

3 Material und Methoden

3.1 Herkunft der Gewebeproben

Die verwendeten Pansenepithelien stammten von institutseigenen Schafen unterschiedlicher Herkunft, Rasse, Geschlecht und Alter. Die Tiere wurden in vier verschiedene Fütterungsgruppen eingeteilt:

- 1) Heu ad libitum
- 2) 600 g Kraftfutter/Tag und Heu ad libitum
- 3) 1200 g Kraftfutter/Tag und Heu ad libitum
- 4) 1800 g Kraftfutter/Tag und Heu ad libitum

Unter dem jeweiligen Fütterungsregime wurden die Tiere mindestens drei Wochen im Institut für Veterinär-Physiologie der Freien Universität Berlin gehalten. Danach wurden sie im Institut für Tierzucht der HU-Berlin geschlachtet. Unmittelbar nach dem Betäuben und Entbluten wurde die Leibeshöhle eröffnet und der Magen-Darm-Trakt entnommen. Aus dem zottenarmen Teil des ventralen Pansensackes wurde ein ca. 250 cm² großes Stück herausgeschnitten, von Ingestaresten befreit; und die Muskelschicht wurde von Hand von der Schleimhaut abgetrennt. Das Gewebestück wurde in einem Dewargefäß transportiert, das mit einem mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begasten und auf 38 °C erwärmten Transportpuffer (Zusammensetzung s. Anhang) gefüllt war. Im Labor wurde die Pansenschleimhaut in für die Ussing-Kammern passende Stücke zugeschnitten. Von der Tötung der Tiere bis zum Einbau der Gewebestücke in die Ussing-Kammern vergingen in der Regel 30-60 Minuten.

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

3.2 Inkubationstechnik

Die Versuchstechnik geht auf eine von Ussing und Zehran (1951) entwickelte und später von Stevens (1964) und Ferreira et al. (1966a) für den Pansen modifizierte Methode zurück.

Zwischen die beiden Hälften einer Plexiglaskammer wurde ein Epithelstück senkrecht eingespannt, so dass die mukosale (= luminale = apikale) Seite nach links und die serosale (= Blut- = basolaterale) Seite nach rechts ausgerichtet war (s. Abbildung 1). Um Quetschungen an den Rändern zu vermeiden ('edge damage'), wurden Silikonringe

untergelegt. In der Kammer wurden 3,14 cm² des Gewebes beidseitig von Pufferlösung umspült. Über den Kammerhälften befand sich jeweils eine doppelwandige Glassäule, die mit der Kammer über flexible Schläuche verbunden war. Auf jeder Kammerseite befanden sich 18 ml Pufferlösung (Zusammensetzung s. Anhang). Zwischen den Wänden der Glassäulen zirkulierte mit Hilfe eines Pumpthermostaten (Haake D1) beheiztes Wasser, so dass die Temperatur der Inkubationslösung konstant 38 °C betrug. Die Pufferlösung wurde über ein Gasliftsystem der Firma Landgraf mit Carbogen begast und dadurch auch kontinuierlich durchmischt (Ferreira et al., 1966a; Stevens, 1964; Ussing und Zehran, 1951).

