

3 Material und Methoden

3.1 Herkunft der Gewebeproben

Die Untersuchungen wurden an Ferkeln im Rahmen der durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Forschergruppe 438 „Integrative Analyse der Wirkungsmechanismen von Probiotika beim Schwein“ durchgeführt. Die Ferkel wurden im Institut für Tierernährung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin geboren und aufgezogen.

3.1.1 Herkunft und Abstammung der verwendeten Tiere

Alle Sauen sowie die zur Bedeckung bzw. künstlichen Besamung verwandten Eber stammten von der Firma Hülsenberger Zuchtschweine GmbH, (Pinneberg, Deutschland)².

Neun der 10 Sauen gehörten zur Hülsenberger Hybridrasse, einer Kreuzung aus Deutsche Landrasse x Duroc. Eine Sau war eine Hybride aus Deutsche Landrasse x Euroc. (Euroc ist eine spezielle Rasse, die von der Firma Hülsenberger Zuchtschweine GmbH aus Duroc entwickelt wurde.) Die Hybrideber waren Tiere unterschiedlicher Rassen: Belgische Landrasse x Hampshire bzw. Belgische Landrasse x Duroc. Für die Künstliche Besamung wurden reinrassige Duroc-Eber verwendet.

Die Sauen waren unterschiedlich alt. Der für den Versuch verwendete Wurf war ihr erster bis 4. Wurf. Jede Sau wurde nur ein Mal mit einem Wurf in den Versuch einbezogen. Es wurden ausschließlich Würfe mit einer Wurfstärke von mindestens 11 Ferkeln pro Sau am 3. Tag nach der Geburt in den Versuch einbezogen, um die Aufzuchtbedingungen für die Ferkel so einheitlich wie möglich zu gestalten.

Die Sauen wurden zwei verschiedenen Fütterungsgruppen zufällig zugeordnet. Diese Zuordnung blieb für die Ferkel der jeweiligen Sauen erhalten. Es wurden insgesamt 40 Ferkel, 20 Kontroll- und 20 Probiotikatiere verwendet. Je 5 Ferkel pro Gruppe wurden im Alter von 14, 28, 35 bzw. 56 Tagen getötet und untersucht. Das Absetzalter betrug 28 Tage. Die Untersuchungszeitpunkte wurden gewählt, um die verschiedenen Entwicklungsstadien des Ferkels untersuchen zu können. Die 14 Tage alten Ferkel hatten ausschließlich Zugang zu Sauenmilch. Die 28 Tage alten Ferkel bekamen vom 15. Tag bis zum Versuchszeitpunkt zusätzlich zur Sauenmilch ein Mischfuttermittel zur freien Aufnahme (siehe Kapitel 3.1.4 und 9.2). Die 35 Tage alten Ferkel wurden 7 Tage und die 56 Tage alten Ferkel 28 Tage nach dem Absetzen untersucht, um die kurz- und längerfristigen Auswirkungen des Absetzens erfassen zu können. Da die oben genannten Stadien alle Ferkel im 'normalen' Produktionsbetrieb durchlaufen, kann hier neben dem Effekt des Probiotikaeinsatzes auf die einzelnen Produktionsphasen auch die Entwicklung der Parameter mit zunehmendem Alter der Ferkel untersucht werden.

² Hülsenberger Zuchtschweine GmbH, Postfach 2062, D-25410 Pinneberg - Tochtergesellschaft der H. Wilhelm Schaumann GmbH, An der Mühlenau 4, D-25421 Pinneberg, Tel: +49(0) 4101 218-0, Fax: +49 (0) 4101 218-318, E-mail: info@schaumann-online.de, Internet: www.schaumann-online.de

Die Ferkel hatten im Alter von 14 Tagen ein Lebendgewicht von 4,28 ($\pm 0,643$)³ kg, im Alter von 28 Tagen wogen die Ferkel 8,09 ($\pm 2,128$) kg. 35 Tage alte Ferkel waren 8,31 ($\pm 2,327$) kg schwer, die 56 Tage alten Ferkel hatten Lebendmassen von 17,25 ($\pm 4,446$) kg.

3.1.2 Haltung der Sauen und Ferkel

Die Haltung erfolgte unter konventionellen Bedingungen.

Tragende Sauen waren in Gruppen von 3-4 Tieren in Liegebuchten mit Laufflächen aus Beton aufgestellt. Laktierende Sauen standen in Kastenständen innerhalb von Buchten, in denen sich die Ferkel frei bewegen konnten, mit Betonboden und Stroheinstreu. Es wurde ein Beleuchtungsprogramm mit 16 h Licht und 8 h Dunkelheit gefahren. Das Stallklima war auf 21,5°C Lufttemperatur sowie 65% Luftfeuchte eingestellt.

Die abgesetzten Ferkel wurden in 'Flat-decks' mit Teilspaltenboden gehalten. Es wurden 2 Ferkel, in Einzelfällen auch ein oder drei Ferkel pro Box aufgestellt. Die Stalltemperatur lag bei ca. 26°C direkt nach dem Absetzen und wurde mit zunehmendem Alter der Ferkel entsprechend reduziert.

3.1.3 Gesundheitlicher Status der Ferkel

Von allen getöteten Ferkeln wurden Gewebeproben des proximalen Ileums genommen. Die Untersuchung mit fluoreszenzserologischen Methoden durch Hr. Dr. Hentschke⁴, ILAT⁵ auf Rota-, Corona- und TGE-Viren ergab: "Kein Nachweis von enteropathogenem Virusantigen".

Bei Untersuchungen auf enteropathogene Bakterien wurden zwar E. coli mit Virulenzgenen gefunden (TARAS et al., 2006), was jedoch aufgrund der fehlenden Klinik nicht von Bedeutung zu sein scheint (SCHIERACK et al., 2006). Der Nachweis von Virulenzgenen allein sagt nichts über die Pathogenität der Stämme aus (SONNTAG et al., 2005).

3.1.4 Fütterung der Sauen und Ferkel

Das Fütterungsregime in beiden Fütterungsgruppen war identisch. In der Kontrollgruppe wurde das der jeweiligen Fütterungsphase entsprechende Alleinfutter gefüttert (siehe Anhang 9.2, Tabelle 9.2.1), in der Probiotikagruppe wurde diesem Alleinfutter das unten beschriebene Probiotikum Toyocerin[®] zugesetzt. Die Zugabe des Probiotikums für tragende Sauen in der Probiotikagruppe begann am 24. Tag nach der Bedeckung, während alle anderen Tiere den Probiotikazusatz durchgängig ab Beginn der jeweiligen Fütterungsphase erhielten (Laktierende Sauen, Saugferkel, abgesetzte Ferkel).

Die pelletierte Futtermischung der Sauen basierte auf Gerste und Weizen. Den Sauen wurde zwei Mal täglich Futter angeboten, die Menge entsprechend ihres Körpergewichtes und der Wurfgröße zugeordnet. Die Grundzutaten des Ferkelfutters waren Weizen und Sojaschrot, es wurde als Brei gefüttert. Das Mischfutter für Ferkel wurde bis zum Tötungstermin *ad libitum* gefüttert. Alle Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Wasser. Die Futterzusammensetzungen

³ Alle in dieser Form dargestellten Werte geben den Mittelwert (\pm Standardabweichung) wieder.

⁴ ZID-Leiter und FTA für Mikrobiologie, Tel: +49 (0) 30 397 84 343, E-mail: hentschke.ilat@bbges.de

⁵ Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen Berlin, Invalidenstr. 60, D-10557 Berlin, Tel: +49 (0) 30 397 84 30, Fax: +49 (0) 30 397 84 380, E-mail: mail@bbges.de

der einzelnen Futtermittel für die verschiedenen Reproduktionsstufen befinden sich in Tabelle 9.2.1 des Anhanges 9.2.

3.1.5 Das Probiotikum Toyocerin®

Das Produkt Toyocerin®⁶ als Futtermittelzusatzstoff ist ein Fermentationsprodukt und besteht aus lebensfähigen Sporen von *Bacillus cereus* var. *toyoi* mit der Stammnummer: CNCM I-1012/NCIMB 40112. Als Trägersubstanz dient Calciumcarbonat. Das verwendete Präparat enthält 10^{10} Sporen von *Bacillus cereus* var. *toyoi*/g. Es ist ein geruchloses, weißes, freifließendes Pulver (LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO. KG, 2004). Toyocerin® wurde dem Futter in einer Menge von 50 mg pro kg Sauenfutter bzw. 100 mg pro kg Ferkelfutter zugesetzt (Mitteilung aus dem Institut für Tierernährung).

