

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Herkunft der Gewebeproben

Die verwendeten Pansenepithelien stammten von institutseigenen Schafen (teilweise eigens für diese Versuche gekaufte Tiere unterschiedlicher Herkunft).

Die Tiere wurden entweder im Institut für Tierzucht und Zuchthygiene der TU Berlin geschlachtet oder im Institut für Veterinäranatomie der FU Berlin getötet.

Aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der Schafe variierten Rasse, Alter, Geschlecht, Fütterung und Haltung. Die Versuchstiere wurden in Abhängigkeit von der Fütterung in zwei Gruppen eingeteilt:

1. Heu ad libitum
2. Heu ad libitum + geringe Mengen Kraftfutter (200 - 400 g/Tag).

Genauere Angaben hinsichtlich der Fütterung (Art des Kraftfutters, Futtermengen) können nicht gemacht werden.

3.2 Präparation der Schleimhäute

Unmittelbar nach Bolzenschuß-Betäubung und Tötung durch Entbluten wurde die Leibeshöhle der Schafe eröffnet und der Vormagentrakt entnommen. Aus dem zottenarmen ventralen Teil des ventralen Pansensackes wurde ein etwa 150 cm² großes Stück herausgeschnitten. Dieses Gewebestück wurde in zwei bis drei Litern des Transportpuffers (siehe Kapitel Nr. 9.1.1) gewaschen und somit von den Ingestaresten befreit. Anschließend wurde die Schleimhaut von Hand von den Muskelschichten abgezogen (stripping) und in etwa zwei Liter frischen, auf 38 °C und pH 7,4 eingestellten, mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begasten Transportpuffer verbracht. Der Transport zum Labor erfolgte in einem Thermosgefäß (DEWAR). Im Labor wurde das Pansenepithel erneut in einer entsprechenden, frischen, temperierten und begasten Pufferlösung inkubiert, dann in für die Ussing-Kammern passende Stücke geschnitten und in diese eingespannt.

Von der Tötung der Tiere bis zum Einbau der Epithelstücke in die Ussing-Kammern vergingen in der Regel 30 bis 60 Minuten.

Der Begriff Epithel wird - wie in der transportphysiologischen Literatur üblich - an Stelle von Mukosa oder Schleimhaut verwendet, um keine Verwechslungen mit anderen Definitionen (mukosal, serosal) entstehen zu lassen.

3.3 Inkubationstechnik

Die Versuchstechnik geht auf eine von USSING und ZERAHN (1951) für die Froschhaut entwickelte und später von STEVENS (1964) und FERREIRA et al. (1966a) für den Pansen modifizierte Methode zurück. Den zentralen Bestandteil dieser Versuchsanordnung stellt eine Kammer aus Plexiglas dar.

Zwischen die beiden Hälften einer sogenannten Ussing-Kammer wurde ein Epithelstück senkrecht eingespannt, so daß die mukosale (= luminale = apikale) Fläche zur einen und die serosale (= Blutseite = basolaterale) Seite zur anderen Kammerhälfte hin ausgerichtet war. Um Quetschungen der Geweberänder (edge damage) und somit eine Beeinflussung der Meßergebnisse zu vermeiden, wurden auf beiden Seiten des Epithels Silikonringe untergelegt. In dieser Ussing-Kammer wurden so 3,14 cm² des Epithels beidseitig von Pufferlösung umspült.

Über den Kammerhälften befand sich je eine doppelwandige Glassäule, die über flexible Schläuche mit der Kammer verbunden war. Die beiden Glassäulen bildeten zusammen die zwei Schenkel eines Gasliftsystems (Fa. Landgraf, Hannover) und ermöglichten einen einseitigen Pufferwechsel, die Zugabe der radioaktiv markierten Isotope sowie die Entnahme der Proben. In jeder Hälfte des Inkubationssystems, bestehend aus Kammerhälfte und Glassäule, befanden sich 18 ml Pufferlösung. Zwischen den Wänden der Säulen zirkulierte mit Hilfe eines Pumphermostaten (Haake D1) beheiztes Wasser, so daß die Temperatur der Inkubationslösung ständig auf 38 °C gehalten wurde. Durch eine Begasung mit Sauerstoff oder Carbogen wurde die Pufferlösung in Bewegung versetzt und gleichzeitig die Sauerstoffversorgung des Epithels gewährleistet.

