

## 4. ERGEBNISSE

Der genaue Versuchsansatz wurde bereits im Abschnitt „MATERIAL UND METHODEN“ dargelegt. Wie auch schon dort beschrieben, wurde der Stofftransport anhand der Veränderungen des gemessenen Kurzschlussstroms ( $\Delta I_{SC}$ ) bestimmt.

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

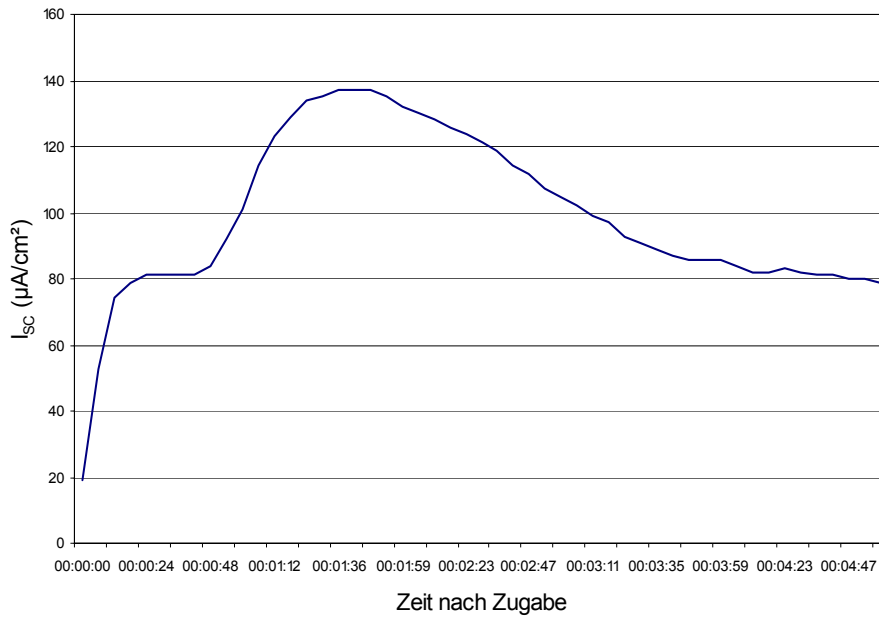
Dadurch wird der elektrische Gradient ausgeschaltet. Wenn gleichzeitig auf beiden Seiten identische Pufferlösungen (= identische Osmolarität) eingesetzt werden, fehlt auch der chemische Gradient. Findet also unter Kurzschlussbedingungen ein Nettotransport statt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen aktiven Transport handelt. In den vorliegenden Versuchen wurde der „aktive Transport“ in der Form des  $I_{SC}$  erfasst, der indirekt den Stofftransport (unterschiedlicher Art) repräsentiert.

### 4.1 Versuchsansatz 1: L-Glutamin – Zugabe

Die während des Versuches pro Kammer gemessenen Werte des  $I_{SC}$  sind in Abbildung 4 beispielhaft dargelegt. Der Spitzenwert (Peak) des Stroms ( $I_{SC}$ ) innerhalb eines definierten Zeitraums (5 Minuten) nach Zugabe einer Lösung wird als  $\Delta I_{SC}$  bezeichnet und in die statistischen Berechnungen einbezogen. Dabei bezieht sich dieser Wert auf einen festgelegten Zeitpunkt (1 Minute) vor der Zugabe.

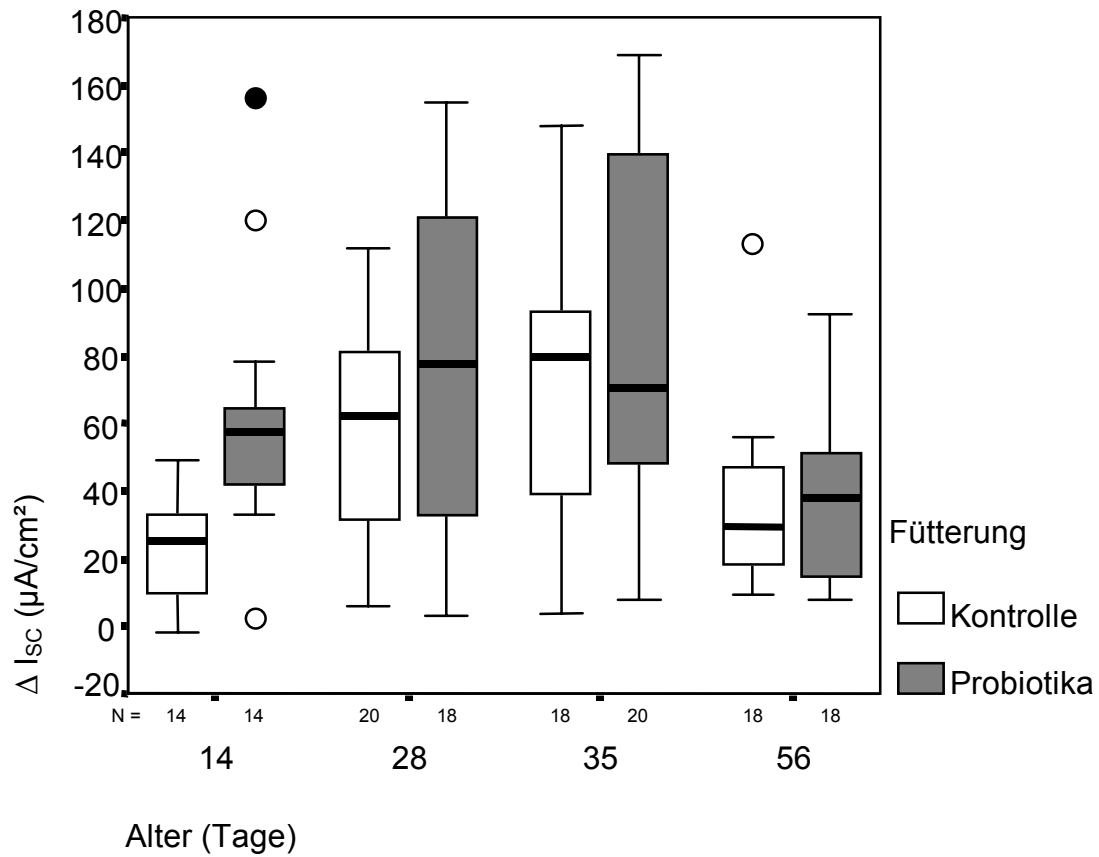
Bei einer vermehrten Absorption von Glutamin (mukosal nach serosal) würde infolge des Ladungstransportes eine Potentialveränderung und damit Veränderungen des  $I_{SC}$  stattfinden. Dies lässt sich anhand der  $I_{SC}$ -Verlaufskurven nachvollziehen.

**Abbildung 4:** Typische Verlaufskurve des  $I_{SC}$  nach Zugabe von L-Glutamin 12 mmol/l mukosal



Bei diesem Versuchsansatz wurde den betreffenden Kammern mukosal 12 mmol/l L-Glutamin zugegeben. Die Veränderung des Kurzschlussstroms innerhalb der ersten fünf Minuten nach Zugabe wurde gemessen und ist in Abbildung 5 für die vier Altersgruppen in der Probiotika- und der Kontrollgruppe dargestellt.

In der Abbildung sind die Extremwerte mit einem Punkt wiedergegeben, die Ausreißer werden mit einem Kreis abgebildet.

**Abbildung 5:**  $\Delta I_{SC}$  nach mukosaler L-Glutamin-Zugabe

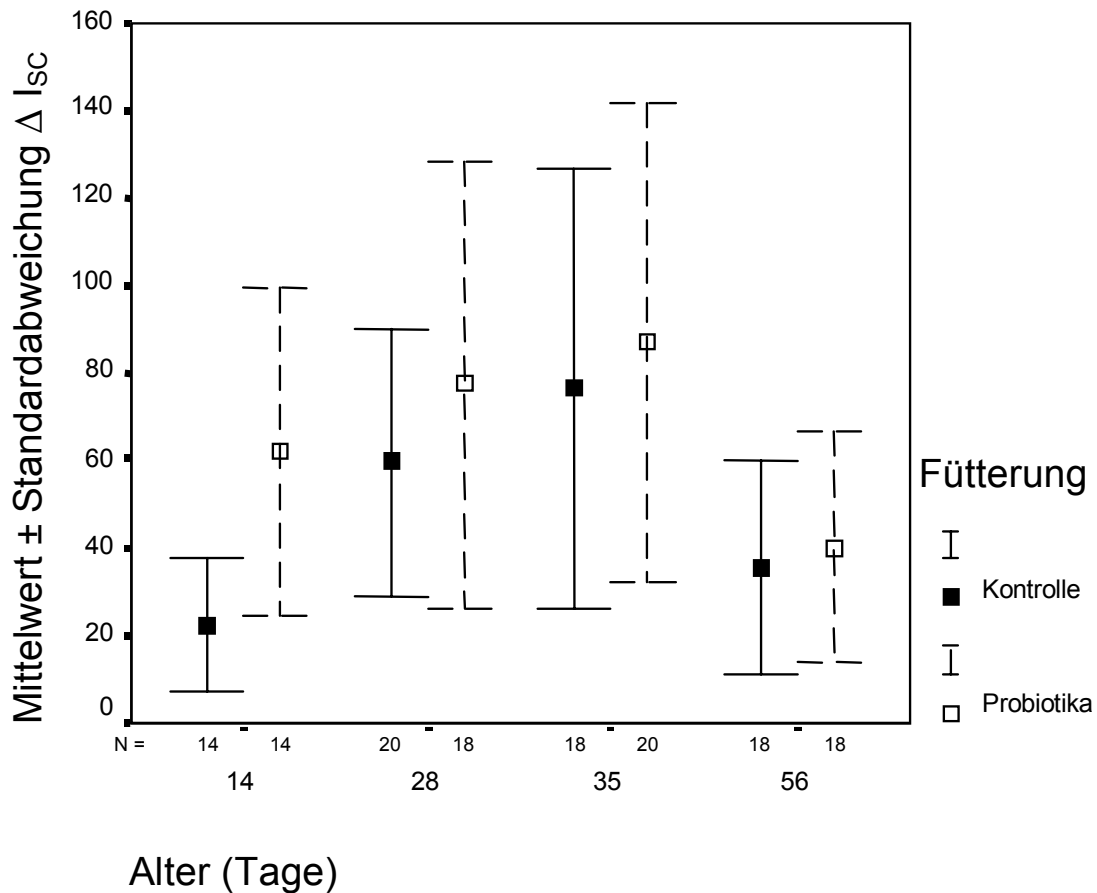
Wie in der Abbildung 6 ersichtlich, liegen die ermittelten Werte von  $\Delta I_{SC}$  der mit Probiotika behandelten Tiere in allen Altersgruppen höher als die der Kontrollgruppe. So sind die Mittelwerte der 14 Tage alten Tiere in der Probiotikagruppe mit  $62,07 \pm 9,99$  (SEM)  $\mu A/cm^2$  höher als die Mittelwerte der Kontrollgruppe mit  $22,43 \pm 4,12$  (SEM)  $\mu A/cm^2$ . Dieser Unterschied in den Mittelwerten ist jedoch in der Varianzanalyse nicht signifikant.

Auch der Vergleich der Altersgruppen 28 und 35 Tage ergibt keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Mittelwerte des  $\Delta I_{SC}$  nach L-Glutamin-Zugabe.

Wie ebenfalls aus der Grafik ersichtlich, bestehen große Unterschiede in den Standardabweichungen und damit der Varianzen zwischen den einzelnen Altersgruppen (siehe „ANHANG“).

Dies wird deutlicher, wenn man die Darstellung in Form von Fehlerbalken wählt (Abbildung 6). Es sind die Mittelwerte mit den Standardabweichungen aufgeführt.

