-
fluoren und N-Hydroxy-Acetylamino-
fluoren 50/50 in der WEC



Legende:

Abbildungen der rechten Körperseite von Rattenembryonen am Tag 11,5 nach 48-stündiger Kultur: Ab 26,1 µM waren alle Embryonen dysmorph. Die Rotation des Rumpfes war nicht mehr vollständig, sowie auch die Ausbildung des Telenzephalons. Es zeigten sich Hämorrhagien in der Kopfregion (Pfeil).

Tab. 20: Effekte verschiedener Konzentrationen von Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren in der 50/50-Mischung auf Rattenembryonen *in vitro* („whole embryo culture“)

Konzentration μM / $\mu\text{g/ml}$	Anzahl der untersuchten Embryonen	Dottersack- durchblutung MW \pm SD	Score MW \pm SD	Somitenzahl MW \pm SD	Dysmorphie Embryonen/ Gesamtzahl der Embryonen	Scheitel- Steiß-Länge (mm) MW \pm SD	Proteingehalt ($\mu\text{g/Embryo}$) MW \pm SD
0 (Kontrolle)	8	3,0 \pm 0,0	36,8 \pm 0,71	24,4 \pm 0,92	0 / 8	3,05 \pm 0,19	135,9 \pm 27,99
13 / 1,6	4	3,0 \pm 0,0	35,3 \pm 0,96*	23,8 \pm 0,96	0 / 4	3,02 \pm 0,08	121,4 \pm 7,19
26,1 / 3,13	8	1,25 \pm 0,46**	18,5 \pm 2,73**	n. d.	8 / 8**	1,96 \pm 0,39**	59,4 \pm 12,43**
52,2 / 6,25	4	1,0 \pm 0,0**	19,0 \pm 0,0**	n. d.	4 / 4**	2,45 \pm 0,18**	78,8 \pm 9,28**

Legende:

Darstellung der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsparameter nach 48-stündiger Inkubation der Embryonen mit aufsteigenden Konzentrationen von Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren in der 50/50-Mischung. Die Darstellung der Ergebnisse von Kontroll- und Konzentrationsgruppen erfolgte in Mittelwerten unter Angabe der Standardabweichung. „n. d.“ steht für „nicht durchführbar“, wenn eine Auswertung nicht mehr möglich war.

MW \pm SD = Mittelwert \pm Standardabweichung

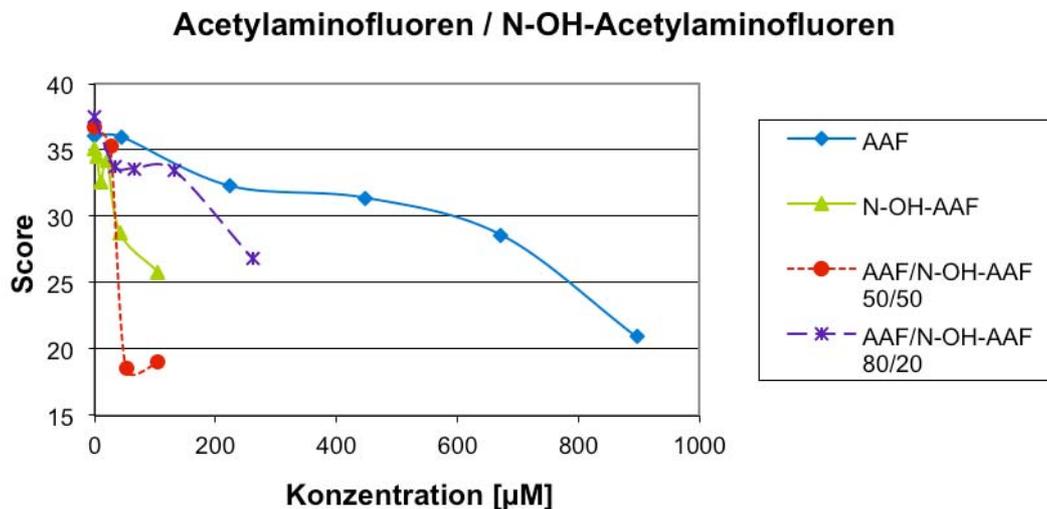
* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

Ergebnisse

Grafik 9: Score in Beziehung zur Konzentration (μM)

Der Score fiel unter der 50/50-Mischung deutlich ab. Die Ausgangssubstanz hingegen zeigte nur eine moderate Abnahme der Konzentrations-Effekt-Beziehung. Der Score der Mischungen verlief in der 50/50-Mischung parallel zu dem des Metaboliten, während bei der 80/20-Mischung eine Linksverschiebung Richtung Ausgangssubstanz festzustellen war.

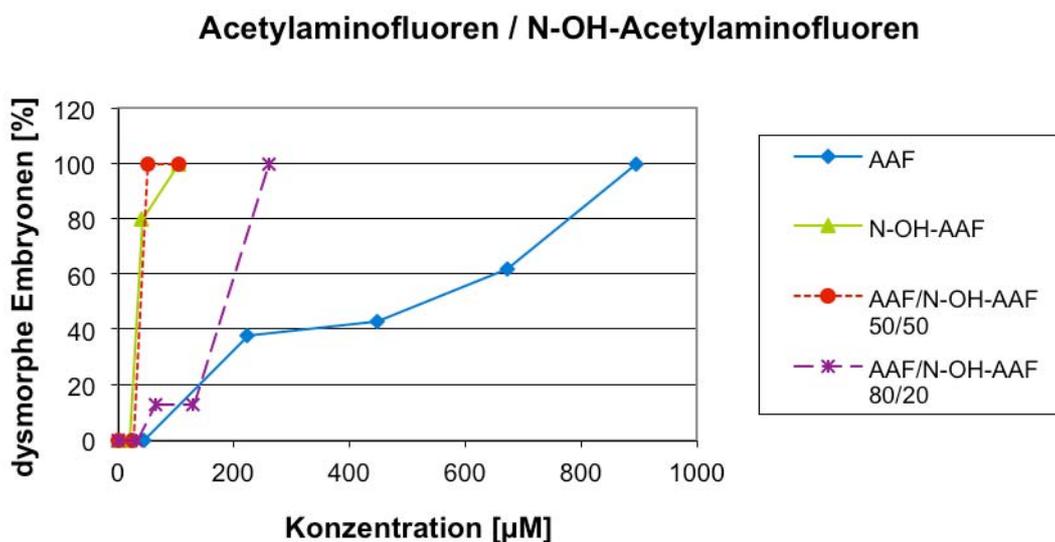


Legende:

Die grafische Darstellung zeigt die Veränderung des Scores von Ausgangssubstanz, Metabolit und der 80/20- und 50/50-Mischung in Abhängigkeit von der Konzentration [μM]. Die verschiedenfarbigen Symbole stehen für die jeweiligen Mittelwerte, die Linien dazwischen sind grafische Hilfsmittel. Auf der X-Achse ist die Konzentration in [μM] aufgetragen, die Y-Achse stellt die Scorewerte dar.

Grafik 10: Dymorphe Embryonen in Beziehung zur Konzentration (μM)

Der Graph der 50/50-Mischung und des Metaboliten zeigten sich fast gleichauf mit dem des Metaboliten. Auch der Parameter „Dysmorphogenese“ ließ eine Linksverschiebung bei der 80/20-Mischung Richtung AAF erkennen.



Legende:

Die Darstellung zeigt die Veränderung der Dysmorphogenese der Embryonen nach 48-stündiger Inkubation mit der Ausgangssubstanz, dem Metabolit bzw. in der 80/20- und 50/50-Mischung in Abhängigkeit von der Konzentration [μM]. Die verschiedenfarbigen Symbole stehen für die jeweiligen Mittelwerte, die Linien dazwischen sind grafische Hilfsmittel. Auf der X-Achse ist die Konzentration in [μM] aufgetragen, die Y-Achse stellt die Scorewerte dar.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der morphologischen Veränderungen der Embryonen nach Exposition mit fünf unterschiedlichen Substanzen

Beim Vergleich der Ergebnisse der Einzelsubstanzen bzw. deren Mischungen mit typischen Metaboliten im Verhältnis 80/20 und 50/50 ließen sich Parallelen in den hervorgerufenen Fehlbildungen bei Rattenembryonen feststellen. Generell waren eine Abnahme der SSL, Somitenzahl und des Proteingehalts sowie ein Einfluss auf die Entwicklung der Dottersackdurchblutung zu beobachten.

Bei Cyclophosphamid, Retinol und Albendazol war hauptsächlich der Kopfbereich (hier insbesondere die Entwicklung der Gehirnanlagen) von den embryotoxischen Effekten betroffen. Cyclophosphamid verursachte ab einer Konzentration von 716,5 μM bzw. 200 $\mu\text{g/ml}$ ein Fehlen der Augenanlage und ein nicht mehr entwicklungsphysiologisch ausgebildetes, d. h. ein verzögert entwickeltes Telenzephalon. Auch Retinol rief (ab 8,73 μM bzw. 2,5 $\mu\text{g/ml}$) bei zwei Drittel der Embryonen einen offenen kranialen Neuroporus hervor. Ab einer Konzentration von 17,46 μM (5,0 $\mu\text{g/ml}$) war hier der Kopfbereich zu 100 % abnorm, wobei das Telenzephalon eine höckerig erscheinende Oberfläche (inklusive mehrerer auffälliger Hämorrhagien und fehlender Augen- und Ohranlagen) aufwies. Bei Albendazol erfolgte eine verminderte Ausbildung des Telenzephalons, wobei das Neuralrohr komplett geschlossen war. Acetylamino-fluoren verursachte ab 223,9 μM bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$ bei einigen Embryonen eine deutliche Ausbildung von Nasenplakoden sowie eine offene Neurulation. Ab einer Konzentration von 895,7 μM (200 $\mu\text{g/ml}$) erschien der Bereich des Telenzephalon nicht mehr deutlich ausgeprägt. Dafür waren bei allen Rattenembryonen stark ausgebildete Nasenplakoden zu sehen, zum Teil mit deutlichen Hämorrhagien. Das Neuralrohr war kranial nicht mehr geschlossen. Die Substanz Valpromid rief hingegen keine mikroskopisch erkennbaren Veränderungen am Telenzephalon hervor.

Typisch für Cyclophosphamid, Valpromid und Acetylamino-fluoren war die unvollständige bzw. keine Rotation des embryonalen Rumpfs („Eichhörnchenhaltung“) ab einer bestimmten Konzentration.

Retinol und Albendazol übten Einfluss auf die Entwicklung der Herzanlage aus. Retinol bewirkte ab 8,73 μM (2,5 $\mu\text{g/ml}$) eine nicht mehr vollständige Ausbildung der Herzanlage, sodass mikroskopisch nur Herzsclläuche, ohne entwicklungsphysiologische Windung zur Herzschleife zu erkennen waren. Für die durch Albendazol hervorgerufenen Veränderungen war das blasenförmig aufgeworfene Perikard charakteristisch.

Retinol zeigte weitere substanzspezifische Veränderungen: die vollständige Verwachsung des Amnions mit dem Rumpf ab einer Konzentration von 17,46 μM bzw. 5,0 $\mu\text{g/ml}$ sowie das verzögerte Wachstum der hinteren Gliedmaßenanlagen und Schwanzanlage bereits ab 8,73 μM (2,5 $\mu\text{g/ml}$). Valpromid verursachte keine konzentrationsabhängigen Veränderungen: Die Embryonen waren trotz hoher Konzentrationen (Bereich von 62,5 bis 500 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,44 bis 3,5 mM) in ihrem Aussehen nicht signifikant verändert, lediglich ein Rückgang der SSL, des Proteingehalts und des Gesamtscores war zu verzeichnen. In den höheren Konzentrationen (ab 0,87 mM) erschienen die Rattenembryonen nicht mehr vollständig gedreht; in der höchsten Konzentration konnte lediglich eine Abnormitätsrate von 80 % (vier von fünf Embryonen) erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der Konzentration hätte eine Überschreitung des DMSO-Anteils erfordert, wodurch keine eindeutige Zuordnung der Fehlbildung – verursacht durch Substanz oder DMSO – mehr möglich gewesen wäre.

