

III. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die verwendeten Psalterepithelien stammen von institutseigenen Schafen und unterschieden sich in Herkunft, Rasse, Geschlecht und Alter. Die Tiere (siehe Anhang 8.3) wurden in zwei Fütterungsgruppen eingeteilt. Die „heugefütterten“ Schafe erhielten Heu (HF) ad libitum. Krafffutter wurde in zwei Mahlzeiten (7.00 und 15.00 Uhr) in einer Menge von 600 g/Tag angeboten. Diesen „Krafffutter gefütterten“ Tieren (KF) stand außerdem Heu ad libitum zur Verfügung. Beide Tiergruppen hatten freien Zugang zu Wasser und Lecksteinen. Das Krafffutter hatte folgende Zusammensetzung: 16 % Rohprotein, 13 % Rohfaser, 3 % Fett und 5.9 ME/kg.

3.2 Gewinnung der Epithelien

Die Tiere wurden entweder im Institut für Tierzucht der Humboldt Universität Berlin oder im Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin geschlachtet. Das Eröffnen der Leibeshöhle und die Entnahme des Magen-Darm-Traktes erfolgte unmittelbar nach der Betäubung und dem Ausbluten.

Der Psalter wurde vom übrigen Verdauungstrakt abgetrennt und längs des Psalterkanals aufgeschnitten, die größeren Psalterblätter an ihrer Basis von der Blättermagenwand abgesetzt und unmittelbar danach im Transportmedium gereinigt und entlang der mittleren Muskelschicht stumpf auseinanderpräpariert.

Der Transport der Epithelien erfolgte bei 38°C im mit Carbogen (5% CO₂ und 95% O₂) begasten Transportmedium.

3.3 Inkubationstechnik und elektrophysiologisches Messprinzip

Die Versuchsdurchführung entspricht der von USSING und ZEHRAN (1951) entwickelten und später von STEVENS (1964) und FERREIRA et al. (1966) modifizierten Technik.

In „sogenannte“ Ussing-Kammern (zweiteilige hohle Plexiglaszylinder) werden, von Silikonringen unterlegt, zurechtgeschnittene Epithelstücke vertikal eingespannt (freiliegende Epithelfläche von 3,14 cm²), so dass mukosale (apikale) und serosale (basolaterale) Seite des Psalterepithels zu je einer Kammerhälfte ausgerichtet sind.

Pro Tier und Versuchstag standen 3 Ussing-Kammern zur Verfügung. Die Versorgung der Epithelien mit Pufferlösung wird durch mit den Kammern über flexible Schläuche in Verbindung stehenden zweischenkeligen und doppelwandigen Glassäulen gewährleistet (18 ml Pufferlösung je Schenkel). Zwischen den Wänden der Glassäulen zirkuliert mittels eines Pumpthermostaten (Haake D1) erwärmtes Wasser zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur der Inkubationslösung von 38°C.

Ein an die Glassäulen angeschlossenes Gasliftsystem (Fa. Landgraf) sorgt gleichzeitig für die Durchmischung der Inkubationslösung und Versorgung des Epithels mit Sauerstoff (serosal) beziehungsweise Carbogen (mukosal resp. luminal). Die Erfassung der elektrophysiologischen Daten erfolgt für jede Ussing-Kammerhälfte über zwei KCl-Agarbrücken (eine gewebe-nahe zur Messung der transepithelialen Potentialdifferenz und eine gewebe-ferne zur Einspeisung externen Stromes), die über 3M KCl mit jeweils einer Ag/AgCl - Elektrode in Kontakt stehen. Potentialdifferenz (P_d in mV), Gewebeleitfähigkeit (G_t in $mS \cdot cm^{-2}$) sowie Kurzschlussstrom (I_{sc} in $\mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) werden durch mikrocomputergesteuerte Strom- und Spannungsklemmeinrichtungen (Messstand CVC6, Datenaufnahmeprogramm Analogon, Dr. Sorgenfrei, Berlin) fortlaufend aufgezeichnet.

Zur Messung der elektrophysiologischen Parameter wurden **open - circuit** und **short - circuit** Bedingungen angewendet.

open - circuit:

Die sich über dem Epithel aufbauende Potentialdifferenz (gemessen über die gewebe-nahen Elektroden) wird erfasst bei fortlaufender Applikation von Strompulsen

von 100µA und 0,2 s Dauer mittels gewebeferner Elektroden. Aus den registrierten Potentialänderungen (ΔPD) und der Größe der Strompulse lassen sich anschließend der Gewebewiderstand bzw. die Gewebeleitfähigkeit berechnen.

$$R_t = \frac{\Delta PD}{I}$$

Der Gewebewiderstand R_t wird definiert als der reziproke Wert der Gewebeleitfähigkeit. Für die Gewebeleitfähigkeit gilt daher:

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

Der vom Gewebe erzeugte (Ionen)Strom ergibt sich nach dem Ohmschen Gesetz aus P_d und G_t .

