

## 4. Diskussion

### 4.1. Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, die im Verlauf der embryonalen Entwicklung von Säugetieren und somit auch dem Menschen auftreten, stehen oft im Zentrum wissenschaftlicher Untersuchungen. Auch aus den Untersuchungen innerhalb dieses Dissertationsprojektes sollten Erkenntnisse gewonnen werden, die möglicherweise ungleich aufwendigere Säugetierversuche vermeiden können. Zur Auswirkung einer Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft auf die Entwicklung des Hühnerembryos ist bekannt, dass in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt, der Dauer und dem Ausmaß der Sauerstoffreduktion der embryonale Blutkreislauf und der Stoffwechsel mit verschiedenen Kompensationsmechanismen einer drohenden Sauerstoffmangelsituation, in den verschiedenen embryonalen Geweben entgegen wirken können. Sauerstoffmangelsituationen, die zu einer Unterversorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff führen, können lokale Ursachen haben oder systemisch bedingt sein. Lokale Unterversorgungen der Herzmuskulatur, die zu einer Hypoxie im Herzmuskel führen, sind meistens Folge einer Reduktion in der nutritiven Versorgung des Herzmuskelgewebes (beispielsweise durch einen Verschluss der Herzkranzgefäße beim Herzinfarkt). Während solche gravierenden und akuten Unterversorgungen meistens zu einem plötzlichen Versagen des Herzmuskelgewebes und damit der Funktion des Herzens führen, sind systemische Ursachen, die eine Dysfunktion des Herzens bedingen, aufgrund der Fähigkeit des Organismus, verschiedene Kompensationsmechanismen „einzuschalten“, längerfristig bestehend und führen erst in der letzten Konsequenz zu einer Dekompensation des Herzens bzw. zum Herzversagen. Gegenüber den akuten, lokalen Ereignissen, die zwangsläufig zu einer Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff, also zu einer Hypoxie am Herzmuskel führen, ist bei den systemischen Veränderungen der Sauerstoffverfügbarkeit nicht genau abzugrenzen, ob und wann beispielsweise eine respiratorische Sauerstoffunterversorgung auch zu einer Hypoxie im Herzmuskelgewebe führt bzw. wie lange und wie effektiv die Kompensationsmechanismen zur Vermeidung einer Hypoxie am Herzmuskel greifen. Generell sollte das Herz, wie auch andere metabolisch hochaktiven Gewebe, eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einer Sauerstoffmangelsituationen haben. So können Säugetiere einschließlich des Menschen längere Phasen in reduziert sauerstoffhaltiger Luft, wie z. B. beim Aufenthalt in Höhenluft, überstehen. Eine Vielzahl von Spezies hat sich im Laufe der Evolution gut an solch scheinbar schwierige Bedingungen angepasst. So besitzen auch Vögel eine hohe Anpassungsfähigkeit an eine

Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes in der Umgebungsluft. Diese Adaptation erfordert nicht nur schützende Mechanismen, sondern auch Anpassungsmechanismen, die potenziell pathologisch werden können. Zum Tragen kommen zum einen Mechanismen, die den foetalen Metabolismus beeinflussen, und solche, die den foetalen Sauerstofftransport optimieren. Eine Reihe von Studien (DUSSEAU et al., 1986; DZIALOWSKI et al., 2002; DECKER, 2003; HÜHNKE, 2003) haben belegt, dass der im Ei heranwachsende Embryo grundsätzlich eine hohe Anpassungsfähigkeit an äußere Stressoren besitzt. Im Zuge der embryonalen Entwicklung können Entwicklungsphasen registriert werden, in denen die Sensibilität für solche „Stressoren“ erhöht zu sein scheint bzw. in denen der Embryo resp. der Foetus nachweislich in der Lage ist, auf bestimmte Umwelteinflüsse und veränderte Inkubationsbedingungen mit Adaptationsreaktionen zu antworten (ADAIR et al., 1987; DUSSEAU et al., 1986; DZIALOWSKI et al., 2002; STRICK et al., 1991). Eine solche „sensible Phase“ oder ein solches „kritisches Zeitfenster“ wurde aufgrund unterschiedlicher Studien für den Hühnerembryo zwischen dem sechsten und dem zwölften Bebrütungstag definiert (DUSSEAU et al., 1986; DZIALOWSKI et al., 2002), so dass auch für die vorliegende Studie das „Fenster“ für die Bebrütung in Sauerstoff reduzierter Luft in der Versuchsgruppe zwischen dem sechsten und dem zwölften Bebrütungstag gewählt wurde. In solchen „kritischen Zeitfenstern“, in denen Adaptationsmechanismen unabhängig von einer genetischen Disposition ablaufen, findet eine Prägung statt, die somit zwar angeboren, aber nicht vererbt ist (HÜHNKE, 2003). Humanmedizinische Studien zum Thema dieser epigenetischen Adaptation zeigten beispielsweise, dass Kinder von Frauen, die während der Schwangerschaft eine gestörte Glukosetoleranz entwickeln, bereits während der embryonalen Entwicklung in Richtung Übergewicht, metabolisches Syndrom und Diabetes mellitus programmiert werden, und somit der Foetus dabei einen intrauterin erworbenen Hyperinsulinismus „erlernt“ und diesen häufig lebenslang beibehält (PLAGEMANN, 2003). Untersuchungen zu epigenetischen Einflüssen können jedoch genau genommen nur an genetisch vollkommen gleichen Tieren vorgenommen und anschließend verglichen werden. Der im Ei heranwachsende Embryo bietet zwar bessere Möglichkeiten zur Durchführung einer solchen Vergleichsstudie als ein vom maternalen Organismus beeinflusster Säugetierembryo, dennoch können epigenetische Faktoren nur an Hühnereiern bzw. -embryonen der selben spezifisch pathogenfreien Elterntiere und unter den selben Bebrütungsbedingungen untersucht werden, so dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie nur unter Vorbehalt als „epigenetische Einflüsse“ diskutiert werden.

## **4.2. Anpassungsmechanismen als Reaktion auf eine Unterversorgung mit Sauerstoff**

Wie bei Bergsteigern während eines anhaltenden Aufenthaltes in der Höhenluft (z. B. bei einer Besteigung des Mount Everest), kommt es auch bei chronisch mit Sauerstoff unversorgten Tieren zu einer Erhöhung der Erythrozytenzahl und damit verbunden zu einer Erhöhung des Hämatokritwertes, sowie zu einem Anstieg des Hämoglobingehaltes der Erythrozyten (TAZAWA et al., 1971) und somit zur Optimierung des Sauerstofftransportes im Organismus. Bei den Embryonen aus denen die in der vorliegenden Studie untersuchten Herzen stammen, konnte DECKER (2002) bei einer Bebrütung dieser Tiere in Sauerstoff reduzierter Luft zwischen dem sechsten und dem zwölften Tag der embryonalen Entwicklung keine signifikante Veränderung des Hämatokritwertes in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe feststellen. Auch der Hämoglobingehalt stieg nur altersabhängig und in beiden Gruppen gleichermaßen. DZIALOWSKI und Mitarbeiter (2002) beschrieben im Gegensatz dazu auch für den sich zwischen dem sechsten und zwölften Bebrütungstag unter Sauerstoffreduktion entwickelnden Hühnerembryo einen Anstieg des Hämatokritwertes, der allerdings bis zum Schlupf wieder das gleiche Niveau erreichte wie bei den Tieren der Kontrollgruppe. Bis auf eine Abnahme der Körpermasse bei den mit reduziertem Sauerstoffgehalt bebrüteten Hühnerembryonen konnte DECKER (2002) auch bei den anderen von ihr bestimmten Parametern (Herzmasse, Catecholaminkonzentration) keine signifikanten Unterschiede feststellen. So herrscht nach den bisherigen Studien Uneinigkeit darüber, ob eine kurzfristige Bebrütung von Hühnerembryonen mit einem niedrigeren Sauerstoffgehalt in der Bebrütungsluft sich überhaupt systemisch auf bestimmte Blutparameter und den Metabolismus oder lokal auf die Funktion und die Struktur des Herzens auswirkt, da der Embryo offensichtlich eine hohe Toleranz gegenüber Sauerstoffreduktionen in der Bebrütungsluft besitzt, so dass es gar nicht erst zu einer Hypoxie im Herzmuskelgewebe kommt. So ist der Definition nach der Ausdruck „hypoxische Bebrütung“ ungenau, da eine Hypoxie nur im Organismus oder in bestimmten Geweben, nicht aber in der Luft vorliegen kann. So ist in der vorliegenden Arbeit auch dann, wenn von einer hypoxischen Bebrütung die Rede ist, tatsächlich eine Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft gemeint. Der Grund für eine solch hohe Toleranz des embryonalen Herzens gegenüber einer verringerten Sauerstoffverfügbarkeit ist die Tatsache, dass das unreife Herz einen geringeren Energiebedarf als das adulte Herz hat und zudem in der Lage ist, diesen Energiebedarf weitgehend durch anaerobe Glykolyse zu decken. Hinzu kommt eine größere Reserve an Glykogen im Vergleich zu dem adulten Herzen (OSTADAL et al., 1999).

Neben den Untersuchungen von DECKER (2002) beschrieben DZIALOWSKI und Mitarbeiter (2002) für den zwischen dem sechsten und dem zwölften Bebrütungstag „hypoxisch“ bebrüteten Hühnerembryo signifikant größere Herzen, wohingegen andere, auf die Morphologie von phänotypischen Merkmalen bezogene Parameter, wie die Schnabellänge oder die Zehenlänge, keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. DZIALOWSKI und Mitarbeiter (2002) beschrieben zudem, dass die unter der Reduktion des Sauerstoffgehaltes veränderten Parameter wie z. B. die Herzmasse oder der Hämatokrit, bis zum Zeitpunkt des Schlupfes in den unterschiedlichen Gruppen (Versuchsgruppe versus Kontrollgruppe) wieder statistisch identisch waren. Ähnliche Ausgleichsreaktionen bei veränderten Parametern innerhalb der Versuchsgruppe (Hypoxie) in Anpassung an die Kontrollgruppe bis kurz vor dem Schlupf beschreibt auch DECKER (2002) für den Stoffwechselmetaboliten 2,3-Diphosphoglycerol (2,3-DPG), der als allosterischer Effektor eine wichtige Rolle in der Affinität des Hämoglobins für Sauerstoff spielt. ACKERMANN und Mitarbeiter (1980) ermittelten bei der signifikant verminderten Körpermasse „hypoxisch“ bebrüteter Embryonen ebenfalls eine Anpassung an die Gewichte der Kontrollgruppe bis kurz vor dem Schlupf. Es ist anzunehmen, dass neben den oben genannten Gründen für eine hohe Toleranz auch die Ereignisse im Zuge der embryonalen Entwicklung bzw. die damit verbundenen Fähigkeiten zur Adaptation des Embryos an Sauerstoff reduzierte Bedingungen eine große Rolle spielen. So erfolgt beispielsweise über die Chorioallantoismembran (CAM) eine Optimierung der Sauerstoffverfügbarkeit des Hühnerembryo genau innerhalb des „kritischen Zeitfensters“ zwischen dem sechsten und dem zwölften Bebrütungstag, in der nach DZIALOWSKI und Mitarbeitern (2002) die CAM von einer fünfunddreißigprozentigen Abdeckung der Eischaleninnenfläche bis auf eine hundertprozentige heranwächst. Obwohl mit dem Erreichen der hundertprozentigen Abdeckung eine weitere Ausdehnung der CAM zur Verbesserung der Sauerstoffaufnahme unmöglich wird, ist nach DUSSEAU und Mitarbeitern (1988) eine Erhöhung der Kapillardichte innerhalb der CAM möglich, die wiederum zu einer besseren Sauerstoffversorgung führt, aber zugleich vom Herzen eine höhere Leistung abfordert, da mit der höheren Kapillardichte ein erhöhter Fließwiderstand verbunden ist (gleiche Folgen durch übermäßig ausgebildetes, sehr gut kapillarisiertes Fettgewebe für das Herz und den Kreislauf). Den Untersuchungen innerhalb dieser Studie wurden die Herzen der von DECKER (2002) für ihre physiologischen Untersuchungen verwendeten Embryonen zugrunde gelegt. Es wurde untersucht, ob die für diese Embryonen von DECKER (2002) beschriebenen Fähigkeiten zur Adaptation möglicherweise strukturell nachweisbare „Spuren“ an den Herzen hinterlassen haben. So ist es denkbar, dass der in anderen Studien (s. o.) beschriebene Anstieg der

