

## 7 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

### 7.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, das Hühneramnion zum besseren Verständnis seiner Funktionen elektrophysiologisch zu charakterisieren. Die Messungen sollten in der Ussing - Kammer erfolgen.

Zu diesem Zweck musste zunächst ein geeignetes Zeitfenster für die Untersuchungen bestimmt werden. Nach den Literaturangaben und eigenen Vorversuchen wurden die Bebrütungstage D9 und D10 gewählt. Auch eine geeignete Präparationsmethode konnte entwickelt werden. Der Untersuchungspuffer wurde nach Literaturangaben zusammengestellt.

Nach Ende dieser Vorarbeiten sollten die elektrophysiologischen Grunddaten des Gewebes wie die Potentialdifferenz, die Leitfähigkeit und der Kurzschlussstrom, erfasst werden.

Die Prüfung der elektrophysiologischen Parameter erfolgte durch Zugabe von Hemmstoffen, die geeignet waren, die zuvor erfassten Messgrößen zu beeinflussen.

Die erhaltenen Werte zeigten sowohl Potentialdifferenzen als auch Kurzschlussströme. Sie waren jedoch sehr klein und lagen in der Größenordnung der Werte, die die Messeinrichtung von sich aus, also ohne enthaltenes Gewebe, aufweist. Zudem wiesen die Kurvenverläufe teilweise unerklärliche Reaktionen auf. Oft widersprachen sich die Entwicklungen des Kurzschlussstroms und die der zugehörigen Leitfähigkeit.

Zur Überprüfung des Kurzschlussstroms wurde zunächst Ouabain eingesetzt.

Es hemmt selektiv die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase und sollte so die Zahl der aktiv über die Fruchthülle transportierten Ionen reduzieren. In der Folge müsste sich der Kurzschlussstrom abschwächen. Dies trat jedoch nicht systematisch ein. Die Ergebnisse blieben nicht eindeutig und nicht reproduzierbar.

Deshalb wurde der Hemmstoff gewechselt und das nicht selektiv wirkende 2,4 Dinitrophenol kam zum Einsatz. Durch seine entkoppelnde Wirkung auf die Atmungskette verursacht es durch den daraus resultierenden ATP - Mangel binnen

kurzer Zeit die Hemmung aller energieabhängigen aktiven Transportmechanismen. Keines der fünf eingesetzten Gewebe reagierte jedoch eindeutig auf DNP.

Deshalb lag nahe, dass die erhaltenen Daten ausschließlich Artefakte der Messeinrichtung darstellten.

Um dies zu sichern, sollte in einem abschließenden Versuch die Dimension des technischen Einflusses der Messeinrichtung auf die Messwerte dargestellt werden.

Bei laufender Messung wurde die Temperatur des Untersuchungspuffers erhöht und erniedrigt. Die Resultate waren eindeutig, die ausgegebenen Werte verhielten sich exakt analog zu den Temperaturen und schon kleine Temperaturänderungen waren eindeutig an den „Gewebewerten“ abzulesen.

Als grundlegendes Problem wird gesehen, dass das Amnion als leckes Epithel mit der hohen gemessenen Leitfähigkeit und den sehr kleinen Potentialdifferenzen einen hohen parazellulären Transport zulässt. Unter diesen Umständen sind die aktiven Ionenverschiebungen schwer zu erfassen, weil sie zu kleine Potentialdifferenzen generieren

Dadurch, dass die Potentialdifferenzen im Bereich des Eigenpotentials der Messeinrichtung liegen, haben kleine Schwankungen im Eigenpotential sehr große Auswirkungen auf die Messergebnisse. So erklären sich auch die häufigen Widersprüche zwischen den Reaktionen der Leitfähigkeit und denen des zugehörigen Kurzschlussstromes.

Es muss in Hinsicht auf weitere Untersuchungen am Amnion festgestellt werden, dass die Ussing - Kammer als Messeinrichtung zur Erfassung der Elektrophysiologie des Hühneramnions nicht geeignet ist.

## 7.2 Summary

### **Experiments to characterize the chick amnion electrophysiologically using “Ussing” - chamber technique**

It was the aim of this study to characterize the chick amnion electrophysiologically using “Ussing” - chamber experiments.

To this end, it was first necessary to establish an appropriate time window for the examinations. According to literature data and preliminary experimental data, incubation days D9 and D10 were chosen. Furthermore, an adequate preparation technique was established. The experimental buffer system was assembled according to literature data.

After clarifying these methodological questions, it was the aim to record basic data such as potential difference, conductance and short circuit current for the chick amnion. The validation of the ascertained electrophysiological parameters was performed using inhibitor substances capable of influencing the measurement parameters established earlier.

The values determined exhibited potential differences as well as short circuit currents. However, these were very small in quantity and were in the range of the technically induced background signal of the measurement unit. Furthermore, in part, the time curves showed inexplicable progressions. In fact, there was often a contradiction between the developments of the short circuit current and the corresponding conductance.

Ouabain was used to validate the short circuit current. This substance selectively blocks the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase and should therefore reduce the amount of ions actively transported through the amnion, which in turn should reduce the short circuit current. However, this did not occur systematically. The results remained unclear and were not reproducible.

Therefore, the inhibitor substance was altered and 2,4-dinitrophenol, a non-selective inhibitor substance, was used. This substance quickly induces an uncoupling of oxidative phosphorylation and a consecutive loss of ATP, which in turn inhibits all energy dependent active transport mechanisms. However, none of the five tissues employed reacted clearly to DNP.

Consequently, it was probable that the data collected solely represented background artifacts generated by the measurement unit.

To validate this conclusion, a final experiment was conducted to determine the scale of technical influence of the measurement unit on the measurement readings.

During experimental data acquisition, the temperature of the incubation buffer was increased and decreased. The results were unequivocal. The values determined behaved in exact analogy to the temperatures and even small temperature changes were clearly visible in the "tissue values".

It appears that a fundamental lies in the fact that the highly permeable amnion, with a high conductance and very small potential difference, allows a high rate of paracellular transport. Under these circumstances, active ion transport phenomena are difficult to discern, because the generated potential differences are too small in quantity.

Due to the fact that the potential differences are in the same order of magnitude as the electrode potential of the measurement unit, fluctuations of the electrode potential have a great influence on the measurement results. This explains the frequent contradictions between the conductance reaction and the reaction of the corresponding short circuit current.

Regarding further studies of the amnion it has to be concluded that the "Ussing" - chamber is an inappropriate tool for the gathering of electrophysiological data in this tissue.