# 5 ERGEBNISSE

Um zunächst Vergleichsdaten zu erhalten, wurden die unbeeinflussten Grunddaten ermittelt.

Zur Überprüfung der Dichtigkeit der eingespannten Gewebeproben wurde vor Versuchsende hochmolare KCI-Lösung serosal zupipettiert. Eine histologische Prüfung des Gewebes war nach Ablauf des Versuches nicht mehr durchführbar, da das Amnion bei der Entnahme aus der Kammer prozessbedingt irreversibel geschädigt wird.

Nachdem eine ausreichende Zahl plausibler (siehe 0) Messungen vorlag, sollten diese daraufhin überprüft werden, ob die ermittelten Werte eindeutig auf vom Amnion aktiv transportierte Ionen zurückzuführen sind. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die Messeinrichtung Artefakte als elektrophysiologische Parameter ausgab.

Dazu sollten im folgenden Versuchsabschnitt Änderungen der aktuellen Messwerte durch Hemmung von Transportmechanismen des Gewebes hervorgerufen werden.

Als Hemmstoffe wurden eingesetzt:

1). Ouabain	Hemmstoff der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> - ATPase (SCHATZMANN, 1953; MARTENS et al., 2001)
2). 2,4 Dinitrophenol	Entkopplung der ATP-Synthese (DRYSDALE und COHN, 1958; MARTENS, 1985)

Im Anschluss an den Versuch mit 2,4 Dinitrophenol wurden diese Gewebe Temperaturen ausgesetzt, die außerhalb der physiologischen Toleranzen lagen.

#### Anmerkung:

Bei den folgenden Ergebnissen handelt es sich um Einzelbeschreibungen. Aufgrund der Zielsetzung und des Charakters der gemessenen Daten entfällt eine weitergehende statistische Auswertung.

# 5.1 Messung der Grunddaten

Die ersten Messungen fanden an Epithelien statt, die über die gesamte Versuchsdauer unter konstanten Bedingungen gehalten wurden.

Die Gewebe blieben zehn Minuten unter "open-circuit" - Bedingungen, dann folgte 30 Minuten lang die Messung unter "short-circuit" - Bedingungen. Als Abschluss wurden in der 40. Versuchsminute serosal 100 µl 3 - molarer KCI-Lösung zugegeben. Danach lief die Messung noch mindestens weitere 15 Minuten.

Es wurden zur Ermittlung der Grunddaten insgesamt 23 Epithelien gemessen, und im Anschluss darauf hin überprüft, ob die Ergebnisse plausibel erschienen. Als unplausibel sollten Messungen gewertet werden, für die galt:

Leitfähigkeit:	20 mS • cm <sup>-2</sup>	< <b>G</b> <sub>t</sub> <	2 mS • cm <sup>-2</sup>
Kurzschlussstrom:	0 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>	<   <sub>sc</sub> <	-1 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>

Auch Gewebe, deren Messwerte während des Versuchverlaufs innerhalb dieser Toleranzen in kurzer Zeit sehr starken Sprüngen unterlagen, wurden von einer weiteren Wertung ausgeschlossen. In den folgenden Abschnitten, in denen die Gewebe den verschiedenen Einflüssen unterlagen, kamen die gleichen Kriterien zum Einsatz, bevor die Verlaufskurven gewertet wurden.

Nachdem die 23 Gewebe auf diese Kriterien hin überprüft waren, konnten 10 als plausibel gewertet werden.

Die restlichen 13 Gewebe wiesen, verglichen miteinander, in ihren Messwertverläufen keine Systematik auf, so dass angenommen werden konnte, dass diesen Messungen ein noch nicht näher charakterisierter, unsystematischer Fehler zugrunde lag.

Die 10 Gewebe, die die Kriterien erfüllten, wiesen in den einzelnen Versuchsabschnitten vergleichbare Messwertverläufe auf.

