# II. Material und Methoden

## 2.1 Elektrolytlösungen

Die nicht gesondert aufgeführten Versuche wurden in Standard-Parsons-Lösung (Parsons und Paterson, 1965) durchgeführt. Deren Zusammensetzung lautete (mmol·l$^{-1}$): NaCl 107, KCl 4,5, $NaHCO_3$ 25, $Na_2HPO_4$ 1,8, $NaH_2PO_4$ 0,2, $CaCl_2$ 1,25, $MgSO_4$ 1, Glucose 12. Der pH-Wert wurde mit HCl/$NaHCO_3$ auf 7,4 eingestellt und die Lösung während der gesamten Dauer der Verwendung mit Carbogen (5 % $CO_2$ / 95 % $O_2$) begast.

Für die $Rb^+$-Fluß-Messungen wurde KCl durch die gleiche Konzentration an RbCl ersetzt.

In $Cl^-$-freien Lösungen wurde NaCl durch die gleiche Konzentration an Natriumgluconat ersetzt. In diesem Fall wurde die Calcium-Konzentration auf 5,8 mmol·l$^{-1}$ angehoben, um die $Ca^{2+}$-puffernden Eigenschaften des Gluconats auszugleichen (Kenyon und Gibbons, 1977).

Für die Versuche zur Messung der Bicarbonat-Sekretion wurde eine pufferfreie Parsons-Lösung verwendet (mmol·l$^{-1}$): NaCl 135,8, KCl 4,5, Glucose 12,2, CaCl2 1,25, $MgSO_4$ 1,0. Diese Lösung wurde aus zur Entfernung von $CO_2$ abgekochtem (30 min) Aqua dest. hergestellt, das durch permanente $O_2$-Begasung mit Sauerstoff gesättigt war. Der pH-Wert wurde mit HCl/NaOH auf 7,4 eingestellt.

## 2.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten zwischen 180 g und 220 g aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und von Harlan-Winkelmann, Borschen, verwendet. Die Tiere wurden unter einem 12 h-hell-12 h-dunkel-Regime gehalten und hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser.

## 2.3 Gewebepräparation

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Ratten durch einen Schlag auf den Kopf und anschließendes Ausbluten getötet (Genehmigung der Tötung der Tiere zur Organentnahme durch das Regierungspräsidium Gießen). Anschließend wurde die Bauchhöhle entlang der Linea alba eröffnet. Das Colon descendens wurde aufgesucht und unmittelbar distal des Lymphknotens am Übergang Colon-Rectum (Lindström et al., 1979) abgesetzt. Das Colon wurde stumpf vom Mesenterium abpräpariert und proximal am Übergang zum Caecum abgetrennt.

Danach wurde das Lumen mit eisgekühlter Parsons-Lösung von Darminhalt freigespült und der Darm auf einen PVC-Stab, Durchmesser 5 mm, aufgezogen. Nach einer zirkulären Inzision mit einem stumpfen Skalpell ca. 5 mm vom distalen Darmende entfernt wurden Tunica serosa und muscularis in proximaler Richtung vorsichtig abgestreift. Das verbleibende Mucosa-Submucosa-Präparat wurde in vier ca. 3 cm lange Segmente unterteilt, jedes Stück längs eröffnet und anschließend in der Ussing-Kammer eingespannt.

Zur Unterscheidung des distalen vom proximalen Colonabschnitt dient die markante, palmblätterartige Schrägstreifung der Schleimhaut, die ausschließlich am proximalen Colon zu finden ist (Lindström et al., 1979).

## 2.4 Ussing-Kammer

Alle Versuche wurden mit Hilfe modifizierter Ussing-Kammern (Abb. II.1) ausgeführt. Eine Ussing-Kammer besteht aus zwei Plexiglasquadern. Das Gewebepräparat (s. o.) wird auf einer der Kammerhälften zwischen 7 Nadelspitzen aufgespannt. Beide Hälften werden durch Schrauben miteinander verbunden, nachdem zuvor die Kontaktflächen zum Abdichten mit Silikon (Baysilone®-Paste mittelviskös, Bayer AG, Leverkusen) bestrichen wurden. Zwischen beiden Kammerhälften verbleibt eine freie Gewebefläche von 1 $cm^2$

