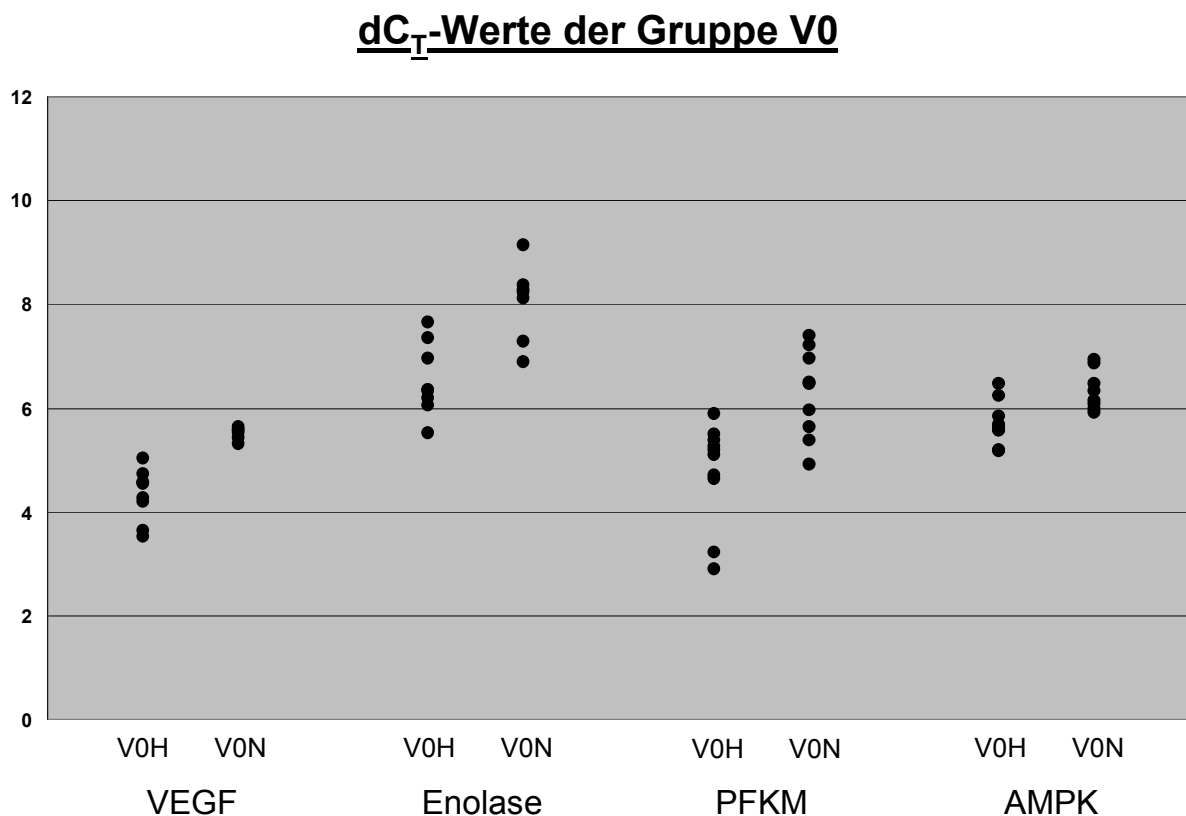


4 Ergebnisse

4.1 Veränderungen im Hühnerembryo an D10 nach Inkubation bei 15% O₂ und 40,0°C über 24 Stunden (V0)

4.1.1 Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK



	VEGF		Enolase		PFK		AMPK	
	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s
V0H	4,35	0,50	6,56	0,71	4,78	0,98	5,71	0,43
V0N	5,51	0,12	8,05	0,74	6,28	0,85	6,34	0,39

Abbildung 8: Vergleich der dC_T-Werte von VEGF, Enolase, PFK und AMPK in der Gruppe V0 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die dC_T-Werte der Testgruppe V0H liegen im Durchschnitt bei allen untersuchten Genen niedriger als in der Basisgruppe V0N. Diese niedrigeren dC_T-Werte stehen für einen höheren

mRNA Gehalt in der Zelle und damit für eine verstärkte Genexpression der überprüften Gene. Dies wird durch die FC-Werte unterstrichen. Sie zeigen bei der Enolase (FC=3,52), bei der PFK (FC=2,48) und bei VEGF (FC=2,43) eine signifikante Aufregulation (FC>2 und p-Wert<0,05) der Genexpression. Die Expression der AMPK (FC1,49) zeigt einen tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Anstieg. Folglich verursacht die Kombination aus Sauerstoffmangel und Hyperthermie innerhalb von 24 Stunden einen Anstieg der Genexpression.

4.1.2 Verhalten der Embryonen- und Herzmassen

	m(H) in g		m(E) in g	
	Mittel	S	Mittel	s
V0H	0,01	0,00	1,95	0,21
V0N	0,01	0,00	1,84	0,21

Abbildung 9: Mittelwerte der Herzmassen (m(H)) und der Embryonenmassen (m(E)) in der Gruppe V0 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die Herzgewichte und die Embryonenmassen weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Der 24 Stunden andauernde Sauerstoffmangel (15%) kombiniert mit einer erhöhten Inkubationstemperatur (40,0°C) hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Embryonenmasse und das Herzgewicht.

