

### **3 LITERATUR**

#### **3.1 Embryonalentwicklung des Huhns**

Die Entwicklung des Hühnerembryos vom befruchteten Ei bis zum schlupfreifen Küken vollzieht sich innerhalb von 21 Tagen (BELLAIRS und OSMOND, 1998). Im Hühnerei als abgeschlossenem System sind alle zur Entwicklung des Embryos notwendigen Stoffe wie Wasser, Nährstoffe und Energie enthalten. Aus dem Austausch mit der Umwelt benötigt der Hühnerembryo lediglich Sauerstoff und Wärme (SCHNORR, 1996; BAGGOTT, 2001).

##### Stadien der Embryogenese

KEIBEL und ABRAHAM (1900) teilten die 21-tägige Embryogenese des Huhnes erstmals in Stadien auf. Diese Einteilung wurde von HAMBURGER und HAMILTON (1951) aufgegriffen, sie erarbeiteten anhand von morphologischen Kriterien des Hühnerembryos 46 Normalstadien der Entwicklung. Durch die Zusammenfassung einiger Entwicklungsstufen existieren nach STARCK und RICKLEFS (1998) heute 42 Stadien in der Embryonalentwicklung des Huhnes.

Die Einteilung der Embryogenese in Stadien nach morphologischen Kriterien besitzt gegenüber der Angabe der Inkubationsdauer ( in Tagen ) den Vorteil der besseren Vergleichbarkeit von Embryonen, weil Faktoren wie der Beginn der Bebrütung nach dem Legen, Inkubationsbedingungen und Eigröße ihren Einfluss verlieren (HAMBURGER und HAMILTON, 1951).

Nach STARCK und RICKLEFS (1998) kann die Embryonalentwicklung der Vögel in vier Hauptabschnitte untergliedert werden:

<b>Entwicklungsstadium I</b>	Frühentwicklung von der ersten Furchungsteilung bis zum Erreichen der Körpergrundgestalt ( Stadien 1-22 )
<b>Entwicklungsstadium II</b>	Ausbildung der Organstruktur Erste Gewebedifferenzierungen ( Stadien 23-33 )
<b>Entwicklungsstadium III</b>	zunehmende Differenzierung der Organe bis zum Erreichen der arttypischen Baumerkmale ( Stadien 34-38 )
<b>Entwicklungsstadium IV</b>	Wachstum und Ausreifung ( Stadien 39-42 )

## **3.2 Amnion des Huhns**

Reptilien, Vögel und Säugetiere werden, aufgrund der Ausbildung einer speziellen Hülle, des Amnions, während der Embryonalentwicklung, als Amniota bezeichnet (WIESNER und RIBBECK, 1999).

### **3.2.1 Aufbau des Amnions**

#### **Entwicklung des Amnions**

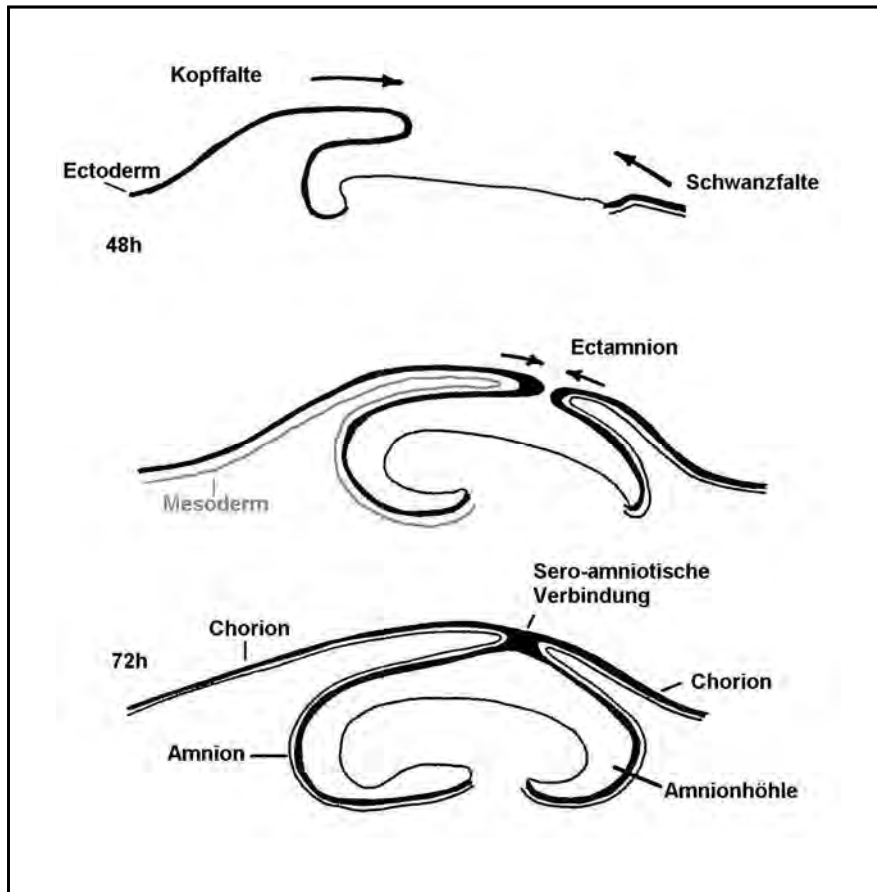
Das Amnion wird zu den extraembryonalen Membranen gezählt, zu denen des Weiteren die Dottersackmembran, das Chorion und die Allantois gehören. Beim Vogel entwickelt sich das Amnion in Form eines Faltamnions (SCHNORR, 1996).

Das Amnion entsteht aus extraembryonaler Somatopleura, die dem Embryo sehr dicht anliegt. Zunächst kommt es apikal vom Kopfbereich des Hühnerembryos zu einer Verdickung des Ektoderms durch Zellproliferation. Diese Zellverdickung wird als Ectamnion oder Grenzfalte bezeichnet. Das Ectamnion wird ungefähr im Stadium 9 (HAMBURGER und HAMILTON, 1951), wenn der Embryo 7 bis 8 Somiten besitzt, sichtbar (FREEMAN und VINCE, 1974; MILLER et al., 1994).

Durch weiteres Wachstum entwickelt sich aus dem Ectamnion die Kopfamnionfalte. Die Kopfamnionfalte erhebt sich nun einerseits durch Wachstum, andererseits durch Absinken des Kopfes in Richtung Dotter über den Embryo (ROMANOFF, 1960). Die Kopffalte erscheint bei einer Bebrütungsdauer von 40 bis 45 Stunden im Stadium 11 der Entwicklung, wenn der Embryo aus ungefähr 13 Somiten besteht (HAMBURGER und HAMILTON, 1951; FREEMAN und VINCE, 1974). Die Kopfamnionfalte wächst sukzessive nach kaudal und bedeckt dabei zunehmend Kopf und Körper des Hühnerembryos. Im Stadium 12 ( 16 Somiten, 45-49 h Inkubation ) umschließt sie den Bereich des Vorderhirns.

Im Stadium 14 ( 22 Somiten, 50-53 h Inkubation ) erstreckt sie sich, gemeinsam mit den lateralen Amnionfalten, bis in den Bereich des siebten bis zehnten Somiten (HAMBURGER und HAMILTON, 1951). Dabei besteht dieses Proamnion, gebildet von der kranialen und den lateralen Amnionfalten, ausschließlich aus Ektoderm (ROMANOFF, 1960; SCHNORR, 1996).

Im Stadium 12 ( 16 Somiten, 45 h – 49 h Inkubation ) beginnt sich aus dem Ectamnion kaudal des Schwanzbereiches des Embryos die Schwanzamnionfalte zu erheben (FREEMAN und VINCE, 1974). Die Schwanzamnionfalte beginnt ein langsames Wachstum nach kranial ( Abbildung 1 ).



**Abbildung 1:** Entstehung von Amnion und Chorion (FREEMAN und VINCE, 1974)

Die Verschmelzung der Kopffalte mit den lateralen Amnionfalten erfolgt im Stadium 15-16 (27 Somiten, 50 h – 56 h Inkubation). Bei der Fusion in der Medianen über dem Körper des Embryos verbinden sich die ektodermalen Verdickungen an den Rändern der Amnionfalten.

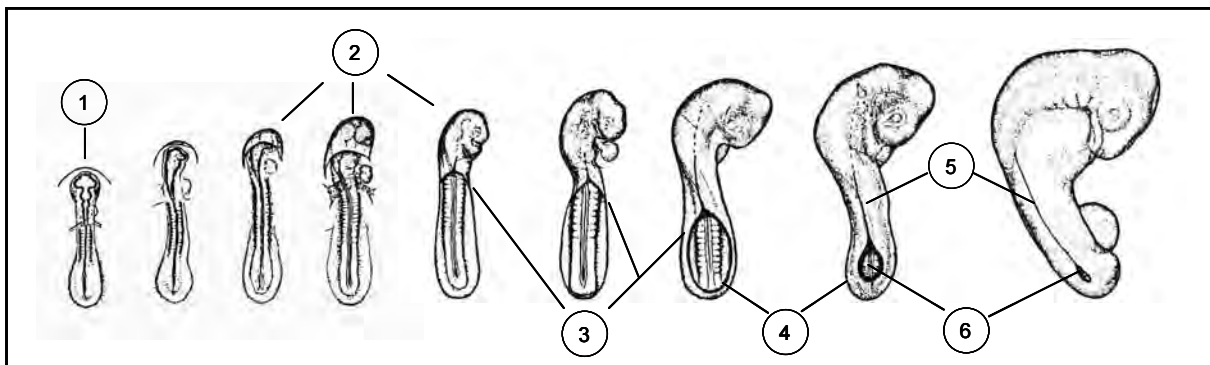
Es entsteht die sero-amniotische Verbindung (ROMANOFF, 1960; OVERTON, 1989).

Nach Vereinigung der Kopffalte mit den beidseitigen lateralen Amnionfalten kommt es zur Einwanderung von avaskulärem Mesoderm in die bis dato rein ektodermale Kopffalte (ROMANOFF, 1960). Die Kopffalte besteht zu diesem Zeitpunkt aus vier Schichten: einer inneren und einer äußeren Schicht Ektoderm und zwei mittleren mesodermalen Schichten. Ektoderm wird schließlich die innere und Mesoderm die äußere Schicht des Amnions bilden. Im Chorion dagegen wird Mesoderm die innere und Ektoderm die äußere Schicht darstellen.

