

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Einleitung

Das Ziel der Untersuchung war es, mit einer direkten volumetrischen Meßtechnik die Durchlässigkeit des Pansenepithels bei mitteleuropäischen Schafen für Wasser zu bestimmen. Es wurde ein Vierkanalsystem verwendet, das anhand einer Vorversuchsreihe mit dem Pansenepithel von Schafen und vier Versuchspuffern überprüft wurde. Die Puffer des Vorversuches besaßen Osmolaritäten zwischen 225 und 450 mosmol pro Liter. Diese Osmolaritäten lagen im Bereich des Hauptversuches.

3.2. Material

3.2.1. Versuchstiere

Die Schafe (mitteleuropäische Schafe vorwiegend der Rasse schwarzköpfiges Fleischschaf) für die Versuchsreihen stammten von einem Schäfer. Bevor eine Versuchsreihe gestartet wurde, befanden sich die Tiere für mindestens vier Wochen im Institut für Veterinärphysiologie der Freien Universität Berlin. Dort erhielten die Tiere entsprechend der Versuchsanordnung eine spezielle Fütterung. Die Rasse und das Geschlecht der Schafe war für diesen Versuchsansatz nicht von Bedeutung. Das Alter der Tiere war generell über zwei Jahre. Somit handelte es sich um relativ alte Tiere, deren Pansenschleimhaut sich in ihrer Struktur schon mehrfach an einen Futterwechsel angepaßt hatte. Das Pansenepithel wurde aus frisch geschlachteten Schafen entnommen. Die Tiere wurden im nahegelegenen Schlachthaus der Versuchsstation "Tierzucht" der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der Humboldt Universität zu Berlin geschlachtet.

3.2.2. Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden während der gesamten Fütterungsphase des Versuches im Stall gehalten. Somit war eine kontrollierte Fütterung gewährleistet. Über eine Selbsttränke stand ihnen Wasser ad libitum zur Verfügung. Sie hatten jederzeit freien Zugang zu einem Salzleckstein.

Die Tiere der ersten Versuchsreihe wurden in einer Gruppe gehalten und erhielten über die gesamte Haltungsperiode Wiesenheu ad libitum. Eine Zufütterung von Kraft- oder Saffutter erfolgte nicht. Die Tiere der zweiten Versuchsreihe wurden in Einzelboxen gehalten und erhielten 800 Gramm Kraftfutter pro Tag (Holstenstolz, Ströh, Hobbersdorf). Das Kraftfutter hatte folgende Zusammensetzung: Rohprotein 16,0 %, Rohfett 3,0 %, Rohfaser 13,0 %, Rohasche 9,5 %, Calcium 1,2 %, Phosphor 0,5 % und Natrium 0,5 %. Dieses entsprach 5,9 MJ ME pro Kilogramm oder 600 Stärkeeinheiten. Außerdem enthielt das Kraftfutter Zusatzstoffe je Kilogramm: 10.000 I. E. Vitamin A, 1.250 I. E. Vitamin D₃, 30 mg Vitamin E und 60 mg Vitamin C. Die Kraftfuttergabe wurde auf zwei Portionen aufgeteilt. Zusätzlich stand den Schafen Wiesenheu ad libitum zur Verfügung. Vor der Schlachtung mußten die Tiere mindestens drei Wochen die spezielle Fütterung der Versuchsreihe erhalten haben. In dieser Zeit erfolgte die Anpassung des Epithels an die neue Fütterung.

3.3. Methoden

3.3.1. Entnahme, Präparation und Behandlung des Pansenepithels

Unmittelbar nach dem Betäuben (Bolzenschuß) und dem Entbluten der Tiere wurde die Leibeshöhle eröffnet und das Vormagenkonvolut ausgeweidet. Nach Eröffnung und Entleerung des Pansens wurde, wenn möglich, der gesamte ventrale Pansensack entnommen. Für den Versuch kamen nur ventrale Schleimhautbezirke in Frage, die wenig verhornt, nicht vernarbt und gleichmäßig mit Zotten besetzt waren. Von der Betäubung bis zur Entnahme des Schleimhautareals vergingen circa drei bis vier Minuten. Die entnommenen Gewebestücke wurden durch mehrmaliges Spülen in einer 38° C warmen, auf pH 7,4 eingestellten und mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂, Messer-Greishelm, Berlin) begasten Pufferlösung (Transportpuffer, siehe Anhang) von den anhaftenden Futterresten befreit und bis zur Präparation in eine frische Transportpufferlösung gelegt. Die eigentliche Schleimhaut wurde von der anhaftenden Muskelschicht (Tunica muscularis) von Hand befreit.