Die tatsächlich gemessene Konzentration an *Bacillus cereus* var. *toyoi* im Sauenfutter lag bei $2,35 (\pm 0,97) \times 10^8$ Zellen pro kg ursprüngliche Substanz (uS) für tragende Sauen und bei $3,65 (\pm 1,11) \times 10^8$ Zellen/kg uS für laktierende Sauen. Im Ferkelfutter wurde eine tatsächliche *Bacillus cereus* var. *toyoi*-Konzentration von $1,15 (\pm 0,48) \times 10^9$ Zellen/kg uS für Saugferkel und $1,28 (\pm 0,34) \times 10^9$ Zellen/kg uS für abgesetzte Ferkel gemessen (Mitteilung aus dem Institut für Tierernährung).

Bis zum Alter von 14 Tagen wurde das Probiotikum durch die Ferkel nur über die Sau als Vektor aufgenommen. Die Aufnahme erfolgte über den Kot der Sau (JADAMUS, 2001; SIMON, 2005) sowie zusätzlich über die kontaminierte Zitzenleiste (Mitteilung aus dem Institut für Tierernährung). In der Literatur wird die Menge an aufgenommenem Sauenkot pro Ferkel mit etwa 20 g/Tag angegeben (SANSOM und GLEED, 1981).

Durch diese Vektorfunktion der Sau waren im Kot von allen Ferkeln eines Wurfes gleichmäßige Konzentrationen von *Bacillus cereus* var. *toyoi* in den ersten 14 Lebenstagen nachweisbar (Mitteilung aus dem Institut für Tierernährung).

Die Aufnahme von Zusatzfutter konnte vom 15. bis zum 28. Tag aufgrund der Haltungsform nur geschätzt werden. Sie wurde mit durchschnittlich etwa 70 g/Tier und Tag angenommen. Zwischen dem 29. und 35. Tag betrug die mittlere Futteraufnahme je Ferkel in der Kontrollgruppe $257 (\pm 87)$ g/Tag und in der Probiotikagruppe $281 (\pm 116)$ g/Tag. Vom 36. bis zum 56. Tag war die Futteraufnahme in der Probiotikagruppe mit $630 (\pm 165)$ g/Tier und Tag wiederum höher als in der Kontrollgruppe mit $617 (\pm 178)$ g/Tier und Tag (Mitteilung aus dem Institut für Tierernährung).

3.2 Pufferlösungen und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden bei den Firmen Merck, Roth und Sigma erworben (siehe Anhang 9.1).

Die Zusammensetzung der Pufferlösungen, in denen das Gewebe transportiert bzw. während des Versuches umspült wurde, kann dem Anhang 9.1 entnommen werden.

Mannit, ein chemisch inerte Zucker, wurde zum Einstellen der Osmolarität auf 300 mosmol/l verwendet. Mannit ist parazellulär permeabel, jedoch ist die Transportrate so gering, dass

⁶ Firma Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Heinz-Lohmann-Str. 4, D-27472 Cuxhaven, Tel: +49 (0) 4721 747 0, Fax: +49 (0) 4721 747 152, E-mail: info@lah.de, Chargennummer: 001562

über die Dauer des Versuches in dieser Arbeit mögliche Konzentrationsänderungen von Mannit in den Puffern vernachlässigbar sind (WINCKLER et al., 1998). Die Osmolarität wurde über die Gefrierpunktmessung mit einem Osmometer der Firma Roebing Messtechnik GmbH⁷ ermittelt.

Alle Puffer wurden mit Carbogen begast. Carbogen ist die Bezeichnung für ein Gasgemisch aus 95% Sauerstoff (O₂) und 5% Kohlendioxid (CO₂). Es wurde von der Firma Air Liquide Deutschland GmbH⁸ bezogen. Bei einer Temperatur von 38 °C und Begasung mit Carbogen betrug der pH-Wert der Puffer 7,4.

Die Substanzen für die verwendeten Lösungen wurden in Messkolben eingewogen und danach mit Wasser auf das Sollvolumen aufgefüllt.

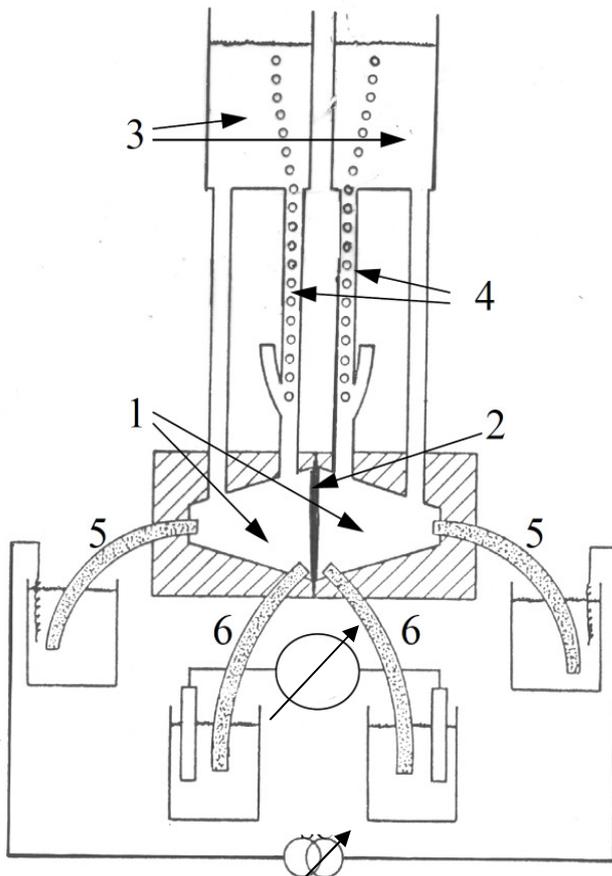
Alle Puffer und Substanzen wurden am Tag des Versuches angesetzt bzw. sofort nach dem Zubereiten auf -20 °C tiefgekühlt und am Tag des Versuches frisch aufgetaut.

⁷ Roebing Messtechnik GmbH, Katteweg 32, D-14129 Berlin, Tel: +49 (0)30 803 5671,
Fax: +49 (0)30 803 6252; Osmometer, Typ 5B, Baujahr 1990, Nr. 9009010

⁸ Air Liquide Deutschland GmbH, Ludwig-Boltzmann-Str. 3, D-12489 Berlin, Tel: +49 (0) 30 6 70 09-3,
Fax: +49 (0) 30 6 70 09-5090, E-mail: region.ost@airliquide.de

3.3 Versuchsaufbau und Inkubation der Epithelien

Der Versuchsaufbau geht auf USSING (1949) für die Untersuchung der Froschhaut zurück und wurde modifiziert, wie in USSING und ZERAHN (1951) sowie nachfolgend beschrieben, verwendet (siehe Abbildung 3.3.1).



- 1) Plexiglas-Halbkammer
- 2) Darmmukosa (Epithel)
- 3) Vorratsbehälter für Pufferlösungen mit Gaslift
- 4) Carbogen-Gasgemisch
- 5) definierte Stromeinspeisung mittels KCl-Agarbrücken, Gefäße mit KCl-Lösung und Ag-AgCl-Elektroden (> 20 mm Entfernung zum Epithel, 5-6 cm lang, 2 mm Innendurchmesser)
- 6) Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz mittels KCl-Agarbrücken und Ag-AgCl-Elektroden (< 3 mm Entfernung zum Epithelzentrum, 15-25 cm lang, 1,14 mm Innendurchmesser)

Abbildung 3.3.1: Ussing-Kammer mit Gasliftapparatur (Nach (KLEIN, 2001; LODEMANN, 2001; SCHEFFLER, 1984)). Links befindet sich die mukosale (= luminale = apikale) Seite, rechts die serosale Seite (= Blutseite = basolaterale Seite) des Epithels bzw. der Schleimhaut.

