

II Material und Methoden

1. Das Tiermodell

1.1 Haltung der Versuchstiere

Unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $21 \pm 5^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $70 \pm 10\%$, 10 Luftwechsel pro Stunde, 12h/12h Tag- Nachtzyklus) wurden 60 männliche Syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) in Einzelkäfigen gehalten (Bezugsquelle: Harlan-Winkelmann, Deutschland). Nach einwöchiger Akklimatisierungszeit erfolgte die Randomisierung der Tiere auf die Versuchsgruppen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere 9 Wochen alt.

1.2 Versuchsgruppen

Gruppe	Tieranzahl	Tumorinduktion	Ernährung
1	15	Ø	konventionelle Linolsäure
2	15	Ø	konjugierte Linolsäure
3	15	BOP	konventionelle Linolsäure
4	15	BOP	konjugierte Linolsäure

Tab. 1: Versuchsgruppen

1.3 Ernährung der Versuchstiere

Eine Woche nach Beginn der Tumorinduktion wurden die Tiere der Versuchsgruppen 1 und 3 jeweils mit einer Spezialdiät (ssniff GmbH, Soest Deutschland) ernährt. Der Gesamtfettanteil betrug 4,7%. Beide Spezialdiäten enthielten jeweils eine 3,3%ige Linolsäuremischung, wobei in den Gruppen 1 und 3 ca. 60% konventioneller LA und in den Gruppen 2 und 4 ca. 60% CLA vorlagen (entspricht jeweils 2% LA bzw. CLA-Gehalt + 1,3% Fettsäuren bestehend aus <C16-, C16:0-, C16:1-, C18:0-, C18:3-, >C18-Fettsäuren).

Alle Tiere hatten während der gesamten Versuchsdauer freien Zugang zu Futter und Trinkwasser.

Inhaltstoff	Anteil (%)
Rohprotein	20,4
Rohfett	4,7
Rohfaser	6,6
Rohasche	7,0
Kalzium	1,0
Phosphor	0,7
Natrium	0,15
Magnesium	0,2
Kalium	1,0
Lysin	1,1
Glycin	1,0
Leucin	1,5
Arginin	1,4
Phenylalanin	1,0

Asparaginsäure	2,0
Glutamat	3,9
Valin	1,0
Mangan	80
Kupfer	12
Zink	75
Jod	2
Eisen	220
Selen	0,2
Kobalt	2
Vitamin A	15.000 IE/kg
Vitamin D ₃	1.000 IE/kg
Vitamin E	100
Cholin	1.600
Nikotinsäure	60
Inosit	50

Tab. 2: Zusammensetzung der Futtermischung

Fettsäuren	Anteil in %
Palmitinsäure	0,2
Stearinsäure	0,2
Ölsäure	0,6
Linolsäure/ konjugierte Linolsäure	3,3 *
Linolensäure	0,2
Arachidonsäure	0,07
Eicosapentaensäure	0,05
Sonstige Fettsäuren	Jeweils <0,05

Tab. 3: Anteile bedeutender Fettsäuren in den Diäten

Spezialdiät	Aufschlüsselung des 3,3%igen Anteils von LA bzw. CLA
Fettsäuremischung Edenor SB05 (Firma Grünau Illertissen GmbH, Illertissen, Deutschland)	60% konventionelle LA (entspricht ca. 2% vom Gesamtfettanteil + 1,3% C18:1-, C16:0-, C18:0-, >C18-Fettsäuren in absteigender Reihenfolge)
Fettsäuremischung Selin-CLA (Firma Grünau Illertissen GmbH, Illertissen, Deutschland)	60% CLA (entspricht ca. 2% vom Gesamtfettanteil + 1,3% C18:1-, C18:2-, C18:0-, <C16-, C16:1-, C18:3-, >C18-Fettsäuren in absteigender Reihenfolge)