50

# 5.1.1 Leitfähigkeit G<sub>t</sub>

Die gewonnenen 10 plausiblen Messwertverläufe (Abbildung 14) verhielten sich in ihrer Leitfähigkeit wie folgt:



Im "open-circuit" - Bereich wies der Verlauf aller Gewebe die Form von Rechteckskurven auf. Die Messwerte lagen zu Beginn zwischen 2,8 und 15,1 mS • cm<sup>-2</sup>. Bei allen Kurven war bis zum Kurzschluss ein Absinken in ihrem Verlauf zu sehen.

Zum Zeitpunkt des Kurzschlusses wurden die folgenden Werte ausgegeben:

0409Ka4:	2,35 mS • cm <sup>-2</sup>	2108Ka4:	12,66 mS • cm <sup>-2</sup>
0409Ka6:	4,85 mS • cm <sup>-2</sup>	2208Ka4:	3,13 mS • cm <sup>-2</sup>
0509Ka6:	0,95 mS • cm <sup>-2</sup>	2608Ka3:	5,81 mS • cm <sup>-2</sup>
1009Ka1:	9,71 mS • cm <sup>-2</sup>	2608Ka5:	5,59 mS • cm <sup>-2</sup>
1009Ka2:	8,62 mS • cm <sup>-2</sup>	2608Ka6:	4,33 mS • cm <sup>-2</sup>

Für den open circuit Bereich ergibt dies für die Leitfähigkeit einen Mittelwert von 5,8 mS • cm<sup>-2</sup>, bei einer Standardabweichung von 3,04 mS • cm<sup>-2</sup>.

Im "short-circuit" - Bereich nahm der Kurvenverlauf bei sieben der zehn Gewebe einen linearen Charakter an. Der Schwankungsbereich der einzelnen Kurven bewegte sich zwischen 0,1 mS • cm<sup>-2</sup> und 0,9 mS • cm<sup>-2</sup>. Drei der Gewebe zeigten über die Zeit einen leichten Anstieg, vier sanken leicht ab.

Die verbleibenden drei Gewebe verhielten sich uneinheitlich, es waren sowohl starke und schwache Anstiege, einzelne Messwertspitzen, als auch mehr oder weniger schnelles Absinken zu sehen. Vor der Zugabe von KCI wurden die folgenden Werte erreicht. (Die Gewebe, die ein uneinheitliches Verhalten zeigten, sind grau hinterlegt.)

0409Ka4:	3,0 mS • cm⁻²	2108Ka4:	14,9 mS • cm <sup>-2</sup>
0409Ka6:	3,66 mS • cm <sup>-2</sup>	2208Ka4:	2,92 mS • cm <sup>-2</sup>
0509Ka6:	0,4 mS • cm <sup>-2</sup>	2608Ka3:	4,26 mS • cm <sup>-2</sup>
1009Ka1:	9,62 mS • cm <sup>-2</sup>	2608Ka5:	5,95 mS • cm <sup>-2</sup>
1009Ka2:	7,5 mS • cm <sup>-2</sup>	2608Ka6:	9,0 mS • cm <sup>-2</sup>

Es folgte die Zugabe von KCI. Bis auf die Probe 2208Ka4D10 wiesen alle Gewebe danach einen unterschiedlich starken, aber sprunghaften Anstieg ihrer Werte auf. Bei acht Geweben setzte sich der Anstieg mehr oder weniger ausgeprägt bis zum Versuchsende fort (auch bei dem Gewebe, das den anfänglichen Sprung nicht aufwies, war ein Anstieg zu verzeichnen). Zwei Gewebe zeigten nach dem Sprung fast gleich bleibende Werte, wobei eines davon nach der Hälfte der Versuchszeit unter KCI auffällige Messwertschwankungen aufwies. Hier ist eine technische Störung wahrscheinlich.

# 5.1.2 Kurzschlussstrom $I_{sc}$

Betrachtet man die Verläufe des Kurzschlussstromes derselben zehn Kammern (Abbildung 15) ergibt sich folgendes Bild:



circuit" - Bereich findet keine Einspeisung von Strom statt

Im "short-circuit" - Bereich wies der  $I_{sc}$  der einzelnen Gewebe einen weitgehend linearen Verlauf auf. Der Schwankungsbereich blieb über die Versuchsdauer weitgehend konstant. Nur bei den schon in der G<sub>t</sub> auffällig gewordenen Geweben waren Abweichungen von dem linearen Verlauf zu sehen (diese drei sind wieder grau hinterlegt).

