

III. Material und Methode

1. Herkunft der Eier

Die Untersuchungen wurden an Hühnerembryonen der Rasse „Weißes Leghorn“ durchgeführt. Diese stammten aus dem Tierstall der Veterinärmedizin der FU Berlin.

2. Verwendetes Material

2.1. Inkubationslösungen und Chemikalien

Im Text verwendeter Name	Zusammensetzung mit Produktnamen	Hersteller
Pufferlösung	SIGMA Nutrit Mixture F12 HAM	SIGMA-ALDRICH
Trypsinlösung	SIGMA Nutrit Mixture F12 HAM SIGMA Trypsin-EDTA Solution (1x)	
Nährlösung	SIGMA Nutrit Mixture F12 HAM SIGMA Fetal Bovine Serum FBS SIGMA L-Glutamin 200mM	
Isoproterenollösung	SIGMA Nutrit Mixture F12 HAM SIGMA (-)-Isoproterenol Hydrochloride	
ELISA-Kit	BIOTRAK cAMP-Enzymimmunoassay code RPN 225	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH

2.2. Geräte

Name	Hersteller
Gasmischer EL FLOW	BRONKHORST HIGH-TECH B.V.
Auto Strip Washer EL _x 50 Ultra	BIO-TEK instruments
Microplate Reader EL _x 808 KC junior	

2.3. Software

Name	Hersteller
KC Junior	BIO-TEK instruments
MS Excel	Microsoft
SPSS 10.0	SPSS Inc.

3. Inkubationsbedingungen

Die Eier wurden in einem Brutschrank mit Wendeautomatik und einem geregelten Ventilationssystem bebrütet. Die Luftfeuchtigkeit betrug 60%. Der Einlegetag, d.h. der erste Tag der Bebrütung, wurde als D1 gezählt.

Die Untersuchungen gliederten sich in zwei voneinander getrennte Versuche. Diese unterschieden sich hinsichtlich der Inkubationsbedingungen, nicht jedoch in Hinblick auf die Gewinnung und Aufbereitung der Proben.

3.1. Temperaturversuch

Die embryonierten Hühnereier wurden in drei Gruppen unterteilt. Die Kontrollgruppe wurde kontinuierlich bei $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ bebrütet. Die Bebrütung der anderen beiden Gruppen erfolgte nur bis zum D15 bei $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Ab diesem Tag erfolgte in der Kaltgruppe eine Inkubation bei $35,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ und in der Warmgruppe bei $38,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (**Abb. III.1.**).

3.2. Sauerstoffmangelversuch

Die embryonierten Hühnereier wurden in zwei Gruppen unterteilt. Die Inkubationstemperatur beider Gruppen betrug $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Die Normoxiegruppe wurde kontinuierlich unter 21% Sauerstoff bebrütet. Die Sauerstoffmangelgruppe wurde ab D12 stetig unter 15% Sauerstoff inkubiert. Die Herstellung des Gemisches erfolgte aus reinem Sauerstoff und reinem Stickstoff mit Hilfe eines Gasmischers (Firma BRONKHORST HIGH-TECH B.V.) (**Abb. III.1.**).

3.3. Entnahme der Eier

Eier aller Gruppen wurden jeweils am D18 und D20 einzeln aus dem Brutschrank entnommen und der weiteren Behandlung zugeführt (**Abb. III.1.**).

