

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Durchführungsbedingungen der Studie**

Zur Beurteilung des Einflusses einer Sauerstoffunterversorgung in der Bebrütungsluft auf die pränatale Entwicklung des Hühnerembryos wurde diese Studie zunächst als Blindstudie durchgeführt, so dass die Bebrütungsbedingungen der einzelnen Embryonen zum Zeitpunkt der Untersuchung und der Auswertungen unbekannt waren, um eine unvoreingenommene Auswertung ohne eine bestimmte Erwartungshaltung erzielen zu können. Erst nach Abschluss der mesoskopischen, lichtmikroskopischen sowie immun- und lektinhistochemischen Auswertungen der Präparate wurden die Bebrütungsbedingungen der einzelnen Embryonen entschlüsselt. Anschließend konnten die Befunde mit den Bebrütungsbedingungen korreliert werden.

### **2.2. Herkunft der embryonalen Herzen und Bebrütung der Hühnerembryonen**

Die untersuchten embryonalen Herzen stammen aus einer Studie, die im Rahmen einer Dissertation von DECKER (2002) durchgeführt wurde. Bei dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft auf bestimmte Stoffwechselfparameter des Hühnerembryos untersucht. Hierzu wurden Hühnereier der Rasse „White Leghorn“ der Firma *Lohmann Tierzucht GmbH* in Brutschränken mit Ventilationssystem und automatischer Wendevorrichtung bebrütet. Die Temperatur betrug durchgehend 37,5 °C (+/- 0,25 %), die Luftfeuchtigkeit 60 % (+/- 2 %).

Die Eier wurden nach dem Zufallsprinzip in Versuchs- und Kontrollgruppen eingeteilt, wobei die Inkubationsbedingungen der einzelnen Eier variiert wurden. Um eine Inkubationsluft mit einem Sauerstoffgehalt von 21 % zu schaffen (Gruppe 1 = Normoxie), wurden die Eier in Raumluft bebrütet. Ein verminderter Sauerstoffgehalt in der Inkubationsluft wurde über ein Gasmisch aus 15 % Sauerstoff und 85 % Stickstoff erreicht (Gruppe 2 = Hypoxie), welches in den Brutschrank eingeleitet wurde.

Die Normoxiegruppe wurde durchgehend mit 21 % Sauerstoffgehalt bebrütet, während die Embryonen der Versuchsgruppe zwischen dem sechsten und dem zwölften Bebrütungstag unter einem Sauerstoffgehalt von 15 % bebrütet wurden. In den Phasen zwischen dem ersten und dem fünften sowie dem dreizehnten und dem zwanzigsten Tag der Bebrütung wurde auch in der Versuchsgruppe unter Raumluft mit 21 % Sauerstoffgehalt bebrütet.

### 2.3. Herstellung der histologischen Präparate

Für diese Untersuchungen standen neununddreißig embryonale Hühnerherzen zur Verfügung (Tab. 2.1). Nach der Präparation der Herzen aus den Hühnerembryonen im Alter von neun bis zwanzig Bebrütungstagen unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen wurden diese in neutralisiertem 4 %igem Formaldehyd (pH 7,2) fixiert.

#### 2.3.1. Tabellarische Übersicht über die Bebrütungsdauer (in Tagen), den Probenumfang und die Inkubationsbedingungen der verschiedenen Herzen sowie die Anzahl der Herzen in den einzelnen Altersgruppen. (D = days)

Tab. 2.1.

Bebrütungsdauer \ Bebrütungsluft	D 09	D10	D 12	D 14	D 16	D 18	D 20
15 % O <sub>2</sub> = Hypoxie	0	6	4	2	2	2	2
21 % O <sub>2</sub> = Normoxie	6	3	4	2	2	2	2
Anzahl gesamt	6	9	8	4	4	4	4

Nach der Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden diese in Paraffin (*Paraplast*<sup>®</sup>, Fa., Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet. Mittels eines Schlittenmikrotomes (*Fa. Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland*) wurden Serienschritte dieser Herzen mit einer Schnittdicke von 5 µm in transversaler Schnittrichtung angefertigt. Vor der histologischen Färbung wurden die Schnitte mit Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in Aqua dest. verbracht. Nach Anwendung der im Folgenden beschriebenen histologischen Färbeverfahren wurden die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, in Xylol geklärt und mit Eukitt (*Fa. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland*) eingedeckt. Mit diesem Verfahren wurden pro Herz zwischen siebzig und zweihundert Objektträger mit jeweils drei bis vier Schnitten pro Objektträger in Serie für die Untersuchung angefertigt.