Die Ussing-Kammer bestand aus zwei Plexiglashalbkammern⁹ (1), zwischen die ein Epithelstück (2) so eingespannt wurde, dass die mukosale (= luminale = apikale) Seite nach links und die serosale (= basolaterale) Seite nach rechts ausgerichtet war (siehe Abbildung 3.3.1). Um Quetschungen an den Rändern der 0,95 cm² großen beidseitig von Pufferlösung umspülten Fläche des Epithels zu vermeiden ('edge leaks'), wurden Silikonringe beidseitig zwischen Gewebe und Plexiglas untergelegt (GORDON et al., 1990). Jede Halbkammer war über flexible Schläuche mit einer doppelwandigen Glassäule verbunden, worin sich jeweils 10 ml Pufferlösung (Zusammensetzung siehe Anhang 9.1) befanden. Mannitpuffer wurde auf der mukosalen Seite (links), Glukosepuffer auf der serosalen Seite (rechts) verwendet. Diese Pufferlösung wurde mit einem Gasliftsystem der Firma Landgraf¹⁰ über wassergefüllte Waschflaschen mit Carbogen begast und kontinuierlich durchmischt. Durch diese

⁹ hergestellt im Institut für Veterinär-Physiologie der FU Berlin, Oertzenweg 19b, D-14163 Berlin, Tel: +49 (0) 30 838 22600, Fax: +49 (0) 30 838 62610

¹⁰ Landgraf Laborsysteme HLL GmbH, Magdeburger Str. 3, D-30855 Langenhagen, Tel: +49 (0) 511 978206-0, Fax: +49 (0) 511 978206-29, E-mail: info@hll.de, Internet: www.HLL.de

Durchmischung des Puffers wurde die Bildung von ungerührten Lösungsschichten an der Epitheloberfläche („unstirred water layers“) vermieden (THOMSON und DIETSCHY, 1980). Zwischen den doppelten Wänden der Glassäulen zirkulierte mit Hilfe eines Pumpthermostaten (Haake D1 von der Firma Thermo¹¹) beheiztes Wasser, wodurch die Temperatur der Inkubationslösung auf 38°C eingestellt wurde.

Die Messung der elektrischen Parameter und die Stromspeisung wurden in der Ussing-Kammer über KCl-Agarbrücken¹² (3 M KCl-Lösung, 3% Agar-Agar) und Ag-AgCl-Elektroden¹³, die jeweils durch Gefäße mit 3 M KCl-Lösung verbunden wurden, mit Hilfe der 'Voltage Clamp'-Anlage (Voltage/Current Clamp für 6 Messkammern¹⁴) durchgeführt, welche auch die Datenerfassung ermöglichte.

Eine genaue Beschreibung der Messtechnik und das Prinzip der Messanlage sind in der Dissertation von SCHEFFLER (1984) nachzulesen. Die von der Gewebefläche abhängigen Größen Kurzschlussstrom I_{sc} und transepithelialer Widerstand R_t wurden von der Apparatur automatisch auf 1 cm² umgerechnet.

3.4 Elektrophysiologisches Messprinzip

Die elektrische Messung der Menge transportierter Ionen über eine bestimmte Epithelfläche in der Ussing-Kammer basiert auf den durch diese Ionen transportierten Ladungen. Dabei ist jedoch nur der Nettotransport von Ladungen messbar. Das heißt, ohne weitere Hilfsmittel sind keine unidirektionalen Fluxkomponenten bzw. Transporte einzelner Ionen bestimmbar (REHM (1975) zitiert nach (SCHEFFLER (1984))).

Es sind drei verschiedene Methoden zur Beeinflussung bzw. Erfassung der elektrophysiologischen Parameter etabliert: 'Open Circuit', 'Short Circuit' und 'Voltage Clamp' (zu Einzelheiten siehe SCHEFFLER (1984)).

3.4.1 'Open Circuit'

Unter der Bedingung des 'Open Circuit', des 'offenen Stromkreises', wird die transmurale Potenzialdifferenz (PD_t) direkt gemessen. Daneben wird durch Aussenden definierter Stromimpulse (ΔI) mit definierter Amplitude (50 bzw. 100 μA , bidirektionale Applikation der Strompulse) und Dauer (200 ms) eine kurzfristige Änderung (Abfall) der Potenzialdifferenz (PD_t) bewirkt. Unter Zuhilfenahme des Ohm'schen Gesetzes kann mittels der PD_t der transmurale Widerstand errechnet werden.

$$R_t = \frac{\Delta PD_t}{\Delta I} \quad (3.4.1)$$

¹¹ Thermo Haake, Dieselstr. 4, D-76227 Karlsruhe, Tel: +49 (0) 721 4094-444, Fax: +49 (0) 721 4094-300, E-mail: info.ctd.de@thermo.com

¹² Polyethylenschläuche; vordere Brücken: Innendurchmesser (ID) 1,14 mm, Außendurchmesser (AD) 1,57 mm; hintere Brücken: ID 2,00 mm, AD 3,00 mm

¹³ vordere Elektroden: Firma Ingold GmbH, Siemensstrasse 9, D-61449 Steinbach/Ts., Tel: +49 (0) 6171 7001-0, Fax: +49 (0) 6171 700199;

hintere Elektroden: hergestellt im Institut für Veterinär-Physiologie der FU Berlin

¹⁴ Einrichtung für Windows, Clamp Version 2.02 von Dipl.- Ing. K. Mußler, Wissenschaftliche Geräte, Auf Beverau 11, D-52066 Aachen, E-mail: kmussler@T-online.de, Internet: <http://www.kmsci.de>

Der transmurale Strom (I_t) kann wiederum mit dem Ohmschen Gesetz berechnet werden. Dazu wird PD_t vor dem Stromimpuls durch den mit Hilfe des Stromimpulses errechneten Widerstand dividiert.

$$I_t = \frac{\Delta PD_t}{R_t} \quad (3.4.2)$$

Es wurde in der Versuchsanordnung unter 'Open Circuit'-Bedingungen kein transmuraler Strom gemessen oder berechnet. Diese Technik wurde nur während der Adaptationsphase des Gewebes an die Ussing-Kammer-Umgebung benutzt (siehe auch Kapitel 3.6 Versuchsaufbau).

Die Berechnungen des transmuralen Widerstandes sowie der transmuralen Potenzialdifferenz erfolgte automatisch durch die Clamp-Anlage (siehe SCHEFFLER (1984)). Alle 6 s wurden eine Aufzeichnung von PD_t [mV] und R_t [$\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$] auf dem angeschlossenen Windows-PC vorgenommen.

3.4.2 'Short Circuit'

Bei Anwendung des 'Short Circuit' (Kurzschluss) wird die transmurale Potenzialdifferenz durch Einspeisen eines externen Stromes auf 0 mV geregelt (= 'geklemmt'). Durch den eingespeisten Strom, Kurzschlussstrom ($-I_{sc}$), werden die elektrogenen Ionenbewegungen kompensiert. Damit ist der $-I_{sc}$ äquivalent der Summe aller elektrogen transportierten Ionen und diesem Nettoladungstransport (I_{sc}) entgegengerichtet (SCHEFFLER, 1984; USSING und ZERAHN, 1951).

Durch diesen Kurzschluss des Epithels wird der elektrische Gradient ausgeschaltet, was zum ersten Mal von Ussing und Zerahn (1951) angewendet wurde. Werden dabei auf beiden Seiten identische Pufferlösungen verwendet, so ist auch der chemische Gradient ausgeschaltet. Tritt der Fall ein, dass auf beiden Seiten Pufferlösungen mit in einer Substanz verschiedener chemischer Zusammensetzung, doch mit gleicher Osmolarität verwendet werden, so ist zwar ein geringer chemischer Gradient vorhanden, jedoch der für passive Transportvorgänge sehr wichtige osmotische Gradient ausgeschaltet. Werden auf beiden Seiten gleiche Pufferfüllhöhe und gleiche Puffertemperatur benutzt, so sind auch der hydrostatische sowie der thermische Gradient ausgeschaltet.

Findet also unter 'Short Circuit'-Bedingungen bei Ausschaltung der oben genannten Gradienten eine Änderung des I_{sc} statt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen (primär oder sekundär) aktiven elektrogenen Nettotransport von Ionen handelt (CIVAN, 1983). Welche Ionen transportiert werden, hängt von den Rahmenbedingungen (Zugabe von Substraten oder Botenstoffen) ab, die so spezifisch wie möglich gestaltet werden müssen, damit es möglich ist, über die Messung auf nur einen bestimmten Ionenstrom zu schließen. Unter basalen Bedingungen wird der Kurzschlussstrom durch den Nettotransport von Na^+ -Ionen determiniert (SCHULTZ und ZALUSKY, 1964a; USSING und WINDHAGER, 1964).

Der transmurale Widerstand wurde wie im 'open circuit' bestimmt. Ebenso wurde alle 6 s eine Aufzeichnung der elektrischen Parameter PD_t [mV], PD_{t0} [mV], I_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$] und R_t [$\Omega \cdot cm^{-2}$] auf dem angeschlossenen Windows-PC vorgenommen.

3.4.3 'Voltage Clamp'

Die 'Voltage Clamp' ('Spannungsklemme') funktioniert im Prinzip wie die Versuchsanordnung 'short circuit'. Der einzige Unterschied besteht darin, dass das Gewebe durch Einspeisen eines externen Stromes nicht auf 0 mV geklemmt wird, sondern auf einen festgelegten positiven oder negativen Wert ungleich 0 mV. Damit entsteht ein definierter elektrischer Gradient über dem Epithel, wodurch passive Ionenströme verursacht werden.