Für den Transport in das Labor wurde das Epithel in ein mit zwei bis drei Liter Transportpuffer gefülltes Thermogefäß (DEWAR) gegeben. Die Temperatur des Puffers betrug ebenfalls 38° C. Der Puffer wurde während des Transportes kontinuierlich mit Carbogen begast. Die Transportzeit zum Untersuchungslabor betrug zwischen 15 und 20 Minuten. Im Labor wurden die Epithelstücke in einen mit Sauerstoff begasten Fettsäurepuffer (isoosmotischer Puffer, 300 mosmol pro Liter, siehe Anhang) überführt und fünf bis zehn Minuten inkubiert. Nachdem die Stücke passend zugeschnitten waren, erfolgte das Einspannen der Epithelien in die modifizierte Kammer nach USSING (1949) und das Auffüllen mit dem isoosmotischen Puffer, der osmotische Druck wurde mit Mannit erzeugt. Erst nach der Anpassung des Epithels an diesen Puffer (Äquibrierung) wurde dieser durch die eigentlichen Versuchspuffer ersetzt.

3.3.2. Versuchsaufbau

3.3.2.1. Modifizierte Kammer nach USSING

Zentraler Bestandteil der Untersuchungsanlage war eine modifizierte Kammer nach USSING (Abb. 2). Diese Kammer bestand aus zwei Hälften, zwischen denen das zu untersuchende Gewebe eingespannt wurde, so daß es von beiden Seiten mit Puffer umspült wurde. Um Quetschungen der Geweberänder, sogenannten "edge damage" und damit eine Beeinflussung der Meßergebnisse zu vermeiden, wurden zwischen dem Epithel und den Kammerblöcken passend zugeschnittene Silikonscheiben eingelegt. Der freie Durchmesser der Kammer betrug in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen 1,6 Zentimeter, die dem Inkubationsmedium ausgesetzte Epithelfläche hatte folglich eine Fläche von 2,0 cm².

Das Gewebe wurde in allen Fällen so fixiert, daß die serosale Seite des Epithels der „geschlossenen“ unteren Hälfte und die Mukosa der „offenen“ oberen, begasten Hälfte des Blockes zugekehrt war. In dieser einseitig mit Sauerstoff begasten Kammer blieb das Epithel während der gesamten Dauer des Versuches. Beide Kammern der modifizierten Kammer nach USSING enthielten wasserdurchströmte Bohrungen. Durch diese Bohrungen wurde 47° C warmes Wasser gepumpt, das dafür sorgte, daß die Puffer auf beiden Seiten des Epithels bei konstanten 38° C gehalten wurden.

Zur Kontrolle der Lebensfähigkeit der Epithelien wurde die transmurale Potential-Differenz (PD_t) kontinuierlich aufgezeichnet. Zu diesem Zweck befanden sich auf der serosalen wie auf der mukosalen Seite des Epithels gewebe-nah je eine KCl-Agarbrücke, die mit in KCl stehenden Ag-AgCl-Elektroden (Type: 363-S7/120, Mettler-Toledo, Urdorf, Schweiz) verbunden waren. Zur Aufzeichnung der Meßwerte wurden die Elektroden mit einem Flachbrettschreiber (MODEL BD 112, Kipp & Zonen, Delft, Niederlande) verbunden. Als eine weitere Kontrolle über den Zustand des Epithels und des Puffers wurde von dem Puffer auf der serosalen "geschlossenen" Seite nach jedem Versuch der pH-Wert bestimmt (DIGITAL-pH-Meter 646, Knick, Berlin).