#### 2.3.2. Histologische Färbeverfahren

Im Anschluss an die Anfertigung der Schnittserien wurde ein Objektträger, im Abstand von jeweils fünf Objektträgern einer Serie, für die folgenden Färbemethoden und Spezialdarstellungen zum Nachweis bestimmter Strukturen am Herzen verwendet:

**- Hämatoxylin und Eosin (H/E)** (ROMEIS, 1989)

Mit Hämatoxylin nach MEYER (1920) werden basophile Strukturen, z. B. die Nukleinsäuren des Zellkernes, dunkelblau dargestellt. Die mit Eosin durchgeführte Gegenfärbung kennzeichnet azidophile Strukturen des Zytoplasmas, z. B. Strukturproteine des Zytoskelettes oder der Myofibrillen.

**- Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) nach McMANUS** (ROMEIS, 1989)

Diese histochemische Reaktion erfasst Glykogen, Glykoproteine und Glykolipide. Die Hydroxylgruppen der Zuckermoleküle werden durch die Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert, an die dann das Schiffsche Reagenz bindet, welches der histologischen Struktur je nach Gehalt an Zuckermolekülen eine rosa bis violette Farbe gibt. Durch eine Präinkubation mit 1 %iger Diastase zwischen Entparaffinierung und PAS-Reaktion wird das Glykogen herausgelöst, so dass nur Glykoproteine und Glykolipide angefärbt werden.

**- Trichromfärbung nach GOLDNER** (ROMEIS, 1989)

Die Trichromfärbung mit den Farbstoffen Eisenhämatoxylin, Orange G und Lichtgrün dient der Differenzierung von Epithel und Bindegewebe. Die Zellkerne beider Gewebe färben sich durch Eisenhämatoxylin blauschwarz an, die Epithelzellen nehmen eine blaurote über rote bis gelborange Farbe an und die kollagenen Fasern des Bindegewebes stellen sich grün gefärbt dar.

Die Auswertung der angefertigten histologischen Präparate erfolgte mit einem Mikroskop „Axioskop“ (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland). Die histologischen Bilder konnten mit der an das Mikroskop gekoppelten digitalen Mikroskopkamera „Prog/Res/3012“ (Fa. Kontron Elektronik, München, Deutschland) direkt an einen Personal Computer weitergeleitet werden. Zur Computer gestützten Bildbearbeitung wurde die Bildbearbeitungssoftware „Photoshop“, Version 7.0 (Fa. Adobe, San Jose, USA) verwendet.

### **2.3.3. Immun- und lektinhistochemische Nachweisverfahren**

Jeder dritte und vierte Objektträger wurde mit Silane beschichtet, bevor der histologische Schnitt auf diesen beschichteten Objektträger aufgezogen wurde, um den Schnitt für die immun- und lektinhistochemischen Untersuchungen zu verwenden.

Antikörper gehören zu einer Gruppe von Proteinen, die als Immunglobuline bezeichnet werden. Diese Immunglobuline (Ig) umfassen fünf Hauptklassen (Ig G, Ig A, Ig M, Ig D und Ig E). Die in der Immunhistochemie am häufigsten verwendeten Antikörper gehören zu den

Ig G und den Ig M. In dieser Studie wurden ausschließlich monoklonale Antikörper verwendet. Diese monoklonalen Antikörper sind das Produkt eines einzelnen Klon von Plasmazellen. Die von einem bestimmten Klon produzierten Antikörper sind identisch und reagieren nur mit einem bestimmten Oberflächenanteil, dem sogenannten Epitop des Antigens, mit dem die Plasmastammzelle immunisiert wurde. Zur Kontrolle der verschiedenen Antikörper wurden Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden, um eine spezifische Bindung des verwendeten Sekundärantikörpers auszuschließen, eine „Pufferkontrolle“ (statt des Primärantikörpers wurde Puffer auf das Präparat gegeben) an einem der Präparate auf jedem Objektträger durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden aufgrund fehlender Möglichkeit, diese an den Antigen liefernden Geweben durchzuführen, so genannte „interne positive Gewebekontrollen“ durchgeführt. Hierzu wurden Gewebe verwendet, die das gesuchte Antigen enthielten. So wurden für diese Kontrollen z. B. Dünndarm oder Uterusgewebe von Katzen verwendet. Im Falle des Anti-Cadherins wurden „interne negative Gewebekontrollen“ durchgeführt, das heißt es wurde ein Kontrollgewebe verwendet, in dem das Antigen nicht vorkommt, wie z. B. der Dünndarm der Katze, die Niere des Schweines oder die Haut des Menschen. Welches Gewebe zur Kontrolluntersuchung angewendet wurde, wird im Folgenden mit den Arbeitsprotokollen der jeweiligen Antikörper angegeben. Obwohl nach den Maßgaben bestimmter Literaturquellen und dem Datenblatt der Hersteller der Antikörper gearbeitet wurde, konnten mit dem Antikörper gegen das N-Cadherin trotz verschiedener Vorbehandlungen keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte, Wahl der verschiedenen Antikörper sowie die Bezugsquellen der verschiedenen Chemikalien für die immunhistochemischen Untersuchungen jeweils aufgeführt. Mit Ausnahme des N-Cadherin-Antikörpers, des Ulex europaeus Agglutinin, des Aleuria aurantia- und des Griffonia simplicifolia-Lektins, wurden die Untersuchungen mit den entsprechenden Antikörpern und den Lektinen an jedem der neununddreißig Herzen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch mehrfache Untersuchungen derselben Herzen auf Reproduzierbarkeit geprüft.

