

Ussing-Kammer - Brevier

Alfred H. Gitter / Version 6 vom 13. 03. 2007

1 Physikalische Grundlagen

Jedes Ion der Wertigkeit z trägt eine Ladungsmenge von $z \cdot e$, wobei e die [Elementarladung](#), eine Naturkonstante mit dem Wert $1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$ ist. Die [Stoffmenge](#) von einem [Mol](#) eines Stoffes enthält definitionsgemäß $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$ Teilchen (Atome, Moleküle oder Ionen). Ein Mol Ionen hat eine Ladung von $z \cdot e \cdot N_A = z \cdot F$, wobei $F = 9,6485 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ die [Faraday-konstante](#) ist.

Wenn Ionen von einem Behälter A in einen anderen, B, fließen, ist der Fluss Φ_{AB} die Stoffmenge, die pro Zeiteinheit transportiert wird. Der Fluss hat die Einheit $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$. Wenn beim Transport einwertiger Ionen (zum Beispiel Na^+) ein Strom I fließt, ist der Fluss $\Phi = I / F$. Allgemein, für Ionen der Ladungszahl z , gilt: $\Phi = I / (z \cdot F)$.

Da der Leitwert eines homogenen, ebenen Gewebes ([Epithel](#)) proportional zu seiner Fläche ist, werden die (transepithelialen) Ströme durch das Gewebe üblicherweise auf die Fläche bezogen (Stromdichte = I_{epi} oder I_{sc}) und entsprechend auch die Flüsse (Flussdichte = Flux = J) und der elektrische Widerstand über dem Epithel ($R_{\text{epi}} = \text{TER}$).

Wird ein Flux in eine Richtung, zum Beispiel vom Behälter A nach B, aber nicht in umgekehrter Richtung, betrachtet, spricht man von einem unidirektionalen Flux (J_{AB}). Wenn die beiden entgegengesetzten unidirektionalen Flüsse ungleich sind, tritt ein Nettoflux ($J_{\text{netto}} = \text{Differenz zwischen zwei unidirektionalen Fluxen } J_{AB} \text{ und } J_{BA}$) auf.

2 Definitionen

Eine Ussing-Kammer ist eine elektrophysiologische Apparatur zur (typischerweise stundenlangen) Zellkultur von Epithelien und Messung von Barriere- und Transportfunktionen des lebenden Gewebes.

Die Barrierefunktion des Epithels wird durch Messung des elektrischen Widerstands über dem Epithel (transepithelialer Widerstand, englisch: transepithelial resistance = TER) bestimmt. Der transepitheliale Widerstand R_{epi} wird auf die Epithelfläche bezogen und hat daher üblicherweise die Einheit $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

