

1 Material und Methoden

1.1 Versuchstiere

Die in den Versuchen verwendeten Schafe wurden nach Art der Fütterung in Heu gefütterte Tiere (HF-Tiere) und Kraftfutter gefütterte Tiere (KF-Tiere) unterschieden. Die Ration der KF-Tiere enthielt 800g Kraftfutter (16% Rohprotein). Diese Unterscheidung wurde vorgenommen, weil bekannt ist, daß energiereiche Fütterung die Aktivität verschiedener Transportsysteme der Vormagenepithelien erhöht (DIRKSEN et al., 1984; DOREAU et al., 1997). Die durch Kraftfuttergabe erhöhte Fermentation von Stärke und vor allem Protein und die damit verbundene Freisetzung von Peptiden könnte sich stimulierend auf die Ausbildung des Peptidtransporters auswirken. In Versuchen an menschlichen Darmzellen konnte gezeigt werden, daß eine Steigerung der Peptidaufnahme nach Erhöhung der Peptidkonzentration im umgebenden Medium erfolgt (WALKER et al., 1998).

Die Auswahl der Tiere erfolgte unabhängig von Alter, Geschlecht und Rasse. Ein Teil der Tiere wurde im Institut für Tierzucht in der Lentzealle mittels Bolzenschuß betäubt und danach durch Entbluten getötet, so daß das Fleisch nach Fleischschau für den menschlichen Verzehr tauglich war. Ein anderer Teil der Tiere wurde im Institut für Veterinär-Anatomie der FU Berlin auf gleiche Art und Weise getötet.

1.2 Gewinnung des Epithels

Nach Schlachtung der Schafe wurde möglichst rasch die Bauchhöhle eröffnet und der Magen-Darm-Trakt exenteriert. Der Blättermagen wurde abgesetzt und längs des Psalterkanals aufgeschnitten, die größeren Psalterblätter wurden an ihrer Basis abgetrennt, im Transportmedium gereinigt und entlang der mittleren Muskelschicht manuell stumpf auseinander präpariert. Vom ventralen Pansensack wurde ein ca. 20×20 cm großes Stück abgetrennt und ebenfalls durch schwenken im Transportmedium gereinigt. Die Präparation der Schleimhaut wurde wie beim Psalter stumpf manuell durchgeführt. Der Transport der Gewebe erfolgte in auf 38°C temperiertem, mit Carbogen (95% O₂ 5% CO₂) begastem Transportmedium.

1.3 Inkubationstechnik

Der in diesen Experimenten verwendete Aufbau geht auf eine von USSING 1949 entwickelte Technik zurück.

Jede sogenannte Ussing-Kammer besteht aus zwei Plexiglashälften, zwischen die das Epithel senkrecht eingespannt wurde (Abb.5). Zum Schutz des Epithels wurde auf beiden Seiten zwischen Plexiglas und Gewebe je ein Silikonring unterlegt. Die entstandene freie Gewebefläche betrug je nach Kammerdurchmesser 0.95 oder 3.14 cm² und wurde im Experiment beidseitig von Pufferlösung umspült. Über der Kammer befanden sich zwei doppelwandige Glassäulen, deren innere Abteilung je 16ml Pufferlösung bei den kleineren und je 18ml Pufferlösung bei den größeren Kammern enthielt. Die Pufferlösung konnte über je zwei Silikonschläuche durch ein Kammerkompartiment zirkulieren und wurde über ein Gasliftsystem mit Carbogen begast. Dadurch wurde die Sauerstoffversorgung des Epithels gewährleistet, die Pufferlösung innerhalb der Glassäule und Kammerhälfte kontinuierlich umgewälzt sowie der pH-Wert konstant gehalten.

Durch die äußere Abteilung der Glassäule floß, von einer Pumpe getrieben, konstant auf 38°C erwärmtes Wasser, um die Pufferlösung in der inneren Abteilung auf konstanter Temperatur zu halten.

Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen sind im Anhang tabellarisch aufgeführt. Ihre Osmolarität wurde mit einem Osmometer überprüft.