### 2.3.3.1. Angaben zu den verwendeten Primärantikörpern und den durchgeführten Kontrolluntersuchungen

#### 2.3.3.1.1. Myosin

**Primärantikörper:** Mouse monoklonal anti-Human smooth muscle Myosin heavy chain, SMMS – 1 ( *Fa. DakoCytomation, Carpinteria, USA*), Katalog Nr. M 3558 /LOT Nr. 020

**Kontrollen:** Negativkontrolle: Pufferkontrolle ohne den Primärantikörper  
Positivkontrolle (interne Kontrolle): Dünndarm der Katze

#### 2.3.3.1.2. Actin

**Primärantikörper:** Mouse monoklonal anti-Human smooth muscle Actin, (*Fa. Serotec, Oxford, UK*), Katalog Nr. MCA 1905

**Kontrollen:** Negativkontrolle: Pufferkontrolle ohne den Primärantikörper  
Positivkontrolle (interne Kontrolle): Dünndarm und Uterus der Katze

#### 2.3.3.1.3. Desmin

**Primärantikörper:** Mouse monoklonal anti-Human Desmin (*Fa. US- Biological, Massachusetts, USA*), Katalog Nr. D3221-10 /LOT Nr. L4551208,

**Kontrollen:** Negativkontrolle: Pufferkontrolle ohne den Primärantikörper  
Positivkontrolle (interne Kontrolle): Dünndarm und Uterus Katze, Niere des Schweines

#### 2.3.3.1.4. Vimentin

**Primärantikörper:** Mouse monoklonal anti-Human Vimentin, Clone V9 (*Fa. DakoCytomation, Carpinteria, USA*), Katalog Nr. M0725

**Kontrollen:** Negativkontrolle: Pufferkontrolle ohne den Primärantikörper  
Positivkontrolle (interne Kontrolle): Dünndarm und Uterus der Katze

### 2.3.3.1.5. N-Cadherin

**Primärantikörper:** Mouse monoklonal anti-Chicken N-Cadherin Clone Nr. 3G49 (*Fa. US-Biological, Massachusetts, USA*), Katalog Nr. C0108-35M/ LOT Nr. L4051104

**Kontrollen:** Negativkontrollen: Pufferkontrolle ohne den Primärantikörper  
Gewebekontrolle (interne Negativkontrolle): Haut des Menschen, Uterus der Katze, Niere des Schweines

## 2.3.3.1.1.1. Protokoll für die immunhistochemischen Nachweise

Tab 2.2.

	<b>Myosin</b>	<b>Actin</b>	<b>Desmin</b>	<b>Vimentin</b>	<b>N-Cadherin</b>
<b>1. Entparaffinieren mit Xylol über eine absteigende Alkoholreihe</b>	X	X	X	X	X
<b>2. Spülen mit Aqua destillata</b>	X	X	X	X	X
<b>3. Vorbehandlung mit Proteinase K/ Kochen in Aqua dest.</b>	30 min. /--	-- /--	30 min. /--	-- /--	30 min. /5 min.
<b>4. Spülen in Tris-Puffer</b>	10 min.	--	10 min.	--	10 min.
<b>5. Spülen in PBS-Puffer</b>	--	X	--	X	X
<b>6. Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung</b>	20 min.	20 min.	20 min.	20 min.	20 min.
<b>7. Spülen in PBS</b>	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
<b>8. Proteinblock</b>	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.
<b>9. Primärantikörper</b>	1:100 in PBS über Nacht	1:100 in PBS über Nacht	1:100 in PBS über Nacht	1:100 in PBS über Nacht	1:50 in PBS über Nacht
<b>10. Kontrollserum</b>	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
<b>11. Spülen in PBS</b>	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
<b>12. Sekundärantikörper</b>	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.
<b>13. Spülen in PBS</b>	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
<b>14. Detektionssystem (Streptavidin-Biotin-Peroxidase)</b>	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.	30 min.
<b>15. Spülen in PBS</b>	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
<b>16. Chromogen: Diaminobenzidin (DAB)</b>	5 - 20 min.	5 - 20 min.	5 - 20 min.	5 - 20 min.	5 - 20 min.
<b>17. Spülen mit Leitungswasser</b>	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
<b>18. Gegenfärbung mit Hämalaun</b>	10 sek.	10 sek.	10 sek.	10 sek.	10 sek.
<b>19. Absteigende Alkoholreihe</b>	X	X	X	X	X
<b>20. Xylol</b>	X	X	X	X	X
<b>21. Eindecken mit Kanadabalsam</b>	X	X	X	X	X

