

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Einfluss von Sauerstoff und Temperatur auf die Zusammensetzung
embryonaler Flüssigkeiten bei Gallus gallus domesticus**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dana Feske (geb. Marquardt)
Tierärztin aus Finsterwalde

Berlin 2009
Journal-Nr. 3271

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karl Dietrich Weyrauch
Dritter Gutachter: PD Dr. Barbara Tzschentke

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

poultry, fowls, gallus gallus, embryonic development, amniotic fluid, blood,
electrolytes, blood gases, oxygen, oxidation

Tag der Promotion: 16.03.2009

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: 978-3-86664-596-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

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 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Janic & Tania

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... IV

1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG..... 1

2. LITERATURÜBERSICHT 3

2.1 Ausgewählte Abschnitte in der Embryogenese des Huhnes 3

 2.1.1 Die Entwicklung der Embryonalhüllen 4

 2.1.1.1 Die Entwicklung der Amnionmembran 4

 2.1.1.2 Der histologischer Aufbau der Amnionmembran..... 6

 2.1.1.3 Die Entwicklung der Allantois..... 7

 2.1.1.4 Die Entwicklung des Chorions 8

 2.1.1.5 Der histologischer Aufbau der Chorioallantoismembran 9

 2.1.1.6 Die physiologische Bedeutung der
 Chorioallantoismembran (CAM) 10

 2.1.1.7 Die Dottersackmembran 10

 2.1.1.8 Der Vergleich der Entwicklung der Hüllen der Sauropsiden und
 Mammalia 11

 2.1.2 Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems 12

 2.1.2.1 Die Entwicklung des Herzens und des Blutkreislaufes 12

 2.1.2.2 Hämoglobin im Vogelblut..... 14

2.2 Die Zusammensetzung der embryonalen Flüssigkeiten 17

 2.2.1 Ausgewählte Inhaltsstoffe der Amnionflüssigkeit..... 17

 2.2.2 Ausgewählte Parameter des Blutes..... 20

2.3 Membranen als Barrieren..... 22

2.4 Ausgewählte Inkubationsparameter 23

 2.4.1 Sauerstoff 23

 2.4.2 Temperatur 24

2.5 Regelkreis und Adaptation 25

2.6 Zusammenfassung 28

3. MATERIAL UND METHODE 29

3.1 Eier..... 29

3.2 Aufzucht der Legehennen..... 29

3.3 Inkubation	29
3.3.1 Inkubatoren.....	29
3.3.1.1 Hemel SKR 168	29
3.3.1.2 Hemel Thermalplastik-Flächenbrüter	30
3.3.2 Gas-Misch-Druck-Regelung	30
3.3.3 TFA Klima-Logger	30
3.4 Blut- und Amnionflüssigkeitsanalyse	31
3.4.1 Blut- und Amnionflüssigkeitsthanalyse mittels Radiometer Copenhagen ABL 605®	31
3.4.1.1 Radiometer Copenhagen ABL™ 500®	31
3.4.1.2 Radiometer Copenhagen EML 100™ Electrolyte Metabolite Laboratory®	32
3.4.1.3 Laptop	32
3.5 Versuchsgruppeneinteilung und Inkubationsbedingungen	33
3.6 Gewinnung der Blut- und Amnionflüssigkeit	34
3.7 Ermittlung morphologischer Parameter	35
3.7.1 Bestimmung der Körpermasse	35
3.7.2 Bestimmung des Herzgewichts	35
3.8 Datenerfassung, Datenaufarbeitung, Statistik	35
4. ERGEBNISSE	38
4.1 pH Werte.....	38
4.2 Sauerstoffpartialdruck	40
4.3 Kohlendioxidpartialdruck	42
4.4 Bikarbonat.....	44
4.5 Sauerstoffsättigung.....	46
4.6 Kalium.....	48
4.7 Natrium	50
4.8 Chlorid	52
4.9 Kalzium.....	54
4.10 Glucose	56
4.11 Lactat.....	58
4.12 Embryonengewicht.....	60

4.13 Herzgewicht	61
4.14 Zusammenfassung der Ergebnisse	62
5. DISKUSSION	65
5.1 Auswirkungen der Inkubationsbedingungen auf die Gasparameter (pH, pO₂, pCO₂, HCO₃⁻, sO₂)	65
5.2 Auswirkungen der Inkubationsbedingungen auf die Elektrolyte und Metabolite (K⁺, Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Glucose, Lactat).....	68
5.2.1 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf Kalium und Natrium (Diagramm 6, 7 Tabellen 17 - 22)	69
5.2.2 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf Chlorid (Diagramm 8, Tabellen 23 - 25)	70
5.2.3 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf Kalzium (Diagramm 9, Tabellen 26 - 28)	71
5.2.4 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf Glucose (Diagramm 10, Tabellen 29 - 30)	71
5.2.5 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf Lactat (Diagramm 11, Tabellen 31 - 32)	72
5.3 Auswirkungen der Inkubationsbedingungen auf morphologische Parameter (Embryonengewicht, Herzgewicht)	73
5.3.1 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf das Embryonengewicht	73
5.3.2 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf das Herzgewicht	74
6. ZUSAMMENFASSUNG	77
7. SUMMARY	81
8. LITERATURVERZEICHNIS	85
9. ANHANG -1- TABELLEN	95
10. ANHANG -2- TABELLENVERZEICHNIS	107
11. ANHANG -3- ABBILDUNGSVERZEICHNIS	109
DANKSAGUNG	111
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	114

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
CAM	Chorioallantoismembran
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CO ₂	Kohlendioxid
D	Inkubationstag
e.p.	external pipping – Zeitpunkt, wenn der Embryo die Eischale durchstößt
et al.	et alii (lat.); und andere
Hb	Hämoglobin
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HH	Hamburger, V. und Hamilton H.L.– Einteilung der Entwicklung der Normalstadien der Hühnerembryonen anhand von morphologischen Eigenschaften
HT	Hyperthermie
i.p.	internal pipping - Zeitpunkt, wenn der Embryo die innere Eischalenmembran zur Luftkammer durchstößt
IP ₅	Inositolpentaphosphat
K	Kontrolle
K ⁺	Kalium-Ion
kSM	kurzfristiger Sauerstoffmangel
O ₂	Sauerstoff
ml	Milliliter
mmol/l	Millimol je Liter
n.e.	nicht ermittelt
p50	Wert, bei welchem das Hämoglobin zu 50% mit Sauerstoff besetzt ist
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Na ⁺	Natrium-Ion
SM	Sauerstoffmangel
SM&HT	Sauerstoffmangel und Hyperthermie
sO ₂	Sauerstoffsättigung
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat

1. Einleitung und Zielstellung

Ohne Veränderung des Erbmaterials kann der Stoffwechsel in kritischen Entwicklungsphasen durch Umweltstressoren entgleisen und damit das Tier krank bzw. die Produktqualität verschlechtert werden. Dieser Denkansatz, der kurz mit „angeboren und nicht vererbt“ charakterisiert wird, beinhaltet epigenetische Mechanismen, die intensiver Forschung unterliegen. Der Hühnerembryo ist ein ausgezeichnetes Modell zur Untersuchung der Stressorwirkung unabhängig vom maternalen Organismus, da dieser nach dem Legen des Eies weder beeinflusst werden muss noch die Reaktionen des Embryos maskiert. Verschiedene Organe des Embryos weisen im Laufe der embryonalen Entwicklung unterschiedliche „kritische Zeitfenster“ auf, in denen sie besonders empfindlich auf veränderte Umwelteinflüsse reagieren. So gilt z.B. der gewählte Zeitraum zwischen den Inkubationstagen (D)6 bis D12 als kritische Phase bezüglich der Entwicklung des Energiestoffwechselliveaus im adulten Huhn (Dzialowski *et al.*, 2002).

Ziele dieser Arbeit waren:

1. den Einfluss von Stressoren - vermindertes Sauerstoffangebot bzw. erhöhte Temperatur - während der kritischen Phase D6 bis D12 auf den Gas- und Elektrolytstatus sowie auf ausgewählte Metabolite im Blut und in der Amnionflüssigkeit zu prüfen,
2. zu prüfen, ob die Zusammensetzung in beiden Kompartimenten nach Stressorwirkung unterschiedlich ist und
3. nach chronischem oder akutem Einfluss von Sauerstoffmangel soll an Hand des Sauerstoffgehaltes im Blut und im Amnion auf eine Beeinflussung der Systeme im Energiestoffwechsel geschlossen werden.

Dazu wurden Hühnerembryonen der Rasse White Leghorn zwischen D6 bis D12 einem verminderten Sauerstoffgehalt (15%) und/oder einer erhöhten Umgebungstemperatur (39,5°C) ausgesetzt. Ab D10 wurden jeden zweiten Tag bis D20 arterielle Blutproben aus der Chorioallantoisvene und Amnionflüssigkeit aus der Amnionhöhle gewonnen. Unmittelbar nach Entnahme der Proben wurden diese im Blut-Gas-System ABL 605® der Fa. Radiometer Copenhagen untersucht. Weiterhin wurden morphologische Parameter erfasst. Kontrollgruppen unter Normbedingungen dienten als Vergleich.

2. Literaturübersicht

2.1 Ausgewählte Abschnitte in der Embryogenese des Huhnes

Das Huhn gehört zu den nestflüchtenden Vogelarten. Der Embryo benötigt bis zum Schlupf 21 Tage. Die während seiner Entwicklung benötigten Nährstoffe und Informationen befinden sich im Eidotter. Das Eidotter ist eine einzige Zelle und wird aufgrund der Größe der Dottermenge als „megalecithal“ bezeichnet.

Der Hühnerembryo entwickelt sich außerhalb des Muttertieres in einer kalzifizierten Eischale. Alle für seine Entwicklung notwendigen Nähr- und Informationsstoffe aus dem Muttertier befinden sich im Eidotter und werden über die nutritiven Gefäße zum Embryo transportiert. Dies ist ein großer Vorteil für die Durchführung von experimentellen Arbeiten mit Hühnerembryonen, da die Muttertiere nicht beeinflusst werden.

Im Jahre 1900 wurden die einzelnen Entwicklungsstadien erstmals von Keibel und Abraham beschrieben. Hamburger & Hamilton (1951) formulierten anhand von strukturellen Verschiedenheiten 46 Normalstadien der Embryogenese des Huhnes, *Gallus gallus domesticus*. Diese Einteilung wurde von Starck & Ricklefs (1998) auf 42 Stadien gekürzt, so dass diese dann auch auf andere Vogelarten anwendbar ist, unabhängig davon ob Nesthocker oder Nestflüchter.

Zusammengefasst kann die Embryonalentwicklung nach Starck & Ricklefs (1998) in vier Abschnitte eingeteilt werden:

Entwicklungsstadium I	beginnt mit der ersten Furchungsteilung und endet mit der Ausbildung der Körpergrundgestalt (bis Stadium 22)
Entwicklungsstadium II	umfasst die Ausbildung der Organstruktur und erste Gewebedifferenzierung (bis Stadium 33)
Entwicklungsstadium III	beinhaltet fortschreitende Organdifferenzierung zu arttypischen Baumerkmale (bis Stadium 38)
Entwicklungsstadium IV	führt zum Ende von Wachstum und Ausreifung (bis zum Schlupf)

2.1.1 Die Entwicklung der Embryonalhüllen

2.1.1.1 Die Entwicklung der Amnionmembran

Das **Amnion** ist ein flüssigkeitsgefüllter Sack, der den Embryo ab dem 3. Inkubationstag (D3) vollständig umgibt und vorwiegend dem Schutz des Embryos gegen mechanischen Stress, Temperaturschwankungen oder Austrocknung dient (Romanoff, 1960). Aufgrund des Vorhandenseins dieser extraembryonalen Hülle zählt der Vogel zu den Amniota (Wiesner und Ribbeck, 1999). Weitere extraembryonale Hüllen sind die *Dottersackmembran*, das *Chorion* und die *Allantois*.

Das Amnion ist eine membranöse Begrenzung, in der sich die Amnionflüssigkeit mit dem Hühnerembryo befindet. Es entwickelt sich bereits kurz nach der Fertilisation gleichzeitig mit dem Chorion, und ist an D3 abgeschlossen. Mit D5 entwickeln sich aus den spindelartigen Mesenchymzellen der Amnionmembran die typischen glattmuskulären Elemente, in denen die Myofibrillen enthalten sind. Diese entstehenden Muskelzellen weisen zu diesem frühen Zeitpunkt bereits Kontraktionen auf (Hamburger und Hamilton, 1951). Die Muskulatur des Amnions wird nicht innerviert. Die Amnionkontraktionen sind autonom und werden von myogenen Schrittmachern generiert (Romanoff, 1960; Engelhardt und Lendle, 1955; Pierce, 1933). Die Kontraktionen nehmen bis D13 zu und danach bis zum D18 ab. Ab diesem Inkubationstag sind keine Kontraktionen mehr nachweisbar (Nechaeva, M. V. und Turpaev, 2002; Wu *et al.*, 2001; Nechaeva, M. V. und Turpaev, 1992; Freeman und Vince, 1974). Auf verschiedene, von außen gesetzte Reize, reagiert der Embryo mit Steigerung oder Erniedrigung der Kontraktionskraft. So ein von außen gesetzter Reiz ist zum Beispiel der Lichtreiz. Das Auge mit seinen dazugehörigen Strukturen entwickelt sich aus dem Ectoderm. Das visuelle System beim Vogelembryo reift relativ spät (Freeman und Vince, 1974).

Die optische Blase entwickelt sich ab HH (Hamburger-Hamilton) 9 (29 – 33h) und entwickelt sich weiter zum Augenbecher am HH 14 (50 – 53h). Zahlreiche Blutgefäße umgeben den Augenbecher sind aber vor HH17 nicht zu beobachten (Hiruma, 1996). Im Unterschied zu den Augen der Säugetiere existieren keine retinalen Blutgefäße, stattdessen gibt es beim Vogel eine spezielle vaskularisierte Struktur, das Pecten (Romanoff, 1960). Die Hauptfunktion dieses Pecten ist die Belieferung der innen Schicht der Retina mit Nährstoffen (Hiruma, 1996). Die Intensität des Umgebungslichtes beeinflusst die embryonale Motilität (Wu *et al.*, 2001). Eine 12fache Erhöhung der Beleuchtungsintensität resultiert in einer 220%igen Zunahme der Embryobewegung (Muller, 2003; Wu *et al.*, 2001). Die Kontraktionsrate des Amnions nimmt bei einer 40%igen Erhöhung der Beleuchtungsdauer zu. Dieser Effekt des autonomen Amnionschrittmachers ist möglicherweise ein elektrischer

oder chemischer Stimulus, bzw. reflektiert eine direkte Sensitivität der Amnionzellen (Muller, 2003).

Neben dem Lichtreiz bewirkt die Senkung der Umgebungstemperatur eine Abnahme der Kontraktibilität des Amnions. Sehr sensibel reagiert das Amnion auf Bedingungen wie Sauerstoffmangel, Hyperkapnie oder Hyperoxie (Nechaeva, M. V. *et al.*, 2004; Nechaeva, M. V. und Turpaev, 2002), wobei nach den ersten beiden mit frequenzhemmender Antwort und auf letztere mit frequenzsteigender Antwort des Amnions zu rechnen ist.

Durch die Kontraktion wird die Amnionflüssigkeit in Bewegung gehalten und versetzt den Embryo in einen schwingenden Zustand. Die Kontraktionen unterstützen die Körperbewegungen des Embryos, verhindern seine Adhäsion an der Amnionmembran und schützen vor Verklebungen einzelner Körperteile des Embryos (Bellairs und Osmond, 1998; Romanoff, 1960; Bautzmann und Schroder, 1953). Weiterhin bewirkt die Kontraktion die Durchmischung der Amnionflüssigkeit, wodurch eine bessere Verteilung von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und des gelösten Sauerstoffs erreicht wird (Nechaeva, M. V. *et al.*, 2004).

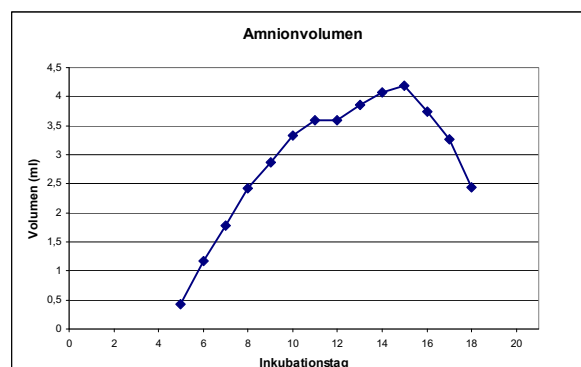


Abbildung 1: Volumen des Amnionflüssigkeit (nach Romanoff, 1960)

Die in dem Amnion enthaltene Flüssigkeit wird am D3 gebildet, kurz nach dem sich die Amnionfalte geschlossen hat. Der Ort der Bildung ist bisher nicht bekannt. Man nimmt an, dass diese extraembryonal erfolgt, da aus bisherigen Untersuchungen gesichert ist, dass sie auch nachdem der Embryo entfernt wurde, gebildet wird (Faber *et al.*, 1973). Am D5 hat sich bereits soviel Amnionflüssigkeit gebildet, dass diese fähig ist, das Amnionepithel vom Embryo abzuheben. Um D14 erreicht sie ihr maximales Volumen mit bis zu 4 ml, um dann bis Tag 18 auf 0,5 ml abzusinken (Abbildung 1) (Romanoff, 1960). Für die Bildung der Flüssigkeit spielt das Chloridion (Cl⁻) eine entscheidende Rolle (Faber *et al.*, 1973). Der erhöhte Chloridgehalt, den auch Bagott (2001) bestätigen konnte, führt nachfolgend zu einem Wasserinflux.

2.1.1.2 Der histologischer Aufbau der Amnionmembran

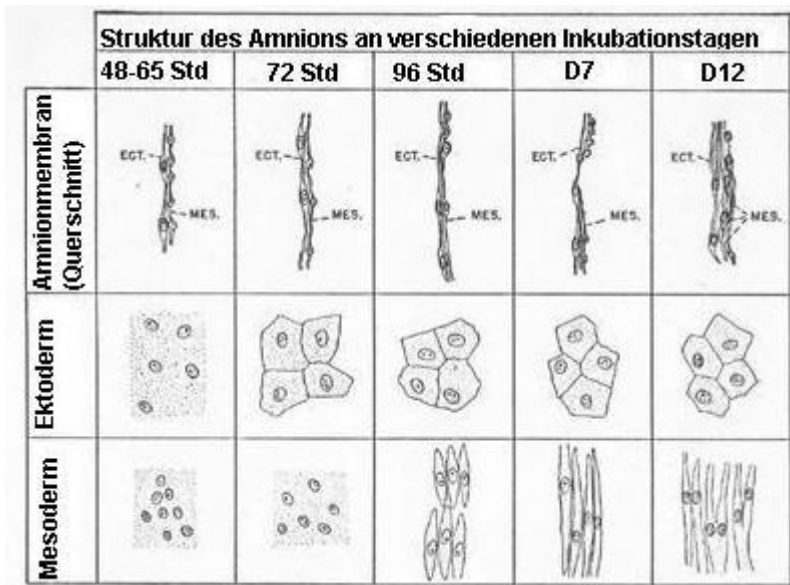


Abbildung 2: Struktur des Amnions an verschiedenen Inkubationstagen, (Romanoff, 1960)

Ein innerer ektodermaler und ein äußerer mesodermaler Anteil bilden das Amnionepithel. Das Ektoderm weist zu Beginn der Entwicklung keine erkennbaren Zellgrenzen auf, erst am D3 differenzieren sich die Zellen zu einem Epithel mit deutlichen Zellgrenzen (Romanoff, 1960).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen vom 7./8. Inkubationstag zeigen, dass

die Epithelzellen einer stark ausgebildeten Basalmembran aufsitzen, die an der Grenze zur Epithelzellbasis einen amorph-homogenen Charakter (Lamina densa) annimmt (Bautzmann und Schmidt, 1960). Die durchschnittlich 20µm großen Epithelzellen, weisen einen großen, runden, abgeplatteten Zellkern auf, der chromatinarm und oft am Rand der Zelle zu finden ist. Das homogene Grundplasma enthält Lipideinschlüsse in unterschiedlicher Größe. Die Epithelzellen stehen untereinander in Verbindung. Das Zytoplasma schiebt sich zwischen oder über die Zelleiber der Nachbarzellen, wobei ein Labyrinth von Zellgrenzen entsteht. Die Plasmalemmata benachbarter Zellen erscheinen elektronenmikroskopisch stellenweise zu Haftplatten, den so genannten Desmosomen, verdichtet. An der Zelloberfläche lässt sich ein unterschiedlich dichter Besatz an längeren oder kürzeren, oft auch verzweigten Mikrovilli erkennen (Bautzmann und Schmidt, 1960). Mit fortschreitender Inkubation nehmen die Amnionepithelzellen langsam an Höhe zu und haben dann eher die Form eines zylindrischen Epithels (Abbildung 2) (Romanoff, 1960).

Der äußere mesodermale Anteil ist avaskulär und liegt dem extraembryonalen Coelom an. Auch das Mesoderm weist bis zum D3 keine klaren Zellgrenzen auf, sondern stellt sich vielmehr als Syncytium mit vielen kleinen, ovalen Kernen dar (Romanoff, 1960). Spindelartige Mesenchymzellen formen sich nach D5 zu den typischen glattmuskulären Elementen um, die Myofibrillen enthalten. Ihr Zytoplasma wird dunkler, der Zelleib streckt sich, die ovalen Zellkerne schrumpfen und der Nukleus nimmt an Größe zu (Blasius, 2006). Anfangs sind die glatten Muskelzellen parallel angeordnet, aber sehr schnell bilden sich diese zu der typischen Muskelzellformation aus. Diese Formation besteht aus Kreuz- oder

Sternanordnung der Myocyten. Aus den spindelförmigen Myocyten entwickeln sich vereinzelt „Ursternzellen“, die aufgrund ihrer Zytoplasmaausläufer das sternförmige Aussehen bewirken. Es können bis zu zehn Zellkerne in den Ursternzellen enthalten sein. Oftmals ist in ihrer unmittelbaren Umgebung eine zweischichtige, glatte Muskulatur vorhanden. Radiär von der „Ursternzelle“ ausgehend, ordnen sich benachbarte Myocyten an. Bis zum D9 bilden sich immer neue Muskelsterne, die bis zum D10 an Größe zunehmen, aber deren Anzahl sich verringert. Am 12. Inkubationstag besteht das mesodermale Blatt des Amnions aus drei Schichten glatter Muskelzellen (Romanoff, 1960). Ein feines Netzwerk aus bindegewebigen Anteilen formt sich um den D3. Besonders häufig sind diese Netzwerke in Gebieten des Amnions mit hoher Kerndichte zu beobachten. Die Bindegewebsfasern geben dem Amnion die nötige Dichte und Festigkeit, aber auch durch ihre wellenartige Anordnung wird eine Unterstützung bei Dehnung und Kontraktion der Amnionmuskulatur erreicht (Romanoff, 1960; Bautzmann, 1953).

In der Amnionmembran fehlt die Ausbildung von Nervenfasern. Die spontane Kontraktion der glatten Amnionmuskulatur kann unter anderem mittels Rezeptoren über Transmitter und/oder Hormone moduliert werden (Bowers und Dahm, 1992).

2.1.1.3 Die Entwicklung der Allantois

Die Allantois ist die letzte der sich entwickelnden Hüllen des Hühnerembryos und unterscheidet sich in ihrer Entwicklung vom Amnion und Chorion durch ihre endodermale Herkunft als Diverticulum des hinteren Darmabschnittes.

Die Allantois entwickelt sich zwischen dem 20. und 28. Somitenstadium (D3) im Embryo am Boden der hinteren endodermalen Darmbucht (Romanoff, 1960). Der Ursprung der Allantois ist intraembryonal und verbleibt auch dort während der gesamten Entwicklung. Die Allantois wächst über den Nabel hinaus in das Exocoelom und vereinigt sich am D4/5 mit den anderen extraembryonalen Hüllen. Die Bildung der Allantoishöhle erfolgt sehr schnell. Sie erstreckt sich zwischen Chorion und Amnion. Die Allantoismembran dient dem Gasaustausch und dem Auffangen der Flüssigkeit mit den Stoffwechselendprodukten der Nieren.

Bevor die embryonale Niere ihre Tätigkeit aufnimmt, ist die Allantoisflüssigkeit klar und farblos. Ab Tag 4 beginnen die embryonalen Nieren ihre Tätigkeit und der Urin wird in der Allantoishöhle aufgefangen. Die Allantoisflüssigkeit wird gelblicher und die Konzentration der Urate wird höher. Das Volumen steigt rapide bis D13 an und wird dann bis Ende der Inkubation durch Resorption des Wassers eingedickt. Dabei kommt es zur Ummantelung einzelner Stoffwechselendprodukte, die sich mit Mucus vermischt als Plaque ablagern (Romanoff, 1960).

2.1.1.4 Die Entwicklung des Chorions

Die Entstehung des Chorions ist eng verbunden mit der Ausbildung des Amnions. Durch die Amnionfaltung entstehen aus dem extraembryonalen Ektoderm sekundär zwei Lamellen. Eine dieser Lamellen richtet sich nach innen, bildet das Amnion und umschließt den Embryo (Romanoff, 1960). Aus der anderen Lamelle, die sich nach außen richtet (Romanoff, 1960), entsteht das Chorion, welches sich der inneren Schalenhaut anschmiegt (Abbildung 3).

Zwischen D4 und D5 stößt die Allantois in das Exocoelom vor und fusioniert mit dem Chorion. Während des Wachstumsprozesses verbindet sich die mesodermale Schicht der Allantois mit der unmittelbar angrenzenden mesodermalen Chorionschicht in den Raum zwischen Chorion und Amnion, so dass sich die beiden Membranen zur Chorioallantoismembran (CAM) zusammenlegen. Innerhalb dieser beiden mesodermalen Schichten kommt es zur Ausbildung eines dichten und stark verzweigten Kapillarnetzwerkes – gebildet von den Aa. und den Vv. umbilicales – welches sich mit dem embryonalen Kreislauf des Hühnerembryos verbindet (Patten, 1957). Durch die Ausbildung der CAM ist es dem Hühnerembryo möglich, ab D6 sein Blut mit Sauerstoff anzureichern, und das anfallende Kohlendioxid in die Außenwelt abzugeben. Erleichtert wird der Prozess des Gasaustausches durch die Anordnung und Ausdehnung der CAM direkt unterhalb der Eischale. Die maximale Ausdehnung der gasaustauschenden CAM wird an D13 erreicht.

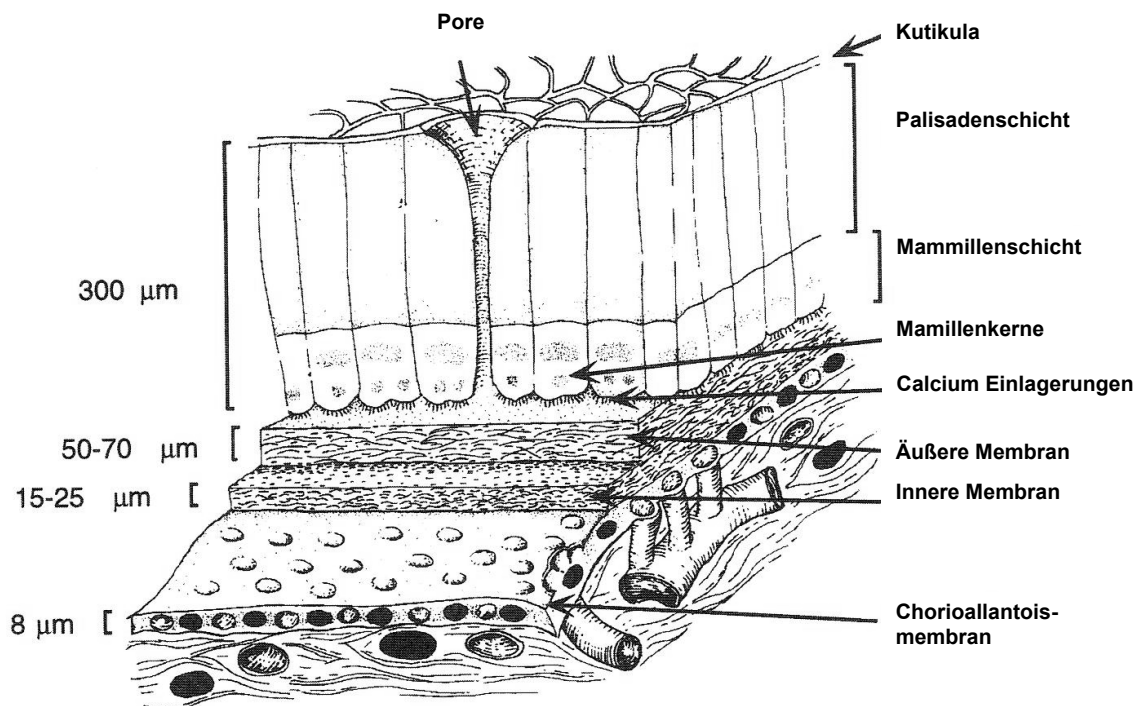


Abbildung 3: Eischale in Verbindung mit der Chorioallantoismembran (Rahn *et al.*, 1979)

2.1.1.5 Der histologischer Aufbau der Chorioallantoismembran

Histologisch kann die Allantoismembran nicht getrennt von der Chorionmembran beschrieben werden, da sie ab D5 verwachsen sind.

Das Epithel der Allantoisblase zeigt im Häutchenpräparat ein verhältnismäßig gleichmäßiges Bild. Es sind große flach-kubische und nahezu geradlinig begrenzte Zellen, die sich unterschiedlich anfärben lassen. Vorwiegend sind die Zellen einkernig, selten zweikernig. Die Kerne sind teils kreisrund, teils oval, können aber auch gelegentlich ein wenig ausgebuchtet und gekantet gesehen werden. Die meisten Zellkerne enthalten zwei Nukleoli. Eine besondere Anordnung der Epithelzellen zeigt sich in der rosettenartigen Ausrichtung von fünf bis acht Zellen um eine in der Mitte liegende kleinere Zelle (Abbildung 4). Die Kerne sind dann der Rosettenmitte zugewandt. Das Zytoplasma der Allantoisepithelzellen besitzt zum Teil schaumige Struktur, bisweilen können auch große Vakuolen auftreten, dann ist der Zellkern wie bei Fettzellen an die Peripherie gedrängt.

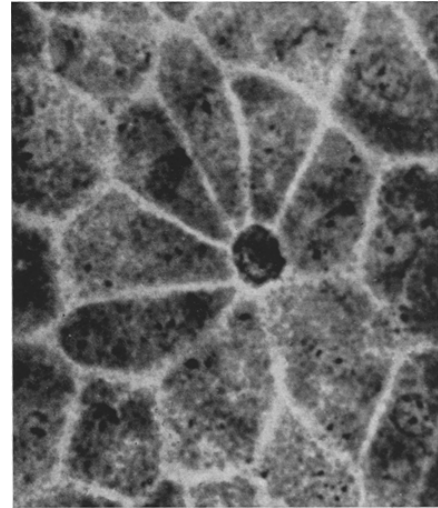


Abbildung 4: Rosettenartige Anordnung von Epithelzellen der Allantois, Flachschnitt, Chrom-Hämatoxylin-Phloxin nach GOMORI, 880fach (Kühnel, 1961)

Das Bindegewebe der Allantois lässt sich durch drei Elemente charakterisieren:

1. Formation argyrophiler Fasern,
2. ausbreitendes Gefäßnetz,
3. spezifische Zellformen (Kühnel, 1961).

Unterschieden werden kann das Bindegewebe, welches dem Allanto-Chorion anliegt von dem Gebiet, welches dem Amnion aufliegt. Um ein membranartiges Epithelgewebe auszubilden, verteilen sich die Gitterfasern zu dichten, flächenhaft ausgebreiteten Netzen. An histologischen Häutchenpräparaten ist erkennbar, dass das subepitheliale Bindegewebe mit einer aus feinstem Bindegewebe bestehenden basalen Schicht besteht. Je weiter man sich davon entfernt, umso größer wird der Querschnitt der Fasern und umso grobmaschiger das Fasernetz (Kühnel, 1961). In diesem Fasernetz sind die großen Gefäße eingebaut. Vom D12 bis D18 konnte Kühnel (1961) keine histologischen Unterschiede im Maschenwerk feststellen.