Der Aufbau der Inkubationstechnik ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt.

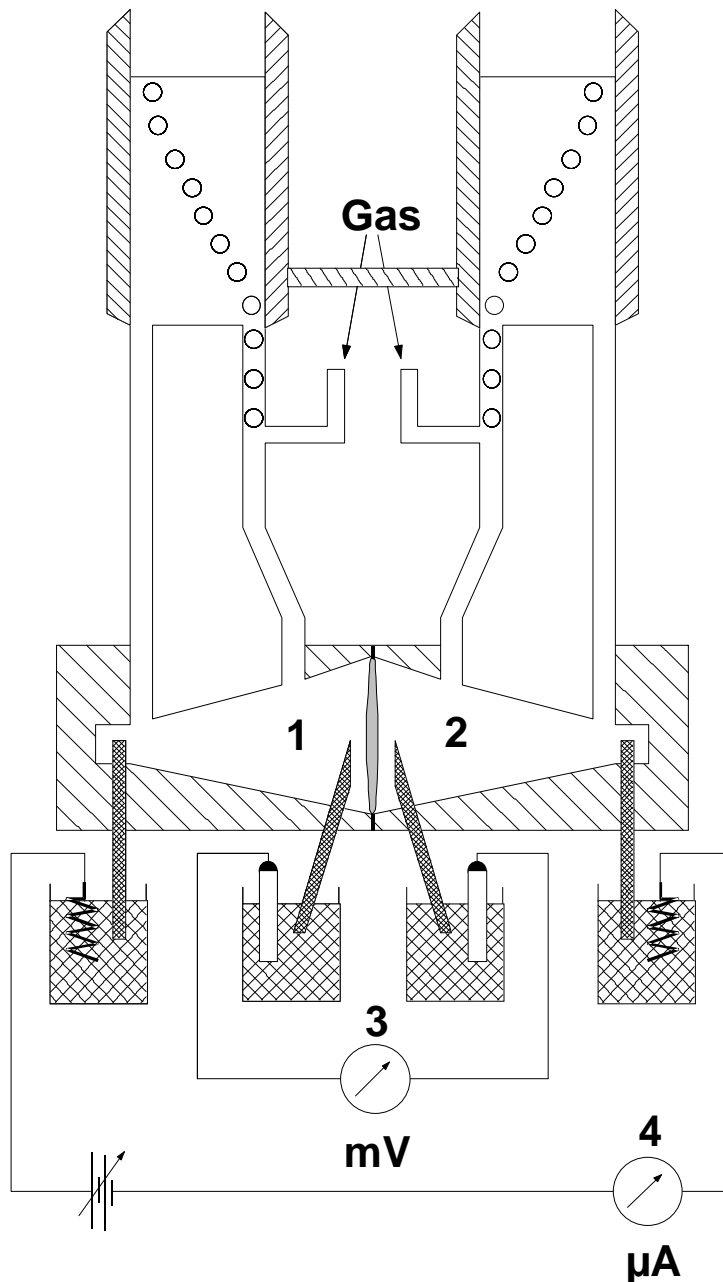


Abbildung 3.1: Ussing-Kammer mit angeschlossener Gasliftapparatur.
1: mukosale Seite des Epithels bzw. der Ussing-Kammer
2: serosale Seite des Epithels bzw. der Ussing-Kammer
3: Messung der transepithelialen Potentialdifferenz mittels Agar-KCl-Elektroden und Ag-AgCl-Elektroden
4: Einspeisung eines definierten Stromes über Agar-KCl-Elektroden und Ag-AgCl-Elektroden.

