

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Herkunft der Gewebeproben

Die verwendeten Jejunumepithelien stammten von Tieren aus dem Sauenbestand des Instituts für Tierernährung. Als Tiere wurden Schweine (Deutsche Landrasse x Duroc oder Deutsche Landrasse/Duroc x Deutsche Landrasse/Hampshire) verwendet, wie sie auch in der Praxis als Mastschwein eingesetzt werden.

Die Sauen wurden per Zufall einer Kontroll- und einer Versuchsgruppe zugeordnet. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine auf Weizen und Soja basierende Standarddiät (Zusammensetzung siehe „ANHANG“), die Sauen der Versuchsgruppe erhielten ab dem 91. Tag *ante partum* bis zum Ende der Laktation zusätzlich *Enterococcus faecium* NCIMB10415 in einer Konzentration von 4×10^8 KBE/kg Futter. Die Tiere wurden *ad libitum* gefüttert. Genauere Angaben der täglichen Aufnahme des Probiotikums können für das Einzeltier aufgrund der Haltungsform nicht gemacht werden.

In die Untersuchung wurden je Variante 6 Sauen mit den daraus resultierenden Ferkeln einbezogen. Die Saugferkel erhielten ab dem 14. Lebenstag Ergänzungsfutter (die Ferkel der Probiotikumgruppe dementsprechend mit Probiotikum) und wurden am 28. Tag abgesetzt.

Es wurden jeweils 10 Ferkel pro Altersstufe untersucht: 5 Ferkel mit Probiotikumzusatz zum Futter und 5 Kontrolltiere ohne Probiotikumzugabe (siehe Tabelle 2).

Die Tötungen erfolgten am 14., 28., 35. und am 56. Tag.

Tabelle 2: Einteilung der Altersgruppen

Alter (Tage)	Kontrolle (Anzahl)	Probiotika (Anzahl)
14	5	5
28	5	5
35	5	5
56	5	5
Gesamt:	20	20

Nach dem Betäuben wurde die Bauchhöhle eröffnet und der Darm vorgelagert. Danach wurden die Tiere euthanasiert (Eutha77[®], Essex Tierarznei, Pentobarbital-Natrium). Der gesamte Darm wurde entnommen und ein 100 cm langes Darmstück aus der Mitte des Jejunums herausgeschnitten. Die Muskelschicht wurde vor Ort per Hand von der Schleimhaut abgetrennt.