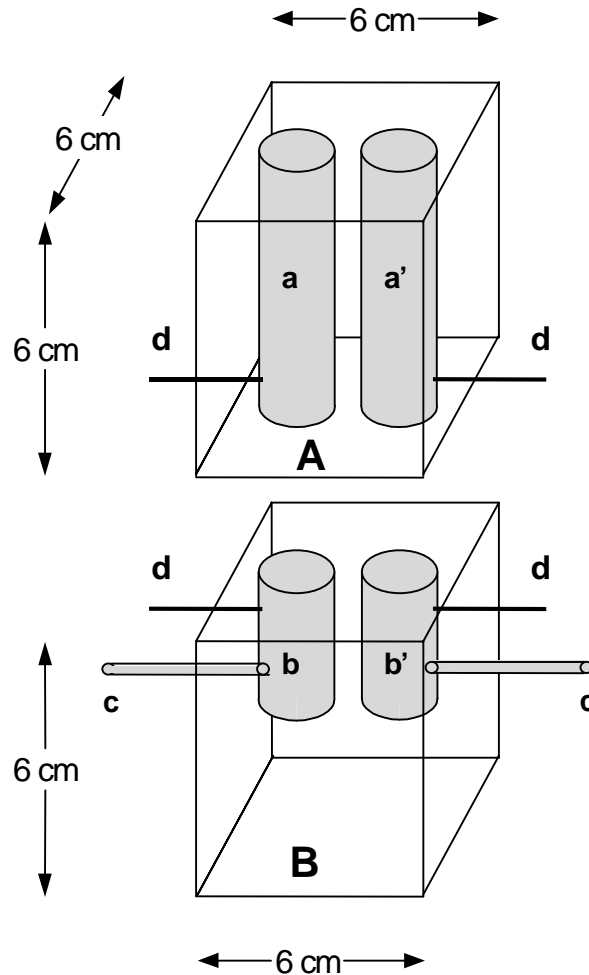


Abb. 2: Modifizierte Kammer nach USSING

Dargestellt ist die modifizierte Kammer nach USSING mit der oberen Hälfte (**A**), der unteren Hälfte (**B**) und den vier Bohrungen für die Puffer. Zwischen den beiden Blöcken befanden sich während des Versuchs die Epithelstücke. Die beiden oberen Bohrungen (**a**; **a'**) wurden begast („offene“ Seite), während die beiden unteren Bohrungen (**b**; **b'**) nicht begast wurden. Der Ausgleich des transportierten Wassers erfolgte über die Wasserbohrungen (**c**). Die transmurale Potentialdifferenz wurde über KCl-Brücken (**d**) zu Ag-AgCl Elektroden geleitet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden das Epithel und die Wärmebohrungen nicht mit eingezeichnet.

3.3.2.2. Bestimmung der Wassertransportraten

Nach der Präparation und dem Einspannen der Gewebe in die modifizierte Kammer nach USSING war eine Äquilibration des Epithels erforderlich. Hierzu wurde der isoosmotische Puffer auf beiden Seiten des Systems zugesetzt. Die Äquilibration war abgeschlossen, wenn die PD_t -Messung einen stabilen Wert (nach circa 20 - 45 min) ergab. Anschließend wurden auf der „offenen“ mukosalen Seite die Puffer ausgetauscht. Auf der serosalen Seite verblieb der isoosmotische Puffer. Bei den mit Heu und den mit Kraftfutter gefütterten Tieren wurde in zwei Versuchsreihen zum einen ein Puffer benutzt, dessen osmotischer Druck mit Mannit (s. Anhang) und zum anderen ein Puffer, dessen osmotischer Druck mit den Kaliumsalzen der drei flüchtigen Fettsäuren Acetat, Butyrat und Propionat (s. Anhang) eingestellt wurde. Die Osmolarität der Pufferlösungen wurde mit Hilfe der Gefrierpunktserniedrigung bestimmt (Osmomat 030, Gonotec, Berlin). Es wurden zwei hypotone (225 und 260 mosmol pro Liter), eine isotone (300 mosmol pro Liter) bzw. vier hypertone Puffer (325; 350; 375 oder 450 mosmol pro Liter) verwendet. Jedes Epithelstück wurde nur einmal mit einer der genannten Osmolaritäten untersucht.

