

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Das von uns untersuchte Gewebe wurde Patienten entnommen, die sich aufgrund eines nach vorheriger Coloskopie histologisch gesicherten colorectalen Carcinoms in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Charité (Campus Mitte, Direktor: Prof. Dr. J. Müller) einer operativen konventionellen oder laparoskopischen Darmresektion (Hemikolektomie rechts oder links, Sigma- oder Rektumresektion) unterzogen. In die Studie wurden insgesamt 46 Patienten eingeschlossen. Hinsichtlich der Lokalisation des Tumors ergab sich folgende Verteilung: 16 Patienten mit einem Carcinom des Colon ascendens, 3 Patienten mit einem Carcinom des Colon transversum, 2 Patienten mit einem Tumor im Bereich des Colon descendens sowie 18 Patienten mit einem Tumor im Bereich des Colon sigmoideum. Die restlichen 7 Patienten litten unter einem Rectumcarzinom. Von den 46 Patienten wurden 19 in laparoskopischer Technik und 27 Patienten nach der konventionellen Operationsmethode operiert. Die eingeschlossenen Patienten wurden im Rahmen der Operationsvorbereitung und -einwilligung über die Entnahme von Gewebepräparaten aus den Operationsresektaten zu Studienzwecken aufgeklärt.

Bei der Auswahl der Patienten wurden folgende Ausschlusskriterien definiert:

- akute und chronische entzündliche Erkrankungen des Darmes (Colitis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Divertikulose, Divertikulitis)
- Vor-Operationen am Gastrointestinaltrakt
- Präoperative Strahlen- und/oder Chemotherapie
- Behandlung mit Theophyllin, Antibiotika, NSAR und/oder Corticosteroiden

Unmittelbar nach Entnahme des Darmresektates durch den operierenden Chirurgen wurde das Gewebe in das Schnellschnittlabor des Institutes für Pathologie der Charité (Charité Campus Mitte) gebracht. Dort wurde durch den diensthabenden Pathologen ein ca. 5x5 cm großes Stück der Darmwand aus dem makroskopisch unauffälligen Randbereich des Resektates möglichst weit entfernt vom Tumor excidiert. Anschließend transportierten wir das Gewebe in einer gekühlten Box in unser Labor zur weiteren Präparation. In der Regel lagen maximal 45 Minuten zwischen der Entnahme des Operationsresektates durch den Operateur und dem Einsetzen des Präparates in

die Versuchsanordnung. In die Auswertung wurden ausschließlich Präparate aus dem distalen Colon (Colon descendens und sigmoideum) eingeschlossen.

2.1.1 Präparation des Gewebes

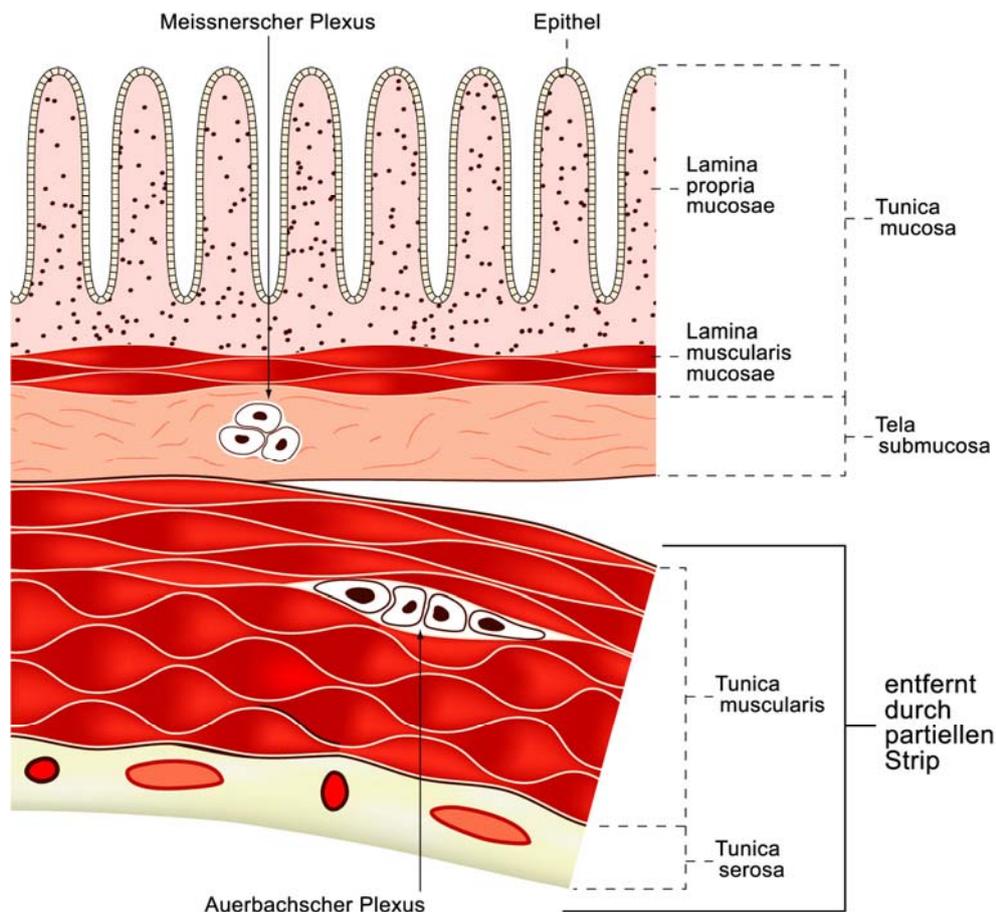


Abb.3: Präparation des Gewebes (Partieller Strip)

Um die Diffusionsbarriere für Sauerstoff und Substrate zu vermindern, wurde die Schleimhaut „partiell gestriipt“, das heißt die Tunica mucosa und submucosa wurde unter Schonung der Lamina muscularis mucosae von der Tunica muscularis und der Tunica serosa freipräpariert (Schulzke et al. 1986). Nachdem das entnommene Präparat mit der mucosalen Seite nach unten auf einer Silikonplatte unter leichtem Zug mit Hilfe von Stecknadeln aufgespannt war, wurde die Tunica muscularis mit einem scharfen Skalpell behutsam von den darunterliegenden Schichten abgelöst. Wie in Abb.

