

2 LITERATUR

Epithelgewebe sind geschlossene Zellverbände, die innere und äußere Oberflächen abschließen. Sie schützen den Organismus einerseits vor schädlichen Umwelteinflüssen und ermöglichen andererseits den Stoffaustausch mit der Umwelt. Der Transport verschiedener Stoffe wie Wasser, CO₂ und Elektrolyte wird durch unterschiedliche Mechanismen gewährleistet. Bezüglich der Passageroute werden parazelluläre und transzelluläre Wege unterschieden.

Der passive, parazelluläre Transport wird durch *tight junctions* der *Zonula occludens* über den Interzellularraum ermöglicht. Dieser auch als *shunt* bezeichnete Passageweg überwiegt in durchlässigen (*leaky*) Epithelien. Der hier geringe parazelluläre Widerstand ermöglicht die Passage von Wasser und Elektrolyten durch einfache Diffusion (POWELL, 1981). Die transepitheliale Potentialdifferenz und chemische Gradienten über dem Gewebe üben einen wesentlichen Einfluss auf die Diffusion aus.

Transzelluläre Transportvorgänge gewinnen quantitativ in Geweben an Bedeutung, die als mäßig dicht (*moderate tight*) oder dicht (*tight*) bezeichnet werden. Um Elektrolyte und andere Stoffe zu befördern, bedarf es spezieller Membranproteine, die den Transport zunächst über die äußere (apikale, mukosale, luminale) Zellmembran und anschließend über die innere (basolaterale, serosale, interstitielle) Zellmembran ermöglichen.

Das mehrschichtige und verhornte Epithel des Pansens verhindert weitgehend einen unkontrollierten passiven parazellulären Stoffaustausch und wird daher als mäßig dichtes Epithel bezeichnet.

2.1 Natriumtransport über das Pansenepithel

Erstmals beschrieben wurde der Transport von Natrium über das Pansenepithel Anfang der fünfziger Jahre mittels *in vivo* Versuchen durch SPERBER und HYDÉN (1952) und PARTHASARATHY (1952). 1959 konnte DOBSON die Ergebnisse bei Versuchen an anästhesierten, fistulierten Schafen bestätigen. Zusätzlich stellte er

fest, dass Natrium trotz entgegen gesetzter elektrischer und chemischer Gradienten vom Pansen ins Blut transportiert wird.

Tatsächlich schwankt die intraruminale Natriumkonzentration um Werte zwischen 20 - 120 mmol/l und liegt damit niedriger als der Gehalt im Plasma mit 139 - 145 mmol/l (MORRIS und GARNER, 1971). Ferner muss das positiv geladene Ion auch gegen einen elektrischen Gradienten transportiert werden, denn die Blutseite des Pansenepithels ist gegenüber dem Lumen positiv polarisiert. Diese Potentialdifferenz kann 30 - 60 mV betragen (DOBSON und PHILLIPSON, 1958; SCOTT, 1966; MARTENS und BLUME, 1987).

DOBSON (1959) kam zu dem Schluss, dass es sich bei dem Transport um einen aktiven energieverbrauchenden Prozess handeln muss, wie er zu der Zeit bereits von der Froschhaut bekannt war (LINDERHOLM, 1952).

In Experimenten mit dem Na^+/K^+ -ATPase-Hemmer Ouabain wurde durch HARRISON et al. (1975) festgestellt, dass die serosale Zugabe des Hemmers den Nettonatriumtransport aufheben konnte. Dagegen hatte die mukosale Zugabe keinerlei Effekt auf den Natriumtransport. Dies bestätigte die Annahme, dass im Pansen, wie auch bei anderen Epithelien, an der basolateralen Seite der Membran Natrium durch die Na^+/K^+ -ATPase aus der Zelle herausgepumpt wird und damit zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Gradienten beiträgt.

2.2 Natriumtransport über die apikale Membran

Der transzelluläre und somit aktive Transport über das Pansenepithel ist ein komplexer Vorgang, bei dem Natrium zunächst über die luminale Membran in die Zelle aufgenommen wird und diese über die basolaterale Membran wieder verlässt.

Alle bisherigen Untersuchungen stützen die Annahme zweier aktiver Transportmechanismen für Natrium, einen elektrogenen und einen elektroneutralen Natriumtransport.

Die funktionelle Bedeutung der parallel arbeitenden Systeme wird allgemein in der Gewährleistung einer optimalen Anpassung an schwankende Natriumkonzentrationen im Pansen gesehen. So werden bei hoher ruminaler Konzentration des Ions

nahezu 90 Prozent des Natriums über den elektroneutralen Mechanismus transportiert. Bei niedrigen Natriumkonzentrationen ist der Na^+/H^+ -Austauscher nur von geringer Bedeutung. Ionengradienten als treibende Kraft für den Austausch sind unter solchen Bedingungen gering bzw. gar nicht vorhanden. Mit Abnahme der Natriumkonzentration in der Pansenflüssigkeit, wie sie etwa in Zusammenhang mit einer hohen Kaliumaufnahme auftritt, dominiert stattdessen der Transport über den elektrogenen Mechanismus. Damit kann man auf eine sinnvolle Arbeitsteilung zwischen den beiden Transportsystemen schließen, die eine effektive Resorption bei praktisch allen physiologisch in der Vormagenflüssigkeit vorkommenden Natriumkonzentrationen ermöglicht (STROZYK, 1987; MARTENS und GÄBEL, 1988).