Eine andere Bindegewebsstruktur stellte Kühnel (1961) in dem Allantoisgebiet fest, welches dem Amnion anliegt und keinen Kontakt zum Chorion aufweist. Hier bildet sich ebenfalls das wie oben beschriebene feinmaschige Gitternetzwerk aus. Bemerkenswert ist jedoch, dass

sich unmittelbar unter dieser Schicht eine Faserschicht anschließt, bei der die Fasern von einzelnen Knotenpunkten aus büschel- oder pinselartig dünne, lange Fasern ausbilden. Die darunter liegende Schicht bildet eine noch größere Verdichtung in seinen Maschen als im Allanto-Chorion.

Auch in der Ausbildung des Blutgefäßsystems lässt sich die Allantois in zwei unterschiedliche Gebiete einteilen. Ein weitmaschiges Gefäßnetz mit einem stark kapillarisierten Netz im Allanto-Chorion steht einem karg ausgestatteten Gefäßnetz, welches dem Amnion zugewandt ist, gegenüber (Kühnel, 1961).

2.1.1.6 Die physiologische Bedeutung der Chorioallantoismembran (CAM)

Die wohl wichtigste Aufgabe der CAM ist die Funktion des Gasaustausches (Bellairs und Osmond, 1998; van Golde *et al.*, 1996), die gleichzusetzen ist mit der Funktion Säugerplazenta oder der adulten Lungenfunktion.

Die CAM ist verantwortlich für den Kalziumtransport (Bellairs und Osmond, 1998; Freeman und Vince, 1974). Während der ersten 10 Entwicklungstage wird die Kalziumversorgung über den Dottersack gewährleistet. Die benötigte Kalziummenge für die Ossifizierung des Vogelskelettes steigt jedoch in den letzten 11 Inkubationstagen, so dass das Kalzium hauptsächlich aus der Schale bereitgestellt wird. Das geschieht durch Kontakt zur CAM, damit verliert die Schale bis zu 50% ihres Gewichtes.

Des Weiteren ist die CAM ein Sammelbecken für stickstoffhaltige Endabbauprodukte, die durch den Embryo produziert werden (Bellairs und Osmond, 1998).

2.1.1.7 Die Dottersackmembran

Im Gegensatz zum Säugetier ist beim Vogel der Dottersack sehr groß angelegt und dient mit dem enthaltenen Dotter der Versorgung des sich entwickelnden Embryos mit Nährstoffen. Die Nährstoffe werden über Kapillaren, die in der mesodermalen Schicht der Dottersackwand verlaufen, in die Dottersackarterien und -venen (Arteriae und Venae vitellinae) transportiert.

Das Dotter wird von einer „Dottersackhaut“, der so genannten Dottersack- oder Vitellinmembran bereits am 5. Bruttag (Burton und Tullet, 1985) umschlossen. Die Dottersackmembran setzt sich aus einem medial gelegenen vaskularisierten Teil – der Area vasculosa – und einem peripher nicht vaskularisierten Anteil – der Area vitellina – zusammen. Letztere, die Area vitellina, ist zusammengesetzt aus einer Area vitellina interna, die mehr medial zu finden ist und einer Area vitellina externa, die mehr peripher zu finden ist. Die Area vitellina weist nur ectodermale und endodermale, aber keine mesodermalen Anteile auf (Romanoff, 1960). Die Area vasculosa besteht aus einem endodermalen Anteil und einen

mesodermalen Anteil, aus welchem sich die Blutgefäße und das Bindegewebe differenzieren (Romanoff, 1960).

2.1.1.8 Der Vergleich der Entwicklung der Hüllen der Sauropsiden und Mammalia

Als erste Keimhülle entsteht bei den Vögeln die Dottersackmembran. Diese epitheliale Hülle entsteht aus Entoblastzellen, die sich dann sekundär durch die Proliferation des viszeralen Blattes des lateralen Mesoderms zur Dottersackmembran entwickelt. Aus dieser Hülle entwickeln sich später in Verbindung mit dem parietalen Blatt des lateralen Mesoderms die äußeren Keimhüllen, das Chorion und das Amnion (Bragulla, 2004).

Bei den plazentaren Mammalia entsteht erst am Ende der inäquaten Furchung das Chorion als extraembryonaler Teil des Ektoblasten in Form eines Vorläufers, des Trophoblasten (Bragulla, 2004).

In der Histologie bestehen Unterschiede zwischen dem Amnionepithel der Hühnerembryonen und dem der Mammalia. Gemeinsam ist ihnen aber die starke Oberflächenvergrößerung durch dichten Besatz mit Mikrovilli. Die Überlappung der Epithelzellen ist beim Hühnerembryo am ausgeprägtesten. Der Interzellularraum ist sehr eng, die dazwischenliegenden Desmosome sind nicht hervorgehoben, da sie nahezu in der Flucht der Zellgrenzen bleiben (Bautzmann und Schmidt, 1960). Beim Menschen konnten Bautzmann und Schmidt (1960) die weitesten Zellzwischenräume mit imposant ausgebildeten Zellbrücken beobachten.

Histologisch sind die Bindegewebszellen der Allantois bei Sauropsiden weniger stark differenziert im Vergleich zu den Säugern, was verdeutlicht, dass der Unterschied in der funktionellen Beanspruchung der Bindegewebe liegt. An der Grenze zwischen Fetus und Muttertier findet ein entsprechender Stoffaustausch statt, hier ist eine schnelle Reaktion des Bindegewebes von Vorteil. Bei den embryonalen Hüllen der Vögel ist diese Reaktion nicht vonnöten, da der Stoffwechsel der Hühnerembryonen keinerlei maternalen Beeinflussungen unterliegt (Kühnel, 1961).

2.1.2 Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems

2.1.2.1 Die Entwicklung des Herzens und des Blutkreislaufes

Das **Herz** beginnt sich früh aus dem Mesoderm zu entwickeln, etwa gleichzeitig mit den extraembryonalen und intraembryonalen Blutgefäßen. Zu Beginn der Herzentwicklung weist dieses eine gerade lang gestreckte Tubusform auf. Ist die Entwicklung des Embryos so weit fortgeschritten, dass dieser 9 oder 10 Somiten aufweist, streckt sich der Herztubus schneller aus als die pericardiale Höhle wächst und beginnt sich somit zu biegen. Gleichzeitig ist der Tubus an anterioren (Aorta) und posterioren (caudale Reste des Mesocardiums) Punkten

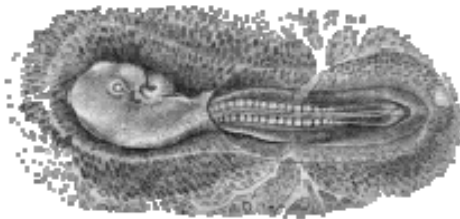


Abbildung 5: 51 h bebrütetes Ei, durch den Herzbeutel erkennt man das S-förmige, mit Blut gefüllte Herz (Keibel, 1906)

fixiert. Bis zum 18-Somiten-Stadium ist die maximale Ausdehnung der U-Form erreicht (Romanoff, 1960). Bereits in dieser frühen Entwicklungsphase ist das Herz fähig, Blut durch den Embryo zu pumpen. Das Blut wird aus der kurzen ventralen Aorta und dem Aortenbaum in die dorsale Aorta gepumpt (Baumann und Meuer, 1992).

Nach weiterem Längenwachstum stößt das U-förmige Herz an den Dottersack. Dadurch vollzieht sich eine linksseitige Torsion. Aus der U-förmigen Gestalt des Herzens entwickelt sich durch weiteres rapides Wachstum eine Herzschleife. Die beiden Enden kommen einander näher und schließen sich zusammen, so dass das Herz eine S-Form beschreibt, wenn das 29-Somiten-Stadium erreicht ist (Abbildung 5). Am Ende des D3 erkennt man bereits die Atria und die Ventrikel. Um D6 bis D8 bildet sich das membranöse Pericardium und umschließt das Herz.

In den ersten zehn Tagen kommt es weitestgehend zur morphologischen Reifung des Herzens. In den restlichen 11 Tagen seiner Entwicklung nimmt vorrangig die Masse zu (Romanoff, 1960).

Schon in der frühen Embryonalphase beginnt die Entwicklung des **Blutkreislaufes**. Als Besonderheit im Vogelembryo entstehen zwei weitestgehend voneinander unabhängige Kreislaufsysteme, das extra- und das intraembryonale Gefäßsystem (Plendl *et al.*, 2002; Romanoff, 1960), die sich erst später in der Embryonalentwicklung vereinigen. Der primäre Blutkreislauf liefert dem Embryo O_2 per Diffusion durch die Eischale und die Membran (Ciotto und Arangi, 1989). Das extraembryonale Gefäßsystem entwickelt sich um den Dottersack durch Vaskulogenese. Dieser Mechanismus bildet aus den in der mesodermalen Schicht der Dottersackwand liegenden Blutinseln neue Gefäße. Die sich bildenden Hämoblasten differenzieren sich über Hämozytoblasten zu Hämangioblasten. In der weiteren Entwicklung bildet sich ein einschichtiger Epithelzellverband aus den Hämangioblasten.

Damit verbunden ist die Bildung runder Hämozytoblasten, die als Vorläufer der Blutzellen gelten. Die frühen Hämangioblasten bilden die so genannten „Blutinseln“ (Decker, 2002).

Innerhalb des Embryos entwickelt sich etwas verzögert - ebenfalls durch Vaskulogenese - das intraembryonale Gefäßsystem. Intraembryonal ist die Entstehung von Endothelzellen nicht mit der Bildung von Blutzellen assoziiert (Risau, 1993).

Mit dem Übergang zum sekundären Blutkreislauf an D3 bilden sich die Gefäße des Dottersackes in einer zweiten Ebene aus. Die Venen verlaufen oberflächlich und die Arterien ziehen in die Tiefe. Der Transport von Sauerstoff ist bereits zu diesem frühen Zeitpunkt an Hämoglobin gebunden.

Über Gefäßsprossung nehmen die Gefäße Verbindung mit der Herzanlage auf und es entsteht so die Kommunikation zwischen dem intra- und dem extraembryonalen Gefäßsystem (Plendl *et al.*, 2002). An D5 entsteht durch die Verschmelzung zweier extraembryonaler Membranen – Chorion und Allantois – die Chorioallantoismembran. Sie übernimmt ab diesem Zeitpunkt die gasaustauschende Funktion. Mit der Ausbildung von Sinusoiden wird die Austauschfläche vergrößert und damit die O₂-Versorgung verbessert (Freeman und Vince, 1974). An D12 wird die Schalenmembran fast vollständig von der CAM bedeckt, eine weitere Ausdehnung ist nicht mehr möglich (Ackerman und Rahn, 1981; Freeman und Vince, 1974). Der arterielle Sauerstoffpartialdruck p_aO_2 in der Chorioallantoisvene sinkt von 83,5 mmHg (ca. 11,11 kPa) an D10 auf 57,2 mmHg (ca. 7,61 kPa) (Tazawa *et al.*, 1971). Somit ist der wachsende Hühnerembryo ab D13 einem steigenden O₂-Mangel ausgesetzt (Freeman und Vince, 1974; Wangenstein und Rahn, 1970).

Als Gegenmaßnahme wird der Blutfluss in der CAM erhöht und dadurch die Sauerstoffversorgung verbessert. Eine weitere Antwort auf den eintretenden Sauerstoffmangel ist die Erhöhung der Kapillardichte in der Muskulatur, wodurch die Diffusionstrecke für die Gase verringert wird (Snyder *et al.*, 1984). Auch diese Regelmechanismen sind jedoch begrenzt (Piiper *et al.*, 1980).

Die Versorgung des Säugetier-Embryos erfolgt über die Plazenta. Aus diesem Grund kann auf das Dotter weitestgehend verzichtet werden. So besteht das embryonale Blutgefäßsystem der Mammalia aus zwei Zirkulationssysteme: dem fetalen Blutkreislauf und dem maternalen Blutkreislauf. Diese beiden Kreisläufe kommunizieren über die Plazenta miteinander. Im Gegensatz zum Säugetier benötigt der Vogelembryo das Dotter für die embryonale Entwicklung. Daher kommt es zur Ausbildung von drei embryonalen Blutkreisläufen beim Hühnerembryo: der intraembryonale, der vitelline und der allantoide

Blutkreislauf. Die letzteren beiden Kreisläufe werden zum extraembryonalen Blutkreislauf zusammen gefasst (Romanoff, 1967).

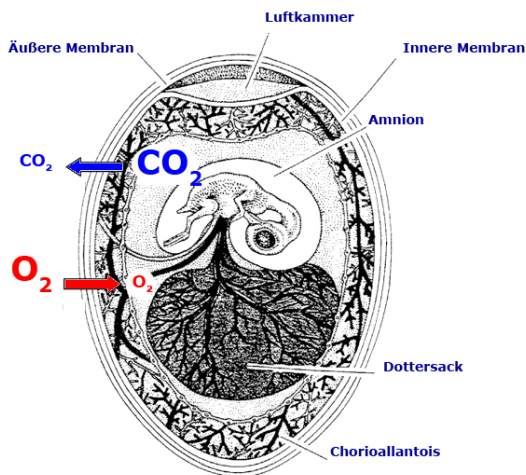


Abbildung 6: Wege des O₂ und CO₂ im Vogelembryo, (Dragon und Baumann, 2003)

Über die stets gleich bleibende Oberfläche der Schale benötigt der wachsende Embryo im zunehmenden Maße Sauerstoff im Austausch gegen Kohlenstoffdioxid.

Den Transport von Sauerstoff zum Embryo übernimmt die Chorioallantoisvene, die unter der Schale verläuft. Das desoxygenierte Blut wird über die Chorioallantoisarterie wieder zum Ort des Gasaustausches mit der Außenwelt abtransportiert (Abbildung 6).

Diese Funktion des Gasaustausches ist gleichzusetzen mit dem plazentaren Kreislauf der Säugetiere.

2.1.2.2 Hämoglobin im Vogelblut

Das Hämoglobin (Hb) ist der in den roten Blutkörperchen enthaltene Blutfarbstoff und hat verschiedene Aufgaben:

- Vehikel für Sauerstoff,
- Vehikel für Kohlenstoffdioxid,
- Pufferung des Blutes.

Während der Embryogenese des Vogels treten embryonale und adulte Formen des Hb auf. Wie beim Säugetier ist das Hb-Molekül des Vogels aus 4 Polypeptidketten (Tetramer) aufgebaut, mit je einer Farbstoffkomponente, dem Häm.

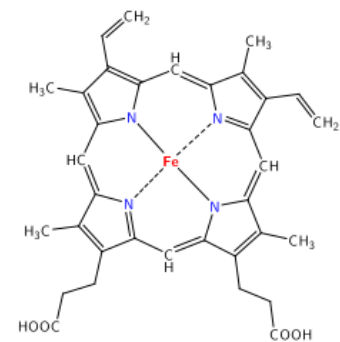


Abbildung 7: Struktur des Hämoglobins

Die Farbstoffkomponente besteht aus vier gleichartigen prosthetischen Gruppen, die als Protoporphyrine mit zentralem zweiwertigem Eisen gekennzeichnet sind. Jedes Protoporphyringerüst besteht aus 4 Pyrrolringen, die über Methinbrücken miteinander verbunden sind und charakteristische Seitenketten tragen (Abbildung 7).

Spezifisch embryonale Hämoglobine der Hühnerembryonen werden von den primitiven Erythrozyten in den ersten Tagen gebildet (Ciotto *et al.*, 1975; Bruns und Ingram, 1973). Analysen dieser Hämoglobine ergaben vier Fraktionen, die von Brown und Ingram (1974) als HbP, HbP', HbE und HbM ermittelt wurden.

Ab dem 6. Inkubationstag treten die definitive Erythrozyten auf. Sie sind nicht mehr in der Lage, embryonales Hb zu synthetisieren. Diese definitiven Erythrozyten produzieren die

auch beim adulten Vogel vorkommenden Hb-Typen HbA und HbD, sowie eine kleine Fraktion HbH, welche nur kurz vor und kurz nach dem Schlupf nachgewiesen werden kann. Um D9 machen diese adulten Formen bereits 65% der gesamten Hämoglobine im Blut des Hühnerembryos aus (Ciroto *et al.*, 1975; Bruns und Ingram, 1973; Schalekamp *et al.*, 1972). An D7, wo die erste Population der definitiven Erythrozyten vorliegt, liegt das Verhältnis von HbA zu HbD bei $\sim 0,64:1$, an D9 bereits bei $\sim 1:1$ (Baumann *et al.*, 1983) und nach dem Schlupf sowie beim adulten Huhn bei 3:1 (Bruns und Ingram, 1973).

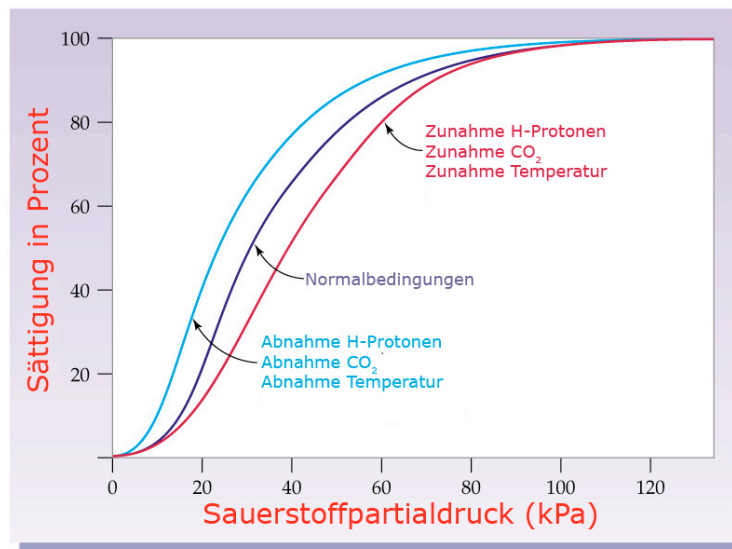


Abbildung 8: Sauerstoffbindungskurve und ihre Einflussfaktoren

Die Hämoglobinuntereinheiten kooperieren miteinander. Dies lässt sich an dem charakteristischen sigmoiden O_2 -Bindungskurvenverlauf erklären (Abbildung 8). Die Beladung des Hämoglobins mit Sauerstoff, die O_2 -Sättigung (sO_2), hängt vom Sauerstoffpartialdruck (pO_2) ab. Im Zustand der Anoxie, d.h. in Abwesenheit von O_2 , ist das Hämoglobin desoxygeniert (O_2 -Sättigung 0%). Mit steigendem pO_2 nimmt die O_2 -Sättigung zu.

Bei einem pO_2 90-100 mmHg (12,0-13,3 kPa) ist das Hämoglobin zu $>95\%$ mit O_2 gesättigt. Bei einem arteriellen pO_2 von 60 mmHg (8,0 kPa) beträgt die O_2 -Sättigung immer noch 90%. Der flache Verlauf im oberen Teil der Bindungskurve (Abbildung 8) wirkt sich günstig auf die Aufnahme von O_2 auf, da selbst bei Erniedrigung des pO_2 (Hypoxie) eine hohe O_2 -Sättigung gewährleistet bleibt.

Im Mittelteil (10-60 mmHg; 1,33-8,0 kPa) verläuft die Kurve steil. Dies ist von Vorteil für die Abgabe von O_2 bei relativ hohen Partialdrucken, da eine bessere Abgabe in das umgebende Gewebe ermöglicht wird.

Die Affinität von Hb zu Sauerstoff wird durch allosterische Effektoren, beim Vogel sind das die organischen Phosphate IP5, ATP und 2,3-DPG, reguliert. Durch Bindung an das Desoxyhämoglobin erfolgt eine Stabilisierung der Quervernetzung der Polypeptidketten und senkt so die Affinität zum Substrat Sauerstoff. Die Affinität von Hb zu Sauerstoff wird durch den P_{50} -Wert charakterisiert. P_{50} -Wert gibt an, bei welchem O_2 -Partialdruck die Zentren des Hämoglobins zu 50% mit Sauerstoff besetzt sind. Je niedriger der P_{50} -Wert, desto höher ist die O_2 -Affinität (Stryer, 2003; Stevens, 1996).

Decker (2002) untersuchte die Gehalte an 2,3-DPG im Blut von Hühnerembryonen und bestätigte Ergebnisse andere Autoren (Bartlett und Borgese, 1976; Borgese und Meldolesi, 1976; Isaacks *et al.*, 1976). Es findet ein Wechsel im Muster der organischen Phosphate vom stärkeren allosterischen Effektor (ATP) zum schwächeren allosterischen Effektor (2,3-DPG) ab D14 statt und damit eine höhere Sauerstoffaffinität zum Hämoglobin (Isaacks *et al.*, 1976). Der Blut-Gas-Status des Embryos wird verbessert. Der Auslöser für den Wechsel ist die zunehmende Hypoxie im letzten Inkubationsdrittel. Nach dem internal pipping (i.p.) an D19 kehrt sich das Muster wieder zugunsten des stärkeren allosterischen Effektors um.

Die embryonalen Hämoglobine weisen wie bei den meisten Tierarten bisher beschrieben, so auch beim Huhn, eine höhere Sauerstoffaffinität auf, als die adulten Formen. Der Bohr-Effekt ist bei den Adulten deutlicher ausgebildet. (Ciotto und Arangi, 1989; Baumann *et al.*, 1982; Ciotto *et al.*, 1975). Als Bohr-Effekt wird die Abhängigkeit der O_2 -Bindung an das Hämoglobin vom pH und vom pCO_2 bezeichnet.

Der Embryo hat gegenüber dem Adulten höhere kompensatorische Möglichkeiten, einem ansteigenden Bikarbonatgehalt entgegen zu wirken. Der pCO_2 -Gehalt erhöht sich (wie oben bereits erwähnt) mit fortschreitender Entwicklung. Trotz dieser Erhöhung wird im Embryo der Blut-pH auf gleich bleibendem Niveau gehalten. Ermöglicht wird diese kompensatorische Maßnahme durch einen steigenden Bikarbonatgehalt (Dawes und Simkiss, 1971). Verändern sich für den Embryo die Umweltbedingungen (mangelnder Sauerstoff in der Umgebung), so steigt der HCO_3^- -Gehalt rapide an, damit verbunden ist auch ein Anstieg im Base Excess (Dawes und Simkiss, 1971). Dawes und Simkiss (1971) vermuten, dass dieser kompensatorische Mechanismus nicht durch die Niere bewerkstelligt wird, sondern durch Resorption von Mineralien aus der Eischale.

2.2 Die Zusammensetzung der embryonalen Flüssigkeiten

2.2.1 Ausgewählte Inhaltsstoffe der Amnionflüssigkeit

Über die Elektrolyte wird der Wasserhaushalt des Embryos einschließlich seiner flüssigkeitsgefüllten Höhlen in Balance gehalten (Simkiss, 1980).

Zahlreiche Studien zur Zusammensetzung der Amnionflüssigkeit zeigen die unterschiedlichsten Konzentrationen an einzelnen Inhaltsstoffen. Deren Funktionen sind wesentlich für den Flüssigkeitshaushalt. So ist z.B. das Chlorid-Ion (Cl^-) entscheidend an der Bildung der Amnionflüssigkeit beteiligt (Baggott, 2001; Faber *et al.*, 1973).

Das embryonale Herz ist in der frühen Entwicklungsphase der Amnionflüssigkeit ausgesetzt. Die Amnionflüssigkeit hat bis D12 die gleiche Ionenzusammensetzung wie das Blut (Harsch und Green, 1963). Danach ergeben sich signifikante Verschiedenheiten in der Zusammensetzung für K^+ , Na^+ und Cl^- in der Blut- und Amnionflüssigkeit (Harsch und Green, 1963).

Ab D11 kommt es durch die Ruptur der seroamniotischen Platte zum Eiweißestrom in die Amnionhöhle, so dass sich ab diesem Inkubationstag die Zusammensetzung dieser Flüssigkeit ändert. Weiterhin zu beachten ist die Verschmelzung des Amnions mit der Chorioallantoismembran ab D 13/14.

Die Amnionmembran ist während der frühen Entwicklungsphase dünn, nimmt jedoch an Gewicht zwischen D9 und D14 von 0,07g auf 0,31g zu (Adolph, 1967).

Wie die Regulation der Amnionflüssigkeit im Zusammenhang mit den umgebenden Kompartimenten erfolgt, ist nicht bekannt. Es handelt sich allerdings um aktive Vorgänge der Sekretion, Absorption oder um passive, wie z.B. des einfachen Abflusses (Adolph, 1967).

Eine umfassende Zusammenstellung ausgewählter Inhaltsstoffe der Amnionflüssigkeit (des Blutes und der Allantoisflüssigkeit) ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: ausgewählte Inhaltsstoffe der Blut-, Amnion- und Allantoisflüssigkeit (verschiedener Autoren)

Autor	Beprobte Flüssigkeit	Tierart	Proben-nahme	K ⁺ (mmol/l)	Na ⁺ (mmol/l)	Cl ⁻ (mmol/l)	Ca ²⁺ (mmol/l)	Lactat (mmol/l)		
Howard 1957	Amnion	Huhn	D6	3,0	136,3					
			D8	3,3	136,4					
			D11-12	3,9	142,2					
	Blut-Plasma		D11	4,5	137,7					
			D12	4,2	132,6					
			D18	3,7	132,7					
Smockkiewiczowa 1959	Amnion	Huhn	D10	4,1	127,0					
			D11	4,5	134,0	131,0	3,2			
			D12	4,7	130,0	141,0	4,2			
			D13	7,0	132,0	144,0	7,0			
			D14	21,8	112,0	108,0	9,4			
			D15	23,8	107,0		7,2			
			D16	19,2	119,0					
	Allantois		D17	18,0	118,0		6,4			
			D11	12,0	115,0	68,0	7,0			
			D12	13,0	110,0	90,0	4,0			
			D13	20,0	105,0	84,0	4,8			
			D14	25,0	84,0	72,0	3,0			
			D15	26,0	82,0		4,0			
			Amnion	Huhn	D11	4,5	134,0	131,0	3,2	
					D12	4,7	130,0	141,0	4,2	
D13	7,0	132,0			144,0	7,0				
D14	21,8	132,0			108,0	9,4				
D15	23,8	107,0				7,2				
Romanoff 1967	Amnion		D11	4,5	134,0	131,0	3,2			
			D12	4,7	130,0	141,0	4,2			
			D13	7,0	132,0	144,0	7,0			
			D14	21,8	132,0	108,0	9,4			
			D15	23,8	107,0		7,2			

Autor	Beprobte Flüssigkeit	Tierart	Probenname	K ⁺ (mmol/l)	Na ⁺ (mmol/l)	Cl ⁻ (mmol/l)	Ca ²⁺ (mmol/l)	Lactat (mmol/l)
Harsch und Green 1963	Amnion	Huhn	D8	3,9	147,3	141,3		
			D11	4,33	142,39	148,95		
	Blut		D11	5,60	139,00	110,37		
			D18	9,10	145,09	97,76		
Faber et al. 1973	Amnion	Huhn	D4	3,38	145	128,5		
Grabowski 1963	Amnion	Huhn	D5	2,2	131,0			
Simkiss 1980	Amnion	Huhn	D15	24,0	107,0	67,0	7,0	
Hoiby et al. 1987	Blut	Huhn	D14					0,51
			D15					0,50
			D16					0,46
			D17					0,51
			D18					0,55
			D19					0,71
			D20					0,94
Mellor 1970	Amnion	Ziege	D81	5,4	155	123		
			D94	5,2	77	110		
			D110	7,9	136	123		
			D124	7,3	108	102		
			D141 (a)*	6,8	136	109		
			D141 (b)*	5,4	147	108		

* (a) und (b) = Zwillinge

2.2.2 Ausgewählte Parameter des Blutes

Aus mehreren Arbeitsgruppen liegen Ergebnisse zu Blutgase vor. In der nachfolgenden Tabelle wurde ein Überblick über die vorhandenen Daten zusammengestellt (Tabelle 2).

Aus diesen Daten geht hervor, dass Unterschiede in der Zusammensetzung der Gasparameter zwischen dem Blut und der Amnionflüssigkeit bestehen (Boutilier, 1977: Amnionflüssigkeit um 6,7; Blut um 4,4).

Dawes und Simkiss (1971) beobachteten einen altersabhängigen Anstieg des pH (D12 7,37, D17 7,40), wohingegen Baumann und Meuer (1992) einen altersabhängigen Abfall ermittelten. Einen gleich bleibenden pH dagegen fanden Boutilier *et al.* (1977) und Hühnke (2003) in ihren Untersuchungen.

Alle Autoren ermittelten einen Abfall für pO_2 und einen Anstieg für pCO_2 über den Inkubationszeitraum.

In Untersuchungen von Hühnke (2003) nahm die Sauerstoffsättigung des Blutes aus der Chorioallantoisvene unter der Bedingung eines verminderten Sauerstoffgehaltes im zweiten bzw. dritten Inkubationsdrittel ab. Dagegen lag dieser unter Kontrollbedingungen an den Untersuchungstagen D14, D16 und D18 konstant bei 96%. Unterschiedliche Sättigungen im Blut fand Baumann, wenn das Blut aus verschiedenen lokalisierten Gefäßen gewonnen wurde (Tabelle 2).

Tabelle 2: Blutgasparameter verschiedener Autoren

Autor	Tierart		Unter- suchungstag	pH	pO ₂ [kPa]	pCO ₂ [kPa]	sO ₂ [%]	HCO ₃ ⁻ [mmol/l]
Dawes und Simkiss (1971)	Gallus gallus f. domestica	Blut	D12	7,370		4,12		
			D13	7,387		4,99		
			D14	7,353		6,48		
			D15	7,360		6,25		
			D16	7,414		6,32		
			D17	7,405		6,71		
			D12 9%CO ₂	7,231		11,68		
			D13 9%CO ₂	7,265		11,36		
			D14 9%CO ₂	7,333		11,13		
			D15 9%CO ₂	7,304		12,68		
D16 9%CO ₂	7,296		11,47					
Boutillier et al. (1977)	Gallus gallus f. domestica	Blut	D8	7,47	9,35	1,57		9,07
			D10	7,42	8,65	2,06		10,55
			D12	7,43	7,39	3,32		17,55
			D14	7,35	5,24	4,24		18,65
			D16	7,40	4,81	4,75		24,68
			D17	7,41	4,58	3,89		20,55
			D18	7,46	5,11	3,95		22,51
			Amnion- flüssigkeit	D8	6,84	11,36	1,65	
		D10	6,66	10,52	1,89		1,83	
		D12	6,60	11,73	3,61		2,90	
		D14	6,62	9,55	3,75		5,64	
		D16	6,63	9,05	4,64		4,83	
		D17	6,89	12,57	4,36		5,91	
		Baumann und Meuer (1992)	Gallus gallus f. domestica	vitelline Vene	D4	8,00	8,53	
D6	7,89				10,8		> 95	
vitelline Arterie	D4			7,80	6		37	
	D6			7,66	6,53		25	
Jugularvene	D4			7,64	3,87		22	
	D6			7,42	4,72		12	
Hühnke (2003)	Gallus gallus f. domestica	Chorioallan- toisvene	D14 K*	7,61	10,19	2,99	96,84	
			D16 K*	7,53	8,08	4,84	96,80	
			D18 K*	7,52	5,91	5,61	96,38	
			D14; SM** von D6-12	7,61	10,41	3,11	97,40	
			D16; SM** von D6-12	7,56	8,07	4,48	96,40	
			D18; SM** D6- 12	7,49	6,37	5,60	89,40	
			D14 SM** D12- Versuchsende	7,65	9,14	2,54	96,08	
			D16 SM** D12- Versuchsende	7,61	7,70	3,11	91,58	
			D18 SM** D12- Versuchsende	7,54	6,55	3,94	87,40	

* K = Kontrolle

** SM= Sauerstoffmangel (15% O₂)

2.3 Membranen als Barrieren

Aus den bisherigen Ausführungen ist abzuleiten, dass im sich entwickelnden Hühnerembryo drei Barrieren bestehen:

- Blut – Allantois – Barriere
- Blut – Amnion – Barriere
- Allantois – Amnion – Barriere.

Sie trennen die Blutflüssigkeit, die Amnionflüssigkeit und die Allantoisflüssigkeit voneinander.

Zwischen D13/14 fusionieren die Amnionmembran und die Allantoismembran. Zwischen beiden Epithelien verlaufen kleine Gewebe mit Blutgefäßen und lymphatischen Gefäßen. Der Austausch der Metabolite zwischen Amnion und Allantois erfolgt via Blut- und Lymphgefäße. Amnion- und Allantoisepithel sind nicht innerviert, so dass die Regulation wahrscheinlich hormonell gesteuert wird. Welche Hormone mit welcher Wirkung involviert sind und über deren möglichen Wege ist in der Literatur nicht beschrieben.