Die angegebenen Werte stellen in etwa das Niveau dar, auf dem sich die einzelnen Gewebe bewegten:

0409Ka4:	-0,14 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>	2108Ka4:	-0,05 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>
0409Ka6:	-0,17 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>	2208Ka4:	-0,21 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>
0509Ka6:	-0,13 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>	2608Ka3:	-0,21 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>
1009Ka1:	-0,35 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>	2608Ka5:	-0,28 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>
1009Ka2:	-0,2 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>	2608Ka6:	-0,27 µeq • cm <sup>-2</sup> • h <sup>-1</sup>

Von den 10 Epithelien reagierten 5 auf die Zugabe der hypertonen KCI-Lösung mit einem kontinuierlichen Abfall des eingespeisten Kurzschlussstromes. Bei einem Gewebe war das Absinken nicht eindeutig. Drei Gewebe reagierten nicht mit einer Änderung der Werte und nur eines zeigte einen deutlichen Anstieg (2108Ka4) der Messwerte. Dieses Epithel war auch das einzige, das, etwa nach der Hälfte der "short-circuit" – Zeit, positive Stromwerte produzierte. Eine zeitlich korrelierende Veränderung in der G<sub>t</sub> war nicht auszumachen.

#### 5.2 Messungen unter Zugabe von Ouabain

Der erste Versuchsteil verlief wie die Erfassung der Grunddaten, allerdings wurde ab der 19. Minute Ouabain zur Hemmung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase zugegeben (SCHATZMANN, 1953; MARTENS et al., 2001). Zuerst erfolgte dies nur serosal, dann folgte der KCI - Test. In einer weiteren Versuchsanordnung wurde Ouabain dann serosal und mucosal ohne KCI - Test zugegeben. In beiden Fällen war die Lösung nach der Zugabe im Ouabain - Anteil 0,1 mmolar.

# 5.2.1 Messungen mit Ouabain serosal und KCI mucosal

Die Gewebe werden wie folgt benannt:

- 1002Ka3 (1)
- 1002Ka5 (2)
- 1002Ka6 (3)

In der 19. Minute wurde Ouabain zugegeben, in der 43. Minute KCI.

# Leitfähigkeit G<sub>t</sub>

Die drei Gewebe, die serosal Ouabain ausgesetzt wurden, reagierten unterschiedlich (Abbildung 16):



Die G<sub>t</sub> der Gewebe reagierte nach der Ouabain - Zugabe entweder gar nicht (Gewebe 1), treppenstufenartig (Gewebe 2) oder wenig eindeutig (Gewebe 3). Wenn bei Gewebe 3 überhaupt eine Änderung der Werte abzulesen war, so blieb der Effekt weitgehend vom Schwankungsbereich überlagert und blieb auch nicht über den ganzen Zeitraum der Ouabain - Wirkung erhalten, die Werte fielen wieder auf das Niveau vor der Zugabe ab. Gewebe 1 zeigte auch keine Reaktion auf KCI, so dass hier von einem (noch nicht näher charakterisierbaren) Fehler in der Messeinrichtung auszugehen ist.

Folglich ist Gewebe 2 das einzige der drei Gewebe, bei dem ein Effekt von Ouabain zu sehen war: Die Messwerte stiegen nach der Zugabe zunächst sprunghaft, danach langsamer an.

# Kurzschlussstrom Isc

Der zugehörige Kurzschlussstrom (Abbildung 17) der drei Gewebe:

Hier lassen sich ähnliche Verhältnisse der Kurven zueinander finden wie zwischen den Kurven für die Leitfähigkeit.