Erythrozytenzahl, des Hämatokritwertes und des Hämoglobingehaltes durch die Veränderungen der Fließeigenschaften des Blutes auch funktionelle Anpassungen des Herzens bedingen, denen nach HOMBERGER (2000) immer auch strukturelle Veränderungen zugrunde liegen müssen. Dem von STROHL (1910) beschriebenen kurzzeitigen Anstieg der Herzfrequenz und des Herzminutenvolumens folgt eine langfristig erhöhte Kontraktionskraft des Herzmuskels als Reaktion auf den erhöhten Fließwiderstand des Blutes.

Die Funktion des Herzmuskels, mit einer erhöhten Kontraktionskraft reagieren zu können, ist an den Gehalt kontraktile Elemente in den Kardiomyozyten und an das frühe Zusammenwirken der Herzmuskelzellen als Synzytium gekoppelt. Diese möglicherweise erhöhte Anforderung an das embryonale, noch in der Entwicklung befindliche Herz wurde mit lichtmikroskopischen, immunhistochemischen und morphometrischen Methoden dokumentiert.

### **4.3. Zur Methodik dieser Studie**

Bei den vierzig untersuchten embryonalen Herzen handelte es sich nicht, wie bereits erwähnt, um eine zufällig gezogene Stichprobe aus einer Population von Hühnerembryonen, sondern es wurden die entnommenen Organe einer vorhergehenden physiologischen Studie zum Einfluss einer Hypoxie auf den Catecholaminhaushalt und verschiedene Stoffwechselmetabolite im Blut von Hühnerembryonen verwendet. Die Bewertung der Herzen erfolgte im Blindversuch. Zunächst wurde ausschließlich durch die lichtmikroskopische Betrachtung der Herzen versucht, eine Differenzierung der beiden Gruppen (Versuchsgruppe = Hypoxie und Kontrollgruppe = Normoxie) anhand von offensichtlichen strukturellen Unterschieden zu erzielen. Darüber hinaus wurden immunhistochemische und morphometrische Methoden angewandt, um eine mögliche strukturelle Anpassung des Arbeitsmyokards an einen reduzierten Sauerstoffgehalt in der Bebrütungsluft zu erfassen. Hierzu wurden Antikörper gegen verschiedene Muskelproteine und Lektine verwendet, die laut der in der Literatur beschriebenen Studien eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung von Vögeln und Säugetieren spielen. Mit den verschiedenen Antikörpern sollte der Differenzierungsgrad der zu untersuchenden Herzmuskelzellen über den Gehalt an kontraktile Elementen bestimmt werden. Zudem wurden morphometrische Untersuchungen durchgeführt, um der Fragestellung der Veränderung der Herzmasse auch auf struktureller bzw. zellulärer Ebene nachzugehen. Grundlegend wurde angenommen, dass eine Reduktion der Sauerstoffversorgung möglicherweise eine verstärkte Mitoseaktivität der Zellen initiiert und damit eine frühere Differenzierung bzw. Reifung des Myokards erfolgt, um der geforderten Mehrarbeit

des Herzens zur Aufrechterhaltung des Kreislaufes gerecht zu werden. Im Folgenden sollen die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie vor diesem Hintergrund diskutiert werden.

#### **4.4. Lichtmikroskopische Betrachtung der Herzen**

Die Literaturangaben über die sehr frühe Entwicklung des Herzens beim Huhn vom tubulären Organ mesodermalen Ursprunges zum septierten, vierkammerigen Organ sowie über den allgemeinen Aufbau des adulten Vogelherzens sind weitgehend übereinstimmend mit den eigenen Untersuchungsergebnissen, wohingegen die Beschreibung der embryonalen Entwicklung des Hühnerherzens bzw. diejenige der morphologischen Merkmale dieser Entwicklung in der Literatur weitgehend uneindeutig oder unvollständig sind. Lichtmikroskopisch konnten Veränderungen der Myokardstruktur mit zunehmendem Alter der untersuchten Embryonen festgestellt werden. Die konstatierte physiologische Massenzunahme und Reifung des Myokards wurde bei den Herzen der unterschiedlichen Versuchsgruppen in gleichem Maße dokumentiert, so dass mit dieser Untersuchung keine Abhängigkeit der Entwicklung des Herzens von einer Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft belegt werden konnte. Die bei einigen Herzen beobachtete Verdickung der Herzwand bzw. des Septum interventriculare wurde als möglicher Hinweis auf die Folge einer Sauerstoffunterversorgung in der Bebrütungsluft gewertet und anschließend durch die morphometrischen Untersuchungen bzw. die Bestimmungen der Zellzahlen verifiziert (s. u.).

##### **4.4.1. Differenzierungsrichtung in der Entwicklung des Myokards**

In einigen mit histologischen Standardfärbungen behandelten Präparaten wurde eine stärkere Anfärbbarkeit der subendokardial gelegenen Myokardzellen beobachtet. Eine solch höhere Azidophilie könnte ein Hinweis auf einen höheren Reifegrad dieser Zellen sein, da der höhere Gehalt an kontraktilen Elementen zu diesem Färbeverhalten führt. Diese Schlussfolgerung bestätigt die Ergebnisse verschiedener anderer Studien. So zeigten die Untersuchungen von TOKUYASU (1987), dass die Myokardzellen in den weniger stark proliferierenden Myokardtrabekeln einen höheren Differenzierungsgrad aufwiesen als jene des kompakten Myokards. Dieses subepikardial gelegene kompakte Myokard wird in dieser Studie aufgrund seiner höheren Proliferationsrate als Quelle für die Kardiomyozyten zum Aufbau des trabekulären Myokards angesehen, wobei die Autoren unerwähnt ließen, wie diese höhere Proliferationsrate der Kardiomyozyten bestimmt wurde. Der höhere Differenzierungsgrad in dem trabekulären Teil des Myokards steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Myosin-expression. Auch SEDMERA und Mitarbeiter (2002) verwendeten in ihren Untersuchungen

die Anfärbarkeit des Zelleibes der Myokardzellen als Differenzierungsmarker. Die eigenen Untersuchungen ergaben zudem erhöhte Glykogengehalte in den subendokardial gelegenen Kardiomyozyten. Diese hohen Glykogengehalte weisen auf einen höheren Energiebedarf dieser reiferen und somit aktiveren subendokardialen Myokardzellen hin und unterstützen damit die Vermutung einer beschleunigten Entwicklung des Arbeitsmyokards ebenso, wie die Literaturangaben zu regionalen Größenunterschieden dieser Kardiomyozyten. LOUD und Mitarbeiter (1978) fanden heraus, dass die Myozytenquerschnittsfläche im Endomyokard (= subendokardiales Myokard) um 26 % größer ist als im Epimyokardbereich (= subepikardiales Myokard). Für das Säugetierherz werden grundsätzlich subendokardial größere Kardiomyozyten als subepikardial gelegene beschrieben (GERDES u. KASTEN, 1980; STOKER et al., 1982; GERDES, 1986), eine Aussage, die möglicherweise auch für das Vogelherz zutrifft. Geht man also von einem erhöhten Reifegrad der lumennahen, subendokardialen Myokardzellen aus, so ist auch durch diese Studie bezüglich der Differenzierungsrichtung der myokardialen Zellen belegt, dass das Myokard in seiner Entwicklung von innen nach außen fortschreitet, und somit im histologischen Präparat ein von epikardial nach endokardial zunehmendes Maß an Differenzierung der Zellen zu finden ist, so dass die reiferen, differenzierteren Zellen subendokardial liegen.

Die in dieser Studie auch rasterelektronenmikroskopisch dargestellten, nicht mit Endothel ausgekleideten Zwischenräume bzw. „Spalten“ auch im bereits kompakten Myokard der älteren Herzen sind möglicherweise mit interzellulärer Flüssigkeit gefüllte Räume, die eine Funktion als „Platzhalter“ besitzen. Das in Abhängigkeit vom Alter an Zellen und somit an Masse zunehmende Myokard nimmt diese Zwischenräume möglicherweise ein, indem es die interzelluläre Flüssigkeit in die Zellen resorbiert und damit das Zellvolumen den „Freiraum“ einnimmt. In der Anzahl bzw. dem Auftreten dieser „Spalten“ wurde jedoch keine Korrelation mit der Zugehörigkeit zur Hypoxie- bzw. Normoxiegruppe festgestellt.

#### **4.4.2. Bedeutung des subepikardialen Mesenchym als Quelle sich differenzierender Myokardzellen**

Die Kardiomyozyten differenzieren sich aus den Vorläuferzellen der kardiogenen Platte im Primitivstreifen (CHRIST u. WACHTLER, 1998), wobei häufig auch das subepikardiale Mesenchym mit seinen Stammzellen als Ursprungsgewebe sich differenzierender Myokardzellen beschrieben wird. Die von MORRIS und Mitarbeitern (1976) erzielten Ergebnisse geben deutliche Hinweise darauf, dass das subepikardiale Mesenchym als eine kontinuierliche Quelle für Kardiomyoblasten anzusehen ist. Basierend auf dieser Hypothese und der

Tatsache, dass das subepikardiale Mesenchym ein Produkt der proepikardialen Serosa ist (VAN EIJNDE et al., 1995; PEREZ-POMARES et al., 1997), kann man vermuten, dass einige myokardiale Zellen des erwachsenen Herzens, speziell die der subepikardial gelegenen Myokardschicht, möglicherweise ein Produkt des in erster Linie „extrakardialen“ Mesenchymes der proepikardialen Serosa sind (MÄNNER, 1999). MUNOZ-CHAPULI und Mitarbeiter (2002) beschreiben das subepikardiale Mesenchym als zusätzliche Quelle für Muskelzellen sowohl für das Säugetierherz als auch für das Vogelherz. Diese einwandernden Muskelzellen sollen vornehmlich am Aufbau von Gefäßen beteiligt sein. Die Invasion des Myokards mit Zellen epikardialer Herkunft, die so genannten Epicardial Derived Cells (EPDC), steht in zeitlichem Zusammenhang mit der myokardialen Kompaktierung des Herzmuskelgewebes. Eine Beteiligung des subepikardialen Mesenchymes am Aufbau des Arbeitsmyokards durch sich zu Kardiomyoblasten differenzierenden Zellen ist bisher jedoch nicht beschrieben worden.