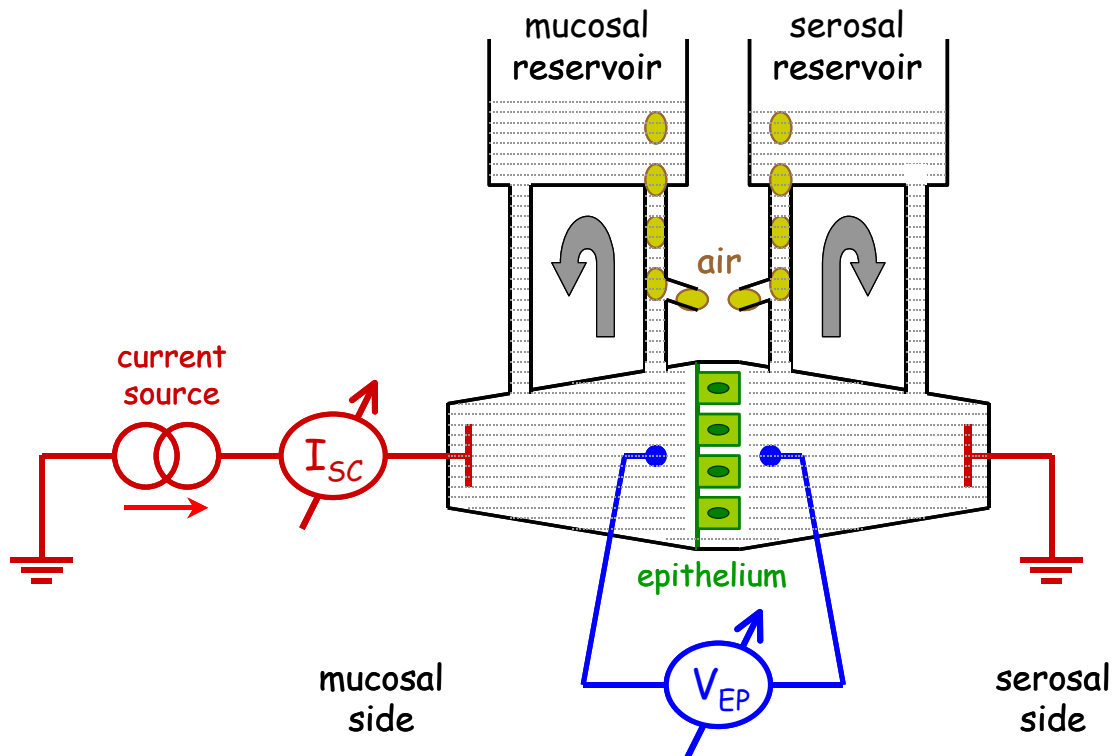
Wenn das Epithel aktiv Ionen von einer zur anderen Seite bewegt (elektrogener Transport), entsteht ein transepithelialer Strom. Wenn kein entgegengesetzter Strom über Elektroden eingespeist wird, erzeugt der Ladungstransport eine transepitheliale Spannung U_{epi} (englisch: open-circuit voltage).

Nur wenn der vom Epithel erzeugte Strom durch einen entgegengesetzten Strom kompensiert wird, bleibt die transepitheliale Spannung U_{epi} gleich Null ("Kurzschluss"). So kann der transepitheliale Kurzschluss-Strom (englisch: short-circuit current = I_{sc}) als Maß für den elektrogenen Transport bestimmt werden. Der transepitheliale Kurzschluss-Strom I_{sc} wird auf die Epithelfläche bezogen und hat daher üblicherweise die Einheit $\mu\text{A} / \text{cm}^2$.

Die transepitheliale Nettotransportrate oder Flux eines Ions der Wertigkeit z ergibt sich aus dem transepithelialen Kurzschluss-Strom gemäss $J = I_{\text{sc}} / (z \cdot F)$, wobei F die Faraday-konstante ist.

Wählt man für J die übliche Einheit $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ und für I_{sc} die übliche Einheit $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, gilt $J [\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}] = 37,31 \cdot I_{\text{sc}} [\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}] / z$.

Beispiel: Bei einem aktiven elektrogenen transepithelialen Na^+ -Transport, der einen I_{sc} von $10 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ erzeugt, ist der Flux J_{Na} gleich $373 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$.



In der Messkammer werden mukosale (m) und serosale Seite (s) des Epithels (grün) getrennt mit Salzlösungen umspült. Beide Salzlösungen werden in einem Reservoir ("Wärmetauscher") auf die gewünschte Temperatur (in der Regel 37 °C) geheizt (über Warmwasser-"Fern"-heizung von einem entfernt platzierten Wasserbad aus) und mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast. Um einen Wasserverlust durch die Begasung zu verhindern, wird das Carbogen zunächst durch eine wassergefüllte Waschflasche geleitet und angefeuchtet.



Die aufsteigenden Luftblasen (gelb) pumpen auf der epithelnahen Seite Salzlösung nach oben und sorgen damit für beständige Umwälzung. Um ungerührte Lösungsschichten ("unstirred layers") an der Epitheloberfläche zu vermeiden, sollte die Umwälzung der Lösung bis nah an das Epithel wirken. (Die kann man durch die Verteilung von zugegebenem Farbstoff prüfen.)