### 2.3.3.1.1.2. Erläuterungen zum Protokoll der immunhistochemischen Untersuchungen und Angabe der Bezugsquellen

- zu 3. Proteinase K (*Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland*) 2,5 µl verdünnt mit 1000 µl Tris-Puffer, pH 7,6
- zu 5., 7., 11., 13., 15. PBS-Puffer nach Dulbecco Kat. Nr. 47302 (*Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland*)
- zu 6. Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung (100 ml Methanol+ 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- zu 8. Protein-Block X0909 (*Fa. DakoCytomation, Carpinteria, USA*)
- zu 9. Angaben zu den Primärantikörpern (siehe oben)
- zu 10. Kontrollserum: Normalserum der Maus, Negative control Ig G1 Kat. Nr. X0931 (*Fa. DakoCytomation, Carpinteria, USA*) in einer Verdünnung von 1:200
- zu 12. Sekundärantikörper ShpXMs (Fab`2) Ig Biotin konjugiert, Kat. Nr. AQ300B, (*Fa. Chemicon, Kalifornien, USA*)
- zu 14. Detektionssystem StreptABCComplex/HRP K0377 (*Fa. DakoCytomation, Carpinteria, USA*) bei Raumtemperatur
- zu 16. POD-Nachweis mit 3,3`-Diaminobenzidine Tablets D-5905 (*Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland*) bei Raumtemperatur im Dunkeln
- zu 18. Mayers Hämalaun



### 2.3.3.2. Angaben zu den verwendeten Lektinen und den durchgeführten Kontrolluntersuchungen

#### 2.3.3.2.1. Wheat Germ-Agglutinin (WGA)

Das Wheat Germ-Agglutinin gehört zu der N-Acetylglucosamin-Gruppe der Lektine. Es besitzt eine spezifische Bindungskapazität für N-Acetylglucosamin (insbesondere Dimere und Trimere). Verwendet wurde in dieser Studie ein biotinyliertes Lektin, Kat. Nr. B-1025 (*Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland*), 1:200 mit PBS nach Dulbecco, Kat. Nr. 47302 (*Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland*), verdünnt.

**Kontrollen:** 1. 50 mg (500 mM N-Acetylgalactosamin / ml PBS) (*Fa. Vector, Burlingame, USA*)  
oder 2. 50 mg N-Acetylgalactosamin / ml 500 mM Essigsäure (*Fa. Vector, Burlingame, USA*)

#### 2.3.3.2.2. Peanut-Agglutinin (PNA)

Das Peanut-Agglutinin ist ein Lektin aus der Galactosegruppe. Wegen seiner spezifischen Bindungskapazitäten für  $\beta$ -1,3-Galactosyl- und N-Acetylgalactosamin reagiert es mit verschiedenen Anteilen des embryonalen Herzen. Zur Anwendung kam ein biotinyliertes Lektin, Kat. Nr. B-1075 (*Fa. Vector, Burlingame, USA*), 1:200 verdünnt mit PBS nach Dulbecco, Kat. Nr. 47302 (*Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland*).

**Kontrollen:** 1. PBS-Puffer nach Dulbecco Kat. Nr. 47302 (*Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland*).  
2. 200 mM Galactose (*Fa. Vector, Burlingame, USA*), 1:1 mit PNA (*Fa. Vector, Burlingame, USA*)

#### 2.3.3.2.3. Griffonia (Bandeireaea) Simplicifolia Lectin I (GSL I, BSL I)

Dieses Lektin gehört ebenfalls in die Galaktose-Gruppe. Es bindet bevorzugt an  $\alpha$ -N-Acetylgalactosamin bzw. an  $\alpha$ -Galactose. Es handelt sich um ein biotinyliertes Lektin, Kat. Nr. B-1105 (*Fa. Vector, Burlingame, USA*), 1:200 verdünnt mit PBS nach Dulbecco, Kat. Nr. 47302 (*Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland*).

**Kontrollen:** 200 mM Galactose / 200 mM N-Acetylgalactosamine / PBS, Lektinlösung und Zuckerlösung im Mischungsverhältnis 1:1

#### 2.3.3.2.4. Aleuria aurantia Lektin (AAL)

Das Aleuria aurantia Lektin ist in die L-Fucose-Gruppe der Lektine einzuordnen. Es besitzt eine Bindungsspezifität für  $\alpha$ -Fucose. Es handelt sich um ein biotinyliertes Lektin, Kat. Nr. B-1395 (Fa. Vector, Burlingame, USA), 1:200 verdünnt mit PBS nach Dulbecco, Kat. Nr. 47302 (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland).

