

1. Literaturübersicht

1.1. Embryonale Entwicklung des Herzens

In der Embryonalentwicklung eines Organismus ist die frühe Bildung des Herz-Kreislauf-Systems von großer Bedeutung (LYONS, 1996), um eine ausreichende, der Entwicklung gemäße Versorgung mit Nähr- und Baustoffen sicher zu stellen. Das Herz versorgt in seiner Funktion als Saug-Druck-Pumpe durch regelmäßige Kontraktionen das heranwachsende Lebewesen über ein sich zeitgleich entwickelndes komplexes Gefäßsystem mit Blut und somit die sich differenzierenden Gewebe eines Embryos mit wichtigen Nährstoffen und Sauerstoff (SEARCY u. YUTZEY, 1998), wobei gleichzeitig Stoffwechselprodukte und Kohlendioxid abtransportiert werden.

1.1.1. Entwicklung des Blutgefäßsystems

1.1.1.1. Vaskulogenese

Zur Bildung des für die frühe Versorgung des Embryos notwendigen Gefäßsystems kommt es nicht – wie ursprünglich angenommen – zu einer zentripetalen Migration extraembryonaler Gefäße in den Embryo, sondern zur Entstehung von zwei voneinander unabhängigen Teilen des Kreislaufapparates, dem extra- und dem intraembryonalen Gefäßsystem (PLENDL et al., 2002). Erst später in der Embryonalentwicklung vereinigen sich diese Systeme zu einem einheitlichen Organsystem, dem Blutgefäßsystem des Embryos. Blutgefäße entstehen durch unterschiedliche Mechanismen. Das extraembryonale Gefäßsystem entwickelt sich durch Vaskulogenese. Dieser Mechanismus sieht die Neubildung von Blutgefäßen („de novo“) aus den Blutinseln in der mesodermalen Schicht der Dottersackwand vor. Im mesenchymalen Bindegewebe dieser Splanchnopleura werden Hämoblasten gebildet, die sich weiter zu Hämozytoblasten und Hämangioblasten differenzieren. Diese Differenzierung führt in der Peripherie der mesodermalen Herzanlage zur Bildung eines einschichtigen Epithelzellverbandes aus Hämangioblasten (späteres Gefäßendothel), und von diesen Zellgruppen eingeschlossen zur Bildung runder Hämozytoblasten (Vorläufer der Blutzellen). Es entstehen sogenannte „Blutinseln“, die miteinander konfluieren (KUTRYK et al., 2003). Durch diesen Prozess bildet sich ein Kapillarnetzwerk, aus dem die zuführenden und ableitenden Dottersackgefäße (Aa. et Vv. vitellinae sive omphalomesentericae) hervorgehen. Das sich etwas später entwickelnde intraembryonale Gefäßsystem entsteht zunächst ebenfalls durch Vaskulogenese aus dem Mesoderm. Intraembryonal ist die Entstehung von

Endothelzellen nicht mit der Bildung von Blutzellen assoziiert, wie dieses im Dottersack der Fall ist (RISAU, 1993). Parallel zur Entwicklung des Herzens entstehen an verschiedenen Stellen des embryonalen Körpers Blutgefäße, wie z. B. die Aorta, in situ durch Vaskulogenese.

1.1.1.2. Angiogenese

Neben der Vaskulogenese ist die Angiogenese der zweite wichtige Prozess zur Entstehung von Blutgefäßen. Die Angiogenese ist das Sprossen von Kapillaren aus bereits bestehenden, durch Vaskulogenese entstandenen Blutgefäßen (RISAU, 1997). Mittels dieser Gefäßsprossung nehmen die Gefäße Verbindung mit der Herzanlage auf. So entsteht schließlich die Kommunikation des extraembryonalen mit dem intraembryonalen Gefäßsystem (PLENDL et al., 2002).

1.1.1.3. Vaskuläre Myogenese und Arteriogenese

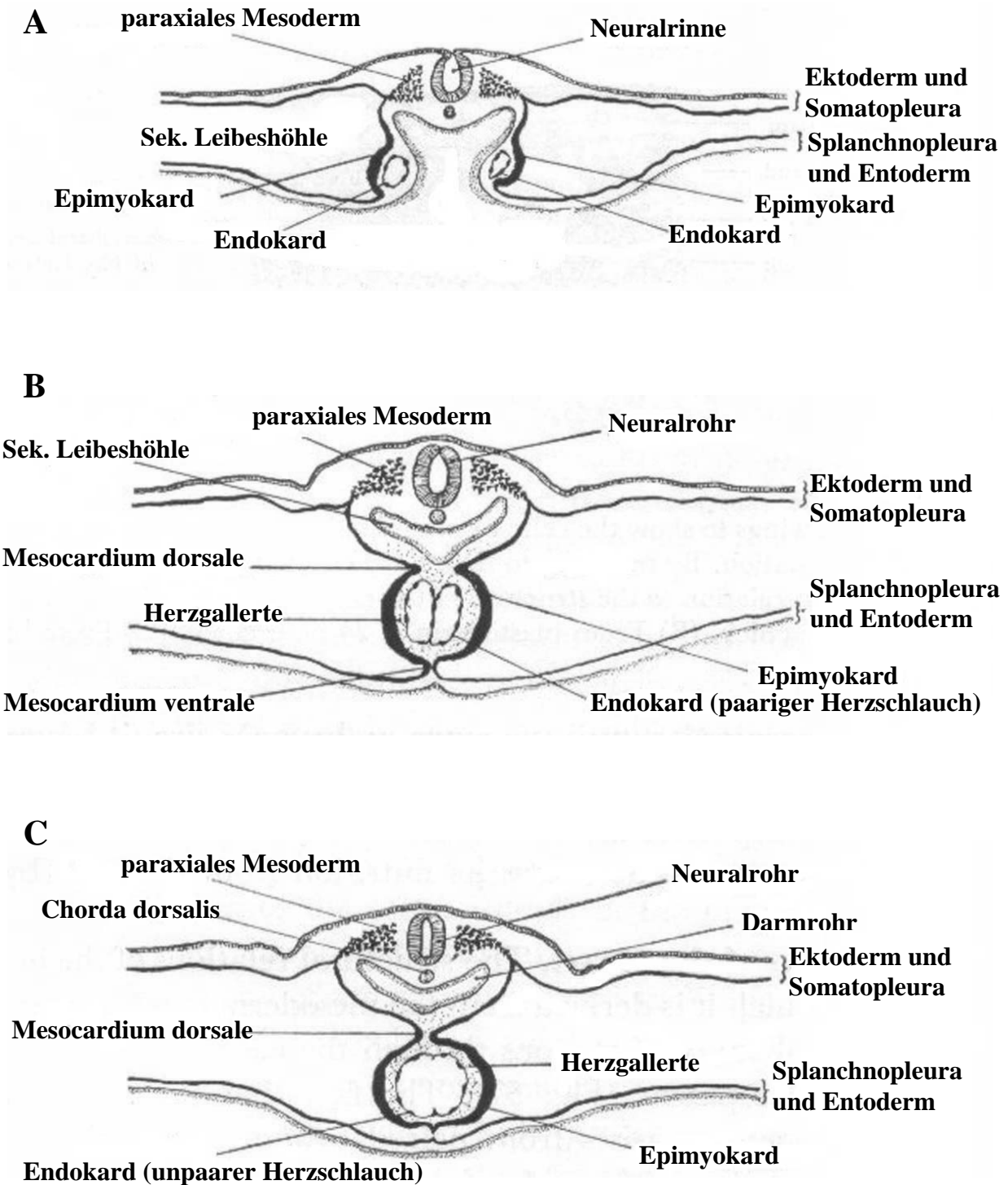
Unter dem Begriff der vaskulären Myogenese versteht man die Entwicklung der Blutgefäßwand aus periendothelialen Zellen im Niederdrucksystem. Unter entsprechenden hämodynamischen Bedingungen schließt sich die Arteriogenese, also die Ausbildung einer muskulös-elastischen Tunica media, an, die die viskoelastischen und vasomotorischen Eigenschaften des arteriellen Hochdrucksystems ermöglicht (PLENDL et al., 2002)

Im Verlauf der Arteriogenese tragen wandständige Zellen zu einer Muskularisierung der Gefäße bei. Dieses kann entweder durch Sprossung oder longitudinale Migration von stabilisierenden Perizyten entlang der endothelialen Gefäße vonstatten gehen.

1.1.2. Bildung der Herzanlage

Auch die Organogenese des Herzens läuft in der Primitiventwicklung des Hühnerembryos parallel zur Blutgefäßentwicklung sehr frühzeitig ab, um die aus dem Dottersack durch die Entodermzellen der Dottersackwand utilisierten Nähr- und Baustoffe im Embryo zu verteilen. Die Bildung des Herzens ist somit eng an die Entstehung des Gefäßsystems gekoppelt. Bereits nach 18 Stunden der Bebrütung (PATTEN, 1957) beginnt im extraembryonalen Abschnitt des viszeralen Blattes des Seitenplattenmesoderm, beiderseits der Membrana buccopharyngica bzw. der Prächordalplatte und unterhalb der Kopfanlage, die Bildung der Herzanlage (s. Abb. 1 a). Die Herzentwicklung beginnt mit der Bildung eines langsam leitenden (KAMINO, 1991) und sich „peristaltoid“ kontrahierenden Herzschlauches (PATTEN et al., 1933). Die im Zuge

der Vaskulogenese gebildeten Blutinseln ermöglichen zum einen an mehreren Stellen der Splanchnopleura die Bildung eines Kapillarnetzwerkes und begründen zudem die Bildung zweier primitiver Herzsclläuche (PATTEN, 1957) (s. Abb. 1 a und 1 b).



Textabb. 1 (a bis c):

Schemazeichnungen des Transversalschnittes durch die perikardiale Region eines Hühnerembryos in verschiedenen Entwicklungsstadien zur Darstellung der embryonalen Entwicklung des Herzen (*modifiziert nach PATTEN, 1957*).

Dauer der Bebrütung: A = 26 Stunden, B = 28 Stunden, C = 29 Stunden.

1.1.3. Anlage des primitiven Herzschlauches

Im Verlaufe der Entwicklung des Herzen kommt es neben der Bildung der mit Hämocytoblasten gefüllten Endothelschläuche (späteres Endokard) auch zur Bildung des Epimyokardmantels, indem die Mesenchymzellen des Seitenplattenmesoderms unterhalb des Serosenepithels (späteres Epikard) proliferieren und sich zu Kardiomyoblasten (zukünftiges Myokard) differenzieren (PATTEN, 1957).

Nach Anlage aller grundlegenden Gewebeschichten in der Herzwand kommt es im Zuge der Embryogenese durch ein Vorwärts- und Abwärtswachstum des Kopfes zu einer Verlagerung des paarigen Herzschlauches unter die vordere Darmbucht (s. Abb. 4 b). Hierbei werden die beiden Herzschläuche um 180° gedreht und medial verschoben, so dass die Herzschläuche sich zunächst einander nähern und anschließend median fusionieren. Aus den paarig angelegten Herzschläuchen entsteht so ein unpaarer Herzschlauch (BRAGULLA, 2003) (s. Abb. 4 c). Nach Rückbildung des ventralen Gekröses (Mesocardium ventrale) liegt das Herz in der einfachen (sekundären) serösen Leibeshöhle (Cavum pericardio-pleuro-peritoneum), aus der später die ventrale Herzbeutelhöhle und die dorsal gelegenen Pleurahöhlen und die hinter dem Zwerchfell gelegene Bauchfellhöhle hervorgehen. Auch der mittlere Teil des dorsalen Gekröses (Mesocardium dorsale) wird im Zuge des Längenwachstums des nun unpaaren Herzschlauches zurückgebildet (BONNET, 1929).

1.1.4. Bildung der Herzschleife

Das im Vergleich zum Wachstum des Embryos überproportionale Längenwachstum des unpaaren Herzschlauches führt zu einer Krümmung und Drehung dieses Schlauches. Generell ist die Meinung verschiedener Autoren zur Definition des Begriffes „Herzdrehung“ sehr unterschiedlich. Einige Autoren sind heutzutage der Meinung, dass eine Vielzahl von Faktoren resp. Mediatoren bei der Herzrechtsdrehung eine Rolle spielt und die Drehung nicht nur Folge eines begrenzten Platzangebotes im Embryo ist (BELLAIRS u. OSMOND, 1998).

Nach der Bildung des primitiven unpaaren Herzschlauches wächst dieser zügig in die Länge und Breite. Besonders die kaudalen zwei Drittel des Herzschlauches nehmen an Umfang zu. Sie bilden später die gegenüber der Vorkammerregion deutlich dickere Ventrikelregion. Das regional differenzierte Wachstum in der Wand des Herzschlauches scheint somit schon Hinweis auf die spätere Struktur bzw. die Kammerung des Herzens zu liefern (MÄNNER, 2000). Die Veränderung der Herzgröße sowie die rostrale (Kiemendarm) und kaudale (Septum transversum) Fixation des wachsenden Herzschlauches führen zu einer Krümmung des Herzens in eine C-förmige Herzschleife. Hierbei nähert sich das zuführende dem

abführenden Herzende (BONNET, 1929). Der zuführende Schleifenring wendet sich dorsalwärts und nach links, der abführende Schenkel des Herzschlauches nach ventral und rechts. Letzterer zeigt zwei Schenkel, einen nach rechts kaudal absteigenden (zukünftige Einstrombahn der Herzkammern) und einen kranial aufsteigenden Schenkel, der in die ventrale Aorta bzw. den Truncus arteriosus übergeht (PATTEN, 1957). Die Umbiegungsstelle der beiden Schenkel entspricht der späteren Herzspitze. Bei Hühnerembryonen gliedert sich der Herzschlauch bereits am dritten Bebrütungstag deutlich in die Abteilungen des vierkammerigen, septierten Herzen. Am kaudalen Ende des Herzschlauches setzt eine Ringfurche den späteren Vorkammerteil gegen den Sinus venosus ab, der die Hohlvenen aufnimmt. Eine weitere Furche, die Atrioventrikularfurche, trennt den schnell wachsenden Vorkammerteil von dem sich zu den Kammern umbildenden absteigenden Ventrikelteil ab (BONNET, 1929). Zwischen diesen beiden Abteilungen bildet sich in Form einer Einschnürung der Herzwand der sogenannte „Ohrkanal“ (Canalis auricularis sive Ostium atrioventriculare commune), der später die Ebene der Atrioventrikularklappen markiert. Eine Interventrikularfurche trennt dann die beiden Ventrikelanlagen, deren Wand sich im Zuge der weiteren Entwicklung des Embryos zunehmend ausdehnt und wächst. Im Vorkammerteil des Herzschlauches führt eine sagittal verlaufende Rinne auf der Dorsalseite der Vorkammerwand äußerlich zu einer Aufteilung in rechte und linke Vorkammer (BONNET, 1929). Durch diese sehr komplexen Umbildungsprozesse erhält das Herz äußerlich bereits seine endgültige charakteristische Gestalt.

1.1.5. Septierung der Vorkammern

Nach einundfünfzig bis sechsundfünfzig Stunden der Bebrütung des Hühnerembryos bilden sich die Anlagen der Atrioventrikularklappen (AV-Klappen), welche in Form von dreieckigen Kämmen, den sogenannten Endokardkissen, das Ostium atrioventriculare commune, von beiden Seiten der kranialen und kaudalen Wand verengen. Diese Endokardkissen bestehen nach HURLE und Mitarbeitern (1977) initial aus sogenannter Herzgallerte (cardiac jelly) und werden anschließend von Zellen des Endokard durchdrungen (ICARDO 1989). Am fünften Tag der Bebrütung treffen die AV-Klappen in der Mitte des Ostium atrioventriculare commune aufeinander, wodurch diese Öffnung in ein rechtes und linkes Ostium atrioventriculare geteilt wird. Gleichzeitig bildet sich ein primäres Septum interatriale, welches sich als schmaler Kamm nach ca. fünfzig Bebrütungsstunden von kaudodorsal in kranioventraler Richtung auf die gebildeten AV-Klappen hin entwickelt.

Am vierten Tag der Bebrütung des Hühnerembryos verbinden sich die AV-Klappen und das primäre Septum interatriale miteinander wodurch das primäre Foramen interatriale zwischen beiden Vorkammern geschlossen und somit die rechte und linke Vorkammer vorübergehend voneinander getrennt werden. Diese stehen wieder über mehrere kleine im Septum interatriale primum entstehende sekundäre interatriale Foramina miteinander in Verbindung, so dass ein gleichmäßiges Wachstum der Vorkammern durch die ausgeglichenen Druckverhältnisse ermöglicht wird. Über den Verschluss dieser sekundären interatrialen Foramina ist wenig bekannt. BELLAIRS und OSMOND (1998) beschreiben, dass das Vogelherz weder ein einzelnes großes Foramen interatriale secundum, vergleichbar dem Foramen ovale des Säugetierherzen, noch ein sekundäres Septum ähnlich dem Septum secundum des Säugetierherzens besitzt. Beim Haushuhn werden später die Pulmonalvenen und Teile des Gewebes der linken Vorkammer vom interatrialen Septum aufgenommen, so dass in dieser Hinsicht die Entwicklung des Vogelherzens von der Entwicklung des Säugerherzens abweichen soll (BELLAIRS u. OSMOND, 1998).

1.1.6. Septierung der Herzkammern

Die Teilung des gemeinsamen Ventrikels in einen rechten und einen linken Ventrikel beginnt am dritten Tag der Bebrütung, an welchem sich der linke Ventrikel aufwölbt, gefolgt von der Aufwölbung des rechten Ventrikels am vierten Bebrütungstag (MÄNNER, 2000). Die Ausdehnung der Ventrikelwände ist Folge des steigenden Blutdruckes. Teile der ursprünglichen Wand des gemeinsamen Ventrikels bleiben zwischen den beiden Aufwölbungen in der Entwicklung zurück und bilden die Grundlage des interventrikulären Septum (LAMERS et al., 2002). Dieses Septum, welches anfänglich nur im Bereich der Herzspitze zu finden ist, erweitert sich in kraniodorsaler Richtung und erreicht die Ebene der AV-Klappen am sechsten Bebrütungstag. Die Verbindung beider Herzkammern miteinander wird hierbei jedoch durch eine Lücke im Septum interventriculare, den so genannten Interventrikularkanal, aufrechterhalten (BELLAIRS u. OSMOND, 1998). Neben der Unterteilung des einen gemeinsamen Ventrikels durch das Septum interventriculare wird das Herz im Bereich der zukünftigen Ausströmbahn der Herzkammer, dem Bulbus cordis, dem Conus arteriosus und dem Truncus arteriosus, aus kaudoventraler und kraniodorsaler Richtung von leistenförmigen Endokardkissen geteilt. Diese vereinigen sich mit dem muskulösen Ventrikelseptum zur Kammerscheidewand. Die Bulbusleisten proliferieren im Bulbus, Conus und Truncus arteriosus in einem spiralförmig gewundenen Verlauf und vereinigen sich dann zu einem Septum aorticopulmonale. Hieraus entsteht ein gewundener

Verlauf der Aorta und des Truncus pulmonalis (BELLAIRS und OSMOND, 1998). Am Übergang des Bulbus cordis in den Conus arteriosus liegen neben den Bulbusleisten weitere transversale Endokardkissen. Diese Endokardkissen befinden sich mit den Verdickungen der Bulbusleisten in einer Ebene und bilden die späteren Taschenklappen im Ursprung der Aorta bzw. des Truncus pulmonalis (PATTEN, 1957).