2.2.1 Elektroneutraler Natriumtransport (NHE)

Bei allen bisherigen *in vitro* Untersuchungen (FERREIRA et al., 1972; CHIEN und STEVENS, 1972; MARTENS und GÄBEL, 1988; MARTENS et al., 1991; STROZYK, 1987) wurde übereinstimmend ein positiver Kurzschlussstrom (I_{sc}), also ein Transport positiv geladener Ionen, über das isolierte Pansenepithel nachgewiesen.

Da der Nettonatriumtransport übereinstimmend jedoch deutlich höher als der I_{sc} ausfiel, folgerte bereits STEVENS (1964), dass es sich bei dem Natriumtransport hauptsächlich um einen elektroneutralen Mechanismus handeln muss.

In vitro Studien von FERREIRA et al. (1972) und CHIEN und STEVENS (1972) und *in vivo* Versuche von MARTENS und BLUME (1987) dokumentierten zudem einen Zusammenhang zwischen der Natrium- und Chloridresorption. Deshalb wurde vermutet, dass am Pansenepithel ein Na^+ - Cl^- -Cotransporter oder parallel zueinander ein Na^+/H^+ - und ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher existieren (CHIEN und STEVENS, 1972). Während Bumetanid und Hydrochlorothiazid, bekannte Hemmstoffe des Na^+ - Cl^- -Cotransporters, keinen Effekt auf den Natriumtransport hatten, wurde die Natriumaufnahme durch hohe Dosen Amilorid (1 mM) signifikant vermindert (MARTENS und GÄBEL, 1988; MARTENS et al., 1991; STROZYK, 1987). Da Amilorid in dieser Konzentration als spezifischer Hemmstoff des Na^+/H^+ -Austauschers wirkt (BENOS, 1982), konnte geschlussfolgert werden, dass die

apikale Natriumaufnahme überwiegend durch einen Na^+/H^+ -Austauscher erfolgt, vermutlich indirekt gekoppelt mit einem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (MARTENS und GÄBEL, 1988; MARTENS et al., 1991).

Der Na^+/H^+ -Austauscher spielt zudem eine zentrale Rolle in der intrazellulären pH-Regulation (MÜLLER et al., 2000). Da im Pansen große Mengen an kurzkettigen Fettsäuren (short chain fatty acids, SCFA) und CO_2 ¹ produziert und über das Epithel aufgenommen werden, besteht ohne Gegenregulation ständig die Gefahr einer letalen Übersäuerung des Zytosols.

Dem zunächst nur funktionellen Nachweis eines Na^+/H^+ -Austauschers durch MÜLLER (2000) folgte 2005 von SCHWEIGEL et al. der molekularbiologische Nachweis zweier Isoformen des Austauschers im Pansenepithel: dem NHE1 und NHE3.

In epithelialen Zellen ist der NHE1 primär in der basolateralen Membran zu finden während der NHE3 ausschließlich auf der apikalen Seite von Epithelien lokalisiert ist (WAKABAYASHI et al., 1997). Die Hauptfunktion des NHE3 ist, in Übereinstimmung mit seiner Lage in der luminalen Membran, die Natriumaufnahme im Zusammenhang mit dem transepithelialen Transport.

2.2.2 Natrium-Glukose-Cotransporter

Im Dünndarm stellt der Natrium-Glukose-Cotransporter (sodium-glucose cotransporter 1, SGLT-1) einen wesentlichen Mechanismus für die Natriumresorption dar. Über diesen Transporter wird Natrium elektrogen über die apikale Membran ins Zytosol transportiert.

Inzwischen konnte der SGLT-1 auch im Pansenepithel nachgewiesen werden (ASCHENBACH et al., 2000). Jedoch haben eine Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt, dass Glukose zum größten Teil durch ruminale Mikroorganismen zu SCFA umgesetzt wird und auch in dieser Form die Pansenwand passiert. Somit steht bei physiologischer Ernährung Glukose nur rudimentär als Cosubstrat für den Natriumtransport zur Verfügung. Der direkte Einfluss auf den Kurzschlussstrom über

¹ In der Pansenwand erfolgt die Hydrierung des CO_2 entsprechend des Reaktionsablaufes $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$. Diese Reaktion wird durch die Karboanhydrase katalysiert.

das Epithel ist demnach sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als sehr gering einzuschätzen (ASCHENBACH et al., 2005) und kann nicht den elektrogenen Transport über das Pansenepithel repräsentieren.

2.2.3 Elektrogener Natriumtransport

Elektrogener Natriumtransport über die apikale Membran ist ein seit Jahrzehnten bekannter Mechanismus bei vielen natriumabsorbierenden Epithelien. Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) in der apikalen Membran stellt dabei den ersten Schritt des transepithelialen Transports dar. Basolateral verlassen die Ionen die Zellen über die Na^+/K^+ -ATPase; Kalium rezirkuliert über einen ebenfalls basolateralen Kaliumkanal. Dieser auch als „klassischer“ Natriumtransport bezeichnete Mechanismus ist ohne Zweifel einer der am besten untersuchten Transportsysteme in Epithelien und wurde an einer Vielzahl von Spezies und Epithelien nachgewiesen und untersucht.

Auch am Pansenepithel wurde bei allen bisherigen *in vitro* Versuchen ein positiver Kurzschlussstrom nachgewiesen, der zwar immer geringer ausfiel als der Nettonatriumtransport, jedoch fast vollständig von der Anwesenheit von Natrium abhängig war (FERREIRA et al., 1966; CHIEN und STEVENS, 1972).