5.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch die jeweiligen Substanzpaare

5.2.1 Cyclophosphamid und Acrolein

5.2.1.1 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Cyclophosphamid

Bemerkenswert war, dass in vorangegangenen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen in der WEC (mit Mäuse- und Rattenembryonen) mit nicht-bioaktiviertem Cyclophosphamid keine teratogenen Effekte im Vergleich mit den Kontrollembryonen nachgewiesen werden konnten (Luijten et al., 2008; Ozolins et al., 1995). Erst eine enzymatische Aktivierung der Substanz führte zu einem teratogenen Potenzial und damit zur Verminderung von SSL, Somitenzahl und Dottersackdurchblutung (Ozolins et al., 1995). Wurde Cyclophosphamid durch eine 24-stündige Co-Kultivierung mit primären, maternalen Mäusehepatozyten bioaktiviert, so ließen sich auch die in der vorliegenden Arbeit veränderten Parameter (SSL, Somitenzahl, Dottersackdurchblutung) darstellen (Ozolins et al., 1995). Dies könnte auf den in der hier vorgestellten Arbeit verwendeten Konzentrationsbereich von 178,3 bis 1433,1 μM bzw. 50 bis 400 $\mu\text{g/ml}$ zurückzuführen sein, der deutlich über den getesteten Bereichen der angesprochenen Studien von Luijten und Mitarbeiter und Ozolins und Mitarbeiter lag, sodass eine teratogene Wirkung mit nicht-bioaktiviertem Cyclophosphamid erst in einem höheren Konzentrationsbereich zu beobachten war. Eventuell lassen die in der hier vorgestellten Arbeit beobachteten teratogenen Effekte bei hohen Konzentrationen auch auf eine geringgradige Metabolisierungskapazität des embryonalen Gewebes einschließlich seiner Hüllen schließen (Kraft und Juchau, 1992; Lee et al., 1991).

Tierversuche an Hühnerembryonen und trächtigen Nagetieren, Kaninchen und Affen haben gezeigt, dass Cyclophosphamid während der sensitiven Phase der Organogenese Embryo- und Fetalresorption, Wachstumsverzögerungen und/oder multiple Anomalien wie Enzephalozelen sowie Gliedmaßen- und Skelettdefekte verursacht (Enns et al., 1999; Mirkes, 1995; Park et al., 2009). Die Tiere litten an Fehlbildungen in der Gesichtsregion: Exophthalmus, Gaumen- bzw. Lippenspalte, abnormen Ohren, Mikrotie sowie Mittelgesichtshypoplasie und diversen Anomalien des Zentralnervensystems (Mirkes, 1995; Gilani und Chatzinoff, 1983). Die überwiegend in der Kopfregion lokalisierten Fehlbildungen zeigen eine Parallele zu den in der hier vorgestellten Arbeit gewonnenen Ergebnissen.

Xiao und Mitarbeiter stellten fest, dass sich teratogene Effekte auf das Zentralnervensystem (ZNS) auch nach Schluss des Neuralrohrs durch Cyclophosphamid-induzierte Apoptose manifestieren können (Xiao et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in den hier beschriebenen WEC-Versuchen erzielt werden. Diese wurden vor Schluss des Neuralrohrs angesetzt (Gestationstag 9,5): Durch die Einwirkung der Substanz wurde bei den inkubierten Embryonen der Schluss des Neuralrohrs inhibiert bzw. es zeigten sich offene kraniale Neuropori.

5.2.1.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen durch Cyclophosphamid und Acrolein

Die augenscheinlichste Veränderung durch Cyclophosphamid zeigte sich am Telenzephalon. Zudem sanken alle Parameter kontinuierlich im Versuchsverlauf ab. Der Metabolit Acrolein wurde bereits in einem weitaus niedrigeren Konzentrationsbereich von 6,25 bis 50 µg/ml (111,5 bis 891,8 µM) getestet und rief mikroskopisch erkennbare Veränderungen an den Rattenembryonen hervor. SSL und Proteingehalt sanken ab einer Konzentration von 25 µg/ml deutlich ab. Der teratogene Effekt auf den Dottersack war ab einer Konzentration von 12,5 µg/ml bzw. 222,9 µM zu beobachten: Hier zeigte sich deutlich eine verringerte Vasculogenese (Cyclophosphamid erst ab 358,2 µM bzw. 100 µg/ml). Ab 445,9 µM (25 µg/ml) waren die Dottersäcke sehr klein, leer und teilweise mit höckeriger oder glatter geröteter Oberfläche versehen (100 % abnorm). In der 80/20-Mischung konnte ab 445,5 µM, bei der 50/50-Mischung bereits ab 356,7 µM, ein Einfluss auf die Bildung der Dottersackgefäße festgestellt werden. Acrolein wirkte damit stärker teratogen auf die Vasculogenese des Dottersacks als seine Ausgangssubstanz. Dieser hier in der WEC dargestellte Effekt von Acrolein auf die Entwicklung der Gefäßstruktur wurde von Günther und Mitarbeitern bei der Tumorthherapie mit Cyclophosphamid (2008) diskutiert. Diese konnten in einer *in-vitro*-Studie nachweisen, dass der Metabolit Acrolein einen negativen Effekt auf die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen (durch Zerstörung der endothelialen F-Aktin-Polymerisation und Häufung von Integrin-V3-Rezeptoren an den fokalen Adhäsionspunkten) hat (Günther et al., 2008).

Cyclophosphamid verursachte ab 200 µg/ml (716,5 µM) eine unvollständige Drehung, während sein Metabolit schon ab 25 µg/ml (445,9 µM) bei 50 % der Rattenembryonen eine Rotation des Rumpfes vollständig verhinderte („Eichhörnchenhaltung“). Acrolein zeigte, wie seine Ausgangssubstanz, auch einen Einfluss auf die Entwicklung des Telenzephalons und der Herzanlage: Die Kopfregion erschien ab einer Konzentration von 25 µg/ml (445,9 µM) blasig, die Herzanlage war mikroskopisch nicht mehr deutlich vom Rumpf abgrenzbar. Alle hier beobachteten morphologischen Veränderungen gingen mit den Veröffentlichungen über die Untersuchung von Acrolein von Mirkes und Mitarbeitern und Slott und Hales konform, wobei letztere aber mit einer Konzentration von 80 µM arbeiteten und Fehlbildungen (Größenabnahme, abnorme Flexion der Embryonen, Fehlbildungen der Gehirnregion, der Gesichtsregion, des Herzens, der Somiten und der Vordergliedmaßenanlagen) feststellten (Mirkes et al., 1984; Slott und Hales, 1986).

Bei den hier durchgeführten Versuchen mit Acrolein waren offene kraniale Neuropori auffällig. Bei Zugabe von Cyclophosphamid und Acrolein im Verhältnis 80/20 wurden bei einer Konzentration von 445,5 µM eine abnorme Neurulation (darunter offene kraniale Neuropori) und eine „ramsköpfige“ Ausbildung der Kopfregion beobachtet. In der 50/50-Mischung der Substanzen bestätigten sich die Fehlbildungen aus den vorangegangenen Einzel- und Mischungsversuchen.

Die bei Ozolin und Mitarbeitern festgestellten Veränderungen wurden auf die vorherige Bioaktivierung des Cyclophosphamids zurückgeführt (Ozolin et al., 1995). In den hier durchgeführten Mischungsversuchen, in denen eine Metabolisierung in zwei verschiedenen Raten simuliert wurde (im Verhältnis 80/20 und 50/50 Ausgangssubstanz/Metabolit), ließen sich in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich (5 bis 40 µg/ml) ähnliche Ergebnisse wie bei Ozolin und Mitarbeitern beobachten.

5.2.1.3 Diskussion der therapeutischen Konzentration und ihrer teratogenen Wirkungen mit den in der WEC festgestellten Veränderungen durch Cyclophosphamid und Acrolein

Die Plasmakonzentration von Cyclophosphamid liegt nach intravenöser Gabe von 0,7 g/m² im Mittel bei 27 µg/ml (nach peroraler Verabreichung bei 22,5 µg/ml), wobei eine mittlere Resorptionsquote von 90 % angegeben wurde (Matthias et al., 1984). Diese Werte liegen (selbst im Hochdosisbereich) unterhalb der in der WEC eingesetzten Konzentrationen.

In dem hier beschriebenen Experiment ließen sich erste Effekte bei einer Konzentration von 100 µg/ml Cyclophosphamid erkennen, die sich in einem geringgradigen Rückgang der SSL, der Somitenzahl und der Dottersackdurchblutung niederschlugen. Ein anderer Verlauf war in den Versuchen mit Acrolein bzw. in den Mischungen Cyclophosphamid und Acrolein zu be-

obachten. Acrolein führte ab 12,5 µg/ml (222,9 µM) zu teratogenen Effekten auf Dottersackdurchblutung und Scorewert. Dies war auch in den Mischungsversuchen zu beobachten: Teratogene Effekte traten in der 80/20-Mischung schon ab einer Gesamtkonzentration von 445,5 µM (Anteil Acrolein: 89,1 µM) und in der 50/50-Mischung ab 356,7 µM (Anteil Acrolein: 178,4 µM) auf. Die in den Mischungen verwendeten Konzentrationen liegen im Bereich der in der Humanmedizin gemessenen Plasmawerte (Matthias et al., 1984). Teratogene Effekte der Ausgangssubstanz waren in der vorliegenden Arbeit erst mit Konzentrationen ab 100 µg/ml (358,2 µM) darstellbar.

Möglicherweise schützt der Dottersack den Embryo bei Einbringen der Substanz in die WEC-Serummischung bis zu dieser Konzentration vor signifikanten teratogenen Effekten. Da *in vivo* der Transport des Medikaments auf dem Blutweg direkt zum Embryo erfolgt, ist ein teratogener Effekt auch schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen der Ausgangssubstanz denkbar. Cyclophosphamid durchläuft *in vivo* die Metabolisierung durch den mütterlichen Organismus, daher ist hier zu bedenken, dass Effekte durch Metaboliten, die den Embryo auf den Blutweg ebenfalls erreichen, auch zu teratogenen Veränderungen führen können.

Bei den *in utero* exponierten Embryonen traten ähnliche Veränderungen wie in der WEC auf. Auffällig waren die Fehlbildungen des Zentralnervensystems inklusive Augen bzw. Orbitae und Ohren, wie auch multiple Fehlbildungen der Gliedmaßen (Gupta et al., 2009). Es ist davon auszugehen, dass Cyclophosphamid *in vivo* erst bioaktiviert wird, bevor es seine teratogene Wirkung entfalten kann. Dies lässt sich auch aus einem *in-vitro*-Experiment ableiten, in dem der Einfluss des Metabolismus auf die Effekte des Cyclophosphamids untersucht wurde (Hettwer et al., 2010).

5.2.2 Retinol und all-trans-Retinsäure

5.2.2.1 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Retinol

Luijten und Mitarbeiter untersuchten auch Retinol in einer Konzentration von 1,0 µg/ml in der WEC mit Rattenembryonen und konnten dabei keine Veränderung im Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle feststellen (Luijten et al., 2008). Es findet sich in der Veröffentlichung keine Beschreibung der genauen Vorgehensweise, d. h. des Einbringens der Substanz in das WEC-Medium, so dass aufgrund der hohen Licht- und Sauerstoffempfindlichkeit von Retinol der fehlende teratogene Effekt auf die Embryonen eventuell methodisch erklärt werden kann. Da zu Beginn der hier vorgestellten Versuchsreihe große Schwierigkeiten bestanden das Retinol in das Medium so einzubringen, dass die Ausgangssubstanz nicht verändert bzw. inaktiviert wurde, waren auch hier in den ersten Versuchen keine Effekte auf die Embryonen erkennbar. Erst nach direktem Einbringen der Substanz unter einer Gelblichtquelle

und mit möglichst kurzzeitigem Sauerstoffkontakt waren ab einer Konzentration von 1,0 µg/ml teratogene Effekte auf die Rattenembryonen mikroskopisch nachzuweisen.