3 dargestellt ist, wurde dabei auf eine vollständige Erhaltung der Lamina mucosa sowie der Lamina submucosa mit dem Plexus submucosus Meissner geachtet.

Anschließend wurden mit einem Fibrinkleber (Histoacryl®, Braun Surgical, Melsungen) speziell angefertigte Plastikringe auf das partiell gestrippte Gewebe aufgeklebt (Abb.2) und die so vorbereiteten Geweberinge (B) in einen Plexiglascontainer (A) eingesetzt. Die Anfertigung der Container, Plastikringe und der Silikonringe (C) zur Abdichtung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dipl.-Phys. Dieter Heinze (Med. - Technische Labore, Charité Campus Mitte). In Abb. 4 sind das Präparat sowie die einzelnen Teile des Containers dargestellt.

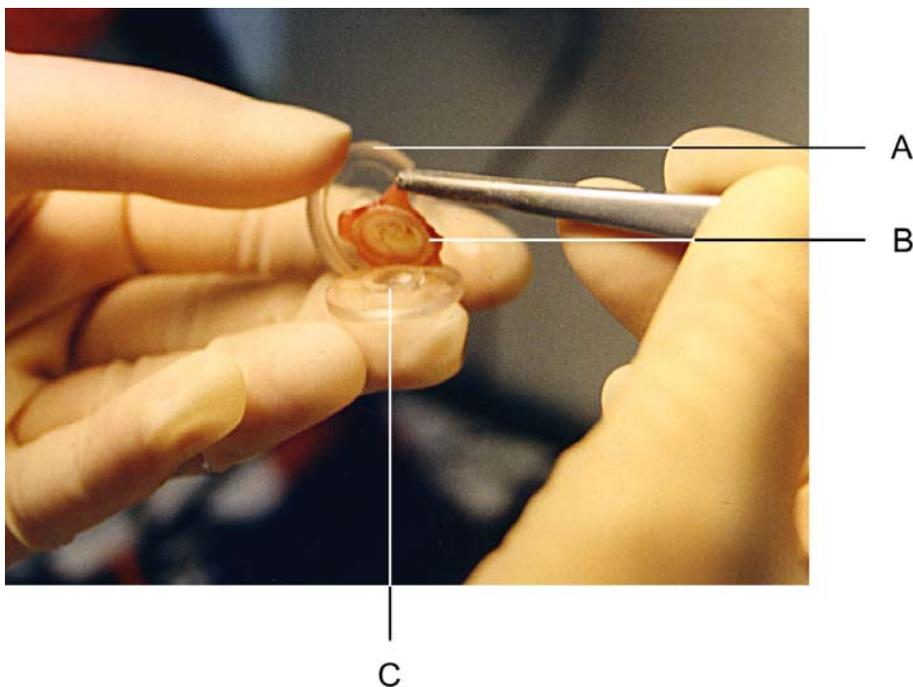


Abb.4: Einsetzen des präparierten Gewebes in den Plexiglascontainer

- A Plexiglascontainer
- B Epithelgewebe mit aufgeklebtem Plastikring
- C Silikonring zur Abdichtung des Gewebes

Die untersuchte Schleimhaut war vergleichbar mit einem Trommelfell durch den

Container gespannt, wobei die in der Ussingkammer untersuchte Fläche, das „Trommelfell“, $0,28 \text{ cm}^2$ umfasste (siehe Abb.4). Alle Messungen in der Ussingkammer bezogen sich auf diese exponierte Messfläche der Mucosa.

2.2 Kurzschlussstromtechnik nach Ussing

Zur Untersuchung des transepithelialen Ionentransportes verwendeten wir die 4-Elektroden-Technik nach Ussing und Zerahn (Ussing & Zerahn 1951).

Die Kurzschlussstromtechnik nach Ussing stellt eine geeignete Methode dar, um in vitro passive von aktiven Transportprozessen abzugrenzen (Fromm und Hierholzer 1997). Der passive Ionentransport wird durch drei Gradienten bewirkt: 1. Der hydrostatische Druckgradient, 2. Der Konzentrationsgradient und 3. der elektrische Gradient.

Zur Unterscheidung des aktiven Ionentransportes ist es notwendig, diese 3 Gradienten auszuschalten. In Abb. 5 ist die Messkammer nach Ussing und Zerahn dargestellt. Das untersuchte Epithelgewebe (A) ist dabei wie eine Membran zwischen zwei gleichartige Hohlräume (F_1 und F_2) eingespannt, die mit einer Elektrolytlösung gleicher Zusammensetzung und gleichen Volumens gefüllt sind. Dadurch ist sichergestellt, dass auf beiden Seiten der Membran der gleiche hydrostatische Druck herrscht und kein Konzentrationsgradient über der Membran existiert. Der elektrische Gradient wird hauptsächlich durch die aldosteronstimulierte Resorption von Natriumionen bestimmt. In unseren Experimenten wurde dieser „unerwünschte“ elektrogene Ionentransport durch die Zugabe von Amilorid in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l gehemmt. Das Schleifendiuretikum Amilorid ist ein hochselektiver Inhibitor des apikalen Natriumkanals (Fromm et al. 1993)

Auf jeder Seite des eingespannten Epithels befindet sich jeweils eine Elektrode (E_U), über die die Potentialdifferenz, bzw. die Spannung über der Membran gemessen und jeweils eine Elektrode (E_I), über die ein Strom angelegt wird. Die externe Stromquelle (Q) wird geregelt durch das Voltmeter (U).

Jeder Ionentransport durch die Epithelmembran geht mit einer Änderung der transepithelialen Spannung einher. Der externe Strom, der notwendig ist, um die gemessene Spannung auf Null zu bringen, das heißt, einen Kurzschluss zu erzeugen,

wird nach Ussing Kurzschlussstrom (I_{sc}) genannt. Er wird durch das Ampèremeter (I) gemessen und entspricht dem Nettoladungstransport der Ionen durch das Epithel.