4.2 Veränderungen im Hühnerembryo an D12 nach Inkubation bei 15% O₂ über 6 d (V1)

4.2.1 Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK

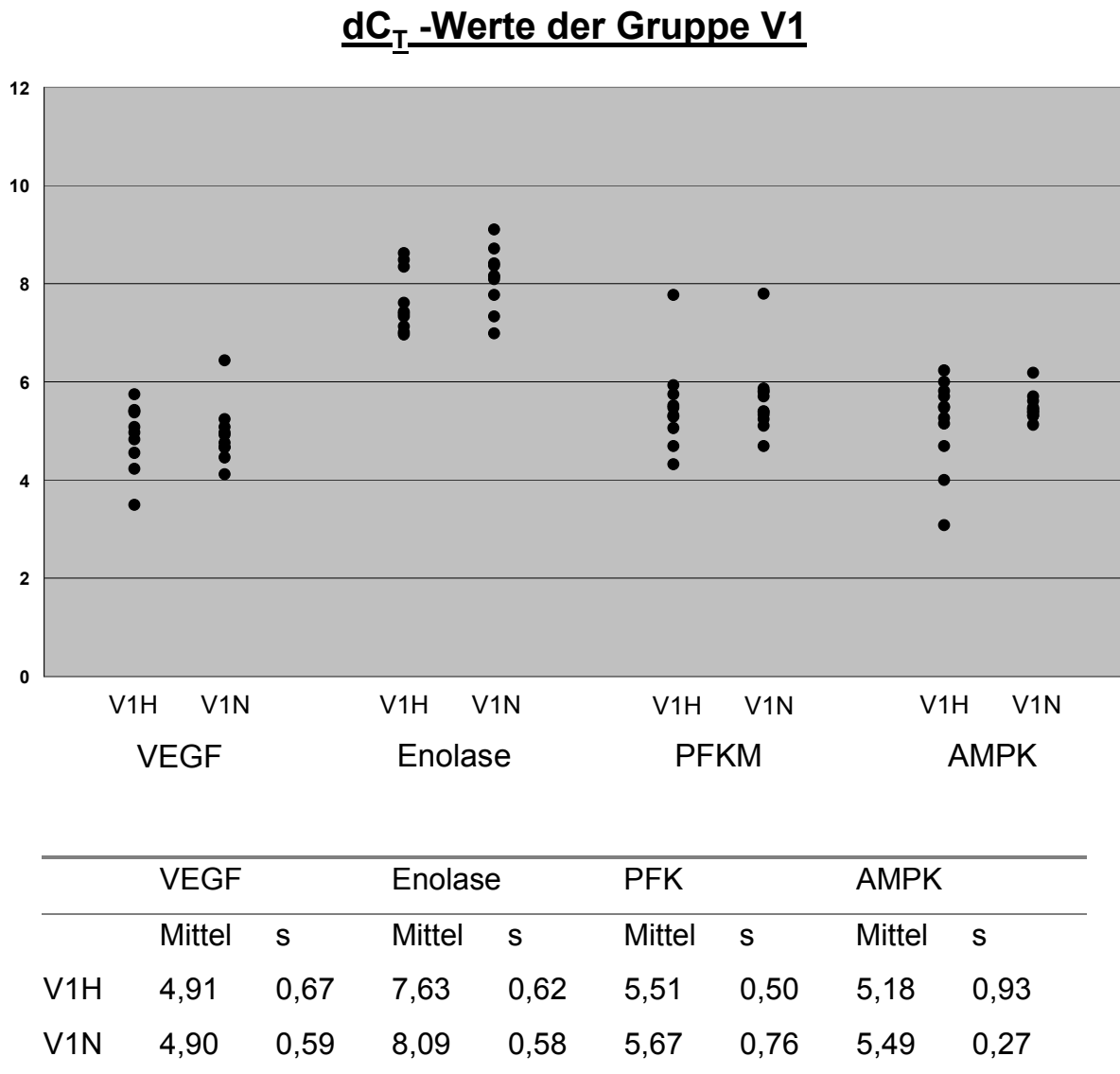


Abbildung 10: Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK in der Gruppe V1 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die dC_T-Werte der Testgruppe V0H weisen im Durchschnitt bei allen untersuchten Genen keine signifikanten Unterschiede zu denen der Basisgruppe V0N auf. Auch die FC-Werte und die dazugehörigen p-Werte liegen bei allen untersuchten Parametern im Bereich zwischen 0,5 und 2,0 bzw. >0,05 und weisen somit keine signifikanten Unterschiede auf. Die

hypoxische Inkubation von D6-12 hat keinen Einfluss auf die Genexpression von VEGF, Enolase, PFK und AMPK.

4.2.2 Verhalten der Embryonen- und Herzmassen

	m(H) in g		m(E) in g	
	Mittel	s	Mittel	s
V1H	0,04	0,01	3,96	0,87
V1N	0,03	0,01	3,83	0,79

Abbildung 11: Mittelwerte der Herzmassen (m(H)) und der Embryonenmassen (m(E)) in der Gruppe V1 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Das Herz- und Embryonalgewicht zeigt keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die hypoxische Inkubation von D6-12 erzeugt jedoch eine tendenziell höhere Herzmasse in der Versuchsgruppe.