1.1.7. Embryonale Entwicklung des Myokards

Der primitive Herzschlauch besteht bereits aus zwei konzentrisch angeordneten Zellschichten, außen aus dem Epimyokard und innen aus dem Endokard. Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich die Herzgallerte (DE JONG et al., 1997). Während der Drehung der Herzsleife wird das atriale und ventrikuläre Arbeitsmyokard durch lokale Proliferationen und Differenzierungen an der äußeren Krümmung des Herzschlauches geformt (CHRISTOFFELS et al., 2000; MOORMAN et al., 2000 a). Die zunächst aus mesenchymalem Bindegewebe, ähnlich dem der Klappen, gebildeten Septen des Herzens werden in den fortgeschrittenen Stadien der Entwicklung weitgehend muskulär (DE JONG et al., 1997; MJAATVEDT et al., 1999; MOORMAN et al., 2000 b). So stellt die Differenzierung myokardialer Zellen innerhalb des Mesenchyms die zweite Phase in der Bildung des Myokardaufbaus dar, die von der direkten Bildung des Myokards des Herzschlauches aus dem viszeralen Seitenplattenmesoderm zu unterscheiden ist. Diese zweite Phase der Ausbildung des Myokards ist nicht auf die Septen und Herzklappen allein beschränkt, sondern konnte auch an den distalen Enden des Herzschlauches beobachtet werden (VAN DEN HOFF et al., 2001). In der Literatur wird diese Form der „myokardialen Formation“ als „Verstärkung“ bezeichnet, um sie von der Kardiomyogenese aus den mesodermalen Herzanlagen und auch von dem Begriff der „Myokardialisierung“ abzugrenzen. Diese „Myokardialisierung“ bezeichnet den Prozess, bei dem Kardiomyozyten in das Mesenchym der endokardialen Klappen bzw. Endokardkissen, einwandern (VAN DEN HOFF et al., 1999) und somit für einen muskulären Aufbau dieser Struktur sorgen. Die Kardiomyozyten, die in die endokardialen Klappen einwandern, scheinen aus dem bereits bestehenden Myokard an der Basis der Endokardkissen zu kommen. Untersuchungen von DE LA CRUZ (1977) sowie DE LA CRUZ und SANCHEZ-GOMEZ (1999) zeigten, dass dieser Prozess der Myokardialisierung möglicherweise nicht die Folge von Zelldifferenzierungen, sondern ein dynamischer Repositionsprozess ist, bei dem erste, bereits vorhandene myokardiale Zellen aktiv in Gebiete einwandern, die aus mesenchymalem Gewebe bestehen (VAN DEN HOFF et al., 2001). Der Grad der Myokardialisierung zeigt speziesspezifische

Unterschiede. Sie ist beim Vogelherzen wesentlich stärker ausgeprägt als beim Säugetierherz (LAMERS et al., 1995; DE JONG et al., 1997; VAN DEN HOFF et al., 1999; MOORMAN et al., 2000 b; KIM et al., 2001).

1.1.8. Beginn der Herzaktion

Bereits nach neunundzwanzig bis dreiunddreißig Stunden der Inkubation können im Hühnerembryo Aktionspotentiale im kardialen Mesoderm registriert werden. Diese treten zunächst in der linken kaudalen Region des Ventrikels auf, noch bevor die Atrien oder der Sinus venosus geformt werden (HIROTA et al., 1987). Diese Aktionspotentiale stellen die ersten Anzeichen für einen Schrittmacher am Herzen dar. Erste Kontraktionen der Kardiomyozyten sind im Hühnerembryo nach sechsunddreißig Stunden sichtbar und nach zwölf weiteren Stunden kann bereits der gesamte Blutkreislauf des heranwachsenden Embryos durch rhythmische und regelmäßige Kontraktionen des Herzschlauches bewerkstelligt werden (TOKUYASU et al. 1987). BELLAIRS u. OSMOND (1998) beschreiben, dass am zweiten Tag der Bebrütung Erregungswellen im Embryo registriert werden können, die sich vom kaudalen Schrittmacher ausbreiten und zu ersten rhythmischen Kontraktionen der Muskulatur führen. Im Zuge der embryonalen Entwicklung differenzieren sich Kardiomyoblasten zu reifen Kardiomyozyten, die über End-zu-End-Connexione bzw. gap junctions verbunden sind und so eine gemeinsame, geordnete Kontraktionswelle ermöglichen (WOODCOCK et al., 2005). KOROHOODA und Mitarbeiter (2005) konnten rhythmische Kontraktionen von Kardiomyozyten auch in der Zellkultur nachweisen. Kardiomyozyten aus Hühnerembryonen setzten während der Isolation und anschließend auf einem Netzwerk aus Glasfasern die Kontraktionen zum Teil über mehrere Monate fort.

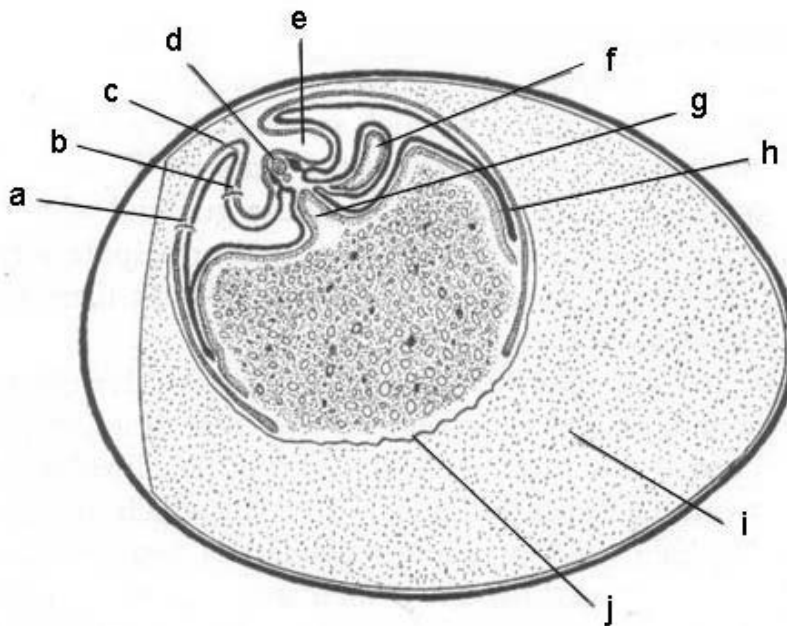
1.1.9. Embryonale Entwicklung des Epikards

Die äußere Schicht der Herzwand, das Epikard, entwickelt sich aus dem viszeralem Blatt des Seitenplattenmesoderms, der Visceropleura (Lamina epithelialis epicardii), und einem extrakardialen Ursprungsgewebe (Lamina propria epicardii), dem sogenannten Proepikard, welches sich aus mesenchymalen Zellen zusammensetzt und sich bei Vogelembryonen auf der kopfwärts gerichteten ventralen Oberfläche des Sinus venosus befindet (MUNOZ-CHAPULI et al., 2002). Die proepikardialen Zellen siedeln sich durch direkte Adhäsion auf der epimyokardialen Oberfläche des Herzens an, um dort das primitive Epikard zu bilden. Diese Ansiedelung erfolgt vornehmlich im Bereich der Atrioventrikularfurche auf der Herzoberfläche. Zwischen dem neu gebildeten Epikard und dem Myokard entwickelt sich ein

Gewebe, welches als subepikardiales Mesenchym bezeichnet wird. Dieses Gewebe tritt ebenfalls zuerst im Bereich der Atrioventrikularfurche in Erscheinung und umgibt später, wie das Epikard, das gesamte Herz, wobei es besonders über den Atrien wesentlich schmaler ist als über den Ventrikeln, oder sogar vollständig fehlt (MUNOZ-CHAPULI et al., 2002). Das subepikardiale Mesenchym enthält neben mesenchymalen und fibroblastoiden Zellen auch die sogenannten epicardial derived cells (EPDC) (PEREZ-POMARES et al. 1997). Diese EPDC werden durch einen Prozess gebildet, der in der Literatur als „epikardiale-mesenchymale Transformation“ bezeichnet wird. Bei diesem Prozess erhalten die epithelialen Zellen des Epikard die Eigenschaften mesenchymaler Zellen, so dass diese in der Lage sind, sich von ihren Nachbarzellen abzulösen, ihr Zytoskelett stark zu verändern und die Basalmembran des Epithels zu durchdringen, um sich subepithelial im Mesenchym weiter zu differenzieren. So können die EPDCs sich zu Zellen des kardialen Bindegewebes und zu Zellen der nutritiven Gefäße des Herzens differenzieren (WESSELS et al., 2004).

1.2. Lebensbedingungen des Hühnerembryos im Ei

Der Hühnerembryo entwickelt sich im Gegensatz zum Säugetierembryo außerhalb des mütterlichen Organismus. Am Modell des Hühnereies können somit verschiedene externe Einflussfaktoren und Stressoren auf die Entwicklung bestimmter Strukturen des Organismus wie z. B. des kardiovaskulären Systems erforscht werden, ohne dass eine Beeinflussung durch Veränderungen des maternalen Metabolismus, des Hormonhaushaltes oder der hämodynamischen Prozesse, wie sie beim Säugetier vorliegen, berücksichtigt werden müssen.



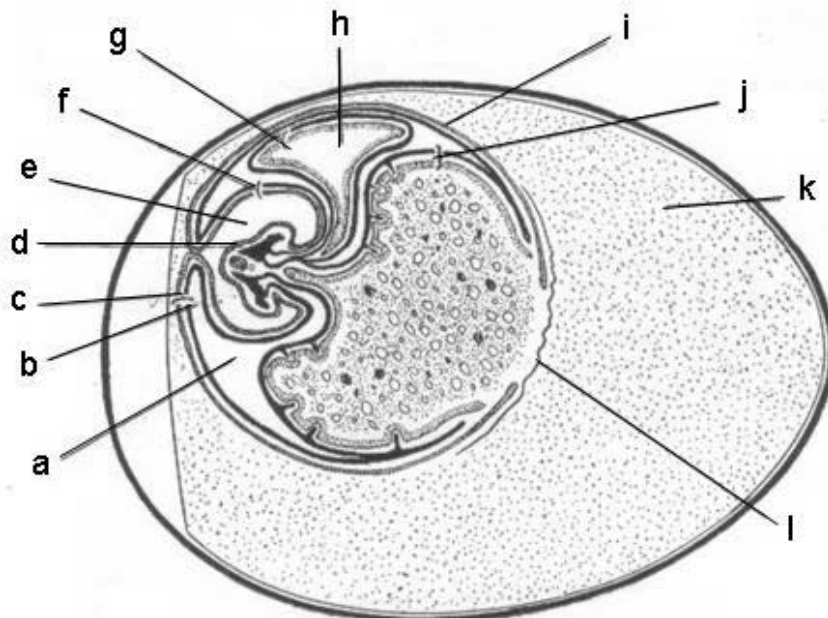
Textabb. 2 a:

Schematische Darstellung der extraembryonalen Membranen im Hühnerei am 3. Bebrütungstag (modifiziert nach PATTEN, 1957). Die Abb. zeigt einen longitudinalen Schnitt durch das Hühnerei. Legende: a = Chorion (Somatopleura und Ektoderm), b = Amnion (Somatopleura und Ektoderm), c = laterale Amnionabfaltung, d = Embryo, e = Amnionhöhle, f = Allantois (Splanchnopleura sive Visceropleura und Entoderm), g = Dottersackstiel, h = Dottersackwand (Splanchnopleura sive Visceropleura und Entoderm), i = Eiweiß, j = Dottersackmembran (= Zellmembran der polylezithalen Eizelle)

Der Vogelembryo entwickelt sich in einem kalkschaligen Ei (Textabb. 2 a, b und c). Im Inneren des Eies ist der Embryo von einer inneren und einer äußeren Eischalenmembran sowie von weiteren embryonalen Hüllen umgeben. Diese extraembryonalen Hüllen erfüllen während der Embryonalentwicklung lebenswichtige Funktionen. Es gibt vier solcher extraembryonalen Hüllen, den Dottersack, das Amnion, das Chorion und die Allantois (PATTEN, 1957).

1.2.1. Dottersack

Der im Gegensatz zum Säugetier beim Vogel sehr groß angelegte Dottersack (s. Textabb. 2 a) wird primär vom extraembryonalen Teil des Entoderm (primäre Dottersackwand) und dann sekundär zusätzlich von der extraembryonalen Ausdehnung der Splanchnopleura in Form einer sackartigen Hülle (sekundärer Dottersack) umfasst (PATTEN, 1957). Zudem wird der Dotter von einer „Dottersackhaut“, der so genannten Dottersack- oder Vitellinmembran umschlossen. Der Dotter dient der Versorgung des Embryos mit Nähr- und Baustoffen. Diese Nährstoffe werden über die Kapillaren in der mesodermalen Schicht der Dottersackwand (Splanchnopleura) und anschließend über die im Dottersackstiel verlaufenden Dottersackarterien und Venen (Arteriae und Venae vitellinae seu omphalomesentericae) in den bzw. aus dem Embryo transportiert (s. Textabb. 3).



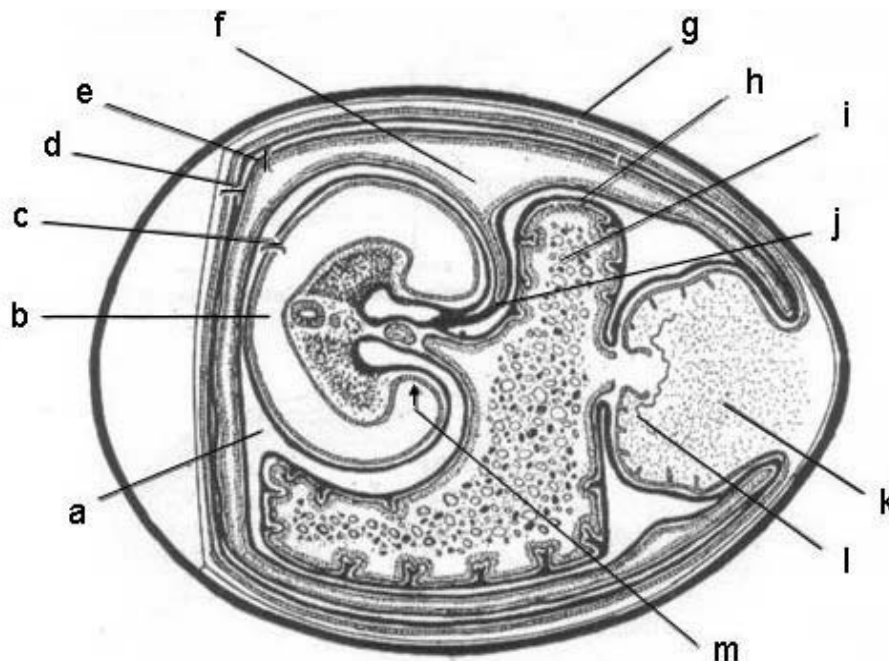
Textabb. 2 b:

Schematische Darstellung der extraembryonalen Membranen am 5. Bebrütungstag (modifiziert nach PATTEN, 1957). Longitudinalschnitt durch das Ei. Legende: a = extraembryonale Leibeshöhle, b = Sero-Amnion-Höhle, c = Chorion (Somatopleura und Ektoderm), d = Embryo, e = Amnionhöhle, f = Amnion (Somatopleura und Ektoderm), g = Allantois, h = Allantoishöhle, i = Ektoderm des Chorion, j = Dottersackwand (Splanchnopleura und Entoderm), k = Eiweiß, l = Dottersackmembran

1.2.2. Amnion und Chorion

Das Amnion (Schafhaut) und das Chorion (Zottenhaut) sind aufgrund ihrer Herkunft eng miteinander verbunden. Beide entstehen primär aus dem extraembryonalen Ektoderm, sekundär wird dieses ektodermale Epithel vom parietalen Blatt des extraembryonalem

Seitenplattenmesoderm, der Somatopleura, unterlagert. Die ersten Hinweise für die Bildung des Amnions sind nach ca. dreißig Stunden der Bebrütung sichtbar (PATTEN, 1957). Es umschließt den Embryo als eine sackartige Hülle. Die dadurch abgegrenzte Amnionhöhle zwischen Amnion und Embryo ist mit Amnionflüssigkeit gefüllt (s. Textabb. 2 b). Die Einbettung in diese Flüssigkeit ermöglicht dem Embryo, seine Form, Größe und Lage zu verändern, ohne dass Veränderungen der externen Druckverhältnisse ihn belasten können (PATTEN, 1957). In der Amnionwand bilden sich kleine Stränge aus glatter Muskulatur, welche durch Kontraktion leichte Strömungen in der Amnionflüssigkeit erzeugen und dem Embryo helfen, die heranwachsenden Teile mit Amnionflüssigkeit umströmt zu halten. Auf diese Art und Weise können Adhäsionen zwischen wachsenden Körpersegmenten und damit verbundene Fehlbildungen des Embryos vermieden werden (PATTEN, 1957).



Textabb. 2 c:

Schematische Darstellung der Embryonalhüllen am 14. Bebrütungstag (modifiziert nach PATTEN, 1957). Longitudinalschnitt durch das Ei. Legende: a = Sero-Amnion-Höhle (= extraembryonaler Teil der sekundären Leibeshöhle), b = Amnionhöhle, c = Amnion, d = Serosa (= Allantochorion), e = Allantois, f = Allantoishöhle, g = Kalkschale, h = Dottersack, i = Dotter, j = Allantoisstiel, k = Eiweiß, l = Dottersackmembran (Rest der Eizellmembran), m = Dottersackstiel (Nabelstrang, Grenzfalte zwischen Embryo und extraembryonalen Anhängen)

1.2.3. Allantois

Die Allantois (Wasserblase) weicht in ihrer Entwicklung vom Amnion und Chorion durch ihre entodermale Herkunft ab. Die Allantois entsteht nach ca. drei Tagen Bebrütung im Embryo am Boden der hinteren entodermalen Darmbucht (s. Textabb. 2 a bis c). Der

Ursprung der Allantois verbleibt während der gesamten Entwicklung intraembryonal. Der distale sackartige Anteil dieser entodermalen Hülle erstreckt sich über den Nabel hinaus außerhalb der Grenzen der intraembryonalen sekundären Leibeshöhle und vereinigt sich sekundär mit den anderen extraembryonalen Membranen, insbesondere mit dem Chorion (s. Textabb. 2 c). Am vierten Bebrütungstag dehnt sich die Allantois aus dem Körper des Embryos in den extraembryonalen Teil der sekundären Leibeshöhle aus. Der enge proximale Teil der Allantois, der so gennante Allantoisstiel, liegt dann neben dem Dottersackstiel im Nabelstrang (s. Textabb. 2 c). Nach dem Herauswachsen des distalen Anteils der Allantois aus dem Embryo vergrößert sich dieser erheblich zur Allantoisblase, die sich durch zunehmende Ansammlung von Flüssigkeit im Zuge der fortschreitenden Entwicklung der Nieren des Embryos weiter ausdehnt. Die Ausdehnung der Allantoisblase erfolgt sehr schnell und erstreckt sich in den Hohlraum zwischen Chorion und Amnion. Die Wand der Allantois wird nun flacher und umschließt letztlich den vom Amnion umhüllten Embryo und den Dottersack vollständig. Bei diesem Prozess verbindet sich die mesodermale Schicht der Allantois, der extraembryonale Teil der Splanchnopleura, mit der angrenzenden mesodermalen Schicht des Chorion (Somatopleura), so dass sich ein doppeltes Mesoderm bestehend aus Somatopleura (Chorion) und Splanchnopleura (Allantois) in der Chorioallantoismembran (CAM) zusammenlegt. In dieser Doppelschicht entsteht ein sehr dichtes und verzweigtes Kapillarnetzwerk, welches sich über die Arterien und Venen der Allantois (Aa. u. Vv. umbilicales) mit dem embryonalen Kreislauf verbindet (PATTEN, 1957). Durch dieses Netzwerk aus Kapillaren wird die Funktion der an die Luftkammer grenzenden Chorioallantoismembran ermöglicht, das Blut des Embryos mit Sauerstoff anzureichern und es von Kohlendioxid zu befreien. Dieses wird auch durch die räumliche Anordnung und Ausdehnung der Chorioallantoismembran dicht unterhalb der Eischale erleichtert (s. Textabb. 2 c). Diese Membran sichert die Sauerstoffversorgung des Embryos ab dem sechsten Tag der Bebrütung (PATTEN, 1957).