Studien aus den Jahren 1991 und 1992 beschäftigten sich mit *WEC*-Rattenembryonen, denen Retinoide (Retinol, all-trans-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure) intraamniotisch verabreicht worden waren und damit die Barriere des Dottersacks und Amnions umgangen wurde (Lee et al., 1991; Kraft und Juchau, 1991; Kraft und Juchau, 1992). Kraft und Juchau vermuteten eine fetale Metabolisierungskapazität, bei der Retinol in all-trans-Retinsäure umgewandelt wurde und damit Voraussetzung für die teratogene Aktivität darstellte. Diese Möglichkeit der embryonalen Metabolisierung von Retinoiden wurde auch von Chen und Mitarbeitern bzw. Chen und Juchau beschrieben (Chen et al., 1995; Chen und Juchau, 1998). Damit würden sich ein teratogener Effekt und die Metabolisierungskapazität des embryonalen Gewebes durch Umwandlung eines Teils des Retinols in all-trans-Retinsäure und andere Metaboliten erklären lassen.

5.2.2.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen durch Retinol und all-trans-Retinsäure

Die hohe teratogene Potenz von Retinol und all-trans-Retinsäure bestätigte sich in den durchgeführten Untersuchungen. Bei Retinol traten bereits ab 1 µg/ml (3,49 µM) Veränderungen auf, die sich in einem Rückgang des Scorewertes niederschlugen. Ab 2,5 µg/ml (17,46 µM) waren Fehlbildungen in der Neurulation und eine verzögerte Entwicklung der Schwanz- und Gliedmaßenanlagen zu beobachten. Die Inkubation mit all-trans-Retinsäure zeigte ab 0,125 µg/ml (0,42 µM) einen Einfluss auf die SSL und die Dottersackdurchblutung. Der Scorewert verringerte sich ab der niedrigsten Konzentration. Auffällig war bei beiden Retinoiden die Affinität zur Neurulation: all-trans-Retinsäure verursachte ab 0,125 µg/ml (0,42 µM) offene kraniale Neuropori, ab 0,5 µg/ml (1,66 µM) fehlte die Augenanlage und es waren vereinzelt Hämorrhagien im Kopfbereich zu erkennen (Foto 7 und 8 auf S. 55). Wie auch die Ausgangssubstanz nahm der Metabolit Einfluss auf die Entwicklung der Gliedmaßen- und Schwanzanlagen und auf die Drehung der Embryonen, wenn auch in einem deutlich niedrigeren Konzentrationsbereich. Ein konzentrationsabhängiger Effekt von Retinoiden auf die Chondrogenese wurde bei Zimmermann und Mitarbeitern nachgewiesen (Zimmermann et al., 1985). Ab einer Konzentration von 1,0 µg/ml (3,33 µM) all-trans-Retinsäure waren in der vorliegenden Studie alle Embryonen abnorm.

Kraft und Juchau stellten nach Inkubation der Rattenembryonen mit all-trans-Retinsäure (0,25 µg/ml) und Retinol (4 µg/ml) ebenfalls fehlende Augenblasen und eine abnorme Achsenrotation fest (Kraft und Juchau, 1992). Kraft und Juchau testeten die Retinoide in der *WEC*, allerdings injizierten sie diese intraamniotisch, so dass eine Metabolisierung seitens des embryonalen Gewebes (Fruchthüllen) minimiert wurde. Kraft und Juchau machten die

Umwandlung von Retinol in all-trans-Retinsäure hauptverantwortlich für die teratogenen Effekte. Im 50/50-Mischungsversuch zeigte sich auch in der hier durchgeführten Studie eine deutliche Linksverschiebung der Konzentration-Effekt-Beziehung: Die Kombination von Retinol und all-trans-Retinsäure war toxischer als die jeweiligen Einzelsubstanzen. Dies ist höchstwahrscheinlich Folge einer Erhöhung des Anteils an all-trans-Retinsäure aufgrund der embryonalen Metabolisierungskapazität von Dottersack, Amnion- und Embryonalgewebe.

Denkbar wäre auch eine Konkurrenz um Bindungsproteine in der Serummischung als Erklärung für die beobachtete Potenzierung des Effekts. Retinol wird in großen Teilen eng an das Plasmaretinolbindungsprotein (RBP) gebunden (Newcomer et al., 2000), während all-trans-Retinsäure hauptsächlich an das Carrierprotein Humanes Serumalbumin (HSA) fixiert vorliegt (Maiti et al., 2006). Ob hier eine wechselseitige Verdrängung aus der Bindung stattfindet und dadurch eine höhere Toxizität zustande kommt, ist in der hier vorliegenden Studie nicht untersucht worden. Das 80/20-Mischungsverhältnis lag in der grafischen Darstellung mit der all-trans-Retinsäure gleich auf. Eine höhere Toxizität als im Einzelversuch mit all-trans-Retinsäure ließ sich nicht erkennen, so dass keine Potenzierung der teratogenen Wirkung ersichtlich war. Eventuell befand sich endogenes Retinol bzw. all-trans-Retinsäure in der Serummischung, so dass eine Erhöhung der teratogenen Potenz durch dieses in Betracht zu ziehen ist.

Welchen Einfluss das Begasungsregime bzw. die Temperatur auf die beiden Substanzen hatte, ist ungeklärt. Es besteht die Möglichkeit, dass es hier zur Metabolisierung bzw. Bildung von Zerfallsprodukten kam, die Auswirkungen auf die Embryonen hatten.

5.2.2.3 Diskussion der therapeutischen Konzentration und ihrer teratogenen Wirkungen mit den in der WEC festgestellten Veränderungen durch Retinol und all-trans-Retinsäure

Retinol und all-trans-Retinsäure erwiesen sich in der hier durchgeführten WEC schon in geringen Konzentrationen als hochpotente Teratogene (Retinol ab 1,0 µg/ml und all-trans-Retinsäure ab 0,125 µg/ml). Die gemessenen endogenen Plasmakonzentrationen von Vitamin A und seinen Metaboliten lagen bei Frauen im ersten Trimenon in vergleichbaren Konzentrationsbereichen wie sie in der WEC getestet wurden (Wiegand et al., 1998). Dass es sich hierbei um scheinbar physiologische Konzentrationsbereiche handelt, die keine kongenitalen Fehlbildungen verursachten, während in der WEC schon in diesem Konzentrationsbereich Veränderungen nachgewiesen werden konnten, bietet mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Hauptsächlich spielen wahrscheinlich Speziesunterschiede eine Rolle (Cohan, 1953; Wiegand et al., 1998). Denkbar ist aber auch eine – wie bereits unter **Punkt 5.2.2.2** beschriebene – Interaktion mit dem verwendeten Serum bzw. eine geringgradige Metabolisierungskompetenz des embryonalen Gewebes (siehe **Punkt 5.2.2.1**), was zu einer Wirkungs-

verstärkung geführt haben könnte. Vor allem bei den Mischungen ist die Potenzierung der Wirkung zu beachten.

Die teratogenen Effekte bei *in utero* exponierten Kindern (Robertson et al., 1985; Camera et al. 1992; Barbero et al., 2004; Ishijima und Sando, 1999) waren, wie auch in der *WEC* mit Rattenembryonen, vor allem auf die Entwicklung des ZNS, der Augen und Ohren gerichtet.

5.2.3 Valpromid und Valproinsäure

5.2.3.1 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Valpromid

Valpromid gilt im Gegensatz zu seinem Metaboliten Valproinsäure als Substanz mit schwacher teratogener Potenz (Radatz et al., 1998). Radatz und Mitarbeiter injizierten subkutan am Tag 8 tragenden Mäusen jeweils 3 mmol/kg Valpromidsuspension. Die am 18. Gestationstag untersuchten Mäuseembryonen wiesen zu (nur) 6 % Exenzephalien auf (Radatz et al., 1998). Dies entspricht den Ergebnissen der hier beschriebenen Arbeit. Die auftretenden Veränderungen unter Valpromidinkubation waren auch hier eher unspezifisch: In aufsteigender Konzentration (62,5 bis 600 µg/ml) war zwar ein kontinuierlicher Rückgang der SSL, des Proteingehalts und der Dottersackdurchblutung feststellbar, jedoch keine substanzspezifischen Veränderungen wie Fehlbildungen im Kopfbereich oder in der Neurulation. Eine Dysmorphogeneserate von 80 % trat erst in der höchsten Konzentration auf. Luijten und Mitarbeiter konnten ebenfalls keine nennenswerten teratogenen Effekte in der *WEC* mit Rattenembryonen nach einer 48-stündigen Inkubation der Embryonen mit 300 µg/ml Valpromid feststellen (Luijten et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnten Effekte in Konzentrationen ausgelöst werden, die über dem von Luijten und Mitarbeitern untersuchten Konzentrationsbereich lagen. Möglicherweise kommt es in höheren Konzentrationen zu einem ausreichenden Abbau der Ausgangssubstanz zu Valproinsäure, welches auf die Rattenembryonen in der *WEC* teratogen wirkt.

5.2.3.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen durch Valpromid- und Valproinsäureinkubation

Im Gegensatz zu seiner Ausgangssubstanz rief Valproinsäure ab der niedrigsten Konzentration (50 µg/ml bzw. 0,3 mM) Effekte bei den Embryonen hervor. Diese Veränderungen waren deutlich spezifischer als bei Valpromid. Am stärksten waren der Kopfbereich (keine physiologische Ausbildung des Telenzephalons ab einer Konzentration von 150 µg/ml bzw. 0,9 mM) und die Achsenrotation der Embryonen betroffen. Ab 200 µg/ml (1,2 mM) waren die Somiten mikroskopisch nicht mehr voneinander abgrenzbar, die Embryonen waren nicht mehr gedreht („Eichhörnchen“), die kranialen und kaudalen Neuropori waren nicht geschlossen und das Neuralrohr zeigte sich kaudal als eine „geschlängelte Linie“ (100 % Abnormitätsrate).

Radatz und Mitarbeiter konnten in ihren Versuchen mit Mäusen Veränderungen in Form von Enzephalozelen, reduziertem Fetalgewicht und einer erhöhten Embryoletalität bei Valproinsäure feststellen (Radatz et al., 1998).

Bruckner und Mitarbeiter konnten ab einer Konzentration von 150 µg/ml Valproinsäure Veränderungen an Mäuseembryonen (an den Somiten, der Rotation der Embryonen und den Dottersackparametern) beobachten. Bei 185 µg/ml Valproinsäure war ein normaler Schluss der Neuropori nicht mehr gegeben und ab 375 µg/ml zeigten sich Exenzephalien und offene Neuralspalten. In den eigenen Versuchen konnte, wie bei Bruckner und Mitarbeitern, ein Einfluss auf die Dottersackparameter festgestellt werden (Bruckner et al., 1983). Dieser war hier bei 200 µg/ml zu 100 % abnorm.

In der Literatur wird daher von einer allenfalls nur geringgradigen teratogenen Potenz des Valpromids ausgegangen. Vielmehr wird der Metabolit Valproinsäure für die Veränderungen am embryonalen Gewebe verantwortlich gemacht. Die geringen Effekte durch Valpromid in der *WEC* mit Rattenembryonen könnten daher auf eine geringe Metabolisierungskompetenz des Embryos und seiner Hüllen zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse der 80/20- und 50/50-Mischungen wiesen ebenfalls in diese Richtung. So war bei einer Erhöhung der Valproinsäurekonzentration eine Linksverschiebung der Konzentrationswirkungskurve zu beobachten, die jedoch die Ergebnisse aus den Einzelversuchen mit Valproinsäure nicht erreichen konnte, sodass es zu keiner kumulierenden bzw. potenzierenden Wirkung bei den Mischungsversuchen kam.

5.2.3.3 Diskussion der therapeutischen Konzentration und ihrer teratogenen Wirkungen mit den in der *WEC* festgestellten Veränderungen durch Valpromid und Valproinsäure

In der Humanmedizin wird Valproinsäure als Therapeutikum häufig angewandt, sein Prodrug spielt als Pharmakon dagegen eher nur eine geringe Rolle (Wasserman et al., 2001). Der pharmakologisch effektive Bereich von Valproinsäure liegt im Allgemeinen zwischen 40 und 100 µg/ml (Fachinformation Ergenyl[®], 2011).

