

## **III. Material und Methoden**

### **1. Versuchstiere**

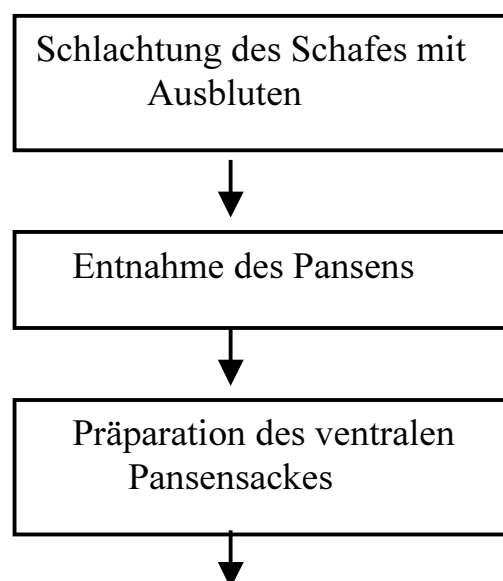
Die Versuche wurden in dem Zeitraum von Dezember 2000 bis Oktober 2001 durchgeführt. Die verwendeten Pansenepithelien stammten von geschlachteten Schafen, die in Alter, Geschlecht und Rasse differierten. Gefüttert wurden die Tiere mit Heu, teilweise wurde Kraftfutter zugefüttert.

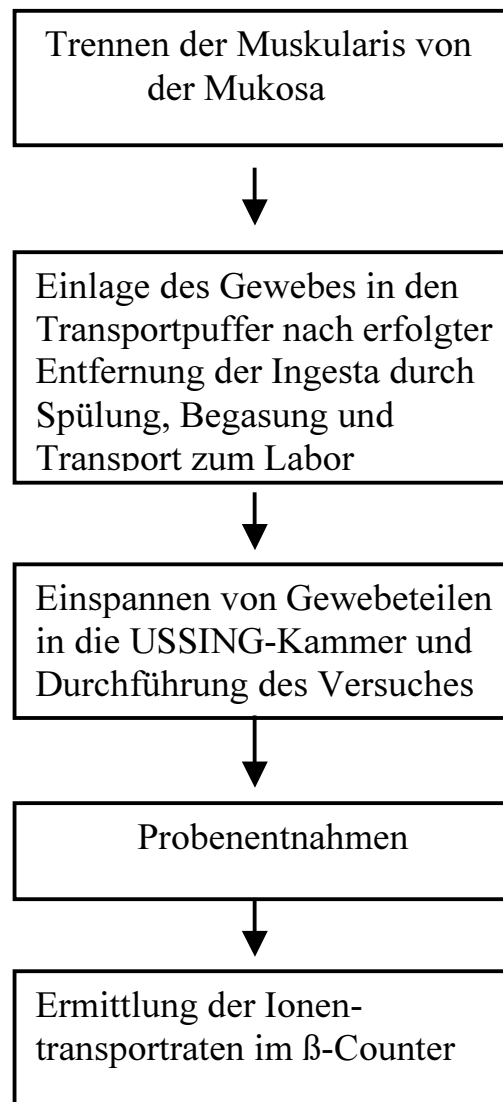
### **2. Versuchsgut**

Der Pansen wurde schlachtfresh entnommen und das Gewebe des ventralen Pansensackes genutzt. Es wurde hierbei auf möglichst gleichmäßigen Zottenbesatz geachtet. Nach Befreiung von Ingestaresten und Abpräparieren der Tunica muscularis von der Mukosa wurde das Epithel bis unmittelbar vor den Versuchen mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Air-Liquide, Berlin) begast und in 38°C- warmen Transportpuffer verbracht.

Zur Verwendung in den USSING-Kammern wurde das Epithel in ca. 3 x 3 cm große Stücke geschnitten.

### **3. Arbeitsgangschema**





#### **4. Versuchsaufbau**

Die Versuche wurden mit Apparaturen durchgeführt, die auf der Technik des dänischen Physiologen Hans USSING basieren. Hierbei wurde das zugeschnittene Gewebe zwischen zwei Plexiglaskammerhälften eingespannt und auf beiden Seiten durch einen 1 mm starken Gummiring vor einer starken Beschädigung der Randzonen (edge damage) geschützt. Als Epithelgrundfläche ergab sich  $3,14 \text{ cm}^2$ . Über den Kammerhälften befand sich je eine doppelwandige Glassäule, die über flexible Schläuche mit der Kammer verbunden war. Für jede Epithelseite wurden 18 ml Pufferlösung in die Glassäule gefüllt, die durch zirkulierendes, warmes Wasser auf  $38^\circ\text{C}$  gehalten wurde.