Open - circuit Bedingungen wurden nach Einbau des Epithels in die Kammern für einen Zeitraum von ca. 30 Minuten (Äquilibrationszeit) angewendet. Nach dieser Erholungsphase von Präparation und Transport und dem Erreichen eines „steady state“ bezüglich P_d und G_t wird das Epithel kurzgeschlossen.

short - circuit:

Durch das sogenannte „Klemmen“ wird die an der Membran aufgrund von Ionenbewegungen aufgebaute transepitheliale Spannung durch Einspeisung eines entsprechend großen Stromes auf 0 mV eingestellt. Dieser Kurzschlussstrom ist somit ein Maß für die Summe der Ionentransporte am Epithel.

Die Ermittlung von Gewebeleitfähigkeit (G_t) und Gewebewiderstand (R_t) erfolgt, wie schon bei open - circuit Bedingungen, mittels der Applikation definierter Strompulse.

Bei der Verwendung gleichartiger Inkubationslösungen auf beiden Seiten der Membran bei einer konstanten P_d von 0 mV durch Klemmen des Epithels gelingt es, den elektrochemischen Gradienten als treibende Kraft für Ionenbewegungen zu eliminieren. Unter diesen Verhältnissen gemessene Nettobewegungen von Ionen müssen als aktive Transportmechanismen angesehen werden.

Vor dem Einspannen des Gewebes wird der Flüssigkeitswiderstand der Pufferlösung und das Eigenpotential der Elektroden gemessen bzw. berechnet und anschließend für die spätere automatische Messwertkorrektur gespeichert.