Morphologische Veränderungen wie Neuralrohrdefekte, insbesondere Spina bifida (Bialer et al., 1984; Ornoy, 2009) durch Valproinsäure, können in der *WEC* in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich von 50 bis 200 µg/ml (0,3 bis 1,2 mM) in Form von offenen kranialen und kaudalen Neuropori sowie entwicklungsverzögertem Telenzephalon und nicht mehr voneinander abgrenzbaren Somiten beobachtet werden. Bialer und Mitarbeiter beschrieben Speziesunterschiede zwischen Mensch, Hund und Ratten im Valpromid-Metabolismus (Bialer et al., 1984). Die hier durchgeführten *WEC* mit Rattenembryonen kamen zu ähnlichen Ergebnissen (in der Art der Veränderungen bzw. Fehlbildungen der Embryonen) wie in Fall-

studien der Humanmedizin dokumentiert (Ornoy, 2009). In beiden Mischungsversuchen war erwartungsgemäß eine Abnahme des teratogenen Potenzials durch den hohen Valpromidanteil zu beobachten, was die Aussage, Valpromid wirke beim Menschen nicht teratogen (Wasserman et al., 2001), stützt.

5.2.4 Albendazol und Albendazolsulfoxid

5.2.4.1 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Albendazol

Die teratogenen Effekte von Albendazol bezogen sich vor allem auf die Entwicklung des Telenzephalons (jedoch ohne den Schluss des Neuralrohrs zu beeinflussen), die Ausbildung der Somiten und der Herzanlage (blasenförmiges Perikard). Zusätzlich bewirkte Albendazol eine Abnahme der SSL und des Proteingehalts. In den hier durchgeführten WEC-Versuchen wurde am Tag 9,5 die Ausgangssubstanz in das Kulturmedium eingebracht. Im Tierversuch mit tragenden Ratten konnten Cristofol und Mitarbeiter nachweisen, dass nach oraler Verabreichung von Netobimin (dessen wichtigster Metabolit Albendazol ist) in Dosen von 50, 59,5 und 70,7 mg/kg am Tag 10 der Trächtigkeit ein dosisabhängig abnehmendes Fetalgewicht und nicht genauer quantifizierte externe sowie skelettale Fehlbildungen auftraten (Cristofol et

5.2.4.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen durch Albendazol- und Albendazolsulfoxidinkubation

Die Metabolisierung des Albendazols führt zur Entgiftung der Substanz, deren Sulfoxidmetabolit *in vitro* eine bis zu 50-fach geringere teratogene Potenz als die Ausgangssubstanz aufweist (Whittaker und Faustman, 1991; Velik et al., 2005). Die hier durchgeführten Versuche zeigten eine bis zu fünffach höhere embryotoxische Potenz des Albendazols gegenüber seinem Metaboliten. Auch der bis zu zehnmal niedrigere Konzentrationsbereich von Albendazol indizierte bereits, dass sein teratogenes Potenzial das seines Metaboliten um ein Vielfaches übersteigt. Während die Ausgangssubstanz vor allem die Entwicklung der Herzanlage und des Telenzephalons beeinflusste (schon ab 0,1 µg/ml), waren beim Metaboliten erst ab 1 µg/ml Effekte auf die Entwicklung der Augen- und Ohranlagen zu beobachten und ab 5 µg/ml auf die Rotation der Embryonen, die Neurulation, den Kopfbereich und die Herzentwicklung.

Die Mischungsversuche verdeutlichten die höhere embryotoxische Potenz des Albendazols, indem sowohl die Ergebnisse aus der Bewertung des Scores als auch der Dismorphogenerate der 80/20- und 50/50-Mischung denen der Ausgangssubstanz glichen. Beide Substanzen führten konzentrationsabhängig zu einer Depression des Proteingehalts, was Cristofol und Mitarbeiter bei Ratten (Gestationstag 20) nach Exposition *in utero* mit Albendazol und seinen Metaboliten ebenso feststellten. Diese beobachteten (wie auch Capece und Mitarbei-

ter im Tierversuch mit tragenden Ratten) bei allen Substanzen einen Einfluss auf die Entwicklung des Skeletts (Cristofol et al., 1997; Capece et al., 2003), was in der *WEC* in dieser Form aufgrund des Entwicklungsstadiums nicht darstellbar war. Lediglich bei einer Albendazolsulfoxidkonzentration von 5 µg/ml waren die Somiten nicht mehr zählbar, was Effekte auf die Entwicklung des Skelettsystems und der Muskulatur wahrscheinlich macht.

5.2.4.3 Diskussion der therapeutischen Konzentration und ihrer teratogenen Wirkungen mit den in der *WEC* festgestellten Veränderungen durch Albendazol und Albendazolsulfoxid

Der Sulfoxid-Metabolit von Albendazol weist eine wesentlich niedrigere teratogene Potenz im Vergleich zu seiner Ausgangssubstanz auf. Dies konnte auch durch die 80/20- und 50/50-Mischungen verdeutlicht werden. Es findet eine „Entgiftung“ der Ausgangssubstanz statt (Whittaker und Faustman, 1991; Velik et al., 2005). Der in der *WEC* getestete Konzentrationsbereich von Albendazol (0,01 bis 1,0 µg/ml) entspricht dem durchschnittlichen Plasmaswert (0,9 µg/ml) des Menschen nach einer Dosis von 15 mg/kg bei einer Neurozystosis-Behandlung (Jung et al., 1990). Nach einer Nüchterngabe von 400 mg Albendazol oral werden im Plasma der Patienten Konzentrationen von ca. 0,2 µg/ml Albendazolsulfoxid gemessen. Zusammen mit fettreicher Kost steigt die Bioverfügbarkeit etwa um das Fünffache an (Fachinformation Eskazole[®], 2010).

Bei *in-vivo*-Studien an Ratten und anderen Tieren wird das Sulfoxid für die teratogenen Effekte verantwortlich gemacht, da der Metabolismus von Albendazol zu seinem Metabolit sehr rasch erfolgt und das Sulfoxid damit in höheren Plasmakonzentrationen vorliegt (Cristofol et al., 1997; Capese et al., 2003).

Während im Tierversuch mit tragenden Ratten (Cristofol et al., 1997; Capese et al., 2003) wie auch in der hier durchgeführten *WEC*-Studie Albendazol und Albendazolsulfoxid zu Fehlbildungen führte, gelten die Ausgangssubstanz und ihr Metabolit beim Menschen bisher als nicht-teratogen (Cowden et al., 2000; Gyapong et al., 2003; Gyorkos et al., 2006; Ndibazza et al., 2010). Laut Fachinformation darf das Arzneimittel allerdings nicht bei Schwangeren angewandt werden (Fachinformation Eskazole[®], 2010).

5.2.5 Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren

5.2.5.1 Diskussion der morphologischen Veränderungen verursacht durch Acetylaminofluoren

In Studien von Faustman-Watts und Mitarbeitern (1983) sowie Luijten und Mitarbeitern (2008) konnte ein teratogenes Potenzial ohne vorherige Aktivierung durch S9-Fraktion und Cofaktoren der Monooxygenase nicht nachgewiesen werden (Konzentrationsbereich von 0 bis 75 µg/ml bei Faustman-Watts und Mitarbeitern bzw. 150 µg/ml bei Luijten und Mitarbeitern). In der hier vorliegenden Arbeit konnte schon ab einer Konzentration von 100 µg/ml der Substanz ohne vorherige Aktivierung ein teratogener Effekt (Verringerung der Dottersackdurchblutung) auf die inkubierten Rattenembryonen festgestellt werden. Zudem zeigte Acetylaminofluoren einen deutlichen Effekt auf die Entwicklung des Neuralrohrs. Möglicherweise ist dieser Effekt durch den früheren Inkubationsbeginn (Tag 9,5) zu erklären. Luijten und Mitarbeiter inkubierten die Rattenembryonen ab Tag 10 der Gestation über 48 Stunden bzw. Faustman-Watts und Mitarbeiter ab Tag 11, was zu einer Unempfindlichkeit der Rattenembryonen gegenüber der Substanz geführt haben könnte (Luijten et al., 2008; Faustman-Watts et al., 1983).

5.2.5.2 Diskussion der morphologischen Veränderungen durch Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren

Ab 50 µg/ml zeigte AAF einen teratogenen Effekt auf die Embryonen (abnorme Haltung, Nasenplakoden, offener kranialer Neuroporus). Die Entwicklung der Dottersackgefäße war ab 100 µg/ml verändert. Das embryotoxische Potenzial seines Metaboliten N-OH-AAF war schon ab 1,0 µg/ml festzustellen: Hier war ein Einfluss auf die Kopfreion sichtbar. Ab 2,5 µg/ml war das Telenzephalon nicht mehr ausgebildet, Nasenplakoden waren zu erkennen und der Dottersackparameter war statistisch signifikant. In den Konzentrationen ab 10 µg/ml war die unvollständige Rotation ein weiteres Merkmal der Dysmorphogenese.

Faustman-Watts sowie Luijten und Mitarbeiter konnten, ohne vorherige Aktivierung durch eine S9-Fraktion und Cofaktoren für die Monooxygenase, keinen Effekt durch die Ausgangssubstanz auf die Embryonen feststellen (Faustman-Watts et al.; 1983; Luijten et al., 2008). Der Metabolit verursachte Fehlbildungen, die mit den in diesem Experiment aufgetretenen Veränderungen vergleichbar waren: ventrolaterale Protusion und Prosenzephalonhypoplasie. Die Neurulation war, wie auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigten, nicht betroffen (Faustman-Watts et al., 1983; Faustman-Watts et al., 1984; Faustman-Watts et al., 1985).

Die Mischungsversuche verliefen erwartungsgemäß analog der Einzeltestungen. Das höhere embryotoxische Potenzial des Metaboliten verursachte eine Linksverschiebung in der Konzentrationswirkungskurve. Die verursachten Fehlbildungen entsprachen den in den Einzelsubstanzuntersuchungen aufgetretenen in Qualität und Lokalisation.

5.2.5.3 Diskussion der therapeutischen Konzentration und ihrer teratogenen Wirkungen mit den in der WEC festgestellten Veränderungen durch Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren

Da es sich bei dem Substanzpaar um Modellsubstanzen zur Kanzerogenese und nicht um Medikamente handelt, ist eine Diskussion der Konzentrationsbereiche und ihrer Wirkungen im therapeutischen Bereich bei Mensch oder Tier nicht möglich.

5.3 Schlussfolgerungen aus den Einzel- und Mischungsversuchen in der WEC mit Rattenembryonen

Insgesamt war bei der Auswertung der Ergebnisse der 80/20- und 50/50-Mischungen eine gute Anwendbarkeit für Substanzpaare, bestehend aus Ausgangssubstanz und ihrem Metaboliten, zu erkennen. Dabei spiegelte die WEC das embryotoxische bzw. teratogene Potenzial der Substanzen sehr gut wieder, da die Ergebnisse meist mit den gefundenen *in-vivo*-Daten korrelierten. In der WEC mit Rattenembryonen kann sowohl eine Toxifizierung (Retinol/all-trans-Retinsäure), als auch eine Entgiftung, wie am Beispiel von Albendazol, dargestellt werden.

Der Einsatz der Mischungen sollte dazu dienen, einen unvollständigen Umsatz von Ausgangsstoff zu Metabolit zu simulieren, wie es auch *in vivo* (durch den maternalen Metabolismus) realistisch wäre. Interessant war vor allem, dass die in der WEC mit Rattenembryonen eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanzen weitgehend im Bereich der in der Humanmedizin gemessenen Serumkonzentrationen lag, so dass eine gute Vergleichbarkeit mit *in-vivo*-Studien bestand.

Die Endergebnisse des gesamten BMBF-Projekts lassen auf eine gute Integrierbarkeit eines Metabolisierungssystems in die WEC schließen. Dadurch wird die Untersuchung von Ausgangssubstanzen und deren (evtl. teratogen wirkenden) Metaboliten in einem *in-vitro*-System ermöglicht. Vor allem für die Substanzen Albendazol und Cyclophosphamid konnte ein signifikanter Stoffumsatz bei Präinkubation in WEC-Medium (Serummischung und HBSS) mit Ratten- und Schweine-Hepatozyten und anschließender Überführung in die WEC (d. h. Einsatz von 92,5 % präinkubierten Hepatozytenüberstand und 7,5 % HBSS) dargestellt werden und damit eine grundsätzliche Eignung der Kombination von Metabolisierungssystemen mit der WEC bestätigen.