Die 'Voltage Clamp' wurde im vorliegenden Versuch nicht verwendet.

3.4.4 Weitere Erläuterungen zu den Messungen

Die transmurale Potenzialdifferenz wird durch elektrogene Ionen Transporte aufgebaut. Dabei ist die mukosale Seite elektrisch negativ gegenüber der serosalen Seite (Referenzseite) (CIVAN, 1983), es liegt also eine negative PD_t vor. Dieser Spannungsaufbau geschieht durch den aktiven transepithelialen Transport von Na^+ (USSING und ZERAHN, 1951), welches hier vor allem über den apikalen Na^+ -Glukosetransporter in die Zelle aufgenommen und über die basolaterale Na^+ - K^+ -ATPase wieder ausströmt, was einen kontinuierlichen Strom positiver Ladungen von mukosal nach serosal erzeugt.

Nachdem sich ein basaler I_{sc} (I_{scB}) stabilisiert hat, werden Substanzen zugesetzt, die spezifische Ionen Transporte verursachen. Dadurch erfolgt eine Änderung des I_{sc} bis zu einer Anstiegsspitze in einem definierten Zeitraum (I_{scV}). Die Differenz ' $I_{scV} - I_{scB}$ ' ergibt ein ΔI_{sc} , welches dem Ionenstrom gleichgerichtet ist. Durch die Berechnung von ΔI_{sc} können neben dem basalen Na^+ -Transport die unspezifischen Ionen Transporte des I_{scB} eliminiert und der durch die Zugabesubstanz hervorgerufene Ionen Transport bestimmt werden.

3.5 Organentnahme und Präparation der Epithelien

Gegen 8.00 Uhr des Versuchstages wurde bei den oben beschriebenen Schweinen die Narkoseeinleitung mit 0,2 ml/kg Ketamin¹⁵ und 0,1 ml/kg Stressnil i.m. durchgeführt. Gleichzeitig wurde der Transportpuffer im Dewar-Gefäß auf 38°C erwärmt, in Methanol gelöstes und bei -20°C gelagertes Indomethacin (2,8 μM im Puffer) zugegeben, sowie die ständige Begasung des Puffers mit Carbogen eingerichtet.

Das Indomethacin diente zur Unterdrückung der endogenen PGE-Synthese durch das Gewebe (ARGENZIO und LIACOS, 1990; BLIKSLAGER et al., 2002).

Gegen 8.30 Uhr wurde die Sedation in eine tiefe Narkose mit 0,6 ml/kg Eutha[®] 77 i.p. überführt. Nach vollem Wirkungseintritt der Narkose (5 bis 10 min) wurde eine Blutentnahme aus der Vena jugularis oder der Vena cava cranialis und die mediane Eröffnung der Bauchhöhle mit zwei lateralen Entlastungsschnitten vorgenommen.

¹⁵ Adressen der Bezugsfirmen aller benutzten Medikamente und Chemikalien siehe Anhang 9.1

Danach, gegen 8.45 Uhr, erfolgte die Tötung des Ferkels mit 0,5 bis 1 ml/kg Eutha[®] 77 i.v. Mit Hilfe von Arterienklemmen wurden doppelte Ligaturen an den Übergängen Duodenum- Jejunum (Ende der Plica duodenocolica) sowie Jejunum-Ileum (Beginn der Plica ileocaecalis) gesetzt. Nach Herzstillstand wurde das Dünndarmkonvolut durch Durchtrennen des Dünndarmgekröses in Gekröselymphknotennähe und des Darmes zwischen den doppelten Ligaturen entnommen und das Darmstück etwa 3 min nach Tod in eine handwarme angewärmte Metallschale verbracht.

Die Jejunumlänge konnte mit Hilfe einer von den Instituten für Tierernährung¹⁶ und für Veterinäranatomie¹⁷ entwickelten biometrischen Methode aus Lebendmasse und Alter der Schweine vor der Entnahme des Darmes berechnet werden.

Die mittleren 1,50 m des Jejunums wurden durch Abmessen aufgefunden und dieses Teilstück nach Isolierung vom restlichen Jejunum sofort in eine Schüssel mit dem oben beschriebenen vorbereiteten Transportpuffer verbracht. Parallel zur Längenmessung wurde das Gekröse unter minimaler physischer Beeinflussung des Darmes entfernt.

Danach wurde bei dem isoliertem Jejunumstück die Tunica mucosa (bestehend aus Epithelium mucosae, Lamina propria, Lamina muscularis mucosae) in der Tela submucosa von der Tunica muscularis (bestehend aus Längs- und Ringmuskelschicht) und Tunica serosa getrennt („strippen“ nach der Methode von UNMACK (2000)), wobei das Gewebe ständig mit Transportpuffer feucht gehalten wurde. Dazu wurden die äußeren Schichten unter Schonung der Tunica mucosa an einem Ende des Darmes zirkulär eingeschnitten. Danach wurde der 'Strumpf' aus Tunica serosa und Tunica muscularis stumpf Richtung unpräpariertes Ende abgezogen, wobei Serosa auf Serosa glitt, bis das ganze Darmstück nur noch aus einem Rohr Tunica mucosa mit anhängenden Teilen der Tela submucosa bestand (siehe Abbildung 3.5.1). Die Tunica mucosa mit partieller Tela submucosa (nachfolgend als Epithel bezeichnet) wurde aufgeschnitten und gegen 9.00 Uhr im Dewar-Gefäß mit Carbogen-begastem 38°C warmen Transportpuffer zur Ussing-Kammer-Anlage transportiert.

¹⁶ Institut für Tierernährung der FU Berlin, Brümmerstrasse 34, D-14195 Berlin, Tel: +49 (0) 30 838 52256, Fax: +49 (0) 30 838 55938, E-mail: ian@zedat.fu-berlin.de

¹⁷ Institut für Veterinäranatomie der FU Berlin, Koserstraße 20, D-14195 Berlin, Tel: +49 (0) 30 838 53555, Fax: +49 (0) 30 838 53480, E-mail: anatomie@vetmed.fu-berlin.de