**Kontrollen:** 1. PBS-Puffer nach Dulbecco Kat. Nr. 47302 (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland)  
2. 200 mM  $\alpha$ -Fucose (Fa. Vector, Burlingame, USA) 1:1 mit Lektin (Fa. Vector, Burlingame, USA)  
Biotinyliertes Lektin, Kat. Nr. B-1065 (Fa. Vector, Burlingame, USA), 1:200 verdünnt mit PBS nach Dulbecco, Kat. Nr. 47302 (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland).

#### 2.3.3.2.5. Ulex europaeus-Agglutinin I (UEA)

Das Ulex europaeus-Agglutinin I gehört ebenfalls der Fucose-Gruppe der Lektine an und bindet bevorzugt an  $\alpha$ -Fucose. Zur Anwendung kam in dieser Studie ein biotinyliertes Lektin, Kat. Nr. B-1065 (Fa. Vector, Burlingame, USA), 1:200 verdünnt mit PBS nach Dulbecco, Kat. Nr. 47302 (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland).

**Kontrollen:** 1. PBS-Puffer nach Dulbecco Kat. Nr. 47302 (Fa. Serva, Heidelberg)  
2. 200 mM Fucose (Fa. Vector, Burlingame, USA), 1:1 mit ULEX (Fa. Vector, Burlingame, USA), verdünnt.

## 2.3.3.2.1.1. Protokoll für die lektinhistochemischen Nachweise

Tab. 2.3.

	<b>WGA</b>	<b>PNA</b>	<b>BSL</b>	<b>AAL</b>	<b>ULEX</b>
<b>1. Entparaffinieren mit Xylol über eine absteigende Alkoholreihe</b>	X	X	X	X	X
<b>2. Spülen in Leitungswasser und Aqua bidestillata</b>	X	X	X	X	X
<b>3. 0,3 %ige Wasserstoffperoxid-Methanollösung</b>	15 min.	30 min.	15 min.	30 min.	30 min.
<b>4. 1 %iges Bovines Serum Albumin</b>	15 min.	30 min.	--	30 min.	30 min.
<b>5. Spülen in PBS-Puffer</b>	3maliges	3maliges	10 min.	3maliges	3maliges
<b>6. Proteinblock</b>	--	--	30 min.	--	--
<b>7. Inkubation mit Lektin</b>	18 Stunden in feuchter Kammer im Kühlschrank	18 Stunden in feuchter Kammer im Kühlschrank	18 Stunden in feuchter Kammer im Kühlschrank	18 Stunden in feuchter Kammer im Kühlschrank	18 Stunden in feuchter Kammer im Kühlschrank
<b>8. Spülen in PBS-Puffer</b>	15 min.	15 min.	15 min.	15 min.	15 min.
<b>9. Detektionssystem (Streptavidin-Biotin-Peroxidase)</b>	60 min.	30 min.	45 min	30 min.	30 min.
<b>10. Spülen in PBS-Puffer</b>	15 min.	15 min.	15 min.	15 min.	15 min.
<b>11. Chromogen</b>	45 sek.	45 sek.	45 sek.	45 sek.	45 sek.
<b>12. Gegenfärben mit Hämalaun</b>	--	--	15 sek.	--	--
<b>13. Spülen in Aqua bidestillata</b>	X	X	X	X	X
<b>14. Entwässern mit Xylol über eine aufsteigende Alkoholreihe,</b>	X	X	X	X	X
<b>15. Eindecken mit Kanadabalsam</b>	X	X	X	X	X