## Material und Methoden

---

Die Pufferlösung wurde je nach Zusammensetzung mit Sauerstoff (O<sub>2</sub>, Air-Liquide, Berlin) oder Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Air-Liquide, Berlin) begast. Die Rezepte für die Pufferlösungen sind im Anhang angegeben. Ihre Osmolarität wurde mit einem Osmometer der Firma Roebling, Berlin überprüft. Der pH- Wert wurde mit Tris-Puffer auf 7,4 eingestellt.

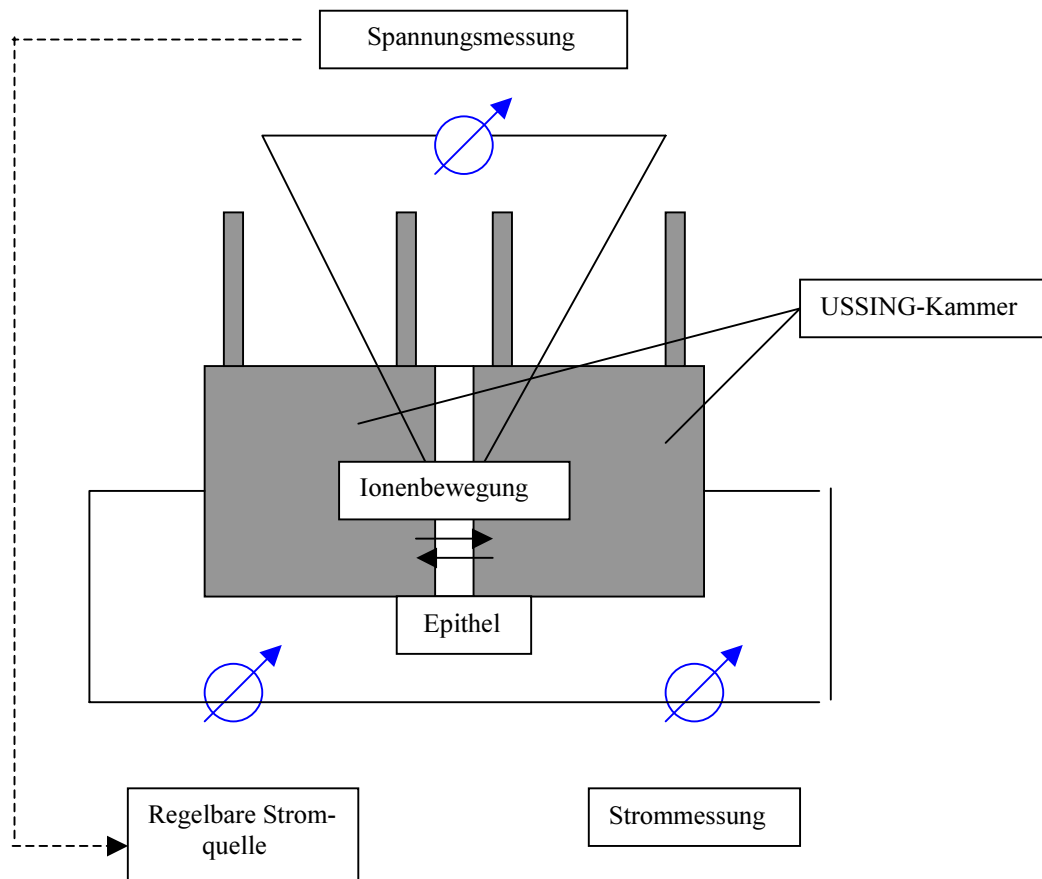


Abb.3: Versuchsaufbau bei Experimenten mit der USSING-Kammer Quelle: SCHMIDT, THEWS 1995

### **5. Elektrische Messungen**

Der Messung der elektrischen Parameter dienten je zwei gewebe-nahe und gewebe-ferne KCl-Agarbrücken. Das gewebe-nahe Paar zur Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz  $PD_t$  war mit Ag/AgCl-Elektroden verbunden, das andere Paar war zur Stromeinspeisung über gleichartige Elektroden mit einer Stromquelle verbunden.