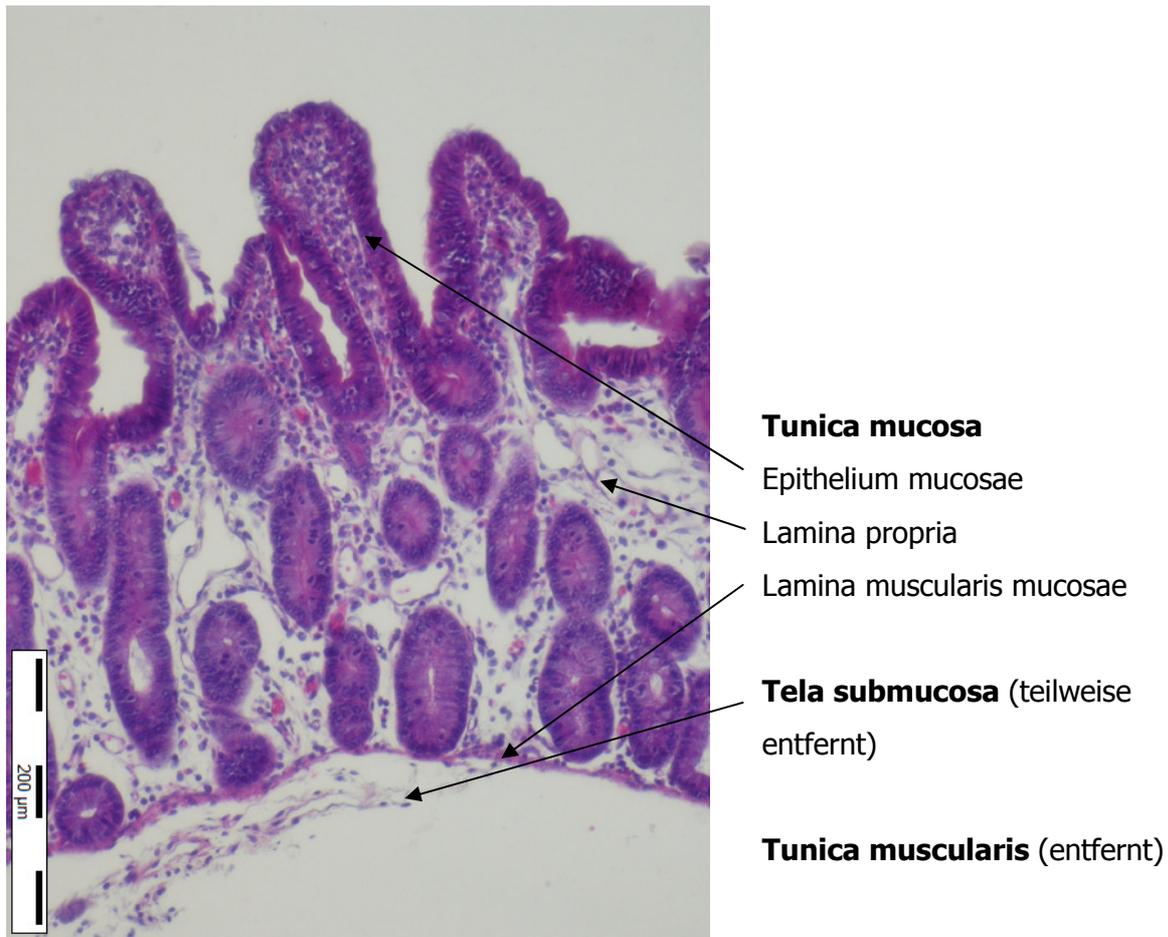


Abbildung 3.5.1: Jejunumepithel nach Präparation und Transport zur Ussing-Kammer-Apparatur, kurz vor dem Einspannen in diese (Versuch am 09.12.03). (Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung), Präparation Institut für Veterinär-Physiologie¹⁸, Schnitt und Färbung Institut für Veterinäranatomie, Mikroskopie, Foto B. Lorenz)

Gegen 9.15 Uhr begann das Einspannen der Epithelien in die Ussing-Kammern. Dazu wurde ein 2-3 cm langes Epithelstück je Kammer, mit Hilfe einer Agarplatte und Parafilm als vorübergehende Stabilisatoren des Epithels so eben wie möglich eingespannt. Beides wurde vor dem Schließen der jeweiligen Kammer restlos entfernt. Während der gesamten Manipulation am Gewebe wurde darauf geachtet, dass keine Scherkräfte an der epithelialen Oberfläche auftraten.

3.6 Versuchsablauf

Die Ussing-Kammer-Technik, die für die transportphysiologischen Untersuchungen der präparierten Darmgewebe genutzt wurde, ist im Institut für Veterinär-Physiologie etabliert (LODEMANN et al., 2003b).

¹⁸ Institut für Veterinär-Physiologie der FU Berlin, Oertzenweg 19b, D-14163 Berlin, Tel: +49 (0) 30 838 22600, Fax: +49 (0) 30 838 62610

3.6.1 Elektrophysiologische Messungen

Die Vorbereitung der Ussing-Kammer-Anlage sowie aller Puffer und Substanzen erfolgten vor Ankunft des Epithels. Dazu gehörten z.B. die Beheizung der Puffer und der doppelwandigen Pufferreservoirs, das Einstellen der Begasung sowie die Vorbereitung und Leermessung der Kammern.

Direkt vor dem Einspannen des Gewebes wurde der Eigenwiderstand (R_R) und das elektrische Eigenpotenzial $\Delta\Phi_A$ (der Elektroden) der Apparatur inklusive des Puffers computergesteuert gemessen (= 'Leermessungen'). Mit diesen Werten wurden die Messungen im Versuch durch die 'Voltage Clamp' automatisch korrigiert. Wichtig ist bei der Leermessung, dass der später auch im Versuch verwendete Puffer benutzt wurde, da hierbei der Widerstand des Puffers zwischen später eingesetztem Gewebe und Brücke sowie der Widerstand der Brücken selbst bestimmt wurde.

Pro Tier (= Versuchstag) wurden 16 Epithelstücke in Ussing-Kammern eingebaut. Sofort nach Einbau wurden die Epithelien 10 - 15 min unter 'Open Circuit'-Bedingungen zur Adaptation an die Ussing-Kammer inkubiert. Danach wurden sie kurzgeschlossen und unter diesen 'Short Circuit'-Bedingungen weitere 15 min adaptiert. Es hatte sich nun ein 'steady state' eingestellt und in den nächsten 5 min Adaptationszeit wurde die Einteilung der Epithelien in 4 Gruppen vorgenommen. An Clamp A waren vier Ussing-Kammern angeschlossen, sie dienten der Untersuchung der Reaktion nach Glutaminzugabe (Gruppe IV). Clamp C und D waren mit je 6 Ussing-Kammern verbunden, sie wurden in 3 Vierergruppen eingeteilt. Gruppe I bzw. II wurden mit Kammern ähnlicher transepithelialer Widerstände bzw. Kurzschlussströme bestückt, wobei Unterschiede bis maximal 25 % akzeptiert wurden. Die restlichen vier Kammern zählten zu Gruppe III, welche für die Mannitfluxmessungen herangezogen wurde.

Nach dieser Einteilung und dem Ende der 30-minütigen Adaptationsphase erfolgte gegen 10.00 Uhr der Versuchsbeginn. Alle Messungen wurden unter 'Short Circuit'-Bedingungen durchgeführt und die Werte wie in Kapitel 3.4 beschrieben von der Messapparatur und dem angeschlossenen PC berechnet und aufgezeichnet. Der Versuchsplan, nach dem jeder Versuch an der Ussing-Kammer-Apparatur durchgeführt wurde, findet sich im Anhang 9.1.5.

Um die Volumenänderungen bei der Zugabe von Substanzen zum Puffer möglichst klein zu halten (maximal 0,25 ml pro 10 ml Puffer), wurden die Zugabesubstanzen hoch dosiert bzw. nach Abpipettieren des zuzusetzenden Volumens, im entsprechenden Puffer gelöst, zugesetzt (maximal 2 ml pro 10 ml, siehe auch Anhang 9.1.5). Bei Zugaben, die osmotische Veränderungen nach sich zogen, wurde auf der Gegenseite zum osmotischen Ausgleich Mannitlösung zugegeben (siehe Anhang 9.1.5). Der durch Substanzzugabe aufgebaute chemische Gradient war vernachlässigbar gering, sowie alle sonstigen unter 3.4.2 genannten Gradienten ausgeschaltet.

Zugaben in die und Entnahmen aus der Ussing-Kammer wurden über die oberen Öffnungen des Gasliftsystems mittels Pipette vorgenommen.

Um die Sekretionseigenschaften des Epithels zu bestimmen und nach Aufzeichnung einer Sättigungskurve die kinetischen Parameter Michaelis-Menten-Konstante und maximale

Transportgeschwindigkeit des PGE₂-stimulierten Cl⁻-Ionen transportes zu errechnen, wurde mit Hilfe von PGE₂ in den Konzentrationen 0,05, 0,1, 0,5 und 1 μM eine Stimulation der Cl⁻-Sekretion in den Gruppen I und II vorgenommen. Es wurden dabei je 2 Epithelien der gleichen Konzentrationsstufe ausgesetzt.

Diese PGE₂-Konzentrationen liegen im Bereich der niedrigen physiologischen Konzentrationen (siehe Kapitel 2.4.1.4).

Zwischen den Messungen der PGE₂- und Glukosereaktionen erfolgte ein Pufferwechsel. Dafür wurde nach Abschalten der Messeinrichtung der Puffer über ein Ablassventil an der tiefsten Stelle der Kammer entfernt. Darauf folgten eine Spülung mit dem neu zuzusetzenden Puffer und ein Auffüllen der Kammer. Nach einer Einwirkzeit von etwa 3 Minuten wurde dieser abgelassen und die Ussing-Kammer mit 10 ml frischem Puffer aufgefüllt. Anschließend an diese Prozedur wurden die Epithelien sofort wieder 'Short Circuit'-Bedingungen ausgesetzt und erreichten in einer 15-minütigen Adaptationsphase erneut ihre basalen Ausgangswerte.

Ein Pufferwechsel erfolgte, wie auch andere Manipulationen, unter weitestgehender Vermeidung hydrostatischer Druckdifferenzen und möglicher Gewebeschädigungen.

Der Na⁺-gekoppelte transzelluläre Glukosetransport wurde im Kapitel 2.4.2 als Mechanismus der Absorption eines Zuckermoleküls über das Dünndarmepithel vorgestellt. Auch hier erfolgte in den Gruppen I und II die Zugabe verschiedener Glukosekonzentrationen (0,5, 1, 4 und 10 mM in je 2 Kammern), um die Aufzeichnung einer Sättigungskurve zu ermöglichen, aus der die kinetischen Parameter Michaelis-Menten-Konstante und maximale Transportgeschwindigkeit des Glukosetransportes errechnet werden sollen. In den verwendeten Puffern befand sich ausreichend Na⁺, um nicht den transportlimitierenden Faktor und eine Störung der Messung darzustellen (siehe Kapitel 2.4.2).