**Abbildung 6:** Mittelwerte und Standardabweichungen des  $\Delta I_{SC}$  nach mukosaler Zugabe von 12 mmol/l L-Glutamin

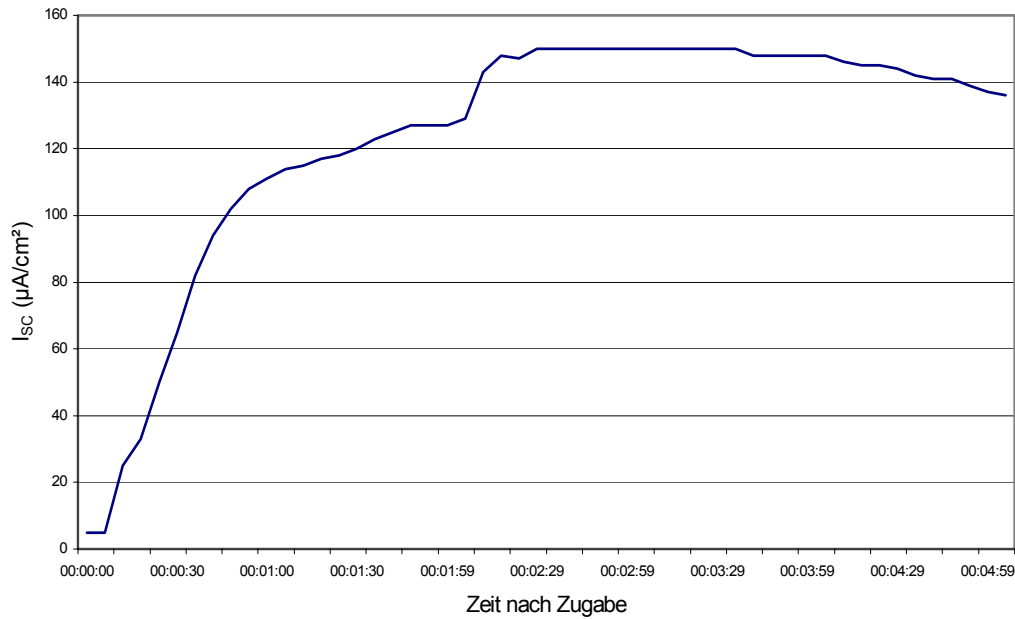


## 4.2 Versuchsansatz 2: PGE<sub>2</sub>-Zugabe

### 4.2.1 PGE<sub>2</sub>: 50 nM

Bei dem Versuchsansatz der Zugabe von PGE<sub>2</sub> wurden vier verschiedene Konzentrationen gewählt, welche im Folgenden einzeln dargestellt werden sollen.

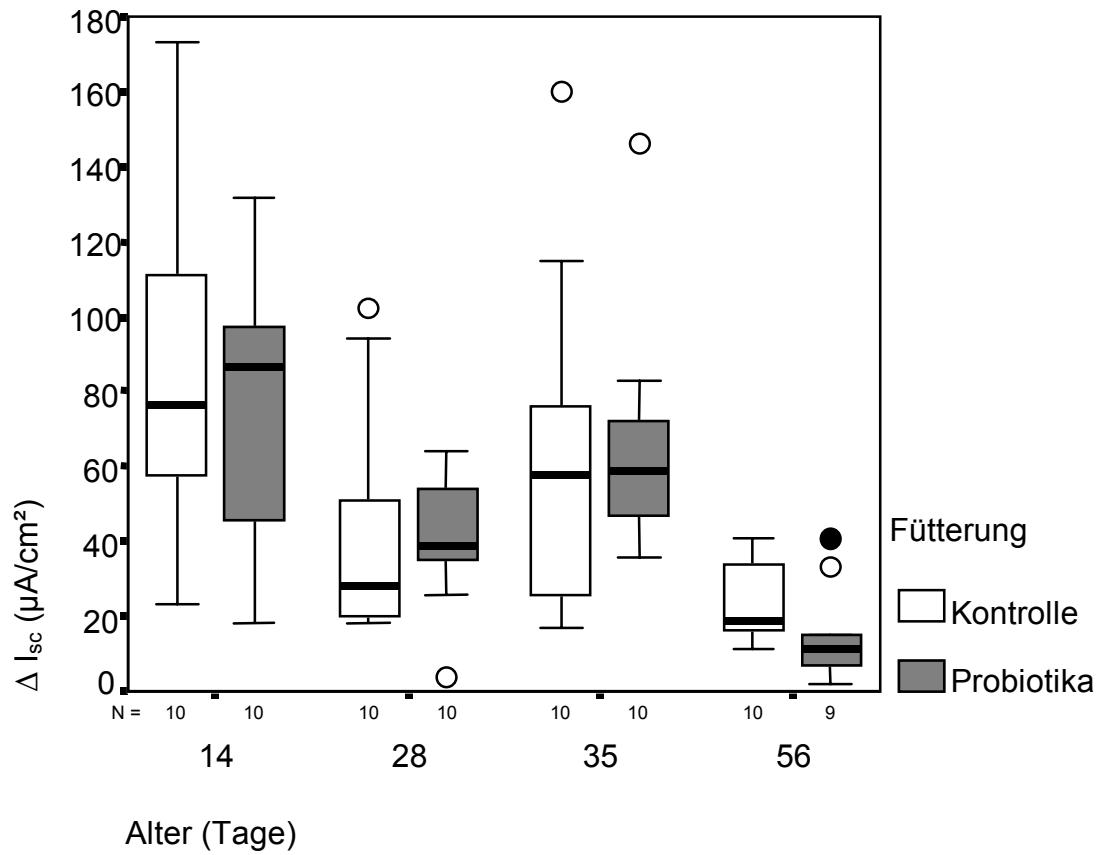
Durch die serosale Zugabe von PGE<sub>2</sub> wird die Chlorid-Sekretion stimuliert, welches sich in einer Veränderung der  $I_{SC}$ -Verlaufskurve bemerkbar macht. Eine typische Verlaufskurve nach PGE<sub>2</sub>-Zugabe zeigt die Abbildung 7.

**Abbildung 7:** Typische Verlaufskurve des  $I_{SC}$  nach Zugabe von 50 nM  $PGE_2$  serosal

Wie im Abschnitt „LITERATUR“ arbeitshypothetisch bereits beschrieben, sollte sich die Schutzfunktion des Probiotikums bei diesem Versuchsansatz in einer verringerten Chlorid-Sekretion darstellen. Wie aus der folgenden Abbildung ersichtlich, ergeben sich (außer bei der Altersgruppe der 28 Tage alten Tiere) tendenziell niedrigere Werte des  $\Delta I_{SC}$  der Probiotika-gefütterten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es liegen jedoch statistisch keine signifikanten Unterschiede vor.

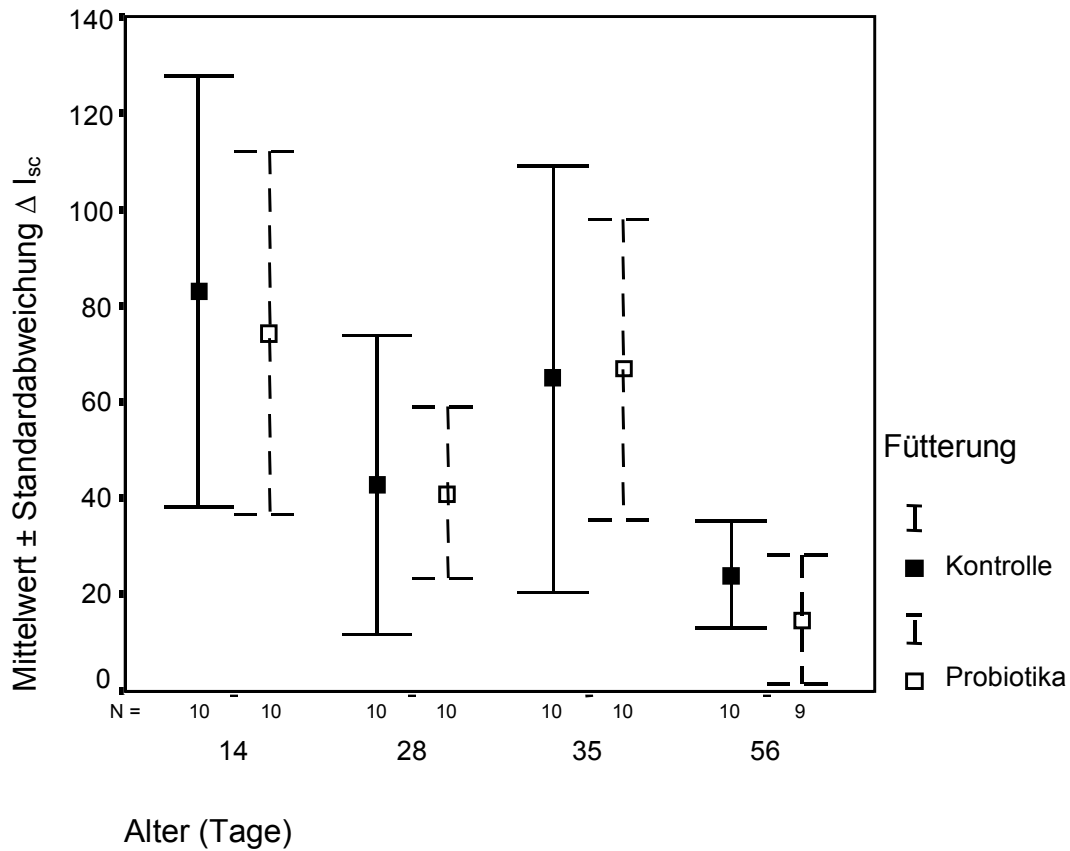
In der Abbildung 8 sind die Extremwerte wieder mit einem Punkt dargestellt, die Ausreißer werden mit einem Kreis abgebildet.

**Abbildung 8:**  $\Delta I_{sc}$  nach serosaler Zugabe von 50 nM PGE<sub>2</sub>



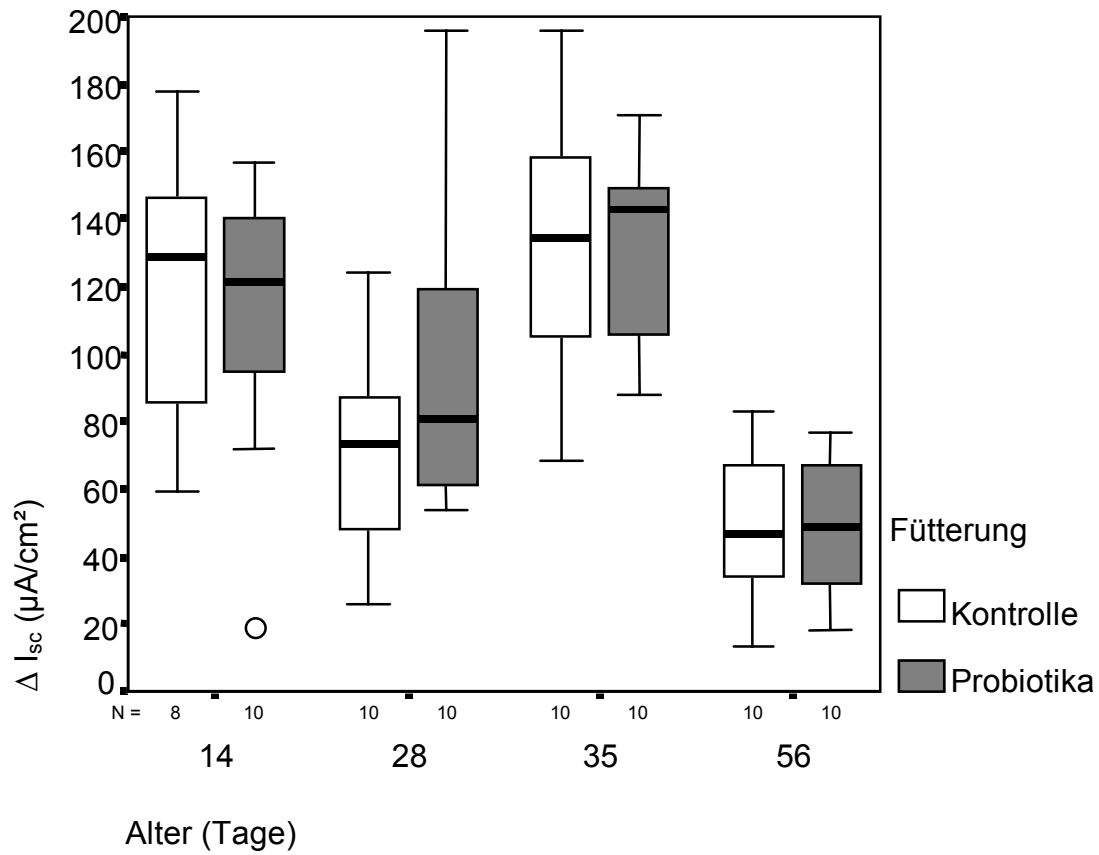
Auch in diesem Versuchsansatz liegen bei den Mittelwerten hohe Standardabweichungen und damit Varianzen vor.