Die Strom- und  $PD_t$ -Messungen erfolgten durch eine mikroelektronische Mess- und Klemmapparatur (Ing.-Büro Mussler, Aachen). Durch das Aussenden definierter Stromimpulse bei gleichzeitigem Erfassen der zugehörigen Spannungsabfälle konnte die Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$ ) berechnet werden.

Damit die Werte für  $\Delta PD_t$  um den Spannungsabfall über dem Flüssigkeitswiderstand korrigiert werden konnten, wurde vor dem Einspannen des Gewebes der Widerstand der Pufferlösungen zwischen den Spannungselektroden gemessen.

#### Open circuit

Hierbei wurde die  $PD_t$  des Epithels gemessen ohne eine Spannung anzulegen.  $G_t$  und der transepitheliale Strom wurden durch die definierten Strompulse ( $\Delta I$ ) und die sich ergebenden Änderungen von  $PD_t$  nach dem Ohm'schen Gesetz wie folgt berechnet:

$$G_t = \frac{\Delta I}{\Delta PD_t} \quad ; \quad \Delta I = \Delta PD_t \cdot G_t$$

#### Short circuit

Mit Hilfe dieser Klemmung wird die  $PD_t$  durch externe Stromeinspeisung auf 0 mV reguliert. Der Kurzschlussstrom  $I_{sc}$  entspricht in seiner Größe genau der Summe aller elektrogenen Ionenbewegungen durch das Gewebe, es wird der aktive Transport von Ionen betrachtet. Voraussetzung hierfür ist, dass keine chemischen Gradienten vorliegen.  $G_t$  kann dann wie oben berechnet werden.

#### Voltage clamp

Hier wird  $PD_t$  auf verschiedene Spannungen reguliert, so dass ein elektrischer Gradient über dem Gewebe vorliegt. Die passive Ionenbewegung wird auf diese Weise mitbetrachtet.

### **6. Ionenflussmessungen**

Zur Bestimmung von Transportvorgängen von K-Ionen durch das Pansenepithel wurde das sich annähernd gleich verhaltende  $^{86}\text{Rb}$  benützt. Pro USSING-Kammer kann nur eine Transportrichtung, also entweder von mukosal nach serosal ( $J_{ms}$ ) oder von serosal nach mukosal ( $J_{sm}$ ), untersucht werden. Um aus den beiden Transportrichtungen die Nettotransportraten bestimmen zu können, mussten diese an elektrophysiologisch ähnlichen Epithelien (das heißt Abweichungen von  $G_t$  und  $I_{sc}$  von höchstens 25%), untersucht werden. Diese "Paarung" erfolgte vor der Zugabe von Rb in die USSING-Kammern, nach einer Äquilibrationszeit von ca. 20 Minuten unter short circuit-Bedingungen. Danach erfolgte die Zugabe des Rb entweder zur mukosalen oder zur serosalen Pufferlösung, die dadurch zur sogenannten "heißen" Seite wurde. Nach einer Äquilibrationszeit von ca. 45 Minuten wurde aus jeder heißen Seite eine Probe von 100 $\mu\text{l}$  entnommen.

Direkt danach wurde aus der jeweils verbleibenden Seite, also der "kalten" Seite, die Nullprobe mit einem Volumen von 750 $\mu\text{l}$  entnommen. Je nach Versuchszweck wurden die restlichen Proben gleichen Volumens aus der kalten Seite nach einem definierten Zeitraum, in der Regel eine Stunde, entnommen. Nach jeder Probenentnahme wurde der Puffer wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

Wurde ein Versuch mit Hemmstoffen durchgeführt, wurde nach Zugabe des jeweiligen Hemmstoffes 20 Minuten inkubiert, bevor die erste Probe genommen wurde.

Bei Versuchen mit magnesium- und calciumfreiem Grundpuffer wurde der Versuch mit dem calcium- und magnesiumhaltigen Grundpuffer begonnen und vor Zugabe der Aktivität mukosal ein Pufferwechsel durchgeführt.

Nach der letzten Probe aus der kalten Seite wurde eine zweite 100 $\mu\text{l}$ -Probe aus der heißen Seite entnommen und der Versuch damit abgeschlossen.

### **7. Lösungen und Chemikalien**

Zur Herstellung aller Pufferlösungen wurden Chemikalien mit p.A. Qualität (Fa. Merck, Darmstadt oder Fa. Sigma, München) verwendet. Grundlage für die Lösungen war destilliertes Wasser. Der pH-Wert wurde auf  $7,4 \pm 0,1$  (Knick pH-Meter, Knauer, Berlin) bei 38 °C und Sauerstoff- oder Carbogenbegasung eingestellt, die Osmolarität nach dem

Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung gemessen und auf  $300 \pm 10$  mosm/kg eingestellt (Roebeling, Berlin).