Die Füllhöhe in mukosalem und serosalem Schenkel des Reservoirs muss annähernd gleich sein, um eine erhebliche hydrostatische Druckdifferenz zu vermeiden. Damit das Epithel etwas auf seinen Träger gedrückt wird, statt von ihm abzuheben, sollte die Füllhöhe mukosal etwas (wenige mm) höher sein als auf der serosalen Seite.



Stromelektroden, die in ein KCl-Gefäß tauchen, können über Salzbrücken einen transepithelialen Strom applizieren (**rot**). Ebenfalls über Salzbrücken messen Spannungselektroden, die in ein KCl-Gefäß tauchen, epithelnah die transepitheliale Spannung, U_{epi} (**blau**). Der Strom, bei dem U_{epi} gleich Null wird, heißt Kurzschlussstrom, I_{SC} .

4 Versuchsablauf

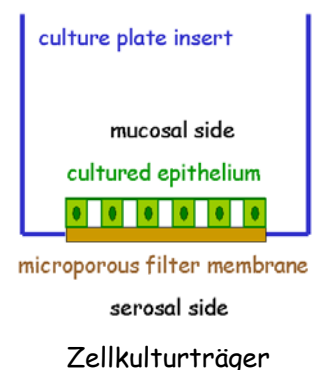
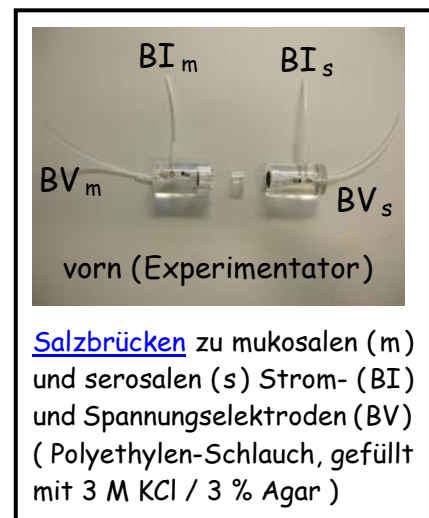
4.1 Vorbereitung

Zunächst wird die Warmwasserheizung des gläsernen Lösungsbehälters eingeschaltet und physiologische Kochsalzlösung in das Wärmebad gestellt. In die Plexiglas-Messkammerhälften werden Gummiringe eingesetzt. Die Messkammer wird dann mit der mukosalen Seite (m) links und der serosalen Seite (s) rechts in die Stativklemme eingesetzt, und die Klemmschraube leicht angezogen.

Die nach oben zeigenden Rohrenden der Messkammer werden über vier kurze Silikonschläuche mit den entsprechenden Rohrenden des gläsernen Lösungsbehälters verbunden. (Vorsicht!) Dann werden die Salzbrücken zu den Strom- und Spannungselektroden eingesetzt. In den mukosalen oder serosalen Lösungsbehälter (hier egal, da die beiden Seiten in der Messkammer kommunizieren) des Wärmetauschers wird 20 ml Kochsalzlösung eingefüllt.

Nun wird die Messung gestartet, indem auf der Benutzeroberfläche des Rechners der Schaltknopf "DC Messung" gedrückt wird. Die von den Spannungselektroden gemessene Spannung U_{epi} wird beobachtet. Diese Asymmetriespannung beruht auf technischen Unvollkommenheiten der Elektroden. Innerhalb von 30 min sollte sich ein konstanter Wert < 5 mV einstellen. (Konstanz bedeutet hier: ± 1 mV für mindestens 5 min.) Ist dies nicht der Fall, müssen die Spannungselektroden ausgewechselt werden. Wenn die Asymmetriespannung im Sollbereich liegt, wird sie kompensiert, indem auf der Benutzeroberfläche der Schaltknopf "Asymmetriespannung kompensieren" gedrückt wird. Danach sollte U_{epi} einen Wert von 0 ± 1 mV haben.