4.3 Veränderungen im Hühnerembryo an D18 nach Inkubation bei 15% O₂ von D6-12 und 21% O₂ von D13-18 (V2)

4.3.1 Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK

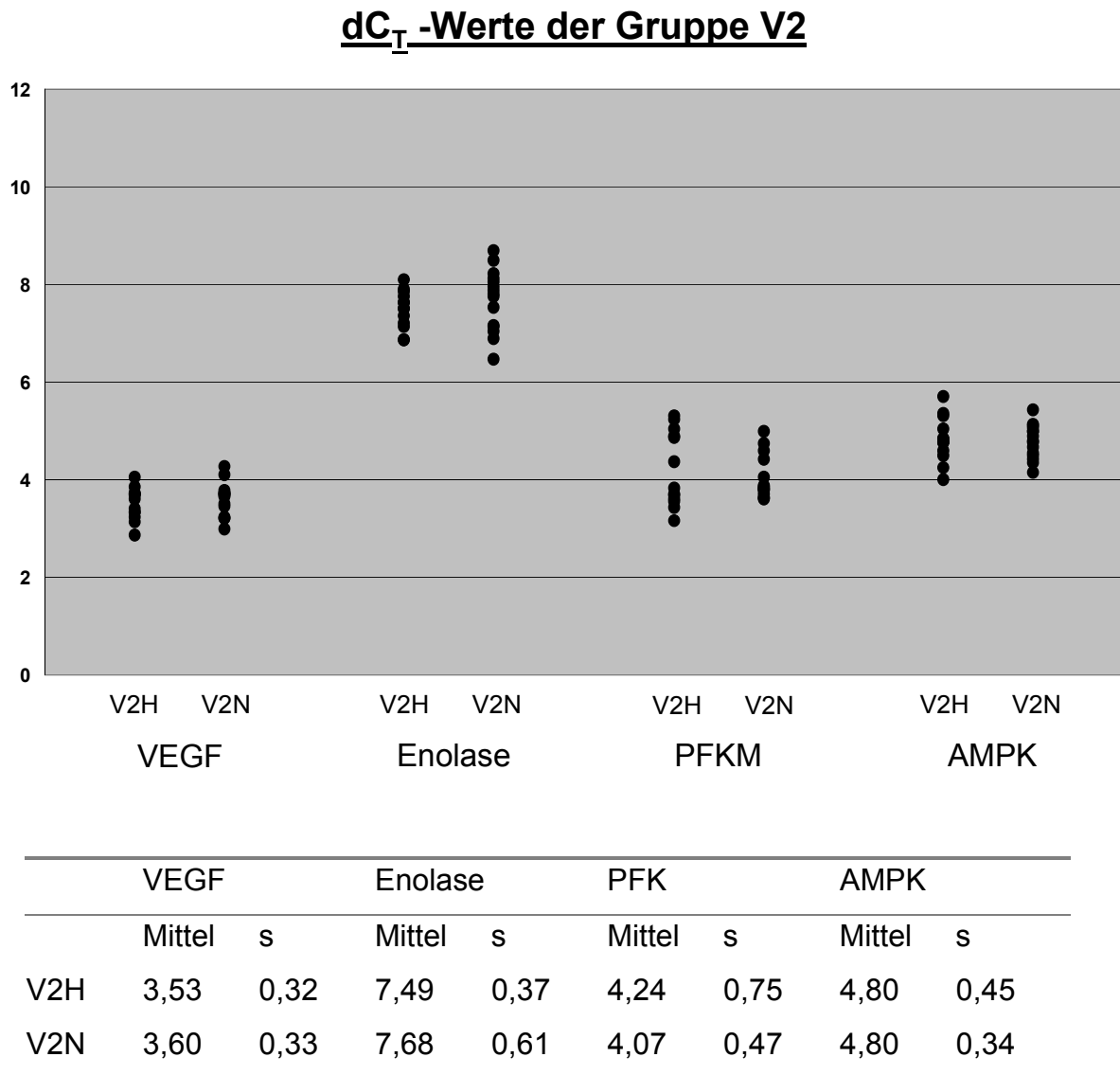


Abbildung 12: Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK in der Gruppe V2 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die dC_T-Werte aller vier untersuchten Gene weisen nahezu gleiche Beträge auf. Die FC-Werte bewegen sich im Bereich zwischen 0,5 und 2,0, der p-Wert liegt über 0,05.

Folglich hinterlässt die Inkubation im Zeitraum von D6-12 bei 15% O₂ keine signifikanten Veränderungen bei den Expressionsraten der untersuchten Gene an D18 im Vergleich zur Basisgruppe.

4.3.2 Verhalten der Embryonen- und Herzmassen

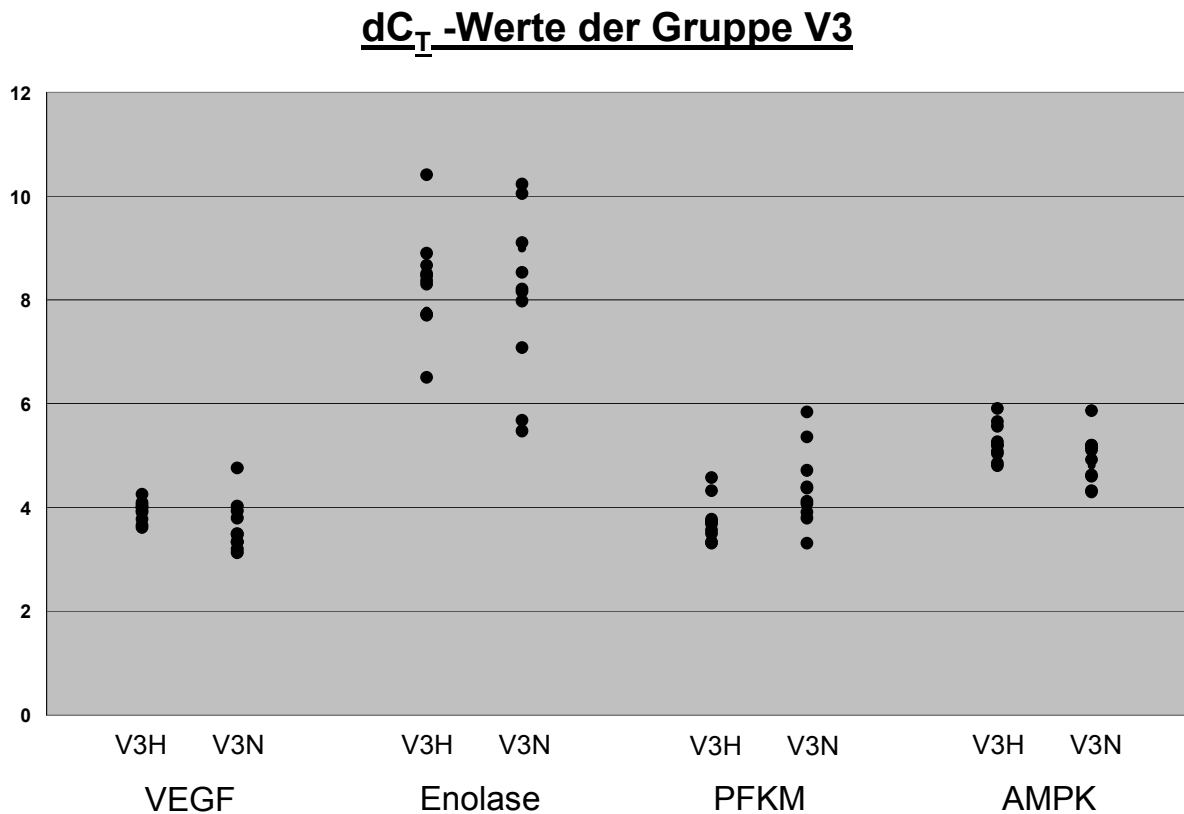
	M(H) in g		m(E) in g	
	Mittel	s	Mittel	s
V2H	0,16	0,03	16,96	2,46
V2N	0,17	0,03	17,82	2,70

Abbildung 13: Mittelwerte der Herzmassen (m(H)) und der Embryonenmassen (m(E)) in der Gruppe V2 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die Gewichte der Embryonen und ihrer Herzen weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testgruppe V2H und der Basisgruppe V2N auf. Jedoch sind die Mittelwerte der Embryonal- und Herzgewichte der Gruppe V2H tendenziell geringer als jene der Gruppe V2H, wobei die Standardabweichungen vergleichbar sind.

