

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Gewebeproben

4.1.1 Herkunft der Gewebeproben

Die verwendeten Amnionepithelien stammten aus Bruteiern der Rasse „*White Leghorn*“ und wurden über die Firma *Lohmann Tierzucht GmbH* bezogen.

Die Legehennen wurden nach einem Standard - Aufzuchtprogramm gehalten, wobei die Futterration und die Futtersorte dem Körpergewicht, Alter und Beleuchtungsprogramm entsprechend gewählt wurden.

Die Bebrütung erfolgte in Brutschränken mit automatischer Wendevorrichtung der Firma „*Hemel Brutgeräte*“. Die Temperatur betrug durchgehend $37,5^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,25\%$), die Luftfeuchtigkeit 60% ($\pm 2\%$). Den Bruteiern wurde durch das Ventilationssystem des Brutschranks ständig frische Raumluft zugeführt.

Die Inkubation der Eier erfolgte binnen 48 Stunden nach Lieferung, wobei sie in der Zwischenzeit bei $8-10^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Diese Lagerzeit wurde in Absprache mit der Firma *Lohmann* als unbedenklich gewählt und hat sich während der Versuche bewährt.

Die ersten 24 Stunden nach Beginn der Inkubation zählten als Bebrütungstag 1 (D1).

4.1.2 Festlegung des Versuchszeitraums und der Präparation

Entscheidung für einen Versuchszeitraum

Aus der Literatur war zu schließen, dass sich der mögliche Zeitrahmen für die Versuche innerhalb der Bebrütungstage sieben bis elf bewegt. Da diese Zeitspanne für definierte Aussagen zu lang ist und nicht im Voraus zu entscheiden war, ob die nötige mechanische Belastbarkeit in dieser Zeit bereits gegeben ist, war eine Reihe von Vorversuchen nötig. Dabei sollte auch ein möglichst schonender Weg zur Isolation der Fruchthülle gefunden und sich die nötige Fingerfertigkeit angeeignet werden. Weiterhin wurde verglichen, ob sich automatisch gewendete oder nicht gewendete Eier besser präparieren lassen.

Die Ergebnisse dieser Vorversuche sind in der folgenden Tabelle 3 zusammengefasst:

Tabelle 3: Vergleich der Präparierbarkeit des Amnions an D7 bis D12

D7	D8	D9
Amnion gut isolierbar zu klein zu wenig gefüllt keine aufhaftenden Gefäße Gewendet: besser zu präparieren n = 2	Amnion schwierig zu isolieren, reißt leicht Größe knapp für Kammer ausreichend Wird von den Nadeln der Kammer beim Aufsetzen zerrissen keine aufhaftenden Gefäße Gewendet besser ablösbar von Embryo bzw. restlichen Fruchthüllen n = 4	Besser zu präparieren Größe ausreichend Ausreichende Belastbarkeit keine aufhaftenden Gefäße Gewendet besser ablösbar von Embryo / restlichen Fruchthüllen n = 6
D10	D11	D12
Präparation gut möglich, nur bei einigen Eiern bereits kleine aufliegende Gefäße Größe und Dicke gut geeignet Gewendet besser ablösbar von Embryo / restlichen Fruchthüllen n = 6	Präparation gut möglich, gehäuft feine Gefäße, bei einigen Eiern auch bereits stärkere Gewendet besser ablösbar von Embryo / restlichen Fruchthüllen n = 4	Präparation erschwert wegen Embryogröße und Gewicht der Amnionflüssigkeit, Auftreten fest verwachsener, großkalibriger Gefäße Gewendet besser ablösbar von Embryo / restlichen Fruchthüllen n = 2

Das Ergebnis zeigte, dass an den Inkubationstagen D9 und D10 die Präparation durchführbar ist und die geforderten Kriterien erfüllt wurden.

Für D10 als letzten Versuchstag spricht auch, dass nach ROMANOFF (1960) ab D10 langsam ein Abbau der sero-amniotischen Platte einsetzt. Dadurch kommt es in steigendem Maße zu einem Einstrom von Eiweiß in die Amnionhöhle.

Dies würde, aufgrund der sich ändernden osmotischen Verhältnisse, Rückschlüsse auf rein aktive Transportmechanismen verfälschen.

