

9 Anhang

9.1 Pufferlösungen und Chemikalien

9.1.1 Transportpuffer

Tabelle 9.1.1: Zusammensetzung des Transportpuffers - Das Indomethacin wurde dem Puffer erst am Versuchstag zugegeben, er hatte eine Osmolarität von 280 mosmol/l, die im Bedarfsfalle mit Hilfe von Mannit eingestellt wurde.

Substanz	Summenformel	MG	mM	g/5l
	NaCl	58,44	115,00	33,60
	NaHCO ₃	84,01	25,00	10,50
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	137,99	0,40	0,28
	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	177,99	2,40	2,14
	KCl	74,56	5,00	1,86
Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	198,18	5,00	4,95
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,02	1,20	0,88
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203,30	1,20	1,22
Indomethacin	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357,80	0,0028 = 2,8 µmol	0,0050092 = 5,0092 mg

Alle Puffer wurden mit Carbogen begast, hatten eine Temperatur von 38 °C und einen pH von 7,4.

9.1.2 Glukosepuffer (serosal)

Tabelle 9.1.2: Zusammensetzung des Glukosepuffers - Das Indomethacin wurde dem Puffer erst am Versuchstag zugegeben, er hatte eine Osmolarität von 300 mosmol/l, die im Bedarfsfalle mit Hilfe von Mannit eingestellt wurde.

Substanz	Summenformel	MG	mM	g/5l
	NaCl	58,44	115,00	33,60
	NaHCO ₃	84,01	25,00	10,50
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	137,99	0,40	0,28
	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂	177,99	2,40	2,14
	KCl	74,56	5,00	1,86
Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	198,18	10,00	9,909
Mannit	C ₆ H ₁₄ O ₆	182,17	2,00	1,8217
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,02	1,20	0,88
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203,30	1,20	1,22
Indomethacin	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357,80	0,0014 = 1,4 µmol	0,0025046 = 2,5046 mg

9.1.3 Mannitpuffer (mukosal)

Tabelle 9.1.3: Zusammensetzung des Mannitpuffers - Das Indomethacin wurde dem Puffer erst am Versuchstag zugegeben, er hatte eine Osmolarität von 300 mosmol/l, die im Bedarfsfalle mit Hilfe von Mannit eingestellt wurde.

Substanz	Summenformel	MG	mM	g/5l
	NaCl	58,44	115,00	33,60
	NaHCO ₃	84,01	25,00	10,50
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	137,99	0,40	0,28
	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂	177,99	2,40	2,14
	KCl	74,56	5,00	1,86
Mannit	C ₆ H ₁₄ O ₆	182,17	12,00	10,9302
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,02	1,20	0,88
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203,30	1,20	1,22
Indomethacin	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357,80	0,0014 = 1,4 µmol	0,0025046 = 2,5046 mg

Tabelle 9.1.4: Firmenverzeichnis

Substanz/Handelsname	ggf. Summenformel	Firma	Reinheit
	NaCl	Carl Roth	≥ 99,5 % p. a.
	NaHCO ₃	Merck	pro analysis (p. a.)
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Merck	p. a.
	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	Merck	p. a.
	KCl	Carl Roth	≥ 99,5 % p. a.
Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	Merck	p. a.
Mannit	C ₆ H ₁₄ O ₆	Sigma	99 %
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Sigma	99 %
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Carl Roth	Ph. Eur. ≥ 98 %
Indomethacin	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	Sigma	99 %
Methanol		Merck	p. a.
Theophyllin		Sigma	99 %
L-Glutamin		Sigma	Biotechnology Performance Certified
Prostaglandin E2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	Sigma	approx. 99% TLC
D-[1- ³ H(N)]-Mannit		PerkinElmer	radiochemische Reinheit > 97 %
Counterflüssigkeit Quicksafe A		Zinsser Analytic	nicht angegeben
Ketamin 10%		HWF Heinrich Fromme GmbH	pro injectionem (p. i.)
Pentobarbital (Eutha [®] 77)		Essex Tierarznei	pro injectionem (p. i.)
Stressnil		Janssen-Cilag GmbH	pro injectionem (p. i.)