4.4 Veränderungen im Hühnerembryo an D18 nach Inkubation bei 15% O₂ von D6-12, 21% O₂ von D13-18 und 0% O₂ über 30 Minuten an D18 (V3)

4.4.1 Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK



	VEGF		Enolase		PFK		AMPK	
	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s
V3H	3,94	0,19	8,30	0,96	3,73	0,37	5,20	0,36
V3N	3,64	0,45	7,94	1,62	4,40	0,70	4,91	0,43

Abbildung 14: Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK in der Gruppe V3 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die dC_T-Werte und der p-Wert zeigen keine eindeutigen Unterschiede zwischen der Test- und Basisgruppe auf. Die FC-Werte bewegen sich im Bereich zwischen 0,5 und 2,0 wodurch die Unterschiede in der Expression zwischen beiden Gruppen nicht als signifikant gewertet

werden können. Beide Gruppen reagieren auf eine 30 Minuten dauernde Anoxie annähernd gleich. Die Inkubation von D6-12 bei 15% O₂ hat keine bleibenden Auswirkungen auf die Expressionsraten der untersuchten Gene in der Testgruppe (V3H).

4.4.2 Verhalten der Embryonen- und Herzmassen

	m(H) in g		m(E) in g	
	Mittel	s	Mittel	s
V3H	0,16	0,03	17,00	3,86
V3N	0,19	0,02	19,75	2,80

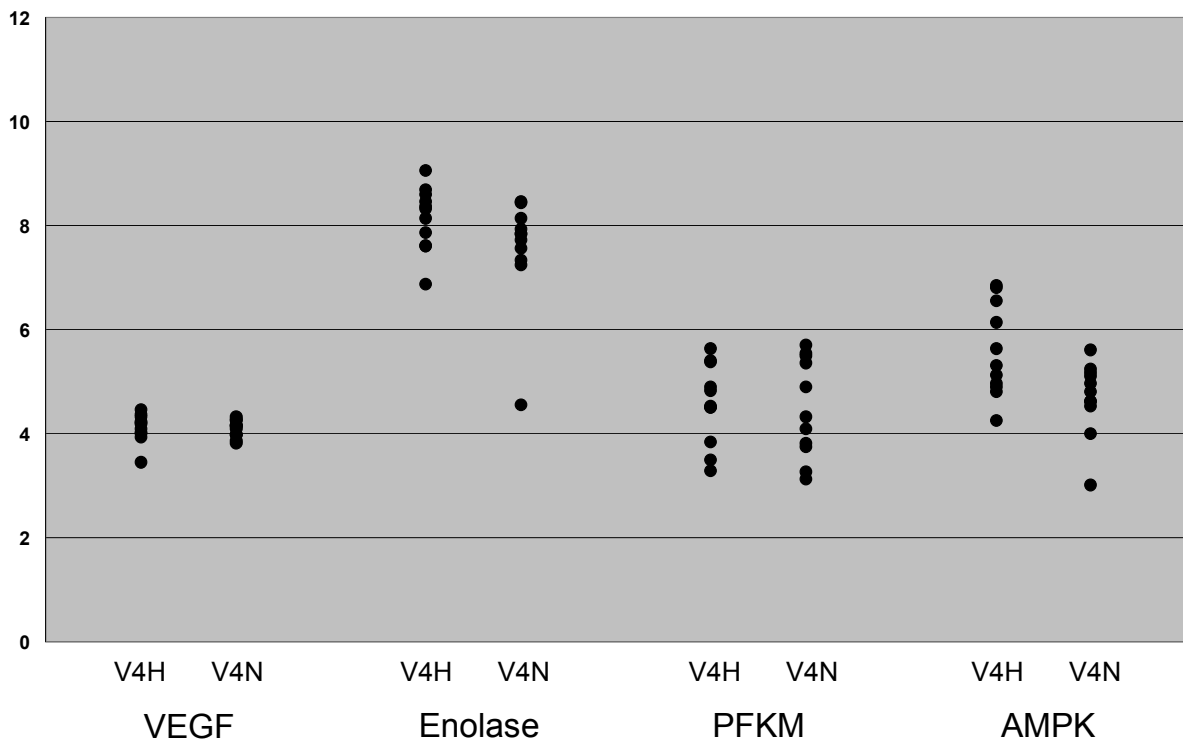
Abbildung 15: Mittelwerte der Herzmassen (m(H)) und der Embryonenmassen (m(E)) in der Gruppe V3 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die Embryonal- und Herzmassen zeigen nach 30 Minuten bei 0% O₂ keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell sind jedoch geringere Massen in der Versuchsgruppe (V3H) zu erkennen, die von Tag 6-12 der Inkubation mit 15% statt 21% Sauerstoff bebrütet wurden.

4.5 Veränderungen im Hühnerembryo an D18 nach Inkubation bei 15% O₂ von D6-12, 21% O₂ von D13-18 und 0% O₂ über 45 Minuten an D18 (V4)

4.5.1 Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK

dC_T-Werte der Gruppe V4



	VEGF		Enolase		PFK		AMPK	
	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s
V4H	4,08	0,29	8,16	0,59	4,56	0,74	5,58	0,84
V4N	4,09	0,16	7,57	1,02	4,56	0,94	4,72	0,67

Abbildung 16: Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK in der Gruppe V4 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die dC_T-Werte weisen keine relevanten Unterschiede zwischen der Test- und Basisgruppe auf. Die FC-Werte zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, sie befinden sich zwischen 0,5 und 2,0 und die p-Werte sind >0,05. Beide Gruppen reagieren auf eine 45

Minuten dauernde Anoxie gleich. Die Inkubation von D6-12 bei 15% O₂ hat keine bleibenden Auswirkungen auf die Expressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK in der Versuchsgruppe (V4H).