L-Glutamin in der Konzentration von 12 mM wurde in der Gruppe IV als Modellsubstanz für die elektrogene Absorption neutraler Aminosäuren in die Epithelzelle des Schweinejejunums ausgewählt.

3.6.2 Fluxmessungen anhand von radioaktiv markiertem ³H-Mannit

Bei den 4 Kammern der Gruppe III, erfolgte die serosale Zugabe von 6 μCi ³H-Mannit. Darauf folgend wurde die serosale als 'heiße' Seite und die mukosale als 'kalte' Seite angesprochen. Die absolut zugegebene Mannitmenge betrug 0,4 μmol auf 10 ml Puffer, was keinen nennenswerten Einfluss auf die Konzentrationsgradienten über dem Epithel hatte.

Die erste Probennahme (H1) erfolgte 10 min nach Zugabe des ³H-Mannits. Dafür wurden 0,1 ml des Puffers der 'heißen', serosalen Seite in Zählgefäße¹⁹ pipettiert, mit Counterflüssigkeit der Firma Zinsser Analytic GmbH (siehe Anhang 9.1) auf 5 ml aufgefüllt und gut geschüttelt. Die verschlossenen Röhrchen wurden beschriftet und bis zum Ende des Versuches gelagert.

Nach weiteren 20 min wurde die erste Probe auf der 'kalten', mukosalen, Seite (P0) entnommen. Nach Entnahme der 0,5 ml für P0 wurde dieses Volumen mit frischem Puffer

¹⁹ Zinsser Minis 2001 aus Polyethylen, für moderne LSC-Geräte; 5,5 ml, 16 mm Durchmesser x 57 mm Höhe, Zinsser Analytic GmbH (siehe Anhang 9.1)

ersetzt. Die Proben enthaltenden Zählgefäße wurden mit oben genannter Counterflüssigkeit auf 5 ml aufgefüllt, geschüttelt, beschriftet und verschlossen gelagert. Die Probennahmen P1, P2 und P3 erfolgten innerhalb einer Stunde alle 20 min in der gleichen Art und Weise (siehe auch Anhang 9.1.5).

Sofort anschließend an die Entnahme der letzten 'kalten' Probe wurde eine zweite 'heiße' Probe (H2) wie oben für H1 beschrieben entnommen (siehe auch Anhang 9.1.5).

Die Radioaktivitäten der Proben, gemessen in Anzahl der Impulse pro Minute (cpm), wurden nach der letzten Probennahme in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (β -Counter²⁰) bestimmt. Der Zählfehler betrug maximal 2 %.

3.6.3 Vitalitätstest

Sofort nach Abschluss der Versuchsreihe an einem Epithel wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Dazu wurde der Phosphodiesterase-Inhibitor Theophyllin zugegeben, so dass sich eine Konzentration von 8 mM Theophyllin im Puffer befand und die Reaktion des I_{sc} auf die Zugabe aufgezeichnet.

3.6.4 Histologische Untersuchungen

Nach Abschluss der Vitalitätstests erfolgte bei Ausbau aus der Ussing-Kammer eine genaue makroskopische Beurteilung jedes einzelnen Epithelstückes. Zusätzlich wurden einige zufällig ausgewählte Epithelien von zwei Versuchstieren nach dem 'Strippen', je vor bzw. nach dem Einspannen in die Ussing-Kammer histologisch untersucht.

Die Epithelien wurden nach Präparation bzw. nach Entnahme aus der Ussing-Kammer sofort mit der serosalen Seite auf Korkplättchen gelegt, mit Igelnadeln zirkulär am Rand fixiert und mit dem Gewebe nach unten in modifizierte Bouin'sche Lösung²¹ getaucht. Nach einer Fixationszeit von 16 bis 22 Stunden fertigte das Institut für Veterinäranatomie der FU Berlin daraus HE-gefärbte Schnitte an. Gemustert und fotografiert wurden die Schnitte an einem Durchlichtmikroskop mit Digitalkamera der Firma Olympus, gekoppelt mit einem PC der Firma Dell, die freundlicherweise von der GIMmbH²² zur Verfügung gestellt wurden.

²⁰ Wallac 1409, Liquid Scintillation Counter, Firma PerkinElmer Wallac GmbH, D-79111 Freiburg

²¹ 4% Pikrinsäure, 2,5% Formol, 3,5% Kupfer(II)-acetat, gelöst in Aqua bidest

²² Gesellschaft für innovative Mikroökologie mbH, Waldheimstr. 47, D-14552 Michendorf OT Wildenbruch, Tel: +49 (0) 33205 46997, E-mail: gimmbh@gmx.de

3.7 Fluxberechnungen

Zur Berechnung der ^3H -Mannitfluxe wurden folgende Formeln angewendet (in Anlehnung an SCHULTZ und ZALUSKY (1964a), USSING (1949)):

$$J = \frac{cpm_2 \cdot \frac{V_s}{V_p} - cpm_1 \cdot \frac{V_s - V_p}{V_p}}{Ak_{spez} \cdot A \cdot t} \cdot 1000 \quad (3.7.1)$$

J = Ionenflux [$\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]

cpm_1 = 'Counts per minute' (Radioaktivität) der zu Beginn eines Fluxes entnommenen Probe

cpm_2 = 'Counts per minute' (Radioaktivität) der am Ende dieses Fluxes entnommenen Probe

V_s = Puffervolumen im Gasliftsystem einer Kammerhälfte (10)²³ [ml]

V_p = Volumen der 'kalten' Probe ($0,5$)²³ [ml]

Ak_{spez} = Spezifische Aktivität [$\text{cpm} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$]

A = Gewebefläche ($0,95$)²³ [cm^2]

t = Dauer eines Fluxes (Zeitintervall zwischen zwei 'kalten' Proben) ($0,3333$)²³ [h]

spezifische Aktivität:

$$Ak_{spez} = \frac{cpm_h}{V_h \cdot c} \quad (3.7.2)$$

cpm_h = 'Counts per minute' der 'heißen' Probe (Mittelwert der Radioaktivität der beiden 'heißen' Proben (H1 und H2))

V_h = Volumen der 'heißen' Probe ($0,1$)²³ [ml]

c = Konzentration des zu untersuchenden nicht radioaktiv markierten Isotops in der Pufferlösung (2)²³ [$\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$]

Mit Hilfe der 4 Probennahmen (P0-P3) wurden die Fluxe für 3 Perioden a 20 min berechnet. Aus diesen drei Fluxen wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und zur Auswertung und statistischen Prüfung (siehe Kapitel 3.9) herangezogen.

3.8 Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante K_m und der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max}

Zur Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante K_m und der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max} stehen für die oben beschriebene Versuchsanordnung zwei unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung. Zur Begründung der in dieser Arbeit getroffenen Wahl der Berechnung werden beide Möglichkeiten kurz diskutiert.

²³ Die in Klammern geschriebenen Werte sind die angesetzten Größen der Variablen in dieser Arbeit.

3.8.1 Lineare Regression

Die doppelt reziproke Darstellung der Konzentration von PGE₂ bzw. Glukose auf der Abszisse und der davon abhängigen Transportgeschwindigkeit V_0 auf der Ordinate wird als Lineweaver-Burk-Darstellung bezeichnet. Durch diese Transformation der Daten lässt sich der zunächst nicht lineare Zusammenhang zwischen PGE₂- bzw. Glukosekonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit graphisch in eine Linearität überführen. Nach LINEWEAVER und BURK (1934) können somit durch Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung Näherungswerte für K_m und V_{max} folgendermaßen dargestellt und berechnet werden:

Michaelis-Menten-Gleichung, (abgeleitet aus MICHAELIS und MENTEN (1913)):

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3.8.1)$$

[S] = Substratkonzentration [mM Glukose bei Glukosezugabe bzw. μ M PGE₂ bei PGE₂-Zugabe]

V_0 = Reaktionsgeschwindigkeit [transportierte Stoffmenge/Fläche und Zeit]
Die Reaktion besteht hier aus einem Transport von Molekülen bzw. Ionen von einer Seite der Zellmembran zur anderen, V_0 kann also auch als Transportgeschwindigkeit angesprochen werden.

V_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit [transportierte Stoffmenge/Fläche und Zeit]

K_m = Michaelis-Menten-Konstante [in der Einheit von [S]]

Die Transportgeschwindigkeit V_0 wird experimentell über den Kurzschlussstrom I_{sc} gemessen. V_0 steht mit I_{sc} in direkter Beziehung und beide können mit Hilfe einer Konstanten, wie in Gleichung (3.8.1) dargestellt, ineinander umgerechnet werden. Die Herleitung der Umrechnungskonstanten aus der Faradayschen Gleichung (9.3.1) wird im Anhang 9.3.3 dargestellt.