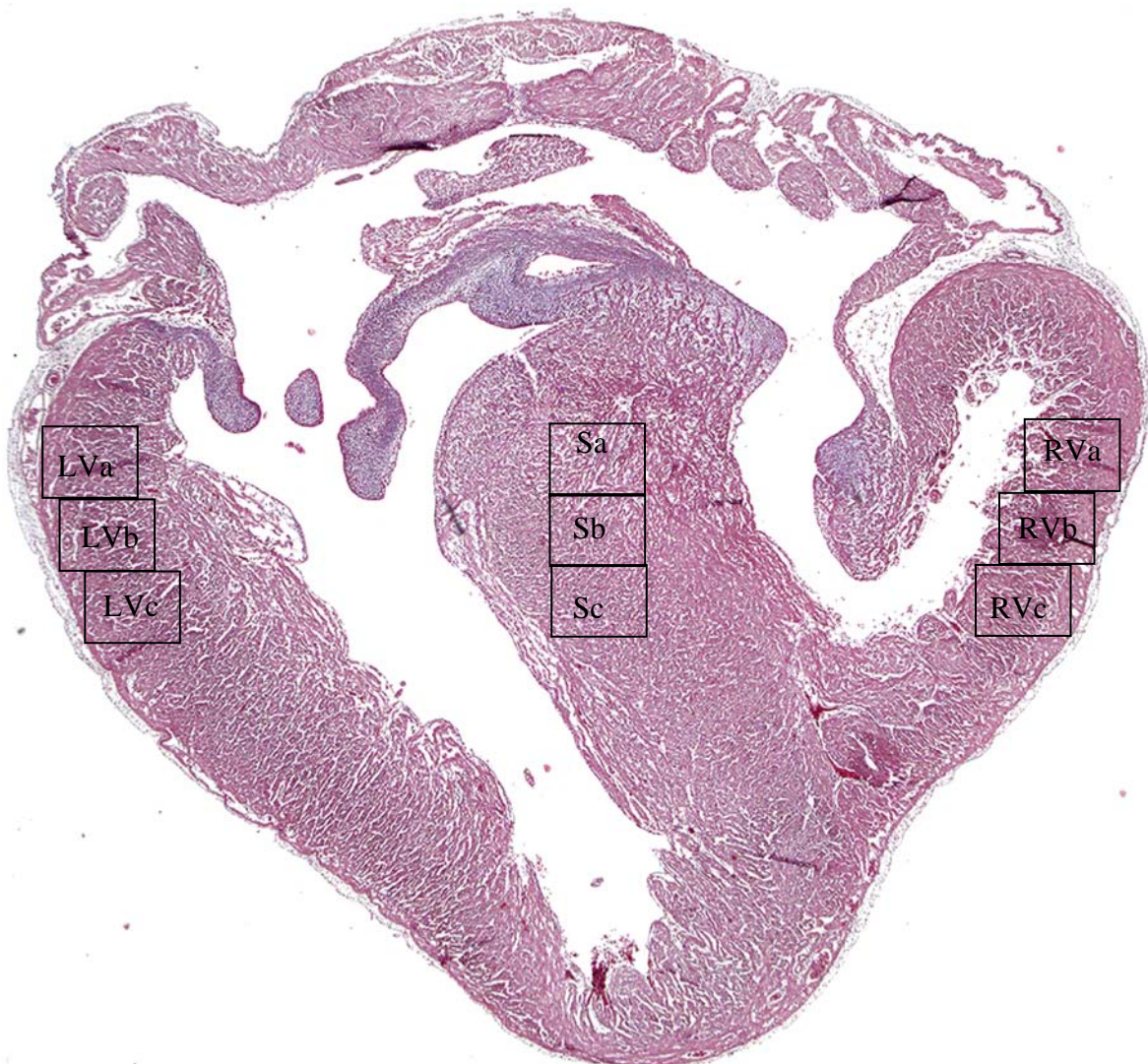
2.3.3.2.1.2. Erläuterungen zum Protokoll der lektinhistochemischen Untersuchungen und Angabe der Bezugsquellen

- Zu 3. Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung (100 ml Methanol+ 0,3 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Zu 4. 1 %iges Bovines Serum Albumin, Fraktion V (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS-Puffer, pH 7,2
- Zu 5., 8., 10. PBS-Puffer nach Dulbecco Kat. Nr. 47302 (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Zu 6. Protein Block (Fa. DakoCytomation, Carpinteria, USA)
- Zu 7. Angaben zu den einzelnen Lektinen (siehe oben) jeweils 18 Stunden Inkubation in der feuchten Kammer im Kühlschrank, 1:200 mit PBS verdünnt.
- Zu 9. StreptABC Complex / HRP K 0377 (Fa. DakoCytomation, Carpinteria, USA), 9 µl Lsg. A und 9 µl Lsg. B / ml PBS
- Zu 11. 20 mg 3,3'-Diaminobenzidine Tablets D-5905 (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) 100 ml TBS + 40 µl 30 %iges Wasserstoffperoxid, pH 7,6
- Zu 12. Mayers Hämalalaun (Romeis, 1989)

## 2.4. Morphometrische Untersuchungen

### 2.4.1. Bestimmung der Zellzahl im Myokard des embryonalen Herzens

Zur Bestimmung des Zellgehaltes im Myokard der einzelnen Herzen wurden drei lichtmikroskopische Bilder des linken Ventrikels, des Septums und des rechten Ventrikels in der 1000fachen Vergrößerung digitalisiert und die Zellkerne ausgezählt. Hierbei wurde beachtet, dass bei jedem Herz ein Transversalschnitt für die Untersuchung verwendet wurde, welcher auf Ebene der AV-Klappen angelegt wurde, so dass alle vier Kammern des Herzen sichtbar waren (s. Textabb. 2.1.).