Tab. 4: *Aufschlüsselung des 3,3%-igen Anteils von LA bzw. CLA

1.4 Tumorinduktion

Die Tumorinduktion erfolgte mit N-Nitrosobis-2-oxopropylamin (BOP, Ash Stevens Chemical Ltd., USA). Über einen Zeitraum von 12 Wochen wurde den Tieren der Gruppen 3 und 4 einmal wöchentlich 10mg/kg Körpergewicht BOP subkutan interskapulär injiziert. Die Injektion erfolgte in Äther-Narkose (Hoechst/Marion-Roussel GmbH, Deutschland). Der Lösungsansatz wurde mit 0,9%iger Natriumchloridlösung (B. Braun GmbH, Deutschland) im Verhältnis 3mg/1ml jeweils unmittelbar vor der Injektion hergestellt. Die Tiere der Versuchsgruppen 1 und 2 erhielten analog einmal wöchentlich 0,5 ml 0,9%ige Natriumchloridlösung subkutan interskapulär injiziert.

1.5 Tumorpromotion

Nach Abschluss der 12-wöchigen Tumorinduktionsphase wurden die Syrischen Goldhamster der Gruppen 1 und 3 gemäß dem Versuchsprotokoll weitere 16 Wochen mit konventioneller Linolsäure-Diät ernährt. Die Tiere der Gruppen 2 und 4 erhielten über den selben Zeitraum die Diät mit konjugierte Linolsäure.

2. Histologische Aufarbeitung

2.1 Obduktion

Die Tötung der Versuchstiere aller Gruppen wurde in der 29. Woche nach Studienbeginn vorgenommen. Hierbei wurden die Tiere in tiefer Narkose mit Ursotamin (Serumwerke Bernburg, Deutschland) getötet. Die Obduktion wurde mit medianer Laparotomie vom Penisansatz bis zum Processus xiphoideus sterni durchgeführt. Nach Inspektion des Bauchraumes und aller Bauchorgane wurde die Leber entnommen.

Bei den Tieren der Gruppen 1 und 2, welche gemäß dem Versuchsprotokoll nicht mit BOP behandelt worden waren, und bei denen demzufolge keine Tumorerkrankungen zu erwarten waren, wurde standardisiert der Lobus sinister lateralis hepatis entnommen und sofort bei – 80°C für die biochemische Analyse eingefroren.

Den Tieren der Versuchsgruppen 3 und 4 wurden sowohl Leber als auch Pankreas entnommen und unmittelbar nach Entnahme makroskopisch und auflichtmikroskopisch (neoLab Stereomikroskop, Eschenbach GmbH, Deutschland) auf solide Tumoren untersucht. Aus tumorverdächtigen Läsionen wurden für die histologische Aufarbeitung Proben exzidiert und in 10%iges, gepuffertes Formaldehyd (Sigma Chemicals Ltd.; Großbritannien) eingelegt. Die Leber der Tiere der Versuchsgruppen 3 und 4 wurde unmittelbar nach Entnahme mit einem Skalpell lamelliert. Hierbei wurden Schnittdicken von ca. 2 mm gewählt. Die Lamellen wurden danach makroskopisch und auflichtmikroskopisch auf solide tumorverdächtige Läsionen untersucht. Die Anzahl aller suspekten Leberveränderungen wurde für jedes Tier erhoben. Die Größe der verdächtigen Läsionen wurde auflichtmikroskopisch zweidimensional gemessen. Bei Herden, die sich über mehr als eine Lamelle erstreckten, wurden die verschiedenen Anteile gemessen und der Mittelwert erhoben. Aus jeder metastasenverdächtigen Läsion wurde eine Probe entnommen, die für die histologische Aufarbeitung in 10%iger, gepufferter Formaldehydlösung (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) aufbewahrt wurde. Analog wurden für die biochemische Untersuchung verdächtige Herde aus der Leber exzidiert und bei – 80°C eingefroren. Zur Kontrolle wurden makroskopisch und auflichtmikroskopisch unauffällige, metastasenferne Leberanteile entnommen und ebenfalls bei – 80°C eingefroren.