mit beidseitigem Kontakt zur Nährlösung. Durch die Öffnungen an der Oberseite der Kammer werden die Lösungen eingefüllt bzw. abgesaugt und durch frische Lösung ersetzt sowie Wirkstoffe zugegeben. An der Unterseite besitzt die Kammer zwei Fritten für die kontinuierliche Begasung der Elektrolytlösungen. Zweck der Begasung ist die Konstanthaltung des pH-Werts der Lösung sowie die Sauerstoffversorgung des Gewebes. Zudem besteht in der Kammer, ohne Verbindung zum Lösungsreservoir, ein Durchflußsystem mit Anschluß an einen Warmwasserkreislauf, womit die Nährlösung auf konstant 38°C gehalten wird. Das Lösungsvolumen beträgt auf beiden Seiten des Gewebes je 3,5 ml.

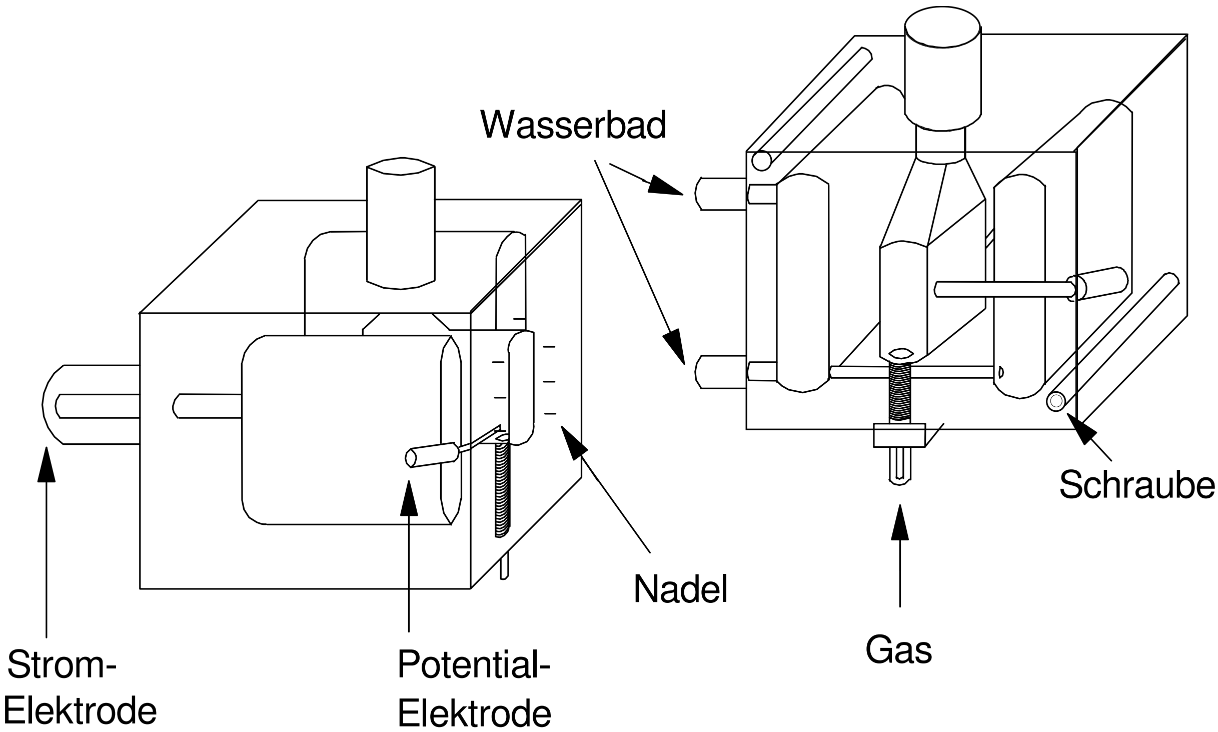


**Abb. II.1:** Schema einer modifizierten Ussing-Kammer.

Unter diesen Bedingungen bleibt das Colongewebe über 5 Stunden lebens- und funktionsfähig. Elektronenmikroskopisch sind nach dieser Versuchsdauer keine morphologischen Veränderungen festzustellen (Diener et al., 1989).