Bei Säugetieren, einschließlich des Menschen, erfolgt der Urinfluss direkt in die Amnionflüssigkeit. Im Gegensatz dazu berichtet ten Busch *et al.* (1997a) beim Vogel, dass die Passage von Urin in die Allantoisflüssigkeit erfolgt. Die Allantoisflüssigkeit ist daher funktionell gleichzusetzen mit der Amnionflüssigkeit der Säugetiere. Die Ionenkonzentrationen müssen durch die Barrieren erhalten werden, um Belastungen des Stoffwechsels bis hin zu Vergiftungen zu vermeiden.

Die Zusammensetzung von Plasma, Amnionflüssigkeit und Allantoisflüssigkeit ist verschieden und spezifisch für jedes Kompartiment (Blasius, 2006; Piechotta *et al.*, 1998; Murphy, 1997; ten Busch *et al.*, 1997b; ten Busch *et al.*, 1997a; Romanoff, 1967; Abramovici, 1966; Harsch und Green, 1963; Romanoff, 1960; Smockiewiczowa, 1959). Verglichen mit dem Plasma und der Allantoisflüssigkeit ist die Amnionflüssigkeit hauptsächlich hyporeguliert (ten Busch *et al.*, 1997b).

Die Allantoismembran ist ein respiratorisches Organ. Die Amnionhöhle ist Ort des Metabolismus sowie Sammelort von Messengersubstanzen und Hormonen (Epple, 1997). In unterschiedlichen Konzentrationen kommen in allen drei Flüssigkeiten freie Catecholamine, sulfatierte Catecholamine, konjugierte Steroide, Aminosäuren, Glucose, Thyroxine, Trijodothronine, freie Steroide und Aminosäuren vor (Epple, 1997; ten Busch *et al.*, 1997b).

Neben den von Epple *et al.* (1992) berichteten unterschiedlichen Konzentrationen der Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin in der Amnionflüssigkeit und im Plasma, zeigten auch Tönhardt *et al.* (1995) und Tomaschek (1997) einen Konzentrationsunterschied zwischen Allantoisflüssigkeit und Plasma. Gill *et al.* (1994)

bestätigte diese festgestellten Unterschiede zwischen Amnionflüssigkeit und Plasma. Die Catecholamine in der Amnionflüssigkeit lagen deutlich unter denen der Allantoisflüssigkeit. Damit konnte die sehr effektive amniotische Barriere für die freien Catecholamine nachgewiesen werden. Ferner konnte das Vorhandensein einer fast absoluten amniotischen Barriere für sulfatierte Catecholamine nachgewiesen werden.

Auch für Aminosäuren und deren abgeleiteten Verbindungen konnte Epple (1997) eine Barrierefunktion feststellen. Fünf von sechs Aminosäuren zeigten an D13/14 unterschiedliche Konzentrationen in den einzelnen Kompartimenten. Die sechsmal höhere Konzentration von Beta-Alanin und 2,8mal höhere Konzentration von Taurin in der Allantoisflüssigkeit gegenüber dem Plasma lässt vermuten, dass der Allantoisflüssigkeit eine Depotfunktion zukommt.

Bereits 1943 konnte Walker anhand der Leitfähigkeit der Allantois- und der Amnionflüssigkeit einen Unterschied in der Zusammensetzung der Kompartimente feststellen. In der Allantoisflüssigkeit verändert sich die Leitfähigkeit aufgrund der metabolischen Endprodukte aus der sich entwickelnden Niere. Eine Leitfähigkeitsveränderung konnte auch in der Amnionflüssigkeit festgestellt werden. Diese beruht jedoch auf dem einströmenden Albumin nach dem Riss der seroamniotischen Platte an D11.

2.4 Ausgewählte Inkubationsparameter

2.4.1 Sauerstoff

Sauerstoff ist ein Umweltfaktor, der während der Untersuchung einfach, exakt und wiederholbar zu dosieren ist.

Der Austausch der Gase Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid über die Eischale wird mit dem FICK'schen Diffusionsgesetz und den effektiven Poren in der Eischale beschrieben (Pagnelli, 1980; Wangenstein und Rahn, 1970; Wangenstein *et al.*, 1970). Zum Austausch trägt die unmittelbar umgebende Ventilation bei (Rahn *et al.*, 1977).

Ein Mangel von Sauerstoff in der Inkubationsluft führt nachweislich zu Reaktionen im Embryo. Viele Arbeitsgruppen haben bereits Erkenntnisse darüber erzielt, wie sich der Vogelembryo den gegebenen veränderten Bedingungen anpasst (Hühnke und Tönhardt, 2004; Ivnitski-Steele *et al.*, 2004; Decker, 2002; Mulder *et al.*, 2000; Ruijtenbeek *et al.*, 2000; Tzschentke und Basta, 2000; Tazawa und Mochizuki, 1977; Tazawa *et al.*, 1971).

Tritt ein Mangel an Sauerstoff auf, unabhängig welcher Ursache, so hat dies Auswirkungen auf den Energiestoffwechsel des Embryos. Besonders kritisch stellt sich dabei die unterschiedliche Entwicklung der einzelnen Organe dar (Dzialowski *et al.*, 2002; Burggren,

1999; Stock und Metcalfe, 1987; McCutcheon *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1969). Der Embryo ist in der Lage, dem Sauerstoffmangel in einem gewissen Umfang über verschiedene kompensatorische Maßnahmen entgegenzuwirken. Zum einen kann die Kapillardichte in der Chorioallantoismembran erhöht werden. Der verminderte Sauerstoffgehalt ist dabei Stimulator für die Angiogenese. Zum anderen kann auch der prozentuale Anteil der Erythrozyten am Gesamtblut, der als Hämatokrit bezeichnet wird, erhöht werden. Nach einer induzierten verminderten Sauerstoffzufuhr vor Tag 13 erhöht sich ebenfalls der Hämatokrit (Dzialowski *et al.*, 2002). Physiologisch wird diese kompensatorische Maßnahme ab dem 13. Inkubationstag genutzt, wenn die Chorioallantoismembran als Austauschfläche ihre maximale Größe erreicht hat.

Neben den Veränderungen zur Steigerung des Sauerstofftransportes werden auch die Blutgase beeinflusst. Wird die maximale Austauschfläche, die durch die Eischale vorgegeben ist, verkleinert oder ist der maximale Gasaustausch erreicht, erhöht sich der arterielle Kohlenstoffdioxidpartialdruck. Mit dieser Erhöhung steigt der Plasma-Bikarbonat-Spiegel. Das dafür benötigte Bikarbonat wird aus der Schale und der Niere bezogen (Freeman und Vince, 1974). Die Folgen sind negativer Einfluss auf die Entwicklung der Nieren und die Stabilität der Eischale. Damit verbunden ist ein ökonomischer Verlust für den Produzenten.

Auch die Catecholamine erfahren eine Änderung ihrer Konzentration unter Sauerstoffmangel. So wird gegen Ende der Inkubationszeit vermehrt Noradrenalin ausgeschüttet, da es zum Erhalt des Blutgasstatus beiträgt. Auch bei akutem Sauerstoffmangel vor Ende der Inkubationszeit wird eine Erhöhung der Konzentration von Noradrenalin festgestellt. Noradrenalin hat weiterhin die Aufgabe, eine Engerstellung der Gefäße und eine Umverteilung des Blutvolumens zugunsten von Herz, Gehirn und Chorioallantoismembran zu bewirken. (von Blumroder und Tonhardt, 2002)

2.4.2 Temperatur

Der Hühnerembryo ist aufgrund seiner Entwicklung außerhalb des Mutterleibes auf exogene Wärmezufuhr angewiesen. Eine optimale Entwicklung ist gewährleistet, wenn die Inkubationstemperatur um 37,5°C liegt.

Mit zunehmenden Wachstum des Hühnerembryos steigt die Eiinnentemperatur auf Grund des erhöhten Metabolismus und erreicht einen Wert von 2°C über der Inkubationstemperatur (Tazawa und Rahn, 1986).

Je nach Entwicklungsstand führen Temperaturänderungen zu unterschiedlichen Reaktionen im Embryo. Hühnerembryonen an frühen Entwicklungstagen zeigen eine höhere Toleranz gegenüber einer Temperatursenkung als ältere Hühnerembryonen. So zeigen Tazawa und

Rahn (1986), dass es bei einer Inkubationstemperatur von 8°C bei Hühnerembryonen an D6 nach 24 Stunden zu Herzstillstand kommt, wohingegen bereits nach 7 Stunden am D20 der Herzstillstand eintritt.

Wird die Umgebungstemperatur erhöht oder abgesenkt, so tritt unmittelbar eine Erhöhung bzw. eine Absenkung der Körpertemperatur ein (Holland, 1998).

Die Veränderungen der optimale Inkubationstemperatur haben je nach

- Art: Erhöhung oder Absenkung
- Ausmaß: extrem oder moderat, oder
- Dauer: kurzzeitig (<24h) oder langfristig (>24h)

unterschiedliche Auswirkungen auf den Entwicklungsgrad des Embryos zum Zeitpunkt der Temperaturänderung (Klemm, 2002). Eine langfristige Absenkung der Inkubationstemperatur hat eine verlängerte Brutzeit zur Folge (Winar, 2006; Booth und Rahn, 1991) und damit eine Verzögerung der Entwicklung. Umgekehrt zeigen Embryonen im frühen Entwicklungszeitraum eine niedrige Toleranz gegenüber einer Erhöhung der Inkubationstemperatur (French, 1997; Romanoff *et al.*, 1938). Die Schlupfrate sinkt, wenn die Temperatur für 6 Tage um 1°C während der ersten oder zweiten Woche der Inkubation erhöht wird. Keine Auswirkungen auf die Schlupfrate zeigte sich bei einer kürzeren Dauer der Temperaturerhöhung (French, 1997).

2.5 Regelkreis und Adaptation

Alle beschriebenen Änderungen können verallgemeinert mittels des Regelkreises erklärt werden. Im Organismus sind Regelungsvorgänge zur Konstanthaltung von Zustandsgrößen gegen Störungen wesentlich. Die „Homöostase“ bezieht sich auf Regelungsvorgänge, in welchem der Organismus seine Bedingungen auf den optimalen Zustand einstellt und diesen erhält. Die biologischen Regelungsvorgänge lassen sich durch die physikalische Regelungslehre beschreiben.

Der Regelkreis besteht aus einer Regelgröße, Regelstrecke, Fühler, Istwert, Führungsgröße und dem Sollwert (Abbildung 9).

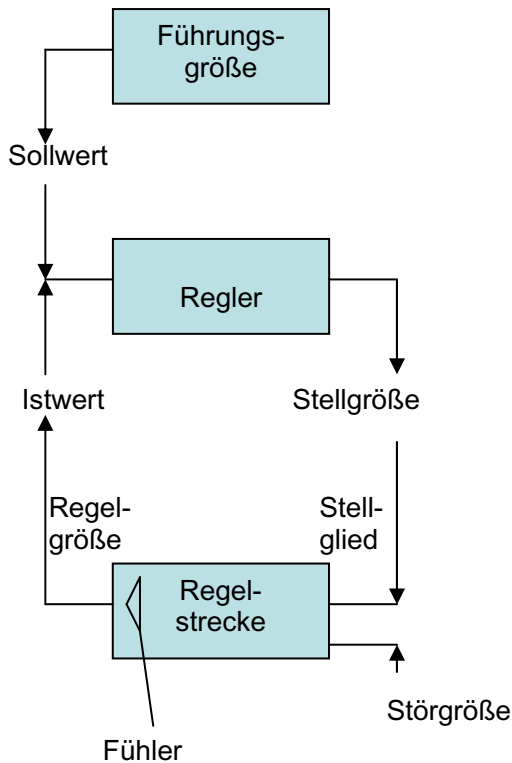


Abbildung 9: schematische Darstellung des einfachen Regelkreises

Die *Regelgröße* beschreibt dabei den Zustand, der konstant gehalten werden soll. Die *Regelstrecke* ist die Einheit, an der der Zustand gehalten wird. Über eine Meßeinrichtung, dem *Fühler*, wird der augenblickliche Wert, der dem *Istwert* entspricht, gemessen. Dieser Istwert wird dann mit dem *Sollwert* verglichen. Sind diese beiden Werte unterschiedlich, so liegt eine Regelabweichung vor. Der Regler berechnet die *Stellgröße*, über die das *Stellglied* korrigierend auf die *Regelgröße* einwirkt, bis der Istwert und der Sollwert übereinstimmen. Die *Störgröße* beschreibt den Einfluss, der die Abweichung zwischen Istwert und Sollwert verursacht (Schmidt und Thews, 1997).

Der Regulationsvorgang ist nicht starr zu verstehen. Nach Einwirkung einer Störung verschieben sich Istwert und Sollwert voneinander. Innerhalb eines bestimmten Zeitraumes vollzieht sich der Regulationsvorgang oszillierend, bis sich der Istwert und der Sollwert an die alte Führungsgröße angeglichen haben. Dieser Mechanismus beschreibt den Regulationsvorgang nach Einwirkung eines kurzen Stressors (Abbildung 10). Weitere Ausgleichsmöglichkeiten bestehen in dem Vorgang der Adaptation.

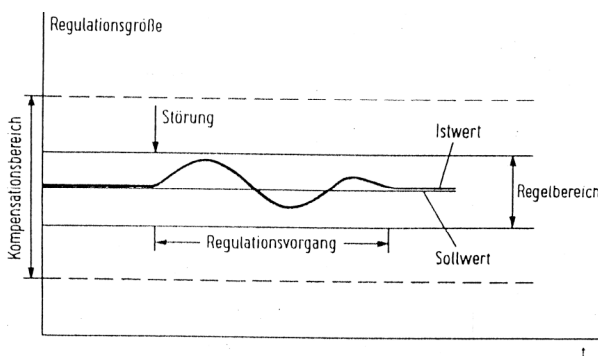


Abbildung 10: Wiedereinstellung des Sollwertes nach kurzzeitiger Störung

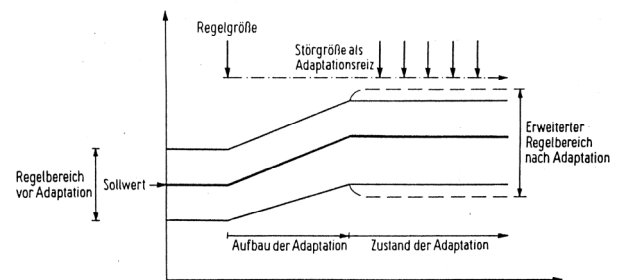


Abbildung 11: Regelbereich vor und nach Adaptation

Als *Adaptation* bezeichnet man die Fähigkeit eines Organismus sich an veränderten Umweltbedingungen anzupassen, ohne dass dies mit dem Erbgut, der DNA, auf nachfolgende Generationen übertragen wird. Das heißt, es kommt zu einer Einstellung eines anderen Funktionsniveaus von bleibendem Charakter (Abbildung 11).

Speziell wird anhand von zeitlichen Reaktionen des Organismus auf einen Reiz die Adaptation in verschiedene Phasen eingeteilt:

- Die schnellste Phase dauert **Sekunden** bis **Minuten**, hier spricht man von einer kurzfristigen Antwort. Auf der systemischen Ebene werden Sauerstoffsensoren angesprochen und der Reiz über das vegetative Nervensystem weitergeleitet. Infolge dessen kommt es zu einer besseren Sauerstoffversorgung durch vorhandene Kapazitäten (Michiels, 2004).
- Innerhalb von **Minuten** bis **Stunden**, die Phase der mittelfristigen Antwort, kommt es zur Änderung und Neuordnung auf der Zell- und Gewebeebene.
- Innerhalb von **Stunden** und **Tagen**, der langfristigen Antwort, kommt es zur Anpassung auf molekularer Ebene mit einer gesteigerten Genexpressionsrate. Es kommt zu einer Erhöhung des Transportes und Verteilung von Sauerstoff durch eine effizientere Vaskularisierung (Michiels, 2004; Pilgis und Granner, 1992).

Adaptationsmechanismen infolge eines anhaltenden O₂-Mangels werden auf zellulärer Ebene ausgebildet. Es kommt zur Störung der Energiebereitstellung und damit zu Störungen der mechanischen, chemischen und osmotischen Arbeit der Zellen. Die Resorptions- und Sekretionsfunktionen, Synthesefunktionen und Kontraktionen der einzelnen Zellen sind eingeschränkt. Um daraus resultierende Störungen bzw. den Zelltod zu verhindern, setzen Schutzmechanismen ein. Als erster Schritt wird der Energieverbrauch durch Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase, der Ca²⁺-ATPase und der Proteinsynthese eingeschränkt. Glykolytische Enzyme werden durch Erhöhung der HIF-1a exprimiert. Es kommt daraufhin zur Vermehrung von Myoglobin und Enzymen des Zitratzyklus und der Atmungskette in den Muskelfasern. Ergebnis dieser Steigerung ist der Schutz der Zellen vor Hypoxie-bedingten Schädigungen durch Steigerung des anaeroben Metabolismus (Mairböurl, 2000).

2.6 Zusammenfassung

Die ausgewählte Literatur zur Morphologie der embryonalen Hüllen und zum Gas-, Elektrolyt- und Metabolitenstatus der Amnionflüssigkeit und des Blutes zeigt, dass wenig aktuelle Forschungsergebnisse zum Vogelembryo vorliegen. Weiterhin ist aus der Literatur wenig bekannt über den Zusammenhang zwischen der Blut- und der Amnionflüssigkeit und damit verbunden über die Funktionsbeeinflussung der Membranen bei veränderten Inkubationsbedingungen wie Sauerstoffmangel und/oder erhöhte Temperatur.

Das ausgewählte zweite Inkubationsdrittel für Veränderungen des Sauerstoffgehaltes und/oder der Inkubationstemperatur ist von Dzialowski (2002) als ein kritisches Fenster in der Entwicklung des Hühnerembryos gegenüber diesen Inkubationsbedingungen charakterisiert worden.

Daraus leitete sich die Aufgabe ab, zu prüfen, ob es nach Veränderungen des Sauerstoffgehaltes und/oder der Umgebungstemperatur zu Veränderungen im Elektrolythaushalt, Metabolitstatus, Gasstatus in den Flüssigkeiten oder bei morphologischen Parametern kommt.

Aussagen über den Erhalt oder die Störung der Homöostase bei Beeinflussung der Inkubation können dazu beitragen, ursächliche Zusammenhänge mit Krankheiten im adulten Stadium der Tiere zu finden (Aszites, Herzerkrankungen).

3. Material und Methode

3.1 Eier

Für die Durchführung der Versuche wurden SPF-Eier der Rasse „White Leghorn“ der Fa. Lohmann Tierzucht GmbH verwendet. Bei der Auswahl der Eier wurde Wert auf gleiches Gewicht und gleiches Herdenalter gelegt. Nach Erhalt der Eier wurden diese für 24h bei ca. 15°C gelagert. Danach wurden die Eier zufällig in Gruppen eingeordnet, beschriftet und in den Inkubator eingelegt.

3.2 Aufzucht der Legehennen

Die SPF-Valo Hühnereier stammen von 20-45 Wochen alten Muttertieren. Die Aufzucht der Muttertiere der Rasse „White Leghorn“ wurde von der Fa. Lohmann Tierzucht GmbH nach einem Standard-Aufzuchtprogramm durchgeführt. Zur Ernährung der Legehennen wird ein vierphasiges Hühnerfutter verabreicht, welches zur Keimreduzierung dampfbehandelt wurde. Die Futterration wurde in Abhängigkeit vom Beleuchtungsprogramm gewählt und dem Körpergewicht und dem Alter entsprechend verfüttert. Die Beleuchtung erfolgt künstlich in Dunkelhäusern. Das Beleuchtungsprogramm wurde dem Alter und weiteren Bedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) angepasst. Bei den Küken wechseln sich kurze Hell- und Dunkelphasen ab, welche mit zunehmendem Alter länger wurden.

3.3 Inkubation

3.3.1 Inkubatoren

3.3.1.1 Hemel SKR 168

Für die Bebrütung der Hühnereier unter Normbedingungen wurde ein computergesteuerter Brutschrank mit vollautomatischer Rollenwendung, Ventilator- und Luftfeuchtigkeitsregulierung verwendet. Die Vorteile dieses Inkubators sind die gleichbleibenden Bedingungen während der gesamten Bebrütungszeit, da nur jeweils zum Umlegen der Eier die Brutschranktür geöffnet wurde. Während die Kontrolle (K) und die Gruppe mit dem kurzfristigen Sauerstoffmangel (für 15 min 10% O₂ und 90% N₂ = kSM) die gesamte Zeit in dem Brutschrank verblieben, wurden die Gruppen unter chronischen Sauerstoffmangel (15% O₂ und 85% N₂ = SM) zwischen D6 und D12 sowie die Gruppen unter Hyperthermie (39,5°C = HT) und unter Sauerstoffmangel und Hyperthermie (15% O₂ und 85% N₂ und 39,5°C = SM&HT) zwischen D8 und D12 in Flächenbrütern umgelegt.

3.3.1.2 Hemel Thermalplastik-Flächenbrüter

Im Inkubationszeitraum zwischen D6 und D12 wurde die Gruppe SM, und zwischen D8 und D12 die Gruppen HT und SM&HT in Flächenbrütern mit vollautomatischer Wendung umgelegt. Die Flächenbrüter wurden so manipuliert, dass es einen separaten Zufluss für das Sauerstoff-Stickstoffgemisch gab und über einen weiteren separaten Zugang die Kontrolle des sauerstoffarmen Zustandes erfolgte. Um den sauerstoffarmen Zustand von 15% Sauerstoff aufrechtzuerhalten, wurde für den Zeitraum D6 bis D12 der Inkubator luftdicht versiegelt.

3.3.2 Gas-Misch-Druck-Regelung

Die hypoxische Inkubationsbedingung wurde mittels Stickstoff-Sauerstoffgemisch erreicht. Die Regelung des Gasdruckes erfolgte über einen Druck-Mess-Regelgerät der Fa. Bronkhorst-Mättig.

3.3.3 TFA Klima-Logger

Die Aufzeichnung der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit der einzelnen Inkubatoren erfolgte mit einem Klima-Logger der Fa. TFA-Dostmann. Dieser Klima-Logger verfügt über eine Basisstation und vier weitere Sensoren. Von der Fa. TFA-Dostmann wurde der Klima-Logger mit den Sensoren einer Kalibrierung in einer Klimakammer unterzogen.

Eine Auswertung erfolgt über die RS 232 Schnittstelle mittels Computer. Zur Aufbereitung und Auswertung der Daten diente die mitgelieferte Software: Data-Recorder mit nachfolgender Konvertierung nach Microsoft Excel.

3.4 Blut- und Amnionflüssigkeitsanalyse

3.4.1 Blut- und Amnionflüssigkeitsthanalyse mittels Radiometer Copenhagen ABL 605®

Vor jedem Untersuchungstag wurde eine Qualitätskontrolle des Gerätes Radiometer Copenhagen ABL605® durchgeführt, um die Zuverlässigkeit der gewonnenen Daten zu sichern.

Über einen extern angeschlossenen Laptop wurden die Daten vom Analysegerät zur Aufzeichnung gesendet.

Das Analysegerät „ABL 605“ setzt sich aus den beiden Einzelgeräten „ABL 500“ und „EML 100“ zusammen.



Abbildung 12: Radiometer Copenhagen ABL 605®

3.4.1.1 Radiometer Copenhagen ABL™ 500®

Das „ABL™ 500®“ (ABL 500) ist primär zur Anwendung an Menschenblut bestimmt. Da sich das Blut von Tieren (und das der Tiere untereinander) in seinen spezifischen Bestandteilen und Konzentrationen von dem des Menschen unterscheidet, müssen abgeleitete Parameter mit Hilfe spezifischer Formeln für die untersuchten Arten gesondert berechnet werden. Dies gilt besonders für die Erythrozyten des Geflügels, die einen Zellkern enthalten.

Das „ABL 500“ misst den pH-Wert, den Kohlenstoffpartialdruck pCO_2 und den Sauerstoffpartialdruck pO_2 .

Das Blutgasmessgerät besteht aus einer Nassektion, einer Basiseinheit, einer Computereinheit, einer numerischen Tastatur und einer Kontrollstation. In der Nassektion befindet sich die thermostatisierte Messkammer mit pH-, pCO₂- und der pO₂-Elektrode sowie einer Bezugselektrode. In dieser Messkammer werden die während der Messungen oder Kalibrierungen benutzten Flüssigkeiten und Gase auf eine Temperatur von 37°C +/- 0,1°C eingestellt, um die korrekten Messbedingungen einzuhalten. Die Nassektion ist von der Basiseinheit getrennt. Dort erfolgt der Lösungs- und Probentransport. Über die Basiseinheit mit Gasmischer erfolgt die elektronische Steuerung der Nassektion. Die Kommunikation zwischen Benutzer und dem Messgerät „ABL 500“ erfolgte über eine Kontrollstation.

3.4.1.2 Radiometer Copenhagen EML 100™ Electrolyte Metabolite Laboratory®

Auch der „EML100“ ist primär zur Anwendung für Menschenblut und -urin bestimmt. Wenn Tierblut oder -urin analysiert werden, müssen die abgeleiteten Parameter separat berechnet werden. Dazu werden Spezies- spezifische Formeln eingesetzt, die vom Gerät vorgegeben sind.

Messbare Parameter sind:

- Kaliumionen-Konzentration in Plasma [K⁺]
- Natriumionen-Konzentration in Plasma [Na⁺]
- Konzentration von ionisiertem Kalzium im Plasma [Ca²⁺]
- Chloridionen-Konzentration in Plasma [Cl⁻]
- Lactatkonzentration im Plasma [Lactat]
- Glucosekonzentration im Plasma [Glucose]

Das Gerät besteht aus Messstation mit Nassektion, Basisstation und der Tastatur mit Display. In der Nassektion befinden sich die Lösungen, die Pumpen sowie die thermostatisierte Einheit mit den K⁺-, Na⁺-, Ca²⁺-, Cl⁻-, Lactat- und Glucose-Elektroden. Die Basiseinheit enthält die Elektronik zur Steuerung der Nassektion.

3.4.1.3 Laptop

Ein Laptop wurde extern als digitales Aufzeichnungsgerät an das „ABL 605“ angeschlossen. Die verwendete Software ist Microsoft Hyperterminal, welche die ausgegebenen Signale als ASCII-Code empfängt und als Text-Datei speichert.

3.5 Versuchsgruppeneinteilung und Inkubationsbedingungen

Untersucht wurden SPF-Eier unterschiedlicher Inkubationszeit, die kürzeste Inkubationsdauer betrug 10 Tage (D), die längste 20 D. Die Inkubationszeit startete, sobald alle Eier in den Inkubator eingelegt waren mit D0.

Der Behandlungszeitraum erstreckte sich von D6 bis D12.

In Vorversuchen führten höhere Temperaturen (40°C) und Sauerstoffmangel in der kritischen Phase (D6 – D12) zu einer erhöhten Mortalität. Aus dieser Erkenntnis heraus wurde entschieden, die Inkubationstemperatur in den hyperthermen Gruppen (HT und SM&HT) um 0,5°C zu erniedrigen und den Zeitraum des Einflusses auf 4 Tage zu verkürzen.

Tabelle 3: Versuchsgruppeneinteilung

Versuchsgruppen	Kondition	Dauer	Tag der Entnahme der Blut- und Amnionproben n=[Blut; Amnionflüssigkeit; Organ]	
K = Kontrolle	21% O ₂ 37,5°C	21 Tage	D10 [00;17;10] D14 [10;10;13] D18 [10;15;15]	D12 [07;10;10] D16 [10;15;15] D20 [09;00;15]
SM = chronischer Sauerstoffmangel	15% O ₂ 37,5°C	6 Tage D6-D12	D10 [00;12;10] D14 [08;15;08] D18 [08;08;10]	D12 [08;05;11]; D16 [10;07;15] D20 [10;00;13]
HT = Hyperthermie	21% O ₂ 39,5°C	4 Tage D8-D12	D10 [00;07;25] D14 [09;07;15] D18 [08;10;15]	D12 [07;07;15] D16 [10;15;15] D20 [07;00;09]
SM&HT = chronischer Sauerstoffmangel und Hyperthermie	15% O ₂ 39,5°C	4 Tage D8-D12	D10 [00;07;07] D14 [07;07;07] D18 [07;07;07]	D12 [10;10;15] D16 [10;07;15] D20 [08;00;12]
kSM = kurzfristiger Sauerstoffmangel	10% O ₂ 37,5 °C	an D10;D12; D14:D16;D18 und D20 für 15 Minuten	D10 [00;07;07] D14 [07;07;07] D18 [07;07;07]	D12 [07;07;07] D16 [07;07;07] D20 [07;00;07] unmittelbar nach Beendigung des Sauerstoffmangels

3.6 Gewinnung der Blut- und Amnionflüssigkeit



Abbildung 13: Eröffnung des Hühnereies oberhalb der Luftkammer und der Schalenmembran



Abbildung 14: Sicht auf Gefäße und Hühnerembryo nach Entfernung der Schalenmembran

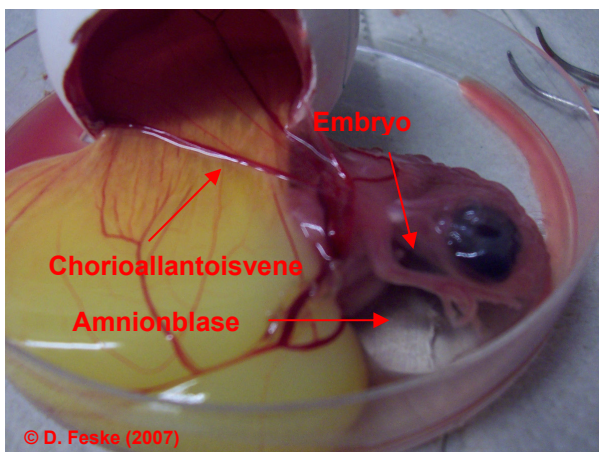


Abbildung 15: Inhalt des Eies nach dem Dekantieren in einer Petrischale (Embryo D10 mit geschlossener Amnionblase und Chorioallantoisgefäß)

Die Blutentnahmen zur Blutgas- und Blutelektrolytbestimmung erfolgten aus der Chorioallantoisvene. Aufgrund technischer Schwierigkeiten (geringe Gefäßdurchmesser und geringe Volumina) an den Tagen 10 und 12 wurden die Proben von zwei Hühnerembryonen eingesetzt. Aus einem wurde Probenmaterial für die Gasmessung und aus dem anderen das Probenmaterial für die Elektrolytmessung gewonnen. Am Tag 10 wurde ebenfalls wegen technischer Schwierigkeiten keine Blutprobe gewonnen. Am Tag 20 wurde aus entwicklungsphysiologischen Gründen keine Amnionflüssigkeit entnommen, da sie bereits resorbiert war.

Vor Eröffnung der Eischale wurden die Eier durchleuchtet und der Verlauf der Chorioallantoisvene angezeichnet. Die Schale wurde dann ohne Beschädigung der Chorioallantoismembran entfernt, die Vene punktiert und das Blut in heparinisierten Glaskapillaren aufgefangen. Die Untersuchung der Blutgasparameter sowie der Blutelektrolyte erfolgte unmittelbar danach.

Für die Gewinnung von Amnionflüssigkeit wurden die zu untersuchenden Eier geschiert und die Luftblase am stumpfen Pol gekennzeichnet. Danach wurde das Ei in vertikale Lage gebracht und vorsichtig über der Luftkammer eröffnet (Abbildung 13).

Nach Entfernung der äußeren Membran und Loslösen von der Eischale (Abbildung 14), wurde der Inhalt des Eies vorsichtig in eine Petrischale überführt (Abbildung 15), ohne dabei die Amnionblase zu zerstören. Mittels einer Pinzette wurde die Amnionhaut über dem Embryo gegriffen und nach oben gezogen, so dass sich die Amnionhaut an dieser Stelle vom Embryo ablöst und eröffnet. Die angelegte Glaskapillare füllte sich aufgrund von Kapillarwirkung. Die Amnionflüssigkeit wurde mittels ABL 605[®] analysiert.

3.7 Ermittlung morphologischer Parameter

3.7.1 Bestimmung der Körpermasse

Ermittelt wurde das Körperfeuchtgewicht. Die Embryonen wurden dazu aus der Eischale entfernt, sofort mittels Scherenschlag dekapitiert und nach Entfernen des Dottersackes einschließlich der embryonalen Hüllen mit einem Tupfer abgetrocknet. Dann folgte mit einer digitalen Feinwaage die Gewichtsbestimmung. Am D20 war der Dottersack vom Hühnerembryo vollständig aufgenommen worden, so dass er bei der Gewichtsbestimmung mit berücksichtigt wurde.