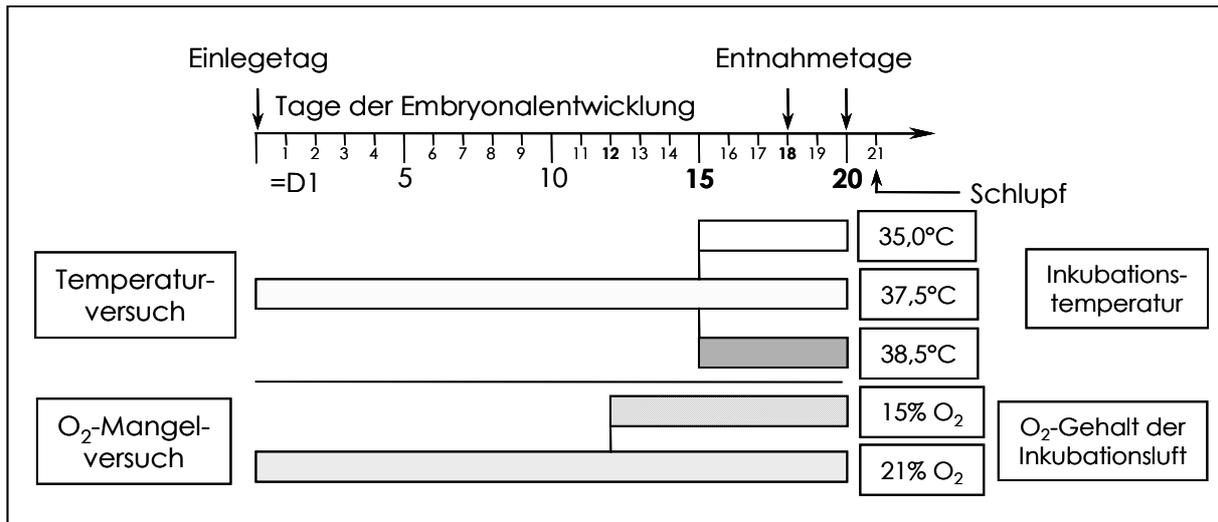


Abb.III.1. Inkubationsbedingungen

4. Gewinnung und Aufbereitung der Proben

4.1. Präparation der Hühnerembryonen

Die Eischale wurde mit Alkohol gesäubert und vorsichtig über der Luftkammer entfernt. Danach konnte der Embryo aus dem Ei entnommen und dekapitiert werden. Der Dottersack wurde vollständig aus dem Embryo vorgelagert und entfernt. Es folgte die Eröffnung der Leibeshöhle mittels eines Scherenschnittes, woraufhin das noch schlagende Herz freigelegt, an seinen Gefäßen abgetrennt und entnommen werden konnte. Daraufhin wurde es über die verbliebenen Gefäßstümpfe mit eisgekühlter Pufferlösung gespült. Die Gefäßreste wurden entfernt und das Herz mit einer Schere in stecknadelgroße Stücke zerteilt. Nach dreimaligem Spülen mit Pufferlösung wurden die Herzstücken in der Pufferlösung auf Eis gestellt.

4.2. Gewinnung der Zellsuspension

Die Herzstücken jeweils eines Tieres sind in Trypsinlösung für 5 Stunden bei 4°C inkubiert worden. Danach wurde die gekühlte Trypsinlösung durch warme ersetzt und die Probe bei 37°C für 20 min inkubiert. Anschließend folgte der Austausch der Trypsinlösung durch warme Nährlösung zur Inhibierung des Trypsins. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren konnten die angedauten Herzstückchen weiter zerteilt werden. Um noch vorhandene Gewebereste zu entfernen, wurde die entstandene Zelllösung durch sterile Gaze filtriert. Die Zellsuspension wurde bei 200x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 3 ml warmer Nährlösung resuspendiert. Die Suspension wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, um den Zellen eine Erholungsphase zu geben (Latenzzeit: 1h bis zur Einstellung des Gleichgewichtes im Elektrolythaushaltes).

4.3. Aufbereitung der Proben

Nach vorheriger Durchmischung wurde die Zellsuspension dreigeteilt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 1ml abgefüllt. Die beiden ersten Teile (A,B) dienten der späteren cAMP-Bestimmung, der dritte (C) der Zellzahlbestimmung (Abb.III.2.).