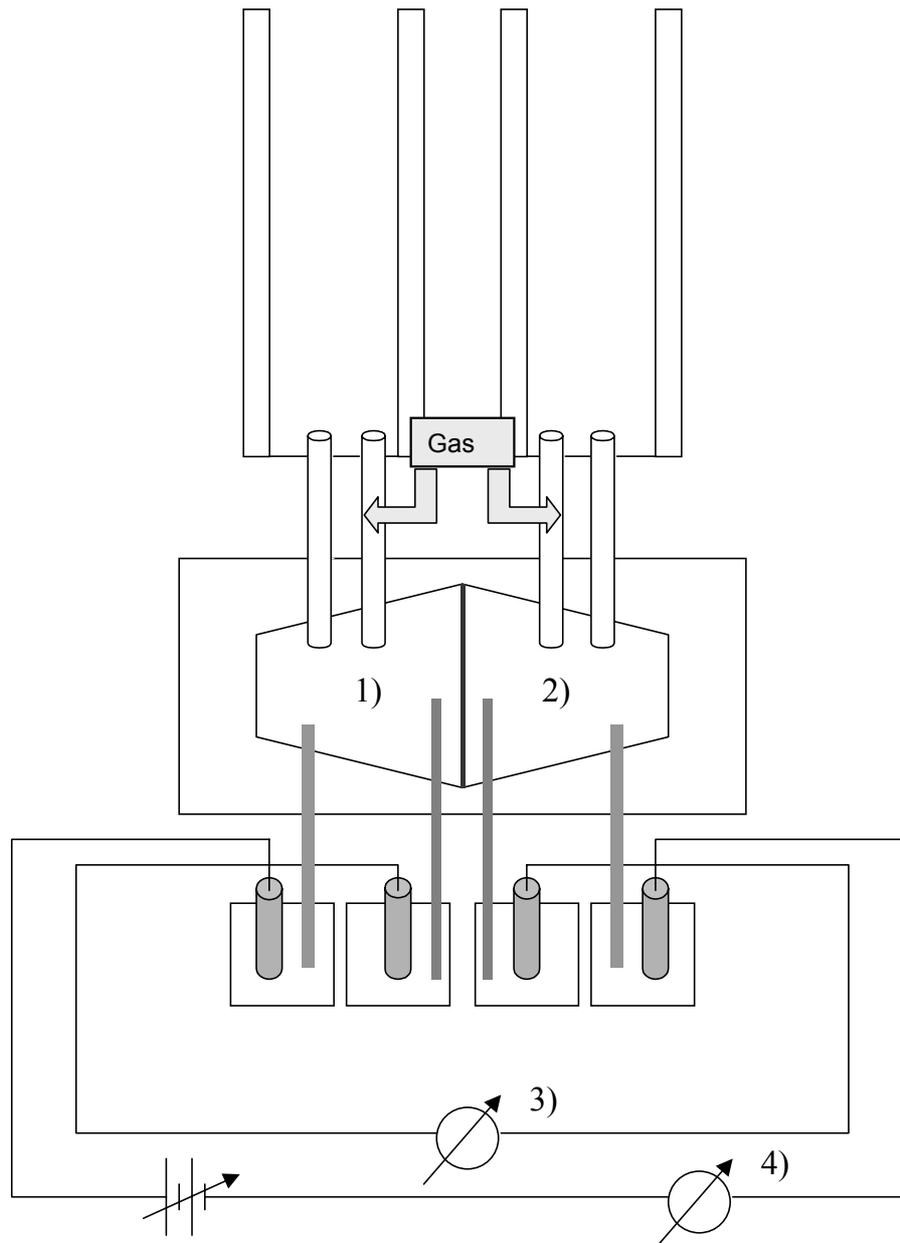


Abbildung 1: Ussing-Kammer mit Gasliftapparat: 1) mukosale (= luminale) Seite; 2) serosale Seite des Epithels bzw. der Schleimhaut (= Blutseite); 3) Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz mittels KCl-Agarbrücken und Ag-AgCl-Elektroden; 4) definierte Stromspeisung mittels KCl-Agarbrücken und Ag-AgCl-Elektroden.

3.3 Elektrophysiologisches Messprinzip

Zur Messung der elektrophysiologischen Daten befand sich an jeder Kammerhälfte jeweils eine gewebe-nahe (< 3 mm) und eine gewebe-ferne (> 20 mm) KCl-Agarbrücke. Die gewebe-nahen Brücken waren mit Ag-AgCl-Elektroden verbunden und dienten der Messung der transepithelialen Potenzialdifferenz (PD_t). Über die gewebe-fernen Brücken, die ebenfalls

mit Ag-AgCl-Elektroden verbunden waren, konnte externer Strom eingespeist werden. Die Messung des Stroms und der transepithelialen Potenzialdifferenz erfolgte durch eine mikrocomputergestützte Voltage/Current Clamp (Einrichtung für Windows, Clamp Version 2.02 von Dipl.-Ing. K. Mußler, Aachen).