Durch die Fusion werden die inneren und äußeren Schichten, respektive Amnion und Chorion, von einander getrennt (OVERTON, 1989). Zwischen beiden entwickelt sich das extraembryonale Coelom.

Im Stadium 18 ( 65-69 h Inkubation ) ist der Hühnerembryo fast vollständig vom Amnion umgeben. In der lumbalen Region zeigt sich noch ein kleines ovales Loch, der Amnionnabel ( Abbildung 2 ). Der Amnionnabel ist von verdicktem Ektoderm umgeben. Durch zentripetales Wachstum der Amnionfalten kommt es schnell zum Schluss des Amnionnabels (HAMBURGER und HAMILTON, 1951; ROMANOFF, 1960; BELLAIRS und OSMOND, 1998).

Der beschriebene Ablauf ist in der folgenden Abbildung dargestellt:



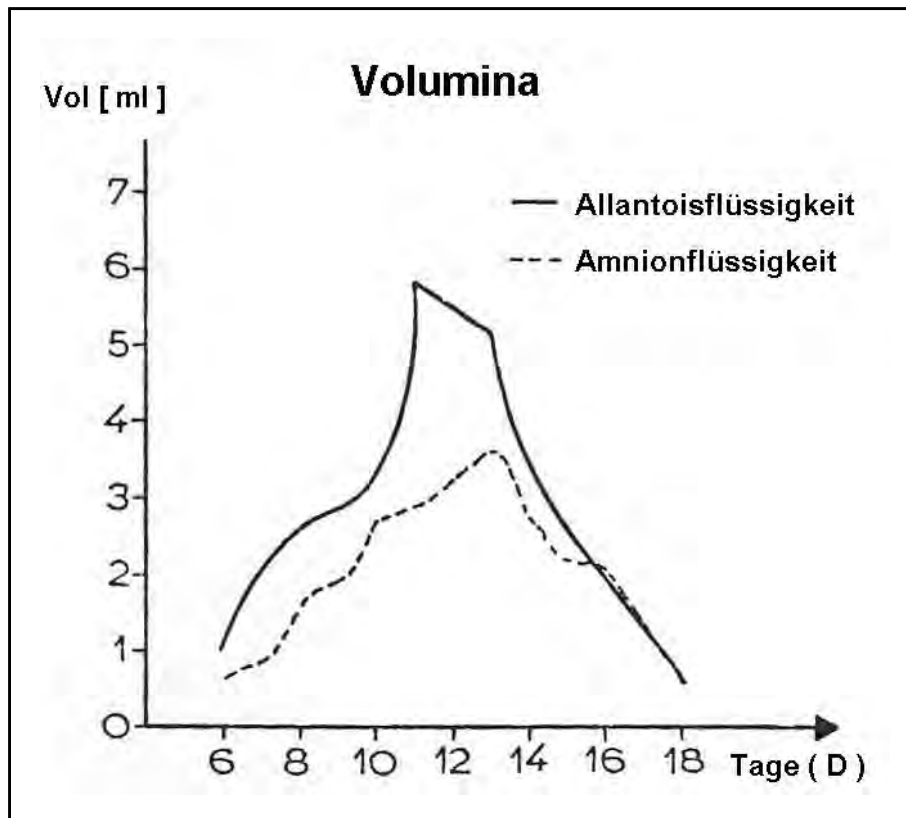
**Abbildung 2:** Bildung der Amnionhöhle: 1.) Ectamnion / Grenzfalte 2.) Kopffalte 3.) laterale Amnionfalten 4.) Schwanzfalte 5.) sero-amniotische Verbindung 6.) Amnionnabel (ROMANOFF, 1960)

Spätestens am 3. Inkubationstag ( Stadium 20 ) ist der Embryo komplett vom Amnion eingeschlossen (FREEMAN und VINCE, 1974). Nach Schluss des Amnions wächst dieses im Ganzen weiter, was anhand seiner Gewichtszunahme nachweisbar ist. Dieses Wachstum ist zwischen dem 9. und 14. Inkubationstag besonders ausgeprägt (ROMANOFF, 1960).

**Weitere Vorgänge am Amnion während der Embryonalentwicklung**

Das Ektoderm der sero-amniotischen Verbindung bzw. Membran beginnt sofort nach der Verschmelzung zu degenieren und wird langsam durch Einwanderung von Mesoderm ersetzt. Am 6. Inkubationstag ist die ektodermale Naht bereits diskontinuierlich und bis zum 9./10. Bebrütungstag hat sich ein mesodermaler Ersatz, die sekundäre, mesodermale sero-amniotische Verbindung, ausgebildet. Diese sekundäre Membran ist von Anfang an breiter als die ursprünglich ektodermale und wird bis zum 11. Tag der Inkubation in eine sehr breite sero-amniotische Platte transformiert. Bereits an Tag 11 entstehen erste Perforationen in der sero-amniotischen Platte. Dadurch kommuniziert die Amnionhöhle mit dem Eiweiß und dieses vermischt sich mit der Amnionflüssigkeit. Die eigentliche Ruptur der sero-amniotischen Platte erfolgt dann an Tag 12 der Bebrütung (ROMANOFF, 1960; BAGGOTT, 2001).

Ab dem 12. Inkubationstag fängt der Hühnerembryo an, Amnionflüssigkeit, vermischt mit Eiweiß, über die Mundspalte aufzunehmen und abzuschlucken (BAINTNER und FEHER, 1974). Die Menge an Amnionflüssigkeit, die der Embryo aufnimmt, steigert sich mit zunehmender Entwicklung. Das Flüssigkeitsvolumen im Amnion erreicht an Tag 13 bis 14 der Inkubation ein Maximum von 3,0 ml - 3,5 ml (Abbildung 3). Ab diesem Zeitraum nimmt das Volumen der Amnionflüssigkeit stark ab, unter anderem wegen der Ingestion durch den Hühnerembryo (ABRAMOVICI, 1966). Am 18. Bebrütungstag sind weniger als 0,5 ml Amnionflüssigkeit nachweisbar. Der Platz in der Amnionhöhle wird zudem durch den stark wachsenden Embryo in Anspruch genommen.



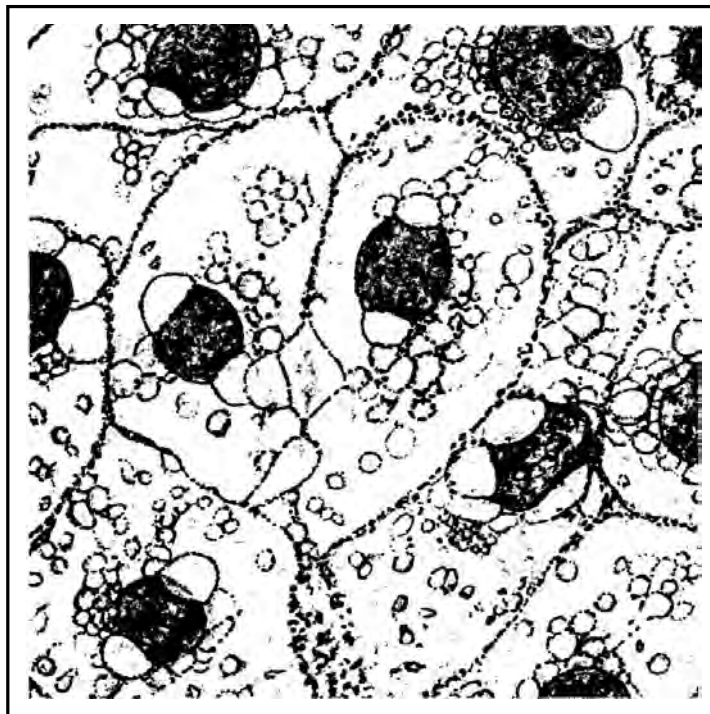
**Abbildung 3:** Volumina von Amnion- und Allantoisflüssigkeit (ABRAMOVICI, 1966)

Die Allantois und das Chorion fusionieren an Tag 5 bis 6 der Inkubation unter Verdrängung des extraembryonalen Coeloms zur Chorioallantoismembran (CAM) (FREEMAN und VINCE, 1974). Ab dem 7. bis 8. Inkubationstag beginnt die langsame, zunächst punktuelle Verschmelzung der CAM mit dem Amnion. Dadurch sprießen von den bereits fusionierten Randbereichen Blutgefäße ins Amnion ein. Ab Tag 14 ist das Amnion so eng mit der CAM verschmolzen, dass eine Trennung unmöglich ist (ROMANOFF, 1960; TEN BUSCH et al., 1997a). Kurz vor dem Schlupf (19. bis 20. Inkubationstag) enthält die mit dem Amnion verschmolzene Chorioallantoismembran nur noch wenig Blut und legt sich klebrig dem Embryo an (HAMBURGER und HAMILTON, 1951).

### Histomorphologischer Aufbau des Amnions

Das Amnion besteht, wie bereits angeführt, aus einer inneren ektodermalen und einer äußeren mesodermalen Schicht.

Das Ektoderm des Amnions hat vor dem Schluss des Amnionnabels ( vor Stadium 18 ) eine eher syncytiale Struktur ohne erkennbare Zellgrenzen (ROMANOFF, 1960). Nach Verschließen des Amnionnabels am 3. Inkubationstag differenziert sich das syncytiale Ektoderm sehr schnell zu einem Epithel mit deutlichen Zellgrenzen. Beim Amnionepithel handelt es sich um ein einschichtiges Plattenepithel ( Abbildung 4 ) ( Epithelium simplex squamosum ) (BOWERS und DAHM, 1992; LIEBICH, 1999).



**Abbildung 4:** Einschichtiges Plattenepithel des Amnions  
(BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953).

Das Epithel besteht aus einer Schicht flacher, verschieden großer Zellen ( durchschnittlich 20  $\mu\text{m}$  Durchmesser ), deren Zellgrenzen häufig wellig verlaufen. Die Epithelzellen weisen einen großen, runden bis ovalen, abgeplatteten Zellkern auf. Er ist chromatinarm und meist exzentrisch zum Rand der Zelle hin gelegen. Im Zellkern ist für gewöhnlich eine Gruppe von 2 bis 5 kleineren, größenvariablen Nucleoli enthalten.



Das Cytoplasma kann homogen oder fein retikuliert erscheinen. Die filamentartigen Mitochondrien sind um den Zellkern herum konzentriert (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953; ROMANOFF, 1960).