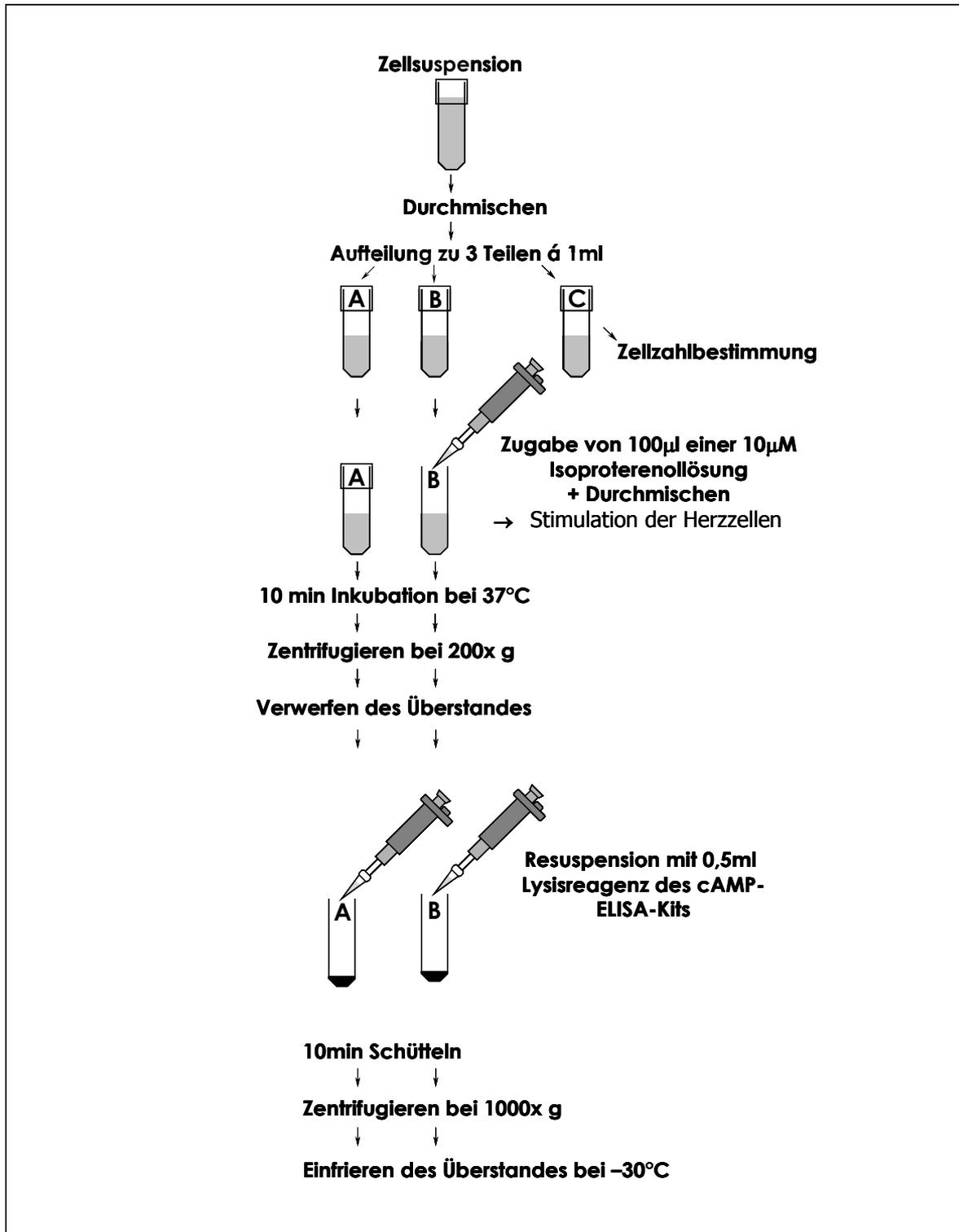


Abb.III.2. Aufbereitung der Proben

Die Suspension **B** wurde nach der Zugabe von 100µl einer 10µM Isoproterenollösung durchgemischt und zusammen mit der Suspension **A** für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach anschließendem Zentrifugieren bei 200x g wurden die Überstände verworfen und die Zellpellets in Lysislösung 1b des ELISA-Kits resuspendiert. Nach 10min Schütteln und nochmaligem Zentrifugieren bei 1000x g wurde der Überstand in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße übertragen und bei -30°C eingefroren.

4.4. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde in der Suspension **C** der Probe mittels einer Zählkammer nach NEUBAUER manuell bestimmt.