2.2 Histologie

Die in Formaldehyd gelagerten Gewebeproben aller Tiere wurden in Gewebekapseln mit Metalldeckeln (Shandon Ltd. Großbritannien) gegeben. Die Entwässerung wurde in der Histokinette 2000 (Reichert-Jung GmbH, Deutschland) durchgeführt. Die entwässerten Gewebeproben wurden anschließend nach Entfernung der Metalldeckel in typischer Technik in Metallwannen (Shandon Ltd., Großbritannien) auf der Gießstation TBS 88 (medite AG, Deutschland) mit Paraffin (Merck AG, Deutschland) überschichtet. Nach Aushärtung der Paraffinblöcke wurden die Gewebelöcke auf dem Rotationsmikrotom HM 350 (Mikrom GmbH, Deutschland) geschnitten. Die Schnittdicke lag bei 2-3 µm. Es wurden jeweils 2 Schnitte, welche einen Abstand von ca. 100µm aufwiesen, verwertet. Aus dem Paraffinstreckbad (medite AG, Deutschland) wurden die

Schnitte auf Objektträger (Menzel Gläser KG, Deutschland) aufgezogen. Im Brutschrank Modell 200 (Memmert GmbH, Deutschland) wurden die Objektträger mit den histologischen Schnitten bei 75°C für 40 Minuten getrocknet. Anschließend wurden die getrockneten Schnitte 2 mal 5 Minuten lang im Xylolbad (Baker, Niederlande) unter dem Abzug Hyperclean (Shandon Ltd. Großbritannien) entparaffiniert. Der Entparaffinierung folgte die Entwässerung in absteigender Alkoholreihe (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien). Auf eine Waschung in Aqua bidest folgte die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (Merck AG, Deutschland) in typischer Technik. Nach erneuter Waschung in Aqua bidest erfolgte die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, der sich die endgültige Entparaffinierung im Xylolbad anschloß. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Kanadabalsam (Merck AG, Deutschland) überschichtet und mit Deckgläschen (Menzel Gläser GmbH, Deutschland) versehen.

Die histologische Beurteilung wurde mit dem Lichtmikroskop Kolleg SHB 45 (Eschenbach GmbH, Deutschland) durchgeführt.

Die Klassifizierung tumorverdächtiger Läsionen erfolgte gemäß Meijers et al.¹⁰⁴. Zur Berechnung der Induktionsraten wurden nur Tiere mit invasiven duktalem Adenokarzinomen des Pankreas herangezogen.

Die mikroskopisch als Tochtergeschwülste eines duktalem Adenokarzinoms des Pankreas klassifizierten Lebermetastasen wurden zur Berechnung der Inzidenz der Lebermetastasen herangezogen. Die Metastasenanzahl pro Tier und die durchschnittlichen Größen wurden auflichtmikroskopisch erhoben.

3. Biochemische Analysen

3.1 Chemikalien

3.1.1 Bestimmung der Glutathion-Peroxidase-Aktivitäten (GSHPX)

Die Bestimmung der GSHPX-Aktivität wurde nach Paglia und Valentine durchgeführt¹⁰⁵. Hierzu wurde das Testkit RANSEL (Randox Ltd., Großbritannien) verwendet. Das Testkit setzte sich wie folgt zusammen:

- Reagenz (Glutathion + Glutathionreduktase + NADPH)
- 50 mM Phosphat-EDTA-Puffer
- 0,18 mM Cumenhydroperoxid
- Verdünnungsmittel

3.1.2 Bestimmung der SOD-Aktivitäten

Die SOD-Aktivitätsbestimmung wurde nach der Methode von Beauchamp und Fridovich durchgeführt¹⁰⁶. Das verwendete Testkit RANSOD (Randox Ltd., Großbritannien) enthielt:

- Mischsubstrat Xanthin
- I.N.T. [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazoliumchlorid]
- 50 mM CAPS-EDTA-Puffer
- Xanthinoxidase (80 U/l)

3.1.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung folgte dem Prinzip von Lowry¹⁰⁷. Folgende Chemikalien wurden verwendet:

- Kalium-Natrium-Tartrat-4-hydrat (2%ig in Aqua dest; Laborchemie Apolda, Deutschland)
- Kupfersulfat-4-hydrat (1%ig in Aqua dest.; Laborchemie Apolda, Deutschland)
- Natriumkarbonat, wasserfrei (0,5 m in 1n Natronlauge, Merck AG, Deutschland)
- Folins Reagenz (Merck AG, Deutschland)