Ein typisches Merkmal der Amnionepithelzellen ist ihre starke Vakuolisierung. Die Zellkerne sind, vor allem in frühen Inkubationsstadien, häufig von Vakuolen deformiert, deren Größe die des Kerns teilweise sogar übertrifft. Neben den kernnahen, flüssigkeitsgefüllten Vakuolen treten in großer Anzahl cytoplasmatische Granula bzw. Vakuolen auf, die Lipide enthalten. Die kernnahen Vakuolen vermehren und vergrößern sich stark, so dass in späteren Entwicklungsstadien ( 8. bis 10. Inkubationstag ) die Zellkerne halbmondförmig deformiert werden (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953).

Bis zum 17. Inkubationstag nehmen die Amnionepithelzellen langsam an Höhe zu. Sie haben dann eher die Form eines zylindrischen Epithels (ROMANOFF, 1960).

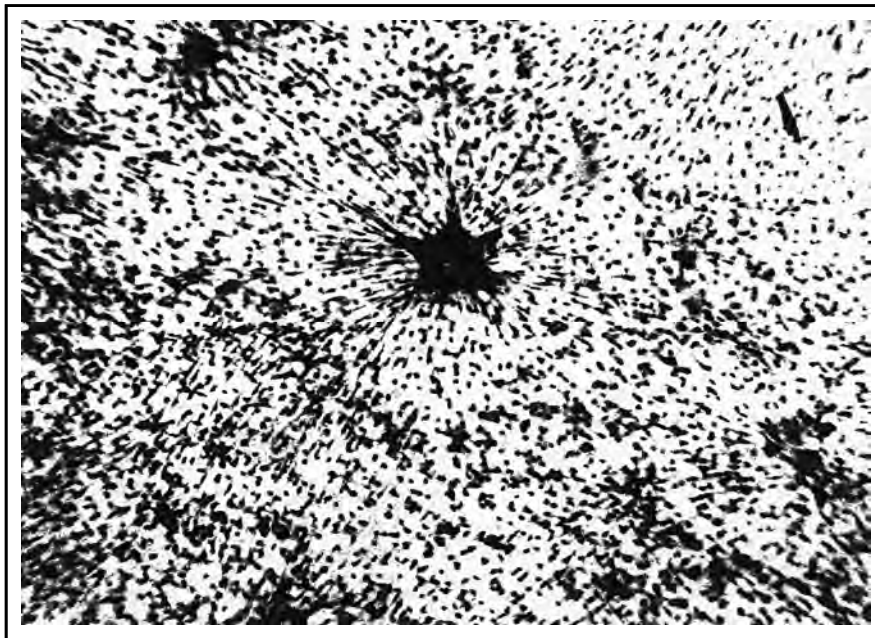
Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Amnionepithels nach BAUTZMANN und SCHMIDT (1960) zeigt, dass die Epithelzellen einer stark ausgeprägten Basalmembran aufsitzen, die am Übergang zu den Epithelzellen den amorph-homogenen Charakter einer Lamina densa aufweist. Die Basis der Amnionepithelzellen erscheint glatt und frei von Cytoplasmadifferenzierungen. Die Zellkontakte der Epithelzellen miteinander sind äußerst komplex aufgebaut: das Cytoplasma benachbarter Zellen scheint abgeflacht und tief in oder unter das Cytoplasma der Nachbarzelle geschoben zu sein. Dies ergibt als Bild ein Labyrinth von Zellgrenzen, das als dachziegelartiges Übereinanderliegen der Zellen interpretiert wird. Die Zellmembranen von Nachbarzellen sind stellenweise zu Desmosomen verdichtet.

Im homogenen Cytoplasma der Amnionepithelzellen können mittels Elektronenmikroskop zahlreiche Lipideinschlüsse, Paladesche Granula und viele flüssigkeitsgefüllte Vakuolen nachgewiesen werden. Die Vakuolen haben Durchmesser zwischen 200 µm und 500 µm. Im Cytoplasma der Epithelzellen lassen sich verstreut Mitochondrien sowohl vom tubulären als auch vom lamellären Typ nachweisen. Weiterhin ist das Cytoplasma von fibrillären Elementen, die bis in die Peripherie der Zelle reichen, durchzogen. Die Zelloberfläche ist verschieden dicht mit Mikrovilli besetzt (BAUTZMANN und SCHMIDT, 1960).

Die äußere Schicht des Amnions, dem extraembryonalen Coelom anliegend, wird durch avaskuläres Mesoderm gebildet. Bis zum 3. Inkubationstag ist das Mesoderm in Form eines Syncytiums mit vielen kleinen, ovalen Kernen organisiert (ROMANOFF, 1960). Ab dem 4. Inkubationstag entwickelt sich ein Netzwerk von spindelförmigen Zellen. Im Bereich um den Nabel ordnen sich die mesenchymalen Zellen radiär entlang langer Achsen an. Histologisch lässt sich in dieser Entwicklungsphase starke mitotische Aktivität der Zellen nachweisen.

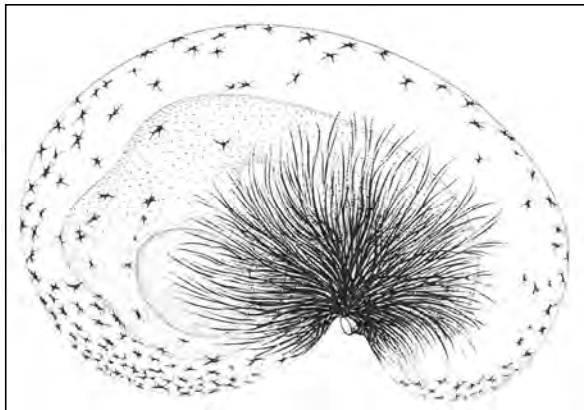
Mit Beginn des 5. Bebrütungstages formen sich die spindelartigen Mesenchymzellen zu typischen glattmuskulären Elementen, die Myofibrillen enthalten, um.

Ihr Cytoplasma wird dunkler, der Zelleib streckt sich, die ovalen Zellkerne schrumpfen und der Nucleolus nimmt an Größe zu. Die glatten Muskelzellen sind zunächst noch parallel angeordnet, aber sehr schnell setzt die Ausbildung der für das Amnion typischen Muskelzellformationen ein. Diese bestehen aus Kreuz- oder Sternanordnungen der Myocyten. Die Organisation der Muskelzellen beginnt am vorderen Pol des Amnions und betrifft vor allem die dorsale Hälfte der nach oben gelegenen Oberfläche (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953).

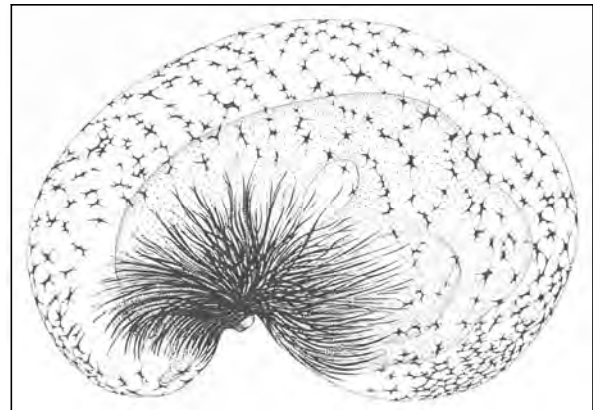


**Abbildung 5:** Muskelstern nach 4,5 Tagen Bebrütungsdauer mit zentral gelegenem Polzentrum (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953)

Aus spindelförmigen Myocyten entwickeln sich vereinzelt sogenannte „Ursternzellen“, deren Cytoplasmaausläufer ihnen ein sternartiges Aussehen verleihen. Sie besitzen bis zu zehn Zellkerne. In ihrem Umfeld ist oft bereits eine zweischichtige, glatte Muskulatur vorhanden. Die benachbarten Myocyten ordnen sich, von den „Ursternzellen“ ausgehend, sternförmig (radiärstrahlig) an. In relativ gleichmäßigen Abständen zu diesen großen Muskelsternen (Abbildung 5) bilden sich bis zum 9. Inkubationstag neue Muskelsternformationen aus. Die Muskelsterne nehmen bis zum 10. Bebrütungstag an Größe zu, aber ihre Anzahl nimmt ab. Aus dem partiellen Zusammenschluss von Muskelsternformationen resultieren die größeren zweidimensionalen Balkenwerke des Muskelamnions. Die Balkenwerke sind als Überkreuzungsfiguren großer Muskelsterne mit betonter Längsachse zu verstehen. Sie entwickeln sich als Knotenpunkte in stark belasteten Spannungsfeldern des Amnions.



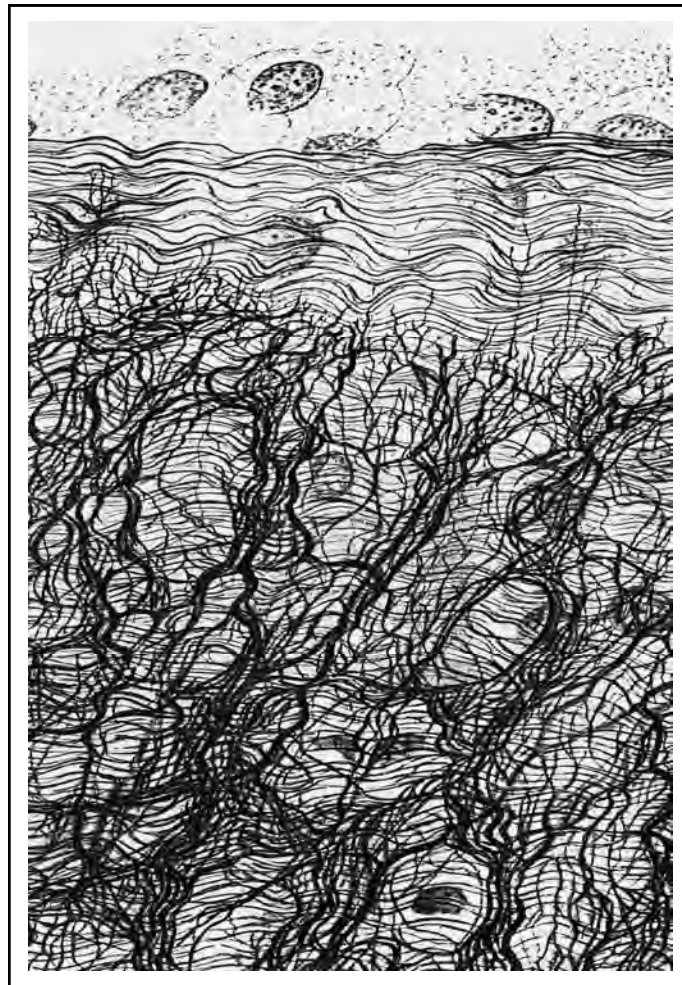
**Abbildung 6:** Verteilung der Muskelsterne auf der dem Dotter zugewandten Seite (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953)



**Abbildung 7:** Verteilung der Muskelsterne von der Schale her betrachtet (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953)

Um den Nabel organisieren sich die Myocyten vom Sphincter ausgehend als lange, radiärstrahlig angeordnete Muskelzüge, die auch als Strahlenkranz (Abbildung 6 und 7) bezeichnet werden. Die muskulären Züge zum vorderen Pol des Amnions sind besonders kräftig ausgebildet (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953; ENGELHARDT und LENDLE, 1955). Am 12. Inkubationstag besteht das mesodermale Blatt des Amnions aus drei Schichten glatter Muskelzellen (ROMANOFF, 1960).