4.5.2 Verhalten der Embryonen- und Herzmassen

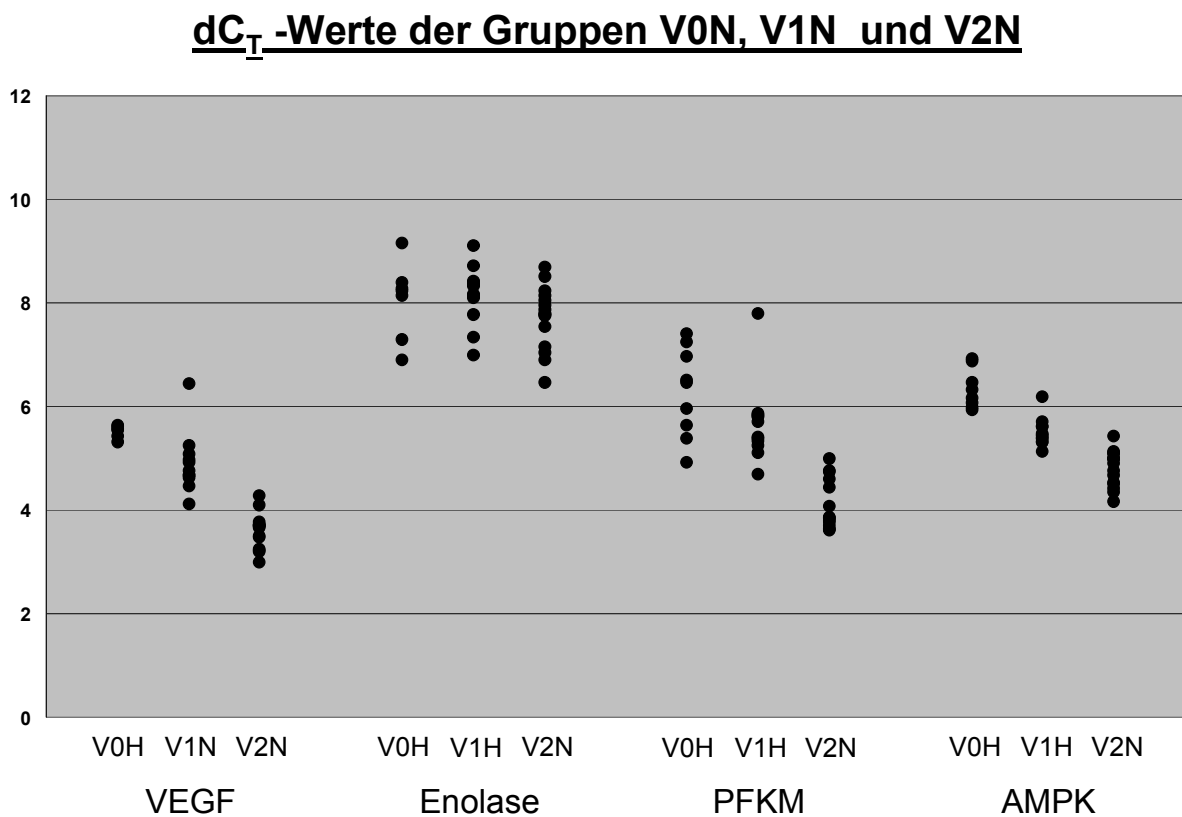
	m(H) in g		m(E) in g	
	Mittel	s	Mittel	s
V4H	0,17	0,02	17,01	2,00
V4N	0,16	0,03	16,86	3,08

Abbildung 17: Darstellung der Mittelwerte von Herz- (m(H)) und Embryonenmassen (m(E)) in der Gruppe V4 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die Embryonal- und Herzgewichte zeigen während einer 45 Minuten andauernden Anoxie keine eindeutigen Unterschiede zwischen Test- und Basisgruppe. Es zeichnet sich ein geringfügiger Unterschied zwischen den Herz- und Embryonenmassen beider Gruppen ab. Beide Massen sind in der Gruppe V4N etwas geringer als in der Gruppe V4H.

4.6 Veränderungen im Hühnerembryo bei 21% O₂ in Abhängigkeit vom Alter

4.6.1 Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK



	VEGF		Enolase		PFK		AMPK	
	Mittel	s	Mittel	S	Mittel	s	Mittel	s
V0N	5,51	0,12	8,05	0,74	6,28	0,85	6,34	0,39
V1N	4,90	0,59	8,09	0,58	5,67	0,76	5,49	0,27
V2N	3,60	0,33	7,68	0,61	4,07	0,47	4,80	0,34

Abbildung 18: Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK in den Kontrollgruppen V0, V1 und V2 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die dC_T-Werte von VEGF, PFK und AMPK sinken mit zunehmendem Alter. Die dC_T-Werte der Enolase ändern sich nur sehr geringfügig. Die FC-Werte verdeutlichen die

altersabhängige Aufregulation der Genexpression. Der FC-Wert der AMPK zeigt eine signifikante Aufregulation zwischen D10 und D18 (FC=2,79; $p=2,09 \cdot 10^{-7}$). Enolase weist einen nur geringfügigen, nicht signifikanten Anstieg seiner Expression auf. Die PFK zeigt eine signifikante Aufregulation zwischen D10 und D18 (FC=5,53; $p=6,49 \cdot 10^{-7}$), sowie zwischen D12 und D18 (FC=2,92; $p=7,70 \cdot 10^{-8}$). VEGF weist ebenfalls zwischen D10 und D18 (FC=3,94; $p=1,78 \cdot 10^{-7}$), sowie zwischen D12 und D18 (FC=2,30; $p=7,96 \cdot 10^{-8}$) einen signifikanten Anstieg in der Expressionsrate auf.

Die Transkriptionsraten dieser Gene korrelieren positiv mit dem Alter der Embryonen. Für die Enolase gilt diese Aussage nicht. Allerdings ist ein tendenzieller Anstieg erkennbar.