Die Hemmung des elektroneutralen Natriumtransports durch Entfernung der permeablen Anionen Chlorid, Bikarbonat und der kurzkettigen Fettsäuren in Ussingkammerversuchen führte zu einer signifikanten Verminderung des Nettonatriumtransports, während der I_{sc} unbeeinflusst blieb (STROZYK, 1987; GÄBEL, 1988; MARTENS und GÄBEL, 1988). Tatsächlich ergaben sich nun beim Vergleich der Natriumtransportrate mit dem I_{sc} annähernd äquivalente Werte (MARTENS und GÄBEL, 1988; HENSELEIT, 1991), weshalb auf die Existenz einer elektrogenen Natriumleitfähigkeit am Pansenepithel geschlossen werden konnte.

2.2.4 Unterschiede zum klassischen epithelialen Natriumtransport

Die Vermutung lag zunächst nahe, dass es sich bei dem elektrogenen Natriumtransport über das Pansenepithel ebenfalls um den klassischen Transportmechanismus handelt. Viele Studien haben jedoch inzwischen gezeigt, dass sich der elektrogene Transport von Natrium über das Epithel des Pansens in wesentlichen Punkten vom klassischen epithelialen Transport unterscheidet.

So ist eine gemeinsame Eigenschaft der ENaCs, dass ihre Leitfähigkeit durch das Diuretikum Amilorid in geringen Dosen gehemmt wird, wodurch dieses quasi als Markersubstanz für den Nachweis von epithelialen Natriumkanälen dienen kann (GARTY und PALMER, 1997). Charakteristisch ist zudem die Stimulation der Natriumabsorption durch das Mineralocorticosteroid Aldosteron, einem essentiellen Hormon im Salz- und Wasserhaushalt von Säugetieren (BASTL und HAYSLETT, 1992). Doch weder übliche Dosen des Blockers Amilorid (1 mM) (HENSELEIT, 1991; MARTENS et al., 1987; MARTENS und GÄBEL, 1988) noch Aldosteron (1 μ M) (RÜBBELKE, 1998) beeinflussten den I_{sc} über das Pansenepithel.

Es ist seit langem hinreichend bekannt, dass divalente Kationen in extrazellulären Lösungen potente Modulatoren für Kanalfunktionen in erregbaren (ARMSTRONG und MATTESON, 1986) und nicht erregbaren Zellen und Geweben sind (VAN DRIESSCHE et al., 1988; SIEMEN, 1993). In verschiedenen Epithelien konnte der I_{sc} durch die Entfernung von Calcium und Magnesium reversibel gesteigert werden (VAN DRIESSCHE et al., 1988).

Auch bei Ussingkammerversuchen mit isolierten Epithelien vom Pansen (LEONHARD, 1990) und Blättermagen (SCHULTHEIß und MARTENS, 1999) konnte durch die Entfernung der divalenten Kationen aus der mukosalen Pufferlösung der Kurzschlussstrom und die Gewebeleitfähigkeit (G_t) des Epithels signifikant erhöht werden. RÜBBELKE (1998) konnte an Pansenepithelien nachweisen, dass dieser calciumsensitive Kurzschlussstrom einem erhöhten Natriumtransport entsprach. Dabei zeigte sich in Anwesenheit von divalenten Kationen eine typische Sättigungskinetik nach Michaelis-Menten. Unter calciumfreien Bedingungen jedoch nahm der I_{sc} mit steigenden Natriumkonzentrationen ohne Sättigungsverhalten zu. Bereits in frühen Studien von AELVOET et al. (1988) bestand eine wichtige

Beobachtung darin, dass calciumsensitive Ströme bei ansteigender Natriumkonzentration keine Sättigung aufwiesen. Diese lineare Beziehung zwischen ansteigendem I_{sc} und erhöhter Natriumkonzentration (DAS und PALMER, 1989; KRATTENMACHER et al., 1990; VAN DRIESSCHE et al., 1991) steht im Gegensatz zum klassischen Natriumtransport.

Die Änderungen des I_{sc} waren bei den Versuchen von RÜBBELKE (1998) immer mit einer Veränderung der G_t verbunden, die auf eine Änderung der Leitfähigkeit der apikalen Membran schließen ließen.

Geht man jedoch von der Beobachtung aus, dass an anderen Geweben divalente Kationen auf die *tight junctions* wirken und damit die parazelluläre Leitfähigkeit erhöhen (GONZALEZ-MARISCAL et al., 1990), musste ein ähnlicher Effekt am Pansenepithel in Betracht gezogen werden. Gegen eine Wirkung auf die parazelluläre Leitfähigkeit durch den Entzug der divalenten Kationen sprach aber (1) der ansteigende I_{sc} trotz entgegen gesetzter elektrochemischer Triebkraft für Natrium (RÜBBELKE, 1998), (2) die Depolarisation der apikalen Membran (LANG und MARTENS, 1999), (3) keine signifikante Änderung des Natriumtransports von serosal nach mukosal (RÜBBELKE, 1998) und (4) zeigten Kontrollstudien mit Mannitol, welches fast vollständig parazellulär transportiert wird und somit als Parameter für parazelluläre Diffusion dienen kann, dass durch den Entzug der divalenten Kationen der Transport des Ersatzstoffes weitgehend unbeeinflusst blieb (RÜBBELKE, 1998 [Pansen]; SCHULTHEIß und MARTENS, 1999 [Blättermagen]).