Nun wird der Zellkulturträger mit dem Epithel eingespannt. Zunächst wird auf der Benutzeroberfläche der Schaltknopf "Stop" gedrückt. Dann wird die Messkammer ausgebaut und die Salzlösung abgelassen. Der Zellkulturträger wird in die Messkammer eingebaut und die Messkammer wieder in die Stativklemme eingesetzt (mukosal = links, Klemmschraube leicht anziehen). Nun werden die Verbindungsschläuche zum Lösungsbehälter und die Salzbrücken zu den Strom- und Spannungselektroden wieder eingesetzt.



In den mukosalen und den serosalen Lösungsbehälter des Wärmetauschers werden nun 10,3 ml (mukosal) beziehungsweise 10,0 ml (serosal) Salzlösung (zum Beispiel Lösung SL_01 für HT-29/B6-Epithelzellen) eingefüllt. Hierfür kann man zwei 10 ml-Spritzen, an die Schläuche gesteckt wurden, verwenden.

Beim Befüllen soll keine wesentliche hydrostatische Druckdifferenz auftreten. Ein leichter Überdruck auf der mukosalen Seite ist tolerabel, weil dadurch die Zellen zum darunter liegenden Substrat gedrückt werden, während sie sich bei umgekehrtem Überdruck ablösen würden. Deshalb befüllt man so, dass die Flüssigkeitssäule auf der mukosale Seite stets etwas (wenige mm) höher steht als auf der serosalen Seite. Diese Differenz bleibt auch nach dem Befüllen bestehen.

Nun wird die Gaszufuhr geöffnet und so eingestellt, dass in jeder Messkammerhälfte 10 bis 20 Gasblasen pro 10 s aufsteigen. Dadurch sollte auch die Salzlösung in jeder Messkammerhälfte umgewälzt werden.

4.2 "DC Messung"

Nun wird die Messung neu gestartet, indem auf der Benutzeroberfläche des Rechners wieder der Schaltknopf "DC Messung" gedrückt wird. Alle 10 Sekunden zeigt die Anzeige den transepithelialen Widerstand R_{epi} , die transepitheliale Spannung U_{epi} und den Kurzschluss-Strom I_{sc} . Die Messdaten werden in einer automatisch erzeugten Datei gespeichert, deren Name mit U_ beginnt, gefolgt vom aktuellen Datum im Format JJMMTT, gefolgt von _xx, wobei xx für eine Zahl steht, welche die laufende Nummer des Experiments an diesem Tag angibt. Die Datei hat die Extension .dat. Die Speicherung der Messdaten läuft weiter, bis die Messung durch Drücken des Schaltknopfes "Stop" beendet wird.

Nach dem Einspannen des Epithels in die Kammer muss man mindestens 20 min warten, bis sich das Gewebe stabilisiert hat. Die Werte von R_{epi} , U_{epi} und I_{sc} sollten dann konstant sein.

Während der Messung können in den Textfenster "allgemeine Info" und "aktuelle Info" beliebige Kommentare eingegeben werden. Der Kommentar im Textfenster "allgemeine Info" wird der Datei als ganzes vorangestellt, während Kommentare im Textfenster "aktuelle Info" nach Drücken der RETURN-Taste mit der Eingabezeit gespeichert werden und später (bei der Auswertung der Datei) zusammen mit den Messwerten dieses Zeitpunktes in einer Zeile angezeigt werden.

Im Fenster " R_{CH} " erscheint der Vorgabewert für den Widerstand der leeren Kammer. Er kann beliebig geändert werden. Seine Messung wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.3 Messung der "leeren Kammer"

Der mit Gewebe gemessene Gesamtwiderstand ist die Summe aus dem Widerstand des Epithels R_{epi} und dem Widerstand der "leeren Kammer" R_{CH} , also der mit Salzlösung gefüllten Messkammer. Da unterschiedliche Salzlösungen verschiedene spezifische Leitfähigkeiten haben, muss der für die Salzlösung bestimmt werden, mit der das Gewebe im Versuch umspült wird. Hierfür wird ein Zellkulturträger ohne Epithel in die Messkammer eingespannt und mit der entsprechenden Salzlösung umspült in der Weise, wie es auch mit Epithel geschähe.