5. cAMP-Bestimmung

Zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes der Proben wurde der BIOTRAK cAMP-Enzymimmunoassay code RPN 225 der Firma Amersham Pharmacia Biotech benutzt. Zur Anwendung kam das Protokoll 3 „Intracellular cAMP Measurement using the non-acetylation EIA with novel lysis reagents“.

Testprinzip - *Das Prinzip basiert auf der Konkurrenz zwischen dem zu bestimmenden cAMP und einer festen Menge cAMP-Peroxidase-Konjugat an einer limitierten Anzahl von cAMP-spezifischen Antikörpern. Die spätere Reaktion zwischen der cAMP-gekoppelten Peroxidase und einer Substratlösung führt zu einer blauen Farbreaktion, die umso stärker ist, je weniger unkonjugiertes cAMP (zu bestimmendes cAMP) an die Antikörper gebunden hat. Mit Hilfe eines Photometers kann diese quantitativ bestimmt werden. Anhand der Standardkurve, welche aus den Extinktionswerten mitgelieferter Standardlösungen aufgestellt wurde, konnten die cAMP-Gehalte bestimmt werden.*

Es erfolgten Doppelbestimmungen von jeweils der Suspension **A** und **B** einer jeden Probe. Zum Waschen der Mikrotiterplatten kam der Auto Strip Washer EL_x 50 und für die photometrische Bestimmung der Ultra Microplate Reader EL_x 808, beides Produkte der Firma BIO-TEK Instruments, zum Einsatz. Die zum Microplate Reader mitgelieferte Software KC junior übernahm die Aufstellung der Eichkurve und die Berechnung der cAMP-Konzentrationen aus den Extinktionswerten der einzelnen Proben. Eine verwendete Eichkurve ist in **Abb.III.3.** dargestellt. Aus dem cAMP-Basalwert in Suspension **A** und dem durch ISO stimulierten cAMP-Wert in Suspension **B** wurde die relative Stimulierbarkeit des cAMP-Wertes berechnet (Stimulierbarkeit [%] = (stimulierter Wert **B** – Basalwert **A**) / Basalwert **A***100).