3.4 Elektrophysiologisches Meßprinzip

In jeder Ussing-Kammer befanden sich je zwei gewebe-nahe (Abstand zum Gewebe < 3 mm) und zwei gewebe-ferne (Abstand zum Gewebe > 20 mm) KCl-Agarbrücken. Diese Agarbrücken hatten über eine 3 molare KCl-Lösung (3 mol/l) Kontakt zu jeweils einer Ag-AgCl-Elektrode, die mit der mikrocomputergesteuerten Strom- und Spannungsklemmapparatur (AC Microclamp; Fa. f + p Datensysteme, Aachen) verbunden waren. Über diese Apparatur und einen angeschlossenen Matrixdrucker erfolgte die kontinuierliche Erfassung und Aufzeichnung der elektrophysiologischen Parameter:

- transepitheliale Potentialdifferenz, PD_t [mV],
- Gewebeleitfähigkeit, G_t [$mS \cdot cm^{-2}$], reziproker Wert des Gewebewiderstandes, und
- Kurzschlußstrom, I_{sc} [$\mu eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$].

Das gewebe-nahe Agarbrückenpaar mit den dazugehörigen Ag-AgCl-Elektroden diente zum Messen der transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t). Über die gewebe-fernen KCl-Agarbrücken und die entsprechenden Ag-AgCl-Elektroden wurde externer Strom eingespeist.

Die mikroelektronische Meß- und Klemmapparatur wird in der Dissertation von SCHEFFLER (1984) ausführlich beschrieben. Diese Spannungsklemmeinrichtung bietet drei verschiedene Methoden zur Beeinflussung bzw. Erfassung der elektrophysiologischen Parameter:

- open-circuit,
- short-circuit und
- voltage-clamp.

3.4.1 open-circuit

Unter diesen „offenen Bedingungen“ wird die transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) direkt gemessen und nicht beeinflusst.

Um die Gewebeleitfähigkeit (G_t) und den Strom (I_{sc}) zu errechnen, wurden definierte Strompulse (ΔI) mittels der gewebe-fernen Agarbrücken über das Epithel geschickt. Die Pulshöhe betrug 100 μA , die Pulsdauer 500 ms. Die Pulse wurden unidirektional in Richtung des Klemmstromes appliziert. Aus den daraus resultierenden kurzzeitigen Änderungen der

Potentialdifferenz (ΔPD_t) wird nach dem Ohmschen Gesetz der Widerstand (R_t) des Epithels berechnet:

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

Die Gewebeleitfähigkeit entspricht dem reziproken Wert des Gewebewiderstandes:

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

Der Kurzschlußstrom (I_{sc}) wird ebenfalls nach dem Ohmschen Gesetz aus der vor dem Strompuls gemessenen PD_t und der errechneten Gewebeleitfähigkeit ermittelt:

$$I_{sc} = PD_t \cdot G_t$$

open-circuit-Bedingungen lagen immer zu Beginn der Versuche, direkt nach dem Einbau der Gewebe in die Ussing-Kammern, für etwa 20 Minuten vor. In dieser Äquilibrationszeit konnten sich die Epithelien ohne weitere Beeinflussung von den erfolgten Manipulationen (Präparation, Transport, Einspannen in die Ussing-Kammern) erholen. Nach Einstellung eines steady-state-Zustandes (Aufrechterhaltung der PD_t über der Membran, Konstanz der G_t und des I_{sc}) wurde das Gewebe „kurzgeschlossen“.

3.4.2 short-circuit (Kurzschluß)

Diese Methode stellt eine Sonderform der unten beschriebenen Spannungsklemme dar.

Die durch elektrogene Ionenbewegung aufgebaute transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) wird durch externe Stromeinspeisung, den sog. Kurzschlußstrom (I_{sc}), auf 0 mV abgeglichen („geklemmt“). Durch die Kompensierung der Potentialdifferenz ($PD_t = 0$ mV) wird der elektrische Gradient über dem Epithel ausgeschaltet.

Wird unter short-circuit-Bedingungen auf beiden Seiten des Epithels eine identische Pufferlösung eingesetzt, so wird zusätzlich zu dem ausgeschalteten elektrischen Gradienten auch der chemische Gradient beseitigt. Ergibt sich bei fehlendem elektrochemischen Gradienten (als passiv treibende Kraft der Ionenbewegung) ein Nettotransport eines Ions, so muß dieser Transport aktiv (primär oder sekundär) und transzellulär erfolgt sein.