Nach Kompensation der Asymmetriespannung (siehe oben) wird der Schaltknopf " R_{CH} bestimmen" gedrückt. Der gemessene Wert erscheint im Fenster " R_{CH} " als neuer Vorgabewert für den Widerstand der leeren Kammer. Ist R_{CH} für eine bestimmte Versuchsbedingung bekannt, braucht er nicht noch einmal gemessen werden. Sein Wert kann direkt in das Fenster " R_{CH} " eingegeben werden, wobei der alte Wert überschrieben wird.

5 Elektrischer Äquivalentschaltkreis für Ussingkammer-Messungen

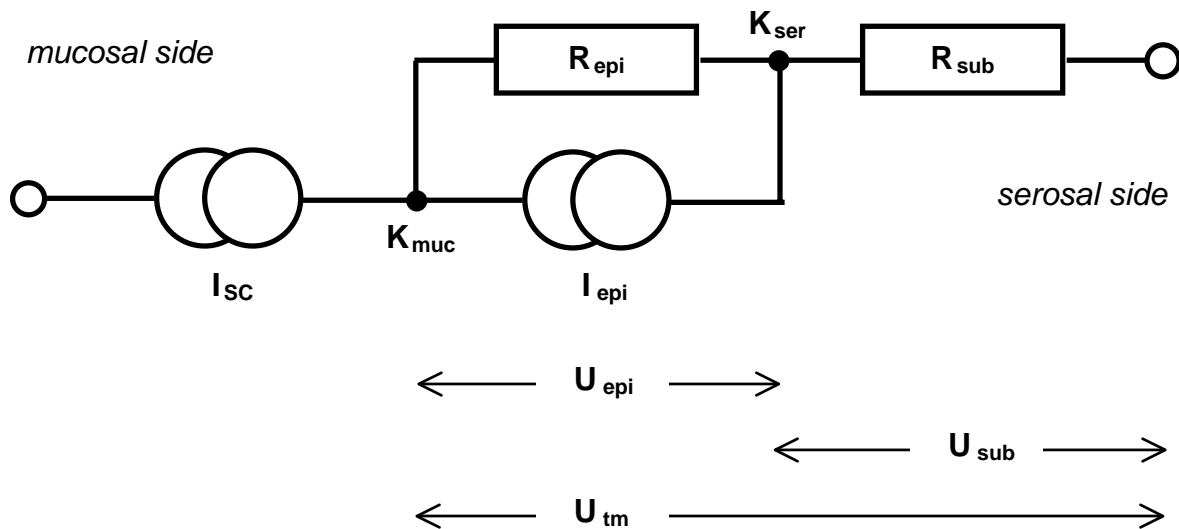


Abb.: Elektrisches Äquivalent eines Epithels mit subepitheliale Gewebe (oder Zellkulturunterlage) unter Gleichstrombedingungen. Es gibt zwei Stromquellen und zwei Widerstände. Alle Spannungen und Ströme werden im Folgenden positiv gezählt, wenn sie von links nach rechts gerichtet sind. Durch den Widerstand R_{epi} fließt der Strom $I_{\text{R-epi}}$ und durch R_{sub} fließt $I_{\text{R-sub}}$. Die transmurale Spannung U_{tm} ist gleich der Summe aus dem Spannungsabfall U_{epi} über R_{epi} (transepitheliale Spannung) und dem Spannungsabfall U_{sub} über R_{sub} .