Die Fusion des vaskularisierten Mesoderms der Allantois mit dem des Chorions weist eine Homologie zum Aufbau des tertiären Chorion der höheren Säugetiere auf. Das tertiäre Chorion von Säugetierembryonen entsteht ebenfalls durch die Fusion von Mesoderm und Allantoisgefäßen mit der inneren, mesodermalen Schicht des Chorions. Dieser Zusammenschluss bildet den foetalen (allantoichorialen) Anteil der Plazenta zwischen Uteruswand und Embryo. Im Säugetierembryo erfüllt der Allantois-Kreislauf in dieser allantoichorialen Plazenta neben der respiratorischen Funktion auch nutritive Aufgaben (BRAGULLA, 2004).

1.3. Die Sauerstoffversorgung des Hühnerembryos

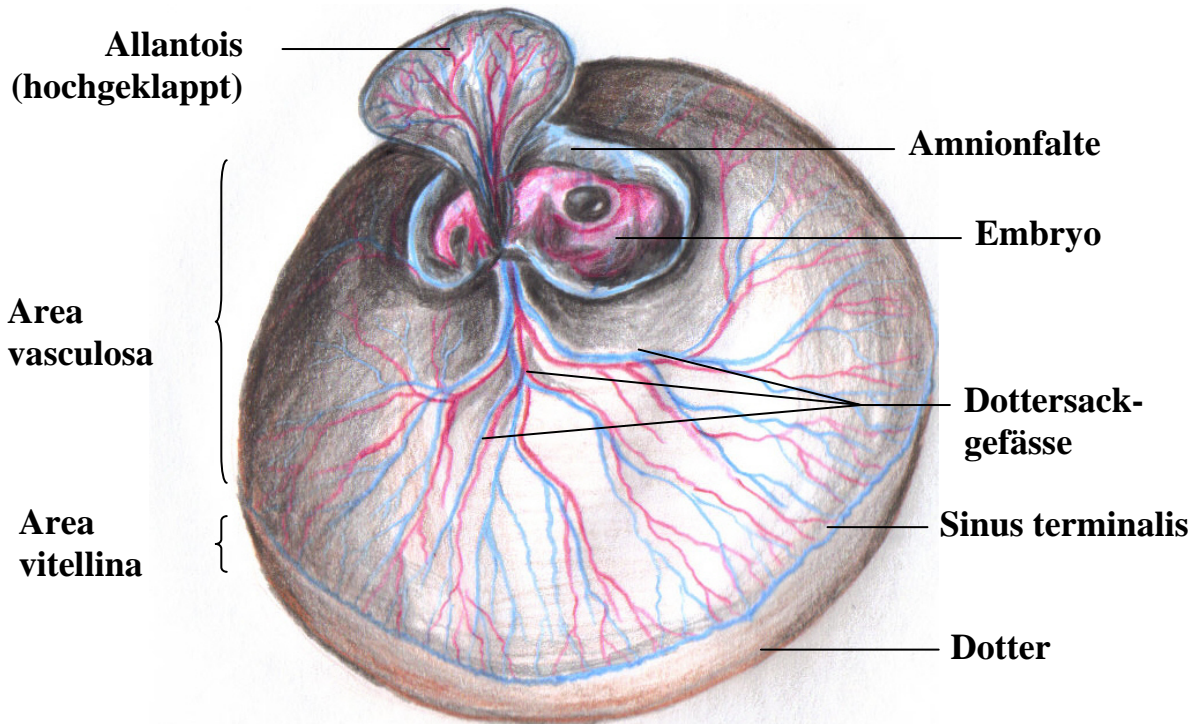
Die Sauerstoffversorgung des Hühnerembryos im Ei muss den Anforderungen des jeweiligen Entwicklungsgrades angepasst sein. In den verschiedenen Stadien der Entwicklung des Embryos erfolgt die Versorgung mit Sauerstoff auf unterschiedliche Art und Weise durch verschiedene gasaustauschende Organe.

Die Entwicklung dieser gasaustauschenden Organe des Hühnerembryos lässt sich grundsätzlich in vier Phasen unterteilen, die durch die Beteiligung unterschiedlicher Kreislaufelemente charakterisiert sind:

1. Primärer Kreislauf
2. Sekundärer Kreislauf
3. Chorioallantoismembran (CAM)
4. Internal Pipping („inneres Schlüpfen“)

1.3.1. Primärer Blutkreislauf

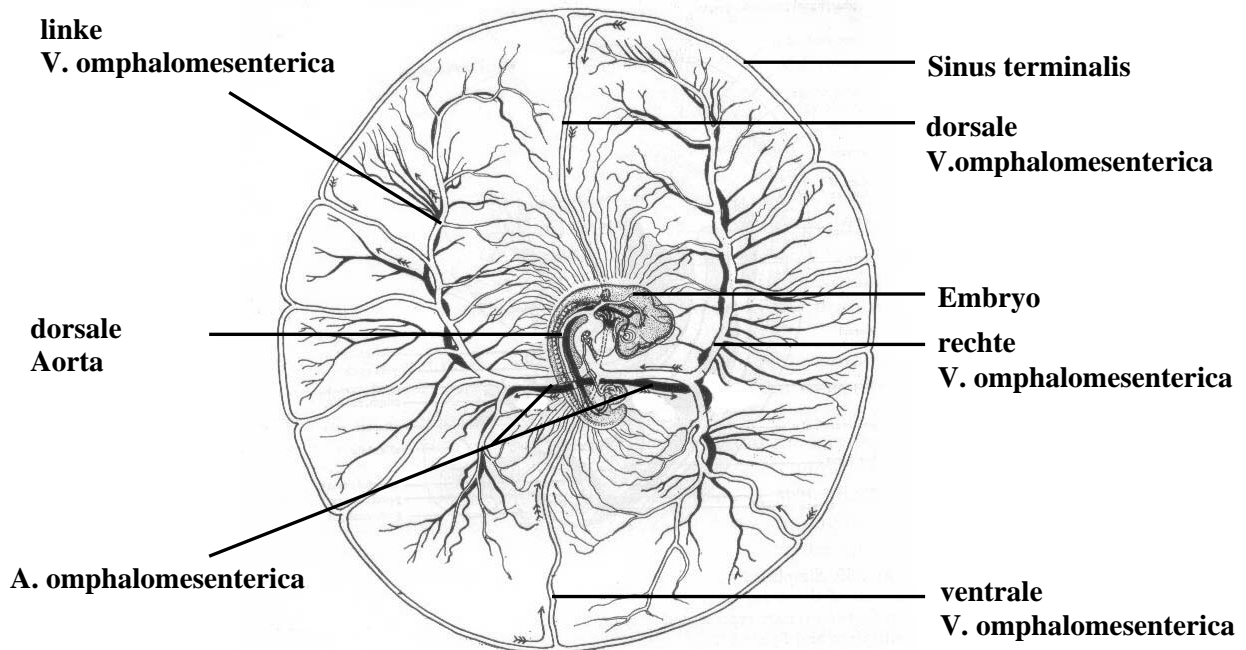
Der primäre Kreislauf des Hühnerembryo setzt nach ca. sechsendreißig bis achtundvierzig Stunden der Bebrütung in Verbindung mit dem Beginn der Herzaktion und somit der Zirkulation des Blutes ein. Dieser primäre Kreislauf setzt sich aus den Gefäßen im Embryo selbst und den Dottersackgefäßen zusammen (ROMANOFF, 1960). Diese Gefäße sind in die Dottersackwand eingefasst (s. Textabb. 3), dessen gefäßreiche Area vasculosa durch eine große ringförmige Vene, dem Sinus terminalis, von der nicht vaskularisierten Area vitellina in der Peripherie des Dottersackes, abgrenzt wird (BELLAIRS u. OSMOND, 1998), (s. Textabb. 3). Das Blut gelangt durch die Kontraktionen des schon gebildeten Herzschlauches über die dorsale Aorta in die rechte und linke Arteria omphalomesenterica resp. Arteria vitellina (Dottersackarterie) und deren Verzweigungen, die gemeinsam die Area vasculosa vaskularisieren, in den Sinus terminalis. Dieser führt das Blut über die Venen der Area vasculosa und die sich anschließenden rechte und linke Vena omphalomesenterica resp. Vena vitellina (Dottersackvene) zurück zum Herzen (s. Textabb. 4). Diese zunächst paarig angelegten Venae omphalomesentericae anastomosieren später. Am Ende des vierten Bebrütungstages bleibt nur noch eine Dottersackvene, während die andere obliteriert (BELLAIRS u. OSMOND, 1998). Die extraembryonalen Gefäße liegen in diesem primären Kreislauf in einer Ebene (LILLIE, 1951). Die Sauerstoffsättigung des arteriellen bzw. des venösen Blutes liegt in dieser Phase bei 18 % bzw. 45 %.



Textabb. 3:

Schematische Darstellung eines Hühnerembryo nach ca. 5 Tagen Bebrütung. Die Eischale wurde vollständig entfernt. Zur Darstellung des im Amnion liegenden Embryos wurde auch das Eiweiß und das Chorion entfernt (modifiziert nach KERR u. PATTEN, 1957).

Die Sauerstoffversorgung des Embryos erfolgt in diesem Stadium der Entwicklung ausschließlich durch Diffusion von Sauerstoff über die Eischale und ihre Membranen (s. o.) zur Dottersackwand (CIROTTA u. ARANGI, 1989).



Textabb. 4:

Schematische Darstellung des primären Dottersackkreislaufes des Hühnerembryos ca. am vierten Bebrütungstag (modifiziert nach LILLIE, 1951). Die Blutflussrichtung ist durch Pfeile gekennzeichnet.

1.3.2. Sekundärer Kreislauf

Schon ab dem dritten Bebrütungstag durchlaufen die Gefäße des primären Kreislaufes im Zuge hämodynamischer Veränderungen (ROMANOFF, 1960) verschiedene Transformationen, so dass sich am Ende des fünften Bebrütungstages ein dichtes Netzwerk aus Blutgefäßen gebildet hat, die ein Kapillarnetz bilden. Die Entwicklung der ersten Kapillaren in der Dottersackwand aus mesenchymalen Stammzellen wird durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren initiiert, die von den Entodermzellen ausgeschüttet werden (KUTRYK u. STEWART, 2003). Das Heranwachsen des Embryos bedingt eine Verlängerung der Transportstrecke für Nährstoffe und Sauerstoff. Diesen wachsenden Anforderungen wird durch eine Erhöhung des Blutvolumens Rechnung getragen. Eine Steigerung des Volumens führt zu einem Anstieg des Blutdruckes im Gefäßsystem, welcher die Verstärkung der Kapillarwand durch die Bildung von muskulösen und fibroelastischen Schichten (Tunica media und Tunica externa sive adventitia) induziert. Die zur Bildung dieser Gefäßwandschichten nötigen Zellen werden aus dem umgebenden mesenchymalen Bindegewebe durch Mediatoren angelockt. Entsprechende Mediatoren werden von den Kapillarendothelzellen auf Grund der mechanischen Belastung des Blutdruckes ausgeschüttet

(BRILL, 2004). Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung liegen die Dottersackgefäße in zwei Ebenen vor, wobei die Arteriae omphalomesentericae tief in den Dottersack eingebettet sind und sich die verbliebene Vena omphalomesenterica auf der Oberfläche befindet. Der Sinus terminalis bildet sich zurück. Der Blutfluss der Arterien verhält sich zum Embryo in zentrifugaler Richtung und der der Venen entgegengesetzt in zentripetaler Richtung. Die Sauerstoffsättigung des venösen Blutes liegt in diesem embryonalen Entwicklungsabschnitt mit 60 % deutlich über dem nur zu 40 % gesättigten arteriellen Blut (CIROTTA u. ARANGI, 1989).

1.3.3. Chorioallantoismembran (CAM)

Die Chorioallantoismembran (CAM) sichert die Sauerstoffversorgung des Embryos ab dem sechsten Bebrütungstag. Diese CAM enthält ein verzweigtes Netzwerk aus Kapillaren, denen das Blut aus den Umbilikalarterien zufließt, bevor es anschließend über die Umbilikalvenen zum Körper des Embryos zurückgeführt wird (BELLAIRS u. OSMOND 1998). Somit löst die CAM als Gas austauschendes Organ den sekundären Dottersackkreislauf ab. Die oben beschriebene Bildung der CAM durch Verschmelzung zweier extraembryonaler Fruchthüllenanteile geht mit der Ausbildung einer Vielzahl von Sinusoiden einher und verbessert so die Sauerstoffversorgung durch die Vergrößerung der Gefäßoberfläche erheblich (FREEMAN u. VINCE, 1974).

Nach zwölf Bebrütungstagen bedeckt die CAM die innere Eischalenmembran vollständig (BURTON u. TULLETT, 1985). Eine weitere Ausdehnung dieses Gas austauschenden Organes ist nicht mehr möglich (ACKERMAN u. RAHN, 1981; FREEMAN u. VINCE, 1974). Grundsätzlich wird zum Zeitpunkt der Bildung der CAM ein voll leistungsfähiger, an Hämoglobin gekoppelter Sauerstofftransport im Blut erreicht (CIROTTA u. ARANGI, 1989). Bereits mit dem Tag der Bildung der CAM ist im arteriellen Blut eine Sauerstoffsättigung von 35 % und im venösen Blut, das die CAM verlässt, eine Sauerstoffsättigung von 85 % messbar.

Mit zunehmender Entwicklung und dem Wachstum des Embryos steigt dessen Sauerstoffbedarf, da dieser Bedarf sich proportional zum Energieumsatz verhält. Weil die Sauerstoffdiffusionskapazität über die Eischale und ihre Membranen konstant bleibt und somit nicht erhöht werden kann, um den erhöhten Anforderungen des wachsenden Embryo gerecht zu werden, entsteht für den Hühnerembryo ab dem dreizehnten Bebrütungstag eine physiologische Sauerstoffmangelsituation (FREEMAN u. VINCE, 1974), die ab diesem Tag der Bebrütung rasant zunimmt (WANGENSTEEN u. RAHN, 1970/1971). Der Sauerstoff-

partialdruck (pO_2) des arteriellen Blutes sinkt in diesem Stadium der Entwicklung von 83,5 mm Hg (ca. 11,11 kPa) am zehnten Bebrütungstag auf 57,2 mm Hg (ca. 7,61 kPa) am achtzehnten Tag der Bebrütung (TAZAWA et al., 1971 a), woraufhin zunächst über eine Steigerung des Blutflusses durch die CAM dem Sauerstoffmangel entgegengewirkt wird. Zudem wird durch eine Erhöhung der Kapillardichte (Angiogenese) in den Geweben resp. Organen des wachsenden Embryos die Diffusionsstrecke für Gase (Sauerstoff und Kohlendioxid) verkürzt (SNYDER et al., 1984).

1.3.4. Internal Pipping („inneres Schlüpfen“)

Die oben beschriebenen kompensatorischen Möglichkeiten zur Sauerstoffversorgung des wachsenden Embryos resp. Foetus kurz vor dem Schlupf sind jedoch begrenzt (PIIPER et al., 1980), so dass der Embryo ein bis drei Tage vor dem Schlupf beginnt, die innere Eischalenmembran zur Luftkammer anzupicken (internal pipping = inneres Schlüpfen), um diese anschließend mit dem Schnabel zu durchstoßen, nachdem er zuvor die restliche Amnionflüssigkeit und das verbliebene Eiklar verschluckt hat (DUNCKER, 2000). Der Schnabel befindet sich nun in der Luftkammer und der Embryo beginnt mit regelmäßigen Atembewegungen schon im Ei (DUNCKER, 1978 b; PIIPER, 1980). Die Luftkammer befindet sich am stumpfen Pol des Eies. Sie bildet sich durch die Veränderung der Temperaturverhältnisse nach der Ablage des Eies, indem die innere und die äußere Eischalenmembran auseinanderweichen. Mit fortschreitender Inkubationsdauer vergrößert sich die Luftkammer durch Wasserverlust des Eiklars (TULLETT u. BURTON, 1985). Der pO_2 in der Luftkammer sinkt von ca. 140 mm Hg (ca. 18,62 kPa) am zehnten Bebrütungstag auf etwa 100 mm Hg (ca. 13,3 kPa) am neunzehnten Tag der Bebrütung. Der Partialdruck für Kohlendioxid (pCO_2) steigt innerhalb dieser Zeit von ca. 13 mm Hg (ca. 1,73 kPa) auf etwa 40 mm Hg (ca. 5,32 kPa) (TAZAWA, 1980). Als Ursache dafür gilt die kontinuierlich ansteigende metabolische Rate des Embryos, gekoppelt mit einer limitierten Diffusionskapazität der Eischale für die Luftgase.

Die Differenz des Partialdruckes des pO_2 in der Luftkammer und der Chorioallantoisvene ist ebenfalls die Folge der geringeren Diffusionskapazität über die innere Diffusionsbarriere (innere Eischalenmembran, CAM und Gefäßendothel) und des arterio-venösen Shunt des Allantoiskreislaufes, durch den ca. 11 % des Blutes die Sauerstoffaufnahme über die CAM umgehen. (OLSZOWKA et al., 1988; PIIPER et al., 1980). Durch das Einsetzen der Lungenatmung nach dem „internal pipping“ erfolgt der Übergang vom ausschließlich diffusiven zum beginnenden konvektiven Gasaustausch (ROMANOFF, 1960; TULLETT u.

BURTON, 1985). Nicht nur die Haupt- und Sekundärbronchien der Lunge zusammen mit den großen, für Vögel charakteristischen Luftsäcken werden dadurch belüftet, sondern auch die Lumina der vollständig vorhandenen Parabronchien (Pfeifenbronchien), deren angelegte und nun weiterwachsende Luftröhrchen (Tubuli respiratorii) zu diesem Zeitpunkt noch mit Lungenflüssigkeit gefüllt sind. Diese Flüssigkeit wird im Zuge der einsetzenden Lungenatmung von den Luftröhrchenepithelien und den Endothelien der diese umgebenden Kapillaren resorbiert. Je nach Eiggröße und Inkubationsdauer sind nach ein bis zwei Tagen die Luftröhrchen vollständig mit Luft gefüllt. Mit dieser Belüftung haben sie auch den Gasaustausch fortschreitend übernommen, den bis dahin die Chorioallantoismembran noch parallel durchführte.

Im Gegensatz zum Säugetier besitzt der Vogel verhältnismäßig kleine, ungelappte, unelastische Lungen (DONAT, 1996). Die Vogellunge besitzt im adulten Vogel keinen Pleuraüberzug wie im Säugetier, so dass ihre konvexe Lateralfäche bindegewebig mit der Brustwand verbunden, die konkave Medialfläche dagegen von einer „Sehnenhaut“, dem Septum horizontale, überzogen ist. Das Septum horizontale und ein darin enthaltener schwacher Musculus costoseptalis vertreten beim Vogel das diesem fehlende Zwerchfell (DONAT, 1996). Aufgrund dieser anatomischen Besonderheiten der „starren“ Vogellunge können diese ihre Fähigkeit zum Gasaustausch nach der Belüftung des Bronchialsystemes nur durch die Resorption der Lungenflüssigkeit aus den Luftröhrchen erlangen, während anfänglich der Gasaustausch noch vollständig von der CAM durchgeführt wird. Somit beruht das Erlangen der Funktionstüchtigkeit der Vogellunge auf der zeitlichen Überschneidung von Chorioallantoisfunktion (bzw.-atmung) und Luftatmung, das in dieser Weise nur in einem hartschaligen Ei möglich ist (DUNCKER, 2000). So sind die Vögel durch ihre hochdifferenzierte, nicht entfaltbare Lungenstruktur zwangsläufig an die Entwicklung in einem kalkschaligen Ei gebunden (DUNCKER, 1978 b), bevor sie dieses nach z. B. beim Huhn einundzwanzig Bebrütungstagen verlassen.