Die eigenen Untersuchungen an den embryonalen Hühnerherzen zeigten, dass jenes subepikardiale Mesenchym eines sich noch in Entwicklung befindlichen Herzens (D 10 – D 16) dicker ist als in einem Herzen, dessen pränatale Entwicklung nahezu abgeschlossen ist (D 18 – D 20). Zudem scheinen bei den verschiedenen Herzen unterschiedliche Gehalte an mesenchymalen Zellen und auch an Variationen bezüglich der Form von Zellen innerhalb dieser Schicht vorzuliegen. Eine Korrelation der Veränderung des subepikardialen Mesenchym zur Sauerstoffunterversorgung ist jedoch fraglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

### **4.5. Immunhistochemische Untersuchung der embryonalen Herzen**

Wie bereits erwähnt, ist die Funktion des Herzmuskels eng an den Gehalt von kontraktile Elementen aus Strukturproteinen (z. B. Actin und Myosin) in den Kardiomyozyten gebunden. Mittels verschiedener Antikörper wurde versucht, diese Unterschiede im Differenzierungsgrad der Kardiomyozyten innerhalb der einzelnen Alters- und zwischen den Versuchsgruppen festzustellen, um so möglicherweise eine frühere Differenzierung der unter einer Sauerstoffreduktion bebrüteten Kardiomyozyten nachweisen und von den entwicklungsbedingten resp. altersbedingten Veränderungen abgrenzen zu können.

#### **4.5.1. Anti-Myosin**

Der Antikörper gegen das smooth-muscle Myosin aus der Maus zeigte eine Kreuzreaktivität mit dem Muskelgewebe embryonaler Hühnerherzen.



Wie im Literaturkapitel beschrieben, beschäftigt sich eine Vielzahl von Studien mit der Expression unterschiedlicher Myosingene am embryonalen oder auch am adulten Herzen. Die Untersuchung mit einem Antikörper gegen das Protein aus der glatten Muskulatur wurde in keiner der Studien erwähnt, obwohl die Herzmuskulatur entwicklungsgeschichtlich als modifizierte Eingeweidemuskulatur gesehen werden muss und somit vergleichbare Eigenschaften in der Zusammensetzung aufweisen dürfte. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der Antikörper, wenn auch sehr ungleichmäßig, mit dem Herzmuskelgewebe des embryonalen Hühnerherzen reagiert. Wesentlich deutlicher war das Ergebnis an der glatten Muskulatur der großen Gefäße, obwohl die Tunica muscularis der kleineren Arteriolen im Myokard der vierzehn bis sechzehn bzw. achtzehn bis zwanzig Tage alten Hühnerembryonen wiederum ohne eine spezifische Reaktion blieb. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass die Zellen in der glatten Muskulatur der großen Gefäßstämme und der Arteriolen im Myokard sich schon embryonal unterschiedlich differenzieren und unterschiedliche Myosine exprimieren. Neben den Befunden an der „quergestreiften“ Muskulatur des Myokards bestätigt diese Tatsache eine komplexe Expression unterschiedlicher Myosine am Vogelherzen. Die Angaben von EVANS und Mitarbeitern (1988) über eine unterschiedliche Myosinexpression im Myokard der Atrien im Gegensatz zu dem der Ventrikel konnte auch mit dem smooth-muscle Myosin bestätigt werden. Auch mit diesem  $\alpha$ -smooth-muscle Myosin konnte eine stärkere Reaktion am Myokard der Atrien festgestellt werden. GONZALEZ-SANCHEZ und Mitarbeiter (1984) kamen zu ähnlichen Ergebnissen und beschrieben die Expression von  $\alpha$ -Myosin Heavy Chain (MHC)-Protein nur im Bereich der Atrien und des Zuflusstraktes. Die positive Reaktion mit einem Antikörper gegen ein Myosin aus der glatten Muskulatur ist bisher nur am embryonalen Hühnerherzen beschrieben worden. Diese Tatsache unterstützt die These, dass die Expression verschiedener kardialer MHC-Isoformen sowohl vom Entwicklungsstadium als auch von der Region im embryonalen Hühnerherzen abhängt und dass die Expression der einzelnen Myosinisoformen am Vogelherzen weitaus komplexer als beim Säugetier ist.

Im Hinblick auf die Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft der Hühnerembryonen wurde keine stärkere oder frühere Myosinexpression in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Aufgrund der entwicklungsbedingten und regionalisierten Variationen in der Myosinexpression sind Untersuchungen mit anderen Myosin-Antikörpern notwendig, um die genauen Zeitrahmen bzw. das möglicherweise zeitliche und regionale Überlappen der Expression von Myosingenen am Herzen zu dokumentieren, um dann anschließend eine Aussage über den Einfluss einer Sauerstoffreduktion machen zu können.

### 4.5.2. Anti-Actin

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von VANDEKERCKOVE und Mitarbeitern (1979 u. 1986) sowie mit denen von BENNETS und Mitarbeitern (1986) konnten die eigenen Untersuchungen mit dem Actin-Antikörper eine Gewebespezifität dieses kontraktile Muskelbestandteiles belegen. SUGI und Mitarbeiter (1993) beschrieben, dass die erste am embryonalen Hühnerherzen vorkommende Actin-Isoform ein smooth-muscle Actin ist. Diese Expression wurde vorübergehend in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium des Embryos verzeichnet. Im Gegensatz dazu zeigten die eigenen Untersuchungen mit einem Antikörper gegen das smooth muscle Actin auch bei den jüngsten, nur neun Tage bebrüteten Organen, keine Reaktion am Myokard, so dass die von den oben genannten Autoren beschriebene temporäre Expression des smooth-muscle Actin schon vor dem neunten Bebrütungstag beendet sein muss. Es wurde jedoch bei den untersuchten Herzen in allen Altersstufen mit dem Antikörper das aus der glatten Muskulatur bekannte  $\alpha$ -Actin in den muskulären Anteilen der Arteriolen des Myokards und den großen Gefäßstämmen von Aorta und Truncus pulmonalis nachgewiesen. So konnten auch mit dieser Studie die Ergebnisse von VANDEKERCKOVE und Mitarbeitern (1979) bestätigt werden. Die Autoren beschrieben das smooth-muscle  $\alpha$ -actin als die Hauptisoform in der Gefäßwand. Aufgrund der scheinbar bereits sehr früh beendeten Expression eines smooth-muscle Actin in der Herzmuskulatur des embryonalen Hühnerherzen kann für den verwendeten Antikörper keine Aussage über eine verstärkte oder frühere Differenzierung des unter dem Einfluss einer Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft stehenden Myokards gemacht werden. Da für den erwachsenen Organismus das cardiac  $\alpha$ -Actin als Hauptisoform am Herzen beschrieben wird, sollten weitere Untersuchungen mit diesem Antikörper auch am embryonalen Herzen durchgeführt werden. Es ist anzunehmen, dass dieses cardiac  $\alpha$ -Actin im Anschluss an die Expression des smooth-muscle Actin, also auch schon während der Embryonalentwicklung, exprimiert wird. Eine frühere Reifung des Myokards unter dem Einfluss einer Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft könnte sich dann möglicherweise in einer früher auftretenden Expression des cardiac  $\alpha$ -Actin äußern. Für die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen ist keine Aussage zur Auswirkung einer Sauerstoffreduktion auf die Expression von verschiedenen Actin-Proteinen möglich. Bei den mit dem Antikörper gegen das smooth-muscle Actin markierten Gefäßwänden konnten keine Unterschiede der Reaktionen in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe verzeichnet werden. So kann auch eine frühere oder stärkere Ausbildung der Arteriolen im Gefäßsystem des Myokards ausgeschlossen werden. Aufgrund einer Vielzahl vorhergehender Untersuchungen

ist belegt, dass es unter dem Einfluss einer verminderten Sauerstoffverfügbarkeit für das Herz, jedoch zu einer verstärkten Kapillarisation des Herzmuskelgewebes kommt, um einer Hypoxie im Muskelgewebe entgegen zu wirken und die Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung des Herzmuskels zu gewährleisten. Die für diese Untersuchung verwendeten Antikörper und Lektine (z. B. das die Endothelzellen im Säugetiergewebe markierende Lektin BSL-I und das WGA) zeigten kein eindeutiges Reaktionsmuster in den Endothelzellen der Kapillaren von Hühnerembryonen, so dass im Rahmen dieser Studie keine morphometrische Untersuchung zu Kapillarisation der Herzen durchgeführt wurde. Mit für Kapillarendothelzellen spezifischen Markern könnten weitere morphometrische Untersuchungen zum Einfluss einer Sauerstoffunterversorgung in der Bebrütungsluft und/oder im Gewebe auf den Grad der Kapillarisation des Herzen durchgeführt werden.

### **4.5.3. Anti-Desmin**

Im Alter von neun Bebrütungstagen konnte bei den embryonalen Hühnerherzen keine Reaktion des Anti-Desmin beobachtet werden. Erst nach zehn Bebrütungstagen wurde eine spezifische Bindung des Antikörpers am Myokard der Herzen verzeichnet. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von GARD und Mitarbeitern (1980), nach denen die Expression von Desmin schon sehr früh in der Embryonalentwicklung des Herzens auftritt. Die Untersuchungen von WEITZER und Mitarbeitern (1995) zeigten, dass beim Ausschalten („Knock out“) des Desmin-Gens bei Mäusen ein vollständiger Verlust der Zelldifferenzierung von drei verschiedenen Muskelgeweben eintrat. Diese Studien belegen eine große Bedeutung von Desmin in der frühen Myofibrillogenese des embryonalen Muskelgewebes. Die eigenen Untersuchungen bestätigen zudem die These von THORNELL und Mitarbeitern (1997), die beschrieben, dass in der frühen Phase der Myofibrillogenese keine Desminfilamente benötigt werden, sondern dass die Desminfilamente an der späteren Stabilisierung und Reparatur von Myofibrillenbündeln beteiligt sind.