6. Zusammenfassung: Untersuchung von fünf Fremdstoffen und deren Hauptmetaboliten allein und in Kombination in der *Whole Embryo Culture (WEC)* mit Rattenembryonen

Einleitung: Ziel des BMBF-Verbundprojektes war die Weiterentwicklung bereits etablierter Alternativmethoden zum Tierversuch unter dem Titel: „Entwicklung eines Biotransformationssystems für die metabolische Aktivierung von validierten *in-vitro*-Systemen zur Prüfung auf Embryotoxizität“. In der in diesem Rahmen entstandenen Dissertation wurden als embryotoxisch bekannte Substanzen und ihre Metaboliten (Cyclophosphamid/Acrolein, Retinol/all-trans-Retinsäure, Valpromid/Valproinsäure, Albendazol/Albendazolsulfoxid, Acetylamino-fluoren/N-Hydroxy-Acetylamino-fluoren) in der *Whole Embryo Culture (WEC)* mit Rattenembryonen verwendet, um im Vorfeld der Metabolisierungsversuche durch Einzeluntersuchung und Mischung der Substanzpaare (im Verhältnis 80/20 und 50/50) den maternalen Metabolismus zu simulieren und die Wirkung der einzelnen Substanzen und deren Mischungen auf den Embryo detailliert darzustellen.

Material und Methoden: Die Substanzen wurden zuerst jeweils einzeln in ansteigenden Konzentrationen und dann mit ihrem dazugehörigen Metaboliten im Mischungsverhältnis 80/20 und 50/50 in der *WEC* (Gestationstag 9,5) unter einem definierten Gaspartialdruck bei 38,5 °C für 48 Stunden in einem rotierenden System inkubiert. Danach wurden die Beobachtungen anhand des morphologischen Scoring-Schemas unter der Stereolupe ausgewertet.

Ergebnisse: Die fünf untersuchten Ausgangssubstanzen – Cyclophosphamid, Retinol, Valpromid, Albendazol und Acetylamino-fluoren – entstammen unterschiedlichen Substanzgruppen, jedoch ließen sich Parallelen in den hervorgerufenen Fehlbildungen bei Rattenembryonen in der mikroskopischen Auswertung beobachten. Alle Ausgangssubstanzen riefen mit jeweils aufsteigender Konzentration eine Reduzierung der Scheitel-Steiß-Länge, des Proteingehalts, der Ausprägung der Dottersackdurchblutung und einen Rückgang des Scorewertes hervor. Meist war auch eine Abnahme der Somitenzahl zu verzeichnen. Im Detail ließen sich substanzspezifische Veränderungen erkennen. Von den teratogenen Effekten der einzelnen Substanzen war hauptsächlich der Kopfbereich, insbesondere die Entwicklung des Telenzephalons betroffen. Cyclophosphamid verursachte ab einer Konzentration von 200 µg/ml (716,5 µM) ein Fehlen der Augenanlage und ein nicht mehr entwicklungsphysiologisch ausgebildetes, d. h. ein verzögert entwickeltes Telenzephalon. Auch Retinol rief (ab 2,5 µg/ml bzw. 8,7 µM) Veränderungen an der Kopfregion hervor: Bei 66,6 % der Embryonen zeigte sich ein offener kranialer Neuroporus. Ab einer Konzentration von 5,0 µg/ml (17,5 µM) war dieser Bereich zu 100 % abnorm, das Telenzephalon zeigte eine höckerig erscheinende Oberfläche und mehrere auffällige Hämorrhagien; Augen- und Ohranlagen fehlten ab dieser Konzentration vollständig. Bei Albendazol erfolgte eine verminderte Ausbildung des Telenzephalons, wobei das Neuralrohr komplett geschlossen war. Acetylamino-fluoren verursachte ab 50 µg/ml bzw. 223,9 µM teilweise deutliche Nasenplakoden und eine offene Neurulation. Ab einer Konzentration von 200 µg/ml (895,7 µM) war das Telenzephalon nicht mehr zu er-

Zusammenfassung

kennen, dafür waren bei allen Rattenembryonen deutlich ausgebildete Nasenplakoden zu sehen, die teilweise hämorrhagisch durchsetzt waren. Das Neuralrohr war kranial offen. Die Substanz Valpromid rief hingegen keine mikroskopisch erkennbaren Veränderungen am Telenzephalon hervor. Für Cyclophosphamid, Valpromid und Acetylaminofluoren war die nicht mehr vollständige Drehung des Rumpfes bzw. die als abnorm zu wertende „Eichhörnchenhaltung“, bei der keine Rotation des embryonalen Rumpfes mehr stattfand, eine typische Fehlbildung der Rattenembryonen. Ebenso war ein Einfluss auf die Entwicklung der Herzanlage durch Retinol und Albendazol zu beobachten. Retinol bewirkte ab 2,5 µg/ml (8,7 µM) eine nicht mehr vollständige Ausbildung der Herzanlage, so dass mikroskopisch nur Herzschläuche ohne entwicklungsphysiologische Windung zur Herzschleife zu erkennen waren. Charakteristisch für die durch Albendazol hervorgerufenen Veränderungen war das blasenförmig aufgeworfene Perikard. Weitere substanzspezifische Veränderungen waren bei Retinol die vollständige Verwachsung des Amnions mit dem Rumpf ab einer Konzentration von 5,0 µg/ml bzw. 17,5 µM sowie das verzögerte Wachstum der hinteren Gliedmaßenanlagen und Schwanzanlage bereits ab 2,5 µg/ml (8,7 µM). Nach Inkubation mit Valpromid in höheren Konzentrationen erschienen die Rattenembryonen nicht mehr vollständig gedreht; in der höchsten Konzentration waren die meisten Embryonen dysmorph. Die Versuche mit den 80/20- und 50/50-Mischungen der jeweiligen Substanzpaare verliefen im Ergebnis überwiegend erwartungsgemäß, d. h. entsprechend ihrer Toxizitätsergebnisse aus den Einzeluntersuchungen.

Diskussion: Im Vergleich der jeweiligen Ausgangssubstanzen mit ihrem Metabolit zeigten sich Veränderungen an den Embryonen meist in den gleichen Körperregionen und ähnelten den in der Literatur beschriebenen Effekten. Auffällig war vor allem bei Retinol und seinem Metaboliten all-trans-Retinsäure, dass in beiden Mischungen eine deutlich erhöhte Toxizität im Vergleich zu den Einzelsubstanzuntersuchungen zu beobachten war. Schon ab der zweithöchsten Konzentration (0,83 µM) in der 80/20-Mischung waren offene kraniale Neuropori und eine nur unvollständige Rotation des Rumpfes festzustellen, während im Einzelversuch mit dem Metaboliten statistisch signifikante Veränderungen erst ab 1,66 µM bzw. 0,5 µg/ml auftraten. In der 50/50-Mischung war diese Entwicklung noch auffälliger: Hier waren schon ab 0,33 µM (0,1 µg/ml) eine unvollständige Drehung und offene Neuropori zu erkennen. Ein gegenteiliges Ergebnis wies die Albendazol/Albendazolsulfoxid-Kombination auf: Hier war der Metabolit weniger wirksam. Dementsprechend waren die beiden Mischungen deutlich weniger toxisch und damit auch weniger teratogen als die Ausgangssubstanz.

Schlussfolgerung: Die WEC mit Rattenembryonen eignet sich für die Untersuchung verschiedener Substanzen in Mischung, vor allem für die Simulation der maternalen Metabolisierungskapazität. Diese Ergebnisse können als Grundlage für die zukünftige Integration eines realen Metabolisierungssystems in die WEC genutzt werden.

7. Summary: Study of various xenobiotics in the *Whole Embryo Culture (WEC)* with rat embryos

Introduction: The aim of the BMBF-project “Development of a biotransforming system for the metabolic activation of validated *in-vitro*-systems to assess embryotoxicity” is to further develop already established alternative methods for animal testing. In this dissertation, embryotoxic substances and their metabolites (cyclophosphamide/acrolein, retinol/all-trans-retinoic acid, valpromide/valproic acid, albendazole/albendazole sulfoxide, acetylaminofluorene/N-hydroxy-acetylaminofluorene) have been tested in the *WEC* with rat embryos to simulate the maternal metabolism and to establish precise concentration-response-curves, followed by examination of substance combinations (in 80/20 and 50/50 ratios) on the embryo.

Substances and methods: First, the substances were tested at increasing concentrations and then combined with their associated metabolite as part of a 80/20 and 50/50 ratio, in the *WEC* with rat embryos (9,5 days old). The embryos were incubated under defined conditions in a rotating system for 48 hours and the results were evaluated on the basis of a morphologic scoring system.

Results: The five examined substances (cyclophosphamide, retinol, valpromide, albendazole, acetylaminofluorene) originate from different substance groups, however, they displayed similarities in the evoked malformations of rat embryos. With increasing concentrations, all substances led to a reduction of size, protein content, somites, and yolk sac vasculogenesis and a decrease in scoring parameters. More specifically, substance-specific alterations were detected. Mostly, the development of the telencephalon was affected. From a concentration of 200 µg/ml (716,5 µM) upward, cyclophosphamide led to the missing of the eye anlage and a stunted telencephalon. Retinol caused also alterations of the telencephalon (at 2,5 µg/ml / 8,73 µM): 66,6 % of the embryos had an open cranial neuroporus. At a concentration of 5,0 µg/ml (17,5 µM), 100 % of the embryos were abnormal, the telencephalon displayed an uneven surface and several hamorrhagies; the eye- and ear anlagen were completely missing. Albendazole caused an impaired development of the telencephalon, but with a closed neural tube. Acetylaminofluorene (50 µg/ml bzw. 223,9 µM) led to the development of placodes of the nose and open neural tubes. At a concentration of 200 µg/ml (895,7 µM) or higher, the telencephalon did not exist anymore, but placodes of the nose and hamorrhagies could be found in all rat embryos. The cranial neural tube was open. Valpromide did not cause any microscopically visible alterations of the telencephalon. Characteristic for cyclophosphamide, valpromide and acetylaminofluorene was the incomplete rotation of the trunk, causing a “squirrel-like” position. Retinol and albendazole showed an effect on the heart. At 2,5 µg/ml, retinol caused an incomplete amnion development, displaying microscopic malfunctions of the cardiac loop, and albendazole caused a malformation of the pericard. Characteristically, retinol also caused a complete adhesion of amnion and trunk at a concentration of 5 µg/ml (17,5 µM). At 2,5 µg/ml (8,7 µM) the composition of the hind

Summary

limbs and tail was retarded. Valpromide did not induce specific or characteristic malformations. At higher concentrations, the rat embryos did not completely rotate, and at the highest tested concentration, most embryos were malformed. The 80/20 and 50/50 combinations of most of the substances caused effects and were in agreement with the results observed with compounds when tested alone.

Discussion: Comparing the test compounds with their metabolites, alterations of the rat embryos were found to be mostly in the same body parts and similar to effects described in earlier publications. Most notably was the higher toxicity found among the retinol/all-trans-retinoic acid-combination in comparison to the testings of retinol and its metabolite alone. At the second concentration (0,83 μM) of 80/20 combination, open cranial neuropori and an incomplete rotation of the trunk was visible, while by testing retinol and its metabolite alone, statistically significant alterations occurred only at concentrations of 1,66 μM and higher. This effect was even more pronounced with the 50/50 combination: The first alterations (incomplete rotation and open neuropori) were already observed at levels of 0,33 μM (0,1 $\mu\text{g/ml}$). Converse results, however, were found with albendazole/albendazole sulfoxide combination. The metabolite was less toxic than the parent compound. As a result, both combinations displayed less pronounced effects than the parent substance alone.