5.1 Open-circuit-Bedingung: $I_{\text{SC}} = 0$, U_{tm} wird gemessen, U_{epi} ist gesucht

Mit am serosalen Ende offenen Stromkreis ist der Strom $I_{\text{R-sub}} = 0$

und nach dem Ohmsches Gesetz ist $U_{\text{sub}} = R_{\text{sub}} \cdot I_{\text{R-sub}} = 0$

Da $U_{\text{tm}} = U_{\text{epi}} + U_{\text{sub}}$, folgt $U_{\text{epi}} = U_{\text{tm}}$.

Der transmurale Widerstand ist $R_{\text{tm}} = R_{\text{epi}} + R_{\text{sub}}$.

5.2 Short-circuit-Bedingung: $U_{\text{tm}} = 0$, I_{SC} wird gemessen, I_{epi} ist gesucht

Für K_{muc} ergibt die Knotenregel $I_{\text{SC}} = I_{\text{R-epi}} + I_{\text{epi}}$ oder $I_{\text{R-epi}} = I_{\text{SC}} - I_{\text{epi}}$

und für K_{ser} ergibt die Knotenregel $I_{\text{R-epi}} + I_{\text{epi}} = I_{\text{R-sub}}$,

Einsetzen der vorletzten in die letzte Gleichungen ergibt $I_{\text{SC}} - I_{\text{epi}} + I_{\text{epi}} = I_{\text{R-sub}}$,
und damit ist $I_{\text{R-sub}} = I_{\text{SC}}$.

Das heißt: Strom der am mukoealen einfließt, fließt am serosalen Ende hinaus.

Einsetzen in $U_{\text{tm}} = U_{\text{epi}} + U_{\text{sub}}$ ergibt $0 = R_{\text{epi}} \cdot I_{\text{R-epi}} + R_{\text{sub}} \cdot I_{\text{R-sub}}$

und daraus wird wegen $I_{\text{R-sub}} = I_{\text{SC}}$ $I_{\text{R-epi}} = - (R_{\text{sub}} / R_{\text{epi}}) \cdot I_{\text{SC}}$

Einsetzen in $I_{\text{R-epi}} + I_{\text{epi}} = I_{\text{R-sub}}$ ergibt $- (R_{\text{sub}} / R_{\text{epi}}) \cdot I_{\text{SC}} + I_{\text{epi}} = I_{\text{SC}}$,

und nach Umformung wird das zu

$$I_{\text{epi}} = I_{\text{SC}} \cdot (R_{\text{epi}} + R_{\text{sub}}) / R_{\text{epi}}.$$

Wenn $R_{\text{sub}} \ll R_{\text{epi}}$, gilt $I_{\text{epi}} = I_{\text{SC}}$; sonst muss I_{epi} mit obiger Formel berechnet werden.

6 Herstellung der Hilfsmittel

6.1 Stromelektroden

Die Stromelektroden sind selbst hergestellte Ag/AgCl-Elektroden. Die Herstellung erfolgt durch elektrolytisches Chloridieren von Silberdrähten (Durchmesser 0,1 - 1 mm, Länge etwa 5 - 30 cm). Dabei erhält ein blanker Silberdraht (Ag) einen Überzug aus Silberchlorid (AgCl). Ein oder mehrere saubere Silberdrähte werden, nach erneuter Reinigung in Alkohol und destilliertem Wasser, in einem Becherglas mit 0,1 N reiner Salzsäure als Anode geschaltet. Als Kathode kann ein ebenfalls ein sauberer Silberdraht (beliebiger Länge) dienen.

Die Chloridierung sollte mit einem Strom von etwa 4 μA pro mm^2 Elektrodenoberfläche erfolgen und dauert dann etwa eine Stunde. Der chloridierte Teil des Drahtes zeigt danach eine dunkelgraue Farbe ohne blankes Silber. Die fertigen Elektroden werden in 0,1 N reiner Kochsalzlösung aufbewahrt, wobei die Elektrodendrähte am nicht chloridierten Ende verbunden ("kurzgeschlossen") werden.