**Abbildung 9:** Mittelwerte und Standardabweichungen des  $\Delta I_{SC}$  nach serosaler Zugabe von 50 nM PGE<sub>2</sub>



#### 4.2.2 PGE<sub>2</sub>: 1 $\mu$ M

Bei dem Vergleich der gemessenen  $\Delta I_{SC}$ -Werte nach Zugabe von 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> serosal stellt sich bei den 14 und 35 Tage alten Tiere ebenfalls die Tendenz dar, dass die Epithelien der Probiotika-gefütterten Tiere eine geringere Chlorid-Sekretion aufweisen.

**Abbildung 10:**  $\Delta I_{SC}$  nach serosaler Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub>

So liegen die Mittelwerte der 14 Tage alten Tiere in der Probiotikagruppe bei  $111,50 \pm 13,53$  (SEM)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  im Vergleich zu  $120,0 \pm 14,8$  (SEM)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  in der Kontrollgruppe.

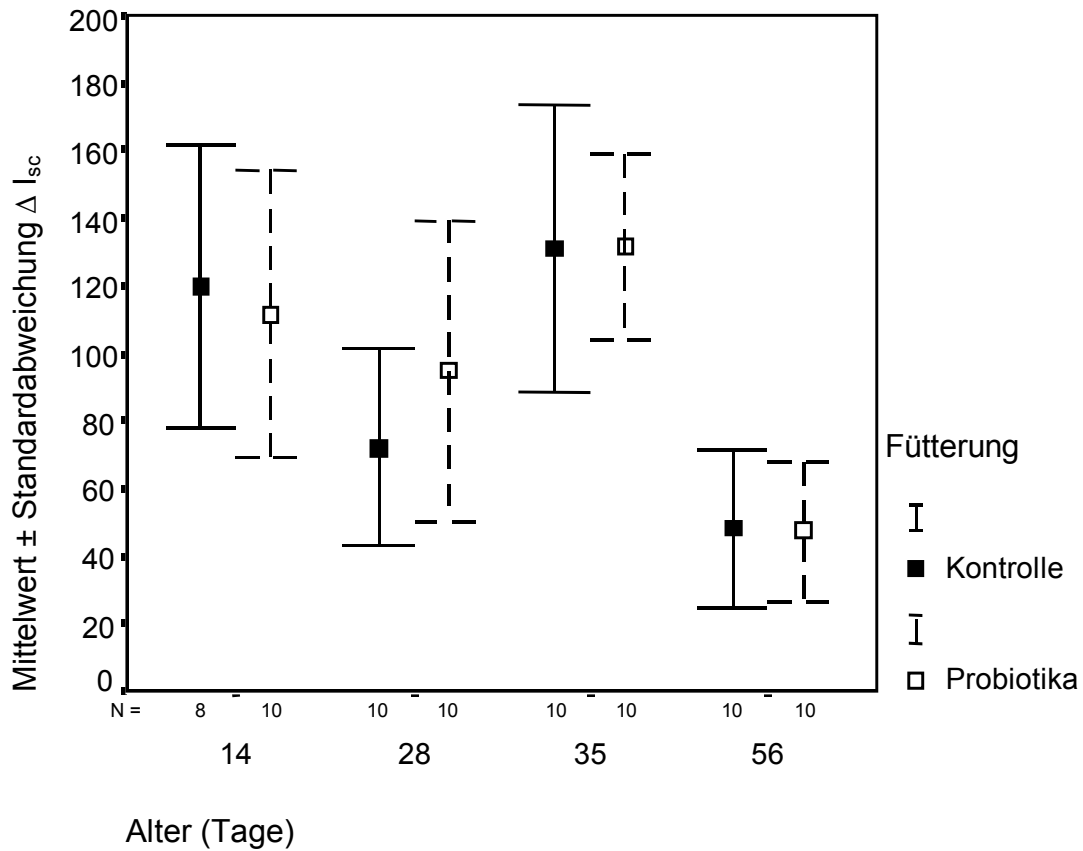
Bei den 28 Tage alten Tieren liegen jedoch die Mittelwerte des  $\Delta I_{SC}$  der Kontrollgruppe mit  $72,0 \pm 9,13$  (SEM)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  deutlich niedriger als die Mittelwerte des  $\Delta I_{SC}$  der Kontrollgruppe ( $94,7 \pm 14,05$  (SEM)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ).

Die beiden anderen Gruppen zeigen hinsichtlich der Verteilung ihrer Mittelwerte kaum Abweichungen.

Es liegen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor.

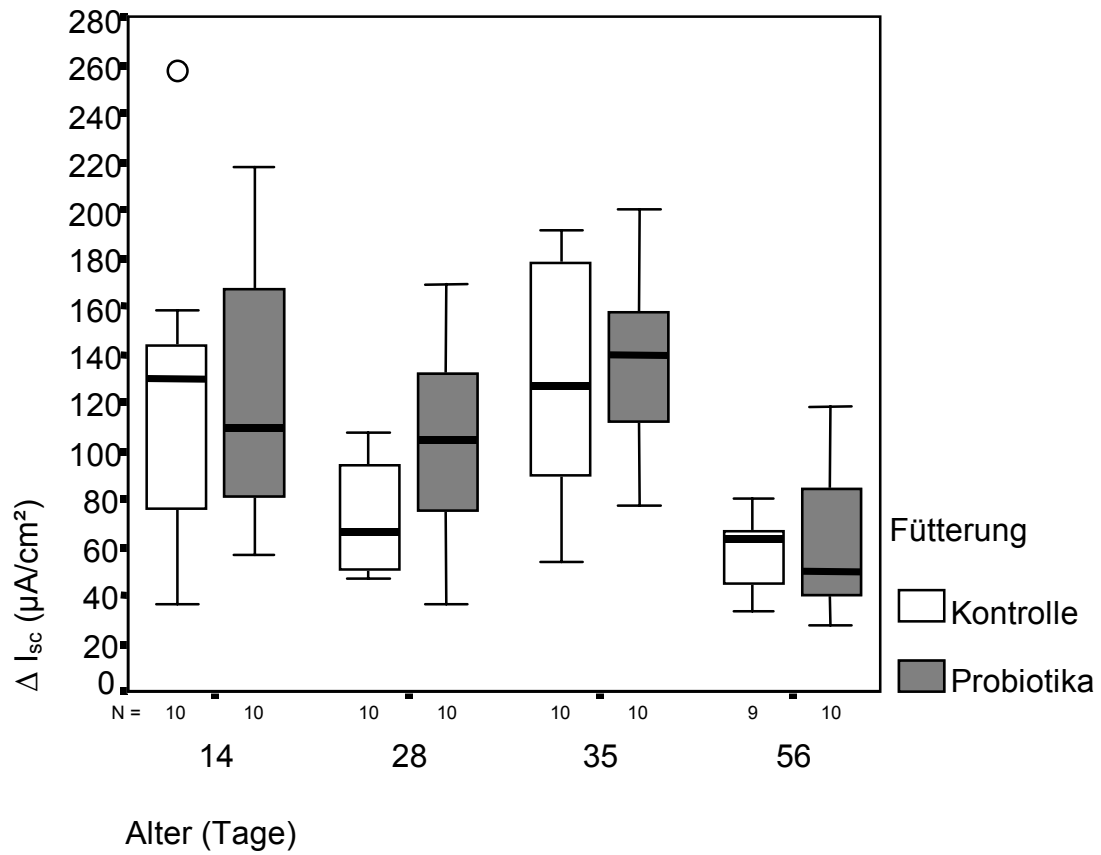


**Abbildung 11:** Mittelwerte und Standardabweichungen des  $\Delta I_{SC}$  nach serosaler Zugabe von  $1 \mu\text{M PGE}_2$



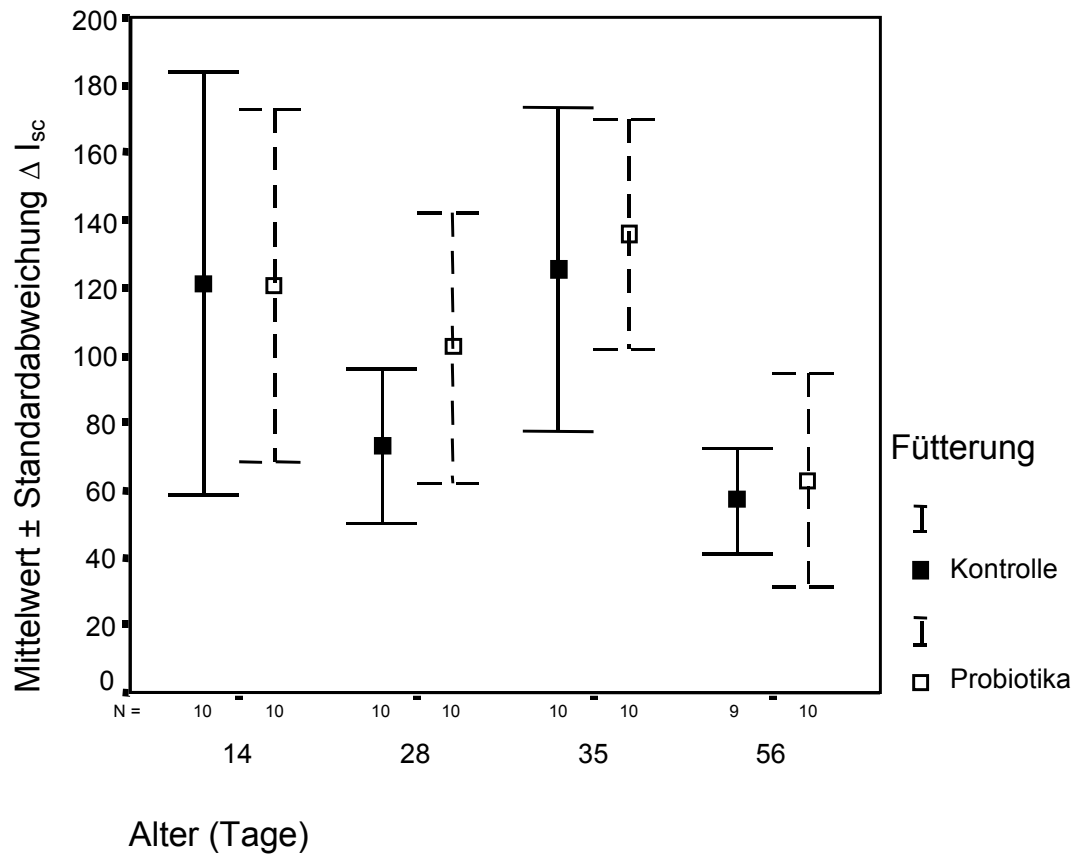
#### 4.2.3 PGE<sub>2</sub>: 3 $\mu\text{M}$

Ein Vergleich der Werte von  $\Delta I_{SC}$  nach Zugabe von  $3 \mu\text{M PGE}_2$  serosal ergibt tendenziell höhere Werte der Probiotikagruppe (außer in der Altersgruppe 35 Tage).

