

## 6 DISKUSSION

Diese Arbeit hatte zum Ziel, die elektrophysiologischen Eigenschaften des Hühneramnions zu charakterisieren. Die Charakterisierung sollte als erster Schritt dem Verständnis der Funktionen des Amnions auf epithelialer Ebene dienen.

Zu den Funktionen zählen sowohl der Schutz des Embryos durch Flüssigkeitsansammlung als auch die Bildung und Erhaltung der für die Entwicklung geeigneten Umgebung mit ihrer definierten stofflichen Zusammensetzung ( siehe unter: 0 )

Für die Regulation der stofflichen Zusammensetzung und auch für die Ansammlung der entsprechenden Menge an Amnionflüssigkeit spielen die epithelialen Eigenschaften des Amnions eine zentrale Rolle.

Für die Untersuchung in der Ussing - Kammer musste zunächst ein geeignetes Zeitfenster bestimmt werden. Es kam darauf an, dass während des Untersuchungszeitraums eine hohe Aktivität am Amnion vorzufinden war. Auch die Isolierbarkeit von anderen Anteilen des Eis, sowie eine ausreichende Größe und mechanische Belastbarkeit mussten gegeben sein ( siehe unter 0 ). Nachdem aus den Literaturangaben ein Zeitrahmen von D7 bis D11 abzuleiten war, sollte dieser in eigenen Vorversuchen auf die zwei am besten geeigneten Bebrütungstage reduziert werden. Während der Vorversuche wurde auch ein sicherer und schonender Präparationsweg entwickelt ( siehe unter 0 ). Nach Auswertung der Vorversuche wurden die Bebrütungstage D9 und D10 als Versuchstage festgelegt.

Zur Erfassung der Elektrophysiologie des Amnions sollten zunächst die elektrophysiologischen Grunddaten des Gewebes, wie das anstehende Potential ( $PD_t$ ), der Strom ( $I_{sc}$ ) und die Leitfähigkeit ( $G_t$ ) ermittelt und durch geeignete Versuche gesichert werden. Die Sicherung kann durch Hemmung von Transportern erfolgen, die als aktive Transportmechanismen in den meisten bekannten Geweben vorkommen und dort für das Membranpotential von Bedeutung sind.

In der vorliegenden Untersuchung wurde sich für Ouabain und 2,4 Dinitrophenol ( DNP ) entschieden. Ouabain hemmt selektiv die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (SCHATZMANN, 1953; MARTENS et al., 2001), während DNP die ATP-Synthese entkoppelt (DRYSDALE und COHN, 1958; MARTENS, 1985) und dadurch binnen kurzer Zeit die aktiven Transporte durch Energiemangel zum Erliegen bringt. Übertragen auf das Gewebe bedeutet dies, dass unter Wirkung der Hemmstoffe weniger, bzw. bei DNP keine, Ionen mehr aktiv über die Fruchthülle transportiert werden. Damit muss der Kurzschlussstrom, der das Äquivalent für die Menge an transportierten Ionen darstellt, reduziert werden.

Für den Fall, dass die eingesetzten Gewebe sich genau so verhalten würden, wäre dies die Bestätigung dafür, dass es sich bei den vor der Zugabe aufgezeichneten Werten um wirklich vom Epithel erzeugte elektrophysiologische Daten handelt und nicht um Artefakte, die von der Messeinrichtung verursacht wurden. Des Weiteren wäre durch eine Reaktion auf Ouabain nachgewiesen, dass somit die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im Hühneramnion vorkommt und in den Ionentransport einbezogen ist.

Die Reaktion auf DNP ließe dagegen keinen Schluss auf einen bestimmten Transporter zu. Dafür ist es bei der Anwendung von DNP wahrscheinlicher, dass überhaupt ein Abfall im Strom eintritt und damit Artefakte in der Messung ausgeschlossen werden können. Auch in diesem Fall wäre davon auszugehen, dass die tatsächlichen elektrophysiologischen Werte ausgegeben wurden.

Die Versuche zur Messung der Grunddaten wurden zunächst ohne Zugaben von Hemmstoffen durchgeführt.