Gewebenah (<3mm) und gewebefern (<25mm) wurden durch die Kammerwand jeder Seite je zwei KCL-Agarbrücken eingefügt. Jede von ihnen erhielt über 3 molare KCl Kontakt zu Ag/AgCl-Elektroden. Das gewebe-nahe Paar diente zum Messen der transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t), die als Folge von Ionentransportvorgängen entsteht. Über das gewebe-ferne Paar wurde mittels einer externen Stromquelle Strom appliziert. Die ermittelten Werte wurden fortlaufend einer Messapparatur zugeführt.

Die genaue Beschreibung der Meßtechnik und das Anlagenprinzip sind in der Dissertation von SCHEFFLER 1984 nachzulesen.

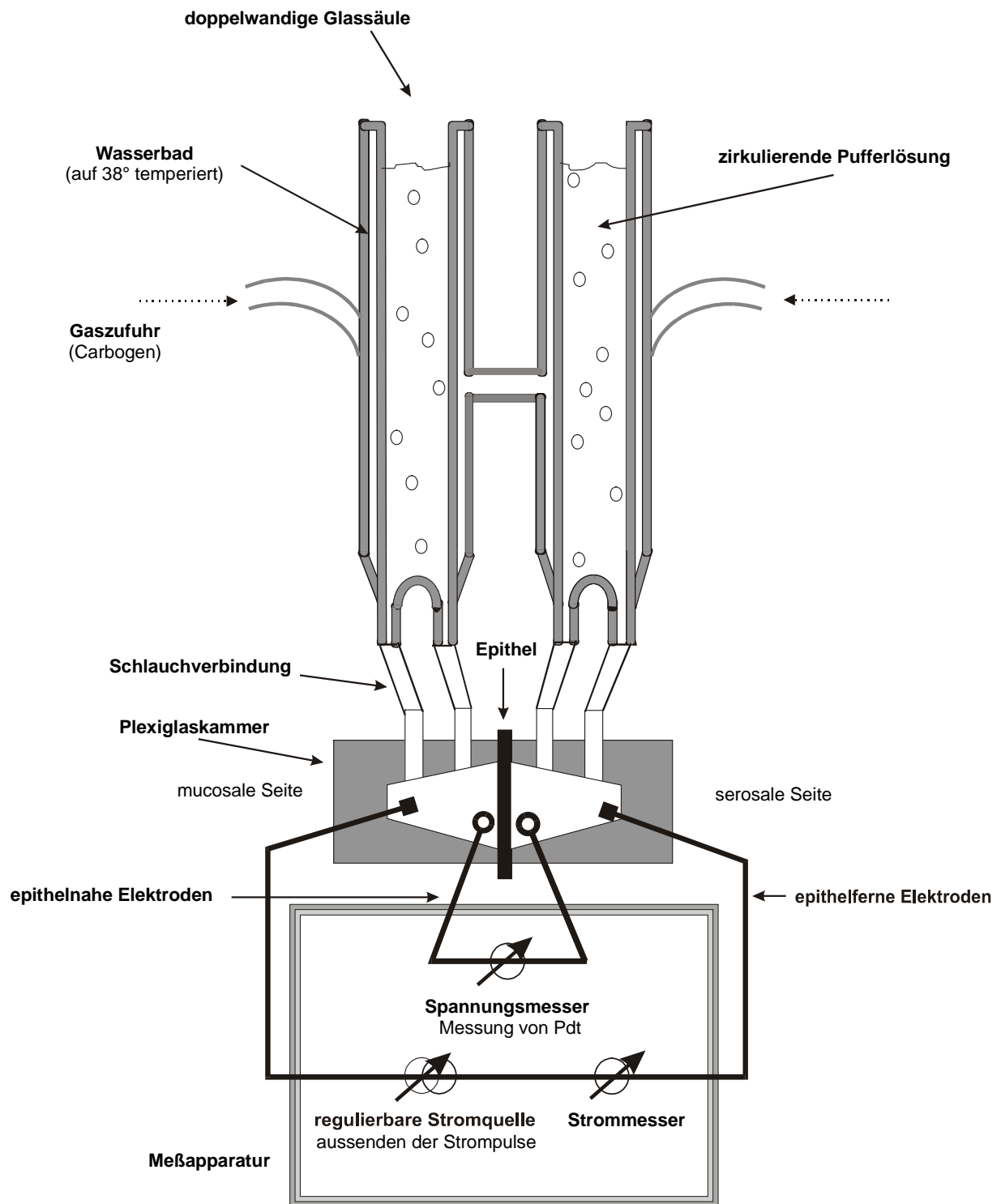


Abb. 5: Aufbau einer Ussing-Kammer. (Erklärungen im Text)