**Abbildung 12:**  $\Delta I_{SC}$  nach serosaler Zugabe von 3  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub>

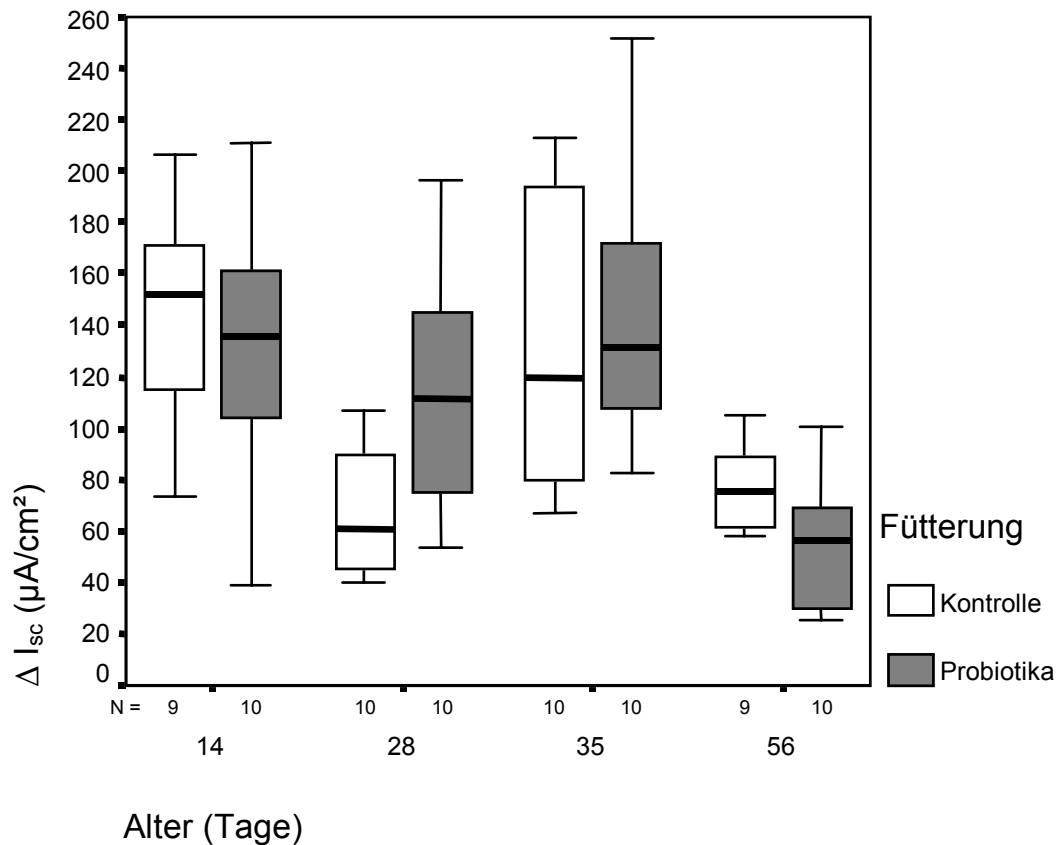
Ein Vergleich der Mittelwerte des  $\Delta I_{SC}$  ergibt außer bei den 28 Tage alten Tieren keine deutlichen Unterschiede. Bei der Altersgruppe der 28 Tage alten Tiere liegen die Mittelwerte des  $\Delta I_{SC}$  der Probiotikagruppe mit  $102,2 \pm 12,72$  (SEM)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  deutlich höher als die Mittelwerte des  $\Delta I_{SC}$  der Kontrollgruppe mit  $73,0 \pm 7,24$  (SEM)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Statistisch liegen keine signifikanten Unterschiede vor.

**Abbildung 13:** Mittelwerte und Standardabweichungen des  $\Delta I_{SC}$  nach serosaler Zugabe von  $3 \mu\text{M PGE}_2$



#### 4.2.4 $\text{PGE}_2$ : $5 \mu\text{M}$

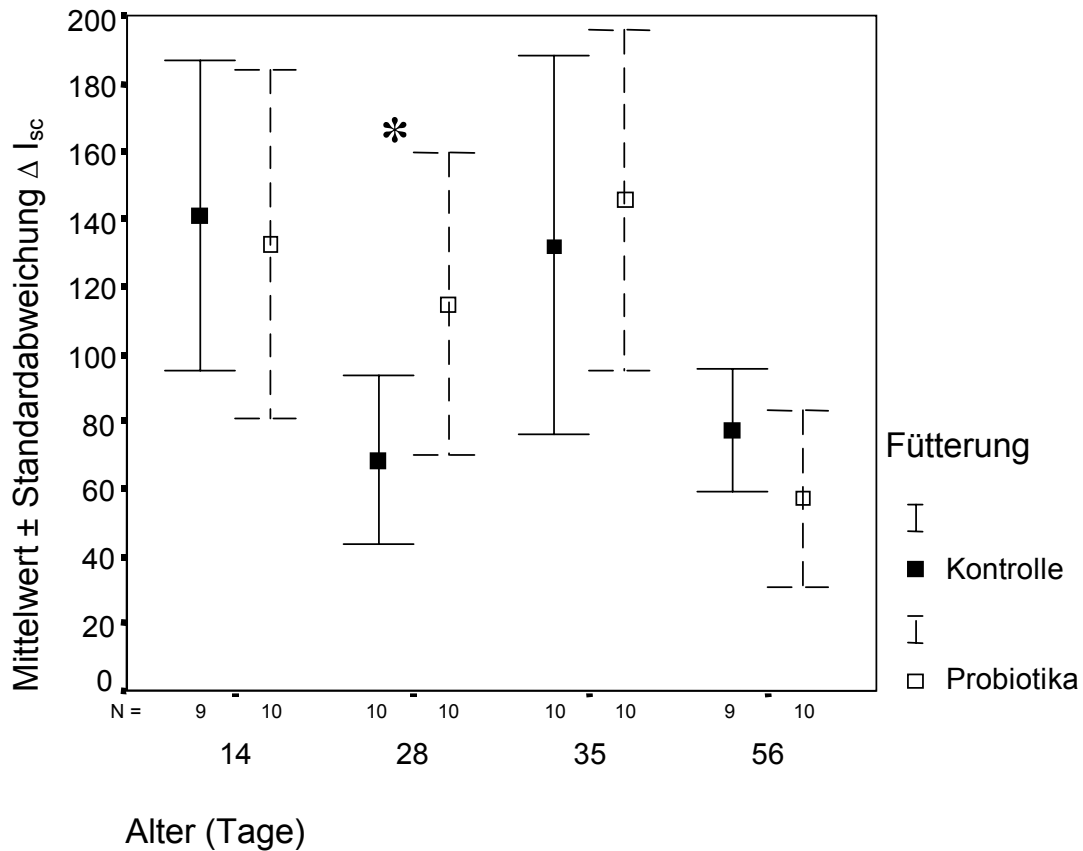
Bei einem Vergleich der Werteverteilung des  $\Delta I_{SC}$  fallen in den Probiotikagruppen tendenziell niedrigere Werte auf. Dies ist jedoch in der Gruppe der 28 Tage alten Tiere genau umgekehrt.

**Abbildung 14:**  $\Delta I_{SC}$  nach serosaler Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  PGE<sub>2</sub>

Bei einem Vergleich der Mittelwerte des  $\Delta I_{SC}$  wird deutlich, dass sowohl innerhalb der Gruppe der 35 als auch der 28 Tage alten Tiere die Werte der Probiotika-gefütterten Tiere höher liegen als die der Kontrollgruppe. Dies ist bei den 28 Tage alten Tieren mit Werten von  $114,5 \pm 14,24$  (SEM)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  signifikant höher im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe mit  $68,6 \pm 7,93$  (SEM)  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

Dies zeigt die Abbildung 15.

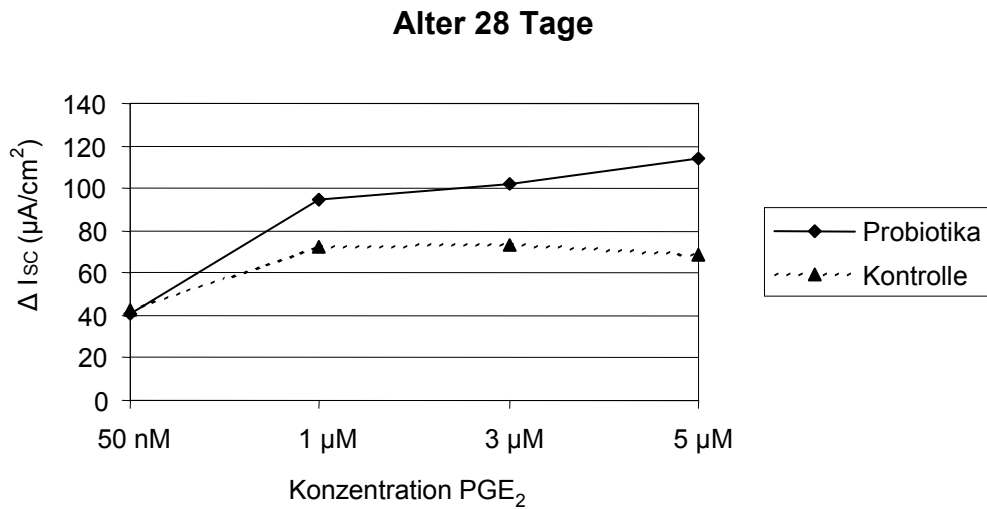
**Abbildung 15:** Mittelwerte und Standardabweichungen des  $\Delta I_{sc}$  nach serosaler Zugabe von  $5 \mu\text{M PGE}_2$



Der Stern \* zeigt die Altersgruppe mit der statistisch gesicherten Signifikanz an.

Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass eine Sättigungskurve entsteht. Dies ist für die Altersgruppe der 28 Tage alten Tiere in Abbildung 16 beispielhaft dargestellt.

**Abbildung 16:** Dosis-Wirkungs-Kurve des  $\Delta I_{SC}$  nach serosaler Zugabe der steigenden Konzentrationen von  $PGE_2$  (28 Tage alte Tiere)



### 4.3 Versuchsansatz 3: Glucose-Zugabe

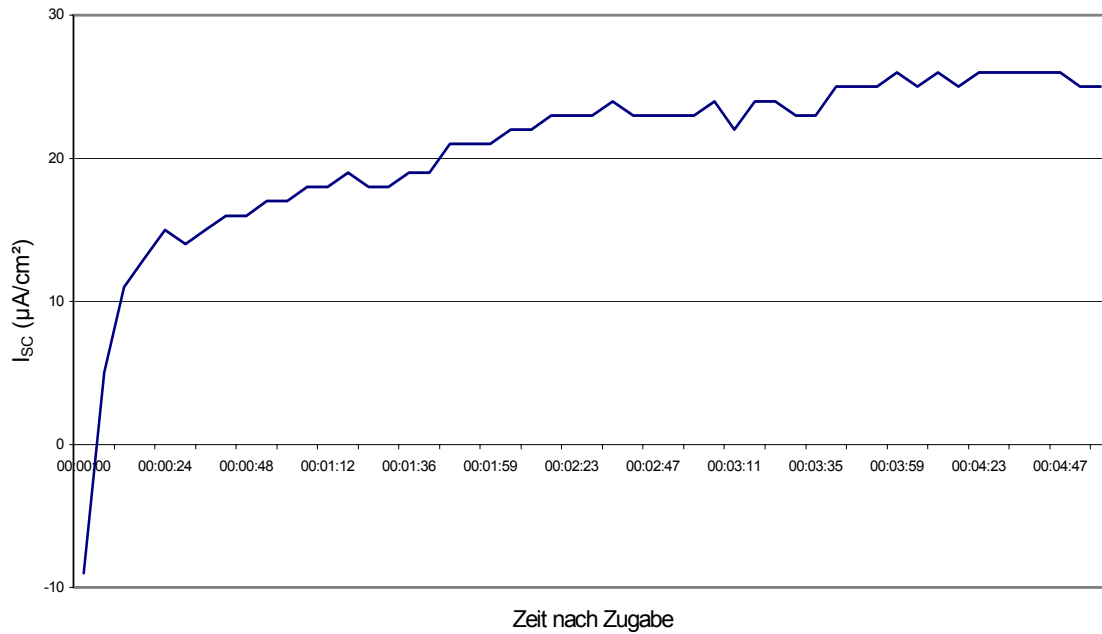
#### 4.3.1 Glucose: 0,5 mmol/l

Bei diesem Versuchsansatz wurde Glucose in vier verschiedenen Konzentrationen mukosal zugegeben. Die Ergebnisse werden im Folgenden einzeln dargestellt.