3.1.4 Bestimmung der Konzentrationen der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS)

Für die Bestimmung der Lipidperoxidationsprodukte TBARS wurden folgende Agenzien gebraucht:

- Azetatpuffer, hergestellt aus 40%iger Essigsäure (analytisch reiner Eisessig; Merck AG, Deutschland) auf pH=5 eingestellt und auf das doppelte Volumen aufgefüllt,
- SDS (Natriumdodecylsulfat, 8,1%ige Lösung in Aqua dest.; Serva GmbH Deutschland)
- N-Butanol (Merck AG, Deutschland)
- BHA (3-Ter-butyl-4-hydroxyanisol), 0,05 mg/ml; Lösungsmittel: Ethanol-Wasser-Gemisch (1:1)
- Malondialdehyd-Standard (die Herstellung erfolgte in modifizierter Form nach Esterbauer und Haberland¹⁰⁸, um den Prozeß der säurekatalysierten Hydrolyse weitgehend zu beenden wurde Malodialdehydacetat eine Stunde in 1%iger Schwefelsäure inkubiert)

4. Geräte

Die Aktivitätsbestimmungen der GSHPX und der SOD, sowie die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgten photometrisch mit dem UV-VIS Scanning Spectrophotometer UV-2101 PC (Shimadzu, Japan).

Die Messung der TBARS-Konzentration wurde mit dem Spectrofluorophotometer RF-5001 PC durchgeführt (Shimadzu, Japan).

Darüber hinaus wurden folgende Geräte verwendet:

- Laborwaage Sartorius excellence (Sartorius AG, Deutschland)
- Schüttelmaschine (Labortechnik Ilmenau, Deutschland)
- Zentrifuge Z 23 (Janetzki, Polen)
- Homogenisator Omni International 2000 (Digitana, Schweiz)

5. Homogenatherstellung

Die bei der Obduktion gewonnenen tiefgefrorenen Gewebeproben von metastasenfreiem und metastatischen Lebergewebe aller Versuchsgruppen wurden vor den biochemischen Analysen homogenisiert.

Für die GSHPX- und die SOD-Bestimmung wurde das gefrorene Gewebe mit eisgekühltem 0,1mol/l-Phosphatpuffer unter Kühlung 4 mal je 15 Sekunden homogenisiert.

Für die TBARS-Messung wurde das Gewebe mit 0,01% Butylhydroxyanisol enthaltender eiskalter 140mmol/l-Natriumchloridlösung (Sigma Chemicals Ltd., Großbritannien) unter Kühlung 4 mal jeweils 15 Sekunden homogenisiert.

Die so erhaltenen Homogenate wurden bei – 80°C gelagert und unmittelbar vor den Analysen für jeweils 15 Sekunden erneut homogenisiert.

6. Proteinbestimmung nach Lowry

6.1 Prinzip

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist eine modifizierte Biuret-Methode ¹⁰⁷. Nach der Biuret-Methode bilden Verbindungen mit zwei oder mehr Peptidbindungen mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen violetten Komplex. Für die Biuret-Methode wird jedoch zum einen umfangreiches Probenmaterial benötigt, zum anderen ist die Biuret-Methode mäßig sensitiv.

Die Lowry-Methode kombiniert die Biuret-Methode mit der Reduktion von Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure (Folins Reagenz) zu Wolfram bzw. Molybdänblau durch die aromatischen Seitenketten des im Kupferkomplex gebundenen Tyrosins und Tryptophans.

6.2 Durchführung und Auswertung

Zuerst wurde aus den entsprechenden Gewebeproben das Proteinhomogenat gewonnen. Zur Herstellung von 50 ml Gebrauchslösung wurden 0,5 ml Kupfersulfatlösung, 0,5 ml Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung und 49 ml Natriumkarbonatlösung vermischt. Im Folgenden wurden 25 μl des zuvor 1:100 verdünnten Homogenates mit 225 μl Aqua bidest versetzt und mit 1,5 ml Gebrauchslösung 10 Minuten lang inkubiert. Unter starkem Schütteln wurden anschließend 150 μl Folins Reagenz hinzugefügt und die Lösung wurde eine Stunde lang inkubiert.