Zum Nachweis von Schäden in den Fruchthüllen wurden zwei Wege eingeschlagen:

Vor Ende der Versuche wurde serosal 100  $\mu\text{l}$  hochmolare KCl-Lösung zupipettiert. Diese Zugabe hatte zum Ziel durch die einseitig erhöhte Ionenkonzentration eine extreme Reaktion der Messwerte zu provozieren. Diese Reaktion kann dann im zeitlichen Verlauf betrachtet werden. Der Theorie nach müsste bei intaktem Gewebe der Konzentrationsunterschied zwischen serosal und mucosal erhalten bleiben. Folglich müssten sich die Messwerte auf einem neuen Niveau einstellen.

Im Gegensatz dazu wäre bei größeren Läsionen im Gewebe davon auszugehen, dass sich die Werte nach einer gewissen Auslenkung wieder auf ihr altes Niveau zurückbewegen würden. Der KCl - Test sollte demnach eine Art Dichtigkeitsprobe darstellen, da eine histologische Untersuchung der Epithelien nach dem Versuch unmöglich war. Die Gewebe wurden prozessbedingt bei der Entnahme aus der Kammer irreversibel zerstört.

Eine weitere Prüfung der Fruchthülle auf Schäden erfolgte mit Hilfe des Farbstoffs Phenolrot. Dieser wurde ab Messbeginn auf einer Seite in den Untersuchungspuffer gegeben, um auch so nicht sichtbare Schäden in den Fruchthüllen aufzudecken. In dem Falle müsste sich die rote Farbe theoretisch auf beide Puffersäulen verteilen. Dies war jedoch auch bei Epithelien kaum der Fall, bei denen der Computer die Messungen selbständig wegen größerer Defekte abbrach.

Deshalb wurde dieser Ansatz, auch wegen seiner schlechten Objektivierbarkeit, wieder fallen gelassen.

### **Zu den Grunddaten:**

Nach dem Start der ersten Versuche wurde von allen in der Messung befindlichen Geweben bzw. Kammern, eine Potentialdifferenz ausgegeben. Sie war mit Werten zwischen 0,1 mV und 1,5 mV ( in Maximalwerten bis selten über 5,0 mV ) zwar gering, ließ aber den Schluss zu, dass ein Ionentransport über das Amnion stattfand. Mit dem angegebenen Schwankungsbereich liegt die Potentialdifferenz innerhalb des Bereiches der Eigenpotentialschwankungen der Messapparatur ( PD -2 mV bis 0 mV ).

Betrachtet man die Verläufe der Leitfähigkeit und des Stromes in Abbildung 14 und 15, so sehen die Ergebnisse zunächst viel versprechend aus. Sie zeigen, abgesehen von einigen Auslenkungen, ein vergleichbares Verhalten über den Messzeitraum, auch ihre jeweiligen absoluten Größen variieren in überschaubaren Grenzen.

Allerdings sind die Ströme sehr klein, bei relativ großer  $G_t$ . Dies bedeutet, dass von dem durchlässigen Epithel ( „leaky“ - (BARA und GUIET-BARA, 1981) ) bei kleiner Potentialdifferenz sehr wenige Ionen transportiert werden.

Betrachtet man die Leitfähigkeit über den „short-circuit“ - Bereich der einzelnen Gewebe, so verhielten sie sich uneinheitlich, es war sowohl ein Ansteigen als auch ein Absinken im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Manche Gewebe zeigten auch mehrfache Abweichungen. Bei den dazugehörigen Strömen sind diese Abweichungen ebenfalls zu finden. Auch nach der KCl - Zugabe reagierten die Gewebe uneinheitlich:

In der  $G_t$  wurde ein sprunghafter Anstieg der Werte sichtbar, dieser setzte sich bei sechs Geweben etwas langsamer aber kontinuierlich während des weiteren Versuchsablaufs fort, die anderen Gewebe hielten ihr erreichtes Niveau. Der Kurzschlussstrom von fünf Geweben fiel ab, einer stieg an und drei blieben in etwa auf ihrem Niveau. Daraus wird deutlich, dass sich das Verhalten der Gewebe in ihrer Leitfähigkeit nicht mit dem ihrer Ströme deckt.

Dieser Umstand soll zu einem späteren Zeitpunkt noch diskutiert werden ( s.u. ).

#### **Zur Verifikation der Grunddaten:**

Das nächste Ziel war, durch die Zugabe von Hemmstoffen den Kurzschlussstrom durch Ausschalten von aktiven Transportmechanismen zu reduzieren. Dazu wurde zuerst Ouabain eingesetzt.