Die bindegewebigen Anteile des Amnions liegen in den frühen Bebrütungsstadien um Tag 3 in Form eines feinen Netzwerkes aus Gitterfasern vor. Die Fasern treten gehäuft und besonders dicht in Bereichen des Amnions mit hoher Kerndichte auf. Durch vielfache Verzweigungen sind die Bindegewebsfasern trotz ihrer unterschiedlichen Durchmesser fortlaufend miteinander verbunden.



**Abbildung 8:** Querschnitt des Amnions  
(BAUTZMANN und SCHRÖDER,  
1953)

Vor allem die Zentren der Muskelsterne werden von den Fasern durch ihre reifenartige Anordnung unterstützt. Zum einen verleihen die Bindegewebsfasern dem Amnion Dichte und Festigkeit, zum anderen ermöglichen sie durch ihren welligen Verlauf (Abbildung 8) eine Dehnung bei Kontraktionen der Amnionmuskulatur. Ab dem 13. Inkubationstag treten stärkere Längsfasern deutlicher hervor (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953; ROMANOFF, 1960).

Das Amnion ist frei von Nerven und Blutgefäßen (BAUTZMANN und SCHMIDT, 1960). Deshalb können die spontanen Kontraktionen der glatten Amnionmuskulatur nur mittels Rezeptor über Transmitter und Hormone moduliert werden (BOWERS, 1989). Blutgefäße fehlen aufgrund der Einsprossung von avaskulärem Mesoderm in das Amnion während seiner Entwicklung. Das hämangioblastische Potential des Mesoderms muss während der Entwicklung durch Kontakt mit Endoderm aktiviert werden, dies ist beim avaskulären Mesoderm des Amnions unterblieben (BELLAIRS und OSMOND, 1998).

### **3.2.2 Amnionkontraktionen**

Die glatte Muskulatur des Amnions ist nicht innerviert. Die Amnionkontraktionen sind somit autonom und werden von myogenen Schrittmacherzellen generiert (PIERCE, 1933; ENGELHARDT und LENDLE, 1955; ROMANOFF, 1960).

Erste, unregelmäßige Kontraktionen der glatten Muskulatur des Amnions sind ab Stadium 18, dem 3. Inkubationstag, in der Entwicklung des Hühnerembryos nachweisbar (HAMBURGER und HAMILTON, 1951). Diese frühen Kontraktionen an Tag 3 bis 4 treten ungefähr mit einer Frequenz von 2,4 pro 5 Minuten auf. Die Frequenz der Amnionkontraktionen steigert sich bis zum 9. Bebrütungstag schnell und stark. An Tag 9 erreichen die Kontraktionen der Muskelschicht mit 73 pro 5 Minuten ihre maximale Aktivität. Danach nimmt diese bis Tag 13 der Inkubation massiv ab ( 22,7 Kontraktionen / 5 Min ). Von Tag 13 bis 15 stellt sich eine Plateauphase der kontraktilen Aktivität ein ( 20 / 5 Min ). Bis zum 18. Bebrütungstag nimmt die Anzahl an Amnionkontraktionen weiter stark ab. Nach Tag 18 sind keine Amnionkontraktionen mehr nachweisbar (FREEMAN und VINCE, 1974; NECHAEVA und TURPAEV, 1992; WU et al., 2001; NECHAEVA und TURPAEV, 2002). Zwischen den Amnionkontraktionen und den aktiven Körperbewegungen des Embryos besteht ein antagonistisches Verhältnis.

Die Kontraktilität des Amnions ist in den frühen Entwicklungsstadien ( bis Tag 9 der Inkubation ) höher. Sie nimmt mit zunehmender muskulärer Aktivität des Embryos ab (WU et al., 2001).

Der Großteil der Amnionkontraktionen beginnt am frontalen Pol des Amnions. Vor dem Kopfscheitel des Hühnerembryos wird das Amnion durch die Muskelsterne zusammengerafft. Durch die Verengung der Amnionhöhle wird der Embryo mit der Amnionflüssigkeit nach kaudal verschoben.

Der Schwanzteil der Fruchthülle erweitert sich kurzzeitig blasenartig, bevor der Embryo wieder in den Kopfteil des Amnions zurückgeflutet wird. Die Kontraktion läuft innerhalb von 1 Sekunde in Form einer rhythmischen Welle vom Kopf- zum Schwanzteil (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953). Sehr viel seltener sind Kontraktionen zu beobachten, die ihren Ursprung am kaudalen Pol des Amnions haben. Die Amnionmuskulatur ist nach einer Kontraktion zunächst refraktär.

Die Amnionmotilität weist zudem aktive und inaktive Phasen auf. Aktive Phasen dauern durchschnittlich 3 bis 5 Minuten, inaktive Phasen sind variabel lang. Am 9. Inkubationstag, dem Tag der maximalen kontraktiven Aktivität des Amnions, zeigen sich rhythmische Wellenkontraktionen, die von ca. 4 - minütigen Pausen unterbrochen werden (WU et al., 2001).

Amnionkontraktionen können durch äußere Reize ausgelöst werden. So kann durch mechanische Reizung, z.B. mit einer Nadel, das Amnion zur Kontraktion angeregt werden (ROMANOFF, 1960). Eine Erhöhung der Lichtintensität bewirkt durchschnittlich eine Steigerung der Kontraktionsfrequenz um 40 %. Die Empfänglichkeit der Muskelzellen auf äußere Reizung ist jedoch in Phasen hoher Eigenaktivität, wie am 9. Inkubationstag, gering. Es kann dann nur ein geringer Frequenzanstieg herbeigeführt werden (WU et al., 2001; MÜLLER, 2003). Als äußerer Reiz beeinflusst auch die Temperatur die Kontraktilität des Amnions. *In vitro* wurde ein Temperaturoptimum von 38,5°C - 39°C für die Ausprägung der Amnionkontraktionen festgestellt (ENGELHARDT und LENDLE, 1955). Ein Absenken der Temperatur bewirkt eine Frequenzabnahme der Kontraktionen, wobei nach Unterschreiten von 30°C die Aktivität zum Erliegen kommt. Dieser Vorgang ist reversibel, bei Rückkehr zur normalen Temperatur laufen die Amnionkontraktionen wie gewohnt ab (NECHAEVA et al., 2004).

Die rhythmische Aktivität des Hühneramnions ist weiterhin sensibel gegenüber Hypoxie, Hyperkapnie und Hyperoxie (NECHAEVA und TURPAEV, 2002; NECHAEVA et al., 2004; NECHAEVA, in press). Hypoxie und Hyperkapnie wirken hemmend auf die Kontraktilität des Amnions. Eine Hyperoxie wirkt hingegen frequenzsteigernd.

Durch Transmitter kann die nicht innervierte Amnionmuskulatur in ihrer Kontraktionsaktivität moduliert werden ( Tabelle 1 ). Daher wird die Muskulatur des Hühneramnions als Modell für die Wirkung verschiedener Transmitter und Pharmaka auf nicht-innervierte, glatte Muskelzellen verwendet.

**Tabelle 1:** Die Wirkung verschiedener Substanzen auf die spontane Kontraktilität der Amnionmuskulatur

<b>Verwendete Substanz</b>	<b>Wirkung: Stimulation ( + ) oder Depression ( - )</b>	<b>Literatur</b>
Histamin	+	ENGELHARDT und LENDLE (1955)
Acetylcholin	++	ELZE et al. (1975)
Adrenalin	-	ELZE et al. (1975)
Serotonin	+	ELZE et al. (1975) TURPAEV und NECHAEVA (1994)
Papaverin	---	ELZE et al. (1975), ROMANOFF (1960)
Substanz P	in vivo: keine in vitro, ohne Basal- membran: +	BOWERS und DAHM (1992)
Muscarin	++	ROMANOFF (1960)
Ergotamintatrat	++	ROMANOFF (1960)
Strophantin	++	ROMANOFF (1960)
Physostigmin	+	ROMANOFF (1960)
Pilocarpin	+	ROMANOFF (1960)
Hypophysin	+	ROMANOFF (1960)
Cholin	+	ROMANOFF (1960)
Koffein	+/-	ROMANOFF (1960)
Pentamethylentetrazol	-	ROMANOFF (1960)
Dilaudin	-	ROMANOFF (1960)
Noradrenalin	-	TURPAEV und NECHAEVA (1994)
Opiumtinktur	--	ROMANOFF (1960)

Normalerweise exprimiert die Amnionmuskulatur mindestens 11 verschiedene Typen an funktionellen Rezeptoren für mindestens 8 verschiedene Neurotransmitter (BOWERS, 1989; BOWERS und DAHM, 1992). Die Myocyten des Amnions verfügen unter anderem über Rezeptoren für Acetylcholin, Noradrenalin, Histamin, 5-Hydroxytryptamin, Somatostatin-28, Neurotensin, Urotensin II und das „vasoaktive intestinal peptide“. Histamin, 5-Hydroxytryptamin und Noradrenalin wirken jeweils über zwei verschiedene, antagonistische Rezeptoren auf die glatte Muskulatur des Amnions ein. Weiterhin reagieren die Myocyten auf Prostaglandin E2 (BOWERS, 1989). Im Gegensatz zu innervierten, glatten Muskelzellen scheinen den Muskelzellen des Amnions die transmitter-aktivierten Enzyme ( MAO, COMT ) zur Aufnahme von Noradrenalin zu fehlen. Die Aufnahme von Noradrenalin in die Myocyten scheint rein über Diffusion zu erfolgen (BURNSTOCK et al., 1971).