Die Gewebeleitfähigkeit (G_t) wird wie unter open-circuit-Bedingungen mit Hilfe kurzzeitiger Strompulse ermittelt.

3.4.3 voltage-clamp (Spannungsklemme)

Bei diesem Verfahren wird die transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) durch extern eingespeisten Strom auf bestimmte Werte eingestellt, um dadurch die elektrophysiologischen Voraussetzungen für den Ionentransport zu verändern. In den eigenen Versuchen wurde das Epithel jeweils für eine dreiviertel Stunde auf eine PD_t von - 40 mV, 0 mV oder + 40 mV geklemmt. Die angegebenen Potentialdifferenzen beziehen sich auf die serosale Gewebeseite (Blutseite). Der benötigte Strom entspricht bei $PD_t \neq 0$ mV nicht dem Kurzschlußstrom, da hier ein elektrischer Gradient über dem Gewebe besteht und Ionenbewegungen so auch passiv erfolgen können.

Auch unter voltage-clamp-Bedingungen werden die G_t und der I_{sc} durch Strompulse vom Mikrocomputer aus der resultierenden Potentialänderung errechnet.

3.5 Pufferlösungen

Die Pufferlösungen wurden i.d.R. ein bis zwei Tage vor den Versuchen mit Chemikalien der Fa. Sigma bzw. der Fa. Merck und destilliertem Wasser angesetzt. Der pH-Wert wurde mit Tris-Puffer (Trizma-Base) auf 7,4 eingestellt. Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte gleich nach der Herstellung der Pufferlösungen sowie während des Versuchs mit einem pH-Meter der Fa. Knick. Die Osmolarität wurde mit einem Osmometer (Fa. Roebing, Berlin) nach dem Prinzip der Gefrierpunktniedrigung geprüft. Zur Vermeidung von Bakterien- und Pilzwachstum wurden die Inkubationslösungen bis zum Versuch bei + 4 °C aufbewahrt, zur längerfristigen Lagerung wurden sie bei - 15 °C tiefgefroren.

Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen und deren Osmolarität sind dem Anhang (Kapitel Nr. 9) zu entnehmen. Die Begasung erfolgte ausschließlich mit Sauerstoff, nur die Pufferlösungen für die „Amiloridversuche“ (Kapitel Nr. 4.1.2.2.2) und der Transportpuffer wurden mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Der pH-Wert betrug durchweg $7,4 \pm 0,1$.

3.6 Elektrodeneigenpotential/Flüssigkeitswiderstand

Die unter Versuchsbedingungen an den Elektroden auftretenden Diffusionspotentiale (Elektrodeneigenpotentiale) müssen bei der Messung der transepithelialen Potentialdifferenz berücksichtigt werden (transepitheliale Potentialdifferenz = gemessene Gesamtpotentialdifferenz - Elektrodeneigenpotential).

Da die Elektroden außerdem die transepitheliale Potentialdifferenz nicht direkt am Gewebe abgreifen und sich zwischen Elektroden bzw. KCl-Agarbrücken und Epithel immer Pufferlösung befindet, muß zur korrekten Berechnung der Gewebeleitfähigkeit (G_T) der Flüssigkeitswiderstand der eingesetzten Pufferlösung bestimmt werden (Gewebewiderstand = gemessener Gesamtwiderstand - Flüssigkeitswiderstand).

Aus diesem Grund wurden vor dem Einspannen der Epithelien in die Ussing-Kammern in den mit Pufferlösung (auf 38 °C erwärmt und mit Sauerstoff begast) gefüllten Kammern das Eigenpotential der Elektroden und der Flüssigkeitswiderstand des Puffers durch die mikrocomputergesteuerte Meß- und Klemmapparatur gemessen und für die automatische Korrektur der im Versuch erhaltenen Meßwerte gespeichert.

3.7 Versuchsablauf

Nach dem Einspannen in die Ussing-Kammern hatten die Epithelien ca. 20 Minuten Zeit, sich unter open-circuit-Bedingungen im Kontrollpuffer zu äquilibrieren. In dieser Zeit veränderten sich die elektrophysiologischen Parameter der Epithelien noch relativ stark; die Leitfähigkeit fiel, die Potentialdifferenz und der Kurzschlußstrom stiegen an.

