



Für die Analyse der zu betrachtenden morphologischen Parameter erfolgte eine Einteilung des vorhandenen Untersuchungsmaterials nach Geschlecht, Alter und Rasse der Tiere. Daraus resultieren folgende Gruppen:

Tab. 10: Gruppeneinteilung

Gruppe	Bezeichnung	Anzahl	Alter	Geschlecht	Rasse
1	JE (P)	10	Jungtier	Eber	Piértrain
2	JS (P)	10	Jungtier	Sau	Piértrain
3	JB (P)	10	Jungtier	Börge	Piértrain
4	JE (H)	10	Jungtier	Eber	Hampshire
5	JS (H)	10	Jungtier	Sau	Hampshire
6	JB (H)	10	Jungtier	Börge	Hampshire
7	AE	10	Alttier	Eber	Piértrain
8	AS	10	Alttier	Sau	Piértrain

Es ergeben sich aus dieser Einteilung insgesamt 60 Jungtiere (JT ges.), 20 Alttiere (AT ges.) sowie jeweils 30 Jungtiere der Rassen Piértrain (P ges.) und Hampshire (H ges.).

### 3.1.2. Probennahme

Die Probennahme erfolgte bis zwei Stunden nach der Tötung aus der linken Ventrikelwand, etwa in der Mitte des oberen Drittels des Margo ventricularis sinister, zwischen den Papillarmuskeln. Aus der rechten Ventrikelwand wurden Proben etwa zwei Zentimeter kranial des Sulcus interventricularis in annähernd gleicher Höhe wie links entnommen.

Die Präparate umfaßten alle Herzmuskelschichten vom Epi- bis zum Endokard und wurden in 4%iger Formalinlösung fixiert. Nach Paraffineinbettung sind mittels eines Mikrotoms 5-7 µm dicke histologische Schnitte angefertigt worden.

Für die Auswertung innerhalb dieser Arbeit wurden Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Präparate der rechten und linken Myokardwand genutzt, um die hier interessierenden myokardialen Gewebestrukturen wie Herzmuskelzellen und Kapillaren zu vermessen.

Die Probenentnahme, Feinpräparation einerseits und die Anfertigung der histologischen Schnitte andererseits erfolgte zur Minimierung des methodischen Fehlers jeweils nur durch eine Person.

### 3.1.3. Mikroskopisch-anatomische Methoden

Die Vermessung der HE-Präparate erfolgte mit einem computergestützten Bildanalyseprogramm, einschließlich dem Bildverarbeitungsprogramm *LUCIA M* Version 2.04 der Firma *Nikon*.

Das von der Videokamera mit einer 40fachen Vergrößerung aufgenommene histologische Bild erscheint mit einer nochmals etwa 4,1fachen Vergrößerung auf dem PC-Monitor und kann nun bearbeitet und vermessen werden. Die Vermessung erfolgte ausschließlich an Herzmuskelquerschnitten, zumeist in der mittleren, myokardialen Herzmuskelschicht. Mittels eines Makro-Programmes innerhalb des Bildanalyseprogrammes wurden folgende Primärdaten ermittelt und zur weiteren Datenaufbereitung in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 5.0 übertragen:

- Myozytenanzahl
- Myozytenquerschnittsflächen
- Kapillaranzahl
- Kapillarquerschnittsflächen
- Distanz zwischen den Kapillaren
- Myozytenkernanzahl und deren Fläche
- Nichtmyozytenkernanzahl und deren Fläche
- Zytoplasmafläche

Durch eine automatische Farbkontrasterkennung wurde am Anfang jeder Messung die Gesamtplasmafläche bestimmt, um so schnittbedingte Artefakte, wie Spalten und Risse, im Mikroskopbildausschnitt zu erfassen.

Danach erfolgte die Bestimmung der Myozytenquerschnittsfläche von mindestens 50 Herzmuskelzellen pro Tier und Herzkammer. Dies geschah durch manuelle Kennzeichnung der Flächen in Kernhöhe (möglichst kreisrunde Zellen mit zentral gelegenen Zellkern) mittels Stiftmaus und Drawing Board.

Für die Berechnung der Myozytenanzahl wurden alle sichtbaren Myozyten auf dem Monitorbild erfaßt.

Die Messung der Zellkerne erfolgte mittels automatischer Kontrastgrenzenerkennung und manueller Differenzierung in Myozyten- und Nichtmyozytenkerne.

Alle erkennbaren Kapillaren wurden nach vorheriger Nachjustierung der Objektschärfe und -helligkeit ebenfalls mit Hilfe des elektronischen Zeichentabletts manuell markiert und anschließend die Anzahl und deren Fläche registriert.

Zwischen den Außenrändern möglichst aller sichtbaren benachbarten Kapillaren wurde am Ende jedes Meßvorganges per Hand die interkapilläre Distanz (ICD) bestimmt.

Pro Tier und Untersuchungsort kamen 5 Monitorbildflächen ( $5 \times 16877,12 \mu\text{m}^2 = 84385,6 \mu\text{m}^2$ ) zur Auswertung.