Durch das Aussenden definierter Strompulse und die Erfassung des jeweils entsprechenden Abfalls der Potenzialdifferenz wurde die zugehörige Gewebeleitfähigkeit (G_t) berechnet. Die Pulshöhe betrug $50 \mu\text{A}$. Die Pulse wurden unidirektional in Richtung des Klemmstromes appliziert. Die Pulsdauer betrug 200 ms . Die Einzelheiten der Apparatur sind in der Dissertation von Scheffler beschrieben (Scheffler, 1984). Es wurden mittels eines PC kontinuierlich folgende Daten aufgezeichnet:

- PD_t [mV]
- Strom [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$]
- G_t [$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$]

Es gibt drei verschiedene Methoden zur Beeinflussung bzw. Erfassung der elektrophysiologischen Parameter: 'open circuit', 'short circuit' und 'voltage clamp'.

Open circuit

Unter diesen Bedingungen wird die transmurale Potenzialdifferenz nicht beeinflusst, sondern direkt gemessen. Durch das Aussenden von Strompulsen (ΔI) definierter Amplitude ($50 \mu\text{A}$) und Dauer (200 ms) wird eine kurzfristige Änderung der Potenzialdifferenz (ΔPD_t) bewirkt. Mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes kann man mit diesen Werten dann den zugehörigen transmuralen Widerstand (R_t) errechnen.

Gleichung 1:

$$R_t = \frac{\Delta PD_t}{\Delta I}$$

Die Gewebeleitfähigkeit (G_t) entspricht dem reziproken Wert des Gewebewiderstandes:

Gleichung 2:

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

Der transmurale Strom wurde unter 'open circuit'-Bedingungen 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 sog. 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 eines Ions statt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen aktiven Transport handelt. - Die Gewebeleitfähigkeit wird wie unter ‘open circuit’-Bedingungen bestimmt.

Voltage clamp

Bei diesem Verfahren (‘Spannungsklemme’) wird die PD_t auf definierte Werte eingestellt, um die elektrophysiologischen Bedingungen für den Ionentransport zu verändern (in unserem Falle -25 und $+25$ mV; die angegebenen Potenzialdifferenzen beziehen sich auf die serosale Gewebeseite (Blutseite)). Um dieses zu erreichen, wird extern Strom eingespeist. Dieser Strom entspricht bei $PD \neq 0$ mV nicht dem Kurzschlussstrom, da unter ‘voltage clamp’-Bedingungen ein elektrischer Gradient über dem Gewebe besteht und so auch passive Ionen Transporte erfolgen.

3.4 Pufferlösungen

Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Pufferlösungen ist dem Anhang zu entnehmen. Die Lösungen wurden mit Chemikalien der Firma Merck und der Firma Sigma angesetzt. Durch Zugabe von Mannit, einem nicht resorbierbaren, chemisch inerten Zucker, wurden die Puffer auf drei verschiedene Osmolaritäten, und zwar 300, 375 und 450 mosmol/l, eingestellt. Die Osmolarität wurde mit einem Osmometer der Firma Roebeling nach dem Prinzip der Gefrierpunktniedrigung gemessen. Alle Puffer wurden mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begast. Der pH-Wert wurde mit Tris-Puffer (Trizma-Base 1 mol/l) so eingestellt, dass er bei 38 °C und Begasung 7,4 betrug.

Mannit ist eine parazellulär permeable Substanz. Der Transport liegt bei $0,09 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (Rübelke, 1998) und ist daher so gering, dass eine Konzentrationsänderung in unserem Versuchsablauf nicht erreicht wird.

In der vorliegenden Arbeit werden die Begriffe ‘Osmolarität’ und ‘Osmolalität’ nebeneinander verwendet. Osmolarität bezeichnet die osmolare Konzentration pro Volumeneinheit einer Lösung, während Osmolalität die osmolare Konzentration pro kg bezeichnet. In unseren Versuchen wurden die Substanzen abgewogen und dann wurde auf 1 l

Lösung mit Wasser aufgefüllt. Unterschiede ergeben sich dann, wenn großmolekulare Substanzen verwendet werden; bei unseren Lösungen spielt das keine Rolle.

Vergleichsdaten aus der Literatur werden in der jeweiligen Einheit des Quelltextes angegeben.