Die durch das Darmgewebe transportierten Elektrolytmengen sind zu gering, um die resultierenden Konzentrationsänderungen in den Nährlösungen auf beiden Seiten des Gewebes durch chemische Analysen bestimmen zu können. Die Ussingkammer-Technik ist eine Methode zur Erfassung des Transports von Ladung - in Form von Ionen - durch die biologische Membran. Diese elektrischen Messungen sind empfindlich genug, um die vom Gewebe erbrachten Ladungsverschiebungen mit ausreichender Genauigkeit zu messen.

## 2.5 Elektrische Messungen

Zur Durchführung der elektrischen Messungen wurden die Ussing-Kammern an eine computerkontrollierte Voltage-Clamp-Anlage (Ing. Büro für Meß- und Datentechnik, Dipl. Ing. K. Mußler, Aachen) angeschlossen. Die Kammern besaßen Silber-Silberchlorid-Elektroden zur kontinuierlichen Messung der Potentialdifferenz (Pd) zwischen beiden Kammerhälften, die über leitfähige Agarbrücken und KCl-Lösung (3 $mol \cdot l^{-1}$) mit den Elektrolytlösungen in der Kammer in Kontakt standen.

Vor den eigentlichen Versuchsbeginn war eine Meßperiode vorgeschaltet, in der die Kammern die im jeweiligen Versuch eingesetzte Elektrolytlösung enthielten, aber noch kein Gewebe. In dieser Phase wurden der Widerstand der Lösung und die Potentialdifferenz zwischen den beiden Pd-Elektroden selbst ermittelt.

Die Agarbrücken, die die Elektrolytlösungen auf beiden Gewebeseiten mit den Meßelektroden verbinden, dienen dem Schutz des Gewebes vor Kontakt mit der hochkonzentrierten KCl-Lösung, in die die Elektroden eintauchen und die das Gewebe zerstören würde. Die Kontaktflächen zwischen den Agarbrücken und der Nährlösung sind so klein, daß der Ionenaustausch zwischen Agar und Lösung vernachlässigbar gering ist.

Das zwischen den Kammerhälften eingespannte Rattencolon sezerniert spontan Anionen ($Cl^-$ und $HCO_3^-$; Strabel et al., 1995), wodurch sich zwischen der mucosalen und der serosalen Gewebeseite eine Spannung aufbaut. Die beiden Agarbrücken mit Verbindung zu den Pd-Elektroden enden dabei in größtmöglicher Nähe zum Gewebe (Abstand 1 mm). So wird die durch das Gewebe erzeugte Potentialdifferenz möglichst wenig vom Lösungswiderstand zwischen den Brücken und dem Gewebe abgeschwächt. Außerdem erfolgt durch den Computer eine automatische Korrektur der gemessenen Pd um den in der Vorlaufphase ermittelten Potentialunterschied zwischen den Elektroden selbst (Messung im sog. „Open-Circuit"-Modus, Abb. II.2.A).

