

2 Literaturübersicht

2.1 Entwicklung eines Hühnerembryo

2.1.1 Entwicklungsstadien der Embryogenese

Ein Vogelembryo ist während seiner Entwicklung fast autark. Er ist nur von einer relativ konstanten, nahe dem physiologischen Bereich liegenden Temperatur und Luftfeuchtigkeit abhängig. Alle Nährstoffe und Informationen für seine Entwicklung befinden sich im Eidotter. Die Entwicklung des Huhnes (*Gallus gallus f. domestica*) findet innerhalb von 21 Tagen statt. Das geschlüpfte Küken ist ein Nestflüchter. Nach Starck (1998) lässt sich die Embryonalentwicklung von Vögeln in vier Abschnitte unterteilen:

Entwicklungsstadium I	beginnt mit der ersten Furchungsteilung und endet mit der Ausbildung der Körpergrundgestalt
Entwicklungsstadium II	umfasst die Ausbildung der Organstruktur und erste Gewebedifferenzierung
Entwicklungsstadium III	beinhaltet fortschreitende Organdifferenzierung zu arttypischen Baumerkmale
Entwicklungsstadium IV	beendet Wachstum und Ausreifung

2.1.2 Entwicklung des Herz- und Kreislaufsystems sowie seines Stoffwechsels

2.1.2.1 Die morphologische Entwicklung des Herzens und des Blutkreislaufes

Das **Herz** und das Gefäßsystem entwickeln sich aus dem Mesoderm. Das Herz ist in der Embryonalentwicklung des Vogels das erste Organ, welches seine Funktion aufnimmt (Romanoff, 1960). Halbmondförmige Anlagen des Herzens sind am ersten Tag der Entwicklung (D1) im Mesoderm nachweisbar. Hieraus entwickelt sich eine **Tubulusstruktur** (Romanoff, 1960), die schon am D2 der Entwicklung rhythmische Kontraktionen aufweist (Baumann und Meuer, 1992). In den darauf folgenden sechs Entwicklungstagen formiert sich aus dem kontraktilem Tubulus ein **vierkammeriges Hohlorgan**. Nach weiteren zwei Tagen der Entwicklung (D10) ist das Herz morphologisch weitestgehend ausgereift und erhöht in den restlichen 11 Tagen seiner Entwicklung vorrangig seine Masse (Romanoff, 1960). Die kontraktile Effizienz des Herzens korreliert mit der Reifung der Mitochondrien, der

Ausbildung organisierter Sarkomere sowie mit größerer Dichte an Mikrofilamenten und der Entwicklung kontraktile Proteine.

Beim **Blutkreislauf** des Embryo können ein intraembryonaler und ein extraembryonaler Abschnitt unterschieden werden. Das Gefäßnetz entsteht aus einzelnen **Blutinseln**. Die zentralen Anteile dieser Blutinseln bilden primitive Blutzellen, während die peripheren Bereiche sich in Endothel umwandeln, wovon sich einzelne Zellen durch Wachstum mit anderen Blutinseln verbinden (Bellairs, 1998). Im Dotter gespeicherte Nährstoffe werden dem Embryo über diese ersten extraembryonalen Gefäße zugeführt (Romanoff, 1960). Die intraembryonale **Vaskularisierung** schreitet zentripetal fort. Aus dem Mesenchym formieren sich Zellhaufen im Bereich der zukünftigen Gefäße. Die Aorten, die Pulmonalgefäße und das Herzendothel sind als erste erkennbar (Romanoff, 1960). Die Herzfunktion des noch nicht völlig ausdifferenzierten Herzens ist mit der eines erwachsenen Herzens vergleichbar. Kontraktionskraft, Schlagfrequenz, Druck, Vor- und Nachlast beeinflussen die Herzleistung (Thorburn, 1994). Das venöse Blut aus den embryonalen Geweben mischt sich mit dem oxygenierten Blut aus der Chorioallantoisvene. Es erreicht das Herz über die rechte Vorkammer. Im Vergleich zum Foramen ovale des Säugetieres besitzen Vögel intraseptale Poren. Der Körperkreislauf und die Chorioallantoisarterie werden mit gemischt-venösem Blut aus dem Herzen gespeist. Über den Ductus arteriosus als Verbindung zwischen der Lungenarterie und der Aorta wird der Lungenkreislauf umgangen. Aus der Chorioallantoisarterie hervorgehend verzweigt sich das kapillare Netzwerk der **Chorioallantoismembran** (CAM) (Olszowka *et al.*, 1988). Aus nutritiven Gründen wird der Lungenkreislauf ebenfalls geringfügig perfundiert (Olszowka *et al.*, 1988). Mit einsetzender **Lungenatmung** ändern sich die Druckverhältnisse, wodurch sich Änderungen im Kreislaufsystem ergeben (Freeman, B. M., Vince, M. A., 1974; Bezzel, 1990). Der Ductus arteriosus verliert seine Funktion, die intraseptalen Poren schließen sich und der Lungenkreislauf wird dem Gesamtkreislauf zugeschaltet. Letztlich bildet sich der extraembryonale Kreislauf zurück.

2.1.2.2 Die Entwicklung des Herzstoffwechsels

Der Herzmuskel leistet kontinuierlich mechanische Arbeit. Auf die Myokardkontraktion (Querbrückenzyklus und Kalziumtransporte) entfällt mit 80-90% der größte Anteil des ATP-Verbrauchs. Nur 1 % des ATP-Umsatzes dient der Aufrechterhaltung der transmembranären Ionentransporte, der Syntheseleistungen zur Strukturhaltung und der Wärmebildung. Daher ist die kontinuierliche Pumpfunktion von adäquatem Energieumsatz abhängig. Der Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels entspricht 10% des Gesamtsauerstoffverbrauches

eines Organismus. Das embryonale bzw. fetale Herz funktioniert und entwickelt sich in einer zunehmend hypoxischen Umgebung (Tazawa *et al.*, 1971b) und verfügt sowohl über aerobe, als auch über anaerobe Möglichkeiten zur Energiegewinnung (Romano *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zum adulten Herzen werden Fettsäuren aufgrund enzymatischer Unreife nur im geringen Maße zur Energieversorgung herangezogen (Abdel-Aleem *et al.*, 1999). Die Glycolyse ist stark an der ATP Produktion beteiligt (Lopaschuk *et al.*, 1991; Plunkett *et al.*, 1996). Dieser Metabolismus ist im embryonalen Herzen von Vorteil, da weniger Sauerstoff benötigt wird als bei der Verstoffwechslung von Fettsäuren.

Die Glykogenkonzentration des embryonalen Herzens ist 10-20fach größer als im ausgewachsenen Herzen (Lopaschuk *et al.*, 1991). Somit kann eine vorübergehende Dezimierung externer Substrate unter Normoxie durch den großen, schnell zur Verfügung stehenden Energievorrat toleriert werden (Barry *et al.*, 1980). Des Weiteren ist eine optimale Ausgangssituation für die anaerobe Energiegewinnung unter Sauerstoffmangel gegeben (Tran *et al.*, 1996). Anaerobe Energiegewinnung kann die Funktion des embryonalen Herzens bei Sauerstoffmangel über einen begrenzten Zeitraum aufrechterhalten, wobei die ATP Konzentration im embryonalen Herzmuskel unbeeinflusst bleibt (Romano *et al.*, 2001).

Trotz dieser Bedingungen zeigen Vogelembryonen kardiovaskuläre Reaktionen auf Sauerstoffmangel innerhalb eines Zeitraumes von Sekunden bis Minuten (Jensen *et al.*, 1999). Es wird deutlich, dass während der Embryonalentwicklung bereits unter physiologischen Bedingungen generell am Limit des Toleranzbereiches gearbeitet wird (Romano *et al.*, 2001).

Hu und Clark (1989) bezeichnen die Sauerstoffversorgung des embryonalen Herzens sogar als kritisch, da in der frühen Entwicklungsphase die Leistungsfähigkeit zunimmt und gleichzeitig auch der Sauerstoffverbrauch wächst (Raddatz *et al.*, 1992).

Des Weiteren haben die Umgebungstemperatur und die sich entwickelnde Endothermie Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch des Embryo. In den ersten 2/3 der Inkubationszeit eines Hühnerembryos verändert sich der Sauerstoffverbrauch linear mit der Umgebungstemperatur, wie dies auch bei ektothermen Tieren der Fall ist. Zum Ende der Inkubation zeigt der Embryo endotherme Reaktionen. Am Schlupftag wird z.B. sinkende Umgebungstemperatur mit einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs beantwortet (Mortola und Labbe, 2005).

2.1.3 Entwicklung der Sauerstoffversorgung

2.1.3.1 Die gasaustauschenden Organe

Die Ausbildung des **primären Kreislaufs**, der sich aus den embryonalen sowie den Dottersackgefäßen zusammensetzt, beginnt an D1,5. Innerhalb dieser Phase bilden sich ein intraembryonaler und ein extraembryonaler Kreislauf. Die extraembryonalen Gefäße liegen noch in einer Ebene vor (Romanoff, 1960). In dieser Phase erreicht der Sauerstoff den Embryo über Diffusion durch die Eischale und ihre Membranen (Ciotto und Arangi, 1989). An D3 beginnt mit dem **sekundären Kreislauf** der hämoglobingebundene Sauerstofftransport. Hier liegen die Dottersackgefäße bereits in zwei Ebenen vor und beginnen sich über ein Kapillarbett zu verbinden (Romanoff, 1960). An D6 setzt beim Haushuhn die Ausbildung der Chorioallantoismembran (CAM) ein. Sie löst als gasaustauschendes Organ den sekundären Kreislauf ab. Die CAM entwickelt sich durch fortschreitende Fusion zweier extraembryonaler Membranen, dem Chorion und der Allantois. Diese Verschmelzung geht mit der Ausbildung einer Vielzahl von Sinusoiden einher und verbessert so die O₂-Versorgung durch Vergrößerung der Gefäßoberfläche (Freeman, B. M., Vince, M. A, 1974). An D12 bedeckt die CAM die innere Schalenmembran nahezu vollständig, eine weitere Ausdehnung ihrer Oberfläche ist nicht mehr möglich (Freeman, B. M., Vince, M. A, 1974; Ackerman, R. A. und Rahn, 1981). Da sich der O₂-Bedarf aber proportional zum Energieumsatz verhält und dieser mit zunehmendem Wachstum des Embryos steigt, die Permeabilität für Sauerstoff über die Eischale und deren Membranen jedoch nur langsam zunimmt, kommt es ab D13 zu einem fortschreitenden Sauerstoffmangel für den Embryo (Freeman, B. M., Vince, M. A, 1974). Der arterielle Sauerstoffpartialdruck in der Chorioallantoisvene sinkt von 83,5 mmHg (ca. 11,11 kPa) an D10 auf 57,2 mmHg (ca. 7,61 kPa) an D18 (Tazawa *et al.*, 1971b). Zunächst wird dieser Sauerstoffmangel durch Steigerung des Blutflusses in der CAM kompensiert. Durch Steigerung der Kapillardichte in der Muskulatur wird die Diffusionsstrecke für Gas verringert (Snyder *et al.*, 1984). Diese Möglichkeiten sind jedoch begrenzt (Freeman, B. M., Vince, M. A, 1974).