### **3.2.3 Funktionen des Amnions**

Das Amnion ist die membranöse Begrenzung der Amnionhöhle, in der sich der Embryo, in Amnionflüssigkeit schwimmend, entwickelt (ROMANOFF, 1960).

Es hat während der Entwicklung des Hühnerembryos eine Vielzahl verschiedener Funktionen zu erfüllen.

#### **Funktionen von Amnionepithel und -flüssigkeit**

##### **Schutz**

Relativ offensichtlich ist die Schutzfunktion des Amnions für den Embryo. Die Amnionflüssigkeit unterstützt den Embryo, indem sie durch den Auftrieb das Gewicht verringert, das auf den sich entwickelnden embryonalen Geweben lastet. Die fragilen Innenstrukturen und die dreidimensionale Gestalt des Keimes können sich dadurch praktisch frei von Masse entwickeln (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953). Die Amnionflüssigkeit hält das Amniongewebe auf Distanz zum Embryo und verhindert so Verwachsungen (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953; ROMANOFF, 1960). Durch den ständigen Kontakt der embryonalen Oberfläche mit der Amnionflüssigkeit wird die Hydratation der Gewebe erhalten.



Selbst bei stärkeren Wasserverlusten über die Eischale wird so eine Dehydratation der embryonalen Gewebe verhindert (DAVIS et al., 1988; AR, 1990). Weiterhin mindert die Trägheit der Flüssigkeit die Einwirkung von mechanischen Stößen und Erschütterungen auf den Embryo. Die Amnionflüssigkeit gleicht mechanische Einwirkungen durch Wellenbewegungen aus und reduziert so das Verletzungsrisiko für den Hühnerembryo. Die Stabilität des membranösen Amnions gegen mechanische Einflüsse steigt bis Tag 17 der Inkubation kontinuierlich an, so kann der dorsale Teil des Amnions an Tag 9 einem Gewicht von 60 g widerstehen (ROMANOFF, 1960).

Als Isolationsschicht schützt die Amnionflüssigkeit den Keim auch gegen plötzlich auftretende Temperaturschwankung (ROMANOFF, 1960).

Als abgegrenzter Raum schafft die Amnionhöhle konstante Umweltbedingungen, u.a. einen konstanten pH-Wert, für die ungestörte Entwicklung des Hühnerembryos (BOUTILIER et al., 1977). Auch starke antibakterielle Eigenschaften werden ihm zugesprochen (ROMANOFF, 1967).

### **Stoffwechsel**

Die Funktion des Amnions als wichtiger embryologischer Stoffwechselapparat wurde bereits früh erkannt (BAUTZMANN und SCHMIDT, 1960). So übernimmt das Amnion ab dem 3. Inkubationstag, nach dem Schluss der Amnionfalten, von der subembryonalen ( subgerminalen ) Flüssigkeit die Aufgabe des extraembryonalen Wasserkompartiments (SIMKISS, 1980; BAGGOTT, 2001). Die Amnionflüssigkeit ist ein wichtiger Flüssigkeitsspeicher für den Embryo, welcher zudem weitgehend unabhängig vom Hydratationszustand des Eies ist.

Nach Perforation der sero-amniotischen Membran am 11. Inkubationstag kommt es zum Einstrom von Eiweiß in die Amnionhöhle und zur Vermischung mit der Amnionflüssigkeit. Die Amnionhöhle wird ab diesem Zeitpunkt als Kanal für die Utilisation des Eiweißes bezeichnet. Ab dem 12. Inkubationstag beginnt der Embryo Amnionflüssigkeit abzuschlucken und zu verdauen. Mit fortschreitender Bebrütung gewinnt diese Form der embryonalen Ernährung, die Ingestion, an Bedeutung (ROMANOFF, 1960; FREEMAN und VINCE, 1974; JOCHEMSEN und JEURISSEN, 2002).

## **Barrierefunktion**

Im Hühnerei existieren verschiedene, voneinander abgegrenzte Flüssigkeitskompartimente. Auf der einen Seite sind die extraembryonalen Kompartimente (subembryonale Flüssigkeit, Amnionflüssigkeit und Allantoisflüssigkeit) und auf der anderen Seite das Blut als embryonales Kompartiment zu betrachten. Die subembryonale Flüssigkeit spielt als Flüssigkeitsspeicher für den Hühnerembryo nur bis Tag 6 eine Rolle (BAGGOTT, 2001) und soll daher für diese Studie außer Acht gelassen werden.

Zwischen der Amnion-, der Allantoisflüssigkeit und dem Blut bestehen drei Barrieren: die Blut/Amnion-Barriere, die Blut/Allantois-Barriere und die Allantois/Amnion-Barriere (ABRAMOVICI, 1966; EPPLE et al., 1992; GILL et al., 1994; EPPLE et al., 1997; TOMASCHEK, 1997; TEN BUSCH et al., 1997a; TEN BUSCH et al., 1997b; PIECHOTTA et al., 1998; HOHLWEG et al., 1999; SCHMIDEK et al., 2001).

Das Vorhandensein dieser Barrieren ist durch die unterschiedliche substantielle Zusammensetzung von Plasma, Amnion- und Allantoisflüssigkeit bewiesen worden. FABER et al. (1973) zeigten, dass der Chloridgehalt in der Amnionflüssigkeit signifikant über dem des Blutplasmas liegt. Zudem scheint Chlorid aktiv vom Blutkreislauf des Hühnerembryos in die Amnionflüssigkeit transportiert zu werden.

EPPLE et al. (1992) berichten über unterschiedliche Konzentrationen der Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin in den drei Kompartimenten. In ihren Untersuchungen lagen die Konzentrationen der drei Katecholamine in der Amnionflüssigkeit deutlich unter den Plasmakonzentrationen. Diese Konzentrationsunterschiede konnten zwischen Allantoisflüssigkeit und Blutplasma ebenfalls von TÖNHARDT et al. (1995) und TOMASCHEK (1997) aufgezeigt werden. GILL et al. (1994) bestätigen diese Unterschiede zwischen Plasma und Amnionflüssigkeit und zeigen, dass die Katecholamingehalte in der Amnionflüssigkeit unter denen der Allantoisflüssigkeit liegen. Sie wiesen dadurch die sehr effektive amniotische Barriere für freie Katecholamine nach. Sie drückt sich durch niedrige intraamniotische Konzentrationen an Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin aus. Ihre Studie bewies ferner eine fast absolute amniotische Barriere für sulfatierte Katecholamine.

So war die Amnionflüssigkeit im Gegensatz zu Allantoisflüssigkeit und Plasma frei von sulfatierten Katecholaminen. Weiterführende Untersuchungen von EPPLE et al. (1997) ergaben neben der Hyporegulation in Bezug auf Katecholamine auch eine Hyporegulation auf Aminometabolite, verglichen mit Plasma und Allantoisflüssigkeit. Amnion- und Allantoisflüssigkeit erwiesen sich als streng regulierte Depots für Metaboliten und Hormone. Das Amnion stellt dabei das am stärksten hyporegulierte Kompartiment dar. Aufgrund der fehlenden Innervation stellten EPPLE et al. (1997) die These einer rein endokrinen Regulation der Barrieren von Amnion und Allantois auf.

TEN BUSCH et al. (1997a) beschreiben das Amnion auch als ein stark abgeschirmtes, da hyporeguliertes Kompartiment. Nach ihren Untersuchungen hält die Blut/Amnion-Barriere 5 Aminometaboliten zurück, die zwar im Plasma anwesend sind, jedoch nicht in der Amnionflüssigkeit (GABA, Homocarnosin, Carnosin, Hydroxylysin 1, Anserin). Die Blut/Amnion-Schranke bewirkt auch signifikant niedrigere Konzentrationen von weiteren Aminosäuren und von Glucose in der Amnionflüssigkeit. Dagegen ist die Konzentration an Phosphoserin und 1-Methylhistidin in der Amnionflüssigkeit deutlich höher als im Blut. Strukturell setzt sich die Blut/Amnion-Barriere aus dem Kapillarendothel, seiner Basallamina und dem Amnionepithel mit seiner Basalmembran zusammen. Die Allantois/Amnion-Barriere schließt die selben 5 Substanzen wie die Blut/Amnion-Barriere aus der Amnionflüssigkeit aus. Sie hält zudem die Konzentration 4 weiterer Metaboliten, unter ihnen Glucose, niedriger als in der Allantoisflüssigkeit. Ein Metabolit, der ausschließlich in der Amnionflüssigkeit vorliegt und von der Allantois/Amnion-Schranke zurückgehalten wird, ist oxidiertes Glutathion. Nach TEN BUSCH et al. (1997b) ist die Amnionflüssigkeit dem Plasma und der Allantoisflüssigkeit gegenüber sowohl hyporeguliert als auch hypoosmotisch.

PIECHOTTA et al. (1998) gehen davon aus, dass es sich bei den Barrieren zwischen den Flüssigkeitskompartimenten um drei bidirektionale Barrieren handelt. Durch die bidirektionale Natur der Barrieren sind sechs Unterbarrieren zu betrachten:

Plasma	→	Allantois
Allantois	→	Plasma
Plasma	→	Amnion
Amnion	→	Plasma
Allantois	→	Amnion
Amnion	→	Allantois

Diese bidirektionalen Barrieren halten die Konzentrationsdifferenzen der Kompartimente in Bezug auf die einzelnen Metaboliten aufrecht.

PIECHOTTA et al. (1998) wiesen weiterhin eine absolute Plasma/Amnion-Barriere für Tryptophan nach, welches in der Amnionflüssigkeit nicht auftritt. In ihren Versuchen injizierten sie Aminosäuren in die Allantois und untersuchten anschließend deren Verteilung in den Kompartimenten. Dabei erwies sich die Allantois/Plasma-Schranke als sehr dicht. Die Allantois/Amnion-Schranke hingegen erschien eher schwach und durchlässig. Sie stellten die These auf, dass das Amnion als Überflutungsbecken für die Allantoisflüssigkeit dienen könnte. Aufgrund von unterschiedlich steilen Anstiegen der injizierten Aminosäuren in der Amnionflüssigkeit gilt das Vorliegen von mindestens zwei verschiedenen Transportmechanismen für Aminosäuren an der Allantois/Amnion-Barriere als gesichert.