Diese Versuche wurden untergliedert in einen Versuchsablauf mit Ouabain auf der serosalen Seite mit anschließendem KCl - Test und einen Ablauf mit serosaler und zusätzlich späterer mucosaler Ouabain - Zugabe.

Von den drei Geweben im ersten Versuchsablauf ( Abbildung 16 und 17 ) verhielt sich nur eines wie erwartet, sein Kurzschlussstrom stieg leicht an und bewegte sich damit gegen Null. Auch die zugehörige Leitfähigkeit stieg unter Ouabain leicht. Unter KCl dagegen drehten sich diese Effekte um. Die  $G_t$  stieg weiter, während  $I_{sc}$  negativer wurde. Auch dieses widersprüchliche Verhalten von  $G_t$  und  $I_{sc}$  soll später diskutiert werden. Das zweite Gewebe zeigt auf keinen gesetzten Einfluss eine Reaktion. Beim dritten Gewebe war zwar anfangs ein Ansteigen des Stroms sichtbar, aber nicht von längerer Dauer. Die zugehörige Leitfähigkeit ließ auch eher auf eine technische Störung in dieser Messeinrichtung schließen, da die Werte sehr hoch und instabil waren.

Der zweite Versuchsablauf mit Ouabain serosal und danach mucosal ( siehe Abbildung 18 und 19 ) verlief ebenfalls ohne sicheres Ergebnis. Ein Gewebe zeigte nur in der Leitfähigkeit eine sichtbare Reaktion. Die beiden anderen wiesen keine Effekte auf, die den vorherigen Schwankungsbereich überstiegen.

Demnach traten unter Ouabain keine eindeutigen und reproduzierbaren Reaktionen auf. Für die Studie bedeutet das, dass die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase entweder im Hühneramnion nicht ausgeprägt ist, auf die Transportphysiologie keinen großen Einfluss ausübt, oder dass sie nicht auf Ouabain sensibel reagiert. Im ungünstigsten Fall bedeutet das Nicht - Reagieren, dass die ausgegebenen Werte ausschließlich Messartefakte darstellen, die dann natürlich auch nicht über Hemmstoffe beeinflussbar sind.

Nun wurde deshalb auf den nicht selektiven Hemmstoff DNP zurückgegriffen, der durch seine entkoppelnde Wirkung auf die Atmungskette alle energieabhängigen Transportmechanismen zum Erliegen bringen sollte. Fünf Gewebe wurden diesem Hemmstoff ausgesetzt. Während des „short-circuit“ - Bereichs stellten sich zwei Gewebe noch auf ihr Niveau ein, als die DNP - Zugabe erfolgte. Bei allen fünf Kammern wurde noch während des Versuchs offensichtlich, dass sich auch auf das unspezifisch wirkende DNP keine Reaktion abzeichnete ( Abbildung 20 und 21 ). So konnte ausgeschlossen werden, dass das Nicht - Reagieren der Werte nur auf Ouabain zurückging.

Dadurch zeichnete sich ab, dass es sich bei den bisher gemessenen Werten aller Versuche um technisch bedingte Artefakte handeln müsse. Um dies zu verifizieren, sollte noch an denselben abgetöteten Geweben ein abschließender Versuch durchgeführt werden.

Ziel dieses Versuches war, die Dimension der rein technischen Einflüsse der Messeinrichtung auf die Versuche darzustellen. Es wurde daher entschieden, das Verhalten unter Erhöhen und unter Absenken der Temperatur zu beobachten. Analog zur RGT - Regel sollte so überprüft werden, ob stärkere Auslenkungen in den Messwerten auch bei abgetötetem Gewebe zu produzieren seien. Diese wären dann allein auf die Messtechnik zurückzuführen.

Sehr schnell wurde deutlich, dass schon geringe Temperaturänderungen wesentlich größere Auslenkungen der „Gewebewerte“ erzielten (Abbildung 22 und 23), als Reaktionen aufgrund der chemisch gesetzten Einflüsse zu verzeichnen waren. Die Auslenkungen verliefen auch sehr einheitlich: Je höher das Ausgangsniveau einer Kammer war, desto deutlicher fielen auch die Änderungen im Kurzschlussstrom und in der Leitfähigkeit aus. Die Werte verliefen eindeutig analog zueinander und zu den Temperaturänderungen, auch beim Abkühlen stellten sie sich wieder auf dem Niveau vor der Temperaturänderung ein. Dabei entsprach die Form des Werteverlaufs dem exponentiellen Abnehmen der Temperatur einer sich abkühlenden Flüssigkeit.