3.4 Bestimmung der HCO_3^- - Transportraten

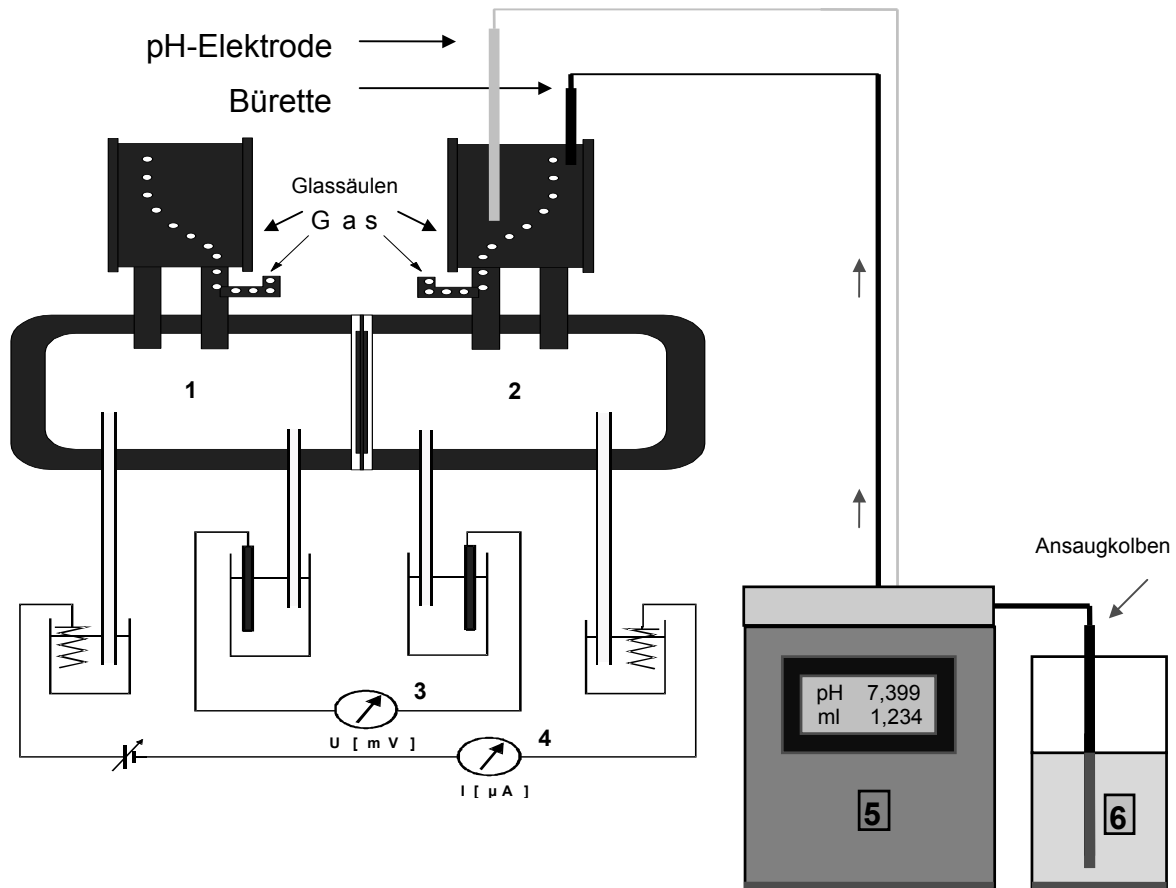


Abb. 1: Ussing-Kammer mit Gasliftapparat und Titrator

- 1 und 2: mukosale (= luminale) und serosale (= Blutseite) Seite des Epithels
- 3 : Messung der transepithelialen Potentialdifferenz mittels Agar-KCl-Brücken und Ag-AgCl-Elektroden
- 4 : Stromeinspeisung (definiert) mittels Agar-KCl-Brücken und Ag-AgCl-Elektroden
- 5 : Titrator (Titroline alpha)
- 6 : Schwefelsäure ($0,01\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Die Bestimmung der HCO_3^- -Transportraten erfolgte nach der pH-Stat -Methode, die bei diesen Untersuchungen mit Hilfe von Titratoren der Marke „Titroline alpha“ automatisiert durchgeführt wurde.

Ein oder zwei Tage vor dem Versuch erfolgte das Ansetzen der verwendeten Pufferlösungen mit Chemikalien der Firma Merck und der Firma Sigma, die bis zum Versuchsbeginn im Kühlschrank gelagert wurden. Während der mukosale HCO_3^- -haltige Puffer sich bei 38°C und Carbogenbegasung auf pH 7,4 einstellt (gepuffertes System), war für den ungepufferten (HCO_3^- -freien) serosalen Puffer noch vor dem Umfüllen in den Glassäulenschenkel eine pH-Korrektur auf 7,4 unter Begasung mit Sauerstoff erforderlich.

Die Osmolarität der Pufferlösungen ($300 \text{ mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurde mit einem Osmometer der Firma Roebing nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung bestimmt.

Eine pH-Elektrode und das Ende eines Bürettenschlauches des Titrators wurden über die Glassäule mit dem serosalen Puffer in Kontakt gebracht (siehe **Abb. 1**). Jede Änderung des pH-Wertes des Puffers aufgrund der HCO_3^- -Resorption (Transport von der mukosalen Seite des Epithels zur serosalen Seite) gleicht diese Apparatur durch automatische Zufuhr von $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Schwefelsäure aus. Der vorgegebene pH-Wert von 7,4 bleibt somit über die Dauer des Versuches konstant.

Die Berechnung der unidirektionalen HCO_3^- -Transportraten erfolgt indirekt über das Zugabevolumen an Schwefelsäure in folgenden Schritten:

1. Berechnung der Schwefelsäurekonzentration in der Säule

2. Berechnung der HCO_3^- -Konzentration mit Hilfe der Henderson -

Hasselbalch - Gleichung:

$$\text{pH} = 7,4$$

$$\text{pK} = 6,1 \text{ (bei } 38^\circ\text{C)}$$

$$7,4 = 6,1 + \log \left(\frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{SO}_4]} \right)$$

3. Berechnung der unidirektionalen HCO_3^- -Transportrate [J_{ms} in $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$]

$$\left(\frac{[\text{HCO}_3^-] * 60}{t} \right) \div \text{cm}^2 = \mu\text{eq} * \text{cm}^{-2} * \text{h}^{-1}$$

Nach einer Äquilibrationszeit von ca. 30 Minuten, in welcher sich die Epithelien von der durch Präparation und Transport bewirkten Manipulation erholen können, wird der Strom „kurzgeschlossen“ (bei Erreichen von „steady-state“ - Bedingungen bezüglich G_t und P_d) und der Hauptversuch mit einer Dauer von drei Stunden gestartet.

Der Versuchsablauf ist aus **Abbildung 2** ersichtlich.