Infolge des zunehmenden Sauerstoffbedarfes wird um den D19 das Anpicken der inneren Eischalenmembran (***internal pipping, ip***) provoziert. Die Lungenatmung beginnt nach dem ip, wenn die innere Membran mit dem Schnabel durchstoßen ist. Mit dem Einsetzen der **Lungenatmung** erfolgt der Übergang vom diffusen zum konvektiven Gasaustausch (Romanoff, 1960; Tullett und Burton, 1985). Der Schnabel befindet sich dann in der Luftkammer. Diese ist am stumpfen Pol des Eis lokalisiert und bildet sich kurz nach der Eiablage durch Abkühlung und dadurch bedingtem Auseinanderweichen der inneren und äußeren Eischalenmembran (Freeman, B. M., Vince, M. A, 1974). Mit fortschreitender

Inkubationszeit vergrößert sich die Luftkammer durch Wasserverlust (Freeman, B. M., Vince, M. A, 1974). Der große Unterschied der Sauerstoffpartialdrücke in Luftkammer (13,83 kPa) und Chorioallantoisvene (7,05 kPa) (siehe Abbildung 1) begründet sich mit der geringen Diffusionskapazität der inneren Diffusionsbarriere und dem arteriovenösen Shunt des Allantoiskreislaufes, über den etwa 11% des Blutes die Sauerstoffaufnahme in der CAM umgehen (Piiper *et al.*, 1980; Olszowka *et al.*, 1988). Diese innere Barriere besteht aus der inneren Eischalenmembran, der Chorioallantoismembran und dem Endothel der Chorioallantoisgefäße. Trotz ihrer relativ geringen Schichtdicke von knapp 15-20µm macht die innere Barriere etwa 2/3 der Barrierefunktion der Eischale aus (Kutchai und Steen, 1971; Piiper *et al.*, 1980).

Die äußere Barriere setzt sich aus der Kalkschale (300µm dick), der Kutikula und der äußeren Eischalenmembran zusammen (Piiper *et al.*, 1980). Kalkschale und Kutikula sind durchsetzt von Poren, deren Anzahl genetisch festgelegt ist und beim Huhn zwischen 10000 und 12000 Poren pro Ei beträgt (Piiper *et al.*, 1980; Ar und Rahn, 1985). Damit haben diese eine Gesamtfläche von 2-3 mm² (Wangensteen und Rahn, 1970) und machen etwa 0,04% der Gesamtoberfläche der Eischale aus (Kutchai und Steen, 1971).

Der Gasaustausch des Vogelembryos nimmt vom Legen des Eis bis zum Schlupf um den Faktor 10³ zu. Das bedeutet, dass O₂ und CO₂ in steigender Menge über die Schale ausgetauscht werden müssen, obgleich die Austauschfläche nahezu konstant bleibt. Diesem Problem wird unter anderem mit der zunehmenden Druckdifferenz zwischen den beiden Seiten der Eischale begegnet, wodurch die Gasaustauschrate zwischen Umgebung und Embryo nach dem Fickschen Diffusionsgesetz beschleunigt wird (Eckert, 1986).

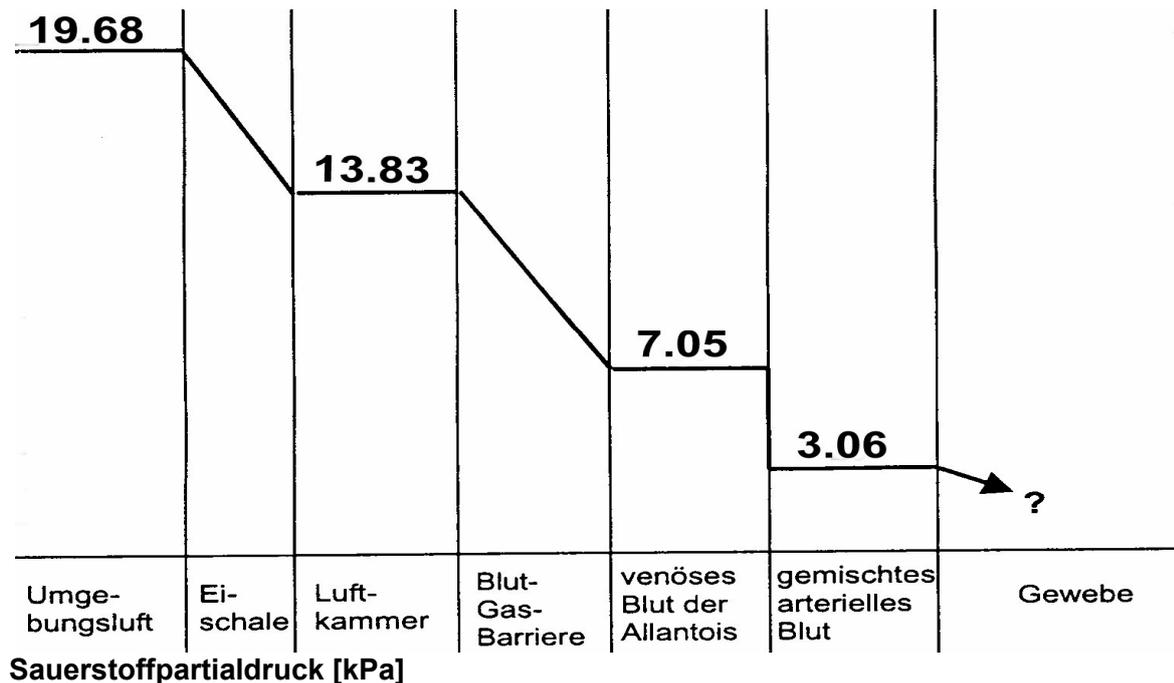


Abbildung 1: Konzentrationsgefälle des Sauerstoffs von der Umgebungsluft bis ins Gewebe modifiziert nach Wangenstein und Rahn (1970).

2.1.3.2 Das Vogelhämoglobin und seine Entwicklung

Die Erythrozyten des Vogels unterscheiden sich von denen der Säugetiere durch ihre Form, Größe und Kernhaltigkeit (Stevens, 1996). In der Embryonalentwicklung des Vogels treten zwei verschiedene Populationen von Erythrozyten auf: die primitiven und die definitiven Erythrozyten. Erste, noch unreife Vertreter der definitiven Linie zeigen sich ab D6 im Blut, ab D9 machen sie bereits den überwiegenden Anteil aus (Romanoff, 1960). Das Verhältnis primitiver zu definitiven Erythrozyten verschiebt sich in der weiteren Entwicklung kontinuierlich zugunsten der definitiven, die ab D18 ausschließlich die Erythrozytenpopulation repräsentieren (Ackerman, N. R. und Ramm, 1971).

Während der Embryogenese treten embryonale und adulte **Formen des Hämoglobins** auf (Stevens, 1996). Das Hämoglobinmolekül (Tetramer) besteht aus vier Peptidketten, die den Proteinanteil (Globin) darstellen. Jedes Globin trägt wiederum eine Häm-Gruppe. Das Häm ist ein Protoporphyrinderivat mit einem zentralen zweiwertigen Eisenatom (Stryer, 2003). Abweichungen der Hämoglobinstruktur verschiedener Tierarten betreffen nur das Globin. Die embryonalen Hämoglobine (HbP, HbE und HbM) werden von den primitiven Erythrozyten gebildet (Brown und Ingram, 1974; Cirotto *et al.*, 1975). Die ab D6 auftretenden definitiven

Erythrozyten produzieren die beim adulten Vogel vorkommenden Hämoglobintypen HbA und HbD sowie eine geringe Menge HbH. Diese Hämoglobintypen unterscheiden sich durch zwei unterschiedliche Globinketten (Stevens, 1996). An D9 dominieren diese adulten Hämoglobinformen bereits mit 65%, beim adulten Vogel beträgt das Verhältnis HbA zu HbD 3:1 (Ciotto *et al.*, 1975; Baumann und Meuer, 1992). Während der Embryogenese überwiegt zunächst das HbD, an D9 ist die Beteiligung der beiden Hämoglobintypen etwa gleichwertig (Baumann *et al.*, 1982).

Hämoglobin ist ein Protein mit positiver Kooperativität, die Bindung eines O₂-Moleküls begünstigt die Bindung weiterer O₂-Moleküle, wodurch auch beim Vogel die sigmoide Form der Sauerstoffdissoziationskurve zustande kommt (Stevens, 1996; Riggs, A. F., 1998). Ab 8 kPa ist das Hämoglobinmolekül optimal mit Sauerstoff beladen. Im Bereich niedrigerer Sauerstoffpartialdrücke, wie sie in den Körpergeweben herrschen, ist die Dissoziationskurve nach rechts verschoben, wodurch Sauerstoff leichter abgegeben wird (Bohreffekt).

Weiterhin wird die Affinität von Hb zu Sauerstoff durch **allosterische Effektoren** in Form von organischen Phosphaten reguliert. Beim Vogel sind ATP und 2,3-BPG (2,3-Bisphosphoglycerat) beteiligt. Sie stabilisieren die Quartärstruktur des desoxygenierten Hämoglobins durch Vernetzung von Polypeptidketten, wodurch die Affinität des Hb zu Sauerstoff gesenkt wird. Hierdurch kann Sauerstoff leichter an Gewebe abgegeben werden.

2.2 Adaptation

Im Zuge der perinatalen Periode entwickeln sich die meisten funktionellen Systeme von einem Steuersystem zu einem Regelkreis. Als Adaptation wird die Anpassung eines Regulationssystems oder des ganzen Organismus an veränderte Bedingungen bezeichnet. Äußere und / oder innere belastende Faktoren bilden dabei die Adaptationsreize, die zur Einstellung eines anderen Funktionsniveaus von bleibenden Charakter führen. Bei erneuter Reizeinwirkung antwortet der Organismus auf den Stressor innerhalb erweiterter physiologischer Toleranzgrenzen (Dörner, 1976). Voraussetzung für eine erfolgreiche Adaptation ist die aufeinander abgestimmte Veränderung aller Bausteine des Regulationssystems. Mangelhafte Koordination der Veränderungen führt über verminderte Stabilität des Regelkreises zur Maladaptation.

Eine besondere Form der Adaptation stellt die **epigenetische Adaptation** dar. Diese Form der Anpassung nimmt Einfluss auf die Kontrolle der Genexpression. Sie führt zur Ausbildung eines anderen Funktionsniveaus, das nicht genetisch fixiert ist, aber den Organismus an die vorhandenen Bedingungen anpasst und auf zu erwartende Umwelt- und Lebensbedingungen vorbereitet. Sie kann ohne Änderung der DNA-Sequenz lange erhalten bleiben und bei der Zellteilung weitergegeben werden (Riggs, A.D. *et al.*, 1996; Nichelmann *et al.*, 1999).