Bei dieser Versuchsanordnung standen vier Kammern zur Verfügung. Die Versuchsanordnung sah aber sieben Puffer vor. Aus diesem Grund wurde bei jedem einzelnen Durchgang der isoosmotische Puffer der Versuchsreihe als Kontrolle mitverwendet. Aus den beiden Werten des isoosmotischen Puffers wurde ein Mittelwert gebildet. Die Verteilung auf die einzelnen Kammern wurde wahllos vorgenommen. Dem Puffertausch folgte eine dreißig-minütige Äquilibrationszeit. Danach erfolgte die Messung der Wassertransportraten über 30 Minuten.

Die direkte quantitative Messung des Wassertransportes erfolgte mit dem „Nanoinjektor“ der Firma Cosinus. In der für diese Versuche angefertigten und modifizierten Version handelte es sich um ein computergesteuertes Vierkanalsystem, das Wasserbewegungen im Nanoliterbereich registrierte und in Sekundenfrist ausglich. Dadurch arbeitete das System selbst bei größeren Flußraten ständig im hydrostatischen Äquilibrium, so daß für die auftretenden Wasserflüsse

lediglich osmotische Gradienten und Transportvorgänge im untersuchten Epithel verantwortlich sein konnten.

Das System bestand aus einem handelsüblichen Personal Computer, der mit einer entsprechenden Hard - und Software vom Hersteller ausgerüstet wurde, einer elektronischen Steuereinheit für vier Kanäle, einer Detektoreinheit für die vier Kanäle und den jeweiligen Verbindungskabeln und Schläuchen (BOURGUET und JARD, 1964). In der Abbildung 3 ist der Aufbau schematisch dargestellt.

Das Prinzip dieser Messung war hierbei das der „kommunizierenden Röhren“: Die „geschlossene“ Seite der modifizierten Kammer nach USSING war über dünne Schläuche mit der Detektoreinheit verbunden. Diese bestand aus einem zweigeteilten Plexiglasblock. In dem Block befand sich pro Kanal eine waagerechte Bohrung, deren eine Seite mit dem von der modifizierten Kammer nach USSING kommenden Schlauch verbunden war, während die zweite Seite die Verbindung jeweils mit einer ausgleichenden Mikropumpe herstellte. In der Mitte des Blockes war pro Kanal eine zweite, senkrechte Bohrung angebracht, die an ihrem tiefsten Punkt auf die erste, waagerechte Bohrung traf. Diese zweite Bohrung, die bis zur Oberfläche des Plexiglasblockes führte, verbreiterte sich an ihrem oberen Ende konisch. Dadurch entstand auf der „geschlossenen“ Seite des Systems erstmals eine Öffnung zur Atmosphäre. Folglich änderte sich der Flüssigkeitsspiegel an dieser Stelle in direkter Abhängigkeit zu einem möglichen Flüssigkeitsnettotransport im Gewebe.

Die senkrecht eingeklebte Platinnadel des Aufsatzes, die über einen elektrischen Kontakt mit der elektronischen Einheit verbunden war, ragte bei korrekter Ausrichtung so weit in den Plexiglasblock hinein, daß ihre Spitze am Beginn der konischen Erweiterung der senkrechten Bohrung, die ebenfalls über einen elektrischen Kontakt mit der elektronischen Einheit verbunden war, endete. Stand eine Flüssigkeit in diesen kommunizierenden Röhren, deren Pegel die konische Erweiterung der senkrechten Bohrung erreichte, so war die Platinnadel des Aufsatzes in diese Flüssigkeit eingetaucht und der elektrische Stromkreis der elektronischen Einheit über die beiden Kontakte geschlossen. Wurde in der modifizierten Kammer nach USSING Flüssigkeit von der „geschlossenen“, serosalen