Conclusion: The *WEC* with rat embryos is appropriate for analysing various substances in combination, thus simulating the situation induced by maternal metabolic activity. The results will be an essential prerequisite for the development and integration of a metabolizing system into the *WEC*.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
AAF	Acetylaminofluoren
Abb.	Abbildung
ABZ	Albendazol
ABZSO	Albendazolsulfoxid
ACR	Acrolein
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CD-1 [®] -Maus	Mehrzweck-Forschungstiermodell, das in den Feldern Toxikologie, Alterungsprozess und Onkologie eingesetzt werden kann.
CNS	Mittelhirnzellen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Cyclophosphamid
CYP-P450	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EST	Embryonaler Stammzelltest / Embryonic Stem Cell Test
EUROCAT	European Surveillance of Congenital Anomalies
evtl.	eventuell
FMO	Flavinmonooxygenase
GST	Gluthation-S-Transferase
g	Gramm
HSA	Humanes Serumalbumin
HBSS-Lösung	Hank's Buffered Salt Solution
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICMAX	Niedrigste in der WEC getestete Konzentration bei der 100 % der Embryonen abnorm waren
ICCVAM	Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods
I.E.	Internationale Einheit
Mio.	Million
MMT	Micromass Test
mg	Milligramm

Anhang

µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
µM	Mikromol
MMT	Zytotoxizitätstest
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
N-AAAF	N-Acetoxy-2-Acetylaminofluoren
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NIH	National Institutes of Health
NMRI-Mäuse	Herkunft aus dem Naval Medical Research Institute
NOAEL	no observed adverse effect level
N-OH-AAF	N-Hydroxy-Acetylaminofluoren
kg	Kilogramm
LB	Limb-Bud-Zellen
LOAEL	lowest observed adverse effect level
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
RA	Retinsäure (retinacid)
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals (Registrierung, Bewertung und Zulassung von Chemikalien)
ROH	Retinol
S.	Seite
SD	Standardabweichung
SPF	spezifisch pathogenfrei
Tab.	Tabelle
Upm	Umdrehungen pro Minute
VMD	Valpromid
VPA	Valproinsäure
WEC	Whole Embryo Culture
WHO	World Health Organisation
ZEBET	„Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch“ am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin
ZNS	Zentrales Nervensystem
7-OH-AAF	7-Hydroxy-Acetylaminofluoren
2-AAF	2-Acetylaminofluoren

8.2 Geräte und Chemikalien

8.2.1 Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Auswertungsprogramm	Microplate Manager 4.0	Biorad, Hercules, USA
Dekapitator	Mod. 130	Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland
Digitalkamera	E995	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Gasmischer	KM 30-3 SE SO	Witt-Gastechnik, Witten, Deutschland
Grafikprogramm	Adobe Photoshop CS4 Extended Version 11.0	Adobe, San Jose, USA
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kaltlichtquelle	KL 1500	Schott Glaswerke, Wiesbaden, Deutschland
Kreisschüttler	IKA KS 125 basic	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Plattenphotometer	Microplate Reader 3550	Biorad, München, Deutschland
Präzisionsbrutschrank	B 15	Memmert, Schwabach, Deutschland
Präzisionswaage	Analytic, A200S	Sartorius, Ratingen, Deutschland
Reine Werkbank	Laminar Air, TL 2448	Heraeus, Osterode, Deutschland
Statistikprogramm	PASW Statistics 18	SPSS, Chicago, USA
Stereolupe	Stemi 2000-C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Stereolupe	Stemi SV 8	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Anhang

8.2.2 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden als Referenzsubstanzen gewählt:

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Cyclophosphamid	5 g Feststoff MW: 279,10 g/mol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Kat. Nr.: 29875 Lot Nr.: 1362353
Acrolein	10 ml Flüssigkeit MW: 56,06 g/mol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Kat. Nr.: 01679 Lot. Nr.: 1399419
Retinol	1 g Feststoff MW: 286,5 g/mol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Kat. Nr.: 95144 Lot. Nr.: 1384515
all-trans-Retinsäure	1 g Feststoff MW: 300,45 g/mol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Kat. Nr.: 95152 (302-79-4) Lot. Nr.: 1268370
Valpromid	50 g Feststoff MW: 143,23 g/mol	Fa. Hangzhou Da-yangchem Co. Limited, Hangzhou, China Kat. Nr.: 2430-27-5 Lot. Nr.: 081101
Valproic acid sodium salt (Valproinsäure, Natriumsalz)	10 g Feststoff MW: 166,19 g/mol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Kat. Nr.: P4543 Lot. Nr.: 067K0761
Albendazol	10 g Feststoff MW: 265,34 g/mol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland Kat. Nr.: A4673 Lot. Nr.: 035K1421
Albendazolsulfoxid	50 g Feststoff MW: 281,33 g/mol	Fa. Hangzhou Da-yangchem Co. Limited, Hangzhou, China Kat. Nr.: 54029-12-8 Lot. Nr.: 60809002
Acetylaminofluoren	5 g Feststoff MW: 223,28 g/mol	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Anhang

		Kat. Nr.: A7015-5G Lot-Nr.: 127K1581
N-Hydroxy- Acetylamino-fluoren	5 g Feststoff MW: 239,27 g/mol	Fa.: Endotherm, Saarbrücken, Deutschland Kat. Nr. 53-95-2 Lot-Nr.: ERH

8.2.3 Puffer, Lösungen und Gase

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Albumin aus Rinderserum	BSA Fraction V	PAA, Linz, Österreich
Dimethylsulfoxid	> 99,5 % (GC)	Fa. Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hanks' balancierte Salzlösung (HBSS)	Ohne Phenolrot, mit 0,35 g/l NaHCO ₃	Biochrom, Berlin, Deutschland
Kohlenstoffdioxid	2.7	AGA Gas, Hamburg, Deutschland
Sauerstoff	Medizinischer	AGA Gas, Hamburg, Deutschland
Stickstoff	Plus 5.0	AGA Gas, Hamburg, Deutschland

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Effekte verschiedener Konzentrationen von Cyclophosphamid auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	40
Tab. 2: Effekte verschiedener Konzentrationen von Acrolein auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	43
Tab. 3: Effekte verschiedener Konzentrationen von Cyclophosphamid und Acrolein im Verhältnis 80/20 auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	46
Tab. 4: Effekte verschiedener Konzentrationen von Cyclophosphamid und Acrolein im Verhältnis 50/50 auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	49
Tab. 5: Effekte verschiedener Konzentrationen von Retinol auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	53
Tab. 6: Effekte verschiedener Konzentrationen von all-trans-Retinsäure auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	56
Tab. 7: Effekte verschiedener Konzentrationen von Retinol und all-trans-Retinsäure im Verhältnis 80/20 auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	59
Tab. 8: Effekte verschiedener Konzentrationen von Retinol und all-trans-Retinsäure im Verhältnis 50/50 auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	62
Tab. 9: Effekte verschiedener Konzentrationen von Valpromid auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	65
Tab. 10: Effekte verschiedener Konzentrationen von Valproinsäure auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	68
Tab. 11: Effekte verschiedener Konzentrationen von Valpromid und Valproinsäure im Verhältnis 80/20 auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	71
Tab. 12: Effekte verschiedener Konzentrationen von Valpromid und Valproinsäure im Verhältnis 50/50 auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	74
Tab. 13: Effekte verschiedener Konzentrationen von Albendazol auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	78
Tab. 14: Effekte verschiedener Konzentrationen von Albendazolsulfoxid auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	81
Tab. 15: Effekte verschiedener Konzentrationen von Albendazol und	

Anhang

	Albendazolsulfoxid im Verhältnis 80/20 auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	84
Tab. 16:	Effekte verschiedener Konzentrationen von Albendazol und Albendazolsulfoxid im Verhältnis 50/50 auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	86
Tab. 17:	Effekte verschiedener Konzentrationen von Acetylamino- fluoren auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	90
Tab. 18:	Effekte verschiedener Konzentrationen von N-Hydroxy- Acetylamino- fluoren auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	93
Tab. 19:	Effekte verschiedener Konzentrationen von Acetylamino- fluoren und N-Hydroxy-Acetylamino- fluoren im Verhältnis 80/20 auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	96
Tab. 20:	Effekte verschiedener Konzentrationen von Acetylamino- fluoren und N-Hydroxy-Acetylamino- fluoren im Verhältnis 50/50 auf Rattenembryonen <i>in vitro</i> („whole embryo culture“)	99

8.4 Grafikverzeichnis

Grafik 1: Score in Beziehung zur Konzentration (μM): Cyclophosphamid / Acrolein.....	50
Grafik 2: Dysmorphie Embryonen in Beziehung zur Konzentration (μM): Cyclophosphamid / Acrolein.....	50
Grafik 3: Score in Beziehung zur Konzentration (μM): Retinol und all-trans-Retinsäure.....	63
Grafik 4: Dysmorphie Embryonen in Beziehung zur Konzentration (μM): Retinol und all-trans-Retinsäure.....	63
Grafik 5: Score in Beziehung zur Konzentration (mM): Valpromid und Valproinsäure.....	75
Grafik 6: Dysmorphie Embryonen in Beziehung zur Konzentration (mM): Valpromid und Valproinsäure.....	75
Grafik 7: Score in Beziehung zur Konzentration (μM): Albendazol und Albendazolsulfoxid.....	87
Grafik 8: Dysmorphie Embryonen in Beziehung zur Konzentration (μM): Albendazol und Albendazolsulfoxid.....	87
Grafik 9: Score in Beziehung zur Konzentration (μM): Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren.....	100
Grafik 10: Dysmorphie Embryonen in Beziehung zur Konzentration (μM): Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren.....	100

8.5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von Cyclophosphamid.....	5
Abb. 2: Metabolisierung von Cyclophosphamid zu Phosphoramidmustard und Acrolein modifiziert nach Ekhart et al., 2008.....	6
Abb. 3: Strukturformel von Acrolein.....	10
Abb. 4: Strukturformel von Retinol.....	11
Abb. 5: Metabolisierung von Retinol zu all-trans-Retinsäure modifiziert nach Lee et al., 1991.....	15
Abb. 6: Strukturformel von all-trans-Retinsäure.....	16
Abb. 7: Strukturformel von Valpromid.....	19
Abb. 8: Strukturformel von Valproinsäure.....	20
Abb. 9: Strukturformel von Albendazol.....	23

Anhang

Abb. 10: Metabolisierung von Albendazol zu Albendazolsulfoxid modifiziert nach Rawden et al., 2000.....	24
Abb. 11: Strukturformel von Albendazolsulfoxid.....	26
Abb. 12: Strukturformel von Acetylaminofluoren.....	28
Abb. 13: Metabolisierung von Acetylaminofluoren zu N-Hydroxy-Acetylaminofluoren modifiziert nach Inami und Masataka, 2008.....	29
Abb. 14: Strukturformel von N-Hydroxy-Acetylaminofluoren.....	30

8.6 Fotoverzeichnis

Foto 1: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Cyclophosphamid in der <i>WEC</i>	39
Foto 2: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Acrolein in der <i>WEC</i>	42
Foto 3: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Cyclophosphamid und Acrolein im Verhältnis 80/20 in der <i>WEC</i>	45
Foto 4: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Cyclophosphamid und Acrolein im Verhältnis 50/50 in der <i>WEC</i>	48
Foto 5: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol in der <i>WEC</i>	52
Foto 6: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol in der <i>WEC</i>	52
Foto 7: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von all-trans-Retinsäure in der <i>WEC</i>	55
Foto 8: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von all-trans-Retinsäure in der <i>WEC</i>	55
Foto 9: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol und all-trans-Retinsäure im Verhältnis 80/20 in der <i>WEC</i>	58
Foto 10: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Retinol und all-trans-Retinsäure im Verhältnis 50/50 in der <i>WEC</i>	61
Foto 11: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Valpromid in der <i>WEC</i>	64

Anhang

Foto 12: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Valproinsäure in der <i>WEC</i>	67
Foto 13: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Valpromid und Valproinsäure im Verhältnis 80/20 in der <i>WEC</i>	70
Foto 14: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Valpromid und Valproinsäure im Verhältnis 50/50 in der <i>WEC</i>	73
Foto 15: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazol in der <i>WEC</i>	77
Foto 16: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazolsulfoxid in der <i>WEC</i>	80
Foto 17: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazol und Albendazolsulfoxid im Verhältnis 80/20 in der <i>WEC</i>	83
Foto 18: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Albendazol und Albendazolsulfoxid im Verhältnis 50/50 in der <i>WEC</i>	85
Foto 19: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Acetylaminofluoren in der <i>WEC</i>	89
Foto 20: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von N-Hydroxy-Acetylaminofluoren in der <i>WEC</i>	92
Foto 21: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren im Verhältnis 80/20 in der <i>WEC</i>	95
Foto 22: Rattenembryonen nach 48 Stunden Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von Acetylaminofluoren und N-Hydroxy-Acetylaminofluoren im Verhältnis 50/50 in der <i>WEC</i>	98