Zusätzlich konnte in jüngeren Untersuchungen mittels der Patch-Clamp-Technik an **isolierten** Pansenepithelzellen eine Steigerung der elektrogenen Natriumleitfähigkeit durch Entfernung von Magnesium und/oder Calcium aus der extrazellulären Lösung nachgewiesen werden. Derselbe Effekt trat auch nach intrazellulärem Entzug von Magnesium ein (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

2.2.5 Nicht selektiver Kationenkanal

Bereits in verschiedenen Epithelien sind Kationenkanäle gefunden worden, die durch Calcium in mikromolarer Konzentration gehemmt werden können (VAN DRIESSCHE et al., 1988). Gemeinsam ist ihnen die Durchlässigkeit für verschiedene Kationen. Die calciumabhängige Leitfähigkeit am Pansenepithel ist ebenfalls unspezifisch. Ein völliger Austausch von Natrium durch Rubidium, Kalium, Cäsium oder Lithium in der mukosalen Pufferlösung bei Ussingkammerversuchen induzierte in allen Fällen einen calciumsensitiven I_{sc} (RÜBBELKE, 1998). Auch bei Patch-Clamp-Messungen an isolierten Pansenepithelzellen sind bereits divalentabhängige Leitfähigkeiten von Kalium, Cäsium und Natrium gemessen worden (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

Bei einer Reihe von Studien an verschiedenen Epithelien konnten elektrogene Kationenkanäle nachgewiesen werden, die der (funktionellen) Familie der so genannten „nicht selektiven Kationenkanäle“ (*non selective cation channel*, NSCC) zugeordnet werden konnten (HAMILTON und BENOS, 1990; KRATTENMACHER et al., 1990; VAN DRIESSCHE et al., 1991). Diese Kanäle erhielten ihren Namen durch die gemeinsame Eigenschaft, verschiedene monovalente und divalente Kationen zu leiten, wobei sich die relativen Permeabilitäten für die einzelnen Ionen voneinander unterscheiden können.

Die gemeinsamen Kennzeichen der NSCC sind (1) die Fähigkeit, mehrere monovalente Kationen zu leiten, (2) vom klassischen Natriumkanal abweichende Kinetik, (3) Amiloridinsensitivität, (4) Inhibierung durch Calcium oder andere divalente Kationen in mikromolarer Konzentration und (5) Sensitivität gegenüber Blockern anderer Kanäle, wie zum Beispiel Barium, einem allgemein bekannten Kaliumkanalblocker. In diesem Zusammenhang konnte durch Patch-Clamp-Messungen an unserem Institut eine Hemmung der Natriumleitfähigkeit durch 5 mM Barium nachgewiesen werden (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

Allerdings erlischt die Natriumpermeabilität von NSCC in Patch-Clamp-Experimenten an Pansenepithelzellen in Anwesenheit von physiologischen Konzentrationen von divalenten Kationen (ABDOUN et al., 2005). Somit müssen *in vivo* andere, unbekannte aktivierende Faktoren eine Rolle bei der Stimulation der Natriumpermeabilität spielen.

2.3 Wirkungsmechanismen von Kalium

2.3.1 Wirkung von Kalium auf die Potentialdifferenz

Nachdem erste *in vivo* Beobachtungen von DOBSON (1959) und SELLERS und DOBSON (1960) auf eine Beziehung zwischen der Potentialdifferenz und der mukosalen Kaliumkonzentration schließen ließen, konnten FERREIRA et al. (1966) zeigen, dass zwischen der transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t) und dem dekadischen Logarithmus der Kaliumkonzentration im Pansen eine lineare Korrelation besteht. Inzwischen wurde diese Beziehung durch neuere Untersuchungen bestätigt (BLUME, 1981) und auch für die apikale Potentialdifferenz (PD_a) nachgewiesen (LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996).

Eine solche Abhängigkeit der Membranspannung von der ruminalen Kaliumkonzentration lässt sich mit der Existenz von apikalen Kaliumleitfähigkeiten in der Membran erklären. In der Tat führten bereits FERREIRA et al. (1966) die Wirkung einer Erhöhung von luminalem Kalium auf die Potentialdifferenz auf beträchtliche Permeabilitäten des Ions über das Epithel zurück. Nachfolgende Ussingkammerversuche bestätigten die Kaliumleitfähigkeit über die apikale Membran (FERREIRA et al., 1972; LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996; BÖDEKER und KEMKOWSKI, 1996).

Wenn, wie auch an anderen Epithelien nachgewiesen, Kalium basolateral über Na^+/K^+ -ATPasen in die Zelle aufgenommen wird und entlang des Konzentrationsgefälles durch Kaliumkanäle apikal und basolateral aus den Zellen herausdiffundiert, kann es so zur Entstehung des Membranpotentials beitragen. Konkret bedeutet somit eine Erhöhung der luminalen Kaliumkonzentration eine geringere apikale Diffusion des positiven Ions aus der Zelle heraus und damit eine Depolarisation der apikalen Membran.

An zahlreichen Epithelien, wie z.B. am Gallenblasenepithel von Necturus (REUSS und FINN, 1975) und am Darmepithel der Flunder (HALM et al., 1985), wurde eine vergleichbare Depolarisation der apikalen Membran bereits beschrieben. Die beobachteten Kaliumleitfähigkeiten ließen sich durch die Zugabe von Barium kompetitiv blockieren (HALM et al., 1985).