**Textabb.: 2.1.**

Standardisierte Auswahl der Gesichtsfelder für die lichtmikroskopische Bestimmung der Zellzahlen in den einzelnen Herzwandanteilen. Linker Ventrikel (LV-a, -b, -c), Septum interventriculare (S-a, -b, -c) und rechter Ventrikel (RV-a, -b, -c).

Bei jedem Herz wurde das erste Gesichtsfeld auf Höhe der linken AV-Klappen, angrenzend an das subepikardiale Mesenchym, festgelegt. Ausgehend von diesem Gesichtsfeld wurden auf gleicher Höhe durch Verlängerung einer gedachten Horizontallinie, die obersten Gesichtsfelder im Septum interventriculare sowie im rechten Ventrikel bestimmt

Alle weiteren Felder innerhalb einer Herzwand wurden direkt angrenzend an die jeweils obersten bestimmt. (s. Textabb. 2.1).

### **2.4.1.1. Statistische Auswertung**

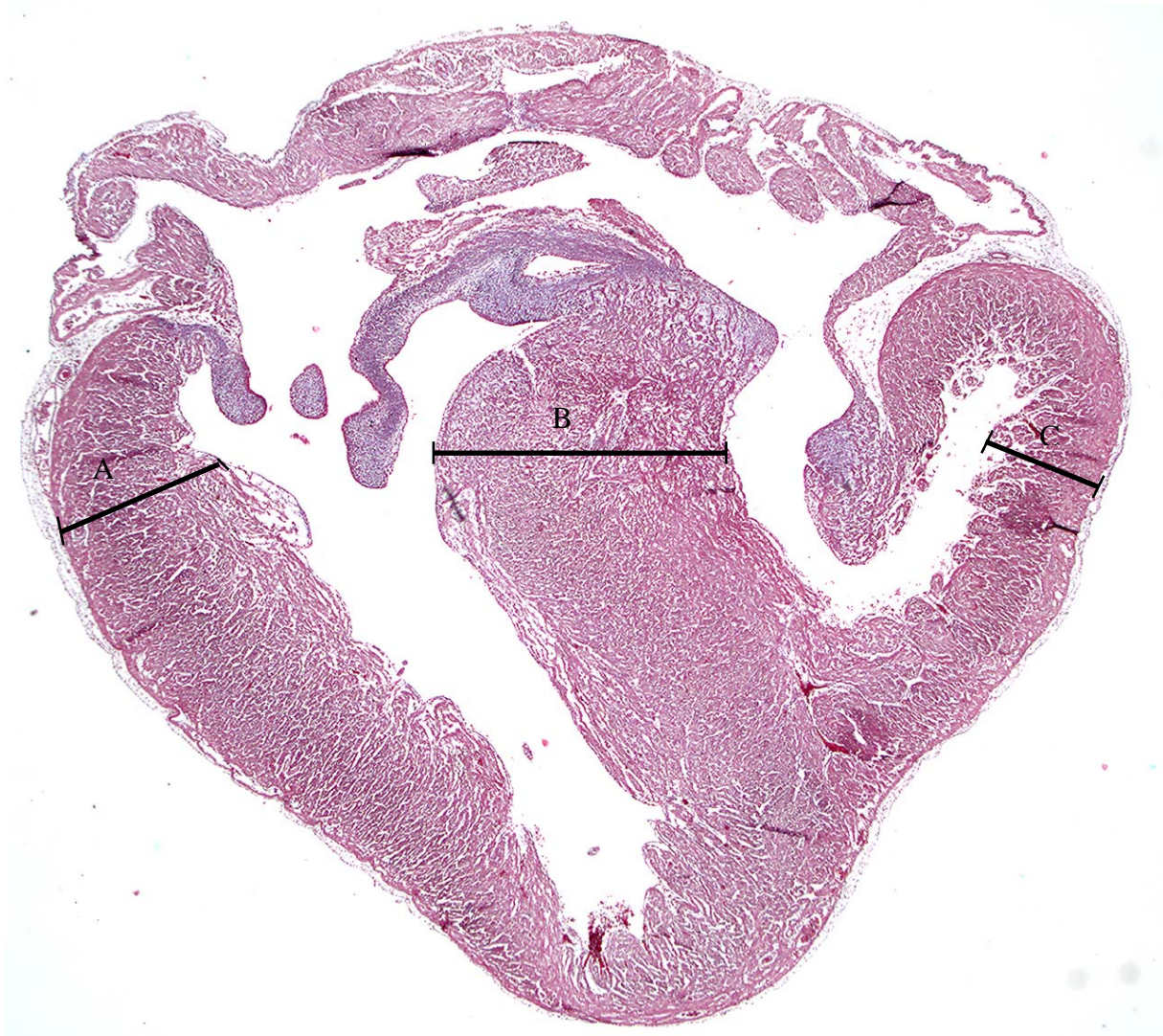
Aufgrund der mit neununddreißig Herzen nur wenig repräsentativen Stichprobe wurde für diese Arbeit eine deskriptive statistische Auswertung gewählt, die sich ausschließlich auf die untersuchten Organe bezieht und eine Verallgemeinerung z. B. auf die Tierart oder die Tierrasse nicht zulässt.