Es besteht zwischen den genannten Autoren also lediglich Einigkeit darüber, dass Desmin eine zentrale Rolle in der Anordnung und Stabilisierung verschiedener Myofibrillen beteiligt ist, so dass das Auftreten von Desmin auch am Herzmuskel generell als Indikator bzw. Marker für den Differenzierungsgrad und die strukturelle Reifung des Myokards gesehen werden kann. Die eigenen Untersuchungen zeigten bei den Altersstufen ab dem zehnten Bebrütungstag eine deutlichere Reaktion des Anti-Desmin am linken Ventrikel und vornehmlich in den subendokardial gelegenen, also lumennahen Kardiomyozyten. Geht man davon aus, dass ein höherer Gehalt an Desmin für eine fortgeschrittenere Differenzierung der

myokardialen Zellen spricht, so kann geschlussfolgert werden, dass – passend zu den Ergebnissen aus den lichtmikroskopischen Untersuchungen der Herzen – die subendokardialen Zellen stärker als die subepikardialen differenziert sind. Ein höherer Reifegrad der Kardiomyozyten des linken Ventrikelmyokards ist gemäß der größeren und früheren mechanischen Belastung der linken Herzkammer als die den „großen Kreislauf“ antreibende Kammer zu erklären. Zudem konnte mit der PAS-Färbung auch ein höherer Gehalt an Glykogen in diesen Anteilen des Herzen verzeichnet werden, der auf eine höhere metabolische Aktivität dieser Zellen hinweist.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse dieser Studie ist anzunehmen, dass – ähnlich wie bei den Muskelproteinen Myosin und Actin – auch beim Desmin verschiedene Isoforme am embryonalen Hühnerherzen exprimiert werden. Dafür sprechen die in den unterschiedlichen Alterstufen stark variierenden Ergebnisse des immunhistochemischen Desminnachweises. Die glatte Muskulatur der Arteriolen im Myokard und in den großen Gefäßstämmen zeigte keine Reaktion auf den Antikörper, wohingegen die Kontrolluntersuchung an der glatten Muskulatur des Katzendarmes eine deutliche und spezifische Reaktion aufwies. Neben den speziesspezifischen Unterschieden, sowie denen zwischen Säugetieren und Vögeln, in der Expression verschiedener Desmin-Isoforme ist auch am Vogelherzen die Ausprägung regional unterschiedlicher Isoforme anzunehmen. Dadurch könnte z. B. auch die bei den meisten Herzen aller Alterstufen fehlende Reaktion des atrialen Myokards erklärt werden. Darüber hinaus wurde bei den ältesten Herzen zwischen dem achtzehnten und dem zwanzigsten Bebrütungstag keine spezifische Bindung des Antikörpers mehr beobachtet. Möglicherweise findet schon zu diesem Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung ein Wechsel in der Expression des Desmin von der embryonalen resp. foetalen Form zu der adulten Form statt. Grundsätzlich sind in den Studien, die in den vergangenen Jahren zu diesem Thema veröffentlicht wurden, unvollständige Angaben über die unterschiedlichen Desmin-Expressionen zu finden. Zudem wird in verschiedenen Quellen die genaue Funktion des Desmin kontrovers diskutiert. Mit den Untersuchungen im Rahmen dieser Studie konnten weitere Erkenntnisse in der Differenzierungsrichtung des embryonalen Myokards gewonnen werden. Darüber hinaus konnte deutlich gemacht werden, dass – in gleicher Weise wie die verschiedenen anderen Muskelproteine – sich auch das Intermediärfilamentprotein Desmin bereits embryonal unterschiedlich differenziert. Die Rolle des Desmin als Differenzierungsmarker myokardialer Zellen konnte belegt werden, wobei auch mit diesem Antikörper keine frühere Differenzierung der Kardiomyozyten des Herzmuskelgewebes von

Hühnerembryonen, die unter der sauerstoffreduzierten Luft bebrütet wurden, nachgewiesen werden konnte.

## **4.6. Strukturelle Veränderungen des Arbeitsmyokards**

### **4.6.1. Veränderung der Herzmasse**

Aus den vorangehenden physiologischen Untersuchungen von DZIALOWSKI (2002) ist bekannt, dass es unter dem Einfluss einer Reduktion des Sauerstoffs in der Bebrütungsluft von Hühnerembryonen zu einer Veränderung der Körpermasse und der Herzmasse der Tiere kommt. DECKER (2002) konnte im Gegensatz dazu nur eine Abnahme der Körpermasse, nicht aber eine Veränderung der Herzmasse feststellen. Andererseits führt eine Abnahme der Körpermasse bei unveränderter (absoluter) Herzmasse zu einer Zunahme der relativen Herzmasse. Neben Untersuchungen am Säugetier belegt eine Vielzahl anderer Untersuchungen eine Variation der Herzgewichte von Vögeln in Korrelation zur Sauerstoffversorgung. In den verschiedenen Studien werden die genauen Auswirkungen einer Sauerstoffreduktion jedoch kontrovers diskutiert. So ist z. B. nach STROHL (1910) der herabgesetzte Sauerstoffpartialdruck der hochalpinen Atemluft beim Alpenschneehuhn für das im Vergleich zum artverwandten Moorschneehuhn höhere Proportionalgewicht des Herzens verantwortlich. Auch TAZAWA und Mitarbeiter (1971) beschrieben für den mit Sauerstoff unterversorgten Vogelembryo ein höheres Proportionalgewicht des Herzens im Vergleich zum Kontrolltier. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse sind jedoch auch die Veränderungen des Verhältnisses zwischen Körpermasse des gesamten Tieres und dem proportional dazu ermittelten Herzgewicht zu sehen. ROUWET und Mitarbeiter (2002) beobachteten die Abnahme des Körpergewichtes um 11 % bei den überlebenden Embryonen gegenüber der Kontrollgruppe sowie ein um 14 % erhöhtes Verhältnis von Herzmasse und Körpermasse unter dem Einfluss einer Reduktion des Sauerstoffes. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen DZIALOWSKI und Mitarbeiter (2002), die bei den Versuchstieren, die zwischen dem sechsten und dem zwölften sowie dem zwölften und dem achtzehnten Bebrütungstag einer Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft ausgesetzt waren, eine Abnahme der Körpermasse und eine Zunahme der Herzmasse gegenüber den Kontrolltieren beschrieben.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Angaben von ASSON-BATRES und Mitarbeitern (1989) sowie zu denen von STOCK und METCALFE (1987), die für den mit Sauerstoff unterversorgten Hühnerembryo zwar eine um 17 % verminderte Gesamtwachstumsrate beschrieben, aber bei der Untersuchung einzelner Organe auch eine

verzögerte Entwicklung feststellten. Die Wachstumsrate und damit die Körpermasse des Embryonen steigen in der zweiten Hälfte der Inkubationszeit schnell an, wodurch der Energie- und Sauerstoffbedarf des Embryos steigt. Der zunehmende Energiebedarf des Embryos wird im Wesentlichen aus dem energiereichen Dotter gedeckt. Nach WIESER (1986) muss die Differenz aus sinkendem Energiegehalt des Dotters und steigendem Energiebedarf des Embryos dem Energieäquivalent des Sauerstoffverbrauches und damit weitgehend den Kosten der eigentlichen Wachstumsarbeit entsprechen. HÜHNKE (2003) schlussfolgerte daraus, dass eine Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft in der zweiten Hälfte der Inkubation zu einer Anpassung der Wachstumsarbeit führt, indem die Massenzunahme sich als Reaktion auf die verminderte Sauerstoffzufuhr verringert.

ASSON-BATRES und Mitarbeiter (1989) schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen ebenfalls ein zur Sauerstoffversorgung proportionales Wachstum von Organewebe, nachdem sie einzelne Organe und Muskelpartien unter dem Einfluss einer Sauerstoffreduktion untersucht hatten.

Mit den eigenen Untersuchungen wurde versucht, Erkenntnisse darüber zu gewinnen, welche strukturellen Veränderungen am Herzen zu Gewichtsvariationen zwischen den Versuchs- und den Kontrolltieren führten. Die für diese Studie bzw. für die untersuchten Herzen zu Grunde gelegten Gewichtsangaben aus der Arbeit von DECKER (2002) sind jedoch nur unter Vorbehalt verwendbar. Die durchgeführte histologische Aufarbeitung der in der Studie von DECKER (2002) entnommenen Organe zeigte, dass die Herzen im Zuge der Präparation zum einen noch Anteile der großen Gefäßstämme (wie z. B. Aorta und Truncus pulmonalis) in unterschiedlichem Maße enthielten oder andererseits große Teile der Vorkammern fehlten. Zum anderen wurden bei einigen histologischen Präparaten neben Teilen von dem Herzen angrenzenden Organen (z. B. Leber) auch stark variierende Gehalte an Blut bzw. Erythrozyten in den Ventrikeln der Herzen gefunden. Diese Befunde lassen, aufgrund der Größe der Embryonen und der entsprechenden Organe (ca. stecknadelkopfgroß), auf eine makroskopisch sehr schwierige und dadurch unpräzise Entnahme der embryonalen Herzen schließen. Aufgrund der vermutlich daraus resultierenden ungenauen Ermittlung der Herzgewichte erfolgt die Auswertung der morphologischen Untersuchungen dieser Studie ohne Berücksichtigung der für die Organe beschriebenen Herzgewichte.

Grundsätzlich wurde jedoch die Arbeitshypothese aufgestellt, dass eine Veränderung der Herzmasse sich auch im lichtmikroskopischen Bild in Form einer Verdickung des Arbeitsmyokards darstellt. Deshalb wurden neben den immunhistochemischen, auch morphometrische Untersuchungen an den embryonalen Herzen durchgeführt.

## 4.7. Morphometrische Untersuchungen

### 4.7.1. Hyperplasie des Arbeitsmyokards?

Der im Zuge der Embryonalentwicklung an Masse und Volumen zunehmende Herzmuskel verstärkt seine Funktion bzw. Effektivität entsprechend einer vom wachsenden embryonalen Kreislauf geforderten höheren Kontraktionskraft. Nach SEDMERA und Mitarbeitern (1997) ist die physiologische Massenzunahme bzw. das foetale Wachstum und die Reifung des Myokards Folge einer Hyperplasie, also einer Zunahme der Zellzahl bei gleich bleibender Zellgröße. Die für eine solche Hyperplasie erforderliche Anzahl an Zellteilung ist nach ARMSTRONG und Mitarbeitern (2000) für das Herzmuskelgewebe begrenzt. Außer dieser Hypothese war zu ergründen, ob externe Einflüsse, wie etwa eine Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft, eine vermehrte Zellteilung über das für das Myokard genetisch festgelegte Maß hinaus induzieren können. Das embryonale Myokard passt sich an die sich ändernden funktionellen Anforderungen an, in dem es seine proliferativen Prozesse modifiziert (SEDMERA, 1999 a). Während Veränderungen der Zellgröße (Hypertrophie) vor dem Schlupf weniger bedeutsam sind (BICAL et al., 1990), werden diese jedoch postnatal als Kompensationsmechanismus beschrieben. MILLER und Mitarbeiter (2000) zeigten in einem in vitro Modell, dass embryonale Kardiomyozyten in der Lage sind, ihre Proliferationsrate (Hyperplasie) als Antwort auf eine mechanische Belastung selbst zu regulieren. So wirkt auch nach ZAK (1979) sowie nach SAIKI und Mitarbeitern (1997) eine Erhöhung des intraventrikulären Druckes als Auslöser für eine verstärkte Proliferation (Hyperplasie) von Kardiomyozyten im embryonalen Herzen. Aufgrund der unterschiedlichen Druckbelastungen der einzelnen Ventrikel sowie der damit verbundenen Arbeitsleistung der Ventrikelwände am embryonalen Hühnerherzen war für die vorliegende Arbeit daher eine regionalisierte Betrachtung der einzelnen Myokardanteile nicht nur im Hinblick auf die Zellzahl, sondern auch für die Myokarddicke sinnvoll.