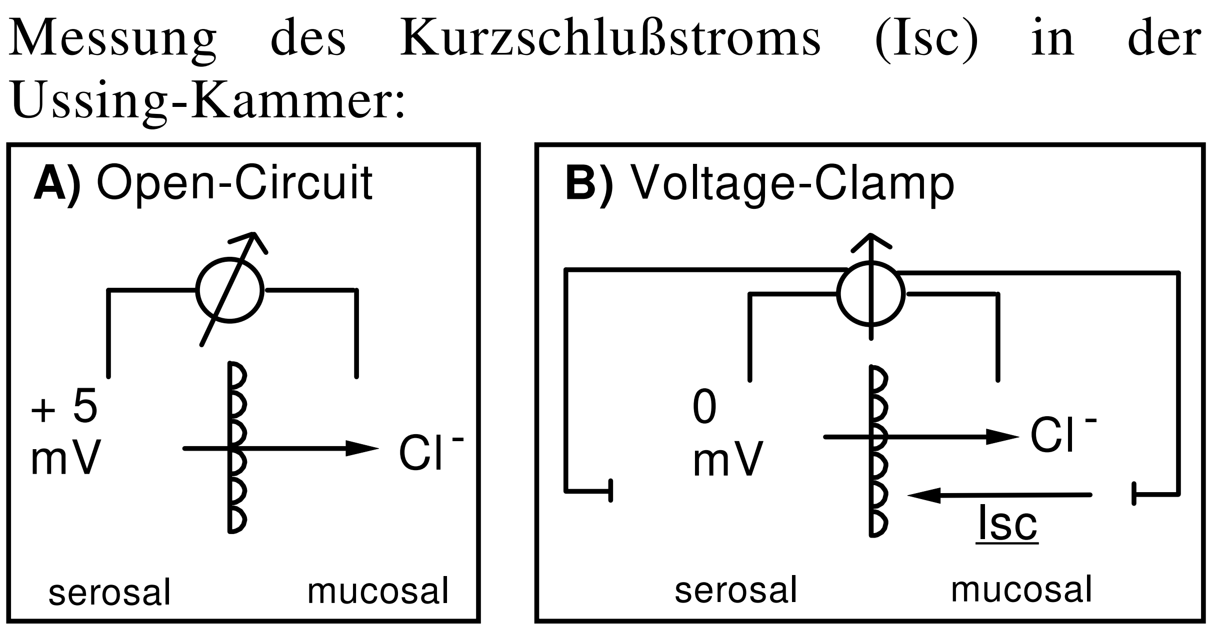


**Abb. II.2:** Das Gewebe baut spontan eine Potentialdifferenz zwischen mucosaler und serosaler Seite auf, die als treibende Kraft für Ionenbewegungen wirkt. Sie wird durch die Applikation des Kurzschlußstroms (Isc) aufgehoben.

Um den elektrischen Gradienten als treibende Kraft für eine Ionenbewegung durch das Gewebe auszuschließen, wurde die spontane Potentialdifferenz durch Applizieren eines sog. Kurzschlußstroms (Isc) über die Stromelektroden kompensiert, d.h. auf Null „geklemmt".

Die Applikation des Isc erfolgte über ein zweites Paar Ag/AgCl-Elektroden, das ebenfalls durch Agarbrücken von den Kammern getrennt war.

Die Agarbrücken der Stromelektroden enden möglichst weit entfernt vom Gewebe und besitzen einen relativ großen Durchmesser. Dadurch ist die Entfernung zwischen Agar und Gewebe in der Mitte der Meßfläche nur unwesentlich kleiner als am Rand. Dies gewährleistet eine gleichmäßige Isc-Applikation über die gesamte Gewebefläche (Messung im sog. „Voltage-Clamp"-Modus, Abb. II.2.B).

Durch die Verwendung identischer Ionenkonzentrationen in der mucosalen und serosalen Elektrolytlösung sowie gleicher Lösungsvolumina auf beiden Seiten des Gewebes wurden auch chemische und hydrostatische Gradienten ausgeschlossen. Die gemessenen Isc-Änderungen können somit nur durch aktiven Trasport von Ionen durch das Gewebe zustande kommen. Ein positiver Isc zeigt einen aktiven Netto-Kationentransport durch das Gewebe von mucosal nach serosal bzw. einen Netto-Anionentransport in umgekehrter Richtung an.

Zur Ermittlung der Gewebeleitfähigkeit (Gt) wurde alle 60 s ein bipolarer Stompuls von 50 µA über eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe appliziert. Aus der resultierenden Potentialänderung wurde anschließend nach dem Ohm´schen Gesetz die Gt berechnet (R = U/I; Gt ist der Kehrwert des Widerstands R). Der Lösungswiderstand zwischen den Agarbrücken wurde automatisch kompensiert. Isc, Pd und Gt wurden kontinuierlich aufgezeichnet und jede Minute ausgedruckt. Der Isc wurde als Ladungstransfer pro Zeit und Gewebefläche ($\mu Eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$) angegeben, um einen direkten Vergleich mit den Ionenflüssen zu ermöglichen ($26{,}9\ \mu A \cdot cm^{-2} = 1\ \mu Eq \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$).

Unter Standard-Versuchsbedingungen (identische Elektrolytlösungen in beiden Kammerhälften) werden mit der Ussing-Technik nur die aus den aktiven Ionentransporten resultierenden Netto-Ströme gemessen. Um differenzieren zu können, inwieweit Kationen- bzw. Anionenbewegungen dazu beitragen, in welcher Richtung die einzelnen Transporte erfolgen und welche Ionen im einzelnen beteiligt sind, werden zusätzlich Versuche durchgeführt, bei denen ein Teil der Ionen durch die entsprechenen Radioisotope ersetzt ist.