Für den weiteren Versuch wurden nur Epithelien verwendet, die in dieser Erholungsphase eine Gewebeleitfähigkeit (G_T) von $< 4 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ und einen Kurzschlußstrom (I_{sc}) von $< 1,2 \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ aufwiesen. Als Kriterium für das Überleben des Gewebes galt die Aufrechterhaltung der Potentialdifferenz über der Membran und die Konstanz der G_T . Ggf. wurde ein Epithelstück durch ein neues ersetzt.

Nach Einstellung von steady-state-Bedingungen wurden die Gewebe „kurzgeschlossen“ und die Einstellung der elektrophysiologischen Parameter abgewartet. Anschließend wurde die Einteilung in Kontrollgruppe und Versuchsgruppen (Inkubation in Pufferlösungen

unterschiedlicher Osmolarität) sowie die „Paarung“ der Kammern (Erklärung siehe Kapitel Nr. 3.8) vorgenommen.

Bei den Versuchsgruppen wurde auf der mukosalen Epithelseite der Kontrollpuffer (Osmolarität 300 mosmol/l) gegen Inkubationslösungen mit erhöhter Osmolarität (350 oder 450 mosmol/l) ausgetauscht. Serosal wurde sowohl bei der Kontroll- als auch bei den Versuchsgruppen der Kontrollpuffer (300 mosmol/l) eingesetzt.

3.8 Ionenfluxe

Für die Fluxmessungen wurden die radioaktiv markierten Isotope $^{51}\text{Cr-EDTA}$, $^{22}\text{Na}^+$ und $^{36}\text{Cl}^-$ (Fa. Amersham Buchler, Braunschweig) verwendet.

Da an einer Gewebeprobe der Ionenfluß nur in einer Richtung bestimmt werden konnte, wurde an einem anderen Gewebestück mit ähnlichen elektrophysiologischen Eigenschaften der Ionenfluß in die andere Richtung bestimmt. Die Kammern wurden zur Bestimmung der unidirektionalen Transportraten von Chrom, Natrium oder Chlorid so „gepaart“, daß sich die „gepaarten“ Epithelien in G_t und I_{sc} nicht mehr als 25 % unterschieden. Mit dem „Paaren“ wurde festgelegt, an welchem Epithel der Ionenflux von mukosal nach serosal (J_{ms}) bzw. von serosal nach mukosal (J_{sm}) bestimmt werden sollte. Die Differenz der Fluxe beider Richtungen ergab dann den Nettotransport eines Ions (J_{net}).

Die Zugabe der radioaktiv markierten Isotope [$240\ \mu\text{l}\ ^{51}\text{Cr-EDTA} = 24\ \mu\text{Ci}$ (880,8 kBq), $15\ \mu\text{l}\ ^{22}\text{Na}^+ = 0,75\ \mu\text{Ci}$ (27,53 kBq) bzw. $14\ \mu\text{l}\ ^{36}\text{Cl}^- = 0,5\ \mu\text{Ci}$ (18,19 kBq)] erfolgte somit innerhalb eines Kammerpaares einmal auf der mukosalen (m) und einmal auf der serosalen (s) Seite, wodurch diese dann als „heiße“ Seite bezeichnet wurde.

Zur genauen Bestimmung der Radioaktivität wurde von der „heißen Seite“ einige Minuten nach der Aktivitätszugabe sowie am Ende des Versuches je eine „heiße“ Probe (je $100\ \mu\text{l}$) entnommen und mit deren Mittelwert die spezifische Aktivität ($A_{k_{spez}}$, siehe Kapitel Nr. 3.9.1) berechnet.

Zur Berechnung der Ionentransportraten über das Pansenepithel wurden 30 Minuten nach der Zugabe der radioaktiven Isotope in den Chromversuchen in jeweils 45 minütigem Abstand, in den Natrium- und Chloridversuchen dagegen in jeweils 30 minütigem Abstand Proben von der unmarkierten, „kalten“ Seite gezogen (für die Chrom- sowie für die Natriumfluxe = 2 ml, für die

Chloridfluxe = 0,75 ml). Nach jeder Probenentnahme wurde das entzogene Probenvolumen durch die Zugabe der entsprechenden Pufferlösung wieder ausgeglichen.