### 3.1.4. Statistische Methoden

Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramm Excel 5.0 errechnete ich für jedes Tier folgende Daten:

- Myozytenanzahl/  $\text{mm}^2$  (=Myozytenanzahl aus 5 Monitorbildflächen x 1 Mio/  $84385,6 \mu\text{m}^2$ )
- Kapillaranzahl/  $\text{mm}^2$  (analog)
- Myozytenkernanzahl/  $\text{mm}^2$  (analog)
- Nichtmyozytenanzahl/  $\text{mm}^2$  (analog)
- Kapillardurchmesser in  $\mu\text{m}$  (=Wurzel aus  $4 \times$  Kapillarquerschnittsfläche in  $\mu\text{m}^2 / \pi$ )
- Kapillar-Myozyt-Quotient (Division Kapillaranzahl durch Myozytenanzahl)
- Quotient aus Nichtmyozyten- zu Myozytenkernen (analog)
- kapillärer Flächenanteil an der Herzmuskelquerschnittsfläche in % (=gemessener kapillärer Flächenanteil x 100 / gemessener Zytoplasmaanteil + Myozytenkernanteil + Nichtmyozytenkernanteil)

Diese Werte, einschließlich den jeweiligen Querschnittsflächen und der interkapillären Distanz, übertrug ich für jedes Tier und Kammerseite in das Statistikprogramm SPSS für Windows. Mit dem SPSS wurden die statistischen Berechnungen, Tests und Diagramm-Zeichnungen durchgeführt. Dazu ordnete ich die bekannten makroskopisch- und mikroskopisch-anatomischen Daten aus der MEWES-Studie.

Der Aufgabenstellung dieser Arbeit folgend, interessieren nur Gruppenpaare, die Geschlechts-, Alters-, und Rassecharakteristiker beschreiben.

Deshalb wurden für die statistische Auswertung die in Tabelle 10 aufgeführten Tiergruppen entsprechend miteinander kombiniert und folgende Gruppenvergleiche gebildet:

Tab.11: Gruppenpaare

Alter	Rassen	Geschlecht			
		ATges-JTges	Pges - Hges		
AE - JE (P)	JE(P) - JE(H)	AE - AS	JEges-JSges	Jeges-JBges	JSges-JBges
AS - JS (P)	JS(P) - JS(H)		JE(P) - JS(P)	JE(P) - JB(P)	JS(P) - JB(P)
	JB(P) - JB(H)		JE(H) - JS(H)	JE(H) - JB(H)	JS(H) - JB(H)

Der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung jeder Meßwertreihe eines Tieres sind Grundlage für die weiteren statistischen Berechnungen.

Für jede Gruppe (siehe Tabelle 10) und jeden Meßwert sind diese statistische Parameter bestimmt worden:

- $N$  (Anzahl der Tiere pro Gruppe),
- $Min$  und  $Max$  (kleinster und größter arithmetischer Mittelwert in einer Gruppe),
- $Erstes$ ,  $Zweites$  (=Median) und  $Drittes Quartil$ ,
- $\bar{x}$  (Mittelwert),
- $s$  (Standardabweichung).

Um eventuelle Streuungsunterschiede in den Gruppen festzustellen, wurde der Levene-Test zur Prüfung auf Homogenität der Varianzen verwendet.

Die Gruppenauswertung basiert also auf der Verwendung von tierbezogenen arithmetischen Mittelwerten, stellvertretend für alle Meßwerte eines Tieres. Nach dem zentralen Grenzwertsatz kann angenommen werden, daß diese Mittelwerte asymptotisch normalverteilt sind (STROM, 1986; LORENZ, 1996).

Wie Tabelle 11 zeigt, ist es für die Aufgabenstellung dieser Arbeit nicht notwendig, jede Gruppe aus Tabelle 10 simultan miteinander zu vergleichen. Vielmehr interessiert der Unterschied in jedem einzelnen Vergleich. Deshalb wurde der *Independent Samples-t-Test* angewendet. Mit diesem statistischen Prüfverfahren kann man bei unabhängigen Stichproben bei gleichen Varianzen signifikante Merkmalsunterschiede

ermitteln. Damit sollen **qualitative** Aussagen zu den gemessenen anatomischen Merkmalen im einzelnen Gruppenvergleich getroffen werden, um die es insbesondere in dieser Untersuchung geht.

Signifikante Unterschiede werden bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  mit (\*) und bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,01$  mit (\*\*) gekennzeichnet.

Nicht signifikante Unterschiede werden mit n.s. bezeichnet.

Hier sei erwähnt, daß diese Signifikanzaussagen nicht zu verallgemeinern sind, sondern besonders große Unterschiede in der vorliegenden Untersuchung aufzeigen.

Für den Vergleich der Meßdaten der linken und rechten Herzkammern als voneinander abhängige Stichproben wurde der *Paired Sample-t-Test* verwendet. Er vergleicht die Mittelwerte von zwei verbundenen Variablen (gleiche Meßgröße, unterschiedlicher Meßort) innerhalb einer Gruppe.

Um Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern zu untersuchen, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman*  $r_s$  ermittelt, der keine linearen Beziehungen voraussetzt, sondern nur monotone. Eine Bewertung kann mit den Ausdrücken nach SCHLITTGEN (1996) mit schwache ( $r_s < 0,5$ ), mittlere ( $0,5 \leq r_s \leq 0,8$ ) und starke Korrelation ( $r_s > 0,8$ ) erfolgen.

Zur Veranschaulichung der Lage, Streuung und Schiefe der Meßwertreihen kam der Box-Whisker-Plot zur Anwendung, mit dem auch sehr gut Gruppen vergleichend dargestellt werden können.

Ergänzend dazu werden die Mittelwerte und deren Standardabweichungen tabellarisch aufgeführt.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse werden in Form von Scatterplots gezeigt.