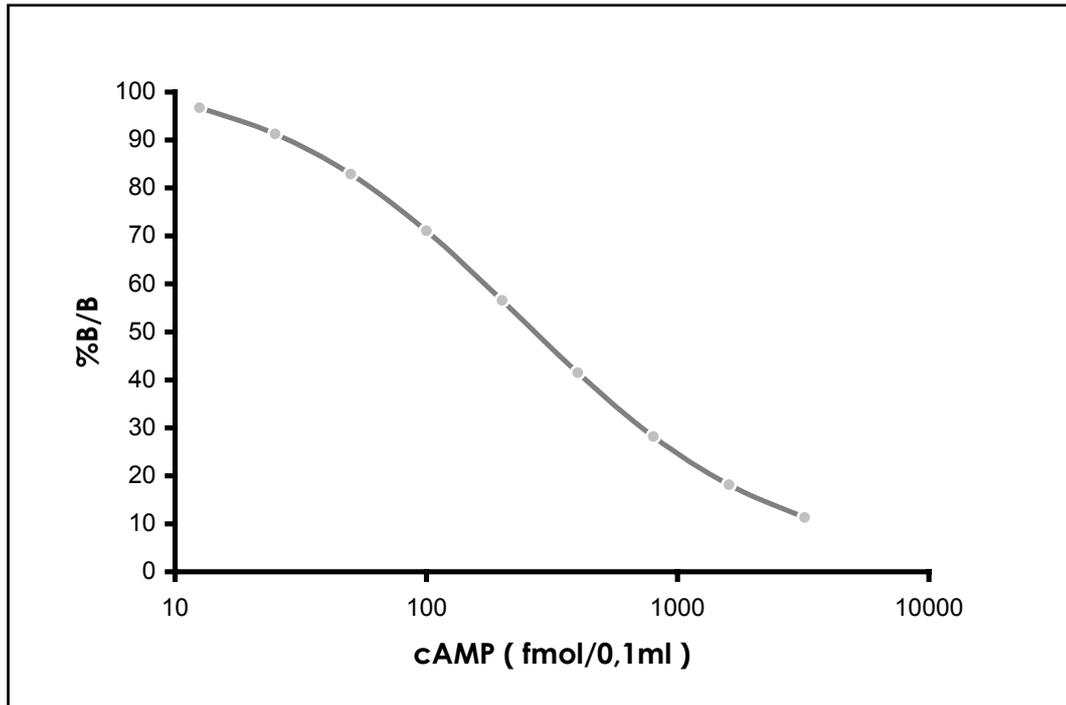


Abb.III.3. *Eichkurve des cAMP-EIA*

6. Bestimmung der Embryonen- und der Herzmasse sowie des Schlupfzustandes und der Lage des Embryos

Das Gewicht des Embryos ohne Dottersack und das des präparierten Herzens ohne Gefäßstümpfe wurde mit Hilfe einer elektronischen Waage bestimmt. Die relative Herzmasse wurde als der prozentuale Anteil der Herzmasse an der Embryonenmasse berechnet.

Während des Entfernens der Eierschale und der inneren Eimembran über der Luftkammer am stumpfen Pol des Eies und der anschließenden Vorlagerung des Embryos wurden der Schlupfzustand und die Lage des Embryos beurteilt.

- | | |
|----------------|---|
| Schlupfzustand | <ul style="list-style-type: none">• External Pipping (die Schnabelspitze hat die Eierschale durchstoßen)• Internal Pipping (die Schnabelspitze hat die innere Eimembran durchstoßen) |
| Lage | <ul style="list-style-type: none">• Normallage (Kopf und Schnabel weisen in Richtung Luftkammer)• Fehllage |

7. Statistische Analyse

Für die Auswertung der Daten wurde die Software „SPSS für Windows“ Version 10.0 (O'Superior Performing Software Systems; WSPSS, Inc.) verwendet. Es wurden ausschließlich nichtparametrische Testverfahren benutzt, da nicht von einer Normalverteilung der Werte auszugehen war. Da die Untersuchungseinheiten zueinander in unabhängiger Beziehung standen (verschiedene Individuen), wurde für den Vergleich von zwei Gruppen der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei Vorhandensein eines signifikanten Unterschiedes wird das Signifikanzniveau p angegeben. Die Nullhypothese, dass die untersuchten Gruppen der gleichen Grundgesamtheit entstammen, wurde bei $p \leq 0,10$ abgelehnt. Für die Hauptzielkriterien cAMP-Gehalt und relative Stimulierbarkeit des cAMP-Gehaltes in embryonalen Herzzellen durch ISO wurde das Signifikanzniveau aufgrund der Probleme des multiplen Testens korrigiert (Temperaturversuch $\alpha \leq 0,011$, Versuch unter verringertem O₂-Angebot $\alpha \leq 0,025$). Die weiteren Versuchsgrößen wurden nur deskriptiv betrachtet, p -Werte von unter 0,05 wurden hierbei als deutliche Unterschiede innerhalb der Stichprobe gewertet. Die Ergebnisse wurden im Sinne ihrer biologischen Relevanz und Schlüssigkeit interpretiert.

Die Ergebnisse wurden größtenteils als Box- and Whisker-Plots graphisch dargestellt (siehe **Abb.3.4.**). Diese Darstellungsart gibt eine schnelle Übersicht über die Verteilung der Werte innerhalb der Gruppen und ist gleichermaßen zum Vergleich der Gruppen untereinander geeignet. Die Box umfasst alle Werte zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil. Der Median wird durch den schwarzen Strich innerhalb der Box dargestellt. Die Querstriche über und unter der Box geben den größten und kleinsten Wert an, der kein Ausreißer ist. Ausreißer werden durch kleine Kreise dargestellt. Dies sind Werte, deren Abstand vom unteren (25%-Perzentil) bzw. vom oberen Rand der Box (75%-Perzentil) mehr als das Anderthalbfache und weniger als das Dreifache der Boxhöhe beträgt. Extreme Werte werden durch Sternchen dargestellt. Der Abstand dieser Werte von dem 25%-oder dem 75%-Perzentil beträgt mehr als das Dreifache der Boxhöhe.



Abb.3.4. Bedeutung der Darstellung als Box- and Whisker-Plots