3.5 Angaben zum Versuchsablauf

Vor dem Einspannen der Epithelien in die Kammern wurde der Flüssigkeitswiderstand der Pufferlösung und das Elektrodeneigenpotenzial gemessen und für den Versuch gespeichert, um die späteren Messungen mit diesen Werten automatisch korrigieren zu können. Pro Tier (d. h. zugleich: pro Versuchstag) wurden 12 Gewebestücke in die Ussing-Kammern eingebaut.

Den Epithelien wurde nach dem Einbauen eine Äquilibrationszeit von ca. 15 min unter 'open circuit'-Bedingungen gegeben, danach wurden sie 'kurzgeschlossen'. Nach weiteren 20 Minuten und Einstellung eines 'steady state' wurde aus jeweils zwei Epithelien, die sich im Hinblick auf ihre Gewebeleitfähigkeit und ihren Kurzschlussstrom um nicht mehr als 25% voneinander unterschieden, ein Paar gebildet für die Messung der Fluxbewegungen über das Epithel. Über das eine Epithel wurde der Ionenflux von mukosal nach serosal (ms), im Sinne einer Resorption, über das andere der Ionenflux von serosal nach mukosal (sm), im Sinne einer Sekretion, bestimmt.

Die sechs Paare wurden in drei Gruppen eingeteilt, die sich durch unterschiedliche Osmolarität ihres mukosalen Puffers unterschieden: 300 mosmol/l (Vergleichs- bzw. Kontrollbedingung, Grundpuffer), 375 mosmol/l und 450 mosmol/l. Pro Tier und Osmolaritätsstufe wurden also jeweils zwei Daten-Sets erhoben.

Die Osmolarität wurde durch Zugabe von Mannit zur Grundpufferlösung (300 mosmol/l) eingestellt. Mukosal wurde der Puffer bei den zwei experimentellen Bedingungen (375, 450 mosmol/l) getauscht, serosal wurde sowohl bei der Kontrollbedingung als auch bei den beiden anderen Bedingungen der Grundpuffer beibehalten.

3.6 Bestimmung des Natriumfluxes

Zur Bestimmung der Natrium-Fluxe wurde auf einer Seite der Kammer das radioaktiv markierte Isotop $^{22}\text{Na}^+$ ($15 \mu\text{l } ^{22}\text{Na}^+ = 0,75 \mu\text{Ci}$) zugesetzt und in definierten Zeitintervallen auf der anderen Seite Lösung entnommen. Das entnommene Volumen wurde durch Pufferlösung ersetzt. Durch Messen der Radioaktivität wurde der unidirektionale Natriumflux berechnet (s. Gleichung 3). An einer Gewebeprobe kann nur der Ionenfluss in eine Richtung

bestimmt werden. Daher wurde an einem anderen Gewebestück mit ähnlichen elektrophysiologischen Eigenschaften der Ionenflux in die andere Richtung bestimmt. Die Differenz der Fluxe beider Richtungen ergibt den Nettoflux ($J_{\text{net}} = J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}}$) (s. Gleichung 5). Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität (s. Gleichung 4 sowie entsprechenden Term in Gleichung 3) wurde jeweils am Anfang und am Ende eines Versuchs eine „heiße“ Probe (100 μl) aus der Seite der Aktivitätszugabe entnommen.

Nach Zugabe von radioaktivem Natrium wurden alle 30 Minuten Proben (à 2 ml) von der unmarkierten, sog. „kalten“ Seite gezogen. Insgesamt liefen drei Fluxperioden (t_1 bis t_3) à 90 min ab. Pro Fluxperiode wurden zwei Fluxe berechnet.

Um potenzialabhängige und -unabhängige Ionenfluxkomponenten zu bestimmen, wurden die Fluxraten von Natrium unter verschiedenen transepithelialen Potenzialdifferenzen bestimmt. Hierfür wurden die Epithelpaare der drei Osmolaritätsgruppen (300, 375, 450 mosmol/l) in unterschiedlicher Reihenfolge hintereinander für jeweils 1,5 h auf -25 , 0 , $+25$ mV geklemmt. Die PD_t -abhängigen und -unabhängigen Fluxanteile lassen sich aus den Natriumtransportraten mit Hilfe der Formel von Frizzell und Schultz (1972), modifiziert nach Jackson und Norris (1985), errechnen (s. Gleichung 6).