4.6.2 Verhalten der Embryonen- und Herzmassen

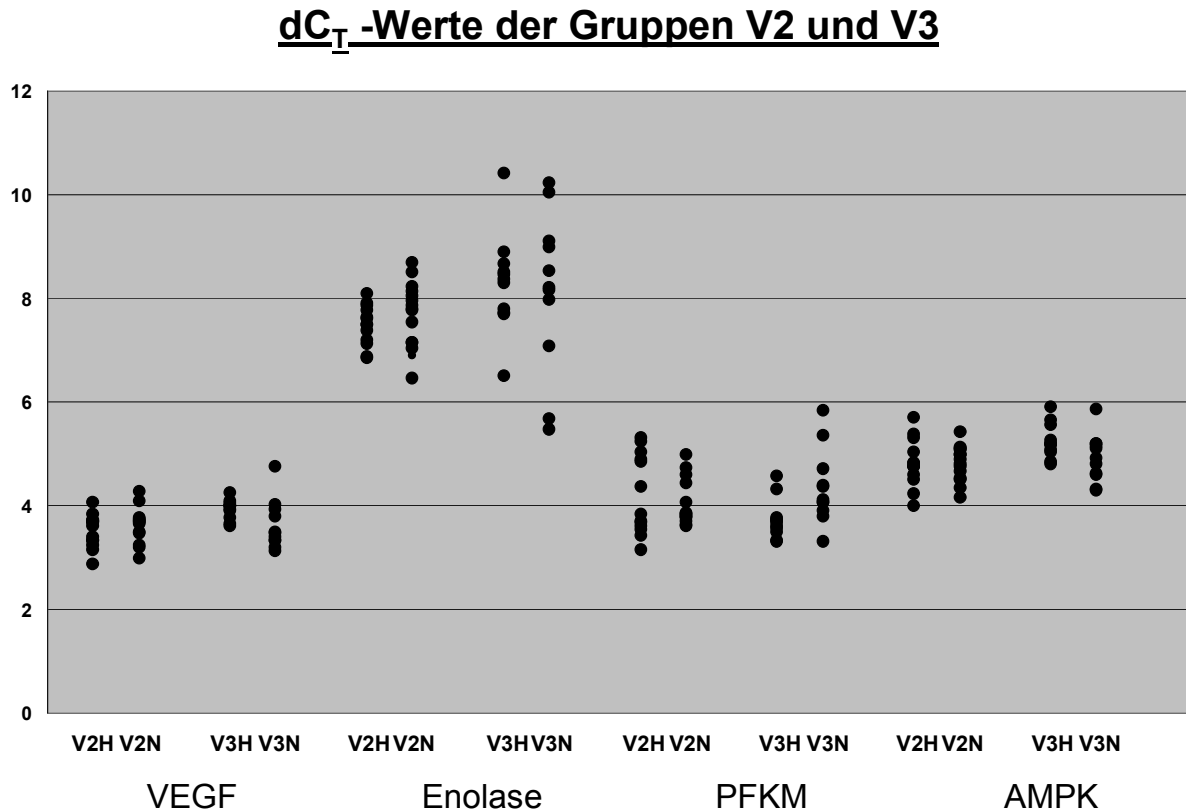
	m(H) in g		m(E) in g	
	Mittel	s	Mittel	s
V0N	0,01	0,00	1,84	0,21
V1N	0,03	0,01	3,83	0,79
V2N	0,17	0,03	17,82	2,70

Abbildung 19: Mittelwerte der Herzmassen (m(H)) und der Embryonenmassen (m(E)) in den Kontrollgruppen V0, V1 und V2 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die Gewichtsentwicklung der Herzen sowie der Embryonen korreliert erwartungsgemäß positiv mit der Inkubationsdauer.

4.7 Vergleich der Reaktionen von Hühnerembryonen auf 30 min andauernde Anoxie an D18 nach Inkubation bei 15% bzw. 21% O₂ von D6-12

4.7.1 Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK



	VEGF		Enolase		PFK		AMPK	
	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s
V2H	3,53	0,32	7,49	0,37	4,24	0,75	4,80	0,45
V2N	3,60	0,33	7,68	0,61	4,07	0,47	4,80	0,34
V3H	3,94	0,19	8,30	0,96	3,73	0,37	5,20	0,36
V3N	3,64	0,45	7,94	1,62	4,40	0,70	4,91	0,43

Abbildung 20: Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK in den Gruppen V2 und V3 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die dC_T-Werte der untersuchten Gene weisen keine wesentlichen Unterschiede auf. Die FC-Werte der untersuchten Parameter liegen beim Vergleich von V2H bzw. V2N mit V3H bzw. V3N immer im Bereich zwischen 0,5 und 2,0 und können daher, obwohl die dazugehörigen

p-Werte teilweise unter 0,05 liegen, nicht als signifikant bezeichnet werden. Weder die 30 Minuten andauernde Anoxie, noch die hypoxische Inkubation von D6-12 führen zu gesicherten Unterschieden zwischen den Gruppen auf transkriptioneller Ebene.

4.7.2 Verhalten der Embryonen- und Herzmassen

	m(H) in g		m(E) in g	
	Mittel	s	Mittel	s
V2H	0,16	0,03	16,96	2,46
V2N	0,17	0,03	17,82	2,70
V3H	0,16	0,03	17,00	3,86
V3N	0,19	0,02	19,75	2,80