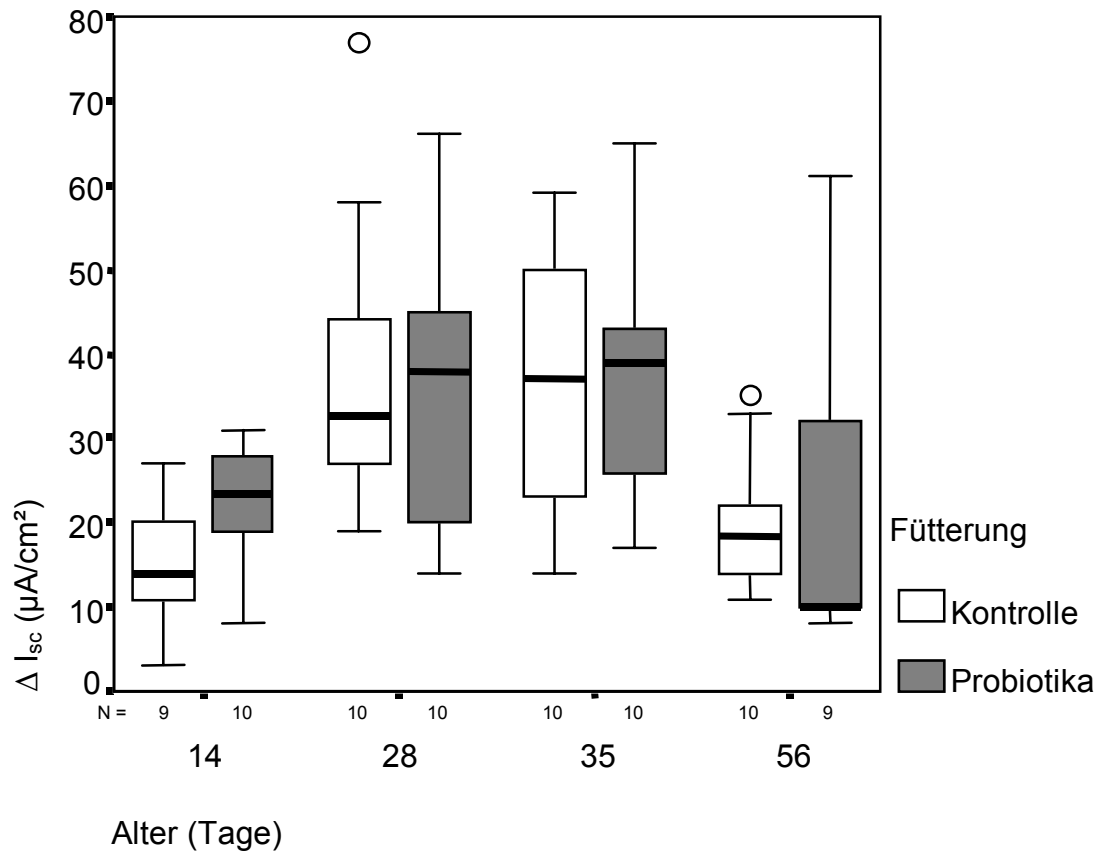
Durch die Zugabe von Glucose sollen die absorptiven Eigenschaften des Epithels untersucht werden. Bei einem positiven Effekt des Probiotikums sollten die Werte dieser Gruppe höher liegen als die der Kontrollgruppe (siehe Abschnitt „LITERATUR“).

Die Verlaufskurve des  $I_{SC}$  nach Zugabe von Glucose zeigt ebenfalls einen charakteristischen Anstieg und ist in Abbildung 17 an einem Beispiel dargelegt.

**Abbildung 17:** Typische Verlaufskurve des  $I_{SC}$  nach Zugabe von 0,5 mmol/l Glucose mukosal



Bei einem Vergleich der Werteverteilung (Abbildung 18) des  $\Delta I_{SC}$  dieses Versuchsansatzes erkennt man tendenziell höhere Werte der Probiotikagruppen in allen Altersstufen, abgesehen von der Gruppe der 35 Tage alten Tiere.

**Abbildung 18:**  $\Delta I_{SC}$  nach mukosaler Zugabe von 0,5 mmol/l Glucose

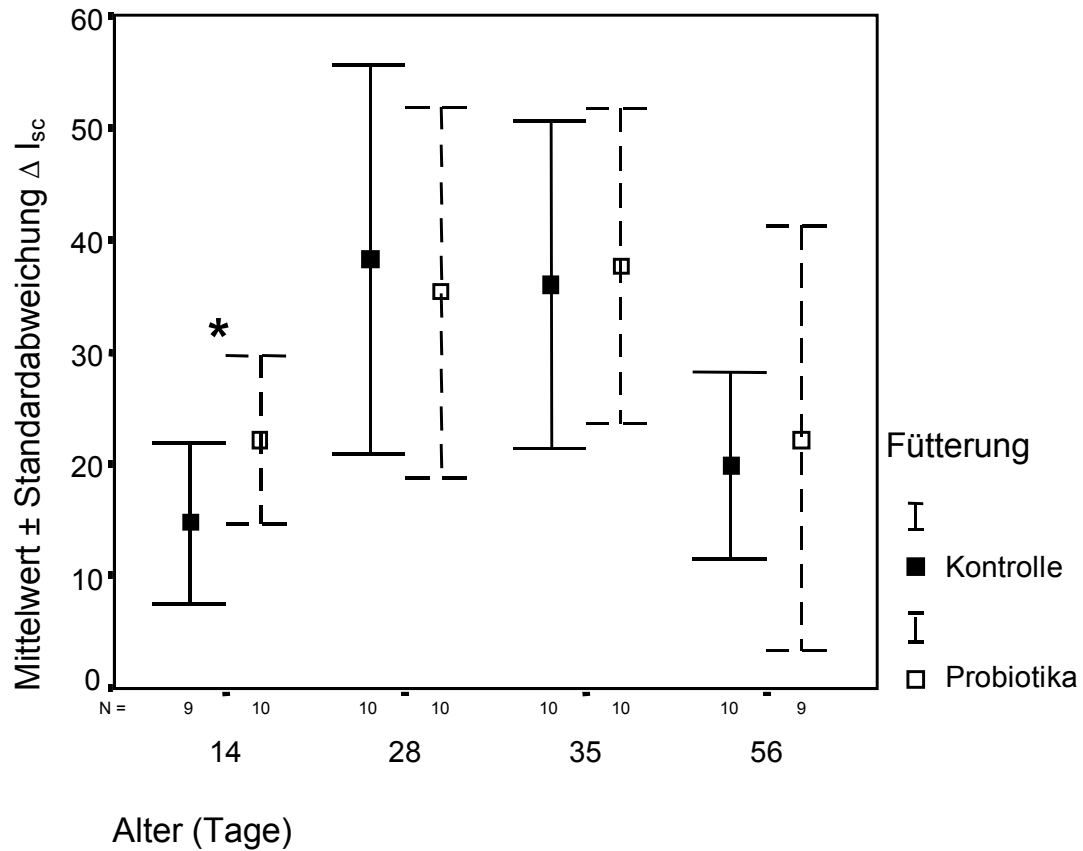
In der Darstellung der Mittelwerte und der Standardabweichungen (Abbildung 19) hält sich dieser Trend.

Die Gruppe der 28 Tage alten Kontroll-Tiere zeigt hier jedoch mit  $38,3 \pm 5,5$  (SEM)  $\mu A/cm^2$  einen höheren Mittelwert im Vergleich zu den Probiotika-gefütterten Tieren mit  $35,4 \pm 5,23$  (SEM)  $\mu A/cm^2$ .

Die 14 Tage alten Tiere zeigen bei der Varianzanalyse einen signifikanten Unterschied mit Mittelwerten von  $14,78 \pm 2,39$  (SEM)  $\mu A/cm^2$  (in der Kontrollgruppe), bzw.  $22,2 \pm 2,35$  (SEM)  $\mu A/cm^2$  (in der Probiotikagruppe).



**Abbildung 19:** Mittelwerte und Standardabweichungen des  $\Delta I_{SC}$  nach Zugabe von 0,5 mmol/l Glucose

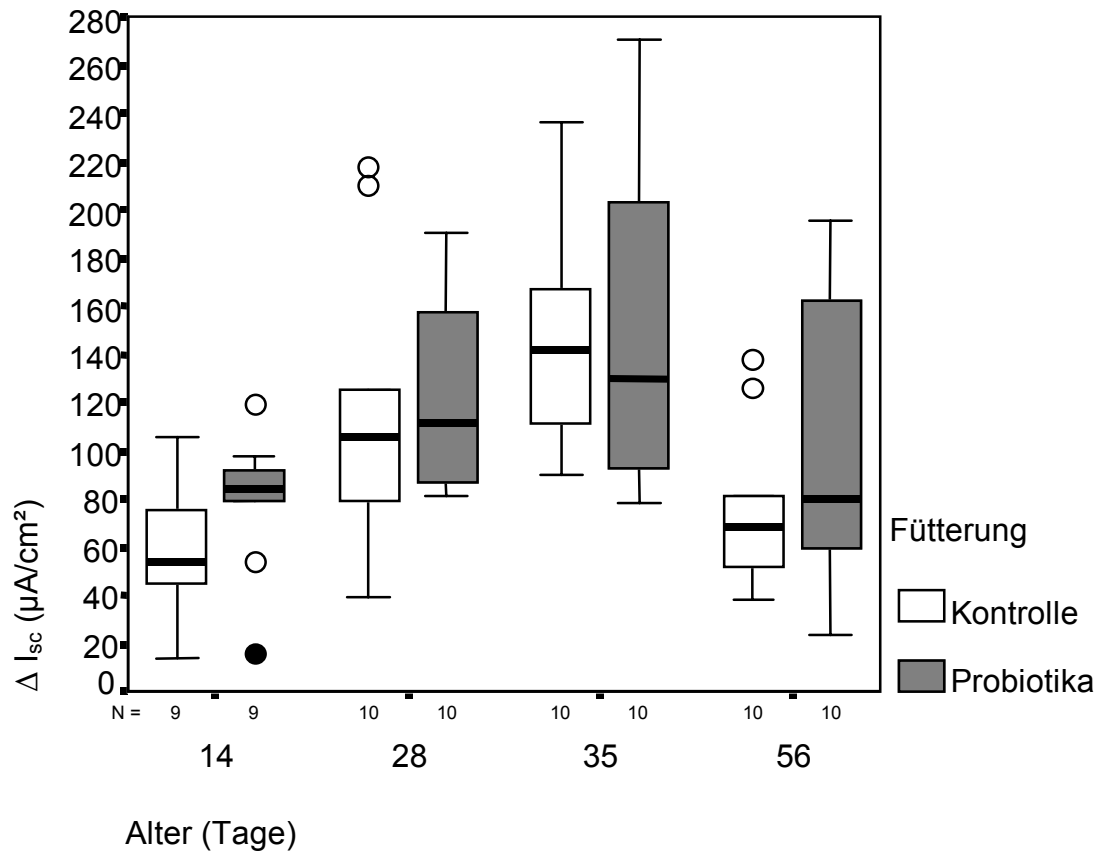


Der Stern \* zeigt die Altersgruppe mit der statistisch gesicherten Signifikanz an.