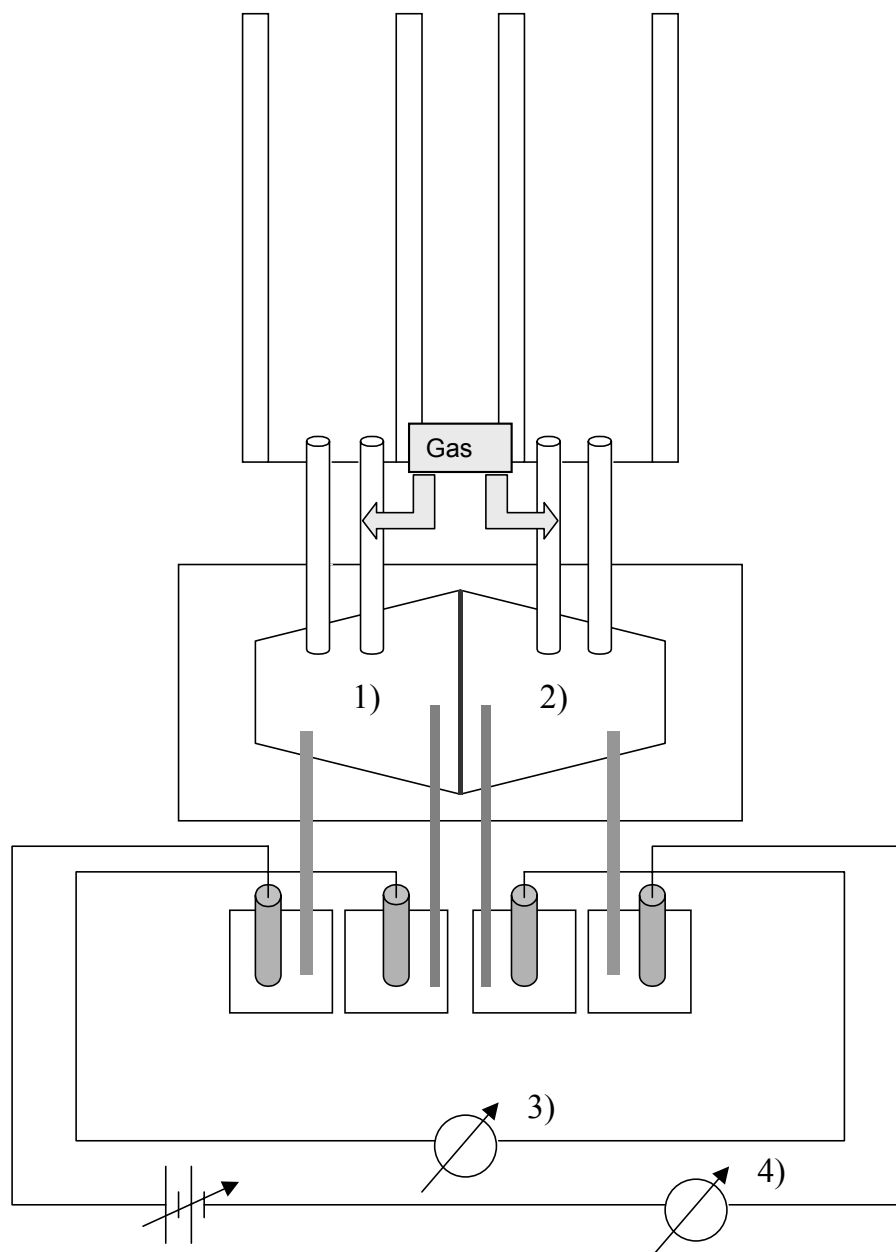
Das Gewebestück wurde in einem Dewargefäß transportiert, das mit einem mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begasten und auf 38°C erwärmten Transportpuffer (Zusammensetzung siehe „ANHANG“) gefüllt war. Im Labor wurde das Jejunum-Stück in für die Ussing-Kammern passende Stücke zugeschnitten. Von der Tötung der Tiere bis zum Einbau in die Ussing-Kammern vergingen in der Regel ca. 40 Minuten.

Der Begriff Epithel wird – wie in der transportphysiologischen Literatur üblich – im Weiteren anstelle von Mukosa oder Schleimhaut verwendet, um keine Verwechslungen mit anderen Definitionen (z. B. mukosal, serosal) aufkommen zu lassen.

3.2 Inkubationstechnik

Die Versuchstechnik geht auf eine von Ussing und Zehran entwickelte Methode zurück (Ussing und Zerahn, 1951).

Abbildung 3: Ussing-Kammer mit Gasliftapparat



1) mukosale (=luminale) Seite; 2) serosale Seite des Epithels bzw. der Schleimhaut (=Blutseite); 3) Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz mittels KCl-Agarbrücken und Ag-AgCl-Elektroden; 4) definierte Stromeinspeisung mittels KCl-Agarbrücken und Ag-AgCl-Elektroden (Lodemann, 2001).

Diese Technik dient der Erfassung von elektrophysiologischen Parametern unter *in vitro*-Bedingungen. Zwischen die beiden Hälften einer Plexiglaskammer wird ein Epithelstück senkrecht eingespannt, so dass die mukosale (=luminale) Seite nach links und die serosale (=basolaterale) Seite nach rechts ausgerichtet ist. Um Quetschungen an den Rändern zu vermeiden („edge damage“) werden Silikonringe untergelegt. In diesen Kammern werden 0,95 cm² des Gewebes beidseitig von Pufferlösungen umspült. Über den Kammerhälften befindet sich jeweils eine doppelwandige Glassäule, die mit der Kammer über flexible Schläuche verbunden ist. Auf jeder Kammerseite befinden sich 10 ml Pufferlösung.

Zwischen den Wänden der Glassäulen zirkuliert mit Hilfe eines Pumpthermostats (Haake D1) beheiztes Wasser, so dass die Temperatur der Pufferlösung konstant 38°C beträgt.

Zusätzlich wird jeder Seite am unteren Ende der Säule kontinuierlich Carbogen zugeführt (Gasliftsystem der Firma Landgraf), welches auch für die ständige Umwälzung der Pufferlösung wichtig ist (Stevens, 1964).

3.3 Elektrophysiologisches Messprinzip

Zur Messung der elektrophysiologischen Daten befindet sich in jeder Kammerhälfte jeweils eine gewebe-nahe (< 3 mm) und eine gewebe-ferne (> 20 mm) KCl-Agarbrücke.