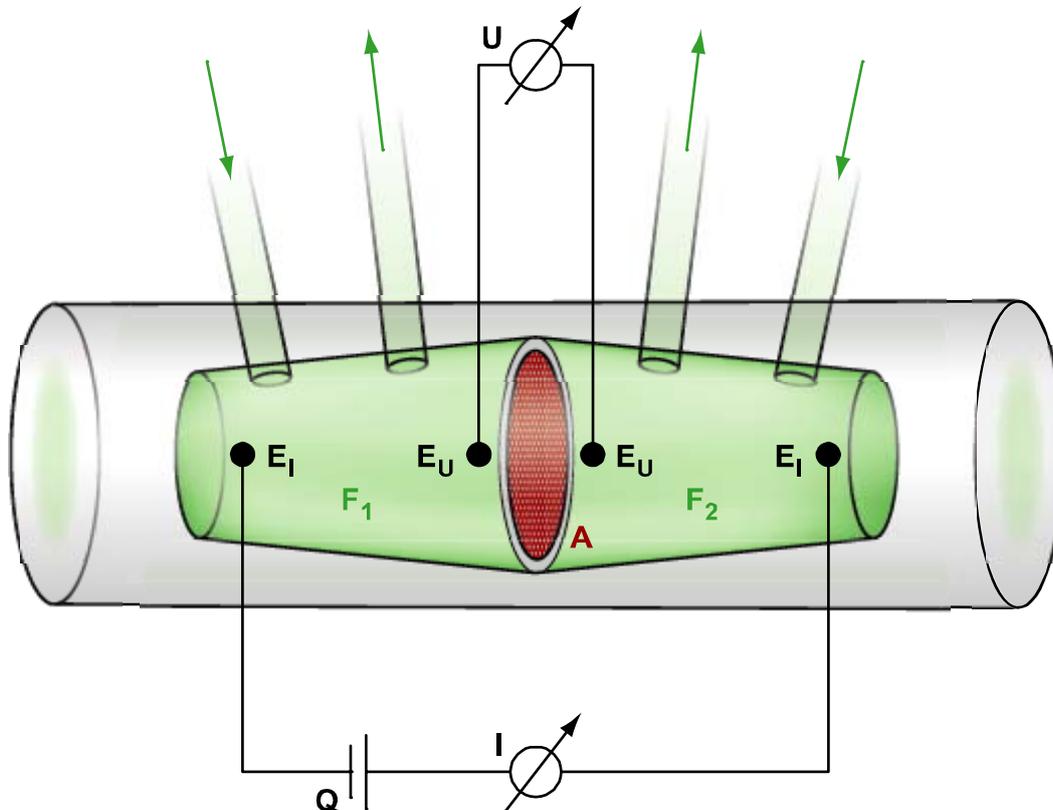


Abb. 5: Messkammer nach Ussing & Zerahn (1951)

A	Epithelgewebe	E₁	Stromelektrode
E_U	Spannungselektrode	F₁	Badlösung mucosal
F₂	Badlösung serosal	I	Ampèremeter
Q	Stromquelle	U	Spannungsquelle

Die Richtung des Ionentransportes ist anhand eines positiven oder negativen Wertes für den Kurzschlussstrom (I_{sc}) zu erkennen. Beispielsweise kann ein positiver Kurzschlussstrom bedingt sein durch eine Absorption von Kationen, das heißt durch einen Transport von positiven Teilchen von der mucosalen auf die serosale Seite der Membran, oder durch eine Sekretion von Anionen (Transport von serosal nach

mucosal). Gleichen sich Sekretions- und Resorptionsvorgänge aus, betragen der Nettoladungstransport und damit der I_{sc} einen Wert von 0. Die an Transportvorgängen beteiligten Ionen können durch die Zugabe von spezifischen Stimulatoren und Inhibitoren unterschieden werden.

Der transepitheliale Widerstand R errechnet sich nach dem Ohm'schen Gesetz aus dem Quotienten von gemessener Spannung und angelegtem Strom ($R=U/I$). Er gilt als Parameter für die Barrierefunktion einer Membran. Ein hoher Widerstand entspricht einer hohen Dichtigkeit des Epithels und der zugehörigen tight junctions, das heißt, die Durchlässigkeit für Solute ist niedrig.

2.3 Versuchsaufbau

Der in den Experimenten verwendete Versuchsstand bestand aus folgenden Teilen: der Messkammer, dem Wärmetauscher mit dem angeschlossenen Wasserbad und der Begasungseinheit sowie dem Messplatz.

Der Versuchsaufbau wurde mit Hilfe von Herrn Dipl.-Phys. Heinze (Med. - Technische Labore, CCM) und dank der intensiven Unterstützung der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. M. Fromm aus dem Institut für Klinische Physiologie der FU Berlin und von Prof. Dr. J.-D. Schulzke aus der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin konstruiert.

2.3.1 Die Messkammer

Die Messkammer bestand aus 2 zusammengesteckten Acrylglasshälften, die durch das untersuchte Gewebe in 2 gleich große Hohlkammern unterteilt waren (siehe Abb.6). Auf jeder Seite befand sich jeweils 1 konische Bohrung, über die die Messkammer zentriert in den Messstand eingespannt wurde. Die in der Abbildung im Bildvordergrund zu sehenden Bohrungen dienten der Aufnahme der mit Agar und 10%iger Kochsalzlösung (Purified Agar, WAK Chemie, Bad Homburg; NaCl 10 %) gefüllten Leitungsbrücken (D), über die der Strom angelegt wurde. Sie führten zu den mit Kaliumchlorid gefüllten Behältern, in denen sich die Stromelektroden (C, eigene Herstellung) befanden. Auf der gegenüberliegenden Seite wurde ebenfalls mit Leitungsbrücken die Verbindung zu den

Spannungselektroden (B, Fa. Mettler Toledo, Urdorf, Schweiz) hergestellt. Die nach oben führenden Schläuche verbanden die Hohlkammern mit dem Wärmetauscher.