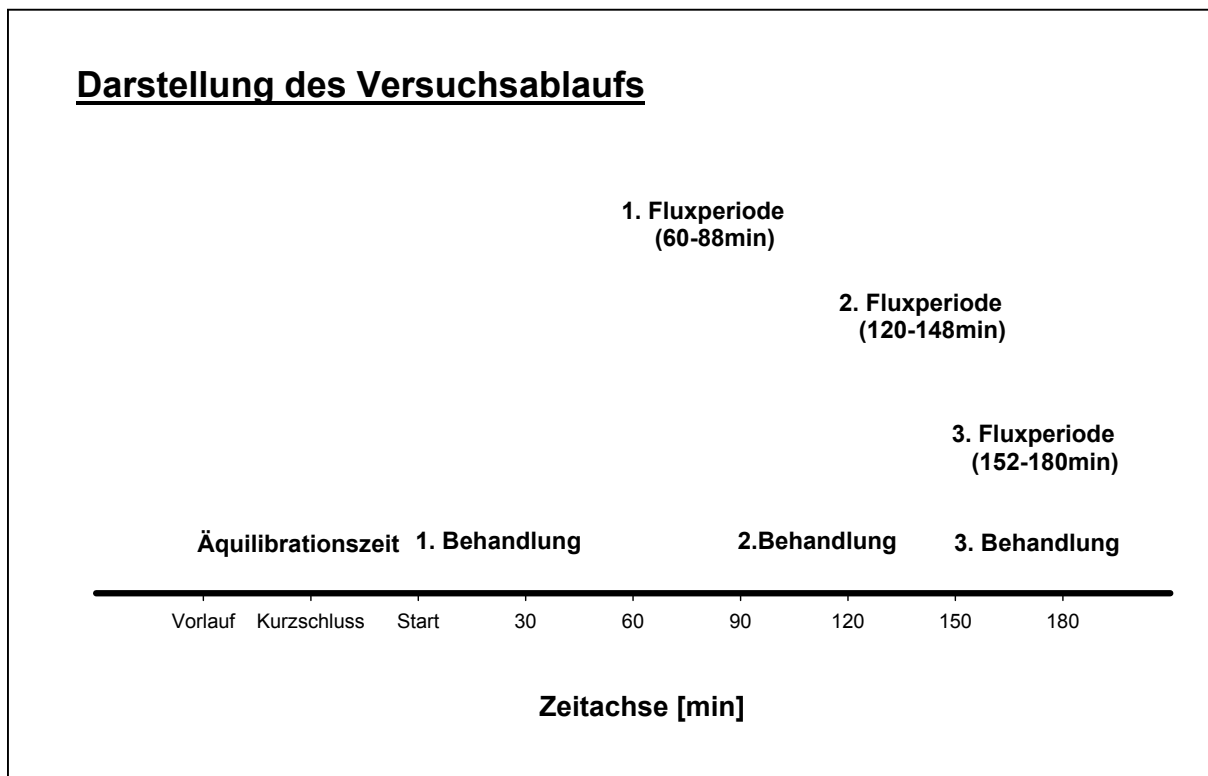


Abb. 2: Darstellung der zeitlichen Abfolge der einzelnen Versuchsschritte. Die Zeit vom Vorlauf bis zur Einstellung der Kurzschlussbedingungen bzw. bis zum Start beträgt jeweils ca. 30 Minuten. Unter Behandlung sind die Versuchsbedingungen zu verstehen. Die 1. Behandlung ist immer als Kontrolle zu verstehen, die 2. und 3. Behandlung variieren entsprechend der Versuchsbedingung.

Die Versuchsansätze unterscheiden sich in der Pufferzusammensetzung (siehe **Anhang** und **Ergebnisse**).

3.5 Hemmstoffe

Durch den Zusatz von Hemmstoffen verschiedener Transportmechanismen wurde versucht, den Nachweis für das Vorhandensein des angenommenen Anionenaustauschers beziehungsweise dessen Kopplung an andere Transportmechanismen zu erbringen.

Zum Einsatz kommen folgende Pharmaka:

- **DIDS** (4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure)

DIDS, ein Stilbenderivat, ist ein Hemmstoff von Anionenaustauschern, der in dieser Versuchsreihe nur im Zusammenhang mit gleichzeitig reduziertem Chloridgehalt eingesetzt werden kann, da seine Wirkung über eine kompetitive Hemmung an der Bindungsstelle für Chlorid vermittelt wird. Die Zugabe von DIDS in einer Konzentration von $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ erfolgt auf der serosalen Seite des Epithels.

- **Bumetanid**

Bumetanid ist ein Hemmstoff des $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ - Cotransporters und gehört zur Gruppe der Schleifendiuretika. Die Zugabe erfolgt in einer Konzentration von $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite des Epithels. Er wurde verwendet, um den Einfluss dieses Transportmechanismus auf den HCO_3^- -Transport zu überprüfen.

3.6 Pufferlösungen / Inkubationslösungen

Die Bestimmung der Bicarbonattransportraten erfolgt über die Menge „verbrauchter“ (titrierter) Schwefelsäure. Um sicherzugehen, dass für beide Ionen, das heißt für Bicarbonat und für Chlorid, eine ausreichend große Triebkraft für den gegenseitigen Austausch vorhanden ist, wurden Pufferlösungen mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen der beiden Elektrolyte für die Versuche angesetzt.

So ist der Konzentrationsgradient von HCO_3^- von mukosaler zu serosaler Seite stets fallend, der für Chlorid jedoch steigend, ausgeglichen und fallend.

Die Konzentration von Bicarbonat des *mukosalen Puffers* beträgt wahlweise 25 beziehungsweise 50 mmol·l⁻¹ sowie 25 mmol·l⁻¹ Chlorid. In der Vorversuchsreihe liegt die mukosale Chloridkonzentration bei 124,8 mmol·l⁻¹. Die Begasung erfolgt entsprechend mit 5% (25 mmol·l⁻¹ HCO₃⁻) resp. 10%igem (50 mmol·l⁻¹ HCO₃⁻) Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂ oder 90% O₂ und 10% CO₂).

Der *serosale Puffer* ist bicarbonatfrei und enthält Chlorid in fünf verschiedenen Konzentrationsstufen: 154,8, 100, 25, 10 oder 0 mmol·l⁻¹.