Aufgrund der oben genannten physikalischen Voraussetzungen wird nun in der Gleichung (3.8.1) V_0 durch I_{sc} ersetzt und somit statt V_{max} $I_{sc\ max}$ errechnet. Dieses Vorgehen ist zulässig, da das Ersetzen der Variablen auf beiden Seiten der Gleichung erfolgt und das Ergebnis von K_m damit nicht verfälscht wird.

Ersetzen von V_0 durch I_{sc} und V_{max} durch $I_{sc\ max}$ in der Michaelis-Menten-Gleichung (3.8.1):

$$I_{sc} = \frac{I_{sc\ max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3.8.2)$$

I_{sc} = gemessener Kurzschlussstrom [μ A·cm⁻²]

$I_{sc\ max}$ = maximaler Kurzschlussstrom [μ A·cm⁻²]

Invertieren der mit I_{sc} formulierten Michaelis-Menten-Gleichung (3.8.2):

$$\frac{I}{I_{sc}} = \frac{K_m + [S]}{I_{sc\ max}[S]} \quad (3.8.3)$$

Trennen des Zählers auf der rechten Seite und vereinfachen:

$$\frac{I}{I_{sc}} = \frac{K_m}{I_{sc \max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{I_{sc \max}} \quad (3.8.4)$$

Diese, in die Form einer Geradengleichung $y = bx + a'$, umgeformte Michaelis-Menten-Gleichung wird als Lineweaver-Burk-Gleichung (3.8.4) bezeichnet.

Wird in einem Koordinatensystem $y = 1/I_{sc}$ gegen $x = 1/[S]$ abgetragen, können K_m und $I_{sc \max}$ mit Hilfe einer Regressionsgeraden durch die aufgetragenen Werte visualisiert werden. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse entspricht dabei $1/I_{sc \max}$ und der Schnittpunkt mit der x-Achse $-1/K_m$. Diese Darstellung ist das Lineweaver-Burk-Diagramm.

Das rechnerische Verfahren für die oben beschriebene graphische Lösung ist die lineare Regression. Diese wird mit der abhängigen Variable $y = 1/I_{sc}$ und der unabhängigen Variable $x = 1/[S]$ durchgeführt. Die Syntax dieser Berechnung in SPSS findet sich im Anhang 9.3.1. So erhält man die Parameter a und b der Geradengleichung $y = bx + a'$, woraus K_m und $I_{sc \max}$ mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Gleichung (3.8.4) wie folgt berechnet werden können:

$$a = \frac{1}{I_{sc \max}} \quad \Leftrightarrow \quad I_{sc \max} = \frac{1}{a} \quad (3.8.5)$$

$$b = \frac{K_m}{I_{sc \max}} \quad \Leftrightarrow \quad K_m = b * I_{sc \max} \quad (3.8.6)$$

Die Näherung über die lineare Regression mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Gleichung ist hinreichend genau, um grobe Schätzwerte für K_m und $I_{sc \max}$ zu erhalten (MOTULSKY und CHRISTOPOULUS, 2003).

Die Ungenauigkeit der Berechnung mit Hilfe der linearen Regression resultiert aus der Verwendung transformierter Daten ($1/[S]$, $1/I_{sc}$). Durch diese Art der Berechnung wird der experimentelle Fehler, welcher bei der Messung angenommen werden muss, verzerrt (MOTULSKY und CHRISTOPOULUS, 2003). Der am stärksten von der Verzerrung beeinflusste Parameter ist in dieser Art der Berechnung die Michaelis-Menten-Konstante K_m . Sie wird mit Hilfe von $I_{sc \max}$ errechnet, wobei $I_{sc \max}$ seinerseits schon aus transformierten Daten berechnet wurde.

3.8.2 Nichtlineare Regression

Durch Anwendung einer nichtlinearen Regression ist es möglich, erheblich genauere Werte für K_m und $I_{sc \max}$, und damit nach Umrechnung für V_{\max} , als mit der linearen Regression zu erhalten (MOTULSKY und CHRISTOPOULUS, 2003).

Der nichtlinearen Regression liegt die Michaelis-Menten-Gleichung (3.8.2), in der V_0 durch I_{sc} und V_{\max} durch $I_{sc \max}$ ersetzt wurde, direkt zugrunde.

$$I_{sc} = \frac{I_{sc\ max} [S]}{K_m + [S]} \quad (3.8.2)$$

Hier entfällt das Transformieren der Daten und die damit verbundene Verzerrung des Fehlerwertes (MOTULSKY und CHRISTOPOULUS, 2003).

Die Anfangswerte für die Parameter K_m und $I_{sc\ max}$ sind die Schätzwerte aus der oben beschriebenen linearen Regression. Diese Anfangsschätzwerte sind im Anhang 9.3.2 aufgeführt. Für die Durchführung der nichtlinearen Regression wurde das Programm SPSS 11.5 verwendet. Die Syntax der Berechnungen mit Hilfe der nichtlinearen Regression befindet sich im Anhang 9.3.2. Die Syntax orientiert sich an den Ausführungen von Bühl und Zöfel (BÜHL und ZÖFEL, 2000), Motulsky und Christopoulos (MOTULSKY und CHRISTOPOULUS, 2003) sowie den Hinweisen von Fr. Dr. Arndt (Institut für Biometrie, FB Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, 2004)

Nach der Berechnung des maximalen Kurzschlussstromes $I_{sc\ max}$ folgt nun die Umrechnung in die maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} mit Hilfe der Gleichung (3.8.7),

$$V_{max} = \frac{I_{sc\ max}}{26,8013} [\mu\text{Mol}/(\text{cm}^2 * \text{h})]. \quad (3.8.7)$$

Eine andere Möglichkeit wäre, zuerst I_{sc} aus V_0 zu errechnen. Dies hätte jedoch zur Folge, dass durch die gerundete Umrechnungskonstante (siehe Gleichung (3.8.7) bzw. (3.9.1)) ein Fehler eingeführt würde, der sich durch alle nachfolgenden Berechnungen zöge. Um dies zu vermeiden und den Rundungsfehler auf ein minimales, leicht abschätzbares Ausmaß zu begrenzen, werden die Regressionen mit der direkt gemessenen Größe I_{sc} durchgeführt und erst im Anschluss daran V_{max} aus $I_{sc\ max}$ errechnet (siehe Anhang 9.3.3).

3.9 Statistische Auswertung

Alle Berechnungen zur Auswertung der Messungen erfolgten mit Hilfe von Excel® 2002 bzw. Proberechnungen per Taschenrechner.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programmes SPSS® 11.5 durchgeführt (Einzelne Gegenprobenrechnungen mit oben genanntem Excel®). Die Graphiken wurden mit SigmaPlot® 2001 erstellt.

3.9.1 Auswertung der Rohdaten

3.9.1.1 Feststellung der Vitalität des Gewebes zum Zeitpunkt der Messung

Theophyllin erhöht die Ionensekretion, dabei hauptsächlich die Cl^- -Sekretion (BAKKER und GROOT, 1984), stark, wodurch der Kurzschlussstrom I_{sc} rapide ansteigt (Mittelwerte \pm Standardabweichungen siehe Kapitel 4.5). Dies geschieht nur bei lebendem, funktionstüchtigen Epithel, weshalb ein Ansteigen des I_{sc} (siehe unten) in den ersten 10 min als Beweis der Vitalität des Epithels zum Zeitpunkt der Messung angesehen wurde (ARGENZIO et al., 1984; MCEWAN et al., 1990; SCHROEDER et al., 2004).

War dies der Fall, konnte davon ausgegangen werden, dass auch die vorangegangenen Zugaben auf ein lebendes, intaktes Epithel getroffen und die Reaktionen des Kurzschlussstromes aussagekräftig waren.

Es wurden Bedingungen zur Akzeptanz der Messergebnisse festgelegt. Der R_t der Kammer musste im gesamten Versuchszeitraum durchgehend mindestens $15 \Omega \cdot \text{cm}^2$ betragen und die makroskopische Beurteilung nach dem Ausbau des Epithels ohne Beanstandungen abgeschlossen sein (dünne Stellen, Verfärbungen, Auflagerungen oder sogar Löcher etc.).

Des Weiteren musste die Höhe der Reaktionen auf die Zugaben von PGE_2 , Glukose bzw. Glutamin größer als $\Delta I_{sc} = 0 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ betragen oder aber bei Reaktionen mit $\Delta I_{sc} = 0 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ die nachfolgende Reaktion auf Theophyllin mindestens $\Delta I_{sc} = 15 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ erreichen. K_m musste nach Berechnung für PGE_2 - sowie Glukosestimulierte Transporte positive Werte aufweisen.