Die gewebe-nahen Brücken sind mit Ag-AgCl-Elektroden verbunden und dienen der Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz (PD_t). Über die gewebe-fernen Brücken, die ebenfalls mit Ag-AgCl-Elektroden verbunden sind, kann externer Strom eingespeist werden. Die Messung des Stromes und der transepithelialen Potenzialdifferenz erfolgt durch eine mikrocomputergestützte Voltage/Current Clamp, Einrichtung für Windows, Clamp Version 2.02 (Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen).

Durch das Zuführen definierter Strompulse (ΔI) und die Erfassung der entsprechenden Veränderungen der Potenzialdifferenz (ΔPD) wird der zugehörige Gewebewiderstand (R_t) errechnet.

Die Pulshöhe betrug 100 μA . Die Pulse wurden bipolar appliziert. Die Pulsdauer war 200 ms. Die Einzelheiten der Apparatur sind in der Dissertation von Scheffler beschrieben (Scheffler, 1984).

Es wurden mittels eines PC ständig folgende Daten aufgezeichnet:

- PD_t [mV]
- Strom [$\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$]
- R_t [$\Omega\cdot\text{cm}^2$]

Die elektrophysiologischen Parameter wurden während der geplanten Untersuchungen unter sogenannten ‚open circuit‘ oder unter ‚short circuit‘ Bedingungen erfasst.

Open circuit

Unter diesen Bedingungen wird die transmurale Potenzialdifferenz nicht beeinflusst, sondern direkt gemessen. Durch das Aussenden von Strompulsen ($=\Delta I$) definierter Amplitude (100 μA) und Dauer (200 ms) wird eine kurzfristige Änderung der Potenzialdifferenz ($=\Delta\text{PD}$) bewirkt. Mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes kann man mit diesen Werten dann den zugehörigen transmuralen Widerstand ($=R_t$) berechnen.

Gleichung 1:

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

Die Gewebeleitfähigkeit entspricht dem reziproken Wert des Gewebewiderstandes.

Gleichung 2:

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

Der transmurale Strom (oder Kurzschlussstrom) wird unter ‚open circuit‘ Bedingungen, welche nur zu Beginn eines jeden Versuches während der Äquilibration bestehen, nicht berechnet.

Short circuit

Unter Kurzschlussbedingungen wird externer Strom eingespeist und so die durch elektrogene Ionenbewegungen aufgebaute Potenzialdifferenz auf 0 mV gegengeregelt (‚geklemmt‘).

Der eingespeiste Strom, der sogenannte Kurzschlussstrom (I_{SC}), kompensiert die elektrogenen Ionenbewegungen und ist somit äquivalent der Summe aller elektrogen transportierten Ionen.

Damit wird der elektrische Gradient ausgeschaltet. Wenn gleichzeitig auf beiden Seiten identische Pufferlösungen eingesetzt werden, fehlt auch der chemische Gradient. Findet also unter Kurzschlussbedingungen ein Nettotransport statt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen aktiven Transport handelt. Der Widerstand wird wie unter ‚open circuit‘ Bedingungen ermittelt.

3.4 Pufferlösungen

Die Lösungen wurden mit Chemikalien der Firma Merck und der Firma Sigma angesetzt.

Die genauen Zusammensetzungen der verschiedenen Pufferlösungen sind dem „ANHANG“ zu entnehmen.

Auf der mukosalen Seite (linke Säule) befand sich ein Mannitpuffer, auf der rechten Seite wurde dem Puffer bei geringerer Mannitkonzentration Glucose zugefügt. (Zusammensetzungen siehe „ANHANG“.)

Mannit, ein chemisch inerte, nicht resorbierbarer Zucker, ist eine parazellulär permeable Substanz. Der Transport liegt bei $0,09 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ und ist daher so gering, dass eine Konzentrationsänderung in unserem Versuchsablauf nicht erreicht wird.

Die Osmolarität wurde mit einem Osmometer der Firma Roebing nach dem Prinzip der Gefrierpunktniedrigung ermittelt.

Alle Puffer wurden mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast.

Der pH-Wert betrug 7,4 bei 38°C und Begasung.

Den Puffern wurde vor dem Gebrauch Indomethacin zugegeben. Indomethacin hemmt die endogene Prostaglandinsynthese, welche durch die dadurch einsetzende Chloridsekretion einen Ionenfluss hervorruft.