Die genaue Zusammensetzung der jeweils verwendeten Pufferlösung ist dem Anhang (8.1) zu entnehmen.

3.7 Eichung der Messapparatur

Die Eichung der Messapparatur (Titratoren der Marke „Titroline alpha“) wurde in folgender Weise vorgenommen:

Die Zugabe von 10µl einer 0,01 mol·l⁻¹ NaOH erfolgte in Abständen von 5 min in den serosalen, mit 18 ml bicarbonatfreien Puffer befüllten Glassäulenschenkel bei einer konstanten Temperatur der mit Sauerstoff begasten Inkubationslösung von 38°C.

Die Änderungen des pH-Wertes aufgrund dieser „Manipulation“ wurde über pH-Elektroden an die Titratoren übermittelt, welche durch Zuführung entsprechender Mengen 0,01 mol·l⁻¹ H₂SO₄ den vorgegebenen pH-Wert von 7,4 einstellten.

Das Ergebnis ist grafisch in **Abb. 3** dargestellt.

Die Ursache für den vorhandenen Intercept zwischen Startpunkt und erstem Messpunkt ist nicht bekannt. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre eine leichte Abweichung der Ausgangs - pH-Werte der drei Messapparaturen.

Der Intercept ist jedoch von untergeordneter Bedeutung und stellt in keiner Weise die Funktionsfähigkeit und auch Gleichmäßigkeit des Messverfahrens der Titratoren in Frage. Dies ist der Grafik eindeutig zu entnehmen.

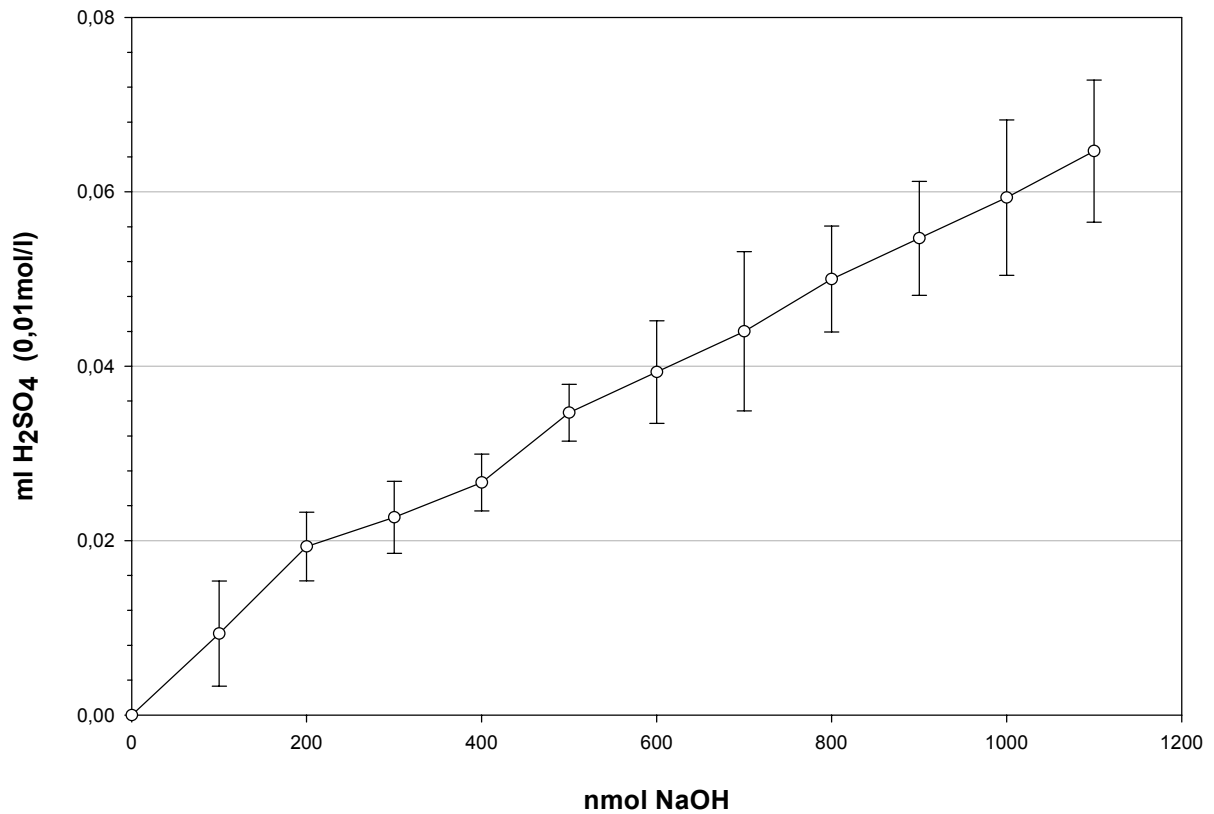


Abb. 3: Eichkurve der Titrationsapparatur (Näheres siehe Text): Mittelwerte mit Std.Dev.; $n = 6$

3.8 Statistische Auswertungsmethoden

Zur zusammenfassenden quantitativen Beschreibung der Ergebnisse in den einzelnen Versuchen werden arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (= S.E.M. = standard error of mean) angegeben, deren Lage und Verlauf grafisch

veranschaulicht wird. Gemittelt wird jeweils über die Epithelien aller Tiere, die einer bestimmten Bedingung ausgesetzt wurden. Die Bezeichnung "N" steht dabei für die Anzahl der Versuchstiere und "n" für die Anzahl der untersuchten Gewebe.