3.7.2 Bestimmung des Herzgewichts

Nach der Bestimmung des Embryonengewichts wurden die Brust-Bauchhöhle entlang des Sternums eröffnet und das Herz präpariert, die Aorten- und Gefäßstümpfe vorsichtig entfernt und das Gewicht mittels der digitalen Feinwaage bestimmt.

3.8 Datenerfassung, Datenaufarbeitung, Statistik

Die Datenerfassung erfolgte mittels elektronischer Datenaufzeichnung in ASCII-Code. Dieser wurde dann in Microsoft Excel 2003 umgeschrieben.

Anschließend wurden die Daten mit dem SPSS Programm 12.0 ausgewertet.

Zur Berechnung der Signifikanz wurde der Median herangezogen, da er robuster ist, d.h. unempfindlicher gegenüber Extremwerten. Da nicht von einer Normalverteilung der Werte auszugehen war, wurde für die statistische Analyse der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Dieser erlaubt den Vergleich zweier Gruppen mit unabhängigen Variablen und wird für den Vergleich innerhalb ein- und derselben Flüssigkeit verwendet. Für die Angabe der Richtung (positiv oder negativ) der Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test, wurden die Mediane der behandelten Gruppen von denen der Kontrollgruppe subtrahiert und in einer Tabelle (siehe Ergebnisteil) angegeben.

Der Wilcoxon-Test ergänzt den Vorzeichentest, da er nicht nur die Richtung der Differenzen, sondern auch die Stärke der Differenzen zwischen zwei gepaarten Stichproben berücksichtigt. Dieser Test wird für den Vergleich der beiden Flüssigkeiten Blut und Amnion verwendet.

Die graphische Darstellung der ermittelten medianen Werte erfolgte mittels Punktdiagramm. Für den schnelleren Vergleich des Verlaufes der Konzentrationen zwischen beiden Flüssigkeiten wurden die Punkte durch Linien verbunden. Die durchgezogene Linie stellt den Verlauf der medianen Konzentrationen innerhalb des Blutes und die unterbrochene Linie den innerhalb der Amnionflüssigkeit dar.

Die Ergebnisse statistischer Signifikanzprüfungen wurden im Sinne ihrer biologischen Relevanz und Schlüssigkeit interpretiert. Die mit Zahlenangabe (siehe Ergebnisteil) gekennzeichneten ermittelten Werte sind bei $p < 0,05$ signifikant verschieden.

4. Ergebnisse

4.1 pH Werte

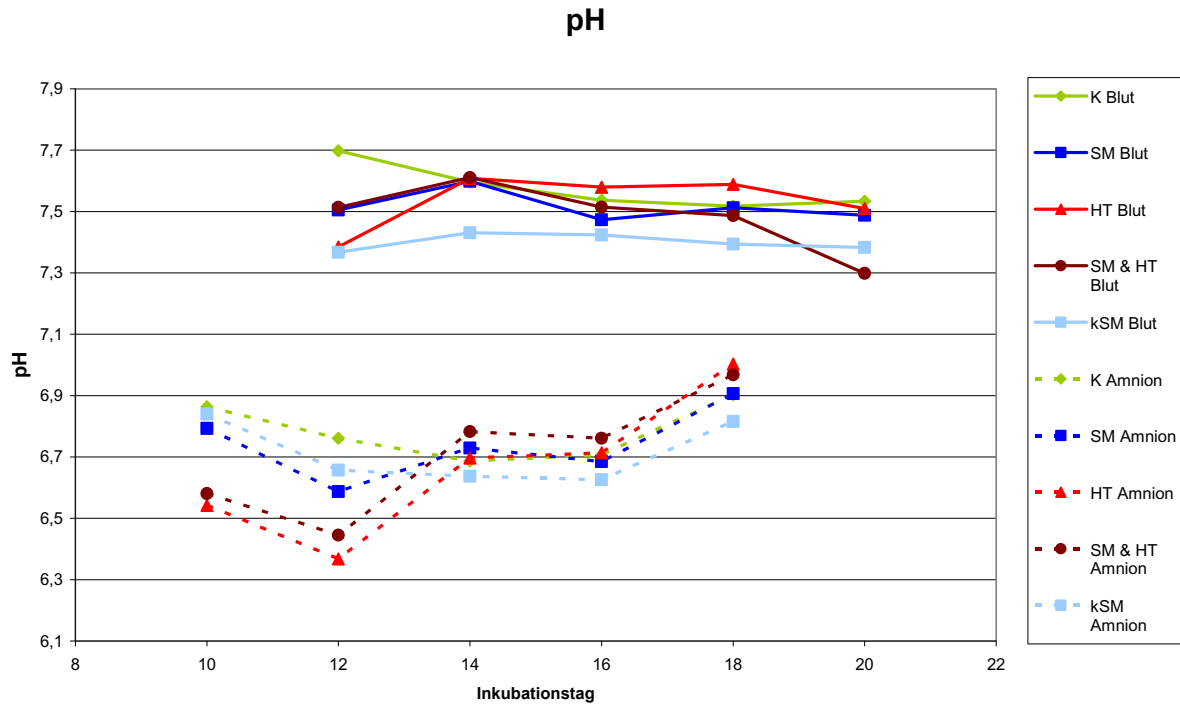


Diagramm 1: pH-Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

Der niedrigste pH-Wert in der Kontrolle (K) im Blut wurde an Tag 16 (7,52¹), der höchste pH-Wert wurde an D12 (7,70) gemessen. Der pH-Wert sank von 7,70 an D12 auf 7,53 an D20 ab.

Unter der Bedingung des chronischen Sauerstoffmangels (SM) wurde im Blut der geringste pH-Wert an D16 mit 7,47 und der höchste an D14 mit 7,60 gemessen. Von D12 bis D14 stieg der pH-Wert und fiel danach bis D18 wieder ab, um an D18 erneut anzusteigen. Wurde von D8 bis D12 die Inkubationstemperatur auf 39,5°C (HT) erhöht, so zeigte sich an D12 der niedrigste pH-Wert mit 7,39 und der höchste pH-Wert an D14 mit 7,61. Wurden beide Veränderungen in den Inkubationsbedingungen angewendet, chronischer Sauerstoffmangel und Hyperthermie (SM&HT), so lag der geringste pH-Wert von 7,30 an D20 und der höchste pH-Wert von 7,61 an D14 vor. Im Verlauf zeigte sich hier ein Anstieg bis D14 und anschließend ein stetiger Abfall bis D20. Der niedrigste pH-Wert wurde an D12 mit 7,37 und der maximale pH-Wert von 7,43 an D14 unter der Bedingung des kurzfristigen Sauerstoffmangels (kSM) beobachtet.

¹ Medianwert; alle folgenden Angaben der ermittelten Werte beziehen sich ebenfalls auf den Median (50% Perzentil)

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe im Blut traten an allen Inkubationstagen in kSM sowie an D12 und D16 in HT auf.

Tabelle 4: Signifikanz des pH-Wertes im Blut – Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	-0,31	--	-0,33
14	--	--	--	-0,17
16	--	-0,33	--	-0,11
18	--	--	--	-0,12
20	--	--	-0,23	-0,15

In der Amnionflüssigkeit:

Unter K wurde in der Amnionflüssigkeit der kleinste pH-Wert von 6,69 an D14 und der höchste pH-Wert von 6,90 an D18 ermittelt. Bis D14 zeigte sich ein Abfall im pH-Wert und darauf folgend einen Anstieg bis D18. Unter der Bedingung des SM fiel der pH-Wert jeweils zu den D12 und D16. Nach einer hyperthermen Phase im zweiten Inkubationsdrittel zeigte sich an D12 der kleinste pH-Wert mit 6,37 und an D18 der höchste pH-Wert mit 7,00. Im Verlauf fiel der pH von D10 zu D12 und stieg dann stetig bis D18 an. Wurden beide Inkubationsbedingungen geändert, so erreichte der pH seinen minimalsten Wert von 6,45 an D12 und einen maximalen Wert mit 6,97 an D18. Von D10 zu D12 sank der pH-Wert, stieg dann bis D18 und wies dabei ein Plateau von D14 bis D16 auf. Nach kSM wurde der höchste pH-Wert an D12 und den niedrigsten pH-Wert an D16 ermittelt. Bis D16 fiel der pH-Wert und stieg dann bis D18 wieder an.

Signifikante Unterschiede in der Amnionflüssigkeit zeigten sich an D10 in den Gruppen SM und HT, an D10, D12 und D16 nach SM&HT und sowie an D12 und D18 nach kSM.

Tabelle 5: Signifikanz des pH-Wertes in der Flüssigkeit Amnion - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	-0,07	-0,32	-0,28	--
12	--	--	-0,32	-0,10
14	--	--	--	--
16	--	--	0,05	--
18	--	--	--	-0,09

Blut und Amnionflüssigkeit

Vergleicht man beide Flüssigkeiten, so ist festzustellen, dass der pH-Wert im Blut gegenüber dem in der Amnionflüssigkeit höher war (Blut: 7,51 – 7,60; Amnionflüssigkeit: 6,71 – 6,91 Kontrolle) und in engeren Grenzen gehalten wurde.

4.2 Sauerstoffpartialdruck

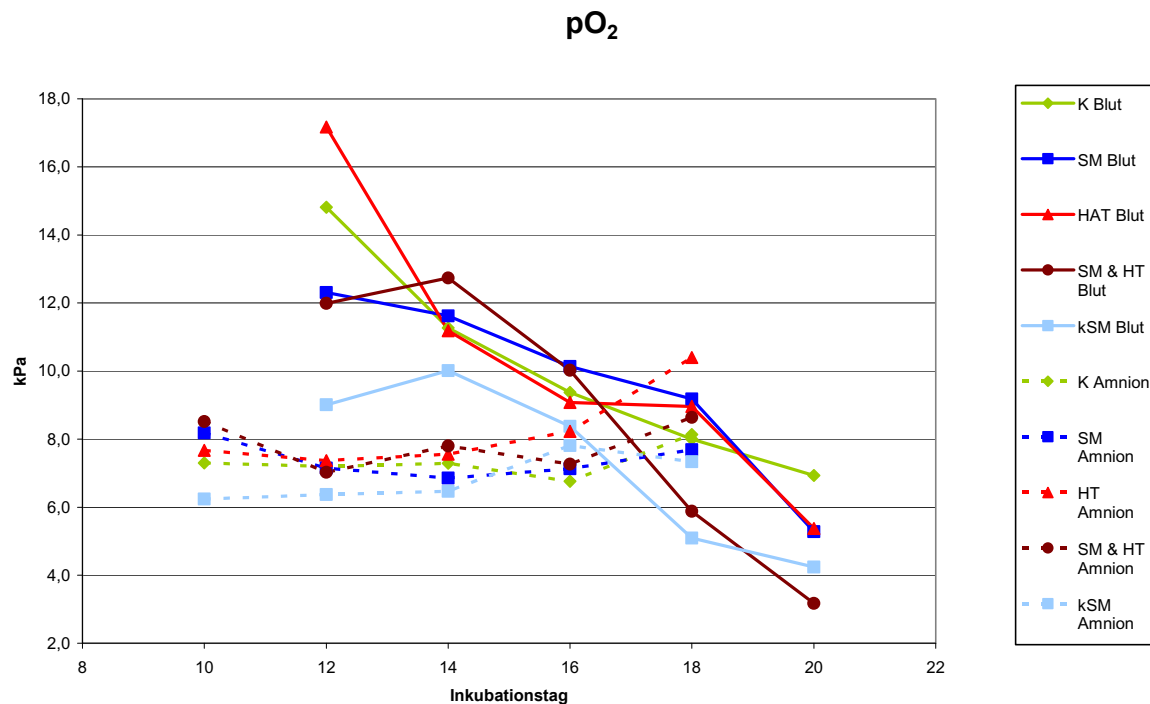


Diagramm 2: pO₂-Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

Im Blut sank der arterielle Sauerstoffpartialdruck (pO₂) unter K stetig ab. An D12 wurde im Blut ein pO₂ von 14,81kPa gemessen, der an D14 auf 11,27kPa, an D16 auf 9,37kPa, an D18 auf 8,0kPa und an D20 auf 6,93kPa fiel. Ähnliche Ergebnisse wurden in SM und HT erzielt, in welchen auch ein kontinuierlicher Abfall des pO₂ beobachtet wurde. Auch in den anderen beiden Gruppen (SM&HT und kSM) kam es zu einer Abnahme des pO₂ im Blut bis zum Ende der Inkubationszeit, jedoch wurde in beiden Gruppen ein Anstieg an D14 ermittelt. Der stärkste Abfall D12 = 17,17kPa auf D20 = 5,37kPa des pO₂ fiel in der Gruppe HT auf. Signifikante Unterschiede (p<0,05) in den einzelnen Gruppen konnten nur unter der Bedingung des kurzfristigen Sauerstoffmangels an den Tagen D12, D18 und D20 sowie in der SM&HT für D20 ermittelt werden.

Tabelle 6: Signifikanz des pO₂ im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = p<0,05; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	--	--	-5,81
14	--	--	--	--
16	--	--	--	--
18	--	--	--	-2,91
20	--	--	-3,76	-2,69

In der Amnionflüssigkeit:

In der Amnionflüssigkeit wies der pO₂ sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den untersuchten Gruppen keine großen Schwankungen auf.

Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen kam es nur in kSM an D10 zu signifikanten Unterschieden.

Tabelle 7: Signifikanz pO₂ in der Flüssigkeit Amnion - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = p<0,05; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	--	--	--	-1,06
12	--	--	--	--
14	--	--	--	--
16	--	--	--	--
18	--	--	--	--

Blut und Amnionflüssigkeit

Bei dem Vergleich beider Flüssigkeiten miteinander, zeigten sich in der K- und in der SM-Gruppe an D14 und D16 signifikante Unterschiede in den Partialdrücken im Blut und in der Amnionflüssigkeit, ebenso an D12 und D18 in SM&HT.

Tabelle 8: Signifikante Unterschiede des pO₂ in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz p<0,05; "--" keine Signifikanz

D	K	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	--	--	0,005	--
14	0,018	0,012	--	--	--
16	0,049	0,046	--	--	--
18	--	--	--	0,028	--

4.3 Kohlendioxidpartialdruck

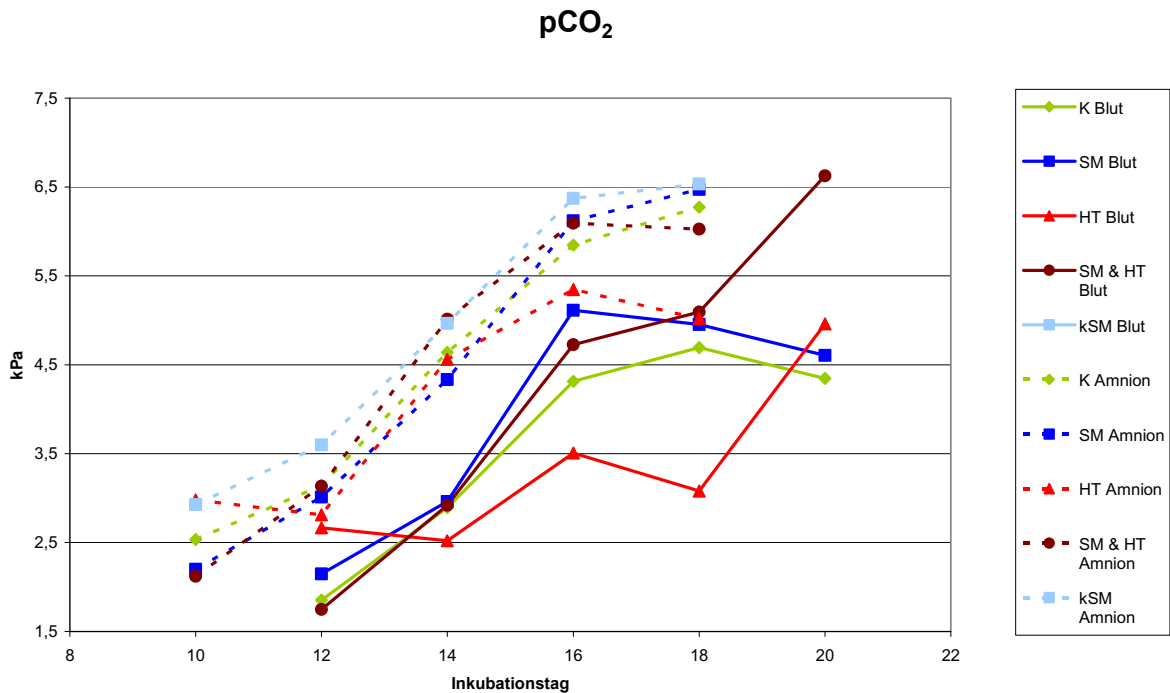


Diagramm 3: pCO₂-Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

Der Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂) im Blut verhielt sich umgekehrt wie der Sauerstoffpartialdruck (pO₂), das heißt, mit zunehmender Inkubationsdauer stieg der pCO₂ im Blut an. Der kleinste Wert wurde in der K an D12 (1,85kPa) gemessen, der höchste Wert an D18 (4,69kPa). Ab D16 bis zum Ende der Untersuchungen an D20 zeigte sich ein gleichbleibender Partialdruck (4,31kPa - 4,69kPa). In der Gruppe SM wurde der kleinste Wert ebenfalls an D12 (2,51kPa) ermittelt, der höchste Wert jedoch schon an D16 (5,11kPa). In den anderen Versuchsgruppen wurden der geringste Partialdruck an D12 und der höchste Partialdruck an D20 gemessen.

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zeigte die Gruppe unter hyperthermen Bedingungen an den Tagen D12, D16 und D18 sowie für die kSM am Inkubationstag D12.

Tabelle 9: Signifikanz des pCO₂ im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	0,81	--	1,13
14	--	--	--	--
16	--	-0,81	--	--
18	--	-1,61	--	--
20	--	--	2,28	1,64

In der Amnionflüssigkeit:

Auch in der Amnionflüssigkeit stieg der $p\text{CO}_2$ mit zunehmender Inkubationsdauer, und dies nicht nur unter Kontrollbedingungen, sondern auch in den einzelnen behandelten Gruppen. Für die Kontrollgruppe lag an D10 ein $p\text{CO}_2$ von 2,53kPa vor, der bis D20 auf 6,27kPa anstieg. Verglichen mit den Kontrollwerten des Blutes, zeigte sich, dass der $p\text{CO}_2$ in der Amnionflüssigkeit einen höheren Wert zum Ende der Inkubationszeit aufwies. Diese Tatsache fiel auch für die behandelten Gruppen auf.

Einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ließ sich für den Bebrütungstag 12 unter den Bedingungen des kurzfristigen Sauerstoffmangels feststellen sowie für den Bebrütungstag 10 in den Gruppen SM und SM&HT.

Tabelle 10: Signifikanz des $p\text{CO}_2$ in der Flüssigkeit Amnion - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	-0,33	--	-0,41	--
12	--	--	--	0,46
14	--	--	--	--
16	--	--	--	--
18	--	--	--	--

Blut und Amnionflüssigkeit:

In beiden Flüssigkeiten stieg über den gesamten Inkubationszeitraum der $p\text{CO}_2$ -Gehalt an. Signifikante Unterschiede zwischen der Blut- und der Amnionflüssigkeit zeigten sich ab D14 in allen Gruppen.

Tabelle 11: Signifikante Unterschiede des $p\text{CO}_2$ in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz

D	K	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	--	--	0,002	--
14	0,018	0,012	0,018	0,018	0,018
16	0,000	0,046	0,001	0,018	--
18	0,001	--	0,017	--	0,043

4.4 Bikarbonat

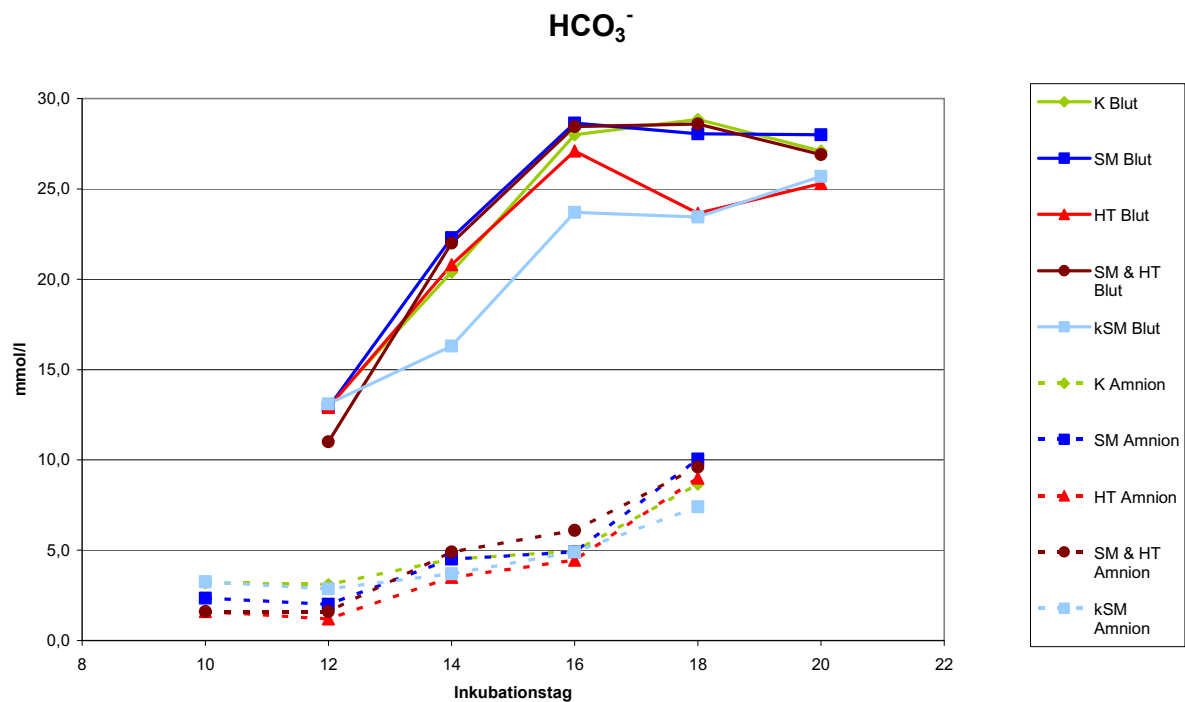


Diagramm 4: HCO_3^- -Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

Der Gehalt an HCO_3^- im Blut unter Kontrollbedingungen stieg bis D16 und blieb dann auf einem Plateau bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes. Der niedrigste Wert war an D12 (13,0mmol/l) messbar. In den Gruppen SM, HT, SM&HT und kSM konnten dieselben Beobachtungen gemacht werden.

Signifikante Unterschiede traten für D18 in der Gruppe HT und an D14, D16 und D18 in der Gruppe kSM auf.

Tabelle 12: Signifikanz des HCO_3^- im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	--	--	--
14	--	--	--	-4,10
16	--	--	--	-4,30
18	--	-5,20	--	-5,40
20	--	--	--	--

In der Amnionflüssigkeit:

Der Bikarbonatgehalt in der Amnionflüssigkeit unter Kontrollbedingungen und in den behandelten Gruppen lag deutlich unter dem Bikarbonatgehalt im Blut. Während im Blut nach D12 ein steiler Anstieg des Bikarbonatgehaltes gefolgt von einem Plateau zu beobachten war, war in der Amnionflüssigkeit ein tendenzieller Anstieg sichtbar.

Signifikante Unterschiede stellten sich in allen behandelten Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten dar. In den wärmebehandelten Gruppen zeigte sich die Signifikanz von D10 bis D16.

Tabelle 13: Signifikanz des HCO_3^- in der Flüssigkeit Amnion - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	-0,85	-1,60	-1,60	--
12	-1,10	-1,90	-1,50	--
14	--	-1,00	--	--
16	--	-0,50	1,15	--
18	--	--	--	-1,25

4.5 Sauerstoffsättigung

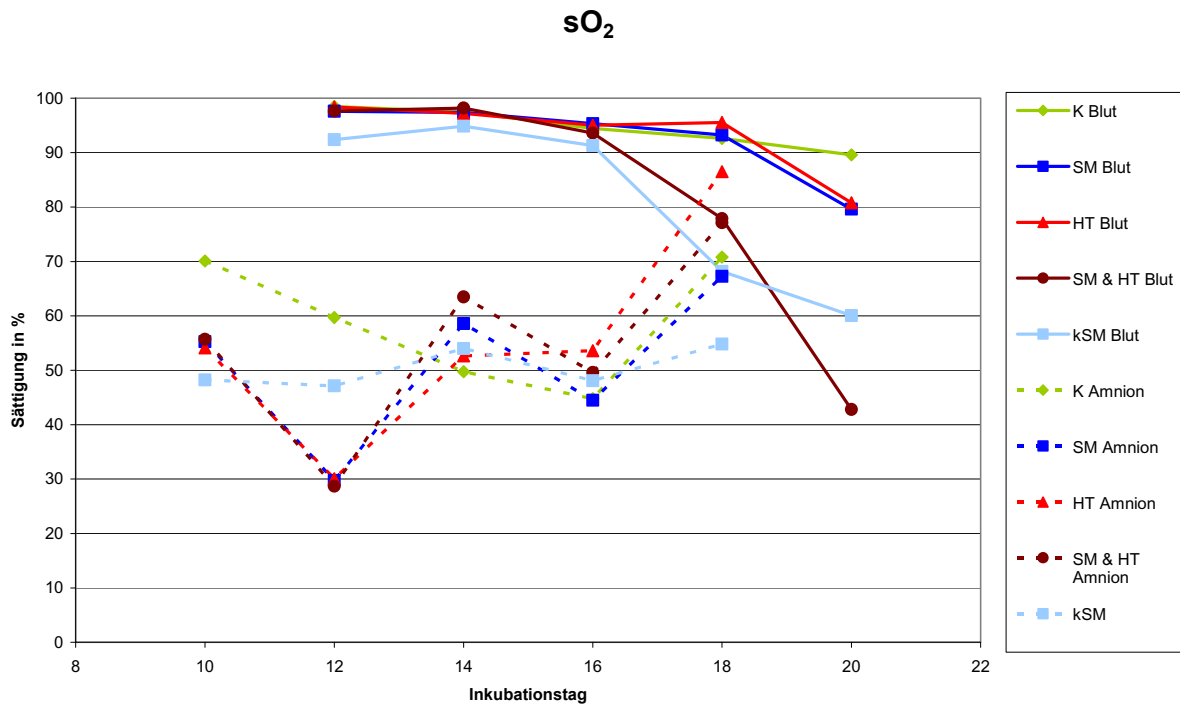


Diagramm 5: sO₂ Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

Unter Kontrollbedingungen zeigte sich eine stetige Abnahme der Sättigung (sO₂) im Blut bis D20. Nach SM stellte sich heraus, dass die niedrigste O₂-Sättigung ebenfalls an D20, auftritt. Die höchste Sättigung stellte sich an D12 dar. In den Gruppen SM&HT und kSM lag im Gegensatz zu den anderen Gruppen ein rapider Abfall der Sättigung von 20% vom D16 zu D18 vor.

Signifikante Unterschiede traten in SM an D20 und kSM an den Tagen D12, D18 und D20 auf.

Tabelle 14: Signifikanz der sO₂ im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = p<0,05; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	--	--	-6,10
14	--	--	--	--
16	--	--	--	--
18	--	--	--	-24,40
20	-10,00	--	--	-29,55

In der Amnionflüssigkeit:

Die Sättigung in der Amnionflüssigkeit war unter Kontrollbedingungen an D16 am niedrigsten (44,8%) und die höchste Sättigung trat an D10 und D18 (70,1% bzw. 70,8%) auf. Nach D16 stieg die Sättigung wieder an. Im SM zeigte sich die niedrigste Sättigung an D12 (29,75%). Auch in der HT fiel die niedrigste Sättigung an D12 auf, die dann kontinuierlich bis D18 anstieg und dort ihren höchsten Wert hatte. In dieser Gruppe betrug die Sättigung ebenfalls an D12 70% weniger im Vergleich zum Blut. Die gleiche Beobachtung traf auch für die Gruppe SM&HT zu. Im Gegensatz zu den anderen Behandlungsgruppen beobachtet man eine deutlich niedrigere Sättigung unter der Bedingung des kSM. Die niedrigste Sättigung lag an D12 bei 47,15% und die höchste Sättigung an D18 bei 54,8%.

Signifikante Unterschiede innerhalb der Amnionflüssigkeit traten an D12 für HT und SM&HT.

Tabelle 15: Signifikanz der sO₂ in der Amnionflüssigkeit- Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = p<0,05; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	--	--	--	--
12	--	-29,60	-31,00	--
14	--	--	--	--
16	--	--	--	--
18	--	--	--	--

Blut und Amnionflüssigkeit:

In der Amnionflüssigkeit lag die Sättigung deutlich unter der im Blut. Eine bis zu 70% niedrigere Sättigung wurde in der Amnionflüssigkeit unter der Bedingung des chronischen Sauerstoffmangels im Vergleich zur SM-Gruppe im Blut gemessen (D12 Blut=97,5%; Amnion=29,75%).

Bei dem Vergleich der beiden Flüssigkeiten stellte sich heraus, dass es zu fast jedem Zeitpunkt zu signifikanten Unterschieden kommt. Ausnahmen bildeten hier D12 der Kontrollgruppe und der kSM, sowie der D18 der SM&HT und kSM.

Tabelle 16: Signifikante Unterschiede der sO₂ in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz p<0,05; "--" keine Signifikanz

D	K	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	0,012	0,180	0,001	--
14	0,018	0,012	0,018	0,018	0,043
16	0,000	0,028	0,001	0,018	0,011
18	0,001	0,025	0,036	--	--

4.6 Kalium

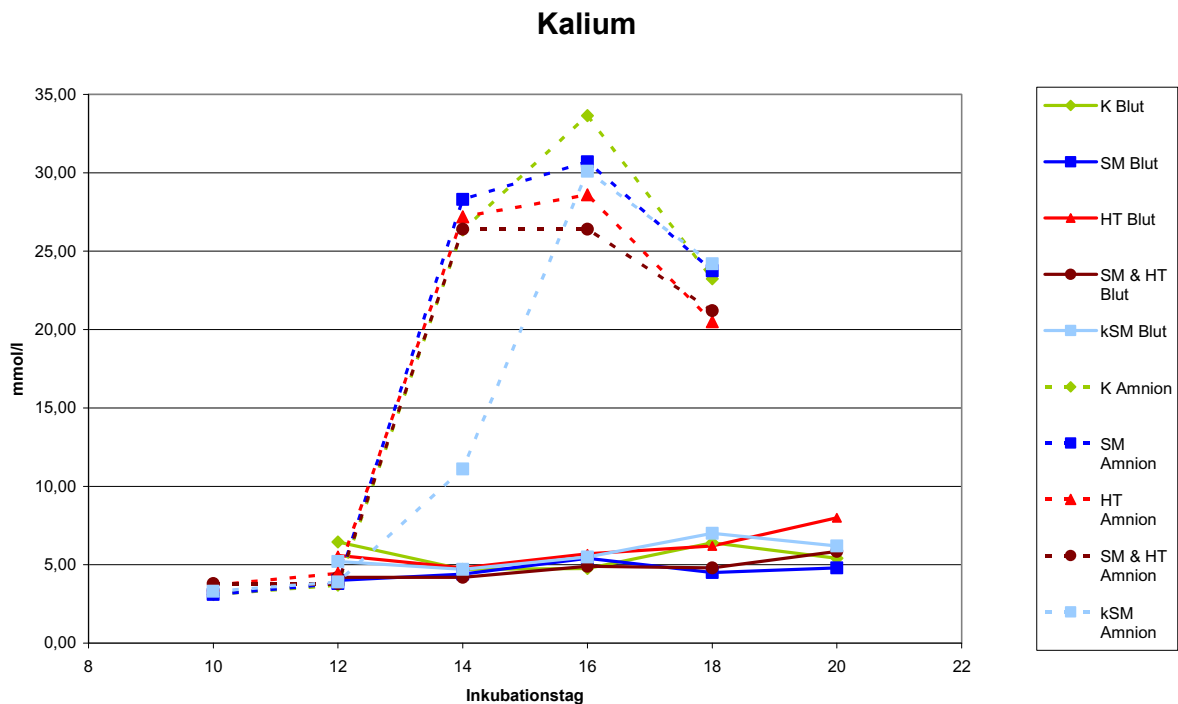


Diagramm 6: Kalium Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

Der Kaliumgehalt im Blut wurde während der Inkubation unter K und unter veränderten Inkubationsbedingungen in sehr engen Grenzen (Kontrolle: 4,7mmol/l – 6,4mmol/l) gehalten. Unter dem Einfluss des langfristigen Sauerstoffmangels stieg der K⁺-Gehalt von D12 bis D16 um 1,4mmol/l an und fiel dann bis D20 um 0,8mmol/l ab. Für die Gruppe HT stieg die K⁺-Konzentration von D14 bis D20 an. In SM&HT stieg die Konzentration von D18 zu D20 von 4,80mmol/l auf 5,85mmol/l. Unter der Bedingung eines kurzfristigen SM wurde der Peak an D18 erreicht, danach fiel er zum letzten Untersuchungstag hin wieder ab.