Firmenadressen:

ESSEX TIERARZNEI, Ndl. der Essex Pharma GmbH, Thomas-Dehler-Strasse 27,
D-81737 München

HWF Heinrich Fromme GmbH, Chemisch Pharmazeutische Fabrik, Werkstr. 42,
D-34414 Warburg

JANSSEN-CILAG GmbH, Raiffeisenstraße 8, D-41470 Neuss, Tel: +49 (0) 2137 955-0,
Fax: +49 (0) 2137 955-327, E-mail: jancil@jacde.jnj.com

MERCK KGaA, Life Science & Analytics, Frankfurter Str. 250, D-64293 Darmstadt,
Tel: +49 (0) 6151 72-0, Fax: +49 (0) 6151 72-7495

PERKINELMER LAS (Germany) GmbH, Ferdinand Porsche Ring 17, D-63110 Rodgau -
Jügesheim, Germany Tel: +49 (0) 800 1 81 00 32, Fax: + 49 (0) 800 1 81 00 31,
E-mail: cc.germany@perkinelmer.com,
Internet: <http://de.instruments.perkinelmer.com>

CARL ROTH GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1-5, D-76185 Karlsruhe,
Tel: +49 (0) 721 5606-0, Fax: +49 (0) 721 5606-149

SIGMA -Aldrich Chemie GmbH, Eschenstrasse 5, D-82024 Taufkirchen bei München
Tel: +49 (0) 89 65 13-0, Fax: +49 (0) 89 65 13-11 69,
E-mail: Deorders@europe.sial.com

ZINSER ANALYTIC GmbH, Eschborner Landstrasse 135, D-60489 Frankfurt
(Quicksafe A, Flammpunkt (PMCC) 148 Grad C)

9.1.5 Versuchsplan

Nach Ankunft des 'gestrippten' Epithels an der Ussing-Kammer-Anlage begann der Einbau desselben in die Kammern. Die eingebauten Epithelien wurden wie folgt weiterbehandelt.

sofort nach Einbau 'Open Circuit'
 nach ~ 10 min 'Short Circuit'
 nach ~ 25 min Gruppierung
 nach ~ 30 min: Start des eigentlichen Versuches/Ende Adaptationszeit

Tabelle 9.1.5: Versuchsplan

Zeit nach Versuchsstart [h:min]	Aktion				Zugabe- bzw. Entnahmenvolumen [ml]
	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	
0:00	Start des Versuches	Start des Versuches	Start des Versuches, serosal H^3 -Mannit-Zugabe $0,6 \mu\text{Ci/ml} - 220\text{kBq}^{25}$	Start des Versuches	0,06
0:06	serosal PGE_2 -Zugabe $0,05; 0,1; 0,5; 1\mu\text{M}$	serosal PGE_2 -Zugabe $0,05; 0,1; 0,5; 1\mu\text{M}$			0,1; 0,2
0:10			serosal H1		0,1
0:12				mukosal; serosal Puffer abpipettieren	1; 0,2
0:13				mukosal Glutamin-Zugabe 12mM	1
0:13				serosal osmotischer Ausgleich mit Mannit 12mM	0,2
0:21	beidseits Pufferwechsel	beidseits Pufferwechsel			
0:30			mukosal PO + auffüllen mit Puffer		0,5

²⁵ Endkonzentration der Substanz im Puffer der Säule (gilt für alle Angaben von Konzentrationen in der Tabelle)

Zeit nach Versuchs- start [h:min]	Aktion				Zugabe- bzw. Entnahme- volumen [ml]
	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	
0:41				beidseits Puffer abpipettieren	2
0:43				beidseits Theophyllin- zugabe 8 mM	2
0:46	mukosal Glukose-Zugabe 0,5; 1; 4; 10 mM	mukosal Glukose-Zugabe 0,5; 1; 4; 10 mM			0,1; 0,25
0:46	serosal osmotischer Ausgleich mit Mannit 0,5; 1; 4; 10 mM	serosal osmotischer Ausgleich mit Mannit 0,5; 1; 4; 10 mM			0,1; 0,25
0:50			mukosal P1 + auffüllen mit Puffer		0,5
1:03				Messung beenden	
1:10			mukosal P2 + auffüllen mit Puffer		0,5
1:14	beidseits Puffer abpipettieren	beidseits Puffer abpipettieren			2
1:16	beidseits Theophyllin- zugabe 8 mM	beidseits Theophyllin- zugabe 8 mM			2
1:30			mukosal P3 + auffüllen mit Puffer		0,5
1:33			serosal H2		0,1
1:34			beidseits Puffer abpipettieren		2
1:36	Messung beenden	Messung beenden	beidseits Theophyllin- zugabe 8 mM		2
1:56			Messung beenden		

9.2 Futterzusammensetzung und zootechnische Parameter

Die Futtermittel wurden gemäß den VDLUFA-Empfehlungen analysiert (NAUMANN und BASLER, 1993).