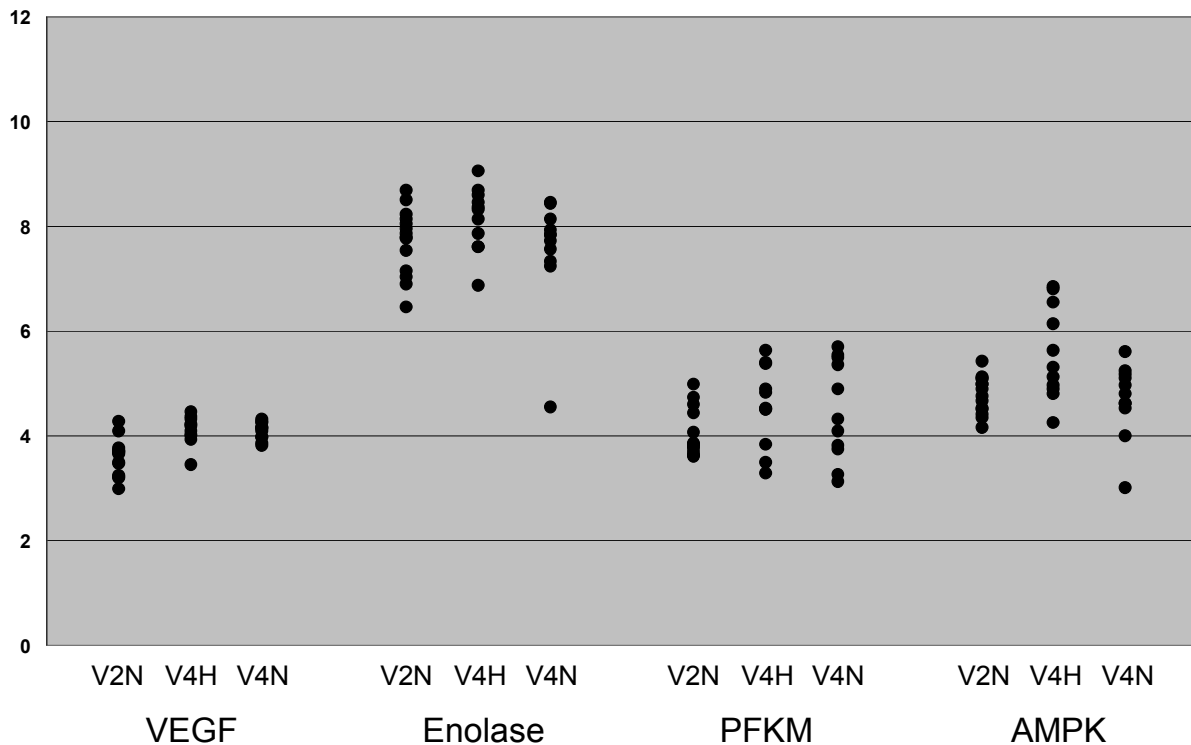
Abbildung 21: Mittelwerte der Herzmassen (m(H)) und der Embryonenmassen (m(E)) in den Gruppen V2 und V3 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Eindeutige Unterschiede in den Herz- und Embryonengewichten sind zwischen den Gruppen V2 und V3 nicht erkennbar. Die von D6-12 normoxisch bebrüteten Embryonen weisen an D18 ein tendenziell höheres Herz- und Embryonalgewicht auf (Vergleich V2H mit V2N). Diese Tendenz verstärkt sich nach 30minütiger Anoxie (Vergleich V3H mit V3N). Die Massen von Herz und Embryo der zwischen D6-12 hypoxisch inkubierten Embryonen bleiben hingegen von der 30minütigen Anoxie unbeeinflusst.

4.8 Vergleich der Reaktionen von Hühnerembryonen auf 45 min andauernde Anoxie an D18 nach Inkubation bei 15% bzw. 21% O₂ von D6-12

4.8.1 Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK

dC_T-Werte der Gruppen V2N, V4H und V4N



	VEGF		Enolase		PFK		AMPK	
	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s
V2N	3,60	0,33	7,68	0,61	4,07	0,47	4,80	0,34
V4H	4,08	0,29	8,16	0,59	4,56	0,74	5,58	0,84
V4N	4,09	0,16	7,57	1,02	4,56	0,94	4,72	0,67

Abbildung 22: Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK in den Kontrollgruppen V2 und V4, sowie der Versuchsgruppe V4 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die dC_T-Werte der untersuchten Gene zeigen keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen V2N, V4H und V4N. Die FC-Werte bestätigen diese Beobachtung. Weder

im Vergleich von V2N zu V4N, noch im Vergleich von V2N zu V4H liegen die FC-Werte außerhalb des Bereiches von 0,5 bis 2,0. Somit gibt es keine signifikante Veränderung der Genexpression nach 45minütiger Anoxie, unabhängig davon, ob die Embryonen zwischen D6-12 hypoxisch oder normoxisch bebrütet wurden.

4.8.2 Verhalten der Embryonen- und Herzmassen unter Normoxie in Abhängigkeit vom Alter an D10, D12 und D18

	m(H) in g		m(E) in g	
	Mittel	s	Mittel	s
V2N	0,17	0,03	17,82	2,70
V4H	0,17	0,02	17,01	2,00
V4N	0,16	0,03	16,86	3,08

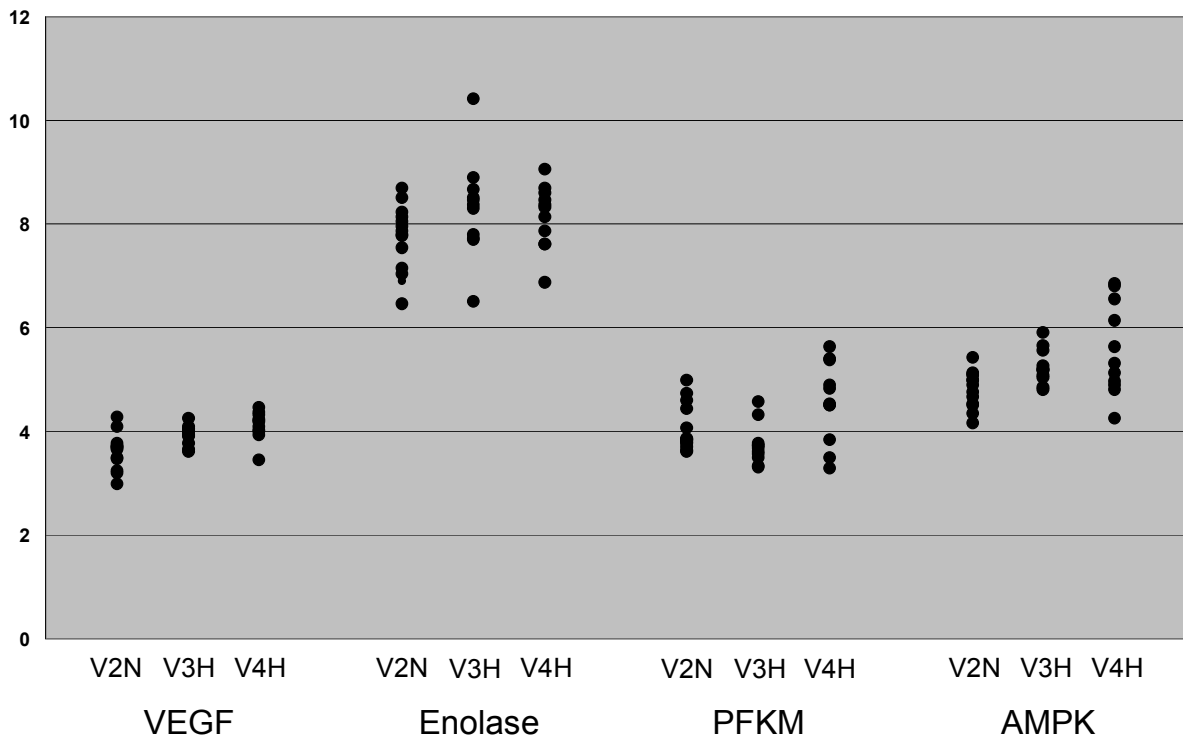
Abbildung 23: Mittelwerte der Herzmassen (m(H)) und der Embryonenmassen (m(E)) in den Basisgruppen V2 und V4, sowie der Testgruppe V4 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die Gewichte der Embryonen und ihrer Herzen weisen keine Unterschiede nach einer 45 Minuten dauernden Phase anoxischer Inkubation im Vergleich zu einem ununterbrochen normoxisch inkubierten Embryo auf.