1.4 Elektrophysiologisches Meßprinzip

Grundsätzlich werden folgende verschiedene Bedingungen zur Bestimmung von Potentialdifferenz (PD_t), Kurzschlußstrom (I_{sc}) und Gewebeleitfähigkeit (G_t) unterschieden:

1.4.1 Messung unter "Open-circuit-Bedingungen"

Die transmurale Potentialdifferenz (PD_t) wird unbeeinflusst direkt über die gewebe nahen Agarbrücken gemessen. Ein definierter Strompuls (ΔI) von $100\mu A$ Stärke und 1s Dauer wird über die gewebe ferneren Agarbrücken über das Gewebe geleitet. Durch den Widerstand des Gewebes entsteht eine kurzfristige Änderung der Potentialdifferenz (ΔPD_t). Aus dieser läßt sich nach dem Ohmschen Gesetz die Leitfähigkeit (G_t) berechnen:

Die Gewebeleitfähigkeit ist der reziproke Wert des Gewebewiderstandes:

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

weil gilt, daß: $R = \frac{U}{I}$ folgt also: $G_t = \frac{I}{U}$.

Für den Strom I werden die definierten Strompulse ΔI angenommen. Für die Spannung U wird die Änderung der Potentialdifferenz (ΔPD_t) eingesetzt.

Daraus folgt: $G_t = \frac{\Delta I}{\Delta PD_t}$

1.4.1.1 Berechnung des transmuralen Stroms I_t

Nach dem Ohmschen Gesetz gilt auch: $I = G_t \cdot U$

Setzt man für U wieder ΔPD_t ein, so erhält man für den Strom I_t der durch Ionen transportvorgänge über dem Gewebe entsteht:

$$I_t = G_t \cdot \Delta PD_t$$

1.4.2 Messung unter "short-circuit-Bedingungen"

Durch eine externe Stromquelle wird die Potentialdifferenz (PD_t) auf 0 mV ausgeglichen. Da die Potentialdifferenz als Folge von Ionen transport durch das Epithel entstanden ist, entspricht der externe Ausgleichsstrom dem aktiven Ionen transport durch das Epithel, wenn kein chemischer Gradient vorliegt, der passive Ionenbewegungen induziert. Dazu müssen Ionenkonzentration und pH-Wert auf beiden Seiten des Epithels gleich sein. Der externe Strom, der benötigt wird um PD_t auf 0 mV auszugleichen, wird Kurzschlußstrom (I_{sc}) genannt.

Die Leitfähigkeit wird wieder berechnet: $G_t = \frac{I_{sc}}{\Delta PDt}$

1.5 Versuchsablauf

1.5.1 Elektrophysiologische Messungen

Für die Versuche zur Elektrophysiologie wurden die kleineren Kammern, die eine Gewebsfläche von 0.95 cm^2 einschließen, verwendet.

Nach einer „Erholungsphase“ von ca. 30 min wurden die Epithelien „kurzgeschlossen“, d.h. die Potentialdifferenz (PD_t) wurde auf $0 = \text{mV}$ ausgeglichen. Nach einer weiteren Adaptationszeit, deren Ende erreicht ist, wenn die physiologischen Parameter Leitfähigkeit (G_t) und Kurzschlußstrom (I_{sc}) stabile Werte erreicht haben, wurden vier Gruppen, die jeweils Epithelien enthalten, deren Ströme und Leitfähigkeiten hohe, mittlere, und niedrige Werte haben, gebildet. Dann wurden pro Gruppe auf der mucosalen Seite jeder Kammer jeweils entweder Captopril, Cefadroxil oder Glycyl-Glutamin zugegeben, so daß in der Inkubationslösung eine Konzentration von 2 mmol/l vorlag. Eine Gruppe diente als Kontrolle.

Leitfähigkeit (G_t) und Kurzschlußstrom (I_{sc}) wurden fortlaufend, ab 8 min vor Zugabe bis 12 min nach Zugabe gemessen und in 2 min Intervallen ausgewertet.