Signifikante Unterschiede im Blut stellten sich für die Gruppe SM an D12 und D18 sowie für SM&HT an D12 dar.

Tabelle 17: Signifikanz des Kaliums im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = p<0,05; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	-2,45	--	-2,25	--
14	--	--	--	--
16	--	--	--	--
18	-1,90	--	--	--
20	--	--	--	--

In der Amnionflüssigkeit:

In der Amnionflüssigkeit ergaben sich signifikante Unterschiede für HT an D10, D12 und D16 sowie für SM&HT an D12 und D16.

Tabelle 18: Signifikanz des Kaliums in der Amnionflüssigkeit - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	--	0,60	0,70	--
12	--	0,20	--	--
14	--	--	--	--
16	--	-5,05	-7,25	--
18	--	--	--	--

Blut und Amnionflüssigkeit:

Zwischen Amnionflüssigkeit und Blut besteht ab D12 ein signifikanter Unterschied im Kaliumgehalt in allen Gruppen mit Ausnahme in der HT, bei der erst nach D14 ein signifikanter Unterschied auftrat. Nach D12 steigt der Gehalt an K^+ -Ionen um das Zehnfache an.

Tabelle 19: Signifikante Unterschiede an K^+ -Ionen in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz

D	K	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	--	--	0,027	0,028
14	0,018	0,018	--	0,018	0,027
16	0,000	0,027	0,005	0,018	0,018
18	0,001	0,028	0,028	0,018	0,028

4.7 Natrium

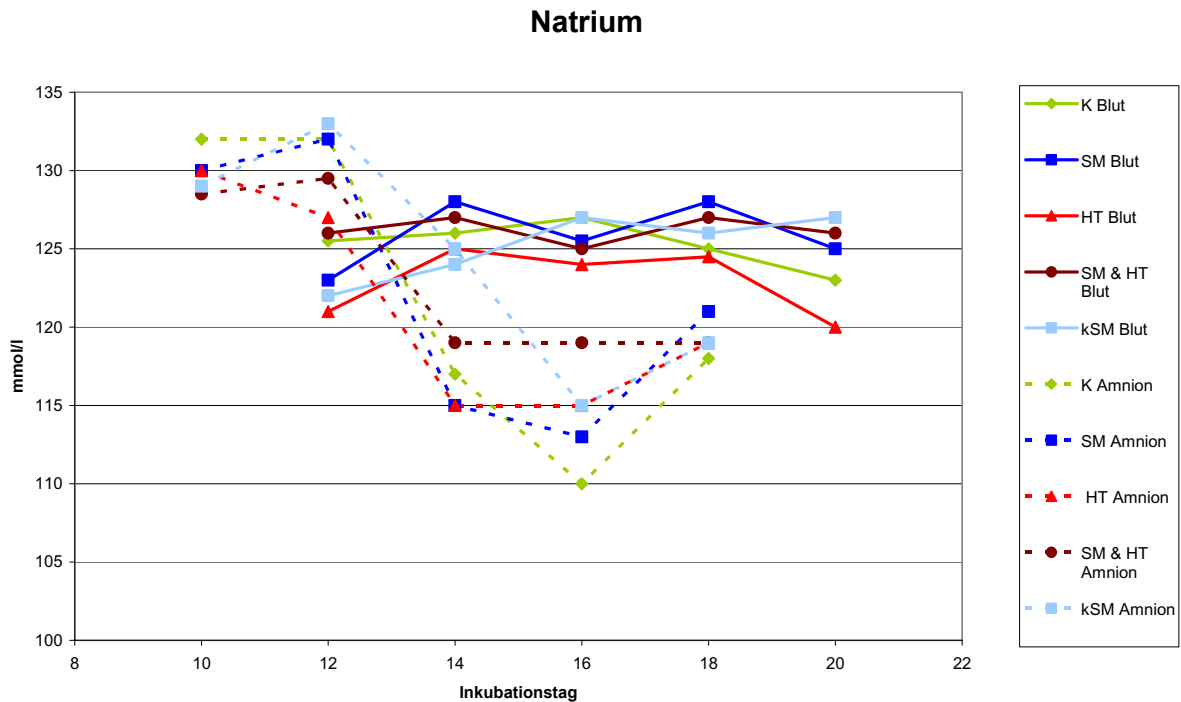


Diagramm 7: Natrium-Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

Wie der K^+ -Gehalt im Blut wurde auch der Natriumgehalt im Blut unter Kontrollbedingungen in engen Grenzen gehalten (123mmol/l bis 127mmol/l). Nach der Anwendung von langfristigem Sauerstoffmangel wurde die Konzentration an Na^+ -Ionen auch unter diesen Bedingungen konstant gehalten. In HT war von D12 zu D14 ein Anstieg mit nachfolgendem Plateau bis D18 und anschließendem Abfall erkennbar. Einen gleich bleibenden Natriumgehalt wie in der Kontrolle fand sich auch im Blut von Embryonen, die unter der Bedingung des SM&HT inkubiert wurden vor. Unter der Bedingung des kSM lag ein Anstieg bis D16 mit nachfolgendem Plateau bis zum Ende der Untersuchung vor.

Signifikante Unterschiede traten am D12 und D16 in HT und an D18 für SM&HT auf.

Tabelle 20: Signifikanz der Natriumkonzentration im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	-3,50	--	--
14	--	--	--	--
16	--	-3,00	--	--
18	--	--	2,00	--
20	--	--	--	--

In der Amnionflüssigkeit:

Im Gegensatz zum Blut zeigte sich in der Amnionflüssigkeit keine enge Regulierung. So waren an D10 und D12 unter K der höchsten Gehalt an Natriumionen (D10 und D12 je 132mmol/l) messbar, der bis D16 abfällt und am letzten Untersuchungstag, an D18, wieder auf 118mmol/l ansteigt. Einen Abfall des Na⁺-Gehaltes nach D12 mit Anstieg zum D18 fand sich auch in der Amnionflüssigkeit der anderen behandelten Gruppen.

Signifikante Unterschiede traten in HT an D12 und D16 auf, in SM&HT an D10, D12 und D16 und in kSM an D16 auf.

Tabelle 21: Signifikanz der Natriumkonzentration in der Amnionflüssigkeit – Differenz der Medianer der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = p<0,05; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	--	--	-3,50	--
12	--	1,00	-2,50	--
14	--	--	--	--
16	--	5,00	9,00	5,00
18	--	--	--	--

Blut und Amnionflüssigkeit:

Aus den ermittelten Werten der beiden Ionen Natrium und Kalium kann folgendes festgestellt werden: Die Konzentration an K⁺ im Blut ist geringer als im Amnion. Wohingegen die Konzentration an Na⁺ geringer im Amnion ist ($K^+_{\text{Amn}} > K^+_{\text{Bl}}$ and $Na^+_{\text{Amn}} < Na^+_{\text{Bl}}$).

Einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Flüssigkeiten stellt sich in SM&HT an allen Inkubationstagen dar.

Tabelle 22: Signifikante Unterschiede an Na⁺-Ionen in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz p<0,05, "--" keine Signifikanz

D	K	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	0,018	--	0,018	0,028
14	--	--	--	0,034	--
16	0,000	0,042	0,047	0,018	0,018
18	--	0,028	0,026	0,018	0,046

4.8 Chlorid

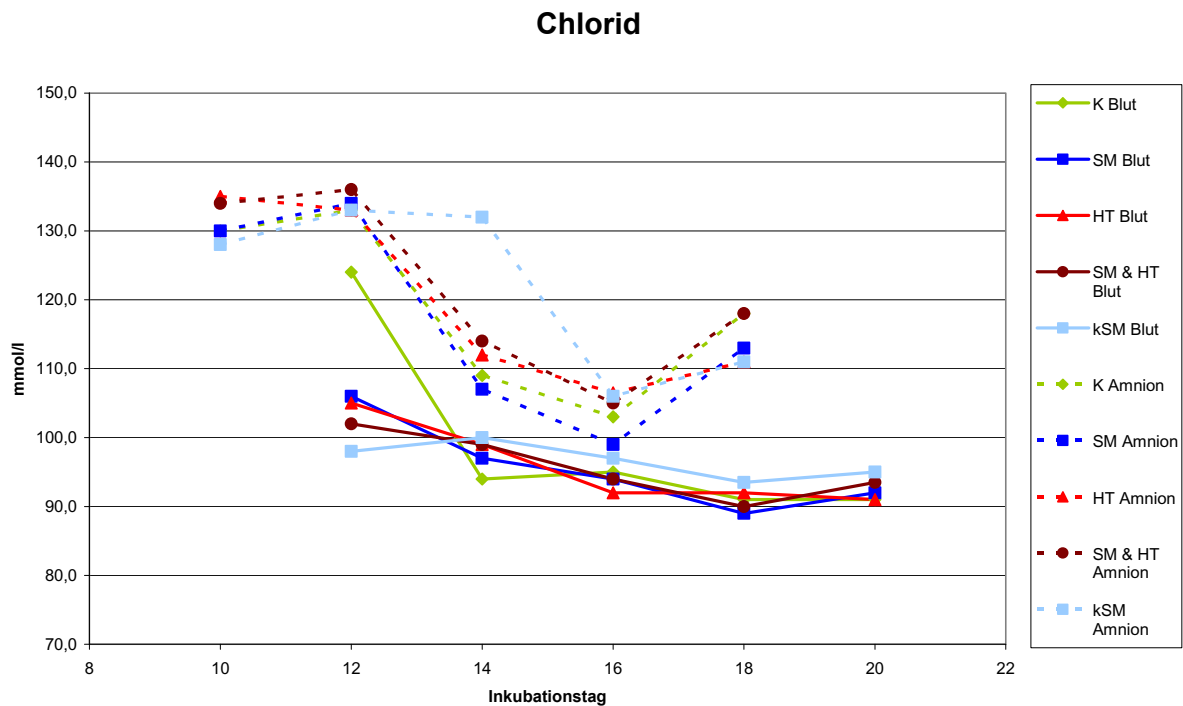


Diagramm 8: Chlorid-Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

Unter K betrug die $[Cl^-]$ an D12 124mmol/l, die anfangs steil abfiel (bis D14 94mmol/l), und danach einen geringeren Abfall aufwies, bis dann an D20 ein Gehalt an 91mmol/l auftrat. Auch unter den veränderten Inkubationsbedingungen zeigte sich dieses Verhalten, jedoch war der gemessene Wert an D12 in den Versuchsgruppen nie so hoch wie in der Kontrollgruppe. Ebenso war auch der nachfolgende Abfall geringer.

Signifikante Unterschiede traten nur an D16 auf in SM, HT und SM&HT auf.

Tabelle 23: Signifikanz der Chloridkonzentration im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	--	--	--
14	--	--	--	--
16	-1,00	-3,00	-1,00	--
18	--	--	--	--
20	--	--	--	--

In der Amnionflüssigkeit:

In dieser wies der Chloridgehalt unter Kontrolle zwischen D10 und D12 einen Anstieg (130mmol/l auf 133mmol/l) und fiel dann bis D16 wieder ab mit anschließendem Anstieg. Auch unter veränderten Inkubationsbedingungen wies der Chloridgehalt dieses Verhalten auf. Unter der Bedingung eines kurzfristigen SM fiel die [Cl⁻] erst nach D14, also zwei Inkubationstage verzögert.

Signifikante Veränderungen zeigten sich an D18 in SM, HT und kSM sowie in SM&HT an D12 und D16.

Tabelle 24: Signifikanz der Chloridkonzentration in der Amnionflüssigkeit - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	--	--	--	--
12	--	--	3,00	--
14	--	--	--	--
16	--	--	2,00	--
18	-5,00	-7,00	--	-7,00

Blut und Amnionflüssigkeit

Es traten signifikante Unterschiede zu allen Zeitpunkten zwischen den beiden Flüssigkeiten auf.

Tabelle 25: Signifikante Unterschiede an Cl⁻-Ionen in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$, "--" keine Signifikanz

D	K	SM	HT	SM&HT	kSM
12	--	0,018	--	0,018	0,028
14	0,043	--	--	0,028	0,027
16	0,028	0,028	0,012	0,017	0,017
18	0,001	0,028	0,046	0,018	--

4.9 Kalzium

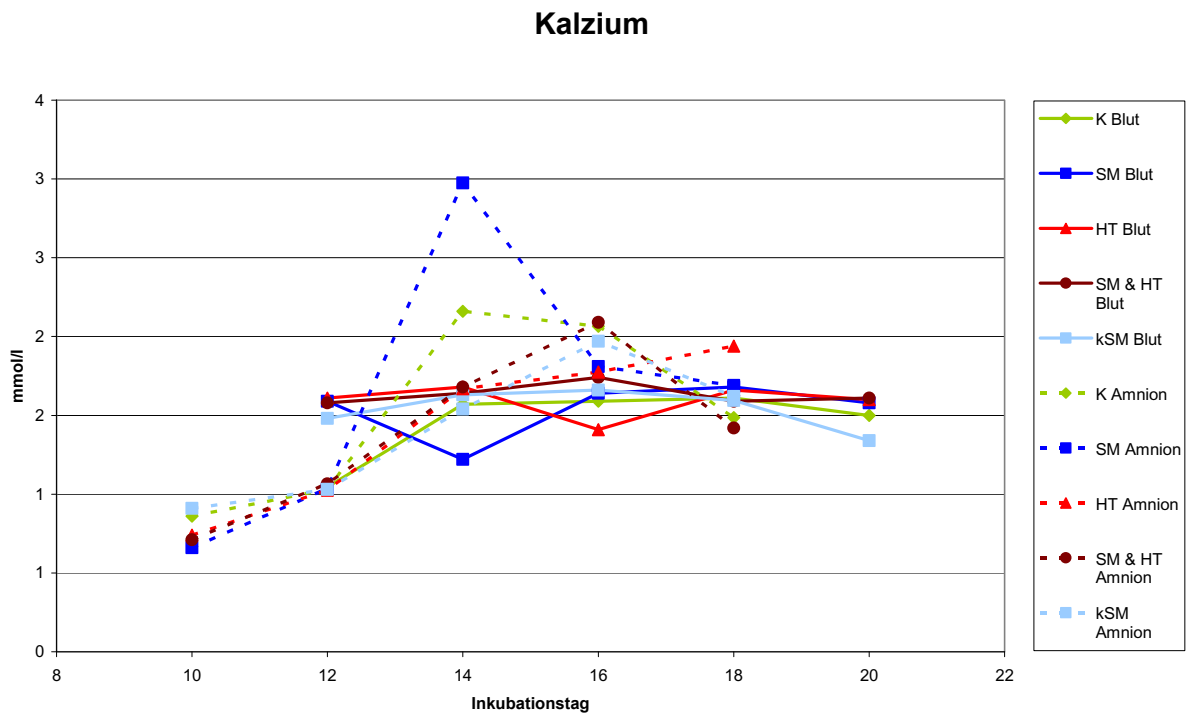


Diagramm 9: Kalzium-Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

In der K wurde der Kalziumspiegel im Blut über den gesamten Untersuchungszeitraum in sehr engen Grenzen gehalten. Die niedrigste $[Ca^{2+}]$ war an D12 (1,05mmol/l) und die höchste an D18 (1,61mmol/l) messbar. Auch unter den veränderten Inkubationsbedingungen zeigte sich eine enge Regulierung des Ca^{2+} -spiegels im Blut.

Eine Ausnahme bildet die Gruppe SM an D14. Hier verringerte sich rapide der Wert von D12 zu D14 und stieg bis D16 ebenso schnell wieder an. Unter hyperthermen Bedingungen verschob sich dieses Bild um zwei Inkubationstage, so dass an D16 die geringste $[Ca^{2+}]$ messbar war.

Signifikante Unterschiede ergaben sich für D12 für alle Gruppen und zusätzlich für D16 in der Gruppe SM&HT und für D20 in der Gruppe kSM.

Tabelle 26: Signifikanz der Kalziumkonzentration im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	0,55	0,57	0,54	0,44
14	--	--	--	--
16	--	--	0,15	--
18	--	--	--	--
20	--	--	--	-0,16

In der Amnionflüssigkeit:

In der Amnionflüssigkeit stellte sich heraus, dass der Kalziumgehalt in der Kontrolle und in den Versuchsgruppen an D10 und D12 gegenüber dem Blut geringer ist. An D12 stieg das Kalzium steil an. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes wurde ein konstanter Kalziumspiegel gemessen. Diese Beobachtungen konnten für alle Gruppen getroffen werden. Unter SM war an D14 die höchste $[Ca^{2+}]$ mit 3,6mmol/l aller behandelten Gruppen messbar.

Signifikante Unterschiede in der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen ließen sich an D18 in SM, an D16 in HT und an D14 in kSM feststellen.

Tabelle 27: Signifikanz der Kalziumkonzentration in der Amnionflüssigkeit - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	--	--	--	--
12	--	--	--	--
14	--	--	--	-0,62
16	--	-0,29	--	--
18	0,21	--	--	--

Blut und Amnionflüssigkeit:

Zu signifikanten Unterschieden zwischen beiden Flüssigkeiten kam es an D16 in allen Behandlungsgruppen. Weitere signifikante Unterschiede ergaben sich an D12 und D14 in SM, an D12 in SM&HT sowie kSM.

Tabelle 28: Signifikante Unterschiede an Ca^{2+} -Ionen in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$, "--" keine Signifikanz

D	K	SM	HT	SM & HT	kSM
12	--	0,018	--	0,018	0,028
14	--	0,028	--	--	--
16	0,000	0,028	0,005	0,018	0,028
18	--	--	--	--	--

4.10 Glucose

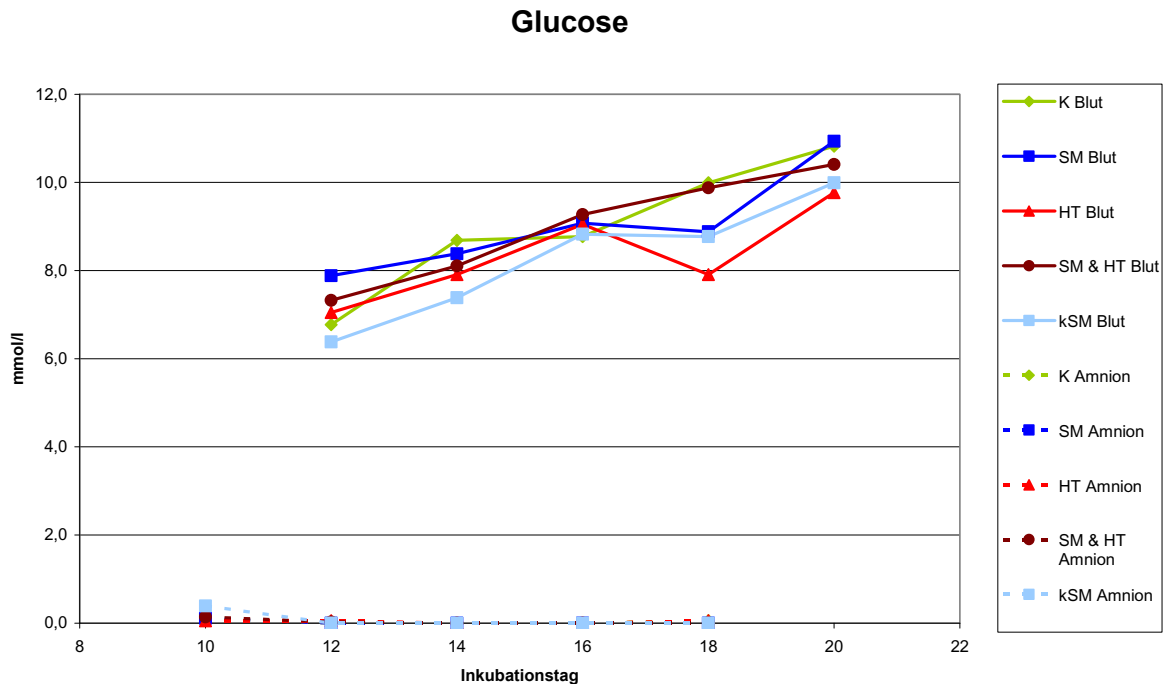


Diagramm 10: Glucose-Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

Im Blut war unter K die geringste [Glucose] an D12 (6,77mmol/l) messbar. Bis Inkubationstag 14 stieg die [Glucose] im Blut an, blieb dann bis D16 auf einen konstanten Level und stieg bis D20 wieder steil an, wo dann die höchste [Glucose] gemessen wurde (10,82mmol/l). Bei der Veränderung des für den Embryo zur Verfügung stehenden Luftsauerstoffes, unter chronischen oder kurzfristigen SM, zeigte sich ebenfalls die niedrigste Konzentration an D12 und die höchste Konzentration an D20. Auffallend ist hier, dass das Plateau um zwei Inkubationstage nach hinten verschoben war. In HT stieg die [Glucose] bis D14 an, fiel bis zum darauf folgenden Untersuchungstag und stieg an D18 wieder an. Ein Plateau konnte hier nicht beobachtet werden. In der Gruppe SM&HT stieg die [Glucose] kontinuierlich bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes.

Signifikante Unterschiede der behandelten Gruppen zur Kontrollgruppe treten an D12 und D18 in SM, an D18 und D20 in HT, an D14 und D16 in SM&HT und an D14 in kSM auf.

Tabelle 29: Signifikanz der Glucosekonzentration im Blut- Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	1,11	--	--	--
14	--	--	-0,58	-1,30
16	--	--	0,50	--
18	-1,11	-2,08	--	--
20	--	-1,05	--	--

In der Amnionflüssigkeit:

Im Unterschied zum Blut fiel ein zehnfacher niedrigerer Wert der [Glucose] in der Amnionflüssigkeit auf. Die niedrigste unter K gemessene Konzentration war 0,0mmol/l an D12, D14 und D18, die höchste gemessene Konzentration betrug 0,11mmol/l an D10. In den Versuchsgruppen betragen die Werte zwischen 0,0mmol/l und 0,39mmol/l.

Signifikante Unterschiede traten nur an D16 in SM und an D10 in kSM auf.

Tabelle 30: Signifikanz der Glucosekonzentration in der Amnionflüssigkeit – Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	--	--	--	0,28
12	--	--	--	--
14	--	--	--	--
16	0,00	--	--	--
18	--	--	--	--

4.11 Lactat

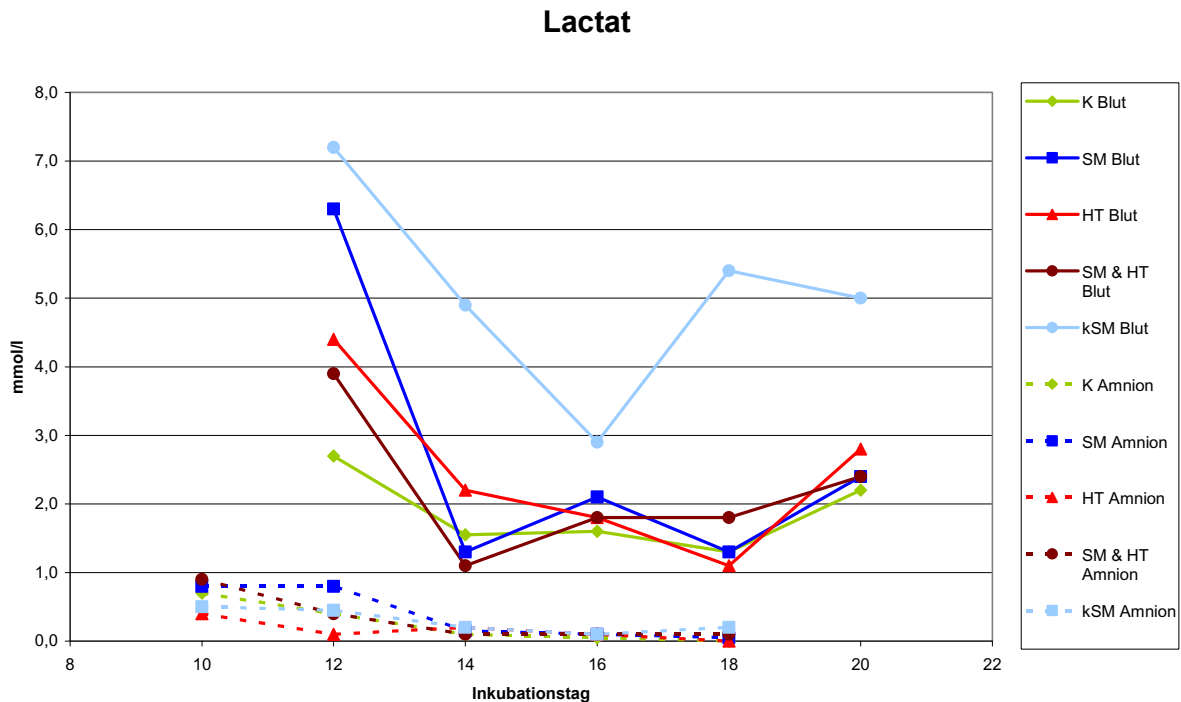


Diagramm 11: Lactat-Werte des Blutes und der Amnionflüssigkeit nach unterschiedlichen Inkubationsbedingungen

Im Blut:

In der Kontrolle fiel die [Lactat] von D12 zu D14 im Blut von 2,7mmol/l auf 1,55mmol/l. Dieser Level wurde bis D18 gehalten und danach stieg die Konzentration an Lactat im Blut wieder auf 2,2mmol/l an. Unter den veränderten Inkubationsbedingungen SM, HT, SM&HT sowie kSM, waren zweifach bis dreifach erhöhte [Lactat] an D12 messbar wie in der Kontrolle. Auch unter veränderten Inkubationsbedingungen war ein Abfall mit nachfolgendem Anstieg von D18 zu D20 messbar. Eine Ausnahme bildet hierbei die Gruppe kSM. Hier zeigte sich zwar ebenfalls einen Abfall, jedoch nicht so prägnant wie in den anderen Versuchsgruppen.

Signifikante Unterschiede waren an D12 und D16 in SM, an D12 in SM&HT und in kSM von D14 bis D20 feststellbar.

Tabelle 31: Signifikanz der Lactatkonzentration im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
12	3,60	--	1,20	--
14	--	--	--	3,35
16	0,50	--	--	1,30
18	--	--	--	4,10
20	--	--	--	2,80

In der Amnionflüssigkeit:

Eine zehnfach niedrigere [Lactat] war in der Amnionflüssigkeit messbar. In der Kontrolle und in den Versuchsgruppen war die [Lactat] an D10 am höchsten und nahm gegen Ende des Untersuchungszeitraumes D16/D18 ab.

Signifikante Unterschiede traten hier an D12 in den Gruppen SM und HT, zusätzlich an D10 in HT sowie an D14 und D 18 in der Gruppe kSM auf.

Tabelle 32: Signifikanz der [Lactatkon] in der Amnionflüssigkeit - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	--	-0,30	--	--
12	0,40	-0,30	--	--
14	--	--	--	0,10
16	--	--	--	--
18	--	--	--	0,20

4.12 Embryonengewicht

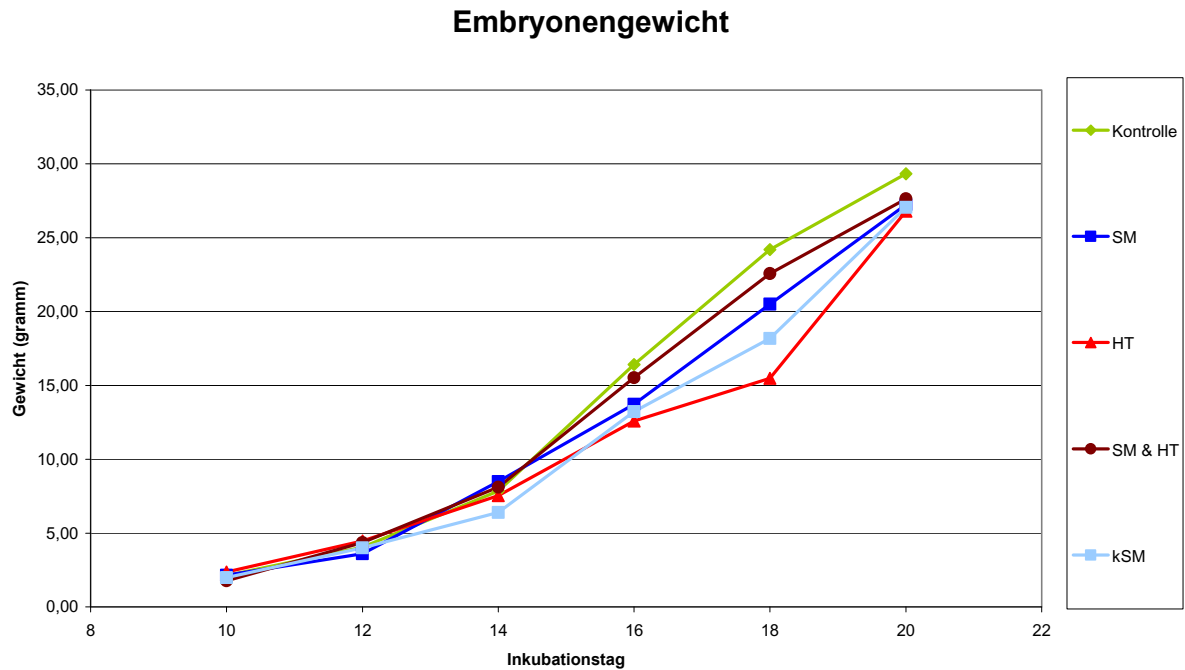


Diagramm 12: Embryonengewicht nach unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

Das Embryonengewicht zeigte einen altersabhängigen Anstieg. In der Kontrolle wogen die Embryonen an D10 2,1g und an D20 29,1g. In den Versuchsgruppen waren ähnliche Werte messbar. In SM&HT wogen die Embryonen im Durchschnitt 0,3g weniger. An D18 waren die größten Unterschiede in den Embryonengewichten (K=22,5g; SM=20,2g; HT=14,8g; SM&HT=22,7g; kSM=26,9g) messbar. Am letzten Untersuchungstag, D20, erreichte keine Versuchsgruppe das Gewicht der Kontrollgruppe.

Zur Kontrolle zeigten sich signifikante Unterschiede an D14 und D18 in SM, an D10, D12, D16 und D18 in HT, an D12 und D16 in SM&HT und an den Tagen D14 bis D20 in kSM.