Bei der Schließung der physiologischen Steuersysteme zu Regelsystemen mit Rückkopplung bestimmt die Höhe des aktuell gesteuerten Wertes die Höhe des Sollwertes im entstehenden Regelkreis. In dieser kurzen Zeitphase (**sensible Phase**) der pränatalen oder frühen postnatalen Entwicklung können Signale aus der Umwelt entscheidend den Aktivitätsbereich physiologischer Regelsysteme beeinflussen (Dörner *et al.*, 1975; Dörner und Plagemann, 1994; Tzschentke und Basta, 2002).

Der Stressor Sauerstoffmangel hat, je nach dem Zeitpunkt seines Auftretens, unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung des Vogelembryo. Des Weiteren weisen verschiedenen Organe zeitlich unterschiedliche sensible Phasen auf (McCutcheon *et al.*, 1982; Dzialowski *et al.*, 2002).

Eine sensible Phase für den Energiestoffwechsel des Herzens von Hühnerembryonen wurde im Inkubationszeitraum von D6 bis D12 beschrieben (Decker, 2002; Dzialowski *et al.*, 2002). Diese Phase fällt somit in den von Stark (1989) als Entwicklungsstadium II bezeichneten Zeitraum, in dem sich Organstrukturen ausbilden und Gewebe differenzieren. In den Untersuchungen von Decker (2002) und Dzialowski *et al.* (2002) zeigte sich nach chronischer Hypoxie während des mittleren Inkubationsdrittels ein Langzeiteffekt auf den Stoffwechsel von Hühnerembryonen. Dies äußerte sich in einer höheren Überlebensrate und

einem verminderten Sauerstoffverbrauch des Stoffwechsels. Sauerstoffmangelbebrütung führt zu veränderten Noradrenalinwerten, die dem Kreislauf durch die Verschiebung der Sauerstoffbindungskurve nach rechts eine bessere Sauerstoffausnutzung ermöglichen (Hühnke und Tönhardt, 2004). Infolge eines chronisch reduzierten Sauerstoffangebotes in der Inkubationsluft kann es auch zur vermehrten Ausbildung periarterieller sympathischer Nerven kommen. Diese Hyperinnervation kann das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen steigern (Ruijtenbeek *et al.*, 2000).

Tönhardt (2004) fand nach Warminkubation höhere Noradrenalinwerte im Plasma verglichen mit dem Plasma nach Kaltinkubation. Die sympathische Stimulierbarkeit der Myokardzellen war dagegen nach Kaltinkubation höher als nach Warminkubation. Die Autorin postuliert darin einen Adaptationsmechanismus, der durch verändertes Systolen-Diastolen-Verhältnis das Herz schützt. Pränatale Temperaturerfahrung führt zu einem klaren Einfluss auf die postnatale neuronale hypothalamische Thermosensitivität (Tzschentke und Basta, 2002).

Ein spezieller Anpassungsmechanismus wird mit dem **Hypoxie-induzierten-Hypometabolismus** beschrieben (Abb. 2). Dieser schützt den Hühnerembryo bei Hypoxie ohne Entstehung einer Sauerstoffschuld (Mortola und Labbe, 2005). Der Hypoxie-induzierte-Hypometabolismus zeigt keine lineare Abhängigkeit des Stoffwechsels vom Sauerstoffmangel. Regulierter Hypometabolismus bedeutet eine regulierte frühzeitige Absenkung des ATP-Verbrauchs. Dadurch werden Funktionsstörungen der ATP-abhängigen Pumpensysteme in anoxie- oder kältetoleranten Zellen herausgezögert (Boutilier, 2001). Es handelt sich um einen aktiv kontrollierten Prozess.

Hierbei gibt es zwei Hauptreaktionen: einerseits sinkt die Körpertemperatur und andererseits kommt es kontrolliert zu einer Verringerung des Stoffwechsels. Beide Mechanismen hängen vermutlich mit der Reduktion der Aktivität und Dichte von Ionenkanälen zusammen (Mortola, 2004). Das Ausmaß des hypometabolischen Effekts hängt von der Höhe des Sauerstoffmangels, dem Alter des Embryos und der Umgebungstemperatur ab. Langzeiteffekte sind eine Reduktion des Organwachstums und ein geringes Geburtsgewicht (Mortola, 2004). In der ektothermen Phase der Entwicklung (bis D14) ist der Hühnerembryo ausschließlich von der Umgebungstemperatur abhängig. In der endothermen Phase seiner Entwicklung (D14 bis D21) hat er die Fähigkeit, selbst Wärme zu produzieren.

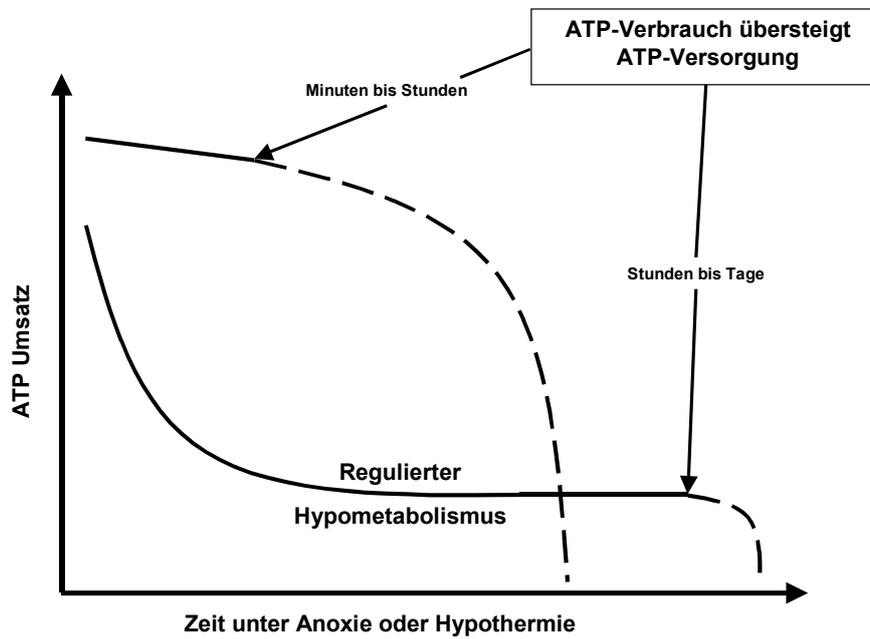


Abbildung 2: Regulierter Hypometabolismus. Darstellung des ATP-Verbrauchs gegenüber der Zeit unter Anoxie oder Hypothermie. Im Bereich der unterbrochenen Linie kommt es aufgrund von ATP-Mangel zu Funktionsstörungen der ATP-abhängigen Pumpensysteme, zur Membrandestabilisation, einem unkontrollierten Kalziumeinstrom und letztlich zur Zellnekrose. Eine regulierte frühzeitige Absenkung des ATP-Verbrauchs (regulierter Hypometabolismus) zögert Funktionsstörungen der ATP-abhängigen Pumpensysteme in anoxie- oder kältetoleranten Zellen heraus. Modifiziert nach Boutilier (2001).

2.3 Auswirkungen des Sauerstoffmangels

2.3.1 Zeitliche Einteilung der Adaptationsphasen an Sauerstoffmangel

Die Reaktionen auf Sauerstoffmangel können nach zeitlichen und funktionellen Gesichtspunkten dargestellt werden.

Die schnellsten Reaktionen (**Sekunden** bis **Minuten**) werden auf systemischer Ebene durch Sauerstoffsensoren ausgelöst, über vegetative Nervenbahnen weitergeleitet und resultieren in verstärkter Ventilation und Steigerung des Herzausstoßes. Insgesamt sorgen diese Mechanismen für eine bessere Sauerstoffbereitstellung mittels vorhandener Kapazitäten (Michiels, 2004).

Innerhalb von **Minuten** bis **Stunden** kommt es auf Zell- und Gewebeebene zu Umverteilungen und Einsparungen im Energieverbrauch, allosterischer Aktivierung glykolytischer Enzyme und zur Aktivierung übergeordneter Regulatoren wie dem Hypoxia-Inducible-Factor (HIF) und der Adenosinmonophosphat-aktivierten-Protein-Kinase (AMPK) (Pilkis und Granner, 1992).

Innerhalb von **Stunden** und **Tagen** kommt es zur Anpassung auf molekularer Ebene (gesteigerte Genexpressionsraten und kovalente Modifikationen) durch Erhöhung der glykolytischen Kapazität, des Transportes von Sauerstoff sowie seiner Verteilung durch verbesserte Vaskularisierung (Pilkis und Granner, 1992; Michiels, 2004).

2.3.2 Senkung des Energieverbrauchs

2.3.2.1 Mechanismen zur Senkung des Energieverbrauchs

Die Aufrechterhaltung der intrazellulären ATP-Versorgung ist essentiell. Unter Normbedingungen werden 80% des verfügbaren Sauerstoffs zur ATP-Produktion verwendet (Rolfe und Brown, 1997). Unter physiologischen Bedingungen sind die Proteinsynthese und die Ionenpumpen (ATPasen) mit 25-30% bzw. 19-28% ATP-Verbrauch die Hauptenergieabnehmer (Rolfe und Brown, 1997). Sie stellen somit primäre Angriffspunkte zur Regulierung des Energieverbrauchs dar. Einsparungen dieser Konsumenten im Energieverbrauch ermöglichen eine Anpassung an Sauerstoffmangel (Guppy *et al.*, 1994). Erforderliche Anpassungen folgen einer Hierarchie. Als erstes werden die RNA- und DNA-Synthese gedrosselt. Damit verbunden ist die Senkung der Proteinsynthese. Als zweites folgt die Verminderung der aktiven Na^+/K^+ und Ca^{2+} Transporte (Hochachka, 1986; Michiels, 2004).

Dem regulierten Hypometabolismus kommt bei der Energieeinsparung große Bedeutung zu. Eine regulierte frühzeitige Absenkung des ATP-Verbrauchs zögert Funktionsstörungen der ATP-abhängigen Pumpensysteme in anoxie- oder kältetoleranten Zellen heraus (Boutilier, 2001). Bei Hypoxie wird der Organismus somit durch niedrige Umgebungstemperaturen und niedrige Stoffwechselraten geschützt (Mortola, 2004).

Erwärmung eines hypoxischen Neugeborenen während der frühen ektothermen Phase seiner Entwicklung führt zum Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und provoziert energieverbrauchende Reaktionen, die nachteilig für das Überleben sind (Mortola, 2004). Bei niedrigen Temperaturen ist der Stoffwechsel in der ektothermen Phase ohnehin niedrig, so dass andauernder Sauerstoffmangel keinen weiteren Effekt auf den Sauerstoffverbrauch hat. Ebenfalls nur geringfügige Veränderungen im Sauerstoffverbrauch zeigen sich unter Sauerstoffmangel und niedrigen Temperaturen während der späten endothermen Phase. In diesem Fall mindert die Hypoxie den Erfolg der Thermogenese. In der ektothermen Phase der Entwicklung ist bei niedrigen Temperaturen und Hypoxie ein erzwungener Abfall des Sauerstoffverbrauchs zu beobachten. Dieser Abfall des Sauerstoffverbrauchs folgt linear der Temperatur und dem Sauerstoffangebot.