Die Bestimmung der Zellzahlen im Myokard ergab an den drei Lokalisationen (rechter Ventrikel, linker Ventrikel und Septum interventriculare) in der Versuchsgruppe eine höheren Mittelwert für die Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe. Obwohl dieser höhere Mittelwert nur für das Septum interventriculare signifikant ist, kann mit diesen Ergebnissen belegt werden, dass eine Wechselwirkung zwischen der Sauerstoffversorgung des Embryo und der Zellzahl im Myokard am embryonalen Hühnerherzen existiert. Im Gegensatz dazu konnten VILLAMOR und Mitarbeiter (2004) auch unter dem Einfluss einer „hypoxischen“ Bebrütung zwischen dem sechsten und dem neunzehnten Bebrütungstag keine Veränderungen in der

Zellzahl feststellen. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass die Betrachtung der einzelnen Lokalisationen am Herzen aufgrund der unterschiedlichen Embryonalentwicklung der einzelnen Regionen von großer Bedeutung ist. Neben den lokalen Unterschieden sind aber auch die altersbezogenen Veränderungen zu berücksichtigen.

### **4.7.1.1. Linker Ventrikel**

Im Myokard des linken Ventrikels nimmt die Zellzahl in der Altersgruppe der zehn oder zwölf Tage bebrüteten Hühnerembryonen zunächst ab. Diese Reduktion der Zellen bei den jungen Herzen passt zu den von ASSON-BATRES und Mitarbeitern (1989) beschriebenen Ergebnissen, die ein zur Sauerstoffversorgung proportionales Wachstum des Organgewebes ermittelten. Diese im Gegensatz zu den anderen Altersgruppen auftretende Reaktion könnte darüber hinaus auch die Folge der in der Literatur (DZIALOWSKI et al., 2002; DUSSEAU et al., 1986) beschriebenen „sensiblen Phase“ zwischen dem sechsten und dem zwölften Tag in der Entwicklung des Embryos sein. So ist scheinbar auch die Anfälligkeit des Zellwachstums für eine Sauerstoffunterversorgung in dieser Phase besonders hoch. In der folgenden Altersgruppe aus vierzehn und sechzehn Tagen bebrüteten Hühnerembryonen ist in der Versuchsgruppe (Hypoxie) ein deutlicher Anstieg der mittleren Zellzahl im Myokard des linken Ventrikels zu beobachten. Dieser nun über dem der Kontrollgruppe (Normoxie) liegende Wert wird als „reaktive Phase“, also als Antwort auf die Zellreduktion während der „sensiblen Phase“, gewertet. Sie ist möglicherweise die Antwort auf eine aus der sensiblen Phase der einwirkenden Sauerstoffreduktion resultierenden, verminderten Kontraktionsleistung des Herzmuskels, so dass dieser temporären Schwäche mit einer höheren mitotischen Aktivität entgegen gewirkt wird. Durch diese Anpassung gleichen sich für den funktionell besonders bedeutenden linken Ventrikel die Mittelwerte der Zellzahlen im Myokard in der Versuchs- und Kontrollgruppe wieder einander an. Deshalb lässt sich schlussfolgern, dass der Einfluss der Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft von Hühnerembryonen in der Entwicklung des linken Ventrikels morphometrisch zwar Auswirkungen zeigt, der Embryo aufgrund seiner hohen Anpassungsfähigkeit jedoch in der Lage ist, diese strukturellen Anpassungen noch vor dem Schlupf nahezu vollständig zu regulieren bzw. auszugleichen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Befunden anderer Studien, die für verschiedene, unter dem Einfluss der Sauerstoffreduktion stehende Parameter ebenfalls eine solche „Ausgleichsreaktion“ in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe beobachteten (ACKERMANN et al., 1980; DECKER, 2002; DZIALOWSKI et al., 2002).



#### **4.7.1.2. Septum interventriculare**

Das Septum interventriculare stellt bei allen Herzen beider Gruppen den breitesten und zellreichsten Anteil des Myokards dar. Die Ergebnisse aus der Bestimmung der Zellzahl am Septum interventriculare stehen im Gegensatz zu denen der Ventrikel. So liegen die Mittelwerte der Zellzahlen in dieser Lokalisation in allen drei Altersgruppen in der Versuchsgruppe (Hypoxie) über den Werten der Kontrollgruppe (Normoxie). Der Gruppenunterschied ist bei den achtzehn und zwanzig Tage lang inkubierten Herzen am deutlichsten. Es ist denkbar, dass aufgrund der unterschiedlichen Differenzierungsrichtung der Kardiomyozyten im Myokard des Septum interventriculare im Vergleich zu denen der Ventrikel auch zeitlich verschobene Anpassungsreaktionen auftreten. Die ausschließlich für diese Lokalisation signifikanten Unterschiede im Zellgehalt der Versuchsgruppe gegenüber dem der Kontrollgruppe kommen aus Sicht dieser Studie als mögliche Ursache für eine proportionale Zunahme der Herzmasse bei unter Sauerstoffreduktion inkubierten Embryonen in Frage. Nur am Septum interventriculare ist die höhere Zellzahl in der Versuchsgruppe in allen Altersgruppen konstant. Trotz der in der vorliegenden Studie konstatierten höheren Zellzahl in der Versuchsgruppe (Hypoxie), gilt der Myokardteil des Septum interventriculare in der Literatur als der am wenigsten von Umbau- bzw. Umformungsprozessen betroffene Anteil des Herzens (JETER et al., 1971; TOKAYUSU, 1990; FRANCO et al., 1997). Im Gegensatz dazu unterliegen die Myokardanteile der äußeren Ventrikelwände im Zuge der Entwicklung starken strukturellen Umformungsprozessen. In den zunächst trabekulär strukturierten Ventrikelwänden weisen die Kardiomyozyten in den Trabekeln einen höheren Differenzierungsgrad auf als jene des kompakten Myokards (TOKAYUSU, 1990; FRANCO et al., 1997); eine Eigenschaft, die der Begrenzung der beiden Ventrikellumina seitens des Septum interventriculare fehlt. SEDMERA und Mitarbeiter (1997) schlussfolgerten aus dem höheren Differenzierungsgrad der in den Trabekeln liegenden Kardiomyozyten eine wichtige Rolle der Trabekel in der frühen Kontraktibilität des Herzens. Darüber hinaus beschrieben BLAUSEN und Mitarbeiter (1990) eine Funktion des trabekulären Netzwerkes in der nutritiven Blutversorgung des Herzmuskels. Die Massenzunahme der Ventrikelwände erfordert nach SEDMERA und Mitarbeitern (2000) eine schwammartige, trabekuläre Struktur des Myokards zur direkten nutritiven Versorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff und somit zur Verhinderung einer Hypoxie im Herzmuskelgewebe. Die zu allen Stadien der Entwicklung nahezu fehlende trabekuläre Struktur des Myokards im Septum interventriculare lässt somit auf eine weniger bedeutende Funktion oder vielmehr „passivere“ Funktion in der Kontraktion des Ventrikelmyokards schließen. Zum anderen scheint die Sensibilität für

Unterversorgungen mit Sauerstoff in den Zellen des Septum interventriculare niedriger zu sein, da das Fehlen der Trabekel eine direkte Versorgung, vergleichbar der der Ventrikelwände, in dieser breitesten Myokardschicht am Herzen verhindert. Somit liegen in den äußeren Ventrikelwänden im Gegensatz zu dem Myokard des Septum interventriculare schon unterschiedliche Voraussetzungen vor, eine Unterversorgung mit Sauerstoff zu „registrieren“ und gegebenenfalls zu kompensieren. OSTADAL und Mitarbeiter (1999) beschreiben, dass das Ausmaß der Auswirkungen einer Sauerstoffunterversorgung nicht nur von der Intensität und Dauer der Sauerstoffreduktion abhängt, sondern auch von der „kardialen Toleranz“ gegenüber einer Sauerstoffreduktion. Nach Angabe der Autoren ändert sich diese Toleranz während der Entwicklung signifikant. Die eigenen Untersuchungen im Rahmen dieser Studie lassen vermuten, dass auch für die einzelnen Lokalisationen am Herzen eine unterschiedliche Toleranz des Myokards gegenüber einer Sauerstoffunterversorgung besteht. Im Allgemeinen erklären OSTADAL und Mitarbeiter (1999) die höhere Toleranz embryonaler Herzen mit einem geringeren Energiebedarf, mit einer gesteigerten Fähigkeit zur anaeroben Glykolyse und mit größeren Glykogenreserven in den Kardiomyozyten. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass tatsächlich auch der Gehalt an Glykogen in den einzelnen Lokalisationen des Herzens stark variiert. Dieses Ergebnis stützt die Annahme zusätzlich, dass regional unterschiedliche Toleranzen im Myokard des embryonalen Hühnerherzen bestehen. Neben den von OSTADAL und Mitarbeitern (1999) beschriebenen unterschiedlichen Toleranzen des Myokards für eine lokale Sauerstoffunterversorgung scheinen jedoch auch die myokardialen Umbildungsprozesse und damit verbunden die Unterschiede in der zellulären Differenzierung der einzelnen Myokardanteile eine Rolle zu spielen. Es werden weitere, z. B. elektronenmikroskopische Untersuchungen der einzelnen Myokardanteile notwendig sein, um mehr Informationen zu den Kardiomyozyten der einzelnen Regionen bzw. zu Auswirkungen einer Sauerstoffreduktion auf die Entwicklung dieser Myokardzellen zu erhalten. Hier könnten insbesondere auch Aussagen über den Gehalt zellulärer Komponenten wie z. B. der Mitochondrien von Bedeutung sein und Aufschluss über den Energiehaushalt und Metabolismus der Kardiomyozyten liefern.

#### 4.7.1.3. Rechter Ventrikel

Das Myokard der rechten Ventrikelwand stellt die dünnste und somit zellärmste Schicht am embryonalen Herzmuskel dar. Wie auch beim adulten Vogel und beim Säugetier ist dieser Unterschied in der Myokardbreite die Folge der unterschiedlichen Arbeitsanforderungen des Herzmuskels des rechten Ventrikels im Gegensatz zu dem den Körperkreislauf aufrechterhaltenden linken Ventrikel. So ergibt auch die morphometrische Untersuchung dieses Ventrikels den niedrigsten Mittelwert für die Zellzahlen pro Gesichtsfeld. Im Myokard der rechten Ventrikelwand zeigen die Mittelwerte der Zellzahlen in den beiden Gruppen nahezu die gleichen Ausgangswerte. So ist – anders als am linken Ventrikel – keine Reaktion des Myokards innerhalb der „sensiblen Phase“ der Entwicklung zu verzeichnen. Dennoch zeigt sich bei den vierzehn bis sechzehn Tage bebrüteten Embryonen auch am rechten Ventrikel eine „reaktive“ Zunahme der Mittelwerte der Zellzahlen in der Versuchsgruppe (Hypoxie) gegenüber denen in der Kontrollgruppe (Normoxie). Trotz einer gegenüber dem linken Ventrikel fehlenden Reduktion der Zellen bei den zehn und zwölf Tage bebrüteten Herzen scheint die Unterversorgung mit Sauerstoff in der bis zum zwölften Tag andauernden „sensiblen Phase“ der Entwicklung eine Zunahme der Zellzahl zu induzieren. Möglicherweise lässt auch dieser Befund die Schlussfolgerung zu, dass eine temporäre Schwäche des Herzmuskels, wie sie am linken Ventrikel vermutet wurde, als Stimulus für eine gesteigerte Mitoseaktivität fungiert, da der rechte Ventrikel sich embryonal auch über den Ductus venosus am Körperkreislauf beteiligt. Wie auch am linken Ventrikel gleichen sich die Zellzahlen zum Ende der Bebrütungszeit wieder einander an, so dass auch nach dem Schlupf keine Auswirkungen der Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft am rechten Ventrikelmyokard mehr zu finden waren, bzw. die Unterschiede in den Mittelwerten der Zellzahlen wie schon am linken Ventrikel, auch für den rechten Ventrikel nahezu vollständig kompensiert bzw. ausgeglichen werden können.