Tabelle 9.2.1: Zusammensetzung der Futtermittel und analysierte Nährstoffe (Mitteilung aus dem Institut für Tierernährung, siehe auch (TARAS et al., 2005)).

	Tragende Sauen	Laktierende Sauen	Saugferkel	Absatzferkel
Fütterungszeitraum	114.-1. d a. p.	0.-28. d p. p.	15.-28. d	29.-56. d
<u>Bestandteile, g/kg:</u>				
Gerste	543.0	400.0	-	130.0
Tritikale	-	149.5	-	-
Weizenkleie	306.0	106.7	-	-
Zuckerrübenbrei, melassiert	106.0	-	-	-
Weizen	-	80.0	454.7	568.7
Sojaschrot	7.7	160.0	274.0	234.0
Milchpulver	-	-	120.0	-
Haferkleie	-	-	100.0	-
Erbsen	-	50.0	-	-
Kalziumkarbonat	10.4	14.7	11.0	18.4
Pflanzenfett	-	17.3	10.0	13.0
Melasse	15.0	-	-	-
Premix	7.5 ^b	10.0 ^c	12.0 ^d	12.0 ^d
Monokalziumphosphat	2.9	9.3	13.0	18.0
Natriumchlorid	-	1.3	-	-
Lysin	1.5	0.8	3.0	3.4
Methionin	-	0.4	1.6	0.9
Threonin	-	-	-	0.9
Tryptophan	-	-	0.7	0.7
<u>Analyzed composition:</u>				
ME, MJ/kg ^a	10.50	13.0	13.8	13.2
Rohprotein, g/kg	133.6	168.6	252.5	213.8
Rohfaser, g/kg	86.3	62.1	44.4	54.1
Rohfett, g/kg	23.8	28.3	22.6	23.1
Kalzium, g/kg	6.4	7.6	10.9	11.5
Phosphor, g/kg	6.7	7.0	8.1	7.8

^a ME = verdauliche Energie (nach Analyse berechneter Gehalt).

^b Ergibt folgenden Gehalt pro Kilogramm fertiges Futtermittel:

12,000 IE Vit. A; 1,500 IE Vit D₃; 45 mg Vit. E; 2.6 mg Vit. K₃; 1.5 mg Vit. B₁; 4.5 mg Vit. B₂; 3 mg Vit. B₆; 28.5 µg Vit. B₁₂; 18.8 mg Nikotinsäure; 112.5 µg Biotin; 7.5 mg Pantothersäure; 0.9 mg Folsäure; 300 mg Cholinchlorid; 75 mg Zn; 150 mg Fe; 60 mg Mn; 23.3 mg Cu; 0.6 mg Co; 0.3 mg Se; 1.5 mg I, 1.5 g Na; 825 mg Ca.

^c Ergibt folgenden Gehalt pro Kilogramm fertiges Futtermittel:

16,000 IE Vit. A; 2,000 IE Vit D₃; 60 mg Vit. E; 3.5 mg Vit. K₃; 2 mg Vit. B₁; 6 mg Vit. B₂; 4 mg Vit. B₆; 38 µg Vit. B₁₂; 25 mg Nikotinsäure; 150 µg Biotin; 10 mg Pantothersäure; 1.2 mg Folsäure; 400 mg Cholinchlorid; 100 mg Zn; 200 mg Fe; 80 mg Mn; 31 mg Cu; 0.8 mg Co; 0.4 mg Se; 2 mg I, 2 g Na; 1.1 g Ca.

^d Ergibt folgenden Gehalt pro Kilogramm fertiges Futtermittel:

4,800 IE Vit. A; 480 IE Vit. D₃; 50.4 mg Vit. E; 2.4 mg Vit. K₃; 2.4 mg Vit. B₁; 3 mg Vit. B₂; 4.8 mg Vit. B₆; 36 µg Vit. B₁₂; 42 mg Nikotinsäure; 240 µg Biotin; 18 mg Pantothersäure; 1.2 mg Folsäure; 960 mg Cholinchlorid; 60 mg Zn; 24 mg Fe; 60 mg Mn; 14.4 mg Cu; 480 µg Co; 420 µg Se; 0.6 mg I, 1.5 g Na; 0.6 g Mg.