Bemerkenswerte Auswirkungen hat milde Hypoxie auf den Sauerstoffverbrauch eines Hühnerembryo bei normalen Temperaturen. Unter diesen Bedingungen kommt es ebenfalls zu einer hypometabolischen Reaktion mit vermindertem Sauerstoffverbrauch, die jedoch nicht linear dem Sauerstoffangebot folgt, sondern einen Regulationsmechanismus (regulierte Sauerstoffkonformität) darstellt (Mortola und Labbe, 2005).

Bei stark erregbaren Säugetierzellen resultiert eine Sauerstoffbegrenzung im Zelltod, da der Energiemangel zu verminderter Leitung der Informationen führt.

Bei Energiemangel kommt es zu einer adaptiven Erniedrigung der Membranpermeabilität. Damit wird einer Membrandestabilisierung entgegengewirkt. Als Teil des Energiesparprozesses werden die Dichte und die Aktivität der Ionenkanäle reduziert. Die „**Kanalhemmung**“ ist eine leistungsfähige Methode der funktionellen und morphologischen Abregulation, um den Energiebedarf zu senken (Hochachka, 1986; Doll *et al.*, 1994; Hochachka *et al.*, 1996; Lutz und Nilsson, 1997; Boutilier, 2001). Das gilt vor allem für niedere Wirbeltiere, Neugeborene und tauchende Säugetiere (Hochachka, 1986; Boutilier, 2001).

Obwohl die anoxie-induzierte Kanalhemmungsstrategie der fakultativen Anaerobier keine Variante für Zellen und Gewebe des Säugers während starker Sauerstoffverknappung darstellt, können Leber- und Herzzellen ihre Stoffwechselrate während anhaltender Perioden von Sauerstoffmangel um 50% erniedrigen (Budinger *et al.*, 1996; Boutilier, 2001). In diesen

Fällen entwickelt sich eine Stoffwechseldepression über 2-3 Stunden, die eine Diffusion von Sauerstoff zu den Mitochondrien so limitieren kann, dass die oxidative Phosphorylierung begrenzt wird (Boutilier, 2001). Dabei verringert lang andauernde Hypoxie in Muskelzellen den Mitochondrien- und Fettgehalt (Hoppeler und Fluck, 2003). Als Modulatoren der durch Anoxie induzierten Kanalthemmung werden Stoffwechselprodukte wie Adenosin vermutet (Boutilier, 2001). Bei Hepatozyten von Ratten und Schildkröten zeigte sich unter Anoxie eine weitestgehende Inhibition der Proteinsynthese (Lefebvre *et al.*, 1993). Die Verteilung des Energieverbrauchs verlagert sich wie zuvor erwähnt von der nun sekundären Protein- und RNA/DNA-Synthese zu den essentiellen ATP-abhängigen Ionenpumpen (Hochachka *et al.*, 1996; Boutilier, 2001).

Insgesamt ist hervorzuheben, dass die Anpassungsmöglichkeiten der Zellen stark mit deren elektrischer Erregbarkeit und dem damit verbundenen hohen Energieverbrauch (ATPasen) zusammenhängen.

Studien an intaktem Myokardium zeigen, dass eine regionale Verringerung der Sauerstoffverfügbarkeit zur Abnahme der Kontraktionen und des Sauerstoffbedarfes führen kann (Arai *et al.*, 1991; Lee und Downey, 1993). Embryonale Kardiomyozyten (Hühnerembryonen) verringern ihre Sauerstoffaufnahme und damit ihre aerobe Energiegewinnung proportional zum lokalen pO_2 . Einerseits verringert sich der Energieverbrauch, was bei länger andauernder Hypoxie mit einer Verminderung der Kontraktilität einhergeht, andererseits wird verstärkt anaerob Energie produziert (Driedzic und Gesser, 1994; Budinger *et al.*, 1996).

Langzeiteffekte sind eine Reduktion des Organwachstums und ein geringes Geburtsgewicht. Während einer folgenden hypermetabolischen Phase können diese Unterschiede jedoch fast völlig kompensiert werden (Mortola, 2004). Damit kann auch das kompensatorische Wachstum des Säugetierembryos nach Perioden des Energiemangels beim Muttertier besser erklärt werden. Einige Veränderungen können jedoch bestehen bleiben.

Insgesamt ist das Abschalten von Funktionen zur Sauerstoffersparnis die Basis, um bei Hypoxie oder Anoxie überleben zu können (Mortola, 2004). Eine kontinuierliche Bebrütung des Embryo bei einem Luftsauerstoffgehalt von unter 21% führt zu einer reduzierten Lebensfähigkeit, die sich proportional zur Abnahme des Sauerstoffgehaltes verhält (ROMANOFF, 1967). Ist die Anpassungsfähigkeit überschritten, steigt die Mortalität (Abb. 3).

Energiemangel ist durch ungenügende Sauerstoffbereitstellung für die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien der Hauptgrund für den anoxiebedingten Zelltod.

Durch erhöhte Ionendurchlässigkeit der Zellmembranen treten Gehirnfehlfunktionen und Herzarrhythmien bei Anoxie auf. Ein Erhalt der intrazellulären Verhältnisse erfordert die Rückverteilung dieser Ionen durch ATP-abhängige Pumpensysteme (Na^+/K^+ -ATPase). In Abhängigkeit der elektrischen Aktivität wird hierfür der Großteil des Ruheenergiestoffwechsels benötigt (Edwards *et al.*, 1989; Rolfe und Brand, 1996). Entspricht die ATP Produktion nicht mehr den Erfordernissen, kommt es zu Funktionsstörungen der ionenbewegenden ATPasen, einer Membrandestabilisation, einem unkontrollierten Kalziumeinstrom durch spannungsgesteuerte Kanäle und letztlich der Aktivierung von kalziumabhängigen Phospholipasen und Proteasen. Weitere Membrandepolarisation, Zellschwellung und Zellnekrose sind die Folge (Boutillier, 2001).

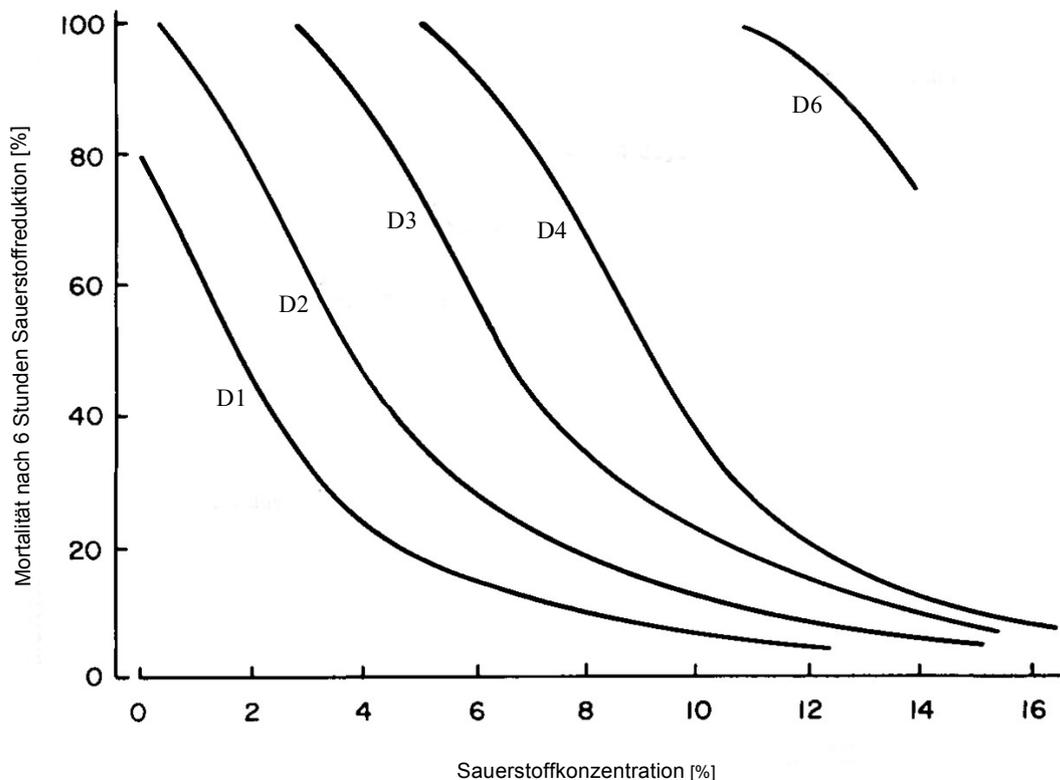


Abbildung 3: Effekt eines 6-stündigen Sauerstoffmangels auf die Mortalitätsrate von Hühnerembryonen an verschiedenen Inkubationstagen nach Romanoff (1972).

2.3.2.2 Adenosinmonophosphat-Aktivierte-Protein-Kinase (AMPK)

Ein Hauptregulator der Energieeinsparung sowohl auf systemischer, als auch auf zellulärer Ebene ist die **AMPK**. Sie wird als metabolischer Schalter betrachtet, der Schlüsselbereiche des anabolen Stoffwechsels inaktiviert und katabolische Prozesse stimuliert (Abb. 4). Ziel ist die ATP-Einsparung (Hardie und Hawley, 2001). Die AMPK ist ein heterotrimeres Enzym, bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheiten, die in verschiedenen Geweben als unterschiedliche Isoenzyme vorkommen (Stapleton *et al.*, 1996). Die α -Untereinheit enthält die Kinase und eine autoinhibitorische Region für die Interaktion mit AMP. Die β -Untereinheit bildet das Proteingerüst, an dem die α - und die γ -Untereinheiten haften (Woods *et al.*, 1996). Die γ -Untereinheit scheint die Bindungsstelle für AMP darzustellen. Die katalytische α -Untereinheit bedarf für ihre Funktion die gerüstbildende β -Untereinheit. Die $\beta 1$ und $\beta 2$ Untereinheiten stimmen zu 70% in ihrer Sequenz überein. Je nach Muskel gibt es verschiedene Zusammensetzungen der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sowie $\beta 1$ und $\beta 2$ (Chen *et al.*, 1999). AMP bindet an einer Schnittstelle zwischen α - und γ -Untereinheit und verhindert so die Assoziation der autoinhibitorischen Untereinheit mit dem Kinasebereich (Hardie und Hawley, 2001).

Die **akuten** Effekte der AMPK Aktivierung erstrecken sich bei anaboler Stoffwechsellage auf die Verringerung der Fettsäure- und Glycogensynthese (Wojtaszewski *et al.*, 2003). Bei kataboler Stoffwechsellage werden die Fettsäureoxidation, die intrazelluläre Glucoseaufnahme und die Glycolyse verstärkt (Hardie und Hawley, 2001). Ein akuter Wirkmechanismus der AMPK führt zur Aktivierung der 6-Phosphofrukto-2-kinase (PFK2) durch Phosphorylierung, wodurch es zur Anregung der Glycolyse kommt (Marsin *et al.*, 2000). Der 6-Phosphofrukto-2-kinase (*pfkfb3*) Gen Promotor enthält wiederum eine Bindungsstelle für HIF1, die zur Aktivierung der Genexpression (HRE) bei Hypoxie notwendig ist (Minchenko *et al.*, 2002; Obach *et al.*, 2004). PFK2/Fruktose-2,6-Bisphosphatase katalysiert einerseits die Synthese und andererseits den Abbau von Fruktose-2,6-Bisphosphat, dem stärksten Stimulator der Phosphofruktokinase (PFK) und damit der Glycolyse (Marsin *et al.*, 2002).