Demgegenüber ist am Pansenepithel die apikale Kaliumsekretion in Natriumchlorid-Lösung trotz aktiver Na^+/K^+ -ATPase verschwindend gering (LEONHARD-MAREK,

1990) und das negative zytosolische Potential wird überwiegend durch den basolateralen Kaliumefflux aufgebaut. Dass es bei einer Erhöhung der apikalen Kaliumkonzentration dennoch zu einer Depolarisation kommt (LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996), kann dadurch erklärt werden, dass bereits eine geringe Permeabilität in Abwesenheit anderer Leitfähigkeiten erhebliche Potentiale aufbauen kann. Zum anderen ist jedoch eine typische Eigenschaft von Kaliumkanälen, dass ihre Leitfähigkeit mit Erhöhung der Kaliumkonzentration zunimmt (HILLE, 2001).

Dass dies auch bei den Kaliumleitfähigkeiten des Pansenepithels der Fall ist, konnte mittlerweile nachgewiesen werden (ABDOUN et al., 2005). Nach Erhöhung der luminalen Kaliumkonzentration steigt somit die Kaliumpermeabilität der apikalen Membran an. Das Zellpotential wird jetzt nicht mehr ausschließlich durch die basolateralen Verhältnisse bestimmt (gegenüber der serosalen Natriumchlorid-Lösung), und der basolaterale Kaliumefflux wird teilweise durch apikalen Influx von Kalium (aus der luminalen kaliumchloridhaltigen Lösung) kompensiert. So kommt es zur Depolarisation der apikalen Membran und des transzellulären Potentials.

2.3.2 Wirkung von Kalium auf den Magnesiumtransport

Die ersten Vermutungen zum Mechanismus der Kaliumwirkung am Pansenepithel stellte DOBSON (1959) an. Er beobachtete, dass die Potentialdifferenz zwischen Pansenlumen und Blut bei höherer ruminaler Kaliumkonzentration anstieg und brachte dies in Zusammenhang mit dem hohen Kalium/Natrium-Verhältnis im Gras von so genannten Tetanieweiden (erhöhtes Aufkommen von Hypomagnesiämien unter den Tieren). Das erhöhte Potential unter diesen Fütterungsbedingungen könnte nach DOBSON (1959) einen Mechanismus darstellen, der die Resorption divalenter Kationen an den Kaliumgehalt der Diät bindet.

Dieser Zusammenhang konnte von MARTENS und HARMEYER (1978), CARE et al. (1984) und MARTENS und BLUME (1986) am Pansen von Schafen bestätigt werden. Die Arbeitsgruppen beobachteten eine verminderte Magnesiumresorption in Abhängigkeit von steigender ruminaler Kaliumkonzentration und steigender PD_t . Eine Steigerung der PD_t bei den *in vitro* Versuchen an isolierten Epithelien von MARTENS et al. (1987) führte zu einer signifikanten Abnahme vom Nettomagnesiumtransport

und zwar unabhängig davon, ob das Potential durch Erhöhung der mukosalen Kaliumkonzentration oder einen externen Strom erzeugt wurde. Auf diese Weise konnte der Kaliumeffekt eindeutig als ein elektrophysiologischer Effekt identifiziert werden.

Die Ergebnisse der Experimente von SCHWEIGEL et al. (1999) mittels Mikroelektrode und Fluoreszenzmessung entsprachen der Erkenntnis eines Antagonismus zwischen hoher ruminaler Kaliumkonzentration, elektrophysiologischer Effekte auf des Pansenepithel und der Wirkung auf den Magnesiumtransport. Zudem zeigten sie, dass die apikale Potentialdifferenz die größte treibende Kraft für die Magnesiumaufnahme in die Pansenepithelzelle darstellt. Chemische Gradienten spielten hingegen nur eine untergeordnete Rolle.

Eine hohe Kaliumaufnahme in den Pansen bewirkt somit eine Depolarisation der apikalen Membran, reduzierte Magnesiumaufnahme in die Zelle und – wie SCHWEIGEL et al. (1999) zeigen konnten – reduzierte zytosolische Magnesiumkonzentrationen mit Abnahme des transzellulären Transports (LEONHARD-MAREK und MARTENS, 1996; MARTENS et al., 1987).

Für die apikale Aufnahme von Magnesium werden schließlich unterschiedliche Mechanismen diskutiert und der Vollständigkeit halber hier erwähnt. Neben dem elektrogeneren spannungsabhängigen Transport über einen Kanal oder Carrier (SCHWEIGEL et al., 2000) gibt es Anhaltspunkte für die Existenz von spannungsunabhängigen Aufnahmemechanismen. Diskutiert werden ein Mg^{2+}/H^{+} -Austauscher und/oder ein Mg^{2+} -Anionen-Cotransporter (LEONHARD-MAREK, 1999; LEONHARD-MAREK et al., 1998; SCHWEIGEL und MARTENS, 2003).

2.3.3 Wirkung von Kalium auf den Natriumtransport

Seit den *in vivo* Versuchen von DOBSON (1959) an anästhesierten Schafen ist bekannt, dass bei steigender Kaliumkonzentration im Pansen die Natriumkonzentration sinkt. 1967 führte SCOTT Experimente an Schafen mit permanenten Pansenkanülen durch. Mit Hilfe der Kanülen variierte er die tägliche Kaliumaufnahme

und maß die Natrium- und Kaliumkonzentrationen in dem Vormagen. Seine Ergebnisse entsprachen denen von DOBSON (1959). Zusätzlich machte er jedoch die Entdeckung, dass die Summe der Konzentrationen beider Kationen mit etwa 140 mmol/l weitgehend konstant blieb.