Entwicklung des Präparationsweges

Die Entnahme des Amnions aus dem Ei erwies sich, wie erwartet, zunächst als recht diffizil. Häufig wurde die dünne Fruchthülle beim Handling beschädigt und Amnionflüssigkeit trat aus. Die Folge war ein schnelles Kollabieren der gesamten Amnionhöhle. Das Ablösen des Amnions vom Embryo stellte sich danach als unmöglich heraus: Einerseits war das Gewebe kaum zu greifen, andererseits seine Verwendung in der Ussing-Kammer ausgeschlossen, da eine Lokalisation des vorangegangenen Schadens nicht möglich war.

Es war also wichtig, das Amnion mit der enthaltenen Amnionflüssigkeit zu gewinnen, da so die Unversehrtheit des Gewebes am wahrscheinlichsten war. Im Folgenden wird der Präparationsweg beschrieben, der sich im Laufe der Vorversuche als der zuverlässigste bewährt hat:

Zunächst wurde über der Luftkammer des Eis die Eischale entfernt. Das Chorion mit seinen Blutgefäßen, der Dottersack und die Amnionhöhle mit innenliegendem Embryo wurden sichtbar.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, wurden Chorion und Dottersack durchtrennt, um einen Zugang in die direkte Umgebung des Amnions zu erhalten.

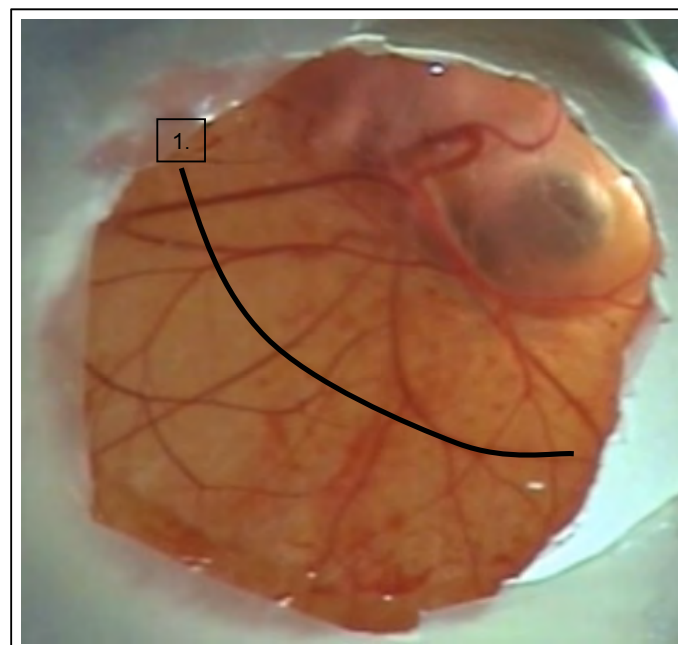


Abbildung 11: Durchtrennen von Chorion und Dottersack:
1.) Erster präparativer Schnitt

Danach konnte das Amnion durch vorsichtiges Schaben an der Eihaut von innen mobilisiert werden.

Es folgte das Verbringen des Amnions auf die Präparationsunterlage:

Das Ei wurde gekippt und es flossen der Dotter, das Eiweiß und das Amnion mit dem Embryo auf eine bereitgestellte Nadelunterlage, die mit Parafilm abgedeckt war.

Wenn das Amnion beim Herausfließen die Öffnung der Eischale passiert hatte, konnte mit einer Pinzette der Amnionnabel festgehalten, und die in der Eischale verbliebenen Reste der Fruchthüllen vor der Pinzette abgeschnitten werden (Schnitt 2 in Abbildung 12). Ab diesem Moment konnte das Amnion am Amnionnabel ohne direkte Berührung auf der Unterlage bewegt werden.

Das Amnion wurde mit temperiertem und begastem Puffer gespült und so von Dotter- und anderen Resten der Eiflüssigkeiten befreit.

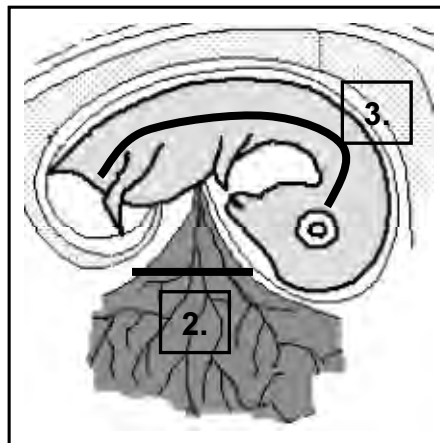


Abbildung 12: Lage nach dem Herausfließen aus dem Ei – es folgt die Isolation des Amnions:
2.) Abtrennen der Dottermembran und der Nabelgefäße 3.) Eröffnen des Amnions

Die folgenden Schritte der Isolation des Amnions fanden unter einem Stereomikroskop *Leica S 6 D* statt:

Mit einer Augenschere wurde ein Schnitt (Schnitt 3 in Abbildung 12) in der Region über dem Auge des Embryos gesetzt. Während die Amnionflüssigkeit austritt, sollte dieser Schnitt vorsichtig aber zügig entlang der Wirbelsäulenachse des Embryos fortgesetzt werden.