Chronische Effekte nach Aktivierung der AMPK entstehen durch Veränderung der Genexpressionsraten. Expressionsraten von Genen der Fettsynthese und der Glyconeogenese werden abreguliert, wohingegen Gene in Verbindung mit der Glycolyse und der Glucoseaufnahme verstärkt abgelesen werden (Hardie und Hawley, 2001).

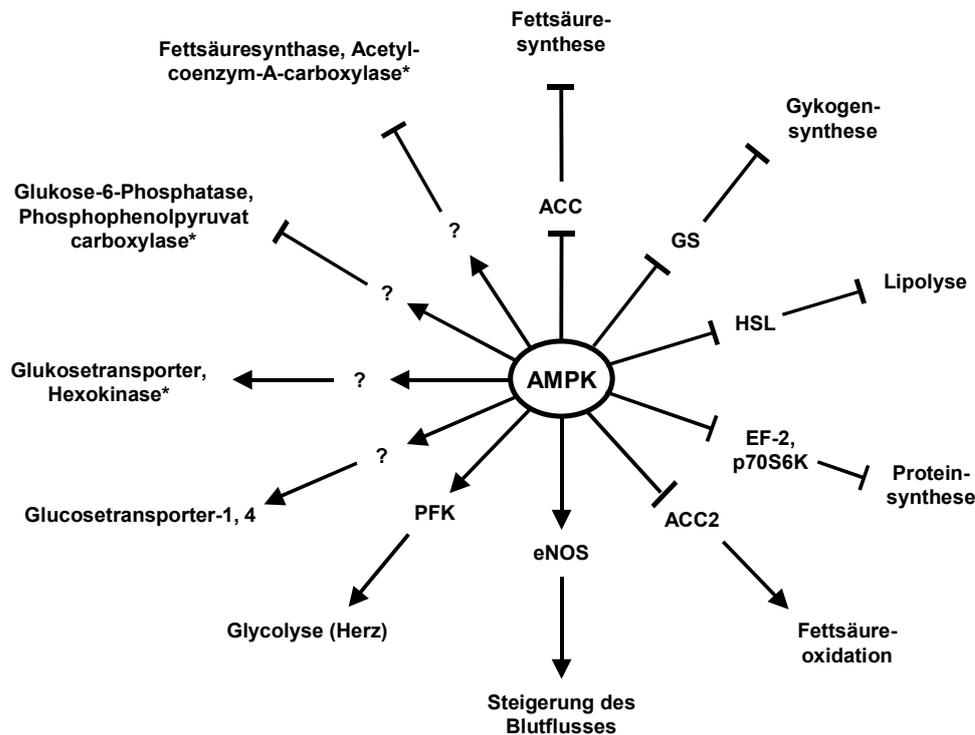


Abbildung 4: Übersicht über die wichtigsten physiologischen Reaktionswege und Zielproteine, die durch das AMPK-System reguliert werden. Bei den mit einem * markierten Enzymen hat die Wirkung der AMPK einen Effekt auf die Genexpression (ACC: Acetyl-coenzym-A-carboxylase; GS: Glycogensynthese; EF2: Elongationsfaktor-2; p70S6K: p70-ribosomale Proteinkinase S6; HSL: hormon-sensitive-Lipase; PFK2: 6-Phosphofructo-2-kinase; eNOS: endotheliale-NO-Synthase). Modifiziert nach Hardie (2004).

Die AMPK-Aktivität wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Energiemangel (z.B. unter Hypoxie) führt durch Erhöhung des AMP/ATP Verhältnisses zur Aktivierung der AMPK (Hardie und Hawley, 2001). Auch die Autoren Hawley *et al.* (1996), Stein *et al.* (2000) und Hardie (2004) schildern, dass die Erhöhung des AMP/ATP Quotienten über ultrasensitive Regulationswege eine Aktivitätssteigerung der AMPK erzeugt. Diese Regulation ist allosterisch und kann auch durch ein sinkendes Verhältnis von Phosphokreatin zu Kreatin ausgelöst werden (Ponticos *et al.*, 1998). Des weiterten führt die Bindung von AMP an die AMPK dazu, dass sie zu einem besseren Substrat für übergeordnete aktivierende Proteinkinasen (AMPK-Kinasen) und gleichzeitig zu einem schlechteren Substrat für deaktivierende Proteinphosphatasen wird (Hong *et al.*, 2003). Übergeordnete AMPK Kinasen erfahren zudem eine Aktivierung durch AMP (Davies *et al.*, 1995) und eine Inhibition durch

ATP (Hawley *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung der α -Untereinheit durch eine AMPK-Kinase führt zur Aktivierung der AMPK.

Es gibt Hinweise, dass auch Glycogen die Aktivität der AMPK regulieren und bei hohen Konzentrationen unterdrücken kann (Hardie, 2004).

Über die Expressionsraten der muskelspezifischen AMPK β 2-Untereinheit (Thornton *et al.*, 1997) gibt es bisher kaum Angaben, zu denen der α -Untereinheiten jedoch verschiedene Daten. So steigen die AMPK-Aktivität und ihre Expression bei chronischen Veränderungen der myokardialen Energievorräte im hypertrophierten Herzen an. Die AMPK α 1- und AMPK α 2-Konzentrationen wachsen auf das 3,5 bzw. 4,8fache an (Tian *et al.*, 2001). Die gesteigerte Expression und die posttranslationale Modifikation tragen zur chronischen Regulation der AMPK-Aktivität bei, wobei Phosphorylierung wahrscheinlich der Hauptmechanismus für die Erhöhung der AMPK-Aktivität ist (Warden *et al.*, 2001).

2.3.3 Effektivere Sauerstoffbereitstellung

2.3.3.1 Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf das Herz

Hypoxische Zustände im Herz entstehen infolge einer Disproportion zwischen Sauerstoffangebot und dem aktuellen Sauerstoffbedarf des Herzens. Der Grad des hypoxischen Schadens hängt einerseits von der Intensität und Dauer des hypoxischen Stimulus und andererseits von der kardialen Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel ab. Diese Toleranzgrenzen ändern sich während der Entwicklung signifikant. Die höhere Resistenz des embryonalen Herzens gegenüber Sauerstoffmangel begründet sich mit einem geringeren Energiebedarf, einer gesteigerten Fähigkeit zur anaeroben Glycolyse sowie größeren Glycogenreserven (Ostadal *et al.*, 1999).

Unter Hypoxie ist die Erhaltung der Herzfunktion von einer intakten Glycolyse und einem geringen Energieverbrauch abhängig. Chronische pränatale Hypoxie von D6-19 bei 15% Sauerstoff erzeugt eine biventrikuläre Vergrößerung, wobei der Quotient aus Herzmasse/Körpermasse als Maß für die Hypertrophie herangezogen wurde (Villamor *et al.*, 2004). Des Weiteren ist nach chronischem pränatalen Sauerstoffmangel neben der Hypertrophie eine signifikante Hyperplasie im Bereich des Septums nachweisbar, die unter Normoxie wieder ausgeglichen wird (Lange, 2005).

Einen protektiven Mechanismus des Hühnerembryo während Hypoxie stellen Chemoreflexe über periphere Chemorezeptoren dar, wodurch vagale efferente Reize am Herzen eine Bradykardie auslösen (Mulder *et al.*, 1998). Des Weiteren unterdrücken während der Hypoxie die Kardiomyozyten ihre Kontraktionen (Haddad, 2002). Der Hühnerembryo gilt in den ersten 2/3 der Inkubation als ektothermer Organismus. Bei diesen Organismen wird Hypoxie oft mit

einer schnellen reflexartigen Bradykardie beantwortet. Die Herzfrequenz sinkt um ca. 50% (Driedzic und Gesser, 1994). Nach Ruijtenbeek *et al.* (2000) führt dagegen eine chronische moderate Hypoxie zu einem Anstieg des Blutdruckes.

2.3.3.2 Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf die Gefäßbildung

Unter Sauerstoffmangel findet eine stärkere Gefäßbildung statt. Hierfür sind Wachstumsfaktoren, wie der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), verantwortlich (Linden *et al.*, 2003; Van Lieshout *et al.*, 2003). Diese Funktion erfüllt VEGF durch Rekrutierung und Proliferation von Endothelzellen. VEGF ist während der embryonalen Entwicklung unter normoxischen Bedingungen nachweisbar und für eine normale Organentwicklung nötig (Sugishita *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001). Es gibt drei verschiedene Isoformen der VEGF-mRNA (das sind die Isoformen 189, 165 und 121). Alle drei Isoformen werden auf mRNA-Niveau unter Hypoxie gleichmäßig induziert (Levy *et al.*, 1995). Jedoch nur die Isoform 165 induziert das Gefäßwachstum dosisabhängig, wohingegen die Isoform 121 auf das Gefäßwachstum keinen Einfluss nimmt (Yue und Tomanek, 2001). Die Transkription von VEGF wird durch HIF1 reguliert (Linden *et al.*, 2003). Hypoxie ist ein starker Stimulus für die Aufregulation der Genexpression von VEGF und somit für die Bildung von Gefäßen (Hashimoto *et al.*, 1994; Van Lieshout *et al.*, 2003). Der Grad der mRNA-Induktion unter Sauerstoffmangel wird unterschiedlich angegeben. In einer kardialen Myozytenzelllinie stieg der mRNA Gehalt nach 24 Stunden Begasung bei 1% Sauerstoff um das 25fache an (Levy *et al.*, 1995). Bei der Inkubation eines Hühnereies an D10 für 24h mit 15% Sauerstoff wird vom 2,5fachen Anstieg der VEGF-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe berichtet (Ivnitski-Steele *et al.*, 2004). Ähnliche Resultate erreicht man mit einer Inkubation bei 1,5% Sauerstoff über 16 Stunden (Hu, C. J. *et al.*, 2003). Auch nach Ischämie kommt es im Herzmuskel zu einem 2,5fachen Anstieg der VEGF-mRNA, gefolgt von einem leichten Abfall. Bis zu 6 Wochen nach einer Ischämie bleibt der mRNA-Gehalt erhöht. Diese Ergebnisse lassen sich auch auf Hypoxiebedingungen übertragen (Li *et al.*, 1996). Hashimoto *et al.* (1994) fanden einen Abfall des VEGF-mRNA-Gehaltes nach 60 Minuten dauernder Hypoxie im Vergleich zur 2fachen Erhöhung nach 30 Minuten. Im Gegensatz dazu behaupten Maulik und Das (2002), dass nach einer vierstündigen Hypoxie die Erhöhung der VEGF Expression auf dem selben Niveau bestehen bleibt. Sie schlussfolgern einen maßgeblichen Beitrag von VEGF zum Schutz von Endothelzellen unter Sauerstoffmangel oder nach einer Ischämie (Maulik und Das, 2002).

Zu den Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf die Gefäßbildung liegen somit unterschiedliche Befunde vor.