Tabelle 9.2.2 : zootechnische Parameter

Eber	n-ter Wurf der Sau	Fütterungsgruppe	Sau	Deckdatum	errechnetes Abferkeldatum (115d p. c.)	tatsächliches Abferkeldatum	Ferkel Tötung 14.d	Ferkel Tötung 28.d	Ferkel Tötung 35.d	Ferkel Tötung 56.d
11/25	3	Probiotika	27	15.01.03	10.05.03	8.5.03	22.5.03	5.6.03	12.6.03	3.7.03
22	3	Probiotika	11	20.02.03	15.06.03	13.6.03	27.6.03	11.7.03	18.7.03	8.8.03
11	1	Kontrolle	40	18.03.03	11.07.03	10.7.03	24.7.03	7.8.03	14.8.03	4.9.03
11	2	Probiotika	31	18.04.03	11.08.03	10.8.03	24.8.03	7.9.03	14.9.03	5.10.03
11	3	Kontrolle	33	23.04.03	16.08.03	13.8.03	27.8.03	10.9.03	17.9.03	8.10.03
22	4	Probiotika	010	11.07.03	03.11.03	4.11.03	18.11.03	2.12.03	9.12.03	30.12.03
KB	1	Kontrolle	41	06.08.03	29.11.03	29.11.03	13.12.03	28.12.03	4.1.03	24.1.04
KB	1	Probiotika	44	07.08.03	30.11.03	30.11.03	14.12.03	29.12.03	5.1.03	25.1.04
KB	4	Kontrolle	37	04.11.03	27.02.04	27.2.04	12.3.04	26.3.04	2.4.04	23.4.04
KB	1	Kontrolle	59	05.11.03	28.02.04	1.3.04	15.3.04	29.3.04	5.4.04	26.4.04

9.3 Anhang zu den Berechnungen

9.3.1 Lineare Regression

Die Parameter 'a' und 'b' der Gleichung der Regressionsgerade im Lineweaver-Burk-Diagramm wurden per linearer Regression mit der in Abbildung 9.3.1 dargestellten Syntax in SPSS 11.5 errechnet (siehe Kapitel 3.8.1). Die Berechnung für K_m und $I_{sc\ max}$ nach Glukosezugabe erfolgte analog mit '1/ ΔI_{sc} nach Glukose-Zugabe' und '1/Glukose-Konzentration der Pufferlösung'.

```
REGRESSION
/MISSING PAIRWISE
/STATISTICS COEFF OUTS
/CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10)
/NOORIGIN
/DEPENDENT rezipge
/METHOD=ENTER rezkomp
/PARTIALPLOT ALL .
```

Abbildung 9.3.1 SPSS-Syntax für die Berechnung von K_m und $I_{sc\ max}$ nach PGE₂-Zugabe per linearer Regression

rezipge = 1/ ΔI_{sc} nach PGE₂-Zugabe

rezkomp = 1/PGE₂-Konzentration der Pufferlösung

Danach folgt jeweils die Berechnung von K_m bzw. $I_{sc\ max}$ aus 'a' bzw. 'b' für die beiden Versuchsteile, welche als Startwerte für die anschließende nichtlineare Regression dienen (siehe Kapitel 3.8.1).

9.3.2 Nichtlineare Regression

Nach Berechnung per linearer Regression streuen die Ergebnisse von K_m und $I_{sc\ max}$ stark. Unter anderem treten negative Werte für K_m auf, die nur theoretischer Natur sein können, da es keine negative Affinität eines Substrates zu einem Enzym geben kann. Die Stoffe würden sich abstoßen, was allein schon den Namen Enzym und Substrat widerspricht. In der Literatur sind jedoch die Affinität von Glukose zum Na⁺-Glukose-Kotransporter sowie die Ionensekretion als Reaktion auf PGE₂-Zugabe, was eine Affinität von PGE₂ zu einem Rezeptor voraussetzt, belegt (MISFELDT und SANDERS, 1981; THORBOLL et al., 1998; WRIGHT et al., 2004) - siehe auch Kapitel 2.4.