8.7 Literaturverzeichnis

1. Astrom, A. and DePierre, J. W. (1982). 2-Acetylaminofluorene induces forms of cytochrome P-450 active in its own metabolism. *Carcinogenesis* **3**, 711-713.
2. Azais-Braesco, V. and Pascal, G. (2000). Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *Am J Clin Nutr* **71**, 1325S-1333S.
3. Balls, M. and Straughan, D. W. (1996). The three Rs of Russell & Burch and the testing of biological products. *Dev Biol Stand* **86**, 11-18.
4. Barbero, P., Lotersztejn, V., Bronberg, R., Perez, M., Alba, L. (2004). Acitretin embryopathy: a case report. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **70**, 831-833.
5. Bialer, M., Rubinstein, A., Raz, I., Abramsky, O. (1984). Pharmacokinetics of valpromide after oral administration of a solution and a tablet to healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* **27**, 501-503.
6. Billig, H., Ziv, E., Bar-On, H., Bialer, M. (1990). The disposition of valpromide in rats and the isolated perfused rat liver. *Drug Metab Dispos* **18**, 238-244.
7. Brown, N. A. (2002). Selection of test chemicals for the ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests. *European Centre for the Validation of Alternative Methods. Altern Lab Anim* **30**, 177-198.
8. Bruckner, A., Lee, Y. J., O'Shea, K. S., Henneberry, R. C. (1983). Teratogenic effects of valproic acid and diphenylhydantoin on mouse embryos in culture. *Teratology* **27**, 29-42.
9. Camera, G. and Pregliasco, P. (1992). Ear malformation in baby born to mother using tretinoin cream. *Lancet* **339**, 687.
10. Capece, B. P., Virkel, G. L., Lanusse, C. E. (2009). Enantiomeric behaviour of al-bendazole and fenbendazole sulfoxides in domestic animals: pharmacological implications. *Vet. J* **181**, 241-250.
11. Chen, H. and Juchau, M. R. (1998). Biotransformation of 13-cis- and 9-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in rat conceptual homogenates. Evidence for catalysis by a conceptual isomerase 13. *Drug Metab Dispos* **26**, 222-228.
12. Chen, H., Namkung, M. J., Juchau, M. R. (1995). Biotransformation of all-trans-retinol and all-trans-retinal to all-trans-retinoic acid in rat conceptual homogenates. *Biochem Pharmacol* **50**, 1257-1264.

13. Chhibber, G. and Gilani, S. H. (1986). Acrolein and embryogenesis: an experimental study. *Environ Res* **39**, 44-49.
14. Claussen, U., Hellmann, W., Pache, G. (1980). The embryotoxicity of the cyclophosphamide metabolite acrolein in rabbits, tested in vivo by i.v. injection and by the yolk-sac method. *Arzneimittelforschung* **30**, 2080-2083.
15. Cohlman, S. Q. (1953). Excessive intake of vitamin A during pregnancy as a cause of congenital anomalies in the rat. *AMA Am J Dis Child* **86**, 348-349.
16. Collins, M. D., Tzimas, G., Hummler, H., Burgin, H., Nau, H. (1994). Comparative teratology and transplacental pharmacokinetics of all-trans-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, and retinyl palmitate following daily administrations in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **127**, 132-144.
17. Corti, N., Heck, A., Rentsch, K., Zingg, W., Jetter, A., Stieger, B., Pauli-Magnus, C. (2009). Effect of ritonavir on the pharmacokinetics of the benzimidazoles albendazole and mebendazole: an interaction study in healthy volunteers. 1. *Eur J Clin Pharmacol* **65**, 999-1006.
18. Cowden J. and Hotez, P. (2000). Mebendazole and albendazole treatment of geohelminth infections in children and pregnant women. *Pediatr Infect Dis J* **19**, 659-660.
19. Cristofol, C., Navarro, M., Franquelo, C., Valladares, J. E., Carretero, A., Ruberte, J., Arboix, M. (1997). Disposition of netobimin, albendazole, and its metabolites in the pregnant rat: developmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **144**, 56-61.
20. DiLiberti, J. H., Farndon, P. A., Dennis N. R., Curry, C. J. (1984). The fetal valproate syndrome. *Am J Med Genet* **3**, 473-481.
21. Dinort, K. (2007). Untersuchung von N-Methyl-pyrrolidon und seinen Metaboliten auf Embryotoxizität in der "Whole Embryo Culture". FU Berlin Dissertation online
22. Ekhart, C., Doodeman, V. D., Rodenhuis, S., Smits, P. H., Beijnen, J. H., Huitema, A. D. (2008). Influence of polymorphisms of drug metabolizing enzymes (CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, GSTA1, GSTP1, ALDH1A1 and ALDH3A1) on the pharmacokinetics of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide. *Pharmacogenet Genomics* **18**, 515-523.
23. Enns, D., Green, H., Tupling, R., Burnett, M., Grant, S., Ranney, D. (1999a). Alterations in sarcoplasmic reticulum function in female vastus lateralis with eccentric exercise. *Mol Cell Biochem* **202**, 19-30.

24. Enns, G. M., Roeder, E., Chan, R. T., li-Khan, C. Z., Cox, V. A., Golabi, M. (1999b). Apparent cyclophosphamide (cytoxan) embryopathy: a distinct phenotype? *Am J Med Genet* **86**, 237-241.
25. Fachinformation Ergenyl[®], Sanofi Aventis Deutschland, Juni 2011, www.fachinfo.de am 14. März 2012 um 13:11h.
26. Fachinformation Eskazole[®], GlaxoSmithKline Deutschland, August 2010, www.fachinfo.de am 14. März 2012 um 13:15h.
27. Faustman-Watts, E., Greenaway, J. C., Namkung, M. J., Fantel, A. G. (1983). Teratogenicity in vitro of 2-Acetylaminofluorene: Role of biotransformation in the rat. *Teratology* **27**, 19-28.
28. Faustman-Watts, E. M., Namkung, M. J., Greenaway, J. C., Juchau, M. R. (1985). Analysis of metabolites of 2-acetylaminofluorene generated in an embryo culture system. Relationship of biotransformation to teratogenicity in vitro 3. *Biochem Pharmacol* **34**, 2953-2959.
29. Faustman-Watts, E. M., Yang, H. Y. L., Namkung, M. J., Greenaway, J. C., Juchau, M. R., Fantel, A. G. (1984). Mutagenic, cytotoxic, and teratogenic effects of 2-Acetylaminofluorene and reactive metabolites in vitro. *Teratog Carcinog Mutagen* **4**, 273-283.
30. Flick, B. (2006). Optimierung und Standardisierung der Kultur ganzer Rattenembryonen als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest durch die Etablierung eines neuen Kulturmediums. FU Berlin Dissertation online www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDiss_thesis_000000002617
31. Flick, B. and Klug, S. (2000). Improvement in standardization of the Whole - Embryo - Culture (WEC): Importance of a more precise staging. *Arch Pharm* **361**, R 168.
32. Flick, B. and Klug, S. (2006). Whole embryo culture: an important tool in developmental toxicology today. *Curr Pharm Des* **12**, 1467-1488.
33. Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Piersma, A., Brady, M., Clemann, N., Huuskonen, H., Paillard, F., Bremer, S., Becker, K. (2002). The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Altern Lab Anim* **30**, 151-176.
34. Gilani, S. H. and Chatzinoff, M. (1983). Embryopathic effects of cyclophosphamide. *Environ Res* **31**, 296-301.

35. Gokbulut, C., Cirak, V. Y., Senlik, B. (2006). Plasma disposition and fecal excretion of netobimin metabolites and enantiospecific disposition of albendazole sulphoxide produced in ewes. *Vet Res Commun* **30**, 791-805.
36. Günther, M., Wagner, E., Ogris, M. (2008). Acrolein: unwanted side product or contribution to antiangiogenic properties of metronomic cyclophosphamide therapy? *J Cell Mol Med* **12** (6B), 2704-16.
37. Gupta, R., Deepanjali, S., Thabrah, M. M., Kaur, P., Gupta, S. (2009). Successful twin pregnancy while on cyclophosphamide therapy in a patient with lupus nephritis. *Rheumatol Int* **29**, 1503-1505.
38. Gyapong, J. O., Chinbuah M. A., Gyapong M. (2003). Inadvertent exposure of pregnant women to ivermectin and albendazole during mass drug administration for lymphatic filariasis. *Trop Med Int Health* **8**, 1093-1101.
39. Gyorkos, T. W., Larocque, R., Casapia, M., Gotuzzo, E. (2006). Lack of risk of adverse birth outcomes after deworming in pregnant woman. *Pediatr Infect Dis J* **25**, 791-794.
40. Han, J., Li, L., Zhang, Z., Xiao, Y., Lin, J., Zheng, L., Li, Y. (2007). Platelet-derived growth factor C plays a role in the branchial arch malformations induced by retinoic acid. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **79**, 221-230.
41. Heringova, L., Jelinek, R., Dostal, M. (2003). Cell-cycle alterations underlie cyclophosphamide-induced teratogenesis in the chick embryo. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **67**, 438-443.
42. Hettwer, M., Reis-Fernandes, M. A., Iken, M., Ott, M., Steinberg, P., Nau, H. (2010). Metabolic activation capacity by primary hepatocytes expands the applicability of the embryonic stem cell test as alternative to experimental animal testing. *Reprod Toxicol* **30**, 113-120.
43. Huang, C. und Hales, B. F. (2009). Teratogen responsive signaling pathways in organogenesis stage mouse limbs. *Reprod Toxicol* **27**, 103-110.
44. Inami, K. und Mochizuki, M. (2008). Oxidative transformation of 2-acetylaminofluorene by a chemical model for cytochrome P450: A water-insoluble porphyrin and tert-butyl hydroperoxide. *Bioorgan Med Chem* **16**, 7070-7.
45. Ishijima, K. und Sando, I. (1999). Multiple temporal bone anomalies in isotretinoin syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **125**, 1385-8.

46. Jentink, J., Loane, M. A., Dolk, H., Barisic, I., Garne, E., Morris, J. K., de Jong-van den Berg, L. T. W. (2010). Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. *N Engl J Med* **362**, 2185-93.
47. Jung, H., Hurtado M., Sanchez M., Medina M. T., Sotelo J. (1990). Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. *Clin Neuropharmacol* **13**, 559-64.
48. Klug, S. (1991). Whole embryo culture: Interpretation of abnormal development in vitro. *Reprod Toxicol* **5**, 237-244.
49. Klug, S., Lewandowski, C., Neubert, D. (1985). Modification and standardization of the culture of early postimplantation embryos for toxicological studies. *Arch Toxicol* **58**, 84-88.
50. Klug, S., Lewandowski, C., Wildi, L., Neubert, D. (1990). Bovine serum: An alternative to rat serum as a culture medium for the rat whole embryo culture. *Toxicol in Vitro* **4**, 598-601.
51. Kraft, J. C., Bechter, R., Lee, Q. P., Juchau, M. R. (1992). Microinjections of cultured rat conceptuses: studies with 4-oxo-all- trans-retinoic acid, 4-oxo-13-cis-retinoic acid and all-trans-retinoyl-beta-glucuronide. *Teratology* **45**, 259-270.
52. Kraft, J. C., Bui, T., Juchau, M. R. (1991). Elevated levels of all-trans-retinoic acid in cultured rat embryos 1,5hr after intraamniotic microinjections with 13-cis-retinoic acid or retinol and correlations with dysmorphogenesis. *Biochemical Pharmacology* **42**, R21-R24.
53. Kraft, J. C. and Juchau, M. R. (1992). Correlations between conceptual concentrations of all-trans-retinoic acid and dysmorphogenesis after microinjections of all-trans-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, all-trans-retinoyl-beta-glucuronide, or retinol in cultured whole rat embryos. *Drug Metab Dispos* **20**, 218-225.
54. Laschinski, G. and Spielmann, H. (1988). [Recommendations for the administration of vitamin A in pregnancy]. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **48**, 196-197.
55. Lee, Q. P., Juchau, M. R., Kraft, J. C. (1991). Microinjection of cultured rat embryos: studies with retinol, 13-cis- and all-trans-retinoic acid. *Teratology* **44**, 313-323.
56. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.