#### 4.3.2 Glucose: 4 mmol/l

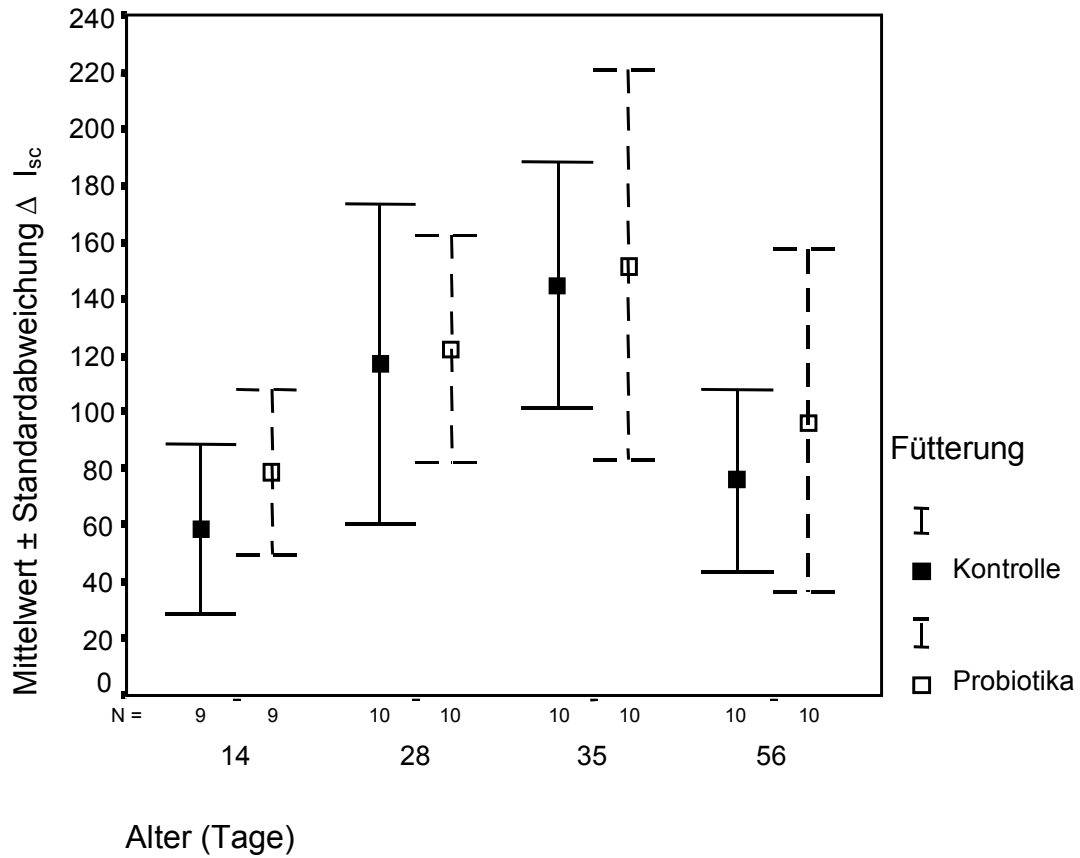
Beim Betrachten der Verteilung der Werte des gemessenen  $\Delta I_{SC}$  nach Zugabe von 4 mmol/l Glucose mukosal erkennt man eine deutliche Tendenz der Probiotika-gruppen in allen Altersstufen zu höheren Werten.

In der Abbildung sind die Extremwerte mit einem Punkt wiedergegeben, die Ausreißer werden mit einem Kreis dargestellt.

**Abbildung 20:**  $\Delta I_{SC}$  nach mukosaler Zugabe von 4 mmol/l Glucose

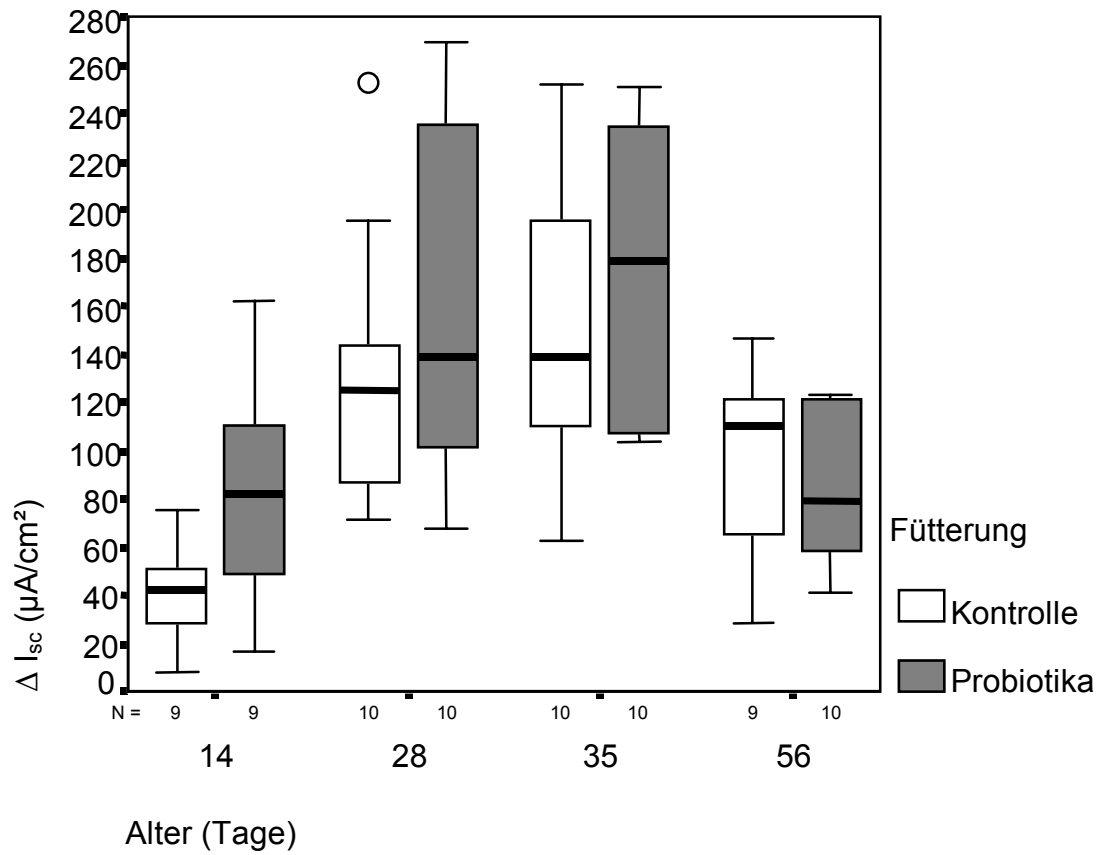
Bei einem Vergleich der Mittelwerte setzt sich diese Tendenz fort, hier ergeben die Werte nach der Varianzanalyse jedoch keine Signifikanz. In der Gruppe der 14 Tage alten Tiere liegt der Mittelwert der Probiotika-Tiere mit  $78,44 \pm 9,7$  (SEM)  $\mu A/cm^2$  deutlich höher als der Wert der Kontroll-Tiere mit  $58,22 \pm 10,01$  (SEM)  $\mu A/cm^2$ . In der Altersstufe der 56 Tage alten Tiere liegt die Probiotikagruppe bei  $96,5 \pm 19,11$  (SEM)  $\mu A/cm^2$ , der Mittelwert der entsprechenden Kontrollgruppe liegt bei  $75,7 \pm 10,31$  (SEM)  $\mu A/cm^2$ .

**Abbildung 21:** Mittelwerte und Standardabweichungen des  $\Delta I_{sc}$  nach mukosaler Zugabe von 4 mmol/l Glucose



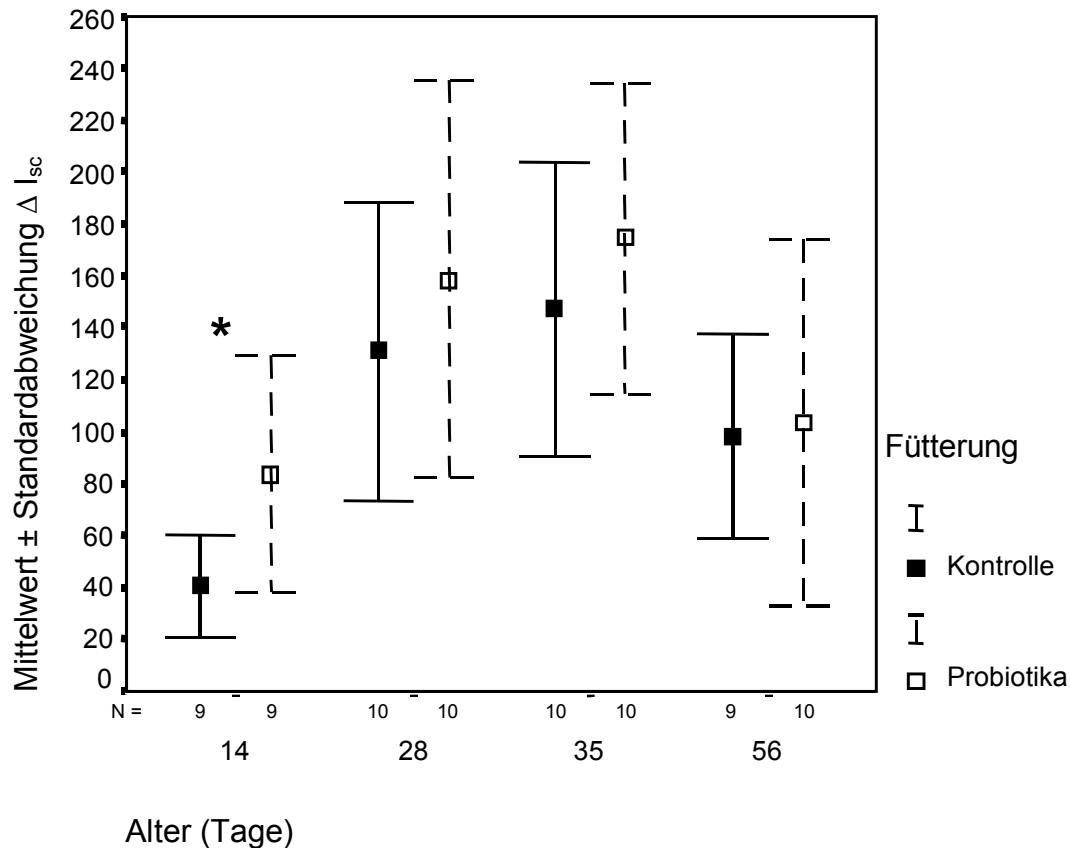
#### 4.3.3 Glucose: 8 mmol/l

Auch bei der Zugabe von 8 mmol/l Glucose mukosal setzt sich die Tendenz der höheren Werte der Probiotikagruppen fort.

**Abbildung 22:**  $\Delta I_{SC}$  nach mukosaler Zugabe von 8 mmol/l Glucose

Dies wird deutlicher, wenn man die Darstellung in Form von Fehlerbalken wählt. Bei den 14 Tage alten Tieren liegen die Mittelwerte des  $\Delta I_{SC}$  der mit Probiotika gefütterten Tiere bei  $83,56 \pm 15,56$  (SEM)  $\mu A/cm^2$ , die Mittelwerte der Kontroll-Tiere liegen mit  $40,67 \pm 6,5$  (SEM)  $\mu A/cm^2$  signifikant niedriger. Die Standardabweichungen und damit die Varianzen sind wieder hoch (28 Tage, Probiotikagruppe:  $158,8 \pm 24,18$  (SEM)  $\mu A/cm^2$ , Kontrollgruppe:  $131,0 \pm 18,08$  (SEM)  $\mu A/cm^2$ ).

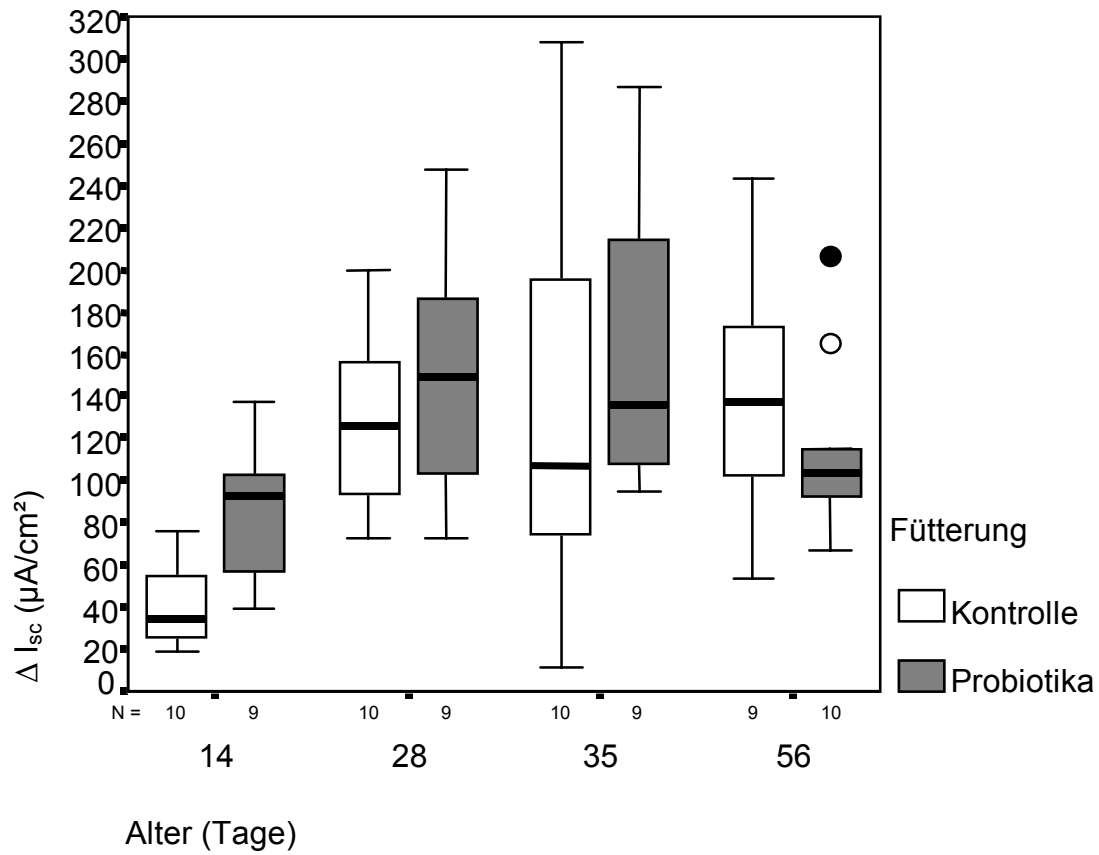
**Abbildung 23:** Mittelwerte und Standardabweichungen des  $\Delta I_{sc}$  nach mukosaler Zugabe von 8 mmol/l Glucose



Der Stern \* zeigt die Altersgruppe mit der statistisch gesicherten Signifikanz an.