Die These der endokrinen Regulation der spezifischen Barrieren von EPPLE et al. (1997) wurde von HOHLWEG et al. (1999) und SCHMIDEK et al. (2001) aufgegriffen. HOHLWEG et al. (1999) zeigten einen starken und spezifischen Einfluss der Hormone Insulin und Prolactin auf die Aminosäurekonzentration in allen drei Flüssigkeitskompartimenten. Insulin bewirkt innerhalb von 30 Minuten einen Anstieg der Aminosäurekonzentrationen sowohl in der sonst stark hyporegulierten Amnionflüssigkeit als auch in der Allantoisflüssigkeit. Prolactin bewirkt im Plasma und in der Amnionflüssigkeit eine Erhöhung der Osmolalität durch Steigerung der Taurinkonzentration. Die unterschiedlichen Einflüsse von Insulin und Prolactin auf die Barrierefunktionen zeigen, dass sie mindestens auf zwei verschiedene transmembranöse Transportsysteme einwirken müssen.

SCHMIDEK et al. (2001) beschäftigen sich mit dem Einfluss von IGF-1 ( insulin-like growth factor 1 ) auf die spezifischen Barrieren zwischen den Flüssigkeitskompartimenten. Auf die Injektion von IGF-1 in die CAM folgte in ihren Experimenten eine Konzentrationssteigerung aller 40 untersuchten Aminometaboliten in der Amnionflüssigkeit. Kaum Effekte von IGF-1 sind hingegen in der Allantoisflüssigkeit zu finden und im Plasma sinkt die Konzentration von 12 Aminometaboliten ab. Als Ursache für die erhöhten Konzentrationen an Aminosäuren in der Amnionflüssigkeit nach IGF-1 postulieren SCHMIDEK et al. (2001) eine Flüssigkeitsabgabe aus der Amnionhöhle. Die Möglichkeit eines transmembranösen Transportes aus der Allantoisflüssigkeit oder dem Blut ins Amnion sowie die Freisetzung der Aminosäuren aus embryonalem Gewebe wird von den Autoren als eher unwahrscheinlich angesehen.

Die Barrierefunktion des Amnions bestätigt sich auch durch die Ergebnisse von GILL et al. (1983). In ihrer Studie konnten keine Östrogene in der Amnionflüssigkeit des Hühnerembryos gefunden werden, weil die Allantois/Amnion-Barriere Steroidhormone ausschließt. Ähnlich verhält es sich nach Untersuchungen von ROMBAUTS et al. (1992) für das Hormon Inhibin. Inhibin tritt in der Amnionflüssigkeit nur in geringen Mengen auf, weil die Blut/Amnion-Barriere das Glykoprotein im Plasma zurückhält.

Ein weiterer Aspekt der amniotischen Barriere beinhaltet sowohl Barriere- als auch Transportfunktionen der Amnionmembran. BOUTILIER et al. (1977) berichten, dass der pH-Wert der Amnionflüssigkeit während der gesamten Inkubation des Hühnereis in engen Grenzen konstant gehalten wird. Im Widerspruch dazu steht der ständige Anstieg des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks (  $p_{CO_2}$  ) während der Entwicklung. Die Säurelast wird durch einen Anstieg der Bicarbonatkonzentration (  $HCO_3^-$  ) in der Amnionflüssigkeit kompensiert. BOUTILIER et al. (1977) konnten zeigen, dass das Bicarbonat in der Amnionflüssigkeit in dem Maße ansteigt, in dem es in der Allantoisflüssigkeit abfällt. Der Transport des Bicarbonats erfolgt entweder direkt über die Allantois/Amnion-Barriere oder eventuell auch über das Chorioallantois-Gefäßsystem. Die enge Regulation des pH-Wertes der Amnionflüssigkeit beweist zudem den besonderen Status des Amnions als abgegrenztes, geschütztes Kompartiment. Ein konstanter pH-Wert der Amnionflüssigkeit ist aufgrund des direkten Kontaktes mit den Oberflächen des Embryos auch für dessen Schutz von größter Bedeutung.

## **Sekretion und Resorption**

BAUTZMANN und SCHMIDT (1960) konnten in Versuchen mit Neutralrot bzw. Myofer zeigen, dass sowohl niedermolekulare als auch hochmolekulare Substanzen vom Amnionepithel resorbiert und in Vakuolen gespeichert werden. Die Aufnahme des hochmolekularen Myofer in die Epithelzellen erfolgte nach ihren Untersuchungen pinocytotisch. Weiterhin sehen BAUTZMANN und SCHMIDT (1960) das Amnionepithel als Synthese- und Sekretionsort der Amnionflüssigkeit an. Das gehäufte Auftreten von Vakuolen, die spezielle basale Oberflächenerweiterung, sowie die dachziegelartigen Verbände der Epithelzellen des Hühneramnions sollen der Sekretion dienen.

## **Funktionen der Amnionkontraktionen**

Unmittelbar nach Schluss der Amnionfalten zum Amnion ( 3. - 4. Inkubationstag ) beginnen spontane Kontraktionen der glatten Muskelzellen des Amnions. Diese rhythmischen Kontraktionen halten die Amnionflüssigkeit in Bewegung und versetzen den Hühnerembryo in einen schwingenden Zustand. Die Amnionkontraktionen unterstützen die Körperbewegungen des Embryos zur Zirkulation in der Amnionflüssigkeit und verhindern Verwachsungen zwischen dem Embryo und der Fruchthülle, aber auch zwischen verschiedenen Körperteilen des Embryos (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953; ROMANOFF, 1960; BELLAIRS und OSMOND, 1998; WU et al., 2001). Die Amnionkontraktionen führen zu einer Durchmischung der Amnionflüssigkeit und verbessern die Verteilung von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und des gelösten Sauerstoffs in der Amnionflüssigkeit (BLAKEWOOD et al., 1989; NECHAEVA et al., 2004). Zusätzlich beeinflusst die konstante Durchmischung der Amnionflüssigkeit metabolische Prozesse im Ei (NECHAEVA et al., 2004).

Die glatte Muskulatur der Fruchthülle sorgt weiterhin für einen gewissen Tonus, durch den Unterschiede des intraamniotischen Drucks ausgeglichen werden können (ROMANOFF, 1960).

Aufgrund der hohen Sensibilität und schnellen Reaktion der Amnionkontraktionen gegenüber Veränderungen von Umweltbedingungen ( Temperatur, Lichtintensität, Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücke ) wird eine Rolle der Amnionkontraktionen in der embryonalen Umweltadaptation postuliert (NECHAEVA et al., 2004).

Damit ist die Motoraktivität des Amnions in die kurzfristige Antwort des Embryos auf veränderte Umweltbedingungen eingebunden.

### **3.2.4 Amnionflüssigkeit ( Liquor amniotic )**

Als Amnionflüssigkeit wird die sich in der Amnionhöhle ansammelnde Flüssigkeit bezeichnet (WIESNER und RIBBECK, 1999).

#### **Bildung**

Die Bildung der Amnionflüssigkeit scheint extraembryonal zu erfolgen, da sie auch nach experimenteller Entfernung des Embryos stattfindet (FABER et al., 1973).

Der Syntheseort der Amnionflüssigkeit ist bisher nicht abschließend gesichert. Eine Sekretion und Modifikation durch das Amnionepithel wird seit langem postuliert (BAUTZMANN und SCHMIDT, 1960; ROMANOFF, 1960; BLAKEWOOD et al., 1989). Andererseits erscheint auch die Transsudation aus Blutgefäßen der Area pellucida denkbar (ROMANOFF, 1960).

Die Bildung der Amnionflüssigkeit erfolgt ab dem Schluss der Amnionfalten zum Amnion am 3. Tag der Inkubation. Die Flüssigkeit sammelt sich kontinuierlich in der Amnionhöhle an. Ab dem 5. Bebrütungstag ist das Volumen der Amnionflüssigkeit ausreichend, um die Fruchthülle vollständig vom Embryo abzuheben (ROMANOFF, 1960). Die Menge der Flüssigkeit in der Amnionhöhle erreicht an Tag 13/14 der Inkubation mit einem Volumen von 3,0 ml bis 3,5 ml ihr Maximum (ABRAMOVICI, 1966). Sie enthält am Tag 13 ebenfalls ihren maximalen Wassergehalt ( Abbildung 9 ). Der Trockenmassegehalt hingegen nimmt während der Embryonalentwicklung noch bis Tag 16/17 langsam zu (ABRAMOVICI, 1966; BAGGOTT, 2001).

The mass of water and solids (dry mass) of the embryo of the domestic fowl for selected days during development (from Romanoff, 1968). The maxima are indicated in bold: either the maximum absolute water or solids content, or the maximum change, increase or decrease, in water or solids content ( $\Delta$  water or  $\Delta$  solids).

	water (g)	$\Delta$ water (g)	solids (g)	$\Delta$ solids (g)
<i>Amniotic fluid</i>				
Day 7	1.2		0.01	
Day 10	2.8	+1.6	0.03	+0.02
Day 13	<b>3.7</b>	+0.9	0.13	<b>+0.10</b>
Day 19	1.6	-2.1	<b>0.15</b>	+0.02

**Abbildung 9:** Entwicklung von Wassergehalt und Trockenmasse der Amnionflüssigkeit (BAGGOTT, 2001)

Bei der Bildung der Amnionflüssigkeit scheint Chlorid eine wichtige Rolle zu spielen. FABER et al. (1973) fanden im Vergleich zum Plasma hohe Chloridkonzentrationen in der Amnionflüssigkeit. Sie bewiesen einen Influx von injiziertem Chlorid aus dem Plasma in die Amnionflüssigkeit. Proportional zu dessen Influx stieg die Flüssigkeitsmenge im Amnion an. BAGOTT (2001) bestätigt den hohen Chloridgehalt der Amnionflüssigkeit und sieht in ihm die Ursache für den Wassereinstrom in die Amnionhöhle.