In den Versuchen zur Bestimmung der Chromtransportraten wurden nach zwei Fluxperioden, in den Versuchen zur Bestimmung der Natriumtransportraten dagegen nach drei Fluxperioden, bei den Versuchsgruppen auf der mukosalen Seite die Pufferlösungen mit den erhöhten Osmolaritäten (350 oder 450 mosmol/l) wieder gegen den Kontrollpuffer (300 mosmol/l) ausgetauscht. Falls die mukosale Seite zuvor radioaktiv markiert war, wurde erneut Aktivität zugeführt und nach mehreren Minuten von dieser Seite eine neue „heiße“ Probe zur Berechnung der spezifischen Aktivität entnommen. Anschließend wurden wieder in regelmäßigen Abständen die „kalten“ Proben gezogen.

Die bei den behandelten Geweben ermittelten Fluxraten wurden jeweils vor und nach dem Pufferwechsel gemittelt, entsprechend wurde mit der Kontrollgruppe verfahren.

In den Versuchen, in denen der Einfluß der transepithelialen Potentialdifferenz auf die Ionentransportraten untersucht werden sollte (Kapitel Nr. 4.1.2.2.4 und Nr. 4.1.2.3.2), wurde dem Epithel nach dem „Klemmen“ auf eine bestimmte PD_t (mit Hilfe der mikroelektronischen Strom- und Spannungsklemme) eine Adaptationszeit von 15 Minuten gewährt, bevor die zwei „kalten“ Proben in halbstündigem Abstand entnommen wurden. Für jedes Kammerpaar wurden dabei drei verschiedene Klemmpotentiale (+ 40 mV, 0 mV, - 40 mV) in zufälliger Reihenfolge vorgegeben. So wurde pro Gewebepaar je eine Fluxperiode bei + 40 mV, 0 mV und bei - 40 mV durchgeführt.

Am Ende eines Versuches wurden die „heißen“ Chrom- bzw. Natriumproben mit Pufferlösung auf 2 ml und alle Chloridproben mit Szintillator (Aquasafe 300 Plus, Fa. Zinsser Analytic, Frankfurt a. M.) auf 5 ml aufgefüllt. Die Radioaktivitäten der Chrom- und Natriumproben wurden in einem Gammazähler (Fa. Berthold, Fa. LKB), die der Chloridproben in einem Betazähler (Liquid Scintillation Counter (LSC) Wallac 1409/11, Fa. Wallac, Finnland) gemessen.

3.9 Berechnungen

3.9.1 Berechnung der Transportraten

Die unidirektionalen Ionenfluxe (J) werden anhand der auf der unmarkierten, „kalten“ Seite erscheinenden Radioaktivität nach folgender Formel berechnet:

$$J = \frac{\text{cpm}_2 \cdot \frac{V_s}{V_p} - \text{cpm}_1 \cdot \frac{V_s - V_p}{V_p}}{A_{\text{spez}} \cdot A \cdot t} \quad [\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}]$$

cpm₁: Radioaktivität der zu Beginn einer Fluxperiode gezogenen „kalten“ Probe
[counts per minute]

cpm₂: Radioaktivität der am Ende der entsprechenden Fluxperiode gezogenen „kalten“
Probe [counts per minute]

V_s: Puffervolumen im Gasliftsystem (18 ml) [ml]

V_p: Volumen der „kalten“ Probe (für ⁵¹Cr und ²²Na⁺ = 2 ml, für ³⁶Cl⁻ = 0,75 ml) [ml]

A_{spez}: spezifische Aktivität [cpm · μeq]

A: Austauschfläche (3,14 cm²) [cm²]

t: Zeitintervall zwischen zwei „kalten“ Proben bzw. Dauer einer Fluxperiode
(für ⁵¹Cr = 0,75 h, für ²²Na⁺ und ³⁶Cl⁻ = 0,5 h) [h]