SELLERS und DOBSON (1960) führten Fütterungsversuche mit Schafen durch und verglichen die Ionenkonzentrationen in der Pansenflüssigkeit. Dabei stießen die Autoren ebenfalls auf Korrelationen zwischen den Kationenkonzentrationen. Die mit Heu gefütterten Schafe wiesen dabei Natriumkonzentrationen von 100 mmol/l und Kaliumkonzentrationen von 30 mmol/l auf. Die Verhältnisse kehrten sich annähernd um, nachdem das Futter auf junges Gras umgestellt wurde, welches allgemein mehr Kalium enthält. Zurückzuführen ist die sinkende Natriumkonzentration dabei auf eine erhöhte Resorption über das Pansenepithel, wie WARNER und STACY (1972) zeigen konnten.

Diese Erkenntnisse erschienen zunächst als Widerspruch. Wenn erhöhtes ruminales Kalium die PD_a erniedrigt, folgen daraus zunächst einmal ein geringerer elektrischer Gradient und damit eine verminderte Triebkraft für die Natriumaufnahme in die Zelle. LANG (1997) hat jedoch nachweisen können, dass bei einer Depolarisation der PD_a die Gewebeleitfähigkeit (G_t) über der apikalen Membran erhöht ist. Eine Erleichterung des Natriumeinstroms durch eine Erhöhung der G_t bietet eine Erklärung für die *in vivo* beobachtete vermehrte Natriumresorption bei hohen Kaliumkonzentrationen in der Pansenflüssigkeit trotz verringerter Triebkraft für die luminale Aufnahme.

Diese Erkenntnisse passten jedoch schlecht zu bisher vorhandenen Daten über nicht selektive Kationenkanäle, die nach bisherigen Erkenntnissen keinen Spannungssensor besitzen.

2.3.4 Wechselwirkungen von Kalium, Magnesium und Natrium

Festzuhalten bleibt zunächst, dass durch eine kaliumreiche Fütterung der Wiederkäuer - wie sie oft bei der Umstellung auf Futter von hoch kaliumgedüngten Weiden vorkommt - die Absorption von Natrium gesteigert wird und so die Summe der Konzentrationen von Natrium und Kalium im Pansen und der osmotische Druck

relativ konstant gehalten wird. Auf diese Weise kann auf der einen Seite ein möglicher Wasserverlust in den Vormagen und auf der anderen Seite die Gefahr einer drohenden Hyperkaliämie durch vermehrte Kaliumabsorption aus dem Pansen vermieden werden. Neben diesem physiologisch sinnvollen Mechanismus bleibt das gleichzeitige Absinken der elektrogenen Magnesiumaufnahme problematisch, welches bei länger andauernder Kaliumaufnahme zu einer Hypomagnesiämie führen kann.

Eine Hypothese, die diese Phänomene in einen – auch physiologisch – sinnvollen Zusammenhang bringt, konnte kürzlich mit Hilfe von Patch-Clamp-Experimenten entwickelt werden. So wurde gezeigt, dass die elektrogene Natriumleitfähigkeit durch intrazelluläres Magnesium reguliert wird (LEONHARD-MAREK et al., 2005).

Daraus ergibt sich folgendes Modell: Die hohe ruminale Kaliumkonzentration depolarisiert zunächst die apikale Membran, dadurch sinkt die elektrochemische Triebkraft für die Magnesiumaufnahme über einen elektrogenen Mechanismus und die zytosolische Magnesiumkonzentration sinkt ab. Dies wiederum führt zur Öffnung eines divalentsensitiven Kanals in der apikalen Membran und zu einem Anstieg der Natriumresorption über das Pansenepithel. Dieses Modell macht die bekannte Zunahme der Natriumresorption am Pansenepithel bei hoher Kaliumaufnahme der Wiederkäuer verständlich und bietet auch eine Erklärung der bereits von LANG und MARTENS (1997) beobachteten Erhöhung der Gewebeleitfähigkeit nach Depolarisation der apikalen Membran. Somit kommt es physiologischerweise nach einer Erhöhung der Osmolarität der Pansenflüssigkeit durch Kalium zu einer adäquaten Osmoregulation, die nach einer Erhöhung der Osmolarität durch nicht-ionale Substanzen ausbleibt (GÄBEL et al., 1987; SCHWEIGEL et al., 2005).

Eine solche Blockade eines Kanals durch intrazelluläres Magnesium ist bereits von dem einwärtsrektifizierenden Kaliumkanal bekannt (HILLE, 2001) und ermöglicht an der intakten Zelle eine Potentialabhängigkeit ohne klassischen Sensor wie an spannungsabhängigen Kanälen.

2.4 Wirkung von cAMP auf den Natriumtransport und den I_{sc} am Pansenepithel

Bei einer Reihe von Spezies ist der Einfluss von cAMP auf den transepithelialen Ionentransport über gastrointestinale Epithelien nachgewiesen worden (VAN DRIESSCHE, 1988). cAMP fungiert dabei als so genannter *second messenger* - einem intrazellulären Signalprotein, durch welches extrazelluläre Hormonsignale in zelluläre Antworten übersetzt werden. Die Wirkung der Hormone wird dabei über die Bindung an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran und anschließende Aktivierung des Adenylatcyclase-Systems vermittelt.

Am Pansenepithel gaben *in vitro* Versuche von WOLFFRAM et al. (1989) erste Hinweise auf eine cAMP-vermittelte Hemmung des Natriumtransports. So führte die serosale Zugabe von Theophyllin, einem Phosphodiesterasehemmer, bei Anwesenheit von SCFA zu einer deutlichen Abnahme des Nettonatriumtransports.

Weiterführende Untersuchungen am isolierten Pansenepithel von GÄBEL et al. (1999) zeigten, dass die Theophyllin-induzierte Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die durch SCFA induzierte Stimulation des elektroneutralen Natriumtransports aufhebt.