Ein asymmetrischer Wassereinstrom vom Eiweiß in die Amnionflüssigkeit konnte ebenfalls von SIMKISS (1980) am 13 Tage alten Hühneramnion aufgezeigt werden. Einen wichtigen Einfluss auf das Volumen und die Zusammensetzung der Amnionflüssigkeit hat die Perforation und nachfolgende Ruptur der sero-amniotischen Verbindung bzw. Membran am 11. und 12. Inkubationstag (ROMANOFF, 1960). Durch das Einreißen der Membran wird eine Verbindung zwischen Amnionhöhle und Eiweiß geschaffen. Es folgt ein Influx von Eiweiß in die Amnionflüssigkeit. Die beiden Flüssigkeiten vermischen sich, wodurch sich die substantielle Zusammensetzung der Amnionflüssigkeit ändert. Ab dem 12. Bebrütungstag beginnt die Ingestion von Amnionflüssigkeit durch den Hühnerembryo (FREEMAN und VINCE, 1974). Die Aufnahme und Verdauung der Flüssigkeit führt zu einem Abfall des Volumens in der Amnionhöhle ab Tag 13 / 14. An Tag 18 der Inkubation sind weniger als 0,5 ml Amnionflüssigkeit nachweisbar (ABRAMOVICI, 1966).



## Zusammensetzung

Eine Vielzahl an Studien sind zum Nachweis von speziellen Inhaltsstoffen der Amnionflüssigkeit unternommen worden. Dabei muss jedoch aufgrund der Vermischung mit dem Eiweiß ab Tag 11 und der Verschmelzung des Amnions mit der Chorio-Allantois ab Tag 13 / 14 immer der Untersuchungszeitpunkt ( Inkubationstag ) beachtet werden.

Die umfassendste Zusammenstellung der Inhaltsstoffe der Amnionflüssigkeit findet sich bei ROMANOFF (1967). In der folgenden Tabelle 2 sind die wichtigen Stoffe als Auszug für die Bebrütungstage D9 und D10 wiedergegeben:

**Tabelle 2:** Auszug aus der chemischen Zusammensetzung der Amnionflüssigkeit nach ROMANOFF (1967)

Inhaltsstoff [mmol/l]	D9	D10
<b>Natrium</b>	139	143
<b>Kalium</b>	2,5	2,5
<b>Calcium</b>	803*	803*
<b>Chlorid</b>	110	126
<b>Magnesium</b>	0,41	2,0
<b>Anorg. Phosphat</b>	18,3*	18,3*
<b>Glucose</b>	110*	110*

\* Werte von D11 – früher nicht untersucht

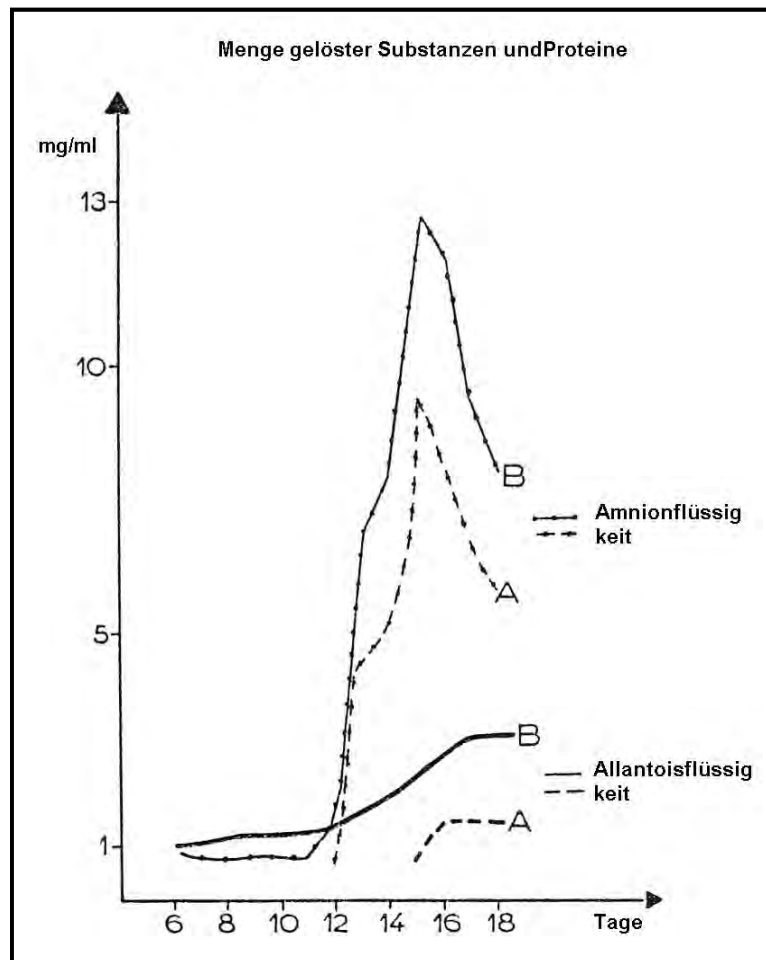
Anhand dieser Werte wurde auch der Untersuchungspuffer für die Experimente in der Ussing - Kammer zusammengestellt.

Nach Untersuchungen von FABER et al. (1973) enthält die Amnionflüssigkeit des Hühnerembryos am 4. Inkubationstag folgende Ionenkonzentrationen:  $[\text{Na}^+]$ :  $145 \pm 1,9$  mmol/l,  $[\text{K}^+]$ :  $3,38 \pm 0,18$  mmol/l und  $[\text{Cl}^-]$ :  $128,5 \pm 1,9$  mmol/l. An Tag 5 der Bebrütung weist GRABOWSKI (1963) eine  $\text{Na}^+$ -Konzentration von 131 mmol/l und eine  $\text{K}^+$ -Konzentration von 2,2 mmol/l nach. HOWARD (1957) beschreibt am 6. Inkubationstag einen Natriumgehalt von 136,3 mmol/l und einen Kaliumgehalt von 3,0 mmol/l in der Amnionflüssigkeit.

Nach SIMKISS (1980) ist die Amnionflüssigkeit an Tag 15 der Bebrütung, also nach Vermischung mit dem Eiweiß, wie folgt zusammengesetzt:  $[\text{Na}^+]$ : 107 mmol/l,  $[\text{K}^+]$ : 24 mmol/l,  $[\text{Ca}^{2+}]$ : 7 mmol/l und  $[\text{Cl}^-]$ : 67 mmol/l.

Der pH-Wert der Amnionflüssigkeit bleibt über die gesamte Embryonalentwicklung weitgehend konstant und wird innerhalb enger Grenzen reguliert. Der pH-Wert schwankt von Tag 8 bis Tag 18 der Inkubation zwischen 6,8 und 7,1 (BOUTILIER et al., 1977; SHAFEY, 2002).

Das spezifische Gewicht der amniotischen Flüssigkeit liegt bis zur Ruptur der sero-amniotischen Membran bei 1003 g/l bis 1005 g/l. Es steigt am 12. Bebrütungstag sprunghaft auf 1030 g/l an. Ähnlich verhält sich der Proteingehalt der Amnionflüssigkeit, bis Tag 12 liegt er bei unter 1 mg/100ml, von Tag 12 bis Tag 15 steigt er auf 9 mg/100ml an (Abbildung 10). Auch die totale Menge an gelösten Stoffen steigt, von 1 mg/100ml an Tag 11 der Inkubation auf 13 mg/100ml an Tag 15 rapide an (ABRAMOVICI, 1966). Den Hauptanteil der Proteine in der Amnionflüssigkeit macht das Ovalbumin aus. In geringen Mengen ist unter anderem Transferrin aufzufinden (MARTIN et al., 1985).



**Abbildung 10:** Gehalt an Proteinen und gelösten Substanzen in Amnion- und Allantoisflüssigkeit: A) Proteine; B) gelöste Substanzen (ABRAMOVICI, 1966)

In der Amnionflüssigkeit konnten die Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin nachgewiesen werden. Wobei von Tag 10 der Bebrütung bis Tag 14 ein deutlicher Konzentrationsanstieg der Katecholamine auftrat. Die Katecholaminkonzentrationen in der Amnionflüssigkeit liegen deutlich unter denen von Plasma und Allantoisflüssigkeit (EPPLÉ et al., 1992). GILL et al. (1994) zeigten, dass es sich dabei ausschließlich um freie Katecholamine handelt und sulfatierte Katecholamine (deren Abbauprodukte) in der Amnionflüssigkeit nicht vorhanden sind. Diese sammeln sich mit zunehmendem Alter und in Abhängigkeit von einwirkenden Stressoren in der Allantoisflüssigkeit an (TÖNHARDT et al., 1995).

Die Glucosekonzentration ( $23 \pm 17$  nmol/ml) der Amnionflüssigkeit liegt signifikant unter den Konzentrationen im Blutplasma und in der Allantoisflüssigkeit (117 nmol/ml bzw. 62 nmol/ml) (TEN BUSCH et al., 1997a). Die Hyporegulation der Amnionflüssigkeit erfolgt auch in Bezug auf den Gehalt an Aminosäuren und Aminometaboliten. Nach TEN BUSCH et al. (1997a) und PIECHOTTA et al. (1998) finden sich in der Amnionflüssigkeit 32 bzw. 34 Aminosäuren und -metabolite, im Vergleich zu 38 im Plasma und 39 in der Allantoisflüssigkeit.

Auch verschiedene Hormone sind in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen worden. So enthält die Amnionflüssigkeit freies Testosteron (EPPLE et al., 1997), jedoch keine Östrogene (GILL et al., 1983). Die Konzentration des Glykoproteinhormones Inhibin ist gering im Vergleich zu Plasma und Allantoisflüssigkeit und bleibt während der Embryogenese konstant (ROMBAUTS et al., 1992). Verschiedene Wachstumsfaktoren sind ebenfalls in der Amnionflüssigkeit enthalten (BLAKEWOOD et al., 1989).

Die totale Phospholipidkonzentration in der Amnionflüssigkeit steigt mit fortschreitender Entwicklung des Hühnerembryos an, da die Phospholipide in die fetalen Atemwege sezerniert werden und über diese in die Amnionflüssigkeit gelangen. Die Konzentration steigt von 2,26 mg/100ml an Tag 9 der Inkubation bis auf 7,75 mg/100ml an Tag 20. Das mengenmäßig dominierende Phospholipid in der Amnionflüssigkeit ist Lecithin (PARIHAR, 1987; PARIHAR et al., 1991).