4.9 Vergleich der Reaktion des Hühnerembryos auf 30 Minuten bzw. 45 Minuten andauernde Anoxie an D18 nach Inkubation bei 15% bzw. 21% O₂ von D6-12

4.9.1 Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK

dC_T-Werte der Gruppen V2N, V3H und V4H



	VEGF		Enolase		PFK		AMPK	
	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s	Mittel	s
V2N	3,60	0,33	7,68	0,61	4,07	0,47	4,80	0,34
V3H	3,94	0,19	8,30	0,96	3,73	0,37	5,20	0,36
V4H	4,08	0,29	8,16	0,59	4,56	0,74	5,58	0,84

Abbildung 24: Vergleich der Genexpressionsraten von VEGF, Enolase, PFK und AMPK in der Basisgruppe V2 und den Testgruppen V3 und V4 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die dC_T-Werte der untersuchten Gene weisen keine eindeutigen Unterschiede auf. Auch die FC-Werte der verglichenen Gruppen bewegen sich im Bereich zwischen 0,5 und 2,0 und

können somit trotz p-Werten unter 0,05 nicht als signifikant betrachtet werden. Trotz chronischer hypoxischer Inkubation (15% O₂) von D6-12 und akuter anoxischer Reizung an D18 über 30 bzw. 45 Minuten treten keine Veränderungen der Genexpression bei den untersuchten Genen im Vergleich zu den immer normoxisch bebrüteten Embryonen auf.

4.9.2 Verhalten der Embryonen- und Herzmassen

	m(H) in g		m(E) in g	
	Mittel	s	Mittel	s
V2N	0,17	0,03	17,82	2,70
V3H	0,16	0,03	17,00	3,86
V4H	0,17	0,02	17,01	2,00

Abbildung 25: Mittelwerte der Herzmassen (m(H)) und der Embryonenmassen (m(E)) in der Basisgruppe V2 und den Testgruppen V3 und V4 (Mittel: Mittelwert; s: Standardabweichung vom Mittelwert)

Die Herz- und Embryonalgewichte gleichen sich in den Versuchsgruppen V2N, V3H und V4H. Die chronische hypoxische Inkubation (15% O₂) von D6-12 und die akute anoxische Reizung an D18 über 30 bzw. 45 Minuten führen zu keinen Veränderungen der Herz- und Embryonenmassen im Vergleich zu einem immer normoxisch bebrüteten Embryo.

4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.10.1 Veränderungen in der Genexpression

Die Expressionsraten von VEGF, PFKM und AMPKb2 steigen mit zunehmendem Alter der Embryonen signifikant an. Diese Altersabhängigkeit ist bei der Enolase allerdings nur tendenziell erkennbar. Die Aussage gilt für alle geprüften Einflüsse. Die Enolase weist bei allen Untersuchungen sehr geringe mRNA- Konzentrationen im Vergleich zu den anderen untersuchten Parametern auf.

Chronischer Sauerstoffmangel von D6-12 hat weder eine Veränderung des mRNA-Gehaltes von VEGF, Enolase, PFKM und AMPKb2 an D12 zur Folge, noch zeigten sich sechs Tage später Veränderungen im Vergleich zur Versuchsgruppe. Dies geschieht unabhängig davon, ob die Proben nach akuter Anoxie oder unter normoxischen Bedingungen entnommen wurden.

Die Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 40,0°C in Kombination mit der Absenkung des Sauerstoffangebotes an D10 (V0H) löst eine signifikante Aufregulation der Genexpression von VEGF, Enolase und PFKM aus. Die Expression der AMPK zeigt einen tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Anstieg.

Folglich sind signifikante Aufregulationen der Genexpression nur mit zunehmendem Alter und bei einer Kombination aus akutem Sauerstoffmangel und Hyperthermie erkennbar. Chronische Hypoxie bzw. akute Anoxie führen zu keinen signifikanten Veränderungen der Genexpression aller untersuchten Gene.

4.10.2 Verhalten der Embryonen- und Herzmassen

Die chronische Reizung durch Sauerstoffmangel von D6-12 erzeugt keine Veränderung in der embryonalen Masse und nur geringfügige Unterschiede bei den Herzmassen im Vergleich zur Testgruppe. Bei akutem Sauerstoffmangel sind keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung des Embryos feststellbar. Die Embryonal- und Herzmassen der zwischen D6-12 hypoxisch inkubierten Gruppe ändern sich während akuter Anoxie tendenziell weniger, als die der stets normoxisch inkubierten Gruppe. An D18 liegt das Gewicht der immer normoxisch bebrüteten Embryonen ca. 1g und nach 30minütiger Anoxie fast 3g über dem der zwischen D6-12 hypoxisch inkubierten Gruppe. Der Durchschnittswert für die Embryonenmasse der zwischen D6-12 hypoxisch inkubierten Gruppe verändert sich nicht. Nach 45minütiger Anoxie sind die Embryonen- und Herzmassen beider Gruppen wieder fast gleich.