Die erhobenen Daten wurden zunächst in dem Programm Excel, Version XP (*Fa. Microsoft, Redmond/USA*) erfasst und anschließend mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 12.0 (*Fa. SPSS Software GmbH, München, Deutschland*) ausgewertet. Hierzu wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse für die einzelnen Lokalisationen am Herzen (linker Ventrikel, rechter Ventrikel und Septum interventriculare) durchgeführt. Hierbei wurden Wechselwirkungen zwischen den Altersgruppen und der Versuchs- und Kontrollgruppe analysiert. Es wurden die Residuen dieses Varianzmodelles berechnet. Mittels des Shapiro-Wilk-Test wurde die Nullhypothese Normalverteilung überprüft. Da keine Abweichungen festgestellt werden konnten, wurden für die Analyse die Mittelwerte der an drei Stellen pro Lokalisation ermittelten Zellzahlen, verwendet ohne diese Werte zu logarithmieren. Auch bei der statistischen Auswertung der Myokardbreite wurde aus Erfahrung annähernd symmetrische Verteilung angenommen, so dass für die Varianzanalyse keine Transformationen notwendig waren. Im Falle eines Alterseffektes wurden paarweise Vergleiche nach Scheffé durchgeführt. Als Beurteilungskriterium bzw. Signifikanzniveau wurde grundsätzlich ein p-Wert kleiner als 0,05 festgelegt.

### **2.4.2. Messung der Myokarddicke**

Außer den Zellzahlen wurde die Breite der einzelnen Herzwände ausgemessen. Auch hier wurde darauf geachtet, dass die zu messende Strecke der Kammerwand möglichst an der gleichen Stelle in den verschiedenen Herzen festgelegt wurde. Diese Streckenmessung erfolgte auf der Horizontalebene der AV-Klappen und zwar an demselben Transversalschnitt, der auch für die Bestimmung der Zellzahl im Myokard diente. Die Messung der

Myokarddicke erfolgte senkrecht zur Oberfläche der Herzwand (s. Textabb. 2.2.). Beide morphometrischen Untersuchungen wurden unter Zuhilfenahme des Morphometrieprogrammes LUCIA, Version 4.11 (Fa. Laboratory Imaging) durchgeführt. Zur Bildbearbeitung wurde die Bildbearbeitungssoftware Photoshop, Version 7.0, (Fa. Adobe, San Jose/USA) genutzt (s. Textabb. 2.2.)



**Textabb. 2.2.**

**Auswahl der Myokardstrecken A, B und C zur Ermittlung der Myokardbreite jeweils auf Ebene der AV-Klappen.**

## **2.5. Methoden der rasterelektronenmikroskopischen Präparation**

Zur rasterelektronenmikroskopischen Darstellung der Herzzinnenwandverhältnisse sowie für die Herstellung der mesoskopischen Aufnahmen wurden sechs weitere embryonale Hühnerherzen entnommen. Diese Herzen stammten nicht wie die für die anderen Untersuchungen verwendeten Herzen aus einem vorhergehenden Versuch, sondern sie wurden normoxisch bebrüteten Hühnerembryonen im Alter zwischen zehn und achtzehn

Tagen entnommen. Die Organe wurden frisch entnommen und zunächst in 4 %igem Formalin fixiert. Anschließend wurden die Herzen gründlich mit Aqua bidestillata gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Hexamethyldisilazanlösung (HMDS) (*Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland*) getrocknet. Die Herzen wurden mit dem elektrisch leitfähigen Klebstoff Leit C nach Göcke (*Fa. Plano, Marburg, Deutschland*) auf Objekteller aus Aluminium geklebt und dann in einem Kathodenzerstäubungsgerät (*Fa. Polaron, Watford/UK*) mit Gold zwei Minuten besputtert (= Dicke der Goldschicht ca. 0,2  $\mu\text{m}$ ). Danach konnten die Proben im Rasterelektronenmikroskop vom Typ Nanolab 2000 (*Fa. Bausch & Lomb, Canada*) untersucht werden. Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder wurden digitalisiert direkt an einen Personal Computer übertragen.