Zwischen Ansatz und Verwendung der Puffer lagen entweder höchstens drei Tage oder der Puffer wurde bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Wurde der calcium- und magnesiumfreie Puffer für den Versuch benutzt, wurde zusätzlich EDTA in einer Konzentration von 1 mmol/l zu dem Puffer in die Säule gegeben.

Wirkstoffe, die bei den verschiedenen Versuchsansätzen zugegeben wurden, sind jeweils einen Tag vor Versuchsbeginn oder am gleichen Tag frisch hergestellt worden. Dabei wurde mit maximalen Konzentrationen gearbeitet, um durch die Zugabe des Puffervolumen während des Versuchs so wenig wie möglich zu verändern.

Alle Substanzen kamen in flüssigen Lösungen zum Einsatz.

Die verwendeten Substanzen mit Angaben zu deren Lösungsmitteln und Konzentrationen sind dem Anhang zu entnehmen.

### **8. Radioaktivitätsbestimmung**

Die jeweiligen Radioaktivitäten der entnommenen Proben wurden nach Auffüllen der Probe auf ein Volumen von 5ml mit Szintillatorflüssigkeit (Zinsser Analytik, Frankfurt) in einem Betazähler der Perkin Elmer bestimmt.

### **9. Berechnung der transportierten Ionenmenge**

Die vom Epithel transportierte Ionenmenge pro Zeiteinheit und Fläche  $J_{ms}$  bzw.  $J_{sm}$  berechnet sich mit folgender Gleichung:

$$J = \frac{P_2 \cdot V_0 / V_P - P_1 \cdot (V_0 - V_P) / V_P}{A_{k\text{ spez.}} \cdot A \cdot t}$$

mit  $J$  = Ionenflux in  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$

$P_1$  = Radioaktivität der zu Beginn der Transportratenperiode gezogenen Probe (cpm)

$P_2$	=	Radioaktivität der am Ende der betreffenden Transportratenperiode gezogenen Probe (cpm)
$V_0$	=	Volumen im Reservoir (18ml)
$V_P$	=	Probenvolumen (750 $\mu$ l)
$A_{k\text{ spez}}$	=	Spezifische Aktivität (cpm/ $\mu$ mol)
$A$	=	freie Kammerfläche (3,14 cm <sup>2</sup> )
$t$	=	Dauer der Transportratenperiode (h)

### **10. Statistik**

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel der Einzelwerte  $\pm$  mittlere Abweichung davon (= S.E.M. = standard error of mean) angegeben. Die Bezeichnung "N" steht dabei für die Anzahl der Versuchstiere und "n" für die Anzahl der untersuchten Gewebe. Wie sich die einzelnen Gewebestücke bei den verschiedenen Versuchsansätzen auf Tiere und unterschiedliche Versuchsbedingungen verteilen, ist Übersichtstabellen im Anhang zu entnehmen.

Für die statistische Auswertung musste zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen differenziert werden. Bei den Versuchsansätzen, die im Folgenden als "vorher-nachher-Versuch" oder als "Parallelversuch" bezeichnet werden, ließen sich die interessierenden Versuchsbedingungen an denselben Tieren studieren. Daneben gab es auch noch Fragestellungen, zu deren Bearbeitung Versuche an verschiedenen Tieren durchgeführt wurden.

#### "vorher-nachher-Versuch"

Bei einem „vorher-nachher-Versuch“ wurden ein- und dieselben Gewebestücke eines Tieres unter verschiedenen Behandlungen betrachtet.

Lägen nur die Epithelien eines einzelnen Tieres vor, wären bei der Auswertung zwei Haupteffekte zu berücksichtigen, ein zufälliger Effekt der Epithelien und ein systematischer der Versuchsbedingungen. Damit im Ergebnis von einem systematischen Effekt der Versuchsbedingungen die Rede sein kann, müsste der Unterschied zwischen den unter den verschiedenen Bedingungen erfolgten Messungen deutlich über den Effekt einer zufälligen Wechselwirkung zwischen Epithelien und Versuchsbedingungen hinausgehen.