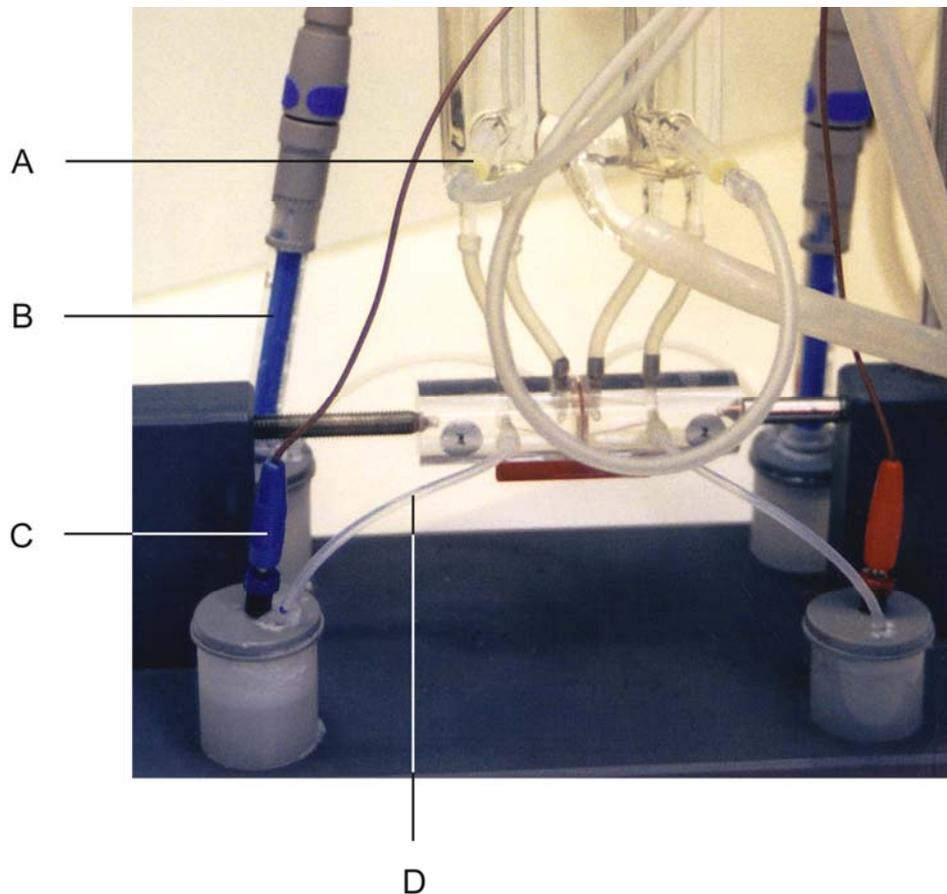


Abb.6: Die Messkammer mit den ableitenden Elektroden

- | | | | |
|----------|-----------------------------|----------|--------------------|
| A | Anschluss zur Gasversorgung | B | Spannungselektrode |
| C | Stromelektrode | D | Agarbrücke |

2.3.2 Der Wärmetauscher

In Abbildung 7 ist der verwendete Wärmetauscher schematisch dargestellt. Im unteren Teil des Bildes ist die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Messkammer mit dem eingespannten Epithelgewebe zu sehen, die über jeweils 2 aufgesetzte Schläuche mit dem Wärmetauscher verbunden wurde.

Der Wärmetauscher bestand aus 2 symmetrisch angeordneten doppelwandigen Glaskolben. Im Inneren der Glaskolben befand sich die Badlösung (in der Abb. grün eingefärbt), in der äußeren Glaskammer zirkulierte Wasser (blau eingefärbt) in einer Temperatur von 37,4° Celsius (Wasserbad von Lauda Dr. Wobser GmbH, Lauda-Königshofen).

Die Badlösung wurde beidseits mit Carbogengas (95% O₂/5% CO₂, Fa. AGA Gas, Bottrop) zur Versorgung des Epithels mit Sauerstoff und zur Aufrechterhaltung der Zirkulation versetzt. Die Einleitung des Gases erfolgte in ausreichendem Abstand zu den Messelektroden und zum Epithel, um Bewegungsartefakte zu vermeiden.

Die beiden Seiten des Wärmetauschers waren in sich geschlossene Flüssigkeitsräume, die nur über die Messkammer und das eingespannte Epithel voneinander getrennt waren. Eine Kommunikation der beiden Kompartimente war somit ausschließlich über das Epithel möglich.

In unseren Experimenten bezogen sich die Angaben mucosal, serosal bzw. beidseits auf die beiden Badlösungen des Versuchsaufbaus (s. Abb.7). Die jeweilige Seite wurde definiert durch die Anordnung der Epithelmembran, das heißt die mucosale Seite des Gewebes entspricht dem mucosalen Flüssigkeitskompartiment, die serosale Seite benennt das serosale Kompartiment.

Um die Verdunstung der Badflüssigkeit zu reduzieren, wurden auf die beiden Glaskolben die in der Abbildung oben zu sehenden Wasserabscheider aufgesetzt. Der Wärmetauscher und die Wasserabscheider wurden speziell angefertigt durch die Glasbläserei der Charité und des Institutes für Physik der Humboldt-Universität zu Berlin.

Durch diese Versuchsanordnung waren hinsichtlich der Temperatur und der Sauerstoffversorgung annähernd physiologische Bedingungen zur Untersuchung des Epithels gewährleistet.