Danach wurden die Proben unter folgenden Bedingungen analysiert:

- 750 nm Wellenlänge
- 25°C Temperatur
- 0,5 cm Küvettschichtdicke

Der Leerwert diente als Vergleichsprobe. Die Auswertung wurde mittels einer Kalibrierfunktion durchgeführt.

7. Messung der Enzymaktivitäten

7.1 Messung der GSHPX-Aktivität

7.1.1 Prinzip

Nach dem Prinzip von Paglia und Valentine katalysiert die GSHPX die Oxidation von Glutathion durch Cumenhydroperoxid, bei der unter Bildung einer Disulfidbrücke oxidiertes Glutathion entsteht (GSSG)¹⁰⁵. Bei Anwesenheit von NADPH+H⁺ wird GSSG sofort reduziert, wobei NADPH oxidiert wird. Gemessen wird die abnehmende NADPH-Extinktion, die in negativ-proportionalem Verhältnis zur Aktivität der GSHPX-Aktivität steht.

7.1.2 Durchführung

Zuerst wurden die Proben nach folgendem Pipettierschema (Tab. 5) angesetzt:

	Leerwert	Proben
Probe [µl]	0	10
Aqua bidest [µl]	50	40
Reagenz [µl]	500	500
Cumenhydroperoxid [µl]	20	20

Tab. 5: Pipettierschema GSHPX-Aktivitätsmessung

Die Ansätze wurden direkt in der Messküvette pipettiert, nach guter Durchmischung wurden die Proben unter folgenden Bedingungen gemessen:

- 340 nm Wellenlänge
- 37°C Temperatur

- 3 Minuten Reaktionszeit
- 0,5 cm Küvettschichtdicke
- Luft als Vergleichsprobe

7.1.3 Berechnung der Ergebnisse

Zugrundeliegend für die Berechnung der Ergebnisse ist das Lambert-Beer'sche Gesetz: $\Delta E = c \cdot d \cdot \varepsilon$, dabei steht ΔE für die Extinktionsänderung, c für die Konzentration, d für die Küvettschichtdicke und ε für den Extinktionskoeffizienten, dessen Wert $6,22 \cdot 10^3 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$ beträgt. Der Extinktionskoeffizient ist konstant. Nach c umgestellt konnte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration in der Probe berechnet werden. Eingefügt wurde der Verdünnungsfaktor. Alle Ergebnisse wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

7.2 Messung der SOD-Aktivität

7.2.1 Prinzip

Hier wurde die Methode nach Beauchamp und Fridovich angewandt¹⁰⁶. Danach bilden Xanthin und Xanthinoxidase Superoxyradikale, die mit I.N.T. zu einem roten Formazanfarbstoff reagieren. Die SOD katalysiert die Dismutation von Superoxidradikalen zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. So kann ihre Aktivität über den Grad der Hemmung der Farbreaktion bestimmt werden.

7.2.2 Durchführung

Zuerst wurden die Proben nach dem Pipettierschema (Tab. 6) angesetzt. Dabei wurden die Verdünnungen der Proben so gewählt, dass die Messwerte zwischen 30% und 60% Hemmung lagen.

	Leerwert	Proben
Probe [μl]	0	95-5
Aqua bidest [μl]	100	5-95
Mischsubstrat [μl]	340	340
Xanthinoxidase	50	50

Tab. 6: Pipettierschema SOD-Messung

Das Pipettieren erfolgte in der Messküvette, nach gutem Durchmischen wurden die Messungen unter folgenden Bedingungen vorgenommen:

- 505 nm Wellenlänge
- 37°C Temperatur
- 3 Minuten Reaktionszeit
- 0,5 cm Küvettschichtdicke
- Luft als Vergleichsprobe