Nach Ablauf der drei Fluxperioden wurden bei den Versuchsgruppen die Pufferlösungen mit erhöhten Osmolaritäten (375 und 450 mosmol/l) wieder gegen Grundpuffer (300 mosmol/l) eingetauscht. Danach wurden über 45 Minuten unter Kurzschlussbedingungen die elektrophysiologischen Daten (PD_t , I_{sc} , G_t) bestimmt. Es wurden keine Proben mehr genommen.

Die Radioaktivität der Proben wurde mit einem Gammacounter der Firma Wallac (Finnland) gemessen.

Berechnung der Transportraten

Die **Natriumfluxe** werden anhand der auf der unmarkierten, „kalten“ Seite gemessenen Radioaktivität nach folgender Formel berechnet:

Gleichung 3:

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

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

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

cpm₂ = ‘Counts per minute’ (Radioaktivität) der am Ende des entsprechenden Fluxes entnommenen Probe

V_s = Puffervolumen im Gasliftsystem [ml]

V_p = Probenvolumen 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:

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

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 [$\mu mol \cdot ml^{-1}$]

Der **Nettoflux** (Nettotransport von Natrium über das Pansenepithel, J_{net}) ergibt sich aus der Differenz der unidirektionalen Fluxe (J_{ms} , J_{sm}):

Gleichung 5:

$$J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$$

J_{net} = Ionen-Nettoflux [$\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]

J_{ms} = Ionenflux von mukosal nach serosal [$\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]

J_{sm} = Ionenflux von serosal nach mukosal [$\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]

Besitzt der Nettoflux eines Ions ein positives Vorzeichen, liegt eine Nettoresorption vor, bei einem negativen Vorzeichen handelt es sich um eine Nettosekretion.

Der **potenzialabhängige und der potenzialunabhängige Anteil** eines (unidirektionalen) Ionenfluxes wird folgender Formel berechnet (Frizzell und Schultz, 1972, modifiziert nach Jackson und Norris, 1985)¹:

Gleichung 6:

$$J = J_{\alpha} \cdot \xi + J_{\beta}$$

J = Gesamtflux eines Ions in die untersuchte Richtung [$\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]

$J_{\alpha} (\cdot \xi)$ = potenzialabhängiger Fluxanteil

J_{β} = potenzialunabhängiger Fluxanteil

¹ In der Originalformel wurden andere Buchstaben verwendet: statt 'α' ein 'd' und statt 'β' ein 'm'. Diese Buchstaben wurden ausgetauscht, um Verwechslungen mit m = mukosal zu vermeiden.

ξ , das Maß für die elektrisch treibende Kraft, ist definiert als:

Gleichung 7:

$$\xi = \frac{z \cdot F \cdot PD_t}{R \cdot T \cdot \left(\exp\left[\frac{z \cdot F \cdot PD_t}{R \cdot T}\right] - 1 \right)}$$

ξ = elektrisch treibende Kraft

PD_t = Potentialdifferenz über dem Gewebe in Fluxrichtung [V]

z = Wertigkeit des Ions

F = Faraday-Konstante (96478 C · mol⁻¹)

R = allgemeine Gaskonstante (8,3143 J · K⁻¹ · mol⁻¹)

T = absolute Temperatur (38 °C = 311 K)

Für $PD_t = 0$ ist ξ nicht definiert, da sich ξ aber für $PD_t \rightarrow 0$ an 1 annähert, wird es für $PD_t = 0$ mit 1 angegeben.

Damit ergibt sich für Natrium und die ‘Klemmungen’ in unseren Versuchen:

Tabelle 1:

| PD_t [mV] | ξ für J_{ms} | ξ für J_{sm} |
|-------------|--------------------|--------------------|
| -25 mV | 1,54 | 0,61 |
| 0 mV | 1 | 1 |
| +25 mV | 0,61 | 1,54 |

3.7 Statistische Auswertung

3.7.1 Allgemeine Angaben

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS für Windows, Version 9.0 bzw. 10.0 (einzelne Korrekturrechnungen per Taschenrechner). Die Graphiken wurden mit Sigma Plot 5.0 erstellt.