Der Effekt dieser Wechselwirkung wäre wiederum im Vergleich zu einer Basisstreuung zu bewerten, die man durch Mehrfachmessungen an demselben Epithel und unter derselben Bedingung bekäme. Das Vorliegen so einer Wechselwirkung hieße, dass die Epithelien des Tieres unterschiedlich auf die Versuchsbedingungen reagieren. Liegen bei der Auswertung keine Mehrfachmessungen vor, kann allerdings nur der systematische Effekt der Versuchsbedingungen im Vergleich zum zufälligen Wechselwirkungseffekt zwischen Epithelien und Versuchsbedingungen bewertet werden.

Mit der Wiederholung des Versuchs an mehreren Tieren kommen zusätzliche zufällige Unterschiede zwischen den Tieren in die Betrachtung, entweder als Niveauunterschiede, die sich als Haupteffekt insgesamt bei allen Werten der Tiere zeigen, oder als zufällige Wechselwirkung mit dem Effekt der Versuchsbedingungen. Das Vorliegen dieser Art von Wechselwirkung hieße, dass Tiere als solche unterschiedlich auf die Versuchsbedingungen reagieren.

Unter den Annahmen, dass die Messungen an Epithelien desselben Tieres unter gleichen Bedingungen annähernd normalverteilt sind und sich keine wesentlichen Streuungsunterschiede bei den verschiedenen Versuchsbedingungen und Tieren zeigen, lassen sich die im Mittel vorgefundenen Unterschiede mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse charakterisieren. Zur Klärung, ob diese Annahmen haltbar sind, wurde jeweils ein Test der Varianzhomogenität nach Levene durchgeführt. Die Hypothese gleicher Varianzen bei den Epithelien desselben Tieres unter den verschiedenen Bedingungen wurde als unzuverlässig angesehen, wenn sich eine Überschreitungswahrscheinlichkeit  $p$  kleiner als 0.01 ergab. Ein derartiges Ergebnis wurde als Hinweis gewertet (neben der graphischen Darstellung der Einzelergebnisse und der beschreibenden Statistiken), dass die Streuungsverhältnisse bei den Tieren und Bedingungen nicht homogen waren. Das Ergebnis der Varianzanalyse ist in solchen Fällen daher mit Vorsicht zu interpretieren.

Den Varianzanalysen für „vorher-nachher-Versuche“ wurde folgendes Modell zugrunde gelegt:

$$y_{ijk} = a_i + \beta_j + e_{k(i)} + \beta_j a_i + \beta_j e_{k(i)} + w_{ijk}$$

wobei  $y_{ijk}$  den Messwert (z.B. Nettoflux) für Epithel  $k$  unter Versuchsbedingung  $j$  beim  $i$ -ten Tier bezeichnet, der sich beschreiben lässt durch:

- einen zufälligen Haupteffekt des  $i$ -ten Tieres,  $a_i$ ,



## Material und Methoden

---

- einen festen Haupteffekt der  $j$ -ten Versuchsbedingung,  $\beta_j$ , über alle Tiere und Epithelien,
- einen zufälligen Haupteffekt des  $k$ -ten Epithels innerhalb des  $i$ -ten Tieres,  $e_{k(i)}$ ,
- einen zufälligen Wechselwirkungseffekt zwischen Tier  $i$  und Versuchsbedingung  $j$ ,  $\beta_j a_i$ , der auftritt, wenn die Tiere unterschiedlich auf die Versuchsbedingungen reagieren,
- und einen zufälligen Wechselwirkungseffekt zwischen Versuchsbedingung  $j$  und Epithel  $k$  innerhalb des Tieres  $i$ ,  $\beta_j e_{k(i)}$ , der auftritt, wenn innerhalb der Tiere die Epithelien unterschiedlich auf die Versuchsbedingungen reagieren,
- und – im Prinzip – noch eine Reststreuung  $w_{ijk}$ , die sich quantifizieren und zur Bewertung der Wechselwirkung heranziehen lässt, wenn je Epithel und Versuchsbedingung Messwiederholungen vorliegen.

Die Bezugsbasis zur Bewertung des zufälligen Wechselwirkungseffektes zwischen Tieren und Versuchsbedingungen,  $\beta_j a_i$ , und des zufälligen Effektes der Epithelien innerhalb der Tiere,  $e_{k(i)}$ , bildet die Wechselwirkung der Epithelien und Versuchsbedingungen,  $\beta_j e_{k(i)}$ .