Dem Versuchspuffer wurde vor Versuchsbeginn eine Indomethacinstammlösung zugesetzt, so dass die Konzentration von 1,4 µmol/l im Puffer erreicht wurde.

3.5 Versuchsablauf

Vor dem Einspannen der Epithelien in die Kammern wurde der Flüssigkeitswiderstand der Pufferlösungen und das Elektrodeneigenpotential gemessen und für den Versuch gespeichert, um die späteren Messungen um diese Werte automatisch korrigieren zu können.

Pro Tier und Versuch wurden 12 Gewebestücke in die Ussing-Kammern eingebaut.

Den Epithelien wurde nach dem Einbauen eine Äquilibrierungszeit von ca. 10 Minuten unter ‚open circuit‘-Bedingungen gegeben, danach wurden sie kurzgeschlossen. Nach weiteren 15 Minuten hatte sich ein ‚steady state‘ eingestellt.

In 8 Kammern wurde eine PGE₂-Lösung mit steigender Konzentration serosal zugegeben, so dass in jeweils zwei Kammern eine Konzentration von 0,05 µmol/l, in die nächsten zwei Kammern 1 µmol/l, in den nächsten 3 µmol/l und in den letzten beiden Kammern 5 µmol/l erreicht wurde.

Bei diesen Kammern wurde nach 15 Minuten ein Pufferwechsel vorgenommen und die Substanz ausgewaschen. Nach weiteren 20 Minuten wurde ihnen mukosal eine Glucoselösung zugegeben, so dass eine steigende Konzentration in den Kammern erreicht wurde: jeweils zwei Kammern erhielten 0,5, 1, 8 und 12 mmol/l. Gleichzeitig wurde serosal als osmotischer Ausgleich Mannit in der gleichen Konzentration zugegeben.

Nach weiteren 30 Minuten wurde bei allen Kammern Theophyllin mukosal und serosal zugegeben (Konzentration in den Säulen: 8 mmol/l). Dies wurde als

sogenannter ‚viability test‘ eingesetzt, mit dem getestet werden soll, ob die Epithelien noch reaktionsfähig sind.

Die vier Kammern, die zur Messung der Mannitfluxe (siehe unten) dienten, wurden nach Entnahme der letzten Probe noch für die Bestimmung des I_{SC} -Anstieges nach mukosaler Zugabe von 12 mmol/l L-Glutamin eingesetzt.

Tabelle 3: Darstellung des Versuchsablaufes pro Gewebestück (=Kammer)

Kammer Zugabe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PGE ₂ 50 nM	X	X										
PGE ₂ 1 µM			X	X								
PGE ₂ 3 µM					X	X						
PGE ₂ 5 µM							X	X				
Glucose 0,5 mmol/l	X	X										
Glucose 4 mmol/l			X	X								
Glucose 8 mmol/l					X	X						
Glucose 12 mmol/l							X	X				
³ H-Mannit									X	X	X	X
L-Glutamin 12 mmol/l									X	X	X	X
Theophyllin 8 mM/l	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

3.6 Bestimmung des Mannitfluxes

Vier Kammern dienten der Messung der Mannitfluxe. Dazu wurde ihnen serosal das radioaktiv markierte Isotop D-[1-³H] in Verbindung mit Mannit (Firma Perkin Elmer) zugegeben. Danach wurde in definierten Zeitintervallen auf der mukosalen Seite Proben entnommen. Das entnommene Volumen wurde durch Pufferlösung ersetzt. Nach Messen der Radioaktivität in den Proben wurde der unidirektionale (von serosal nach mukosal) Mannitflux berechnet (siehe Gleichung 3).

Mannit ist eine parazellulär permeable Substanz, bei fehlendem Gradienten müsste also der Flux von serosal nach mukosal dem in die andere Richtung entsprechen.

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde jeweils am Anfang und am Ende eines Versuches eine ‚heiße‘ Probe, d.h. eine Probe aus der Seite der Aktivitätszugabe entnommen.

Nach Zugabe von radioaktivem Mannit (serosal) wurden alle 20 Minuten Proben von der unmarkierten (mukosalen), sogenannten ‚kalten‘ Seite, gezogen. Insgesamt wurden drei Fluxperioden (t1-t3) à 20 Minuten bestimmt. Die Radioaktivität der Proben wurde mit einem β-Counter der Firma Wallac (Finnland) gemessen.