Das Signifikanzniveau wurde generell auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die verschiedenen Analysen wurden jedoch methodisch unterschiedlich streng durchgeführt, einige haben daher eher explorativen, andere ‘prüfenden’ Charakter (s. Ergebnisteil).

Da von jedem Tier mehrere Gewebestücke untersucht wurden (s. unten), wird in einigen Tabellen die Anzahl der verwendeten Schafe mit 'N', die Zahl der Gewebestücke mit 'n' angegeben (N/n).

Auf eine Überprüfung der Daten in den 'Zellen' des Auswertungsplans auf Normalverteilung wurde verzichtet, da die Häufigkeiten in den 'Zellen' gering sind (z. T. nur 6 Werte).

Der Untersuchungsplan sah ursprünglich vor, dass pro Fütterungsgruppe 5 Tiere (mit jeweils doppeltem Präparate- bzw. Datensatz) einbezogen werden.

In den Gruppen 'Kf 600 g/d' (Kf = Kraftfutter) und 'Kf 1200 g/d' liegen wegen organisatorisch oder messtechnisch bedingter Ausfälle nur die Daten für 4 Tiere vor. - Bei einigen Tieren konnte nicht für alle Osmolaritätsstufen der doppelte Datensatz erhoben werden. - In einem Einzelfall wurden die Daten eines Epithelpaares wegen Ausreißercharakteristika ausgeschieden (Votum von Prof. H. Martens).

Die Tatsache, dass das 'n' in den einzelnen Teilgruppen (Zellen des jeweiligen Auswertungsplans) relativ gering und von unterschiedlicher Größe ist (ohne Zusammenhang mit den Faktoren des Untersuchungsplanes), sollte bei der Bewertung der Ergebnisse der statistischen Analyse berücksichtigt werden. Denn bei kleinen und unterschiedlichen Fallzahlen reagieren die angewandten statistischen Verfahren deutlich auf eine Verletzung der Anwendungsvoraussetzungen, und zwar, wie z. B. Diehl und Arbinger (1990) darlegen, in der Regel mit einer unkalkulierbaren Erhöhung des 'eigentlichen' α -Fehlers.

3.7.2 G_t -Verlaufskurven

Pro Fütterungsgruppe wurden die G_t -Verlaufskurven der 3 Osmolaritätsstufen in einer Graphik dargestellt (Mittelwerte \pm SEM). An mehreren Zeitpunkten (15-21x über den gesamten Versuchszeitraum) wurde, bildlich gesprochen, ein Querschnitt durch die Kurven gelegt. Über die Datenverteilungen der entsprechenden Mittelwerte wurde jeweils eine einfaktorielle Varianzanalyse (VA) berechnet, - mit nachträglichen zweiseitigen Dunnett-Vergleichen, falls der Faktor 'Osmolarität' sich als signifikant erwies (Bezugspunkt: Stufe 300 mosmol/l).

Da es sich bei den Daten der verschiedenen Querschnitte natürlich nicht um unabhängige Stichproben handelt und da die Anzahl der Analysen hoch ist, haben die Ergebnisse der VA eher beschreibenden oder explorierenden Charakter.

3.7.3 G_t und J_{net} Na unter Kurzschlussbedingungen

Da zu den Variablen G_{t0} und J_{net0} Na in der entsprechenden Literatur bereits eine Reihe von Befunden vorliegt, daher gezielte Erwartungen bestanden, wurde methodisch strenger geprüft. Der Anlage des Untersuchungsplanes entsprechend wurde jeweils eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt (4 Fütterungsgruppen, 3 Osmolaritätsstufen (sogenannte feste Effekte bei beiden Faktoren), Interaktion beider). Die Osmolaritätsstufen werden nicht als sog. wiederholte Messungen behandelt, da jeweils andere Gewebepräparate verwandt wurden und die Korrelationen zwischen den Messungen sehr unterschiedlich, z. T. nicht von 0 verschieden waren. - Der vorgeschaltete Levene-Test wies auf das Vorliegen heterogener Varianzen hin; damit war eine der Voraussetzungen der Anwendbarkeit der VA verletzt. In Anlehnung an einen Vorschlag von Diehl und Arbinger (1990) wurden daher vorsichtshalber die Freiheitsgrade der F-Werte für die Haupteffekte und Interaktion z. T. anders als üblich bestimmt, für die Post-hoc-Vergleiche der Zeilen- und Spalteneffekte wurde die Version Dunnett-T3 (Brosius, 1998) gewählt.