War das caudale Ende erreicht, legte man die freien Schnittkanten sukzessive mit einer feinen Pinzette faltenfrei und ohne sie zu sehr zu dehnen nach außen. Dort wurden sie mit feinen Nadeln in geringen Abständen fixiert.

Am Ende sollte das Amnion eine annähernd kreisrunde Form haben, und der Amnionnabel musste außerhalb des Zentrums liegen, in dem später die Messungen stattfinden sollten. Im Allgemeinen gelang dies, wenn zu Beginn der Präparation (also bei noch geschlossenem Amnion) der Embryo in Seitenlage und der Amnionnabel ventral des Embryos lag.

Der noch innen liegende Embryo verblieb an seinen Versorgungsgefäßen und wurde an den Rand zwischen die Nadeln geschoben.

Die Präparation des Amnions war damit abgeschlossen.

Es konnte in die Ussing - Kammer eingespannt werden.

4.1.3 Vorbereitung der Messungen

Vorbereitung der Kammern

Es wurden Messkammern mit einer Innenfläche von $0,5 \text{ cm}^2$ verwendet.

Die Vorbereitung der Messkammern fand so weit statt, dass der Zeitverlust zwischen der Präparation des Amnions und dem Anschließen an die Messeinrichtung sowie die Pufferversorgung möglichst kurz blieb.

Auf die linke Kammerhälfte, die mit sehr feinen Präparationsnadeln ausgestattet ist, wurde ein weicher Silikonring aufgelegt, der die durch die Kammerkanten auf das Gewebe wirkenden Kräfte mindert. Dies diente der Vermeidung von „edge damages“. Über diesen Silikonring wurden Stücke eines Stützgewebes aus Kunststoff gleichmäßig aufgespannt. Um einer elektrostatischen Aufladung entgegenzuwirken, waren die vorbereiteten Stücke 12 Stunden in 3-molarer KCl-Lösung gelagert worden. Kurz vor dem Einbau wurden sie mit Versuchspuffer gespült.

Ein weiterer Silikonring und die rechte Kammerhälfte waren bereitzuhalten.

Einspannen und Anschließen an die Messeinrichtung

Die vorbereitete linke Kammerhälfte wurde mittig in den Nadelkreis mit dem umgebenen Amnion eingesetzt und leicht angedrückt. Die Nadeln der Kammerhälfte durchstießen dabei das Amnion und den Parafilm.

Die Kammer wurde unter leichtem Druck gehalten und dabei konnten die äußeren Nadeln und der Embryo mit überstehenden Geweberesten entfernt werden.

Mit der freien Hand wurde nun der Parafilm gegriffen und sodann Parafilm und Kammer gleichzeitig angehoben und umgedreht. Mit dem Daumen der Hand, die die Kammerhälfte hielt, drückte man ein noch sichtbares Stück Amniongewebe an die Wandung der Messkammer und begann an dieser Stelle mit der anderen Hand den Parafilm anzuheben. Tat man dies im spitzen Winkel von der Stelle weg, blieb das Amnion auf der Kammer bzw. dem Stützgewebe haften.

Nach Entfernen des Parafilms war das Amnion auf dem Stützgewebe als sehr dünner durchscheinender Belag sichtbar. Es durften keine größeren Gefäße oder andere Auflagerungen im Bereich der Messfläche liegen.

Abschließend wurden der zweite Silikonring und die rechte Kammerhälfte passend auf die Präparationsnadeln gesteckt.

Die Kammer konnte nun an die Messeinrichtung angeschlossen werden.

4.2 Inkubationstechnik

4.2.1 Aufbau der Ussing - Kammer

Die Versuchstechnik geht auf eine von USSING und ZERAHN (1951) entwickelte Methode zurück.