Berechnung der Transportraten

Die Mannitfluxe werden anhand der auf der unmarkierten Seite gemessenen Radioaktivität nach folgender Formel berechnet:

Gleichung 3:

$$J = \frac{cpm_2 \cdot \frac{V_s}{V_p} - cpm_1 \cdot \frac{V_s - V_p}{V_p}}{Ak_{spez} \cdot A \cdot t} \quad [\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}]$$

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

cpm₁ = ‘counts per minute’ (Radioaktivität) der zu Beginn eines Fluxes entnommenen Probe

cpm_2	= ‚counts per minute‘ (Radioaktivität) der am Ende des entsprechenden Fluxes entnommenen Probe
V_s	= Puffervolumen im Gasliftsystem [ml]
V_p	= Puffervolumen der ‚kalten‘ Seite [ml]
Ak_{spez}	= Spezifische Aktivität [$cpm \cdot \mu mol^{-1}$]
A	= Gewebefläche [cm^2]
T	= Dauer eines Fluxes (Zeitintervall zwischen zwei ‚kalten‘ Proben) [h]

Die spezifische Aktivität berechnet sich aus:

Gleichung 4:

$$Ak_{spez} = \frac{cpm_h}{V_h \cdot c} \quad [cpm \cdot \mu mol^{-1}]$$

cpm_h	= Radioaktivität der ‚heißen‘ Probe (Mittelwert aus den zwei ‚heißen‘ Proben) [counts per minute]
V_h	= Volumen der ‚heißen‘ Probe [ml]
c	= Konzentration des zu untersuchenden nicht radioaktiv markierten Isotops in der Pufferlösung [$\mu mol \cdot ml^{-1}$]

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS für Windows, Version 11.5. Die Graphiken wurden mit SPSS und Excel erstellt.

Die Varianzanalyse untersucht den Einfluss von einer oder mehreren unabhängigen Variablen auf eine abhängige Variable (univariate Analyse), d.h. beobachtete Unterschiede in gemessenen Ergebnissen beruhen oftmals auf mehreren Faktoren, wobei untersucht werden muss, welcher der Faktoren einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse ausübt.

Die mit dieser Prozedur getestete Nullhypothese unterstellt, alle miteinander verglichenen Gruppenmittelwerte der betrachteten Variablen seien in der Grundgesamtheit identisch. Neben diesem simultanen Vergleich aller Mittelwerte führt diese Prozedur zudem multiple Vergleichstests durch, mit denen identifiziert werden kann, zwischen welchen der betrachteten Gruppen signifikante Unterschiede bestehen.

Das Ziel dieser Untersuchung ist es, die verschiedenen Stofftransporte über Kurzschlussstromveränderungen (ΔI_{SC}) bzw. Fluxen (Mannit) an der Dünndarmschleimhaut von Ferkeln aus zwei Fütterungsgruppen (Probiotika und Kontrolle, s.o.) an jeweils zwei gleichbehandelten Epithelien in den vier Altersgruppen zu vergleichen.

Die geeignete Bezugsbasis zur Bewertung des Fütterungseffektes bildet die Streuung zwischen Tieren, die hinsichtlich dieses Faktors denselben Bedingungen ausgesetzt sind. Damit dieser Bezug hergestellt wird, muss bei einer varianzanalytischen Auswertung der Versuchsdaten ein zufälliger Tiereffekt in das statistische Modell aufgenommen werden. Ansonsten kann es zu einer Unterschätzung der Streuung zwischen den Tieren kommen.

Unter der Annahme, dass die Transporte der eingesetzten Stoffe bei Epithelien desselben Tieres unter gleichen Bedingungen annähernd normalverteilt sind und keine wesentlichen Streuungsunterschiede bei verschiedenen Fütterungsgruppen oder Tieren auftreten, lassen sich die Versuchsdaten mit Hilfe eines varianzanalytischen Ansatzes auswerten. Für zufällige Tiereffekte wird ebenfalls angenommen, dass sie unter identischen Bedingungen annähernd normalverteilt sind und eine konstante Streuung besitzen.

Über die Datenwerte der entsprechenden Mittelwerte wurde jeweils eine univariate Varianzanalyse berechnet.

Die Daten der Tiere wurden nach Altersgruppen aufgeteilt, die Fütterungsgruppen wurden verglichen.

Das Signifikanzniveau wurde generell auf $\alpha \leq 0,05$ festgelegt.

Das Fehlen einzelner Daten ist auf technische Störungen während der Messungen zurückzuführen. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich um zufällig fehlende Werte handelt.