zur „offenen“, mukosalen Seite transportiert, so sank der Pegel in der senkrechten Bohrung der Detektoreinheit und unterbrach dadurch den elektrischen Stromkreis. Daraufhin sendete die elektronische Einheit so lange ein Arbeitssignal an die ausgleichende Mikropumpe, bis das notwendige Volumen aufgefüllt und der Stromkreis wieder geschlossen war. Gleichzeitig meldete sie dieses Volumen pro (vorzuwählender) Zeiteinheit an den Computer, der dieses automatisch speicherte. Bei einem Wassertransport von der mukosalen zur serosalen Seite bestand die Möglichkeit, mit Hilfe der elektronischen Einheit die Mikropumpen umzuschalten. Durch die aufsteigende Wassersäule wurde zwischen den beiden Platinnadeln ein Kontakt geschlossen. Daraufhin sendete die elektronische Einheit wieder ein Arbeitssignal an die ausgleichende Mikropumpe, jedoch zog die Pumpe in diesem Falle das Wasser solange aus der Bohrung bis der Kontakt unterbrochen wurde. Gleichzeitig meldete sie wieder dieses Volumen pro Zeiteinheit an den Computer, der dieses automatisch speicherte.

Als Ergebnis erhielt man dann das transportierte Nettovolumen pro Zeiteinheit. Sie betrug in dieser Versuchsreihe immer eine Minute.

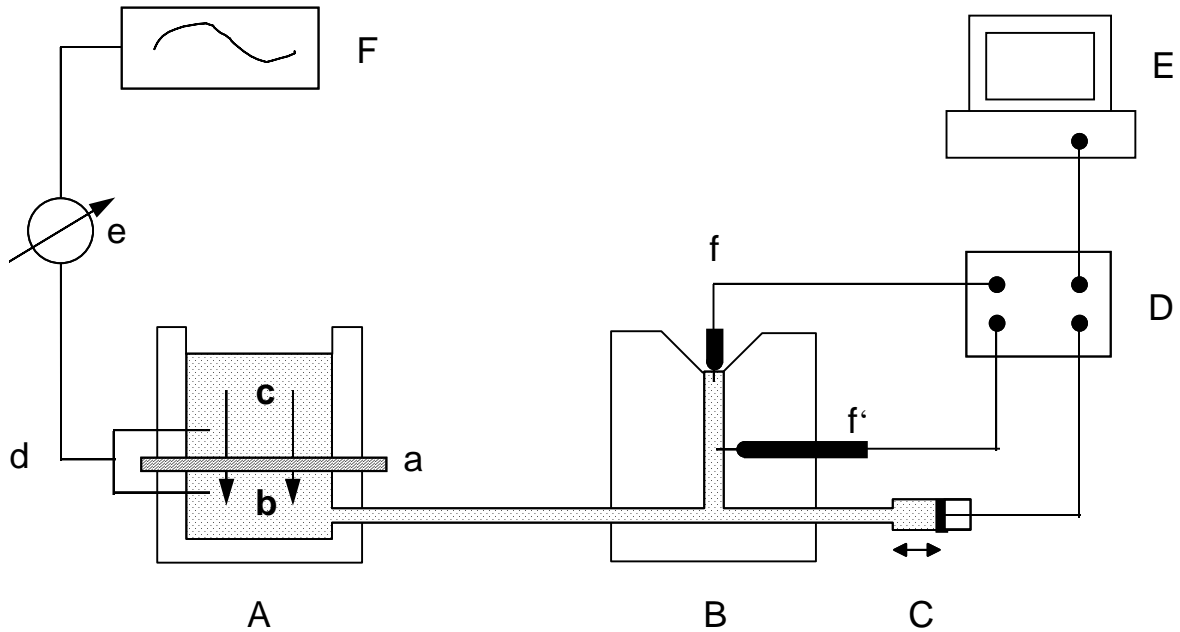


Abb. 3: Versuchsaufbau

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues: Modifizierte Kammer nach USSING (A), mit eingespanntem Epithel (a), der serosalen Pufferlösung (b) und der mukosalen Pufferlösung (c). Die transmurale Potentialdifferenz wird über KCl-Brücken (d) abgegriffen und mit Ag-AgCl Elektroden (e) abgeleitet. Die Aufzeichnung erfolgt mit einem Flachbrettschreiber (F). In der Detektoreinheit (B) wird der Wasserstand über zwei Platinnadeln (f und f') bestimmt, die Steuerung der ausgleichenden Mikropumpen (C) erfolgt in der elektronischen Einheit (D). Diese Einheit meldet die benötigten Umdrehungen an den Computer (E).