Durch die Vermischung der Amnionflüssigkeit mit dem Eiweiß nach Ruptur der sero-amniotischen Membran gehen einige Substanzen, die vorher nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen in der amniotischen Flüssigkeit vorkamen, in diese über. Die Flavinglehalte (FAD, FMN) steigen stark an (YAGI und NEGASE, 1975). Mit dem Influx von Eiweiß gelangt auch der Eiweiß-Trypsin-Inhibitor in die Amnionhöhle und wird vom Embryo aufgenommen (BAINTNER und FEHER, 1974). Auch Immunglobuline und Antikörper gelangen erst mit dem Eiweiß in die Amnionflüssigkeit. Ihre Titer erhöhen sich nach Perforation der sero-amniotischen Verbindung kontinuierlich (KRAMER und CHO, 1970).

### **3.2.5 Vergleich des Hühneramnions mit dem mammalen bzw. humanen Amnion**

Ein wichtiger Unterschied zwischen Huhn und Säuger bzw. Mensch ist das Fehlen der maternalen Seite und ihres Einflusses bei der Entwicklung des Hühneramnions (EPPLE et al., 1997). Der Hühnerembryo und die extraembryonalen Kompartimente müssen während der Embryogenese die Verteilung der Flüssigkeit im Ei sowie die Speicherung von Metaboliten in Depots ohne Austausch mit der Umwelt realisieren (EPPLE et al., 1992). Der Säugerembryo besitzt den Vorteil eines Abtransportes von Metaboliten und Stoffwechselendprodukten sowie der Versorgung mit Nährstoffen und Flüssigkeit über die maternale Plazenta. Dieser Austausch mit der Umgebung ist im Hühnerei als weitgehend abgeschlossenem System nicht möglich (BAGGOTT, 2001).

Zwischen dem Amnion des Huhnes und dem mammalen bzw. humanen Amnion bestehen sowohl im Hinblick auf histologischen Aufbau als auch in Bezug auf die Entwicklung während der Embryogenese gravierende Unterschiede.

Das Amnionepithel des Hühnerembryos besteht aus glattwandigen Epithelzellen mit extrem abgeflachten Rändern, die sich über weite Strecken dachziegelartig mit denen der Nachbarzellen überlappen. Die Zellzwischenräume sind als laminärer Spalt ausgebildet. Im Gegensatz dazu zeigen mammale und humane Amnionepithelzellen eine stark zerklüftete und fortsatzreiche Plasmamembran, die der Oberflächenvergrößerung dient. Die Epithelzellen stehen bei Säugern über zahlreiche Cytoplasmafortsätze miteinander in Kontakt (BAUTZMANN und SCHMIDT, 1960). Das humane Amnionepithel besteht aus einem Monolayer polarisierter Zellen, die durch breite Interzellularräume voneinander getrennt sind. Die Epithelzellen bilden zur Amnionhöhle hin Mikrovilli und zur maternalen Seite hin Podocyten aus (BARA und GUIET-BARA, 1994).

Eine weitere Differenz zwischen Vögeln und Säugern ist die Zusammensetzung und Funktion der Amnionflüssigkeit. Bei den meisten Säugetieren gelangt ein Teil des fetalen Urins in die Amnionflüssigkeit, beim menschlichen Embryo ist es sogar der gesamte. Die Ursache für die Entsorgung des fetalen Urins in die Amnionflüssigkeit ist die Rückbildung der Allantois, die beim Säuger sehr früh in der Embryonalentwicklung erfolgt (TEN BUSCH et al., 1997a; SCHMIDEK et al., 2001). Beim Hühnerembryo hingegen gelangt der embryonale Urin in die Allantois.

Die Allantois- und die Amnionflüssigkeit sind beim Huhn durch die Allantois/Amnion-Barriere strikt voneinander getrennt. Das Amnion des Huhns stellt somit ein besonders geschütztes und abgeschirmtes Kompartiment dar (TEN BUSCH et al., 1997a).

Das humane Amnionepithel wird als leckes („leaky“) und asymmetrisches Epithel charakterisiert (BARA und GUIET-BARA, 1981). Parazellulär werden  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen über das Amnion transportiert. Transzellulärer Transport von Ionen wird mit Hilfe der folgenden nachgewiesenen Systeme realisiert:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter ( auf fetaler und maternaler Seite ) sowie eines  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$  - Co-Transporters auf fetaler Seite (BARA und GUIET-BARA, 1994).

Eine elektrophysiologische Charakterisierung der Barrierefunktionen des Hühneramnionepithels steht noch aus.

### **3.3 Zusammenfassung der Literatur**

Die Amnionflüssigkeit schützt den Embryo vor schädlichen mechanischen und thermischen Einflüssen von außen. Auch starke antibakterielle Eigenschaften werden ihr zugesprochen (ROMANOFF, 1967).

Sie verleiht dem Embryo Auftrieb und sorgt dafür, dass sich die embryonalen Gewebe praktisch gewichtslos entwickeln können. Die Amnionflüssigkeit hält die Fruchthülle auf Distanz zum Embryo und verhindert so Verwachsungen (BAUTZMANN und SCHRÖDER, 1953; ROMANOFF, 1960). Weiterhin schafft sie als abgegrenzter Raum konstante und geschützte Umweltbedingungen für die ungestörte Entwicklung des Hühnerembryos (TEN BUSCH et al., 1997a).

Zu diesem Zweck ist die Zusammensetzung der Amnionflüssigkeit streng reguliert. Viele Autoren ( siehe unten ) haben hierzu die Gehalte verschiedener Inhaltsstoffe in den unterschiedlichen Eikompartimenten verglichen. Sie postulieren in Anlehnung daran verschiedene Barrieren im Hühnerei. Welche Rolle das Amnion mit seinen epithelialen Eigenschaften bei dieser Barrierefunktion spielt, sollte in dieser Studie untersucht werden.

Die weiteren, in der Literatur angegebenen Fakten lassen sich in zwei Bereiche gliedern:

Zum einen ergeben sich aus ihnen mögliche Zielsetzungen für die Versuche ( 0 )

Zum anderen sind sie als „Literaturangaben zu den Versuchsbedingungen“ zu verstehen ( 0 ).

### **3.3.1 Zielsetzungen der Versuche**

Der Syntheseort der Amnionflüssigkeit ist nicht abschließend gesichert.

Im Hühnerei werden drei Barrieren postuliert: Die Blut/Amnion-Barriere, die Blut/Allantois-Barriere und die Allantois/Amnion-Barriere (ABRAMOVICI, 1966; EPPLE et al., 1992; GILL et al., 1994; EPPLE et al., 1997; TOMASCHEK, 1997; TEN BUSCH et al., 1997a; TEN BUSCH et al., 1997b; PIECHOTTA et al., 1998; HOHLWEG et al., 1999; SCHMIDEK et al., 2001). Diese wurden anhand der unterschiedlichen stofflichen Zusammensetzungen der Flüssigkeiten von vielen Autoren nachgewiesen. Sie werden auch aktuell genutzt, um die Auswirkungen gezielt gesetzter Umwelteinflüsse auf den Embryo und die Eikompartimente zu klären.

Bei der Bildung der Amnionflüssigkeit scheint Chlorid eine wichtige Rolle zu spielen. Ins Plasma injiziertes Chlorid wurde auch in der Amnionflüssigkeit nachweisbar und proportional dazu stieg deren Volumen an (FABER et al., 1973).

Im humanen Amnion werden  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen parazellulär transportiert, während als transzelluläre Transporter die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, ein  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter, und  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$ -Co-Transporter ( letzterer nur auf fetaler Seite ) nachgewiesen wurden (BARA und GUIET-BARA, 1994). Das Gewebe wurde insgesamt als „leaky“ ( = leck ) und asymmetrisch charakterisiert (BARA und GUIET-BARA, 1981).

Diese Arbeit soll als erster Schritt verstanden werden, die oben angeführten Funktionen des Hühneramnions in ihren Grundlagen zu erfassen. Dazu bietet sich die elektrophysiologische Charakterisierung der Fruchthülle in der Ussing - Kammer an.

Die Untersuchungsmethode ist geeignet sowohl den aktiven zellulären, als auch den passiven parazellulären Transport an Epithelien zu erfassen. Auch der Nachweis bestimmter Transportmechanismen ist durch deren gezielte Hemmung möglich.

### **3.3.2 Literaturangaben zu den Versuchsbedingungen**

Um für die Versuche geeignet zu sein, muss die Fruchthülle gewissen Anforderungen genügen, die sich aus der Untersuchungsmethode und den gesetzten Zielen ergeben. Der erste Schritt dieser Studie war es also, ein geeignetes Zeitfenster und die genaueren Untersuchungsumstände für die Versuche festzulegen.

Hierzu konnten der Literatur die folgenden Hilfen entnommen werden:

Ab D11 entstehen erste Perforationen der sero-amniotischen Verbindung, was durch den Einstrom von Eiweiß in die Amnionhöhle deutliche Änderungen in der Zusammensetzung der Amnionflüssigkeit zur Folge hat (ROMANOFF, 1960; BAGGOTT, 2001) und sich unter anderem am sprunghaften Anstieg des spezifischen Gewichts zeigt (ABRAMOVICI, 1966). Der Versuchszeitraum muss folglich vor D11 liegen um extraamniotische Einflüsse auszuschließen.

An D9 erreicht die Frequenz der Amnionkontraktionen ihr Maximum (FREEMAN und VINCE, 1974). Zwischen D9 und D14 liegen auch die maximale Gewichtszunahme und Akkumulation von Amnionflüssigkeit (ROMANOFF, 1960), so dass in diesem Zeitraum auch von der gewünschten Aktivität am Amnion ausgegangen werden kann.

An D9 kann das Amnion einem Gewicht von 60 g widerstehen (ROMANOFF, 1960), was eine gewisse mechanische Belastbarkeit der Fruchthülle für die Versuche garantiert.

Ob dieser Wert für die praktische Anwendung ausreicht, war in eigenen Vorversuchen sicherzustellen. Dabei sollte auch untersucht werden, ob zu diesem Zeitpunkt die Größe der Fruchthülle für eine Verwendung in der Messkammer ausreicht.

Auch das Verwachsen des Amnions mit dem Chorion durfte nicht zu weit fortgeschritten sein, und so eine schadensfreie Isolation nicht unmöglich werden.



Aus den oben genannten Veröffentlichungen, die die Barrierefunktion des Amnions postulieren, ist auch die Zusammensetzung der Amnionflüssigkeit zu entnehmen. ROMANOFF (1967) gibt zu diesem Punkt gute tabellarische Übersichten.

So konnte aus der Literatur weitestgehend die Zusammensetzung des Untersuchungspuffers hergeleitet werden ( siehe Tabelle 2 ).