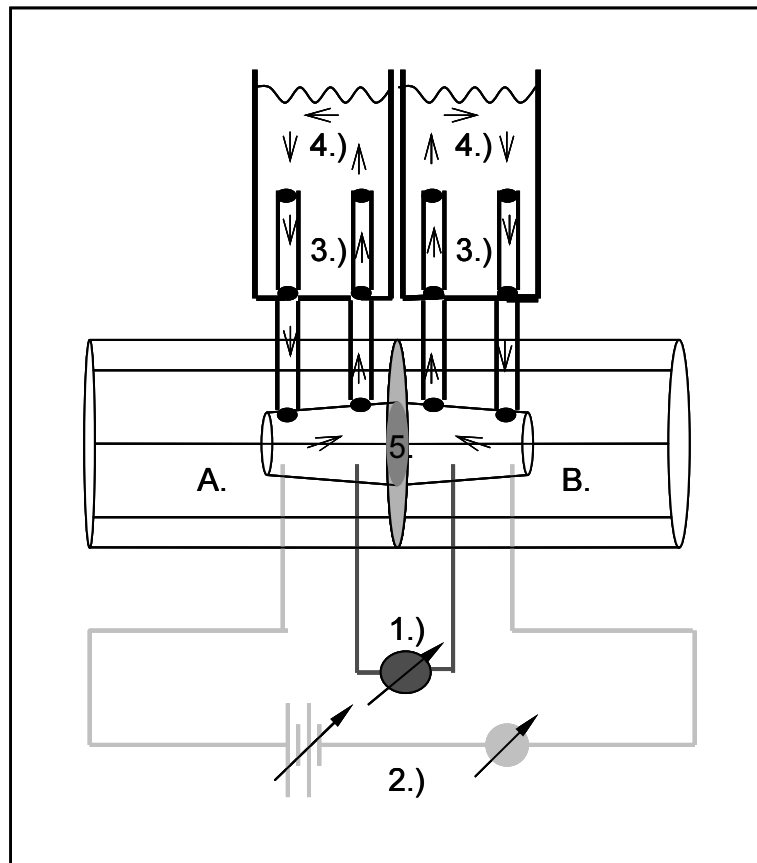


Abbildung 13: Ussing-Kammer mit Gasliftapparat: A.: epitheliale (= luminal) Seite; B.: serosale Seite des Amnions; 1.) Messung der transepithelialen Potentialdifferenz mittels KCl-Agarbrücken und Ag-AgCl-Elektroden; 2.) definierte Stromspeisung mittels KCl-Agarbrücken und Ag-AgCl-Elektroden; 3.) Gasliftapparat: aufsteigende Gasblasen bewirken Sog auf der amnionnahen Seite der Kammer → Umwälzung und Begasung des Puffers; 4.) Pufferreservoir; 5.) Amnion

Diese Technik dient der Erfassung von elektrophysiologischen Parametern unter *in vitro* Bedingungen. Zwischen die beiden Hälften einer Plexigaskammer wird ein Epithelstück senkrecht eingespannt, so dass die epitheliale (= luminale) Seite nach links und die serosale (= basolaterale) Seite nach rechts ausgerichtet ist (Abbildung 13).

Über den Kammerhälften befindet sich jeweils eine doppelwandige Glassäule, die mit der Kammer über flexible Schläuche verbunden ist. Durch jede Kammerseite zirkulieren jeweils 10 ml Pufferlösung.

Zwischen den Wänden der Glassäulen wird durch einen Pumpthermostat (*Haake D1*) beheiztes Wasser umgewälzt, so dass die Temperatur der Pufferlösung konstant 38°C beträgt.

Zusätzlich wird jeder Seite am unteren Ende der Säule kontinuierlich Carbogen zugeführt (Gasliftsystem der *Firma Landgraf*), welches auch für die ständige Umwälzung der Pufferlösung wichtig ist (STEVENS, 1964).

4.2.2 Zusammensetzung des Untersuchungspuffers

Die Pufferlösung wurde anhand der Literaturangaben zusammengestellt und mit den in Tabelle 4 aufgeführten Bestandteilen in Aqua bidest. angesetzt:

Tabelle 4: Inhaltsstoffe des Versuchspuffers

	MG	mmol/l	g/l
NaCl	58,44	103,00	6,02
NaHCO₃	84,01	14,00	1,18
NaH₂PO₄·H₂O	137,99	0,58	0,08
KCl	74,56	2,50	0,19
C₆H₁₂O₆·H₂O	198,18	10,00	1,98
CaCl₂·2 H₂O	147,02	7,00	1,03
MgCl₂·6 H₂O	203,30	2,80	0,57

Der Puffer stellte sich, nachdem er unter Carbogenbegasung stand und die Inkubationstemperatur erreicht hatte, auf einen pH von 7,1 ein. Dies entsprach dem erforderlichen Wert.