Durch diesen Versuch wurde belegt, dass die Messeinrichtung zu große technische Einflüsse auf die erhaltenen Werte hat. Damit kann man die in der Studie erhaltenen Werte nicht auf die Elektrophysiologie des Hühneramnions zurückführen.

An dieser Stelle soll der oben bereits angekündigte Umstand aufgegriffen und diskutiert werden, warum sich Reaktionen der Leitfähigkeit und der zugehörigen Kurzschlussströme oft so widersprüchlich verhalten haben könnten.

Nach dem Ohm'schen Gesetz ist der Gewebewiderstand gleich dem Gewebepotential geteilt durch den Kurzschlussstrom:

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

Da die Gewebeleitfähigkeit der Kehrwert des Widerstands ist,

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

folgt daraus:

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

Formt man dieses Verhältnis um, so ergibt sich:

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

Die „short circuit“-Bedingungen besagen, dass die Potentialdifferenz mit Hilfe der gespeicherten Werte aus der „fluid resistance“ auf 0 mV geregelt wird. Wenn man sich die, über den Versuchsverlauf gespeicherten, Potentiale betrachtet, so ändern sich diese nach den Zugaben nicht und schwanken nur sehr gering.

Deshalb kann  $\Delta PD_t$  hier als konstant angesehen werden.

Daraus ergibt sich:

$$\frac{\Delta I}{G_t} = \text{konst.}$$

Wenn nun der Kurzschlussstrom während des Versuchs ansteigt, muss dies automatisch auch für die Leitfähigkeit gelten.

In jedem Versuchsansatz fanden sich jedoch ein oder mehrere Gewebe, die genau dem nicht entsprachen. In diesen Fällen war zu beobachten, dass sich zum Beispiel nach einem Anstieg des Kurzschlussstroms zunächst auch die Leitfähigkeit erhöhte; dann aber nach einer weiteren Zugabe (Hemmstoff oder KCl) der Kurzschlussstrom sank, während die Leitfähigkeit weiter stieg. Dies ist unter der Voraussetzung der konstanten Potentialdifferenz, so wie sie aufgezeichnet wurde, nicht möglich.

Die sicherste Erklärung hierfür sind Unregelmäßigkeiten im Eigenpotential der Messeinrichtung bzw. der Kammern (also der Werte, die in der „fluid resistance“ gespeichert wurden, und um die die aktuellen Messwerte jeweils korrigiert werden). Das bedeutet, dass diese Änderungen des Eigenpotentials als Messwerte des Gewebes empfunden werden und dann von der Messeinrichtung über die Einspeisung von mehr oder weniger Kurzschlussstrom kompensiert werden. Diese veränderten Ströme werden dann als zum Gewebe gehörig dargestellt und verfälschen neben dem Kurzschlussstrom auch die Leitfähigkeit.

Die Schwankungen im Eigenpotential, die auf unterschiedlichste Weise herbeigeführt worden sein können, haben im Fall des Amnionepithels deshalb so große Auswirkungen, weil das Gewebe nur so kleine Potentiale aufbauen kann. Sie sind meist kleiner als das Eigenpotential der Messeinrichtung. Wären sie weit größer als das Eigenpotential, so würden sich dessen Schwankungen nicht so stark auf die Mess- und Berechnungsergebnisse niederschlagen.

Die kleinen Potentiale passen auch ins Bild, wenn man das Amnionepithel als ein relativ undichtes („leaky“) Epithel sieht, das hohe parazelluläre Ionenverschiebungen zulässt, während der aktive transzelluläre Transport im Hintergrund bleibt. Dies wird untermauert durch die Werte, die die Leitfähigkeit während der Versuche angenommen hat. Sie sind, als reziproker Wert des direkt gemessenen Widerstands des Gewebes, als verlässlich anzusehen.