## 2.6 Messungen unidirektionaler Ionenflüsse

### *2.6.1 $K^+$-Flüsse*

Zur Messung der resorptiven ($J_{ms}$) und sekretorischen ($J_{sm}$) $K^+$-Ionenflüsse wurde im Versuch $K^+$ durch $Rb^+$ ersetzt. $Rb^+$ wird über die gleichen Mechanismen wie $K^+$ in der Darmwand transportiert (Foster et al., 1984); das verfügbare Radoisotop $^{86}Rb^+$ besitzt aber eine erheblich längere Halbwertzeit (17d) als das $^{42}K^+$-Isotop.

Nach einer 60-minütigen Phase, in der sich der Isc auf ein gleichmäßiges Niveau stabilisierte, wurde $^{86}Rb^+$ (37 kBq) auf einer Seite des Gewebes zugegeben, zur Messung der $Rb^+$-Resorption auf der mucosalen Seite, zur Messung der Sekretion auf der serosalen Seite. Nach weiteren 20 Minuten, in denen der Isotopenfluß ein stabiles Niveau erreichte, wurde der basale unidirektionale $Rb^+$-Fluß bestimmt. Dazu wurden zu Beginn und am Ende einer 20-Minuten-Periode aus der nicht radioaktiv markierten Kammerhälfte Doppelproben von je 250 µl entnommen und durch frische RbCl-Parsons-Lösung (unmarkiert) ersetzt. Aus der Zunahme an radioaktiver Strahlung über diesen Zeitraum wurde die $Rb^+$-Transportrate errechnet. Durch Wiegen der Probengefäße vor und nach Einfüllen der entnommenen Proben wurde das exakte Probenvolumen ermittelt.

Fünf Minuten nach Ende dieser Basalfluß-Periode wurde Adrenalin ($5x10^{-6}$ $mol \cdot l^{-1}$) serosal zugegeben. Weitere 5 Minuten danach startete die zweite Flußperiode von 20 Minuten, in der die Veränderungen des $Rb^+$-Transports nach Adrenalin bestimmt wurde. Aus den gemessenen unidirektionalen Flüssen wurden Netto-Ionenflüsse berechnet: $J^{Rb}{}_{net} = J^{Rb}{}_{ms} - J^{Rb}{}_{sm}$.

Die Radioaktivität in den Proben wurde nach Zusetzen von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (rotiszint® eco plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in einem β-Szintillationscounter (TRI-CARB® 2000CA Liquid Scintillation Analyzer, Packard, Frankfurt) gemessen. Die Hintergrundaktivität wurde anhand von Leerwerten mitbestimmt und von den übrigen Meßwerten subtrahiert.

### *2.6.2 $Na^{+}$- und $Cl^{-}$-Flüsse*

Nach dem gleichen Prinzip wie die $Rb^{+}$-Flüsse wurden die unidirektionalen $Na^{+}$- und $Cl^{-}$-Flüsse bestimmt. In diesem Fall wurde mucosal bzw. serosal ein $^{22}Na$/$^{36}Cl$-Gemisch zugegeben (59 kBq $^{22}Na$/29 kBq $^{36}Cl$). 60 min nach Versuchsbeginn wurden die Isotope mucosal oder serosal zugesetzt. Nach weiteren 20 min zur Stabilisation der Ionenflußraten wurde der Basalionenfluß sowie 5 min nach Adrenalinzugabe dessen Änderung über Perioden von je 20 min bestimmt.

Die Messung der Aktivität erfolgte für $^{22}Na$ in einem γ-Szintillationscounter (Auto-Gamma® 5000 Series MINAXI, Packard, Frankfurt), für $^{36}Cl$ in einem β-Counter (TRI-CARB® 2700 TR Liquid Scintillation Analyzer, Packard, Frankfurt). $^{22}Na$ strahlt in das $^{36}Cl$-Zählfenster ein. Daher wurden Proben mitgemessen, die ausschließlich $^{22}Na$ enthielten, und anschließend die Kontamination durch die $^{22}Na$-Strahlung von den $^{36}Cl$-Meßwerten abgezogen.

Der Residualionenfluß $J^{R}_{net}$, d. h. alle Ionenbewegungen außer $Na^{+}$- und $Cl^{-}$-Flüssen, wurde wie folgt berechnet: $J^{R}_{net} = Isc - (J^{Na}_{net} - J^{Cl}_{net})$. Ein positiver Residualionenfluß bedeutet entweder eine Kationen-Resorption oder eine Anionen-Sekretion.