Zum Zeitpunkt der Messung der elektrischen Parameter während eines Mannit-Fluxes (jeweils 2 min vor Entnahme der 'kalten' Probe) sowie auch des ΔI_{sc} nach PGE_2 -, Glukose- bzw. Glutaminzugabe musste ein sehr stabiler Kurzschluss des Gewebes ($\text{PD}_t = 0 \pm 0,1 \text{ mV}$) vorliegen. Die Theophyllinzugabe musste nach Abschluss der Mannitfluxmessungen bei allen Kammern der Gruppe III mindestens eine Reaktion von $10 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ hervorrufen.

Nichterfüllen eines der Kriterien deutete auf ein nicht viables Gewebe bzw. ein technisches Problem zum Zeitpunkt der Messung hin. Die entsprechenden Messergebnisse wurden gestrichen und in der Auswertung als fehlende Werte behandelt.

3.9.1.2 Auswertung der Messergebnisse und Berechnung der elektrophysiologischen Parameter

Um den Wert für ΔI_{sc} zu ermitteln, wurde der basale I_{scB} 1 min vor Zugabe der Substanz gemessen, sowie der höchste I_{scV} während der Periode nach Zugabe einer Substanz bestimmt. Die Differenz ergab ΔI_{sc} ($I_{scV} - I_{scB} = \Delta I_{sc}$). Bei Messung von I_{scB} und I_{scV} musste 6 s vor der Messung, sowie während der Messung selbst die Klemmung des Epithels $\text{PD}_t = 0 \text{ mV}$ vorliegen. R_t sowie PD_{t0} zum Zeitpunkt von I_{scV} wurden ebenfalls protokolliert.

Die Perioden, in denen I_{scV} gemessen wurde, waren für die verschiedenen Zugabesubstanzen unterschiedlich. Nach Zugabe von PGE_2 wurde eine Periode von 10 min zur Messung herangezogen. Für Glukose und Glutamin waren die ersten 5 min entscheidend.

Der ΔR_t nach Zugabe von PGE_2 wurde analog zur Bestimmung von ΔI_{sc} nach Zugabe von PGE_2 bestimmt.

Die elektrophysiologischen Werte (I_{sc} , R_t und PD_{t0}) für je eine Mannit-Fluxperiode wurden als arithmetischer Mittelwert, der je 2 min vor den beiden entsprechenden Probennahmen aufgezeichneten Werte, ermittelt. Eine annähernd symmetrische Verteilung der Daten kann hier angenommen und damit die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes durchgeführt werden, da die Division von arithmetischem Mittelwert durch Median Werte zwischen 0,9 und 1,1 annahm (IMMICH, 1974). Wie für die Fluxmessungen wurden ebenso die elektrophysiologischen Parameter für die drei Fluxperioden bestimmt und dann der arithmetische Mittelwert dieser zur Auswertung und statistischen Prüfung herangezogen.

3.9.2 Prüfung der elektrophysiologischen Parameter auf Unterschiede zwischen den Fütterungs- bzw. Altersgruppen

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 5 \%$ festgelegt und mit $p \leq 0,05$ angegeben. Eventuelle Abweichungen davon sind gesondert gekennzeichnet. Aus der Abhängigkeitsstruktur der Daten (mehrere Epithelien pro Tier) ergibt sich ein gemischtes Modell der Varianzanalysen, die den Zufallsfaktor 'Tier' einschließen, mit welchem die Daten aller Transportmechanismen beurteilt wurden (LODEMANN et al., 2004a; WINER, 1971). Es wurde mit dem statistischen Modell der Varianzanalyse nach LODEMANN et al. (2004a) mit den festen Faktoren 'Fütterung' und 'Alter', zum Teil 'Konzentration' sowie dem Zufallsfaktor 'Tier' gerechnet (im Folgenden 'Modell 1' genannt, Modellgleichung der Varianzanalyse siehe LODEMANN et al., 2004). Im Gegensatz zu LODEMANN et al. (2004a) wurden jedoch keine fehlenden Werte ergänzt sondern ohne diese gerechnet. Anschließend an die Varianzanalyse wurde bei Signifikanz des untersuchten Faktors Posthoc ein Scheffé-Test durchgeführt (IMMICH, 1974; LODEMANN et al., 2006). Die Aufteilung der Daten für die Analysen folgte den jeweils in den Graphen dargestellten Aufteilungen (siehe Kapitel 4).

Ein Teil der Graphiken stellt zur Verdeutlichung der per Varianzanalyse untersuchten Beziehungen zwischen den Gruppen die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen dar. Daneben werden zur Beschreibung der Daten Boxplots verwendet. Welche Darstellungsform vorliegt wird jeweils erwähnt.

Von jedem Tier wurden mehrere Epithelstücke (16) untersucht, aufgeteilt auf die verschiedenen Untersuchungen. Im Folgenden stellt deshalb 'n' die Anzahl der untersuchten Epithelstücke und 'N' die Anzahl der untersuchten Tiere dar.

Die Bedingungen für die Varianzanalyse, Normalverteilung und Varianzhomogenität, wurden in jedem Versuchsteil (Zugabe von PGE_2 , Glukose, Glutamin, Mannit, Theophyllin) getrennt für ΔI_{sc} , ΔR_t , R_{tB} bzw. die Mannitfluxe mit den Tests nach Kolmogorov-Smirnov auf Normalverteilung und nach Levene auf Varianzhomogenität geprüft. Sowohl Normalverteilung als auch Varianzhomogenität konnte für die Daten, auch aufgrund der Erfahrungen aus früheren Arbeiten (LODEMANN et al. (2003b), LODEMANN et al., 2004a), nicht abgelehnt werden.

Wenn sich keine Unterschiede der Kurzschlussstromreaktionen zwischen den Fütterungsgruppen einer Altersklasse bzw. Konzentrationsstufe ergaben, wurden beide Fütterungsgruppen der jeweiligen Gruppen für weitere Analysen zusammengefasst (BOUDRY et al., 2003) und mit dem Modell der Varianzanalyse nach LODEMANN et al., 2004a, ohne den Faktor 'Fütterung', untersucht (im Folgenden 'Modell 2' genannt).

Die Bewertung von Korrelationskoeffizienten (r) erfolgte auf der Grundlage von GNAMBS (2004).

$r = 0$	kein Zusammenhang
$r \leq 0.2$	sehr schwacher Zusammenhang
$0.2 < r \leq 0.5$	schwacher Zusammenhang
$0.5 < r \leq 0.7$	mittlerer Zusammenhang
$0.7 < r \leq 0.9$	starker Zusammenhang
$0.9 < r \leq 1$	sehr starker Zusammenhang

3.9.3 Prüfung von K_m und V_{max} auf Unterschiede zwischen den Fütterungs- bzw. Altersgruppen

Um dem in der vorliegenden Arbeit gewählten Weg der Kalkulation von Michaelis-Menten-Konstante und maximaler Transportgeschwindigkeit sowie den statistischen Berechnungen per Varianzanalyse und Scheffé-Test konsequent zu folgen wurden für Darstellung und statistische Berechnung von K_m und V_{max} die unten beschriebenen Verfahren angewandt.

Für die graphische Darstellung als Lineweaver-Burk-Diagramme wurden K_m und V_{max} der jeweilig darzustellenden Gruppe über die nichtlineare Gesamtregression aller Rohwerte dieser Gruppe berechnet. Die so berechneten Werte für K_m bzw. V_{max} werden jeweils mit ihrem 95%-Konfidenzintervall in den Tabellen aufgeführt.

Zur Prüfung der Hypothesen bezüglich K_m und V_{max} wurden die Ergebnisse der nichtlinearen Regressionen der Einzeltiere einer Varianzanalyse, die wie oben beschrieben durchgeführt wurde, unterzogen. Für die Korrelation von K_m und V_{max} wurden ebenfalls die Ergebnisse der nichtlinearen Regressionen der Einzeltiere zugrunde gelegt.

Wenn die Analyse nach 'Modell 1' keine Unterschiede der Werte für K_m bzw. V_{max} zwischen den Fütterungsgruppen einer Altersklasse zeigte ($\alpha \leq 0,05$), wurden in diesen Fällen beide Fütterungsgruppen dieses Alters zusammengefasst (BOUDRY et al., 2003). Für diese fütterungsunabhängige Betrachtung erfolgt nach der Zusammenfassung der Fütterungsgruppen eine erneute Berechnung von K_m und V_{max} mit Hilfe einer nichtlinearen Regression über alle Tiere dieser Altersgruppe. Eventuell vorhandene Einflüsse des Alters auf K_m oder V_{max} können so mit Hilfe der erhöhten Gruppengröße unter Verwendung von 'Modell 2' besser identifiziert werden.