Die Ursache für diese Unterschiede in der Anpassung der einzelnen Myokardanteile insbesondere auch der beiden Ventrikelwände erklärt sich nicht nur, wie bereits erwähnt, aus unterschiedlichen Differenzierungsprozessen in den verschiedenen Ventrikeln. Diese Umbauprozesse werden darüber hinaus an die funktionellen Anforderungen der einzelnen Herzanteile angepasst sein. Der linke Ventrikel versorgt über die Aorta den Körperkreislauf, und sichert so die für das Wachstum des Embryos unabdingliche Versorgung mit Sauerstoff. Gegenüber dem rechten Ventrikel erfüllt der linke Ventrikel schon früh in der Embryonalentwicklung eine höhere Arbeitsleistung. Das Myokard dieser Herzkammer arbeitet kontinuierlich gegen den Widerstand im Gefäßsystem an. Aus dieser Tatsache erklärt

sich ein kräftigeres und grundsätzlich breiteres Myokard im linken Ventrikel. Angepasst an die höheren funktionellen Ansprüche des linken Ventrikels ist auch die in dieser Studie beobachtete frühere Kompaktierung des Myokards vom trabekulärem Gewebe zu einem kompakten, dreischichtigen Herzmuskelgewebe zu erklären.

Über den Sinus venosus, dem Mündungsort der Hohlvenen, gelangt das im Embryonalkreislauf noch sauerstoffreichere Blut in den rechten Vorhof und anschließend in den rechten Ventrikel. Dieser besitzt sowohl bei Vögeln als auch beim Säugetier ein dünneres Myokard. Die eigenen Untersuchungen bestätigten die Beobachtungen anderer Studien (RYCHTER et al., 1981; BEN-SHACHAR et al., 1985; MANASEK et al., 1986; ICARDO et al., 1987; BLAUSEN et al., 1990; DE JONG et al., 1992; SEDMERA et al., 1997 u. 2000), dass das rechte Ventrikelmyokard über einen längeren Zeitraum während der Embryonalentwicklung eine trabekuläre Struktur als das der linken Kammer aufweist und die Kompaktierung erst später erfolgt. Die Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass die Kardiomyozyten des rechten Ventrikelmyokards bei allen untersuchten Herzen über den niedrigsten Glykogengehalt verfügen. Geht man nun davon aus, dass die trabekuläre Struktur des Myokards, wie bereits erwähnt, zu einer direkten Sauerstoffversorgung des Arbeitsmyokards beiträgt, so scheint diese für den rechten Ventrikel länger zu bestehen, zumal der rechte Ventrikel mit dem embryonal noch sauerstoffreicheren, venösen Blut versorgt wird. Diese Hypothese einer besseren und vor allem längeren Versorgung des rechten Ventrikelmyokards mit Sauerstoff gegenüber den anderen Teilen des Herzens wird auch mit dem niedrigeren Glykogengehalt der Zellen dieses Abschnittes gestützt. Aufgrund der für die einzelnen Lokalisationen am Herzen zu erwartenden unterschiedlichen Auswirkungen einer Sauerstoffreduktion muss daher wieder betont werden, dass für eine Betrachtung der Entwicklung des Myokards in Abhängigkeit zur Versorgung mit Sauerstoff eine Unterteilung in Regionen erforderlich ist.

#### **4.7.2. Hypertrophie des Arbeitsmyokards?**

Wie bereits erwähnt, ist die physiologische Massenzunahme bzw. das foetale Wachstum und die Reifung des Myokards die Folge einer Hyperplasie (SEDMERA et al., 1997). Im Gegensatz dazu erfolgt die Organzunahme postnatal durch eine Hypertrophie der Kardiomyozyten. Auch die pathologische Zunahme der Herzmasse ist, zumindest für das adulte Herz, meistens die Folge einer Hypertrophie der Kardiomyozyten. Diese Zunahme der Zellgröße bei gleich bleibender Zellzahl wurde von einer Vielzahl von Autoren beschrieben. So beobachteten ARMSTRONG und Mitarbeiter (2000) im Anschluss an die physiologische, pränatale Hyperplasie der Kardiomyozyten ein postmitotisches Stadium der Hypertrophie

dieser Zellen. In der Pathologie gilt eine Reihe von Faktoren als potentieller Auslöser einer Hypertrophie des Arbeitsmyokards. Hierbei stehen die Faktoren im Vordergrund, die den Ventrikeldruck erhöhen. Neben den beim Vogel sehr seltenen mechanischen Ursachen, wie z. B. die Klappenstenosen, die zu einer erhöhten Anforderung an die Kontraktionskraft des Herzens führen, sind auch metabolische oder hämodynamische Faktoren, die die Sauerstoffverfügbarkeit im Organismus verändern bzw. herabsetzen, ein bekannter Stimulus für eine Veränderung des Herzmuskelgewebes. HOLLENBERG und Mitarbeiter (1976) beschrieben eine Verstärkung des Zellwachstums in neonatalen Säugetierorganen als Antwort auf eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit. Aus den einheitlichen Angaben verschiedener Autoren (CLARK et al., 1989; BISHOP, 1990; BICAL et al., 1990; SEDMERA et al., 1997; ARMSTRONG et al., 2000), dass eine Hyperplasie vornehmlich pränatal auftritt, während eine Hypertrophie erst postnatal stattfindet, kann geschlussfolgert werden, dass die Faktoren, die postnatal Auslöser einer Hypertrophie sind, pränatal möglicherweise eine Hyperplasie auslösen. So führt z. B. die von TAZAWA und Mitarbeitern (1971) unter Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft beim Hühnerembryo beschriebene Zunahme der Erythrozytenzahl zu einer Veränderung des Hämatokritwertes. Wie bereits oben erwähnt, sorgt dieser auch von lang anhaltenden Expeditionen in Höhenluft bei Menschen bekannte Kompensationsmechanismus des Organismus nicht nur für einen besseren Sauerstofftransport im Blut, sondern durch den Anstieg des Hämatokritwertes kommt es auch zu einem höheren Fließwiderstand des Blutes im Gefäßsystem. Das Herz muss das nun „dickere“ Blut mit einem entsprechend höheren Druck durch das Gefäßsystem transportieren. Auch RUITJENBEEK und Mitarbeiter (2000) beschrieben den Anstieg des Blutdruckes als kardiovaskuläre Antwort auf einen akuten Abfall des arteriellen Sauerstoffdruckes. Laut STROHL (1910) versucht das Herz diesen höheren Widerstand zunächst durch eine Erhöhung der Herzfrequenz zu kompensieren. Langfristig ist zur Kompensation einer vom Herzen geforderten Mehrarbeit jedoch eine Verstärkung der Kontraktionskraft des Herzmuskels notwendig. Das Ergebnis dieser „Herzkraftverstärkung“ ist eine Zunahme der Größe der vorhandenen Zellen des Arbeitsmyokards, also eine Hypertrophie der Kardiomyozyten. Das bei anhaltendem Stimulus für diese Proliferation (Hypertrophie) der Kardiomyozyten stark an Masse zunehmende Herz ist am Ende dieser Kompensation nicht mehr in der Lage, sich selbst mit Sauerstoff zu versorgen, da die Diffusionsstrecke für den Sauerstoff am Herzmuskel für die einzelne „dicke“ (hypertrophe) Herzmuskelzelle zu groß geworden ist. Die Folge einer solchen „Dekompensation“ des Herzens sind Infarkte bzw. vollständige Herz-Kreislauf-Zusammenbrüche. Darüber hinaus kann es laut RUITJENBEEK und Mitarbeitern (2002)

infolge eines chronisch reduzierten Sauerstoffangebotes in der Inkubationsluft auch zu einer gesteigerten Entwicklung und vermehrten Ausbildung periarterieller sympathischer Nerven kommen. Diese Hyperinnervation soll das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen steigern. Nach SEDMERA und Mitarbeitern (2002) sind die genauen Ereignisse im Organismus, die zu einer erhöhten Proliferationsrate der Zellen bzw. zu einer Hypertrophie im adulten Organismus führen, noch nicht eingehend erforscht. Es ist darüber hinaus anzunehmen, dass auch im embryonalen oder foetalen Organismus die genauen Kompensationsmechanismen bei einer Unterversorgung mit Sauerstoff auf zellulärer Ebene noch nicht ausreichend erforscht sind. Aus vorangehenden Studien ist bekannt, dass das embryonale Myokard sich an die sich ändernden funktionellen Anforderungen anpasst, in dem es in der Lage ist, seine proliferativen Prozesse zu modifizieren (SEDMERA, 1999 a), bzw. dass embryonale Kardiomyozyten in der Lage sind, ihre Proliferationsrate als Antwort auf eine mechanische Belastung selbst zu regulieren (MILLER et al., 2000). VILLAMOR und Mitarbeiter (2004) beschreiben ein verschobenes Gleichgewicht im Verhältnis der Herzmasse zur Körpermasse als ein Kriterium für das Vorliegen einer Hypertrophie des Arbeitsmyokards. Gleichzeitig könnte man daraus schlussfolgern, dass auch das am embryonalen Organismus von einigen Autoren beschriebene Missverhältnis dieser Faktoren den Hinweis auf eine Hyperplasie gibt. Geht man also davon aus, dass die Voraussetzungen, die im adulten Organismus zu einer Hypertrophie führen, in embryonalen Entwicklungsstadien eine Hyperplasie auslösen, so scheint diese in der Konsequenz für den Organismus geringere Auswirkungen zu haben, da bei einer Hyperplasie niemals die kritische Größe der Zelle erreicht wird, die auch trotz einer vermehrten Kapillarisation bei einer Hypertrophie eine Versorgung der Zelle aufgrund der zu hohen Diffusionsstrecke verhindert. Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zellzahl nur am Septum interventriculare auch kurz vor dem Schlupf in der Versuchsgruppe noch erhöht war. An den Lokalisationen des rechten und des linken Ventrikels ist die absolute Zellzahl vor dem Schlupf in beiden Gruppen annähernd gleich, wurde jedoch in der Versuchsgruppe (Hypoxie) vermutlich durch eine gesteigerte Mitoserate im Alter zwischen vierzehn und sechzehn Tagen schon vorzeitig erhöht.