Für die Bearbeitung der einzelnen Fragestellungen wurden unterschiedliche Versuchsansätze gewählt, deren Messungen in den Hauptversuchen varianzanalytisch ausgewertet wurden. Unter der Annahme, dass die Messungen an Epithelien desselben Tieres unter gleichen Bedingungen annähernd normalverteilt sind und keine wesentlichen Streuungsunterschiede über die verschiedenen Bedingungen und Tiere hinweg zeigen, lassen sich die im Mittel vorgefundenen Tier- und Gruppenunterschiede mit Hilfe univariater Varianzanalysen charakterisieren.

Von einem erkennbaren Effekt soll hier die Rede sein, wenn die Abweichungen so weit über die jeweilige Bezugsstreuung (Reststreuung oder zufälliger Effekt der Wechselwirkung) hinausgehen, dass die Wahrscheinlichkeit für ein rein zufällig bedingtes Überschreiten kleiner als 5% ist (das heißt Überschreitungswahrscheinlichkeit $p < 0.05$).

Zur Klärung, ob die für die Varianzanalysen getroffene Annahme gleicher Varianzen verlässlich ist, wurde ein Test der Varianzhomogenität nach LEVENE (SACHS, 1992) durchgeführt. Die Hypothese gleicher Varianzen bei den Epithelien der Tiere unter den verschiedenen Bedingungen ist dabei abzulehnen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit p kleiner als ein vorzugebendes Niveau ist. Hier wurde ein Grenzwert von 0.01 gewählt.

Wenn sich Varianzunterschiede zeigen, ist dies ein weiterer Hinweis (neben der grafischen Darstellung der Einzelergebnisse und der beschreibenden Statistiken), dass die Streuungsverhältnisse bei den Tieren und Bedingungen nicht homogen sind. Das Ergebnis der Varianzanalyse ist dann mit Vorsicht zu interpretieren.

Eine Übersicht, wieviele Tiere und Epithelien jeweils unter verschiedenen Bedingungen untersucht wurden, ist im Anhang zu finden, ebenso wie die tabellarische Darstellung der statistischen Auswertungsergebnisse.

Mukosale Variation von HCO_3^-

Dieser Versuch wurde in zwei Gruppen an jeweils zwei Tieren durchgeführt, die Gruppen unterschieden sich in der zugegebenen Menge von HCO_3^- im Verlauf des

Versuches. In der einen Gruppe ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurde der Versuch bei beiden Tieren an 3 Epithelien ausgeführt, in der anderen Gruppe ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) bei einem Tier an 2 Epithelien und bei dem anderen Tier an 3 Epithelien.

Die Messungen erfolgten in drei Fluxperioden an jedem Epithel, für die statistische Auswertung wurden je Epithel aber die Werte der zweiten und dritten Periode zuvor in Form eines arithmetischen Mittelwertes zusammengefasst.

Hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Messergebnisse lassen sich daher zwei Faktoren mit festen Effekten bewerten, die Gruppe (Konzentration von 25 oder $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zur ersten Fluxperiode) und die Behandlung als solche, für die sich hier Zeiteffekte zeigen müssten. Dazu kommen zwei Faktoren mit zufälligen Effekten - Tiere und Epithelien - durch die Wiederholungen des Versuches an Tieren innerhalb der Gruppen und an Epithelien innerhalb der Tiere.

Das für die Auswertung unterstellte Varianzanalysemodell berücksichtigt folgende Effekte:

Messwert = Gruppe + Zeit + Gruppe · Zeit + Tier(Gruppe) + Tier(Gruppe) · Zeit + Epithel(Tier)

Dabei kennzeichnet:

Gruppe einen systematischen Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

Zeit einen systematischen Unterschied zwischen den Fluxperioden.

Gruppe · Zeit den systematischen Effekt einer Wechselwirkung zwischen Gruppe und Zeit, d.h. eine unterschiedliche Ausprägung des Zeiteffektes in den beiden Gruppen; erst dieser Effekt kennzeichnet eine unterschiedliche Wirkung von HCO_3^- aufgrund unterschiedlicher mukosaler HCO_3^- - Konzentrationen.

Tier(Gruppe) die zufällige Streuung zwischen Tieren innerhalb einer Gruppe.