Bemerkenswerterweise wiesen sowohl GÄBEL et al. (1999) als auch WOLFFRAM et al. (1989) in diesen Versuchen zusätzlich einen Effekt auf den I_{sc} nach, der jedoch übereinstimmend deutlich geringer ausfiel als der Effekt auf den Nettonatriumtransport.

Aufgrund der Diskrepanz zwischen dem Abfall des Nettonatriumtransports und des I_{sc} und der hemmenden Wirkung auf den durch SCFA stimulierten Natriumtransport schlussfolgerten sie, dass cAMP die Natriumtransportraten senkt, indem es hauptsächlich den elektroneutralen Na^+/H^+ -Austauscher hemmt. Der Abfall des I_{sc} wäre nach den Autoren durch eine vergleichbar geringere Hemmwirkung des Nukleotids auf den elektrogenen Natriumtransport erklärbar, jedoch konnte auch eine Wirkung auf die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase nicht ausgeschlossen werden.

GÄBEL et al. (1999) wiesen zusätzlich nach, dass *in vivo* endogene Prostaglandine zu einer Regulation des Natriumtransports führen könnten. Der Einsatz des Cyclooxygenasehemmers Indomethacin, der die Prostaglandinsynthese und somit auch die Bereitstellung von cAMP reduziert, erhöhte dabei die Natriumtransportrate, wohingegen exogenes Prostaglandin E₂ (PGE₂) den Natriumtransport hemmte. BÖTTCHER (2000) gelang nachfolgend mit Hilfe eines Enzymimmunoassays der Nachweis, dass exogenes PGE₂ den zytosolischen cAMP-Spiegel erhöht. Diese Ergebnisse lassen auf die Anwesenheit und Aktivierung der durch PGE₂ stimulierbaren Rezeptoren EP2 oder EP4 in der Membran von Pansenepithelzellen schließen (AUDOLY et al., 1999; NARUMIYA et al., 1999).

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie (LEONHARD-MAREK et al., 2005) wurde mittels Ussingkammerexperimenten gezeigt, dass die Erhöhung von intrazellulärem cAMP den Kurzschlussstrom *erhöht*, wenn zuvor Calcium aus der mukosalen Lösung entfernt wurde. Dieser Anstieg des I_{sc} wurde durch Absenkung der serosalen Natriumkonzentration reduziert und war abhängig von der Anwesenheit von mukosalem Magnesium. Das ließ auf einen Effekt von cAMP auf einen basolateralen Na⁺/Mg²⁺-Austauscher schließen. Durch die Stimulation des Austauschers sinkt demnach die zytosolische Magnesiumkonzentration (SCHWEIGEL, 1999) und führt so zu einer indirekten Stimulation des divalentsensitiven Stroms durch den NSCC.

Ungeklärt ist bislang, ob cAMP auch einen direkten Effekt auf den NSCC ausübt. So spricht auch die Tatsache, dass die cAMP-erhöhenden Pharmaka in der mukosalen Pufferlösung einen größeren Effekt hatten als in der serosalen Lösung (LEONHARD-MAREK et al., 2005), unter Umständen für eine direkte Wirkung des zyklischen Nukleotids auf elektrogene Leitfähigkeiten in der apikalen Membran. Somit scheint es denkbar, dass die Natriumleitfähigkeit des NSCC am Pansenepithel durch cAMP auch unabhängig von Veränderungen in der Konzentration von divalenten Kationen moduliert wird.

2.4.1 Wirkung von cAMP auf den elektrogenen Transport weiterer Ionen über das Pansenepithel

Da der I_{sc} als Differenz aller Kationen- und Anionenströme nicht automatisch mit dem elektrogenen Natriumtransport über das Epithel gleichzusetzen ist, kann man Effekte von cAMP auf den elektrogenen Transport anderer Ionen nicht grundsätzlich ausschließen. Bei der Analyse eines cAMP-Effekts muss deshalb die Wirkung auf Transportmechanismen verschiedener Ionen immer in Betracht gezogen werden.

So stellt der Aufbau eines transepithelialen Potentials durch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase und der elektrogene Natriumtransport die entscheidende Triebkraft dar für die Resorption von Anionen. Hierunter fällt insbesondere **Chlorid**, das wie Natrium auch entgegen einem Konzentrationsgradienten aus dem Pansen resorbiert werden kann (PARTHASARATHY und PHILLIPSON, 1953). Dabei erfolgt die apikale Resorption von Chlorid elektroneutral über einen Austausch mit HCO_3^- (MARTENS und GÄBEL, 1988). Ussingkammerdaten sprechen für einen basolateralen, wahrscheinlich elektrogenen Efflux (MARTENS und GÄBEL, 1984; DIERNÆS et al., 1994).

Die Ussingkammerversuche von WOLFFRAM et al. (1989) zeigten jedoch keinen Einfluss von Theophyllin auf den Chloridtransport. GÄBEL et al. (1999) konnten durch den Einsatz von Indomethacin, einem Prostaglandinsynthesehemmer ebenfalls keine veränderten Chloridtransportraten nachweisen. Theophyllin (in Kombination mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase) hemmte den Chloridtransport zwar zwei Stunden nach Zugabe der Pharmaka signifikant, der Effekt der Pharmaka auf den I_{sc} war jedoch bereits nach einer Stunde hoch signifikant.