Die spezifische Aktivität (A_{spez}) ergibt sich aus folgender Formel:

$$A_{\text{spez}} = \frac{\text{cpm}_H}{V_H \cdot c}$$

cpm_H: Radioaktivität der „heißen“ Probe (Mittelwert aus zwei „heißen“ Proben)
[counts per minute]

V_H: Volumen der „heißen“ Probe (100 μl = 0,1 ml) [ml]

c: Konzentration des zu untersuchenden nicht radioaktiv markierten Isotops in der
Pufferlösung [μmol/ml]

Der Nettoflux (Nettotransport von Chrom, Natrium bzw. Chlorid über das Pansenepithel, J_{net}) ergibt sich aus der Differenz der unidirektionalen Fluxe:

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

J_{ms} : Ionenflux von mukosal nach serosal

J_{sm} : Ionenflux von serosal nach mukosal

J_{net} : Nettoionenflux

Besitzt der Nettoflux (J_{net}) ein positives Vorzeichen, so liegt eine Nettoresorption von Chrom, Natrium bzw. Chlorid vor, bei negativem Vorzeichen handelt es sich um eine Nettosekretion dieser Ionen.

3.9.2 Berechnung der potentialabhängigen und der potentialunabhängigen Komponente der unidirektionalen Fluxe

Zur Bestimmung der PD_t -abhängigen und PD_t -unabhängigen Komponente eines unidirektionalen Ionenfluxes wird die Formel nach FRIZZEL und SCHULTZ (1972), modifiziert von JACKSON und NORRIS (1985), verwendet:

$$J = J_d \cdot \xi + J_m \quad [\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}]$$

J : Gesamtflux eines Ions in die untersuchte Richtung

$J_d \cdot \xi$: PD_t -abhängiger Fluxanteil (= diffusibler Anteil)

J_m : PD_t -unabhängiger Fluxanteil (= elektroneutrale Komponente)

ξ ist die elektrische Triebkraft und definiert als

$$\xi = \frac{z \cdot F \cdot PD_t}{R \cdot T \cdot \left(\exp\left(\frac{z \cdot F \cdot PD_t}{R \cdot T}\right) - 1 \right)}$$

z: Wertigkeit des Ions

F: Faraday-Konstante (96478 C · mol⁻¹)

PD_t: transepitheliale Potentialdifferenz in Richtung des betrachteten Ionenflusses [mV]

R: allgemeine Gaskonstante (8,3143 J · mol⁻¹ · K⁻¹)

T: Versuchstemperatur (38 °C = 311 K) [K]

Die nach dieser Formel errechneten Werte für ²²Na⁺ und ³⁶Cl⁻ können der nachfolgenden Tabelle 3.1 entnommen werden.

Tabelle 3.1: Anwendung der Formel nach FRIZZEL und SCHULTZ (1972), modifiziert nach JACKSON und NORRIS (1985), auf ²²Na⁺ und ³⁶Cl⁻

	PD _t	für J _{ms}	für J _{sm}
²² Na ⁺	+ 40 mV	ζ = 0,43	ζ = 1,93
	0 mV	ζ = 1,00	ζ = 1,00
	- 40 mV	ζ = 1,93	ζ = 0,43
³⁶ Cl ⁻	+ 40 mV	ζ = 1,93	ζ = 0,43
	0 mV	ζ = 1,00	ζ = 1,00
	- 40 mV	ζ = 0,43	ζ = 1,93

3.10 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms „SigmaStat for Windows, Version 1.0“ (Jandel Corporation). Die grafischen Darstellungen wurden mit dem Computerprogramm „SigmaPlot for Windows, Version 2.01“ (Jandel Corporation) erstellt.

Bei der Anwendung der statistischen Tests wurde eine Normalverteilung der Grundgesamtheit vorausgesetzt, wenn die Stichproben eine etwa symmetrische Verteilung aufwiesen.

Normalverteilte Daten werden mit ihrem arithmetischen Mittelwert (\bar{x}) und dem Standardfehler (standard error of the mean = SEM) angegeben.