7.2.3 Berechnung der Ergebnisse

Die Messwerte wurden als Extinktionsänderung* $10^3/\text{min}$ angegeben. Die Umrechnung in die prozentuale Hemmung der Formazanreaktion erfolgte mit folgender Gleichung: Hemmung [%]= $100 - [(\Delta E \cdot \text{min}^{-1}_{\text{Probe}} \cdot 100) / \Delta E \cdot \text{min}^{-1}_{\text{Leerwert}}]$. Um die Aktivität in Units angeben zu können wurde definiert, daß 1U SOD-Aktivität 50% Hemmung entsprechen soll. Die erhaltenen Werte wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

7.3 Messung der Lipidperoxidationsprodukte

7.3.1 Prinzip

Die Messung der Lipidperoxidationsprodukte wurde nach dem Prinzip von Ohkawa durchgeführt¹⁰⁹. Produkte der Lipidperoxidation bilden hiernach mit Thiobarbitursäure

(TBA) einen roten Polymethinfarbstoff, der in seiner Konzentration fluorimetrisch bestimmt werden kann. Die aus der Lipidperoxidation hervorgehenden Substanzen, welche die Farbreaktion eingehen, werden als Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) bezeichnet.

Diese Nachweismethode wurde in Hinblick auf ihre Spezifität, Aspekte der Probengewinnung und –aufbewahrung von Janero et al. kritisch gesehen ¹¹⁰, nach unseren Erfahrungen mit vorhergehenden Analysen gehen wir jedoch davon aus, dass Artefaktbildungen im Hinblick auf die TBARS-Levels durch optimierte Arbeitsschritte (z.B. schnelles Einfrieren der Gewebeproben nach Entnahme, Aufbewahrung der Proben in flüssigem Stickstoff, Analyse und Homogenisierung unter Hinzufügen von antioxidativ wirkenden Substanzen) verhindert werden können.

7.3.2 Durchführung und Auswertung

Das Homogenat wurde mit Aqua bidest zu 150µl ergänzt. Danach wurden 40µl SDS, 300µl TBA und 300µl Azetatpuffer zugesetzt. Dieser Ansatz wurde für 90 Minuten bei 90°C ins Wasserbad gestellt. Im Folgenden wurden nach fünfminütiger Abkühlung in Eiswasser 200µl Aqua bidest und 1 ml n-Butanol hinzugefügt. Diese Mischung wurde 20 Minuten lang geschüttelt und im Anschluß daran 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Zum Schluß wurde die überstehende n-Butanolphase bei folgenden Bedingungen gemessen:

- 515 nm Wellenlänge für Exzitation
- 553 nm Wellenlänge für Emission
- 25°C Temperatur
- 0,5 cm Küvettenschichtdicke
- Leerwert als Vergleichsprobe

Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierfunktion.

8. Statistische Berechnungen

Alle Werte wurden als prozentuale Häufigkeiten, als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. Median und Range angegeben. Quantitative Daten wurden mit dem Normalitätstest nach Shapiro und Francia dargestellt.

Bei normalverteilten Parametern wurden die Mittelwertvergleiche zwischen den Versuchsgruppen als Einfaktorielle Multivarianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Beim Vorliegen von vergleichbaren Varianzen in den Versuchsgruppen erfolgte die Post-Hoc-Korrektur nach dem Bonferroni-Modell. Lagen hingegen zwischen den Gruppen ungleiche Varianzen vor, wurde als Post-Hoc-Korrektur das Dunnet's-T3-Modell gewählt.

Nicht normalverteilte Parameter wurden hinsichtlich der Mittelwerte der Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen.

Bei Ablehnung der globalen Nullhypothese fanden die folgenden Einzelvergleiche zwischen den Gruppen als Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung der α -Fehlerkumulierung statt.

Die Vergleiche innerhalb einer Versuchsgruppe zwischen metastatischen und nicht-metastatischen Werten wurden bei Normalverteilung als T-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Parametern fanden diese Vergleiche als Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Test statt.

Aufgrund der geringen Umfänge wurden kategorielle Daten mit dem Fisher-Test verglichen.

Das Signifikanzniveau wurde grundsätzlich mit 95% ($p < 0,05$) definiert. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 9.2[®] für Windows98[®] durchgeführt.