Die Messungen erfolgten an Pansen und Psalter und wurden jeweils bei einem pH-Wert von 7,4 und 6,4 mucosal durchgeführt. Auf der serosalen Seite betrug der pH-Wert immer 7,4.

1.5.2 Messung der Peptidfluxe

Zur Messung der Transportraten von Peptiden wurden Ussing-Kammern mit einer Inkubationsfläche von 3.14 cm^2 verwendet.

Nach der üblichen Zeit zur Anpassung wurden die Epithelien „kurzgeschlossen“ und nach entsprechender Äquilibrationszeit aus jeweils zwei, in ihren elektrophysiologischen Parametern ähnlichen Geweben, ein Paar gebildet. Die Unterschiede in der Leitfähigkeit durften nicht mehr als 20 % betragen. Die Zugabe von $10 \mu\text{Ci}$ des radioaktiv markierten Peptids (D-Phenylalanyl-L-Alanin [$2,3\text{-}^3\text{H}$]) erfolgte bei einer Kammer jeden Paares auf der mucosalen Seite, um den Transport nach serosal zu ermitteln (J_{ms}), bei der anderen Kammer auf der serosalen Seite (J_{sm}), um die Transporte in die Gegenrichtung festzustellen. Ca. 80 min nach Zugabe des Peptids wurde die erste, kurz vor Versuchsende die zweite Probe ($100 \mu\text{l}$) von der „heißen“ (Zugabe-) Seite genommen und mit dem Mittelwert die spezifische Aktivität berechnet (s. Formel). 90 min nach Zugabe des Peptids wurde die erste Probe ($750 \mu\text{l}$) von der

gegenüberliegenden „kalten“ Seite entnommen und das entzogene Volumen durch frische Pufferlösung ersetzt. Die Proben wurden mit Szintillator auf 5ml aufgefüllt und die in ihnen enthaltene Aktivität im Betazähler (Liquid Scintillation Counter (LCS) Wallac 1409/11, Wallac Finnland) gemessen.

Es wurden drei Fluxraten im Abstand von je einer Stunde bestimmt. Danach wurde in den ersten drei Versuchen auf der serosalen Seite Ouabain (Konzentration von 0,1 mmol/l) zugegeben und nach 20 min erneut zwei Fluxraten im Abstand von jeweils einer Stunde bestimmt.

In weiteren Versuchen wurde nach Bestimmung der ersten drei Fluxraten auf der mucosalen Seite der osmotische Druck von 200 mmol/l auf 500 mmol/l durch Mannitzugabe erhöht und nach 90 min erneut zwei Fluxraten im Abstand von je einer Stunde ermittelt.

Die Fluxraten wurden nach folgender Formel berechnet und als Transport in Nanomol über 1 cm² pro Stunde ausgedrückt.

Berechnung der unidirektionalen Peptidtransportraten:

$$J = \frac{cpm_2 \cdot \frac{V_S}{V_P} - \left(cpm_1 \cdot \frac{V_S - V_P}{V_P} \right)}{\frac{cpm_H}{S} \cdot t \cdot A} \quad [\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}]$$

cpm: counts pro Minute [1/min]

cpm_{2/1}: der zum Zeitpunkt t₁ oder t₂ entnommenen Proben von der „kalten“ Seite

cpm_H: des Mittelwertes der Proben von der „heißen“ Seite.

V_S: gesamtes Puffervolumen in der Säule + Kammerhälfte [ml]

V_P: Volumen der von der „kalten“ Seite entnommenen Probe [ml]

S: Konz. nicht radioaktiven Peptids in der „heißen“ Probe [mmol/l]
(der Term cpm_H/S entspricht der spezifischen Aktivität)

t: Zeitintervall zwischen zwei „kalten“ Proben [h]

A: in der Kammer freiliegende Epithelfläche [cm²]

Aus den unidirektionalen Fluxraten (J_{ms} und J_{sm}) wurde der Nettoflux, J_{net}, nach folgender Formel errechnet:

$$J_{\text{net}} = J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}} \quad [\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}]$$

Ein positives Vorzeichen bedeutet Nettoresorption, ein negatives Nettosekretion.