57. Luijten, M., Verhoef, A., Westerman, A., Piersma, A. H. (2008). Application of a metabolizing system as an adjunct to the rat whole embryo culture. *Toxicol In Vitro* **22**, 1332-1336.
58. Maiti, T. K., Ghosh, K. S., Debnath, J., Dasgupta, S. (2006). Binding of all-trans retinoic acid to human serum albumin: fluorescence, FT-IR and circular dichroism studies. *Int J Biol Macromol* **38**, 197-202.
59. Matthias, M., Sohr, R., Preiss, R., Brockmann, B. (1984). Bioavailability of cyclophosphamide following oral administration in high doses. *Onkologie* **7**, 48-49.
60. Meador, K. J., Penovich, P., Baker, G. A., Pennell, P. B., Bromfield, E., Pack, A., Liporace, J. D., Sam, M., Kalayjian, L. A., Thurman D. J., Moore, E., Loring, D. W., NEAD Study Group (2009). Antiepileptic drug use in women of childbearing age. *Epilepsy Behav* **15**, 339-43.
61. Miller, R. K., Hendrickx, A. G., Mills, J. L., Hummler, H., Wiegand, U. W. (1998). Periconceptual vitamin A use: how much is teratogenic? *Reprod Toxicol*. **12**, 75-88.
62. Mirkes, P. E. (1985). Cyclophosphamide teratogenesis: a review. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **5**, 75-88.
63. Mirkes, P. E., Greenaway, J. C., Rogers, J. G., Brundrett, R. B. (1984). Role of acrolein in cyclophosphamide teratogenicity in rat embryos in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* **72**, 281-291.
64. Ndibazza, J., Muhangi, L., Akishule, D., Kiggundu, M., Ameke, C., Oweka, J., Kizindo, R., Duong, T., Kleinschmidt, I., Muwanga, M., Elliott, A. M., (2010). Effects of deworming during pregnancy on maternal and perinatal outcomes in Entebbe, Uganda: A randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* **50**, 531-540.
65. New, D., A., T., Coppola, P., T., Terry, S. (1973). Culture of explanted rat embryos in rotating tubes. *J Reprod Fert* **35**, 135-138.
66. Newcomer, M. E. and Ong, D. E. (2000). Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 57-64.
67. Nobakht, M., Zirak, A., Mehdizadeh, M., Tabatabaeei, P. (2006). Teratogenic effects of retinoic acid on neurulation in mice embryos. *Pathophysiology* **13**, 57-61.
68. Ornoy, A. (2009). Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol* **28**, 1-10.

69. Ozolins, T. R., Oglesby, L. A., Wiley, M. J., Wells, P. G. (1995). In vitro murine embryotoxicity of cyclophosphamide in embryos co-cultured with maternal hepatocytes: development and application of a murine embryo-hepatocyte co-culture model. *Toxicology* **102**, 259-274.
70. Palomares, F., Palencia, G., Ambrosio, J. R., Ortiz, A., Jung-Cook, H. (2006). Evaluation of the efficacy of albendazole sulphoxide and praziquantel in combination on *Taenia crassiceps* cysts: in-vitro-Studies. *J Antimicrob Chemother* **57**, 482-488.
71. Park, D., Jeon, J. H., Shin, S., Joo, S. S., Kang, D. H., Moon, S. H., Jang, M. J., Cho, Y. M., Kim, J. W., Ji, H. J., Ahn, B., Oh, K. W., Kim, Y. B. (2009). Green tea extract increases cyclophosphamide-induced teratogenesis by modulating the expression of cytochrome P-450 mRNA. *Reprod Toxicol* **27**, 79-84.
72. Paskulin, G. A., Gazzola Zen, P. R., de Camargo Pinto, L. L., Rosa, R., Graziadio, C. (2005). Combined chemotherapy and teratogenicity. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **73**, 634-637.
73. Pavez, L. E., Chamcheu, J. C., Vahlquist, A., Torma, H. (2009). Both all-trans retinoic acid and cytochrome P450 (CYP26) inhibitors affect the expression of vitamin A metabolizing enzymes and retinoid biomarkers in organotypic epidermis. *Arch Dermatol Res* **307**, 475-85.
74. Piersma, A. H., Janer, G., Wolterink, G., Bessems, J. G., Hakkert, B. C., Slob, W. (2008). Quantitative extrapolation of in vitro whole embryo culture embryotoxicity data to developmental toxicity in vivo using the benchmark dose approach. *Toxicol Sci* **101**, 91-100.
75. Piersma, A. H., Verhoef, A., Sweep, C. G., de Jong, W. H., van, L. H. (2002). Developmental toxicity but no immunotoxicity in the rat after prenatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicology* **174**, 173-181.
76. Radatz, M., Ehlers, K., Yagen, B., Bialer, M., Nau, H. (1998). Valnoctamide, valpromide and valnoctic acid are much less teratogenic in mice than valproic acid. *Epilepsy Res* **30**, 41-48.
77. Rawden, H. C., Kokwaro, G. O., Ward, S. A., Edwards, G. (2000). Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* **49**, 313-322.
78. Robertson, R. and MacLeod, P. M. (1985). Accutane-induced teratogenesis. *CMAJ* **133**, 1147-1148.

79. Rothman, K., Moore, L., Singer, M., Nguyen, U.-S.; Mannino, S., Milunsky, A. (1995). Teratogenicity of high vitamin A intake, *N Engl J Med*, **333**, 1369-1373.
80. Russell, W. M. and Burch, R. L. (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen & Co, London.
81. Slott, V. L. and Hales, B. F. (1986). The embryoethality and teratogenicity of acrolein in cultured rat embryos. *Teratology* **34**, 155-163.
82. Slott, V. L. and Hales, B. F. (1988). Role of the 4-hydroxy intermediate in the in vitro embryotoxicity of cyclophosphamide and dechlorocyclophosphamide. *Toxicol Appl Pharmacol* **92**, 170-178.
83. Spielmann, H. and Liebsch, M. (2002). Validation successes: chemicals 62. *Altern Lab Anim* **30**, 33-40.
84. Stahlmann, R., Bluth, U., Neubert, D. (1985). Effects of the cyclophosphamide metabolite acrolein in mammalian limb bud cultures. *Arch Toxicol* **57**, 163-167.
85. The Teratology Society (1987). Teratology Society Position Paper: Recommendations for Vitamin A use during pregnancy. *Teratology*, **35**, 269-275
86. Timbrell, J. A. 2000. *Principles of biochemical toxicology*. Taylor & Francis, 293-295.
87. Tillner, J. und Dingermann, T. (1998). Retinoide und Embryonalentwicklung. *Deutsche Apotheker Zeitung*, **9**, 704-710.
88. Velik, J., Baliharova, V., Skalova, L., Szotakova, B., Wsol, V., Lamka, J. (2005). Liver microsomal biotransformation of albendazole in deer, cattle, sheep and pig and some related wild breeds. *J Vet. Pharmacol Ther* **28**, 377-384.
89. Wasserman, M., Yagen, B., Blotnik, S., Papo, N., Bialer, M. (2001). Stereoselective pharmacokinetic analysis and antiepileptic activity of N-2-hydroxypropyl valpromide, a central nervous system--active chiral valproylamide. *Ther Drug Monit.* **23**, 414-420.
90. Whittaker, S. G. and Faustman, E. M. (1991). Effects of albendazole and albendazole sulfoxide on cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicol Appl. Pharmacol* **109**, 73-84.
91. Wiegand, U. W. and Chou, R. C. (1998). Pharmacokinetics of oral isotretinoin. *J Am Acad Dermatol* **39**, 8-12.
92. Wiegand, U. W., Hartmann, S., Hummler, H. (1998). Safety of vitamin A: recent results. *Int J Vitam. Nutr Res* **68**, 411-416.

93. Winkler, I., Sobol, E., Yagen, B., Steinman, A., Devor, M., Bialer, M. (2005). Efficacy of antiepileptic tetramethylcyclopropyl analogues of valproic acid amides in a rat model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* **49**, 1110-1120.
94. Xiao, R., Yu, H. L., Zhao, H. F., Liang, J., Feng, J. F., Wang, W. (2007). Developmental neurotoxicity role of cyclophosphamide on post-neural tube closure of rodents in vitro and in vivo. *Int J Dev Neurosci* **25**, 531-537.
95. Zimmermann, B. and Tsambaos, D. (1985). Retinoids inhibit the differentiation of embryonic-mouse mesenchymal cells in vitro. *Arch Dermatol Res* **277**, 98-104.
96. Zurlo, J., Rudacille, D., Goldberg, A. M. (1996). The three Rs: the way forward. *Environ Health Perspect* **104**, 878-880.

9. Poster und Publikationen

9.1 Posterpräsentation

- Effects of albendazole and its sulfoxide in two validated *in-vitro*-Tests for developmental toxicity (Johanna Kaltenhäuser, Kathrin Eckardt, Caroline Hofbeck, Uschi Gruber, Andreas Luch, Andrea Seiler, Ralf Stahlmann, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin; DGPT-Fachtagung Mainz, 23. bis 25.03.2010)
- *In vitro* embryotoxic Potenzial of albendazole and albendazole sulfoxide on rat embryos in culture (Caroline Hofbeck, Kathrin Eckardt, Ralf Stahlmann, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin; Society of Toxicology, 49th Annual Meeting, Salt Lake City, March 2010)

9.2 Publikation

- Eckardt K., Kaltenhäuser J., Kilb C., Seiler A., Stahlmann R., (2012). Relative potency of albendazole and its sulfoxide metabolite in two *in-vitro*-Tests for developmental toxicity: The rat whole embryo culture and the mouse embryonic stem cell test. *Reprod Toxicol* – Article in press.

10. Danksagung

Die Dissertation wurde am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité Universitätsmedizin Berlin angefertigt. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. med. Stahlmann (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité, Berlin) und Frau Prof. Dr. med. vet. Plendl (Institut für Veterinär-Anatomie an der FU Berlin), die meine Doktorarbeit vertreten haben und trotz meiner Vollzeitstelle den Glauben an die Fertigstellung der Arbeit nicht verloren haben.

Für Rat und Tat, liebe Worte und großartige Unterstützung, sowohl bei den *WEC*-Versuchen als auch bei der Auswertung der Ergebnisse und dem Korrigieren meiner Arbeit, möchte ich Dr. med. vet. Kathrin Eckardt danken, die meine Arbeit mit betreut hat. Eine sehr große Hilfe bei der Durchführung der Versuche waren auch Katharina Frieß und Flavia Schmidt.

Harald Weinrich danke ich für die oft benötigte Netzwerk- und Computerunterstützung vor Ort, Christine Gericke (Charité Universitätsmedizin Berlin) und dem Team des Instituts für Biometrie und Informationsverarbeitung der FU Berlin für die wertvollen Hinweise für die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Die Literaturrecherche abseits des Charitézugangs ermöglichten mir Mathias Bippert und Ehssan Khasaeli, denen ich ganz herzlich für die Zuarbeit danke.

Ohne meine „fast-Muttersprachlerin“, Verena Weiß, wäre die Übersetzung sicherlich auch nicht so treffend formuliert worden. Daher möchte ich ihr an dieser Stelle für die fremdsprachliche Unterstützung danken.

Retter in der heimischen Computer-Not waren Falko Partosch und Marcus Viefeld, die mit ihren Tipps und Tricks maßgeblich an dem Gelingen der Formatierung beteiligt waren.

Ein großes Dankeschön gilt auch Annika Irlé, Annika Schulz, Jens Oltersdorf, Sebastian Seeger und meinem Mann, Patrick Kilb, die diese Arbeit geduldig Korrektur gelesen haben und dabei sämtliche Tippfehler ausgemerzt und unermüdlich an Formulierungen mit mir geübt haben.

Herrn OFVet Hilgers möchte ich für das Verständnis und die Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit danken.

Selbständigkeitserklärung

11. Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Leipzig, 21.08.2012

Caroline Kilb