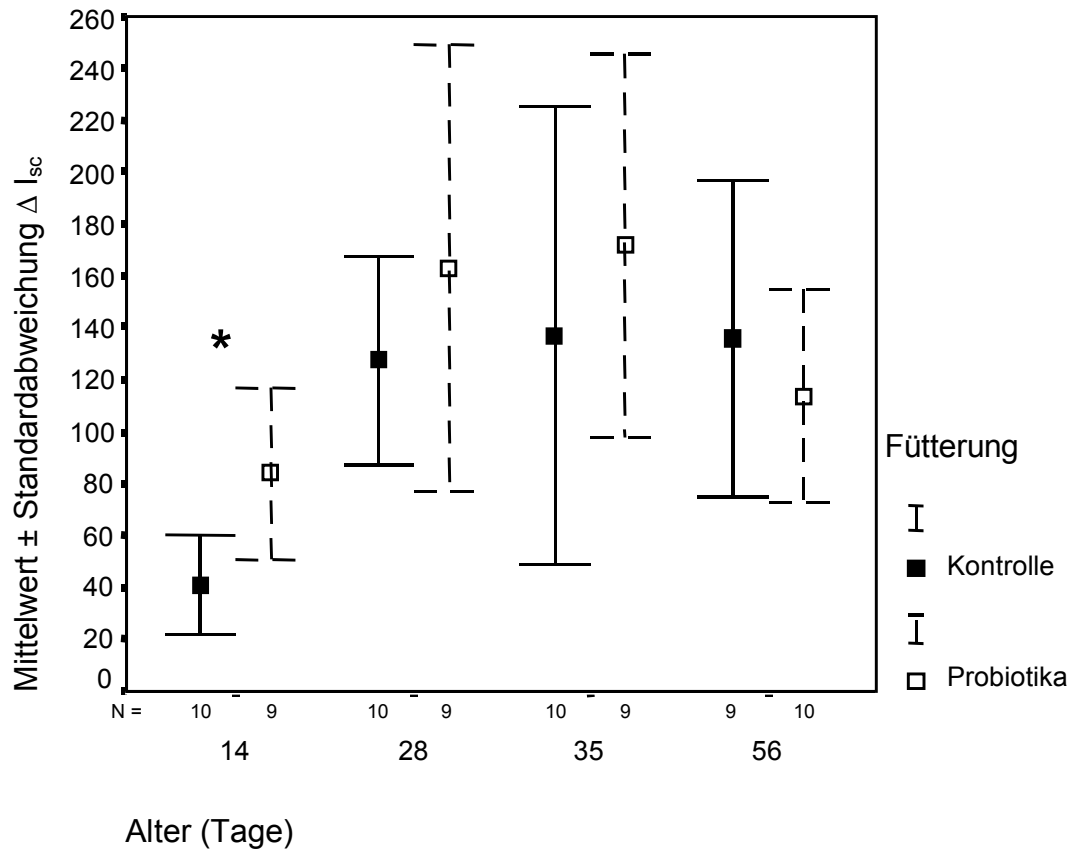
#### 4.3.4 Glucose: 12 mmol/l

Bei diesem Versuchsansatz zeigen die Probiotikagruppen die Tendenz, höhere Werte zu haben als die entsprechenden Kontrollgruppen. Dies ist bei der Altersstufe der 56 Tage alten Tiere jedoch nicht der Fall. Dort liegt der Mittelwert der Probiotikagruppe bei  $113,6 \pm 13,13$  (SEM)  $\mu A/cm^2$  und der Mittelwert der Kontrollgruppe mit  $135,78 \pm 20,27$  (SEM)  $\mu A/cm^2$  deutlich höher (siehe Abbildung 24).

**Abbildung 24:**  $\Delta I_{sc}$  nach mukosaler Zugabe von 12 mmol/l Glucose

Ein Vergleich der Mittelwerte zeigt nach Zugabe von 12 mmol/l Glucose mukosal, dass die Standardabweichungen hoch sind, die Werte der Probiotika-gefütterten Tiere liegen jedoch hier auch deutlich höher als die der vergleichbaren Kontroll-Tiere. Auch hier ist der Unterschied bei den 14 Tage alten Tieren mit  $84,11 \pm 11,01$  (SEM)  $\mu A/cm^2$  in der Probiotikagruppe statistisch signifikant höher als der Wert der Kontrollgruppe mit  $40,4 \pm 6,03$  (SEM)  $\mu A/cm^2$ .

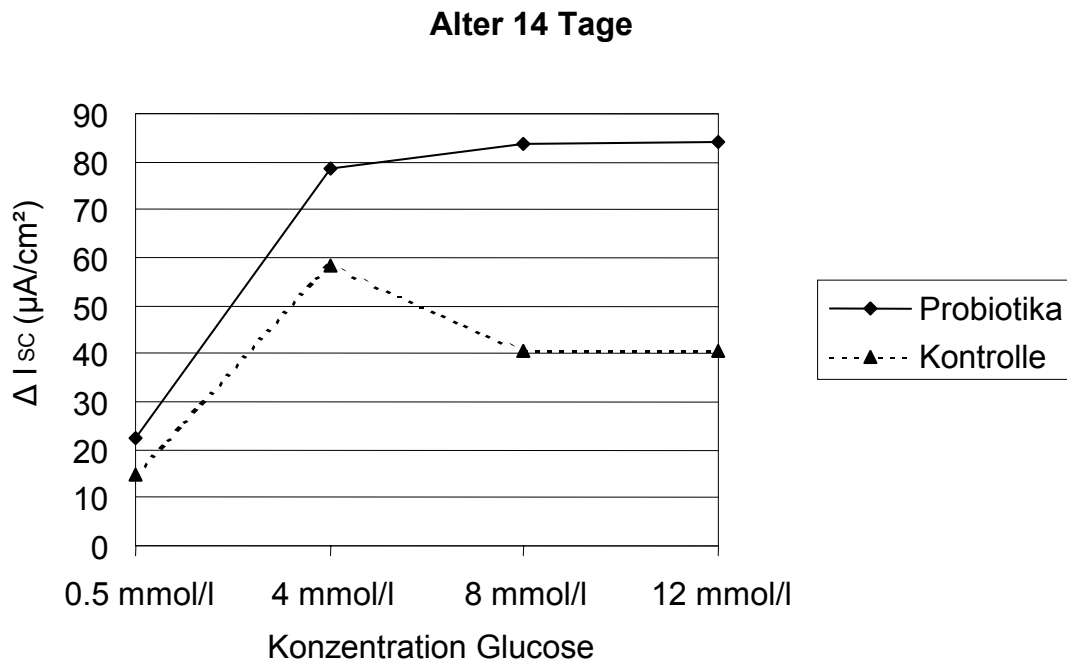
**Abbildung 25:** Mittelwerte und Standardabweichungen des  $\Delta I_{sc}$  nach mukosaler Zugabe von 12 mmol/l Glucose



Der Stern \* zeigt die Altersgruppe mit der statistisch gesicherten Signifikanz an.

Auch in diesem Versuchsansatz wurden die Konzentrationen so gewählt, dass sich eine Sättigung einstellt. Dies ist in der Abbildung 26 für die verschiedenen Glucose-Konzentrationen für die Altersgruppe der 14 Tage alten Tiere dargestellt.

**Abbildung 26:** Dosis-Wirkungs-Kurve des  $\Delta I_{SC}$  nach mukosaler Zugabe der steigenden Konzentrationen von Glucose (14 Tage alte Tiere)



## 4.4 Versuchsansatz 4: Messung der Mannitfluxe

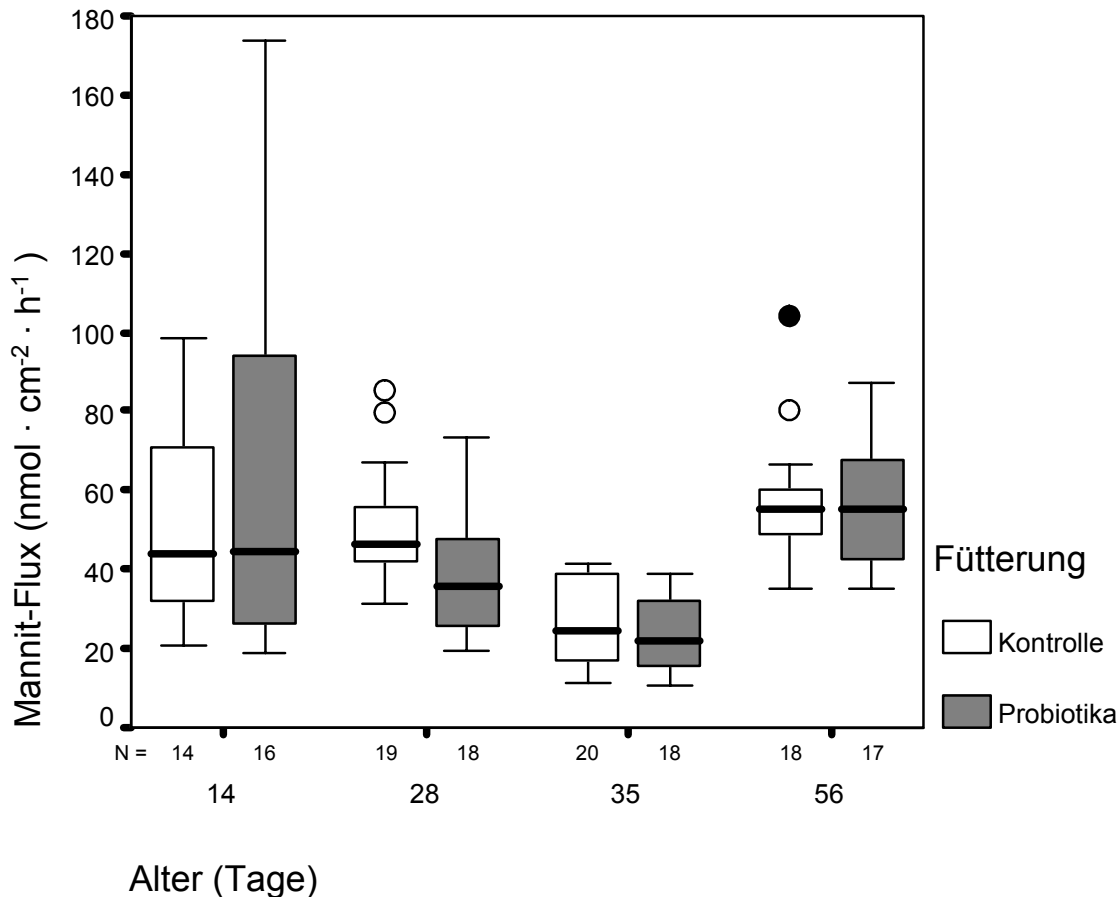
### 4.4.1 Mannitfluxe

Bei einer positiven Wirkung des Probiotikums in Bezug auf die Permeabilität des Darmes müsste sich diese verringern. Dies wurde mit Mannit, einer ausschließlich parazellulär permeablen Substanz, überprüft.