Vor dem Hintergrund dieser Fragestellung ist jedoch die Durchführung der eigenen morphometrischen Untersuchungen kritisch zu betrachten. In den für die einzelnen Lokalisationen am Herzen festgelegten mikroskopischen Gesichtsfeldern wurden mittels des Morphometriprogrammes alle Zellkerne dieses Ausschnittes gezählt. Hierbei wurden somit nicht nur die Zellkerne der Kardiomyozyten erfasst, sondern auch die der Kapillaren und diejenigen der Fibroblasten bzw. Fibrozyten. Dieses in einer Vielzahl anderer Studien

angewandte Verfahren zur Festlegung der Zellzahl eines Bereiches ist jedoch genau genommen nicht zu einer Differenzierung zwischen Hyperplasie und Hypertrophie geeignet. Eine solche Untersuchung müsste zur korrekten Durchführung auch die Bestimmung des mittleren Zelldurchmessers beinhalten, da nur so eine Zunahme der Zellgröße morphometrisch dokumentiert werden kann. Gestützt durch die Ausführungen von BICAL und Mitarbeitern (1990), nach denen Veränderungen der Zellgröße vor dem Schlupf weniger bedeutsam sind, lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie den Schluss auf das Vorliegen einer pränatalen Hypertrophie der Kardiomyozyten nicht zu, obwohl die Durchmesser der Zellen nicht bestimmt wurden. Die untersuchten Zellen wiesen dem Anschein nach in den unterschiedlichen Altersgruppen sowie Versuchsgruppen vergleichbare Durchmesser auf. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass es sich bei der oben beschriebenen Abnahme der Zellzahl für eine bestimmte Lokalisation tatsächlich um eine pränatale Hypertrophie statt einer Hyperplasie dieser Kardiomyozyten handelt. Die möglicherweise im Durchmesser vergrößerten Herzmuskelzellen würden insgesamt eine größere Fläche einnehmen, was bei gleich bleibender Größe des mikroskopischen Gesichtsfeldes zu einer Abnahme der Anzahl der Zellkerne führen müsste. Es sollte daher bei zukünftigen morphometrischen Untersuchungen auch die Anzahl der Zellkerne in Relation zur Größe der Zellen berücksichtigt werden, zudem die Zunahme der Anzahl der Zellkerne in den Herzmuskelzellen auch Folge amitotischer Prozesse sein könnten.

Im Hinblick auf eine am Septum interventriculare deutlich höhere Zellzahl bleibt die Frage offen, ob die Anzahl der Kardiomyozyten in den einzelnen Regionen des Herzens genetisch festgelegt ist und wenn ja, ob eine Veränderung der Sauerstoffverfügbarkeit in der Bebrütungsluft in diesen genetischen „Programmablauf“ einzugreifen vermag. Die Erforschung dieses Sachverhaltes würde den Rahmen dieser Studie sprengen und sollte daher ebenfalls Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

#### **4.7.3. Morphometrische Untersuchung der Myokardbreite**

Aufgrund der im lichtmikroskopischen Bild auffallenden Variationen in der Myokardbreite der einzelnen Ventrikel wurde die morphometrische Ermittlung der Breite der einzelnen Ventrikelwände durchgeführt. Eine Zunahme der Herzmasse wird in der Literatur meist als Folge einer Verdickung der Ventrikelwand beschrieben. So beschreiben VILLAMOR und Mitarbeiter (2004) in ihrer Studie zur Entwicklung des Hühnerembryos unter Einfluss einer Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft eine nur durch die Verdickung des linken Ventrikelmyokards bedingte Zunahme der Herzmasse.

Für die vorliegende Studie ist es wichtig, neben der morphometrischen Bestimmung der Zellzahl auch die Ausdehnung der einzelnen Ventrikelwände bzw. die Kammerwandverhältnisse zu berücksichtigen. Die Hypertrophie von Kardiomyozyten kann, wie oben beschrieben, am adulten Herzen zu einer pathologischen Verdickung des Arbeitsmyokards führen. Mit den eigenen Untersuchungen sollten die Konsequenzen einer möglichen pränatalen Hyperplasie auf die Dicke der Myokardwände am embryonalen Herzen erfasst werden. Auch für diese Untersuchung war die differenzierte Betrachtung der einzelnen Regionen des Herzens aufgrund starker funktioneller und entwicklungsbedingter Unterschiede zwischen den Wandanteilen erforderlich, so dass im Nachfolgenden, wie auch für die Zellzahl, die Ergebnisse aus der Bestimmung der Myokardbreite an den einzelnen Regionen des Herzens diskutiert werden sollen.

#### **4.7.3.1. Linker Ventrikel**

Im Zuge der embryonalen Reifung des Herzmuskelgewebes und den wachsenden Anforderungen des Herzens konnte eine altersabhängige physiologische Dickenzunahme des Arbeitsmyokards auch durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Im Vergleich der Gruppen (Versuchsgruppe = Hypoxie und Kontrollgruppe = Normoxie) wurde darüber hinaus eine Abnahme der Myokarddicke unter dem Einfluss eines reduzierten Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft festgestellt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ausführungen von ASSON-BATRES und Mitarbeitern (1989) überein, nach denen das Wachstum von Organgewebe proportional zur Sauerstoffversorgung erfolgt. Die Autoren beschrieben für das mit Sauerstoff unterversorgte Herz ein verzögertes Wachstum. Die eigenen Untersuchungen zeigten eine geringere Breite des Arbeitsmyokards in der Versuchsgruppe (Hypoxie) jedoch nur am linken Ventrikel. Geht man davon aus, dass die Myokardbreite in Korrelation zum Zellgehalt steht und die Herzmasse sich im Zusammenhang mit beiden Faktoren verändert, so stehen die eigenen Untersuchungen nicht nur im Gegensatz zu den Literaturangaben, nach denen die Unterversorgung eines Organismus zwangsläufig auch zu einer Zunahme der Herzmasse führt, wobei bei dieser Aussage natürlich das Entwicklungsalter des jeweiligen Organismus sowie die Dauer des „hypoxischen“ Zustandes besonders zu berücksichtigen sind, sondern die Abnahme der Myokardbreite für den linken Ventrikel ist augenscheinlich betrachtet auch widersprüchlich zu den eigenen Ergebnissen aus der Bestimmung der Zellzahl am linken Ventrikel. Demnach müsste die im Alter von vierzehn bis sechzehn Bebrütungstagen dokumentierte „reaktive“ Zunahme der Zellzahl auch einen messbaren Einfluss auf die Myokardbreite haben. Die Methodik verbietet jedoch diese Schlussfolgerung,



da durch die standardisierte Festlegung der Gesichtsfelder die Zellzahl eines Gesichtsfeldes nicht auf die Myokardbreite, sondern auf die Fläche des Gesichtsfeldes bezogen wurde.

Die Kompaktierung bzw. Strukturierung der einzelnen Kardiomyozyten ist ein wichtiges Merkmal der funktionellen Reifung des Myokards. Der linke Ventrikel ist für die Aufrechterhaltung des Kreislaufes gerade unter dem Einfluss einer Sauerstoffmangelsituation von essentieller Bedeutung. Die oben beschriebenen Adaptionsmechanismen bezüglich der Kontraktionskraft des Herzmuskels erfordern daher möglicherweise eine frühere Kompaktierung der Kardiomyozyten, um als funktionelles Synzytium arbeiten zu können. Es ist also denkbar, dass innerhalb der Grenzen eines Gesichtsfeldes des linken Ventrikels die beschriebene Zunahme der Zellzahl durch einen stärkeren Kompaktierungsgrad dieser Zellen zu erklären ist. Hierbei würde die Zellzahl pro Gesichtsfeld aufgrund der höheren Dichte der Zellen zunehmen, während die Myokardbreite sich im Zuge des besseren Zusammenhaltes der Zellen als funktionelle Einheit verkleinert.

#### **4.7.3.2. Septum interventriculare**

Die Wand des Septum interventriculare erreicht mit zunehmender Entwicklung eine ähnliche Breite wie der linke Ventrikel, wobei das Septum interventriculare, wie bereits erwähnt, grundsätzlich die breiteste Myokardschicht am embryonalen Hühnerherzen darstellt. Der absolute Zellgehalt weist in allen Altersgruppen für das Septum interventriculare die höchsten Werte auf. Die morphometrische Untersuchung ergab für diese Schicht in der Versuchsgruppe (= Hypoxie) eine geringfügig schmalere Myokardausdehnung in der jüngsten und in der ältesten Altersgruppe gegenüber der Myokardbreite in der Kontrollgruppe. Der mathematisch-statistischen Definition nach sind diese Gruppenunterschiede jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu sind die aus der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnisse aus der Bestimmung der Zellzahl für das Septum interventriculare signifikant (s. Tab. a im Anhang S. 195). Wie bereits am Beispiel des linken Ventrikels erläutert, kann die ermittelte Zellzahl pro mikroskopisches Gesichtsfeld nicht in Korrelation zur Veränderung oder Zunahme der Myokardbreite gesehen werden. Aufgrund der bereits oben erwähnten weniger starken Ausprägung von Umformungs- und Strukturierungsprozessen am Septum interventriculare ist auch die für den linken Ventrikel angenommene Kompaktierung als Ursache für eine Erhöhung der Zellzahl unwahrscheinlich. So scheint am Septum interventriculare tatsächlich eine höhere Mitoserate der Kardiomyozyten Ursache für den erhöhten Zellgehalt zu sein. Das für die Versuchsgruppe ermittelte dickere Myokard ist möglicherweise Folge dieser Hyperplasie des Septum interventriculare unter dem Einfluss einer Reduktion des

Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass nach statistischen Gesichtspunkten im Gruppenvergleich der Myokardbreite des Septum interventriculare — wie auch für die der Ventrikelwände — keine signifikanten Unterschiede zu beobachten sind.

#### **4.7.3.3. Rechter Ventrikel**

Die dünnste Myokardwand des embryonalen Herzens ist im rechten Ventrikel zu finden. Die Ergebnisse aus der Bestimmung der Myokardbreite belegen in gleicher Weise wie für das Septum interventriculare eine Verbreiterung des Myokards am rechten Ventrikel in den Versuchsgruppen der jüngsten und der ältesten Altersgruppe. Grundsätzlich sind die eigenen morphometrischen Untersuchungen der Myokardbreite am rechten Ventrikel jedoch kritisch zu betrachten. Die im Verlauf der embryonalen Entwicklung sehr lange anhaltende „trabekuläre“ Struktur des rechten Ventrikels lässt mit der angewandten Methodik eine genaue Bestimmung der Myokardbreite nicht zu. Diese Tatsache ist ein weiterer Grund, davon abzusehen, die Myokardbreite mit der ermittelten Zellzahl ins Verhältnis zu setzen, da die z. T. zellreichen „Trabekel“ des rechten Ventrikels bei der Bemessung der Myokardbreite nicht berücksichtigt wurden. Um die altersbedingte Kompaktierung der eigentlichen Wand des Myokards registrieren zu können, wurde bei der Bemessung ausschließlich die Ausdehnung des kompakten Myokards zugrunde gelegt. Der zunehmende Grad der Kompaktierung im Verlaufe der embryonalen Entwicklung des Herzens ist trotz der ermittelten Zunahme der Zellzahl in der Altersgruppe von vierzehn bis sechzehn Tagen wahrscheinlich, wie auch am linken Ventrikel, Ursache für eine Abnahme der Myokardbreite des rechten Ventrikels. Die eigenen Untersuchungen zeigen jedoch, dass das rechte Myokard seine trabekuläre Struktur im Verlauf der Entwicklung wesentlich länger behält als das linke Ventrikelmyokard. Nach den Ausführungen von BLAUSEN und Mitarbeitern (1990) ist diese Eigenschaft des rechten Ventrikelmyokards an der direkten nutritiven Versorgung des Herzmuskels beteiligt, so dass geschlussfolgert werden kann, dass eine frühere Kompaktierung des rechten Myokards und damit verbunden eine Veränderung in der Myokardbreite, auch zu einer Verschlechterung der Sauerstoffversorgung des Herzmuskels am rechten Ventrikel führen würde. Da die bei der morphometrischen Untersuchung am rechten Ventrikel ermittelten Unterschiede der Werte jedoch weder für die Zellzahl, noch für die Myokardbreite signifikant waren und darüber hinaus, wie bereits beschrieben, aufgrund der trabekulären Struktur dieser Myokardwand, Ungenauigkeiten bei der Bemessung nicht auszuschließen sind, ist die Bewertung des rechten Ventrikels gegenüber

den anderen Lokalisationen am Herzen schwieriger, so dass auch die Interpretation der Ergebnisse mit entsprechender Vorsicht erfolgen sollte.

#### **4.8. Lektin histochemische Untersuchungen**

Neben den immunhistochemischen Untersuchungen wurden die embryonalen Hühnerherzen auch mit verschiedenen Lektinen untersucht. Die Auswahl der verwendeten Lektine wurde überwiegend aufgrund von Literaturangaben getroffen. Wegen unvollständiger Literaturangaben zur Reaktion verschiedener Lektine am embryonalen Hühnerherzen wurden darüber hinaus zusätzlich Lektine aus verschiedenen Zuckergruppen und somit auch mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten für verschiedene Glukokonjugate für die Untersuchungen im Rahmen dieser Studie gewählt, um ein repräsentatives Screening zur Reaktion von Lektinen auf das embryonale Hühnerherz zu erzielen. Nicht alle in dieser Studie verwendeten Lektine zeigten eine Reaktion am embryonalen Herzen. Im Folgenden sollen daher nur die Untersuchungsergebnisse zu den beiden wichtigsten Lektinen dieser Untersuchungen herausgestellt und diskutiert werden.

##### **4.8.1. Wheat Germ-Agglutinin (WGA)**

Die lektin histochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Studie konnten z. T. die Angaben anderer Autoren zur Reaktion von Lektinen am embryonalen Hühnerherzen bestätigen. In der Altersgruppe von neun bis zwölf Bebrütungstagen konnte wie in der Literatur beschrieben eine Reaktion des Wheat Germ-Agglutinins (WGA) auf das Endothel von kleineren Gefäßen und am Endokard der Herzkammern nachgewiesen werden. Allerdings konnte am Kapillarendothel keine Reaktion beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden von JILANI und Mitarbeitern (2003), wonach das WGA eine starke Reaktion am Gefäßendothel von Hühnerembryonen zwischen dem zweiten und dem vierten Bebrütungstag aufweist. Zudem belegt eine Reihe von Studien (JILANI et al., 2003; NANKA et al., 2001) die Rolle des WGA als spezifischer Marker für endotheliale Zellen auch in den Kapillaren. Diese Beobachtungen konnten mit den eigenen Untersuchungen wider Erwarten nicht bestätigt werden. Aufgrund der fehlenden Reaktion dieses Lektins auf das Kapillarendothel wurde im Rahmen dieser Studie von der morphometrischen Bestimmung des Kapillargehaltes im Myokard der einzelnen Herzen abgesehen. Die spezifische Reaktion des WGA am Myokard der untersuchten Hühnerembryonen im Alter zwischen neun und zwölf Tagen belegen die von NANKA und Mitarbeitern (2001) beschriebene Reaktion des WGA am Skelettmuskelgewebe des Vogels auch für das Herzmuskelgewebe sowie für die Zellen

der Tunica muscularis der Arteriolen. Allerdings konnte die Reaktion nicht einheitlich an allen Herzen beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten sich im Reaktionsmuster des WGA auch regionale Unterschiede. So zeigte das atriale Myokard eine stärkere Reaktion als das Myokard der Ventrikel. Diese Beobachtungen, sowie die sich mit zunehmendem Alter ändernde Reaktion des WGA an den verschiedenen Strukturen des embryonalen Hühnerherzen, bestätigen die Aussagen von JORNS und Mitarbeitern (2003) sowie GRIFFITH und Mitarbeitern (1991), wonach es im Zuge der Entwicklung des Embryo zu Veränderungen in der Expression verschiedener, mit den Zelloberflächen assoziierten Glykoproteine und Glykolipide kommt, die zu starken Variationen in der Bindungsspezifität der Lektine beim Vogel führen. Aus dieser Tatsache erklärt sich auch die Variation in den Befunden an den einzelnen Herzen der verschiedenen Altersgruppen und innerhalb einer Altersgruppe. Eine unterschiedliche Reaktionsstärke wurde bei den untersuchten Herzen auch schon bei den Untersuchungen mit verschiedenen Antikörpern beobachtet. Zwischen den beiden Versuchsgruppen konnte jedoch kein Unterschied im Reaktionsmuster des Wheat Germ-Agglutinins verzeichnet werden. So geben die Befunde der im Rahmen dieser Studie durchgeführten lektin histochemischen Untersuchung zwar neue Erkenntnisse über die Bindungsspezifität des WGA und anderer Lektine, es konnte jedoch, ähnlich wie bei der Immunhistochemie keine Veränderung in der Zusammensetzung von Glykokonjugaten auf Zelloberflächen unter dem Einfluss einer Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft registriert werden. Auch dieses Ergebnis belegt somit eine hohe Toleranz des Hühnerembryos gegenüber einer Herabsetzung des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft.

#### **4.8.2. Peanut-Agglutinin (PNA)**

Die lektin histochemische Untersuchung mit dem Peanut-Agglutinin (PNA) ergab, dass in der Altersgruppe zwischen neun und zwölf Tagen sowohl das Endokard als auch das Endothel der großen Gefäßstämme eine spezifische Reaktion mit dem Lektin zeigte. Darüber hinaus konnte auch das Myokard der Ventrikel markiert werden. Allerdings waren auch bei diesem Lektin Variationen der Ausdehnung und Intensität der Reaktion festzustellen. Im Gegensatz dazu beschrieben FAZEL und Mitarbeiter (1989) eine Bindung des PNA im Myokard von Hühnerembryonen nur zwischen dem dritten und dem sechsten Bebrütungstag. Die in der vorliegenden Studie beobachteten Reaktionen am Endokard, sowie am Endothel der großen Gefäße standen jedoch im Einklang mit den Befunden von FAZEL und Mitarbeitern (1989). Wie auch schon für die Affinität des Wheat Germ-Agglutinins beobachtet, scheint es zwischen dem Endothel der großen Gefäße, dem der Arteriolen, dem der Kapillaren und dem des

Endokard starke Unterschiede im Gehalt zellassoziierter Glykokonjugate zu geben, da beide Lektine ein stark unterschiedliches Reaktionsmuster an den einzelnen Strukturen aufwiesen. Darüber hinaus ist bei den Herzen von Embryonen zwischen dem achtzehnten und dem zwanzigsten Bebrütungstag keine Reaktion des Endokard und des Endothel der Gefäße mehr festzustellen. Es ist wahrscheinlich, dass kurz vor dem Schlupf eine Umstellung in der Zusammensetzung der Zellmembranen bzw. der an dieser gebunden Glykoproteine und Glykolipide besteht, und sich dadurch die lektinbindenden Strukturen ändern. Eine solche Veränderung in der Expression bestimmter Glykoproteine und Glykolipide in Abhängigkeit vom Stadium der Embryonalentwicklung wurde auch von JORNS und Mitarbeitern (2003) sowie GRIFFITH und Mitarbeitern (1991) beschrieben.

Eine besonders deutliche und spezifische Reaktion konnte bei einigen Herzen ab dem vierzehnten Bebrütungstag an der rechten Atrioventrikularklappe beobachtet werden. FAZEL und Mitarbeiter (1989) beschrieben im Gegensatz dazu eine starke Reaktion des PNA auf die Taschenklappen von Aorta und Truncus pulmonalis von embryonalen Hühnerherzen, allerdings nur nach enzymatischer Vorbehandlung mit Sialidase (Neuraminidase). Die Affinität der Atrioventrikularklappen zu PNA war jedoch nicht bei allen Herzen zu registrieren und sie zeigte keine Korrelation zur Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft. Eine Erklärung für die sehr spezifische Reaktion einiger Herzen an der rechten Atrioventrikularklappe muss in der Zusammensetzung dieser Klappe in den unterschiedlichen Stadien der Embryonalentwicklung zu finden sein. GRIFFITH und Mitarbeiter (1991) beschrieben eine Bindung von PNA an extrazelluläre Matrixfibrillen, während HEMMING und Mitarbeiter (1998) sowie HOEDT-SCHMIDT und Mitarbeiter (1993) die Bindung von PNA an Keratansulphat (ein Proteoglykan) in speziellen Zellen des Herzens und verschiedener anderer Organe dokumentierten. Die Autoren ließen hierbei jedoch unerwähnt, in welche Strukturen am Herzen diese speziellen Zellen zu finden sind. Aufgrund der elastischen, kollagenfaserigen Struktur der Klappen ist es denkbar, dass Proteoglykane zumindest embryonal auch am Aufbau der Herzklappen beteiligt sind, obwohl FAZEL und Mitarbeiter (1989) im Bereich des „kollagenfaserigen Klappenskelettes“ keine Reaktion von PNA feststellen konnten. Zudem bleibt bei der Annahme einer Reaktion des Klappenskelettes die Frage offen, warum diese Struktur nur bei fünf der untersuchten Herzen beobachtet werden konnte, und warum sich die Reaktion auf die rechte Atrioventrikularklappe beschränkte. Die Beantwortung dieser Fragen war aufgrund des Fehlens eines Zusammenhanges zwischen der „hypoxischen“ Bebrütung und dem Reaktionsmuster dieses

Lektins wenig aussagekräftig und sollte daher Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

#### **4.9. Schlussfolgerungen und Ausblick**

Im Rahmen dieser Studie konnten neue Erkenntnisse der Reaktion verschiedener Antikörper und Lektine in der embryonalen Entwicklung des Herzens im Hühnerembryo gewonnen werden. Darüber hinaus zeigten die morphometrischen Untersuchungen zum Zellgehalt und zur Myokardbreite Unterschiede dieser Parameter an den einzelnen Lokalisationen und in den unterschiedlichen Versuchs- und Altersgruppen. Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass Untersuchungen zur Struktur des Herzens wichtig sind, um sie im Zusammenhang mit beispielsweise physiologischen Untersuchungen zu interpretieren. Die strukturellen, morphometrischen bzw. histologischen Untersuchungen zur Unterstützung von Ergebnissen aus physiologischen und klinischen Studien sollten im Sinne des Zusammenhanges von Struktur (Morphe) und Funktion (Physis) auch Gegenstand zukünftiger Fächer übergreifender Untersuchungen sein.

Wie bereits erwähnt, könnte die vorliegende Studie durch die Dokumentation von Reaktionen weiterer Antikörper und Lektine mit den verschiedenen Geweben im Herzen sowie durch eine morphometrische Bestimmung des Kapillargehaltes am Herzmuskel von in Sauerstoff reduzierter Bebrütungsluft entwickelten Hühnerembryonen ausgedehnt werden.