Zur Bewertung des zufälligen Haupteffektes der Tiere,  $a_i$ , werden alle anderen zufälligen Effekte herangezogen: der Effekt der Epithelien innerhalb der Tiere,  $e_{k(i)}$ , und die beiden Wechselwirkungen,  $\beta_j a_i$  und  $\beta_j e_{k(i)}$ .

Zur Bewertung des systematischen Effektes der Versuchsbedingungen,  $\beta_j$ , werden die beiden zufälligen Wechselwirkungseffekte,  $\beta_j a_i$  und  $\beta_j e_{k(i)}$ , herangezogen.

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  $p < 0.05$  bzw. ein Signifikanzniveau bei 0.05).

### "Parallelversuch"

Bei einem „Parallelversuch“ wurden verschiedene Gewebestücke desselben Tieres unterschiedlich behandelt und verglichen.

Würden nur Epithelien eines einzelnen Tieres betrachtet, müsste der Unterschied zwischen den Mittelwerten der Vergleichsgruppen deutlich über die Basisstreuung (zwischen Epithelien desselben Tieres unter gleichen Bedingungen) hinausgehen, damit von einem systematischen Effekt der Versuchsbedingungen gesprochen werden kann.

Mit der Wiederholung des Versuchs an mehreren Tieren kommen aber auch noch zufällige Unterschiede zwischen den Tieren ins Spiel, entweder als Niveauunterschiede, die sich als Haupteffekt insgesamt bei allen Gewebestücken der Tiere zeigen, oder als zufällige Wechselwirkung mit dem Effekt der Versuchsbedingungen. Das Vorliegen einer Wechselwirkung hieße wieder, dass Tiere unterschiedlich auf die Versuchsbedingungen reagieren.

Unter den gleichen Annahmen wie bei einem „vorher-nachher-Versuch“ lassen sich die im Mittel vorgefundenen Tier- und Gruppenunterschiede mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse charakterisieren.

Das zugrundegelegte Modell hatte bei diesem Versuchsansatz die Form:

$$y_{ijk} = a_i + \beta_j + a_i\beta_j + e_{ijk}$$

wobei  $y_{ijk}$  den Messwert (z.B. Nettoflux) für Epithel  $k$  unter Versuchsbedingung  $j$  beim  $i$ -ten Tier bezeichnet, der sich beschreiben lässt durch:

- einen zufälligen Haupteffekt des  $i$ -ten Tieres,  $a_i$ ,
- einen festen Haupteffekt der  $j$ -ten Versuchsbedingung,  $\beta_j$ , über alle Tiere hinweg,
- einen zufälligen Wechselwirkungseffekt zwischen Tier  $i$  und Versuchsbedingung  $j$ ,  $a_i\beta_j$ , der auftritt, wenn die Tiere unterschiedlich auf die Versuchsbedingungen reagieren,
- und einen zufälligen Rest,  $e_{ijk}$ , der die Streuung zwischen den Epithelien desselben Tieres unter gleichen Bedingungen charakterisiert.

Zur Bewertung des zufälligen Wechselwirkungseffektes zwischen Tieren und Versuchsbedingungen werden die der Wechselwirkung zuschreibbaren Abweichungen zur Reststreuung  $e_{ijk}$  in Beziehung gesetzt.

Die Basis zur Bewertung der beiden Haupteffekte bildet der Wechselwirkungseffekt, zu dem die durch die zufälligen Tiereffekte bedingten und die den festen Effekten der Versuchsbedingungen zuschreibbaren Abweichungen in Beziehung gesetzt werden.

## Material und Methoden

---

Auch hier soll von einem erkennbaren Effekt 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  $p < 0.05$  bzw. ein Signifikanzniveau bei 0.05).

### Versuch an verschiedenen Tieren

Bei diesem Versuchsansatz werden die zu vergleichenden Versuchsbedingungen an Gewebestücken unterschiedlicher Tiere betrachtet.

Ein Vergleich der Versuchsbedingungen innerhalb der Tiere wie im „vorher-nachher-“ oder im „Parallelversuch“, also unter Ausschaltung der zusätzlichen Unterschiede zwischen den Tieren, war in diesem Fall nicht möglich. Zudem zeigten sich bei den Untersuchungen, die an verschiedenen Tieren durchgeführt wurden, so große Streuungen innerhalb des Tiermaterials, dass entschieden wurde, sie nicht weiter biometrisch auszuwerten, sondern die Messergebnisse nur graphisch darzustellen.