Die  $G_t$  betrug in ihrem Mittelwert, bezogen auf die Grunddaten,  $5,8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ , bei einer Standardabweichung von  $3,40 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Bezieht man alle als plausibel gemessenen Gewebe in diese Rechnung ein, so erhöht sich der Mittelwert auf  $6,1 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ , bei einer Standardabweichung von  $3,35 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Mit solchen Werten für die Leitfähigkeit ( und damit Widerständen von  $172,41 \text{ Ohm}$  bis  $163,9 \text{ Ohm}$  ) ist das Gewebe als sehr durchlässig zu beurteilen.

Bei den sehr kleinen generierten Potentialen ist so der aktive Transport mit der Ussing - Kammer - Methode schwer zu erfassen.

Bereits an dieser Stelle bleibt festzuhalten, dass die Ussing - Kammer als Messeinrichtung für das Amnionepithel nicht geeignet war.

Weitere mögliche Fehlerquellen sind aber noch zu diskutieren.

Zunächst steht die Unversehrtheit des Amnions nach der Präparation zur Diskussion. Der KCl - Test sollte eigentlich größere Schäden in der Fruchthülle ausschließen, zumindest wenn diese mit einer nicht mehr ausreichenden Trennung der Puffersäulen in rechter und linker Kammer einhergehen. Auch makroskopisch wurde das entnommene Gewebe vor dem Verbringen in die Kammer untersucht. Das Problem bleiben feinere Läsionen im Gewebe, die weder sichtbar sind, noch die Verschiebung größerer Flüssigkeitsmengen zwischen den Kammerhälften erlauben. Die Fruchthülle ist mit solchen Schäden aber nicht mehr in der Lage, ihre Ionengradienten aufrecht zu erhalten. Diese Mikroläsionen vor dem Einbau in die Kammer zu erkennen oder definitiv auszuschließen, war mit bei der Zielsetzung und den angewandten Methoden ( s.o. ) nicht möglich. Es wurde allerdings versucht, durch einen möglichst schonenden Umgang mit dem Amnion die auftretenden Belastungen zu minimieren ( siehe 0 ). Durch den Umstand, dass eine histologische Untersuchung nach Versuchsende nicht möglich war, konnten eventuelle Gewebsschäden auch im Nachhinein nicht sicher festgestellt werden.

Theoretisch wäre auch möglich, dass die Fruchthüllen unter der Präparation abstarben, auch wenn versucht wurde, schädigende Einflüsse bei der Präparation zu vermeiden. Eine Lebendfärbung (BAUTZMANN und SCHMIDT, 1960) und entsprechende mikroskopische Untersuchung waren, wegen der damit verbundenen erhöhten Belastung für das Gewebe, nicht möglich.

Diese beiden, das Amnion betreffenden, möglichen Fehlerquellen können somit nicht ausgeschlossen werden und sind deshalb bei zukünftigen Studien vorrangig zu berücksichtigen.

Das gleiche gilt für die technische Seite:

Auch hier sind die möglichen Fehlerquellen, wie das schwankende Eigenpotential, konstruktiv bedingt und deshalb nicht gänzlich zu beseitigen. Generell wurde darauf geachtet, während des laufenden Versuchs keine Einflüsse auf die Messeinrichtung auszuüben.

Zu solchen Einflüssen zählt zum Beispiel die Übertragung statischer Ladungen auf die KCl-Agarbrücken und Ag-AgCl-Elektroden mit den zugehörigen Kabeln ( durch statisch geladene Personen oder Kleidung etc. ). Die Abstände zwischen KCl-Agarbrücken und Gewebe in der Kammer können ebenfalls durch äußere Einwirkungen verändert werden.

Auch diese Fehlerquellen sind trotz des sehr bewussten und vorsichtigen Umgangs mit der Messeinrichtung nicht völlig auszuschließen.

Für die Zielsetzung dieser Studie, ein Grundverständnis der epithelialen Eigenschaften des Amnions herzustellen, hatte die Ussing - Kammer – Technik den Vorteil, dass sie in der Lage ist, sowohl den aktiven zellulären, als auch den passiven parazellulären Transport zu erfassen. Deshalb wurde sich in unserem Falle für die Ussing - Kammer – Technik entschieden.

Für zukünftige Untersuchungen an diesem Thema sind jedoch sensiblere Methoden zu empfehlen.