Tabelle 33: Signifikanz des Embryonengewichtes - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM&HT	kSM
10	--	0,24	--	--
12	--	0,54	0,44	--
14	0,63	--	--	-1,45
16	--	-1,54	1,40	-0,90
18	-1,54	-6,56	--	-3,87
20	--	--	--	-2,28

4.13 Herzgewicht

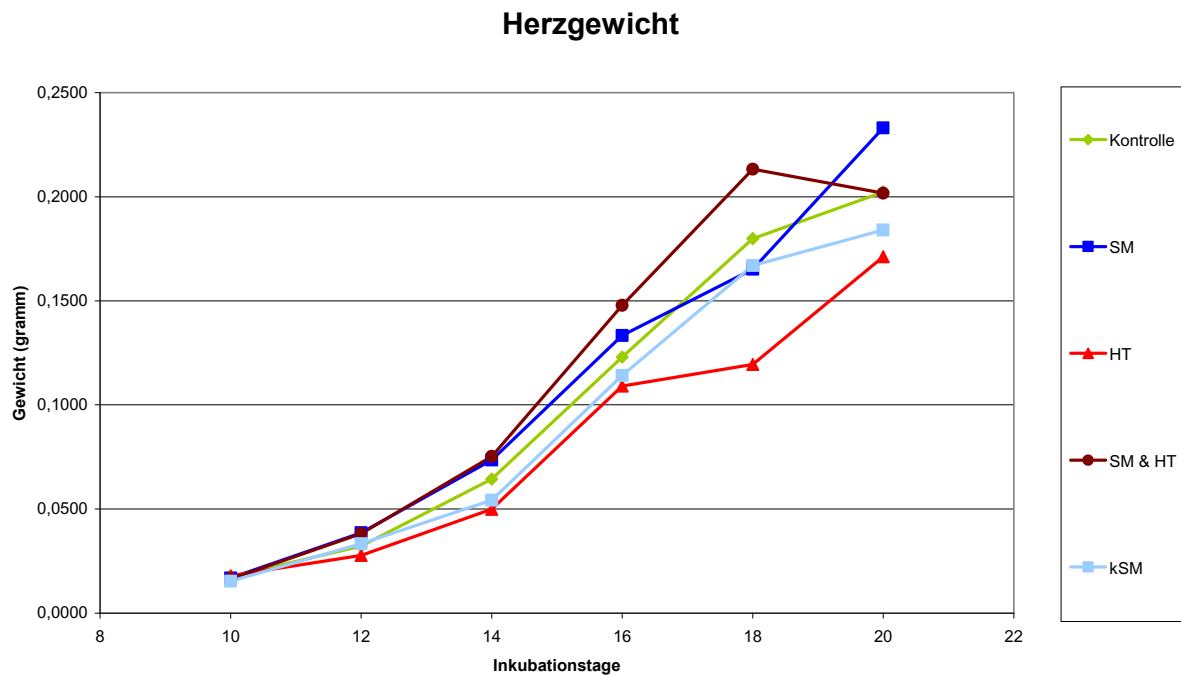


Diagramm 13: Herzgewicht nach unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

Wie beim Embryonengewicht stellte sich auch beim Herzgewicht eine Altersabhängigkeit dar. An D10 wogen alle Herzen aller Gruppen in etwa gleich viel (0,015g - 0,018g). An D18 waren wie bei den Embryonengewichten die größten Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen messbar. Ferner stellte sich heraus, dass am Ende der Inkubationszeit (D20) das Herzgewicht der HT niedrigerer im Vergleich zur Kontrollgruppe war (HT=0,17g < K=0,20g). Die Gruppe SM wies ein höheres Endgewicht auf im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Signifikante Unterschiede traten in der Gruppe SM an D12 und D20 auf, in HT von D14 bis D20 und in SM&HT von D12 bis D18 auf.

Tabelle 34: Signifikanz des Herzgewichtes- Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)

D	SM	HT	SM & HT	kSM
10	--	--	--	--
12	0,0064	--	0,0061	--
14	--	-0,0145	0,0109	--
16	--	-0,0140	0,0249	--
18	--	-0,0605	0,0333	--
20	0,0309	-0,0311	--	--

4.14 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Ermittlung der Protonenkonzentration beider Flüssigkeiten stellte sich heraus, dass der pH-Wert im Blut höher ist und in engeren Grenzen gehalten wird, als in der Amnionflüssigkeit. Diese Beobachtung konnte nicht nur in der Kontrolle ermittelt werden, sondern auch unter den veränderten Inkubationsbedingungen.

Der pO_2 -Gehalt im Blut sank mit fortwährender Inkubationszeit, wohingegen in der Amnionflüssigkeit der pO_2 -Gehalt mäßig stieg und seinen höchsten Wert an D18 erreichte (Kontrollbedingungen und in den behandelten Gruppen). Signifikante Unterschiede innerhalb der Flüssigkeit Blut traten nach kurzfristigem Sauerstoffmangel auf. In der Amnionflüssigkeit konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Im Vergleich beider Flüssigkeiten miteinander zeigten sich signifikante Veränderungen nach D12 in Kontrolle und SM.

Über die gesamte Entwicklungsperiode stieg der pCO_2 -Gehalt sowohl in der Blut- als auch in der Amnionflüssigkeit. Signifikante Unterschiede traten im Blut an D12 in SM und in SM&HT auf. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich ab D14 zwischen beiden Flüssigkeiten in allen Gruppen.

Einen steilen Anstieg des HCO_3^- -Gehaltes zwischen D12 und D16 konnte in der Flüssigkeit Blut ermittelt werden. Dieser Anstieg war bis D20 nur noch gering. Dies war nicht nur in der Kontrolle sichtbar, sondern auch in den behandelten Gruppen. Ein nicht so steiler Anstieg trat in der Amnionflüssigkeit auf, hier stieg der HCO_3^- -Gehalt zwischen D10 und D12 nur geringfügig an. Signifikante Unterschiede waren vor allem bei erhöhter Temperatur in der Amnionflüssigkeit sichtbar.

Die Sauerstoffsättigung im Blut lag zwischen 100% und 90% und fiel mit zunehmender Inkubationszeit. In der Amnionflüssigkeit lag die Sättigung zwischen 30% und 60% bevor an D18 ein rapider Anstieg von ca. 50% auf bis zu fast 90% zu beobachten war. Am deutlichsten war der Anstieg in den Gruppen SM&HT und kSM. Die Gruppe SM erreichte als einzige nicht die Werte von der Kontrolle zu diesem Zeitpunkt. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Flüssigkeiten lagen vor.

In der Amnionflüssigkeit stieg nach D12 die $[K^+]$ um das zehnfache gegenüber der Blutflüssigkeit, und erreichte an D16 einen Peak. Der folgende mäßige Abfall führt nicht zu den Ausgangswerten. Im Blut wurde sowohl unter Kontroll- als auch unter den veränderten Inkubationsbedingungen ein konstanter Kaliumspiegel gehalten.

Die $[Na^+]$ im Blut wurde über den gesamten Inkubationszeitraum in engen Grenzen gehalten. Die Konzentration an Na^+ verhielt sich in der Amnionflüssigkeit umgekehrt wie die Konzentration an K^+ . So wurde ein Abfall der $[Na^+]$ nach D12 in allen Gruppen und einen Anstieg nach D16 beobachtet, ohne jedoch die Ausgangswerte wieder zu erreichen.

Mit zunehmender Inkubationsdauer fiel die $[Cl^-]$ im Blut ab. In der Amnionflüssigkeit sank der Chloridgehalt auf seinen tiefsten Wert von D12 zu D16 ab, stieg dann wieder an, ohne jedoch die Ausgangswerte zu erreichen. Die gleichen Beobachtungen wurden auch in den Gruppen mit den veränderten Inkubationsbedingungen gesehen.

Die $[Ca^{2+}]$ wurde im Blut in sehr engen Grenzen reguliert. Unter Versuchsbedingungen zeigten sich Unterschiede an D12 in allen Gruppen. In der Amnionflüssigkeit erreichte das Calcium seinen Peak unter Kontrollbedingungen an D14. Dieser Peak war unter der Bedingung des längerfristigen Sauerstoffmangels besonders stark ausgeprägt. Unter der Bedingung des kSM wurde dieser Peak erst zwei Inkubationstage später erreicht. Nach dem Erreichen des Peaks fiel die $[Ca^{2+}]$ wieder bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes ab. Unterschiede zwischen beiden Flüssigkeiten bestanden an D16 für alle Gruppen.

Die Glucose stellte sich äußerst interessant in diesen Untersuchungen dar. So lag ein zehnfach höherer Wert im Blut im Vergleich zur Amnionflüssigkeit vor. Ein Plateau stellte sich unter Kontrollbedingungen zwischen D14 und D16 im Blut ein. Durch die unterschiedlichen Behandlungen war das Plateau um bis zu zwei Inkubationstage nach hinten verschoben.

Unter den Stressbedingungen der veränderten Inkubationsparameter Sauerstoff und Temperatur zeigten sich erhöhte $[Lactat]$ gegenüber den Kontrollbedingungen im Blut. Sowohl in der Kontrolle als auch in den behandelten Gruppen fiel der Lactatgehalt von D12 zu D14 steil ab und danach nur noch langsam bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes. Veränderte Inkubationsbedingungen hatten nur geringe Auswirkungen auf die Lactatkonzentration in der Amnionflüssigkeit gegenüber der Kontrolle. Der Gehalt an Lactat fiel auch in der Amnionflüssigkeit mit fortschreitender Inkubationszeit.

Die ermittelten morphologischen Parameter, Embryonen- und Herzgewicht, zeigten einen altersabhängigen Anstieg. Die größten Abweichungen der Embryonengewichte konnten an D18 ermittelt werden. Zum Ende der Inkubationszeit lag das Embryonengewicht der Kontrolle deutlich über denen der behandelten Gruppen.

Auch beim Herzgewicht war die größte Abweichung an D18 feststellbar. Als Besonderheit stellte sich hier heraus, dass unter chronischem Sauerstoffmangel zum Ende der Inkubationszeit (D20) ein höheres Herzgewicht erreicht wurde.

5. Diskussion

Vogelembryonen entwickeln sich im Gegensatz zu Säugetierembryonen außerhalb des Mutterleibes. Sie sind auf exogene Wärmezufuhr angewiesen. Die Auswirkungen langfristiger Änderungen der Temperatur sind deutlich ausgeprägt und die Anpassungsmechanismen bedürfen weiterer Klärung.

Sauerstoffmangel im zweiten Inkubationsdrittel senkt den Energieumsatz des Hühnerembryos (Dzialowski *et al.*, 2002) und beeinflusst die Abwehrmechanismen (Ali *et al.*, 2008). In dieser Dissertation wurde der Einfluss von Sauerstoffmangel und von Temperaturänderung in kritischen Phasen der Embryonalentwicklung geprüft.

In allen behandelten Gruppen und in der Kontrollgruppe wurden die Gasparameter (pH, pO₂, pCO₂, HCO₃⁻, sO₂) sowie der Elektrolyt- und Metabolitstatus (K⁺, Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Glucose, Lactat) vergleichend in der Amnionflüssigkeit und im arteriellen Blut (Chorioallantoisvene) bestimmt. Außerdem erfolgte die Erfassung der morphologische Parameter (Körpergewicht, Herzgewicht). Es sollte geprüft werden, ob zwischen den Kompartimenten Blut und Amnion Beziehungen bestehen, die als zusätzliche Aufgaben zu den bisher bekannten Aufgaben der Amnionflüssigkeit und Amnionmembran interpretiert werden könnten. Neben ihrer mechanischen Schutzfunktion wäre ihre Funktion als Lieferant und Speicher für Gase, Elektrolyte und Metabolite denkbar.

5.1 Auswirkungen der Inkubationsbedingungen auf die Gasparameter (pH, pO₂, pCO₂, HCO₃⁻, sO₂)

In der Blutflüssigkeit sank der pH-Wert bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes. Er wird in engen Grenzen gehalten. In der Kontrollgruppe schwankt er z. B. nur zwischen 7,5 und 7,7 (Diagramm1). Langfristiger Sauerstoffmangel und/oder Hyperthermie hatten nur geringe Auswirkungen auf die Konstanzhaltung des pH-Wertes. Bei kurzfristigem Sauerstoffmangel zeigten sich dagegen signifikante Unterschiede an allen Untersuchungstagen. Der pH-Wert bei kurzfristigem Sauerstoffmangel (Gruppe kSM) liegt deutlich niedriger im Vergleich zur K (Kontrolle). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es bei kurzfristigem Sauerstoffmangel eine gewisse Zeit dauert, bis die neuen Gleichgewichte zwischen Blut, Amnionflüssigkeit und Niere wieder erreicht sind. Zu stabilen Werten kommt es bei längerfristiger Beeinflussung unter Einbeziehung aller beteiligten Flüssigkeiten. Der pH in der Amnionflüssigkeit ist signifikant niedriger im Vergleich zum Blut. Nach einem anfänglichen Abfall des pH-Wertes, steigt dieser bis zum Ende der Untersuchung wieder an. Deutlich wird ein altersabhängiger Anstieg. Die Amnionflüssigkeit scheint Protonen aus dem Blut aufzunehmen, da der Blut-pH leicht abfällt. Im Gegensatz zum Blut, sind die Auswirkungen des kurzfristigen

Sauerstoffmangels kaum ausgeprägt. Die Ursache für den niedrigeren pH-Wert ist vermutlich auf den steigenden Stoffwechsel des Hühnerembryos zurückzuführen.

Im Gegensatz wird ein steigender $p\text{CO}_2$ im Blut und in der Amnionflüssigkeit sowohl in der Kontrollgruppe als auch in allen Versuchsgruppen gefunden.

Bei adulten Tieren führt dieser Anstieg des $p\text{CO}_2$ ohne kompensatorische Mechanismen zu einer respiratorischen Azidose (Dawes und Simkiss, 1969). Der steigende $p\text{CO}_2$ ab D12 wird zurückgeführt auf die limitierte Aufnahme- und Abgabefähigkeit der CAM. Sie hat an D12 ihre maximale Ausdehnung und damit ihre Kapazitätsgrenze für den Gastransport erreicht (Ackerman und Rahn, 1981). In Zusammenhang mit dem steigenden $p\text{CO}_2$ steht der stetig steigende Metabolismus des wachsenden Embryos. Der Hühnerembryo besitzt auch ohne Hypo- bzw. Hyperventilation der Lunge regulatorische Mechanismen, um der Azidose entgegenzuwirken. Anzunehmen sind die Aktivität der Niere und in geringerem Maß die Regulation über den Magen-Darm-Trakt. Beides ist im Zusammenhang mit der Chorioallantoisflüssigkeit zu sehen, die den Abfall aufnimmt.

Um diesem steigenden $p\text{CO}_2$ sicher entgegenzuwirken, setzt der Embryo das Bikarbonat-Puffersystem im Blut ein. Als wichtigstes Puffersystem im Organismus enthält er die schwache Säure der Kohlensäure (H_2CO_3), die schnell in Wasserstoffprotonen (H^+) und Bikarbonationen (HCO_3^-) dissoziiert. Zwischen der undissoziierten Kohlensäure und den dissoziierten Bestandteilen dieses Puffersystems besteht ein Gleichgewicht, welches durch die Dissoziationskonstante K bestimmt ist. Steigt infolge einer Azidose die Protonenkonzentration an, so wird vermehrt CO_2 gebildet. Bei den Adulten wird das vermehrt anfallende CO_2 über die Lungen abgeatmet. Bei den Hühnerembryonen erfolgt der Abtransport des anfallenden CO_2 über die Blutgefäße. Es ist möglich, dass dieses überschüssige CO_2 in der Amnionflüssigkeit gespeichert wird. Im Diagramm 3 ist ein rapider Anstieg des $p\text{CO}_2$ im Blut und im Amnion ab D12 erkennbar. Dieses Verhalten konnte jedoch nicht im Blut der Gruppe unter Hyperthermie (HT) beobachtet werden. Vielmehr sank der $p\text{CO}_2$ nach D12 ab und stieg kaum mehr an. Das Bikarbonat zeigte dagegen einen Anstieg. Vermutlich wird infolge der höheren Temperatur eine erhöhte Aktivität des Enzyms Carboanhydrase erreicht und so das anfallende CO_2 schneller abgebaut. Da die Gewichtszunahme geringer ausfällt, ist auch eine Verringerung des Metabolismus und damit ein Absinken des $p\text{CO}_2$ möglich (Diagramm 12, Körpergewicht bei Hyperthermie am D18).

Der höhere Gehalt an CO_2 in der Amnionflüssigkeit lässt vermuten, dass dort das Bikarbonat-Puffersystem nicht so stark ausgeprägt ist oder aber die Flüssigkeit als Speicher dient. Bei ansteigendem $p\text{CO}_2$ war kein Bikarbonatverbrauch (kein Absinken) zu erkennen. In der Phase, in welcher das Puffersystem im Blut steigt, befindet sich HCO_3^- -Spiegel in der Amnionflüssigkeit in einer Plateauphase (Diagramm 4). Zu dem Zeitpunkt, in welcher die Plateauphase im Blut erreicht ist (D16 – D18 in der Kontrolle bzw. D16 – D20 in den

behandelten Gruppen), steigt der HCO_3^- -Spiegel in der Amnionflüssigkeit leicht an (Diagramm 4). Beide Befunde lassen auf ein Zusammenwirken beider Flüssigkeiten schließen.

Unter Kontrollbedingungen wird ein Absinken des pCO_2 im Blut nach D18 erkennbar, was mit dem i.p. (internal pipping) unter optimalen Bedingungen zwischen D18 und D19 zu erklären ist. Danach befindet sich der Vogel mit dem Schnabel in der Luftkammer. Ab diesem Zeitpunkt wird die Atmung über die Außenwelt und unter Einbeziehung der Lunge erleichtert. Der noch weiter steigende pCO_2 in den behandelten Gruppen ist mit dem zunehmenden Stoffwechsel erklärbar bzw. mit dem regulierten hypoxischen Metabolismus (Stuhrberg, 2006). Dafür spricht das Überleben der Embryonen mit einer geringeren Embryonenmasse. In allen untersuchten Gruppen fiel der O_2 -Gehalt im Blut bis zum Schlupf (von 14,81kPa an D12 auf 6,93kPa an D20). Zurückzuführen ist der Abfall auf die ab dem D12 gleich bleibende Gasaustauschfläche der CAM sowie auf den mit dem für die Synthese von Gewebe (Wachstum) verbundenen steigenden Metabolismus.

Die Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes im Zusammenhang mit der Zunahme des Kohlendioxidpartialdruckes wird in der Literatur als Stimulus für das i.p. beschrieben (Tullett und Burton, 1985; Freeman und Vince, 1974).

In der Amnionflüssigkeit ist ein Abfall des Sauerstoffpartialdruckes nicht zu erkennen. Es wird eine Zunahme des pO_2 gegen Ende der Inkubation sichtbar. Es ist daher anzunehmen, dass die Amnionflüssigkeit, wenn auch im geringen Umfang, als Reservoir für den physikalisch gelösten Sauerstoff dienen kann (Nechaeva, M. B. *et al.*, 2008).

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe, weisen die behandelten Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf. Eine Erklärung hierfür kann sein, dass der Einfluss des Sauerstoffmangels und der Hyperthermie in dem sensiblen zweiten Inkubationsdrittel stattgefunden hat und es dann zu Anpassungsprozessen kam.

Der Sauerstoff ist im Blut an das Hämoglobin gebunden. Die Fähigkeit zur Bindung hängt z.B. von der Temperatur, dem pH, dem Gehalt an 2,3-DPG oder dem CO_2 -Gehalt ab.

In der Kontrollgruppe sank die Sättigung im Blut bis zum Ende des Untersuchungszeitpunktes (98,50% D12 auf 89,60% D20).

Signifikante Unterschiede im Blut traten in der Versuchsgruppe kSM auf. Die Hühnerembryonen unterliegen bis zum Zeitpunkt der Behandlung optimalen Inkubationsbedingungen. Nach Setzen des Stressors haben diese Hühnerembryonen innerhalb der kurzen Zeit (15minütiger Sauerstoffmangel) keinerlei Möglichkeiten sich den veränderten Sauerstoffbedingungen anzupassen. Andere Behandlungsgruppen hatten durch chronische Stressoreinwirkung die Möglichkeit der Anpassung über Veränderung der Regulation.

Weitere signifikante Unterschiede traten an D20 in der Versuchsgruppe mit Sauerstoffmangel (SM) und an D18 und D20 in der Versuchsgruppe SM&HT auf, in denen nur eine geringe O₂-Sättigung im Blut ermittelt wurde. Dagegen blieb der pO₂ trotz sinkender Sättigung in den anderen Gruppen gleich. Es handelt sich hier um eine Rechtsverschiebung der Sauerstoffsättigungskurve. Für den Organismus bedeutet die Rechtsverschiebung, dass mehr O₂ im Gewebe abgegeben werden kann und damit weniger O₂ in der Chorioallantoisvene gebunden ist (Stryer, 2003). Für den Embryo bedeutet dies eine Aufrechterhaltung der O₂ Versorgung trotz sinkender Sättigung.

Die Amnionflüssigkeit ist frei von Erythrozyten und enthält kein Hb. Der O₂ ist in der Amnionflüssigkeit physikalisch gelöst. Die sO₂ in der Amnionflüssigkeit zeigte in allen Versuchsgruppen einen biphasischen Verlauf. Auffallend ist, dass die sO₂ an D18 deutlich zunimmt. Der Grund liegt vermutlich an dem beginnenden i.p.

Die sO₂ in Amnionflüssigkeit unterliegt ständigen Schwankungen, es ist daher nicht ausgeschlossen, dass im Bedarfsfall Sauerstoff über die Amnionmembran zu den Blutgefäßen diffundieren kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass veränderte Inkubationsbedingungen zur Änderung der Membranaktivität führen können. Gibson et al. (2008) zeigten, dass es zu signifikanten metabolischen Effekten (Inhibierung der Glykolyse) und zu Antworten in der Ionenhomöostase bei veränderter O₂-Spannung kommt. Dabei kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wenn die Ionenhomöostase nicht aufrechterhalten werden kann. Diese Dysfunktion führt zu Veränderungen der Transporteigenschaften und der Signalübertragung. Damit ist die Prädisposition z.B. für Ödembildung gegeben.

5.2 Auswirkungen der Inkubationsbedingungen auf die Elektrolyte und Metabolite (K⁺, Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Glucose, Lactat)

Natrium und Kalium sind für die Erhaltung des elektro-chemischen sowie des osmotischen Gradienten erforderlich und damit für die Bewegung des Wassers durch die Membranen. Calcium ist Bestandteil des Knochens und der Schale und muss während der Entwicklung in ausreichender Menge für die Ossifikation vorhanden sein. Außerdem ist es in eine Reihe physiologischer Prozesse, wie z.B. die intrazelluläre Signaltransduktion, einbezogen. Chlorid dient ebenfalls der Wasserbewegung. Glucose wird im Energiestoffwechsel verbraucht und Laktat spielt bei der Einstellung des pH-Wertes eine Rolle.

Für die Regulation der Elektrolyte und Metabolite in der Blut- und Amnionflüssigkeit sind die elektrophysiologischen Eigenschaften des Gefäßendothels und des Amnionepithels von größter Bedeutung. Das Amnionepithel und das Gefäßendothel umschließen zwei voneinander getrennte Kompartimente. Es kommt an diesen Membranen zu elektrophysiologischen Vorgängen (Blasius, 2006).

Bautzmann und Schmidt (1960) haben in histologischen Arbeiten nachgewiesen, dass das Amnionepithel resorptive und sekretorische Fähigkeiten besitzt.

5.2.1 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf Kalium und Natrium (Diagramm 6, 7 Tabellen 17 - 22)

Aufgrund der Präparationstechnik konnte erst ab D12 Blut gewonnen werden, während die Amnionflüssigkeit bereits ab D 10 entnommen wurde. Bei Betrachtung der Diagramme 6 und 7 fällt auf, dass die Konzentrationen für Kalium und Natrium an D12 in beiden Flüssigkeiten gleich hoch sind, ab D14 unterschieden sie sich signifikant. Zu diesem Ergebnis kamen auch Harsch und Green (1963). Der Grund für diese Ähnlichkeit der Konzentrationen an K^+ und Na^+ im Blut und in der Amnionflüssigkeit liegt ihrer Meinung nach darin begründet, dass die inneren Organe bis etwa D12 von der Amnionflüssigkeit umspült werden und die Diffusion über die großen Flächen zum Ausgleich führt. Danach schließen sich die Körper- und Membranhöhlen, und neben den passiven Prozessen führen aktive Transportmechanismen zu den Konzentrationsunterschieden.

Die verschiedenen Inkubationsbedingungen führen bei beiden Ionen bei Hyperthermie und bei Hyperthermie plus Sauerstoffmangel an einigen Tagen der Entwicklung zu signifikanten Unterschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 14-18). Es ist denkbar, dass es durch die erhöhte Temperatur zur Beeinflussung der Transportmechanismen kommen kann (Beschleunigung durch erhöhte Wärmeenergie oder Drosselung, um die freiwerdende Wärmeenergie der Natrium- bzw. Kaliumpumpen zu verringern). Hier wäre eine erste Erklärung für die Prädisposition späterer Störungen im Wassertransport zu sehen. Durch unphysiologischen Mengen an K^+ und Na^+ kann es zu Gewebsschädigungen kommen und es können sich Ödeme ausbilden. Die genauen Transportvorgänge zwischen diesen beiden Kompartimenten bedürfen noch weiterer Untersuchung. Vorstellbar ist eine vermehrte Wassereinlagerung bei erhöhter Ionenkonzentration. Wie die Proteine in ihrer kolloidosmotischen Funktion wirken, wird hier nicht diskutiert, da sie nicht gemessen wurden. In der Blutflüssigkeit findet man Schwankungen von maximal 8 mmol/l zwischen höchster und niedrigster Konzentration, in der Amnionflüssigkeit von 15 mmol/l. Das Endothel der Gefäße reguliert als Barriere den Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut sowie zwischen Amnion und Blut und es können daher geringe Schwankungen auftreten.

Das Epithel des Amnions kann auch sezernieren und so zu den Schwankungen beitragen. Auf Grund dieser Beobachtung ist es denkbar, dass bei erhöhter Wärmezufuhr die Amnionflüssigkeit Kalium und Natrium für das Kapillarblut vermehrt bereitstellt bzw. aus dem Blut aufnimmt. Die Amnionmembran ist also nicht nur Speicher von Ionen sondern hat auch eine Funktion im Elektrolyttransfer.

Der Vergleich der Ionenkonzentrationen zwischen beiden Flüssigkeiten zeigt auch hier den signifikanten Einfluss der Temperatur (alle Altersgruppen). Bei älteren Embryonen führen auch der Sauerstoffmangel bzw. kurzfristige Einflüsse zu gesicherten Unterschieden zwischen Blut und Amnion (Tab. 19). Das deutet an, dass die jüngeren Entwicklungsstadien sehr widerstandsfähig sind.

5.2.2 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf Chlorid

(Diagramm 8, Tabellen 23 - 25)

Die Konzentration an Chlorid-Ionen in der Amnionflüssigkeit ist entscheidend für den nachfolgenden Wassereinstrom in die Amnionhöhle (Faber *et al.*, 1973). So wies Faber mittels radioaktiv markierten Chlorid-Ionen den Transfer vom Blut in die Amnionflüssigkeit und den folgenden Wasserstrom nach. Er führte den Vorgang auf teilweise aktive Transportprozesse zurück. In den eigenen Ergebnissen war die Cl⁻-Konzentration im Blut und in der Amnionflüssigkeit stark altersabhängig, wobei ein gesicherter Abfall von D12 (133mmol/l) zu D14 (109mmol/l) in der Amnionflüssigkeit auffiel. In diesem Zeitraum reißt die seroamniotische Platte der Amnionhöhle und es strömen Proteine ein. Es ist denkbar, dass der Proteineinstrom zu einem veränderten kolloidosmotischen Druck führt und damit den Wassereinstrom nach sich zieht. Die osmotischen Kräfte über die Chlorid-Ionen verlieren ihre Bedeutung für den Influx von Wasser. Die veränderten Inkubationsbedingungen führen zu einem gleichen Verlauf wie in der Kontrolle. Eine Ausnahme zeigte sich in der Gruppe kSM. Das Absinken der Cl⁻ Konzentration trat hier erst an D14 auf. Es ist anzunehmen, dass die pH-Wert-Regulation zu langsam erfolgt und die Auswirkungen des seroamniotischen Plattenrisses verspätet einsetzen, so dass Cl⁻ in der hohen Konzentration (132mmol/l) seine osmotische Bedeutung für die Regulation des Wassereinstromes beibehält.

In der Blutflüssigkeit der behandelten Gruppen wurde an D12 eine durchschnittlich 20% geringere Cl⁻-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Diagramm 8) ermittelt. An den darauf folgenden Untersuchungstagen glichen sich die Werte an. Es ist denkbar, dass nach Wiederherstellung der optimalen Inkubationsbedingungen eine Einstellung auf das physiologische Gleichgewicht im Cl⁻-Haushalt stattgefunden hat. Das würde ein Zusammenwirken beider Flüssigkeiten bestätigen.

Zwischen beiden Flüssigkeiten traten zu jedem Entwicklungszeitpunkt signifikante Unterschiede auf. Das würde ein Zusammenwirken beider Flüssigkeiten ebenfalls bestätigen.

5.2.3 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf Kalzium

(Diagramm 9, Tabellen 26 - 28)

Die Eischale des Hühnervogels liefert etwa 80% des Kalziums, welches der Embryo für den Knochenstoffwechsel benötigt. Neben der respiratorischen Aufgabe erfüllt die CAM noch die Aufgabe der Mobilisierung und den Transport des Kalziums aus der Eischale. Über spezifische temperatur-sensitive CAM-vermittelte Stoffwechselwege (Akins und Tuan, 1993; Crooks und Simkiss, 1975) erreicht das Kalzium, beginnend an D10 und einem Maximum an D17, die embryonalen Gefäße. Der CAM-Kalzium-Transport ist ein unidirektionaler, aktiver Prozess der spezifisch für Ca^{2+} ist und durch Vitamin K reguliert wird (Akins und Tuan, 1993). Mittels kinetischer Analysen und dem Einsatz von radioaktiv markiertem Ca^{2+} konnte von dieser Arbeitsgruppe der Transport des Ca^{2+} durch endosomale Vesikel nachgewiesen werden.

Unter Kontrollbedingungen *stieg* im Blut die Ca^{2+} -Konzentration von 1,05mmol/l an D12 auf 1,57mmol/l an D14 und blieb bis zum Ende der Untersuchungen auf dieser Höhe.

In der Gruppe SM der Amnionflüssigkeit fiel eine Besonderheit mit einem deutlichem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration von 1,04mmol/l an D12 auf 2,98mmol/l an D14 auf. Danach sank die Ca^{2+} -Konzentration zum folgenden Untersuchungstag wieder ab (D16=1,81mmol/l) (Diagramm 9). Wird der Ca^{2+} -Gehalt zum selben Untersuchungszeitpunkt mit dem im Blut verglichen, zeigt sich ein umgekehrter Verlauf an Ca^{2+} im Blut. Sauerstoffmangel verursacht eine Abnahme der Kontraktionshäufigkeit des Amnionepithels (Nechaeva, M. B. *et al.*, 2008). Nach Beendigung der sauerstoffarmen Phase (nach D12) nahmen die Kontraktionen des Amniongewebes wieder zu. Das dazu benötigte Ca^{2+} scheint aus dem Blut in die Amnionflüssigkeit transportiert zu werden. Hat sich der Embryo an die neuen Bedingungen (normaler Sauerstoffgehalt in der Inkubationsluft) gewöhnt, kommt es zu einem Ca^{2+} -Gleichgewicht zwischen dem Blut und der Amnionflüssigkeit (Diagramm 9).

Die physiologische Entwicklung des Embryos hängt von einer gleich bleibenden Zufuhr an Kalzium ab, so dass die These des Zusammenwirkens beider Flüssigkeiten auch hier funktionell begründet ist.

5.2.4 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf Glucose

(Diagramm 10, Tabellen 29 - 30)

Die Glucose zeigte im Blut einen altersabhängigen Anstieg. Das embryonale (unreife) Herz hat einen geringeren Energiebedarf im Vergleich zum adulten (reifen) Herz, und gewinnt die benötigte Energie aus der anaeroben Glykolyse. Des Weiteren besitzt das embryonale Herz eine größere Glykogenspeicherkapazität im Vergleich zum adulten Herzen (Ostadal *et al.*, 1999).

In der Amnionflüssigkeit war ein um das zehnfach erniedrigter Wert an Glucose im Vergleich zum Blut über die gesamte Inkubationsperiode messbar (Diagramm 10). Es ist denkbar, dass das Amnionepithel keine spezifischen Transportmechanismen für die Glucose aufweist, da kein Bergauf-Transport in das Blut erfolgt.

5.2.5 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf Lactat

(Diagramm 11, Tabellen 31 - 32)

In der zweiten Inkubationshälfte, wenn das Wachstum des Embryos am stärksten ist, steigt auch der Energiebedarf. Gleichzeitig wird ab D12 der Hühnerembryo einem zunehmenden Sauerstoffmangel ausgesetzt, da die CAM physiologisch ihre größte Ausdehnung erreicht hat. Dem eintretenden Sauerstoffmangel kann der Embryo anfangs entgegenwirken, indem er den Blutfluss in der CAM oder die Kapillardichte in der Muskulatur erhöht (Snyder *et al.*, 1984). Eine weitere Möglichkeit der Anpassung an lang anhaltende Sauerstoffmangelzustände erfolgt auf zellulärer Ebene über die anaerobe Energiegewinnung (Mairböurl, 2000). Der Geflügelembryo stellt seine Energiegewinnung aber erst an D19 auf anaeroben Metabolismus um (Hoiby *et al.*, 1987). Hoiby *et al.* (1987) untersuchte Blut aus der A. umbilicalis und verglichen die Ergebnisse mit der Amnionflüssigkeit ab D14. Sie beobachtete, dass nach einem Plateau von D14 bis D18 ein Anstieg des Lactatgehaltes ab D19 bis zum Schlupf folgt. Die Lactatkonzentration in der Amnionflüssigkeit variierte wenig von D14 bis D19. In dieser Arbeit wurden ähnliche Beobachtungen zur Lactatkonzentrationen im Blut und in der Amnionflüssigkeit im gleichen Zeitraum (D14 - D19) gemacht. Die ermittelten Lactatkonzentrationen waren allerdings um das dreifache gegenüber denen von Hoiby *et al.* (1987) ermittelten Werten erhöht. Die höheren Werte erklären sich aus dem Ort der Probenentnahme. Während Hoiby *et al.* (1987) Blut aus der A. umbilicalis gewonnen hatte, wurde für diese Untersuchung das Blut aus der Chorioallantoisvene entnommen.