2.3.3.3 Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf Catecholamine und 2,3-BPG

Die Catecholamine haben in frühen Entwicklungsstadien zunächst morphogenetische Funktionen (Sarasa und Climent, 1987; Shields *et al.*, 1990). Im späteren Entwicklungsverlauf spielen sie eine entscheidende Rolle als Vermittler der Stressantwort bei Sauerstoffmangel (Mulder *et al.*, 2000). In verschiedenen Studien konnte ein Anstieg der basalen Catecholaminwerte im Plasma von Vogelembryonen während des letzten Drittels der Inkubation beobachtet werden (Döcke, 1994; Tomaschek, 1997; Decker, 2002). Insbesondere das Noradrenalin trägt wesentlich zum Schutze des Vogelembryo gegen den zum Ende der Inkubation auftretenden Sauerstoffmangel bei. Auch auf einen akuten Sauerstoffmangel reagiert der Hühnerembryo mit einem Anstieg der Plasma-NoradrenalinKonzentration (Epple *et al.*, 1992). Durch periphere Vasokonstriktion und eine Umverteilung des Herzauswurfvolumens zugunsten von Herz, Gehirn und Chorioallantoismembran wird der Embryo vor Schaden bewahrt (Wittmann und Prechtel, 1991; Mulder *et al.*, 1998).

Ein deutlicher Konzentrationsgipfel der Catecholamine im Blut tritt um den Geburts- bzw. Schlupftermin auf (Döcke, 1994). Zu diesem Zeitpunkt sind sie wesentlich an der Kontrolle der Herz-Kreislauffunktion und der Ausreifung der Lunge beteiligt. Die Konzentrationen der Catecholamine können während der Bebrütung durch lang anhaltende Änderungen der Temperatur variieren, wobei die relativen Verhältnisse zueinander konstant bleiben (von Blumroder und Tonhardt, 2002). Auch der Säugerfetus reagiert auf Sauerstoffmangelzustände mit einem Anstieg des Noradrenalins im Plasma (Cohen *et al.*, 1984).

Das Auftreten von Noradrenalin im Blut induziert am D 13/14 in den Erythrozyten die Synthese von Carboanhydrase und 2,3-BPG via cAMP-abhängige Rezeptoraktivierung (Dragon *et al.*, 1996). Darin ist die große Bedeutung des hohen Noradrenalinwertes unter hypoxischen Bedingungen zu sehen. Das 2,3-BPG ist als allosterischer Effektor des Hämoglobins für dessen Sauerstoffaffinität verantwortlich. Es stabilisiert durch Quervernetzung der Seitenketten das Hämoglobin in seiner desoxygenierten Form und senkt somit dessen Affinität zum Sauerstoff (Stryer, 2003). Ab D14 kommt es im Blut von Hühnerembryonen zu einem steilen Anstieg von 2,3-BPG, welches an D18 das Maximum der Konzentration erreicht (Baumann *et al.*, 1986). Dieser Konzentrationsanstieg begründet sich mit dem kontinuierlichen Sinken des pO_2 (Tazawa *et al.*, 1971b). 2,3 BPG stellt eine Verbindung zur anaeroben Energiegewinnung unter Sauerstoffmangel her. Nach dem ip und der damit verbesserten Sauerstoffversorgung sinkt der 2,3-BPG-Spiegel stetig ab. Durch eine Reduktion des Luftsauerstoffgehaltes auf 15% im Inkubationszeitraum D6-D12 erfolgt

der Anstieg des 2,3-BPG von D14-D18 auf einem deutlich niedrigeren Niveau (Decker, 2002).

Durch Verringerung der Austauschfläche mittels Beschichtung der Eischale wurde eine Steigerung des arteriellen $p\text{CO}_2$ bewirkt (Tazawa *et al.*, 1971a). Durch Inkubation in einer CO_2 -reichen Umwelt wurde ein vergleichbares Resultat erhalten (Dawes und Simkiss, 1971). Die Antwort auf den erhöhten $p\text{CO}_2$ ist eine kompensatorische Steigerung des Plasma-Bikarbonat-Spiegels. Durch Inkubation in Höhen wurden der $p\text{O}_2$ und der Druckgradient zwischen dem Embryo und der Atmosphäre verringert. Dieser Gradient ist verantwortlich für die Sauerstoffmenge, die dem Embryo zugeführt werden kann. Das reduzierte Sauerstoffangebot äußert sich in einem geringeren Massenzuwachs und einem verzögerten Schlupf (Freeman, B. M., Vince, M. A, 1974).

2.3.3.4 Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf Hämoglobin und Hämatokrit

Ein wesentlicher Zusammenhang von Entwicklungszeitpunkt und Inkubationsbedingungen gilt auch für den Hämatokrit (prozentualer Anteil der Erythrozyten am Gesamtblut) und den Hämoglobingehalt. Der sich ab D13 aufgrund der sich nicht weiter ausdehnenden CAM schnell entwickelnde Sauerstoffmangel gilt als Auslöser für eine Reihe kompensatorischer Reaktionen des Embryo (Freeman, B. M., Vince, M. A, 1974; Ackerman, R. A. und Rahn, 1981). In diesem Zusammenhang kommt es auch zu einer Erhöhung der Erythrozytenzahl und des Hämokrits sowie zu einem gesteigerten Hämoglobingehalt (Tazawa *et al.*, 1971b). Nach einer chronischen Sauerstoffreduktion auf 15% in der Inkubationsluft von D6-D12 ist der Hämatokrit gegenüber der Kontrollgruppe an D12 signifikant erhöht (Dzialowski *et al.*, 2002). Durch Beschichtung von $\frac{1}{4}$ der Eischalenoberfläche von D14-D18 lässt sich die Sauerstoffzufuhr reduzieren, was sich in Form deutlich höherer Hämatokritwerte an D18 widerspiegelt (Tazawa *et al.*, 1971b). Auch die O_2 -Bindungsaffinität des Hämoglobins sinkt unter Sauerstoffmangel (Riggs, A. F., 1998). Die Genexpression von Erythropoetin und der Transferrinrezeptoren steigt an, wodurch die Erythrozytenproduktion begünstigt wird (Michiels, 2004). Des weiteren treten unter Hypoxie weniger reife primitive, als unreife definitive Erythrozyten auf.

2.3.3.5 Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf die Chorioallantoismembran

Während der Inkubationsperiode von D6-D12 wächst die CAM als gasaustauschendes Organ von ca. 35% auf nahezu 100% der Eischalenoberfläche (Ackerman, R. A. und Rahn, 1981). Die CAM entspricht in ihrer Funktion der fetalen Plazenta des Säugetiers (Tazawa *et al.*, 1971b). Die Chorioallantoisvene bringt das sauerstoffangereicherte Blut aus dem

extraembryonalen Kreislauf in den intraembryonalen. Über die Chorioallantoisarterie wird das desoxygenierte Blut aus dem Embryo zum Ort des Gasaustausches befördert. Über einen arterio-venösen Shunt im Chorioallantoiskreislauf umgehen etwa 11% des Blutes die Sauerstoffaufnahme in der Chorioallantoismembran (Piiper *et al.*, 1980; Olszowka *et al.*, 1988). Wird das Ei im Zeitraum des CAM-Wachstums einem verminderten Sauerstoffgehalt ausgesetzt, so nimmt die Kapillardichte in der CAM zu (Dusseau und Hutchins, 1988). Snyder *et al.* (1984) kamen bei der Untersuchung von Kanada-Gänsen zu einem vergleichbaren Ergebnis. Verminderte Sauerstoffkonzentrationen führen zur Stimulation der Angiogenese. Dabei sind dosisabhängige Muster beobachtet worden (Strick *et al.*, 1991). Diese Antwort stellt eine langfristige autoregulatorische Reaktion dar, mit der das metabolische Gleichgewicht zwischen Blutfluss und Sauerstoffbedarf aufrecht erhalten wird (Dusseau und Hutchins, 1988).

2.3.4 Anaerobe Energiegewinnung

2.3.4.1 Hypoxia Inducible Factor

Anpassungen an chronischen Sauerstoffmangel werden entscheidend über den **Hypoxia Inducible Factor** (HIF1) reguliert (Schofield und Ratcliffe, 2004). Der Reaktionsweg von HIF1 wird bei einem Gewebssauerstoffgehalt von weniger als 4% aktiviert (Yu *et al.*, 1998). Die Sauerstoffkonzentration der Atmosphäre liegt bei ca. 21%, wohingegen der physiologische pO_2 in der Nierenrinde 3-4% und im Myokard ca. 2% beträgt (Semenza, 1999). Daher kommt es schon bei kleinen Änderungen im Gleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch, sowie unter normoxischen Bedingungen zur graduellen Veränderung der transkriptionellen Antwort auf Hypoxie durch Aktivierung sauerstoffabhängiger Gene (Semenza, 1999). Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 5 dargestellt.

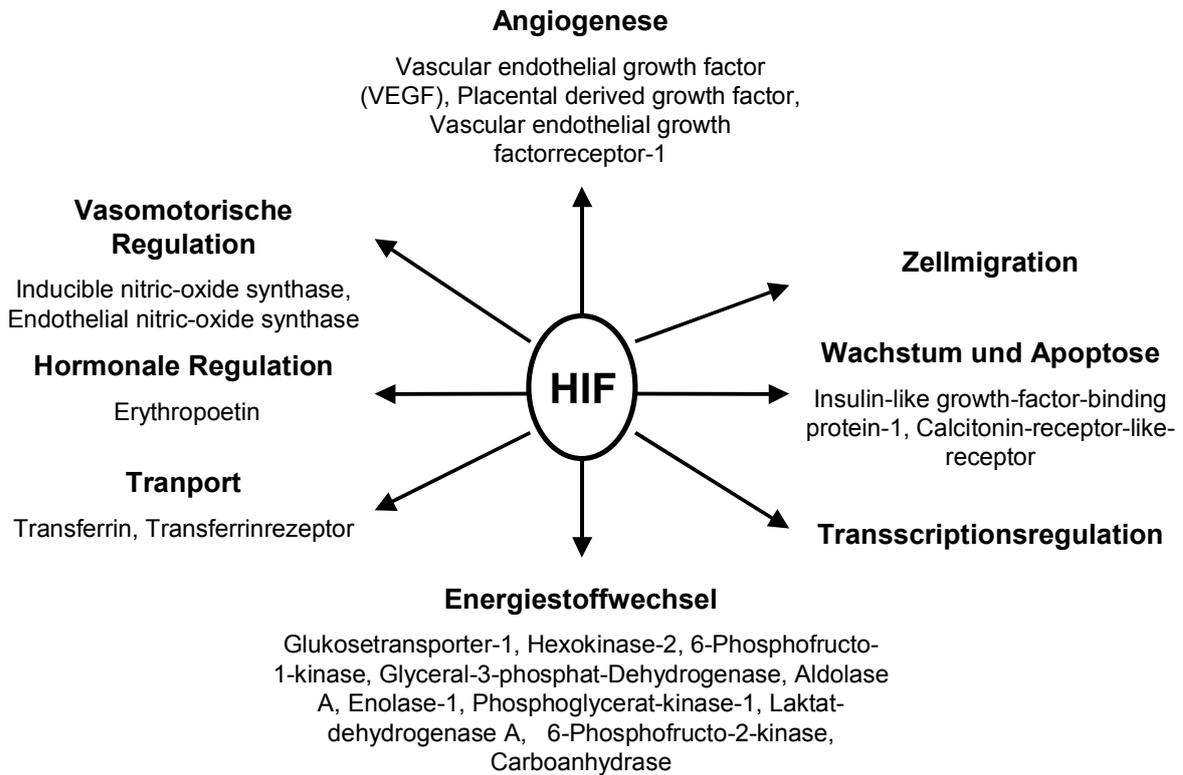


Abbildung 5: Übersicht zu wichtigen Einflussbereichen von HIF. Modifiziert nach Schofield und Ratcliffe (2004).