Wegen des mikrobiellen Abbaus von Kohlenhydraten im Pansen werden dort große Mengen an **SCFA** produziert. Eine effektive Resorption der kurzkettigen Fettsäuren ist unerlässlich, um ein Absinken des pH-Wertes und einen Anstieg des osmotischen Drucks zu vermeiden. Die SCFA passieren die Zelle passiv auf transzellulärem Weg, wobei der hohe chemische Gradient zwischen Pansenlumen und Blut als wesentliche Triebkraft angesehen werden muss (SEHESTED et al., 1999). Apikal können die SCFA zum einen als Anion in dissoziierter Form über einen Anionenaustauscher, der unter anderem kurzkettige Fettsäuren gegen Hydrogenkarbonat austauscht, in die Zelle aufgenommen werden (ASH und DOBSON, 1963; SEHESTED et al., 1999;

GÄBEL et al., 2002; SCHWEIGEL und MARTENS, 2003). Zum anderen können SCFA nach Absinken des ruminalen pH-Wertes in undissoziierter Form über Diffusion in die Zelle aufgenommen werden (AAFJES, 1967; SEHESTED et al., 1999; GÄBEL et al., 2002). Die ionisierten SCFA dissoziieren sofort wieder im Zytosol und das abgegebene H^+ -Ion wird über den Na^+/H^+ -Austauscher recycelt (PETERSEN et al., 1981; GÄBEL et al., 1991).

Im Hinblick auf die basolaterale Abgabe der SCFA liegen bisher keine schlüssigen Versuchsergebnisse vor.

Ein Einfluss von SCFA auf den I_{sc} bei Versuchen mit Pansenepithel von Schafen konnte bislang nicht bestätigt werden. GÄBEL et al. (1999) untersuchten den Effekt von Theophyllin auf den Transport von Fettsäuren stellvertretend an den Fluxraten von Propionat bei unterschiedlichen pH-Werten. In keinem Fall konnte Theophyllin (+ Forskolin) einen Effekt hervorrufen.

Die Ergebnisse von DIERNÆS et al. (1994) an bovinem Pansenepithel erbrachten demgegenüber einen Abfall des I_{sc} durch das Hinzufügen von SCFA zur Pufferlösung.

Insgesamt ist der Einfluss von SCFA auf den I_{sc} aus den bisherigen Versuchen nicht eindeutig zu klären.

FOSTER et al. (1983) konnten bei Ussingkammerexperimenten an Darmepithelien von Ratten eine stimulierende Wirkung von cAMP auf die **Kalium**sekretion durch Kaliumkanäle nachweisen. In den Experimenten von WOLFFRAM et al. (1989) zeigte sich jedoch kein Effekt von Theophyllin auf den Kaliumtransport.

Neuere Untersuchungen von SCHWEIGEL und MARTENS (2003) lassen auf die Existenz einer vakuolären H^+ -ATPase (vH^+ -ATPase) in der apikalen Membran von Pansenepithelzellen schließen, die positive Ladungen in Form von **Protonen** vom Zytosol ins Lumen transportiert.

Untersuchungen zu einem Einfluss von Theophyllin auf die vH^+ -ATPase liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht vor. Denkbar wäre aber ein Anstieg der Aktivität nach vorhergehender Ansäuerung des Zytosols, wie es zum Beispiel nach einer Hemmung des apikalen Na^+/H^+ -Austauschers durch cAMP der Fall wäre. Diese wäre dann mit einem Absinken des I_{sc} verbunden.

2.5 Zusammenfassung für die eigene Fragestellung

Obwohl die aktive, transzelluläre Resorption von Natrium eine der bedeutendsten transportphysiologischen Aufgaben des Pansenepithels darstellt, sind die Kenntnisse über die Regulationsmechanismen nach wie vor lückenhaft.

Aus den bisher veröffentlichten Arbeiten über den Natriumtransport am Pansenepithel geht hervor, dass die Natriumresorption zwei aktiven Transportmechanismen unterliegt. Dabei wird der größte Teil elektroneutral über einen Na^+/H^+ -Austauscher aufgenommen. Ein wesentlich geringerer Teil gelangt über einen elektrogenen Aufnahmemechanismus in die Zelle, bei dem es sich nach Ausschluss üblicher an Epithelien vorkommende Natriumkanäle vermutlich um einen nicht selektiven Kationenkanal handelt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen elektrogenen Natriumtransport mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik näher zu charakterisieren, Regulationsmechanismen zu untersuchen und Möglichkeiten für seine physiologische Funktion aufzuzeigen.

So wirft die Blockade der Natriumleitfähigkeit im Patch-Clamp-Experiment durch sehr niedrige Calciumkonzentrationen (μM) die Frage auf, ob es *in vivo* Faktoren gibt, die eine solche Blockade modulieren. Die Konzentrationen von Calcium und Magnesium in der Vormagenflüssigkeit von Schafen liegen in millimolaren Bereichen (HALL et al., 1988), bei denen NSCC im Allgemeinen blockiert sind.

Es war ungewiss, ob diese Leitfähigkeit durch physiologischerweise vorhandene *second messenger* auch in Anwesenheit von divalenten Kationen moduliert werden kann. Eine direkte Modulation von Kanalproteinen ist bereits an zahlreichen Präparaten beschrieben worden.

Die nachgewiesene endogene Prostaglandinsynthese im Pansenepithel (GÄBEL et al., 1999) mit Erhöhung von zytosolischem cAMP legten es nahe, den Einfluss dieses *second messengers* auf die elektrogene Natriumleitfähigkeit von isolierten Pansenepithelzellen in Anwesenheit von physiologischen Konzentrationen divalenter Kationen zu untersuchen.