In einem zweiten Schritt erfolgten Analysen der 'einfachen' oder 'bedingten' Haupteffekte. Zum Vergleich der 4 Fütterungsgruppen jeweils innerhalb einer der 3 Osmolaritätsstufen (3VAn) und der 3 Osmolaritätsstufen innerhalb der Fütterungsgruppen (4 VAn) wurden einfaktorielle Varianzanalysen durchgeführt. Um zu vermeiden, dass das 'eigentliche' α sich gegenüber dem nominellen (generell 0,05) unkontrolliert erhöht, erfolgten die Einzelanalysen nach einem Vorschlag von Diehl und Arbinger (1990) auf einem gemäß der Anzahl der Vergleiche ("family-wise") korrigierten α' -Niveau ($\alpha' = \alpha/3$ bzw. $\alpha/4$, d. h. $\alpha' = 0,017$ bzw. 0,0125). In den einzelnen Fällen, in denen bei den Einzelanalysen heterogene Varianzen vorlagen, wurden wieder entsprechende Korrekturen der F-Werte bzw. Freiheitsgrade durchgeführt. Die Post-hoc-Vergleiche erfolgten mit Hilfe von einseitigen Dunnett-T-Tests, wenn nötig mit Dunnett-T3-Tests.

3.7.4 ΔG_t ($G_{t\ 30\ min} - G_{t\ 0\ min}$), J_{ms0} Na, J_{sm0} Na, J_{net} Na bei Variation der Potenzialdifferenz

Die Analysen erfolgten nach einem Vorschlag des Instituts für Biometrie und Informationsverarbeitung (Frau Dr. Arndt) in der Regel auf zweierlei Weise:
Für den Vergleich der 4 Fütterungsgruppen pro Osmolaritätsstufe wurden einfaktorielle VAn mit nachträglichen Dunnett-T-Tests durchgeführt.

Der Vergleich der 3 Osmolaritätsstufen pro Fütterungsgruppe erfolgte ebenfalls mit Hilfe einer VA mit ‘Osmolarität’ als festem Faktor (‘fixed factor’) und ‘Tier’ als Zufallsfaktor (‘random factor’), - mit nachfolgenden zweiseitigen Dunnett-T-Tests bei den Osmolaritätsstufen.

3.7.5 J_{α} , J_{β} für J_{ms} und J_{sm}

Zur Ermittlung der Steigungs- (J_{α}) und Interceptwerte (J_{β}) wurde (nach einem Vorschlag von Frau Dr. Arndt) pro Tier eine Regressionsgleichung bestimmt (s. Abschnitt 3.6); die Regressionsgerade wurde in der Regel durch 6 Wertepaare (J_{ms}/ξ oder J_{sm}/ξ) oder - wenn pro Tier nur 3 Gewebepreparate vorhanden waren - durch 3 Wertepaare gelegt. Untersuchungseinheit für die weitere Analyse war also das Tier, nicht wie in den bisherigen Analysen das Gewebepreparat; das ‘n’ pro Zelle ist daher deutlich kleiner.

Pro Osmolaritätsstufe wurde eine einfaktorielle VA mit nachfolgenden Dunnett-Vergleichen der Fütterungsgruppen durchgeführt.

Pro Fütterungsgruppe erfolgte zum Vergleich der Osmolaritätsstufen wiederum eine VA mit ‘Osmolarität’ als festem Faktor und ‘Tier’ als Zufallsfaktor (mit unabhängigen Stufen), d. h. mit nur einem Wert in den ‘Zellen’ des Auswertungsplans (3 Osmolaritätsstufen x 5 Tiere bzw. 3 Osmolaritätsstufen x 4 Tiere). Nachfolgend wurden wieder - wenn der Faktor ‘Osmolarität’ sich als signifikant erwies - Dunnett-Vergleiche durchgeführt.