Es zeigte sich nach Ausprobieren mit den heterogenen Startwerten aus der linearen Regression, dass die nichtlineare Regression tatsächlich sehr robust ist, wie von MOTULSKY und CHRISTOPOULUS (2003) beschrieben. Sie durchläuft bei den Proben unterschiedlich viele Regressionsschritte, jedoch sind die Ergebnisse für K_m und $I_{sc\ max}$ immer bis zur 2. Dezimalstelle identisch (Werte nicht dargestellt). Es wurden deshalb für alle nichtlinearen Regressionen gerundete allgemeine Startwerte aus den Ergebnissen der linearen Regression verwendet: Ein Paar K_m und $I_{sc\ max}$ für alle Glukose-Regressionen und eines für alle PGE₂-Regressionen (siehe Abbildungen 9.3.2 und 9.3.3).

```

* NonLinear Regression.
MODEL PROGRAM VMAX=40 KM=0.1 .
COMPUTE PRED_ = (Vmax*konzpge2)/(Km+konzpge2).
NLR dtai5glc
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8 .

```

Abbildung 9.3.2 SPSS-Syntax für die Berechnung von K_m und $I_{sc\ max}$ nach PGE_2 -Zugabe per nichtlinearer Regression

Startwerte der nichtlinearen Regressionen zu PGE_2 : $K_m = 0,1\ \mu M$ und $I_{sc\ max} = 40\ \mu A \cdot cm^{-2}$
konzpge2 = PGE_2 -Konzentration der serosalen Pufferlösung
dtai5glc = ΔI_{sc} nach PGE_2 -Zugabe

```

* NonLinear Regression.
MODEL PROGRAM VMAX=90 KM=1.5 .
COMPUTE PRED_ = (Vmax*konzgluc)/(Km+konzgluc).
NLR dtai5glc
/PRED PRED_
/CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8 .

```

Abbildung 9.3.3 SPSS-Syntax für die Berechnung von K_m und $I_{sc\ max}$ nach Glukosezugabe per nichtlinearer Regression

Startwerte der nichtlinearen Regressionen zu Glukose: $K_m = 1,5\ mM$; $I_{sc\ max} = 90\ \mu A \cdot cm^{-2}$
konzgluc = Glukose-Konzentration der mukosalen Pufferlösung
dtai5glc = ΔI_{sc} nach Glukose-Zugabe

9.3.3 Herleitung der Konstanten zur Umrechnung des Kurzschlussstromes in die Transportgeschwindigkeit mit Hilfe der Faradayschen Gesetze

Die Herleitung der Gleichung (3.8.7) aus der Gleichung nach den Faradayschen Gesetzen (9.3.1) ist im Folgenden beschrieben:

$$I * t = F * n * z \quad (\text{MARTIN et al., 1991}) \quad (9.3.1)$$

I = Stromstärke [A],
t = Zeit [s],
F = Faradaykonstante = 96485 [A·s·Mol⁻¹] (MARTIN et al., 1991),
n = Stoffmenge [Mol],
z = Anzahl der Elementarladungen

Bezogen auf einen Quadratzentimeter und pro Stunde:

$$I_{sc} * t = F * m * z \quad (9.3.2)$$

- I_{sc} = Stromstärke des Kurzschlussstromes [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$],
 t = Zeit [s] (hier 3600, da der Transport für eine Stunde berechnet wird),
 F = Faradaykonstante = 96485 [$\mu\text{A} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{Mol}^{-1}$],
 m = transportierte Stoffmenge [$\mu\text{Mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$], entspricht der Transportgeschwindigkeit V_0 ,
 z = Anzahl der Elementarladungen (für Na^+ als Austauschion für Glukose = 2, sowie für Cl^- als sezerniertes Ion in Reaktion auf die Zugabe von PGE_2 = 1)

ergibt eingesetzt:

$$I_{sc} [\mu\text{A}/\text{cm}^2] * 3600 [\text{s}] = 96485 [\mu\text{A} * \text{s}/\mu\text{Mol}] * m [\mu\text{Mol}/(\text{cm}^2 * \text{h})] * 1 \quad (9.3.3)$$

umgeformt:

$$m [\mu\text{Mol}/(\text{cm}^2 * \text{h})] = \frac{I_{sc} [\mu\text{A}/\text{cm}^2] * 3600 [\text{s}]}{96485 [\mu\text{A} * \text{s}/\mu\text{Mol}]} \quad (9.3.4)$$

und vereinfacht:

$$m [\mu\text{Mol}/(\text{cm}^2 * \text{h})] = V_0 = \frac{I_{sc} [\mu\text{A}/\text{cm}^2]}{26,8013 [\mu\text{A} * \text{h}/\mu\text{Mol}]} \quad (9.3.5)$$

Diese Gleichung entspricht Gleichung (3.8.7), in der I_{sc} durch $I_{sc \text{ max}}$ und V_0 durch V_{max} ersetzt wurden.