Auch im Zeitpunkt der Probenentnahme besteht ein Unterschied. Während für diese Untersuchung das Blut bereits am 12. Inkubationstag gewonnen wurde, ermittelten Hoiby *et al.* (1987) die Lactatkonzentration erst ab D14. An D12 wurde unter Kontrollbedingungen ein etwa doppelt so hoher Wert wie am darauf folgenden Untersuchungstag (D14) gemessen. Diese hohe Lactatkonzentration ist erklärbar mit der wachsenden Sauerstoffschuld durch das Erreichen der maximalen Ausbreitung der CAM sowie durch den entstehenden Sauerstoffmangel.

5.3 Auswirkungen der Inkubationsbedingungen auf morphologische Parameter (Embryonengewicht, Herzgewicht)

5.3.1 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf das Embryonengewicht

Die absoluten Körperfeuchtgewichte der Embryonen wurden an jedem Untersuchungstag in allen fünf Gruppen ermittelt. In allen Gruppen stiegen die die Körpermasse mit zunehmender Inkubationsdauer (Diagramm 12).

Während an den Inkubationstagen D10 und D12 keine bis nur geringe Unterschiede auftraten, stellten sich an D18 die größten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen dar.

In der zweiten Inkubationshälfte ist das embryonale Wachstum am stärksten. Für seine Entwicklung benötigt der Embryo zunehmend Energie und Sauerstoff. Die Energiezufuhr erfolgt aus dem energiereichen Dotter. Die Sauerstoffzufuhr zum Embryo erfolgt von der Außenwelt über die Eischale und die CAM. Es ergibt sich für den Embryo nach D12 (max. Ausdehnung der CAM) ein physiologischer Sauerstoffmangel. Diesem Minderangebot an Sauerstoff in der Inkubationsluft kann der Embryo bis zu einem gewissen Grad entgegenwirken. Die weitere Verringerung des Sauerstoffangebotes während des zweiten Inkubationsdrittels kann nicht mehr toleriert werden. Es kommt zu einem verminderten Körperwachstum. Unter starker Hypoxie verlagert sich die Verteilung des Energieverbrauchs von der Protein- und RNA/DNA-Synthese hin zur Erhaltung der Funktion der ATP-abhängigen Ionenpumpen. Dieses Phänomen wurde unter Anoxie an Zellen von Ratten und Schildkröten bestätigt (Lefebvre *et al.*, 1993).

Eine Verlagerung des Energieverbrauchs von der Protein- und RNA/DNA-Synthese hin zur den ATP-abhängigen Ionenpumpen würde im wachsenden Organismus zu einer verzögerten Entwicklung führen, die sich in geringeren Embryonenmassen manifestiert.

Eine weitere Erklärung bietet der geregelte Hypometabolismus. Es kommt bei milder Hypoxie zu einer hypometabolischen Reaktion mit vermindertem Sauerstoffverbrauch, die jedoch nicht linear dem Sauerstoffangebot folgt, sondern einen Regulationsmechanismus darstellt. Während dieser hypometabolischen Reaktion entsteht keine Sauerstoffschuld, also kein Sauerstoffmangel auf Gewebesebene. Die Umgebungstemperatur spielt bei dieser Anpassungsform eine ausschlaggebende Rolle. Bei niedriger Temperatur und wenig Sauerstoff kommt es an D11 zur Absenkung des Sauerstoffverbrauchs, der Körpertemperatur und des Stoffwechsels und damit zu weniger Gewichtszunahme (Stuhrberg, 2006).

Bei erhöhter Inkubationstemperatur fiel die Gewichtszunahme am geringsten aus. In Untersuchungen über die Entwicklung der Körpertemperatur bei Hühnerembryonen stellte Janke (2002) fest, dass es bereits vor dem letzten Inkubationsdrittels zu

thermoregulatorischen Änderungen in der Wärmeproduktion kommt. Zu diesem Zeitpunkt sind thermoregulatorische Anpassungen wahrscheinlich noch ineffektiv, zeigen aber im Zusammenspiel mit der Ausbildung des Thermoregulationssystems eine epigenetische Anpassung an die zu erwartende Umwelt. Die Thermoregulation erfordert ebenfalls energetischen Aufwand, so dass sich die Energiereserven weiter verringern und dem Körperwachstum nicht zur Verfügung stehen.

5.3.2 Einfluss der veränderten Inkubationsbedingungen auf das Herzgewicht

Auch die Herzgewichte stiegen mit zunehmendem Alter. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle traten in beiden wärmebehandelten Gruppen sowie in der SM-Gruppe an D20 auf. Die Herzgewichte weisen wie die Embryonengewichte an D10 und D12 geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen auf. Die größten Unterschiede bestanden an D18 im Vergleich zur Kontrolle.

Das höhere Herzgewicht in der SM-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ist erklärbar mit einer reaktiven Hyperplasie der Kardiomyozyten (Lange, 2005). In histologischen Untersuchungen von Herzmuskelgewebe fand Lange (2005) heraus, dass der Sauerstoffmangel in der Inkubationsluft Einfluss auf strukturelle Entwicklung bzw. Differenzierung der embryonalen Herzmuskulatur hat. So führte dieser Sauerstoffmangel im zweiten Inkubationsdrittel zu einer Zellzahlerhöhung der Herzmuskulatur und somit zu einer Massenzunahme (Lange, 2005).

Die Herzgewichtszunahme unter dem Einfluss einer erhöhten Temperatur im Vergleich zur Kontrollgruppe ist signifikant geringer. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den verringerten Körpermassen in dieser Versuchsgruppe.

Interessanterweise zeigte sich eine höhere Zunahme des Herzgewichtes gegenüber der Kontrolle in der Gruppe SM&HT. Hier scheint das erhöhte Herzgewicht mit der durch den Sauerstoffmangel induzierten reaktiven Hyperplasie der Kardiomyozyten erklärbar zu sein. Die Wachstumsantwort auf den Sauerstoffmangel ist stärker als auf die erhöhte Inkubationstemperatur.

Die Ergebnisse zur Embryo- und Herzmasse weisen letztendlich auf die Existenz des geregelten Hypometabolismus hin (Stuhrberg, 2006).

Das Ausmaß des hypometabolischen Effekts hängt von der Höhe des Sauerstoffmangels, dem Alter des Embryos und der Umgebungstemperatur ab. Die Langzeiteffekte sind eine Reduktion des Organwachstums und ein geringes Schlupfgewicht.

Der Vogelembryo kann also diese suboptimalen Inkubationsbedingungen mit einer geringeren Zunahme des Körpergewichtes und/oder Herzgewichtes überstehen. Hier ist anzunehmen, dass durch die unter dieser Bedingung zunehmende Herzfrequenz des

Embryos ausreichend Blut zum Gehirn und zu den anderen Organen gepumpt wird, so dass die gesteigerte Durchblutung die Sauerstoffversorgung sichert.

Insgesamt ist nach Diskussion aller Befunde festzustellen, dass zwischen Amnionflüssigkeit und Blutplasma unterschiedliche Konzentrationen der geprüften Parameter gemessen wurden. Unter Einfluss von chronischem bzw. akuten Sauerstoffmangel bzw. erhöhter Temperatur wurden Regulationen zwischen beiden Flüssigkeiten interpretiert, die auf einen Zusammenhang hinweisen und daher der Amnionflüssigkeit eine größere Bedeutung zukommt, als bisher angenommen.

6. Zusammenfassung

Einfluss von Sauerstoff und Temperatur auf die Zusammensetzung embryonaler Flüssigkeiten bei Gallus gallus domesticus

Der Einfluss von Sauerstoffmangel und/oder erhöhter Temperatur führt nachweislich im Vogelembryo der Rasse „White Leghorn“ zu Anpassungsmechanismen bezüglich der Morphologie und hormonaler Regulationen (Tönhardt *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Sauerstoffmangel und/oder erhöhter Temperatur im zweiten Inkubationsdrittel auf die Ionenzusammensetzung der Blut- und Amnionflüssigkeit von D10 bis D20 geprüft. Damit sollte ein Nachweis für das funktionelle Zusammenwirken der beiden Kompartimente bei der Anpassung an diese Stressoreinwirkung geleistet werden.

Die fertilen Eier der Rasse „White Leghorn“ wurden im Zeitraum von D6-D12 einem vermindertem Sauerstoffgehalt (chronisch; 15% O₂) **oder** einer erhöhten Temperatur (39,5°C), sowie von D8-D12 einem vermindertem Sauerstoffgehalt **und** einer erhöhten Temperatur (chronisch; 15% O₂ und 39,5°C) ausgesetzt. Ebenfalls geprüft wurde der Einfluss eines kurzfristigen Sauerstoffmangels (akut; 10% O₂ für 15 Minuten). Erfasst wurden sowohl in der Blut- als auch in der Amnionflüssigkeit ausgewählte Gasparameter (pH, pO₂, pCO₂, sO₂), Elektrolyte (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻) und Metabolite (Glucose, Lactat⁻) mittels Blut-Gas-Analyzer Radiometer Copenhagen ABL 605[®] sowie morphologische Daten (Herz- sowie Körpermassen).

Die geprüften Gasparameter stehen in enger Beziehung zum Alter der Embryonen. So fällt der pH-Wert im Blut und in der Amnionflüssigkeit mit zunehmender Inkubationsdauer ab. Einen altersabhängigen Abfall wies auch die Sauerstoffsättigung (sO₂) im Blut auf. Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) zeigte im Blut ebenfalls einen altersbedingten Abfall, im Vergleich dazu in der Amnionflüssigkeit einen altersabhängigen Anstieg. Der Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂) erhöhte sich im Blut und in der Amnionflüssigkeit. Diese unterschiedlichen Verläufe der geprüften Gasparameter weisen eindeutig auf die Eigenschaft der beiden Membranen (Epithel des Amnions und Endothel der Kapillare) hin, dass Transportprozesse zwischen den beiden Kompartimenten möglich sind und damit unterschiedliche Konzentrationen in beiden Kompartimenten aufrechterhalten werden.

Die erhöhte Temperatur (39,5°C) hatte an D10 bis D16 Auswirkungen sowohl auf den pCO₂ als auch auf den HCO₃⁻ im Blut im Vergleich zur physiologisch bebrüteten Kontrolle (37,5°C). Dies lässt auf eine Steigerung der Stoffwechselaktivität der Embryonen durch die Temperaturerhöhung schließen.

Temperaturerhöhung und langfristiger Sauerstoffmangel hatten dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Parameter. Dieser langfristige Einfluss hat Vorgänge eingeleitet, die auf eine Adaptation deuten. Lange (2005) fand eine Dickenzunahme des Septums, was auf erhöhte Herzarbeit schließen lässt.

Im Vergleich zur chronischen Beeinflussung führte kurzfristiger Sauerstoffmangel im Blut zu signifikanten Unterschieden des pH-Wertes (an allen Untersuchungstagen), des pO_2 (selektiv) und des Bikarbonatgehaltes (selektiv) im Vergleich zu den nicht behandelten Gruppen. Dies deutet darauf hin, dass die Einstellung dieser Werte nach Stressorwirkung sehr empfindlich geregelt wird.

Der pH-Wert im Blut wird unter allen Einflüssen zwischen 7,5 bis 7,6 gehalten, in der Amnionflüssigkeit zwischen 6,7 bis 6,9. Der altersabhängige Abfall im Blut und der vergleichbare Anstieg des pH-Wertes in der Amnionflüssigkeit zeigt eine Feinabstimmung in Abhängigkeit vom Alter.

Diese Konstanzhaltung in engen Grenzen, aber auf unterschiedlicher Höhe in beiden Flüssigkeiten, unterstützt die Aussage, dass beide Kompartimente unterschiedlich geregelt werden können.

Die untersuchten Elektrolyte stehen ebenfalls in enger Beziehung zum Alter der Embryonen. Veränderte Inkubationsbedingungen führten **innerhalb** einer Flüssigkeit an einzelnen Tagen zu signifikanten Veränderungen. **Zwischen** beiden Flüssigkeiten kommt es nach D12 zu signifikanten Beeinflussungen.

In der Amnionflüssigkeit stiegen die Konzentrationen an K^+ und Ca^{2+} mit zunehmender Inkubationsdauer (Auffangbecken im Zusammenhang mit dem Blut), die Konzentrationen an Na^+ , Cl^- und $Lactat^-$ fielen (Lieferung für das Blut).

Die Amnionflüssigkeit entspricht bezogen auf Na^+ , K^+ und HCO_3^- der intrazellulären und das Blut der extrazellulären Ionenkonzentrationen.

Die Konzentrationen an Glucose und Laktat unterscheiden sich zwischen Blut und Amnionflüssigkeit um das 30- bis 50fache. Die Glucose zeigte einen altersabhängigen Anstieg im Blut (D12=6,77 bis D20=10,82 mmol/l). In der Amnionflüssigkeit lag die Konzentration bei 0,2 mmol/l und blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant.

Hyperthermie führte bei der Glucose im Blut zu größten Abweichungen im Vergleich zur Kontrolle, Hyperthermie und Sauerstoffmangel dagegen hatten keine Abweichungen zur Folge.

Lactat zeigte einen altersabhängigen Abfall in beiden Flüssigkeiten. An allen Inkubationstagen zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach langfristigem Sauerstoffmangel.

Embryonen- und Herzgewicht stiegen mit zunehmendem Alter. Hyperthermie hatte zum Ende der Inkubation ein geringeres Körper- und Herzgewicht im Vergleich zur Kontrolle zur Folge. Hyperthermie und Sauerstoffmangel dagegen führten zu einem höheren Herzgewicht und hatten keinen Einfluss auf die Embryonengewichte.

Blut und Amnionflüssigkeit stehen in enger Verbindung über das Endothel der Gefäße und das Epithel des Amnions. Die Amnionflüssigkeit scheint Reservoir und Lieferant der geprüften Gase, Elektrolyte und Metabolite für den Stoffwechsel des Embryos unter physiologischen und belastenden Bedingungen zu sein.

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen bei Gasparametern, in der Konzentration der Elektrolyte und der Glucose im Blut und in der Amnionflüssigkeit gemessen, verursacht durch Alter, Temperatur und Sauerstoffmangel. Damit ist die Grundlage für veränderten hydrostatischen und (kolloid)osmotischen Druck gegeben. Diese Einflüsse können zu veränderter Elektrolyt- und damit Wasserbalance im Embryo führen. Im schnell wachsenden Masthähnchen kommt als weitere Komplikation die mangelhafte Kapillarisation der weißen Brustmuskulatur hinzu. Das Herz muss mit erhöhtem Druck arbeiten, was zu Links- und Rechts Herzinsuffizienz führen kann. Damit wäre zumindest teilweise das häufige Vorkommen der Ascites bei Mastgeflügel u.a. auch im Zusammenwirken des Blut- und Amnionkompartiments zu erklären.

7. Summary

Influence of oxygen and temperature on the composition of embryonic fluid in Gallus gallus domesticus

The influence of reduced oxygen and/or increased temperature leads to demonstrable adaptation mechanisms with respect to morphological structures and hormonal regulation in the chick embryo of the race of White Leghorn hens (Tönhardt *et al.* 1995). In the following work, the influence of oxygen deprivation and/or elevated temperature on the ion composition of the blood and amniotic fluid has been examined during the second third of the incubation period, i.e. days 10-20 (D10-D20). Thus, an evidence for the functional cooperation of the two compartments should be carried out with the adjustment to this exposure of stress.

Fertile eggs of the race of White Leghorn hens were treated during the embryonic period of D6-D12 with reduced oxygen (chronically; 15% O₂) **or** with increased temperature (39.5°C) and during the period D8-D12 with reduced oxygen **and** increased temperature (chronically; 15% O₂ and 39.5°C). Likewise, the effects of a short reduction in oxygen (acute; 10% O₂ for 15 min) was examined. We collected selected gas parameters, measured in the blood as well as in the amniotic fluid (pH, pO₂, pCO₂, sO₂), electrolytes (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻) and metabolite (glucose, lactate) by means of blood-gas-analyzer Radiometer Copenhagen ABL 605[®] as well as morphologic data (heart- and body weight).

The tested gas parameters are closely correlated with the age of the embryo. Thus, the pH value of the blood and in the amniotic fluid falls with increasing incubation time. An age-related decrease also occurs with respect to oxygen saturation (sO₂) in the blood. The partial pressure of the oxygen (pO₂) similarly drops, whereas this value shows an increase in the amniotic fluid. The partial pressure of carbon dioxide (pCO₂) rises in both the blood and amniotic fluid. These various changes in the tested gas parameters clearly indicate on the characteristic of the two membranes (epithelium of the amnion and endothelium of the capillary). The transportation processes between the two compartments are feasible and for this reason different concentrations in both compartments are sustained.

The increased temperature and chronic oxygen deprivation did not have significant influence on the measured parameters. This long-term treatment probably stimulates a regulatory mechanism, thereby indicating that adaptation has taken place. Lange (2005) found a thickness increase of the septum, which suggests increased heart work.

In comparison with the chronic effects, short-term oxygen deprivation in the blood leads to significant differences in pH values (on all examined days), in pO_2 (selective) and in bicarbonate levels (selective) from the control group. The maintenance of these values thus requires a longer adaptation. This points to the fact, that the attitude of these values is very sensitively regulated after influence of stress.

The pH value in the blood is kept between 7.5 to 7.6 under all influences, in the amniotic fluid between 6.7 to 6.9. The age-dependent decline in the blood and the comparable rise of the pH value in the amniotic fluid shows a fine adjustment as a function of the age. This stabilisation within narrow confines, but on different height in both liquids, supports the statement that both compartments can be differently regulated.

The tested gas parameters are closely correlated with the age of the embryo, too. Alterations in incubation conditions lead, on specific days, to clear changes within one fluid. Significant influences occur between the two fluids after D12.

In the amniotic fluid, the concentrations of K^+ and Ca^{2+} increase with incubation time (storage function in relation to the blood), whereas the concentrations of Na^+ , Cl^- and lactate fall (delivery to the blood).

The amniotic fluid conforms, related to Na^+ , K^+ and HCO_3^- , to the intracellular and the blood to the extracellular ion concentrations.

The measured metabolites glucose and lactate show great differences between the blood and amniotic fluid. Glucose rises age-dependently in the blood (D12=6.77, D20=10.82mmol/l). In the amniotic fluid, however, only a lower order of magnitude of glucose is measurable and this remains constant during the examined period (0.2mmol/l).

Hyperthermia leads with glucose to the largest deviations in the comparison with the control. Hyperthermia and oxygen deficiency did not show any variances.

Lactate exhibits an age-related fall in both fluids and is significantly affected on all examined days following long-term oxygen deprivation.

The weights of the embryo and heart increase with increasing age. A rise in incubation temperature caused a smaller body and heart weight at the end of the incubation in comparison to the control. Hyperthermia and oxygen deficiency did lead to a higher heart weight and had no influence on the embryo weights.

Blood and amniotic fluid are in close contact across the endothelium of the blood vessels and the amniotic epithelium. The amniotic fluid seems to be a reservoir and supplier for the examined gases, electrolytes and metabolites for the metabolism of the embryo under physiological and aggravating conditions. Different concentrations were measured in the concentration of the gas parameters, in the concentration of the electrolytes and glucose in the blood and in the amniotic fluid, caused by age, temperature and oxygen deficiency. Therefore the basis for changed hydrostatic and (colloid)osmotic pressure is given. These influences can lead to changed electrolyte and thus water balance in the embryo. For this reason you could at least partly explain the prevalent appearance of ascites in mast poultry, e.g. in the cooperation of the blood- and amnion compartment.

In fast growing mast broilers the unsatisfactory capillaryisation of the white breast musculature is added as a further complication. The heart has to work with increased pressure, which can lead to left- and/or right heart insufficiency.

8. Literaturverzeichnis

- ABRAMOVICI, A. (1966)
[Refractometric study of the allantoic and amniotic fluids of the chicken embryo during normal development].
C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **263**(4): S. 389-92
- ACKERMAN, R. A. und RAHN, H. (1981)
In vivo O₂ and water vapor permeability of the hen's eggshell during early development.
Respir Physiol **45**(1): S. 1-8
- ADOLPH, E. F. (1967)
Ontogeny of volume regulations in embryonic extracellular fluids.
Q Rev Biol **42**(1): S. 1-39
- AKINS, R. E. und TUAN, R. S. (1993)
Transepithelial calcium transport in the chick chorioallantoic membrane. I. Isolation and characterization of chorionic ectoderm cells.
J Cell Sci **105** (Pt 2): S. 369-79
- ALI, O. H. A.; E.A., A. und ELHADI, H. M. (2008)
Effect of Season on the Immunity of Newly Hatched Broiler Chicks Reared in Arid-Hot Climate.
Pak J Biol Sci **11**(2): S. 318-320
- BAGGOTT, G. K. (2001)
Development of extra-embryonic membranes and fluid compartments In:
Perspectives in Fertilisation and Embryonic Development in Poultry. G.K. Baggot, M.K. Bakst, R. Bellairs, V.L. Christensen, G.M. Fasenko und J.M. StarkM: Tatite Conference Books
- BARTLETT, G. R. und BORGESE, T. A. (1976)
Phosphate compounds in red cells of the chicken and duck embryo and hatchling.
Comp Biochem Physiol A **55**(3): S. 207-10
- BAUMANN, R. und MEUER, H. J. (1992)
Blood oxygen transport in the early avian embryo.
Physiol Rev **72**(4): S. 941-65
- BAUMANN, R.; PADEKEN, S. und HALLER, E. A. (1982)
Functional properties of embryonic chicken hemoglobins.
J Appl Physiol **53**(6): S. 1439-48
- BAUMANN, R.; PADEKEN, S.; HALLER, E. A. und BRILMAYER, T. (1983)
Effects of hypoxia on oxygen affinity, hemoglobin pattern, and blood volume of early chicken embryos.
Am J Physiol **244**(5): S. R733-41

- BAUTZMANN, H. (1953)
[Comments on the phase phenomenon in development of earliest vertebrates.].
Acta Med Scand Suppl **278**: S. 131-4
- BAUTZMANN, H. und SCHMIDT, W. (1960)
[Comparative electron microscopic studies on the amnion of Sauropsida and Mammalia (chicken, cat, man).].
Z Zellforsch Mikrosk Anat **51**: S. 571-88
- BAUTZMANN, H. und SCHRODER, R. (1953)
[Studies on the functional histology and histogenesis of the amnion in chickens and man.].
Z Anat Entwicklungsgesch **117**(3): S. 166-214
- BELLAIRS, R. und OSMOND, M. (1998)
The Atlas of Chick Development.
Academic Press, San Diego, London (ISBN 0-12-084790-6)
- BLASIUS, H. (2006)
Versuche zur elektrophysiologischen Charakterisierung des Amnions von Hühnerembryonen (*Gallus gallus f. domestica*) mit Hilfe der Ussing-Kammer-Methode.
Diss FU Berlin, Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin
- BOOTH, D. T. und RAHN, H. (1991)
Effect of periodic egg cooling during incubation.
In: Avian incubation. S.G. Tullet, e. B.-H. Ltd. Surrey, UK
- BORGESE, N. und MELDOLESI, J. (1976)
Immunological similarity of the NADH-cytochrome c electron transport system in microsomes, Golgi complex and mitochondrial outer membrane of rat liver cells.
FEBS Lett **63**(2): S. 231-4
- BOUTILIER, R. G.; GIBSON, M. A.; TOEWS, D. P. und ANDERSON, W. (1977)
Gas exchange and acid-base regulation in the blood and extraembryonic fluids of the developing chicken embryo.
Respir Physiol **31**(1): S. 81-9
- BOWERS, C. W. und DAHM, L. M. (1992)
Extracellular matrix regulates smooth muscle responses to substance P.
Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): S. 8130-4
- BRAGULLA, H. (2004)
Skript zur Vorlesung Embryologie.
- BROWN, J. L. und INGRAM, V. M. (1974)
Structural studies on chick embryonic hemoglobins.
J Biol Chem **249**(12): S. 3960-72
- BRUNS, G. A. und INGRAM, V. M. (1973)
The erythroid cells and haemoglobins of the chick embryo.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **266**(877): S. 225-305

- BURGGREN, W. (1999)
Genetic, environmental and maternal influences on embryonic cardiac rhythms.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **124**(4): S. 423-7
- BURTON, F. G. und TULLET, S. G. (1985)
Respiration of avian embryo.
Comp. Biochem. Physiol. **82A**: S. 735-744
- CIROTTA, C. und ARANGI, I. (1989)
Chick embryo survival under acute carbon monoxide challenges.
Comp Biochem Physiol A **94**(1): S. 117-23
- CIROTTA, C.; SCOTTO DI TELLA, A. und GERACI, G. (1975)
The hemoglobins of the developing chicken embryos. Fractionation and globin composition of the individual component of total erythrocytes and of a single erythrocyte type.
Cell Differ **4**(2): S. 87-99
- CROOKS, R. J. und SIMKISS, K. (1975)
Calcium transport by the chick chorioallantois in vivo.
Q J Exp Physiol Cogn Med Sci **60**(1): S. 55-63
- DAWES, C. M. und SIMKISS, K. (1969)
The acid-base status of the blood of the developing chick embryo.
J Exp Biol **50**: S. 79-86
- DAWES, C. M. und SIMKISS, K. (1971)
The Effects of Respiratory Acidosis in the Chick Embryo.
J Exp Biol **55**: S. 77-84
- DECKER, S. (2002)
Der langfristige Einfluss eines verminderten Sauerstoffangebotes während der Inkubation auf Katecholamine, Stoffwechselmetabolite sowie Hämatokrit und Hämoglobin im Blut von Hühner- und Entenembryonen.
Diss FU Berlin, Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin
- DRAGON, S. und BAUMANN, R. (2003)
Hypoxia, hormones, and red blood cell function in chick embryos.
News Physiol Sci **18**: S. 77-82
- DZIALOWSKI, E. M.; VON PLETTENBERG, D.; ELMONOUFY, N. A. und BURGGREN, W. (2002)
Chronic hypoxia alters the physiological and morphological trajectories of developing chicken embryos.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **131**(4): S. 713-24
- ENGELHARDT, G. und LENDLE, L. (1955)
Serum-anaphylaktische Reaktionen an nervenfreien Hühneramnion.
Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol **255**(5): S. 402-420
- EPPLE, A. (1997)
Stress Responses in Avian Embryos.
Amer. Zool., **37**: S. 536-545

- FABER, J. J.; GAULT, C. F.; GREEN, T. J.; LONG, L. R. und THORNBURG, K. L. (1973)
Chloride and the generation of amniotic fluid in the early embryo.
J Exp Zool **183**(3): S. 343-52
- FREEMAN, B. M. und VINCE, M. A. (1974)
Development of the Avian Embryo: Chapman & Hall, London- ISBN:0-412-11520-4
- FRENCH, N. A. (1997)
Modeling incubation temperature: the effects of incubator design, embryonic development, and egg size.
Poult Sci **76**(1): S. 124-33
- GIBSON, J. S.; MILNER, P. I.; WHITE, R.; FAIRFAX, T. P. und WILKINS, R. J. (2008)
Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis.
Pflugers Arch **455**(4): S. 563-73
- GILL, T. S.; PORTA, S.; NIBBIO, B. und EPPLE, A. (1994)
Sulfate conjugates of catecholamines in the allantoic fluid of the chicken embryo.
Gen Comp Endocrinol **96**(2): S. 255-8
- GRABOWSKI, C. T. (1963)
Teratogenic Significance of Ionic and Fluid Imbalances.
Science **142**: S. 1064-5
- HAMBURGER, V. und HAMILTON, H. L. (1951)
A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo.
Journal of Morphology **88**(1): S. 49-98
- HARSCH, M. und GREEN, J. W. (1963)
Electrolyte Analyses of Chick Embryonic Fluids and Heart Tissues.
J Cell Physiol **62**: S. 319-26
- HIRUMA, T. (1996)
Formation of the ocular arteries in the chick embryo: observations of corrosion casts by scanning electron microscopy.
Anat Embryol (Berl) **193**(6): S. 585-92
- HOIBY, M.; AULIE, A. und BJONNES, P. O. (1987)
Anaerobic metabolism in fowl embryos during normal incubation.
Comp Biochem Physiol A **86**(1): S. 91-4
- HOLLAND, S. (1998)
Untersuchungen zum Einfluss der Umgebungstemperatur auf Herzfrequenz, Atemfrequenz, periphere Durchblutung und Temperatur bei Vogelembryonen.
Diss FU Berlin, Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin
- HOWARD, E. (1957)
Ontogenic changes in the freezing point and sodium and potassium content of the subgerminal fluid and blood plasma of the chick embryo.