*2.6.3 Sekretorischer $HCO_3^-$-Fluß*

Zur Messung der Bicarbonat-Sekretion wurde eine Titrationstechnik verwendet, bei der die Alkalinisierung einer ungepufferten Elektrolytlösung bestimmt wurde. Diese pH-Wert-Anhebung kam infolge des $HCO_3^-$-Transports von einer Gewebeseite auf die andere zustande (Winterhager et al., 1986). Dazu wurde die Nährlösung auf der mucosalen Gewebeseite durch pufferfreie Parsons-Lösung ersetzt. Serosal wurde Parsons-Standard-Lösung verwendet.

Nach einer Stabilisationsphase von 60 min wurde der Puffer auf beiden Seiten des Gewebes durch frische Lösungen ersetzt (mucosal: pufferfreie Parsons-Lösung mit $O_2$-Begasung, serosal: Parsons-Standard-Puffer mit Carbogen-Begasung). Während 2 Perioden von jeweils 30 min wurde der basale sekretorische Bicarbonat-Transport bestimmt. Zu Beginn der 3. Periode wurde in den Testgeweben jeweils Adrenalin ($5x10^{-6}$ $mol \cdot l^{-1}$) serosal zugegeben und die Änderung der Bicarbonat-Transportrate während der 3. und 4. Flux-Periode (ebenfalls je 30 min) ermittelt. Ein Vergleich erfolgte mit einer Kontrollgruppe, die kein Adrenalin erhielt. Zur Probennahme wurde das Kammervolumen mucosal und serosal vollständig abgesaugt und mit je 3,5 ml frischen Lösungen wieder aufgefüllt, die, falls notwendig, auch Adrenalin enthielten.

Alle Versuche wurden mit Bumetanid-Vorbehandlung ($10^{-4}$ $mol \cdot l^{-1}$ serosal) durchgeführt, um die spontane und Adrenalin-stimulierte $Cl^-$-Sekretion zu unterdrücken.

Die Bestimmung der Bicarbonat-Konzentration erfolgte titrimetrisch und anhand des Vergleichs mit einer Eichkurve: Zur Erstellung der Eichkurve wurde eine Bicarbonat-Verdünnungsreihe (0,1 - 1 $mmol \cdot l^{-1}$, unter Verwendung von sauerstoffgesättigtem A. dest., s. o.) hergestellt. Proben jeder Verdünnungsstufe mit einem Volumen von 2,5 ml wurden unter $O_2$-Begasung mit 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ HCl-Lösung auf pH 7,0 titriert. Die aus den verbrauchten

Volumina an HCl sich ergebende Eichkurve (s. Abb. II.3) hatte einen linearen Verlauf (Korrelationskoeffizient r = 0,996).

Bicarbonat-Eichkurve:

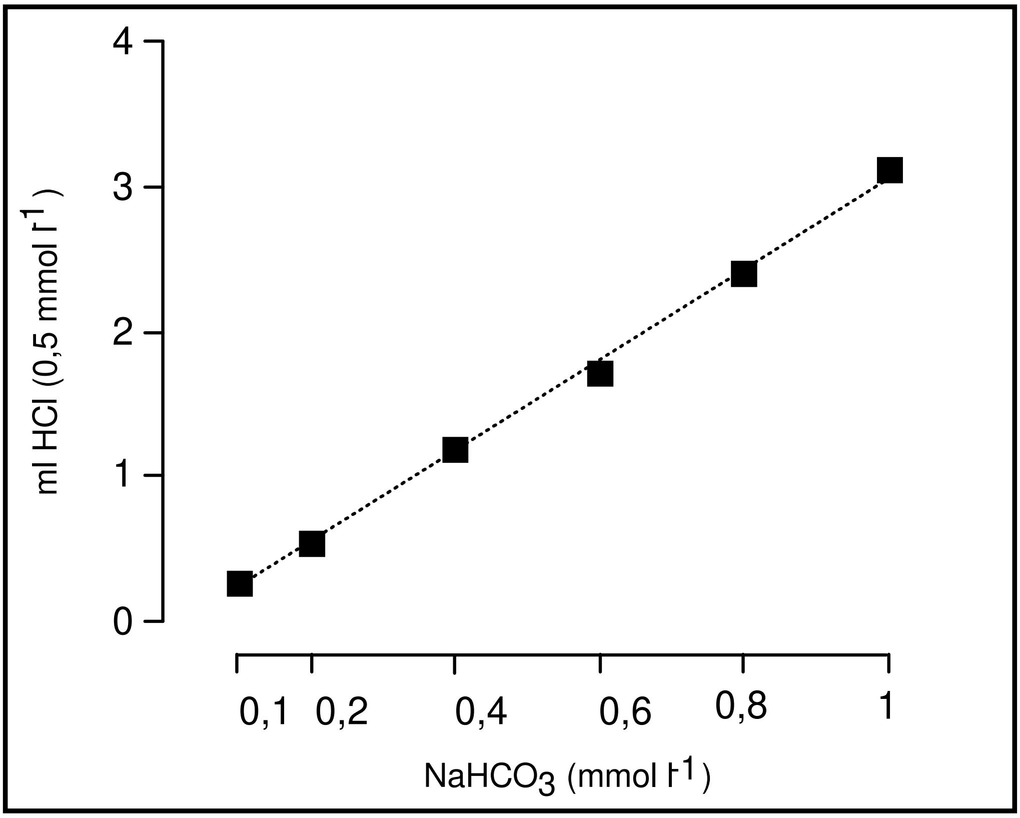


**Abb. II.3**: Die SEM-Werte werden von den Symbolen der Mittelwerte (Quadrate) verdeckt. Die gestrichelte Linie stellt die Bestgerade dar (Eichkurve: r = 0,996). n = 6.

Zur Ermittlung der Bicarbonat-Transportrate durch das Gewebe wurden 2,5 ml der mucosal gewonnenen Proben unter $O_2$-Begasung mit 0,5 mmol·$l^{-1}$ HCl auf pH 7,0 titriert. Die dem verbrauchten HCl-Volumen entsprechende Bicarbonat-Konzentration in der Probe wurde an der Eichkurve abgelesen und daraus die Konzentration in der mucosalen Kammerhälfte und die Transportrate pro Zeit und Stunde errechnet.

## 2.7 Chemikalien:

Adrenalin, Atenolol (Geschenk von Zeneca, Plankstadt), Atropin-Sulfat, Hexamethonium-Chlorid, ICI 118551 (1-[2,3-(Dihydro-7-methyl-1H-inden-4-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol-Hydrochlorid, Tocris, Bristol, Großbritannien), Prazosin-Hydrochlorid (Geschenk von Pfizer, Karlsruhe), Propranolol (Aldrich, Steinheim) und Tetraethylammonium-Chlorid (TEA) wurden in einer wässrigen Stammlösung angesetzt.

Tetrodotoxin (TTX) wurde in 20 $mmol \cdot l^{-1}$ Citratpuffer gelöst.

Bumetanid, Indometacin, Quinin-Hydrochlorid und Yohimbin wurden in Ethanol gelöst (maximale Ethanol-Endkonzentration in der Kammer 0,25 Vol%).

Phentolamin-Methansulfat (Aldrich, Steinheim) wurde in DMSO gelöst (maximale Endkonzentration in der Kammer 0,28 Vol%).

Falls nicht anders angegeben, waren alle Chemikalien von Sigma, Deisenhofen.

Die Radioisotope stammten von NEN Life Science Products, Köln. Die spezifischen Aktivitäten betrugen für $^{22}Na$: 3,9 TBq/g, für $^{36}Cl$: 550 MBq/g; die anfängliche Aktivität von $^{86}Rb$ betrug 411 GBq/g.

## 2.8 Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± mittlerer Fehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Statistische Vergleiche wurden mit verbundenem oder unverbundenem Student´s t-Test durchgeführt oder, falls der F-Test signifikante Abweichungen zwischen den Varianzen der zu vergleichenden Mittelwerte ergab, mit dem U-Test. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Regressionsgeraden wurden anhand des linearen Korrelationskoeffizienten r getestet. Die Größe der Variabilität, d. h. des Auftretens oder Nicht-Auftretens der 1. bzw. 2. Phase der Adrenalin-Antwort, wurde mittels $X^2$-Test (Vierfelder-Test) ermittelt. Die Standardabweichung errechneter Werte (Netto-Ionenflüsse) wurde nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz aus den Abweichungen von $J_{ms}$ und $J_{sm}$ errechnet.