Tier(Gruppe)·Zeit den zufälligen Effekt einer Wechselwirkung zwischen Tier und Zeit, d.h. eine unterschiedliche Ausprägung des Zeiteffektes bzw. des Effektes der unterschiedlichen HCO_3^- - Konzentrationen bei verschiedenen Tieren.

Epithel(Tier) die zufällige Streuung zwischen Epithelien innerhalb eines Tieres.

Die Basis zur Bewertung der Effekte bilden die zufälligen Effekte auf den unteren Ebenen. Der Unterschied zwischen den Gruppen müsste beispielsweise deutlich über die Unterschiede zwischen Tieren innerhalb der Gruppen hinausgehen, damit von einem erkennbaren Effekt die Rede sein kann. Der Zeiteffekt wird im Vergleich zur Wechselwirkung zwischen Tier und Zeit bewertet. Der Effekt der Wechselwirkung zwischen Gruppe und Zeit wird zu einer Reststreuung in Bezug gesetzt, die die zufällige Wechselwirkung der Faktoren Epithel innerhalb der Tiere und Zeit charakterisiert.

Chloridreduktion 1

Dieser Versuch wurde mit jeweils 2 Epithelien von 5 Tieren durchgeführt, wobei jeweils ein Epithel über alle 3 Fluxperioden den Kontrollbedingungen ausgesetzt war und das andere nach der ersten Fluxperiode mit Chloridreduktion (auf $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) serosal „behandelt“ wurde.

Hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Messergebnisse lassen sich daher die Faktoren Behandlungsfolge (Kontrolle und Chloridreduktion) und Zeit (über drei Fluxperioden) mit systematischen Effekten bewerten sowie der Faktor Tier mit zufälligen Effekten. Das für die Auswertung unterstellte Varianzanalysemodell berücksichtigt folgende Effekte:

Messwert = Tier + Folge + Zeit + Zeit · Folge + Tier · Folge + Zeit · Tier

Dabei kennzeichnet:

- | | |
|---------------------|---|
| Tier | den zufälligen Effekt des Faktors Tier. |
| Folge | einen systematischen Unterschied zwischen den beiden Behandlungsfolgen über alle Fluxperioden; in der ersten Fluxperiode dürfte der Unterschied allerdings nicht groß sein, da hier die Bedingungen noch gleich sind. |
| Zeit | einen systematischen Unterschied zwischen den Fluxperioden bei beiden Behandlungen. |
| Zeit · Folge | den systematischen Effekt einer Wechselwirkung zwischen Behandlungsfolge und Zeit; d.h. eine unterschiedliche |

Ausprägung des Zeiteffektes bei den beiden Behandlungsfolgen; dieser Effekt würde in diesem Fall einen Unterschied in der Entwicklung aufgrund der Chloridreduktion kennzeichnen.

Tier · Folge den zufälligen Effekt einer Wechselwirkung zwischen Tier und Behandlungsfolge, das hieße in diesem Fall, dass die Tiere unterschiedlich auf die Chloridreduktion reagieren.

Zeit · Tier den zufälligen Effekt einer Wechselwirkung zwischen Tier und Zeit, das hieße, dass die Tiere ein unterschiedliches Profil über die Fluxperioden zeigen.

Die Basis zur Bewertung der Effekte bilden die zufälligen Effekte der Wechselwirkungen auf den unteren Ebenen. Damit von erkennbaren Einflüssen die Rede sein kann, müsste der Unterschied zwischen den Behandlungsfolgen deutlich über den Effekt der Wechselwirkung zwischen Tier und Folge hinausgehen, der Unterschied zwischen den Fluxperioden (Zeit) über den Effekt der Wechselwirkung zwischen Tier und Zeit und der Effekt der Wechselwirkung zwischen Behandlungsfolge und Fluxperiode über den Effekt einer Dreifachwechselwirkung zwischen den drei Faktoren, der in diesem Fall die Reststreuung charakterisiert.

Chloridreduktion 2

Dieser Versuch fand an Epithelien von 4 Tieren statt, an denen 2 verschiedene Behandlungsfolgen durchgeführt wurden. Da für die eine Behandlungsfolge (Kontrolle) je Tier nur ein Epithel verwendet werden konnte, während für die andere Folge (Chloridreduktion) jeweils zwei zur Verfügung standen, wurden die beiden Behandlungsfolgen getrennt varianzanalytisch ausgewertet.

Bei der ersten Behandlungsfolge (Kontrolle) lässt sich die Wirkung des Faktors Tier mit zufälligen Effekten und des Faktors Zeit (Fluxperioden) mit systematischen Effekten charakterisieren.

Das unterstellte Varianzanalysemodell hat die Form:

Messwert = Tier + Zeit + Tier · Zeit

Dabei kennzeichnet:

- Tier** den zufälligen Effekt des Faktors Tier.
- Zeit** den systematischen Effekt des Faktors Zeit, d.h. Unterschiede zwischen den Fluxperioden.
- Tier · Zeit** den zufälligen Effekt einer Wechselwirkung zwischen Tier und Zeit; eine Wechselwirkung hieße, dass sich die Verläufe über die Fluxperioden bei den Tieren unterscheiden.