1.4. Beeinflussung des Vogelembryo durch eine Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft

Der Gasaustausch des Vogelembryos nimmt von der Eiablage bis zum Schlupf des Kükens um den Faktor tausend zu. Das bedeutet, dass, obwohl die Gasaustauschfläche der Eischale eine konstante Größe hat, vermehrt Sauerstoff und Kohlendioxid über die Schale ausgetauscht werden müssen. Dieses Problem wird unter anderem durch die zunehmende Druckdifferenz

zwischen dem Inneren des Eies und seiner Umgebung gelöst, wodurch die Gasaustauschrate zwischen Umgebung und Embryo erhöht wird (ECKERT, 1986).

Eine Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft hat, je nach Zeitpunkt ihres Auftretens, unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung des Vogelembryos. Nicht jede Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft ist somit mit einer Sauerstoffmangelsituation für den Embryo gleichzusetzen. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass die verschiedenen Organe des Embryo im Laufe ihrer embryonalen Entwicklung unterschiedliche sogenannte „kritische Zeitfenster“ aufweisen, in denen sie besonders empfindlich auf veränderte Umwelteinflüsse reagieren (DZIALOWSKI et al., 2002, BURGGREN, 1999; McCUTCHEON et al., 1982; SMITH et al., 1969; STOCK u. METCALFE, 1987). So beschrieben ASSON-BATRES und Mitarbeiter (1989) ein disproportional zur Sauerstoffverfügbarkeit verändertes Wachstum bestimmter Organe (s. u.).

Die neuesten Untersuchungen von CHAN und Mitarbeitern (2005) ergaben, dass eine Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft innerhalb der „kritischen Zeitfenster“ z. B. Auswirkungen auf die Größe der Augen oder auf die Schnabellänge zeigt, lebenswichtige Organe hingegen, wie Leber, Gehirn, Nieren, Magen, Darm, die langen Röhrenknochen und auch das Herz, werden durch eine lang anhaltende Reduktion des Sauerstoffpartialdruckes auf 15 % in der Bebrütungsluft zu keinem Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung beeinflusst.

1.4.1. Auswirkung einer Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft auf das Herz-Kreislauf-System des Vogelembryos

Sauerstoffmangelzustände des Herz-Kreislauf-Systems haben oft schwere Konsequenzen für den gesamten Organismus und stehen daher im Zentrum wissenschaftlicher Untersuchungen. Sie entstehen infolge eines Missverhältnisses zwischen dem Sauerstoffangebot und dem aktuellen Bedarf des Embryos und des arbeitenden Herzens. Die Konsequenzen einer Sauerstoffmangelsituation hängen nicht nur von der Intensität und der Dauer dieses Zustandes, sondern auch von der Toleranz des Herzens gegenüber der Unterversorgung ab. Diese Toleranz ändert sich während der Embryonalentwicklung signifikant. Die höhere Toleranz eines embryonalen Herzens gegenüber einem Sauerstoffmangel wird mit einem geringeren Energiebedarf, einer gesteigerten Fähigkeit zur anaeroben Glykolyse sowie größerer Glykogenreserven begründet (OSTADAL et al., 1999).

1.4.2. Auswirkungen einer Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft auf den Hämoglobingehalt und den Hämatokritwert des Vogelembryos

Der Hämoglobingehalt (Hb) sowie der Hämatokrit (Hkt) des Blutes spielen eine direkte Rolle in der Sauerstoffversorgung der verschiedenen Gewebe des Vogelembryos im Ei (CAMPBELL, 1995). Das Hämoglobin ist als sauerstoffbindendes Chromoprotein der wesentliche Bestandteil der Erythrozyten (JAIN, 1993). Der Hämatokrit beschreibt das Verhältnis zwischen festen Bestandteilen des Blutes, den Blutzellen (vorwiegend Erythrozyten), und dem Blutplasma, ausgedrückt als Prozentwert. Veränderungen dieser beiden Werte spiegeln die Sauerstoffversorgung des entsprechenden Gewebes wider (CAMPBELL, 1995). Der Definition nach hat eine Erniedrigung des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) in einem Gewebe infolge respiratorischer Insuffizienz oder des Aufenthaltes in großen Höhen eine sogenannte hypoxämische Hypoxie zur Folge. Mit diesem Fachbegriff wird ausgedrückt, dass das Hämoglobin in den Erythrozyten wegen Sauerstoffmangels nur ungenügend mit Sauerstoff gesättigt ist und deshalb das fragliche Gewebe auch nur unzureichend mit Sauerstoff versorgt wird.

Demgegenüber führt eine Herabsetzung der O_2 -Bindungskapazität des Blutes durch einen verminderten Hämoglobingehalt zu einer so genannten anämischen Hypoxie (PSCHYREMBEL, 1994). BAUMANN und Mitarbeiter (1982) untersuchten die Sauerstoffbindungskapazitäten der vier verschiedenen embryonalen Hämoglobintypen (Hb P, Hb P', Hb M und Hb E) der Säugetiere und beschrieben einen mehrphasigen Kurvenverlauf bei der Darstellung der Bindungskapazitäten des embryonalen Säugetierblutes für Sauerstoff, gemessen in verschiedenen Altersstufen.

Der physiologische Sauerstoffmangelzustand, der sich ca. ab dem dreizehnten Bebrütungstag beim Hühnerembryo einstellt (s. o.), gilt als initiales Ereignis für eine Vielzahl kompensatorischer physiologischer Mechanismen des Embryos, die einen hypoxischen Zustand, also einen Sauerstoffmangel im Gewebe, verhindern sollen (TAZAWA et al., 1971). Zur Auswirkung einer Reduktion des Sauerstoffgehaltes auf die Entwicklung des Hühnerembryos ist bekannt, dass der embryonale Blutkreislauf und Stoffwechsel in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt, der Dauer und dem Ausmaß der Sauerstoffunterversorgung mit einer Erhöhung der Erythrozytenzahl reagiert. Diese Erhöhung der Zellzahl im Blut hat wiederum einen Anstieg des Hämatokritwertes zur Folge. Zudem kommt es zu einem Anstieg des Hämoglobingehaltes in den Erythrozyten (TAZAWA et al., 1971; TAZAWA et al., 1971 a). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch HASSANZADEH und Mitarbeiter (2002), die unter dem Einfluss einer Erhöhung des Partialdruckes von Kohlendioxid (pCO_2) ebenfalls

einen Anstieg des Hämatokritwertes beschrieben. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ausführungen von DECKER (2002), die bei der Bebrütung von Hühnerembryonen mit einem reduzierten Sauerstoffpartialdruck in der Bebrütungsluft von 15 % statt 21 %, zwar einen, mit zunehmendem Alter der Embryonen, ansteigenden Hämatokritwert beschreibt, jedoch keinen Unterschied zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe registrierte. Durch Veränderung dieser Blutparameter steigt die Viskosität des Blutes, was wiederum zu einem erhöhten Fließwiderstand in den Blutgefäßen, insbesondere in den Kapillaren, führt. Diese Veränderungen der Blutparameter resp. der Fließeigenschaften des Blutes bedingen funktionelle Anpassungen des Herzens. So steigen kurzfristig die Herzfrequenz und das Herzminutenvolumen an, langfristig nimmt die Kontraktionskraft des Herzmuskels als Reaktion auf den erhöhten Fließwiderstand des Blutes zu (STROHL, 1910). Ein akuter Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes führt zu einer kardiovaskulären Reaktion, wie z. B. zu einem Anstieg des Blutdruckes (RUIJTENBEEK et al., 2000). Nach einer längerfristigen Sauerstoffreduktion von 21 % auf 15 % in der Bebrütungsluft zwischen dem sechsten und dem zwölften Bebrütungstag sind Hämatokritwert und Hämoglobingehalt des Blutes von Hühnerembryonen gegenüber demjenigen in der Kontrollgruppe am zwölften Bebrütungstag signifikant erhöht (DZIALOWSKI et al., 2002).

Das Abdecken eines Teiles der Eischalenoberfläche zwischen dem vierzehnten und dem achtzehnten Bebrütungstag reduziert die Sauerstoffaufnahme aus der Umgebung des Eies und führt ebenfalls zu einer Erhöhung des Hämatokritwertes des Blutes (TAZAWA, 1971; TAZAWA et al., 1971 a). Als weiterer kompensatorischer Mechanismus wurde von ISAACKS und Mitarbeitern (1976) bei einer Reduktion des Sauerstoffs in der Bebrütungsluft eine höhere Bindungskapazität des Hämoglobins für Sauerstoff beschrieben.

1.4.2.1. Die Rolle von Hämoglobin in der Sauerstoffversorgung des Hühnerembryos

Das Hämoglobin ist in den Erythrozyten lokalisiert. Die Erythrozyten des Vogels sind im Gegensatz zu denen des Säugetieres kernhaltig und unterscheiden sich von diesen zudem in Form und Größe (STEVENS, 1996). In der Embryonalentwicklung des Vogels treten zwei verschiedene Populationen von Erythrozyten auf: die „primitiven“ und die „definitiven“ Erythrozyten. Erste, noch unreife Vertreter der definitiven Linie zeigen sich ab dem sechsten Bebrütungstag im Blut (ROMANOFF, 1960), ab dem neunten Bebrütungstag machen sie bereits den überwiegenden Anteil aus. Zirka drei Tage vor dem Schlupf, am achtzehnten Bebrütungstag, sind ausschließlich „definitive“ Erythrozyten im Blut des Huhnes zu finden.

Reife Erythrozyten des Vogels sind ellipsoid und $5,0\ \mu\text{m} \times 9,7\ \mu\text{m}$ bis $5,0\ \mu\text{m} \times 15,9\ \mu\text{m}$ groß (KING u. McLELLAND, 1984).

Zudem treten während der Embryogenese embryonale und adulte Formen des Hämoglobins auf (STEVENS, 1996). Embryonale Hämoglobine werden von den primitiven Erythrozyten gebildet (BRUNS u. INGRAM, 1973; CIROTTO et al., 1975; CIROTTO et al., 1977). Der adulte Vogel verfügt über die Hämoglobin (Hb) der Typen Hb A und Hb D, die sich in ihren Globinketten unterscheiden. Diese Hämoglobintypen sind mit dem zeitlichen Auftreten von „definitiven“ Erythrozyten in diesen nachweisbar. Darüber hinaus konnte um den Schlupftermin des Vogels eine geringe Menge an Hb H nachgewiesen werden (STEVENS, 1996). Während der Embryogenese überwiegt zunächst das Hb D. BAUMANN und Mitarbeiter (1984) beschreiben am neunten Bebrütungstag ein relativ ausgeglichenes Verhältnis zwischen den beiden Hb-Typen, während beim adulten Vogel dieses Verhältnis, Hb A zu Hb D, drei zu eins beträgt (BAUMANN et al., 1984; BRUNS u. INGRAM, 1973). Am neunten Bebrütungstag stellen diese adulten Hämoglobinformen mit 65 % bereits den überwiegenden Anteil des Gesamthämoglobins dar (BRUNS u. INGRAM, 1973; CIROTTO et al., 1975; CIROTTO et al., 1980). Hämoglobin ist ein Protein mit positiver Kooperativität, das heißt, die Bindung eines O_2 -Moleküls begünstigt die Bindung weiterer, wodurch auch die sigmoide Form der Sauerstoffdissoziationskurve zustande kommt (STEVENS, 1996). Die biologische Bedeutung dieser sigmoiden Bindungscharakteristik ist sehr groß: im Bereich hoher Sauerstoffpartialdrucke kann das Hämoglobinmolekül optimal mit Sauerstoff beladen werden. Im Bereich niedrigerer Sauerstoffpartialdrucke, wie sie in den Körpergeweben herrschen, ist die Dissoziationskurve wesentlich steiler, wodurch Sauerstoff leichter abgegeben wird.

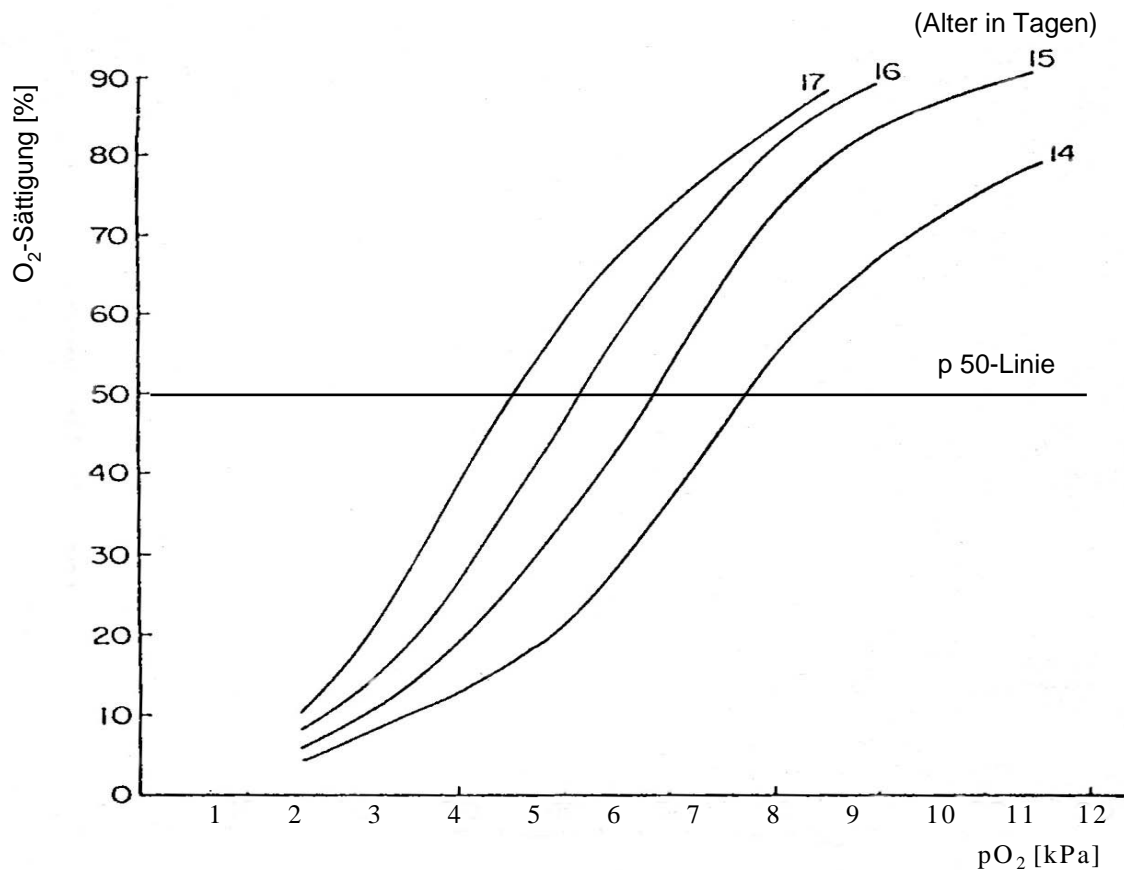
Zudem wird die Affinität von Hb zu Sauerstoff durch allosterische Effektoren in Form von organischen Phosphaten reguliert. Beim Vogel sind Inositolpentaphosphat (IP₅), Adenosintriphosphat (ATP) und 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) beteiligt. Ihr Wirkungsmechanismus liegt in der Stabilisierung der Quartärstruktur des desoxygenierten Hämoglobins. Durch Vernetzung von Polypeptidketten wird so die Affinität des Hb zu Sauerstoff gesenkt. Reflektiert wird die Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff durch den p_{50} -Wert. Dieser ist als Sauerstoffpartialdruck definiert, bei dem die Halbsättigung des Blutes mit Sauerstoff vorliegt. Je niedriger dieser Wert ist, desto höher ist die O_2 -Affinität des Blutes resp. des Hämoglobins (STEVENS, 1996; STRYER, 2003).

1.4.2.2. Die Sauerstoffaufnahme

Die Sauerstoffaufnahme (Oxygenierung) des Hämoglobins wird mittels der O₂-Dissoziationskurve dargestellt. In dieser Kurve werden der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) in der Abszisse und die Sauerstoffsättigung (sO₂) des Blutes in der Ordinate eines zweidimensionalen Koordinatensystems gegeneinander aufgetragen. Der sigmoide Verlauf dieser Kurve ist für die positive kooperative Bindung charakteristisch und von großer physiologischer Bedeutung.

Der arterielle Sauerstoffpartialdruck (pO₂) ist dagegen der Teildruck, unter dem Sauerstoff im Blut (physikalisch, nicht an Hämoglobin gebunden) gelöst ist und stellt als solcher ein Maß für die O₂-Aufnahme in der Lunge bzw. in den Gas austauschenden Organen dar (RADIOMETER MEDICAL A/S, 1999).

Die Sauerstoffsättigung (sO₂) stellt den prozentualen Anteil des oxygenierten Hämoglobin am Gesamthämoglobin dar (HOPPE et al., 1982). Als Halbsättigungswert (p50-Wert) wird jener Partialdruck bezeichnet, der nötig ist, um eine 50 %ige Sättigung des Hämoglobins zu erreichen. Er reflektiert somit die Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff. Liegt eine verminderte Sauerstoffaffinität des Hämoglobin vor, kommt es zu einem sogenannten „Rechts-Shift“, die O₂-Dissoziationskurve ist nach rechts verschoben, der p50-Wert ist also erhöht und die Entkopplung von Sauerstoff im Gewebe gesteigert. Diese Entkopplung des O₂ kann von lokalen Stoffwechselprozessen beeinflusst werden (DEETJEN u. SPECKMANN, 1994).



Graphik 1.1.:

Sauerstoffdissoziationskurven des Blutes im Hühnerembryo an verschiedenen Inkubationstagen, modifiziert nach FREEMAN u. VINCE (1974); Schlussfolgerung – das Blut (resp. das Hämoglobin) der älteren Hühnerembryonen ist schon bei einem niedrigeren Sauerstoffpartialdruck mehr mit Sauerstoff gesättigt als das von jüngeren Embryonen.

1.4.3. Auswirkungen einer Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft auf die Kapillarisation der Chorioallantoismembran (CAM)

Hypoxische Zustände sind ein bekanntes Signal für die Angiogenese, die mit der Bildung von Kapillaren beginnt. So kamen LEE und Mitarbeiter (2001) durch ihre Untersuchungen zu dem Schluss, dass eine Sauerstoffunterversorgung in embryonalen Geweben möglicherweise physiologisch zu finden sein könnte und dadurch eine Neubildung von Blutgefäßen induziert werden könnte.

Die Chorioallantoismembran (CAM) des Vogelembryos entspricht in ihrer Funktion dem foetalen Teil der Plazenta des Säugetieres (TAZAWA, 1971; TAZAWA et al., 1971 a). Sie entwickelt sich am sechsten Tag der Bebrütung und wächst, bis sie am zwölften Bebrütungstag 100 % der inneren Eischalenwand einnimmt (ACKERMAN u. RAHN, 1981).

Eine Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft des Eies in der Phase der Bebrütung, in der sich die CAM entwickelt, führt zu einer Erhöhung der Kapillardichte in der CAM (CORONA et al., 2000; DUSSEAU et al., 1988; DUSSEAU et al., 1989). SNYDER und Mitarbeiter (1984) untersuchten ebenfalls die Kapillardichte im Muskelgewebe von Gänsen unter den Einfluss einer Sauerstoffreduktion und beschrieben ähnliche Ergebnisse. Andere Untersuchungen der Kapillardichte in Geweben bei unterschiedlichen Sauerstoffgehalten zeigten zudem, dass eine Stimulation der Kapillarbildung in positiver Korrelation zur Sauerstoffversorgung steht (STRICK et al., 1991). Mit der Zunahme der Kapillardichte wird eine bessere Durchblutung und Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff erreicht. Diese Reaktion auf einen veränderten Sauerstoffgehalt als exogener Umwelteinfluss stellt eine langfristige autoregulatorische Reaktion im Gewebe dar, mit der das metabolische Gleichgewicht zwischen Sauerstoffversorgung und Sauerstoffbedarf aufrecht erhalten wird (DUSSEAU et al., 1988).