59

Gewebe 1 reagierte auf keinen der gesetzten Einflüsse, so dass hier eine Störung zu Grunde zu liegen schien. Bei Gewebe 2 war über den gesamten Wirkzeitraum des Ouabain scheinbar ein Effekt zu erkennen: Sowohl G<sub>t</sub> als auch I<sub>sc</sub> stiegen an. Auf die KCI Zugabe hingegen stieg die G<sub>t</sub> weiter an, während der I<sub>sc</sub> wieder, und jetzt verstärkt, abfiel. Prinzipiell das gleiche ist bei Gewebe 3 der Fall: Auf Ouabain war zunächst ein Anstieg in G<sub>t</sub> und I<sub>sc</sub> zu sehen (wenn auch nicht über den gesamten Zeitraum), nach der KCI – Zugabe stieg die G<sub>t</sub> weiter, während im Strom ein starker Abfall zu sehen war.

### 5.2.2 Messungen mit Ouabain serosal und mucosal

Die Gewebe werden wie folgt benannt:

- 0302Ka6 (1)
- 0402Ka3 (2)
- 0402Ka5 (3)

Zugaben von Ouabain fanden in der 19. Minute serosal und in der 43. Minute mucosal statt.

# Leitfähigkeit G<sub>t</sub>

Gewebe 1 zeigte bei geringsten Schwankungen einen stufenartigen Verlauf (Abbildung 18), bei dem die Stufen in engem zeitlichem Zusammenhang mit den Ouabain - Zugaben lagen.



Bei den beiden anderen Geweben waren diese Effekte nicht eindeutig nachweisbar, da sie größtenteils vom Schwankungsbereich der Messungen überlagert wurden. Auch der zeitliche Zusammenhang mit den Zugaben ist nicht so deutlich wie bei Gewebe 1.

### Kurzschlussstrom Isc

Der stufenartige Verlauf bei Gewebe 1, der bei der Aufzeichnung der Leitfähigkeit zu sehen war, lässt sich hier nicht mehr nachvollziehen (Abbildung 19). Alle drei Messkurven liegen eng beieinander und zeigen nur geringfügige Änderungen.



63

Die drei Gewebe zeigten uneinheitliche Reaktionen: Gewebe 1 reagierte gar nicht ( im Gegensatz zu seinem Verhalten in der  $G_t$  ); Gewebe 2 nur auf die serosale Zugabe ( vorher zeigte es allerdings schon unerklärliche Irritationen ) und Gewebe 3 reagierte nicht erkennbar.

Als Fazit bleibt zu sagen, dass unter Einfluss von Ouabain keine eindeutigen und reproduzierbaren Reaktionen des Amnion, weder in der Leitfähigkeit noch im Kurzschlussstrom, zu verzeichnen waren.

# 5.3 Messungen unter Zugabe von 2,4 Dinitrophenol

Aufgrund der nicht befriedigenden Ergebnisse unter Ouabain, wurde beschlossen, 2,4 Dinitrophenol (DNP) als unselektiven Hemmstoff der ATP-Synthese (DRYSDALE und COHN, 1958; MARTENS, 1985) einzusetzen, um aktive, ATPabhängige, elektrogene Ionentransporte zu beeinflussen. Die Unterbindung der ATP-Synthese müsste nach kürzester Zeit zu einer Hemmung jeglicher aktiver Transportmechanismen führen, was sich auf jeden Fall in den elektrophysiologischen Parametern widerspiegeln sollte. Im Gegensatz zu Ouabain ist gegen DNP keine herabgesetzte Reaktivität bekannt.

Die Pufferlösung wurde in der 20. Minute serosal und mucosal auf eine Konzentration von 0,1 mmol 2,4 Dinitrophenol gebracht. Die Daten wurden bis zur 40. Minute allein unter dem Einfluss von DNP belassen. Die Gewebe werden wie folgt benannt:

- 0605Ka1 (1)
- 0605Ka2 (2)
- 0605Ka3 (3)
- 0605Ka5 (4)
- 0605Ka6 (5)

# 5.3.1 Leitfähigkeit G<sub>t</sub>

Unter der Wirkung von DNP (Abbildung 20) waren keine eindeutigen und einheitlichen Veränderungen der G<sub>t</sub> im zeitlichen Verlauf zu verzeichnen:



Die Gewebe 2, 3 und 5 zeigten keine Reaktion auf DNP. Bei Gewebe 1 und 4 war im "short circuit" - Bereich schon eine eindeutige Tendenz zum Absinken der Werte sichtbar, diese blieb unter DNP erhalten, ließ aber in der Geschwindigkeit des Absinkens etwas nach.