3.3.3. Gewicht und Oberfläche der untersuchten Pansenepithelien

Nach Beendigung jedes einzelnen Versuches wurden die Epithelien des eigentlichen Meßbereiches ausgestochen und auf einer Analysenwaage (A 200S, Satorius, Göttingen) das Gewicht in frischem Zustand bestimmt. In einem Trockenofen (U10, Memmert, Schwabach) wurden die Epithelien anschließend bei 80° C getrocknet und das Trockengewicht bestimmt.

In der Auswertung der Daten wird das Trockengewicht der Epithelien in bezug zu den Wassertransportraten gesetzt. Es sollte überprüft werden, ob die Schwankungen in den Meßergebnissen mit den gemessenen Gewichten in Beziehung stehen.

3.4. Statistik

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Anzahl der Tiere je Fütterungsgruppe und Puffer die Abkürzung „N“ verwendet. Als Lagemaß wurde der arithmetische Mittelwert und als Streuungsmaß der mittlere Fehler des Mittelwertes (Standardfehler), englisch: Standard Error of Means (S. E. M.), berechnet. Der S. E. M. kann auch als Standardabweichung der Mittelwerte betrachtet werden und ergibt sich als

$$\text{S. E. M.} = s (\sqrt{n})^{-1}.$$

Hierbei ist **n** die Anzahl der Werte aus denen der Mittelwert gebildet wird. Bei diesen Versuchen ist $n = 30$; **s** ist die Standardabweichung der dreißig Einzelwerte. Die dargestellten Regressionsgeraden durch die arithmetischen Mittelwerte wurden durch die Gleichung $y = a \cdot x + b$ beschrieben.

Die verwendeten statistischen Verfahren dienen dazu, die Struktur der Daten zu beschreiben. Als Versuchseinheit wurde das Pansenepithel eines Schafes betrachtet. Dieses Epithel wurde verschiedenen Osmolaritäten ausgesetzt (7 Stufen) und die jeweiligen Wasserfluxwerte gemessen. Die Wasserfluxwerte bei einer

Osmolarität bestehen aus einer 30-minütigen Meßreihe mit dreißig Einzelwerten, die zum Teil erheblich schwanken. Der abgebildete Graph zeigt dieses deutlich (Abb. 4).