1.4.4. Auswirkungen einer Reduktion des Sauerstoffgehaltes in der Bebrütungsluft auf die Mortalität der Embryonen

Eine kontinuierliche Bebrütung der Embryonen bei einem Luftsauerstoffgehalt von unter 21 % führt zu einer zunehmenden Sterberate der Vogelembryonen bzw. zu einer reduzierten Lebensfähigkeit des Kükens, die sich proportional zur Abnahme des Sauerstoffgehaltes verhält (ROMANOFF, 1967; YAMAMOTO et al., 1964). Vier Tage alte Hühnerembryonen, die 6 Stunden einer Sauerstoffreduktion auf 10 % in der Bebrütungsluft ausgesetzt wurden, zeigten eine erhöhte Mortalität. In der Versuchsgruppe lag die Sterblichkeit bei 38,9 %, wohingegen diese in der Kontrollgruppe, die kontinuierlich mit 21 % Sauerstoffgehalt in der Bebrütungsluft inkubiert wurden, bei nur 18 % lag (ALTIMIRAS u. PHU, 2000). ROUWET und Mitarbeiter (2002) beschreiben unter dem Einfluss einer nicht näher erläuterten chronischen Sauerstoffunterversorgung eine um 33 % gesteigerte Sterberate. In den ersten beiden Inkubationstagen ist der Hühnerembryo dagegen gegenüber einem reduzierten Sauerstoffangebot weniger empfindlich als im weiteren Verlauf der embryonalen Entwicklung (ROMANOFF, 1967).

1.4.5. Auswirkungen einer Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft auf das Körper- und Herzgewicht der Hühnerembryonen

Der Einfluss von Sauerstoff als ein potentieller Regulator für Wachstum und Metabolismus des heranwachsenden Säugetieres wurde in der Vergangenheit durch verschiedene Untersuchungen belegt. So wird z. B. durch eine begrenzte uterine Sauerstoffversorgung das foetale Wachstum verzögert (CREASY et al. 1972; GARVEY u. LONGO, 1978). Niedrige Geburtsgewichte von Säugetieren stehen ebenfalls in einer direkten Korrelation zu einem reduzierten maternalen Sauerstofftransport zur Plazenta (MOORE et al., 1982; STEIN u. KLINE, 1983; WHITTEMORE, 1983), verursacht durch respiratorische Sauerstoffunterversorgung des Muttertieres oder durch eine Verminderung der Sauerstoffversorgung des Embryo über die Placenta materna. HOLLENBERG und Mitarbeiter (1976) beschrieben eine Verstärkung des Zellwachstums in neonatalen Säugetierorganen als Antwort auf eine verminderte Sauerstoffverfügbarkeit.

Außer den Untersuchungen am Säugetier belegt eine Vielzahl an Untersuchungen von Vögeln eine Variation der Herzgewichte in Korrelation zur Sauerstoffversorgung. 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. Ebenso beschrieben TAZAWA und Mitarbeiter (1971) für den mit Sauerstoff unterversorgten Vogelembryo ein höheres Proportionalgewicht des Herzens im Vergleich zum Kontrolltier. DECKER (2002) konnte dagegen, bei den von ihr untersuchten Hühnerembryonen am sechszehnten Tag der Bebrütung in der Versuchsgruppe zwar eine signifikant niedrigere Körpermasse jedoch keine niedrigere Herzmasse gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe feststellen.

ASSON-BATRES und Mitarbeiter (1989) untersuchten den Einfluss von Sauerstoff auf das Wachstum und den Metabolismus des Hühnerembryos. Sie beobachteten hierbei, dass Veränderungen in der Sauerstoffverfügbarkeit aus der Bebrütungsluft signifikante Veränderungen im embryonalen Wachstum sowie im Metabolismus (STOCK u. METCALFE, 1987) bewirkten, wobei jedoch unerwähnt blieb, um welche Veränderungen es sich handelt.

Bei einer Bebrütung der Hühnerembryonen bei Raumluft (21 % Sauerstoff) stieg die durchschnittliche Gewichtszunahme (Gewicht in Gramm pro Tag) gleichmäßig zwischen dem sechsten und dem vierzehnten Bebrütungstag an und fiel bis zum neunzehnten Bebrütungstag, dem Zeitpunkt des „internal pippings“ (s. o.), dem Beginn der Luftatmung, ab (ROMANOFF, 1960). Die Absenkung der Sauerstoffkonzentration von 21 % auf 15 % in der Bebrütungsluft

zwischen dem sechzehnten und dem achtzehnten Bebrütungstag führt zu einer Abnahme der Wachstumsrate des Embryos. Das Wachstum in den verschiedenen Geweben der Organe ist proportional zur Sauerstoffverfügbarkeit verändert. So weisen das Herz, die Leber und der Tibiotarsus ein verzögertes Wachstum unter dem Einfluss einer Sauerstoffunterversorgung auf (ASSON–BATRES et al., 1989). Zudem beschrieben STOCK und METCALFE (1987) eine um 17 % verminderte Gesamtwachstumsrate bei Hühnerembryonen, die zwischen dem sechzehnten und dem achtzehnten Bebrütungstag mit 15 % statt 21 % Sauerstoff in der Bebrütungsluft inkubiert wurden. Im Allgemeinen zeigen diese altersabhängigen Konsequenzen einer Unterversorgung mit Sauerstoff, dass hypoxische Phasen, wenn sie sehr früh in der Embryonalentwicklung (am zweiten oder dritten Tag der Bebrütung) erfolgen, keine Auswirkungen auf die Entwicklung des Hühnerembryos haben. Ab dem vierten Tag ist jedoch die Überlebensfähigkeit der Embryonen durch eine Sauerstoffunterversorgung in der Bebrütungsluft stark herabgesetzt. Zudem kommt es zu Veränderungen der Herzmasse (ALTIMIRAS u. PHU, 2000).

VILLAMOR und Mitarbeiter (2004) beschrieben ein verändertes Verhältnis zwischen Herzmasse und Körpermasse als einen Hinweis auf eine kardiale Hypertrophie bei einer Sauerstoffunterversorgung. Ihre Untersuchungen ergaben, dass dieses Verhältnis von Herzmasse und Körpermasse bei den zwischen dem sechsten und dem neunzehnten Bebrütungstag mit 15 % Sauerstoffgehalt (Versuchsgruppe) statt mit 21 % (Kontrollgruppe) inkubierten Hühnerembryonen höher war. Die Zunahme des Herzgewichtes war bei dieser Untersuchung Resultat einer Verdickung des linken Ventrikelmyokards, wohingegen die rechte Ventrikelwand und das Septum interventriculare keine signifikanten Veränderungen aufwiesen.

Eine Abnahme des Körpergewichtes um 11 % bei den überlebenden Embryonen gegenüber der Kontrollgruppe sowie ein um 14 % erhöhtes Verhältnis von Herzmasse zu Körpermasse unter dem Einfluss einer Reduktion des Sauerstoff wurde auch von ROUWET und Mitarbeitern (2002) beschrieben. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen zudem DZIALOWSKI und Mitarbeiter (2002). Sie beobachteten bei den Versuchstieren, die zwischen dem sechsten und dem zwölften oder dem zwölften und dem achtzehnten Bebrütungstag einer Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft ausgesetzt waren, eine Abnahme der Körpermasse gegenüber den Kontrolltieren, und eine Zunahme der Herzgröße, wobei diese Relation zur niedrigeren Körpermasse zu sehen ist. DZIALOWSKI und Mitarbeiter (2002) beschrieben zudem, dass zum Zeitpunkt des Schlupfes die veränderten morphologischen Parameter in den unterschiedlichen Gruppen wieder identisch waren.

1.5. Embryonale Entwicklung der Struktur des Arbeitsmyokards

Im Zuge der embryonalen Entwicklung kommt es zu strukturellen Veränderungen des Arbeitsmyokards. So verändert sich das zunächst trabekulär strukturierte Myokard, dessen fingerartig geformten Myokardausläufer in das Lumen des jeweiligen Ventrikels hineinragen und die ein vielfach verzweigtes Netzwerk ausprägen, in seiner Struktur. Im Laufe der Entwicklung nimmt das Myokard an Breite zu und es erhält eine gleichmäßigere, kompaktere Struktur (SEDMERA et al., 1997).

Vor der Entwicklung des Koronarkreislaufes durchläuft das Herz Entwicklungsphasen, in denen die Herzmasse innerhalb kurzer Zeit zunimmt. Diese Massenzunahme vor dem Einsetzen des Koronarkreislaufes zur nutritiven Versorgung des Herzmuskels selbst erfordert einen schwammartigen trabekulären Aufbau des Myokards in dieser Phase der Entwicklung. Ein solches Netzwerk von Myokardausläufern verhindert eine myokardiale Hypoxie (BLAUSEN et al., 1990; SEDMERA et al., 2000). Während dieser Entwicklungsphase sind diese trabekulären Ausläufer des Myokards die am stärksten differenzierten Anteile des ventrikulären Myokards und sie sind Teil des frühen Netzwerkes des Reizbildungs- und Erregungsleitungsystems am embryonalen Herzen (DE JONG et al., 1992), so dass die „Trabekel“ eine wichtige Rolle in der Kontraktilität des Herzmuskels spielen (SEDMERA et al., 1997). Eine Vielzahl von Autoren beschreibt die Unterschiede in der trabekulären Strukturierung zwischen dem rechten und dem linken Ventrikel des embryonalen Herzens (RYCHTER et al., 1981; BEN – SHACHAR et al., 1985; MANASEK et al., 1986; ICARDO et al., 1987) als auch im Herzen des adulten Huhnes (KOMAREK et al., 1982; KING et al., 1984). So beschreiben SEDMERA und Mitarbeiter (1997) das Auftreten der trabekulären Struktur des Myokards am rechten Ventrikel schon nach ca. dreieinhalb Bebrütungstagen, während die weitere Ausprägung dieses Netzwerkes nach viereinhalb Bebrütungstagen sich dann über beide Ventrikel erstreckt. Zu Beginn der Herzmuskelentwicklung stellt das frühe kompakte Gewebe des Myokards den Ursprung der Zellen für die Ausbildung der Trabekel dar. In diesem Teil des Herzen konnte eine zwei- bis dreifach erhöhte Mitoserate und dabei eine geringere Differenzierung der Zellen beobachtet werden (JETER et al., 1971; TOKAYUSU, 1990; FRANCO et al., 1997). SEDMERA und Mitarbeiter (1999) werten den Grad der Anfärbbarkeit als Differenzierungsmarker für die Myokardzellen. Sie beschreiben eine Abnahme der Anfärbbarkeit bzw. der Eosinophilie bei Zellen aus den hypoplastischen linken Ventrikeln. Während die Unterschiede im kompakten Myokard des rechten und des linken Ventrikel recht klein waren, zeigen die Myokardtrabekel des rechten Ventrikels sowohl eine höhere Proliferationsrate als auch einen höheren Differenzierungsgrad, bezogen auf die

kontraktilen Elemente. Im linken Ventrikel kommt es zu einer deutlicheren und früheren Kompaktierung der Trabekel. Dieses führt zu einer Dickenzunahme der Ventrikelwand (RYCHTER, 1981; SEDMERA et al., 1997; SEDMERA et al., 2000).

In der Entwicklung des embryonalen Hühnerherzen kommt es ca. ab dem siebten Bebrütungstag zu einer solchen Kompaktierung des Myokards, die mit einer Zunahme der Herzmasse im Bereich der Ventrikelwand einhergeht. Diese Zunahme kann zum einen Folge einer beschleunigten oder verstärkten Kompaktierung des Myokards oder zum anderen das Ergebnis einer höheren Mitoserate (Hyperplasie s. u.) während der Phase der Kompaktierung sein (SEDMERA et al., 1999). CHENG und Mitarbeiter (2002) beschreiben für den rechten Ventrikel des Hühnerembryo eine Zunahme apoptotischer Zellen, die im Zusammenhang mit der Kompaktierung des Herzmuskelgewebes auftritt, während POELMANN und Mitarbeiter (2000) im Verlauf der Embryogenese nur wenige apoptotische Prozesse im Arbeitsmyokard beobachten.

1.5.1. Proliferation des Arbeitsmyokards — Hyperplasie oder Hypertrophie?

Der an Masse und Volumen zunehmende Herzmuskel erhöht gemäß einer vom wachsenden Embryo geforderten höheren Kontraktionskraft auch seine Funktion bzw. Effektivität. Die physiologische Massenzunahme bzw. das foetale Wachstum und die Reifung des Myokards sind Folge einer Hyperplasie, also einer Zunahme der Zellzahl bei gleich bleibender Zellgröße (SEDMERA et al., 1997). Dieser Prozess ist streng beherrscht durch angeborene Faktoren und kann lediglich leicht durch externe Umweltfaktoren epigenetisch¹ beeinflusst werden. Die physiologische Hyperplasie erfordert eine bestimmte Anzahl an Zellteilungen. Die Anzahl dieser Zellteilungen ist abhängig von der Spezies sowie dem Gewebe und endet gewöhnlich kurz nach der Geburt bzw. dem Schlupf des Lebewesens (CLARK et al., 1989; BISHOP, 1990; ARMSTRONG et al., 2000).

Die Anzahl der pränatalen Zellteilungen ist im Herzmuskelgewebe begrenzt, so dass nach der pränatalen Hyperplasie ein postmitotisches Stadium der Kardiomyozyten folgt

¹ **Epigenetik:** übersetzt: "jenseits konventioneller Genetik". Die Epigenetik betrifft alle Vorgänge, die sich 'epi' – d. h. jenseits dieser vererbaren Grundprinzipien vollziehen und dazu führen, dass die in einem Gen festgelegte (kodierte) Information auch realisiert (exprimiert) wird. Ursprünglich verstand man darunter die Ausprägung eines bestimmten Merkmals (Phänotyps) des Individuums auf der Grundlage bestimmter Expressionsmuster. Im engeren Sinne beschäftigt sich die Epigenetik heute, im ersten Jahrzehnt des dritten Jahrtausends, mit der Frage, welches die Mechanismen sind, die die stabile Veränderung der Regulation/Expression von Genen bewirken und wie dieser Zustand von Zelle zu Zelle weitergegeben wird (WIKIPEDIA, 2005).

(ARMSTRONG et al., 2000). Zu dieser Erkenntnis kamen auch RAKUSAN und Mitarbeiter (1965), die jede Zunahme der Herzmasse nach der Geburt bzw. beim Säugetier nach dem Absetzen des Säuglings als Folge einer Hypertrophie, also einer Zunahme der Zellgröße bei gleich bleibender Zellzahl, beschrieben. WULFSOHN und Mitarbeiter (2004) fanden bei neugeborenen Ratten ab dem fünften postnatalen Lebenstag ein Größenwachstum der Kardiomyozyten durch Hypertrophie, während die interstitiellen Zellen des Herzens ein hyperplastisches Wachstum aufwiesen. Die Autoren ließen jedoch unerwähnt, um welche interstitiellen Zellen es sich handelt, und ob z.B. auch Stammzellen oder Kapillarendothelzellen bei dieser Studie nachgewiesen wurden. BRÜEL und Mitarbeiter (2002) beschrieben im Gegensatz dazu, dass bei Ratten die Anzahl an Zellkernen im Myokard auch postnatal noch ansteigen kann. Hierbei wurde jedoch nicht ermittelt, ob es sich bei den gezählten Zellkernen auch um Kardiomyozytenkerne handelte und somit tatsächlich Hinweis auf eine fortgesetzte Hyperplasie nach der Geburt oder eine Zunahme der Zellkerne pro Herzzelle (so genannte Amitose) vorlag. Ergebnisse anderer Untersuchungen zeigen, dass unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen eine Regeneration von Kardiomyozyten durch Zellteilungen (= Hyperplasie) auch bei adulten Ratten stattfindet (ANVERSA u. NADAL-GINAR, 2002).

In den verschiedenen Phasen der strukturellen Entwicklung des Herzmuskels von Hühnerembryonen unterscheidet man Phasen mit vornehmlich proliferativen Prozessen von solchen mit einem dynamischem Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung sowie von den Phasen, in denen die Differenzierung von Kardiomyozyten vorherrscht (DANILOV et al., 1993). Das embryonale Myokard passt sich an die sich ändernden funktionellen Anforderungen an, in dem es seine proliferativen Prozesse (Mitoserate) zeitlich modifiziert (SEDMERA, 1999 a). Während Veränderungen der Zellgröße (Hypertrophie) vor dem Schlupf weniger bedeutsam sind (BICAL et al., 1990), spielt diese Veränderung nach dem Schlupf und bei adulten Tieren eine große Rolle.

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 SAIKI und Mitarbeitern (1997) eine Erhöhung des intraventrikulären Druckes am embryonalen Herzen als Auslöser für eine verstärkte Proliferation von Kardiomyozyten. Die Kaskade von Ereignissen, die von einer mechanischen Belastung zur Induktion einer erhöhten Proliferationsrate bzw. Hypertrophie im adulten Organismus führt, ist noch nicht vollständig erforscht (SEDMERA et al., 2002). HEFTI und Mitarbeiter (1997) beschrieben eine Reihe von Substanzen (z.B.

Zytokine, verschiedene Wachstumsfaktoren, Catecholamine sowie vasoaktive Peptidhormone) als wichtige Faktoren bei der Regulation der Proliferation bzw. bei der Induktion einer Hypertrophie von Kardiomyozyten in Zellkultur.

Verschiedene Autoren haben sich am Modell des Hühnerembryos mit solchen Wachstumsfaktoren befasst. Nach diesen Autoren sind am embryonalen Hühnerherzen der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (JEDLICKA et al. 1991; PEXIEDER et al. 1995) sowie der Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 (PARLOW et al., 1991; SUGI et al., 1993; MIMA et al., 1995; SEDMERA et al., 1999 a;) an der Regulation der Proliferation (Hyperplasie) von Kardiomyozyten beteiligt. Die morphometrische Untersuchung des Kammermyokards der Herzen von Hühnerembryonen, die zwischen dem sechsten und dem neunzehnten Bebrütungstag einer Sauerstoffkonzentration von 15 % statt 21 % ausgesetzt waren, ergab aber eine unveränderte Anzahl der durchschnittlich gezählten Zellkerne (Myokardzellen und Nicht-Myokardzellen) pro Gesichtsfeld in der Versuchs- und der Kontrollgruppe (VILLAMOR et al. 2004).

1.5.2. Auswirkungen einer Sauerstoffreduktion in der Bebrütungsluft auf strukturelle Veränderungen des Arbeitsmyokards

Eine Zunahme der Zellgröße der Kardiomyozyten über die Phase der physiologischen Hypertrophie im Rahmen des Herzwachstums hinaus ist meist die Folge einer geforderten Mehrarbeit des Herzens aufgrund von verschiedensten Faktoren. Eine solche Hypertrophie kann zudem ein pathologischer Prozess sein. Dabei ist schwer abzugrenzen, ab wann von einer physiologischen und wann von einer pathologischen Hypertrophie die Rede sein sollte. Nach BISHOP und Mitarbeitern (1990) entsteht eine pathologische Hypertrophie durch eine erhöhte Proteinsynthese der Zelle und ist meist die Antwort der Kardiomyozyten auf verschiedene Stimuli wie hämodynamische, humorale oder ischämische Faktoren. ASSON-BATRES und Mitarbeiter (1989) beschreiben ein verändertes Protein/DNA-Verhältnis im Herzmuskel bei den mit Sauerstoff unterversorgten Hühnerembryonen und erklären damit eine zelluläre Hypertrophie des Myokards durch einen veränderten Proteinmetabolismus. Der Einfluss einer Hypoxie (HOLLENBERG et al., 1976) oder simulierter Höhenluft (PIETSCHMANN u. BARTELS, 1985) führt zu einer Erhöhung der Kardiomyozytenzahl (Hyperplasie) in den Ventrikeln und des DNA-Gehaltes der ventrikulären Kardiomyozyten bei neugeborenen Ratten. Hypoxische und ischämische Prozesse führen nicht nur zu einer kardialen Hypertrophie am Herzen, sondern beeinflussen auch den Zelluntergang und bewirken letztendlich ein myokardiales Versagen.