# 5.3.2 Kurzschlussstrom Isc

Auch im Kurzschlussstrom blieben eindeutige Veränderungen auf DNP (Abbildung 21) aus. Die Kurven verhielten sich uneinheitlich.



1.) "open circuit"; 2.) "short circuit"; 3.) DNP – Wirkung

Da diese Daten nicht die erwarteten Veränderungen zeigten, das Epithel aber auf jeden Fall auf DNP hätte reagieren müssen, lag schon während der Versuchszeit der Schluss nahe, dass es sich bei den aufgezeichneten Daten um technisch bedingte Artefakte handeln könnte. Aus diesem Grund wurden die noch im Versuch befindlichen Gewebe zeitgleich sich ändernden Temperaturen ausgesetzt. Die einzelnen Epithelien waren zu diesem Zeitpunkt mit Sicherheit durch das DNP abgetötet. Somit würden jetzt auftretende Veränderungen eindeutig die Dimensionen des rein technischen Einflusses der Messeinrichtung auf die bisher erhaltenen Daten darstellen.

# 5.4 Messungen bei Temperaturänderung – nach DNP - Zugabe

Da alle im Versuch befindlichen Gewebe über Schläuche aus einem gemeinsamen Wasserreservoir von einem zentralen Heizelement mit Wärme versorgt wurden, konnte die Temperaturregulierung zentral und für alle Gewebe gleichmäßig und gleichzeitig erfolgen.

Der Ablauf sah vor, das zirkulierende Heizwasser auf 45°C aufzuheizen und dann langsam wieder bis unter 30°C abkühlen zulassen. Wegen einer technischen Störung schaltete sich zum Zeitpunkt 00:47:30 h das Heizelement aus. Dieser Umstand wurde genutzt, um nach der anfänglichen Erwärmung eine langsame Abkühlphase bis 26°C einzulegen. Danach wurde die Heizung wieder zugeschaltet und nach Erreichen von 45°C eine schnelle Abkühlungsphase eingeleitet. Zur beschleunigten Abkühlung wurde Eiswasser in das Wasserreservoir gegeben. Der Ablauf ist im Folgenden als Übersicht dargestellt:

Versuchszeit [h]	
00:20:00	Zugabe DNP 0,1mmol
00:40:00	Heizung auf 45°C
00:47:30	Ausfall der Heizung
01:33:00	Temp. 26°C erreicht
01:33:06	Heizung auf 45°C
01:56:00	Temp. 45°C erreicht
01:57:00	Eiszugabe
02:06:00	Temp. 26°C erreicht

Die Benennung der einzelnen Gewebe erfolgt wie im Abschnitt "Messungen unter DNP".

# 5.4.1 Leitfähigkeit G<sub>t</sub>

Bereits kurz nach Beginn der Temperaturerhöhung begannen die Messwerte zu steigen und es zeichnete sich ab, dass der Einfluss der Temperatur stärker ausfallen würde als die bisherigen chemischen Einflüsse (Abbildung 22).



**1.** Aufheizphase (00:40:00 bis ca. 00:47:30): Bei allen Geweben steigen die Werte an. Die Ausprägung der G<sub>t</sub> - Erhöhung ist umso stärker, je höher das Ausgangsniveau der G<sub>t</sub> war.

Langsame Abkühlungsphase (ca. 00:47:30 bis 01:33:06): Die Werte fallen bei allen Geweben. Bei den Geweben 1 und 5, wo die Erhöhung zuvor besonders deutlich war, ist die Form des Absinkens identisch mit der Form eines Temperaturverlaufs, wie er sich beim Abkühlen einer Flüssigkeit darstellt (Abklingfunktion).