Der 6-Phosphofruktose-2-kinase Gen Promotor enthält eine Bindungsstelle für HIF1 (HRE), die zur Aktivierung bei Hypoxie notwendig ist. Die Reizung einer Zelllinie mit 2% Sauerstoff über 6h ergibt einen zehnfachen Anstieg der mRNA von PFKFB3 (Obach *et al.*, 2004). An diesem Beispiel wird die synergistische Wirkung von HIF1 und AMPK deutlich.

HIF ist ein Heterodimer bestehend aus zwei **basic helix-loop-helix Proteinen** (HIF α und HIF β). Das HIF α/β -Dimer bindet an definierte Regionen in **Hypoxia Response Elements (HREs)**. Diese HREs befinden sich in Promotorregionen von Zielgenen (Semenza, 2001). Nach Bindung des HIF-Dimers an HREs werden so markierte Gene verstärkt transkribiert. HIF1 α ist im Gegensatz zu HIF β durch Hypoxie stark induzierbar.

Die **Regulation** von HIF1 α erfolgt auf zwei unabhängigen Wegen. Unter Normoxie erfolgt einerseits ein posttranslationaler Abbau von HIF durch Proteolyse und andererseits eine Inhibition der Aktivierung von HIF. Unter Sauerstoffmangel wird der proteolytische Abbau gestoppt und die Aktivierung von HIF nicht mehr blockiert (Poellinger und Johnson, 2004).

HIF1a wird an zwei zentral gelegenen und unabhängig voneinander funktionierenden sauerstoffabhängigen Degradierungsdomänen proteolytisch reguliert. Die Transkription regulieren zwei Aktivierungsdomänen durch Bindung von Co-Aktivatoren (Poellinger und Johnson, 2004).

Beide Regulationsmechanismen werden durch sauerstoffabhängige Enzyme eingeleitet. Diese Enzyme gehören zu den **2-oxoglutarat-abhängigen Oxygenasen**. Als Dioxygenasen binden sie Sauerstoff in zwei Substrate. Sie enthalten ein nicht durch Häm gebundenes Eisenatom. Ihre Aktivität ist nicht nur sauerstoffabhängig, sondern auch von Succinat, Stickstoffmonoxid u.a. beeinflussbar.

Unter normoxischen Bedingungen hydroxylieren sauerstoffabhängige Enzyme Prolinreste der Degradierungsdomänen (Abbildung 6). Hierdurch erhöht sich die Affinität für den von Hippel-Lindau Faktor (vHL), dessen Bindung über die Erkennung einer Multikomponenten-Ubiquitin-Ligase die Proteolyse einleitet.

Unter Hypoxie findet keine Hydroxylierung der Prolinreste statt, wodurch sich HIF1 α in den Zellen anhäuft. Ähnliche Mechanismen wirken bei der Regulation der Transkriptionsaktivität. Unter Normoxie hydroxylieren sauerstoffabhängige Enzyme Asparaginreste innerhalb der Aktivierungsdomänen. Eine Bindung des p300 Co-Aktivatoren unterbleibt (Schofield und Ratcliffe, 2004).

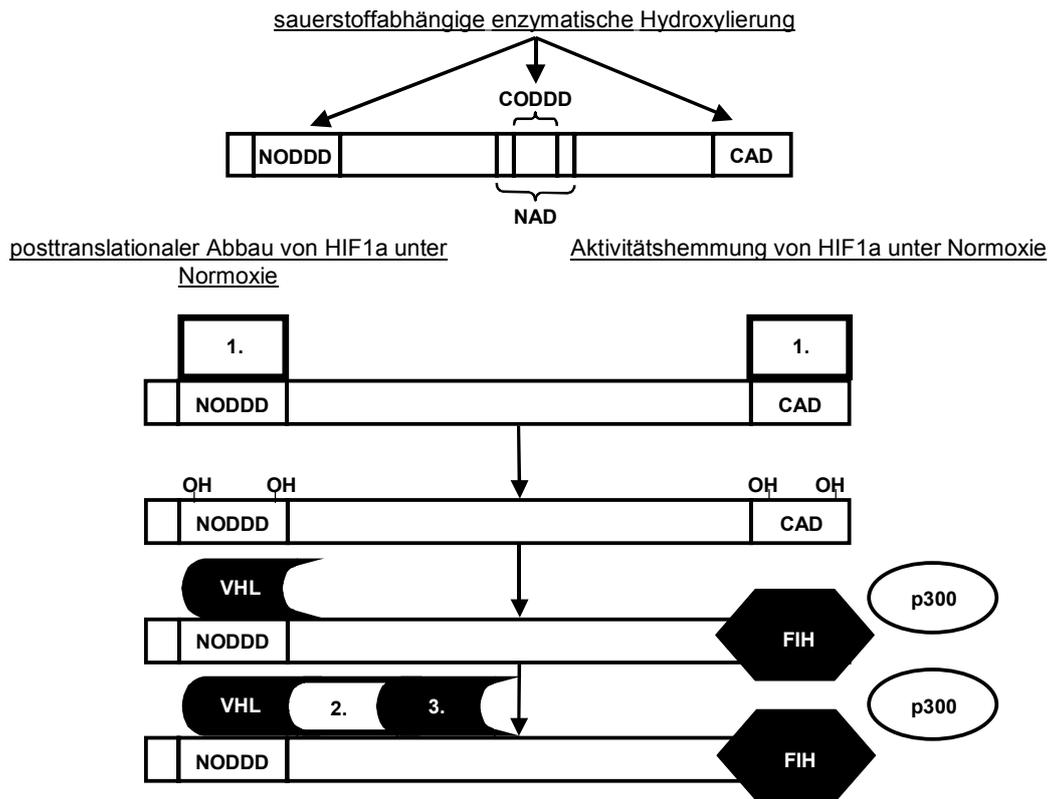


Abbildung 6: Proteinstruktur und posttranslationaler Abbau, sowie Aktivitätshemmung von HIF1a. HIF1a weist Domänen auf, die von sauerstoffabhängigen Oxygenasen bei physiologischem Sauerstoffgehalt hydroxyliert werden. An diese Proteinbereiche lagern sich der von Hippel-Lindau-Faktor (VHL) bzw. der HIF-inhibierende-Faktor (FIH) an. Der VHL leitet den Abbau von HIF ein und der FIH verhindert die Anlagerung vom Transkriptions-Co-Aktivator p300, was die Interaktion mit den Hypoxia-Response-Element (HRE) verhindert. Für jeden dieser Kontrollmechanismen gibt es im HIF1a Protein zwei Domänen, von denen sich die CODDD und die NAD überlappen (NODDD/CODDD: amino-/carboxyterminale sauerstoffabhängige Degradierungsdomäne; NAD/CAD: amino-/carboxyterminale Aktivierungsdomäne; 1.: 2-Oxoglutarat-abhängige Oxygenase; 2.: Multi-Komponenten-Ubiquitin-Ligase; 3.: multikatalytische Protease; p300: Transkriptions-Co-Aktivator; FIH: HIF-inhibierender Faktor).

Diese posttranslationale Regulation zeigt sich auch darin, dass beim Wechsel von hypoxischen Bedingungen vor der Geburt zur normoxischen postnatalen Umgebung der zelluläre Proteingehalt an HIF1a trotz gleich bleibenden mRNA-Gehalt an HIF1a schnell abfällt (Nau *et al.*, 2002). Trotzdem soll es zu einem 400%igem Anstieg der mRNA nach einer 24 Stunden andauernden Hypoxie mit 15% Sauerstoff kommen, wobei dieser mRNA Anstieg sich nicht im Proteingehalt widerspiegeln muss (Catron *et al.*, 2001).

Weitere Regulationsmöglichkeiten bestehen in dem aktiven Ausschluss aus dem Kern, alternativen Splicingvarianten, der Inaktivierung von HIF1 α durch Bildung eines Heterodimers mit einem inhibitorischen PAS-Protein sowie der verstärkten Genexpression durch höhere Transkriptionsraten von HIF1 α (Thrash-Bingham und Tartof, 1999). Des Weiteren stabilisieren hohe NO-Konzentrationen HIF1 α unabhängig von der Sauerstoffkonzentration (Mateo *et al.*, 2003).

Zur transkriptionellen Regulation von HIF1 α gibt es unterschiedliche Angaben. Es wird eine Induktion der HIF1 α -mRNA als Antwort auf Hypoxie oder Ischämie *in vivo* nachgewiesen (Wiener *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1998). Diese Induktion scheint sich auf der Ebene der mRNA Stabilisierung abzuspielen (Wang *et al.*, 1995), da es keine Anzeichen für eine Induktion der HIF1 α -Promoter Aktivierung als Antwort auf Hypoxie gibt (Iyer *et al.*, 1998b; Semenza, 1999).

Insgesamt ist zu bemerken, dass HIF nicht nur für verschiedene Reaktionen in Bezug auf chronische Hypoxie verantwortlich ist, sondern auch für die physiologische Entwicklung des Embryo, seines Herzens und seiner Gefäßversorgung als unentbehrlich gilt (Iyer *et al.*, 1998a; Poellinger und Johnson, 2004).

2.3.4.2 Auswirkungen des Sauerstoffmangels auf die Glycolyse

Der Ablauf der Glycolyse ist in Abb. 7 dargestellt. Die Glycolyseaktivität steigt bei Hypoxie. Der essentielle Energiebedarf kann bei abnehmendem Sauerstoffangebot nur mit Hilfe anaerober ATP-Gewinnung („Pasteur Effekt“) gedeckt werden (Driedzic und Gesser, 1994). Sauerstoff ist nicht nur ein Regulator der Glycolysegeschwindigkeit, sondern auch ein Regulator der Genexpression glykolytischer Enzyme (Webster, 2003). Chronische Hypoxie erzeugt eine signifikante und aufeinander abgestimmte Aktivierung der Transkription folgender glykolytischer Gene: Fructose-2,6-bisphosphataldolase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglyceratkinase, Enolase, Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase (Webster, 1987; Semenza *et al.*, 1994).