- HÜHNKE, A. (2003)
Der Einfluss von Sauerstoffmangel in der Inkubationsluft auf den Blut-Gas-Status und morphologische Parameter von Hühnerembryonen (*Gallus gallus f. domestica*).
Diss FU Berlin, Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin
- HÜHNKE, A. und TÖNHARDT, H. (2004)
Oxygen deficiency and blood-gas-status in the chorioallantoic vein in chicken embryo (*Gallus gallus f. domestica*).
Avian and Poultry Biology reviews **15**((3/4)): S. 132-136
- ISAACKS, R. E.; HARKNESS, D. R.; ADLER, J. L. und GOLDMAN, P. H. (1976)
Studies on avian erythrocyte metabolism. Effect of organic phosphates on oxygen affinity of embryonic and adult-type hemoglobins of the chick embryo.
Arch Biochem Biophys **173**(1): S. 114-20
- IVNITSKI-STEELE, I. D.; SANCHEZ, A. und WALKER, M. K. (2004)
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin reduces myocardial hypoxia and vascular endothelial growth factor expression during chick embryo development.
Birth Defects Res A Clin Mol Teratol **70**(2): S. 51-8
- JANKE, O.; TZSCHENTKE, B.; HOCHERL, J. und NICHELMANN, M. (2002)
Metabolic responses of chicken and muscovy duck embryos to high incubation temperatures.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **131**(4): S. 741-50
- KEIBEL, F. (1906)
Embryonale Entwicklung der Vögel
- KEIBEL, F. und ABRAHAM, K. (1900)
Normentafel zur Entwicklungsgeschichte des Huhnes (*Gallus domesticus*).
Gustav Fischer Verlag Jena
- KLEMM, C. (2002)
Bestimmung von Catecholaminen, Cortisol, 2,3-Diphosphoglycerat und Glucose im Blut von Entenembryonen (*Cairina moschata*) unter dem Einfluss verschiedener Inkubationstemperaturen sowie unter Berücksichtigung der Lage und des internal pipping der Embryonen.
Diss FU-Berlin
- KÜHNEL, W. (1961)
Morphologische und Experimentelle Untersuchungen an der Allantois des Hühnchens.
Z Zellforsch **54**: S. 807-830
- LANGE, S. (2005)
Auswirkung eines reduzierten Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft auf die Entwicklung des Herzmuskelgewebes im Hühnerembryo (*Gallus gallus f. domestica*) - eine lichtmikroskopische, immunhistochemische und morphometrische Studie.
Diss FU Berlin, Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin

- LEFEBVRE, V. H.; VAN STEENBRUGGE, M.; BECKERS, V.; ROBERFROID, M. und BUC-CALDERON, P. (1993)
Adenine nucleotides and inhibition of protein synthesis in isolated hepatocytes incubated under different pO₂ levels.
Arch Biochem Biophys **304**(2): S. 322-31
- MAIRBÄURL, H. (2000)
Höhenakklimatisation.
Dtsch Z Sportmed **51**(12): S. 390-395
- MCCUTCHEON, I. E.; METCALFE, J.; METZENBERG, A. B. und T., E. (1982)
Organ growth in hyperoxic and hypoxic chick embryos.
Respir. Physiol. **50**: S. 153-163
- MELLOR, D. J. (1970)
Distribution of ions and electrical potential differences between mother and foetus at different gestational ages in goats and sheep.
J Physiol **207**(1): S. 133-50
- MICHIELS, C. (2004)
Physiological and pathological responses to hypoxia.
Am J Pathol **164**(6): S. 1875-82
- MULDER, A. L.; GOLDE, J. M.; GOOR, A. A.; GIUSSANI, D. A. und BLANCO, C. E. (2000)
Developmental changes in plasma catecholamine concentrations during normoxia and acute hypoxia in the chick embryo.
J Physiol **527 Pt 3**: S. 593-9
- MULLER, G. B. (2003)
Embryonic motility: environmental influences and evolutionary innovation.
Evol Dev **5**(1): S. 56-60
- MURPHY, M. J. (1997)
Endocrine Control of Hydromineral Balance in Bird Embryos.
American Zoologist **37**: S. 546-552
- NECHAEVA, M. B.; TÖNHARDT, H.; MARQUARDT, D. und HÜHNKE, A. (2008)
Effect of acute hypoxia during chick embryogenesis on amniotic fluid gases and catecholamines.
in press
- NECHAEVA, M. V.; TÖNHARDT, H.; HÜHNKE, A.; MAKARENKO, I. G. und TURPAEV, T. M. (2004)
Effects of some Environmental Factors on the Amnion Rhythmic contractions in Chick Embryogenesis.
Avian and Poultry Biology Reviews **15**(3/4): S. 137-144
- NECHAEVA, M. V. und TURPAEV, T. M. (1992)
[The motor activity of the chick embryo amnion in the late stages of development. The role of serotonin and noradrenaline].
Zh Obshch Biol **53**(5): S. 750-6

- NECHAEVA, M. V. und TURPAEV, T. M. (2002)
Rhythmic contractions in chick amnio-yolk sac and snake amnion during embryogenesis.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **131**(4): S. 861-70
- OSTADAL, B.; OSTADALOVA, I. und DHALLA, N. S. (1999)
Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects.
Physiol Rev **79**(3): S. 635-59
- PAGNELLI, C. A. (1980)
The Physics of Gas Exchange Across the Avian Eggshell1.
Amer. Zool., **20**: S. 329-338
- PATTEN, B. M. (1957)
Early Embryology of the Chick.
New York, McGraw-Hill Book Company
- PIECHOTTA, R.; MILAKOFSKY, L.; NIBBIO, B.; HARE, T. und EPPLER, A. (1998)
Impact of exogenous amino acids on endogenous amino compounds in the fluid compartments of the chicken embryo.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **120**(2): S. 325-37
- PIERCE, M. E. (1933)
The amnion of the chick as independent effector.
J Exp Zool **65**: S. 443-473
- PIIPER, J.; TAZAWA, H.; AR, A. und RAHN, H. (1980)
Analysis of chorioallantoic gas exchange in the chick embryo.
Respir Physiol **39**(3): S. 273-84
- PILKIS, S. J. und GRANNER, D. K. (1992)
Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis.
Annu Rev Physiol **54**: S. 885-909
- PLENDL, J.; HIRSCHBERG, R. M. und HÜNIGEN, H. (2002)
Mechanismen der vaskulären Entwicklung und Regression.
Tierärztl Prax Ausg K **30**: S. 243-253
- RAHN, H.; AR, A. und PAGANELLI, C. (1979)
How bird eggs breathe.
Sci. Am. **240**: S. 38-47
- RAHN, H.; CAREY, C.; BALMAS, K.; BHATIA, B. und PAGANELLI, C. (1977)
Reduction of pore area of the avian eggshell as an adaptation to altitude.
Proc Natl Acad Sci U S A **74**(7): S. 3095-3098
- RISAU, W. (1993)
Development of the vascular system of the organs and tissues. In: J Shaper, W Shaper (Eds.) "Collateral circulations".
Kluwer Academic Publisher: S. Pp. 17-23

- ROMANOFF, A. L. (1960)
The Avian Embryo - Structural and Functional Development.
THE Macimillan Company, New York
- ROMANOFF, A. L. (1967)
Biochemistry of the Avian Embryo.
THE Macimillan Company, New York
- ROMANOFF, A. L.; SMITH, L. L. und SULLIVAN, R. A. (1938)
Biochemistry and biophysics of the developing hen's egg. III. Influence of temperature.
Cornell Univ. Exp. Sta. Memoir 216
- RUIJTENBEEK, K.; LE NOBLE, F. A.; JANSSEN, G. M.; KESSELS, C. G.; FAZZI, G. E.; BLANCO, C. E. und DE MEY, J. G. (2000)
Chronic hypoxia stimulates periarterial sympathetic nerve development in chicken embryo.
Circulation **102**(23): S. 2892-7
- SCHALEKAMP, M.; VAN GOOR, D. und SLINGERLAND, R. (1972)
Expression of multiple genes in the developmental pattern of the chicken hemoglobins.
Acta Morphol Neerl Scand **10**(4): S. 387
- SCHMIDT, R. F. und THEWS, G. (1997)
Physiologie des Menschen
Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokyo: Springer Verlag
- SIMKISS, K. (1980)
Water and Ionic Fluxes Inside the Egg.
Amer. Zool., **20**: S. 385-393
- SMITH, A. H.; BURTON, R. R. und BESCH, E. L. (1969)
Development of the chick embryo at high altitude.
Fed Proc **28**(3): S. 1092-8
- SMOCZKIEWICZOWA, A. (1959)
Sodium, potassium, calcium and chloride ion contents and protein fractions in the fluids of chick embryos.
Nature **183**(4670): S. 1260-1
- SNYDER, G. K.; BYERS, R. L. und KAYAR, S. R. (1984)
Effects of hypoxia on tissue capillarity in geese.
Respir Physiol **58**(2): S. 151-60
- STARCK, J. und RICKLEFS, R. (1998)
Avian Growth and Development.
Oxford Univ. Press **8**: S. 42-46
- STEVENS, L. (1996)
Avian Biochemistry and Molecular Biology: Cambridge, University Press

- STOCK, M. K. und METCALFE, J. (1987)
Modulation of growth and metabolism of the chick embryo by a brief (72-hr) change in oxygen availability.
J Exp Zool Suppl **1**: S. 351-6
- STRYER, L. (2003)
Biochemie. Heidelberg, Berlin, Oxford; Spektrum Akademischer Verlag
- STUHRBERG, V.-U. (2006)
Metabolische Antworten von Vogelembryonen auf vermindertes Sauerstoffangebot während der Inkubation: Diss FU Berlin, Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin- ISBN:978-3-86664-105-1
- TAZAWA, H.; MIKAMI, T. und YOSHIMOTO, C. (1971)
Respiratory properties of chicken embryonic blood during development.
Respir Physiol **13**(2): S. 160-70
- TAZAWA, H. und MOCHIZUKI, M. (1977)
Oxygen analyses of chicken embryo blood.
Respir Physiol **31**(2): S. 203-15
- TAZAWA, H. und RAHN, H. (1986)
Tolerance of chick embryos to low temperatures in reference to the heart rate.
Comp Biochem Physiol A **85**(3): S. 531-4
- TEN BUSCH, M.; MILAKOFSKY, L.; HARE, T.; NIBBIO, B. und EPPLE, A. (1997a)
Impact of ethanol stress on components of the allantoic fluid of the chicken embryo.
Comp Biochem Physiol A Physiol **116**(2): S. 125-9
- TEN BUSCH, M.; MILAKOFSKY, L.; HARE, T.; NIBBIO, B. und EPPLE, A. (1997b)
Regulation of substances in allantoic and amniotic fluid of the chicken embryo.
Comp Biochem Physiol A Physiol **116**(2): S. 131-6
- TOMASCHEK, E. (1997)
Der Einfluss einer kurzzeitigen Hypothermie auf die Catecholaminkonzentration in Körperflüssigkeiten von Hühnerembryonen verschiedenen Alters.
Diss FU Berlin, Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin
- TÖNHARDT, H.; BOHNENWANGER, C.; GEILE, E. und TOMASCHEK, E. (1995)
Zur Funktion der Catecholamine und Glucocorticoide während der Entwicklung des Hühnerembryos.
In: Prae-, peri- and postnatal processes of adaptation: S. Frankfurt/Main. 3-12
- TULLETT, S. G. und BURTON, F. G. (1985)
The effects of eggshell porosity on blood-gas and acid-base status of domestic fowl embryos within eggs of the same weight.
Comp Biochem Physiol A **81**(1): S. 137-42
- TZSCHENTKE, B. und BASTA, D. (2000)
Development of hypothalamic thermosensitivity during the perinatal period.
J. therm. Biol. **25**: S. 119-123

- VAN GOLDE, J.; MULDER, T.; V STRAATEN, H. und BLANCO, C. E. (1996)
The chorioallantoic artery blood flow of the chick embryo from stage 34 to 43.
Pediatr Res **40**(6): S. 867-71
- VON BLUMRODER, D. und TONHARDT, H. (2002)
Influence of long-term changes in incubation temperature on catecholamine levels in
plasma of chicken embryos (*Gallus gallus f. domestica*).
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **131**(4): S. 701-11
- WALKER, P. A. (1943)
Physical Properties of the Allantoic and Amniotic Fluids of the Chick III. Surface
tension.
J Gen Physiol: S. 29-36
- WANGENSTEEN, O. D. und RAHN, H. (1970)
Respiratory gas exchange by the avian embryo.
Respir Physiol **11**(1): S. 31-45
- WANGENSTEEN, O. D.; WILSON, D. und RAHN, H. (1970)
Diffusion of gases across the shell of the hen's egg.
Respir Physiol **11**(1): S. 16-30
- WIESNER, E. und RIBBECK, R. (1999)
Lexikon der Veterinärmedizin.
Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart
- WINAR, A. (2006)
Vergleichende Untersuchungen thermoregulatorischer Prozesse bei Moschusenten-
und Hühnerembryonen mit unterschiedlicher pränataler Temperaturerfahrung.
Diss FU Berlin, Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin
- WU, K.-C.; STREICHER, J.; LEE, M.-L.; B.-K., H. und MULLER, G.-B. (2001)
Role of motility in embryonic development I: Embryo movements and amnion
contractions in the chick and the influence of illumination.
J Exp Zool **291**(2): S. 186-194

9. Anhang -1- Tabellen

Tabelle 35: Medianwerte des pH in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	pH im Blut	pH im Amnion
D10	K	n.e.	6,86
	SM	n.e.	6,79
	HT	n.e.	6,54
	SM&HT	n.e.	6,58
	kSM	n.e.	6,84
D12	K	7,70	6,76
	SM	7,51	6,59
	HT	7,39	6,37
	SM&HT	7,51	6,45
	kSM	7,37	6,66
D14	K	7,60	6,69
	SM	7,60	6,73
	HT	7,61	6,70
	SM&HT	7,61	6,78
	kSM	7,43	6,64
D16	K	7,54	6,71
	SM	7,47	6,69
	HT	7,58	6,71
	SM&HT	7,51	6,76
	kSM	7,42	6,63
D18	K	7,52	6,90
	SM	7,51	6,91
	HT	7,59	7,00
	SM&HT	7,49	6,97
	kSM	7,39	6,82
D20	K	7,53	n.e.
	SM	7,49	n.e.
	HT	7,51	n.e.
	SM&HT	7,30	n.e.
	kSM	7,38	n.e.

Tabelle 36: Medianwerte des pO₂ in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	[pO ₂] im Blut [kPa]	[pO ₂] im Amnion [kPa]
D10	K	n.e.	7,30
	SM	n.e.	8,18
	HT	n.e.	7,67
	SM&HT	n.e.	8,51
	kSM	n.e.	6,24
D12	K	14,81	7,19
	SM	12,31	7,15
	HT	17,17	7,37
	SM&HT	11,99	7,03
	kSM	9,01	6,37
D14	K	11,27	7,29
	SM	11,62	6,85
	HT	11,19	7,56
	SM&HT	12,73	7,80
	kSM	10,01	6,47
D16	K	9,37	6,76
	SM	10,13	7,13
	HT	9,08	8,23
	SM&HT	10,03	7,27
	kSM	8,37	7,81
D18	K	8,00	8,13
	SM	9,18	7,69
	HT	8,96	10,40
	SM&HT	5,88	8,64
	kSM	5,09	7,33
D20	K	6,93	n.e.
	SM	5,28	n.e.
	HT	5,37	n.e.
	SM&HT	3,17	n.e.
	kSM	4,24	n.e.

Tabelle 37: Medianwerte des pCO₂ in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	[pCO₂] im Blut [kPa]	[pCO₂] im Amnion [kPa]
D10	K	n.e.	2,53
	SM	n.e.	2,20
	HT	n.e.	2,98
	SM&HT	n.e.	2,12
	kSM	n.e.	2,93
D12	K	1,85	3,14
	SM	2,15	3,01
	HT	2,67	2,81
	SM&HT	1,75	3,13
	kSM	2,98	3,60
D14	K	2,89	4,64
	SM	2,96	4,33
	HT	2,52	4,56
	SM&HT	2,92	5,01
	kSM	3,35	4,97
D16	K	4,31	5,85
	SM	5,11	6,12
	HT	3,51	5,35
	SM&HT	4,73	6,09
	kSM	4,67	6,37
D18	K	4,69	6,27
	SM	4,95	6,47
	HT	3,08	5,02
	SM&HT	5,09	6,03
	kSM	5,35	6,53
D20	K	4,35	n.e.
	SM	4,61	n.e.
	HT	4,96	n.e.
	SM&HT	6,63	n.e.
	kSM	5,99	n.e.

Tabelle 38: Medianwerte des HCO_3^- in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	$[\text{HCO}_3^-]$ im Blut [mmol]	$[\text{HCO}_3^-]$ im Amnion [mmol]
D10	K	n.e.	3,20
	SM	n.e.	2,35
	HT	n.e.	1,60
	SM&HT	n.e.	1,60
	kSM	n.e.	3,25
D12	K	13,00	3,10
	SM	12,90	2,00
	HT	12,90	1,20
	SM&HT	11,00	1,60
	kSM	13,10	2,85
D14	K	20,40	4,50
	SM	22,30	4,50
	HT	20,80	3,50
	SM&HT	22,00	4,90
	kSM	16,30	3,70
D16	K	28,00	4,95
	SM	28,65	4,90
	HT	27,10	4,45
	SM&HT	28,45	6,10
	kSM	23,70	4,90
D18	K	28,85	8,65
	SM	28,05	10,05
	HT	23,65	9,00
	SM&HT	28,60	9,60
	kSM	23,45	7,40
D20	K	27,10	n.e.
	SM	28,00	n.e.
	HT	25,30	n.e.
	SM&HT	26,90	n.e.
	kSM	25,70	n.e.

Tabelle 39: Medianwerte des sO₂ in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	sO ₂ im Blut [%]	sO ₂ im Amnion [%]
D10	K	n.e.	70,10
	SM	n.e.	55,25
	HT	n.e.	54,10
	SM&HT	n.e.	55,70
	kSM	n.e.	48,25
D12	K	98,50	59,70
	SM	97,60	29,75
	HT	98,40	30,10
	SM&HT	97,65	28,70
	kSM	92,40	47,15
D14	K	97,50	49,75
	SM	97,40	58,60
	HT	97,20	52,65
	SM&HT	98,20	63,50
	kSM	94,85	54,00
D16	K	94,45	44,80
	SM	95,35	44,50
	HT	95,05	53,60
	SM&HT	93,60	49,60
	kSM	91,30	48,10
D18	K	92,60	70,80
	SM	93,25	67,25
	HT	95,55	86,50
	SM&HT	77,90	77,10
	kSM	68,20	54,80
D20	K	89,60	n.e.
	SM	79,60	n.e.
	HT	80,80	n.e.
	SM&HT	42,80	n.e.
	kSM	60,05	n.e.

Tabelle 40: Medianwerte der Kaliumkonzentration in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	[K ⁺] im Blut [mmol/l]	[K ⁺] im Amnion [mmol/l]
D10	K	n.e.	3,10
	SM	n.e.	3,10
	HT	n.e.	3,70
	SM&HT	n.e.	3,80
	kSM	n.e.	3,30
D12	K	6,45	3,70
	SM	4,00	3,80
	HT	5,60	4,45
	SM&HT	4,20	3,80
	kSM	5,20	3,90
D14	K	4,70	26,35
	SM	4,40	28,30
	HT	4,80	27,20
	SM&HT	4,20	26,40
	kSM	4,70	11,10
D16	K	4,75	33,65
	SM	5,40	30,70
	HT	5,70	28,60
	SM&HT	4,90	26,40
	kSM	5,50	30,10
D18	K	6,40	23,25
	SM	4,50	23,75
	HT	6,20	20,50
	SM&HT	4,80	21,20
	kSM	7,00	24,20
D20	K	5,40	n.e.
	SM	4,80	n.e.
	HT	8,00	n.e.
	SM&HT	5,85	n.e.
	kSM	6,20	n.e.

Tabelle 41: Medianwerte der Natriumkonzentration in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	[Na ⁺] im Blut [mmol/l]	[Na ⁺] im Amnion [mmol/l]
D10	K	n.e.	132,0
	SM	n.e.	130,0
	HT	n.e.	130,0
	SM&HT	n.e.	128,5
	kSM	n.e.	129,0
D12	K	125,5	132,0
	SM	123,0	132,0
	HT	121,0	127,0
	SM&HT	126,0	129,0
	kSM	122,0	133,0
D14	K	126,0	117,0
	SM	128,0	115,0
	HT	125,0	115,0
	SM&HT	127,0	119,0
	kSM	124,0	125,0
D16	K	127,0	110,0
	SM	125,5	113,0
	HT	124,0	115,0
	SM&HT	125,0	119,0
	kSM	127,0	115,0
D18	K	125,0	118,0
	SM	128,0	121,0
	HT	124,5	119,0
	SM&HT	127,0	119,0
	kSM	126,0	119,0
D20	K	123,0	n.e.
	SM	125,0	n.e.
	HT	120,0	n.e.
	SM&HT	126,0	n.e.
	kSM	127,0	n.e.

Tabelle 42: Medianwerte der Chloridkonzentration in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	[Cl ⁻] im Blut [mmol/l]	[Cl ⁻] im Amnion [mmol/l]
D10	K	n.e.	130,0
	SM	n.e.	130,0
	HT	n.e.	135,0
	SM&HT	n.e.	134,0
	kSM	n.e.	128,0
D12	K	124,0	133,0
	SM	106,0	134,0
	HT	105,0	133,0
	SM&HT	102,0	136,0
	kSM	98,0	133,0
D14	K	94,0	109,0
	SM	97,0	107,0
	HT	99,0	112,0
	SM&HT	99,0	114,0
	kSM	100,0	132,0
D16	K	95,0	103,0
	SM	94,0	99,0
	HT	92,0	106,5
	SM&HT	94,0	105,0
	kSM	97,0	106,0
D18	K	91,0	118,0
	SM	89,0	113,0
	HT	92,0	111,0
	SM&HT	90,0	118,0
	kSM	93,5	111,0
D20	K	91,0	n.e.
	SM	92,0	n.e.
	HT	91,0	n.e.
	SM&HT	93,5	n.e.
	kSM	95,0	n.e.

Tabelle 43: Medianwerte der Kalziumkonzentration in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	[Ca ²⁺] im Blut [mmol/l]	[Ca ²⁺] im Amnion [mmol/l]
D10	K	n.e.	0,86
	SM	n.e.	0,66
	HT	n.e.	0,74
	SM&HT	n.e.	0,71
	kSM	n.e.	0,91
D12	K	1,05	1,03
	SM	1,59	1,04
	HT	1,61	1,03
	SM&HT	1,58	1,07
	kSM	1,48	1,03
D14	K	1,57	2,16
	SM	1,22	2,98
	HT	1,68	1,67
	SM&HT	1,64	1,68
	kSM	1,63	1,54
D16	K	1,59	2,07
	SM	1,64	1,81
	HT	1,41	1,78
	SM&HT	1,74	2,09
	kSM	1,66	1,97
D18	K	1,61	1,49
	SM	1,68	1,69
	HT	1,66	1,94
	SM&HT	1,59	1,42
	kSM	1,60	1,62
D20	K	1,50	n.e.
	SM	1,58	n.e.
	HT	1,60	n.e.
	SM&HT	1,61	n.e.
	kSM	1,34	n.e.

Tabelle 44: Medianwerte der Glucosekonzentration in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	Glucose im Blut [mmol/l]	Glucose im Amnion [mmol/l]
D10	K	n.e.	0,11
	SM	n.e.	0,11
	HT	n.e.	0,06
	SM&HT	n.e.	0,14
	kSM	n.e.	0,39
D12	K	6,77	0,00
	SM	7,88	0,00
	HT	7,05	0,06
	SM&HT	7,33	0,03
	kSM	6,38	0,00
D14	K	8,69	0,00
	SM	8,38	0,00
	HT	7,91	0,00
	SM&HT	8,10	0,00
	kSM	7,38	0,00
D16	K	8,77	0,00
	SM	9,07	0,00
	HT	9,05	0,00
	SM&HT	9,27	0,00
	kSM	8,82	0,00
D18	K	9,99	0,06
	SM	8,88	0,00
	HT	7,91	0,06
	SM&HT	9,88	0,00
	kSM	8,77	0,00
D20	K	10,82	n.e.
	SM	10,93	n.e.
	HT	9,77	n.e.
	SM&HT	10,41	n.e.
	kSM	9,99	n.e.

Tabelle 45: Medianwerte der Lactatkonzentrationen in Blut und Amnionflüssigkeit

Tag	Gruppe	[Lactat] im Blut [mmol/l]	[Lactat] im Amnion [mmol/l]
D10	K	n.e.	0,70
	SM	n.e.	0,80
	HT	n.e.	0,40
	SM&HT	n.e.	0,90
	kSM	n.e.	0,50
D12	K	2,70	0,40
	SM	6,30	0,80
	HT	4,40	0,10
	SM&HT	3,90	0,40
	kSM	7,20	0,45
D14	K	1,55	0,10
	SM	1,30	0,15
	HT	2,20	0,20
	SM&HT	1,10	0,10
	kSM	4,90	0,20
D16	K	1,60	0,05
	SM	2,10	0,10
	HT	1,80	0,10
	SM&HT	1,80	0,10
	kSM	2,90	0,10
D18	K	1,30	0,00
	SM	1,30	0,05
	HT	1,10	0,00
	SM&HT	1,80	0,10
	kSM	5,40	0,20
D20	K	2,20	n.e.
	SM	2,40	n.e.
	HT	2,80	n.e.
	SM&HT	2,40	n.e.
	kSM	5,00	n.e.

Tabelle 46: Medianwerte der Embryonen- und Herzgewichte

Tag	Gruppe	Embryonengewicht [Gramm]	Herzgewicht [Gramm]
D10	K	2,13	0,0175
	SM	2,16	0,0169
	HT	2,37	0,0180
	SM&HT	1,77	0,0164
	kSM	1,99	0,0154
D12	K	4,05	0,0322
	SM	3,60	0,0386
	HT	4,46	0,0277
	SM&HT	4,36	0,0383
	kSM	4,01	0,0333
D14	K	7,85	0,0644
	SM	8,48	0,0735
	HT	7,54	0,0499
	SM&HT	8,11	0,0753
	kSM	6,40	0,0542
D16	K	16,42	0,1230
	SM	13,73	0,1334
	HT	12,59	0,1091
	SM&HT	15,53	0,1479
	kSM	13,22	0,1142
D18	K	24,21	0,1799
	SM	20,51	0,1652
	HT	15,49	0,1194
	SM&HT	22,57	0,2132
	kSM	18,18	0,1670
D20	K	29,33	0,2023
	SM	27,25	0,2332
	HT	26,80	0,1712
	SM&HT	27,64	0,2017
	kSM	27,05	0,1840

10. Anhang -2- Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ausgewählte Inhaltsstoffe der Blut-, Amnion- und Allantoisflüssigkeit (verschiedener Autoren)	18
Tabelle 2: Blutgasparameter verschiedener Autoren	21
Tabelle 3: Versuchsgruppeneinteilung	33
Tabelle 4: Signifikanz des pH-Wertes im Blut – Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	39
Tabelle 5: Signifikanz des pH-Wertes in der Flüssigkeit Amnion - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	39
Tabelle 6: Signifikanz des pO_2 im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	41
Tabelle 7: Signifikanz pO_2 in der Flüssigkeit Amnion - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	41
Tabelle 8: Signifikante Unterschiede des pO_2 in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz	41
Tabelle 9: Signifikanz des pCO_2 im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	42
Tabelle 10: Signifikanz des pCO_2 in der Flüssigkeit Amnion - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	43
Tabelle 11: Signifikante Unterschiede des pCO_2 in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz	43
Tabelle 12: Signifikanz des HCO_3^- im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	44
Tabelle 13: Signifikanz des HCO_3^- in der Flüssigkeit Amnion - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	45
Tabelle 14: Signifikanz der sO_2 im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	46
Tabelle 15: Signifikanz der sO_2 in der Amnionflüssigkeit- Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	47
Tabelle 16: Signifikante Unterschiede der sO_2 in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz	47
Tabelle 17: Signifikanz des Kaliums im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	48
Tabelle 18: Signifikanz des Kaliums in der Amnionflüssigkeit - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	49
Tabelle 19: Signifikante Unterschiede an K^+ -Ionen in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz	49
Tabelle 20: Signifikanz der Natriumkonzentration im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	50

Tabelle 21: Signifikanz der Natriumkonzentration in der Amnionflüssigkeit – Differenz der Medianeder behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	51
Tabelle 22: Signifikante Unterschiede an Na^+ -Ionen in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$, "--" keine Signifikanz	51
Tabelle 23: Signifikanz der Chloridkonzentration im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	52
Tabelle 24: Signifikanz der Chloridkonzentration in der Amnionflüssigkeit - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	53
Tabelle 25: Signifikante Unterschiede an Cl^- -Ionen in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$, "--" keine Signifikanz	53
Tabelle 26: Signifikanz der Kalziumkonzentration im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	54
Tabelle 27: Signifikanz der Kalziumkonzentration in der Amnionflüssigkeit - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	55
Tabelle 28: Signifikante Unterschiede an Ca^{2+} -Ionen in beiden Flüssigkeiten, Wilcoxon-Test; Signifikanz $p < 0,05$, "--" keine Signifikanz	55
Tabelle 29: Signifikanz der Glucosekonzentration im Blut- Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	57
Tabelle 30: Signifikanz der Glucosekonzentration in der Amnionflüssigkeit – Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	57
Tabelle 31: Signifikanz der Lactatkonzentration im Blut - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	58
Tabelle 32: Signifikanz der [Lactatkon] in der Amnionflüssigkeit - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	59
Tabelle 33: Signifikanz des Embryonengewichtes - Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	60
Tabelle 34: Signifikanz des Herzgewichtes- Differenz der Mediane der behandelten Gruppe minus denen der Kontrollgruppe („Zahlenwert“ Signifikanz = $p < 0,05$; "--" keine Signifikanz)	61
Tabelle 35: Medianwerte des pH in Blut und Amnionflüssigkeit	95
Tabelle 36: Medianwerte des pO_2 in Blut und Amnionflüssigkeit	96
Tabelle 37: Medianwerte des pCO_2 in Blut und Amnionflüssigkeit	97
Tabelle 38: Medianwerte des HCO_3^- in Blut und Amnionflüssigkeit	98
Tabelle 39: Medianwerte des sO_2 in Blut und Amnionflüssigkeit	99
Tabelle 40: Medianwerte der Kaliumkonzentration in Blut und Amnionflüssigkeit	100
Tabelle 41: Medianwerte der Natriumkonzentration in Blut und Amnionflüssigkeit	101
Tabelle 42: Medianwerte der Chloridkonzentration in Blut und Amnionflüssigkeit	102
Tabelle 43: Medianwerte der Kalziumkonzentration in Blut und Amnionflüssigkeit	103
Tabelle 44: Medianwerte der Glucosekonzentration in Blut und Amnionflüssigkeit	104
Tabelle 45: Medianwerte der Lactatkonzentrationen in Blut und Amnionflüssigkeit	105
Tabelle 46: Medianwerte der Embryonen- und Herzgewichte	106

11. Anhang -3- Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Volumen des Amnionflüssigkeit (nach Romanoff, 1960).....	5
Abbildung 2: Struktur des Amnions an verschiedenen Inkubationstagen, (Romanoff, 1960) ..	6
Abbildung 3: Eischale in Verbindung mit der Chorioallantoismembran (Rahn <i>et al.</i> , 1979)	8
Abbildung 4: Rosettenartige Anordnung von Epithelzellen der Allantois, Flachschnitt, Chrom-Hämatoxylin-Phloxin nach GOMORI, 880fach (Kühnel, 1961).....	9
Abbildung 5: 51 h bebrütetes Ei, durch den Herz-beutel erkennt man das S-förmige, mit Blut gefüllte Herz (Keibel, 1906)	12
Abbildung 6: Wege des O ₂ und CO ₂ im Vogelembryo, (nach Dragon und Baumann, 2003) .	14
Abbildung 7: Struktur des Hämoglobins	14
Abbildung 8: Sauerstoffbindungskurve und ihre Einflussfaktoren	15
Abbildung 9: schematische Darstellung des einfachen Regelkreises	26
Abbildung 10: Wiedereinstellung des Sollwertes nach kurzzeitiger Störung.....	26
Abbildung 11: Regelbereich vor und nach Adaptation	26
Abbildung 12: Radiometer Copenhagen ABL 605®	31
Abbildung 13: Eröffnung des Hühnereies oberhalb der Luftkammer und der Schalenmembran	34
Abbildung 14: Sicht auf Gefäße und Hühnerembryo nach Entfernung der Schalenmembran	34
Abbildung 15: Inhalt des Eies nach dem Dekantieren in einer Petrischale (Embryo D10 mit geschlossener Amnionblase und Choroallantoisgefäß)	34

Danksagung

Frau Prof. Dr. Heike Tönhardt danke ich für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährende Unterstützung, für die stets motivierenden und optimistischen Worte. Vielen Dank, dass ich mich bei anfallenden Fragen immer an sie wenden durfte.

Ein herzliches Dankeschön an **alle Mitarbeiter des Institutes für Veterinär-Physiologie** für die Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit und der angenehmen Atmosphäre im Institut.

Ein Dank an alle Mitstreiter, für die angenehmen Gespräche und netten Zusammenkünften mit **Peter** Wenning, **Gerhard** Zechner und **Lisa** Bachmann.

Ich bin **Frau Dr. G. Arndt** sehr dankbar für ihre Hilfestellung bei der statistischen Auswertung des umfangreichen Datenmaterials.

Mein Dank gilt auch **Frau Dr. C. Siegling** für die fachlich kritische(n) Durchsicht(en) sowie die immer aufmunternden und motivierenden Worte.

Frau Dr. C. Deiner für die Unterstützung beim Erstellen des Vortrages für den 3rd Combined Workshop on Fundamental Physiology and Perinatal Development in Poultry. Thank you for the moments of English conversation and tutoring.

Außerdem danke ich **Herrn Rhode** und **Herrn Korth** von der Fa. Radiometer für die telefonische Erreichbarkeit in Notfällen zu fast jeder Tageszeit und den schnellen kompetenten Service vor Ort, auch hier habe ich viel gelernt.

Danke an alle Freunde, Bekannte und Verwandte (entschuldigt, wenn ich Euch nicht alle persönlich anspreche, aber der Platz reicht nicht). Ein Besonderes Dankeschön an unseren **Hundsängern** und an **Gisela Ulbrich** für die Versorgung mit „Roter Apfelschorle“.

Ein großes Dankeschön an **Dany** und **Ringo**, die mir den Start in Berlin so sehr erleichtert haben und mir anfangs ein Dach über dem Kopf gewährten.

Den wichtigsten Personen in meinem Leben gebührt ein extra Dank: **Meiner lieben Mutter Ines Marquardt** und **meinem Bruder Guido**, für die finanzielle und materielle Unterstützung während der gesamten Studienzeit und bei der Doktorarbeit, für den steten Glauben an meine Person, meine Fähigkeiten und mein Können.

Meinem Mann Michael Feske, der mit mir gemeinsam die Höhen und Tiefen bereits während des Studiums durchlebte. Vielen Dank für Dein Verständnis, für Deine tröstenden Worte, für Deine aufmunternden Worte. ICH LIEBE DICH.

Unserem Sohn Janic Lukas, unserer Tochter Tania Anouk, Danke dass es euch gibt.

Vielen Dank!

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 16.03.2009

Dana Feske