1.6 Messung intrazellulärer pH-Werte

1.6.1 Kultivierung der Pansenepithelzellen

Aus dem caudalen Blindsack des Pansens wurden ca. 10 cm lange Gewebestreifen entnommen, 3-4 mal in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier, gepufferter Salzlösung (DPBS) mit 4,0% Penicillin-Streptomycin gewaschen und anschließend 1h bei 4°C in dieser Lösung inkubiert. Nach Trennung der Pansenzotten vom Bindegewebe und zweimaligem Waschen in antibiotikafreier DPBS wurden die Zotten einer fraktionierten Trypsinierung unterzogen (=25% Trypsin-EDTA-Lösung mit 2,5g Schweinetrypsin und 0,2g EDTA/l, 38°C). Dabei wurde die Trypsinlösung alle 30 min gewechselt, die gewonnenen Fraktionen wurden durch Gaze gefiltert und dann bei 4°C aufbewahrt. Nach mikroskopischer Begutachtung wurden die Zellfraktionen ausgewählt, die überwiegend Zellen aus dem Stratum basale und Stratum spinosum enthalten. Diese wurden in DPBS mit 1% Penicillin - Streptomycin gewaschen, in Medium resuspendiert, gezählt und die Vitalität mit Trypanblau geprüft. Die Zellen wurden anschließend in collagenbeschichtete Kulturgefäße eingesät (5×10^5 Zellen/ml). Die Kulturen wurden täglich mikroskopisch begutachtet. Für Messungen ist der Zeitraum zwischen dem 8. und 12. Kulturtag geeignet, danach sind die Zellen zu stark differenziert und dadurch verhornt.

1.6.2 Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen

Zur Messung von intrazellulären Ionenkonzentrationen werden die Zellen mit Fluoreszenzindikatoren beladen. Die Fluoreszenzindikatoren sind Polyanionen, deren aktive Formen mit bestimmten Ionen Komplexe bilden können und dadurch ihre Fluoreszenzintensität und die Exzitations- bzw. Emissionsmaxima verändern. Diese Veränderungen sind proportional zum Verhältnis freier Indikator/Indikator-Ion-Komplex. Deshalb kann dieses Verhältnis zur Bestimmung der Ionenkonzentration herangezogen werden. Die Beladung der Zellen erfolgt mit der membrangängigen Esterform des Indikators, die intrazellulär durch unspezifische Esterasen hydrolysiert und so aktiviert wird. Für die Messung intrazellulärer H^{+} -Konzentrationen wird der Indikator BCEFC verwendet.

Vorbereitung der Zellen für die Messung:

Durch kurze Trypsinierung werden die Zellen vom Substrat gelöst (unter mikroskopischer Kontrolle). Die isolierten Zellen wurden zweimal in HANKs-BSS mit Hapes und 1 mmol/l Ca^{2+} gewaschen, (10 min, 800 G) und resuspendiert. Nach einer Erholungsphase von 15 min wird die Zellsuspension (Zytokrit: 10%) mit Indikatorlösung (Indikator-Stammlösung,

Pluronsäure F-127, HANKs-BSS) im Verhältnis 3:1 gemischt. Der Beladungsvorgang (für BCECF 25 min, bei einer Indikatorenendkonzentration von 0,5 $\mu\text{mol/l}$) erfolgt bei 37°C in einem Schüttelwasserbad. Durch anschließendes Waschen (10min, 800 G) in HANKs-BSS wurde überflüssiger Indikator entfernt. Nach ca. 30 min ist der Farbstoff in den Zellen hydrolisiert und damit aktiviert.

1.6.3 Gewinnung und Quantifizierung der Fluoreszenzdaten

Die Messungen wurden mit einem computergesteuerten Fluoreszenzspektrometer LS 50-B der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Zur Steuerung des Meßplatzes und zur Auswertung der Versuchsdaten wurde die Perkin-Elmer-Software FL Win-Lab eingesetzt. Die Fluoreszenzintensität wurde in einer 10mm-Küvette bei konstanter Temperatur (37°C) unter kontinuierlichem Rühren über einen Zeitraum von 600 sec gemessen. 300 sec nach Beginn der Messungen erfolgte die Peptidzugabe (Phen-Ala-Ala) in Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$, 250 $\mu\text{mol/l}$, 500 $\mu\text{mol/l}$ oder 1mmol/l. In den Messungen des ersten Versuchsansatzes wurde das umgebende Medium auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, in einem zweiten Versuchsansatz erfolgten Messungen bei einem extrazellulären pH von 6,4, um durch den erhöhten Protonengradienten die Triebkraft des Protonen- gekoppelten Transporters zu verstärken. Die Berechnung der Ionenkonzentration aus den Fluoreszenzdaten erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve.