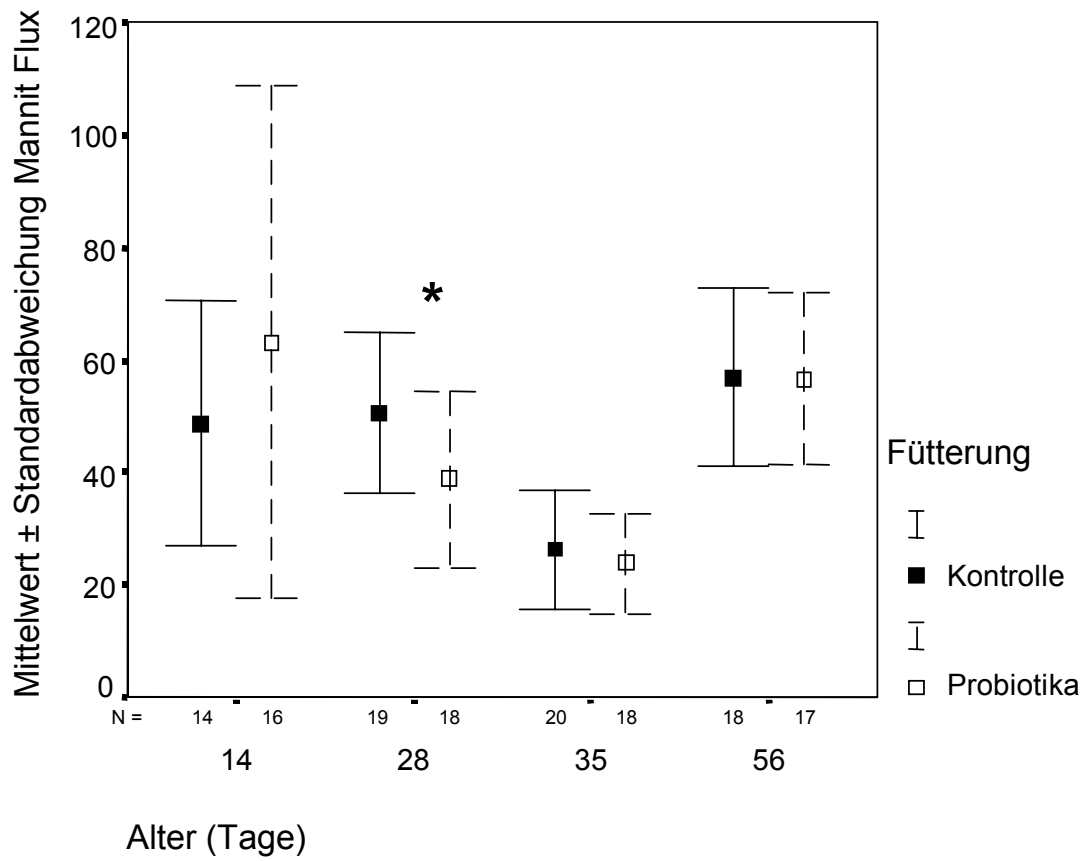
Wie bereits im Abschnitt „MATERIAL UND METHODEN“ beschrieben, dienen vier Kammern der Messung der Mannitfluxe. Dazu wurde ihnen serosal das radioaktiv markierte Isotop D-[1-<sup>3</sup>H]-Mannit zugegeben. Danach wurde in definierten Zeitintervallen auf der mukosalen Seite Proben entnommen. Das entnommene Volumen wurde durch Pufferlösung ersetzt. Nach Messen der Radioaktivität in den Proben wurde der unidirektionale Mannitflux berechnet. Gemessen wurden drei Fluxperioden, von denen der jeweils errechnete Mittelwert in die statistische Auswertung einbezogen wurde.

Die Abbildung 27 zeigt die Verteilung dieser Werte. Auf der y-Achse sind die Fluxraten in  $nmol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$  dargestellt.



**Abbildung 27:** Mannitfluxe ( $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )

Bei einem Vergleich der Mittelwerte wird ersichtlich, dass die Mittelwerte der Probiotikagruppen in den Altersstufen 28 und 35 Tage niedriger liegen als die vergleichbaren Werte der Kontrollgruppen. Dies ist bei den 28 Tage alten Tieren mit  $50,61 \pm 3,26$  (SEM)  $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  in der Probiotikagruppe zu  $38,73 \pm 3,68$  (SEM)  $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  in der Kontrollgruppe statistisch signifikant. In der Altersstufe der 56 Tage alten Tiere ist der Unterschied zwischen der Probiotikagruppe mit  $56,59 \pm 3,68$  (SEM)  $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  und der Kontrollgruppe mit  $56,75 \pm 3,73$  (SEM)  $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  sehr gering. Bei den 14 Tage alten Tieren liegt die Probiotikagruppe mit  $63,05 \pm 11,37$  (SEM)  $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  deutlich höher als die Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von  $48,68 \pm 5,88$  (SEM)  $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ . Hier sind die Standardabweichungen auch deutlich größer.

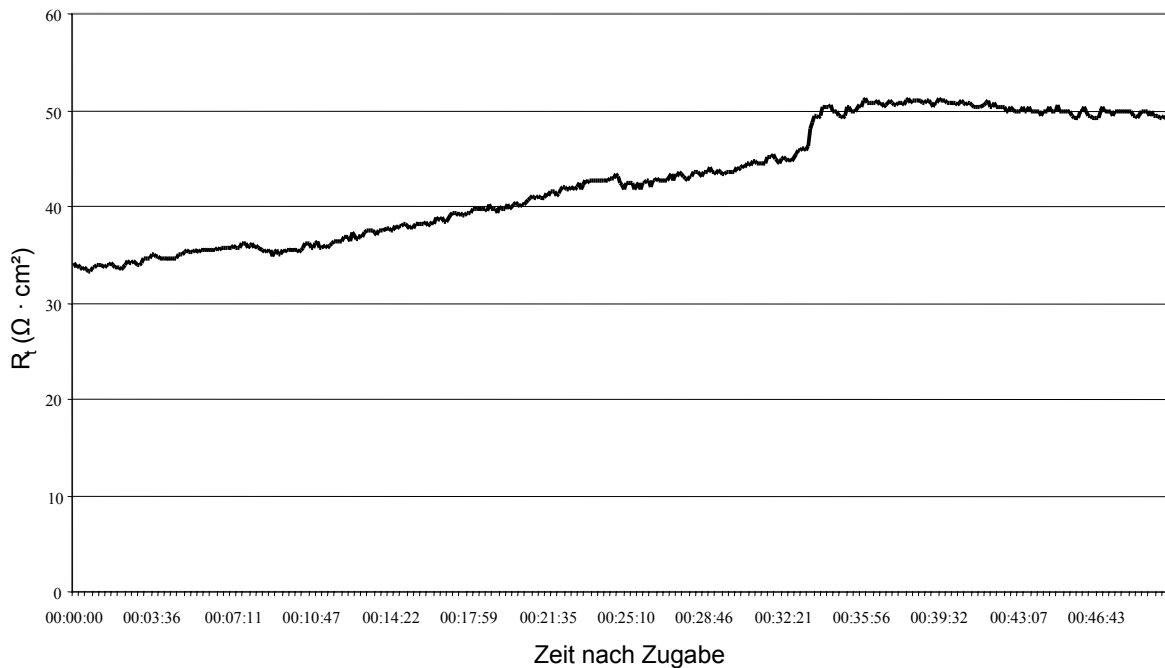
**Abbildung 28:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Mannitfluxe ( $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )

Der Stern \* zeigt die Altersgruppe mit der statistisch gesicherten Signifikanz an.

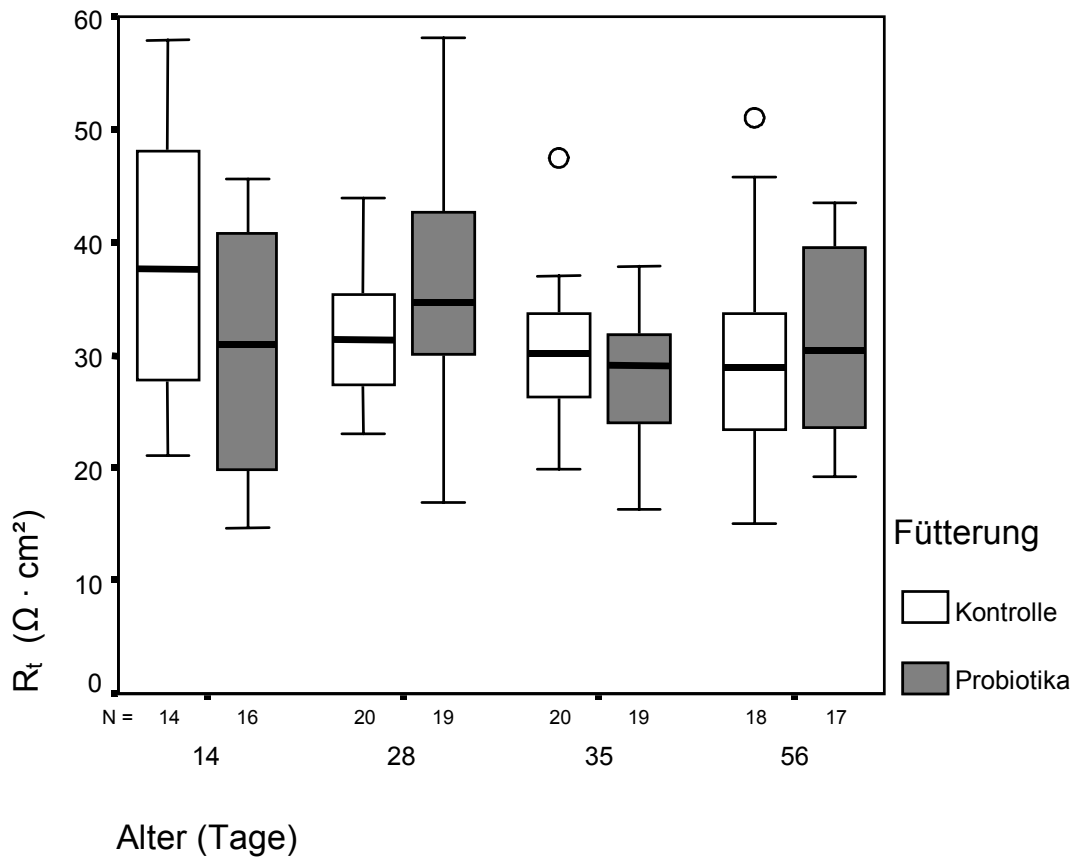
#### 4.4.2 Mannit: Widerstand

Zusätzlich zu den Mannitfluxen wurde noch der Verlauf des Widerstandes während der Messungen der Fluxe gemessen. Laut genereller Annahme sollte sich der Widerstand (im Vergleich zur Kontrollgruppe) erhöhen, wenn die parazelluläre Permeabilität sinkt. Ein typischer Verlauf der Widerstands-Kurve ist in Abbildung 29 dargestellt. Die den drei Fluxperioden zugehörigen Widerstands-Werte wurden gemittelt und so in die statistische Auswertung einbezogen.

**Abbildung 29:** Typische Verlaufskurve von  $R_t$  nach serosaler Zugabe des radioaktiv markierten Isotop D-[1- $^3$ H]-Mannit



Beim Vergleich der Verteilung der Werte sieht man bei den 28 und 56 Tage alten Tieren der Probiotikagruppe höhere Werte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Bei den 14 und 35 Tage alten Tieren ist dies jedoch umgekehrt: hier liegen die Kontrollgruppen mit ihren Widerstandswerten höher.

**Abbildung 30:** Widerstand ( $R_t$ ) während der Messung der Mannitfluxe ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )

Dies wird auch bei Betrachten der Mittelwerte deutlich. Der Mittelwert der Kontrollgruppe in der Altersgruppe 14 Tage liegt bei  $40,68 \pm 4,62$  (SEM)  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , während die dazugehörige Probiotikagruppe mit ihrem Mittelwert bei  $30,38 \pm 2,77$  (SEM)  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  liegt.

Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

**Abbildung 31:** Mittelwerte und Standardabweichungen von  $R_t$  während der Messung der Mannitfluxe ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )