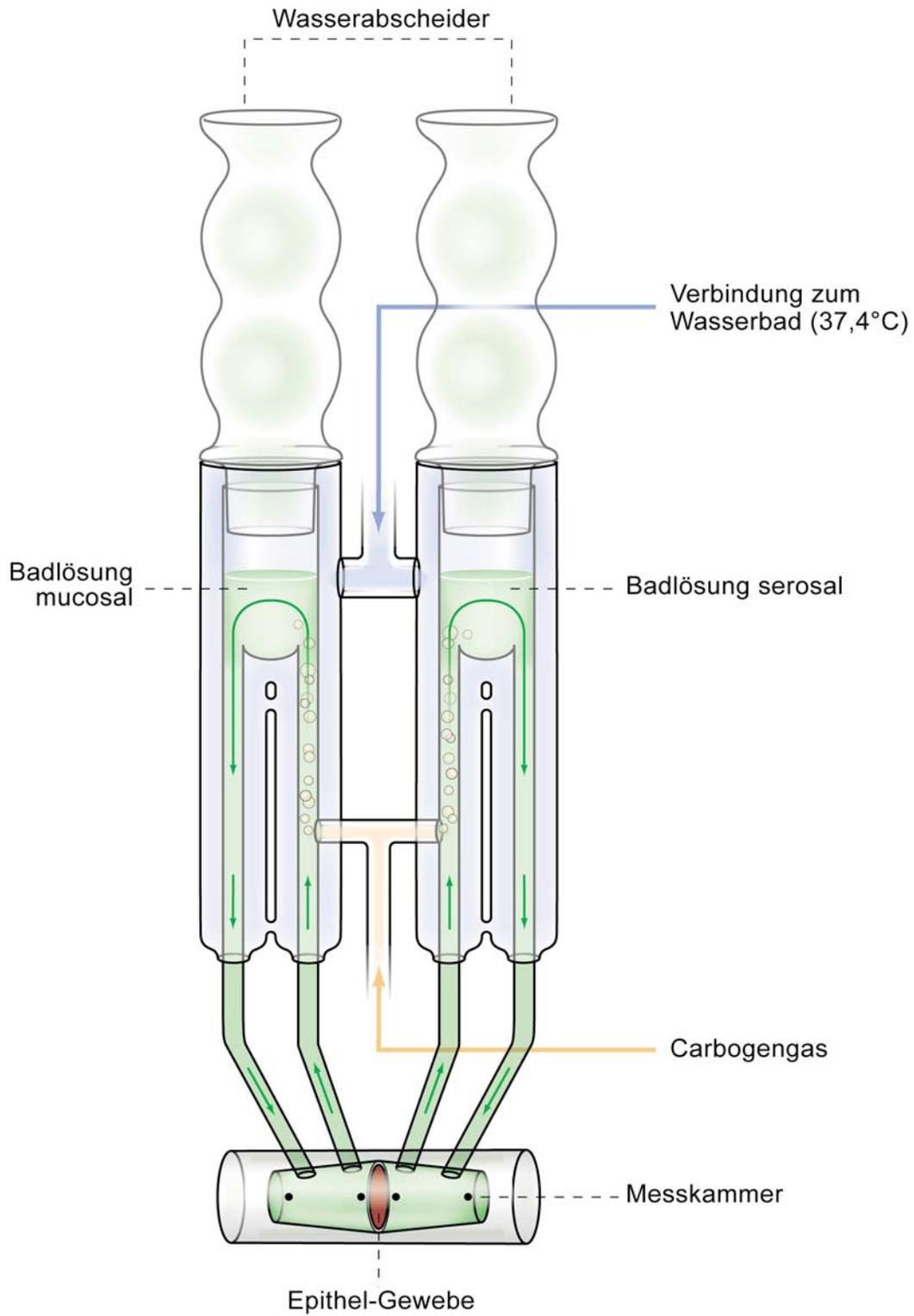


Abb.7: Wärmetauscher und Messkammer

2.3.3 Der Messplatz

Um mehrere Experimente gleichzeitig durchführen zu können, verwendeten wir 6 parallel angeordnete Messstände (D). Wie in Abb. 8 dargestellt ist, war jeder Versuchsstand über Schläuche an die Begasungseinheit (A) angeschlossen. Über separate Regler war es möglich, den Gasfluss jedes einzelnen Glaskolbens zu regulieren. Die Strom- und Spannungselektroden waren mit dem CVC 6 Interface (B, Fa. Fiebig, Berlin) verbunden. Über diese Messstation wurden fortlaufend Spannung und Kurzschlussstrom gemessen und an den im Bildhintergrund zu sehenden Computerarbeitsplatz (C) weitergeleitet. Zur Online- Datenaufnahme und Speicherung verwendeten wir das Softwareprogramm Analogon (Fa. Fiebig, Berlin).

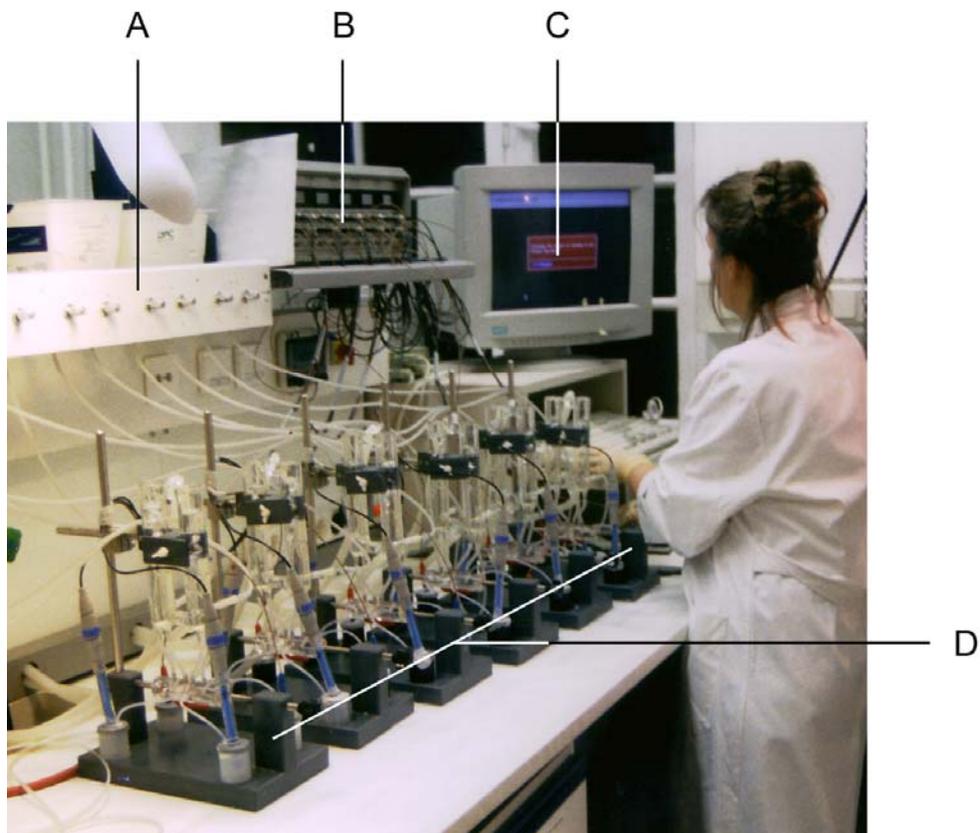


Abb.8: Parallele Anordnung der Messstände

A Begasungseinheit mit separaten Reglern

B CVC 6 Interface

C Computerarbeitsplatz

D parallel angeordnete Messstände

2.4 Versuchsablauf

2.4.1 Vorbereitung

Am Morgen des Versuchstages wurde zunächst die Badlösung hergestellt.

Die Badlösung enthielt 140 mmol/l Na^+ , 123,8 mmol/l Cl^- , 5,4 mmol/l K^+ , 1,2 mmol/l Ca^{2+} , 1,2 mmol/l Mg^{2+} , 2,4 mmol/l HPO_4^{2-} , 0,6 mmol/l H_2PO_4^- und 21 mmol/l HCO_3^- und entsprach damit einer physiologischen Elektrolytlösung. Zusätzlich wurden folgende Nährsubstrate hinzugegeben: 10 mmol/l D(+)-Glucose, 0,5 mmol/l β -Hydroxybutyrat, 2,5 mmol/l Glutamin und 10 mmol/l D(+)-Mannose (nach Fromm & Schultz, 1981).

Anschließend wurden die leeren Ussingkammern ohne Gewebe in den Versuchsaufbau eingebaut, die Leitungsbrücken mit den Elektroden verbunden, das Wasserbad eingestellt und nach Einfüllen der Badlösung die Begasung eingestellt. Zur Ermittlung des Eigenwiderstandes der Versuchsanordnung und des Asymmetriepotentials der angeschlossenen Elektroden wurden daraufhin Messungen durchgeführt. Die Messungen wurden unmittelbar vor Einsetzen des Epithelgewebes noch einmal durchgeführt. Die so ermittelten Leerwerte wurden später zur Korrektur der Messungen verwendet.

2.4.2 Zeitlicher Ablauf des Versuchs

Nach Einsetzen des Epithelgewebes in die Messkammer wurden mucosal wie serosal jeweils 10 ml der oben beschriebenen Badlösung in die Wärmetauscher eingefüllt. Zusätzlich wurden 10 mg/l Zienam® (Imipenem/Cilastatin, MSD, Madrid, Spanien) und 50 mg/l Securopen® (Azlocillin, Bayer AG, Leverkusen) beidseits hinzugegeben, um eine bakterielle Überwucherung der Badlösung zu vermeiden. Weiterhin wurden der Badlösung mucosal und serosal Bovines Serumalbumin (Sigma Chemical, Co, USA) in einer Konzentration von 50 mg/l zugesetzt, um die Oberflächenspannung und damit die Adhäsion an die Wände des Wärmetauschers und der Wasserabscheider zu reduzieren.

Nach Zugabe von Amilorid in der in 2.2 beschriebenen Konzentration von 10^{-5} mol/l beidseits begann die ca. 150 Minuten dauernde Equilibrierung bis Erreichen des steady state und damit dem Beginn der Experimente. Als steady state wird ein

Gleichgewichtszustand von Sekretions- und Absorptionsvorgängen des untersuchten Epithels bezeichnet. Er ist gekennzeichnet durch einen ausgeglichenen Nettoladungstransport über der Membran, das heißt, durch ein Gleichbleiben bzw. geringe Schwankungen der gemessenen Kurzschlussstromwerte. Die Zugabe der untersuchten Substanzen erfolgte zum Zeitpunkt 0, anschließend wurden Messungen über einen Zeitraum von 180 Minuten durchgeführt. Nach Ende der Messzeit wurde zur Ermittlung der Vitalität des untersuchten Epithels Theophyllin hinzugegeben. 10 Minuten nach Zugabe von Theophyllin war der Versuch beendet.

Der zeitliche Ablauf der Experimente ist in Abb. 9 dargestellt.

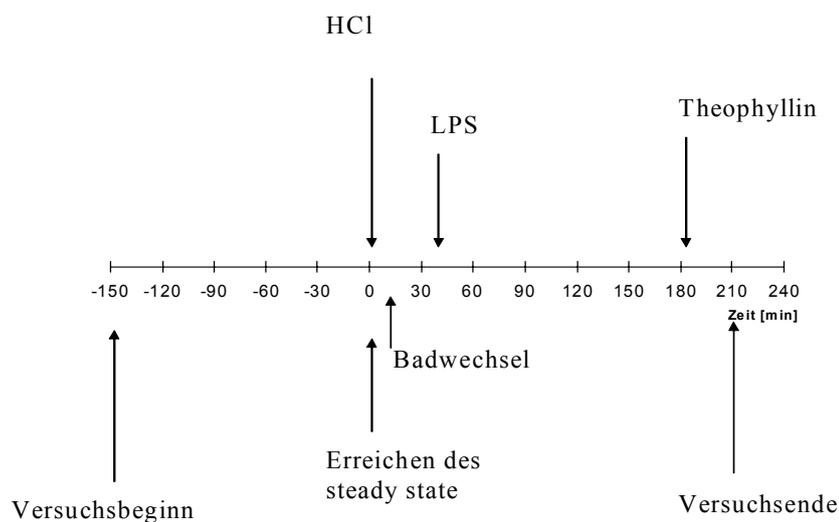


Abb.9: Zeitlicher Ablauf der Versuche

2.4.3 Zugabe von Theophyllin

Zum Abschluss des Versuches wurde Theophyllin (Sigma Chemical, St. Louis, USA) in einer Konzentration von 10 mmol/l beidseits hinzugegeben.

Theophyllin hemmt das Enzym Phosphodiesterase, das cAMP zu 5'AMP abbaut. Durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP wird eine vermehrte Chloridsekretion ausgelöst. Bei einem intakten Epithel zeigt sich als Reaktion auf Theophyllin ein Anstieg des I_{sc}

innerhalb von 1-10 Minuten (Argenzio und Whipp 1981).

Somit konnte durch die Gabe von Theophyllin die Sekretionsfähigkeit und damit die Vitalität des untersuchten Gewebes zum Ende der Versuchszeit überprüft werden.

2.5 Getestete Substanzen

Im Folgenden sind die einzelnen von uns getesteten Substanzen dargestellt. Die Zugabe der Substanzen erfolgte immer erst nach Erreichen des steady state. Bei mucosaler, serosaler oder beidseitiger Zugabe einer Substanz wurde vorher auf beiden Seiten das der Zugabemenge entsprechende Volumen abpipettiert, um das Flüssigkeitsvolumen der Badlösung jederzeit auf beiden Seiten gleich und über die Zeit konstant zu halten. Nach mucosaler oder serosaler Gabe einer Substanz wurde auf der entsprechenden anderen Seite des Epithels das gleiche Volumen an Badlösung hinzugegeben. Auf diese Art und Weise konnten Artefakte durch einen unterschiedlichen hydrostatischen Druck auf der einen oder anderen Seite der Membran vermieden werden.

Die angegebenen Konzentrationen entsprechen jeweils der Endkonzentration in der Badlösung.

2.5.1 Exposition des Epithels mit Salzsäure (HCl)

Nach Erreichen des steady state wurde HCl (HCl, Merck, Darmstadt) in Konzentrationen in der Badlösung von 20, 25, 30, 35, 40 und 45 mmol/l auf der mucosalen Seite nach vorheriger Abnahme des entsprechenden Volumens (s. 2.6) hinzugegeben. Nach Inkubation über einen Zeitraum von 10 Minuten wurde die Badlösung auf der serosalen und mucosalen Seite gleichzeitig gewechselt, um eine weitere Exposition mit HCl zu vermeiden. Die neu eingefüllte Badlösung war in Menge und Zusammensetzung identisch mit der Badlösung vor der Zugabe von HCl.

Bei den Kontrollversuchen wurde in identischer Weise die Badlösung gewechselt. Dabei zeigten sich während des Badwechsels Artefakte, bedingt durch das Ablassen der leitenden Elektrolytlösung, nach dem Badwechsel waren Widerstand und Kurzschlussstrom unverändert gegenüber dem Ausgangswert.

Im Anschluss an den Wechsel der Badlösung wurden Messungen des Widerstandes und Kurzschlussstromes über einen Zeitraum von 180 Minuten durchgeführt. Zum Abschluss des Versuches wurde Theophyllin in einer Konzentration von 10 mmol/l beidseits hinzugegeben und der I_{sc} über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen (s.2.4.3).

Im Ergebnisteil dargestellt sind die prozentuale Änderung des Widerstandes sowie die Differenz des Kurzschlussstromes zu den Zeitpunkten 30, 90 und 180 Minuten nach Exposition mit HCl. Zur Berechnung der Prozente bzw. Differenzen diente der Mittelwert 11 bis 15 Minuten vor Exposition mit HCl. Weiterhin wurde die relative Änderung des I_{sc} nach beidseitiger Zugabe von Theophyllin (im Folgenden Theophyllinantwort genannt) bestimmt. Dabei diente als Ausgangswert zur Berechnung der Mittelwert des I_{sc} 10 bis 1 Minute vor Zugabe von Theophyllin.

2.5.2 Effekt von Lipopolysacchariden (LPS)

LPS (E.coli Serotype 055:B5, Sigma Chemical, St. Louis, USA) wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml mucosal, serosal und beidseits zum Zeitpunkt 0 hinzugegeben. Vorher wurden die entsprechenden Volumina in der in 2.6 beschriebenen Weise abpipettiert. Anschließend wurde der Zeitverlauf des Kurzschlussstromes I_{sc} über einen Zeitraum von 180 Minuten gemessen.

Am Ende des Versuches wurde Theophyllin in einer Konzentration von 10 mmol/l beidseits in der in 2.4.3 beschriebenen Weise hinzugegeben und der I_{sc} über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen.

In den Ergebnissen dargestellt sind die Änderungen des I_{sc} im Zeitverlauf über 180 Minuten nach Zugabe von LPS. Zur Berechnung der Differenzen diente der Mittelwert 11 bis 15 Minuten vor Zugabe von LPS als Ausgangswert.

2.5.3 Effekt von LPS nach vorheriger Exposition mit HCl

Das Epithel wurde zunächst mit HCl in einer Konzentration von 35 mmol/l mucosal über einen Zeitraum von 10 Minuten inkubiert. Zugabe von HCl und Wechsel der Badlösung wurden in der in 2.5.1 beschriebenen Weise durchgeführt. 30 Minuten nach Zugabe von

HCl wurde LPS in einer Konzentration von 10 µg/ml auf der mucosalen Seite des Epithels hinzugegeben. Daraufhin wurde der Zeitverlauf des Widerstandes R_T , des Kurzschlussstromes (I_{sc}) über einen Zeitraum von 180 Minuten nach Zugabe von HCl gemessen. Zur Überprüfung der Sekretionsfähigkeit wurde am Ende des Versuches Theophyllin in einer Konzentration von 10 mmol/l beidseits hinzugegeben und der I_{sc} über 10 Minuten gemessen.

2.5.4 Effekt von Barriereprotektiven Substanzen

Effekt von transforming growth factor (TGF)

Weiterhin wurde der Effekt von TGF-β1 (Genzyme, Cambridge, MA, USA) auf den zeitlichen Verlauf des Widerstandes nach vorheriger Zugabe von HCl (35 mmol/l mucosal) untersucht. Zunächst wurde HCl in der in 2.5.1 beschriebenen Weise hinzugegeben und die Badlösung nach 10 Minuten gewechselt. Unmittelbar im Anschluss an den Badwechsel wurde TGF in Konzentrationen von 10 bzw. 20 ng/ml beidseits hinzugegeben und der zeitliche Verlauf des Widerstandes über einen Zeitraum von 180 Minuten untersucht.

Zu den einzelnen Konzentrationen wurden von uns Pilotversuche durchgeführt mit einer Fallzahl von 1-3 Versuchen pro Konzentration. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde keine statistische Auswertung durchgeführt, im Ergebnisteil sind exemplarisch Einzelversuche dargestellt.

Effekt von Diosmectit

Nach vorheriger Zugabe von 35 mmol/l HCl mucosal wurde mit dem Badwechsel Diosmectit (Colina®, MED-IPSEN GmbH, Ettlingen) in Konzentrationen von 1 und 10 mg/ml mucosal hinzugegeben. Zugabe von HCl und Wechsel der Badlösung wurden dabei in der in 2.5.1 beschriebenen Weise durchgeführt. Anschließend wurde der Verlauf des Widerstandes über einen Zeitraum von 180 Minuten gemessen.

Zu den einzelnen Konzentrationen wurden von uns Pilotversuche durchgeführt mit einer Fallzahl von 1-3 Versuchen pro Konzentration. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde keine statistische Auswertung durchgeführt, im Ergebnisteil sind exemplarisch

Einzelversuche dargestellt.

2.6 Messung des pH-Wertes

Um die Wirkung unterschiedlicher mucosaler Konzentrationen von HCl auf den pH-Wert der Badlösung zu untersuchen, wurden exemplarisch bei einem der in 2.5.1 beschriebenen Versuche pH-Messungen in der Badlösung durchgeführt. Zu folgenden Zeitpunkten wurde gemessen: 1. vor Exposition mit HCl, 2. während der Exposition mit 20, 25, 30, 35, 40, 45 bzw. ohne Exposition (Kontrolle) und 3. nach Durchführung der Badwechsel, d.h. nach Beendigung der 10- minütigen Inkubation mit HCl. Es wurden jeweils mucosal und serosal Messungen durchgeführt, jede Messung wurde 2-mal wiederholt. Vor jeder einzelnen Messung wurde das pH-Meter (100 ISFET; Beckman Instruments, Fullerton, Ca, USA) mittels einer vom Hersteller vorgegebenen pH-definierten Lösung geeicht.

2.7 Histologische Untersuchung

2.7.1 Herstellung der histologischen Präparate

Unmittelbar nach Beendigung des Versuchs wurde das untersuchte Epithelgewebe aus der Ussingkammer herausgenommen und mit dem aufgeklebten Plastikring in Formalin 4% fixiert. Der Plastikring wurde nach Herausnahme aus der Fixierlösung kurz vor der Entwässerung des Präparates sorgfältig mit dem Skalpell abpräpariert.

Die Aufarbeitung der Präparate wurde im Histochemischen Labor des Institutes für Pathologie (Dir: Prof. Dr. med. M. Dietel) durchgeführt. Nach Entwässerung des Epithelgewebes in der aufsteigenden Alkoholreihe (70/80/96/100 % Ethanol) wurde das Gewebe über das Intermedium Xylol in Paraffin eingebettet. Die so hergestellten Paraffinblöcke wurden daraufhin im Schlittenmikrotom in 1-3 µm dünne Schichten geschnitten. Die Schnittebene verlief parallel zu den Krypten. Anschließend wurden die Längsschnitte auf Objektträger gezogen, gestreckt und bei 65° Celsius im Trockenautomat getrocknet. Zur Auswaschung des Paraffins wurden die Präparate zunächst in Xylol sowie weiterhin in Alkohol in absteigender Konzentration (100/96/80/70 % Ethanol) gebadet und mit Aqua destillata abgespült.

Zur Differenzierung der Gewebestrukturen erfolgte eine Doppelfärbung mit Hämalaun und Eosin (H&E). Zunächst wurde die Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (Fa. Merck, Darmstadt) durchgeführt, danach mit Aqua dest. abgespült und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Präparate in Eosin 0,1% (Fa. Merck, Darmstadt) in Aqua dest. über 5-15 Minuten gefärbt. Zuletzt wurden die Schnittpräparate in der aufsteigenden Alkoholreihe (70/80/96/100 % Ethanol) sowie in Xylol gebadet und eingedeckt.

2.7.2 Lichtmikroskopische Untersuchung und digitale Fotografie

Die Untersuchung der Schnittpräparate erfolgte im Molekulargenetischen Labor von Herrn Dr. med. Alexander Swidsinski in der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen.

Verwendet wurde das Lichtmikroskop Eclipse E 600 von Nikon, Japan versehen mit dem Okular Nikon CFIUW 10x/25 und 2 unterschiedlichen Objektiven: 1. Nikon Plan Fluor 20x/0.50 ($\infty/0,17$; WD 2,1) und 2. Nikon Plan Fluor 40x/0.75 ($\infty/0,17$; WD 0,72). Mit dieser Kombination von Okular und Objektiven konnten die Schnittpräparate 200- und 400-fach vergrößert werden. Die in den Ergebnissen gezeigten Abbildungen wurden mit der Digital Camera DXM 1200 (Nikon, Japan) fotografiert, die digitale Bildverarbeitung erfolgte mit der Software ACT 1 (Nikon, Japan).

Eine quantitative Auswertung der Schnittpräparate wurde von uns nicht durchgeführt. Im Ergebnisteil sind zu jeder Schädigungskonzentration exemplarisch einzelne Schnittbilder dargestellt und beschrieben. Die Auswertung erfolgte qualitativ.

2.8 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse sind dargestellt in Mittelwerten \pm mittlerer Standardfehler (SEM).

Bei Mehrfachvergleichen wurde zunächst der Kruskal-Wallis-Test angewendet, um die Verteilungen der untersuchten Stichproben auf ihre Unterschiedlichkeit zu testen. Bei Signifikanz ($p < 0.05 = \alpha$) wurden anschließend Paarvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Da der Kruskal-Wallis-Test wie auch der Mann-Whitney-U-Test zu den nichtparametrischen Tests zählen und damit auf Rängen wie dem Median basieren,

wurde neben der graphischen Darstellung von Mittelwert und SEM in den Datentabellen der Median aufgeführt. Bei mehrfachen Paarvergleichen wurde eine α -Adjustierung nach Bonferroni-Holm durchgeführt. Zur statistischen Berechnung wurde SPSS Version 10.0 verwendet. Die vorliegende Arbeit wurde in statistischen Fragen von Frau Dr. I. Kuchler aus dem Institut für Medizinische Biometrie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin (Dir. Prof. Dr. K.-D. Wernecke) betreut.

2.9 Verwendete Chemikalien

(R)-3-Hydroxybutyric acid	Fluka Chemie, Steinheim
Amilorid Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin	Sigma Chemical ,Co, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ciprobay 100	Bayer Vital, Leverkusen
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
Diosmectit (Colina®)	MED-IPSEN GmbH, Ettlingen
D-Mannitol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
D-Mannose	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
HCl 30%	Merck, Darmstadt
Histoacryl®	Braun Surgical, Melsungen
Kaliumchlorid	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
Lactulose	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

L-Glutamine	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
Lipopolysaccharide (E.coli Serotype 055:B5)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Magnesiumchlorid	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Fluka-Chemie, Neu-Ulm
Securoopen® 0,5g	BayerVital, Leverkusen
TGF-β1	Genzyme, Cambridge, MA, USA
Theophyllin	Sigma Chemical, St. Louis, USA
Turanose	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Zienam 500®	MSD Sharpe Dohm, Haar