4.3 Elektrophysiologisches Messprinzip

Zur Messung der elektrophysiologischen Daten befindet sich in jeder Kammerhälfte jeweils eine gewebe-nahe ($< 3 \text{ mm}$) und eine gewebe-ferne ($> 20 \text{ mm}$) KCl-Agarbrücke.

Die gewebe-nahen Brücken sind mit Ag-AgCl-Elektroden verbunden und dienen der Messung der transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t). Über die gewebe-fernen Brücken, die ebenfalls mit Ag-AgCl-Elektroden verbunden sind, kann externer Strom eingespeist werden. Die Messung des Stromes und der transepithelialen Potentialdifferenz erfolgt durch eine mikrocomputergestützte Voltage/Current Clamp, Einrichtung für Windows, Clamp Version 2.02 (*Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen*).

Durch das Zuführen definierter Strompulse (ΔI) und die Erfassung der entsprechenden Veränderungen der Potentialdifferenz (ΔPD) wird der zugehörige Gewebewiderstand (R_t) errechnet.

Die Pulshöhe betrug in dieser Studie $100 \mu\text{A}$. Die Pulse wurden bipolar appliziert. Die Pulsdauer lag bei 200 ms .

Das Gerät wird zunächst vor Beginn des eigentlichen Versuches komplett aufgebaut und misst ohne enthaltenes Gewebe die **„fluid resistance“**. In diesen Wert fließen alle Einflüsse, die von der Apparatur auf die Messung einwirken, ein. Während des eigentlichen Versuches werden die gemessenen Daten dann um die „fluid resistance“ korrigiert, um nur die Messwerte für das Gewebe zu erhalten. Die „fluid resistance“ der in dieser Studie verwendeten Kammern mit dem Untersuchungspuffer lagen für den Widerstand (R_t) zwischen 80 Ohm und 170 Ohm und für die Potentialdifferenz (PD) zwischen -2 mV und 0 mV .

Die Einzelheiten der Apparatur sind in der Dissertation von SCHEFFLER (1984) beschrieben.

Es wurden mit Hilfe eines PC's ständig folgende Daten aufgezeichnet:

- PD_t [mV]
- I_{sc} [$\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]
- G_t [$\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$]

Diese waren bereits um die „fluid resistance“ korrigiert.

Die elektrophysiologischen Parameter wurden während der geplanten Untersuchungen unter so genannten „open circuit“ oder unter „short circuit“ Bedingungen erfasst.

4.3.1 Open circuit

Unter diesen Bedingungen wird die transmurale Potentialdifferenz nicht beeinflusst, sondern direkt gemessen. Durch das Aussenden von Strompulsen (ΔI) definierter Amplitude ($100 \mu\text{A}$) und Dauer (200ms) wird eine kurzfristige Änderung der Potentialdifferenz (ΔPD) bewirkt. Mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes kann man mit diesen Werten dann den zugehörigen transmuralen Widerstand (R_t) berechnen.

Gleichung 1:

$$R_t = \frac{\Delta PD_t}{\Delta I}$$

Die Gewebeleitfähigkeit entspricht dem reziproken Wert des Gewebewiderstandes.

Gleichung 2:

$$G_t = \frac{1}{R_t}$$

Der transmurale Strom (oder Kurzschlussstrom) wird unter „open circuit“ Bedingungen, welche nur zu Beginn eines jeden Versuches während der Äquilibration bestehen, nicht berechnet.

4.3.2 Short circuit

Unter Kurzschlussbedingungen wird externer Strom eingespeist und so die durch elektrogene Ionenbewegungen aufgebaute Potentialdifferenz auf 0 mV gegengeregelt („geklemmt“).

Der eingespeiste Strom, der sog. Kurzschlussstrom (I_{sc}), kompensiert die elektrogenen Ionenbewegungen und ist somit äquivalent der Summe aller elektrogen transportierten Ionen.

Damit wird der elektrische Gradient ausgeschaltet. Wenn gleichzeitig auf beiden Seiten identische Pufferlösungen (= identische Osmolarität) eingesetzt werden, fehlt auch der chemische Gradient. Findet also unter Kurzschlussbedingungen ein Nettotransport statt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen aktiven Transport handelt. Die Gewebeleitfähigkeit wird wie unter „open circuit“ Bedingungen ermittelt.