Da unter Kontrollbedingungen nur jeweils ein Epithel je Tier untersucht wurde, stellt der Effekt der Wechselwirkung zwischen Tier und Zeit bereits die Reststreuung dar, anhand der die Effekte der beiden Faktoren bewertet werden.

Bei der zweiten Behandlungsfolge (Chloridreduktion) kommt mit der Wiederholung des Versuches an zwei Epithelien innerhalb eines Tieres neben den Faktoren Tier und Zeit noch ein zweiter Faktor mit zufälligen Effekten ins Spiel.

Das in diesem Fall verwendete Varianzanalysemodell hat die Form:

$$\text{Messwert} = \text{Tier} + \text{Zeit} + \text{Tier} \cdot \text{Zeit} + \text{Epithel(Tier)} + \text{Zeit} \cdot \text{Epithel(Tier)}$$

Dabei kennzeichnet:

- Tier** den zufälligen Effekt des Faktors Tier.
- Zeit** den systematischen Effekt des Faktors Zeit, der in diesem Fall auch den Effekt der Behandlung, d.h. der Chloridreduktion, beinhaltet.
- Tier · Zeit** den zufälligen Effekt einer Wechselwirkung zwischen Tier und Zeit; eine Wechselwirkung hieße, dass sich der Verlauf über die Fluxperioden bzw. der Effekt der Chloridreduktion bei den Tieren unterscheidet.
- Epithel(Tier)** den zufälligen Effekt des Faktors Epithel innerhalb der Tiere.
- Zeit · Epithel(Tier)** den zufälligen Effekt einer Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Epithel innerhalb der Tiere.

Die Wechselwirkung zwischen den Faktoren Zeit und Epithel wird hier als Reststreuung behandelt, an der der Effekt der Wechselwirkung zwischen den Faktoren Tier und Zeit zu messen ist. Der Faktor Zeit (Chloridreduktion) wird wieder

im Vergleich zum Effekt der Wechselwirkung zwischen den Faktoren Tier und Zeit bewertet.

Hemmstoffe: DIDS

Dieser Versuch wurde mit jeweils 2 Epithelien von 4 Tieren durchgeführt, wobei jeweils ein Epithel über alle 3 Fluxperioden den Kontrollbedingungen ausgesetzt war und das andere nach der ersten Fluxperiode mit DIDS serosal behandelt wurde.

Hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Messergebnisse lassen sich daher ebenfalls die Faktoren Behandlungsfolge (Kontrolle und DIDS serosal) und Zeit (über drei Fluxperioden) mit systematischen Effekten bewerten sowie der Faktor Tier mit zufälligen Effekten. Das Varianzanalysemodell entspricht damit dem unter „Chloridreduktion 1“ schon beschriebenen Modell.

Hemmstoffe: Bumetanid

Dieser Versuch fand an Epithelien von 4 Tieren statt, an denen 2 verschiedene Behandlungsfolgen durchgeführt wurden. Da für eine Behandlungsfolge (Bumetanid serosal) je Tier nur ein Epithel verwendet werden konnte, während für die andere Folge (Chloridreduktion und anschließend Bumetanid serosal) jeweils zwei zur Verfügung standen, wurden die beiden Behandlungsfolgen getrennt varianzanalytisch ausgewertet.

Der Versuchsaufbau entspricht damit dem schon unter „Chloridreduktion 2“ beschriebenen Schema. Bei der einen Behandlungsfolge lassen sich die Faktoren Tier und Zeit (bzw. Effekt der Behandlung) bewerten, bei der anderen Folge kommt noch der Faktor Epithel mit zufälligen Effekten ins Spiel. Daher wurden hier wieder die schon unter „Chloridreduktion 2“ beschriebenen Varianzanalysemodelle verwendet.

Mannit

Dieser Versuch fand an Epithelien von 3 Tieren statt, an denen eine bestimmte Behandlungsfolge über die Zeit (Fluxperioden) durchgeführt wurde. Je Tier standen für diese Behandlung jeweils 3 Epithelien zur Verfügung.

Der Versuchsaufbau entspricht damit dem schon unter „Chloridreduktion 2“ beschriebenen Schema für den Fall, dass mehrere Epithelien je Tier im Versuch sind. Es lassen sich die Faktoren Tier und Zeit (bzw. Behandlung) bewerten, zu denen noch der Faktor Epithel mit zufälligen Effekten ins Spiel kommt. Daher wurde hier das schon unter „Chloridreduktion 2“ als zweites beschriebene Varianzanalysemodell verwendet.

Die Auswertungen dienen in erster Linie der Beschreibung des vorliegenden Datenmaterials. Die Verallgemeinerbarkeit dieser Ergebnisse sind aufgrund der willkürlichen Auswahl des Tiermaterials eingeschränkt. In diesem beschreibenden Sinne sind Signifikanzaussagen zu interpretieren.