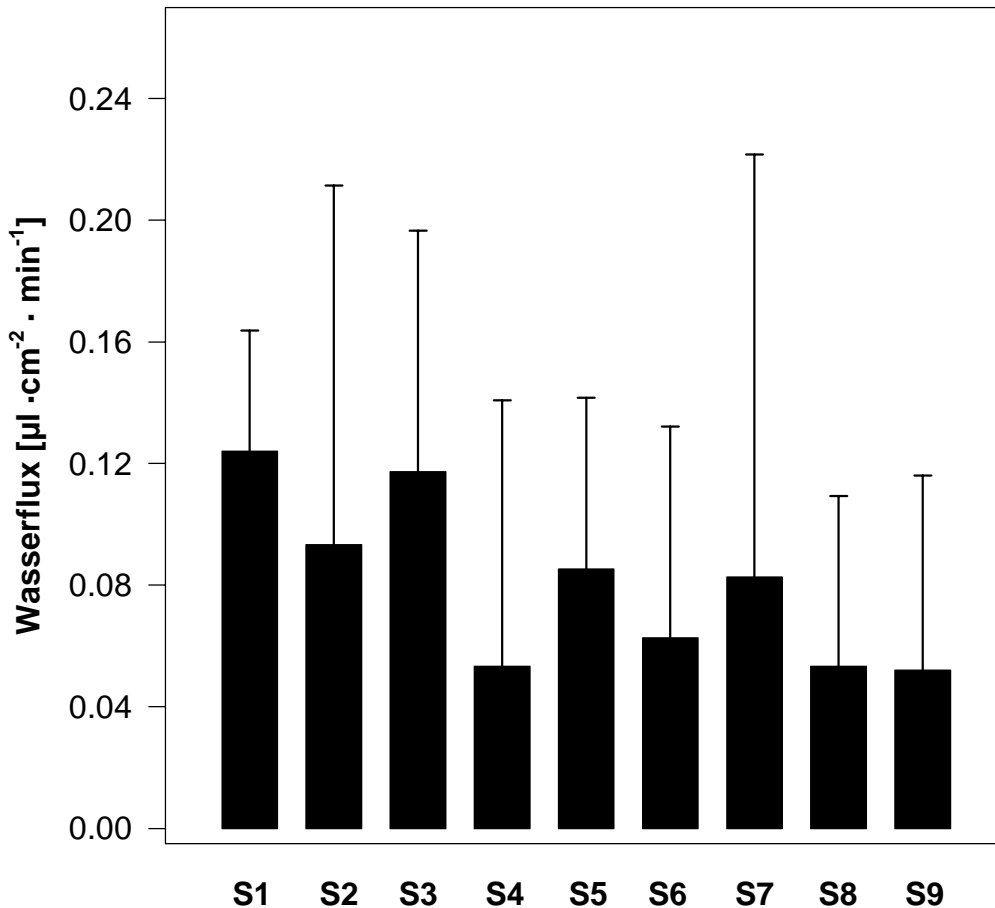


Abb. 4: Beispiel für die Einzelmeßwerte der Wasserfluxe bei 225 mosmol·l⁻¹

Die Abbildung zeigt die zum Teil hohen Standardabweichungen der Einzelwerte der Wasserfluxmessungen bei einer Osmolarität von 225 mosmol·l⁻¹. (S1-9: Kennziffern der einzelnen Tiere)

Aus diesem Grunde wurden für die weiteren Berechnungen die Summen der Einzelwerte der 30-minütigen Wasserfluxmessungen gebildet. Somit ergaben sich sieben Werte pro Tier. Desweiteren wurden diese Werte auf eine Stunde hochgerechnet, um somit eine Vergleichsbasis mit den Literaturangaben zu schaffen.

Die Berechnung der Summe der Einzelwerte der 30-minütigen Wasserfluxmessungen machte es möglich, die Werte der Tiere einer Fütterungsgruppe als Verlaufskurve darzustellen. Durch die visuelle Inspektion der Verlaufskurven und die unifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwertwiederholung war es möglich zu entscheiden, ob es neben den durch die Osmolarität bedingten Unterschieden noch erkennbare Unterschiede zwischen den Tieren zu verzeichnen gab.

Desweiteren wurde nach der Inspektion und der Varianzanalyse entschieden, ob eine Regressionsgerade (siehe Anhang) geschätzt werden sollte, um den Verlauf der sieben Punkte durch nur noch zwei Punkte (y-Achsenabschnitt und Steigungskoeffizient) zu charakterisieren. Durch die Bildung der Regressionsgeraden konnten die einzelnen Fütterungsgruppen mit jeweils **N** Tieren verglichen werden. In diesen Untersuchungen wurden die Steigungskoeffizienten der Regressionsgeraden der einzelnen Fütterungsgruppen miteinander verglichen. Der Vergleich von Fütterungsgruppen miteinander erfolgte mit dem Mann-Whitney-Rang-Test. Das gleiche Verfahren wurde bei dem Vergleich der PD_t-Wertmessungen durchgeführt. Signifikanzaussagen sind im Sinne einer explorativen Datenanalyse zu verstehen, als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ gewählt.

Die graphischen Darstellungen der Versuchsergebnisse wurden mit dem Computerprogramm SigmaPlot v. 2.01 (Jandel Scientific) erstellt, die statistischen Berechnungen erfolgten mit den Programmen SigmaStat v. 1.0 (Jandel Scientific) und BIAS. v. 6.0 (ACKERMANN, 1998).