1.7 Chemikalien und Bezugsquellen

1.7.1 Inkubationslösungen

Die Pufferlösungen wurden ein bis zwei Tage vor dem Versuch mit Chemikalien der Firmen Merck, Sigma und Bachem hergestellt (Qualität: pro analysi) und im Kühlschrank aufbewahrt. Der pH-Wert wurde beim Erstellen der Lösungen und im Versuch mittels pH-Meter (Fa. Knick) gemessen, die Osmolarität mit einem Osmometer der (Fa. Roebing/ Gefrierpunktserniedrigung) bestimmt. Die Zusammensetzung der Inkubationslösungen, ihr pH-Wert und die Osmolarität sind im Anhang aufgeführt.

1.7.2 Pharmaka

Die Substanzen Captopril, Cefadroxil, Glycyl-Glutamin und Ouabain wurden von der Firma Sigma bezogen.

Captopril, Glycyl-Glutamin und Ouabain wurden in Aqua dest. gelöst. Als Lösungsmittel für Cefadroxil diente NH_3 -Lösung (1 mol/l).

D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3- ^3H] wurde von der Fa. ARC (American Radiolabeled Chem.) bezogen.

Sämtliche Substanzen für die Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

1.8 Statistik

In dieser Arbeit wurden von je einem Versuchstier immer mehrere Epithelien in verschiedenen Ussingkammern untersucht. Die Anzahl der Versuchstiere wurde mit „N“ bezeichnet, die Anzahl der verwendeten Epithelien pro Behandlungsgruppe wurde „n“ genannt.

Statistische Berechnungen erfolgten mit dem Programm-Paket SPSS 8.0 für Windows, sowie dem Programm Sigma Stat. (Jandel Scientific).

1.8.1 Elektrophysiologische Messungen

Jeder Versuchsansatz wurde an vier Tieren durchgeführt. Von jedem Versuchstier wurden für jede Behandlungsgruppe (Kontrolle, Captopril, Gly-Gln und Cefadroxil) jeweils drei Epithelien verwendet.

Um Veränderungen durch Substanzzugabe zu ermitteln, wurde für jedes Epithel der Wert am Zugabezeitpunkt (=0min) von dem nach 2min ermittelten Meßwert subtrahiert, so daß jeweils 3 Differenzwerte je Behandlungsgruppe und Versuchstier vorliegen.

Die Auswertung erfolgt in Form einer Varianzanalyse mit einem zweifaktoriellen Modell mit Wechselwirkung (Elektronentransport=Versuch+Zugabe+Versuch*Zugabe+Rest). „Zugabe“ (=Behandlungsgruppe) stellt den interessierenden systematischen Effekt dar, „Versuch“ (=Versuchstier) ist ein zufälliger Effekt.

Die Beurteilung des Effektes „Zugabe“ geschieht im Vergleich zum zufälligen Effekt der Wechselwirkung „Versuch* Zugabe“, ggf. gepoolt mit der „Rest-Streuung“ innerhalb von Versuch und Behandlung. Von einem erkennbaren Unterschied wird im folgenden gesprochen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit p des Effekts der Zugabe kleiner als 0,05 ist. Von einem zusätzlichen systematischen Unterschied zwischen den Versuchstieren

wird ausgegangen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Effekts Versuchstier kleiner als 0,05 ist.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse werden die einzelnen Differenzwerte in Punktediagrammen dargestellt, mit unterschiedlichen Symbolen für die verschiedenen Versuchstiere.

Darüberhinaus werden aus sämtlichen Werten, die für jede Behandlungsgruppe (Kontrolle, Captopril, Glycyl-Glutamin und Cefadroxil) in jedem Versuchsansatz (HF- und KF-Tiere, pH 7,4 und pH 6,4 mucosal) gemessen wurden, Mittelwerte (mit Standardfehler) zu jedem Meßzeitpunkt errechnet und als Kurven in Abhängigkeit zum zeitlichen Verlauf dargestellt. An den so ermittelten Verlaufskurven wurde der Zeitpunkt 0 min (Zugabe) gegenüber dem Zeitpunkt 2 min auf signifikante Veränderungen mit dem Programm Sigma Stat. (t-Test) überprüft.