Da für jede Versuchsreihe mehrere Tiere benötigt wurden und in jedem Versuch von einem Tier mehrere Epithelstücke in verschiedenen Ussing-Kammern untersucht wurden, wird die Anzahl der verwendeten Schafe mit N, die Zahl der Gewebestücke pro Behandlungsgruppe mit n gekennzeichnet. In den Versuchen zur Bestimmung der Ionentransportraten (Kapitel Nr. 4.1.2 und Nr. 4.2.2) bezieht sich die Zahlenangabe n in den Tabellen immer auf ein Epithelpaar (J_{ms}/J_{sm}), bei den grafischen Darstellungen der unidirektionalen Fluxraten (J_{ms} bzw. J_{sm}) dagegen auf die einzelnen Epithelien.

In jedem Versuch wurden die Epithelien eines Tieres sowohl in die verschiedenen Behandlungsgruppen als auch in eine Kontrollgruppe aufgeteilt, um Unterschiede zwischen den verschiedenen Tieren auszuschalten. Um eventuell noch bestehende Unterschiede zwischen den Schafen bzw. zwischen den Epithelstücken nicht zu vernachlässigen, wurden außerdem alle Berechnungen mit den Einzelwerten eines Gewebestückes bzw. eines Gewebepaares durchgeführt.

In den Versuchen zur Bestimmung der Ionentransportraten wurden pro Epithel jeweils die Fluxraten während und nach einer Behandlung gemittelt. Anschließend erfolgte eine Zusammenfassung der Werte aller Epithelien mit der gleichen Behandlung und die Bestimmung der Mittelwerte.

Der Effekt einer Behandlung (z.B. einer Änderung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung) wurde mit dem gepaarten t-Test für jedes Gewebestück bzw. Gewebepaar einzeln geprüft. Um Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe zu ermitteln, wurde die einfache Varianzanalyse mit Anschlußtest nach Student-Newman-Keuls angewendet. Die Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen nur zwei unabhängigen Stichproben erfolgte mittels des t-Testes nach Student. Beim Vergleich der beiden Fütterungsgruppen „Heu“ und „Kraftfutter + Heu“ wurden variierende Ausgangswerte vor einer Behandlung ausgeglichen, indem die Differenz der Werte vor und während der Behandlung bzw. während und nach der Behandlung untersucht wurden. Somit wurde zwischen den beiden Fütterungsgruppen nur die durch die Behandlung ausgelöste Veränderung der Daten verglichen.

Bei den durchgeführten Regressionen werden neben den Regressionsgleichungen das Bestimmtheitsmaß (r^2 , Quadrat des Korrelationskoeffizienten), der standard error of the

estimate (SEE) und der p-Wert angegeben. Die Regressionen wurden auf der Basis der Einzelwerte durchgeführt, auch wenn die grafische Darstellung teilweise auf den Mittelwerten \pm SEM beruht. In den Versuchen der Kapitel Nr. 4.1.2.2.4 und Nr. 4.1.2.3.2 wurde jedes Epithelpaar in zufälliger Reihenfolge auf die drei verschiedenen Klemmpotentiale geklemmt und für jedes Epithel eine Regression durchgeführt. Anschließend wurden alle Epithelien einer Versuchsgruppe (300 bzw. 450 mosmol/l) zusammengefaßt und eine Regression auf der Basis der Einzelregressionen durchgeführt. Der statistische Vergleich der Interzepte bzw. der Steigungen zweier Geraden erfolgte mit dem t-Test nach Student, ebenfalls auf der Basis der Einzelwerte.

Das Signifikanzniveau wurde einheitlich mit $\alpha = 5\%$ festgelegt, daß heißt, die Wahrscheinlichkeit, einen Unterschied zwischen zwei Gruppen anzunehmen, obwohl kein Unterschied besteht (Fehler 1. Art) darf maximal 5% betragen ($p < 0,05$). Beim Vergleich mehrerer Versuchsgruppen mit einer Kontrollgruppe durch Anwendung des Student-Newman-Keuls-Testes wurde eine Korrektur durchgeführt, um das globale Signifikanzniveau von 5% einzuhalten (Signifikanzniveau des einzelnen Tests = globales Signifikanzniveau : Anzahl der untersuchten Versuchsgruppen).