Auch Gewebe 4 lässt diese Form noch erkennen. Bei den anderen beiden Geweben war die Ausprägung zu schwach, um dies eindeutig sehen zu können. Zum Ende der Abkühlungsphase (annähernd bei  $26^{\circ}$ C) lag die G<sub>t</sub> bei allen deutlich unter den Ausgangswerten bei einer Inkubationstemperatur von  $38,5^{\circ}$ C.

**2.** Aufheizphase (01:33:06 bis ca. 01:56:00): Mit der steigenden Temperatur stiegen auch die Werte wieder an, und zwar in der gleichen Geschwindigkeit wie die Temperaturerhöhung stattfand. Zumindest wird diese Proportionalität nahe gelegt, wenn man bedenkt, dass der Temperaturanstieg durch das Heizgerät schneller erfolgt und vor allem linear stattfindet. Gleiches spiegeln auch die Graphen der G<sub>t</sub> in diesem Zeitraum wider. Im letzten Viertel der Erwärmung (über 40°C) ist der Anstieg der G<sub>t</sub> noch mal stärker. Dies könnte auch mit der zunehmenden Erwärmung der KCI-Brücken und deren dadurch erhöhter Leitfähigkeit zu tun haben. Wie in der ersten Heizphase sind die Auslenkungen der Kurven umso höher, je höher die Ausgangswerte der Gewebe vor der Temperaturerhöhung waren.

**Schnelle Abkühlungsphase:** Nach Zugabe von Eiswasser in das gemeinsame Temperierungsbad sanken die Werte zunächst sehr schnell linear, nahmen dann aber wieder die Form der exponentialen Abklingfunktion, vergleichbar zur ersten Abkühlphase an ( allerdings verkürzt / analog zu dem schnelleren Temperaturabfall ). Die Endwerte bei den zuletzt erreichten 26°C lagen ungefähr in dem Bereich, in dem sich die G<sub>t</sub> auch bei 26°C nach der ersten Abkühlung befand. Die beiden Gewebe, die sehr starke Auslenkungen nach oben gezeigt hatten, waren noch nicht wieder ganz bei ihren 26°C – Werten angelangt, näherten sich diesen aber immer noch deutlich an, als der Versuch beendet wurde.

# 5.4.2 Kurzschlussstrom $I_{sc}$

Auch im I<sub>sc</sub> ließ sich bereits kurz nach Beginn der Temperaturänderung absehen, dass die Dimensionen der Änderung der Messwerte größer sein würden als während der chemischen Beeinflussung (Abbildung 23).



Prinzipiell lassen sich, umgekehrt proportional, im Strom die gleichen Verhältnisse wieder finden, die auch in der G<sub>t</sub> zu finden waren. Die dortige Beschreibung der Kurvenverläufe (0) kann also auf die Kurzschlussströme übertragen werden. Was allerdings auffällt ist, dass die Stärke der I<sub>sc</sub> und die Ausprägung ihrer Stromänderungen sich etwas anders verhalten als in der G<sub>t</sub>.

In der folgenden Gegenüberstellung werden die Gewebe in der Reihenfolge ihres Niveaus in  $G_t$  und Strom in eine Reihenfolge gebracht ( "starke" über "schwachen" Geweben ).

Gt	I <sub>sc</sub>
Gewebe 5	Gewebe 5
Gewebe 1	Gewebe 2
Gewebe 4	Gewebe 4
Gewebe 3	Gewebe 1
Gewebe 2	Gewebe 3

Im Gegensatz zur G<sub>t</sub>, bei der die Gewebe mit der höheren Grundleitfähigkeit auch auf die Änderung der Temperatur am stärksten reagieren ( nämlich die Gewebe 5, 1 und 4), ist dieses Verhältnis zwischen Grundbetrag und Höhe der Änderung in  $I_{sc}$ nicht zu finden. Hier ist die Reihenfolge der Gewebe weitgehend eine andere.

Der im Kapitel 0 angegebene Mittelwert der Leitfähigkeiten in erhöht sich unter Einbeziehung aller als plausibel gewerteten Gewebe in allen Versuchsabschnitten auf 6,1 mS • cm<sup>-2</sup>. Die Standardabweichung beträgt dann 3,35 mS • cm<sup>-2</sup>