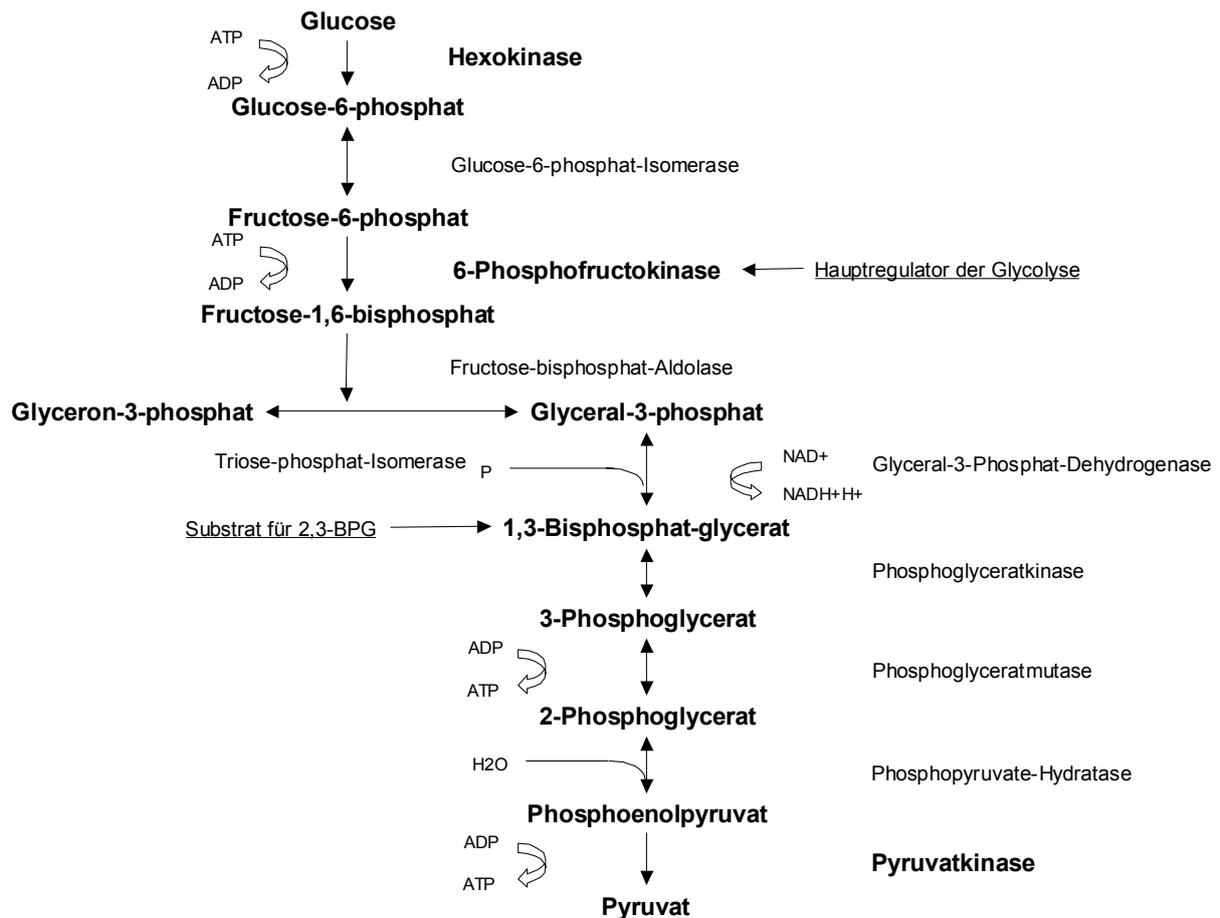


Abbildung 7: Darstellung der Reaktionswege in der Glycolyse. Schlüsselenzyme der Glycolyse sind die Hexokinase, die Phosphofruktokinase und die Pyruvatkinase. Das Produkt der Glycolyse Pyruvat steht dem Zitratzyklus als Substrat zur Verfügung oder wird bei Sauerstoffmangel in Lactat umgewandelt.

Der Erhalt der Herzfunktion unter Hypoxie ist von anaerober Glycolyse abhängig (Driedzic und Gesser, 1994). Der oxidative Muskelstoffwechsel verlagert sich unter Langzeithypoxie hin zu einem verstärkten Kohlenhydratstoffwechsel, wobei auch die intramuskulären Fettvorräte minimiert werden (Hoppeler *et al.*, 2003). Hypoxie vermindert des weiteren den Mitochondriengehalt in Muskelzellen (Hoppeler *et al.*, 2003).

Die Anpassung der Glycolyse an Sauerstoffmangel erfolgt durch eine effektive Regulation der irreversiblen Reaktionsschritte. Die Reaktionen der Hexokinase, der Phosphofruktokinase und der Pyruvatkinase sind irreversibel, alle drei Enzyme dienen der Regulation der Glycolyse. Ihre Aktivität wird durch die reversible Bindung allosterischer Effektoren (Millisekunden) oder durch kovalente Modifikation (Sekunden) reguliert (Pilkis und Granner, 1992). Des weiteren wird die Menge dieser Schlüsselenzyme durch Transkriptionskontrolle mittelfristig angepasst (Hance *et al.*, 1980; Pilkis und Granner, 1992). Die Regulation der Genexpressionsraten glykolytischer Enzyme erfolgt durch Hypoxie-

abhängige Transkriptionsfaktoren (Semenza, 2001; Webster, 2003; Schofield und Ratcliffe, 2004).

Insbesondere durch HIF1a werden glykolytische Enzyme induziert. Hierzu gehören die Hexokinase, die Phosphofruktokinase, die Glyceralaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, die Aldolase, die Enolase, die Phosphoglyceratkinase, die Laktatdehydrogenase und die Pyruvatkinase (Firth *et al.*, 1994; Semenza *et al.*, 1994; Nau *et al.*, 2002; Schofield und Ratcliffe, 2004). Letztlich scheinen alle Enzyme der Glycolyse durch Hypoxie induziert zu werden. Auch die durch Hypoxie gesteigerte Expression von PFKFB3 ist eine zur Verstärkung der Glycolyse führende Anpassung (Minchenko *et al.*, 2002). Unter Hypoxie erhöht sich der Anteil der Glucose am Energiestoffwechsel in Muskelzellen um den Faktor 12 und die Enzymproteinmenge glykolytischer Enzyme steigt um das 3-5fache an (Webster, 2003).

Die Phosphofruktokinase ist das wichtigste Schlüsselenzym der Glycolyse. Sie erfährt durch hohe ATP-Konzentrationen eine Hemmung, die durch höhere AMP-Konzentrationen wieder aufgehoben wird. Somit wird die Glycolyse angeregt, wenn der Energiegehalt der Zelle sinkt. Die Hexokinase wird durch Glucose-6-phosphat gehemmt, so dass bei einem Synthesestau in der Glycolyse durch Hemmung der Phosphofruktokinase auch die Hexokinase gehemmt wird. Die Pyruvatkinase erfährt durch Fructose-1,6-bisphosphat (Produkt des vorausgegangenen irreversiblen Schrittes) eine Aktivierung, wohingegen ATP und Alanin sie hemmen. Im Menschen kommt die PFK in drei Isoenzymen vor: M (Muskel), L (Leber) und P (Plättchen) (Nakajima, 1995). Die PFK hat eine Schlüsselfunktion im Glucosestoffwechsel inne. Ihre Aktivität wird hauptsächlich allosterisch reguliert (Vestergaard, 1999).

Die mittelfristige Anpassung an Sauerstoffmangel durch höhere Genexpressionsraten ist mittels mRNA-Mengen bestimmter Gene quantifizierbar. Die mRNA-Gehalte der Laktatdehydrogenase A, der Phosphofruktokinase M, der Triosephosphatisomerase und der Aldolase steigen unter 2% Sauerstoffgehalt 2-5fach an (Semenza *et al.*, 1994). Bei 1,5% Sauerstoff über 16 Stunden steigen die mRNA Gehalte von PGK 2,5fach, von LDHA 3,0fach und von PKM 1,5fach an (Hu, C. J. *et al.*, 2003). Es wird beschrieben, dass der myokardiale Gehalt an α -Enolase, LDHA und PFK-L mRNA dem starken postnatalen Abfall von HIF1 α -Proteingehalt gleicht, dagegen der Gehalt an mRNA von Aldolase A, β -Enolase und PFK-M postnatal ansteigt (Nau *et al.*, 2002).

Die Enolase (EC 4.2.1.11) ist ein glykolytisches Enzym, das als Dimer aktiv ist (Keller *et al.*, 1992). In Wirbeltieren kommt sie als Homo- und Heterodimer vor. Sie besteht aus drei strukturell verwandten Untereinheiten, welche auf eigenen Genen codiert werden (Lamande *et al.*, 1989). Es wurde gezeigt, dass die Aufregulation der Genexpression von β -Enolase in verschiedenen Muskelzellen die gesteigerte Neusynthese von mRNA-Transkripten widerspiegelt und nicht durch eine Veränderung in deren Halbwertszeit verursacht wird

(Lamande *et al.*, 1995). Enolase a wird unter Hypoxie verstärkt exprimiert. So stieg der mRNA Gehalt der Enolase a in Zellkultur unter Anoxie auf das 1,7fache an (Roland *et al.*, 2000).

2.4 Zusammenfassung der Literatur

Das ausgewertete Schrifttum verdeutlicht, dass der Hühnerembryo über zahlreiche Anpassungsmechanismen verfügt, um einem Sauerstoffmangel zu begegnen. Der Untersuchungszeitraum umfasst das letzte Inkubationsdrittel. In dieser Zeit entsteht unter physiologischen Bedingungen eine zunehmende Differenz zwischen Sauerstoffbereitstellung und Sauerstoffbedarf (Romanoff, 1960; Hu, N. und Clark, 1989; Raddatz *et al.*, 1992; Romano *et al.*, 2001). Der Gasaustausch erfolgt über die CAM, die an D12 ihre maximale Ausdehnung erreicht. Das Herz ist ausdifferenziert. Im Gegensatz dazu bleibt die Diffusionskapazität über die Eischale trotz steigenden Sauerstoffbedarfs nahezu konstant. Diese Diskrepanz beantwortet der Embryo unter normalen Inkubationsbedingungen mit diversen Anpassungsmechanismen. Verstärkt man den Stressor Sauerstoffmangel in einer sensiblen Phase (D6-12), so resultieren daraus langfristige Veränderungen in der Toleranz gegenüber Sauerstoffmangel (Decker, 2002; Dzialowski *et al.*, 2002). Hierzu gehören Anpassungen, die zu Energieeinsparungen im ganzen Organismus führen, eine intensivere Sauerstoffbereitstellung nach sich ziehen und die anaerobe Energiegewinnung verstärken (Pilkis und Granner, 1992; Michiels, 2004).

Diese unabhängig von der genetischen Prädisposition auftretende Prägung des Embryo durch die Umwelt kann ohne Veränderungen des Erbmaterials zu späteren Erkrankungen führen (Ruijtenbeek *et al.*, 2000). Derartige epigenetische Mechanismen sind bisher noch nicht ausreichend erforscht. Daraus kann abgeleitet werden, dass ein Modell zur Wirkung pränataler Umwelteinflüsse, vorrangig am Beispiel unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen, sowie Temperaturen, auf die Ontogenese von Körperfunktionen (epigenetische Anpassung) von allgemeinem wissenschaftlichem Interesse ist.