1.8.2 Messung der Transportraten von radioaktiv markiertem Peptid

Die Messung der Transportraten von radioaktiv markiertem Peptid wurde an insgesamt sechs Tieren durchgeführt. Von jedem Tier wurden für jede Gewebeart (Pansen und Psalter) vier Epithelproben untersucht, zwei in der Transportrichtung J_{ms} , zwei in der Richtung J_{sm} . Aus den auf diese Weise ermittelten unidirektionalen Transportraten wurde dann der Nettotransport J_{net} errechnet.

Nach Bestimmung von drei Fluxperioden wurde bei den Epithelien von drei Tieren auf der serosalen Seite Ouabain zugegeben und danach zwei weitere Fluxperioden bestimmt. Bei den Epithelien der anderen drei Tiere erfolgte nach Bestimmung von drei Fluxperioden die Zugabe von Mannit auf der mucosalen Seite.

Nettofluxraten:

Für die Messungen der Kontrollgruppe (vor Zugabe von Ouabain, bzw. Mannit; N=6 Versuchstiere) mit jeweils zwei Epithelien für jede unidirektionale Transportrichtung pro Tier und Gewebe wurde eine Varianzanalyse zur Quantifizierung der intraindividuellen (zwischen Epithelien desselben Tieres) und der zusätzlichen interindividuellen (zwischen Tieren) Varianz durchgeführt.

Verwendet wurde das gemischte zweifaktorielle Modell mit Wechselwirkung, erweitert um einen zufälligen Effekt „Paare“ (=Epithel) innerhalb von Versuch und Behandlung. (Flux= Versuch + Behandlung * Versuch + Rest). Untersucht wird ob ein erkennbarer Unterschied

zwischen „Paare“ im Vergleich zur „Rest“-Streuung zu erkennen ist. Das würde bedeuten, daß die Streuung zwischen den Epithelien deutlich größer ist als die Streuung der Wiederholungsmessungen.

Von einem erkennbaren Unterschied wird im folgenden gesprochen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit p des Effekts kleiner als 0,05 ist. Von einem zusätzlichen systematischen Unterschied zwischen den Versuchstieren wird ausgegangen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit p des Effekts „Versuch“ kleiner als 0,05 ist.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse werden die einzelnen Nettotransportraten in Punktediagrammen dargestellt, mit unterschiedlichen Symbolen für die verschiedenen Versuchstiere.

Gerichtete Transportraten:

Zur Untersuchung der einzelnen Transportrichtungen (J_{ms} und J_{sm}) wurden die pro Epithel erfolgten 3 Einzelmessungen herangezogen und zunächst wieder mit Hilfe einer Varianzkomponenten-Schätzung die Restvarianz solcher Wiederholungsmessungen an demselben Epithel bestimmt. Zusätzlich wurden die durch eine Wechselwirkung zwischen Versuchstier und Epithel bedingte Varianz, die zwischen Epithelien desselben Tieres auftretende Varianz und darüber hinaus die zwischen Tieren vorkommende Varianz quantifiziert.

Der Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen erfolgt hier in Form einer Varianzanalyse mit einem zweifaktoriellen Modell mit Wechselwirkung ($\text{Flux} = \text{Versuch} + \text{Zugabe} + \text{Versuch} * \text{Zugabe} + \text{Rest}$). „Zugabe“ (=Behandlungsgruppe) stellt den interessierenden systematischen Effekt dar, „Versuch“ ist ein zufälliger Effekt. Die Beurteilung des Effektes „Zugabe“ geschieht im Vergleich zum zufälligen Effekt der Wechselwirkung „Versuch*Zugabe“, ggf. gepoolt mit der „Rest“-Streuung innerhalb von Versuch und Behandlung. Von einem erkennbaren Unterschied wird im folgenden gesprochen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit p des Effekts der „Zugabe“ kleiner als 0,05 ist. Von einem zusätzlichen systematischen Unterschied zwischen den Versuchstieren wird ausgegangen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit p des Effekts „Versuch“ kleiner als 0,05 ist.