Das kardiale Bindegewebe sowie die neuronalen und vaskulären Komponenten des Myokards reifen im Einklang mit den Kardiomyozyten, so dass Veränderungen dieser Gewebe die Funktion der Kardiomyozyten ebenfalls wesentlich beeinträchtigen (BISHOP, 1990). Die Zunahme der Größe der Herzmuskelzellen (Hypertrophie) führt zunächst zu einer Verdickung der entsprechenden Ventrikelwand und der des Septum interventriculare. Diese Verdickungen verengen die Ventrikellumina bei zunächst unbeeinträchtigter Kontraktionskraft zunehmend. Man spricht dann von einer konzentrischen oder auch hypertrophen Kardiomyopathie (RUDOLPH, 2003). Mit dem Wachstum der Herzmuskelzellen wird auch die Diffusionsstrecke für Sauerstoff von den Kapillaren in das Zentrum der Herzmuskelzellen zunehmend verlängert, bis es zu einer manifesten Hypoxie im Herzmuskelgewebe kommt. Während eines hypertrophen Wachstums des Herzens entsteht ein Missverhältnis zwischen dem Sauerstoffangebot und dem Sauerstoffbedarf der Herzmuskelzellen. Das Herz wird insuffizient und versagt unter Umständen vollständig (DE TOMBE et al., 2002). Ein solch geschwächtes Herz zeichnet sich meist durch Dilatation der Ventrikel zugunsten des Kammervolumens aus, da das geschwächte Myokard unter den bestehenden Umständen dem vorherrschenden intrakardialen Blutdruck nicht mehr standhalten kann. Man spricht nun aus Sicht des Kammerlumens von einer exzentrischen oder auch dilatativen Hypertrophie des Arbeitsmyokards (RUDOLPH, 2003).

Eine Reihe weiterer Untersuchungen zeigte die Entstehung einer Hypertrophie unter dem Einfluss einer Sauerstoffunterversorgung bei Säugetieren und Vögeln. PEACOCK und Mitarbeiter (1989) beschrieben eine häufig auftretende Hypertrophie des rechten Ventrikels bei nach dem Schlupf sehr schnell wachsenden Hühnerküken im Gegensatz zu normal wachsenden. Als Grund wird ein hypoxischer Stimulus vermutet, der mit einem erhöhten pulmonalen Druck einhergeht und damit eine Hypertrophie der rechten Kammerwand verursacht, da diese gegen einen erhöhten Widerstand in der Lunge arbeiten muss. Eine andere Untersuchung von ROUWET und Mitarbeitern (2002) ergab, dass eine Unterversorgung mit Sauerstoff während der embryonalen Entwicklung Veränderungen der kardialen und vaskulären Strukturen und Funktionen induziert und Einfluss auf hämodynamische Faktoren hat. Bei dieser Studie wurde festgestellt, dass bei den mit Sauerstoff unterversorgten Embryonen das Lumen des aufsteigenden Teiles der Aorta um 23 % kleiner ist als das der Kontrollgruppen, was wiederum eine Veränderung der ventrikulären Blutdruckverhältnisse bewirkt.

1.6. Makroskopisch - anatomische Beschreibung des Vogelherzens

1.6.1. Lage des Vogelherzens

Das Herz des Huhnes liegt im kranialen Teil der einheitlichen Rumpfhöhle (Cavum trunci commune), welche keine transversale Trennwand zwischen Brust- und Bauchhöhle besitzt (DONAT, 1996), wie sie das Zwerchfell beim Säugetier herstellt. Das Vogelherz wird von einem derben Perikard umhüllt, welches die Herzbeutelhöhle umschließt. Diese ist mit einer geringen Menge seröser Flüssigkeit gefüllt. Das fibröse Perikard steht sowohl mit der dorsalen Oberfläche des Sternums als auch mit den umgebenden Luftsäcken in lockerer Verbindung (AKESTER, 1971). Zusätzlich ist es über das Peritonaeum der beim Huhn vorhandenen Leberbauchfellsäcke an der Wirbelsäule befestigt. Diese Befestigungen sichern die Lage des Herzens. So zeigt das Herz mit seiner Spitze kaudodorsal und wird zum Teil von Leberlappen umschlossen (BRUSH, 1966; AKESTER, 1971).

1.6.2. Form und Größe des Vogelherzens

Im Vergleich zu dem Säugetierherzen ist das Vogelherz relativ groß. Die Herzgewichte liegen beim Vogel zwischen 1 % des Körpergewichtes bei relativ großen Spezies und 2,4 % bei kleineren Spezies, z. B. beim Kolibri (HARTMANN, 1955; BRUSH, 1966). Das Herz von Säugetieren vergleichbarer Körpergröße macht dagegen nur ca. 0,5 % des Körpergewichtes aus (QUIRING, 1950). Das im Verhältnis zum Säugetier größere Herz des Vogels wird in der Literatur auf die erheblich größere Arbeitslast des Vogelherzens zurückgeführt (AKESTER, 1971). Die grundlegenden funktionellen Einheiten des Vogelherzens sind mit denen des Säugetieres vergleichbar. So besitzt auch das Vogelherz zwei vollständig geteilte Vorhöfe (Atrium dextrum et Atrium sinistrum) sowie zwei Herzkammern (Ventriculus dexter et Ventriculus sinister) (WEST et al., 1981).

1.6.3. Vorkammern und Kammern des Vogelherzens

Der rechte Vorhof des Vogelherzens besitzt eine Vertiefung (Rezessus sinister atrii dextri), die links dorsal den Aortenbogen erreicht, welcher beim Vogel im Gegensatz zum Säugetier rechts der Medianen liegt (YELBUZ et al., 2004). Bei einigen Spezies, vor allem bei Hühnern, ist ein Sinus venosus in der rechten Vorkammer auch beim adulten Huhn noch nicht zurückgebildet; dieser dient dann als gewöhnliche Erweiterung der Mündungen zumindest zweier großer Körperven (AKESTER, 1971).

Die rechte Vorhof-Kammer-Öffnung (Ostium atrioventriculare dextrum) wird bei der Kammersystole durch die rechte Atrioventrikularklappe (AV-Klappe) verschlossen, welche eine vogelspezifische Struktur aufweist (QUIRING, 1933). Diese Klappe enthält beim Vogel im Gegensatz zum Säugetier einen dicken Muskelwulst (Musculus valvae atrioventricularis dextrae), welcher schräg an der Außenwand des rechten Ventrikels befestigt ist. Dieser Muskelwulst bildet einen muskulösen Kamm, der von der Außenseite bis zur Kammerscheidewand (Septum interventriculare) reicht (WEST et al., 1981).

Die Struktur dieser rechten Atrioventrikularklappe spricht gegen einen „sphinkterartigen“ Verschluss, wie er von SIMONS (1960) und EDE (1964) beschrieben wurde. Entgegen dieser Annahme wird der Klappenschluss wahrscheinlich zu einem Teil durch aktive Kontraktionen des Muskelkammes und des Weiteren durch passive Ablenkung durch einen geringen Rückfluss während der frühen Ventrikelkontraktion (Kammersystole) bewirkt (WEST et al., 1981).

Die freie Wand des rechten Ventrikels geht kontinuierlich in die äußere Wand des linken Ventrikels über und umschließt die rechte Seite des Herzens, wobei ein halbmondförmiger Hohlraum entsteht (Cavitas ventriculi dextri), welcher die Herzspitze nicht erreicht (AKESTER, 1971). Der rechte Ventrikel ist durch eine glatte innere Oberfläche ohne Papillarmuskeln gekennzeichnet. Der im Vergleich zur Dicke der Wand relativ große Durchmesser dieser rechten Herzkammer reflektiert den niedrigeren Druck, der von dieser Kammer erzeugt werden muss (SIMONS, 1960). Die Größe der Kammer erlaubt eine blasebalgähnliche Funktion des Blutaustoßes, so dass das Schlagvolumen des rechten Ventrikels mit einer minimalen Verkürzung der Muskulatur aufrechterhalten werden kann (WEST et al., 1981). Deswegen können größere Veränderungen des Schlagvolumens oder des Reservevolumens durch kleinste Veränderungen im Grad der Verkürzung der Muskelfasern erfüllt werden. Die Form, in der sich der rechte Ventrikel sich um den linken Ventrikel legt (s. Abb. 5), ähnelt der Form der rechten Kammer im Herzen der Säugetiere und lässt ähnliche Funktionen vermuten (AKESTER, 1971).

Der Ausflusstrakt (Conus arteriosus) des rechten Ventrikels umringt den linken Ventrikel beim Vogel mehr als beim Säugetier (GARCIA-PELAEZ et al., 1993; WEST et al., 1981), mit der Folge, dass der Blutaustoß in den Pulmonalarterienstamm (Truncus pulmonalis) mehr in einer linksdorsalen als linksventralen Position dem systemischen Blutfluss über die Aorta angepasst ist (WEST et al., 1981). Die Öffnung des Truncus pulmonalis (Ostium trunci pulmonalis) wird durch die Pulmonalklappe (Valva trunci pulmonalis) kontrolliert, die genauso wie beim Säugetier aus drei halbmondförmigen Kläppchen (Valvulae semilunares

sinistra, dextra et dorsalis) besteht (EDE, 1964; WEST et al., 1981). Diese Klappe verhindert in der Kammerdiastole den Rückfluss aus dem Truncus pulmonalis in den rechten Ventrikel. Die „Segel“ dieser Klappe sind, gemäß eines niedrigeren Drucks, der auf diese Klappe wirkt, im Vergleich zu denen der Aortenklappe recht dünn und weich (AKESTER, 1971).

Die aus dem Lungehilus hervortretenden Lungenvenen (Venae pulmonales) können getrennt (Ostium venae pulmonalis dextrae et Ostium venae pulmonalis sinistrae) oder zusammen in den linken Vorhof münden. Im Inneren dieses Vorhofes verbinden sich die beiden Pulmonalvenen zu einem Gefäß (Camera pulmonalis), welches in den Vorhof eingestülpt ist (AKESTER, 1971). Der linke Rand dieses zusammengesetzten Gefäßes soll als Klappe fungieren, um den Rückfluss des Blutes in die Lunge zu verhindern (WEST et al., 1981).

Genauso wie die Wand des rechten Vorhofes, ist auch die Wand des linken Vorhofes dünn, aber muskulös. An einigen Stellen der Vorhofwand sind die Muskelfasern zu dicken Bündeln angeordnet (WEST et al., 1981). Die Öffnung zwischen dem linken Vorhof und der linken Kammer (Ostium atrioventriculare sinistrum) wird bei der Kammerdiastole durch eine membranöse AV-Klappe (Valva atrioventricularis sinistra) verschlossen (AKESTER, 1971). Diese AV-Klappe bildet eine durchgehende Umrandung der Vorhof-Kammer-Öffnung. Beim Säugetier wird sie aufgrund ihrer Struktur, bestehend aus zwei membranösen Klappenanteilen, die sich beim Schluss der Klappe über die Öffnung spannen, als zweizipflige Segelklappe bezeichnet. Diese AV-Klappe weist dagegen beim Huhn nur undeutlich ausgeprägte Zipfel auf (WEST et al., 1981). Diese Tatsache hat darüber Verwirrung gestiftet, ob beim Huhn eine zweizipflige Segelklappe (Mitralklappe) oder eine dreizipflige Segelklappe (Trikuspidalklappe) ausgebildet ist (SIMONS, 1960; HODGES, 1974). Das freie Ende der Klappe ist durch eine Vielzahl von Sehnenfäden (Chordae tendinae) am Endokard des linken Ventrikels fixiert. Sie verhindern eine „Umkehr“ bzw. ein Einstülpen der Klappe in Richtung des linken Vorhofes während der Kammerdiastole (WEST et al., 1981; YILDIZ et al., 2004). Das proximale Ende der Sehnenfäden verbindet sich entweder zu längsverlaufenden Muskelkämmen, welche die gesamte Kammer durchziehen, oder zu kurzen Papillarmuskeln (Musculi papillares). Lange, deutlich sichtbare Papillarmuskeln sind am Vogelherzen im Gegensatz zum Herzen der Säuger jedoch nicht vorhanden (HODGES, 1974). Die beiden Ventrikel des Vogelherzens sind ungleichmäßig groß ausgeprägt und geformt. So ist die Wand des linken Ventrikels zwei- bis dreimal dicker als die der rechten Kammer (SIMONS, 1964). Zudem bietet der kleinere Durchmesser der linken Kammer mechanische Vorteile, um den nötigen Druck für die Aufrechterhaltung des Körperkreislaufes zu erzeugen (WEST et al., 1981). Diese beiden strukturellen Eigenschaften

begründen die Fähigkeit des linken Ventrikels, einen vier- bis fünfmal höheren Druck als der rechte Ventrikel zu erzeugen (WEST et al., 1981). Der linke Ventrikel ist zapfenförmig und bildet die Herzspitze. Seine mediane Wand bildet gemeinsam mit derjenigen der rechten Kammer die Kammerscheidewand (Septum interventriculare) (AKESTER, 1971). Die Aortenklappe (Valva aortae), welche die Öffnung der Aorta (Ostium aortae) in der Kammerdiastole verschließt, besteht – wie diejenige im Ursprung des Truncus pulmonalis – aus drei sogenannten Semilunarklappen (Valvulae semilunares sinistra, dextra ventralis et dextra dorsalis); diese sind wesentlich fester und zudem direkt im Myokard ihres Ventrikels befestigt, was dazu führt, dass sie kaum in Richtung der Aortenwand beweglich sind (WEST et al., 1981). Es ist zudem unwahrscheinlich, dass diese derbe, gut befestigte Klappe ausschließlich passiv durch das Schlagvolumen des linken Ventrikels weit geöffnet werden kann (AKESTER, 1971). Diese Tatsachen lassen die Vermutung zu, dass durch die Verbindung der Klappe mit dem angrenzenden Myokard der Aortenklappe eine aktive Beweglichkeit durch ventrikuläre Kontraktion erlaubt wird (WEST et al., 1981).

1.6.4. Hohlvenen

Unter den Vögeln besitzen die Hühner zwei kraniale bzw. obere Hohlvenen (Venae cavae craniales) und eine kaudale bzw. untere Hohlvene (WEST et al., 1981). Die einzige kaudale Hohlvene (Vena cava caudalis) und die rechte kraniale Hohlvene (Vena cava cranialis dextra) münden in den Sinus venosus. Dieser Mündungsort wird durch eine muskulöse Scheidewand (Septum sinus venosi) von der Mündung der linken kranialen Hohlvene (Vena cava cranialis sinistra) getrennt (WEST et al., 1981). Die Verbindung zwischen dem Sinus venosus und dem rechten Vorhof wird von einer dünnen, muskulären Klappe (Valva sinuatrialis) begrenzt (AKESTER, 1971). Diese Sinuatrialklappe wird aus einem rechten und aus einem linken Klappenanteil zusammengesetzt (Valvula sinuatrialis dextra et Valvula sinuatrialis sinistra) (SIMONS, 1964). In der Wand des rechten Vorhofes mündet die linke kraniale Hohlvene (Vena cava cranialis sinistra) mit der dafür vorgesehenen Öffnung (Ostium venae cavae cranialis sinistrae) (WEST et al., 1981). Ein im Zuge der Präparation kollabierendes, aus dem Vogel entnommenes Herz kann die Ausprägung von Herzohren, vergleichbar denen des Säugetieres, auch am Vogelherzen in Erscheinung treten lassen (WEST et al., 1981), obwohl diese dem Vogel im Allgemeinen fehlen.

In allen Kammern existieren – mit Ausnahme des linken Ventrikels – zahlreiche Öffnungen von kleinen Herzvenen (Foramina venarum minimarum), welche der Versorgung des Herzmuskels dienen (AKESTER, 1971).

1.7. Mikroskopisch - anatomische Beschreibung des Herzen

1.7.1. Grundlegende Struktur und Zusammensetzung der Herzmuskulatur

Das Herz des Huhnes weist in seinem grundsätzlichen Wandaufbau gegenüber dem Säugetierherzen wenige spezifische Unterschiede auf (KERN, 1962). Auch am Vogelherzen ist eine Unterteilung des Wandaufbaus in Epi-, Myo- und Endokard zu finden, wobei im generellen Aufbau der Herzmuskelfasern Unterschiede zwischen dem Herzen der Säugetiere und dem der Vögel bestehen (AKESTER, 1971). Das Serosaepithel des Epikards ist das viscerele Blatt des Pericardium serosum der Herzbeutelwand. Dieses Epikardepithel liegt einer dünnen Bindegewebsschicht auf (subepikardiales Mesenchym).

Das vom Epikard bedeckte Myokard setzt sich aus Herzmuskelzellen und einem schwach ausgebildeten, bindegewebigen Netzwerk zusammen, in dessen Maschen ein dichtes Kapillarnetzwerk eingelagert ist. Zusätzlich verlaufen hier autonome Nervenfasern und zahlreiche Lymphgefäße.

Das Endokard kann mit der Intima der Gefäße verglichen werden. Es setzt sich aus einem dünnen Endothel und einem lockeren, subendothelialen Bindegewebe zusammen. Diesem liegt eine Schicht kollagener und elastischer Fasern an, in deren Maschenwerk glatte Muskelzellen eingelagert sind (Stratum myoelasticum). Das Endokard wird mit dem Myokard durch eine Gefäß führende Tela subendocardialis verbunden. In dieser Zwischenschicht verlaufen in den Herzkammern auch die Fasern des autonomen Nervensystems (Myofibrae conducentes cardiacae, früher als Purkinje-Fasern bezeichnet). Die Herzklappen sind Endokardausstülpungen, deren strukturelle Grundlage ein derbes, kollagenfaseriges Gerüst („Klappenskelett“) ist. Die Klappen sind gefäßlos, schließen jedoch zahlreiche vegetative Nervenfasern ein (AKESTER, 1971).

1.7.2. Arbeitsmyokard

Wesentlichstes Bauelement des Arbeitsmyokards (im Unterschied zu den modifizierten Myokardzellen des Erregungsbildungs- und Leitungssystem) sind die Herzmuskelzellen

(Kardiomyozyten) selbst und die zu ihrer Versorgung notwendigen, in spärlich ausgeprägtes Bindegewebe eingebetteten Blutgefäße (WEST et al., 1981). SMOLLICH und MICHEL (1992) beschreiben einen dreischichtigen Bau dieses Arbeitsmyokards. Die Autoren unterscheiden eine äußere und innere längs verlaufende sowie eine mittlere zirkulär verlaufende Muskellage, wobei die Muskelfasern eine raumspiralige oder schraubenartige Orientierung einnehmen. Dabei verlaufen die äußeren Muskelfasern in der Ventrikelwand in Richtung Herzspitze und die inneren in Richtung des Ostium atrioventriculare. Die Vorhofmuskulatur weist dagegen keine ausgeprägte Verlaufsrichtung auf. Die Anordnung der verschiedenen Muskelfaserschichten mit verschiedener Ausrichtung der Fasern ermöglicht eine gleichmäßige Kontraktion des Herzens und somit einen gerichteten Blutfluss (SMOLLICH u. MICHEL, 1992). Nach HEINE (1989) ist dagegen ein fest gefügtes Strukturprinzip der Herzmuskulatur weder präparatorisch noch histologisch fassbar.

1.7.3. Feinbau des Herzmuskelgewebes

Die Hauptmasse des Myokards bildet die Arbeitsmuskulatur. Daneben enthält das Myokard die modifizierten Herzmuskelzellen des Reizbildungs- und Erregungsleitungssystems (im Sinusknoten, im AV-Knoten sowie in den Aschoff-Tawara-Schenkeln und in den Purkinje-Fasern bzw. den Myofibrae conducentes cardiacae). Das Arbeitsmyokard erzeugt die Kraft, die nötig ist, um den Blutfluss durch das Herz-Kreislauf-System zu ermöglichen (SAJONSKI u. SMOLLICH, 1990). Die Herzmuskelzellen bilden ein funktionelles Synzytium und funktionieren nach dem „Alles oder Nichts“-Prinzip (SAJONSKI u. SMOLLICH, 1990). Das heißt, dass ein Einzelreiz bzw. ein Aktionspotential immer auch zu einer Erregung des gesamten Myokards von Vorhof und Kammern führt, oder eine Erregung vollständig ausbleibt.

Neben den Herzmuskelzellen besteht die Ventrikelwand vorrangig aus den im Interstitium vorhandenen Bindegewebsfasern, den Fibroblasten, den Fibrozyten, den Kapillaren sowie den autonomen Nervenzellen und den zahlreichen Lymphgefäßen (WEST et al., 1981). ANVERSA und Mitarbeiter (1984) geben eine Zusammensetzung für das rechte Vorkammer- und Kammermyokard der Ratte an. Dieses setzt sich zu 82,47 % aus Kardiomyozyten, zu 10,22 % aus Kapillaren und zu 7,31 % aus interstitiellem Bindegewebe zusammen.

Die Herzmuskelzellen bilden ihren strukturellen und funktionellen Zusammenhalt über eine Vielzahl spezialisierter Kontakte ihrer Zellmembranen. Um ein stabiles und koordiniert arbeitendes Herzmuskelgewebe zu bilden, sind die einzelnen Zellen an ihren Enden sowie an den seitlichen Wänden miteinander über Zellkontakte verbunden (SEDMERA et al., 1997).

Laterale Zellverbindungen bestehen gewöhnlich aus Desmosomen (Maculae adhaerentes). Ein solches Desmosom setzt sich aus je einer Verdickung der Zellmembran der beiden zu verbindenden Zellen sowie aus einer dazwischen liegenden extrazellulären Schicht spezieller Proteine zusammen (GUTSTEIN et al., 2002). Die Enden der Herzmuskelzellen sind über spezielle Verbindungen aneinandergesetzt, welche einen komplexen Aufbau haben und die unter dem Mikroskop sichtbaren Glanzstreifen (Disci intercalares) bilden (GUTSTEIN et al., 2002). In den Glanzstreifen verzahnen sich die Zellgrenzen fingerförmig (LIEBIG, 1990). Innerhalb der Glanzstreifen sorgen neben den Desmosomen für die mechanisch stabile Verbindung die so genannten Gap junctions (Nexus) für eine fast widerstandsfreie Ausbreitung der Erregungswellen im Herzzellverband (BECKER et al., 1998). Deshalb wird das Herzmuskelgewebe im Gegensatz zum quer gestreiften Skelettmuskel als funktionelles Synzytium bezeichnet.

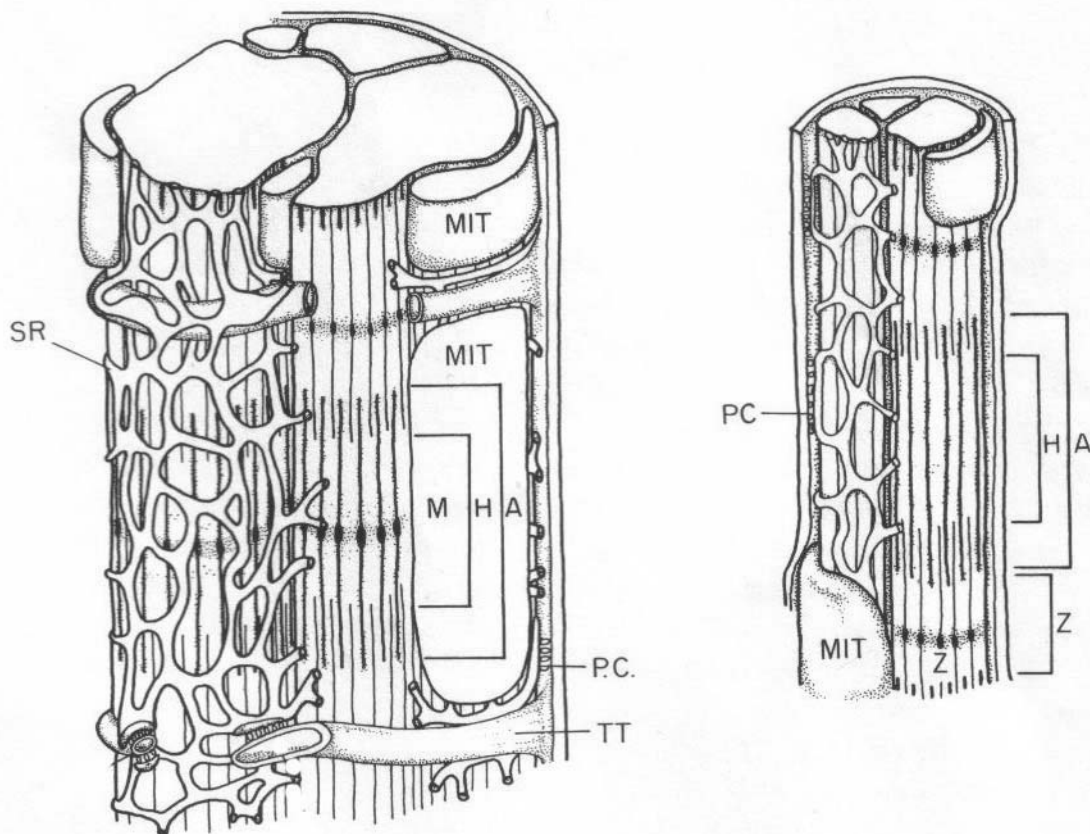
1.7.3.1. Kardiomyozyten

Die Herzmuskelzelle ist die kleinste funktionelle Einheit des Myokards (SAJONSKI u. SMOLLICH, 1990). Im Gegensatz zum Säugetier sind die Kardiomyozytendurchmesser und Muskelfaserstärken des Vogels wesentlich kleiner (AKESTER, 1971; HODGES, 1974). Vögel besitzen nur eine Herzmuskelzellstärke von 2 – 7 µm im Durchmesser gegenüber den 10 – 15 µm dicken Zellen der Säugetiere (SOMMER et al., 1970; HIRAKOW, 1970).

Die Feinstruktur dieser Herzmuskelzellen (Myocyti cardiaci) setzt sich aus den Myofibrillen, den Mitochondrien, dem Zellkern, der Zellmatrix und dem sarkoplasmatischen Retikulum zusammen (LIEBIG, 1990). Ein T-Tubulus-System, die transversalen Einstülpungen der Zellmembran, zur beschleunigten Impulsübertragung fehlt den Herzmuskelzellen im Vogelherzen im Gegensatz zu denjenigen im Säugetierherzen (WEST et al., 1981).

Jede Herzmuskelzelle besitzt eine Zellmembran, das Sarkolemm. Bündel aus fünf oder sechs solcher Zellen bilden die kardialen Muskelfasern, wobei jede dieser Fasern von einer Basalmembran umgeben wird und von einem dichten Kapillarnetzwerk mit Blut versorgt wird (AKESTER, 1971). Jede Herzmuskelzelle wird von vier bis acht eigenen Kapillaren versorgt und besitzt in der Regel nur einen Zellkern, bei einzelnen Tierspezies oder unter bestimmten Umständen aber auch amitotisch gebildete zwei oder mehrere Zellkerne und viele parallel zu ihrer Längsachse verlaufende Myofibrillen (LEGATO, 1979; CANALE et al., 1986). Durch die regelmäßige Anordnung dieser Myofibrillen kommt die für Skelett- und Herzmuskulatur charakteristische Querstreifung im mikroskopischen Bild zustande (LIEBIG, 1990). [Die Herzmuskulatur darf, genau genommen, nicht als modifizierte quergestreifte

Skelettmuskulatur bezeichnet werden, da es sich – abgeleitet aus der Entwicklung – um glatte, modifizierte Eingeweidemuskel handelt (BRAGULLA, 2004)]. Die Querstreifung ist auf eine unterschiedliche Brechung des polarisierten Lichtes durch die in den Myofibrillen regelmäßig und parallel angeordneten Myofilamente (Actin und Myosin) zurückzuführen (s. Textabb. 5). Man unterscheidet isotrope (I-Band: nicht doppelbrechend) und anisotrope (A-Band: doppelbrechend, die Polarisationssebene des Lichtes verändernd) Bänder, die zentral noch einmal jeweils durch dichtere Querlinien (Z-Streifen sive Telophragma resp. Mesophragma) halbiert werden.



Textabb.: 5

Schematische Darstellung des Aufbaus von Kardiomyozyten des Säugetieres (A) und des Vogels (B). Als Hauptunterschiede zeigen sich am Herzmuskelgewebe des Vogels die kleineren Zelldurchmesser und das Fehlen von Mesophragma (M-Streifen) und transversalen Tubuli. Legende: SR = Sarkoplasmatisches Retikulum, PC = periphere Verbindungsstelle, TT = transversaler Tubulus, MIT = Mitochondrien; zudem sind die charakteristischen M, H, A, I und Z – Bänder der quergestreiften Muskulatur dargestellt (modifiziert nach SOMMER u. JOHNSON, 1969).

Das I-Band wird durch eine dunkle Zwischenscheibe (Z-Streifen = Telophragma) halbiert, das A-Band wird in der quergestreiften Herzmuskelzelle des Säugetieres zudem durch einen

schmalen M-Streifen (Mesophragma im H-Band = Hensensches oder helles Band) unterteilt, welcher jedoch dem Vogel fehlt (LIEBIG, 1990) (s. Textabb. 5).

Die Herzmuskelzellen der Vögel besitzen ein gut ausgeprägtes sarkoplasmatisches Retikulum (WEST et al., 1981). HIRAKOW (1970) beschreibt, dass dieses gut ausgeprägte sarkoplasmatische Retikulum und die große Anzahl an Mitochondrien in den Kardiomyozyten des Vogels funktionelle Anpassungen an die höhere Herzfrequenz der Vögel sind.

1.7.3.2. Myofibrillen und Myofilamente

Am embryonalen Herzschlauch kann eine Kontraktion der Kardiomyozyten bereits nach sechsunddreißig Stunden der Bebrütung registriert werden. Eine solche Kontraktion erfordert das Zusammenspiel eines Netzwerkes aus Myofibrillen und den darin enthaltenen Mikro- und Intermediärfilamenten (TOKUYASU et al., 1987 a). Die Anordnung der myofibrillären Proteine in ihren funktionellen Einheiten, den Sarkomeren, ist ein schneller und gut koordinierter Prozess in der Entwicklung des Herzens (EHLER et al., 1999; RHEE et al. 1994; SANGER et al., 2001). Das Sarkomer ist die grundlegende funktionelle Einheit einer Myofibrille. Jede Myofibrille beinhaltet mehrere aneinander gereihte Sarkomere. Die Herzmuskelfasern der quer gestreiften Skelett- und Herzmuskulatur enthalten in den Sarkomeren eine Vielzahl von regelmäßig parallel ausgerichteten Myofilamenten, die sich zu kontraktilen Myofibrillen anordnen. Die Myofibrillen sind funktionelle Einheiten aus dicken und dünnen Myofilamenten. Die dicken intermediären Filamente (Durchmesser ca. 10 nm) bestehen aus dem Strukturprotein Myosin, während die dünnen Mikrofilamente (Durchmesser ca. 5 nm) aus dem Protein Actin bestehen (FISCHMANN, 1986).

Eine Vielzahl von Literaturquellen behandelt die „Anordnung von Myofibrillen“. Embryonale Kardiomyozyten zeigen vor der Bildung der Herzschleife die Struktur eines primitiven, mesodermalen Epithels, welches aus zwei Zellschichten besteht (SHIRAISHI et al., 1997). Diese unreifen Zellen differenzieren sich unmittelbar vor Bildung der Herzschleife zu Myozyten mit einem hohen Gehalt an Myofibrillen (MANASEK, 1968). Am Säugetierherzen, insbesondere dem Herzen der Maus, ist die myofibrilläre Strukturierung der Kardiomyozyten auch zum Zeitpunkt der Geburt noch unreif (MANASEK, 1970; HIRAKOW, 1980; CHALLICE u. VIRAGH, 1973). Nach RUMYANTSEV (1977), führt die Entwicklung des Herzens und eine Reifung der Kardiomyozyten gleichzeitig zu einer Abnahme des mitotischen Wachstums im Herzmuskel. Der Autor beschreibt zudem, dass die mitotische Teilung der Kardiomyozyten von einem temporären Verlust der Myofibrillenstruktur begleitet wird.

Die Reihenfolge der Ausbildung der verschiedenen Anteile des Myofibrillennetzwerkes während der Embryonalentwicklung des Herzens wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Die Myofibrillen sollen sich aus so genannten „Prämyofibrillen“ differenzieren (SANGER et al., 2000). Diese Prämyofibrillen organisieren sich anschließend zu Sarkomeren (HOLTZER et al., 1997; EHLER et al., 1999; RUDY et al., 2001). DANTO und Mitarbeiter (1984) geben an, dass das Intermediärfilamentprotein Desmin als erste Struktur in der Myofibrillogenese des Skelettmuskels nachweisbar ist. Erst anschließend folgt die Expression von Titin und anderen Sarkomerproteinen. Die Reifung eines Skelettmuskels dauert fast eine Woche (FISCHMANN, 1986), wohingegen das früh arbeitende Herz in wenigen Stunden der embryonalen Entwicklung seine Fähigkeit zur Kontraktion erlangen muss. Daraus wird die Hypothese einer vom Skelettmuskel abweichenden Form der Myofibrillogenese für den Herzmuskel abgeleitet. Außer den Strukturproteinen Actin und Myosin werden im Zuge der Myofibrillogenese noch weitere Proteine in die kontraktile Elemente der Herzmuskelzelle eingebaut. GUAN und Mitarbeiter (1999) geben für das Herz eine der Entwicklung bzw. der Expression einzelner Proteine angepassten Myofibrillogenese an. Die Autoren beschreiben folgende Reihenfolge: Titin (als stabilisierender Bestandteil eines Sarkomers), α -Actinin (Strukturprotein und Bestandteil des Z-Streifens), Myomesin, Titin (im M-Band), Heavy Chain Myosin, Actin, cardiac Troponin und M-Protein. Nach NAGY und Mitarbeitern (2001) ist das α -smooth-muscle Actin (α -SMA) das erste Strukturprotein im Herzmuskelgewebe des Hühnerembryos. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen RUZICKA und Mitarbeiter (1988) sowie HUNGERFORD und Mitarbeiter (1996 u. 1997). Letztere beschreiben, wie auch LEE und Mitarbeiter (1997), dass α -Actinin erst nach Auftreten des α -SMA nachweisbar ist. Andere Proteine wie Calponin, Smoothelin oder Desmin werden nach den Angaben dieser Autoren erst später gebildet. Für das embryonale Hühnerherz beschreiben TOKAYUSU et al. (1987), dass α -Actinin und Titin in der Entwicklung der Sarkomere erst dann auftraten, nachdem Actin und Myosin schon diffus in der Zelle nachgewiesen werden konnten. Im Zuge der weiteren Entwicklung beobachteten diese Autoren das Myosin bereits in einer Sarkomeranordnung, während Actin noch diffus in der Zelle verteilt vorlag. Die Anordnung von Actin ändert sich während der Entwicklung der Herzmuskelzellen. Das zunächst in einem unregelmäßigen Netzwerk vorliegende Protein differenziert sich zu Actinbündeln, noch bevor I-Banden in Erscheinung treten (SHIRASHI et al., 1992). Bei Untersuchungen zur Lokalisation von Vinculin, N-Cadherin, Fibronectin und Phosphotyrosin zeigte sich, dass Myofibrillen benachbarter Kardiomyozyten sich bereits sehr früh in der Myofibrillogenese über Zellkontakte miteinander verbinden, woraus abgeleitet wird, dass diese

Verbindungsstellen eine entscheidende Rolle für die Ausrichtung der Myofibrillen in der Herzmuskelzelle spielen (TOKAYUSU, 1989; SHIRAIISHI et al., 1993, 1995, 1997). Aufgrund der Vielzahl verschiedener Myofilamente, Intermediärfilamente und anderer fibrillärer Proteine, die am Aufbau des Herzmuskelgewebes beteiligt sind, soll im Folgenden nur auf die in dieser Studie immunhistologisch untersuchten Anteile der Myofibrillen in den Kardiomyozyten näher eingegangen werden. Zur Begründung der Wahl bestimmter Antikörper gegen myofibrilläre Proteine wird auf das Kapitel 4 verwiesen.

1.7.3.2.1. Myosin

Die dicken Myofilamente in der Herzmuskulatur bestehen aus dem Strukturprotein Myosin. Jedes Myosinmolekül besteht aus zwei lang gestreckten miteinander verdrillten Proteinmonomeren, die zum einen Ende hin in Form von zwei „Köpfchen“ verdickt sind. Man unterscheidet im Einzelnen die hochmolekularen (= schweren) Myosinproteine bzw. „Myosinketten“ (Myosin heavy chain, MHC) und zwei niedermolekulare (= leichte) Myosinproteine (Myosin light chain, MLC) (HORWITZ, 2003). Das schwere Meromyosin aus „Kopf“ und „Hals“ des Myosins bildet die Querbrücken, die seitlich aus dem Myosinfilament herausragen und eine Verbindung zum Aktinfilament herstellen können. Diese Verbindung ist grundlegend für den Kontraktionsvorgang des Muskels. Im Übergangsbereich von Kopf- und Halsteil liegen die leichten Myosinketten, innerhalb dieser so genannten „Schaftregion“ sind etwa zwei- bis dreihundert Myosinmoleküle miteinander verbunden und bilden das eigentliche Myosinfilament (PEIPER, 1996). Die Expression des Proteins Myosin-heavy-chain (MHC) scheint im Vogelherzen komplexer zu sein als diejenige im Herzmuskel des Säugetieres (GHATPANDE et al., 2001). Zudem sind MHCs im Myokard der Atrien und in dem der Ventrikel des adulten Huhnes immunhistochemisch unterschiedlich (EVANS et al., 1988). Im Zuge der embryonalen Entwicklung des Hühnerembryo lassen sich bezüglich des MHC-Gehaltes im Myokard fünf morphologisch und funktionell unterschiedliche Regionen erkennen: der Zuflusstrakt, die Atrien, der Atrioventrikularkanal, die Ventrikel und der Ausflusstrakt (MOORMAN et al., 1994). Innerhalb dieser fünf Regionen des embryonalen Herzen gibt es unterschiedliche Reifegrade der Kardiomyozyten. Zeitgleich mit dem Auftreten eines derart regionalisierten embryonalen Herzen werden auch unterschiedliche Isoforme der Myosin heavy chain-Proteine (MHC) exprimiert (LYONS, 1994; FRANCO et al., 1998). Alpha-MHCs sind im Bereich der Atrien und des Zuflusstraktes zu finden, wohingegen beta-MHCs in den Ventrikeln und dem Ausflusstrakt exprimiert werden. Es gibt am Hühnerherzen mindestens drei verschiedene Isoforme von MHC-

Proteinen (GONZALEZ-SANCHEZ et al., 1984 u. 1985; ZHANG et al., 1986; SWEENEY et al., 1987). Mit spezifischen Antikörpern gegen die verschiedenen Proteinisoforme untersuchten EVANS und Mitarbeiter (1988) die gewebespezifische Expression der verschiedenen Myosin-Isoforme. Sie beschreiben, dass bereits am zweiten Bebrütungstag die verschiedenen Antikörper zum Zeitpunkt der einsetzenden Myosin-Expression eine gewebespezifische Reaktion aufwiesen. Darüber hinaus belegte eine andere Studie, dass am embryonalen Hühnerherzen eine MHC-Isoform im Bereich der Atrien exprimiert wird, welches nicht im Myokard von Herzen adulter Hühner zu finden ist (SWEENEY et al., 1987). Diese Studien belegen, dass die Expression verschiedener kardialer MHC-Isoforme sowohl vom Entwicklungsstadium, als auch von der Region im embryonalen Hühnerherzen abhängt. Die Untersuchungen von TOKUYASU (1990) zeigen, dass im frühen (ca. siebter Bebrütungstag) embryonalen Hühnerherzen die Myokardzellen in den weniger stark proliferierenden Trabekeln einen höheren Differenzierungsgrad aufwiesen als jene des kompakten Myokard, welches mit seiner höheren Proliferationsrate von den Autoren als Quelle für die Zellen zum Aufbau des trabekulären Myokard bezeichnet wird. Dieser höhere Differenzierungsgrad stand im Zusammenhang mit einer erhöhten Myosinexpression. Aufgrund der Unreife der embryonalen Myofibrillen in den Herzmuskelzellen und ihrer noch fehlenden regelmäßigen Anordnung (= ohne Querstreifung) nutzten SEDMERA und Mitarbeiter (2002) in ihren Untersuchungen die Anfärbbarkeit des Zelleibes der Myokardzellen als groben Differenzierungsmarker. Sie beobachteten eine Abnahme der Eosinophilie bei hypoplastischen linken Ventrikeln (SEDMERA et al., 1999 a). Neuere Untersuchungen der Autoren aus dem Jahr 2002 zeigten gleichzeitig auch eine Abnahme der spezifischen Bindung des Myosin-Antikörpers in den Zellen des Myokards hypoplastischer Ventrikel.

1.7.3.2.2. Actin

Das Strukturprotein Actin ist gemeinsam mit Myosin das wichtigste Protein im Aufbau einer jeden Myofibrille. Actin-Filamente setzen sich aus zwei, sich in Form einer Helix umschlingenden filamentären Actinmolekülen zusammen. Darüber hinaus binden diese dünnen Actin-Filamente weitere Proteine wie Tropomyosin und Troponin, die an der Kontraktion der einzelnen Myofibrille resp. der einzelnen Muskelzelle bzw. des gesamten Muskels beteiligt sind. In der quergestreiften Muskulatur sind diese Filamente sehr regelmäßig angeordnet. Die Muskelkontraktionen werden durch das Entlanggleiten von Myosin an den Actinfilamenten erzeugt (HORWITZ, 2003). Dieser Energie fordernde

Prozess der Muskelkontraktion wird durch die Hydrolyse von Adenosintri-phosphat (ATP) ermöglicht, bei der gleichzeitig die chemische Energie in mechanische Energie (= Muskelkontraktion) umgesetzt wird (ECKERT, 1986).

Die Actinmoleküle setzen sich insgesamt aus einer Familie von sechs gewebespezifischen Proteinen zusammen (SUGI et al., 1992). Anhand der Aminosäuresequenzen dieser Proteine können vier verschiedene Actin-Isoproteine in Muskelzellen gefunden werden (SUGI et al. 1992; HANDEL, 1991). Im erwachsenen Organismus ist das „skeletal α -Actin“ das dominierende Isoform im Skelettmuskel, während am Herzen das „cardiac α -Actin“ verstärkt exprimiert wird (VANDEKERCKHOVE et al., 1979 u. 1986; BENNETS et al. 1989). „ α -smooth-muscle Actin“ ist das Hauptisofom der Actin-Proteine in der Gefäßwand, wohingegen das „ γ -smooth-muscle Actin“ im Muskelgewebe des Verdauungstraktes und des Genitaltraktes dominiert (VANDEKERCKHOVE et al., 1979). SUGI und Mitarbeiter (1992) beschreiben, dass in der Embryogenese des Huhnes nach sechsundzwanzig bis dreiunddreißig Stunden der Bebrütung das α smooth-muscle Actin als erstes Isoform in der Kardiogenese auftritt. Nach dreiunddreißig Stunden Bebrütung konnten die Autoren durch in situ-Hybridisierung das später hauptsächlich ausgeprägte Actin-Isoform, das „cardiac α -actin“, nachweisen.

Verschiedene Autoren beschreiben eine vorübergehende Expression von α -smooth muscle Actin (α -SMA) im embryonalen Herzen von Huhn und Ratte (SUGI et al., 1992; RUZICKA et al., 1988; WOODCOCK – MITCHEL et al., 1988; SAWTELL et al., 1989). Nach YA und Mitarbeitern (1997) tritt neben der Expression von α -SMA im embryonalen Herzen zum selbem Zeitpunkt eine Coexpression von α -, und β -heavy chain Myosin und darüber hinaus noch von smooth muscle Calponin und Troponin auf.

1.7.3.2.3. Desmin

Das Protein Desmin ist ein für Muskelgewebe spezifisches Intermediärfilament. Als wichtiger Bestandteil des Zytoskelettes der Herzmuskelzelle ist es in den Z-Banden dieses Muskelgewebes zu finden (WANG, 2000). Die Desminfilamente korrespondieren mit verschiedenen anderen Intermediärfilamentproteinen derselben Klasse, wie z. B. mit Vimentin (COSTA et al., 2005). Die Expression von Desmin beginnt früh in der Entwicklung des Herzmuskelgewebes (GARD et al., 1980). Nach OSINSKA und Mitarbeitern (1989) fungiert das Desmin auch im Herzmuskel als eine dreidimensionale Matrix, die einzelne Myofibrillen miteinander und mit der Plasmamembran (Sarkolemm) mittels der Z-Banden verbindet. Nach GARD und Mitarbeitern (1982) sowie OSINSKA und Mitarbeitern (1989)

spielt das Intermediärfilament Desmin daher eine wichtige Rolle in der seitlichen bzw. parallelen, regelmäßig ausgerichteten Anordnung neu gebildeter Myofibrillen im embryonalen Herzmuskelgewebe. Im Gegensatz dazu beschreiben WANG und Mitarbeiter (2000), dass Desmin nicht an der lateralen Verbindung der Myofibrillen untereinander beteiligt ist. So ist die Frage der Funktion von Desmin wissenschaftlich noch nicht eindeutig beantwortet. In embryonalen Stammzellen der Maus führte die Zerstörung (knock out) des Desmin-Gens zu einem vollständigen Verlust der Muskeldifferenzierung in den drei verschiedenen Muskelgeweben (WEITZER et al., 1995). Diese Untersuchung bestätigt eine große Bedeutung des Desmin in der Differenzierung von Muskelgeweben (LI et al., 1994; WEITZER et al., 1995). SCHULTHEISS und Mitarbeiter (1991) zeigten, dass die Integration eines Desmin-Gens in postmitotische Myoblasten die normale Entwicklung von Muskelgewebe sowie die Anordnung von Myofibrillen nicht beeinflusste. Durch verschiedene Untersuchungen kamen LI und Mitarbeiter (1997) sowie THORNELL und Mitarbeiter (1997) zu der Hypothese, dass in der frühen Phase der Myofibrillogenese keine Desminfilamente benötigt werden, sondern dass die Desminfilamente an der späteren Stabilisierung und Reparatur von Myofibrillen beteiligt sind. Aufgrund seiner wichtigen Funktion im Muskelzellverband ist anzunehmen, dass das Auftreten von Desmin jedoch generell als Indikator bzw. Marker für den Differenzierungsgrad und die strukturelle Reifung des Myokards gesehen werden kann (JING et al., 1997).

1.7.3.2.4. Vimentin

Wie das Protein Desmin ist auch das Vimentin ein Intermediärfilament im Zytoskelett der Kardiomyozyten. Die Strukturproteine, die die Intermediärfilamente aufbauen, sind gewebespezifisch. Die Intermediärfilamente von Muskelzellen beinhalten im Gegensatz zu denen der meisten anderen Zellen überwiegend die Proteine Desmin und Vimentin. So wird Vimentin zeitgleich mit Desmin exprimiert (COSTA et al., 2005) und fungiert als ein Stützgerüst bei der Organisation von Desmin während der frühen Myogenese (VELEZ et al., 2000). Im Laufe dieser Myogenese verliert Vimentin an Bedeutung; im Herzmuskel adulter Individuen ist es kaum noch nachweisbar (COSTA et al., 2005). Im embryonalen Herzen wird mit fortschreitender Entwicklung des Muskelgewebes die zunächst longitudinale Anordnung der Vimentin/Desmin-Filamente in ein transverses System transformiert, welches mit dem Sarkolemm und den Z-Banden der Myofibrillen assoziiert ist (CARY et al., 1994).

1.7.3.2.5. N-Cadherin

Das Protein N-Cadherin (= neuronales Cadherin) ist ein zellmembranassoziiertes, kalziumabhängiges Adhäsionsmolekül, welches im Nervengewebe vorkommt und im Myokard vorwiegend in den Zellmembran assoziierten Z-Banden zu finden ist (GEIGER et al., 1992).

Die Cadherine sind an der Bildung von Zell-zu-Zell Adhäsionen beteiligt, die interzelluläre Kommunikationen und Transduktionssignale für die verschiedenen morphogenetischen Prozesse regulieren (KOCH et al., 1994; MARRS et al., 1996; YAP et al., 1997). Das N-Cadherin ist das einzige bisher bekannte Cadherin, welches im Myokard exprimiert wird; es wird von einigen Autoren mit verschiedenen Ereignissen in der Organogenese des Herzens in Zusammenhang gebracht. So sind diese Proteine z. B. an der Auswahl bzw. Bestimmung der Lokalisation für das praekardiale Mesoderm (LINASK et al. 1997), der Bildung der Rechts-Links-Asymmetrie des Herzens (GARCIA-CASTRO et al., 2000), der Bildung der Herzscherle (SHIRAISHI et al., 1993) und an der Bildung der „trabekulären Herzwand“ (ONG et al., 1998) beteiligt. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Cadherine ihre Funktionen nur erfüllen können, wenn sie mit bestimmten zytoplasmatischen Proteinen, den Cateninen, verbunden sind. Man unterscheidet die α -Catenine von den β -Cateninen und von dem Protein Plakoglobin (HIRANO et al., 1992). Verschiedene Autoren zeigten, dass Cadherin-Catenin-Komplexe mit Elementen des Zytoskeletts, wie z. B. mit Actinfilamenten, interagieren (HIRANO et al., 1987). Die Cadherine bilden durch Kalzium vermittelte Zellverbindungen, die es den einzelnen Zellen ermöglichen, die gleichen Cadherine zu exprimieren, damit diese Zellen sich während der Entwicklung und Differenzierung wieder erkennen und einander anlagern können (GALLICANO, 2004). Neben der Beteiligung von Cadherinen an der Bildung adhäsiver Zell-zu-Zell-Verbindungen, haben weitere Studien gezeigt, dass Cadherine die Ausbildung von anderen Zellverbindungen wie z. B. von Desmosomen oder von Gap junctions fördern können. Diese beiden Formen der Zellkontakte spielen eine wichtige Rolle in der Funktion des Myokards (JONGEN et al., 1991; MEYER et al., 1992), weshalb dem N-Cadherin auch eine wichtige, wenn auch indirekte Bedeutung für die Myofibrillogenese zukommt (SOLER et al., 1994).

1.8. Lektine

Lektine sind zuckerbindende Proteine mit der Eigenschaft, Zellen spezifisch zu agglutinieren und/oder Glykokonjugate (= Moleküle mit einem Kohlenhydratanteil, z. B. Polysaccharide,

Glykoproteine oder Glykolipide) zu präzipitieren. Da sie ursprünglich nur aus Pflanzenextrakten isoliert worden sind und zur Agglutination von Blutzellen (Erythrozyten) eingesetzt wurden, sprach man zunächst von Phytohaemagglutininen. Später stellte sich heraus, dass sie auch aus tierischen Organen (vornehmlich der Invertebraten) zu gewinnen sind und dass keineswegs alle an Erythrozyten binden (SENGBUSCH, 2003). BOYD und SLAPEIGH führten daher 1954 den Begriff Lektin (lat: legere = auswählen) ein. Diese Lektine besitzen mindestens zwei spezifische Zuckerbindungsstellen, sonst wäre ihr Agglutinations- bzw. Präzipitationsvermögen nicht zu erklären. Tatsächlich bestehen die meisten von ihnen aus zwei, vier oder mehr meist gleichartigen Untereinheiten (SENGBUSCH, 2003). Ihre Bindungsspezifität wird durch jenes Mono- oder Oligosaccharid definiert, welches das Agglutinationsvermögen kompetitiv inhibiert. Diese Affinität eines Lektins zu Zellen oder Makromolekülen (Liganden) liegt weit über der zu einzelnen Zuckern. Daraus wurde geschlossen, dass es bei der Bindung der Liganden nicht nur auf die Kohlenhydratanteile ankommt, sondern dass zusätzliche, unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen (schwache Bindungen) den Komplex stabilisieren. Man kennt beispielsweise eine Reihe von Lektinen (z. B. Peanut-Agglutinin = PNA, Soybean-Agglutinin = SBA) mit einer Affinität zu β -D-Galactosylresten. Zudem findet man deutliche Unterschiede in ihrem Bindungsvermögen zu bestimmten Zellen oder Glykoproteinen auf Zelloberflächen. Einen großen Einfluss übt die sterische Lage der Kohlenhydrate an der Molekül- oder Zelloberfläche aus; sie müssen für das Lektin zugänglich sein. Wegen der strukturellen Komplexität der Liganden werden die lektinbindenden Moleküle üblicherweise als Lektinrezeptoren bezeichnet. Trotz gewisser Unsicherheiten bezüglich ihrer chemischen Charakterisierung werden Lektine in den letzten Jahrzehnten in steigendem Umfang in der medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt. Sie eignen sich, um bestimmte Zelltypen oder Zellfragmente (z. B. Membrantypen) zu charakterisieren, Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erkennen, normale von Tumorzellen zu unterscheiden, die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu markieren und verschiedene Zelltypen affinitätschromatographisch voneinander zu trennen (SENGBUSCH, 2003). Zudem wurden auch bei Säugetieren und Vögeln in den letzten Jahren endogene, also körpereigene Lektine isoliert.

Die Veränderungen der Glykokonjugate auf der Oberfläche von Zellen und in der extrazellulären Matrix weisen darauf hin, dass die Zellen selbst strukturelle Veränderungen während ihrer Entwicklung und im Zuge der Differenzierung von Gewebe durchlaufen (MANN et al., 1987; RICHA et al., 1986). Untersuchungen verschiedener Wissenschaftler haben gezeigt, dass Glykokonjugate eine wichtige Rolle in Zell-zu-Zell- und in Zell-zu-

Substrat-Interaktionen im embryonalen Entwicklungsprozess spielen (JEANLOZ et al., 1976; IVATT, 1984). Trotz dieser viel versprechenden Aussage wurden die strukturellen Veränderungen dieser Glykokonjugate während der Embryonalentwicklung des Herzens bisher nur unzulänglich untersucht. Im Rahmen dieser Studie wurden die embryonalen Hühnerherzen mit unterschiedlichen Lektinen untersucht. Um ein repräsentatives Screening über die Reaktion von Lektinen am embryonalen Hühnerherzen durchzuführen, wurden die Lektine zum einen aus verschiedenen Zuckergruppen gewählt, und zum anderen wurden Ergebnisse verschiedener Autoren über das Bindungsverhalten von bestimmten Lektinen als Grundlage für die eigenen Untersuchungen verwendet.

1.8.1. Wheat Germ-Agglutinin

Die Embryonalentwicklung eines jeden Organismus ist begleitet von komplexen Differenzierungsprozessen, Umbildungsprozessen und damit verbundenen Veränderungen der Zelloberflächen bezüglich ihrer Zusammensetzung und den beteiligten Glykokonjugaten.

Die Darstellung verschiedener Strukturen mit einer großen Bandbreite an Lektinen hat diese Form der Histochemie in den letzten Jahren auch bei Untersuchungen an Vögeln zu einem wichtigen Instrument in der spezifischen Markierung und Untersuchung bestimmter Strukturen gemacht. Trotz einer Vielzahl von Literaturquellen zu lektinhistochemischen Untersuchungen ist bisher über die Reaktion verschiedener Lektine am embryonalen Herzen wenig bekannt.

HA und Mitarbeiter (2005) beschrieben eine spezifische Färbung der Zellmembran von Kardiomyozyten von Mäusen mit dem Wheat Germ-Agglutinin (WGA). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen RYOKE und Mitarbeiter (2002) und JOVANOVIC und Mitarbeiter (1999) die mit dem WGA eine Reaktion der Zellmembran bei Kardiomyozyten des Hamsters bzw. des Hundes beschrieben. Darüber hinaus zeigten GRIFFITH und Mitarbeiter (1991) eine Bedeutung des Wheat Germ-Agglutinins schon in den frühen embryonalen Stadien. So beschrieben die Autoren am Modell der Maus den Nachweis einer Reaktion des WGA auf die lateralen Anteile des Primitivstreifens, sowie eine starke Bindung des WGA an mesodermale Zellen. Eine andere Studie wurde an Hühnerembryonen durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass zwischen dem zweiten und dem vierten Bebrütungstag das WGA auch am Vogel ein geeigneter Marker für mikrovaskuläre Strukturen, vornehmlich dem Gefäßendothel ist (JILANI et al., 2003; NICO et al., 1998). JILANI und Mitarbeiter (2003) beschrieben jedoch, dass bei den Älteren Entwicklungsstadien der Hühnerembryonen das Lens Cullinaris-Agglutinin zur Markierung von Gefäßendothelien geeigneter ist. NANKA und Mitarbeiter

(2001) beschrieben neben der Reaktion des Wheat Germ-Agglutinin am Gefäßendothel von Hühnern und Tauben auch eine in Ausdehnung und Intensität variierende Reaktion dieses Lektins am aviärem Muskelgewebe, wobei die Reaktion sich auf das Endomysium und die Basalmembran von Muskelzellen beschränkte.

1.8.2. Peanut-Agglutinin (PNA)

Vorangehende Untersuchungen haben gezeigt, dass das Peanut-Agglutinin (PNA) im embryonalen Hühnerherzen spezifisch bindet. FAZEL und Mitarbeiter (1989) beschrieben eine starke Reaktion dieses Lektins mit dem Endokard der Ventrikel und dem der Vorkammern. Darüber hinaus fanden diese Autoren bei den drei bis sechs Tage bebrüteten Hühnerembryonen eine starke Reaktion am Myokard der Ventrikel, und dokumentierten zudem in allen Stadien der Entwicklung eine fehlende Reaktion in der Matrix des „cardiac jelly“, dem kollagenfaserreichen Klappengerüst, sowie mesenchymalen Zellen. Eine enzymatische Vorbehandlung mit Sialidase (Neuraminidase), einem Enzym, das Neuraminsäureglykoside spaltet, führte bei den älteren Hühnerembryonen zu einer sehr starken und deutlichen Reaktion im Bereich der Taschenklappen von Aorta und Truncus pulmonalis.

HEMMING und Mitarbeiter (1998) beschreiben das Peanut-Agglutinin als Marker für axonales Wachstum im Embryo. Von verschiedenen Autoren (HEMMING et al., 1998; HOEDT-SCHMIDT et al., 1993) wird eine Bindung des PNA an Keratansulphat Proteoglycane beschrieben. Nach HEMMING und Mitarbeitern (1998) ist Keratansulphat, in Abhängigkeit von verschiedenen Stadien innerhalb der embryonalen Entwicklung, Bestandteil spezieller Zellen in Knorpelgewebe, den Gonaden, dem Pankreas und auch im Herzen. Darüber hinaus schlussfolgerten die Autoren eine Aufgabe des Keratansulphat als schützende Struktur der Haut, des Knorpels des Darms und des Herzens.

Die lektinhistochemischen Untersuchungen von JORNS und Mitarbeitern (2003) an verschiedenen Geweben des Vogels zeigten, dass es im Verlauf der embryonalen Entwicklung des Vogels zu Veränderungen in der Expression zellassoziierter Glycoproteine und Glycolipide kommt. Aus dem von ihnen durchgeführten lektinhistochemischen „screening“ mit Lektinen aus den verschiedenen Zuckergruppen, schlussfolgerten sie eine mit dem Säugetier vergleichbare Vielfalt von Bindungsspezifitäten für bestimmte Lektine (JORNS et al., 2003).