Sollen gebrauchte Elektroden wiederverwendet werden, kann die AgCl-Schicht mit feinem (1000er) Schleifpapier entfernt werden und die Elektrode danach mit Alkohol (am Besten im Ultraschallbad) gereinigt werden. Falls man Aceton zur Entfernung von Fettrückständen verwendet, muss dies unbedingt gut ausgespült werden, da Acetonrückstände die Qualität der Elektroden verschlechtern.

6.2 KCl-Lösung

In der Umgebung von Ag/AgCl-Elektroden und zur Herstellung von Salzbrücken wird 3 mol/l KCl-Lösung benötigt. Dafür werden, bei einer molaren Masse von 74,6 g/mol, 224 g wasserfreies KCl in einen 1 L - Messkolben eingebracht und dann auf 1 L Volumen aufgefüllt (oder 56 g in einen 250 ml - Messkolben eingebracht und dann auf 250 ml Volumen aufgefüllt).

6.3 Salzbrücken

Die Verbindung zwischen der KCl-Lösung um die Elektroden und der Salzlösung der (mukosalen oder serosalen Hälfte der) Messkammer geschieht durch Salzbrücken. Wirksamer Bestandteil ist 3 mol/l KCl-Lösung. Um sie einzudicken, wird der KCl-Lösung 30 g/l Agar-Agar hinzugesetzt. Nach Auflösung des Agars in erwärmter KCl-Lösung wird die Lösung mit einer vorgewärmten Spritze in vorgewärmte Polyethylenschläuche (für Spannungselektroden: Innendurchmesser 1,0 mm und Außendurchmesser 2,0 mm; für Stromelektroden: Innendurchmesser 2,0 mm; Außendurchmesser 3,0 mm) eingefüllt. Nach dem Abkühlen erstarrt die Lösung.

Nun kann der gefüllte Schlauch mit einem scharfen Messer oder Skalpell in Stücke der gewünschten Länge geschnitten werden. Die fertigen Salzbrücken werden dann in einem gut schließenden Gefäß mit 3 M KCl-Lösung dunkel (und nach Möglichkeit kühl) aufbewahrt. Wenn Austrocknung vermieden wird, ist eine monatelange Lagerung möglich, bis Mikroorganismen (Pilze) in der Lösung wachsen und die Brücken unbrauchbar machen. Bei der Benutzung ist darauf zu achten, dass die Salzbrücken nicht stark gebogen werden.

6.4 Salzlösungen

Die Salzlösung **SL_01** zur Kurzzeit-Zellkultur von HT-29/B6-Epithelzellen in der Ussing-kammer enthält folgende Bestandteile

Stoff	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	D(+)-Glukose	D(+)-Mannose	Glutamin	β-OH-Butyrat
mmol/l	140	5,4	1,2	1,2	123,8	21	2,4	0,6	10	10	2,5	0,5

Die Lösung wird mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast und hat bei 37 °C einen pH-Wert von 7,4 und einen spezifischen Volumenwiderstand, ρ, von 53,7 Ω·cm.

Wenn eine erniedrigte Kalziumkonzentration gewünscht ist, ergeben 0,76 mmol/l CaCl₂ und 1 mmol/l Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,'N'-tetraessigsäure (EGTA) 0,25 μmol/l freies Ca²⁺.

7 Literatur

[1] Gitter AH, Schulzke JD, Sorgenfrei D, Fromm M (1997) [Ussing chamber for high-frequency trans-mural impedance analysis of epithelial tissues](#). J. Biochem. Biophys. Methods 35: 81-88.

[2] Stockmann M, Gitter AH, Sorgenfrei D, Fromm M, Schulzke JD (1999) [Low edge damage container insert that adjusts intestinal forceps biopsies into Ussing chamber systems](#). Pflügers Arch. 438: 107-112.

Internet-Links

http://www.wpiinc.com/WPI_Web/Tissue_Cell/USSING_System.html

<http://www.diss.fu-berlin.de/2000/86/>